

한외여과 공정을 이용한 고순도 황균 Lysozyme의 분리 및 막 침착 특성

이은영 · 우건조

이화여자대학교 식품영양학과

Separation of Highly Purified Antimicrobial Lysozyme Using Ultrafiltration and Characteristics of Membrane Fouling

Eun Young Lee and Gun-Jo Woo

Department of Foods and Nutrition, Ewha Women's University

Abstract

The value of lysozyme as a natural food preservative is continuously increased due to its unique antimicrobial activity. To determine the optimum separation concentration among the various hen egg white protein (HEWP) concentrations (0.25, 0.5, 1.0, w/v), protein concentrations, lysozyme concentrations, specific activities (SA), and purification factors of prefiltered solution (PFS) and PM30 permeate solution (PMS) were compared. The purity of lysozyme separated at each step was analyzed and confirmed by gel permeation chromatography and electrophoresis. The fouling deposits on membrane were observed by SEM. The non-enzymatic proteins were removed over 99% by ultrafiltration (UF). The increased feed concentration did not contribute to the increase of SA. SA of PMS was 18 to 31 times higher than that of PFS. The optimum feed concentration was decided as 0.25% based on SA and purification factor. The non-enzymatic region of gel chromatogram was proved to be ovalbumin. The thickness of deposit on the UF membrane was approximately 0.9 μm and removed by cleaning with 0.1 N NaOH. Therefore, UF using PM30 membrane was very effective to separate the antimicrobial lysozyme from various HEWPs.

Key words: lysozyme, ultrafiltration, SEM, gel permeation chromatography, electrophoresis

서 론

Lysozyme은 코 점막, 눈물, 고무나무 유액(plant latex), 난백 등에 존재하며, 이 중 난백은 lysozyme을 공업적으로 대량 생산할 수 있는 좋은 급원으로 알려져 있다⁽¹⁾. 난백 유래 lysozyme은 129개의 아미노산으로 된 단일 펩타이드 사슬로 구성되어 있으며 아미노산 64~80, 76~94, 6~127, 30~115의 네 부분에 이황화 결합(S-S bond)을 형성하고 있다⁽²⁾. 분자량과 pI가 각각 14,600, 10.7인 lysozyme은 대부분의 그램 양성 박테리아와 일부 그램 음성 박테리아의 세포벽을 가수분해할 뿐만 아니라 고온에서도 매우 안정한 효소이므로^(2,5) 천연 식품 보존제 및 의약품으로서의 활용도가 매우 높다⁽²⁾. 난백은 13종의 단백질로 구성되어 있

는데⁽⁶⁾, lysozyme만을 선택적으로 분리하여 공업적으로 대량 생산하는 공정이 필요하며, 현재 일반적으로 유통되고 있는 상업용 난백 lysozyme은 3번의 결정화 단계를 거쳐 동결 건조시켜 제품화되고 있다⁽⁷⁾. 최근에는 기존의 결정화 방법외에 다양한 크로마토그래피를 이용하거나⁽⁸⁻¹⁰⁾ 다공성의 키틴 막을 이용하여 lysozyme을 분리하기도 한다⁽¹¹⁾. Lysozyme과 같은 효소를 분리·정제할 때는 최종 물질의 순도, 활성 및 정제 비용 등이 가격 결정에 매우 중요한 요소이다. 복잡하고 다양한 화합물로부터 원하는 물질만을 순수 분리하기 위하여 사용되는 분리 공정 중 막 분리 공정(membrane separation processes)은 생물 공학 분야에 빠르게 도입되고 있으며^(12,13), 이미 몇몇 연구자들에 의해 막을 이용하여 단백질이나 효소의 분리·정제에 적용하려는 시도가 있었다⁽¹³⁻¹⁶⁾. 그러나, 한외여과(ultrafiltration, UF) 중 용질의 이동을 방해하는 농도 분극 현상, 흡착, 겔화, 물질의 침착 등에 의한 flux 저하 현상 때문에

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

식품 산업에서 UF 공정의 적용이 부분적으로 제한 받고 있다⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. 이러한 농도 분극 현상은 다양한 방법으로 완화시킬 수 있는데, 막과 용액 내 분자들간 상호 작용이 막 침착 현상의 주요 요인이므로⁽²⁰⁾ 막의 재질이나 분리 물질과의 상호 작용을 구명함으로써 flux 감소 요인을 효과적으로 제어할 수 있다. 또한, 원하는 물질을 가장 효율적으로 분리할 수 있는 최적 조건을 구하는 것이 물질 분리에 있어서 가장 중요한 과제이므로, 이 등⁽²¹⁾은 이미 한계분자량 30,000인 한외여과 막을 이용하여 13종의 난백 단백질로부터 lysozyme을 선택적으로 분리하기 위한 최적 분리 조건에 대하여 연구한 바 있다. 본 연구에서는 이 등⁽²¹⁾의 최적 막 분리 조건에 근거하여 농도를 달리한 난백 용액의 분리 단계별 단백질 농도, lysozyme 농도, 비활성도 및 purification factor를 측정함으로써 최적 분리 농도를 결정하고자 하였다. 또한, 분리된 lysozyme의 순도를 겔투과 크로마토그래피와 전기 영동으로 확인하고 난백 단백질의 막 침착 현상을 SEM으로 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 예비여과

신선한 달걀(송산 농장, 경기도 화성군 남양면)의 난백으로부터 lysozyme을 분리하기 위하여 난백을 냉동 건조하여 -20°C에서 보관하였다. 냉동 건조된 난백 분말을 citrate-phosphate buffer (pH 4.6)에 용해시킨 후 생성된 응고-침전물은 Whatman No. 4 여과지를 이용하여 제거하였다.

한외여과

Lysozyme 분리에는 한계분자량 30,000, 막 직경 62 mm, 막 표면적 28.7 cm², 물의 permeation flow rate 2.0~6.0 mL/cm²/min, 최대 허용 압력 55 psi인 polysulfone 재질의 PM30 막을 사용하였다⁽²²⁾. 난백 농도 0.25, 0.5, 1.0% (w/v)의 단백질 용액을 온도 35°C, 막 횡단압력 30 psi, 교반 속도 300 rpm인 회분식 막 분리 시스템을 이용하여 분리하였으며 사용한 한외여과 시스템은 Fig. 1과 같다. 각 농도별 원시료 용액(origin), 예비 여과 여액(prefiltered solution, PFS), 한외여과 여액(PM 30 permeate solution, PMS)의 분리 단계별 단백질 농도와 lysozyme 농도를 측정하였고 수율과 비활성도를 결정하였다.

단백질 분석

각 시료의 단백질 함량은 bovine serum albumin을

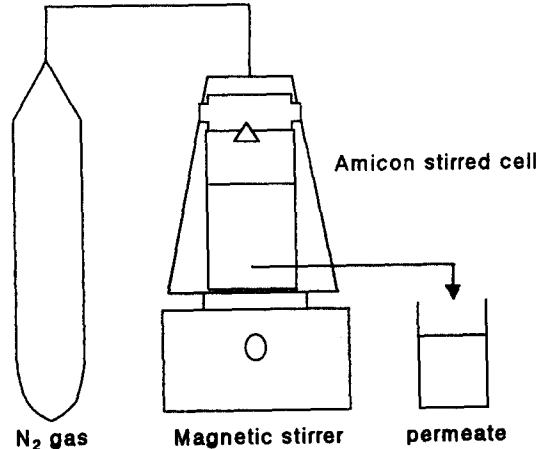


Fig. 1. Schematic flow diagram of the ultrafiltration system used for separation of lysozyme. Experiment was performed at 35°C, 30 psi, and 300 rpm.

표준 단백질로 하여 Lowry 방법⁽²³⁾으로 측정하였다. 단백질 표준 곡선은 protein assay kit (Sigma, USA)을 이용하여 구하였다. 단백질의 흡광도는 spectrophotometer 301 (Milton Roy Co., USA)을 사용하여 750 nm에서 측정하였다.

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 5.8 mL씩 넣고 각 시료를 0.2 mL씩 취하여 25°C, 450 nm에서 흡광도 감소를 관찰하였다. Lysozyme 1.0 unit은 pH 7.0, 25°C에서 1분간 흡광도가 0.001 감소하는 것으로 정의하였다⁽²⁴⁾.

겔 투과 크로마토그래피

Sephacrose-6B (Pharmacia, Sweden)로 충전한 C26/100 컬럼(gel bed height=90.0 cm)에 0.25% 난백 용액의 각 분리 단계별 여액을 20 mL 씩 주입하여 280 nm에서 single path monitor UV-1(Pharmacia, Sweden)을 사용하여 흡광도를 측정하였다. 시료의 주입속도는 1.38 mL/min이었으며 민감도는 1.0 A.U.이었다. 용출액으로는 pH 5.8 potassium phosphate buffer를 사용하였다.

전기 영동

Bollag 등⁽²⁵⁾의 방법에 따라 LKB Midget electrophoresis unit (Pharmacia, USA)을 이용하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-

PAGE, 5% stacking gel, 15% separating gel)를 행하였다. Standard로는 SDS molecular weight markers (MW 10,000~70,000, Sigma, USA)를 사용하였으며 각 시료 10 μ L를 polyacrylamide 겔에 Hamilton syringe로 주입한 후 50 mA에서 전기 영동하였다. 전기 영동이 끝난 겔은 coomassie brilliant blue로 염색하였으며 탈염 후 건조시켰다.

Scanning Electron Microscope (SEM)

단백질에 의한 막 침착도와 막 세척 후 침착된 단백질의 제거 효과를 알아보기 위하여 막을 동결 건조시킨 후 S-4200 FE-scanning electron microscope (Hitachi, Japan)로 막의 표면 구조를 관찰하였다. PM 30막, lysozyme 분리에 사용한 한외여과 막과 세척한 막을 탄소 테이프를 붙인 시료판(stub)에 고정시키고 e 1030 ion sputter (Hitachi, Japan)에서 도금한 후, 20,000, 60,000배로 관찰하였다. 한외여과에 사용된 막은 0.1 N NaOH 용액으로 세척하였다.

결 과

여과액의 단백질 농도

시료의 농도가 0.25%, 0.5, 1.0% (w/v)로 증가함에 따라 PFS의 단백질 농도는 2.4, 4.8, 10.8 μ g/mL로 비

례적으로 증가하였으며, 예비 여과 단계에서 각 농도별 단백질 제거율은 49.0~55.5%이었다(Table 1). 한외 여과 여액인 PMS의 단백질 함량은 0.038~0.14 μ g/mL로 원시료 대비 99% 이상의 단백질이 막분리 단계에서 제거되었다.

Lysozyme 농도

Table 1에 제시되어 있듯이 PFS의 경우 시료의 농도가 0.25%의 2배, 4배로 증가함에 따라 PFS내 lysozyme 농도도 각각 2.6배, 4.4배로 증가하여 lysozyme 함량이 시료 농도에 대체로 비례하였다. PFS의 평균 lysozyme 농도는 각 농도별 원시료의 75% 이상이었으나, 막 분리한 PMS내 lysozyme 농도는 0.25% PMS를 제외하고는 원시료 lysozyme 농도의 30% 미만으로 감소하였다(Table 1).

여과액의 비활성도와 purification factor

Lysozyme의 순도를 의미하는 비활성도(specific activity)는 PMS (3,071~4,737 units/mg protein)가 원시료(91.7 units/mg protein)나 PFS (148.7~199.5 units/mg protein)의 비활성도보다 매우 높았다. 비활성도가 높은 순서는 0.25% PMS > 0.50% PMS > 1.0% PMS 순이었다(Table 1). 시료 농도를 달리한 PMS lysozyme의 purification factor는 33.49~51.66으로 PFS의 1.67~2.18에

Table 1. Purification of lysozyme at various hen egg white protein concentrations

Sample concn (w/v)	Separation Step	Volume of fraction (mL)	Protein		Lysozyme				
			Concn. (mg/mL)	Total amount (mg)	Concn. (mg/mL)	Specific activity (Units/mg protein)	Total amount (Units)	Yield (%)	Purification factor (Fold)
0.25%	Origin	100.0	5.278 (100.0%) ¹⁾	527.8	484 (100.0%)	91.7	48390	100	1.00
	PFS ²⁾	94.0	2.354 (-55.5%)	221.3	360 (-25.6%)	152.9	33840	69.9	1.67
	PMS ³⁾	88.5	0.038 (-99.3%)	3.4	180 (-62.8%)	4,736.8	15930	32.9	51.66
0.50%	Origin	100.0	10.556 (100.0%)	1,055.6	968 (100.0%)	91.7	96,770	100	1.00
	PFS	88.8	4.762 (-54.9%)	422.9	950 (-1.9%)	199.5	84,360	87.2	2.18
	PMS	82.0	0.072 (-99.3%)	5.9	260 (-73.1%)	3,611.1	21,320	22.0	39.38
1.00%	Origin	100.0	21.110 (100.0%)	2,111.0	1936 (100.0%)	91.7	193,550	100	1.00
	PFS	92.5	10.762 (-49.0%)	995.5	1600 (-17.4%)	148.7	148,000	76.5	1.62
	PMS	84.0	0.140 (-99.3%)	11.8	430 (-78.0%)	3,071.4	36,120	18.7	33.49

¹⁾ () means the % of the protein and the lysozyme which were removed at each separation step.

²⁾ PFS means prefiltered solution in pH 4.6 citrate-phosphate buffer.

³⁾ PMS means PM30 permeate solution.

비해 막 분리 단계를 거치면서 약 20~30배 더 증가하였다(Table 1). Purification factor는 시료의 농도와 일정한 상관관계가 없었으며, 세 가지 농도의 시료 중 0.25% PMS의 purification factor가 51.66으로 가장 높았다.

겔 투과 크로마토그래피

Purification factor가 가장 높았던 0.25% (w/v) 난백 용액을 분리 단계별로 겔 크로마토그래피한 결과는 Fig. 2와 같다. Potassium phosphate buffer (pH 5.8)에 녹인 0.25% 시료 1은 두 번째 peak (1-b)가 둥근 산 모양이었으나 pH 4.6인 citrate-phosphate buffer에 녹인 0.25% 시료 (2, 3, 4)는 두 번째 peak의 가운데가 함몰되어 두 개의 peak가 중첩되는 형태로 나타났다(Fig. 2.2-b, 3-b, 4-b). Lysozyme의 활성은 1, 2, 3, 4 네 시료의 두 번째 peak에서만 측정되었으며, 2, 3, 4의 경우는 두 번째 peak(b)의 두 봉우리 중 뒤쪽 봉우리 부분에서 lysozyme의 활성이 더 높게 나타났다. 크로마토그래피 결과 첫 번째의 비효소성 단백질 peak(a)가 한외 여과 단계에서 완전히 제거되었음을 알 수 있었다(Fig. 2.4-b).

전기 영동

난백 용액(0.25%, w/v)을 전기 영동하였을 때 난백의 대부분을 차지하는 단백질은 분자량 45,000인

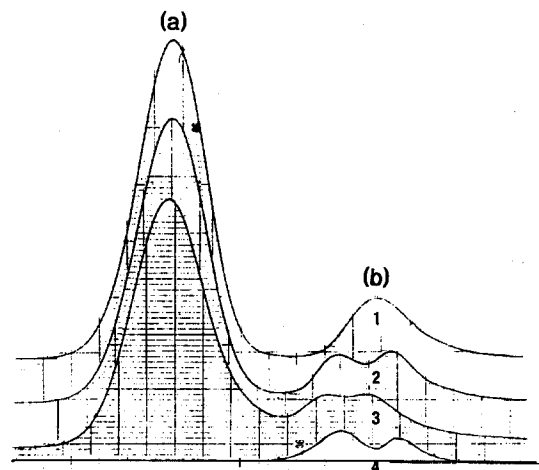


Fig. 2 Gel permeation chromatogram of 0.25% HEWP solution at each separation step. 1. Origin: 0.25% HEWP solution pH 5.8 potassium phosphate buffer, 2. Prefiltration permeate: 0.25% HEWP solution in pH 4.6 citrate-phosphate buffer, 3. Heating for 2 hr after prefiltration: 0.25% HEWP solution in pH 4.6 citrate-phosphate buffer, 4. PM30 membrane permeate: 0.25% HEWP solution in pH 4.6 citrate-phosphate buffer

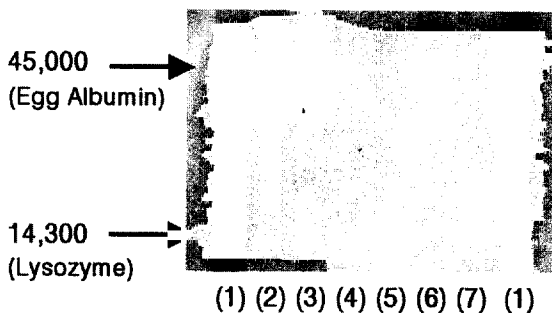


Fig. 3. SDS-PAGE of hen egg white lysozyme in each separation step. Lane 1: Standard proteins, Lane 2: 0.25% (w/v) hen egg white protein reconstituted with water, Lane 3: PFS, Lane 4: PMS, Lane 5: Sigma lysozyme, Lane 6: Chromatography fraction No. 40, Lane 7: Chromatography fraction No. 50

ovalbumin이었다(Fig. 3, lane 2). 대부분의 ovalbumin은 PFS 단계에서 제거되었으며, 비록 일부 ovalbumin이 함께 여액으로 분리되었지만 PMS에는 정제도가 높은 lysozyme이 존재하였다. 겔 크로마토그래피 분석을 전기 영동한 Fig. 3의 lane 6과 7에 나타난 것처럼 크로마토그래피의 첫 번째 peak (Fig. 2.1-a, Fig. 2.2-a, Fig. 2.3-a)는 비효소 분획이었으며, 이들 대부분이 전기영동 결과 ovalbumin으로 판명되었다.

SEM

새 PM30 막의 표면에는 세공들이 균일하게 분포하고 있었으나(Fig. 4.A-1), 0.25% 난백 용액을 여과한 한외여과 막(Fig. 4.B-1, B-2)에는 비교적 두꺼운 단백질 층이 막 표면을 덮고 있어 Fig. 4.A-1에서 관찰된 세공들을 발견할 수 없었다. PM30 막을 옆에서 관찰한 Fig. 4.B-2에서 막 표면에 침착된 단백질 층의 두께는 약 0.9 μm 였으며, 이들 대부분이 0.1 N NaOH로 세척 후 제거되었다(Fig. 4.C-1, Fig. 4.C-2).

고찰

여과액의 단백질 농도

모든 PFS 시료의 단백질 함량은 원시료의 절반 수준이었다. 이러한 단백질 함량 감소는 난백의 대부분을 차지하고 있던 ovalbumin (난백 단백질의 54%, pI=4.6), ovomucin (1.5%, pI=4.5~5.0), ovomacroglobulin (0.5%, pI=4.5~4.7) 등이 예비여과 단계에서 난백 용액의 pH를 4.6으로 유지시키면 이들 단백질들은 등전점인 pH 4.6에서 net charge가 0이 되어 용해도를 상실하면서 침착되었기 때문이다^(6,26). 시료의 농도가 증가

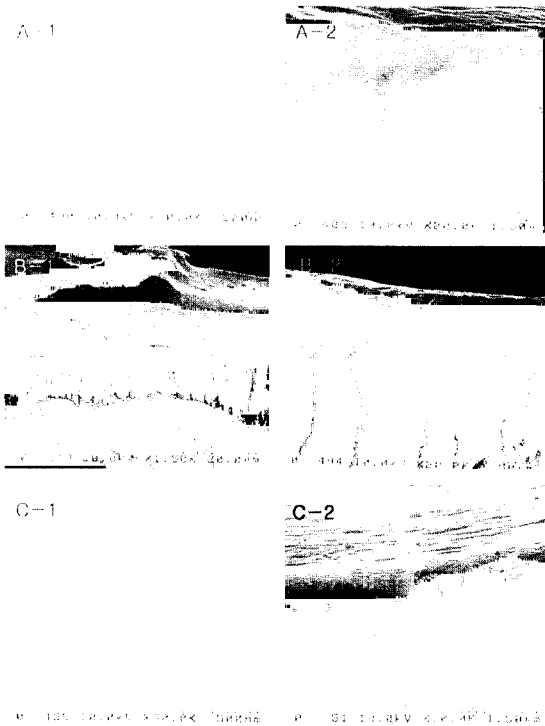


Fig. 4. Scanning electron micrographs of fouling deposits on the PM30 membrane. (A) New membrane (B) Filtered membrane (C) Cleaned membrane. (1) membrane surface (2) skin layer

할수록 침전되는 단백질의 비율이 약간 감소하였는데 이러한 현상은 단백질의 양극성에 기인하는 것으로 판단된다⁽²⁷⁾. 실제로 예비여과한 시료의 pH를 측정할 결과, 0.25% PFS의 pH가 4.67인데 반해 농도가 증가할수록 pH도 증가하여 1.0% PFS의 경우는 pH가 4.81이었다. 일반적으로 단백질은 등전점에서 멀어질수록 정전기적 힘에 의해 구조적으로 안정해지며 용해도도 증가한다^(6,27). 따라서, 단백질의 농도가 증가할수록 ovalbumin 등전점과의 차이가 커지므로 단백질 침전율이 감소하는 것으로 판단된다. 원시료 단백질의 99%가 한외여과 단계에서 제거되는 것은(Table 1) 한외여과 공정에 의해 lysozyme 이외 대부분의 단백질들이 제거되었기 때문이다.

Lysozyme 농도

Table 1에 의하면 원시료 단백질의 50% 이상이 예비여과 단계에서 제거된 것과는 달리 PFS의 lysozyme 농도는 원시료의 75% 이상이었는데, 이와 같은 현상은 다른 난백 단백질들($pI=4.6$)에 비해 등전점이 높은 lysozyme($pI=10.7$)은 침전되지 않고 예비여과 단계에서

대부분 여액으로 빠져나왔기 때문이다. PMS lysozyme의 함량은 원시료의 30% 수준이었는데, 한외여과 단계를 거치면서 막 표면에 흡착되었거나 다른 난백 단백질과의 상호 작용으로 인하여 함께 침전되면서 소실된 것으로 판단된다.

여과액의 비활성도와 purification factor

신선한 난백의 단백질 함량은 1.24%이며, 이 중 ovalbumin이 54%를 차지하는 것으로 알려져 있다⁽⁶⁾. PMS lysozyme의 함량이 원시료나 PFS보다 낮음에도 불구하고 PMS lysozyme의 비활성도가 PFS lysozyme에 비해 18~31배까지 증가된 것은 예비여과와 막 분리 단계를 거치면서 PM30 막에 의해 분자량 30,000이상의 비효소성 단백질의 대부분이 여액으로 빠져나가지 못하고 lysozyme만이 선택적으로 분리·정제되었기 때문이다(Table 1). 흡착 크로마토그래피를 사용하여 분리한 난백 lysozyme의 비활성도와 purification factor는 각각 28,340 units/mg protein과 19.4로 나타났는데⁽⁶⁾, 본 실험에서 분리한 lysozyme에 비하여 비활성도는 높고 purification factor는 낮았다. Moss 등⁽⁶⁾은 양이온 교환 크로마토그래피, 겔 크로마토그래피, reverse-phase FPLC의 3가지 방법을 연속적으로 사용하여 소의 관절과 코의 연골 조직으로부터 lysozyme을 분리하였는데, 3단계의 정제 과정을 거치면서 lysozyme의 purification factor는 각각 18, 112, 254로 상승하였으나, purification factor가 254배로 증가된 lysozyme의 비활성도가 1.419밖에 되지 않은 것으로 보아 lysozyme 이외의 다른 단백질들이 정제액내에 상당량 존재함을 알 수 있었다. 반면에 본 실험에서 single-step으로 막 분리한 0.25% PMS lysozyme의 비활성도는 4,736.8 units/mg protein으로 매우 높게 나타났으므로, 막분리 공정이 Moss 등⁽⁶⁾이 수행한 크로마토그래피 공정에 비해 lysozyme 분리에 더 효율적인 분리 방법임이 입증되었다. 세 가지 다른 농도의 시료 중 비활성도와 purification factor가 가장 높은 시료는 0.25% PMS 용액이었으므로 본 실험에 사용된 규모의 한외여과 시스템의 최적 시료 농도는 0.25%로 판단되었다.

겔 투과 크로마토그래피

Lysozyme은 13종의 난백 단백질 중 가장 분자량이 작으므로 크로마토그래피의 가장 뒷부분 peak에서 lysozyme 활성이 나타날 것으로 예측할 수 있었으며, 실제로 크로마토그래피 획분의 lysozyme 활성을 측정해 본 결과 1, 2, 3, 4 네 가지 시료의 두 번째 peak (Fig. 2.b)에서만 효소 활성이 측정되었다. Fig. 2에서

시료 2, 3, 4번의 두 번째 peak 모양이 시료 1과 다른 이유는 lysozyme과 분자량이 비슷하고 등전점이 4.6 부근인 단백질이 citrate-phosphate buffer에 의해 분리 단계 전에 침전되어 제거되었기 때문으로 사료된다. 시료 4에서는 시료 1, 2, 3과 달리 첫 번째 peak(a)가 크로마토그램 상에 전혀 나타나지 않았는데 이것은 PM30 막에 의해 고분자의 비효소 단백질이 완전히 제거되었음을 의미하며 본 실험에 사용된 막의 분리 효율이 상당히 높음을 알 수 있었다.

전기 영동

분리 단계별로 회수한 0.25% 난백 단백질을 전기 영동한 결과 ovalbumin을 제외한 다른 단백질은 농도가 매우 낮기 때문에 염색된 band의 수가 13개로 선명히 나타나지는 않았으나, ovalbumin은 분자량 45,000 부근에서 매우 굵고 선명한 band를 형성하였다(Fig. 3, lane 2). 키틴을 흡착시킨 크로마토그래피를 이용하여 인간의 혈액, 모유, 염소 젖으로부터 lysozyme을 분리한 Weaver 등¹⁰은 시료의 성질과 순도가 정제도에 많은 영향을 미친다고 하였으며, disc 겔 전기영동 결과 키틴 흡착 크로마토그래피에 의하여 원료에 관계없이 순수한 lysozyme을 분리하였다. FPLC로 분리한 lysozyme을 전기 영동하여 silver stain으로 염색한 Moss 등¹¹에 의하면, lysozyme이외의 다른 단백질 band가 많이 존재하였으며 분자량 14,100과 15,000 부근에서 lysozyme band가 관찰되었으므로 lysozyme의 isoform이 존재한다고 보고하였다. 예비 여과와 막 분리 과정을 거칠수록 분자량 45,000 부근의 단백질은 대폭 줄어들고 lysozyme의 band가 굵고 진해지는 것으로 보아(Fig. 3, lane 3-4) PM30 막이 lysozyme을 선택적으로 분리하는데 매우 효과적인 분리 방법인 것으로 판단된다. PMS내에 ovalbumin으로 추측되는 다른 단백질이 일부 존재하였는데, 이는 한계 분자량 30,000의 막이라고 하더라도 실질적인 막 분리 단계에서는 분자량 30,000 이상의 단백질도 일부 통과되는 비교적 큰 세공을 부분적으로 갖고 있기 때문이다. Kim 등¹⁴은 막의 실질적인 세공의 크기가 명목적인 세공의 크기보다 더 크다고 하였으며, Cheryan¹²은 세공의 분포가 다양하기 때문에 명목적인 세공의 크기와 실질적인 세공의 크기가 반드시 일치하지는 않는다고 하였다. 크로마토그래피 첫 번째 peak 부분(Fig. 2.a)이 비효소성 단백질이라는 것이 전기 영동 결과 확인되었으며, 활성 측정 결과 두 번째 peak에서만 효소 활성이 나타났듯이 전기 영동 결과에서도 상당히 순도 높은 lysozyme이 한외여과 후 여액에 존재한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3, lane 4).

SEM

일반적으로 막 분리시 flux의 저하를 유발하는 가장 주된 원인으로서는 막 표면에 형성되는 단백질 층(Fig. 4.B-1, B-2)을 꼽을 수 있다. Fane 등²⁸은 flux의 감소는 흡착된 단백질이 서서히 막 표면에 쌓이기 때문이며, 침착된 단백질 중 막과 단단하게 결합된 것은 세척 후에도 flux를 회복하는데 문제가 된다고 하였다. Guell 등²⁹은 BSA, lysozyme, ovalbumin을 각각 3시간 동안 미세여과하였을 때, polysulfone 막에 침착 현상이 가장 심한 단백질은 ovalbumin인 것으로 보고한 바 있다. 따라서, 막 표면에 침착된 단백질 층의 주된 구성 물질은 난백의 대부분을 차지하는 ovalbumin이며, 이 침착층이 막 분리시 flux 저하를 유발하는 주된 물질임을 알 수 있었다. 본 실험에서 사용된 한외여과 막은 미세 여과 막보다 세공 크기가 작으므로 대부분의 ovalbumin이 막 표면에서 침착되었으며, 막 침착 물질이 0.1 N NaOH로 세척 후에는 거의 대부분 제거되었으므로 PM30 막이 lysozyme의 선택적 분리에 적합한 것으로 판단되었다.

요 약

난백 lysozyme은 박테리아 세포벽을 선택적으로 분해하므로 식품 가공 및 저장용 천연 식품보존제로서의 이용 가치가 높다. 농도(0.25, 0.5, 1.0%, w/v)를 달리한 난백 용액을 예비여과하여 얻은 여액(PFS)과 PFS를 35°C에서 한외여과하여 얻은 여액(PMS)의 단백질 농도와 lysozyme 농도를 측정하고 비활성도와 purification factor를 계산하여 최적 분리 농도를 결정하였다. 난백 용액의 각 단계별 lysozyme의 분리·정제도를 겔 크로마토그래피와 전기영동으로 확인하였으며, PM30 막에 대한 난백 단백질의 막 침착도는 SEM으로 관찰하였다. 예비여과와 한외여과 단계를 거치면서 lysozyme 이외의 비효소성 단백질은 99% 이상이 제거되었다. 비활성도는 0.25% PMS > 0.50% PMS > 1.0% PMS 순이었으며 PFS에 비해 PMS의 비활성도는 한외여과 단계를 거치면서 최저 18배에서 최고 31배까지 증가하였으므로, 비활성도와 purification factor가 가장 높은 0.25% 난백 용액을 최적 농도로 결정하였다. 난백 용액(0.25%, w/v)의 겔투과 크로마토그래피 결과 비효소 성분은 대부분 ovalbumin으로 판명되었으며, 전기영동 결과 PMS내에는 고순도의 lysozyme이 존재하였다. 분자량이 큰 단백질들이 0.9 μm 의 두께로 한외여과 막 표면에 침착되었으나, SEM 관찰 결과 이들 침착 단백질의 대부분은 0.1 N NaOH로 세척

시 제거되는 것으로 나타났다. 따라서, polysulfone계의 PM30 막을 사용한 한외여과 공정이 고순도의 lysozyme만을 선택적으로 분리하는데 매우 효과적이었다.

감사의 글

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

문 헌

- Hughey, V.L. and Johnson, E.A.: Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2165-2170 (1987)
- 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)
- Biotol: Principles of enzymology for technological applications. Butterworth-Heinemann. (1993)
- Atlas, R.M.: Organization and structure of microorganisms. In *Principles of Microbiology*, 2nd, Wm. C. Brown. Publishers, USA, p. 84-141 (1997)
- Ibrahim, H.R., Higashiguchi, S., Koketsu, M., Juneja, L. R., Kim, M., Yamamoto, T., Sugimoto, Y. and Aoki, T.: Partially unfolded lysozyme at neutral pH agglutinates and kills gram-negative and gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3799-3806 (1996)
- 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. 71-148 (1996)
- <https://www.sigma-aldrich.com/SACatalog.nsf/SearchAll/3374A32988704548862566320076B3B0?OpenDocument>
- Moss, J.M., Damme, M.P.L., Murphy, W.H. Stanton, P.G., Thomas, P. and Preston, B.N.: Purification, characterization, and biosynthesis of bovine cartilage lysozyme isoforms. *Arch. Biochem. Biophys.* **339**, 172-182 (1997)
- Owen, R.O. and Chase, H.A.: Direct purification of lysozyme using continuous counter-current expanded bed adsorption. *J. Chromatography A*, **757**, 41-49 (1997)
- Weaver, G.L. and Kroger, M.: Deaminated chitin affinity chromatography: A method for the isolation, purification and concentration of lysozyme. *J. Food Sci.*, **42**, 1084-1087 (1977)
- Ruckenstein, E. and Zeng, X.: Macroporous chitin affinity membranes for lysozyme separation. *Biotech. Bioeng.*, **56**, 610-617 (1997)
- Cheryan, M.: Fouling and cleaning. In *Ultrafiltration and microfiltration Handbook*, Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, p. 237-292 (1998)
- 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)
- Kim, K.J., Chen, V. and Fane, A.G.: Some factors determining protein aggregation during ultrafiltration. *Biotech. Bioeng.*, **42**, 260-265 (1993)
- 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)
- Ehsani N., Nyström, M., Ojamo H. and Siika-aho M.: Separation of enzymes produced by *Trichoderma reesei* with hydrophobic ultrafiltration membranes. *Process Biochem.*, **31**, 253-263 (1996)
- 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)
- 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)
- 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)
- Nyström, M., Pihlajamäki, A. and Ehsani N.: Characterization of ultrafiltration membranes by simultaneous streaming potential and flux measurements. *J. Membr. Sci.*, **87**, 245-256 (1994)
- Lee, E.Y. and Woo, G.J.: Ultrafiltration and separation process optimization of hen egg white lysozyme as natural antimicrobial enzyme. *Korean J. Food. Sci.*, **30**, 397-406 (1998)
- Amicon catalog* No. 388, p. 8-53 (1995)
- 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)
- Stenesh, J.: Isolation, purification, and assay of egg white lysozyme. In *Experimental Biochemistry*, Allyn and Bacon, MA, p. 135-147 (1984)
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D. and Edelstein, S.J.: Gel electrophoresis under denaturing conditions. In *Protein methods*, 2nd ed., Wiley-Liss, Inc., New York, p. 107-154 (1996)
- Stryer, L.: Exploring proteins. In *Biochemistry*, 3rd ed., W.H. Freeman and Company, New York, p. 43-70 (1988)
- Damodaran, S.: Amino acids, peptides, and proteins. In *Food Chemistry*, 3rd ed., Fennema, O.R. (Ed.), Marcel Dekker, New York, p. 321-430 (1996)
- 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)
- Guell, C. and Davis, R.H.: Membrane fouling during microfiltration of protein mixtures. *J. Membr. Sci.*, **119**, 269-284 (1996)