

Bio-Rex 젤을 이용한 난백으로 부터의 Lysozyme의 분리

김형원, 박인규, 송재양, 김인호
충남대학교 공과대학 화학공학과
전화(042)821-7675, FAX(042)822-8995

Abstract

Lysozyme is an enzyme which has the ability to lyse bacteria such as *Micrococcus lysodeikticus* or gram positive and gram negative bacteria by hydrolyzing in the peptidoglycan layer of the bacterial cell wall. Lysozyme is abundantly contained in an egg white. In order to obtain lysozyme from egg white, we used Bio-rax ion exchange chromatography and can identify the exist of lysozyme by SDS-PAGE and protein assay.

서론

Lysozyme은 용균효소로서 *Micrococcus lysodeikticus*같은 세균이나 다른 그람 양성세균과 음성세균을 용균시키는 특성을 갖는 효소로 처음 보고되었다¹⁾. 이런 효과를 이용하여 lysozyme을 식품의 보존료와 의약품원료 및 유아식의 영양강화 부분에 사용하고 있다. lysozyme은 특히 난백 중에 함량이 약 0.3%로 가장 높다. 난백은 다른 lysozyme 함유물질에 비하여 생산량이 풍부하며, 추출조작이 비교적 용이하기 때문에 lysozyme 추출원료로 가장 적합한 것으로 알려져 있다. 수율 및 순도가 높고 추출 후 난백의 재활용이 가능한 이온교환 크로마토그래피법이 산업적으로 이용되고 있다²⁾. 본 연구는 고분자 재질인 Bio-rax 젤을 이용한 lysozyme의 크로마토그래피 분리에 관한 보고이다.

재료 및 방법

1. 난백의 준비

달걀을 난백과 난황으로 분리한 후 난백을 증류수로 10배 희석하였다. 이 희석용액을 4시간 교반한 후에 원심분리기를 이용하여 8,000 rpm에서 30분간 분리하여 시료로 사용하였다.

2. 등온흡착선

젤의 흡착용량을 알기 위하여 난백의 주입양에 따른 등온흡착선을 구하였다. 부피가 3ml인 Bio-rax 70 젤에 난백의 양을 3g, 7g, 10g, 13g, 15g, 20g, 25g으로 변화를 주었고 여기에 0.02M 인산 완충 용액(pH 7.0)을 넣어 총 부피가 28ml이 되게

하였다. 2시간동안 방치하면서 간헐적으로 흔들어 주는 후 다시 0.02M 인산 완충 용액(pH 7.0)을 넣어 젤을 washing한 다음 1M NaCl 20ml을 넣고 30분간 탈착시켜 상등액을 얻었다. 이 용액을 Lowry method로 정량하여 포화점을 찾아보았다.

3. 크로마토그래피

본 실험에 사용한 이온교환 컬럼은 25mm ID × 330mm L 유리컬럼 (Spectra/chrom co.)을 사용하였고 양이온교환 수지로는 Bio-Rex[®] 70 Resin(Bio-Rad Laboratories)을 사용하였다. 완충용액은 pH 7인 0.02M 인산 용액을 사용하여 겔을 평형화시켰다. 용리 용액은 NaCl을 사용하였는데, 0M에서 1M까지 한시간 동안 gradient를 걸어 용리하였다. Fig. 1과 같은 순서로 실험을 하였으며 각 단계에의 실험조건은 Table 1과 같다.

4. 정량 및 정성 분석방법

시료의 단백질 함량은 Lowry method로 측정하였다. 750nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 그리고 Lysozyme의 확인은 15% Acrylamide SDS-PAGE를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. Bio-rex 젤의 등온흡착선

탈착액을 취하여 Lowry method로 단백질을 정량해 본 결과는 Fig. 2과 같다. 젤 3ml 당 난백 20g 일 때 포화가 되어 더 이상의 난백을 흡착할 수 없었다. 따라서 이 비율에 맞춰 시료를 주입하였다.

2. Lysozyme의 분리 및 정량

Bio-rex 젤을 이용하여 난백에서 lysozyme를 분리해 낸 크로마토그램은 아래의 Fig.3과 같다. 선명한 두 개의 피크가 나타났는데 이것은 수지에 강하게 결합된 단백질과 약하게 결합된 단백질이 시간차를 두고 다른 농도의 NaCl에서 용출됨을 말해준다. 크로마토그램의 흡광도 값과 Lowry method(Fig.4)에 의한 단백질의 양은 비슷한 경향을 보였는데 이는 분취하여 얻은 시료의 대부분이 단백질임을 말해준다. 시료가 포함하고 있는 단백질이 lysozyme 인가 알아보기 위하여 SDS-PAGE를 해본 결과(Fig.5) 앞 피크에는 잡 단백질이 뒤 피크에 다량의 lysozyme이 함유되어 있다는 것을 알 수 있었다. 뒤 피크 중에서도 뒷 부분, 즉 시료 22번부터는 순수한 lysozyme이 존재하기 때문에 용출시키고난 뒤 약 44분부터 분취를 받는다면 순수한 lysozyme을 얻을 수 있다.

요약

용균작용을 하는 lysozyme을 난백으로부터 분리하기 위해 이온교환크로마토그래피를 사용하였다. 용출시에 gradient를 걸어준 결과 젤과 약하게 결합된 단백질과 강하게 결합된 단백질이 분리되어 나옴을 SDS-PAGE와 Lowry method를 통하여 알 수 있었다.

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.

Table 1. Condition of ion exchange chromatography.

Resin bed volume	17.7ml
Flow rate and time	
equilibration	4.5ml/min for 20min
sample loading(egg white)	1.5ml/min for 30min
washing	4.5ml/min for 15min
elution	1.5ml/min for 60min
Equilibrium and washing buffer	0.02M phosphate buffer (pH 7.0)
Elution solution	from 0M NaCl to 1M NaCl in 0.02M phosphate buffer (pH 7.0)

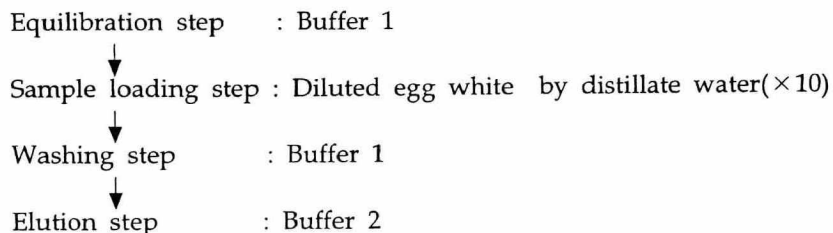


Fig. 1. Flow chart of ion exchange chromatography for purification of lysozyme from egg white; buffer 1 : 0.02M phosphate buffer (pH 7.0), solution 1 : from 0M NaCl to 1M NaCl in 0.02M phosphate buffer (pH 7.0).

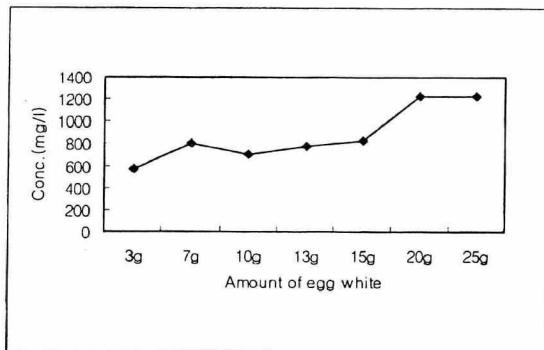


Fig. 2. Capacity of Bio-rex gel.

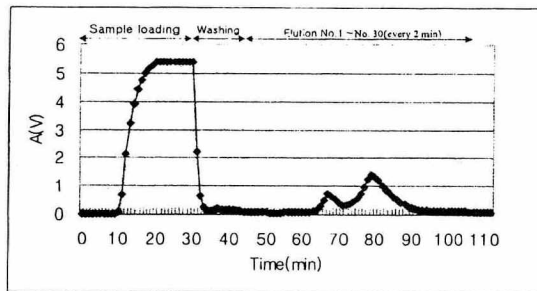


Fig. 3. Ion exchange chromatography of egg white.

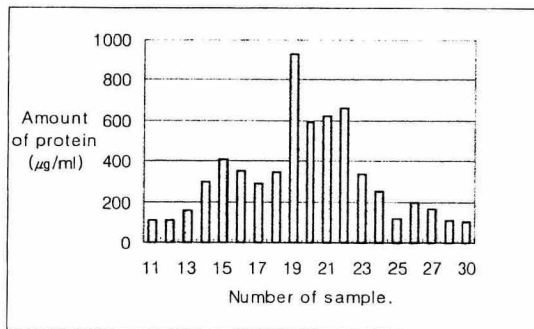


Fig. 4. Amount of protein by Lowry method.

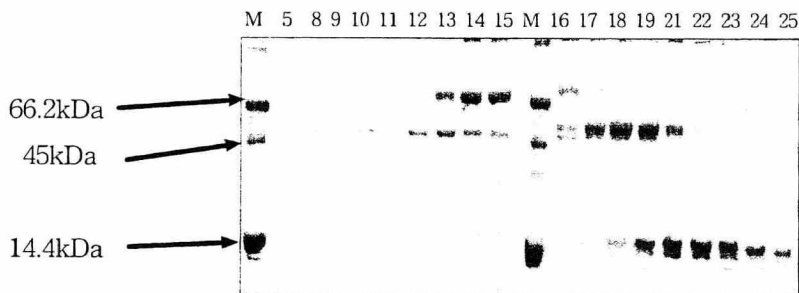


Fig. 5. 15% SDS-PAGE of collected samples.