

광화학적으로 제조된 Superoxide Radical을 이용한 Superoxide Dismutase를 생산하는 해양미생물의 탐색 및 효소정제

조기용

한국해양연구원 해양천연물연구실

해양세균으로부터 superoxide dismutase를 생산하는 균주를 광화학적 superoxide ion 형성 및 nitrite 정량 방법으로 검색하여 고효성 균주 B-446을 확보하고 본 균주로부터 35-75% ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex A-25 ion exchange chromatography, Sephadex G-200 gel filtration chromatography, High-Q anion exchange chromatography 그리고 HPLC-GPC를 이용하여 수율 6%, 정제도 32.3 배의 정제된 SOD를 얻었으며 정제 과정에서 효소활성 분석에 본 광화학적 superoxide ion 생성 방법으로 사용하였다.

Key words □ marine bacteria, superoxide dismutase (SOD)

생체 에너지의 생산에 산소를 최종 전자수용체로 이용하는 것은 매우 높은 효율의 에너지생산을 보장하지만 이를 가능하게 하는 모든 생명체는 대사과정에서 발생하는 활성산소종 (Reactive oxygen species, ROS)에 의한 산화의 위험을 안고 있다. 이들 활성산소종 중에서 가장 쉽게 먼저 생기는 것이 산소분자가 1개의 전자를 받아 생성되는 superoxide radical이다. Superoxide radical은 추가로 1 개의 전자를 더 받게 되면 과산화수소를 형성하며 여기서 1 개의 전자가 더해지면 peroxide bond에 환원적 분해가 일어나 hydroxide 이온과 hydroxyl radical이 형성된다(2). 이들은 산화반응의 유발자인 동시에 자체가 가지고 있는 높은 반응성으로 인해 암발생의 원인이 되거나 노화를 촉진시키는 등 여러 부작용도 보이고 있다. 따라서 생명체는 이러한 산화반응에 대응하기 위하여 superoxide dismutase (EC1.15.1.1.), glutathione peroxidase, peroxidase, catalase 등과 같은 항산화 효소를 생산하여 산소의 독성에 대하여 세포를 방어한다.

이들 중 Superoxide dismutase (SOD)는 산소분자가 1 개의 전자를 받아 환원된 superoxide radical ion (O_2^-)을 제거하는 반응을 수행하는 효소로서 2 분자의 superoxide radical을 disproportion 반응을 통하여 1 분자의 산소와 1 분자의 과산화수소를 생산하게 된다. 산소 호흡으로 생명을 유지하는 생물들의 생체내에서 필연적으로 발생하는 활성 산소종들을 첫 번째 단계에서 제거하는 생체 방어 체계의 일종이다(10). SOD는 활성위치에 존재하는 산화 환원 금속의 종류에 따라 Mn-SOD, Fe-SOD, 그리고 Cu/Zn-SOD의 3 종류로 구별하며 세균 SOD는 거의 대부분 Mn-SOD 이거나 Fe-SOD 인 것으로 알려져 있으나 예외적으로 Cu/Zn-SOD를 갖는 경우도 보고되어있다(2,7,8). 특히 유제품 생

산에 현재 이용되고 있는 무해한 세균 *Streptococcus lactis*는 Mn-SOD를 생산하는데 이 균주의 이러한 성질을 이용하여 SOD를 함유하는 유제품의 개발에도 이용되고 있다(12).

SOD의 지방 산화를 억제하는 천연 항산화제로서의 응용가능성은 Michelson과 Monod에 의해 처음 논의된 후(9) 노화방지, 건강기능성 소재, 또 국소 빈혈 치료 및 동맥경화, 암, 당뇨병 등의 의료용 치료제로서의 가능성도 주목받고 있다(10). 또 자유산소 라디칼 등에 의하여 야기되는 통증 치료 등 소염 진통제나 피부 보호를 위한 화장품 첨가제로 그 이용범위가 넓어 SOD 자체 뿐만 아니라 유사한 활성을 보이는 저분자 물질의 탐색(4,11)이나 합성에 의한 활성 분자의 개발도 연구되고 있다(6). 본 연구에서는 해양 미생물을 대상으로 SOD의 생산을 효율적으로 탐색하는 방법을 사용하여 고역가 SOD 생산 균주를 획득하고 이로부터 분리정제 및 효소 특성 조사에 새로운 재료로 SOD의 이용 가능성을 연구하였다.

재료 및 방법

재료

FMN, hydroxyl amine, Tris base, Tris · HCl, EDTA, sulfanilic acid, acetic acid, 1-naphthyl amine 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)에서 구입하였으며 FMN은 DEAE-cellulose ion exchange column chromatography를 이용하여 추가 정제한 후 5 mM 농도로 제조하여 1 ml 씩 나누어 냉동고에 보관하며 사용하였다.

균주수집

해양생물을 채집한 현장에서 내장 및 조직 생물 시료를 약 1 g 씩 취한 후 2.2 ml polypropylene tube에 넣고 여기에 미리 준

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-400-6171, Fax: 031-408-4493
E-mail: kwcho@kordi.re.kr

비된 멸균된 해수를 1 ml 씩 가하여 일회용 homogenizer로 잘게 분쇄한 뒤 상층액을 평판 배지에 순차적으로 도말하는 방법으로 해양생물 공생 미생물 등 생물체내에 함유된 균주를 분리하였다. 균주를 분리하기 위한 배지로서는 세균의 경우는 주로 ZoBell 배지(0.5% peptone, 0.1% yeast extract, agar 15 g/l, 속성해수 50%, pH 7.0) 및 Sea Water Complete 배지(0.5% Bacto tryptone, 0.3% yeast extract, 0.3% (v/v) glycerol, agar 15 g/l, 속성해수 75%, pH 7.0)를 사용하였다. 형성된 균체 집락들을 육안으로 그 집락 형태를 관찰하여 특성에 따라 새로운 고형 배지에 접종하여 동일 형태의 순수 집락을 형성하도록 3 일간 25°C에서 배양한 후 순수 분리하였다.

분리장소는 거문도, 삼부도, 백도, 거제도, 남해도등 남해 일원을 중심으로 동해안과 서해안을 포함하고 아울러 태평양 심해저 시료와 남극 세종기근 근처 해역의 시료를 대상으로 해양세균과 방선균을 중심으로 수집하였으며 분리된 균주는 glycerol을 20% 함유한 멸균 해수에 현탁하여 -70°C에 보관하였다.

Superoxide Dismutase 생산 균주 검색 및 효소활성도 측정

Agar plate에서 자란 탐색 대상 균주를 loop로 약 50 mg 정도 취하여 시험관에 옮기고 Tris buffer (25 mM Tris · HCl, 1 mM sodium EDTA, pH 8.0) 1 ml에 현탁한다. 여기에 다시 1 ml의 toluene을 가하고 1 분간 vortex로 섞어준 후 층이 분리될 때까지 얼음물에 담가둔다. 층이 분리된 후 0.1 ml의 수용액층(효소액)을 회수하여 여기에 1 ml의 Tris buffer (25 mM Tris · HCl, 1 mM sodium EDTA, 10 μM FMN, 5 mM hydroxyamine, pH 8.0)을 가하여 잘 섞어준 후 25°C에서 형광등으로 빛을 쬐어 25 분간 방치한다. 반응물에 각각 1 ml씩의 naphthyl amine 용액 (7 mM, 4.2 M acetic acid 함유)과 sulfanilic acid 용액 (20 mM, 4.2 M acetic acid 함유)을 가하고 20 분 후 spectrophotometer (Milton-Roy MR-3000, Rochester, USA)를 이용하여 530 nm에서 흡광도를 측정한다. SOD activity=[A_{530 nm} (sample)]⁻¹·[A_{530 nm} (control)]⁻¹으로 결정하였다. 단백질의 정량은 280 nm에서의 흡광도 1.0을 1 mg/ml 추정하여 계산하였다.

SOD의 정제

Late exponential phase에 도달한 균주를 0.2 μm pore size의 tangential flow filter (3,500 cm² surface, Amicon Co., Beverly, USA)를 이용하여 2 l로 농축시키고 High speed centrifuge (Vision Science Co., Seoul, Korea)로 15,000×g에서 20 분간 원심분리하여 균체를 수확하였다. 100 g정도의 균체를 얻은 후 여기에 미리 4°C로 식혀둔 900 ml의 buffer (5 mM phosphate buffer, 10 mM EDTA, pH 7.0)를 가하여 4°C에서 1 시간동안 교반 시킨다. 세포파괴를 보다 확실하게 하기 위하여 초음파분쇄기 (VCX-500, Sonic and Material, Danbury, USA)를 이용하여 얼음물에 담긴 상태에서 1 분간 초음파를 가하고 1 분간 교반 시키는 과정을 5 회 반복한다. 세포내 추출물을 분리하고 파괴된 세포 부스러기를 제거하기 위하여 25,000×g에서 30 분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 이 상등액에 ammonium sulfate를

가하여 농도 35%와 75% 포화도 사이에 침전된 침전물을 회수하였다. 이를 20 ml의 50 mM Tris · HCl buffer (pH 8.0)에 녹인 후 Econo 10-DG desalting column으로 ammonium sulfate를 제거한 후 이를 DEAE-Sephadex column (2.5 cm×30 cm)에 가하고 0.1 M에서 0.8 M까지 NaCl 농도구배를 형성하는 50 mM Tris · HCl buffer (pH 8.0)로 column을 용출시켜 5 ml씩 분취하여 SOD 활성도를 보이는 분을 회수하여 한외여과 (Amicon stirred cell, 50 ml capacity, with PM30 membrane filter)하여 5 ml로 농축하였다. 이를 Sephadex G-200 column (2.5 cm×95 cm)에 가하고 column을 0.1 M NaCl을 포함한 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 용출시켰다(Flow rate=10⁻¹² ml/hr). 활성 분획을 모아 MWCO 30,000 dalton으로 한외여과하여 5 ml로 농축하고 이를 High-Q cartridge (Bio-Rad Co., 5 ml capacity)에 가하고 0.1 M에서 0.8 M까지 NaCl 농도구배를 형성하는 50 mM Tris · HCl buffer (pH 8.0)로 column을 용출시켜 5 ml씩 분취하여 SOD 활성도를 보이는 분획을 회수한 후 다시 한외여과하여 5 ml로 농축하였다.

결과 및 고찰

해양미생물로부터 유용효소 검색을 위하여 분리된 균주는 본 기간 중 모두 2,500 여 균주였으며 여기서 고역가의 SOD 생산 균주는 145 균주였다. 이들 중 가장 효소활성이 우수한 균주는 균주번호 B446과 B328로 이들 중 B446 균주를 본 연구의 일차 대상으로 선정하였다. 전반적으로 해양성 세균에서는 SOD의 활성이 거의 보편적인 현상으로 여겨질 만큼 일반적으로 검출된다. 이는 해양조건이 대체로 낮은 온도를 유지하고 있고 이 온도에서는 산소의 용해도가 높아져 전반적으로 높은 산소 분압에 노출되어 있다는 사실과 연관이 있는 것으로 추정된다. 본 균주의 최적 배지 선정을 위하여 ZoBell, Sea water complete, 75% sea water LB 배지 등을 사용하여 성장과 단위 균체당 SOD 활성을 검사한 growth curve를 구한 결과 Sea water complete가 가장 우수한 배지로 밝혀져 이를 주 배양 배지로 사용하였다. 균체를 SWC 배지에서 배양한 결과 배양 20 시간에서 최대의 효소활성도를 보였으며 이 때의 건조 균체량은 3.5 g/l였으며 활성은 428 Unit/g dry cell 이었다. 본 SOD는 cell mass에 따라 그 함량이 비례하여 증가하는 양상을 보였으며 stationary phase에 도달하면 급속히 활성이 낮아지는 현상을 보였다. 이에 따라 효소생산을 위한 균주회수의 시기는 초기 stationary phase에서 수행하였다.

SOD의 활성을 분석하는 assay 방법은 매우 다양하다. 우선 필요한 것이 지속적으로 superoxide radical을 형성하는 방법과 형성된 superoxide radical과 쉽게 반응하여 발색 등 검출을 쉽게 하는 물질이 필요한데 superoxide radical 형성을 위해서는 xanthine/xanthine oxidase (1), alkaline dimethyl sulfoxide (2) 등의 방법이 사용되고 superoxide radical과 반응하여 검출될 수 있는 물질로는 cytochrome C, nitro blue tetrazolium (NBT) 등이 사용된다. 본 연구에서는 superoxide radical 형성을 위하여 FMN

과 EDTA를 사용한 photochemical reduction을 사용하였고 superoxide radical과 반응하는 물질로는 hydroxylamine을 선택하였다. 반응의 원리는 다음과 같다.

- (1) $FMN+EDTA+O_2+light \rightarrow O_2^-$
- (2) $NH_2OH+O_2^-+H^+ \rightarrow NHOH+H_2O_2$
- (3) $NHOH+O_2^- \rightarrow NO_2^-+H_2O$

우선 반응(1)에서 FMN이 EDTA를 전자 공여자로 이용하여 광화학적 환원 반응에 의해 FMN₂로 전환되는데 이 반응은 무산소조건에서 수행하면 해양 발광 세균의 luciferase 분석시에 FMN을 환원시키기 위해 사용되는 방법과 동일하다(3). 그러나 유산소 조건에서는 다시 산소와 반응하여 FMNH-4a-hydroperoxide를 형성한 후 이 hydroperoxide의 분해에 의하여 flavin semiquinone과 superoxide radical이 형성된다(5). 이렇게 형성된 superoxide radical이 hydroxyl amine과 반응하여 NHOH를 형성하고 다시 nitrite를 형성하는데(반응 2, 3) SOD는 superoxide radical을 제거하여 nitrite의 생산을 저해한다. 이렇게 형성된 nitrite는 산성 조건에서 sulfanilic acid와 반응하여 diazo 화합물을 형성하고 이것이 다시 naphthyl amine과 반응하여 530 nm에서 최대 흡광치를 보이는 붉은색 화합물을 형성하는데 이 nitrite의 정량 과정은 해양 환경이나 수질조사 분야에서 질소 정량시에 흔히 사용되는 정량법이다. 본 분석 조건에서 SOD 효소활성도의 단위는 본 assay 방법이 위의 반응(1)에서 photochemical reaction의 결과 형성된 superoxide anion이 NH₂OH와의 반응을 경쟁적으로 저해하는 활성이므로 SOD activity (unit)=[A_{530 nm} (sample)]⁻¹·[A_{530 nm} (control)]⁻¹으로 결정하였고 이에 따르면 포함된 효소의 양과 activity가 가장 직선에 가까운 curve를 보인다.

해양세균 B-446 균주의 SOD의 분리 정제는 이 균체를 원심분리로 회수하여 ultrasonicator로 분쇄하여 얻은 조효소액으로부터 35-75% ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex A-25 ion exchange chromatography, Sephadex G-200 gel filtration chromatography, High-Q anion exchange chromatography 그리고 HPLC-GPC를 이용하여 수율 6%, 정제도 32.3 배의 정제된 SOD를 얻었다 (Table 1).

HPLC-GPC 에서는 분자량 75 kD에 해당되는 위치에 SOD peak가 나타나는데 정제된 SOD의 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis 결과 43 kD과 30 kD에서 2 개의 band를 확인할 수 있어 (결과는 명시하지 않음) 본 SOD는

43 kD과 30 kD의 분자량을 갖는 2 개의 subunit으로 구성된 heterodimer로 추정되었다.

해양세균 B446에서 분리된 SOD의 일반적인 특성을 알기 위한 실험에서 최적반응 온도는 본 효소는 35°C로 나타났으며 25°C에서는 35°C에 비해 약 85% 정도의 활성을 보이고 있어 비교

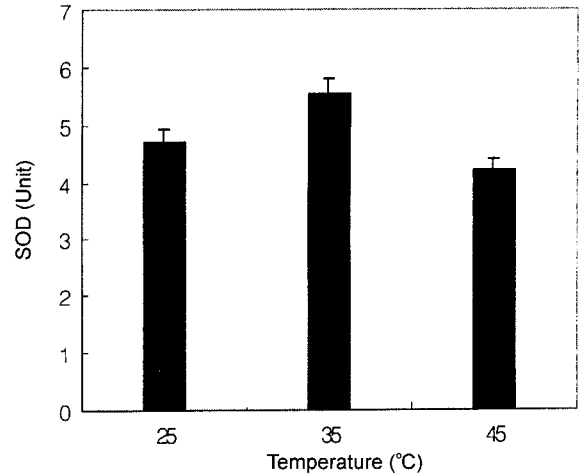


Fig. 1. Effect of temperature on the SOD activity.

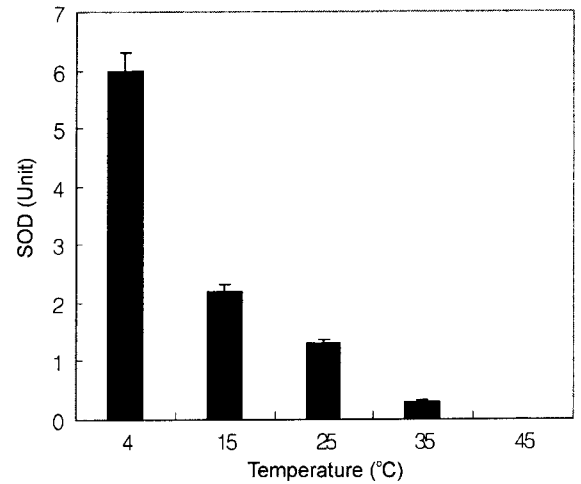


Fig. 2. Effect of temperature on the SOD stability. Incubation of 0.1 ml SOD in 1 ml of 50 mM Tris · HCl (pH 8.0) at various temperatures for 24 hr and then assay in standard condition.

Table 1. Purification of SOD produced by marine bacterium B446

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (unit ^a)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification fold
Cell lysis	1235	2262	1.8	100.0	1.0
35-75% ammonium sulfate ppt	994	1940	2.0	85.8	1.1
DEAE-Sephadex	234	980	4.2	43.3	2.3
Sephadex G-200	43.2	452	10.5	20.0	5.7
High-Q	10.2	217	21.3	9.6	11.6
HPLC-GPC	2.3	136	59.1	6.0	32.3

^aSOD activity (unit)=[A_{530 nm} (sample)]⁻¹·[A_{530 nm} (control)]⁻¹

적 최적 온도 범위가 넓은 것으로 나타난다(Fig. 1). 또 pH 8에서 열에 대한 안정성은 4°C에서는 24 시간 동안 활성의 손실이 거의 없었으나 35°C에서는 24 시간 후 거의 모든 활성이 사라짐을 볼 수 있었다(Fig. 2). 또 반응의 최적 pH는 pH 8로 나타났으나 여러 pH에서의 효소의 안정성은 최적활성이 pH 8에서 나타난 것과는 달리 pH 6에서 최적으로 나타났으며 pH 8에서는 pH 6에 비하여 약 85% 정도의 활성이 24 시간 후 남아있었다(Fig. 3, 4).

금속이온의 영향에서 Fe(II)와 Mg(II)의 경우 효소의 활성을 증가시키는 경향을 보였는데 Fe(II)는 1 mM 농도에서는 약간의 활성 감소를 보이고 있으나 10 mM에서는 4 unit의 활성을 보이고 있으며 50 mM에서는 12.5 Unit의 활성을 나타내는 등 매우

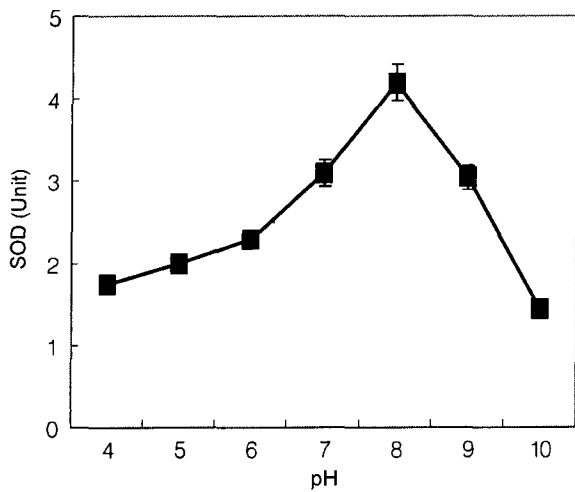


Fig. 3. Effect of pH (pH 4-10) on the SOD activity, pH 4 and pH 5 : Acetate buffer (50 mM), pH 6 and pH 7 : Phosphate buffer (50 mM), pH 8 and pH 9 : Tris · HCl buffer 50 mM), pH 10 : Carbonate buffer (50 mM).

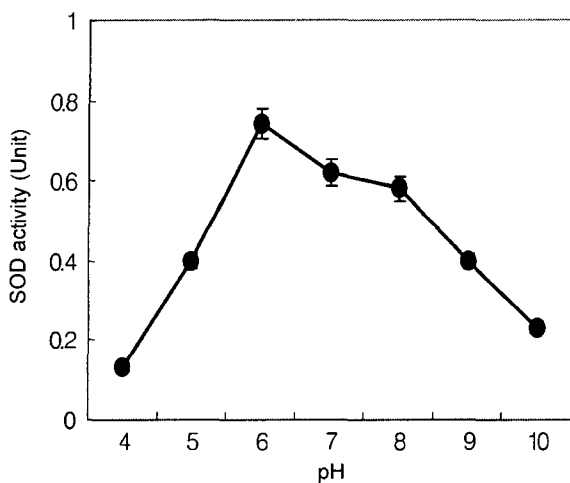


Fig. 4. Effect of pH (pH 4-10) on the SOD stability : incubation of enzyme in buffers of various pH for 24 hr and then exchange the buffer to 50 mM Tris · HCl (pH 8.0) with Econo 10-DG desalting column and the remaining activities were assayed in standard condition.

뛰어난 활성 증가 효과를 보이고 있어 본 효소가 Fe-SOD로 추정되었다. 그러나 SOD 반응의 결과 형성되는 일차 산물이 hydrogen peroxide임을 고려하면 형성된 hydrogen peroxide가 Fe(II)와 반응(Fenton reaction)하여 hydroxide ion과 hydroxyl radical을 형성하므로 이렇게 형성된 hydroxyl radical이 superoxide radical과 반응하여 superoxide radical과 hydroxyl amine의 반응을 저해하여 결과적으로 SOD 반응성이 높아진 것처럼 보일 가능성도 있다. Mg(II)는 활성 증가 정도가 이보다는 훨씬 낮아 1 mM에서는 거의 영향이 없으며 10 mM에서 3.23 unit 그리고 50 mM에서도 3.8 unit 수준의 활성을 보인다. 이러한 경향은 Mn(II)나 Cu(II)에서도 유사하게 나타나 이들 2 금속이온은 SOD 반응의 증대효과가 거의 없었다. 금속 이온의 chelator인 EDTA의 경우는 낮은 농도에서는 chelation 효과보다 전자공여체로서의 역할이 커서 10 mM까지는 저해 현상 대신 약간의 증진효과를 보였으나 50 mM이상의 농도에서는 저해현상을 보였다. Fe(II) ion의 특이적인 chelator인 1,10-phenanthroline은 10 mM에서 90 %정도의 효소활성을 저해하였다. 이는 본 효소의 cofactor인 transition ion이 Fe(II)일 것을 뒷받침하는 결과로 사료된다. 그러나 NaN₃는 매우 강력한 저해효과를 보였으며 H₂O₂와 NaCN 역시 10 mM에서 효소활성도를 50% 감소시켰다. NaN₃는 azide ion 그자체로서 nitrogen radical이고 H₂O₂는 Fenton 반응 등을 통해 복잡한 oxygen radical을 형성시켜 Cu/Zn-SOD와 Fe-SOD에 특이적인 저해제로 작용하며 NaCN은 Cu/Zn-SOD나 cyto-chrom oxidase의 저해제로 알려져있어 본 결과만로는 본 효소의 cofactor를 결론내리기는 어렵다. Transition metal ion과의 반응성이 비교적 낮은 NaF에 의해서는 오히려 효소활성이 다소 증가하는 결과가 나타났(Fig. 5).

본 고에서 보고한 균주 탐색과 효소 정제 그리고 기초적인 효소특성 조사 등에 사용된 FMN의 광환원에 의한 SOD assay 방법은 본 연구와 같은 SOD 효소뿐만 아니라 SOD 활성을 보이는 저분자 물질(항산화제)의 탐색이나 분석(6,11)에도 잘 적용될

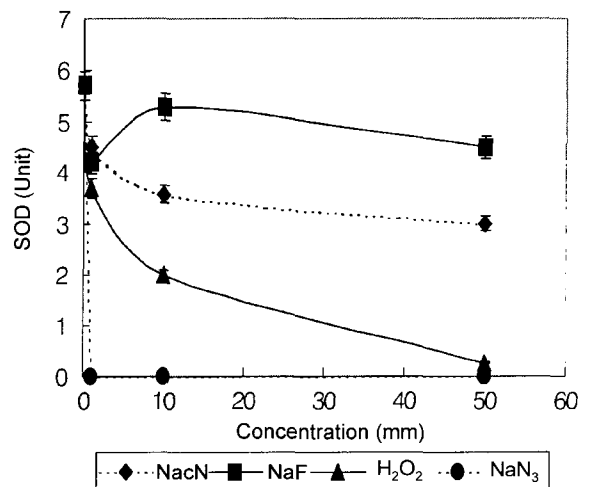


Fig. 5. Effect of potential inhibitors on the activity of SOD (at 1, 10 and 50 mM of NaCN, NaF, H₂O₂, NaN₃).

수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국해양연구원 기관고유과제 연구비로 수행되었습니다.

참고문헌

1. Archibald, F.S. 1990. Assay of superoxide dismutase applicable to whole bacterial cell. *Methods Enzymol.* 186, 237-242.
2. Fridovich, I. 1989. Superoxide dismutase: An adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* 264, 7761-7764.
3. Hastings, J.W., T.O. Baldwin, and M.Z. Nicoli. 1978. Bacterial luciferase: assay, purification and properties. *Methods Enzymol.* 57, 135-152.
4. Kim, S.J., D. Han, M.H. Park, and J.S. Rhee. 1994. Screening for Superoxide dismutase-like compounds and its activators in extracts of fruits and vegetables. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 2263-2265.
5. Kurfurst, M., S. Ghisla, R.P. Presswood and J.W. Hastings. 1982. Structure and catalytic inactivity of the bacterial luciferase neutral flavin radical. *Eur. J. Biochem.* 123, 355-361.
6. Kwak, B.K.W. Cho, M. Pyo and M.S. Lah. 1999. Synthesis and characterization of ferric complex of biomimetic tripodal ligands, tris(2-benzimidazolymethyl) amine : Superoxide dismutase mimic. *Inorg. Chem. Acta* 290, 21-27.
7. Lee, S.O., S.W. Kim, I. Uno, and T.H. Lee. 1993. Direct sequencing of superoxide dismutase genes from two bacterial strains amplified by polymerase chain reaction. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 1454-1460.
8. McCord, J. M. and I., Fridovich. 1969. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyprin (hemocuprin). *J. Biol. Chem.* 224, 6049-6055.
9. Micheson, A.M. and J. Monod. 1975. Superoxide dismutase and their applications as oxidation inhibitors, US patent 3 920 521.
10. Bannister W.H. and J.W. Banister. 1980. Biological and Clinical Aspect of Superoxide and Superoxide Dismutase. Vol. IIB, Elsevier, New York.
11. Shin, J., Y. Seo, K. W. Cho, S.-S. Moon, and Y.J. Cho. 1999. Euplexides A-E: Novel farnesylhydroquinone glycosides from the gorgonian *Euplexaura anastomosans*. *J. Org. Chem.* 64, 1853-1858.
12. Taniguchi, M., K. Hoshino, T. Itoh, H. Kumakura and M. Fujii. 1992. Production of superoxide dismutase in *Streptococcus lactis* by a combination of use of herbaric oxygen and fermentation with cross-flow filtration. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 886-890.

(Received May 23, 2002/Accepted June 7, 2002)

ABSTRACT: Screening and Purification of Superoxide Dismutase Producing Marine Bacterium Using Photochemically Generated Superoxide Ion

Ki Woong Cho (Marine Natural Products Chemistry Lab. Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan 425-600, Korea)

A marine bacterium producing superoxide dismutase, strain number B446, was screened with nitrite quantitation method using hydroxy amine and photochemically generated superoxide ion, and the superoxide dismutase was purified through 35-75% ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex A-25 ion exchange chromatography, Sephadex G-200 gel filtration chromatography, and High-Q anion exchange chromatography to a yield of 6% and purification fold of 32.3.