

난백 및 이온교환수지의 전처리 조건이 난백 lysozyme 의 추출에 미치는 영향

유익종 · 이성기 · 김경환 · 민병용
한국식품개발연구원
(1989. 9. 5 接受)

Effects of Egg White and Ion Exchange Resin Pretreatment on Separation of Egg White Lysozyme

I. J. Yoo, S. K. Lee, K. H. Kim and B. Y. Min

Korea Food Research Institute
(Received September 5, 1989)

SUMMARY

Pretreatment of egg white and ion exchange resins was attempted to separate lysozyme from egg white efficiently. Apparent viscosity of egg white could be decreased to 3cp by homogenization for 30 minutes at 2,000rpm and ultrasonication for 45 minutes. The result of testing adsorption capacity of lysozyme was as follows; CM-Sephadex C-25 > Duolite C-464 > Amberlite C-50 > Dowex MSC-1 > Amberlite IRC-50 > Amberlite IRC-84. Although CM-Sephadex C-25 showed highest adsorption capacity of lysozyme, egg white could not eluted easily. Duolite C-464 was selected based on relatively high lysozyme adsorption and good egg white eluting property for separation of egg white lysozyme. Na⁺ form of Duolite C-464 was most effective on adsorption of lysozyme. To separate lysozyme from egg white efficiently rinse buffer and eluting solution were selected 0.1M sodium phosphate buffer at pH 6.5 and 10% ammonium sulfate respectively. After separating lysozyme from egg white, foaming power of egg white was decreased to 85.3%. Color of egg white gel was not changed while hardness of egg white gel was decreased by 30% after separating lysozyme. However, elasticity of egg white gel was increased by 13% in lysozyme-separated egg white.

I. 서 론

Lysozyme은 난백단백질의 3.5% 가량 차지하는

강한 알카리성 효소로서 등전점이 10.5~11.0에 속하며 분자량은 14,300으로 알려져 있으며 그 공식 명칭은 muramidase에 속하는 N-acetylhexosa-

minodase이다. 또한 lysozyme은 세균의 세포벽의 주요 구성성분인 mucopolysaccharide의 N-acetylglucosamine과 muramic acid의 사이에 연결된 β -linkage를 가수분해시키는 작용을 하므로서 세포벽의 성분을 용해시키기 때문에 그람 양성균의 성장 억제 또는 사멸에 효과가 있는 것으로 밝혀져 있다 (Proctor, 1988).

이러한 lysozyme은 세균 뿐 아니라 virus 등에도 불용성 물질을 생성하므로 불활성화시키는 작용을 하여(Hasselberger, 1978) 오래전부터 소염제 또는 항생물질 대용 등의 목적으로 의약품 원료로 이용되어 왔다(Kageoka, 1977). 한편 lysozyme은 눈물, 혈장, 췌장, 모유나 우유(Wardlaw, 1962; Jolles, 1961) 등 동물조직이나 양배추 (Ereifej, 1980) 같은 식물조직 등 자연계에 널리 분포되고 있으며 특히 우유에는 100 ml당 13 μ g이 들어 있으나 모유에는 이의 약 3,000배인 100 ml당 39 mg이 들어 있으므로 조직내의 감염을 막는 작용을 하며 우유에 난백 lysozyme을 첨가하면 부드러운 커드를 형성하고 우유의 소화증진에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 조제분유를 모유화 할 경우 lysozyme을 대개 20 mg % 이상 첨가할 것을 권장하고 있기도 하다(Proctor, 1988). 그러나 계란에는 난백 중에 0.5% (전물량 기준시 3.5%) 가 존재하고 있어 유통되고 있는 lysozyme은 대부분 난백 lysozyme이 유통되고 있다. 즉 lysozyme은 자연계에서 직접 추출하기 때문에 일반 화학보존료나 방부제와는 구별되고 미생물의 적용범위도 다르기 때문에 식품산업의 이용에 새로운 가능성을 가지고 있다. 현재 치즈의 장기 숙성시에 젖산 이외의 불필요한 산인 butyric acid를 생산하는 균을 억제한다(Stadhouders, 1986)든지 캔제품의 저온살균이 요구될 때나 살균하기 곤란한 식품에 이용되고 있다 (Eisai, 1988). 뿐만 아니라 항암적 기능에 관여하는 중간매개체로서 연구가 진행된 바가 있다(Itakura, 1978).

Lysozyme은 이와 같이 난백에 다량 존재하므로 이를 회수하여 효과적으로 활용하기 위한 시도가 오랫동안 진행되어 왔다. Alderton과 Fevold (1946) 등이 처음으로 분리에 성공한 이후, 많은 사람들이 이의 추출율을 개선하기 위하여 여러가지 시도가 이루어졌고 (Ahvenainen, 1980; Chang, 1986), 친화성 물질을 이용하여 효소 역가가 높은 lysozyme을 분

리하기도 하였다(Cherkasov, 1969; Weaver, 1977; Imoto, 1973; Reid, 1985; Yoshimato, 1975; Muzzarelli, 1978). 그러나 친화성물질을 사용할 경우 수지의 가격이 대체로 비싸고 난백을 회석시켜야 하는 단점이 있어 이온교환수지를 이용한 추출법의 개발이 시도되었다(Chielmetti, 1968; Notariani, 1968; Matsuki, 1974; Ishibashi, 1966; Li-chan, 1986). 이러한 이온교환수지를 이용한 lysozyme추출의 경우에도 난백 및 수지의 재활용, 추출된 lysozyme의 수율 향상, 순도 및 역가 증진, 공정의 연속성 및 단순화 등의 과제가 남아 있는 상태이다. 우리나라에서는 1987년 현재 연간 6.8% (약 80만 달러)의 lysozyme이 전량 수입되어 의약품용으로 사용되고 있으며 매년 수입물량이 증가하고 있는 추세이다. 한편 국내의 연간 계란 생산량은 1987년 현재 362,000%으로 계란 중 난백이 차지하는 비율이 약 58%이므로 210,000%의 난백이 연간 생산되는 셈이며 이중 10%를 가공하여 lysozyme을 추출할 경우 72.7%을 생산할 수 있다. 또한 최근 국내에서는 어육연제품 산업이 발달하면서 난백의 수요량이 늘고 있으며 마요네즈 산업에서는 난백이 부산물로 생산되므로 이렇게 생산된 난백으로 부터 lysozyme을 추출한 후 나머지의 난백을 그대로 활용할 수 있게 할 경우 계란의 부가가치를 크게 높일 수 있을 것이다.

따라서 본 시험에서는 난백을 재활용할 수 있는 lysozyme의 효과적인 추출방법을 확립하기 위하여 양이온 교환수지를 사용하여 lysozyme을 추출할 경우 난백 및 이온교환수지의 전처리 조건이 lysozyme의 추출에 미치는 영향을 구명하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 전처리

사용된 달걀은 갈색의 특란이었으며 난백의 수소 이온농도는 8.75~9.01의 것이었다. 난백을 얻기 위해 손으로 환란하였으며 난황 및 알끈을 제거한 후 점도의 저하를 위하여 균질기(Model DH-S08, 대한이화학기기)로 2,000 rpm의 속도로 균질하거나 초음파처리(Kyu Sonic, 경일초음파주식회사)를 실시하여 시료에 공시하였다.

2. 수지 특성의 검토

본 연구에 사용된 약산성 양이온교환수지는 Duolite C-464, Amberlite CG-50 (Fluka AG), Dowex MSC-1, Amberlite IRC-50, Amberlite IRC-84 (Sigma), CM-Sephadex C-25 (Pharmacia Fine Chemicals)를 이었으며 사용된 lysozyme standards는 Sigma Prod. No. L-6876 (90% protein, $\geq 54,000$ units/mg) 및 Scripps Prod. No. 273704 (98% protein, $\geq 23,900$ units/mg)이었다. 수지의 lysozyme 흡착능력 검토는 전처리된 각 수지를 지름 16mm의 column에 bed volume 4cm의 높이로 충전하고 분당 0.69ml의 속도로 0.5%의 lysozyme 용액을 유출시켜 흘러나오는 액을 280nm에서의 흡광도를 측정하여 실시하였다. 그리고 수지의 form 결정을 위하여 2M의 sodium hydroxide, ammonium hydroxide, potassium hydroxide 처리로서 Na^+ , NH_4^+ , K^+ form으로 각각 만들어 그 특성을 비교검토하였다.

3. Lysozyme의 추출

난백으로부터 lysozyme을 추출하기 위하여 Fig. 1과 같이 난백을 균질, 초음파처리하여 수지를 채운 column에 통과시킨 후 rinse buffer로 수지에 흡착되지 않은 난백을 씻어 내렸으며 lysozyme eluting buffer로 수지에 흡착된 lysozyme을 추출하여 염을 제거한 후 정제하고 건조하여 이를 lysozyme 시료로 사용하였다. 여기서 사용된 수지 및 기타 추출조건은 결과 및 고찰에서 자세히 언급하기로 한다.

4. 조사항목 및 방법

1) Lysozyme 역가의 측정

Lysozyme의 역가는 Li-Chan 등(1986)의 방법을 참고하여 다음과 같이 측정하였다. *Micrococcus lysodeikticus* 현탁액을 0.066M potassium phosphate buffer pH 6.24 용액으로 450nm에서 0.6~0.7 범위의 흡광도를 나타내는 농도(Sigma Prod. No. M-3770의 경우 buffer 10ml당 약 1.5mg)로 조제하여 기질로 사용하였다. 기질현탁액 2.5ml에 0.066M potassium phosphate buffer pH 6.24 용액에 녹아있는 200~400 units/ml의 lysozyme 용액 0.1ml를 가하고 즉시 반전혼합하여 450nm에서의 흡광도를 2분 동안 매 10초 간격으로 기록하였

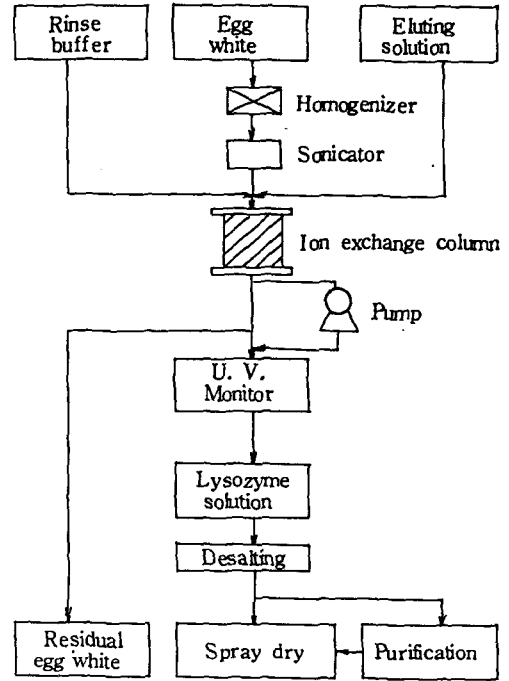


Fig. 1. Diagram of isolating lysozyme from egg white by ion exchange chromatography.

으며 분당 흡광도의 변화치는 기록초기값인 최대기울기를 적용하였다.

$$\text{units/mg solid} = \frac{450 \text{ nm에서의 흡광도 변화치/minute}}{0.001 \times \text{mg solid/Reaction Mixture}}$$

2) Lysozyme 회수율

난백의 lysozyme 함량에 대한 추출된 lysozyme의 함량을 백분율로 나타내었다. 난백질의 함량은 순수 lysozyme을 표준물질로 하여 Lowry 등(1951)의 방법에 의하여 측정하였다.

3) SDS-PAGE

Weber and Osborn(1969)의 방법에 준하였다.

4) 점도

난백의 pH에 따른 점도는 회전점도계인 Visco-tron (Model No. 8024)을 이용하여 measuring

system D 14에 의해 측정하였으며 128 rpm에서의 shear rate 469.76 sec⁻¹을 기준으로 표시하였다. 균질 및 초음파 처리에 따른 난백의 점도는 Brookfield Synchro-Lectric Viscometer (LVT Models)를 사용하여 측정하였으며 이 때 사용된 spindle은 No. 1으로 60 rpm의 shear rate 60 sec⁻¹을 기준으로 표시하였다.

5) 색택

난백 및 가열된 젤의 색택은 Color Difference Meter (Yasuda Seiki Co. UC 600 IV)를 이용하여 L, a, b 및 E치를 구하였으며 표준색판은 백색 plate (L : 89.2, a : 0.923, b : 0.783)를 사용하였다.

6) 기포력

난백 20 ml와 증류수 30 ml를 혼합한 후 2,000 rpm에서 30초간 예비교반 시킨 후 10,000 rpm에서 1분간 교반시켜 전체부피를 ml로 표시하여 처리간의 차를 비교하였다. 사용된 교반기는 Ace Homogenizer (Model Nissei AM-8)이었다. 교반된 거품의 용량은 mess cylinder로 측정하였다.

7) 텍스처

난백의 젤강도 및 텍스처를 측정하기 위하여 80°C에서 30분간 가열한 후 Instron (Model No. 1140)을 사용하여 측정하였으며 시료의 지름은 3.3 mm, 높이는 15 mm, plunger의 지름은 12 mm, 간격 (clearance)은 2 mm, crosshead 속도 200 mm/min, chart 속도 100 mm/min의 조건을 채택하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 난백의 점도 저하

난백의 점도 저하는 난백으로 부터 lysozyme을 효율적으로 추출하는 데 가장 중요한 공정의 하나이다. 왜냐하면 난백은 그 구성분이 크게 두가지로 되어 있는데 그 중 하나는 수양난백이고 나머지는 농후난백이다. 이 중 특히 농후난백은 점도가 높아 50 mesh의 sieve를 통과하지 못할 정도이다. Stadelman (1977)은 # 3 Buchner funnel에 6번 강제로 통과시킨 혼합난백의 겔보기 점도가 24 sec⁻¹의 shear rate에서 15 - 27 cp이었으며 가소성유체의 특성을 가진 물질이라고 보고한 바 있다.

난백의 점도를 저하시키기 위하여 균질기를 사용하여 2,000 rpm의 속도로 0 ~ 60분까지 균질하고

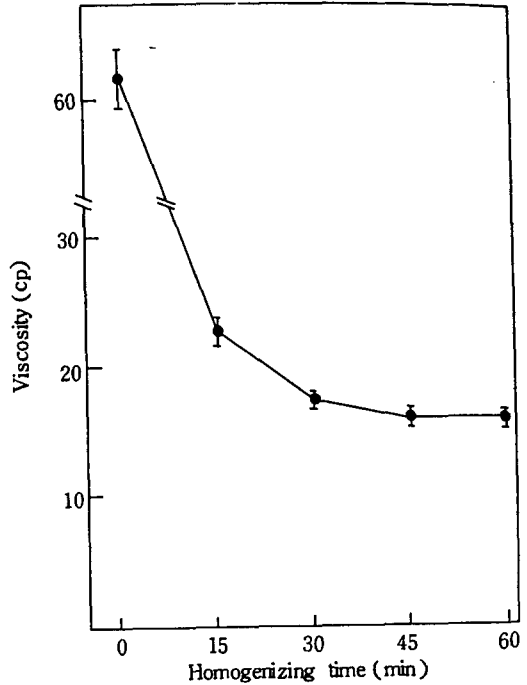


Fig. 2. Changes in apparent viscosity of egg white with different homogenizing time.

그 겔보기 점도를 측정된 결과 Fig. 2과 같이 나타났다. 즉 원료난백의 경우 60 sec⁻¹의 shear rate에서 62 cp의 점도를 나타내었으며 균질시간이 증가할수록 점도는 떨어지는 경향이었으나 30분 이상 균질할 경우 그 저하율이 점차 낮아졌으며 60분간 균질 후에는 약 15 cp까지 떨어졌다.

30분간의 균질처리를 완료한 난백은 더욱 점도를 저하시키기 위하여 초음파처리를 실시하였다. 그 결과 Fig. 3에서와 같이 처리시간에 따라 점차 낮은 점도를 나타내어 45분 경과후에는 60 sec⁻¹의 shear rate에서 3 cp부근까지 떨어졌다. 그러나 더 이상의 처리에 의하여 난백의 점도는 오히려 다소 증가하는 듯 하였다. 이러한 결과는 Li-Chan 등 (1986)이 lysozyme의 분리를 위한 난백의 전처리 과정에서 난백의 겔보기 점도를 3-7 cp로 낮추어 이용하였다고 보고한 바를 고려할 때 전처리 조건으로 만족할 만 하다고 사료된다.

난백의 점도가 pH에 따라 어떻게 변화되는가를 살펴보기 위하여 시험한 결과 Fig. 4과 같이 나타났

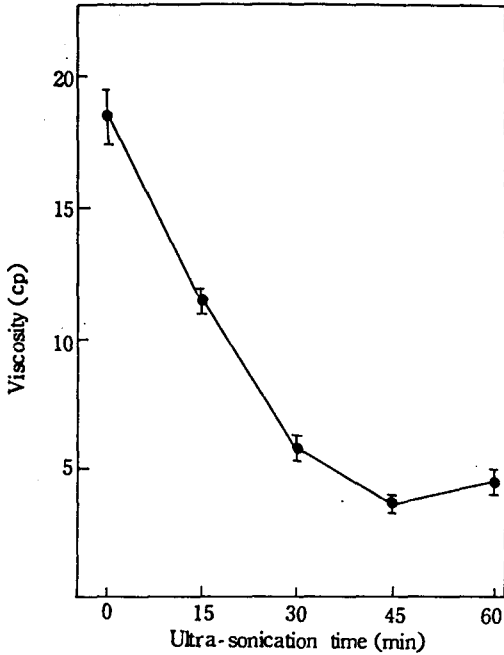


Fig. 3. Changes in apparent viscosity of egg white with different ultra-sonication time. (Egg white was homogenized for 30 min before ultra-sonication)

다. 원료난백을 상기 시험에서와 같이 30분간의 균질처리 및 45분간의 초음파처리를 연속적으로 한 다음 2N HCl로 pH를 조정하여 점도를 측정 한 결과, 원료난백의 pH인 8.95에서는 469.76 sec⁻¹의 shear rate에서 약 1.6 cp의 점도를 나타내었으나 pH 7까지 저하할수록 점도는 떨어져 약 1.2 cp의 점도로 떨어졌다. 그러나 pH 6.5로 저하할 경우 난백의 점도는 약 1.3 cp의 점도를 나타내어 pH 7의 경우에 비해서는 다소 높은 점도를 나타내었다.

Katz (1975)에 의하면 난백 lysozyme을 분리하기 위한 점도저하 방안으로 pH를 6.5로 저하시켰다고 하였으나 본시험 결과 원료란에 비해서는 낮은 점도를 나타내었으나 pH 7에 비해서는 다소 높은 결과가 나타난 것으로 미루어 pH에 의하여 점도를 저하시킬 경우 pH를 7로 조정함이 추천된다 하겠다. 그러나 본 시험의 예비시험결과 pH저하 단독처리에 의해서는 난백의 점도를 효율적으로 떨어뜨리지 못함을 확인한 바 있으며 또한 pH저하에 의한 난백의

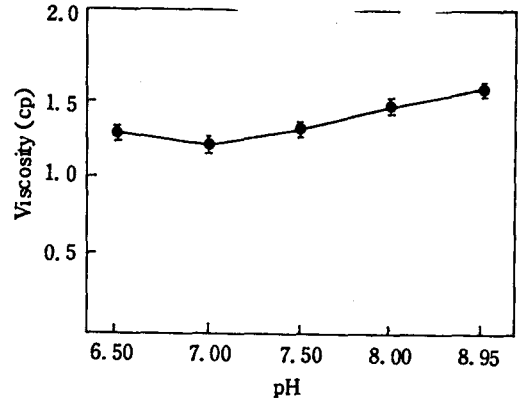


Fig. 4. Changes in apparent viscosity of egg white with different pH. (Egg white was homogenized for 30 min. and ultra-sonicated for 45 min. before adjusting pH)

점도저하효과는 전술한 효과에 비해 상대적으로 미약하며 산업적으로 이용될 때의 공정단순화 등을 고려하여 본 시험을 위한 난백처리에서는 pH저하처리를 생략하였다.

2. 이온교환수지의 선택시험

Lysozyme의 추출을 위한 수지 선택을 위하여 lysozyme standards (Scripps)를 0.1M sodium phosphate buffer pH 7.5에 용해시켜 0.5%용액으로 만들어 수지가 충전된 column에 통과시켰다. 사용한 column의 직경은 16 mm이었으며 수지의 bed volume은 8.0 ml이었다. Lysozyme 표준용액의 유출 속도는 0.69 ml/min로 일정하게 조정하였으며 이때 수지에 대한 lysozyme의 contact time은 11.6분이었다. 용액의 유출은 하향유출방식을 채택하였다.

그 결과 Fig. 5에서 나타난 바와 같이 Amberlite IRC-84와 Amberlite IRC-50, Dowex MSC-1의 경우 0.5% lysozyme 용액 13.8 ml, 20.7 ml, 27.6 ml를 각각 유출시켰을 때 수지는 이미 포화상태를 나타내었으며 이상의 세가지 수지에 대한 반포화점은 9.7~13.8 ml의 lysozyme 용액이었으며 이것은 bed volume 8 ml의 수지당 48~69 mg의 lysozyme에 해당되는 것이었다.

Amberlite CG-50은 상기 두가지 수지에 비해서

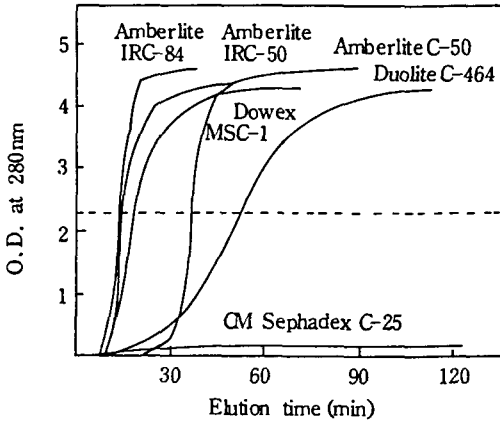


Fig. 5. Half-point saturation curves for adsorption of lysozyme on various resins (0.50% standard lysozyme solutions were used).

는 높은 흡착력을 보였으나 여전히 lysozyme 흡착력이 낮아 lysozyme 용액 25.5 ml를 유출시켰을 때 반포화점에 도달했으며 이것은 bed volume 8ml의 수지당 127.7mg의 lysozyme에 해당되는 것이었다.

이에 비해서 Duolite C-464는 높은 lysozyme 흡착력을 나타내어 lysozyme 용액 37.3 ml를 유출시켰을 때 반포화점에 도달하여 bed volume 8ml의 수지당 186.3mg의 lysozyme에 해당되는 양 만큼인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Li-Chan 등(1986)이 보고한 bed volume 7.5 ml의 수지당 225mg의 lysozyme을 흡착할 수 있었다는 보고와는 다소 차이가 있었으나 이것은 lysozyme 용액의 유출속도 즉 수지에 대한 lysozyme의 contact time이 37.5분에서 11.6분으로 1/3 이하 짧아졌기 때문인 것으로 보여진다.

그러나 CM-Sephadex C-25의 경우 lysozyme 용액 37.3 ml를 유출시켰을 때 까지 반포화점에 도달하지 않아 좋은 흡착력을 나타내었으나 난백에 적용시 점도의 급격한 상승으로 말미암아 연속적 공정인 column을 통한 lysozyme의 분리에는 적합하지 않은 것으로 나타났다. 따라서 lysozyme의 추출을 위한 수지는 Duolite C-464로 결정하였으며 수지의 form 결정시험을 계속 수행하였다.

3. Duolite C-464의 form 결정시험

수지 Duolite C-464의 form 결정을 위하여 2M

의 sodium hydroxide, ammonium hydroxide, potassium hydroxide 처리로서 Na^+ , NH_4^+ , K^+ form으로 각각 만들어 column에 충전시키고 lysozyme standards (Scripps)를 0.1M sodium phosphate buffer pH 7.5에 용해시켜 0.5% 용액으로 만들어 수지가 충전된 column에 통과시켰다. 사용한 column의 직경은 16mm이었으며 수지의 bed volume은 15ml이었다. Lysozyme 표준용액의 유출속도는 0.69 ml/min로 일정하게 조정하였으며 이때 수지에 대한 lysozyme의 contact time은 22분이었다. 한편 여기서 채택한 용액의 유출은 상향유출방식을 채택하였다.

시험 결과 Fig. 6에서 나타난 바와 같이 Duolite C-464의 K^+ , NH_4^+ , Na^+ form에 0.5% lysozyme 용액 84.9 ml, 97.3 ml, 115.9 ml를 각각 유출시켰을 때 수지의 반포화점에 도달했으며 이것은 bed volume 15ml의 수지당 각각 424, 486, 580mg의 lysozyme에 해당되는 것으로 나타나 Na^+ form이 가장 높은 흡착력을 지닌 상태로 보였다.

이러한 결과는 수지 선택시험에서와는 달리 Li-Chan 등(1986)이 보고한 bed volume 7.5 ml의 수지당 225mg의 lysozyme의 흡착력과 비교할 때 7.5 ml의 수지당 290mg의 lysozyme을 흡착한 것으로 나타나 오히려 높은 결과로 나타났다. 이렇게 lysozyme 용액의 유출속도 즉, 수지에 대한 lysozyme의 contact time이 37.5분(Li-Chan 등, 1986)에서 22분으로 짧아졌음에도 불구하고 lysozyme의

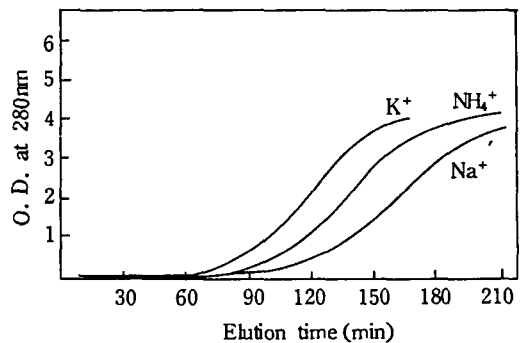


Fig. 6. Elution curves of standard egg white lysozyme on the various form of duolite C-464 ion exchange resin.

흡착력이 증가한 것은 Li - Chan 등(1986)이 실시한 lysozyme 용액의 하향유출방식에 반하여 본 시험에서는 상향유출방식을 채택한 것이 가장 커다란 이유로 판단된다.

또한 Ahvenainen 등(1980)은 Duolite C - 464 의 form이 NH_4^+ 일 때가 K, Na 일때보다 lysozyme의 흡착력이 좋았다고 보고하였으며 NH_4^+ 형태로 만들어 주기 위하여 ammonium hydroxide 처리를 하였다고 했다. 그러나 본 연구 결과에 의하면 Na^+ form이 가장 좋은 것으로 나타나 서로 다른 결과를 나타내었음을 알 수 있었다.

따라서 본 시험에서는 Duolite C-464 의 form을 Na^+ form으로 결정하여 난백 lysozyme의 추출시험을 실시하였다.

4. 난백 lysozyme의 추출시험

상기 시험에서 결정된 시료 및 수지의 종류, 형태로서 난백으로 부터 lysozyme을 추출하기 위한 조건은 다음과 같이 설정하였다. Column의 직경은 26 mm이었으며 수지의 bed volume은 85 ml로 하였다. 수지에 대한 난백의 contact time은 30.35분이었으며 이때 난백의 유출속도는 2.8 ml/min이었다. 난백의 유출이 완료된 후 rinse buffer로 수지에 흡착되지 않은 난백을 씻어 내렸으며 이때 유출속도는 4.0 ml/min이었다. 난백이 완전히 씻어 졌는지 흡광도로서 확인 후 lysozyme eluting buffer로 수지에 흡착된 lysozyme을 유출속도 4.0 ml/min으로 추출하였다. 용액의 유출은 전과정에 걸쳐 상향유출방식을 채택하였다. 여기서 추출된 lysozyme용액은

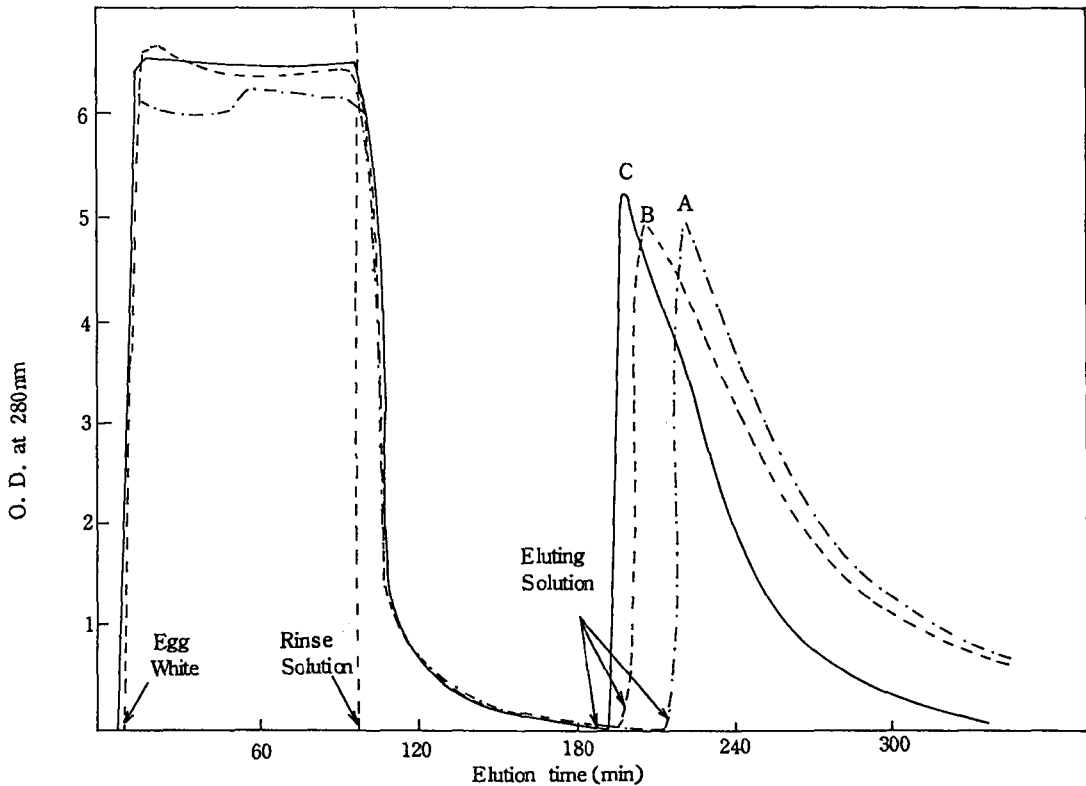


Fig. 7. Separation curves of lysozyme from egg white using duolite C-464 column chromatography at different rinse and eluting solution.

모두 모아 한꺼번에 단백질 함량을 측정하였으며 라이소자임 단백질을 침전시켜 석출하므로써 염을 제거하였다. 석출된 lysozyme은 상온에서 건조하여 순도와 역가 측정용으로 사용하였다.

난백으로부터 lysozyme추출시 280 nm에서의 흡광도 변화치는 Fig. 7과 같이 나타났다. Rinse solution의 pH를 달리 했을 때 흡광도로 판단하여 수지로 부터 흡착되지 않은 난백을 완전히 씻어내리는 데 소요된 시간은 pH 7.5의 0.1 M sodium phosphate buffer를 사용했을 때에는 126분이 소요되어 504 ml가 필요하였으나 pH 6.5를 사용하였을 때에는 각각 18분씩 짧아져서 pH 7.5의 rinse buffer를 사용하였을 때에 비해 각각 85.3%만의 rinse buffer가 소요되어 약 13~17%의 절약효과가 기대된다. 한편 난백으로부터 lysozyme을 추출하는데 소요된 총소요시간은 A처리구가 6시간 4분, B처리구가 5시간 46분, C처리구가 5시간 25분으로 C처리구가 가장 짧은 시간이 소요된 것으로 나타났다(Table 1). 이러한 소요시간은 Li-Chan등(1986)이 실시한 시험에서 4.4~5.0시간에 비해 다소 길었으나 이것은 Li-Chan등(1986)의 경우에는 rinse buffer 및 lysozyme eluting solution의 유출 속도가 분당 10 ml로 본 시험에서의 분당 4 ml에 비하여 2.5배 빨랐기 때문이다. 그러나 본 시험에서 사용한 pump는 그 최대 속도한계가 분당 4.5분이었으므로 소요시간을 더이상 줄일 수 없는 까닭이 되었다.

이러한 조건하에서 용출된 lysozyme의 량은 용

액상태에서의 단백질 함량으로 계산한 결과 난백 1,000 ml당 각각 4,200, 4,452, 4,473 mg으로 pH 6.5의 0.1 M sodium phosphate buffer를 rinse buffer로 사용하고 10% ammonium sulfate를 lysozyme eluting solution으로 사용한 처리구의 경우 가장 높은 lysozyme 회수율을 보였다. 그러나 본 시험에서 나타난 lysozyme의 회수율은 Stadelman 등(1977)이 언급한 난백의 0.35%에 비해서 다소 많은 것으로 나타났다. 이것은 Ahvenainen 등(1980)이 보고 했듯이 난백 내 lysozyme의 함량이 0.35~0.65%까지 그 변이가 크기 때문인 것으로 보인다. 따라서 난백으로부터 lysozyme의 회수율을 표시할 경우 난백 내 lysozyme의 함량에 대한 백분율보다 단위 난백원료당 추출된 lysozyme의 량을 표시하는 것이 더욱 실질적인 의미가 있는 것으로 판단된다.

Lysozyme eluting solution으로 추출된 lysozyme은 염을 제거하고 결정 상태로 석출하였다. 여기서 석출된 lysozyme은 두차례에 걸쳐 정제한 후 상온에서 건조하여 순도와 역가 측정용으로 사용하였다.

Table 2에서 나타난 바와 같이 추출된 난백 lysozyme의 역가는 51,000 unit/mg으로서 현재 유통되고 있는 시약 등급의 lysozyme의 역가 55,000~62,000 units/mg과 비교해 볼때 크게 떨어지지 않는 것으로 나타났다. 특히 식품의 보존료나 의약용으로 사용되는 lysozyme의 역가가 20,000 unit/mg 이상인 점을 고려할 때 본 시험에서 추출된 lysozyme의 역가는 충분히 높은 것을 알 수 있다.

Table 1. Consumed time, lysozyme recovery and activity with different chromatographic conditions for lysozyme separation using Duolite C-464 (column size, 26mm i.d.; resin bed volume, 85ml)

	Chromatographic conditions		
	A	B	C
Rinse solution :	0.1 M Nap (7.5)	0.1 M Nap (6.5)	0.1 M Nap (6.5)
&	&	&	&
Eluting solution :	0.5 M Nap (8.0)	0.5 M Nap (8.0)	10% (NH ₄) ₂ SO ₄
Total time consumed	364 min	346 min	325 min
- Egg white eluting time	86 min	86 min	86 min
- Rinse time	126 min	108 min	108 min
- Eluting time	152 min	152 min	131 min
Lysozyme recovery (g/E.W. 1,000 ml)	4,200 g	4,452 g	4,473 g

Table 2. Comparison of the isolated lysozyme activity with various commercial lysozyme

Lysozyme	Activity (Unit/mg)
Isolated*	51,000 ± 2,000
A Co. **	52,000 ± 1,500
B Co. **	59,000 ± 2,500
C Co. **	55,000 ± 2,500

* Isolated lysozyme was prepared by two times purification and dried at ambient condition

** Commercial lysozyme was produced from different makers A, B, and C

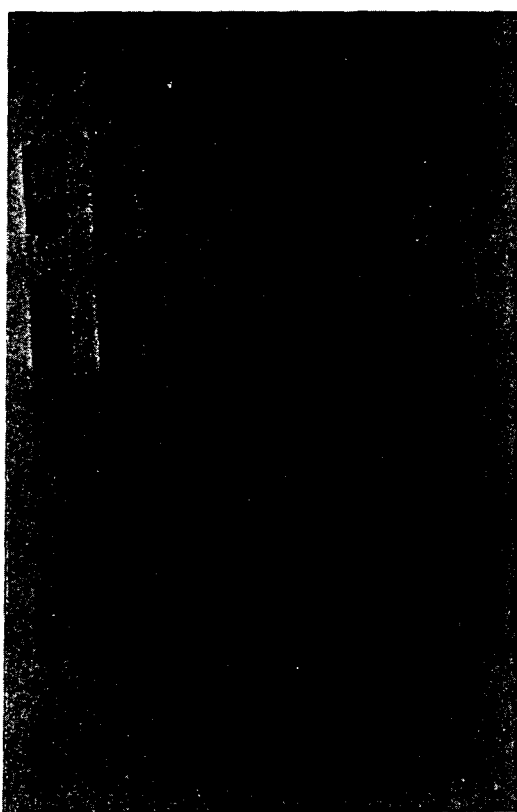


Fig. 8. SDS-PAGE patterns of native egg white (NE), lysozyme free egg white (FE), isolated lysozyme (IL₁, IL₂) and commercial lysozyme (AL, BL, CL) produced from different makers.

한편 추출된 lysozyme의 순도를 알아 보기 위하여 전기영동을 실시하여 SDS-PAGE pattern을 관찰한 결과 Fig. 8에서와 같이 수입 유통되고 있는 시약 등급의 lysozyme인 AL, BL, CL 등과 비교해 볼때 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. 또한 lysozyme 추출 전, 후의 난백을 함께 전기영동하여 SDS-PAGE pattern을 관찰한 결과 lysozyme을 추출한 후의 난백에서는 lysozyme의 band를 확인할 수가 없었으므로 본시험에서 사용한 이온교환수지에 의한 lysozyme의 추출이 효과적인 것으로 판단된다.

5. Lysozyme 추출 후 회수된 난백의 가공적성 검토

Lysozyme을 추출하고 회수된 난백과 원료 난백의 가공적성 등을 비교하기 위하여 난백액의 색택, pH 및 기포력(Table 3)과 80 °C에서 30분간 가열처리한 난백겔의 색택, 조짐감 등(Table 4)을 측정하였다.

난백액의 색택은 Table 3에서 나타난 바와 같이 lysozyme을 추출한 뒤 회수된 난백액이 원료난백에 비해서 lightness와 yellowness가 다소 감소하였다. 육안으로 관찰할 경우에도 난백의 전형적인 색인 옅은 노란색이 lysozyme의 추출에 의해 더욱 옅어진 것을 확인할 수 있었다. 난백액의 pH는 lysozyme을 추출한 뒤 회수된 난백액이 원료난백에 비해 1.11만큼 떨어진 것으로 나타났다. 이러한 것은 lysozyme 추출에 사용된 수지가 6.5~7.5의 pH를 가

Table 3. Comparison of the objective color score, pH and foaming power of egg white before and after lysozyme separation

Items	Liquid Egg White	
	Before lysozyme separation	After lysozyme separation
Color		
L	16.9 ± 0.4	10.0 ± 0.2
a	0.94 ± 0.02	0.35 ± 0.03
b	0.12 ± 0.03	-17.9 ± 0.05
E	83.4 ± 0.5	92.0 ± 0.7
pH	8.77 ± 0.02	7.66 ± 0.02
Foaming power(%)	509 ± 29.5	434 ± 21.5

진 buffer로 전처리되었기 때문인 것으로 보인다. Lysozyme을 추출한 후의 난백액을 pH의 조정없이 바로 가공적성의 검토를 실시하였다. 난백의 기포력은 원료난백에 비하여 회수된 난백의 약 85.3%의 기포력을 지녀 원료에 비해 다소 기포력이 떨어지는 것으로 나타났다.

난백액을 80℃에서 30분간 가열처리하여 난백겔을 만들고 이것의 기계적 텍스처를 측정한 결과 Table 4와 같이 가타났다. Lysozyme을 추출한 뒤 회수된 난백액을 원료로 준비한 난백겔은 원료난백으로 준비한 난백겔에 비해 약 30% 낮은 겔강도를 나타내었으며 저작성이 다소 낮아졌다. 그러나 탄력성은 오히려 13%가량 향상된 것으로 나타났으며 응집성과 부착성 등은 시료간에 유의차가 인정되지 않았다. 난백겔의 선택은 회수된 난백으로 조제한 것과 원료난백으로 조제한 것이 L, a, b, E치에 있어서 서로 유의차가 인정되지 않아 lysozyme제거에 의해 난백겔의 선택에는 아무런 영향을 주지 않았다.

즉 lysozyme을 추출한 후 난백의 가공적성중 기포력은 추출전의 난백액에 대하여 85.3%로서 다소 떨어졌으나 가열한 난백겔의 경우에는 추출전, 후 선택의 변화가 크지 않았으며 조직감의 경우에는 hardness가 다소 떨어졌으나 elasticity는 오히려 13

Table 4. Comparison of the objective color and texture score of egg white gel before and after lysozyme separation

Items	Egg White Gel	
	Before lysozyme separation	After lysozyme separation
Color		
L	93.9 ± 1.1	93.8 ± 0.5
a	2.79 ± 0.21	2.73 ± 0.09
b	10.10 ± 0.4	10.22 ± 0.5
E	10.9 ± 0.1	10.0 ± 0.2
Texture		
Hardness (g)	830 ± 14	577 ± 6
Cohesiveness	0.83 ± 0.01	0.85 ± 0.01
Adhesiveness (g)	103 ± 5	100 ± 10
Elasticity (mm)	6.63 ± 0.48	7.50 ± 0.58
Chewiness (g)	470 ± 41	391 ± 34

% 가량 증가 되었다.

IV. 요 약

난백으로 부터 lysozyme을 효과적으로 추출하기 위하여 난백의 전처리와 이온교환수지의 선택 및 전처리 등 추출조건에 관한 연구를 실시한 결과는 다음과 같다.

난백의 점도저하를 위하여 2,000 rpm의 속도로 30분간 균질하고 45분간 초음파처리를 실시한 결과 난백의 겔보기 점도가 3 cp까지 떨어졌으나 pH의 변화에 따라서는 점도의 차이가 크지 않았다. lysozyme의 추출을 위한 이온교환수지의 선택을 위하여 Amberlite IRC-84 등 6종류의 수지에 대한 Lysozyme 흡착력을 검토한 결과 CM-Sephadex C-25 > Duolite C-464 > Amberlite C-50 > Dowex MSC-1 > Amberlite IRC-50 > Amberlite IRC-84의 순으로 lysozyme 흡착력이 높았으나 난백에의 적용시 CM-Sephadex C-25의 경우에는 난백의 유출이 용이하지 않은 것으로 나타나 Duolite C-464가 가장 적합한 것으로 나타났다. 양이온교환수지인 Duolite C-464의 양이온형태 결정을 위하여 Na⁺, NH₄⁺, K⁺ form으로 만들어 lysozyme 흡착력을 검토한 결과 Na⁺ > NH₄⁺ > K⁺의 순으로 나타나 Na⁺ form으로 하는 것이 가장 효과적인 것으로 나타났다. Duolite C-464의 Na⁺ form을 이용하여 lysozyme을 추출할 경우 rinse buffer는 pH 6.5의 0.1 M sodium phosphate buffer, eluting solution은 10% ammonium sulfate가 효율적이었다. Lysozyme을 추출한 전, 후 난백의 가공적성을 측정한 결과 기포력은 추출전의 난백액에 대하여 85.3%로서 다소 떨어졌으나 가열한 난백겔의 경우에는 추출전, 후 선택의 변화가 크지 않았으며 조직감의 경우에도 hardness가 다소 떨어졌으나 elasticity는 오히려 13%가량 증가되었다.

V. 인용 문헌

1. Ahvenainen, R., Heikonen, M., Kreula, M., Linko, M. and Linko, P.: 1980. Separation of Lysozyme from Egg White. Food Process Engr., 2, 301.
2. Alderton, G. and Fevold, H. L.: 1946. Direct Crystallization of Lysozyme from Egg White

- Crystalline Salts of Lysozyme. *J. Biol. Chem.*, 164.
3. Chang, C. T., Chen, L. H., Sung, H. Y., and Kao, M. D.: 1986. Studies on the Purification of Lysozyme from Egg White by Ultrafiltration. *J. Chinese Agr. Chem. Soc.*, 24, 86.
 4. Cherkasov, I. A. and Kravchenko, N. A.: 1969. Improved Method for Isolation of Lysozyme by Enzyme Substrate Chromatograph. *Biokhemiya*, 34, 1089.
 5. Chielmetti, G. and Trinchera, C.: 1968. Lysozyme Production from Egg White. *Brit. Patent*, 1, 110, 466.
 6. Eisai, K. K.: 1980. Sake Storage, Japanese Examined Patent, 5, 535, 105.
 7. Ereifej, K. I. and Markakis, P.: 1980. Cauliflower Lysozyme. *J. Food Sci.*, 45, 1781.
 8. Hasselberger, F. X.: 1978. "Uses of Enzymes and Immobilized Enzymes" p. 128. Nelson-hall Inc. Publishers Chicago.
 9. Imoto, T. and Yagishita, K.: 1973. Chitin Coated Cellulose as an Adsorbent of Lysozyme-like Enzyme: Some Applications. *Agr. Biol. Chem.*, 37, 1191.
 10. Ishibashi, K. and Takai, S.: 1966. Egg White Lysozyme. *Japan. Patent*, 667, 828.
 11. Itakura, E.: 1978. Lysis Effect by Lysozyme and Amoxicillin. *Jpn. J. Dermatol.*, 88, 17.
 12. Jolles, P. and Jolles, J.: 1961. Lysozymes from Human Milk. *Nature*, 192, 1187.
 13. Kageoka, T., Nakashima, K., and Miwa, S.: 1977. Simultaneous Demonstration of Peroxidase and Lysozyme Activities in Leukemic Cells. *Am. J. Clin. Pathol.*, 67, 48.
 14. Katz, F., Fishman, L. and Levy, M.: 1975. Method of isolation of lysozyme. *Brit. J.*, 418, 738.
 15. Matsuki, A., Fujita, Y., and Nomoto, M.: 1974. Preparation of Egg White Lysozyme. *Kokai*, 74, 590.
 16. Muzzarelli, R. A. A., Barontinin, G., and Rocchetti, R.: 1978. Isolation of Lysozyme on Chitosan. *Biotech. Bioengr.*, XX, 87.
 17. Li-chan, E., Nakai, S., Sim, J. Bragg, D. B., and Lo, K. V.: 1986. Lysozyme Separation from Egg White by Cation Exchange Column Chromatograph. *J. Food Sci.*, 51, 1032.
 18. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
 19. Notarianai, A. F. and Chielmetti, G.: 1968. Lysozyme Recovery and Purification. *Brit. Patent*, 1, 155, 793.
 20. Proctor, V. A., and Cunningham F. E.: 1988. The Chemistry of Lysozyme and Its Use as a Food Preservative and a Pharmaceutical. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 26, 359.
 21. Reid, L. S.: 1985. Method for Separating Lysozyme from Egg-White. *United State Patent*, 4, 552, 845.
 22. Stadelman, W. J., and Cotterill, O. J.: 1977. *Egg Science and Technology*, 2nd ed., 71-74.
 23. Stadhouders, J., Stegink, H., and Berg, V. D.: 1986. The Use of Lysozyme for the Prevention of Butyric acid in Gouda Cheese. The Limited Effect of the Enzyme. *Meijeritietellinen Aikakauskirij*, XLIV, 23.
 24. Wardlaw, A. C.: 1962. The Complement-dependent Bacteriolytic Activity of Normal Human Serum. I. The Effect of pH and Ion Strength and the Role of Lysozymes. *J. Exp. Med.*, 115, 1231.
 25. Weaver, G. L., Kroger, M., and Katz, F.: 1977. Deaminated Chitin Affinity Chromatograph: A Method for Isolation, Purification, and Concentration of Lysozyme. *J. Food Sci.*, 42, 1084.
 26. Weber, K. and Osborn, M.: 1969. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl-sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244, 4406.
 27. Yoshimato, T., Hayashida, S., Tobilishi, M., Kado, K., and Tsuru, D.: 1975. Purification of Several Bacteriolytic Enzymes by Affinity Chromatograph on Lysozymelysate of *Micrococcus Lysodeikticus* Cell Wall coupled With Sepharose. *J. Biochem.*, 78, 253.