

계란 면역 단백질(IgY)의 정제 연구

*김인호·이용택·이청희·정봉현
충남대학교 화학공학과, ¹생명공학연구소
(접수 : 1999. 11. 29., 게재승인 : 1999. 12. 18.)

Purification of Egg Immunoglobulin IgY

In-Ho Kim*, Yong-Tak Lee, Chung-Hee Lee, and Bong-Hyun Chung¹
Dept. of Chem. Eng., Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea
¹Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Taejeon 305-600, Korea
(Received : 1999. 11. 29., Accepted : 1999. 12. 18.)

Purification of egg yolk immunoglobulin(IgY) was performed to understand the property of egg immunoglobulin. IgY differs from mammalian IgY in the molecular size(larger), isoelectric point(more acidic), and binding ability with mammalian complement and protein A(nonbinding ability). IgY is also known as γ -livetin and exists in egg yolk together with other two water-soluble proteins, α -livetin(chicken serum albumin) and β -livetin(α_2 -glycoprotein) and various lipoproteins(Low density lipoprotein, LDL and High density lipoprotein, HDL) which are the major components of egg yolk. The first step of isolation of IgY is to separate the water-soluble proteins from lipoproteins. We report a simple method for separation of water soluble proteins using κ -carrageenan and sedimentation. κ -carrageenan was found to be effective for removal of yolk lipoprotein as a precipitate. IgY remained supernatant, and was isolated by chromatography on columns of DEAE-Sephacel and G 75 gel filtration chromatography.

Key Words : IgY, egg, purification

서론

계란의 난황에 존재하는 IgY는 IgG 계열의 수용성 면역단백질로서 IgG는 순수한 연구분야, 진단분야에서 폭 넓게 이용되고 있고, 수동면역치치와 전염성질병(예 dental caries, rotavirus diarrhea) 등을 억제하는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라 화장품이나 식품공업에도 응용되고 있다(1,2). 이러한 IgG는 혈장이나 초유에서 분리할 수 있는데 난황을 이용하여 IgG를 대체할 수 있는 IgY를 분리함으로써 원료수급의 경제적인 측면과 대량 확보의 어려움이 해결된다. 이러한 IgY의 분리정제에 대한 기술이 최근에 많은 연구되고 있다(3).

IgY는 γ -livetin이라고 하며 분자량 64kDa의 heavy chain과 분자량 28kDa의 light chain으로 이루어져 있고 IgG보다 등전점이 산성에 가까우며 닭의 혈액에서 분리한 IgG와 같은 전기 영동 경향을 보인다(4). 계란의 난황에서 IgY를 분리해 내는 과정 중 첫단계가 난황에서 수용성 단백질과 나머지 성분들(phospholipid, lipoprotein etc)을 분리하는 단계이다. 이 과정에 대한 연구가 몇

가지 보고 되어 있으나 경제성이 떨어지고 복잡한 단점을 가지고 있다(5). 계란의 난황은 이 외에도 α -livetin, β -livetin이라는 수용성 단백질과 인지질성분(LDL, HDL)등으로 구성되어 있다. IgY의 표준물질은 Pharmacia사의 gamma Yolk Kit를 이용하여 계란의 난황으로부터 분리된 IgY로 순도는 90%이상으로 보고되고 있다(6).

본 연구에서는 계란의 난황으로부터 IgY를 분리정제 하는데 있어서 기존의 방법들 보다 간단하고 효율적인 분리정제를 위해 원심분리, 첨가물을 넣은 후의 원심분리, 자연침전으로 나누어 전처리 단계를 비교검토 하였다. 그리고 난황은 점도가 높은 물질이므로 크로마토그래피를 수행하기 위해서는 희석이 필수적이므로 2배 또는 10배희석을 통하여 점도를 감소시켰고 인지질의 제거가 목적인 전처리 단계에서는 0.15% κ -카라지난을 사용하여 원심분리하거나 자연침전후 장시간 방치하였다. 전처리를 거친 상등액 샘플로 각기 이온교환 크로마토그래피, 젤여과 크로마토그래피, 고압 액체 크로마토그래피 등의 여러 가지 정제 방법을 시도하고 이 결과를 토대로 경제성이 있는 정제 흐름을 정하였다.

재료 및 방법

시료의 준비와 전처리

달걀의 난황만을 분리하여 증류수로 2배 희석한 후 mixer를

*Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Chungnam National University, Taejeon, 305-764
Tel : 042-821-5685, Fax : 042-822-8995
E-mail: ihkim@hanbat.chungnam.ac.kr

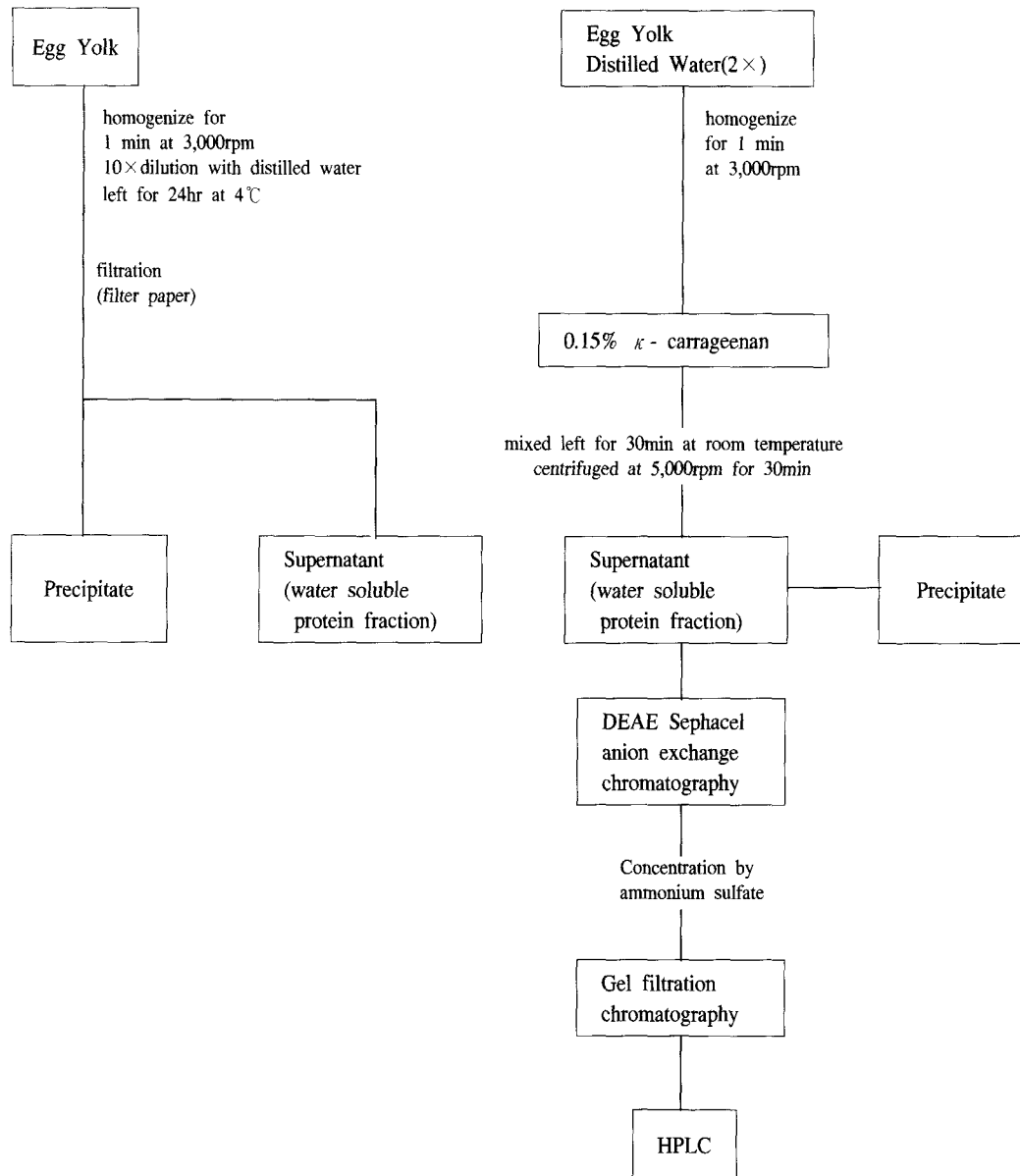


Figure 1. Purification scheme of IgY.

이용하여 3000 rpm에서 1분간 균질화한 후 총 부피 2배의 0.15% κ -카라지난을 혼합하여 4°C 5000rpm에서 30분간 원심 분리한 후 상등액만을 여과지(Whatman, No 1441 110)를 이용하여 여과하였다. 또 달걀의 난황만을 분리하여 증류수로 10배 희석한 후 mixer를 이용하여 3000 rpm에서 1분간 균질화한 후 이 시료를 4°C에서 침전시킨다. 24시간 경과 후 상등액만을 여과지를 이용하여 여과한 후 시료의 pH를 맞춘다. 이 시료를 DEAE Sephacel과 혼합한 후 250 rpm에서 1시간 동안 진탕하였다.

음이온 교환 크로마토그래피

직경 2.5 cm인 유리 칼럼(Spectrum, USA)에 진척리가 끝난 시료와 결합시킨 DEAE Sephacel(SIGMA, USA)을 충전하고

완충 용액(20mM 인산나트륨용액)으로 세척하여 준다. 세척 후 소금 농도를 선형구배 기울기 형태로 이온 강도를 높여 단백질을 용출시켰고 UV monitor(Spectrum, USA)로 280nm에서 측정하였고 측정되는 전기적 신호는 컴퓨팅 인터페이스(Spectra Physics, PU4811-Philips)를 이용하여 기록하였다. 용출되는 단백질은 Fraction collector (KMC 2000, Vison, Korea)로 모았다(5). 음이온교환 크로마토그래피를 pH 8.0, 7.0, 6.4, 5.8에서 각기 수행하였다.

젤 여과 크로마토그래피

Sephadex G75 (Pharmacia, Sweden)가 충전된 칼럼 (2.2 cm D × 90 cm L)에서 완충 용액(20mM 인산나트륨용액, pH 8)을 0.25 ml/min의 용출속도로 젤 여과 크로마토그래피를 수행하였다.

젤 여과 크로마토그래피를 수행하기 위해서 이온교환 칼럼 용출액을 황산암모니움을 포화 농도의 50%로 가하여 IgY를 침전시켜 농축시켰다. 크로마토그래피 장치의 구성은 이온교환 크로마토그래피와 같았다.

고압 액체 크로마토그래피(HPLC)

HPLC(영인과학, 한국)를 이용하여 정제과정중의 여러 샘플을 분석하였다. 칼럼은 역상칼럼인 μ BONDAPACK C18(Waters USA) 칼럼을 사용하였고 용매의 조성은 아세토니트릴과 물을 1:1로 혼합하여 0.1% TFA(Trifluoroacetic acid, Sigma, USA)를 첨가하여 사용하였으며 용매는 이송펌프(Model 910, 영인 과학)를 사용하여 칼럼에 주입하였고 모든 이동상 용액은 펌프로 이송되기 전에 기공 크기가 0.2 μ m인 여과장치를 이용하여 불순물을 제거하고, 감압장치를 이용하여 충분히 탈기하여 사용하였다. 용출되는 단백질의 농도는 Absorbance detector(M720, 영인 과학)을 사용하여 280nm에서 측정하였고 컴퓨팅 인터그래이터(Spectra Phsics, PU4811-Philips)를 이용하여 기록하였다.

분석방법

단백질의 농도 결정은 Lowry의 방법(7)을 이용하였고, 용출액들의 정성 분석은 미니 전기영동 장치(Hoeffer, USA)를 이용하여 SDS-PAGE를 Laemli의 방법을 기초로 하여 stacking gel은 5% polyacrylamide gel을, separating gel은 10% polyacrylamide gel을 제조하여 수행하였다(8,9). 젤의 염색은 Coomassie blue staining 방법으로 수행하여 칼럼을 통해 분리한 IgY의 순도를 확인하였다. 대조군으로 사용한 IgY는 Phamacia사의 gamma Yolk[®]를 이용하였다. 난황분리후 난황낭을 제거하고 난황부피의 50%에 해당하는 PBS(Phosphate buffer with saline)에 녹이고 gamma Yolk[®]의 Separation reagent 1을 넣고 2,000rpm(4 $^{\circ}$ C)에서 30분간 원심 분리한 후 상등액을 분리하고 상등액과 같은 부피의 Buffer solution 2를 넣은 후 실온에서 15분간 방치한다. 여기에 원심 분리에서 얻은 상등액 부피의 2배에 해당하는 Separation reagent 2를 넣고 실온에서 15분간 방치후 2,000rpm(4 $^{\circ}$ C)에서 30분간 원심 분리한 후 상등액은 버리고 상등액의 부피와 같은 부피의 증류수로 침전물을 재현탁 해준다. 이 샘플을 실온에서 15분간 방치한 후 상등액과 같은 부피의 Separation reagent 3을 넣은 후 실온에서 15분간 방치한 후 2,000rpm(4 $^{\circ}$ C)에서 30분간 원심 분리한다. 상등액을 가만히 따라 버린 후 pH 9.2의 Carbonate buffer로 재현탁해준다. 이 과정들을 거쳐 분리한 IgY의 순도는 90%이상이며 이것을 대조군으로 사용하였다.

결과 및 고찰

시료의 준비와 전처리

계란의 난황을 분리하여 수용성 단백질을 분리하는 단계에서 자연침전 보다는 원심분리방법이 시간적 측면에서 효율적이고 수율 면에서도 약 10%정도 높게 나타난다(Table 1). 원심분리시에도 κ -카라지난과 같은 첨가물을 사용하여 원심분리하는 경우 수율은 떨어지지만 전기영동상에서 확인하여 볼 때 인지질의 제거에 효과적이다. 그러나 원심분리에 따른 비용의 상승과 스케일업의 측면과 뒤따르는 정제 단계를 고려하여 본 실험에서는 10배 희석후 침전시키는 방법을 주로 하여 실험하였다. 다른 연

Table 1. Comparison of pretreatment of egg yolk.

	Total protein	
	Qty (mg)	Yield (%)
Egg yolk*	2000	100
10 \times dilution (24 hr natural sedimentation)	650	32.5
10 \times dilution & centrifuge sample	830	41.5
Centrifuge sample (add 0.15% κ -carrageenan)	315	15.8

*The egg yolk used for the purification was 15g, Centrifuge 5000rpm 30min at 4 $^{\circ}$ C

구자의 전처리 방법의 비교에서도 물로 희석하는 방법이 IgY의 전처리에 유리하다고 보고되고 있다(10).

음이온 교환 크로마토그래피와 분획의 전기영동 특성

Figure 2에서 pH가 5.8의 조건에서 탈착된 단백질의 양이

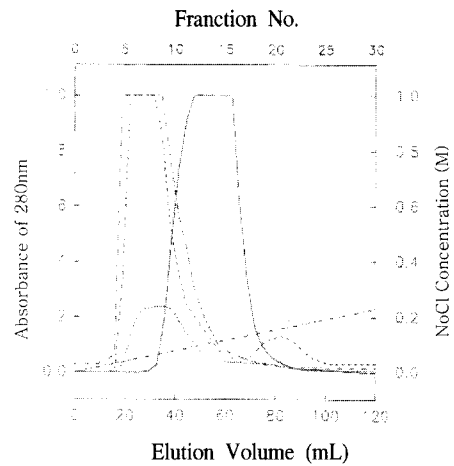


Figure 2. Anion exchange chromatogram, flowrate : 0.5ml/min, volume of each fraction: 5ml, ... : pH=5.8, -.- : pH=6.4, - - - : pH=7, - : pH=8.

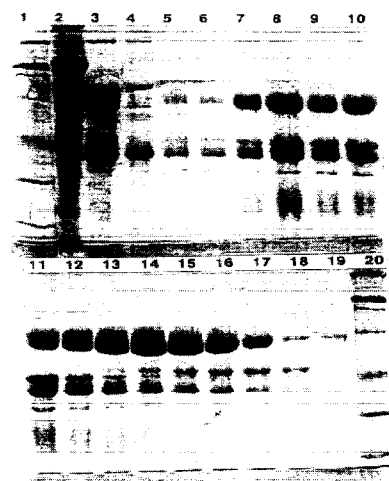


Figure 3. SDS-PAGE of samples from ion exchange chromatography at pH 8.0, lanes 1 and 20: molecular weight markers, lane 2: 10 \times dilution supernatant, lane 3: flowthrough, lane 4-19: elute fraction no.1- no.35.

작고 pH=6.4 이상에서 탈착된 단백질의 양이 증가 하였다. pH=6.4와 pH=7.0의 크로마토그램의 차이는 작았다. 다시 pH의 증가 실험을 한 결과 IgY의 결합력이 더 커졌고 용리가 뒤에 이루어졌다. 난황의 pH가 높을 수록 수지의 IgY 흡착능이 증가 하여 늦게 용출되는 경향이 있으므로 흡착이 많이 되는 조건에서 실험하기 위해 pH를 8로 결정하여 크로마토그래피를 수행하였다. DEAE와 결합시켰다가 소금의 농도를 증가시키며 분리한 분획들의 Figure 3의 전기영동 결과는 염의 농도의 증가에 따라 서서히 용출되는 경향을 보였다. 전기영동상에서 보면 IgY의 light chain 부분이 heavy chain에 비해 상대적으로 약하게 젤에 결합되어 있어 앞의 분획에 나타남을 알 수 있다.

젤 여과 크로마토그래피와 분획의 전기영동 특성

황산암모늄으로 농축(50%)한 후 수행한 젤 여과 크로마토그

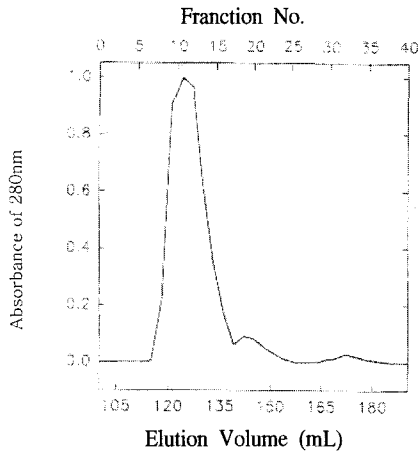


Figure 4. Gel filtration chromatogram, sodium phosphate at pH 8.0, flowrate : 0.5mL/min, volume of fraction: 5mL.

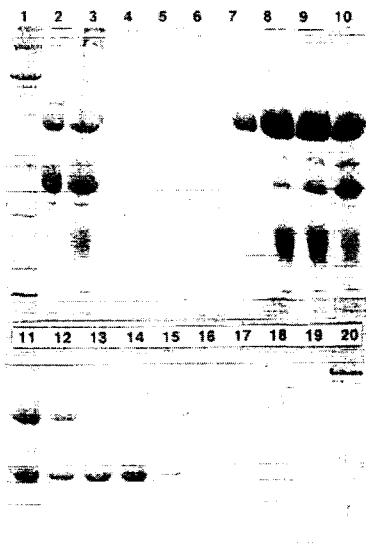


Figure 5. SDS-PAGE samples from gel filtration chromatography, lanes 1 and 20: molecular weight markers, lane 2: 10× dilution supernatant, lane 3: loading sample, lane 4: eluent before 1st peak, lane 5-19: elute fraction no.1- no.20.

래피에서의 크로마토그램과 전기 영동 경향을 보면 IgY의 순도가 이온교환크로마토그래피보다 증가하였다. 분자량이 다른 heavy chain 부분과 light chain 부분이 전기영동 상에서 같이 나타나는 것을 볼 때 light chain은 heavy chain과 결합되어 젤 여과 크로마토그래피 상에서 같이 이동한다는 것을 의미하고 heavy chain이나 light chain의 band가 따로 나타나는 부분은 heavy chain과 light chain의 결합이 깨져 분자량에 따라 용출되는것이다. heavy chain 부분이 light chain 부분에 비하여 전기영동 상에 더 강하게 나타나는 것은 light chain 부분의 결합력이 heavy chain에 비해 약하기 때문이다.

고압액체크로마토그래피(HPLC)

HPLC 수행시 난황 10배 희석액의 상등액에 비하여 gamma Yolk Kit[®]와 gel filtration까지를 거친 시료의 peak가 더 높고 peak의 폭이 더 좁은 것을 볼 수 있다. 이것은 정제 과정을 거친 sample은 IgY의 순도가 증가하므로 peak의 폭이 좁고 단순 침전만을 거친 시료의 peak는 크로마토그램상에 상대적으로 넓게 나타나는 것이다(Figure 6). 그리고 gamma Yolk Kit[®]로 분리한 IgY의 peak와 gel filtration을 거쳐 분리해낸 IgY의 peak를 비교하여 보면 gel filtration을 거쳐 분리해낸 IgY의 순도는 적어도 90%이상이라는 것을 알 수 있다.

요 약

계란의 난황으로부터 유래한 IgY의 분리와 정제과정의 흐름을 정리한 결과, 난황에서의 수용성 단백질의 분리단계가 단백질의 수율을 증가시키는데 가장 큰 영향을 미치는 것으로 판단되었다. 본 연구에서는 자연 침전방법을 통하여 실험하였는데 수율의 증가를 위해서는 원심분리와 같이 수용성 단백질의 양을 많이 얻을 수 있는 방법이 필요하고, 인지질이나 lipoprotein등의 성분의 제거효율을 높이기 위해서는 γ -carrageenan등과 같은 natural gum성분의 첨가와 같은 방법이 필요하다. 그러므로 자연침

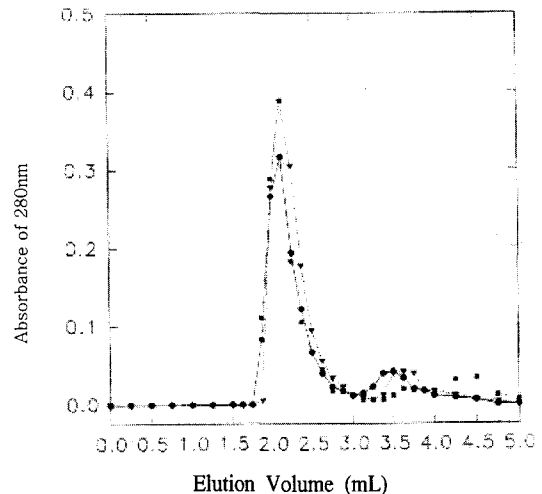


Figure 6. HPLC chromatograms of purified samples, ■ : sample from GFC, ● : sample from×10 dilution treatmet, ▼ : sample from gamma Yolk preparation.

전을 이용하여 수율의 증가측면과 비용의 절감의 효과를 얻을 수 있었다. 보다 효율적인 IgY의 분리를 위해서는 초기 단계에서 수율의 극대화와 불순물 제거의 최대화가 동시에 요구되고 있다. 전처리 후의 시료를 이용하여 이온교환 크로마토그래피와 gel filtration chromatography를 통해 순도 90% 이상의 IgY를 얻을 수 있었다.

REFERENCES

- Hatta, H., J. S. Sim and S. Nakai (1988), Separation of phospholipids from egg yolk and recovery of water-soluble proteins. *J. Food Sci.* **53**, 425-431.
- Hassl, A. and H. Aspöck (1988), Purification of egg yolk immunoglobulins. A two step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *J. Immunol. Meth.* **110**:225-228.
- Hansen, P. J.A. Scoble, B. Hanson and N. J. Hoogenraad (1998), Isolation and purification of immunoglobins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography, *J. Immunol. Methods.* **215**, 1-7.
- Shimizu, M., C. R. Fitzsimmons and S. Nakai (1988), Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food Sci.* **53**, 1360-1366.
- Burley, R. W. and D. V. Vadehra (1979), Chromatographic separation of the soluble proteins of hen's egg yolk: An analytical and preparative study. *Anal. Biochem.* **94**, 53-59.
- Fichtali, J., E. A. Charter, K. V. Lo, and S. Nakai (1992) Separation of egg yolk immunoglobulins using an automated liquid chromatography system. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 1388-1394.
- 한국생화학회 교재편찬위원회 (1994), 실험생화학, 8th ed., pp. 58, 탐구당. 한국.
- Laemli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680.
- Bollag, D. M. and S. J. Edelstein(1991), Protein Methods, pp. 115, Wiley-Liss, Inc., New York.
- Akita, A. M. and S. Nakai (1993), Comparison of four purification methods for the production of immunoglobins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E.coli* strain, *J. Immunol. Methods*, **160**, 207-214.