

달걀 단백질 분석을 위한 HPLC 연구

전 영 주 · 이 은 · † 김 인 호

충남대학교 화학공학과

(접수 : 2007. 4. 2., 게재승인 : 2007. 4. 20.)

HPLC Study for Egg White Analysis

Young Ju Jeon, Eun Lee, and In Ho Kim†

Department of Chemical engineering, Chungnam National University,

220, Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

(Received : 2007. 4. 2., Accepted : 2007. 4. 20.)

Since egg white contains various protein, it is important to research the protein distribution of egg white. Specially, lysozyme and ovalbumin important proteins, are used in medicine and food industry. Reversed phase high performance liquid chromatography has been used for separation of egg white, and column of RP-HPLC is available in variety. We have used C4, C8 and C18 columns to obtain chromatograms by varying carbon chain length of stationary phase. Long carbon chain length of stationary phase has good separation of egg white. Also, we have changed the composition of mobile phase (acetonitrile, water, and trifluoroacetic acid) to find optimum chromatograms. Acetonitrile and water composition of 50 : 50 show many peaks from egg white. Isocratic and gradient elution in RP-HPLC were used to compare the chromatography of egg white.

Key Words : RP-HPLC, gradient elution system, egg white

서 론

계란은 완전식품이라 불릴 정도로 인간에게 꼭 필요한 단백질, 탄수화물, 지방, 무기질, 비타민 등이 포함되어 있는 식품이다. 보통 계란 흰자로 불리고 있는 난백은 순수 단백질 덩어리라고 할 수 있을 정도로 많은 단백질을 함유하고 있어 난백을 섭취하는 것은 순수 단백질만 섭취하는 것과 같다고 할 수 있다. 따라서 지방과 탄수화물의 섭취를 줄일 수 있어 다이어트 효과에도 좋다. 그 중에서도 ovalbumin이나 lysozyme 단백질은 현재 음식 산업과 제약 부분에 많이 이용되고 있는 단백질이다(1). Lysozyme은 항염증 작용, 항출혈 작용, 항세균 작용 등의 특성을 지니고 있어 소염효소제로 사용되거나 궤양, 감염, 상처의 치료에도 사용된다. 또한 여러 발효제품의 보존제로 사용하기도 한다(2). 이런 lysozyme은 동물의 조직, 체액, 식물 및 미생물 등에 널리 분포되어 있고 그 중 난백에서 함량이 약

0.3%로 가장 높으며 추출조작이 비교적 용이하기 때문에 추출원료에 가장 적합한 것으로 알려져 있다(3). 난백에 50% 이상 존재하는 ovalbumin은 인류의 식품 및 약리 분야에서 유용한 재료이며, 이러한 연구 및 개발의 활성화를 위한 선결 과제로 분리, 분석 실험을 통해 ovalbumin의 특성을 파악하는 것은 중요한 작업이다(4).

난백 분리 방법으로 이온교환, 겔 투과, RP-HPLC방법이 사용되는데 특히 RP-HPLC는 다른 방법보다 시료의 준비가 쉽고 수율 및 순도가 높고 추출 후 난백의 재활용이 가능하여 산업적으로 이용되고 있다(5). 역상 크로마토그래피는 극성 용매를 사용해 용리액 세기를 증가시킬 수 있다. 또한 뛰어난 분리를 얻을 수 있으며, 극성 물질이 극성 충전물에 흡착되어 일어나는 봉우리 꼬리 끌기 현상을 제거할 수 있다. 또한 역상 크로마토그래피는 용리액에 포함되는 극성 불순물에 덜 민감하다(6).

크로마토그래피는 여러 가지 파라미터에 의해 분리가 좌우된다. 우선 컬럼은 고정상의 관능기에 따라 다르다. 단백질 분리에는 C4, C8, C18 컬럼을 사용한다. 이들 컬럼은 Si 표면 위에 각각 C4H9, C8H17, C18H37의 관능기를 가지고 있다. 또한, 어떤 이동상을 선택하느냐가 중요하다. RP-HPLC에서는 소수성 단백질에 ethanol, isopropanol, acetonitrile을 사용한다. 난백 단백질에서는 이동상은 고정

† Corresponding Author : Department of Chemical engineering, Chungnam National University, 220, Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

Tel : +82-42-821-5685, Fax : +82-42-822-8995

E-mail : ihkim@cnu.ac.kr

상의 특성을 변화시키지 않아야하며 점도가 작고 순수하고 시료를 쉽게 재생시킬 수 있어야 하여 acetonitrile을 많이 이용한다(5). 이동상의 조성은 등용매 용리와 기울기 용리 두 가지 방법이 있다. 등용매 용리는 한 가지 조성만 가지고 있기 때문에 특정 물질을 잘 분리하지 못한다. 하지만 기울기 용리는 등용매 용리와 달리 시료가 컬럼을 지나는 동안 이동상의 조성을 변화할 수 있다. 기울기 용리의 장점은 분석시간이 단축되며 피크의 모양이 Gaussian type의 대칭성이 되어 분리도가 증가한다(6).

본 연구에서는 난백 단백질 내의 lysozyme와 ovalbumin 분석을 목표로 하였다. 우선, 단백질 분리에 사용하는 C4, C8, C18 컬럼을 비교하여 분리도가 좋은 컬럼을 선택하였고, 선택된 컬럼에 이동상의 조성을 바꾸어가며 등용매 용리를 하였다. 여러 등용매 용리 조성을 통하여 최적의 이동상 조성을 찾았으며, 이 조건을 토대로 기울기 용리 조성을 선택하여 난백을 분석하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

시료는 시중에서 구입한 egg white와 lysozyme, ovalbumin (Sigma, USA)을 사용하였다. 시료는 증류수와 이동상에 잘 녹지 않기 때문에 원심분리기를 이용하여 30분간 2000 rpm으로 분리한 후 멤브레인 필터 (0.22 μ m GVPP, Millipore, USA)를 통한 여과 과정을 거친 후 시료로서 사용하였다. 컬럼 비교를 위해 사용된 컬럼은 BioBasic C4, C8, C18 (ThermoHypersil-Keystone, USA)이며 크기는 150 \times 4.6 mm이며 기울기 용리에 사용된 컬럼은 Luna C18 (Phenomenex, USA) 크기는 250 \times 4.6 mm이다. 이동상은 Acetonitrile (ACN, 99.9% Duksan, Korea)와 Trifluoroacetic acid (TFA, 99% Aldrich, USA), 증류수를 사용하였다. 특히 ACN은 0.22 μ m의 멤브레인 필터로 감압, 여과하였다. 이동상에 존재하는 공기를 제거하기 위해 sonicator (Brason, USA.)로 20분간 탈기한 후 사용하였다. HPLC 장치로 펌프는 model 700 (Young-lin, Korea)을 사용하였다. 기울기 용리를 하기위해서 이 펌프를 master로 같은 모델의 또 하나의 펌프를 slave로 사용하였다. UV detector는 model 720 (Young-lin, Korea)을 사용하였고 파장은 280 nm으로 고정하였으며 데이터 수집은 Autochro-2000 (Young-lin, Korea)을 사용하였다. 모든 실험은 상온에서 실험하였다.

등용매 용리

컬럼 선택을 위해 C4, C8 컬럼과 이동상으로 ACN과 증류수의 비율을 50 : 50, pH 조절을 위해 TFA 0.1%를 첨가하여 HPLC 분석하여 크로마토그램을 비교하였다. C8 컬럼의 분리도가 좋아 C18 컬럼과 같은 이동상에서 비교하였다. 최적의 등용매 용리 조건을 찾기 위해 가장 많은 피크를 보인 C18 컬럼을 이용하여 이동상으로 ACN과 증류수의 조성을 각각 30 : 70, 40 : 60, 50 : 50, 60 : 40으로 비교 실험하였다. 난백의 농도는 1 g/l, 시료는 100 μ l 주입하였으며 유량은 1 ml/min으로 하였다.

Table 1. Gradient elution condition

Time (min)	ACN (%)	water (%)
0	40	60
20	60	40

기울기 용리

이동상은 master 펌프에 100% ACN이 slave 펌프에는 100% 증류수가 연결되었다. 등용매 용리를 통해 50 : 50에서 가장 많은 피크가 나타났으므로 이 결과를 바탕으로 기울기 조건을 Table 1로 하였다. 피크가 많이 나타나는 ACN 40~60%에서는 기울기를 천천히 변화시켰다. 난백의 주입량은 100 μ l이며 유량은 1 ml/min으로 하였다. 등용매 용리와 달리 회석이 많이 되어 흡광도가 낮기 때문에 난백의 농도는 등용매 용리와 다르게 3 g/l을 하였다. 난백에 함유되어 있는 lysozyme와 ovalbumin 단백질을 확인하기 위하여 단일 성분인 lysozyme와 ovalbumin의 HPLC chromatogram을 얻었다. 1 g/l의 농도를 사용하였고 주입량은 100 μ l, 유량은 1 ml/min으로 하였다.

결과 및 고찰

컬럼 선택

난백 분리에 사용할 컬럼을 선택하기 위해 C4와 C8 컬럼을 비교하였다(Fig. 1). 비교 결과 C8 컬럼이 더 좋은 분리도를 보이고 있다. 또한 C8과 C18의 비교 측정은 C18 컬럼에서 더 많은 피크를 보이고 있다(Fig. 2). Abalo 등(7)에 의하면 물에 잘 녹지 않는 단백질은 알킬 그룹이 짧고 작은 사이즈의 고정상인 컬럼이 좋다고 하여 C4의 컬럼을 이용하였지만 Hiroko Itoth 등(8)은 C18 컬럼에서도 lysozyme와 ovalbumin도 분리가 잘 되는 것을 보였다.

본 실험도 C18에서 더 많은 피크를 보였기 때문에 C18 컬럼이 난백 단백질 분리에 좋은 컬럼으로 확인하였고 이 컬럼으로 실험을 계속하였다.

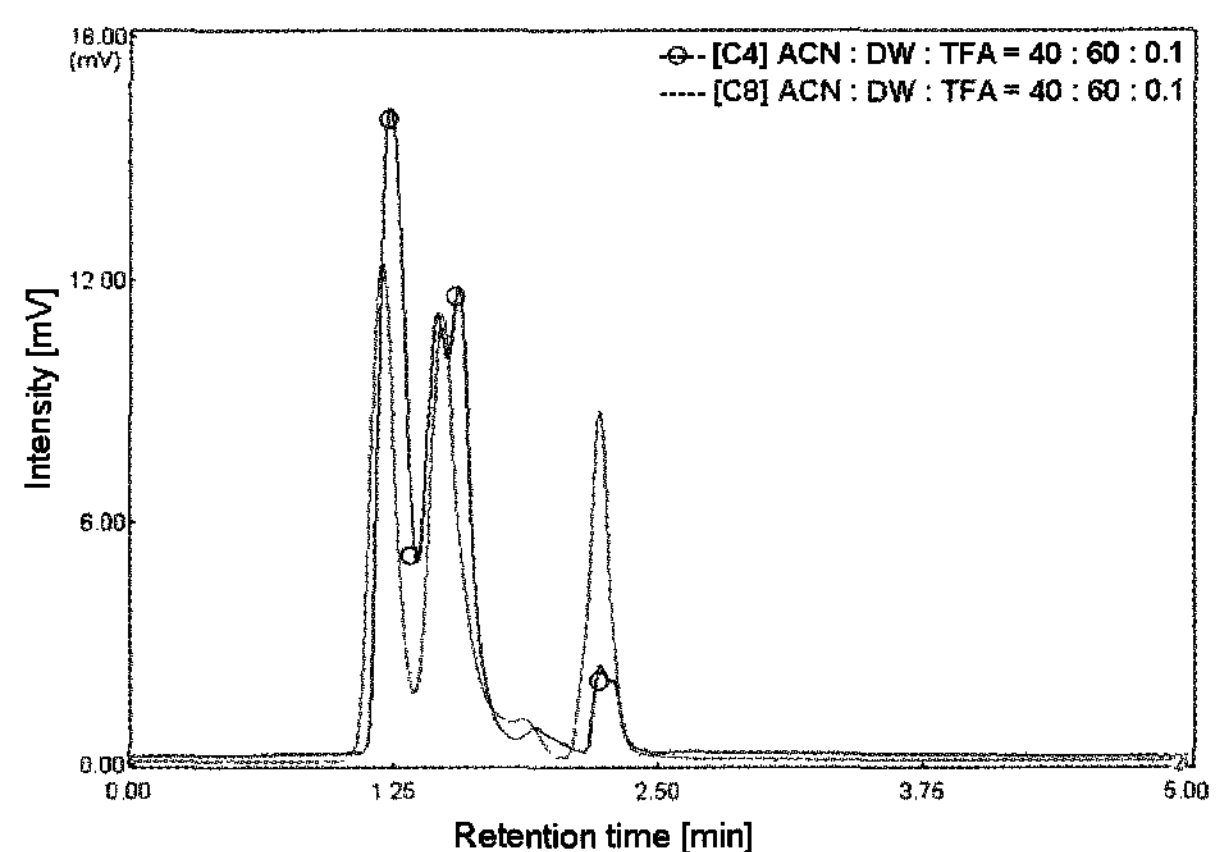


Figure 1. Chromatogram of egg white From C4 and C8 columns.

등용매 용리

가장 많은 피크를 보인 C18 컬럼을 이동상인 ACN과 증류수의 조성을 각각 30 : 70, 40 : 60, 50 : 50, 60 : 40으로

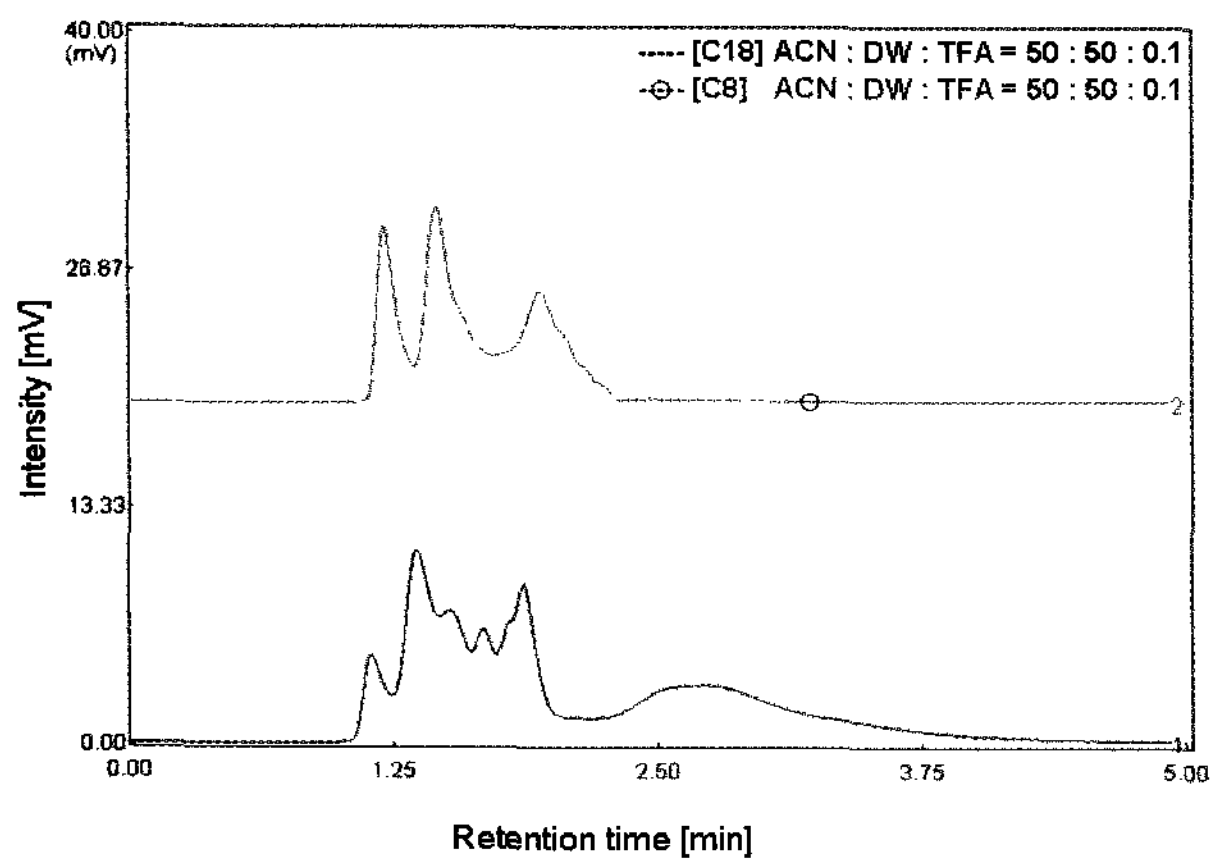


Figure 2. Chromatogram of egg whit from C8 and C18 columns.

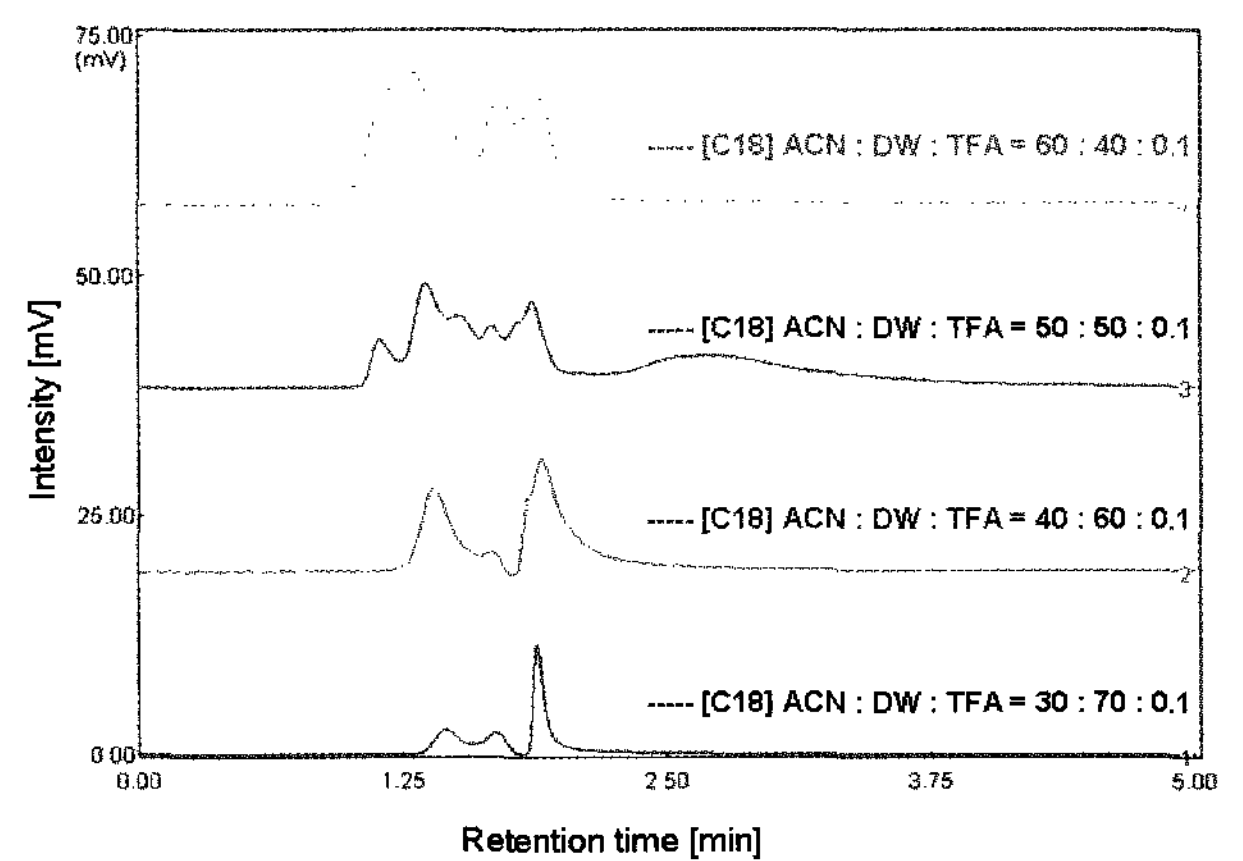


Figure 3. Chromatogram of egg white with change of mobile phase compositions in C18 column.

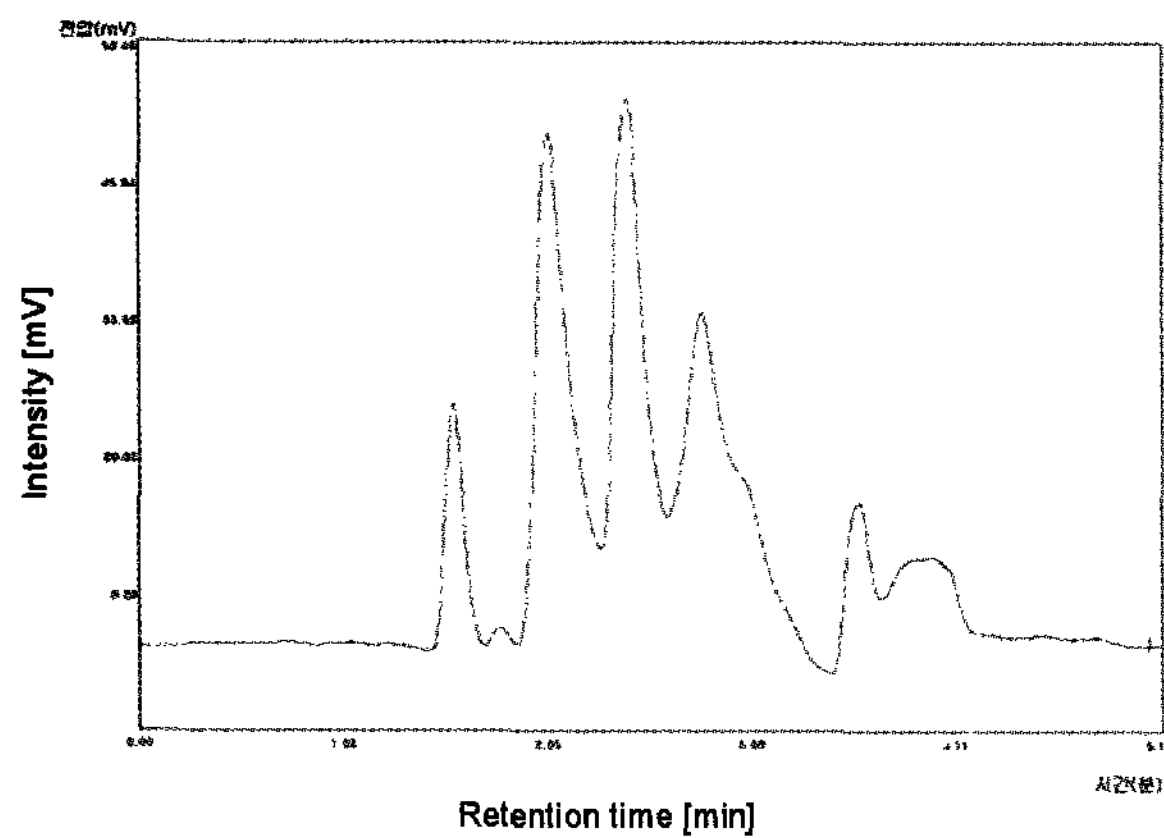


Figure 4. Chromatogram of egg white under table1 gradient condition.

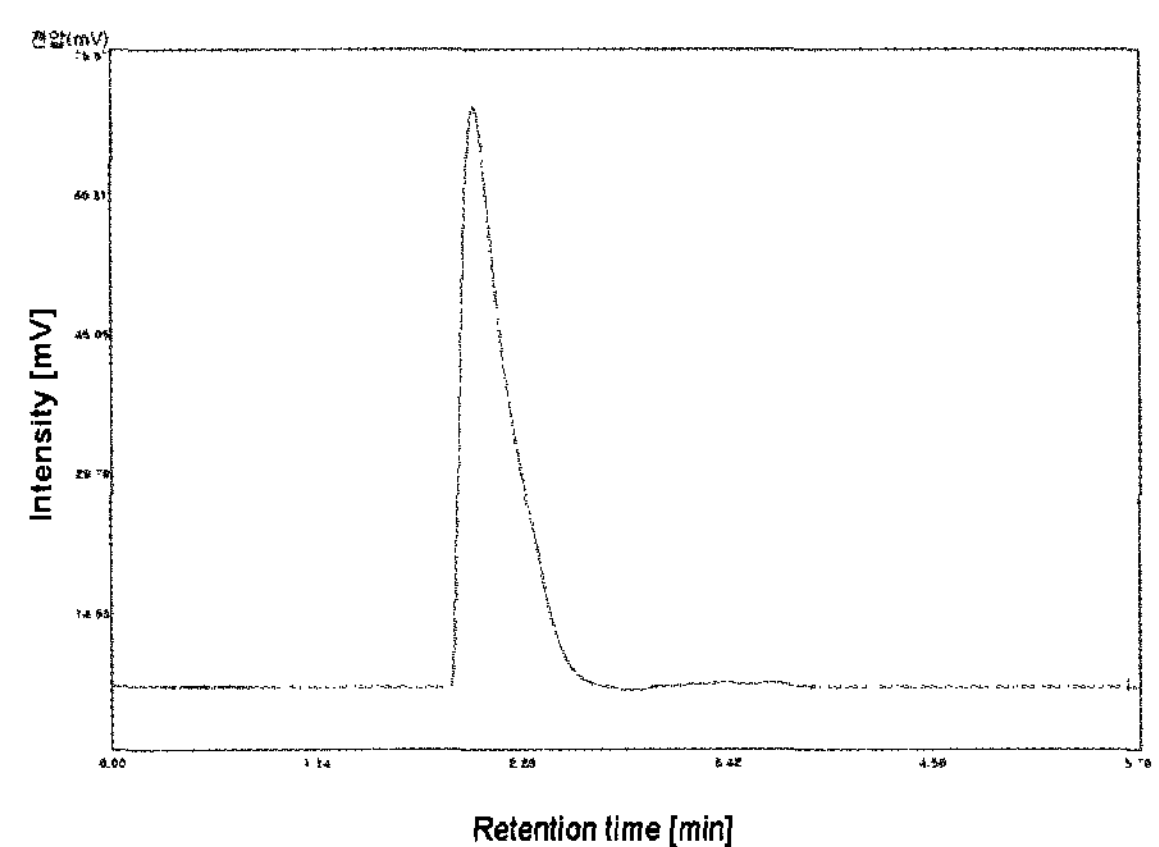


Figure 5. Chromatogram of lysozyme under table1 gradient condition.

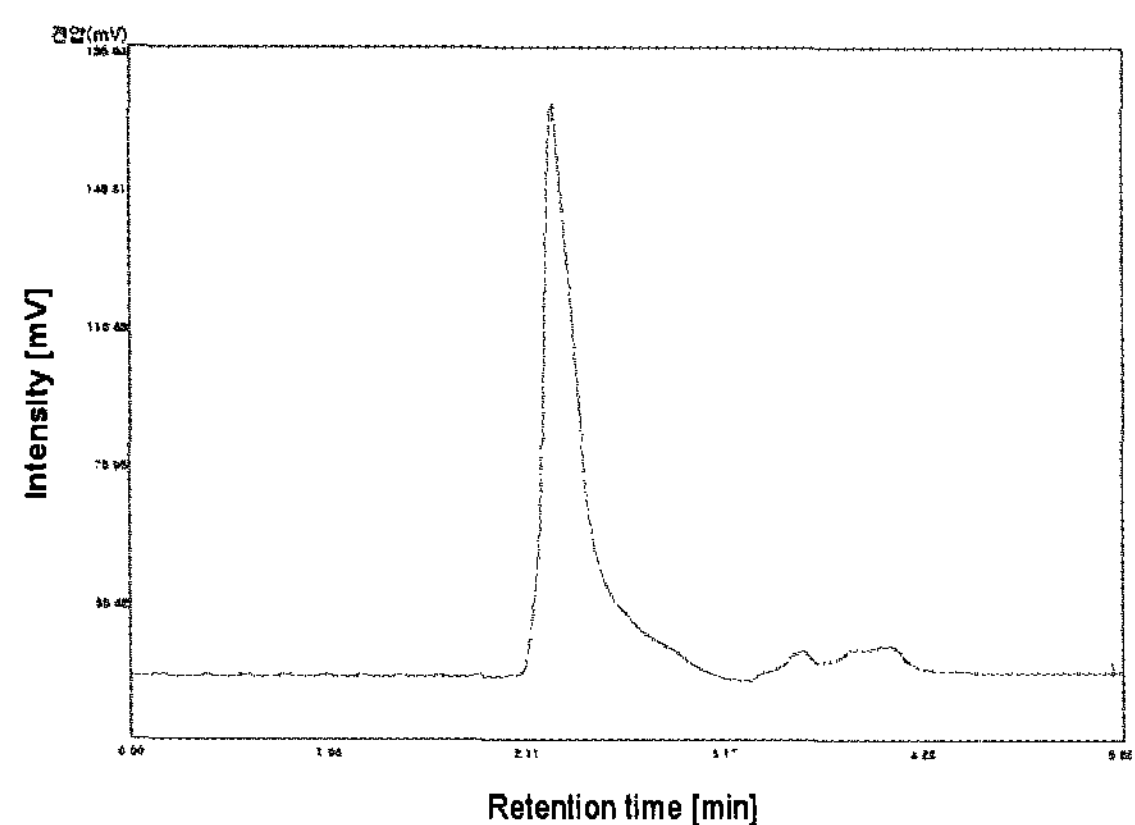


Figure 6. Chromatogram of ovalbumin under table1 gradient condition.

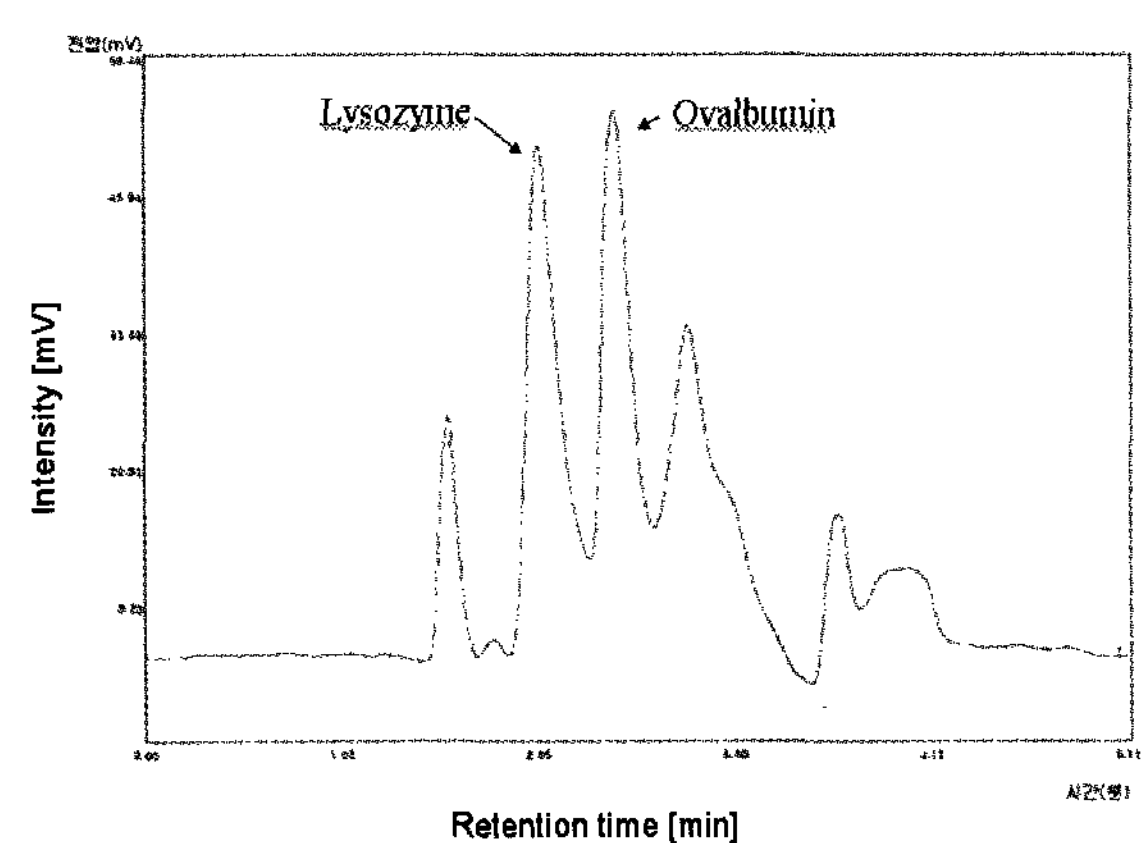


Figure 7. Chromatogram of egg white under table1 gradient condition.

비교 측정하였다(Fig. 3). Fig. 3에서 보듯이 50 : 50 조건에서 가장 많은 피크를 보이고 있다. 그러나 난백에 들어 있는 많은 단백질들의 피크가 분리되지 않고 서로 겹쳐 있기 때문에 이 결과를 토대로 난백을 ACN의 조성이 50% 근처에 분리가 잘되도록 기울기 용리 HPLC 실험을 계속 하였다.

기울기 용리

등용매 용리와 달리 크게 4가지의 피크가 분리되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 4). 4가지 피크는 난백 단백질에 많이 들어있는 ovalbumin, conalbumin, ovomucoid, lysozyme과 ovomusin의 5가지 성분 중에서 예측할 수 있지만 Abalo C 등(7)에 의하면 ovomusin은 0.45 μ m 필터에서 투과하지 못한다고 하였다. 본 실험은 더 작은 사이즈의 0.22 μ m의 필

터를 사용하였기 때문에 5가지가 아닌 4가지의 피크를 확인할 수 있었다. 분리된 성분을 확인하기 위하여 lysozyme와 ovalbumin를 같은 조건의 기울기 용리를 하여 분석하여 Lysozyme은 Fig. 5에서 2분의 체류시간을 확인하였고 ovalbumin의 체류시간을 측정하였는데(Fig. 6) 2분 30초였다. 난백 크로마토그램에서 같은 체류시간의 피크를 확인하여 Fig. 7과 같이 난백크로마토그램에서 2개의 피크를 확인하였다. 난백 단백질의 50%를 차지하는 ovalbumin의 피크가 상대적으로 작게 나온 이유는 Abalo 등(7)에서 분자량이 크고 강한 소수성인 ovalbumin이 용출 후에도 30%가 컬럼에 남았기 때문이다. 4가지 피크 중 다른 2가지의 피크는 F. Nau 등(5)과 Abalo 등(7)의 결과로 가장 먼저 나오는 피크는 ovomucin, 나머지 피크는 conalbumin으로 예상할 수 있었다.

요 약

RP-HPLC에서 주요 변수인 이동상의 조성과 컬럼의 종류를 변화시켜 난백 단백질을 실험하였다. C4, C8 C18 컬럼을 비교 실험하여 C18 컬럼에서 가장 많은 피크를 보여 C18 컬럼을 선택하였다. 등용매 용리에서 ACN : water의 조성이 50 : 50에서 가장 많은 피크를 보여 이 결과를 토대로 기울기 용리를 하여 실험하였다. 기울기 용리에서 얻어진 4가지 피크를 확인하기 위하여 단일성분인 lysozyme와 ovalbumin의 체류시간을 측정하여 확인하였고 논문을 통해 2가지 피크를 예측할 수 있었다.

감 사

본 연구는 충남대 학술 진흥 재단의 연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Lu, J., Y. Wan, and Z. Cui (2006), Strategy to separate lysozyme and ovalbumin from CEW using UF, *Desalination*, **200**, 477-479.
2. Kim, W. K. and B. H. Chung (1999), Optimization of chromatographic separation of lysozyme from homogenate of hen egg white by comparison of breakthrough behavior, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**(3), 279-283.
3. Kim, H. W. and I. H. Kim (2003), Comparison lysozyme purification from egg white between ion exchange chromatography and precipitation, *HWAK KONGHAK* **41**(3), 332-336.
4. Huntington, J. A. and P. Stein (2001), Structure and properties of ovalbumin, *J. Chromatogr. B* **756**, 189-198.
5. Nau, F., A. Mallard, J. Pages, and G. Brule (1999), Reversed-phase liquid chromatography of egg white proteins. Optimization of ovalbumin elution, *J. Liq. Chrom.&Rel. Technol.* **22**(8), 1129-1147.
6. Guiochon, G., Golshan-Shirazi, A. M., S. Katti (1994), Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography, P393-397, Academic Press, Boston.
7. Awade, A. C. and T. Efstathiou (1999), Comparison of three liquid chromatographic methods for egg-white protein analysis, *J. Chromatogr. B* **723**, 69-74.
8. Itoh, H., N. Noriyuki, T. Kinoshita, N. Nagae, and N. Mitsugu (1991), Fast protein separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography on octadecylsilyl-bonded nonporous silica gel, *Anal. Biochem.* **199**, 7-10.