

親和性 크로마토그래피에 의한 酵素 精製

변 시 명·백 옥 련
(韓國科學院 生物工學科)

Enzyme Purification Using Affinity Chromatographic Technique.

Si Myung Byun and Ok Ryun Baik

Department of Biological Science and Technology
Korea Advanced Institute of Science

I. 緒 論

親和性 크로마토그래피(affinity chromatography)는 生物學的 特異性 吸着 크로마토그래피(biospecific adsorption chromatography)로서 特定物質에 生物學的으로 特異하게 親和성을 가진 "ligand"를 不溶性 高分子物質(matrix 또는 support라 칭함)에 結合시킨 後 크로마토그래피를 行하면 目的한 特定物質만을 純粹精製할 수 있는 分離方法이다. 여기서 리간드는 分子量이 작은 化合物로서 高分子 物質과 共有結合에 依하여 結合된 物質로서 精製하고자 하는 物質(酵素)과 特異한 親和성을 가지고 있어야 하므로 基質과 構造가 비슷한 阻害劑, allosteric effectors, 助酵素등이 使用되며 경우에 따라서는 基質이나 生成物 自體가 리간드로 쓰일 수 있다. 親和性크로마토그래피는 1907年 charcoal에 trypsin을 特異하게 吸着시키는 方法(1)에 依하여 오래전부터 始作되었으며, 原理에 있어서 抗體와 抗原의 特異結合과 같은 것으로 抗體分離에 利用되었다(2). 이와 더불어 酵素의 固定化도 密接한 關係를 가지고 있어서 같은 分野로 發展되어 왔음을 이미 언급한바 있다(3).

酵素를 產業的으로 利用하는데 있어서 커다란 두가지 問題點은 酵素가 不安定하다는 點과 分離精製에 있어서 經費가 많이 든다는 것으로서 安定성은 酵素 性質上 불가피한 點이어서 工程面에서 安定성을 增進시키는 方法과 條件을 取하고 있지만, 分離精製에 있어서는 時間과 努力이 많이 所要되는 在來方法을 改善할 必要가 있어서 이에 對한 研究가 계속되어 왔다. 在來的

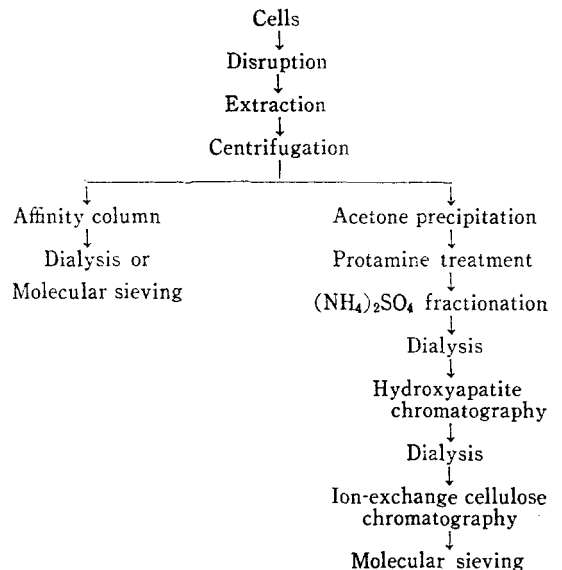


Fig. 1. Comparison of affinity with conventional methods

方法은 蛋白質의 溶解度, 分子의 크기 및 形態, 電荷의 差異, 溶媒抽出등 物理的인 조그만 差異에 依하여 分離하기 때문에 지루하고 조심스러운 作業으로 行하였으므로 時間과 經費를 쉽게 節約할 수 없었고 더욱이 酵素는 生體內에 0.1% (乾物量 基準)로 극히 少量存在하여 여러가지 分離精製 操作을 거치면 蛋白質 變性이 일어나 收率이 매우 낮았다. 따라서 親和性 크로마토그래피는 酵素와 結合력이 크고 효소-리간드의 親和성을 利用하기 때문에 간단한 處理로써 時間과 努力이 적게 들어 經費를 크게 節約할 수 있다. 그림 1에

Table 1. Some application of affinity chromatography

1. Purification of enzymes
2. Purification of antigens and antibodies
3. Concentration of dilute protein solutions
4. Purification of complementary peptide fragments
5. Storage of otherwise unstable proteins in immobilized form
6. Separation of cells and viruses
7. Purification of nucleic acids and nucleotides
8. Removal of denatured and chemically modified proteins from native proteins
9. Separation of enzymatically inactive subunits or mutant enzyme forms
10. Investigation of kinetic sequences and ligand interaction to enzyme subunits
11. Purification of hormone-binding proteins
12. Purification of sulfhydryl proteins
13. Purification of enzyme inhibitors
14. Purification of biologically active peptides (e.g. peptide hormones)
15. Purification of repressor proteins
16. Purification of ribosomal structures
17. Separation of lymphocyte and cell populations

친화성 크로마토그래피에 의한 효소정제의 간편성과
 在來의 정제方法을 比較하여 表示하였다.

在來方法에 依하면 各段階의 收率을 80%로 가정하
 더라도 5단계를 거친다면 全體적으로 32%의 낮은 收
 率밖에 안되는 反面 親和性 크로마토그래피는 한단계
 操作으로 完全히 精製하지 못하는 경우가 많지만, 在
 來의 方法보다 훨씬 좋은 收率을 期待할 수 있어 酵素
 의 간편한 精製方法으로 매우 重要한 意義를 갖게 되
 었다.

親和性 크로마토그래피는 酵素의 精製뿐만 아니라
 生物學의 力價를 갖는 抗體, 抗原, 核酸, 호르몬, bi-
 nding(또는 receptor) protein의 分離에 利用할 수 있
 으며 微生物 細胞 또는 바이러스 自體의 分離에도 利
 用할 수 있다. 표 1에 親和性 크로마토그래피의 利用
 可能性을 列擧하였다.

여러 면에서 利用可能性이 있는 이 方法은 食品工業
 면에서도 매우 重要한 것으로서 酵素는 食品工業에 多
 樣하게 利用되나 製造과정에서 너무 經費가 많이 들어
 大部分 粗酵素 製品을 使用하게 되는 바 不純物에 依
 하여 毒性이 생기거나 官能面에서 食品에 惡影響을 미

치게 되는 off-taste 物質이 생기는 경우 경제酵素를 使
 用하게 되면 이러한 문제를 解決할 수 있다.

따라서 在來 方法보다 손쉽고 간편하며 經濟적으로
 有利한 親和性 크로마토그래피를 利用하면 한 단계 또
 는 두 단계 作業으로 이러한 不純物을 쉽게 제거할 수
 있게되어 便利하다. 그러나 이 方法의 成敗는 값싸고
 安定하며 親和성이 큰 리간드를 選擇하는 問題와 매트-
 릭스에 結合시키는 方法에 달려있으므로 本欄에서는
 이의 一般의인 考察을 하고자 한다.

II. 親和性 크로마토그래피의 一般原理

一般의인 過程을 그림 2에 表示하였다. 여러 다른
 蛋白質과 混合된 酵素液을 매트릭스에 結合시킨 리간드
 컬럼에 통과시키면 特異하게 親和성을 갖는 特定酵素
 만이 吸着되고 其他 다른 蛋白質및 成分은 흘러나오게
 된다. 充分히 洗滌하고 난 後 吸着된 特定 酵素를 적
 당한 脫着劑로 溶離시키면 特定酵素만이 溶離되므로

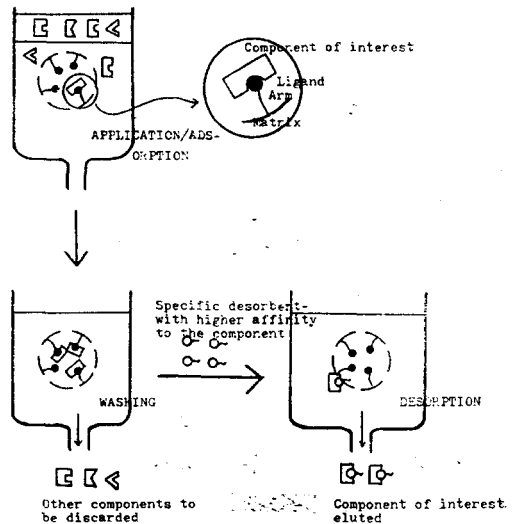


Fig. 2. Schematic representation of affinity chromatography showing specificity of affinity process during adsorption and desorption.

Sample components are separated based on their different biological specificity, as in antigen-antibody or enzyme-inhibitor systems. A ligand with specific affinity for the sample components of interest is covalently coupled to the granulated gel matrix. When sample is applied, only the components with an affinity for the ligand are absorbed to the gel matrix while the other components are washed away. Desorption is obtained by a controlled altering the pH/or salt concentration of the ligand or by using a specific desorbing agent.

이를 모으게 된다. 脫着劑로는 分子量이 적은 阻害劑 또는 基質 용액을 쓸수 있으나 一般的으로는 리간드로 쓰일수 있는 物質이면 사용할 수 있다. 特定脫着劑를 사용하지 않고 완충액의 pH나 鹽의 濃度を 變化시켜 酸素와 리간드의 親和性을 없애게 되면 吸着된 酵素가 떨어져 나오게 되며 이러한 非特異性 脫着方法이 오히려 더 많이 사용되며 有利하다. 精製된 酵素는 모아서 透析등으로 鹽을 제거시킴과 동시에 濃縮시키게 된다. 이러한 操作은 컬럼을 使用할 필요없이 懸탁액 形態로 使用한 다음 여과하는 方法으로도 行할수 있으나 一般的으로 컬럼作業이 용이하다. 特異性 親和性 크로마토그래피의 特徵은 作業의 간편성과 더불어 選擇性이 높은 點이다. 在來方法은 蛋白質들의 物理化學的 性質의 差에 依한 方法이므로 蛋白質間에 서로 비슷한 選擇性을 보이게 되나 이 方法은 蛋白質의 三次元的 構造의 特異性에 依하므로 精製된 特성을 나타낸다. 이러한 特異性은 吸着時 리간드와 構造의 特異성에 의하여 結合하는 反面 또한 脫着 時에도 나타나므로 分離하고자 하는 酵素를 純粹하게 精製할 수 있는 것이다. 그러나 實際作業時에는 이러한 特異성이 完全하게 作用하지 못하는 경우를 가끔 볼 수 있다(4). 이것은 特定酵素는 리간드와의 特異성에 依하여 吸着되나 다른 蛋白質은 메트릭스와 非特異性 (이온결합 또는 疏水性결합 등)에 의하여 吸着됨과 동시에 脫着時에는 脫着劑의 pH와 鹽濃도의 變化에 따라 함께 溶離되므로 精製 효과를 떨어뜨리게 된다.

다른 문제로서 "group specific ligand"를 使用하였을 경우는 單一 酵素뿐만 아니라 特異성이 비슷한 여러가지 酵素가 같이 吸着된다. 이때 特定한 條件의 脫着을 行하면 각 酵素를 따로 따로 分離할 수 있으나 如意치 못하면 이들 酵素가 다같이 溶離되어 部分精製의 成果 밖에 얻지 못하게 된다. 예를 들면 그림 3에 kinase와 dehydrogenase에 모두 特異성을 보이는 Blue Sepharose 6B의 構造를 表示하였다.

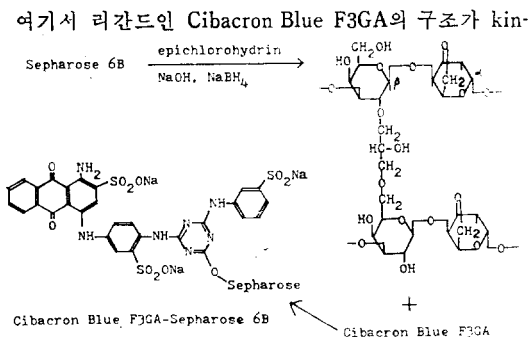


Fig. 3. Chemical structure and synthesis of Blue Sepharose 6B (6)

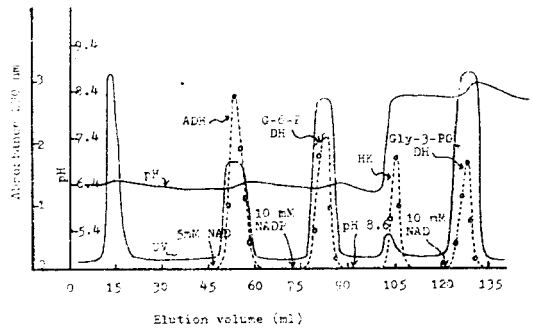


Fig. 4. Affinity chromatography of crude yeast extract on Blue Sepharose 6B (5)

Dried baker's yeast was lysed in 1 M dibasic sodium phosphate for 3hr at 37°C and then centrifuged at 13,700 × g for 1hr. The supernatant was filtered through cheese cloth and 0~75 % saturation (NH₄)₂SO₄ cut was made. A 1.6 × 5cm bed of Blue Sepharose 6B was equilibrated with starting buffer consisting of 0.02 M Tris HCl, pH 6.4; 5 × 10⁻³ MgCl₂; 4 × 10⁻⁴ M EDTA; 2 × 10⁻⁶ M 2-mercaptoethanol. A sample of crude extract containing 223 O.D. units in 10 ml was applied to the bed and washed with starting buffer. Various enzymes were eluted in starting buffer at pH 6.4 or 8.6, as noted, with the addition of selective cofactors. Alcohol dehydrogenase(ADH), glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-P DH), hexokinase(HK), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(Gly-3-PO₄ DH) were eluted with 5 mM NAD, 10 mM NADP, pH 8.6, and 10mM NAD respectively.

ase가 작용하는 ATP, dehydrogenase에 작용하는 NAD⁺, NADP⁺의 adenine環 構造와 비슷하여 두 酵素에 親和성을 보이게 되어 kinase, dehydrogenase혼합液을 통과시킬때 모두 흡착된다. 따라서 이들을 각각 分離하고자 할 때는 溶離條件을 달리해야 한다. 그림 4에서 酵母의 실험 결과를 表示하였다(5).

本 實驗室에서 酵素源이 다른 *L. mesenteroides*의 G-6-P dehydrogenase를 精제하기 위하여 Blue Sepharose 4B 컬럼을 사용한 結果 alcohol dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase 등은 檢出할 수 없었으나 lactate dehydroenase가 少量 混入되어 있었다. 1단계 方法으로 매우 良好한 精製효과를 얻은 바 있다(6).

이러한 "group specific ligand"를 使用하여 單一 酵素를 分離하는데 있어서는 문제가 복잡한 反面 경우에 따라서는 여러 酵素를 同時에 精제할 수 있는 效果를 얻을수 있어서 pyridine nucleotide, adenine nucleotide, flavin nucleotide, pyridoxal, folate, biotin, lipoic acid,

Table 2. Criteria for the ideal support materials

1. The matrix should have an abundant chemical functionality sufficiently general to permit reaction with a variety of groups on proteins and ligands for affinity chromatography
2. The matrix must form a loose porous network which permits unpaired movement of large macromolecules
3. The gel particles should be uniform, spherical and rigid with good flow properties
4. The matrix should not interact with proteins in general so that there is no non-specific adsorption
5. The gel must be mechanically and chemically stable to the conditions of coupling, adsorption and elution
6. The matrix should be cheap and regenerable
7. The gel should have high capacity for enzyme and ligand

covalamin등 많은 리간드가 이 목적으로 사용되고 있다(7). 親和性 크로마토그래피를 행하는데 있어서 特異性문제는 理論의이기 보다 종종 직접 實驗 條件을 分析하면서 시행하는 것이 結果를 판단하는데 도움이 되며 經驗을 必要로 하는 경우가 많다.

不溶性高分子 매트릭스 : 在來的인 크로마토그래피용을 使用할 수 있으며 이 매트릭스에 대해서는 이미 자세히 言及한 바 있다(3). 또한 이문제는 다른곳에서 (7-12) 이미 소개가 되었으므로 이를 참조하기 바라며 本欄에서는 간단히 取扱하기로 한다. 表 2에 親和性 크로마토그래피용 매트릭스의 選定條件을 열거하였다.

表 2에서 열거한 基準에 덧붙여 매트릭스는 全體의 構造의인 변화를 일으키지 않고 쉽게 化學的인 變形을 받을수 있어야 충분한 리간드를 結合시킬수 있다. 이때 겔이 收縮되면 流速이 느려지는 反面, 化學的 變形으로 이온기가 形成되면 非特異性結合의 문제점이 처음에는 없었더라도 後에 이러한 문제가 생기게 되어 좋지않다.

이런 點 때문에 agarose, polyacrylamide, glass 매트릭스가 良好하며 cellulose나 polystyrene 매트릭스는 종종 使用되고 있기는 하나(13, 14) 親和性 크로마토그래피目的에는 부적당 한 것으로 알려져 왔다. 때때로 변형시키지 않은 매트릭스가 有用한 경우도 있으며 epichlorohydrin으로 처리한 dextran이 糖結合蛋白質(saccharide-binding protein)이나 "anti-A agglutinin"을 分離하는데 특히 有效하다고 보고된 바 있으나(15-16) 多孔性이 아니어서 부적당하다.

C. Spacer arm의 重要性 : 리간드가 酵素와 좋은 親和性을 갖는다 하더라도 거대한 分子인 매트릭스에 結合되어 있을 경우에는 酵素가 接近하지 못하게 되어 位置障礙가 생기기 때문에 親和性 크로마토그래피를 成功的으로 할 수 없는 경우가 있다(17, 18). 이러한 現象은 특히 酵素의 分子量이 크거나, 親和性이 낮은 리간드를 사용했을 경우(19) 심하게 나타난다. 이럴 경우에는 리간드의 한쪽에 "spacer arm(또는 leash)"을

붙이고 다른 끝을 매트릭스에 結合시켜 리간드가 溶媒 方向으로 뻗어 나오도록해서 리간드와 매트릭스사이 에 충분한 거리가 생기게 하면 해결할 수 있다. 리간드를 세가지 방법으로 매트릭스에 붙인 例를 그림 5에 표시 하였다.

이 결과 β -galactosidase의 競爭的 阻害劑인 p-aminophenyl- β -thiogalactopyranoside를 사용하였을 때 리간드를 그림 5의 "A"처럼 직접 agarose에 結合시킨 매트릭스는 β -galactosidase와 親和性이 전혀 없어 流出液에 전부 흘러나오나 "B"처럼 어느 정도 길이(약 10Å)의 spacer arm을 넣으면 약한 親和性을 나타내 크로마토 그래피時 "void volume"정도에서 흘러 나왔다. 그러나 "C"처럼 약 21 Å정도 길이의 arm을 사용했을 경우에는 β -galactosidase가 매우 강한 親和性을 보여 정제 효과가 매우 좋은것으로 나타났다. Arm의 효과는 매우 중요하지만 너무 길 경우 arm 自體가 구부러져 매트릭스 속으로 감춰지게 되어 逆效果가 나타나므로 매트릭스 및 酵素의 종류에 따라 決定해야 한다. 또한 arm의 効

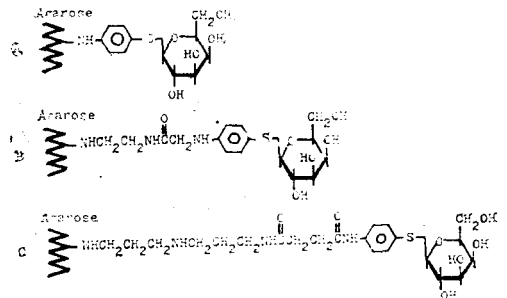


Fig. 5. Agarose adsorbents which have different length of spacer arms for β -galactosidase affinity chromatography (17)

The weak (K_i about $10^{-8}M$) competitive inhibitor, p-aminophenyl- β -D-thiogalactopyranoside, is attached to agarose through extensions of varying length. The enzyme does not bind to columns containing derivative A, is only slightly retarded with derivative B, and adsorbs strongly to derivative C.

果가 인정되는 반면, arm의 性質때문에 非特異性 結合 現象이 일어나 경제효과를 떨어뜨리는 경우도 있어 선택을 신중히 해야하는 點이 요망된다(20).

D. 리간드 : 리간드 選定은 가장 重要한 問題로서 다음 두가지 原則에서 보통 行한다. 첫째 리간드의 親和力이 溶液속에서 녹아있는 狀態에서 $10^{-4} \sim 10^{-8}$ M의 범위에 속하면 親和性 크로마토그래피에 利用하기 알맞으나 이보다 강하더라도 사용할수는 있다. 가령 K_i 가 용액 중에서 10^{-3} M(1 mM)이더라도 매트릭스에 결합시키면 일반적으로 1/1000로 줄어들므로 사용할 수 있으나 脫着時 強한 處理를 해야 하므로 酵素의 變성이 일어나는 難點이 생긴다. 둘째 리간드를 매트릭스에 結合시켜야 하므로 化學的으로 變形시킬수 있는 作用基를 가지고 있어야 한다. 리간드를 매트릭스에 結合시킨 後에도 酵素와의 親和性이 변하지 않아야 한다. 즉 親和力은 어느정도 감소되더라도 親和性이 없어져서는 안된다. 이러한 條件이 成立되면 리간드로 사용할수 있으나, 一般的으로 매우 不安定하며 값이 비싼 경우가 허다하여 產業的으로 酵素를 分離하기 위해서는 安定性이 좋고 값이 싸야한다.

리간드는 分離하려는 物質과 親和性이 있어야 하므로 前述한 基質類似物質(競爭的 阻害劑), 酵素效果因子(effector), 助酵素가 많이 사용된다. 그러나 效果의 選擇을 위해서는 리간드와의 作用機作을 잘 이해하는 것이 중요하다.

예를 들어 그림 6에서 보는 바와 같이 a: 基質이 하나인 경우는 反應物 A 및 生成物 P의 類似物質을 리간드로 사용할 수 있다. b: 基質이 두개로서 "compulsory order" 反應인 경우 A나 Q는 E와 직접 결합하여 親和性을 보이거나 B와 P는 E와 직접 결합하지 못하고 EA 또는 EQ와 結合하여 EAB 또는 EPQ를 만든다. 따라서 A나 Q의 類似物質을 직접 作用할 수 있으나 B 또는 P의 類似物質은 E에는 親和性이 없고 EA 또는 EQ와 親和性을 가지고 있어 이들을 사용하려면 A와 Q를 酵素 E와 동시에 컬럼에 통과시켜야 E가 EA 또는 EQ로 존재하게 되어 吸着된다. C: 基質이 두개로서

Table 3. Some ligands that have been immobilized and used for affinity chromatography

Ligands	References
Substrate and substrate analogs	17, 21
Inhibitors	22, 23
Allosteric effectors	24
Cofactors	25, 26
Nucleic acids	27
Nucleotides	28
t-RNA	29
Plant hormones	30
Steroids	31
Antibiotics	32
Enzymes	33
Protease inhibitors	34
Hydrophobic ligands	35
Chromophores	36
Antibodies	37

"random order"인 경우는 A와 B 또는 P와 Q가 E에 대하여 각각 다른 親和性을 가지므로 이들의 類似物質은 리간드가 될수 있으나 酵素 E에 대하여 親和力이 더 큰 것이 더 좋은 리간드로 作用할 수 있게 되므로 이러한 酵素作用 機作을 理解하면 리간드 選定에 좋은 情報를 얻을 수 있다. 一般的으로 리간드로 使用할 수 있는 化合物의 例를 表 3에 열거하였다.

좋은 리간드가 選定되었다 하더라도 매트릭스에 結合시키는 方法도 역시 중요하다. 結合方法은 리간드, 매트릭스 및 分離하고자 하는 酵素의 종류에 따라 適當한 方法을 檢討하여야 하며 이미 一般的인 것을 소개하였으므로(3) 여기서는 생략하기로 한다. 結合法에 대하여는 여러 곳에서 많이 소개되었으며(7, 8, 9, 38) 이에 대한 化學은 "Chemical Modification of Proteins"(39)에 자세히 소개되었으므로 참조하기 바란다. 예를 들어 같은 리간드라 하더라도 結合시키는 方法에 따라 리간드의 立體性이 달라져 親和力에 큰 영향을 주게된

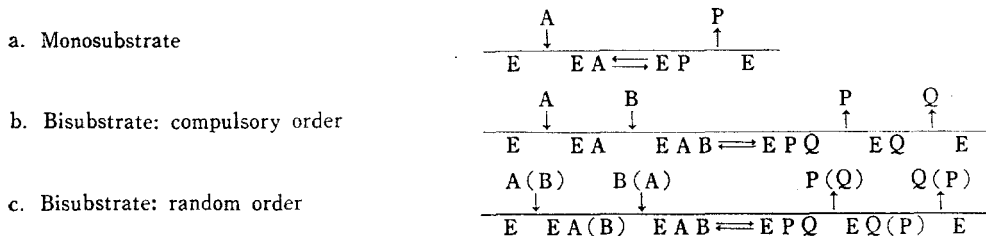


Fig. 6. Some common enzyme mechanisms
E: enzyme, A and B: reactants, P and Q: products

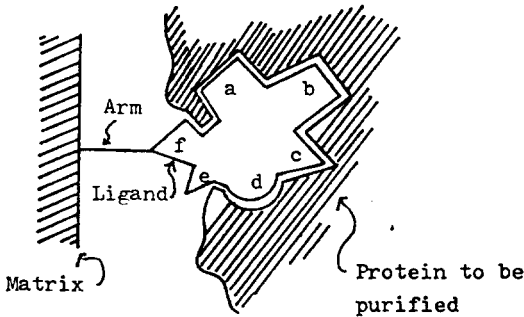


Fig. 7. The importance of the mode of attachment of the ligand to the matrix

다. 가령 리간드와 酵素가 그림 7과 같이 작용할 경우 리간드 a, b, c, d部分을 매트릭스와 結合시키면 親和性이 없어질 것이 당연하며 e에 結合시킬 경우는 親和力이 떨어질 것이 예상되고 f부분과 結合시키는 것이 가장 理想的인 일 것이다. 본 實驗室에서 *Penicillium*이 生産하는 glucose oxidase를 精製하고자 D-gluconic acid를 Sepharose 6B에 여러 方法으로 結合시킨 결과 이러한 現象을 뚜렷이 觀察한 바 있다(40). 이 結果에 依하면 D-gluconic acid의 제6번 炭素에 있는 $-CH_2OH$ 基를 結

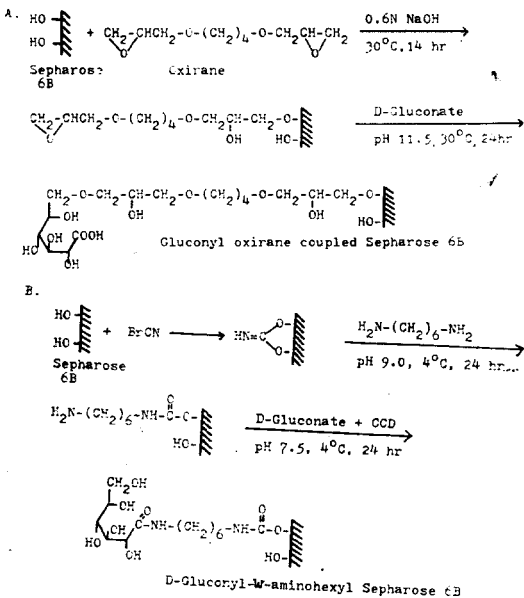


Fig. 8. Coupling of D-gluconate to Sepharose 6B by various method(40)

- A, Activation of the matrix with oxirane and coupling of D-gluconate at CH_2OH of C-6.
 B. Activation of the matrix with BrCN and coupling of D-gluconate at $COOH$ of C-1.
 CCD : 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-p-toluene sulphonate

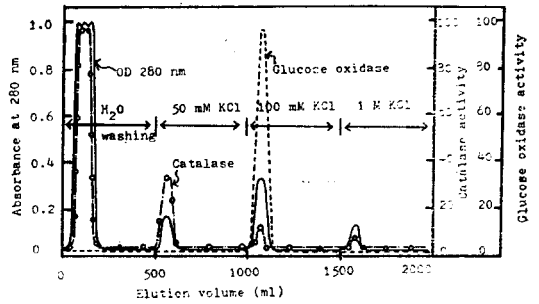


Fig. 9. Affinity chromatography of glucose oxidase on D-gluconyl- ω -aminoethyl Sepharose 6B (Fig. 8-B)(40)

Incubation mixture of *Penicillium* species (2.2 l) was filtered and 60-90% saturation $(NH_4)_2SO_4$ cut was made. The precipitate was dissolved in 50ml of dist. H_2O and dialyzed. The sample containing 4×10^8 U of glucose oxidase in 50 ml was applied to 1×10 cm of D-gluconyl- ω -aminoethyl Sepharose 6B equilibrated with water. The enzyme was eluted with different concentrations of KCl solution as noted after washing with 500 ml of dist water. D-gluconate, competitive inhibitor to glucose oxidase, was used as a ligand.

합시켰을 경우(그림 8 A)에는 glucose oxidase와 親和力이 없이 전혀 吸着이 안되고 流出液에 흘러 나왔으나 제1번 炭素의 $-COOH$ 基와 結合시켰을 경우(그림 8 B)에는 酵素가 吸着되어 精製效果를 얻을 수 있었다. 이때 catalase가 非特異적으로 吸着되어 少量 混入되어 있었다(그림 9). 이의 結果를 그림 8 및 9에 表示하였다.

근래에는 흔히 使用되는 酵素의 精製를 위하여 매트릭스에 적당한 리간드를 結合시킨 製品이 Pharmacia Fine Chem.을 비롯하여 Sigma, Cal Biochem.등 여러 회사에서 市販되고 있는 實情이다.

E. 酵素의 溶離(脫着) : 親和性 크로마토그래피 컬럼에 吸着된 酵素를 溶離하는데 있어서 脫着劑를 선택하는 문제는 酵素와 리간드의 相互作用을 고려하여 酵素에 對한 리간드의 親和性을 없애거나 감소시키는 方法을 택해야 한다. 여러 方法이 있으나 一般의인 方法을 表 4에 열거하였으며 實際에 있어서는 많은 經驗이 필요하다.

一般적으로 鹽濃度를 변화시키거나 pH 句配를 사용하는 溶離 方法이 많이 使用되고 있으나 이것은, 값비싼 助酵素를 사용하지 않으므로, 經濟적으로 費用을 節約한다는 장점이 있기는 하지만 이 方法은 結合方法의 特異性을 철저히 검토하고 實行하여야지 그렇지 못한

Table 4. Methods of elution from affinity matrices

1. Ligand competetion
2. Inhibitor competetion
3. Allosteric modification
4. Co-substrate elution
5. Ligand concentration changes
6. Ionic strength alterations (salt concentration changes)
7. Solvent changes
8. Temperature elution
9. Buffer and/or pH changes
10. Chaotropic reagents
11. Electrophoresis

경우에는 精製效果를 떨어뜨리게 된다. 즉 便利한 方法이긴 하지만 非特異性 脫着때문에 吸着時 非特異하게 결합된 다른 蛋白質도 함께 溶離시키므로 精製效果가 떨어지게 된다. 이러한 問題는 그대로 넘어가기 쉬운 점이므로 주의를 해야하며, 特定酵素의 溶離를 pH나 鹽의

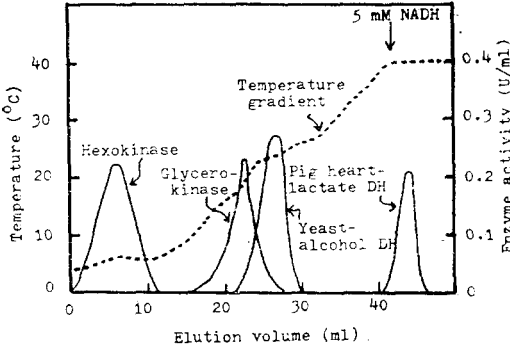


Fig. 10. Non-specific elution of an enzyme mixture on N⁶-(6-aminoethyl)-AMP-Sepharos by a temperature gradient(43)

The enzyme sample (100 μl), containing 5 U of each enzyme and bovine serum albumin (1.5mg), was applied to a column (5 mm × 50 mm) containing 0.5 g N⁶-(6-aminoethyl)-AMP-Sepharose (1.5 M AMP/ml) at 47°C. The column was equilibrated at each individual temperature for 5min prior to elution with 1.6 ml equilibrium buffer, 10 mM tricine-KOH, pH 7.5, containing 10 mM glycerol, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA and 0.02 % sodium azide. A 'pulse' (200 μl) of 5 mM NADH in the equilibration buffer was added as indicated by the arrow. Bovine serum albumin was located in the initial column wash (0-4 ml). Ligand AMP was used as an analog of ATP for kinases or of NAD/NADP for dehydrogenases.

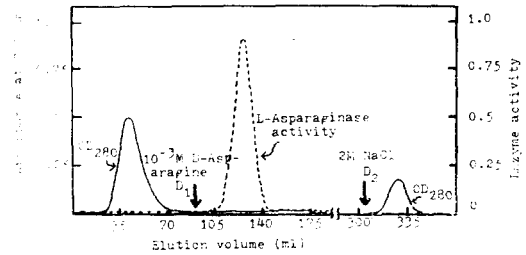


Fig. 11. Specific elution of L-asparaginase from D-asparagine-Sepharose column(44)

Buffer during adsorption phase: 0.05 M borate, containing 0.3 M NaCl and 0.006 % Na₃N₃, pH 8.6. Desorption with 10⁻³ M D-asparagine in buffer started at D₁, desorption of residual non-specifically bound material with 2 M NaCl in buffer started at D₂. Broken line indicates asparaginase activity. D-Asparagine, competitive inhibitor to L-asparaginase was used as ligand.

농도를 변화시켜 좋은 결과를 얻었다라도 同一酵素를 다른 酵素源에서 分離할 경우는 構成蛋白質의 종류가 각각 다르므로 좋은 결과를 얻을 수 없는 경우가 있어 주의가 필요하다. 특히 매트릭스가 이온기와 疏水性기를 같이 갖고 있는 경우에 非特異的結合 現象이 심하므로(41) 주의해야 한다. 表 4의 1번부터 5번까지는 特異性 溶離 방법이며 나머지는 非特異性 溶離 방법이다.

非特異的 方法에 비하여 特異性 方法은 精製效果가 높은 反面 값이 비싼 阻害劑 또는 助酵素를 溶離液에 넣어 사용하므로 많은 量이 소모되고 酵素농도가 심하게 희석되므로 농축시켜야 한다는 새로운 문제가 생긴다. 特異한 脫着劑로는 表 3에 열거한 종류의 리간드용액을 사용할 수 있으나 리간드보다 脫着劑가 酵素에 대하여 親和力이 더 커야한다. 特異性 脫着劑와 함께 pH나 鹽 농도를 변화시키는 洗滌方法이나, 蛋白質 變性劑(구아니딘, 尿素液 또는 界面活性劑)를 混用하는 방법을 사용하면 좋은 결과를 얻을 수도 있다(43).

그림 10과 11에 非特異性 溶離와 特異性 溶離 方法의 例 하나씩을 소개하고 끝을 맺기로 한다(43, 44).

結 論

生物學的 力價를 가진 蛋白質의 分離精製 方法으로서 近來 크게 부각되고 있는 親和性 크로마토그래피에 대하여 간단히 記述하였다. 親和性 크로마토그래피는 生物學的으로 特異한 親和力에 의하여 蛋白質을 分離精製하기 때문에 간편하고, 特異성이 있으며, 精製效果가 높고 收率이 좋은 利點이 있어 條件만 잘 선택하면 1段

階作業으로 純粹製品을 얻을수 있어 在來의 分離 精製 方法보다 훨씬 優秀하다.

이러한 親和性 크로마토그래피 技術을 利用하면 食品工業에 有用한 여러가지 酵素를 製造하는데 있어서 經濟의面에서 커다란 利點이 있을 것으로 믿으며 앞으로 이에 對한 應用이 많이 研究되리라 믿어 이를 간 단히 소개하였다.

끝으로 紙面관계상 이에 對한 理論面의 소개와 研究 例를 소개하지 못하였으나 여러가지 문헌(7, 38, 45, 47)을 참조하면 많은 도움이 되리라 믿는다.

IV. References

- Herdin, S. G., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 50, 497(1907)
- Campbell, D. H., E. Leuscher, and L. S. Lermann, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 37, 575(1951)
- Byun, S. M. and M. Y. Lim, Production and Application of Immobilized Enzymes for Food Systems, Food Science (Korea), 10, No. 1. p (1978)
- Huang, C. C., and D. Aminoff, Biophys. Acta, 371, 462(1974)
- Easterday, R. L. and I. M. Easterday, p.123 in Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography, ed. by R. B. Dunlap, Plenum Press, N. Y. (1974)
- Choi, Y. D., S. M. Byun, and M. H. Han, To be published. Choi's KAIS MS thesis: Purification and Characterization G-6-P DH of *L. mesenteroides* (1978)
- Lowe, C. R. and P. D. G. Dean, Affinity Chromatography, p.90 Wiley-Interscience pub. N. Y.(1974)
- Royer, G. P., Chemtech., Nov. p.694 (1974)
- Porath, J. and L. Sundberg, in M. L. Hair(ed) "The Chemistry of Biosurfaces" Vol. III, p.633, Marcel Dekker, N. Y. (1972)
- Sundberg, L. and J. Porath, J. Chromatog., 90, 87(1974)
- May, S. W. and O. R. Zaborsky, Sep. and Purif. Methods, 3, 1(1974)
- Scouten, W. H., International Lab., Dec. p.13 (1974)
- Uren, J. R., Biochim. Biophys. Acta, 236, 67(1970)
- Lowe, C. R., K. Mosbach, and P. D. G. Dean, Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 1004(1974)
- Ishiyama, I. and G. Uhlenbruck, Z. Immun. Forsch 148, 147(1972)
- Harisdangkul, V., E. A. Kabat, R. J. McDonough, and M. M. Sigei, J. Immunol., 108, 1244(1972)
- Steers, E., P. Cuatrecasas, and H. Pollard, J. Biol. Chem., 246, 196(1971)
- Cuatrecasas, P., J. Biol. Chem., 245, 3059(1970)
- Lowe, C. R., M. J. Harvey, D. B. Craven, and P. D. G. Dean, Biochem. J., 133, 499(1973)
- O'Carra, P., S. Barry, and T. Griffin, Biochem. Soc. Trans., 1, 289(1973)
- Cuatrecasas, P., M. Wilchek, and C. B. Anfinsen, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. A., 61, 636(1968)
- Wilchek, M. and M. Gorecki, Eur. J. Biochem., 11, 491(1969)
- Clayssens, M., H. Kersters-Hilderson, J. P. Van Wauwe, and C. K., DeBruyne, FEBS Lett., 11, 336(1970)
- Chan, W. W. C. and M. Takahashi, Biochem. Biophys. Res. Commun., 37, 272(1969)
- Newbold, P. C. H. and N. G. L. Harding Biochem. J., 124, 1(1971)
- Lingens, F., W. Goebel, and H. Usseler, Eur. J. Biochem., 1, 363(1967)
- Schaller, H., C. Nusslein, F. J. Bonhoeffer, C. Kurz, and I. Nietzsche, Eur. J. Biochem., 26, 474(1972)
- Barker, R., K. W. Olsen, J. H. Shaper, and R. L. Hill, J. Biol. Chem., 247, 7135(1972)
- Nelidova, O. D. and L. L. Kiselev, Molecul. Biol. 2, 60(1968)
- Venis, M. A., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 68, 1824(1971)
- Nicolas, J. C., M. Pons, B. Descomps, and A. Crastes de Paulet, FEBS Lett., 23, 175(1972)
- Crane, L. J., G. E. Bettinger, and J. O. Lampen, Biochem. Biophys. Res. Commun., 50, 220(1973)
- Wilchek, M., FEBS Lett., 7, 161(1970)
- Stewart, K. K. and R. F. Doherty, FEBS Lett., 16, 226(1971)
- Yon, R. J., Biochem. J., 126, 765(1972)
- Röschlau, P. and B. Hess, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 441(1972)
- Valyulis, R. A., A. A. Glemzha, and V. V. Trak-

- imene, *Biochem. Translated from Russia*, **40**, 765 (1975)
38. Porath, J. and T. Kristiansen, in "Proteins", 3rd ed. p. 95(1973)
39. Means, G. E. and R. E. Feeney, "Chemical Modification of Proteins", Holden-Day, Inc. San Francisco(1971)
40. Byun, S. M. and J. H. Ko, To be published, Ko's KAIS thesis: Studies on Glucose Oxidase(1978)
41. Nishikawa, A. H. and P. Bailon, *Arch. Biochem. Biophys.*, **168**, 576(1975)
42. Affitprn Corp., "General Aspects of Affinity Chromatography", Cost Mesa, CA (1973)
43. Harvey, M. J., C. R. Lowe, and P. D. G. Dean, *Eur. J. Biochem.*, **41**, 335(1974)
44. Kristiansen, T., M. Einarsson, L. Sundberg, and J. Porath, *FEBS Lett.*, **7**, 294(1970)
45. Wankel, C. P., *Anal. Chem.*, **46**, 1400(1974)
46. Cuatrecasas, P. and C. B. Anfinsen, *Methods Enzymol.*, **22**, 345(1971)
47. Gaylor, V. F. and H. L. James, *Anal. Chem.*, **48**, 44 R(1976)