

## 한외여과를 통한 난백 중 라이소자임의 분리정제

손 동 호 · 전 회 진 · 이 윤 희 · 구 자 경<sup>†</sup> · 조 남 준 · 장 동 일\*

한국기술교육대학교 응용화학공학과, \*(주)롯데  
(2005년 5월 19일 접수, 2005년 6월 21일 채택)

### Separation and Purification of Lysozyme from Chicken Eggwhite Through Ultrafiltration

Dongho Son, Hoejin Jun, Yunhee Lee, Ja-Kyung Koo<sup>†</sup>, Namjun Cho, and Dong Il Jang\*

Department of Applied Chemical Engineering, Korea University of Technology and Education,  
307 Gajeon-ri, Byungchon-myon, Chonan, Chungnam 330-708, Korea

\*Cotde Co. Inc, 43-5 Samun-ri, Jiksan-up, Chonan, Chungnam 330-810, Korea

(Received May 19, 2005, Accepted June 21, 2005)

**요 약:** 한외여과를 통하여 난백으로부터 라이소자임을 분리, 정제하는 연구를 수행하였다. 교반식 한외여과장치에 분획 분자량(MWCO)이 각각 10 kDa, 30 kDa 및 100 kDa의 셀룰로즈 재질 분리막을 사용하여 알부민과 라이소자임의 투과실험 데이터를 수집하였다. 단백질 용액은 20 mM, pH 6, 7, 8의 인산염 완충용액에 난단백 함량을 1%, 2%, 3% 및 10% 첨가하여 제조하였으며, 막간압력차(TMP)는 0.5~3 bar의 구간에서 실험을 하였다. 분리막의 분획분자량이 증가하면서 투과유속은 증가하였으며, 분리막에서의 막간압력차가 증가하면서 그리고 공급원액의 난백농도가 감소하면서 투과유속은 증가하였다. 또한, 분리막의 분획분자량이 감소하면서 알부민의 라이소자임에 대한 선택도는 증가하였으며, 모든 분리막에서 pH와 공급원액의 난백농도 그리고 막간압력차가 증가하면서 라이소자임의 알부민에 대한 선택도는 증가하였다.

**Abstract:** Separation and purification of lysozyme from chicken egg white was studied using ultrafiltration. We have obtained experimental data through the cellulose membranes with the molecular weight cut off (MWCO) of 10 kDa, 30 kDa and 100 kDa in a stirred ultrafiltration device. Certain amounts of egg white were dissolved into 20 mM phosphate buffers of pH 6, 7 and 8 to make protein solutions of 1%, 2%, 3% and 10% concentration. Permeation flux increased with increasing MWCO of the membrane. Permeation flux increased with increasing transmembrane pressure (TMP) and decreasing the protein concentration. As the MWCO of membrane decreased, the selectivity increased. The selectivity increased with increasing TMP and protein concentration of the solution.

**Keywords:** ultrafiltration, protein, lysozyme, albumin, separation

### 1. 서 론

생명공학 기술이 발전함에 따라 단백질 등의 생화학 물질을 대량으로 분리, 정제하는 기술의 중요성이 더해지고 있다. 이를 목적으로 한 기존 기술로는 침전법, 결정화법 그리고 원심분리법 등의 재래식 방법이 알려져 있으나 이들 대부분의 방법은 낮은 분리선택도로 인해 원하는 단백질 성분을 분리정제 하는 데에는 적합하지 못하다. 크로마토그래피법과 전기영동법 등과 같이 높

은 선택도를 위한 방법도 알려져 있으나 이들 방법들도 대량생산을 위한 방법으로 사용되기가 매우 어렵다는 단점이 있다. 이들 기존의 방법에 대하여 한외여과법은 대량상산체제에 가장 적합한 방법으로 알려져 있으며 [1-3], 분리막의 적절한 선택에 따라서는 분리선택도 역시 크게 높일 수도 있다. 한외여과법을 포함한 대부분의 분리막공정은 여타의 공정에 비하여 그 규모를 확장하기가 매우 용이하며 그 운전도 매우 간편하게 이루어지는 등 여러 가지 장점이 있다.

라이소자임은 매우 다양한 용도를 지닌 효소이다.

<sup>†</sup>주저자(e-mail : jay@kut.ac.kr)

라이소자임은 미생물 세포막을 파괴하여 결과적으로 미생물에 대한 살균효과를 보이는 효소로서 이러한 라이소자임의 살균효과는 각종 식품에서 방부제를 대용할 수 있는 첨가제로서의 용도로 사용되고 있으며 라이소자임의 항암효과도 확인된 바 있어서 암 치료제로서 사용될 가능성도 보고된 바 있다[4-6].

라이소자임을 함유하는 천연물로는 조류 알의 흰자위에 존재하는 것으로 알려져 있으며 그 이외에도 말젓, papaya 고무 그리고 곤충의 애벌레 등에 존재하는 것으로 알려져 있다. 라이소자임은 이러한 여러 가지 천연물 중 주로 계란의 흰자위에서 분리, 정제되어 사용되고 있으며 이러한 알부민을 분리, 정제하기 위하여 앞서 언급한 여러 가지 재래식 방법을 주로 사용하여 왔다.

라이소자임은 난단백 내에 매우 미량(약 3.4%)으로 존재하므로 이를 분리, 정제하는 과정에는 많은 어려움이 내재되어 있다. 이러한 상황에서 한외여과법은 좋은 해결책이 될 수 있다. 난단백 중의 라이소자임을 분리하기 위하여 분리막과, 막분리공정의 여러 가지 변수를 최적화 할 경우 매우 높은 순도의 라이소자임을 손쉽게 얻을 수도 있다. 한외여과법의 또 다른 장점은 한외여과과정 자체를 통하여 원액 내에 존재하는 세균은 물론 용액제제 중에 첨가되는 각종 불순물 입자가 완벽하게 제거되며 이로 인해 한외여과를 통하여 분리된 라이소자임은 추가의 불순물 제거과정 없이 직접 상품으로 사용될 수 있다는 점이다.

본 연구의 목적은 난단백으로부터 라이소자임을 분리하는 공정의 효율을 높이는 방안을 마련하는 것이다. 라이소자임 분리공정의 효율을 높이기 위하여서는 다량의 라이소자임을 높은 순도로 얻어내어야 한다. 이러한 라이소자임의 분리효율을 나타내는 투과특성으로는 투과유속(permeate flux, J)과 여과계수(sieving coefficient,  $\tau$ )가 있다. 여과계수는 아래의 식과 같이 표현된다.

$$\tau_{ob} = \frac{C_p}{C_b} \quad (1)$$

위의 식에서  $C_b$ 와  $C_p$ 는 각각 공급원액과 투과용액에서의 특정단백질의 농도를 의미하며, 여과계수는 특정성분의 분리막을 통한 투과의 용이도를 나타낸다. 투과유량과 여과계수 외에도 한외여과 공정의 효율을 규명

하기 위하여서는 추가의 척도가 필요하며 이는 선택도(selectivity)이다. 선택도는 특정성분과 다른 성분과의 여과계수의 비를 의미한다. 예컨대 난백 내에 존재하는 라이소자임과 알부민 간의 선택도는 아래의 식과 같이 라이소자임과 알부민 간의 여과계수의 비로 나타낼 수 있다.

$$\psi = \frac{\tau_{lys}}{\tau_{alb}} \quad (2)$$

한외여과공정의 분리효율을 높이기 위하여서는 단백질 용액의 높은 투과유속과 라이소자임의 높은 여과계수, 그리고 라이소자임의 알부민에 대한 높은 선택도를 동시에 얻어내야 한다. 이와 같은 단백질의 한외여과공정에서의 투과특성은 분리대상이 되는 단백질 성분별 분자량은 물론 단백질 분자의 2차, 3차 분자구조뿐만 아니라 이들 단백질의 등전점 등의 단백질 분자의 물리적 화학적 성질, 그리고 한외여과에 사용될 분리막의 공극직경과 한외여과공정에서의 막간압력차, 용질의 농도 및 공급원액의 pH와 같은 여러 가지 공정변수의 영향을 받는다. 그러므로 한외여과공정의 최적화를 위하여서는 이들 다양한 변수의 영향을 규명하여야 한다. 이를 위해 본 연구에서는 공급원액의 pH와 난백의 농도, 그리고 분리막의 분획분자량과 한외여과에서의 막간압력차 등을 변화시켜가면서 실험을 수행하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험재료

예비실험을 위한 라이소자임(L-6876) 알부민(A-5503)은 Sigma Chemical Company로부터 구입하여 사용하였으며 난백은 일반 식품점으로부터 계란을 구입한 후 난황을 제거하여 사용하였다. 난단백 내에 존재하는 각종 단백질 성분의 함량, 분자량 및 등전점은 Table 1에 나타내었다. 분리막은 직경이 44.5 mm이고 그 분획분자량은 각각 10 kDa (PLHK04310), 30 kDa (PLTK04310), 및 100 kDa (PLGC04310)의 셀룰로즈 재질 한외여과막을 Micropore사로부터 구입하여 사용하였다. 본 실험에서 용매로서 사용된 완충용액은 (주)덕산이화학에서 구입한  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  및  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 를 2차 증류수에 용해하여 사용하였으며 완충용액은 농도 20 mM, pH는 각각 6, 8, 7로 제조하였다. 모든 단백질 용

**Table 1.** Major Proteins in Chicken Eggwhite

	Molecular weight (kDa)	Isoelectric point (pI)	% of total protein
Ovalbumin	45	4.5	54~57%
Conalbumin	80	6.1	12~15%
Ovomucin	5,500~8,300	4.7	3~4%
Lysozyme	14.3	11.0	3.4%

액은 라이소자임, 알부민 혹은 계란 흰자위를 완충용액에 용해한 후, 공극직경 0.2  $\mu\text{m}$ 의 정밀여과막을 통하여 여과하여 사용하였다. 투과실험을 위한 단백질 용액은 이들 완충용액에 각각 1%, 2%, 3% 및 10%의 함량으로 제조하였다.

2.2. 한외여과장치 및 실험방법

Fig. 1은 본 연구에서 사용된 교반식 한외여과장치의 개략도이다. 교반식 한외여과장치(Amicon8050)는 Amicon 사로부터 구입하였으며, 이 장치는 장치 내에 50 mL의 용액을 수용하여, 직경 44.5 mm의 분리막으로 한외여과 실험을 하도록 제조되었다. 장치는 magnetic stirrer 위에 올려서 사용하였으며 장치 내에 장착된 자석 재질의 임펠러(길이 30 mm, 폭 10 mm)는 한외여과장치 아래의 magnetic stirrer에 의해 구동, 회전되고, 교반속도는 광 타고미터를 통하여 측정되었다. 한외여과장치내의 임펠러 회전속도는 1,400 rpm으로 고정하여 실험

하였으며, 임펠러와 분리막간의 간극은 1.5 mm 정도이다. 장치내의 용액은 실린더로부터 공급되는 압축질소를 사용하여 0.5~3 bar의 범위로 막간압력차를 가하였다. 막을 통해 투과된 용액은 전자저울 위에서 그 질량과 질량증가속도가 측정되었으며 이를 통하여 투과유속이 산출되었다.

2.3. 분석장치

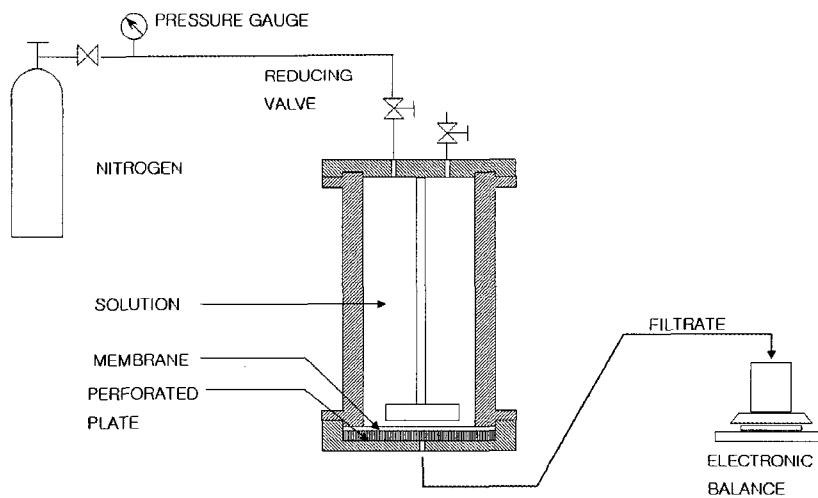
공급원액과 투과용액의 조성은 HPLC (Hewlett Packard series 1100)를 이용하여 분석하였다. 칼럼으로는 단백질 분석용으로 원형 실리카 겔 표면에 친수성기로 도포된 재질로 충전된 GPC 칼럼(Shodex, WAT035943)을 사용하였으며 이동상은 20 mM, pH 7의 phosphate 완충용액을 사용하였다. HPLC 분석 peak를 통하여 공급원액 및 투과용액 내의 단백질 농도를 평가하는 기준으로서 알부민과 라이소자임 함량이 각각 0.5%인 용액을 사용하여 표준 peak를 작성하였다.

Fig. 2는 표준 0.05%의 라이소자임과 0.05% 알부민 용액에 대하여 HPLC 분석을 통하여 얻은 표준 peak이다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 투과유속

다공성 분리막을 통한 투과유속을 예측하기 위한 상관식 중 가장 간단한 형태는 아래와 같은 Hagen-



**Fig. 1.** Experimental set-up for ultrafiltration.

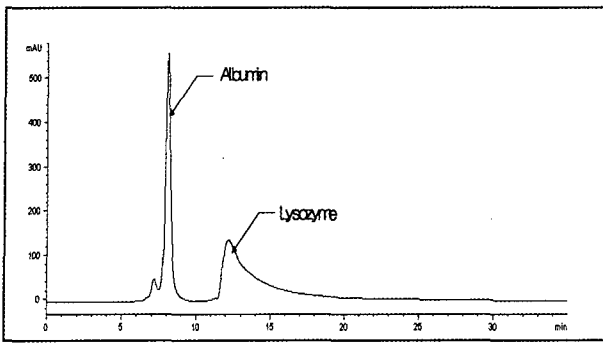


Fig. 2. HPLC (using Shodex WAT035943 column) for lysozyme (0.5%) and albumin (0.5%) solution.

Poiseuille 식으로 표현된다.

$$J = \frac{\epsilon d_p^2 P_T}{32 \Delta x \mu} \quad (3)$$

위의 식에서  $\epsilon$ 는 막의 공극률,  $d_p$ 는 공극직경,  $P_T$ 는 막간압력차  $\Delta x$ 는 막의 두께 그리고  $\mu$ 는 용액의 점도를 의미한다. 위의 식에서 볼 수 있듯이 막을 통한 투과유속은 막의 공극직경의 제곱에 비례하며 막간압력차에 비례한다. 그러나 이와 같은 막간압력차와 투과유속간의 비례관계는 공급원액의 농도가 낮은 경우 또는 투과유속이 낮은 경우에 국한되며 그 이외에 막간압력차와 투과유속간의 실제 상관관계에서는 Hagen-Poiseuille 식에서의 예측과는 다소의 편차가 있게 된다. 이는 여과과정이 이루어지면서 분리막 상류부 표면에는 분리막에 의해 차폐된 입자가 축적되는 이른바 농도분극 현상이 일어나게 되며[1-3,7,8] 이러한 농도분극 현상은 용질의 농도가 높은 경우나 높은 투과유속에서 더 심하게 일어난다. 농도분극 현상이 심화되면서 분리막 표면에는 고점도의 케이크 층이 형성된다. 그리고 이러한 케이크 층은 막을 통한 투과에 대하여 새로운 저항을 야기하게 된다. 농도분극 현상과 이로 인하여 형성되는 케이크 층으로 인해 많은 경우 1) 막간압력차의 증가에 따른 투과유속의 증가율은 감소하게 되며, 경우에 따라서는 2) 막간압력차의 증가에 의한 투과유속 증가추세가 멈춰지고 투과유속이 일정한 값을 유지하게 되기도 하고, 농도분극 현상이 매우 심한 경우 3) 막간압력차가 증가함에 따라 투과유속이 증가하다 최대값을 보인 후 감소하기 시작하는 경우도 있다.

Fig. 3은 막간압력차 1.5 bar의 한외여과에서 분획분

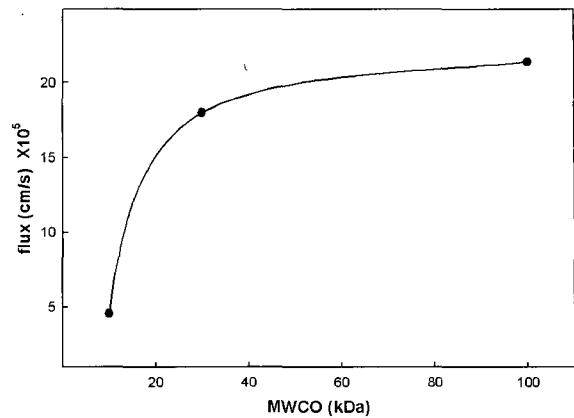


Fig. 3. Effect of MWCO on the permeation flux (TMP: 1 bar, pH 8, 1% CEW solution).

자량의 변화가 투과유속에 미치는 영향을 나타낸다. Fig. 3에서 보듯이 분리막의 분획분자량이 증가하면서 투과유속은 증가함을 볼 수 있다. 분리막의 분획분자량은 분리막을 통해 차폐되는 단백질 분자의 최소 분자량을 나타낸다. 즉 분획분자량의 증가는 분리막 공극 직경의 증가를 의미한다고 볼 수 있다. 결과적으로, Fig. 3을 통하여 분리막의 공극직경의 증가에 따라 분리막을 통한 투과유속이 증가한 것으로 볼 수 있다. 그러나 이와 같은 추세가 항상 적용되지는 않는다. Fig. 4는 분획분자량 10 kDa, 30 kDa 및 100 kDa에서 막간압력차가 투과유속에 미치는 영향을 나타낸다. Fig. 4에서 보듯이 분획분자량 10 kDa의 분리막의 경우에는 막간압력차가 증가함에 따라 투과유속은 지속적으로 증가하였지만 그 증가율은 약간씩 감소하였다. 분획분자량 30 kDa 분리막의 경우에서도 막간압력차의 증가에 따라 투과유속은 증가하였고 막간압력차가 높아짐에 따라 그 증가율은 크게 감소하였으며, 막간압력차 2.0 bar 이상의 구간에서는 투과유속이 거의 변화하지 않는 것을 볼 수 있다. 분획분자량 100 kDa 분리막에 있어서는 낮은 압력구간(1.0 bar 이하)에서는 막간압력차의 증가에 따라 투과유속이 증가하였지만 막간압력차가 1.0 bar 부근에 도달하면서 투과유속은 최대값을 보인 이후 막간압력차의 증가에 따라 투과유속이 감소하는 것을 볼 수 있다. 이로 인해 막간압력차 1.5 bar 부근 이상의 구간에서는 Fig. 3에서 보았던 바와 같이 분획분자량 100 kDa의 분리막에서의 투과유속의 값이 분획분자량 30 kDa의 분리막에서보다 더 큰 값을 갖는 추세는 역전되어 분획분자량 30 kDa의 분리막을 통한 투과유속값 보

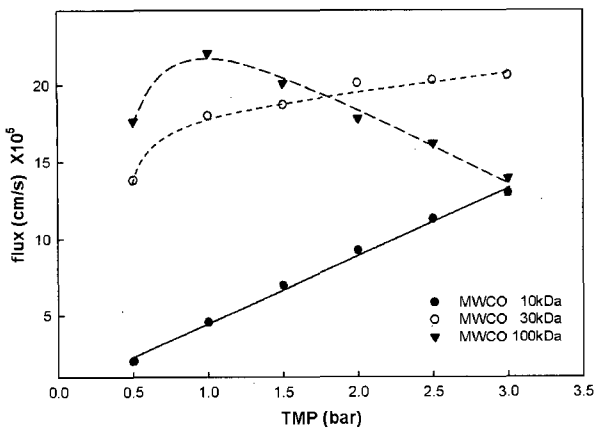


Fig. 4. Effect of TMP on the permeation flux (pH 8, 1% CEW solution).

다 더 낮은 투과유속 값을 보이게 된다. 분획분자량 10 kDa 분리막에서의 막간압력차의 증가에 따른 투과유속 증가율의 감소는 농도분극을 통하여 형성된 케이크 층의 저항으로 인한 것으로 보인다. 분획분자량 30 kDa 분리막에 있어서는 분획분자량 10 kDa 분리막에 비하여 상대적으로 높은 투과유속으로 인해 농도분극현상은 더욱 심하게 일어나며 이로 인해 막간압력차가 특정한 값(2 bar)을 넘어선 이후에는 막을 통한 투과유속은 막간압력차의 증가에도 영향을 받지 않고 일정하게 유지되는 것으로 보인다. 분획분자량 100 kDa의 분리막에 있어서는 농도분극 현상이 더더욱 심화되고 케이크 층에 의한 투과저항이 극단적으로 높아져서 막간압력차 1 bar 이상에서는 막간압력차의 증가에 따른 투과유속 저하가 있게 된다.

Fig. 5는 공급원액 중의 난백 농도 증가에 따른 투과유속의 변화를 나타낸다. 분획분자량 10 kDa 분자량에 있어서는 공급원액농도가 증가함에 따라 투과유속은 지속적으로 소폭 감소하는 것을 볼 수 있다. 반면 분획분자량 30 kDa 및 100 kDa 분리막에 있어서는 낮은 공급원액농도 구간(3% 이하)에서는 공급원액농도가 증가함에 따라 투과유속은 비교적 급격히 감소하였으나 그 이상의 구간에서는 투과유속이 소폭 감소하는 것을 볼 수 있다. 분획분자량 30 kDa의 분리막과 100 kDa의 분리막을 서로 비교해 볼 때에 낮은 농도(1%)에서는 100 kDa 분리막에서 30 kDa 분리막보다 더 높은 투과유속을 보였다. 그러나 공급원액의 농도가 증가함에 따라 분획분자량 100 kDa 분리막에서는 30 kDa 분리막에 비해 투과유속이 더욱 급격하게 감소하여 3%

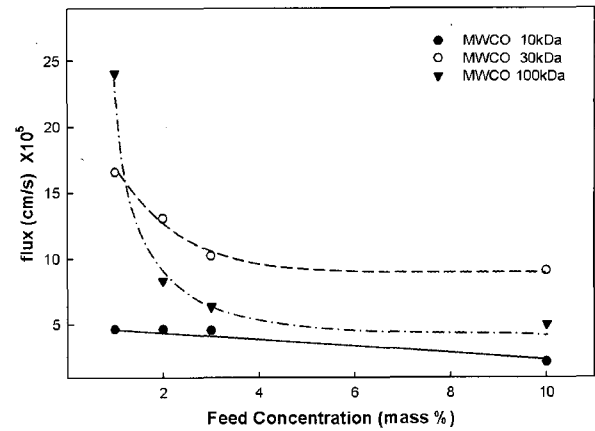


Fig. 5. Effect of CEW concentration in the feed on the permeation flux (pH 8, 1 bar).

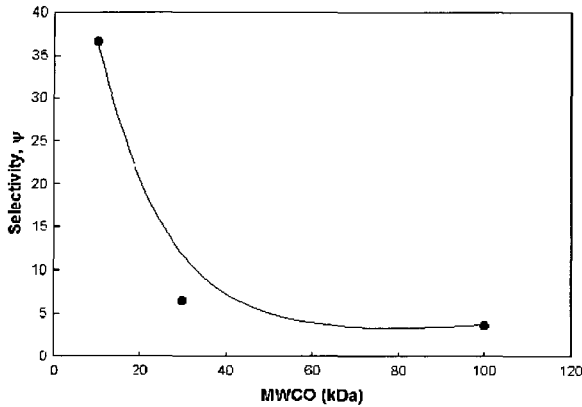
이상의 농도구간에서는 분획분자량 30 kDa의 분리막에 비해서 낮은 투과유속 값을 갖는 것을 볼 수 있다. 공급원액농도가 증가함에 따라 투과유속이 감소하는 현상은 공급원액 중의 난백농도의 증가에 따라 분리막 상류부 표면에서의 단백질의 농축에 의한 농도분극현상은 더욱 촉진되기 때문이다. 분획분자량 30 kDa의 분리막과 100 kDa의 분리막에서 낮은 농도범위에서는 투과유속이 급격하게 감소하다가 높은 농도구간에서는 투과유속이 낮은 감소율로 줄어드는 것은 본 실험의 난백농도 범위에서는 농도분극현상에 의하여 형성되는 케이크 층의 단백질 농도와 케이크 층에 의한 투과저항은 동일한 막간압력차에서는 그 한계가 있으며 공급원액의 농도가 증가하면서 케이크 층 농도와 투과저항의 한계치에 접근하는 것으로 볼 수 있다. 분획분자량 30 kDa와 100 kDa 분리막에서의 투과유속의 변화추세를 비교하여 볼 때에 분획분자량 100 kDa 분리막에서의 농도분극 현상이 더 크게 진행되며 그로인해 투과유속의 감소가 30 kDa 분리막에 비해 더 급격히 일어난다고 볼 수 있다. 반면 이들 높은 분획분자량의 분리막에서의 투과에 비하여 분획분자량 10 kDa의 분리막에서는 낮은 유속으로 인해 농도분극현상이 매우 약하게 일어나므로 급격한 투과유속 감소를 볼 수 없었다.

### 3.2. 단백질의 투과

Table 2는 은 분리막의 분획분자량과별로 투과용액 중의 라이소자임 및 알부민의 여과계수를 보여준다. Table 2에서 보듯이 분리막의 분획분자량이 증가함에 따라 알부민의 여과계수가 증가함을 볼 수 있다. 앞서

**Table 2.** Sieving Coefficients of Lysozyme and Albumin in Membranes with Different MWCO (pH: 8, MWCO: 30 kDa, 1% solution)

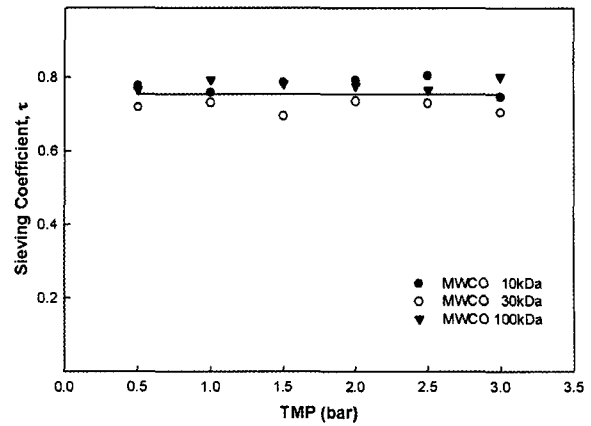
	10 kDa	30 kDa	100 kDa
lysozyme	0.11	0.75	0.65
Albumin	$3.00 \times 10^{-3}$	0.12	0.18



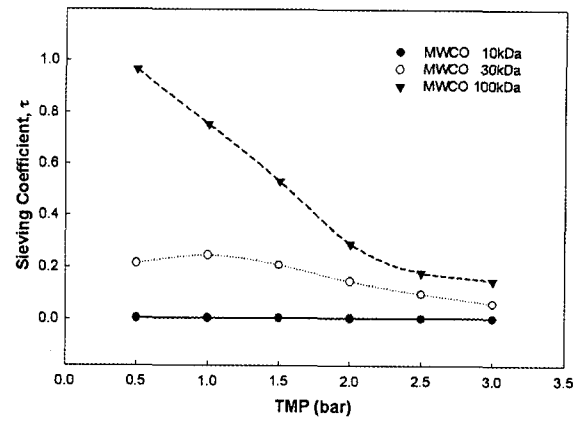
**Fig. 6.** Effect of MWCO on the lysozyme selectivity to albumin (pH 8, 1% solution).

기술하였듯이 분리막의 분획분자량은 분리막의 공극 직경의 척도이며 결과적으로 분리막의 공극이 증가함에 따라 알부민 분자가 분리막의 공극을 용이하게 통과하기 때문이다. Table 2에서 알부민 및 라이소자임의 여과계수의 변화 추세를 살펴보면 알부민의 경우는 분획분자량이 10 kDa의 분리막에서  $3.00 \times 10^{-3}$ 의 여과계수 값이 분리막의 분획분자량이 30 kDa 및 100 kDa로 증가하면서 0.12 및 0.18 값으로 각각 40배 및 60배 증가한 것을 볼 수 있다. 반면 라이소자임의 경우 10 kDa의 분리막에서의 투과계수값이 0.11이었으나 30 kDa 및 100 kDa 분리막에서는 각각 0.75 및 0.65의 값을 보이며 각각 7배 및 6배 증가하는데에 그쳤다. 이는 알부민에 비하여 라이소자임은 그 분자용적이 월등히 작으므로 분리막의 공극을 통과하기가 매우 용이하며 따라서 분리막 공극의 크기에도 비교적 영향을 적게 받기 때문이다[9].

Fig. 6은 분리막의 분획분자량의 변화에 따른 라이소자임의 알부민에 대한 선택도의 변화추세를 보인다. 그림에서 보듯이 분획분자량이 증가하면서 알부민에 대한 라이소자임의 선택도가 감소하는 것을 볼 수 있으며 이는 분리막의 분획분자량이 증가함에 따라 큰 값을 보이는 라이소자임의 여과계수는 큰 변화가 없는 반면 작



(a)



(b)

**Fig. 7.** Effect of TMP on the sieving coefficients of albumin and lysozyme (pH 8, 1% solution) (a): albumin, (b): lysozyme.

은 값을 보이는 알부민의 여과계수 값은 크게 증가하기 때문이다.

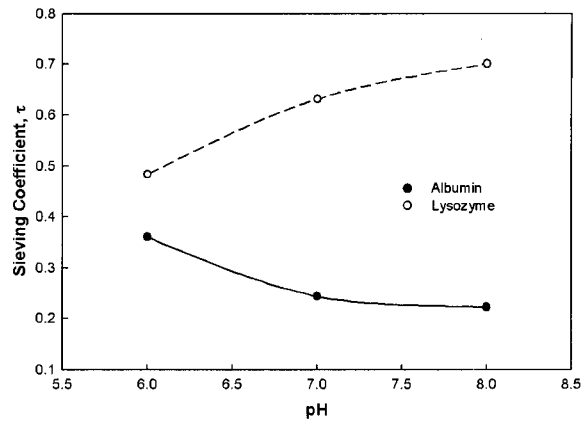
Fig. 7은 막간압력차의 증가에 따른 라이소자임과 알부민의 여과계수의 변화를 보인다. Fig. 7에서 보듯이 막간압력차가 증가함에 따라 알부민의 여과계수는 감소하는 것을 알 수 있다. 이러한 현상은 단백질 용액의 한외여과 과정에서 수반되는 농도분극 현상과 막 오염의 관점에서 설명될 수 있다[1,2,7,8]. 낮은 막간압력차에서는 투과유속이 작으므로 막 표면에서의 농도분극 현상이나 오염되는 현상이 미미하며 단백질 분자가 막의 공극을 통과하는 과정에서 비교적 작은 저항을 받게 된다. 반면, 막간압력차가 증가하고 막을 통한 투과유속이 증가하면서 막 표면에서의 농도분극현상으로 인해 과 케이크 층의 형성이 증가되며 단백질 용액이 막의 공극을 통과하는 과정에서의 저항이 증가하게 된다.

**Table 3.** Sieving Coefficients and Selectivities of Lysozyme and Albumin at Different TMPs (pH: 8, MWCO: 30 kDa, 1% solution)

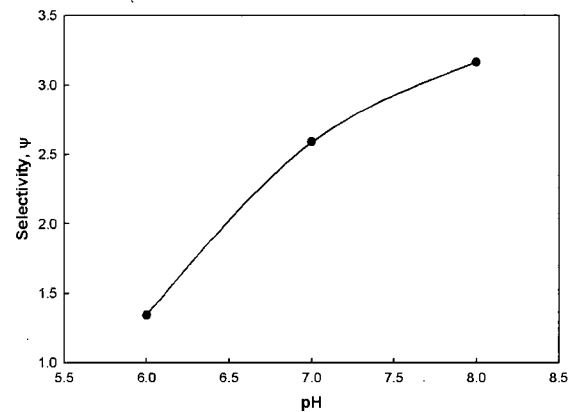
TMP (bar)	$\tau_{\text{lysozyme}}$	$\tau_{\text{albumin}}$	$\Psi_{\text{lysozyme/albumin}}$	% purity of lysozyme
0.5	0.91	0.45	2.02	4
1.0	0.90	0.34	2.64	6
1.5	0.85	0.19	4.47	8
2.0	0.75	0.12	6.25	11
2.5	0.64	0.07	9.14	17
3.0	0.55	0.04	13.75	20

이 때에 흐름에 대한 저항은 용매에 비하여 용질인 알부민 분자에 대해 월등히 크게 작용하게 된다. 결과적으로 막간압력차의 증가에 따라 알부민의 여과계수는 감소하게 된다. Fig. 7에서는 또한 라이소자임의 경우 여과계수가 막간압력차의 영향을 거의 받지 않고 비교적 일정한 값을 유지하는 것도 볼 수 있다. 이는 라이소자임의 분자직경이 알부민에 비하여 매우 작으므로 알부민에 비하여 분리막을 통한 투과에 대하여 월등히 작은 저항이 작용하며 이로 인해 라이소자임 분자는 공극을 비교적 자유롭게 통과할 수 있기 때문이다[9]. Table 3을 통하여 분획분자량 30 kDa 분리막에서의 막간압력차 대비 투과유속과 라이소자임, 알부민의 여과계수와 라이소자임의 알부민 대비 선택도 그리고 투과용액 내의 단백질 중의 라이소자임의 순도와 선택도를 정리하였다. Table 3을 통하여 단백질 분리정제를 위한 막분리공정에서 막간압력차를 조정함으로써 분리효율과 제품의 순도를 극대화시킬 수 있는 가능성을 보여준다.

Fig. 8은 난백 공급원액의 pH의 변화에 대한 알부민과 라이소자임의 여과계수를 나타낸다. Fig. 8에서 보듯이 공급원액의 pH가 증가하면서 알부민의 여과계수는 감소하는 것을 볼 수 있다. 반면 라이소자임의 경우 여과계수는 공급원액 pH의 증가와 함께 증가하는 것을 볼 수 있다. PH가 증가하면서 알부민의 여과계수가 감소하는 현상은 정전기적 알부민 분자간의 정전기적 상호작용으로 설명할 수 있다. 알부민을 이루는 ovalbumin과 conalbumin의 등전점(PI)은 각각 4.5와 6.1이며 본 연구에서는 공급원액의 pH 값의 범위를 6, 7, 8로 채택하여 실험하였다. 이들 공급원액 중 pH 6의 용액에서는 ovalbumin은 음으로 하전되며 conalbumin은 중성



**Fig. 8.** Effect of feed pH on the sieving coefficients of lysozyme and albumin (TMP: 1.5 bar, MWCO: 30 kDa, 1% solution).



**Fig. 9.** Effect of feed pH on the selectivity of lysozyme to albumin (TMP: 1.5 bar, MWCO: 30 kDa, 1% solution).

분자로 용액에 존재한다. 용액의 pH가 7, 8로 증가하면서 ovalbumin과 conalbumin은 계속 음으로 하전 되며 그 하전량은 증가한다. 한편, 한외여과를 통해 분리막 상류부 표면에는 알부민과 분자가 집중, 축적되며 결과적으로 분리막 상류부 표면에서는 전체에서 보다 더 높아지게 된다. 이는 투과용액중의 알부민 농도도 함께 증가시키는 작용을 한다. 그러나 알부민 분자가 하전을 띄면 알부민 분자 상호간에는 정전기적인 척력이 작용하게 되며, 알부민 분자를 용액 전체로 분산시키려는 경향이 생겨나고, 알부민 분자의 확산속도를 증가시킨다. 이러한 척력은 알부민 분자의 하전량이 증가하면서 더욱 강하여지며 이는 알부민 분자가 용액 전체로 분산되는 경향을 더욱 강화시킨다[10-13]. 결과적으로 분리

막의 상류부 표면과 맞닿는 용액에서의 알부민의 농도는 감소하며 투과용액중의 알부민 농도도 함께 감소시키고, 결과적으로 알부민의 여과계수도 감소시킨다. 반면 라이소자임의 등전점은 11이므로 본 실험에서 채택된 공급원액 pH 범위는 모두 라이소자임의 등전점보다 낮은 값을 갖게 된다. 이러한 pH 범위에서는 라이소자임은 항상 양으로 하전 되며, 공급원액의 pH가 증가할수록 라이소자임의 하전량은 감소할 것이다. 이러한 현상의 결과로 공급원액의 pH가 높아질수록 분리막 상류부 표면에 맞닿는 부위에서의 라이소자임 농도는 증가하며 투과용액중의 라이소자임 농도역시 증가하고 결과적으로 라이소자임의 투과계수도 증가한다[11,13,14]. Fig. 9는 pH의 증가에 따른 분리막을 통한 라이소자임의 알부민에 대한 선택도의 변화를 나타낸다. pH의 증가에 따라 알부민의 여과계수는 감소하며, 라이소자임의 여과계수는 증가하므로, 그 결과 pH의 증가에 따라 라이소자임의 알부민 대비 선택도는 증가하였다. 이러한 추세는 라이소자임의 등전점인 pH 11까지 지속될 것으로 예상할 수 있다.

Fig. 10은 공급원액내의 난백 농도변화가 투과용액내의 알부민의 농도에 미치는 영향을 보인다. 분획분자량 30 kDa의 분리막에 있어서 공급원액내의 낮은 난백농도구간에서는 난백농도가 증가하면서 알부민의 여과계수는 증가하여 공급원액내의 난백농도가 2%일 때에 최대치에 도달한 이후 투과용액내의 알부민 농도는 감소하는 것을 볼 수 있다. 분획분자량 10 kDa 분리막에 있어서도 낮은 공급원액농도 범위에서는 공급원액농도 증가에 따라 투과용액의 알부민 농도는 증가하였다. 그러나 투과용액내의 알부민 농도 최대치는 3%에서 10%의 구간 내에 존재하는 것을 알 수 있으며 공급원액농도 10%에서의 투과용액 중 알부민 농도는 공급원액농도 3%일 때 보다 약간 낮은 값을 보였다. 반면, 분획분자량 100 kDa 분리막에 있어서는 공급원액의 농도가 증가하면서 투과용액중의 알부민 농도는 일방적으로 감소하는 것을 볼 수 있다. 이는 공정조건별 농도분극현상이 일어나는 강도로서 설명할 수 있다. 앞서 투과유속에서 설명하였듯이 농도분극현상은 공급원액 내의 단백질 농도가 증가하면서 그리고, 분리막별로 비교할 때에는 공극 직경이 커질 때 더 강하게 일어난다. 그러므로 본 연구에서 사용된 모든 분리막에서는 공급원액의 농도가 증가하면서 초기에는 투과용액 중의 알부민

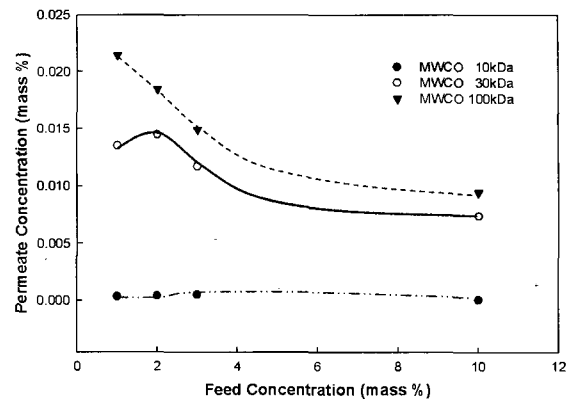


Fig. 10. Effect of CEW concentration in the feed on albumin concentration in permeate (pH: 8, TMP: 2 bar).

농도도 증가하며, 분리막별로 특정 공급원액농도에서 투과용액중의 알부민 농도는 최대치를 보인 이후에는 분리막 표면의 농도분극현상이 심화되고 알부민에 대한 투과저항이 증가하여 공급원액이 농도가 증가하면서 반대로 투과용액중의 알부민 농도는 감소하게 되는 것이다[1,2,12,15]. 이러한 현상은 분리막 공극직경이 증가할수록 더 심하게 나타나므로 분획분자량 10 kDa의 분리막에 비해 30 kDa 분리막에서는 더 낮은 농도에서 나타나며, 분획분자량 100 kDa의 분리막에서는 용액중 알부민 농도의 최대치가 본 실험에서의 공급원액 농도의 범위에서 가장 최저치인 1% 이하에 존재하므로 본 연구의 범위에서는 공급원액 농도가 증가하면서 투과용액중의 알부민 농도는 일방적으로 감소하는 것으로 나타난 것이다.

Fig. 11은 공급원액내의 난백 농도변화가 투과용액내의 라이소자임의 농도에 미치는 영향을 보인다. Fig. 11에서는 분획분자량 10 kDa 분리막에서는 공급원액의 농도가 증가함에 따라 투과용액중의 라이소자임의 농도는 지속적으로 증가하였다. 그러나 분획분자량 30 kDa 및 100 kDa 분리막에서는 공급원액 농도가 증가함에 따라 낮은 농도범위에서는 투과용액중의 라이소자임 농도는 증가하였지만 높은 농도범위에서는 그 증가추세가 멈춰지는 것을 볼 수 있다. 이로부터 공급원액의 농도가 증가하면서 투과과정에서의 농도분극현상이 알부민뿐만 아니라 라이소자임에서도 나타나는 것을 알 수 있다. 라이소자임은 알부민에 비하여 공급원액내의 농도도 매우 낮고 그 분자용적이 매우 작으므로 같은 조건일 때에는 알부민보다 분리막을 더 용이하게



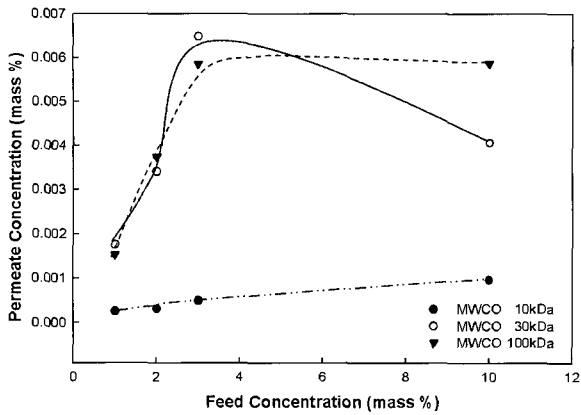


Fig. 11. Effect of CEW concentration in the feed on lysozyme concentration in permeate (pH: 8, TMP: 2 bar).

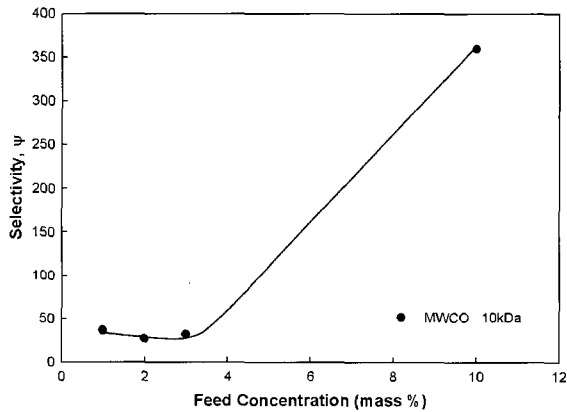


Fig. 12. Effect of CEW concentration in the feed on lysozyme selectivity in 10 kDa ultrafiltration membrane (pH: 8, TMP: 2 bar).

통과하며 농도분극 현상도 더 약하게 나타나게 된다. 그러므로 라이소자임의 농도분극 현상은 알부민보다 월등히 높은 농도에서 나타난 것을 알 수 있다. Fig. 12는 공급원액의 농도증가에 따른 분획분자량 10 kDa 분리막에서의 라이소자임의 알부민에 대한 선택도의 변화를 보인다. Fig. 12에서 공급원액의 농도가 증가하면서 낮은 농도구간에서는 라이소자임의 선택도가 큰 변화를 보이지 않았으나 공급원액 농도 3~10% 사이의 구간에서는 공급원액 농도의 증가에 라이소자임 선택도가 급격히 증가한 것을 볼 수 있다. 이는 Fig. 11에서 보았듯이 3~10% 사이의 농도구간에서 알부민은 농도분극현상으로 인해 투과용액중의 알부민 농도가 급격히 감소하였으나 비교적 분리막을 자유롭게 투과하는 라이소자임의 경우 투과용액중의 농도가 지속적으로

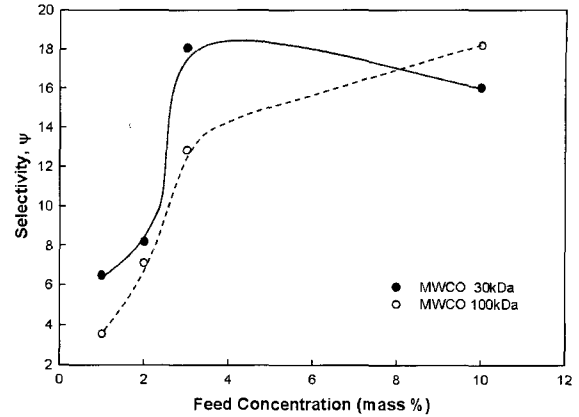


Fig. 13. Effect of CEW concentration in the feed on lysozyme selectivity in 30 kDa and 100 kDa ultrafiltration membranes (pH: 8, TMP: 2 bar).

증가하였으므로 나타나는 결과이다. Fig. 13은 공급원액의 농도증가에 따른 분획분자량 30 kDa 및 100 kDa의 분리막에서의 라이소자임의 알부민에 대한 선택도 변화를 보인다. 그림에서 보듯이 낮은 농도구간에서는 공급원액의 농도증가에 따라 라이소자임의 알부민에 대한 선택도는 급격히 증가하였으나, 높은 농도구간에서는 그 증가추세가 사라지는 것을 볼 수 있다. 이는 낮은 농도구간에서는 농도분극현상에 대한 투과저항이 알부민 분자에만 적용되어 알부민의 투과가 둔화되는 동안 라이소자임의 투과는 지속적으로 증가하지만, 공급원액의 농도가 증가하면서 라이소자임에도 농도분극현상이 일어나므로 여과계수 증가가 멈춰지기 때문이다. 이상의 결과를 통하여 공급원액내의 난백의 농도가 증가하면서 알부민 대비 라이소자임의 선택도가 증가하지만 공급원액의 농도가 지속적으로 증가하면서 라이소자임의 선택도를 최대치를 보인 이후 감소하기 시작한다는 결론을 내릴 수 있었다. 또한 난단백 중 라이소자임을 분리정제하기 위하여서는 분리막의 분획분자량과 공급원액의 농도 그리고 막간압력차 등의 공정변수에 대한 최적화가 요구된다는 결론도 도출되었다.

#### 4. 결 론

이상의 실험결과로부터 다음과 같은 결론을 도출할 수 있었다.

1) 막간압력차의 변화에 따라 분리막을 통한 투과유속은 분리막별로 상이한 추세로 변화하였다. 분획분자

량이 10 kDa인 분리막에서는 막간압력차가 증가하면서 투과유속은 지속적으로 증가하였으나, 30 kDa의 분리막에서는 막간압력차의 증가에 따라 초기에는 투과유속이 증가하였고, 막간압력차의 추가의 증가에 따라 투과유속은 증가는 멈추고 일정한 값을 유지하였다. 100 kDa 분리막의 경우는 막간압력차의 증가에 따라 초기에는 증가하던 투과유속이 최대값을 보인 후 감소하였다.

2) 분획분자량 10 kDa의 분리막에서는 공급원액의 난백농도가 증가하면서 투과유속은 지속적으로 감소하였으나, 30 kDa 및 100 kDa 분리막에서는 낮은 농도구간에서 공급원액의 농도증가에 따라 투과유속이 급격히 감소한 후 높은 농도구간에서는 비교적 일정한 값을 유지하였다.

3) 모든 분리막에서 공급원액이 1%인 경우 막간압력차가 증가함에 따라서 알부민의 여과계수는 감소한 반면, 라이소자임의 여과계수는 큰 변화 없이 비교적 일정한 값을 유지하였다. 결과적으로 막간압력차의 증가에 따라 라이소자임의 알부민에 대한 선택도는 증가하였다.

4) 모든 분리막에서 공급원액의 pH가 증가하면서 알부민의 여과계수는 감소한 반면 라이소자임의 여과계수는 증가하였다. 결과적으로 공급원액의 pH가 증가하면서 라이소자임의 알부민에 대한 선택도는 증가하였다.

5) 낮은 분획분자량(10 kDa)의 분리막에서는 공급원액의 농도가 증가하면서 라이소자임의 알부민에 대한 선택도가 증가하였다. 그러나 높은 분획분자량(30 kDa 및 100 kDa)의 분리막에서는 낮은 농도범위에서는 공급원액 농도의 증가에 선택도는 증가하였으나, 높은 농도범위에서는 라이소자임의 선택도 증가 추세가 멈춰졌다.

## 감 사

본 연구는 한국산업기술재단에서 주관하는 '지역혁신 석박사연구인력양성사업'의 지원으로 수행되었으며 이를 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. R. Ghosh and Z. F. Cui, "Purification of lysozyme using ultrafiltration", *Biotechnol. Bioeng.*, **68**, 191 (2000).
2. R. Ghosh and Z. F. Cui, "Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane", *J. Membr. Sci.*, **167**, 47 (2000).
3. A. Reddy, D. Mohan, A. Bhattacharya, V. J. Shah, and P. Ghosh, "Surface modification of ultrafiltration membranes by preadsorption of a negatively charged polymer - I. Permeation of water soluble polymers and inorganic salt solutions and fouling resistance property", *J. Membr. Sci.*, **214**, 211 (2003).
4. G. Sava, A. Benetti, V. Seschia, and S. Pacor, "Lysozyme and cancer: Role of exogenous lysozyme as anticancer agent", *Anticanc. Res.*, **9**, 583 (1989).
5. S. Das, S. Banerjee, and J. Dasgupta, "Experimental evaluation of preventive and therapeutic potentials of lysozyme", *Chemotherapy*, **38**, 350 (1992).
6. J. Waren, J. Reinhart, B. Jeilling, and J. Neidhart, "Lysozyme enhancement of tumor cell immunoprotection in a murine fibrosarcome", *Canc. Res.*, **41**, 1642 (1993).
7. 염경호, "고분자 용액의 한외여과에서의 농도분극 층 저항에 관한 연구", *멤브레인*, **2**, 59 (1992).
8. 육영재, 염경호, "초음파를 이용한 한외여과의 성능 향상", *멤브레인*, **13**, 283 (2003).
9. M. Balakrishnan and G. P. Agarwal, "Protein fractionation in a vortex flow filter I: Effect of system hydrodynamics and solution environment on single protein transmission", *J. Membr. Sci.*, **112**, 47 (1996).
10. M. Nystrom, P. Aimar, S. Luque, M. Kulovaara, and S. Mestsamuuronen, "Fractionation of model proteins using their physicochemical properties", *Coll. Surf. A*, **138**, 185 (1998).
11. R. Ghosh and Z. F. Cui, "Fractionation of BSA and lysozyme using ultrafiltration: Effect of pH

- and membrane pretreatment”, *J. Membr. Sci.*, **139**, 17 (1998).
12. S. Saksena and A. L. Zydney, “Effect of solution pH and ionic strength on the separation of albumin from immunoglobins(IgG) by selective filtration”, *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 960 (1994).
13. N. Ehsani and S. Nystrom, “Fractionation of natural and model egg-white protein solutions with modified and unmodified polysulfone UF membranes”, *J. Membr. Sci.*, **123**, 105 (1997).
14. N. S. Pujar and A. L. Zydney, “Charge regulation and electrostatic interactions for a spherical particle in a cylindrical pore”, *J. Coll. Interface Sci.*, **192**, 338 (1997).
15. R. van Reis and S. Saksena, “Optimum diagram for membrane separation”, *J. Membr. Sci.*, **159**, 133 (1997).