

## 양이온교환 크로마토그래피에서 Lysozyme 분리 실험과 전산모사

김 정 애 · 성 연 경 · † 김 인 호  
충남대학교 화학공학과  
(접수 : 2006. 3. 29., 게재승인 : 2006. 6. 20.)

### Experimental and Simulation Study of Lysozyme Separation in Cation Exchange Chromatography

Jung Ae Kim, Yeon Kyeong Seong, and In Ho Kim†  
Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea  
(Received : 2006. 3. 29., Accepted : 2006. 6. 20.)

Lysozyme is an important antibacterial material, as effective food preservative. A number of lysozymes are found in nature such as egg white, where exists about 3.5% of egg proteins. In this study, carboxymethyl cation exchange chromatography has been used for separation of lysozyme. A simulation study by ASPEN was also performed for saving time and cost in chromatography purification experiments. Important parameters in experimental chromatography were sample loading amount, NaCl concentration, and pH of eluent. Simulation results were successfully fitted with chromatograms from experiments with change of parameters mentioned above.

**Key Words** : Chromatography, lysozyme, ASPEN simulation

#### 서 론

Lysozyme은 N-acetylmuramic acid와 N-acylglucosamine 사이의  $\beta$ -1,4 linkage의 가수분해에 대해 촉매작용을 한다. Lysozyme은 많은 미생물에 효소 작용을 통해 세균 세포벽을 분해 하는 것 뿐만 아니라 면역능력 증강 효과, 항생물질의 작용 증강, 염증 시의 조직 회복 과정의 촉진 등의 다양한 작용을 나타낸다. 이러한 Lysozyme은 식품의 안전과 저장성 향상을 위한 천연 항균제로서 가치를 인정받고 있다. Lysozyme의 다양한 효과가 밝혀진 이후로 제약분야에도 호흡기질환의 감기 치료제나 영양식에 첨가되어 세균 저항력을 높이는 데 많이 이용되고 있다(1).

Lysozyme 분리시 가장 많이 사용하는 방법은 양이온 교환 수지를 이용한 방법이다(2). 양이온 교환 수지란 음전하를 가져 양이온을 흡착하는 고분자 담체로서 단백질 정제에 흔히 이용되는 양이온 교환체는 carboxymethyl cellulose (CM-cellulose)이며 cellulose의 히드록시기에 carboxymethyl기 (-CH<sub>3</sub>COO-)가 부가된 구조를 가져 음전하를 띠므로 양전하를 가진 단백질 분자를 흡착한다. 문헌에 따르면

lysozyme의 크로마토그래피에서 회수율은 달걀흰자로부터 80~90%라고 보고되고 있다(3).

Lysozyme을 분리함에 있어 침전과 같은 다른 정제 방법보다는 이온 교환 크로마토그래피가 가장 높은 정제 효율을 보이지만 방법이 복잡하고 많은 장비가 필요하다는 단점이 있다. 또한 직접 실험을 통해서 정제 효율을 높이기 위해서는 많은 시간과 비용이 필요하다. 그러나 simulator를 이용하면(4) 실제 실험을 하지 않고도 정제 효율을 예측할 수 있으므로 정제 효율 향상을 위한 실험 조건을 쉽게 얻을 수 있다. 따라서 본 연구에서는 lysozyme의 이온 교환 크로마토그래피 실험을 통해 lysozyme의 분리 경향성을 파악하고, 실험결과를 Aspen chromatography simulator를 이용한 결과와 비교함으로써 simulation의 유용성을 연구하였다.

#### 재료 및 방법

##### 실험 재료와 장치

이온교환 크로마토그래피는 양이온교환 수지 (Cellufine CM (Carboxyl Methyl) C-200, Amicon, USA)를 column (100 mm L × 16 mm ID, Phamacia Biotech XK16, USA)에 충전하여 사용하였다. 실험 샘플로 lysozyme (Sigma, USA)을 분리에 사용하였으며, 세척용액과 평행용액으로 0.02 M 인

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,  
Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea  
Tel : +82-42-821-5685, Fax : +82-42-822-8995  
E-mail : ihkim@cnu.ac.kr

산완충용액을 사용하였다. 용출용액으로는 NaCl을 인산 완충용액에 녹여 사용하였다. 용출된 lysozyme의 크로마토그램은 UV monitor (Spectrum, USA)에서 측정되어 전압으로 기록되었다.

**이온교환 크로마토그래피 실험**

사용한 젤은 건조된 무게로 3 g이었다. 20% 에탄올에 미리 처리한 젤을 0.02 M 인산완충용액으로 여러번 세정하여 젤을 평형화시켰다. 그후 30분 동안 탈기시켜 column에 충전하였고, 젤이 중력에 의해 자유 침강될 때까지 하루 정도 방치해 두었다. 충전 후에는 blue 테스트란 (2 mg/ml)을 컬럼에 흘려주어 충진이 잘 되었는지 확인하였다. 충전 확인 후에는 0.02 M 인산완충용액을 사용하여 평형화 시켰다. 평형 후에 준비한 lysozyme 샘플을 주입하였는데, 1 ml/min의 속도로 4 mg, 8 mg을 주입하였다. 시료 주입 후에는 0.02 M 인산완충용액으로 1 ml/min으로 30분간 세척하였다. 세척 후에는 NaCl이 포함된 인산완충용액을 1 ml/min으로 50분간 주입해 줌으로써 lysozyme의 용출이 일어나게 하였다.

이온교환 크로마토그래피 실험조건의 변화로 NaCl의 농도, 인산완충용액의 pH, 그리고 lysozyme의 주입량을 변화시켰다. NaCl의 농도를 0.5, 1.0 M로 변화시켰고 인산완충용액의 pH를 pH 6, 7, 8로 조작하였다. 그리고 lysozyme의 주입량을 1 ml/min의 속도로 1분, 2분씩 주입함으로써 4 mg, 8 mg의 lysozyme이 column에 투입되었다. 모든 경우 동일하게 lysozyme의 용출액을 1분 간격으로 분취하였다.

**Simulation(5)**

실험 결과와 비교하기 위해 Aspen Technology사의 Aspen chromatography를 사용하였다. 이것으로 산업적 batch chromatography 공정 시뮬레이션, 디자인, 그리고 최적화를 수행함으로써 보다 효율적인 공정을 설계하고 저비용으로 실제에 적용할 수 있다. Aspen chromatography는 기본적으로 Menu, Toolbar, Flowsheet Window, Message Window, Status Bar, Simulation Explorer Window로 구성되어 있다. 이렇게 구성된 Aspen chromatography의 simulation 실행 결과는 Report Tab에서 수율, 농도, 피크 시간, 그리고 NTP 값 등으로 정리되어 정보를 제공한다.

이온 교환 크로마토그래피 공정에 적용하여 사용할 수 있는 흡착 모델은 Langmuir 흡착식을 비롯하여 다양하다. lysozyme의 양이온 교환 고정상에 대한 흡착 거동으로 Yamamoto 흡착 모델을 사용하여 표현하였다. Yamamoto 흡착 모델은 용출 용액의 이온 세기 변화를 고려한 모델이고, 다음식과 같다.

$$W_k = (IP_{1k} + IP_{2k} C_b^{IP_{2k}}) C_k$$

여기서, IP는 매개변수

C<sub>b</sub>는 교환 이온의 농도

W<sub>k</sub>는 고정상에 흡착된 단백질 당량을 나타낸다.

컬럼에서 물질 전달 저항은 Linear lumped resistance에

따라서 표현된다고 가정하였다.

$$\frac{\partial w_i}{\partial t} = MTC_{si}(w_i^* - w_i)$$

여기서 MTC는 Mass transfer coefficient이다. 그리고 이론 단수는 실험 크로마토그램에서 얻어 다음식으로 계산하였다.

$$E_z = \frac{\nu H_B}{2N_p \epsilon_i}$$

여기서, E<sub>z</sub> : 축방향 분배계수

v<sub>1</sub> : 유속

H<sub>B</sub> : 컬럼 길이

N<sub>p</sub> : 이론 단수

ε<sub>i</sub> : 공극률

**결과 및 고찰**

**이온교환 크로마토그래피**

NaCl의 농도에 따른 분리 효과를 알아보기 위해 lysozyme 주입량 8 mg, pH 8의 조건에서 실험을 하였다. Fig. 1의 결과에서 NaCl 0.5 M의 조건에서 49분에 1.283 V의 최대 피크를 보였으며, NaCl 1.0 M의 조건에서 47분에 1.987 V의 최대 피크를 보임을 확인하였다. NaCl 용출용액의 농도가 커질수록 머무름 시간이 감소하며 최대 피크의 높이가 커졌다. 이는 탈착 용액의 농도가 높을수록 짧은 시간에 lysozyme 양이온과 Na 이온 간의 이온 교환이 이루어짐을 보인다.

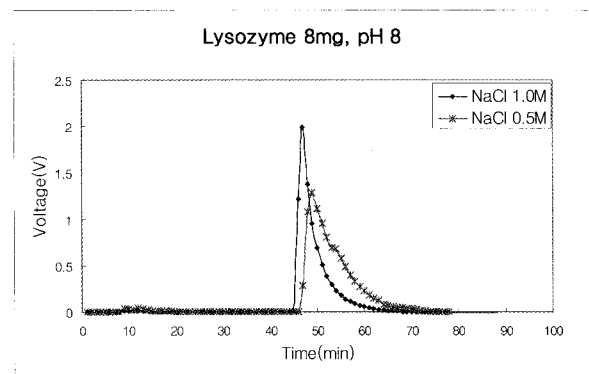


Figure 1. Variation of voltage according to the increase of NaCl (concentration); Lysozyme: 8 mg, Buffer solution: pH 8.

pH의 변화가 분리에 미치는 영향을 알아보기 위해 lysozyme 주입량 4 mg, NaCl 1.0 M의 조건에서 인산 완충용액 pH를 pH 6, 7, 8로 변화시키면서 실험을 수행하였다. Fig. 2에서 pH 8일 때는 47분에 0.981 V, pH 7일 때는 49분에 0.938 V, pH 6일 때는 51분에 0.781 V의 최대 피크값을 보임을 관찰하였다. pH가 증가할수록 최대 피크 높이

가 증가하며, 분리 시간이 짧아지는 것을 알 수 있었다. 이는 pH가 등전점에서 멀어질수록 단백질이 갖는 총 전하는 증가하기 때문이다. 즉 pH가 높아져서 pI 10.5에 근접하게 됨에 따라 고정상과 lysozyme의 상호 결합력이 약해지게 된다. pH 8일 때, 가장 작은 상호 인력을 가지고 lysozyme의 탈착이 가장 빠르게 이루어진다(6).

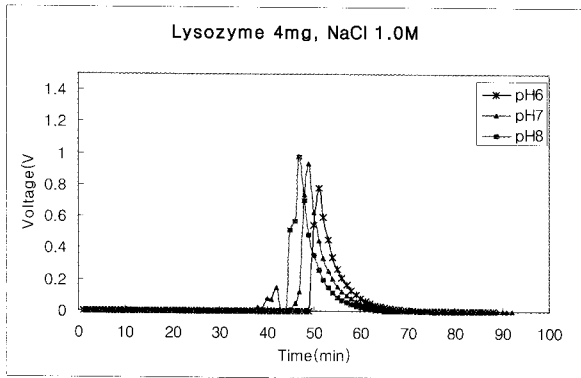


Figure 2. Variation of voltage according to the increase of buffer solution pH; Lysozyme: 4 mg, NaCl: 0.5 M.

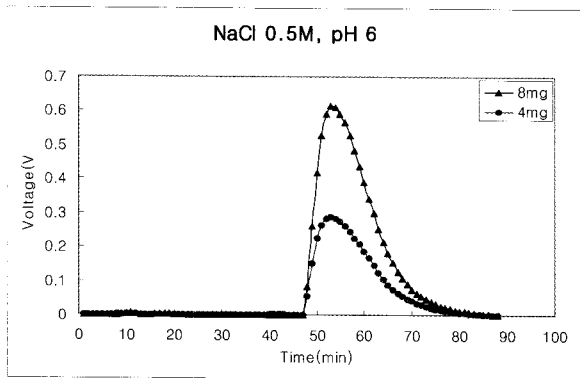


Figure 3. Variation of voltage according to the increase of lysozyme loading; NaCl: 1 M, pH 6.

Fig.3은 주입량의 변화가 크로마토그램에 미치는 영향을 보기위해 pH 6, NaCl 0.5 M의 조건에서 lysozyme 4 mg과 8 mg을 주입한 결과이다. Lysozyme 4 mg에서는 53분에 0.288 V, 8 mg에서는 53분에 0.615 V의 최대 피크값을 얻었다. 주입량이 2배일 때, 최대 피크의 높이도 2배로 높아짐을 확인하였다. 그리고 최대 피크 높이가 나타나는 시간은 주입량에 관계없이 일정하였다. 이는 lysozyme의 주입량이 등온 흡착식의 비선형 영역에 들어가지 않아 피크 시간이 변화하지 않음을 나타낸다.

**Simulation 결과의 비교**

pH 8, lysozyme 8mg의 조건에 대해 시뮬레이션과 비교한 Fig.4.에서 최대 피크 시간은 실험과 전산모사가 동일하였고 탈착 초기부터 피크에 도달하는 때까지는 전산모사 결과가 실험과 잘 일치하지만 피크 시간 후에는 실험의 피크 끌림 현상을 잘 표현하지 못했다. 이는 pH 8 실험에서 lysozyme 탈착 과정이 Yamamoto 식으로 잘 표현되지

못함을 의미한다. pH 8에서 NaCl과 lysozyme 단백질의 관능기에 대한 경쟁을 표현한 식이 칼럼안에서 탈착현상을 잘 표현하지 못함을 의미한다(7).

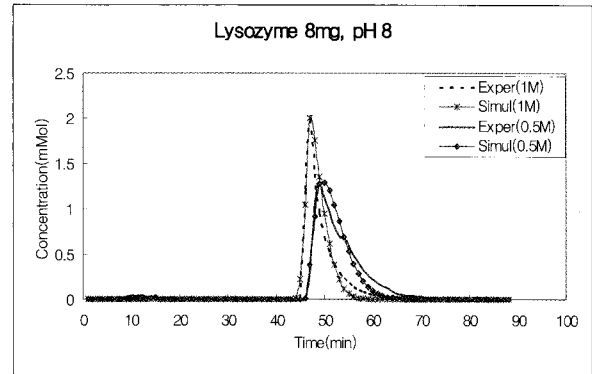


Figure 4. Comparison of chromatograms between experiment and simulation; lysozyme 8 mg, buffer solution pH 8, NaCl 0.5 M and 1 M.

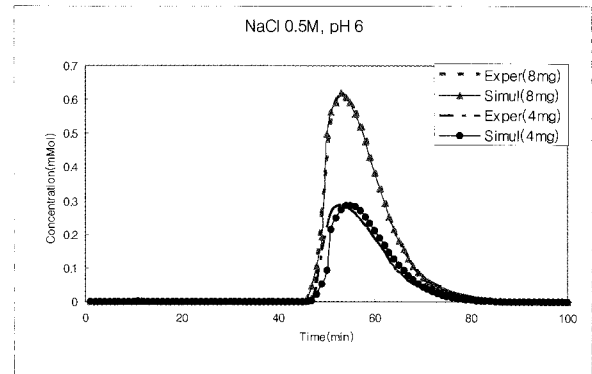


Figure 5. Comparison of chromatograms between experiment and simulation; buffer solution pH 6, NaCl 0.5 M.

Fig.5에서 pH 6, NaCl 0.5 M의 조건에서 주입량 변화에 대한 실험과 시뮬레이션 결과를 비교하였을 때, 실험과 시뮬레이션의 최대 피크 농도는 동일하였고 비선형 영역에 적용한 Yamamoto 흡착 모델이 피크의 끌림 현상을 잘 표현함을 알 수 있다. 실험과 전산모사의 비교에서 pH 6의 비교가 pH 8의 비교보다 우수한 것으로 보아 양이온 교환젤과 lysozyme의 결합력이 강한 pH 6의 경우 Yamamoto 식이 전산모사에서 유용한 모델임을 알 수 있었다.

**요 약**

이온교환 크로마토그래피에서 주요 변수로 샘플 투입량, 용출 NaCl 농도, 용출액 pH를 변화시켜 lysozyme 크로마토그래피 실험을 하였다. 그리고 Aspen Chromatography simulator를 이용하여 위의 변수 변화에 대한 모사된 크로마토그램을 얻고 그 모사결과들을 실험 결과와 비교하였다. 용출 용액 NaCl의 농도가 높아질수록 단백질의 머무름 시간이 감소하며, 최대 피크의 높이가 높아졌다. pH가 증가함에 따라 최대 피크 높이가 증가하며, 분리 시간이 앞

으로 이동하였다. 단백질의 주입량에 따라 분리 시간에 상관없이 최대 피크 높이만 비례적으로 증가하는 것을 확인하였다. 그리고 실험을 통해 얻어진 결과와 시뮬레이션 결과의 비교를 통해 같은 경향을 보임을 확인하였다.

### 감 사

본 연구는 인하대학교 초정밀 생물분리기술 연구센터의 연구비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

1. Huh, Y. S., H. W. Kim, and I. H. Kim (2003), Purification of Lysozyme from Egg White by Multicycle Ion Exchange Chromatography, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**(2), 1-7.
2. Yao, S. J., Y. X. Guan, and L. H. Yu (2003), Adsorption Performance of Proteins to CM Sepharose FF and DEAE Sepharose FF Adsorbents, *Korean J. Chem. Eng.* **20**(1), 93-98.
3. Lee, W. K and J. S. Ko (2003), Kinetic Model for the Simulation of Hen Egg White Lysozyme Adsorption at Solid/Water Interface, *Korean J. Chem. Eng.* **20**(3), 549-553.
4. Jin, L. M., S. K. Han, D. K. Choi, and K. H. Row (2005), Nonlinear Adsorption Isotherm of Single and Multi-Components of 2'-Deoxyribonucleosides, *Korea Chem. Eng. Res.* **43**(2), 230-235.
5. Aspen Chromatography User Manual (2002).
6. Kim, H. W. and I. H. Kim (2003), Comparison of Lysozyme Purification from Egg White Between Ion Exchange Chromatography and Precipitation, *HWAHAK KONGHAK* **41**(3), 332-336.
7. Kim, I. H. and J. T. Kim (1998), Pulse Response Test in Medium Pressure Protein Chromatography, *Korea J. Chem. Eng.* **15**(6), 575-579.