

## 천연 항균 효소제 난백 lysozyme의 한외여과 조건 최적화

이은영 · 우건조

이화여자대학교 식품영양학과

### Ultrafiltration and Separation Process Optimization of Hen Egg White Lysozyme as Natural Antimicrobial Enzyme

Eun Young Lee and Gun-Jo Woo

Department of Foods and Nutrition, Ewha Women's University

#### Abstract

Hen egg white lysozyme (HEWL) is very valuable as a natural preservative in food processing due to its selective bactericidal activity. HEWL which traditionally isolated by crystallization or freeze drying was simply separated from 13 different hen egg white (HEW) proteins by a single-step ultrafiltration. Freeze dried HEW (0.25%, w/v) dissolved in a citrate-phosphate buffer (pH 4.6) was ultrafiltered with a PM30 membrane under various operating conditions, by changing concentration, temperature, transmembrane pressure ( $\Delta P_T$ ), and stirring speed. Optimum separation conditions were decided when maximal flux was obtained. Under the optimum separation conditions, the effect of membrane material and fouling on flux as time passed as well as lysozyme concentration, protein concentration, specific activity (SA) in the permeate were measured. Best separation conditions of HEWL with PM30 membrane were sample concentration 0.25%, temperature 35°C,  $\Delta P_T$  30 psi, and stirring speed 300 rpm. During the first 12 min, the flux of YM30 was higher, but at the steady-state it was lower than that of PM30. The SA of the PM30 permeate was over 2 times higher in spite of the lysozyme and protein concentration being lower than that of YM30 permeate. The flux of 5 times used PM30 decreased 30% compared to a new PM30, but both had the same tendency in flux decrease when time passed. Both of them reached a steady-state after 35 min and remained at 70% of the initial flux. In the PM30 permeate, the lysozyme concentration and SA were 110 units/mL and 2,821 units/mg protein, respectively. Therefore, PM30 membrane separation was very effective for separation of antimicrobial lysozyme.

Key words: ultrafiltration, lysozyme, antimicrobial enzyme

#### 서 론

식품은 다양한 분자량을 가진 물질들의 복합체 내지는 혼합체이다<sup>(1)</sup>. 이러한 복잡한 화합물인 식품으로부터 우리가 원하는 물질들을 분리하기 위하여 여과, 원심분리, 추출, 흡착, 크로마토그래피, 전기영동, 결정화 등의 방법이 분리 공정에서 사용되었다. 최근 들어 에너지 소모를 최소화시키면서 기본적인 품질을 바람직하게 유지하며 낮은 온도에서 액체상태의 식품을 효과적으로 농축하거나 정제하기 위한 비열처리 공정으로서 막분리 공정이 식품산업체의 다양한 분야에 이용되고 있다<sup>(2,4)</sup>. '막'이란 '두 흐름 사이에서 한가

지 혹은 그 이상의 물질이 이동하는 것을 제한하는 장벽'이다<sup>(4)</sup>. 낮은 온도와 압력에서 액체 식품을 여과시키면 다공성의 막은 저분자 물질을 고분자 물질로부터 분리해내어 물과 함께 막을 통과시킨다<sup>(2)</sup>. 지금까지의 식품 공정에서는 분리와 정제에 상당히 많은 비용이 소요되었었는데, downstream processing 비용을 낮출 수 있는 새로운 기술로서 막에 관한 연구가 활발히 연구되고 있으며 특히 생물 공학 분야에서 빠르게 도입되고 있다<sup>(2,5)</sup>. 막을 이용하여 단백질 분자나 효소를 분리하려는 시도가 있었는데<sup>(6,8)</sup>, 한외여과(ultrafiltration, UF) 중 용질의 이동을 방해하는 요소는 농도 분극 현상, 흡착, 겔화, 물질의 침착 등이며<sup>(3,9)</sup>, 이들 현상이 식품 산업에서 UF의 적용을 제한하는 주요 요인으로 작용하고 있다<sup>(10)</sup>. 비가역적 막 침착현상은 고분자 물질이나 저분자 물질이 다공질의 막 구멍을 막거나(pore

Corresponding author: Gun-Jo Woo, Department of Foods and Nutrition, Ewha Women's University, 11-1 Daehyun-dong, Sodaemun-ku, Seoul 120-750, Korea

plugging) 막 표면에 흡착(adsorption)함으로써 주로 발생하며, 막 세척으로도 flux가 회복되지 않는다<sup>(11)</sup>. Ehsani 등<sup>(8)</sup>은 막 분리시 이러한 flux 감소는 양전하를 띤 단백질과 음전하를 띤 막 사이의 결합에 의해 막에 단백질이 흡착되었기 때문이라고 하였으며, Kelly 등<sup>(12)</sup>은 thiol기를 가진 단백질을 막분리 할 경우 초기 flux 감소 현상이 다른 단백질에 비해 심화된다고 하였다. 이러한 농도 분극 현상은 다양한 방법으로 완화시킬 수 있는데, 막과 용액 내 분자들간 상호 작용이 침착현상의 주요 요인이므로<sup>(13)</sup> 막의 재질이나 분리 물질과의 상호 작용을 구명함으로써 flux 감소 요인을 효과적으로 제어할 수 있다. 또한, 원하는 물질을 가장 효율적으로 분리할 수 있는 분리 공정상의 최적 조건을 구하는 것이 실제 물질 분리에 있어서 가장 중요한 과제이다.

난백 lysozyme은 박테리아 세포벽을 선택적으로 분해하는 항균 효소제로서<sup>(14,15)</sup> 결정화와 냉동 건조 기술이 주요 분리 방법으로 이용되어 왔으나<sup>(16)</sup>, 본 연구에서는 한외여과 막을 이용하여 single step으로 lysozyme을 분리하고자 하였다. 따라서, PM30 막을 이용하여 난백으로부터 lysozyme을 선택적으로 막 분리 할 때 용액의 농도, 온도, 막 횡단 압력, 교반속도 등의 운용 변수를 조정하여 최적 한외여과 조건을 구하고, 막 재질과 시간에 따른 flux 변화를 측정함으로써 flux를 감소시키는 농도 분극 현상이나 막 침착현상을 최소화하고자 하였다. 또한, 분리된 lysozyme의 농도와 비활성도를 측정함으로써 천연식품 보존제로서의 이용 가능성을 모색하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시료

신선한 달걀(송산 농장, 경기도 화성군 남양면)의 난백으로부터 lysozyme을 분리하기 위하여 난백을 냉동건조(진공도 10  $\mu$ Hg, 1~3단계 프로그램 온도: 20°C, 4~16단계 프로그램 온도: 40°C, Ilshin Eng. Co., Korea) 하여 냉동 보관(-20°C)하였다. 냉동 건조한 난백 분말을 pH 4.6인 citrate-phosphate buffer에 농도를 달리하여(0.25, 0.5, 0.75, 1.0%, w/v) 녹인 후, Whatman filter paper (No. 4)를 사용하여 예비여과하였다. 예비여과된 여액을 한계 분자량(molecular weight cut-off, MWCO) 30,000인 PM30 막(Amicon Corp., USA)으로 한외여과하였다.

### Ovalbumin 제거와 예비여과

난백 단백질 중 54%를 차지하지만 비항균성 단백

질인 ovalbumin (pI=4.6)을 제거하기 위하여, 냉동 건조된 난백 분말을 pH 4.6 citrate-phosphate buffer에 녹인 후, 응고·침전된 ovalbumin을 Whatman No. 4 filter paper에서 retentate로 제거하였다.

### 막 종류와 막 세척

Lysozyme 분리에 사용한 PM30 막은 한계분자량 30,000, 막 직경 62 mm, 막 표면적 28.7 cm<sup>2</sup>, 물의 permeation flow rate 2.0~6.0 mL/cm<sup>2</sup>/min, 최대 허용 압력 55 psi인 polysulfone 재질이었다. YM30 막은 한계분자량 30,000인 cellulosic 형태이었다. 한번 사용한 막은 0.1 N NaOH와 0.1% protease로 30분간 세척하였으며, 막 세척 후 증류수를 사용하여 원래의 flux 회복 여부를 판단하였다.

### 한외여과 시스템

PM30 막을 장착한 Amicon cell에서 각 실험 조건에 따라 예비여과된 시료(180 mL)의 flux 변화를 측정함으로써 최대 flux를 나타내는 최적 막 분리 조건을 구하였다.

온도: Whatman filter paper (No. 4)로 여과하였을 때 여과 속도가 가장 빠른 0.75% 난백 용액을 시료로 하여 막 횡단 압력(transmembrane pressure)과 막 분리 온도(5, 20, 35, 43°C)에 따른 flux 변화를 측정하였다.

농도와 막 횡단 압력: 시료 농도를 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.0% (w/v)로 달리하였을 경우, 막 횡단 압력에 따른 flux 변화를 비교함으로써 최적 막 분리 농도와 최적 막 횡단 압력을 결정하였다.

교반속도: 농도 차이가 10배인 0.1%와 1.0% 난백 용액을 시료로 하여 교반과 비교반시의 flux 차이를 비교하였으며, 교반속도에 따른 flux 변화를 측정하였다.

염농도: 용액의 염농도가 flux에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 최적 분리 조건하에서 염을 첨가하지 않은 것과 NaCl 농도가 각각 50, 100, 200, 500 mM인 0.25% HEWP 용액의 flux 변화를 측정하였다. 각 염 농도 시료의 막 분리 여액내 lysozyme 농도와 단백질 농도를 측정하였다.

막 재질과 시간: 최적 막 분리 조건하에서 막 재질 (PM30, YM30)과 세척 효과(새 PM30, 5회 사용한 PM30)가 장기간 막 분리시 flux에 미치는 영향을 살펴보았다. 막 재질이 lysozyme 분리도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 YM30 막과 PM30 막을 통과한 여액의 lysozyme 농도와 단백질 농도를 측정하여 분리액내 효소의 비활성도(specific activity, SA)를 비교하였다.

단백질 분석

한외여과 시스템에서 얻어진 여액의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry 방법<sup>(17)</sup>을 이용하여 측정하였다. 단백질 표준 곡선은 Sigma protein assay kit (No. P5656, USA)를 이용하여 구하였다. 시료의 단백질 함량은 Spectrophotometer 301 (Milton Roy Co., USA)로 750 nm에서 단백질의 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다.

Lysozyme의 활성 측정

*Micrococcus luteus*를 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 녹여 0.3 mg/mL의 농도로 한 후 *M. luteus* 용액을 시험관에 각각 5.8 mL씩 넣고 시료를 0.2 mL씩 취하여 25°C, 450 nm에서 흡광도 감소를 관찰하였다. 초기 흡광도 감소 속도는 1분간 감소한 흡광도로 계산하였으며, 흡광도 감소는 0.02에서 0.04의 범주의 것을 택하였다. Lysozyme 1.0 unit은 pH 7.0, 25°C에서 1분간의 흡광도 감소 0.001로 정의하였다<sup>(18)</sup>.

결 과

온도 변화에 따른 막분리도

43°C의 citrate-phosphate buffer와 예비여과한 5, 20, 35, 43°C의 0.75% HEWP 용액의 온도와 막 횡단 압력에 따른 flux 변화는 Fig. 1과 같다. 43°C citrate-phosphate buffer는 막 횡단 압력이 10 psi부터 50 psi까지 10 psi씩 상승함에 따라 25.7, 43.3, 58.4, 76.2, 117.4 L/m<sup>2</sup>/hr (LMH)의 flux를 나타내어 막 횡단 압력에 비례적으로 flux가 증가하였으나 0.75% 난백 용액의 경우에는 온도에 따른 flux 차이가 컸으며 막 횡단 압력 20 psi 이상에서 전반적으로 flux 증가율이 낮아졌다. 막 횡단 압력이 10 psi일 때 20, 35, 43°C 시료들은 5°C 시료에 비하여 3배 이상 flux가 높았으나 이들 시료간 flux 차이는 10% 미만으로 20°C 이상에서는 온도에 따른 flux 차이가 적었다. 10 psi에 비해 막 횡단 압력이 20 psi일 때, 20°C 용액의 flux는 약 20%, 35°C와 43°C 용액의 flux는 약 40% 증가하여 35°C와 43°C 용액의 flux 증가율이 20°C에 비해 약 2배 높았다. 냉장 온도인 5°C 시료의 경우, 10 psi와 50 psi의 flux 차이가 0.5 LMH 미만으로 막 횡단 압력이 증가하여도 flux가 거의 증가하지 않았다. 막 횡단 압력 40 psi 이상에서 더 이상 flux가 증가하지 않았던 35°C와 달리 43°C 용액에서는 작은 폭으로나마 flux가 증가하였으나 35°C보다 온도가 8°C 더 높은 것에 반해 flux 차이는 10% 미만으로 매우 적었다. 결과적으로, 막 횡단

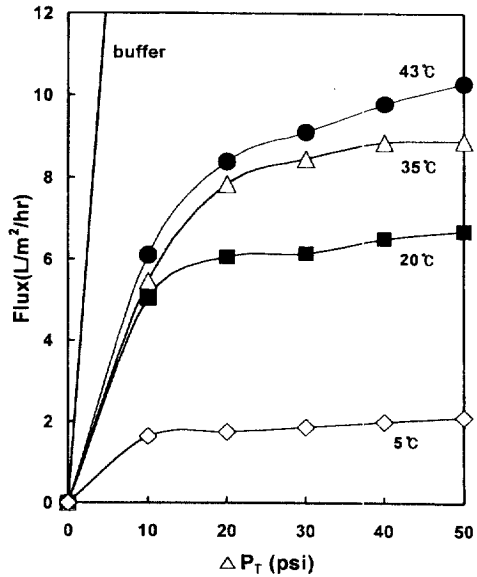
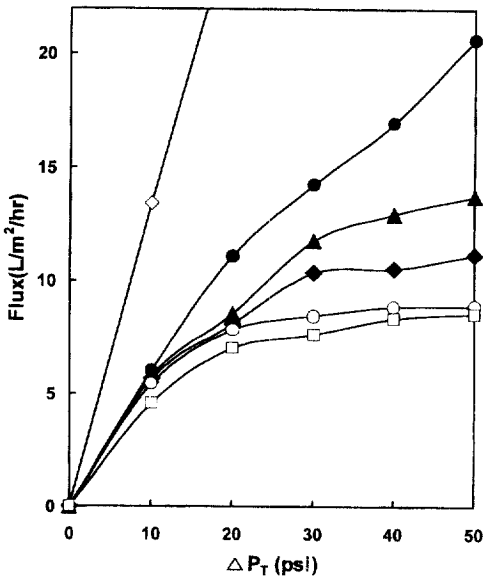


Fig. 1. Effect of temperature on permeate flow rate at various transmembrane pressures ( $\Delta P_T$ ) in an Amicon stirred cell with PM30 membrane. The sample was a 0.75% (w/v) HEWP solution prefiltered with Whatman No. 4 filter paper in pH 4.6 citrate-phosphate buffer.

압력과 온도가 증가할수록 0.75% HEWP 용액의 flux도 증가하였으나 막 횡단 압력 20 psi 이상에서는 압력보다 온도가 flux에 더 큰 영향을 미쳤다. 따라서, 본 실험 조건에서 막 분리 최적 온도는 35°C, 최적 막 횡단 압력은 20 psi였다.

농도 변화에 따른 막분리도

농도를 달리한 35°C HEWP 용액(0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0%)의 flux를 측정된 결과 농도가 낮을수록, 막 횡단 압력이 높을수록 flux가 증가하였으며, 막 횡단 압력이 증가하여도 flux가 더 이상 증가하지 않는 지점이 시료 농도에 따라 달랐다(Fig. 2). 최소 적용 압력인 10 psi에서 1.0%를 제외한 시료간 flux 차이가 0.2 LMH 미만이었으나, 최대 적용 압력인 50 psi에서는 0.1%를 기준으로 농도가 2.5배, 5배, 7.5배 10배로 증가함에 따라 flux가 33, 46, 57, 59% 감소하였다. 0.1%는 50 psi까지 flux가 거의 직선에 가깝게 증가하는 반면, 0.25%와 0.5%는 30 psi, 0.75%와 1.0%는 20 psi에서 mass-transfer controlled region과 pressure controlled region으로 구분되어 농도에 따라 최적 막 횡단 압력이 달랐다. 난백 용액 중 flux가 가장 높았던 것은 0.1% 시료였으나, 50 psi에서도 flux 증가율이 직선적일 만큼 용액의 농도가 매우 낮았다. 낮은 용액 농도는 공정

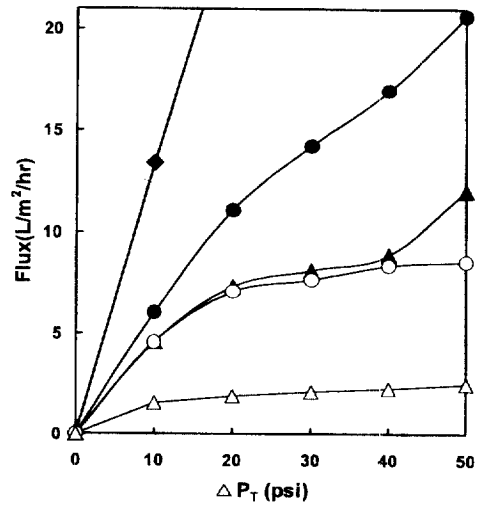


**Fig. 2. Effect of sample concentration and transmembrane pressure on flux.** Samples were 180 mL, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0% (w/v) HEWP solutions with a pH 4.6 citrate-phosphate buffer in an Amicon stirred cell equipped with PM 30 membrane. Separation temperature was 35°C. S in the Figure denotes stirring (300 rpm), ◇—◇: 35°C buffer, ●—●: 0.1%-S, ▲—▲: 0.25%-S, ◆—◆: 0.5%-S, ○—○: 0.75%-S, □—□: 1.0%-S.

scale-up시 비용 손실의 가능성이 크므로, flux가 2배로 높았던 0.25%를 최적 농도로 결정하였으며 이때의 최적 막 횡단 압력은 30 psi였다.

**교반에 따른 막 분리도**

Fig. 3은 HEWP 0.1%와 1.0% 용액(35°C)을 magnetic stirrer를 이용하여 각각 교반(300 rpm)시키거나 교반시키지 않았을 때 교반 유무가 flux에 미치는 영향을 보여주고 있다. 모든 적용 압력 하에서 비교적 낮은 농도의 0.1% 용액은 교반 여부와 관계없이 1.0%보다 flux가 높았다. 0.1% 교반 시료와 교반하지 않은 시료의 flux 차이는 10 psi에서 1.5 LMH이던 것이 50 psi에서는 8.6 LMH로 5.7배 증가한 반면, 1.0% 시료의 교반에 따른 flux 차이는 10 psi에서 3.9 LMH이던 것이 50 psi에서 6.1 LMH로 1.6배 증가한 것에 그쳤다. 막 횡단 압력이 증가함에 따라 교반 0.1% 용액의 flux는 거의 직선적으로 증가하였으나, 비교반 0.1%와 교반 1.0% 용액은 20 psi에서 flux가 현저히 감소하였다. 비교반 1.0% 용액에서는 적용 막 횡단 압력이 10 psi에서 50 psi로 증가하여도 flux가 1.0 LMH만이 증가하여, 압력의 증가에 flux가 거의 영향을 받지 않았다.



**Fig. 3. Effect of stirring and transmembrane pressure on permeate flow rate.** Samples were 0.1% and 1.0% HEWP solutions (180 mL). The effect of stirring on flux change was measured at 35°C with a condition of 300 rpm, ◆—◆: 35°C buffer, ●—●: 0.1%-S, ▲—▲: 0.1%, ○—○: 1.0%-S, △—△: 1.0%.

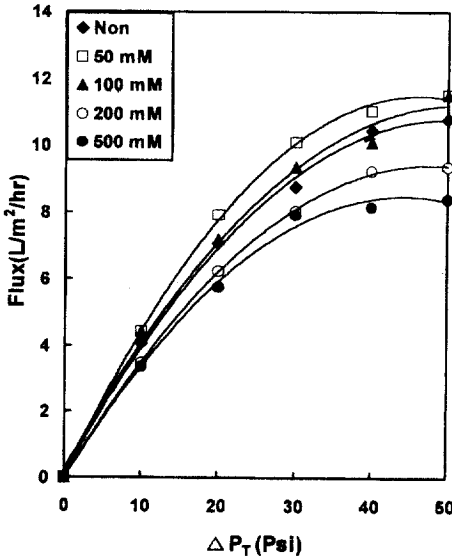
막 횡단 압력이 증가할수록 고 농도에서보다는 저 농도에서 교반 효과가 더 큰 것으로 나타났다.

**염농도와 flux**

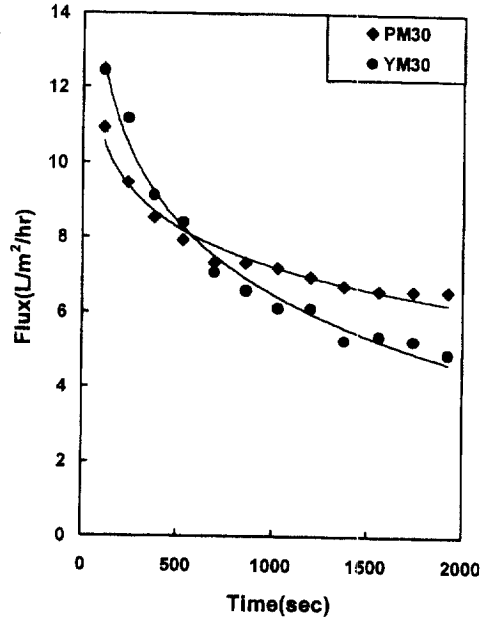
염농도를 달리한 0.25% HEWP 용액을 최적 조건하에서 막 분리하였을 때(Fig. 4), 50 mM의 염농도에서 flux가 가장 높았으며 용액내 염농도가 증가할수록 flux는 감소하였다. 50 mM과 100 mM의 염농도 시료는 염을 전혀 첨가하지 않은 시료에 비하여 flux가 높았으나, 이들간 flux 차이는 크지 않았다.

**염농도와 효소의 비활성도**

0.25% HEWP 용액에 농도를 달리하여 NaCl을 첨가한 결과, 각 permeate내의 lysozyme 농도와 단백질 농도는 염을 첨가하지 않은 시료 (A)보다 높았으며, 특히 100 mM 염농도 permeate (C)의 lysozyme 농도와 단백질 농도는 (A)에 비하여 각각 2배, 3배 높았다(Table 1). 그러나, 염 첨가에 의해 lysozyme의 비활성도는 오히려 감소하여 100 mM 이상의 염농도에서 비활성도는 (A)의 54~64% 수준이었다. 염농도가 50 mM (B)인 경우에도 여액내 lysozyme의 비활성도는 현저히 증가하지 않았으므로 순수한 lysozyme만을 분리하기 위해서는 염을 첨가하지 않는 것이 바람직하였다. 결과적으로 lysozyme 분리를 위한 최적 시료는 염을 전혀 첨가하지 않은 0.25% HEWP이었다.



**Fig. 4.** Effect of salt concentration on permeability of a 0.25% (w/v) HEWP solution ultrafiltered with PM30 membrane. Salt concentration were 0, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM NaCl in 180 mL 0.25% HEWP. Experiment was performed at 35°C, 30 psi, and 300 rpm.



**Fig. 5.** Effect of separation time on flux of a 0.25% (w/v) HEWP solution in an Amicon stirred cell with PM30 and YM30 membrane. Both membranes were cleaned with distilled water for 1 hr. Experiment was performed at the optimum conditions (Temp.: 35°C,  $\Delta P_T$ : 30 psi, stirring speed: 300 rpm, no salt added)

**Table 1.** Lysozyme concentration, protein concentration, and specific activity in PM30 permeate at various salt (NaCl) concentrations. Salt was added to 180 mL 0.25% (w/v) hen egg white protein solution

| NaCl concn. | Enzyme concn. (units/mL) | Protein concn. (mg/mL) | Specific activity (units/mg protein) |
|-------------|--------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| (A) Non     | 110                      | 0.039                  | 2,821                                |
| (B) 50 mM   | 145                      | 0.052                  | 2,888                                |
| (C) 100 mM  | 210                      | 0.116                  | 1,810                                |
| (D) 200 mM  | 130                      | 0.085                  | 1,529                                |
| (E) 500 mM  | 130                      | 0.076                  | 1,711                                |

**Table 2.** Lysozyme concentration, protein concentration, and specific activity in permeate of 0.25% (w/v) hen egg white protein solution ultrafiltered with PM30 and YM30 membrane

| Membrane type | Enzyme concn. (units/mL) | Protein concn. (mg/mL) | Specific activity (units/mg protein) |
|---------------|--------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| PM30          | 110                      | 0.039                  | 2,821                                |
| YM30          | 195                      | 0.147                  | 1,327                                |

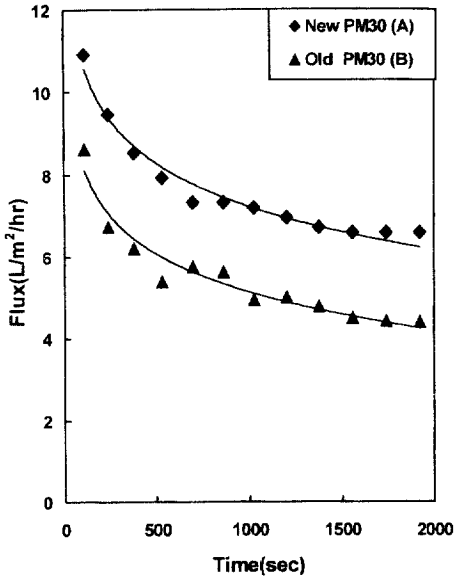
막 재질과 시간에 따른 flux 변화

최적 막 분리 조건하에서 PM30 막과 YM30 막의 시간에 따른 flux 변화를 살펴보았다(Fig. 5). 막 분리 초기에는 YM30 막의 flux가 더 높았으나 꾸준한 flux 감소로 인하여 막 분리 후 12분 경과시에는 PM30 막의 flux가 더 높았으며 이때 flux는 거의 정상상태에 이르렀다. 반면, YM30 막은 약 24분 경과 후 정상상태에 이르렀는데, 정상상태에서 PM30 막과 YM30 막의 flux는 막 분리 초기에 비하여 각각 33%, 58% 감소하였다. Table 2에 나타나 있듯이 막 분리 5분 경과 후 수거한 여액내 lysozyme 농도와 단백질 농도는 PM30 막보다 YM30 막의 경우 각각 1.8배, 3.8배 더 높았으

나 효소의 비활성도는 절반 수준이었다. 따라서, 시간 경과에 따른 flux 감소율이 낮아 빨리 정상상태에 이르며, lysozyme의 비활성도 또한 높은 PM30 막을 사용하는 것이 YM30 막을 사용하는 경우보다 lysozyme 분리에 더 적합한 것으로 나타났다.

막 침착에 의한 flux 변화

글리세린만을 제거한 새 PM30 막 (A)과 5회 이상 막 분리에 사용한 PM30 막 (B)으로 lysozyme을 분리하였을 때, 시간 경과에 따른 flux 변화는 Fig. 6과 같다. (A)와 (B) 모두 막 분리 12분 경과 후 정상상태의 flux에 이르렀으며, 이 때의 flux는 막 분리 초기에 비해 33% 감소한 수준이었다. (A)에 비해 (B)의 flux가



**Fig. 6. Effect of membrane fouling on flux.** (A) New-PM was cleaned with distilled water for 1 hr and never been used before. (B) Old-PM was first ultrafiltered, cleaned for 30 min with 0.1 N NaOH and then with 0.1% protease solution, and finally rinsed with distilled water. This procedure was repeated 5 times.

약 30% 감소하였으나, 분리 시간 경과에 따른 flux 감소 경향은 두 막이 거의 동일하였다.

## 고 찰

### 온도와 막 횡단 압력에 따른 막분리도

한외여과 공정에서 구동력(driving force)은 막 횡단 압력(transmembrane pressure,  $\Delta P_t$ )이므로, 막 횡단 압력이 증가함에 따라 flux가 증가한다. 그러나, 일정 막 횡단 압력 이상에서 더 이상 flux가 증가하지 않는 것은 막 분리 공정이 진행됨에 따라 막 표면에 침착된 물질이 서서히 농축되어 용액의 점성이 증가하고, 높은 압력일수록 막 표면에서 농도분극 현상이 심화되어 막 표면에 단단한 겔층을 형성하기 때문이다<sup>(2,6)</sup>. 이러한 결과는 flux가 막 횡단 압력과 용액의 점도, 막 투과도에 의하여 결정됨을 입증한 Hagen-Poiseuille의 법칙에 부합된다<sup>(2)</sup>. Fig. 1에서 같은 막 횡단 압력이라도 온도에 따라 flux 차이가 컸는데 이와 같은 현상은 flux가 막 횡단 압력보다는 용액의 점성에 의해 더 큰 영향을 받는다는 것을 의미한다<sup>(2,3)</sup>. 막 횡단 압력이 증가하여도 5°C 시료의 flux는 거의 증가하지 않았는데, 이는 낮은 온도에서 용액의 점성이 높아져 막 투

과 속도가 감소하였기 때문이다. 20°C 이상의 시료는 5°C 시료에 비해 점도가 감소하였으므로 비교적 낮은 막 횡단 압력인 10 psi에서도 5°C 시료보다 flux가 3배 높게 나타났다. 막 횡단 압력 20 psi 이상에서 20°C의 flux가 35°C나 43°C에 비해 낮은 것 또한 20°C 용액의 점성이 이 두 용액 (35, 43°C)보다 높았기 때문이다. 35°C와 43°C의 flux 차이는 10% 미만으로 온도 증가에 의한 flux 증가 효과가 크지 않았다. 35°C 시료에 비해 43°C 시료의 flux가 약간 높았지만 35°C를 최적 온도로 결정한 이유는 분리 온도가 높을수록 효소 활성이 감소할 가능성이 크기 때문이다. 따라서, 0.75% HEWP의 막 분리 최적 온도는 35°C였으며 이 온도에서 flux 증가율이 가장 높고 pumping에 소요되는 에너지가 최소인 막 횡단 압력은 20 psi인 것으로 나타났다.

### 농도 변화에 따른 막분리도

다양한 농도와 막 횡단 압력에서 농도가 낮을수록, 막 횡단 압력이 높을수록 flux가 증가하였는데(Fig. 2), 이러한 현상은 낮은 농도일 때 막 표면에서 용질 침착율이 낮으며 한외여과 공정의 주요 구동력이 막 횡단 압력이기 때문이다. 0.1% 시료는 막의 최대 허용 압력에 가까운 50 psi까지 막 횡단 압력 증가에 따라 flux가 비례적으로 증가하는 pressure controlled region이 있었으므로 농도 분극 현상이 거의 발생하지 않았음을 알 수 있었다. 0.1%를 제외한 다른 농도에서는 막 횡단 압력 30 psi 이상(0.25%, 0.5%)과 20 psi 이상(0.75%, 1.0%)에서 각각 mass-transfer controlled region이 관찰되었는데, 이 구역에서 flux가 막 횡단 압력에 비례하지 않는 것은 막 표면에서 부분적인 물질 농축으로 인한 농도 분극 현상이 발생하여 구동력인 막 횡단 압력을 상쇄시켰기 때문이다. 10 psi에서보다 50 psi에서 농도별 flux 차이가 큰 것은 고 농도의 시료일수록 많은 단백질이 막 표면에서 침착을 일으키며 침착된 물질이 높은 압력하에서 막 표면에 겔층을 형성하기 때문에 물질의 막 통과가 저해되어 flux가 감소되었기 때문이다<sup>(6)</sup>. 따라서, lysozyme 회수 효과를 고려하여 0.25%를 최적 농도로 결정하였으며, 이때 최적 막 횡단 압력은 pressure controlled region과 mass-transfer controlled region이 구분되어지는 30 psi였다.

### 교반에 따른 막분리도

모든 막 횡단 압력에서 교반 0.1%와 1.0% 시료와 비교한 시료에 비하여 flux가 상당히 높았으며, 높은 막 횡단 압력일수록 아슬간 flux 차이가 컸다(Fig. 3). 이러한 결과는 막 표면에서의 교반 효과로 인하여 부

분적으로 농축된 2차 겔 층(secondary gel layer)의 형성과 단백질 분자들의 침착이 억제되었기 때문이며<sup>(2)</sup>, 특히 높은 적용 압력에서 이러한 효과가 컸음을 알 수 있었다. 비교반 0.1%와 교반 1.0% flux 차이가 거의 없는 것은 용액의 전체적인 농도 차이는 10 배이지만, 비교반 0.1% 용액내 형성된 2차 겔층의 농도가 교반 1.0%와 비슷한 농도이기 때문인 것으로 판단된다. 실험 결과로는 제시하지 않았지만 0.25% HEWP 용액에 교반속도를 달리하여 막 분리 하였을 때, 300 rpm 이상에서는 flux가 거의 증가하지 않았다. Kim 등<sup>(6)</sup>은 0.1% BSA의 한외여과시 단백질의 응집에 영향을 미치는 요인을 전자현미경으로 조사한 결과, 교반속도가 400 rpm일 때는 막 표면에 얇은 단백질 층이 형성되었으나 600 rpm의 교반속도에서는 단백질이 응고물을 형성하였으며, 이러한 단백질의 응고 현상은 교반 효과에 의한 높은 flux로 인해 막 표면에서 단백질이 빠르게 농축되었기 때문이라고 하였다. 단백질 응고 현상을 감소시키고 flux를 증가시키기 위해서는 적절한 교반속도의 선택이 중요하므로, 최적 교반속도를 300 rpm으로 결정하였다.

#### 염농도와 flux

난백의 9.7~10.6%를 차지하는 13종의 난백 단백질은 대부분 구형 단백질로 구성되어 있다<sup>(19)</sup>. 염의 종류와 농도에 따라 이들 단백질의 용해도가 달라지는데, 낮은 농도의 염은 단백질 표면의 전하를 중화시킴으로써 단백질의 구조를 안정화시키고 단백질의 수화도를 증가시킨다. 반면, 높은 염농도에서는 염이 물의 수소 결합을 약화시켜 물의 구조를 깨뜨리기 때문에 극성 분자인 단백질의 용해도가 감소하여 응집 현상이 발생한다<sup>(1)</sup>. Fig. 4에서 염을 첨가하지 않은 0.25% HEWP 용액보다 50 mM과 100 mM 염농도 시료의 flux가 더 높은 것은 염이 난백 단백질의 구조를 안정시켜 용해도를 증가시켰기 때문이며, 200 mM 이상의 염농도는 주변 물분자의 구조를 불안정하게 하여 단백질의 용해도를 오히려 감소시킴으로써 flux를 저해하는 것으로 사료된다. 염 첨가에 의한 단백질의 용해도 감소와 계속된 용액의 농축으로 인하여 막 표면에 침착된 단백질 층에는 등전점(pI)이 알칼리 범위의 단백질들보다 pH 4.6 부근인 단백질들이 더 많이 침착되었을 것이다. 침착된 단백질 층에는 pI에서 단백질 구조가 압축되어 막과 단단히 결합한 단백질(ovalbumin, ovoglobulin 등)과, 용액의 농축으로 단백질간 상호결합에 의하여 느슨하게 결합한 단백질(lysozyme)이 있다. 저농도의 염은 pI에서 단백질 분자의 net charge를

회복시켜 분자의 크기를 크게 만들므로 침착 층의 투과도를 향상시키지만, 염농도가 높을 때에는 침착된 단백질 분자들을 수축시키므로 투과도가 감소되는 것이라 사료된다. Fane 등<sup>(20)</sup>은 0.1% BSA에 다양한 농도의 염(NaCl)을 첨가하여 한외여과하였는데, BSA의 pI에서 염의 농도가 0.2 M 일 때 flux가 급격히 증가하였고 0.8 M 이상에서는 급격한 flux의 감소를 나타내어 flux를 증가, 혹은 감소시키는 염농도가 다르다고 하였다. 또한, pI에서는 염 첨가 시료의 flux가 더 높았으나 pI로부터 멀어질수록 염이 flux를 저하시킨다고 하였다. Cheryan 등<sup>(21)</sup>은 염이 단백질의 구조 변형을 유발하여 단백질을 침전시키며, 막과 단백질 분자간에 salt bridge를 형성시킨다고 보고한 바 있다. 대부분의 난백 단백질의 pI가 pH 4~5이며 buffer의 pH를 ovalbumin (난백의 54%)의 pI (4.6)로 조정하였으므로, 염의 첨가가 예비여과 단계에서 제거하려했던 ovalbumin의 용해도를 높여 막 분리 여액으로 더 많이 여과되는 역효과가 있음을 Fane 등<sup>(20)</sup>의 결과로부터 예측할 수 있었다. 또한, 항균력이 있는 lysozyme과 avidin은 pI가 각각 10.7과 9.5로<sup>(19)</sup> ovalbumin의 pI와 상당한 차이가 있으므로 염의 첨가가 오히려 막 분리 여액내 이 두 단백질의 농도를 감소시킬 가능성이 있었다. 따라서, 0.25% HEWP 용액의 막 분리시 낮은 농도의 염은 약간의 flux 향상 효과를 유발하였으나, 선택적인 lysozyme 분리에는 바람직하지 않은 것으로 판단된다.

#### 효소의 농도와 비활성도

등전점 이하나 이상의 pH에서 단백질은 (+) 혹은 (-)의 net charge를 띄므로 단백질 분자간 정전기적 반발력과 단백질 주위의 극성 물분자와의 수소 결합에 의해 수화도가 증가한다<sup>(1)</sup>. 대부분의 난백 단백질과 달리 lysozyme의 pI는 10.7로서<sup>(19)</sup>, 산성 용액에서 용해도가 높으며 활성을 잘 유지한다<sup>(15)</sup>. 시료의 염농도를 100 mM까지 증가시켰을 때 lysozyme의 농도가 2배 가량 증가하는 것은(Table 1) 염이 lysozyme의 용해도 증가와 구조 안정화에 기여하였기 때문이라 사료된다. 염의 농도가 0.05~0.1 M일 때 lysozyme의 활성이 증가하였으며, 고농도의 염분은 lysozyme의 활성을 저해하지만 저농도의 염분은 오히려 활성을 증가시켰다는 보고가 있다<sup>(15)</sup>. Table 1에 의하면, 효소를 포함한 단백질의 농도는 (C)에서 가장 높았지만 효소의 순도를 의미하는 비활성도는 (A)의 65% 수준이었으므로, 염농도가 증가함에 따라 lysozyme 이외의 단백질도 상당량 막을 통과하였음을 알 수 있었다. Fane 등<sup>(22)</sup>은

염이 존재하지 않을 때 pH에서의 단백질 분자는 net charge가 0이므로 가장 치밀한 상태가 되어 침착된 단백질 층이 가장 낮은 투과도를 지나나, 염이 존재하면 (-)기의 결합에 의해 분자의 크기와 net charge가 모두 증가하여 용액의 막 투과도가 증가된다고 하였다. 200 mM 이상의 염농도에서 효소와 단백질 농도가 모두 감소하는 것은 전하의 차폐(shielding)로 인하여 전하의 효과가 점차적으로 감소하여 투과도가 감소하였기 때문이다. 이러한 효과는 양이온보다 음이온이 더 크므로<sup>(1)</sup>, Na<sup>+</sup> 이온보다 Cl<sup>-</sup> 이온이 단백질 구조에 많은 영향을 미치는 것으로 판단된다. 일정 농도의 염 첨가가 flux와 효소 농도, 단백질 농도 등을 향상시키지만, lysozyme의 비활성도는 오히려 감소시키므로 막 분리시 염을 첨가하지 않는 것이 바람직한 것으로 나타났다.

#### 막 재질과 시간에 따른 flux 변화

친수성인 YM (cellulosic type) 막은 단백질과의 흡착력이 매우 낮아 용질의 회수율이 높다. PM 막은 비이온성 중합체(non-ionic polymer)로서, 이온이나 유기 용질은 흡착되지 않지만 steroids나 소수성 고분자 물질들이 막에 잘 흡착된다<sup>(23)</sup>. 막 분리 초기에 YM30 막의 flux가 PM30 막보다 더 높은 것은(Fig. 5) YM30 막의 높은 용질 회수율과 낮은 단백질 흡착성 때문이다. 시간이 경과함에 따라 두 막의 flux가 모두 감소한 것은 막 표면과 pore내에 단백질 분자가 침착되고 일부 단백질과 물이 여액으로 빠져나가면서 stirred cell 내부의 용액이 점점 농축되었기 때문이다. Cheryan 등<sup>(21)</sup>은 막 분리 시간이 경과함에 따라 막에 흡착되는 유청 단백질의 양이 증가하여 flux가 감소하였다고 보고하였으며, Ehsani 등<sup>(8)</sup>은 효소의 한외여과시 시간이 경과함에 따라 flux가 급격히 감소하였으며 이러한 flux 감소는 양전하를 띤 단백질과 음전하를 띤 막 사이의 결합에 의해 막에 단백질이 흡착되기 때문이라고 하였다. Kelly 등<sup>(22)</sup>은 단백질 용액의 flux 감소는 단백질 분자들이 막 표면에서 침착되기 때문이며 thiol기를 가진 단백질의 경우 초기 flux 감소 현상이 심화된다고 하였다. 13종의 난백 단백질 중 황을 함유한 단백질은 ovalbumin과 lysozyme이며, 특히 난백의 54%를 차지하는 ovalbumin은 lysozyme의 S-S기를 SH기로 환원시켜 활성을 잃게 할 수 있다. 더욱이 thiol기를 가지지 않는 단백질 분자들이 단순한 물리적 현상에 의해 큰 단백질 응고물을 형성하여 막에 침착되는 반면, 자유 thiol기를 함유한 단백질 분자는 SH-SS 상호 교환 반응에 의해 다른 단백질과 화학적 결합을 하여 막 표

면에서 침착이 잘 되므로<sup>(12)</sup>, 예비여과 단계에서 ovalbumin의 제거가 막 분리시 높은 flux 유지에 있어서도 필수적임을 알 수 있었다. Fig. 5에서 막 분리 12분 경과 후부터는 PM30 막의 flux가 YM30 막보다 더 높았는데, 막 분리 초기에는 단백질의 막 흡착에 의해 flux가 감소하므로 단백질의 막 흡착력이 높은 PM30 막의 flux가 낮았으나, 일단 막 표면에 얇은 단백질 층이 형성된 후에는 단백질 흡착력보다는 막 투과율에 의해 flux가 더 많은 영향을 받으므로 빨리 정상상태에 도달한 PM30 막의 flux가 더 높게 나타난 것으로 판단된다. 일반적으로 YM 막보다 PM 막이 더 빠른 flux를 나타내는데<sup>(23)</sup>, 이러한 flux 차이는 막 재질이 달라 막 제조시 생성되는 pore의 크기가 달라지기 때문이다. 용매와 용질은 막 표면에 있는 pore 중 가장 큰 pore를 통해 이동하므로 "실질적인" pore 크기는 평균 pore 크기보다 크다<sup>(10)</sup>. 따라서, 명목적인 한계 분자량(nominal molecular weight cut-off)은 같지만 실질적인 pore 크기 차이로 인해 막 재질이 다른 YM30 막과 PM30 막의 flux가 다를 수 있으며, PM30 막의 실질적인 pore 크기가 YM30 막보다 더 커서 정상상태에서 더 빠른 flux를 나타내는 것이라 사료된다. Table 2에서 PM30 막의 높은 단백질 흡착력으로 인하여 YM30 막 여액내 lysozyme과 단백질 농도는 PM30 막보다 더 높았다. 그러나, PM30에 비교한 YM30 막 여액내의 효소 농도의 증가는 비효소성 단백질의 증가비율에 비하여 훨씬 떨어져 비활성도는 YM30 막이 오히려 더 낮게 나타났다. 따라서, 더 빠르게 정상상태에 이르러 높은 flux를 유지하며 비활성도도 높은 PM30 막이 lysozyme 분리시 더 적합한 재질의 막으로 판단되었다.

#### 막 침착에 의한 flux 변화

막의 총 저항성(total resistance)은 막 분리시 농도 분극으로 인한 저항성(polarized layer resistance,  $R_p$ )이 50% 이상을 차지하고, 막 세척으로 회복 가능한 가역적 저항성(reversible resistance,  $R_r$ )과 막 세척으로도 회복 불가능한 비가역적 저항성(irreversible resistance,  $\Delta R_m$ )이 30~38% 정도를 차지한다<sup>(22)</sup>. 막 자체가 갖는 초기 저항성(initial resistance,  $R_{m0}$ )은 모든 막이 가지고 있으므로 거의 무시할 만하다. Fig. 6에서 모든 막 분리 조건과 막 재질이 동일한 (A), (B)의 flux 차이가 2 LMH로 일정하게 나타나는 것은 세척으로도 회복 불가능한 비가역적 저항성 때문이다. Fane 등<sup>(20)</sup>은 flux의 감소는 흡착된 단백질이 서서히 막에 쌓이기 때문이며, 침착된 단백질 중 막과 단단하게 결합(tightly-



bound)된 것은 세척 후에도 flux를 회복하는데 문제가 된다고 하였다. Guell 등<sup>(24)</sup>은 BSA, lysozyme, ovalbumin을 각각 3시간 동안 미세여과하였을 때, BSA와 lysozyme은 polysulfone 막의 내부에만 침착되었지만 ovalbumin은 막 내부에 주로 침착된 후 막 외부와 막 표면에도 침착하였으며, polysulfone 막은 ovalbumin이 존재할 경우 가장 심한 침착현상을 일으켰다고 하였다. Pore를 막거나 pore를 좁게 하는 주된 원인은 단백질의 흡착과 막 내부에서 주로 발생하는 염의 침착 때문이다<sup>(10)</sup>. Oppenheim 등<sup>(27)</sup>은 double spin-labeled lysozyme (15,000 Da)을 PM10과 PM30 막으로 한외여과시킨 후 EPR (electron paramagnetic resonance) spectroscopy로 단백질 구조를 관찰한 결과, 막 표면의 단백질 구조보다 막 pore에 갇혀있거나 막을 막고 있는 단백질 구조가 더 압착된 형태라고 하였다. 따라서, 막 내부 pore에 침착된 일부 lysozyme과 ovalbumin이 존재하고 막 표면에 침착된 단백질들도 막과 단단히 결합하였거나 가해진 압력에 의해 압착됨으로써 막 세척시에 제거되지 않았기 때문에 (B)의 flux가 (A)에 비해 약 30% 감소한 것으로 사료된다. 시간이 경과함에 따라 (A), (B)의 flux 감소 경향이 동일하였는데, 이것은 막 재질과 막 운용 조건이 동일하여 두 막의  $R_p$ 나  $R_s$ 가 거의 같기 때문인 것으로 사료된다. 일반적으로 시간 경과에 따른 flux 감소 현상은 투입 용액의 물성 변화와 관련된 막 침착현상과 농도 분극 현상 (concentration polarization) 때문에 발생한다<sup>(2)</sup>. 용매가 다공질의 한외여과 막을 통과할 때는 Hagen-Poiseuille 법칙을 따르므로 고형물이 농축되면 feed의 점도와 밀도가 상승하고 확산도가 감소하여 물보다 낮은 flux를 나타낸다. 막 표면에 용질의 농도가 국부적으로 증가하면 삼투압이 현저히 증가하여 구동력과 flux가 감소하는데<sup>(2)</sup>, 분리 시간이 경과됨에 따라 flux가 급격히 감소하다 일정 수준에서 flux를 유지하는 것은 처음에는 물질이 막에 많이 흡착되었다가 점차 침착되는 양이 감소하여 여액으로 많이 빠져나가고 케이크가 형성될 때까지 이 과정이 진행되기 때문이다. Kim 등<sup>(10)</sup>은 장기간 단백질을 한외여과할 경우 막 표면에서의 케이크 형성이 더 심화된다고 하였다. Fig. 6에서 (A), (B) 모두 막 분리 초기에 각각 10.9 LMH, 8.6 LMH의 높은 flux를 나타내던 것이 분리 시간이 경과함에 따라 flux가 점차 감소한 것은 본 실험에서 사용한 소수성 재질의 polysulfone 막과 다양한 종류의 난백 단백질 분자의 상호 결합으로 인하여 막 침착현상이 발생하였기 때문이며, 막 분리 12분 경과 후 7.3 LMH와 5.8 LMH를 유지하는 것은 막 표면에 형성된 농도 분극

층에 의한 용질의 역 이동과 구동력에 의한 물질 이동이 평형을 이루어 정상 상태에 이르렀기 때문이다.

## 요 약

난백 lysozyme은 박테리아 세포벽을 선택적으로 분해하므로 식품 가공 공정에 있어서 천연 식품보존제로서의 이용 가치가 높다. 기존의 결정화와 냉동건조 방법 대신 PM30 막을 사용하여 한외여과함으로써 13종의 난백 단백질로부터 single-step에 의해 lysozyme을 분리하고자 하였다. 냉동 건조한 lysozyme을 pH 4.6 citrate-phosphate buffer에 녹여 PM30 막으로 한외여과 시 시료 농도, 온도, 막 횡단 압력, 교반속도 등의 운용 조건을 변화시켜주면서 flux를 최대화하는 최적 막 분리 조건을 구하였다. 최적 막 분리 조건하에서 시간이 경과함에 따라 막 재질과 막 침착이 flux에 미치는 효과를 측정하였고, 막 분리 여액내 단백질 농도와 lysozyme 농도, 비활성도를 측정하였다. PM30 막을 이용한 난백 lysozyme의 막 분리 최적 조건은 시료 농도 0.25%, 온도 35°C, 막 횡단 압력 30 psi, 교반속도 300 rpm이었다. 막 분리 초기 12분까지는 YM30 막의 flux가 더 높았으나, 정상상태에서의 flux는 PM30 막이 더 높았다. PM30 막의 분리 여액내 단백질 농도와 lysozyme 농도는 YM30 막에 비해 낮았으나, 비활성도는 2배 이상 높았다. 5회 막 분리한 PM30 막은 새 PM30 막에 비하여 flux가 약 30% 감소하였으나 시간 경과에 따른 flux 감소 경향은 거의 동일하였으며, 막 분리 35분 경과 후 정상상태에 이르러 초기 flux의 약 70%를 유지하였다. 막 분리 여액내 lysozyme 농도와 비활성도는 각각 110 units/mL, 2,821 units/mg protein이었으므로, PM30 막을 이용한 한외여과 공정은 천연 항균 효소제인 lysozyme을 분리하는데 매우 효과적인 방법이었다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 첨단기술개발사업 (296048)의 지원으로 수행된 연구결과에 일부로서 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Damodaran, S.: Amino acids, peptides, and proteins. In *Food Chemistry*, 3rd ed., Fennema, O.R. (Ed.), Marcel Dekker, New York, p.321-430 (1996)
2. Cheryan, M.: Modelling of ultrafiltration processes. In

- Ultrafiltration Handbook*, Technomic Publishing Co., PA, p.73-125 (1986)
3. Aimar, P.: Separation by membranes. In *Membranes in Bioprocessing: Theory and Applications*, Howell, J.A., Sanchez, V. and Field, R.W. (Ed.), Chapman and Hall, New York, p.113-140 (1993)
  4. Kosikowski, F.V.: Membrane separations in food processing. In *Membrane Separations in Biotechnology*, McGregor, W.C. (Ed.), Marcel Dekker, New York, p.201-254 (1986)
  5. Conrad, K.M., Mast, M.G. Ball, H.R. Froning, G. and Mac Neil, J.H.: Concentration of liquid egg white by vacuum evaporation and reverse osmosis. *J. Food Sci.*, **58**, 1017-1020 (1993)
  6. Kim, K.J., Chen, V. and Fane, A.G.: Some factors determining protein aggregation during ultrafiltration. *Biotech. Bioeng.*, **42**, 260-265 (1993)
  7. Chiang, B.H., Su, C.K., Tsai, G.J. and Tsao, G.T.: Egg white lysozyme purification by ultrafiltration and affinity chromatography. *J. Food Sci.*, **58**, 303-306 (1993)
  8. Ehsani N., Nystrom, M., Ojamo H. and Siika-aho M.: Separation of enzymes produced by *Trichoderma reesei* with hydrophobic ultrafiltration membranes. *Process Biochem.*, **31**, 253-263 (1996)
  9. Aimar, P., Taddei, C., Lafaille, J.P. and Sanchez, V.: Mass transfer limitations during ultrafiltration of cheese whey with inorganic membranes. *J. Membr. Sci.*, **38**, 203-221 (1988)
  10. Hanemaaijer, J.H., Robbertsen, T., van den Boomgaard and Gunnink, J.W.: Fouling of ultrafiltration membranes. the role of protein adsorption and salt precipitation. *J. Membr. Sci.*, **40**, 199-217 (1989)
  11. Aimar, P., Meireles, M. and Sanchez, V.: A contribution to the translation of retention curves into pore size distributions for sieving membranes. *J. Membr. Sci.*, **54**, 321-338 (1990)
  12. Kelly, S.T. and Zydney, A.L.: Protein fouling during microfiltration: comparative behavior of different model proteins. *Biotech. Bioeng.*, **55**, 91-100 (1997)
  13. Nystrom, M., Pihlajam ki, A. and Ehsani N.: Characterization of ultrafiltration membranes by simultaneous streaming potential and flux measurements. *J. Membr. Sci.*, **87**, 245-256 (1994)
  14. Ibrahim, H.R., Hatta, H., Fujiki, M., Kim, M. and Yamamoto, T.: Enhanced antimicrobial action of lysozyme against gram-negative and gram-positive bacteria due to modification with perillaldehyde. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1813-1817 (1994)
  15. Proctor, V.A. and Cunningham, F.E.: The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *CRC Crit. Rev. in Food Sci. Nutr.*, **26**, 359-395 (1988)
  16. Ghieimetti, G. and Trinchera, C.: Process for the production of lysozyme. *U.S. Patent* 3,515,643 (1970)
  17. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
  18. Stenesh, J.: Isolation, purification, and assay of egg white lysozyme. In *Experimental Biochemistry*, Allyn and Bacon, MA, p.135-147 (1984)
  19. Kilara, A. and Harwalkar, V.R.: Denaturation. In *Food Proteins: Properties and Characterization*, Nakai, S. and Modler, H.W. (Ed.), VCH Publishers, Inc., New York, p. 136-148 (1996)
  20. Fane, A.G., Fell, C.J.D. and Waters, A.G.: Ultrafiltration of protein solutions through partially permeable membranes-the effect of adsorption and solution environment. *J. Membr. Sci.*, **16**, 211-224 (1983)
  21. Cheryan, M. and Merin, U.: A study of the fouling phenomenon during ultrafiltration of cottage cheese whey. In *Ultrafiltration Membranes and Applications*, Cooper, A.R. (Ed.), Plenum Press, New York, Vol. 13, p.619-629 (1980)
  22. Fane, A.G., Fell, C.J.D. and Suki, A.: The effect of pH and ionic environment on the ultrafiltration of protein solutions with retentive membranes. *J. Membr. Sci.*, **16**, 195-210 (1983)
  23. *Amicon catalog* No. 388, p.8-53 (1995)
  24. Guell, C. and Davis, R.H.: Membrane fouling during microfiltration of protein mixtures. *J. Membr. Sci.*, **119**, 269-284 (1996)
  25. Oppenheim, S.F., Buettner, G.R. Dordick, J.S. and Rodgers, V.G.J.: Applying electron paramagnetic resonance spectroscopy to the study of fouling in protein ultrafiltration. *J. Membr. Sci.*, **96**, 289-297 (1994)

---

(1998년 2월 17일 접수)