家禽誌 17(2) : 109 ~ 114 (1990)　　K. J. Poul. Sci. 17(2) : 109 ~ 114 (1990)

난백 lysozyme의 역가측정과 안정성에 관한 연구

이성기 · 유익종 · 김기성 · 김영붕
한국식품개발연구원
(1990. 4. 20. 接受)

Studies on the Activity and Stability of Egg White lysozyme

Sung-Ki Lee, Ick-Jong Yoo, Kee-Sung Kim, Young-Boong Kim
Korea Food Research Institute
(Received April 20, 1990)

SUMMARY

Enzymatic activity of isolated lysozyme from egg white by cation ion-exchange chromatography was detected with various methods and stability of lysozyme in solution was studied by heat and pH treatments.

Lysozyme activity refered to mg pure lysozyme/mg sample was more accurate although it needed standard lysozyme. But lysozyme activity refered to units/mg sample could be detected easily and reducted total detection time.

Enzymatic activity of isolated lysozyme which dissolved in 0.066M phosphate buffer(pH 6.3) and then incubated at 37℃ for 2hr was increased remarkably on the lysis of *Micrococcus lysodeikticus.*

The activity of isolated lysozyme by CM Sephadex C-25 was higher in eluting solution of above O. D. 1.0 at 640nm and attained 36,000 units/mg solid.

The stability of isolated lysozyme was decreased by various heat treatment. Activity began to decrease above 60℃ and dropped rapidly at 100℃.Especially, 35% loss of activity occured in 0.066M phosphate buffer at 100℃. for 15min.

The stability of lysozyme was also affected by pH. lysozyme was very stable in acidic solution but in alkaline solution. Enzymatic activity showed maximum value at pH 3.0 solution while decreased rapidly above pH 6.0 solution.

I. 서 론

Lysozme은 미생물 세포벽의 β - linkage를 가수분해시키는 용균효소로서 그람 양성균에 유리한 효소이기도 하다. Lysozyme의 분자량은 14,300으로 3곳에 antigenic site가 있고 소수성 및 친수성 결합이 일정치 않게 분포되어 있다. 또 이들은 3개의 S-S 결합을 가지고 있고 이 중 2개가 효소적 역가를 유지시키는 작용을 한다(Protor와 Cunningham, 1988).

난백으로 부터 수지를 통해 분리한 lysozyme 은 수

지 종류에 따라 회수율과 순도가 달라지고 이에 따라 최종 효소적 역가도 변하게 된다. 또 추출한 lysozyme이 의약품의 원료나 식품에 이용될 때, 열이나 pH등의 환경에 접하게 되면 효소적 활성을 알기쉽다. Uchida (1972)은 일본 청주에 20ppm의 lysozyme을 넣은 결과 상온에서 1년동안 95%이상의 역가를 유지시킬 수 있었다고 하였다. Gorini와 Felix(1953)는 borate 완충액(pH 7.9)에서 70℃, 30분간 가열시 역가가 25%만큼 감소한다고 하였고, 산성용액에서는 100℃에서도 상당시간 역가를 유지시킬 수 있다(Smolelis와 Hartsell, 1952 : Matsuoka등, 1966)하여 lysozyme의 안전성에 대해 고찰 한바 있다.

현재 lysozyme의 역가정도는 미생물(*Micrococcus lysodeikticus*)의 세포벽을 가수분해시켜 흡광도의 변화량으로 측정되고 있다. 그러나 각 나라마다 각기 다른 측정방법을 사용하고 있다. 대표적으로 lysozyme의 역가를 ㎎/㎎ 또는 백분율로 표시하거나(Nagasawa 등, 1970 : 小崎道雄등, 1980) unit/㎎으로 표시하고 있다(Li-chan등, 1986 : Anonymous, 1989). 또 동일한 방법일지라도 완충액의 pH나 농도, 온도, 흡광도의 파장등을 달리하고 있어 측정방법에 따른 상대적인 차이가 많아 일관성이 부족한 실정이다.

그러므로 본 연구는 난백으로 부터 추출한 lysozyme의 수지 종류와 분리액의 농도에 따른 역가 측정과 측정방법에 따른 상호 비교분석을 실시하였고 또 추출 난백 lysozyme의 pH 및 열처리에 대한 역가 안정성을 구명하기 위해 실시하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 난백으로 부터 lysozyme의 제조

Lysozyme은 이등(1989)의 방법에 따라 난백을 양이온 교환수지를 통해 흡착시키고 염용액으로 분리시켜 탈염 및 건조를 실시하여 제조하였다.

2. Lysozyme 역가의 측정(A-1, A-2)

1) 시료무게 당 순수 lysozyme 함량법

Nagasawa 등(1970)의 방법에 의해 일본 국립위생시험 연구소에서 제조한 lysozyme 표준품(Control 871)과 시료를 *Micrococcus lysodeikticus*에 혼합하여 640 nm에서 흡광도 변화량으로 비교 분석하였다.

○ 방법 1(A-1)

Lysozyme 50 ㎎을 인산염 완충액(pH6.2) 100 ㎖에 녹여 희석배수를 달리하여 고농도량과 저농도량으로 나눈다음 35℃에서 3분간 둔 후 각각의 용액에 동일한 온도로 처리한 *M. lysodeikticus* 용액을 동량 넣어 35℃에서 10분간 흡광도를 3회 반복하여 측정하였다.

$$\text{역가}(㎎/㎎,\ \text{또는}\ \%) = \frac{\text{lysozyme 표준품의 량}(㎎)}{\text{시료의 중량}(㎎)} \times \text{역가비}(R)$$

여기서 $\text{역가비}(R) = \text{Antilog}\ \frac{FI}{E}$

$$F = 1/2(Esh + Esl - Eth - Etl)$$

$$E = 1/2(Esl + Etl - Esh - Eth)$$

$$I = log\ \frac{\text{고농도량}}{\text{저농도량}} = log\ 1.5$$

여기서 Etl : 저농도량 시료용액 3회 합계 흡광도값
Eth : 저농도량 시료용액 3회 합계 흡광도값
Esl : 저농도량 표준액 3회 합계 흡광도값
Esh : 저농도량 표준액 3회 합계 흡광도값

○ 방법 2(A-2)

방법 1과 동일하게 실시하였으나 lysozyme용액을 2종류의 농도로 희석하지 않았다.

$$\text{역가}(㎎/㎎\ \text{또는}\ \%) = \frac{\text{lysozyme 표준품의 량}(㎎)}{\text{시료의 중량}(㎎)} \times \frac{Eo - Et}{Eo - Es}$$

여기서 Eo : 기질액의 3회 합계 흡광도
Et : 시료액+기질액의 3회 흡광도
Es : 시료액+표준액의 3회 흡광도

2) 시료무게 당 unit 법(B)

이등(1989)와 유등(1989)의 방법으로 lysozyme을 0.066M 인산염 완충액(pH 6.3) 1 ㎖당 0.01 ㎎을 녹여 활성화 시킨것과 *M. lysodeikticus*을 혼합하여 450 nm에서 20초 간격으로 2분간 측정하였다.

$$\text{역가}(\text{unit}/㎎) = \frac{\text{450nm에서의 흡광도 변화치/분}}{0.001 \times ㎎\ \text{solid/반응 혼합물}}$$

3. 추출한 lysozyme의 수지 및 분리농도별 역가

흡착 분리용으로 이용한 양이온 교환수지는 CM Sephadex C-25, Duolite C-464, Amberite IRP-64이었으며 이들로 부터 분리된 용액을 450 nm에서 흡광도 1.0이상과 이하로 나누어 역가를 측정하였다. 역가측정방법은 시료 무게당 unit으로 측정하였다.

4. 열 및 pH처리에 의한 lysozyme의 안전성

CM Sephadex C-25를 통해 투석, 동결건조시킨 lysozyme을 0.066M 인산염 완충액(pH 6.3)에 1 ml당 0.01 mg을 녹인 다음 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40℃로 15분간 각각 가열한 후 즉각 냉각시켜 역가를 측정하였다.

pH에 따른 역가의 변화를 보기 위해 0.1N HCl과 0.1N NaOH로 pH 2에서 10까지 조정한 후 100℃에서 15분간 가열하고 즉시 냉각시킨 다음 역가를 unit 방법으로 측정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 측정 방법별 역가의 차이

Lysozyme의 역가를 정의하는 대표적인 2종류의 측정방법을 선정하여 기존 시판되고 있는 lysozyme과 추출 lysozyme과의 역가 분석을 실시하였다. Table 1에서와 같이 시료 무게당 순수 lysozyme함량비로 나타낸 A방법을 보면 A-1방법에 의한 역가가 A-2방법에 비해 0.01 mg/mg만큼 높았고 표준편차도 더 낮았다. Nagasawa 등(1970)의 A-1방법이 A-2 방법에 비해 0.01 mg/mg만큼 높았다는 보고와는 약간의 차이가 있으나 표준편차의 범위가 조금 넓었다는 점에서 동일한 경향을 보였다. 그러므로 A-1방법이 실험중에 *M. lysodeikticus* 용액을 희석하는 번거러움이 있고 계산방법이 복잡한 면이 있지만 A-2에 비해 반복에 따른 정확도가 더 높음을 알 수 있다. 이에 비해 unit/mg방법은 lysozyme의 용균작용을 단순히 단위 시간당 흡광도 변화량으로 정의하기 때문에 측정하거나 계산하기에 편리하다. 시판 lysozyme의 역가는 48,500 ± 2,000 units/mg으로 추출 lysozyme의 36,000±1,500 units/mg에 비해 12,500 units/mg만큼 높았다. 이는 추출 lysozyme이 정제과정을 거치지 않아 순도가 그 만큼 떨어졌기 때문인 것으로 생각되었다. 그러나 시판 lysozyme은 단백질 mg당 약 40,000 units인 것에 비해 8,000 units 만큼 높았다. 여기서 시료 모두가 100% 단백질인지의 여부도 확인할 수 없어 직접적인 비교는 곤란하지만 측정시에 처리조건에 따른 차이인 것으로 생각되었다. 이같이 unit 방법에 의한 역가측정은 순수 lysozyme 함량비에 비해 표준품이 필요로 하지않고 신속하게 측정할 수 있는 장점이 있었다.

Table 1. Effect of detection methods on standard and isolated lysozyme activity

Detection* methods	Losozyme** Standard	Isolated
A-1(mg/mg)	0.97± 0.02	0.82± 0.02
A-2(mg/mg)	0.96± 0.03	0.81± 0.02
B(units/mg)	48,000± 2,000	36,000± 1,500

* See Material and Method.

** Standard lysozyme was used with Sigma Chem. Co. l-6876 and isolated lysozyme was extracted by CM-Sephadex C-25 resin.

2. 분리한 수지 및 농도별 lysozyme의 역가

양이온 교환수지를 이용하여 난백으로 부터 lysozyme을 분리할 때 수지별 추출 lysozyme의 역가는 Table 2와 같다. 가장 역가가 높은 것은 CM Sephadex C-25에서 분리시킨 lysozyme으로 30,000-36,000 units/mg이었다. 동일한 수지일지라도 전처리하는 방법에 따라 lysozymed의 역가가 달라졌다. Lysozyme을 증류수에 녹여 직접 *M. lysodeikticus*를 용균시킨 것이 30,000 units/mg인데 비해 0.066M 인산염 완충액에 녹여 37℃에서 2시간 둔후에 용균시킨 구는 36,000 units/mg으로 6,000 units/mg만큼 lysozyme의 활력이 증진됨을 알 수 있다. 그러므로 시료 무게당 un-

Table 2. Activity of standard and isolated lysozyme by dissolving methods (units/mg)

Dissolving methods	Standard lysozyme	CM-Sepha. C-25	Duolite C-464	Amberite IRP-64
Dissolving in distilled water	38,000 ± 2,000	30,000 ± 1,500	27,000 ± 1,500	28,000 ± 1,500
Dissolving in D. W. at 37℃ for 2hrs	44,000 ± 2,000	33,000 ± 2,000	28,000 ± 1,500	30,000 ± 2,000
Dissolving in buffer at 37℃ for 2hr**	48,000 ± 2,000	36,000 ± 2,000	30,000 ± 1,500	32,500 ± 2,000

* Standard lysozyme was used by Sigma Chem. Co.

* * Lysozyme was dissolved in 0.066M phosphate buffer(pH 6.3) and incubated.

it으로 역가를 측정할때는 인산염 완충액에 녹여 활력을 증진시킨 후에 용균시키는 것이 바람직하겠다.

Fig. 1은 CM Sephadex C-25에서 추출 건조한 lysozyme과 시판 lysozyme을 전처리 용해방법에 따른 역가를 나타낸 것이다. Lysozyme을 증류수에 녹여 직접 *M. lysodeikticus*에 첨가할 경우 흡광도 1.0이상이 30,000 units/㎎이고 1.0이하가 21,000 units/㎎으로 다른 전처리구에 비해서 낮았다. 그런데 lysozyme을 증류수 대신 인산염 완충액속에 녹여 활성화시킨 후에 측정하면 36,000와 26,000 units/㎎으로 직접 측정한 구에 비해 약 20%이상 증가하였다. 이와같은 결과도 증류수에 비해 인산염 완충액이 효소적 안전성에 기여하는 것으로 나타났으며 또 일정시간 항온이 lysozyme의 활력을 증진시키는 것으로 판명되었다. Proctor와 Cunningham(1988)도 인산염 완충액내의 lysozyme이 증류수내 lysozyme에 비해 62.5℃에서 50배이상 안정하다고 총설한 바 있다. 또한 흡광도 1.0이상의 분리액에서 추출한 lysozyme의 역가가 1.0이하보다 더 높게 나타난 것은 수지에 흡착된 lysozyme이 분리될때 초기에 다량 흘러나오고 나중에는 기타 단백질이 함께 흘러나왔기 때문으로 사료되었다.

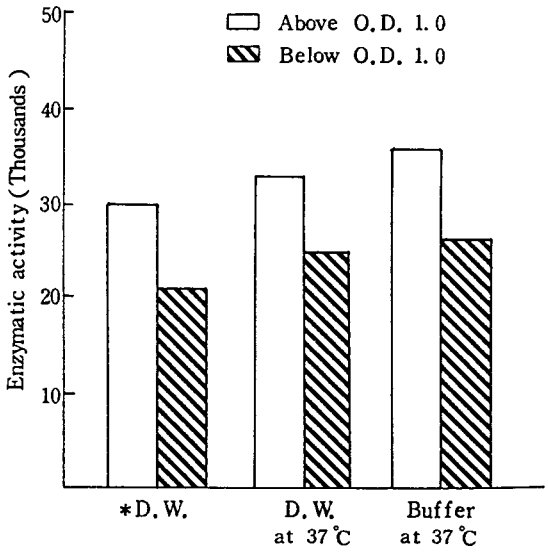

Fig. 1. Activity of isolated lysozyme by dissolving mothods (Eluted lysozyme solution from CM Sephadex C-25 was divided with optical density degree at 280nm wavelength).
* D. W. : Dissolving in distilled water
D. W. at 37℃ : Dissolving in distilled water at 37℃ for 2hr.
Buffer at 37℃ : Dissolving in 0.066M phosphate buffer(pH 6.3) at 37℃ for 2hr.

3. 열 및 pH에 대한 안정성

Fig. 2는 CM Sephadex C-25에서 추출한 lysozy-

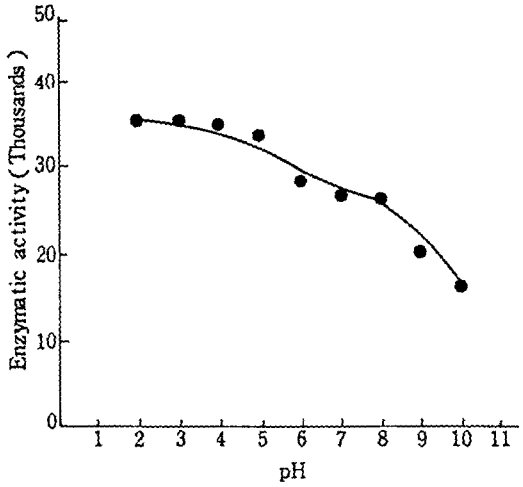

Fig 2. Heat sensitivity profile of isolated lysozyme by various heat treatment after boiling for 15min (Lysozyme was dissolved in 0.066M phosphate buffer, pH 6.3).

me을 0.066M 인산염 완충액에 0.5% 녹여 각 온도별로 15분간 가열한 후 급냉시켰을때 역가의 변화를 나타내고 있다. 온도를 50℃까지 올렸을때에도 역가의 큰 변화는 없다가 60℃ 이상이 되면서 감소하기 시작하였다. 그러나 100℃에서 15분간 가열하여도 약 30%정도의 역가만이 상실하였기 때문에 열에 상당히 강한 효소인 것으로 판명이 되었다.

Lysozyme은 열, pH, 완충액의 종류나 농도, 첨가물질등에 따라 안정성이 매우 다르게 나타나는 것으로 알려지고 있다. Cunningham과 Lineweaver (1965)는 계란속의 lysozyme이 62.5℃에서 pH 7.0일때 10%가 감소되었으며 pH 9.0에서 95%이상이 감소되었다고 한바 있다. 그러나 본 실험은 약산성 영역인 pH6.3인 인산염 완충액에서 가열을 하였기 때문에 저항성이 더 강하게 나타난 것 같다.

이와같이 열변성은 lysozyme의 H_2O기가 없는 외부의 극성 아미노산 잔기가 열에 의해 펩타이드-를 결합기로 전환되면서 비롯되었다고 한다(Frasco등 1978). Wu (1975)와 Wu등(1975)은 lysozyme에 열을 연속적으로 증감하여 변성시켰을때 분자도 연속적으로 활성화, 비활성화, 재활성화가 이루어져 최종 역가가 감소하게 된다고 하였다.

Fig. 3은 pH용액을 달리하여 100℃에서 15분간 가열한 후 급냉시킨 lysozyme의 역가 변화를 나타내고 있다. Lysozyme은 산성 영역에서 매우 안정하나 알칼리성 용액에서 불안정한 효소로 알려진(Smolelis와 Hartsell, 1952)바와 같이 pH6.0이후로 급격히 감소하고 있다.

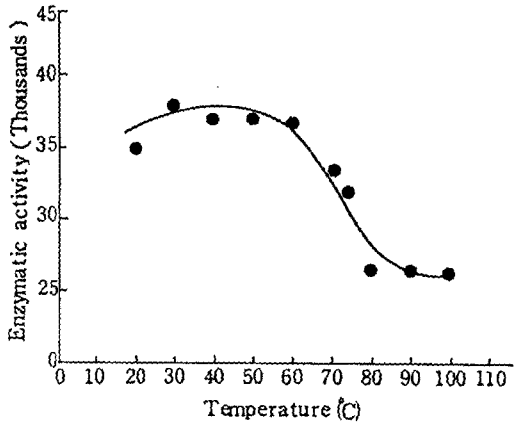

Fig 3. pH sensitivity profile of isolated lysozyme in various pH solution after boiling for 15min.

Matsuoka등(1966)이 lysozyme은 pH4.5 용액에서 100℃로 3분까지, pH 5.29에서 30분까지 안정하다는 보고와는 차이가 있으나 본 실험에서는 pH 조정후 15분간 가열하였기 때문에 조금더 낮아졌으리라 생각되었다. 그러나 Yashitake와 Shinichiro(1977)가 식품내 lysozyme이 pH6.0이상의 알칼리 영역에서 역가가 급격히 떨어진다는 유사한 보고를 한 바 있다. 이와같이 lysozyme은 보존제로서 식품에 이용할 때는 그 식품이 약산성 영역인 pH6.0이하 이어야만 가열처리하여도 역가에 크게 손상시키지 않아 기능을 발휘할 것으로 보인다.

Ⅳ. 요 약

양이온 교환수지를 이용하여 추출한 난백 lysozyme의 분리방법에 따른 역가측정과 역가 측정방법에 따른

차이를 비교 검토하고 pH와 열에 대한 안정성을 구명하였다.

Lysozyme의 역가를 측정하는데 있어서 시료 무게당 lysozyme량으로 정의할 경우는 순도 높은 표준품의 구입이 필요하나 반복에 따른 측정 오차의 범위가 적었다. 반면 시료 무게당 units으로 할때 오차의 범위는 조금 넓었지만 간편 신속하게 측정할 수 있었다.

난백 lysozyme을 pH6.3인 0.066M 인산염 완충액에 넣어 37℃에서 2시간동안 항온시켰을때 *Micrococcus lysodeikticus*의 용균작용이 가장 활발히 일어났다.

CM Sephadex C-25로 O.D. 1.0이상의 용액에서 회수한 lysozyme의 역가는 36,000 units/㎎으로 처리구 중 가장 높았다.

추출 lysozyme은 가열함에 따라 역가가 감소하였으며 인산염 완충액에서 100℃, 15분간 가열하였을때 35%이상이 감소하였다.

추출한 lysozyme용액을 pH별로 100℃에서 15분간 가열했을때 산성영역에서는 매우 안정되었으나 pH6.0 이상의 알칼리 영역에서 급격히 불활성화 되었다.

V. 인용문헌

1. Anonymous. 1988. Certificate of Analysis. Quality Control Files Number 15547, Worthington Biochemical Corporation.
2. Cunningham, F. E. and H. Lineweaver. 1965. Stabilization of egg-white proteins to pasteurizing temperatures above 60℃. Food Technol., 19, 136.
3. Frasco, C. B., E. Karmas and S. G. Gilbert. 1978. Water binding patterns of native and denaturation lysozyme as determined by infrared spectroscopy. Int. Congr Food Sci. Technol. Abstr., p. 170.
4. Gorini, L. and F. Felix. 1953. Influence of manganese for stability of lysozyme. Biochem. Biophys. Acta., 10, 128.
5. Li-chan, E. S. nakai, J. Sim, D. B. Bragg and K. V. Lo. 1986. Lysozyme separation from egg white by cation exchange column chromatograph. J. Food Sci., 51, 1032.
6. Matsuoka, Y., Y. Hidaka and M. Yashima. 1966. Processing method of lysozyme. Japanese Patent, 41, 150.
7. nagasawa, K., S. Nisihzaki and I. Yokota. 1970. On the national institute of hygienic sciences standard "Lysozyme standard" The Report of National Institute of Hygienic Sciences. Technical date. 88, 84.
8. Proctor, v. A. and F. E. Cunningham. 1988. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutri., 26, 359~395.
9. Smolelis, A. N. and S. E. Hartsell. 1952. Factors affecting the lytic activity of lysozyme. J. Bacterol., 63, 665.
10. Uchida, M., S. Yokomura and G. Nagahama. 1972. Studies of lactobacilli isolate from mirin liquar. V. Antiseptic effects of egg-white lysozyme on the growth of *Lactobacillus* in mirin liquar. J. Ferment. Technol., 50, 292.
11. Wu, A. C. M. 1975. Studies of activities and stabilities of yeast invertase, bovine-pacrease chymotrypsin, lysozyme, and the stability of soy protein extract under fluctuation temperature. Diss. Abstr. Int. B., 35, 5936.
12. Wu, A. C. M., R. R. Eitenmiller and J. J. Powers. 1975. Yields from chymotrypsin and lysozyme under fluctuation treatments. J. Food Sci., 40, 840.
13. Yashitake, S. and A. Shinichiro. 1977. Use of egg white New Food Inc., lysozyme in the food industry. 19, 17.
14. 小崎 道雄. 相泥孝亮, 小野正之, 手塚隆久, 柳田藤治. 1980. 酵素利用 ハプテズベノ. 地人書館.
15. 유익종. 이성기. 김경환. 민병용. 1989. 난백 및 이온교환수지의 전처리 조건이 난백 lysozyme의 추출에 미치는 영향. 한국가금학회지. 16(3), 157. Lysozyme의 추출에 관한 연구. 한국축산학회지. 31(12), 780.
16. 이성기. 유익종. 민병용. 1989. 이온교한 크로마토그래피에 의한 Lysozyme의 추출에 관한 연구. 한국축산학회지. 31(12), 780.