

## 이온교환 칼럼 크로마토그래피를 이용한 난백에서 Lysozyme의 연속추출

박성준 · 김현석 · 김현위 · 안태희 · 박기문 · 최춘언

오뚜기 중앙연구소

### Continuous Separation of Lysozyme from Egg White by Ion Exchange Column Chromatography

Seong-Joon Park, Hyeon-Seok Kim, Hyeon-Wee Kim, Tae-Hoe Ahn,

Ki-Moon Park and Chun-Un Choi

Ottogi Research Center, Anyang

#### Abstract

Continuous column chromatographic separation of lysozyme from egg white was investigated. A weak acid type cation exchange resin, Duolite C-464, was used because of high lysozyme recovery and ease of column operation in this experiment. The resin was equilibrated at pH  $7.9 \pm 0.1$  in Na<sup>+</sup> form. Continuous lysozyme separation was processed by repeating cycles (one cycle : resin equilibration, flow egg white, rinse, lysozyme elution) in automated preparative Liquid Chromatography (LC) system (column size ; i.d. 50 mm, resin bed volume ; 1020 ml). At comparison of UV levels in rinse end point and elution end point of every cycle, the UV levels of rinse end point are maintained below 30% for 19 cycles and that of elution end point are also maintained below 30% for 17 cycles, stably, but was increased above 50% after 18 cycle. That indicated the eluting ability of lysozyme was reduced conspicuously after 18 cycle in continuous cycling process. The recovery of lysozyme was maintained above 90% from one to 17 cycle, but was decreased to 72% and 65% in 18 cycle and 19 cycle, respectively.

Key words : lysozyme, egg white, continuous column chromatographic separation

#### 서 론

Lysozyme은 1922년 Alexander Fleming에 의해 최초로 발견된 용균효소<sup>(1)</sup>(E.C.3.2.1.17)로서 그 용균작용은 세균 세포벽의 N-acetylmuramic acid- $\beta$ -(1-4) N-acetylglucosamine(peptidoglycan)을 가수분해 시킴으로써 이루어지며 특히, 이 효소는 peptidoglycan이 노출되어 있는 gram 양성균에 주효하고, gram 음성균 중에서도 *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* 및 *Escherichia* 등에 알칼리제와 혼용했을 때 그 효과가 큰 것으로 보고되고 있다<sup>(2,3)</sup>. 또한, 이 효소는 용균작용 외에도 virus의 불활성화와 단백질의 소화, 흡수촉진 및 장내 유용균주인 비피더스균의 증식을 촉진시키는 효과 등도 보고되고 있다<sup>(4)</sup>. 이런 효과들을 이용하여 lysozyme을 식품의 보존료와 의약품원료 및 유아식의 영양강화 부문에 사용하고 있으며<sup>(4-7)</sup>. 현재 국내에서도 연간 10톤 가량을

외국에서 수입하고 있다<sup>(8)</sup>.

이상과 같이 유용한 천연물질인 lysozyme은 동물의 조직, 체액, 식물 및 미생물 등에 널리 분포되어 있지만, 난백 중에 함량이 약 0.3%로 가장 높다. 난백은 다른 lysozyme 함유물질에 비하여 생산량이 풍부하며, 추출 조도가 비교적 용이하기 때문에 lysozyme 추출원료로 가장 적합한 것으로 알려져 있다<sup>(9)</sup>. 난백에서 lysozyme의 추출은 직접결정화법, 친화성 크로마토그래피법, 이온교환 크로마토그래피법 및 한외여과법 등이 시도 되어왔는데 직접결정화법<sup>(9,10)</sup>은 추출한 lysozyme의 수율 및 순도가 떨어지고 추출 후 난백의 재활용이 어려우며, 친화성 크로마토그래피법<sup>(11,12)</sup>은 친화성물질이 고가이므로 산업적으로 이용하기엔 불리하다. 또, 한외여과법은 수율이 현저하게 떨어지며 수율증대를 위하여는 요소나 pronase 같은 화학물질을 첨가<sup>(13)</sup>해야 하는 문제점이 있다. 이에 반해 이온교환 크로마토그래피법은 수율 및 순도가 높고 추출 후 난백의 재활용이 가능하기 때문에 산업적으로 이용되고 있다. 이온교환수지를 이용한 난백에서 lysozyme의 추출은 batch식과 column식이 시도

Corresponding author : Seong-Joon Park, Ottogi Research Center, 166-4, Pyeongchon-dong, Anyang, Kyeonggi-do, 430-070, Korea

되었으나, 수율과 연속작업성에서 column식이 우수한 것으로 보고되고 있다<sup>(14)</sup>. 또한, 몇몇 연구자들에 의하여 여러 종류의 이온교환수지로 난백에서 lysozyme 추출시 순도, 수율, 수지의 부피변화, clogging 상태 및 추출조건들에 대하여 비교 검토된 바 있지만<sup>(14,15)</sup>, 이들의 연속적 추출에 대한 연구는 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 난백에서 lysozyme을 산업적 규모로 추출키 위한 기초자료를 얻음 목적으로 지금까지 수율, 순도, 수지의 작동 용이성 등의 측면에서 가장 효과적이라고 밝혀져 있는 Duolite C-464 양이온교환수지<sup>(14)</sup>를 선택하여 자동분취용 Liquid Chromatography(LC) system을 이용하여 연속 추출하면서 각 cycle별 수율, 순도 및 재현성에 관하여 고찰하였다.

재료 및 방법

실험재료

약산성 양이온교환수지인 Duolite C-464는 Duolite international사(프랑스) 제품을 구입하여 산, 알칼리 처리 후 Na<sup>-</sup> 형으로 평형화하여 사용하였다. Commercial lysozyme은 캐나다, 일본 등에서 각기 다른 제조회사로부터 만들어진 제품을 사용하였고, 표준품 lysozyme과 *Micrococcus lysodeikticus*는 Sigma사(미국) 제품을 사용하였다.

시료 난백 및 전처리

국내 농장에서 산란 24시간 이내의 계란을 자동할란기에서 할란 및 분리하여 얻은 난백을 Gaulin homogenizer(내부압력; 207 kg/cm<sup>2</sup>, 미국)로 균질화하여 점도를 3mPa 이하로 떨어뜨린 후 본 실험에 사용하였다.

연속추출 장치

본 실험에 사용한 난백에서 lysozyme 연속추출 장치는 자동분취용 Liquid Chromatography(LC) system(Soken, 일본)으로서 pump, buffer select unit, detector, fraction collector로 구성되어 있으며, 컴퓨터로 전자동 연속제어 할 수 있는 system이다.

연속추출 및 정제

난백으로부터 lysozyme의 추출은 상기 LC system으로 행하였고, 그 과정은 Fig. 1과 같다. 즉, 균질화 시킨 할란난백을 칼럼에 통과시켜 lysozyme을 흡착, 용출함으로써 lysozyme 용출 확분을 얻었다. 또한, lysozyme-용출 확분에서 등전점 결정화, 중화, 탈염 및 건조를 함으로서 lysozyme을 정제하였다. 여기서 연속추출은 상기 추출 조작 즉, 평형화, 난백 접촉, rinse, lysozyme 용출과정을

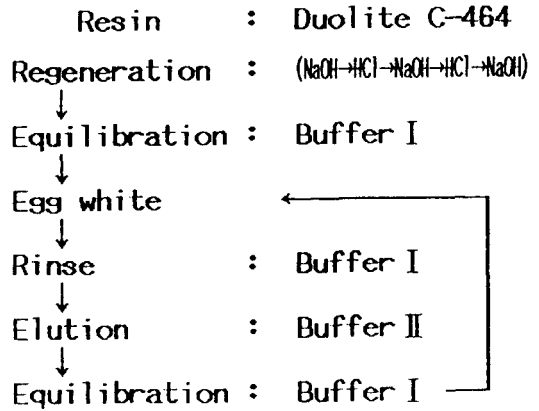


Fig. 1. Flow chart of continuous column chromatographic separation of lysozyme from egg white in LC system

Buffer I : 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.9±0.1)  
Buffer II : 2 M NaCl

Table 1. Condition of column chromatography

Resin	Duolite C-464, Na <sup>+</sup> form
Column size	i.d. 50 mm, height 52 cm
Resin bed volumn	1020 ml
Flow rate and time	
equilibration	60 ml/min for 50 min
egg white	30 ml/min for 100 min
rinse	60 ml/min for 50 min
elution	60 ml/min for 90 min
Equilibration and	
rinse buffer	0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.9±0.1)
Eluting buffer	2 M NaCl

1 cycle로 하여 연속적으로 cycle을 반복함으로써 행하였고, 또한, 추출 크로마토그래피 조건은 Table 1과 같다.

UV level값의 측정

본 실험에 사용한 LC의 detector는 UV detector로서 280 nm에서 검출 하였으며 이 때, 흡광도(optical density, OD)를 UV level로 환산하여 나타내었다. 여기서 UV level 값은 280 nm에서 OD값이 2.0 일 때를 100%로 하여 백분율로 나타내었다.

Lysozyme의 회수율

시료 난백의 lysozyme 함량에 대한 추출·정제된 lysozyme의 양을 백분율(%)로 나타내었다. 시료 난백의 lysozyme 함량은 고속액체크로마토그래피(HPLC, 칼럼, protein pak 125; 용매, 0.1 M sodium phosphate buffer : Waters사, 미국)를 이용하여 정량하였다.

Table 2. Comparison of recovery due to changes of flow rate of egg white in column chromatography<sup>a)</sup>

Flow rate (ml/min)	Contact time(min)	Recovered amount(g) <sup>b)</sup>	Total nitrogen(%)	Activity (unit/mg)	Total run time(min)
18	167	11.84	14.1	31,700 ± 2,000	357
24	125	11.73	14.0	30,300 ± 2,000	315
30	100	11.69	14.2	32,200 ± 2,000	290
36	83	9.33	14.1	31,900 ± 2,000	273

a) Other chromatographic conditions are the same as shown in Table 1.  
 b) Amount of applied egg white is 3l in each condition.

**Lysozyme의 활성 측정**

Lysozyme의 활성은 Li Chan 등의 방법<sup>(14)</sup>으로 측정하였다. 즉, 기질인 *Micrococcus lysodeikticus*(M-3770)의 현탁액(기질 0.015g을 0.066 M 인산 완충액, pH 6.24, 100 ml에 녹임) 2.5 ml에 대한 lysozyme 용액 0.1 ml를 가하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 2분간 측정하였다. 활성 표시 단위인 unit는 상기 반응액 2.6 ml(기질 현탁액; 2.5 ml+lysozyme 용액; 0.1 ml)의 450 nm에서 흡광도 변화의 값이 1분당 0.001 변하는 것으로 정의하며, 활성은 lysozyme의 mg당 unit로 표시하였다. 또한, 이상의 활성 측정은 25°C에서 행하였다.

**Lysozyme 등전점 결정화 및 탈염**

Lysozyme 용액을 5~10%의 NaCl 농도에서 pH를 9.5~10.0으로 조절한 후 4°C에서 교반함으로써 lysozyme을 등전점 결정화시켰다<sup>(16)</sup>. 탈염은 dialysis tubing (Sigma사, 미국)으로 유수에서 행하였다.

**SDS-전기영동 및 순도 측정**

Weber and Osborn의 방법<sup>(17)</sup>을 참고로 12.5% acrylamide 농도로 slab gel 전기영동하였고, densitometer로 lysozyme band의 순도를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**난백 접촉조건에의 설정**

1 cycle당 난백 접촉량은 3l이며, 난백의 접촉속도별 lysozyme 회수량과 활성을 분석한 결과를 Table 2에 나타내었다. 유속이 30 ml/분 이하의 접촉에서는 회수량과 활성이 최대로 유지되다가 36 ml/분일 때 회수량이 현격히 감소됨을 알 수 있다. 따라서 본 실험에서 난백 접촉 속도는 30 ml/분으로 하였다.

**크로마토그래피 및 연속추출시 재현성**

1 cycle의 UV detector(280 nm)에서 그린 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다. 1 cycle이 진행되면서 수지에 흡착되지 않은 난백 흰분과 용출 buffer에 의한 lysozyme

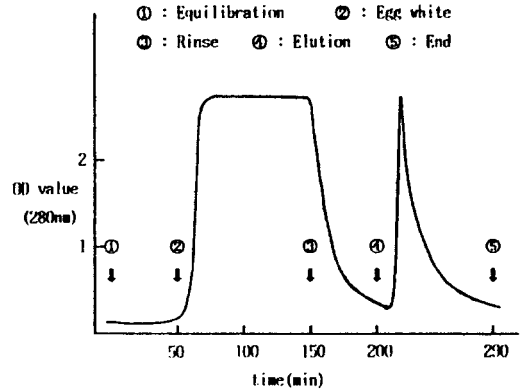
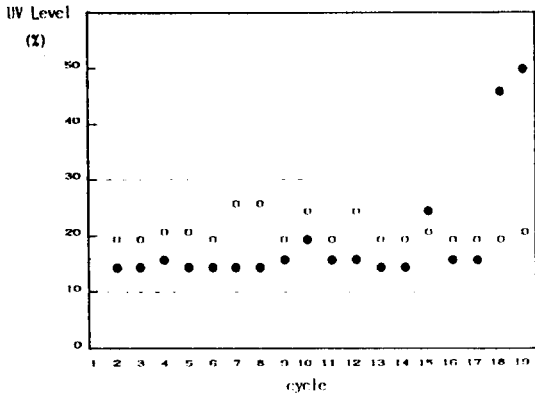


Fig. 2. Chromatogram of 1 cycle for separation of lysozyme from egg white using Duolite C-464 column chromatography

흰분이 잘 분리되고 있음을 알 수 있다. 여기서 lysozyme 용출흰분을 각 cycle별로 정제하여 수율 및 활성도를 측정하였고, cycle을 연속적으로 반복하면서 상기 추출 크로마토그래피의 재현성을 살펴보기 위해 크로마토그램 중 rinse끝점과 용출끝점의 UV level값을 비교하였다 (Fig. 3). 그 결과 rinse끝점은 19 cycle까지 30% 이하를 유지하였다. 용출끝점은 17 cycle까지는 30% 이하에서 비교적 안정하게 나타났으나 18 cycle 이후 부터는 50% 이상으로 나타났다. 이 결과로부터 연속 17 cycle까지는 흡착 및 용출이 양호하고, 18 cycle 이후부터는 흡착은 순조로우나 용출능력이 현저하게 감소함을 알 수 있었다. 여기서 1부터 17 cycle까지의 rinse 및 용출끝점의 UV level값이 평균 20% 정도였고, 이 값을 본 크로마토그래피의 baseline으로 생각한다면, UV level값이 30% 이하라는 것은 분리에 있어 비교적 안정된 범위로 볼 수 있을 것으로 사료되었다.

**연속추출시 수율 및 활성도**

Cycle을 연속적으로 반복하면서 나온 각 cycle의 lysozyme 용출흰분을 상기 방법으로 정제하여 lysozyme의 회수율, 질소함량(%), 활성 등을 탈염 전과 탈염 후로 나누어 각 cycle별로 비교검토한 결과를 Table 3에 나



**Fig. 3.** UV levels at the end point of rinsing and elution in each cycle of continuous column chromatography  
 —○— : End point of rinsing  
 —●— : End point of elution  
 UV level is the percentage of OD Value at 280 nm.

타내었다.

1부터 19 cycle까지 반복함에 따라 추출 정제된 lysozyme의 질소함량과 활성에는 별 차이가 없었다. 회수율에 있어 1부터 17 cycle까지는 90% 이상이 유지되었으나 18 cycle은 75%, 19 cycle에서는 68%로 감소하였다. 이는 Fig. 3에서 용출능력이 현저히 감소하는 것과 상관있는 결과로 사료되었다. 또한, 정제과정 중 탈염을 하지 않은 lysozyme을 건조분말로 했을 때 염이 약 15% 정도 존재하기 때문에 질소함량이 14% 이하로 나타났는데 이는 의약품 원료 규격기준<sup>(18)</sup>의 하한치인 15.5%를 밑도는 수준이었다. 물론, lysozyme 용출액에서 대부분의 염은 등전점 결정화하여 lysozyme만을 침전 석출함으로써 제거가 가능하지만 이것만으로는 부족하다. 유수에서



**Fig. 4.** SDS-PAGE patterns and densitometric purities of refined lysozyme and other commercial preparations

1 : raw egg white, 2 : lysozyme-free egg white, 3 : eluted fraction, 4 : lysozyme after isoelectric crystallization, 5 : lysozyme after purification, 6, 7 : commercial lysozyme, 8 : standard lysozyme

dialysis했을 경우 즉, 탈염 후의 lysozyme은 질소함량이 약 17%로 증가하였으며 또한, 활성은 40,000~50,000 (unit/mg)로 나타났다.

추출 정제된 lysozyme의 SDS-전기영동 패턴의 순도 비교

본 방법으로 추출·정제된 lysozyme의 전기영동 패턴을 Fig. 4에 나타내었다. 본 연구에서 정제된 lysozyme을 비롯하여 여타의 lysozyme 제품은 모두 단일

**Table 3.** Recovery of lysozyme from egg white in continuous column chromatography

Cycle	Lysozyme before dialysis			After dialysis			
	Recovered amount(g)	Total nitrogen(%)	Activity (unit/mg)	Recovered amount(g)	Total nitrogen(%)	Recovery ratio(%) <sup>a)</sup>	Activity (unit/mg)
1	12.11	14.3	32,800±2,000	9.87	17.2	94	47,600±2,000
3	12.21	14.4	33,100±2,000	10.08	17.1	96	43,300±2,000
6	12.37	14.2	31,800±2,000	10.19	16.9	97	41,100±2,000
9	11.99	14.3	32,200±2,000	9.77	17.2	93	44,700±2,000
12	11.82	14.5	33,900±2,000	9.66	17.4	92	45,800±2,000
15	12.51	14.0	29,500±2,000	9.98	17.2	95	48,300±2,000
16	12.27	14.2	31,700±2,000	9.87	17.3	94	51,400±2,000
17	11.61	14.2	30,800±2,000	9.45	17.1	90	45,100±2,000
18	9.42	14.0	28,300±2,000	7.56	17.1	72	41,400±2,000
19	8.49	14.1	29,600±2,000	6.82	17.2	65	43,709±2,000

<sup>a)</sup> Recovery ratio(%) is calculated by following formulation :

$$\text{Recovery ratio(}\%) = \frac{\text{Recovered amount}}{\text{Amount of lysozyme in egg white}} \times 100$$

band를 보였고, 표준품 lysozyme과 동일한 이동도(Rf치)를 나타내었으며, densitometric purity는 99% 이상을 나타내었다. 본 추출·정제과정 중 칼럼에서 용출되어 나온 lysozyme 용출 핵분의 lysozyme 순도는 약 92%이었으나 등전점 결정화를 함으로써 그 순도가 98%로 증가되었다. 또한, 등전점 결정화시킨 lysozyme을 염화물 형태로 만들기 위해 HCl을 첨가하여 pH를 3~4로 맞추면서 물에 용해시키면 lysozyme은 잘 용해되나 극미량 존재하는 이종단백질은 녹지 않으므로 제거가 가능하고 이를 제거한 정제 lysozyme은 순도가 99% 이상이었다.

결론적으로, 본 추출 정제방법 및 조건하에서 난백으로부터 lysozyme을 추출할 때 17 cycle까지 연속적으로 반복추출한 후 수지를 다시 재생하고 또 연속추출과 재생을 반복하는 것이 산업적으로 유리할 것으로 사료되었다.

요 약

식품 및 의약품 원료로 이용되고 있는 lysozyme을 난백으로부터 이온교환 크로마토그래프를 이용하여 연속추출하였다. 사용된 수지는 지금까지 수율, 순도, 작동용이성에서 가장 효과적이라고 밝혀져 있는 Duolite C-464 양이온교환수지를 선택하여 Na<sup>+</sup>형으로 pH 7.9±0.1로 평형화하여 사용하였다. 조제용 자동 Liquid Chromatography(LC) system(column size ; i.d. 50 mm, bed volumn ; 1020 ml)에서 수지 평형화, 난백접촉, rinse, lysozyme용출 순으로 cycle을 연속적으로 반복하면서 시행하고 그 재현성을 관찰하기 위해 각 cycle별 rinse끝점과 용출끝점의 UV level을 비교하였다. 그 결과 rinse끝점은 19 cycle까지 30% 이하를 유지하였다. 용출끝점은 17 cycle까지는 30% 이하에서 비교적 안정하였으나 18 cycle 이후 부터는 50% 이상으로 용출능력이 현저하게 감소하였다. 또한, 회수율 비교에서 17 cycle까지는 90% 이상을 유지하다가 18 cycle에서는 72%, 19 cycle에서는 65%로 격감하였다. 본 추출·정제 lysozyme은 전기영동상 단일 band로 나타났고, densitometer로 측정된 순도는 99% 이상이었다.

문 헌

1. Fleming, A. : On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretins. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B.*, 93, 306(1922)
2. Procter, V.A. and Cunningham, F.E. : The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 26, 359(1988)

3. Hasseolberger, F.X. : *Uses of Enzymes and Immobilized Enzymes*. Nelsonhall Inc. Publisher, Chicago, p. 128 (1978)
4. Yoshitaka, M. : Egg white lysozyme Its chemistry and application. *J. Jap. Soc. Food and Nutr.*, 24(6), 311 (1971)
5. Kageoka, T., Nakashima, K. and Miwa, S. : Simultaneous demonstration of peroxidase and lysozyme activities in leukemic cells. *Am. J. Clin. Pathol.*, 67, 48 (1977)
6. 吉田 一也, 今井 忠平, 長谷川 峯夫 : 食品用保存劑. 日本特許公報, 昭61-34793(1986)
7. 五十嵐 久尚 : 植物性食用生鮮水産物の鮮度保持法. 日本特許公報, 昭46-19576(1971)
8. 의약품 수출입 협회 : 의약품 수출입 통계연보 p. 776 (1988)
9. Alderton, G. and Fevold, H.L. : Direct crystallization of lysozyme from egg white crystalline salts of lysozyme. *J. Biol. Chem.*, 164, 1(1944)
10. 松岡 芳隆 : 卵白リゾチーム製造法. 日本特許公報, 昭41-150(1966)
11. Gary, L.W. and Manfred, K. : Deaminated chitin affinity chromatography. A method for the isolation, purification and concentration of lysozyme. *J. Food Sci.*, 42(4), 1084(1977)
12. Chang, C.-T., Jen, J.-C., Sung, H.-Y. and Su, J.-C. : Purification of lysozyme from hen egg white by affinity chromatography. *J. Chinese Agri. Chem. Soc.*, 24(3), 276(1986)
13. Chang, C.-T., Chen, L.-H., Sung, H.-Y. and Kao, M.-D. : Studies on the purification of lysozyme from egg white by ultrafiltration. *J. Chinese Agri. Chem. Soc.*, 24(1), 86(1986)
14. Li-Chan, E., Nakai, S., Sim, J., Bragg, D.B. and Lo, K.V. : Lysozyme separation from egg white by cation exchange column chromatography. *J. Food Sci.*, 51(4), 1032(1986)
15. 이성기 : 계란으로부터 Lysozyme추출에 관한 연구. *식품기술*. 2(3), 68(1989)
16. 長谷川 峯夫, 吉田 一也 : 卵白リゾチームの結晶化方法. 日本特許公報, 昭58-212784(1983)
17. Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 224, 4406 (1969)
18. 한국 제약협회 : 의약품 시험기준 및 시험방법집, p. 1165(1983)