

## 계란으로부터 Lysozyme 추출에 관한 연구

이 성 기

(응용연구실)

### I. 서 론

Lysozyme은 인간 눈물속에서 다량 함유된 항 미생물 성분으로 1922년 Alexander Fleming<sup>1)</sup>에 의해 최초로 발견되었다. 이것은 박테리아 세포벽의 주요 구성성분인 mucopolysaccharide의 n-acetylglucosamine과 muramic acid 사이에 연결되어 있는  $\beta$ -linkage를 가수분해 시키는 효소인 것이다.

난백으로부터 lysozyme을 추출시키는 방법에 대해서는 난백에 5% 소금첨가와 pH 9.5로 직접 결정화시켜 처음으로 성공<sup>2)</sup>한 후 다시 5% NaCl과 여러종류의 산 첨가로 결정화시키는 방법을 개선한 바<sup>3)</sup>도 있다. 이와 같은 방법은 나머지 난백을 재활용할 수 없고 추출한 lysozyme의 수율과 순도가 낮은 결함이 있기 때문에 그 후로 친화성 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 한외여과법 등을 시도하게 되었다.

최초로 이용된 친화성 수지는 chitin이었다. Cherkasov 등<sup>4)</sup>은 chitin을 탈아미노화시켜 glucochitin을 만들어 달걀 1개당 100-120mg의 lysozyme을 흡착시켜 추출할 수 있었다고 하였고 Weaver 등<sup>5)</sup>도 탈아미노시킨 chitin을 이용하여 달걀로부터 99%의 회수율과 높은 활성도를 얻었다고 한 바 있다. 이외에도 친화성 물질로는 chitin coated cellulose<sup>6-7)</sup>, carageenan<sup>8)</sup>, sepharose

유도체<sup>9)</sup>, chitosan<sup>10)</sup> 등이 시도된 바 있다. 모든 친화성 크로마토그래피로 lysozyme을 생산할 경우에 수율과 순도가 높은 장점은 있지만 수지가 특별한 것이 요구되어 구입하거나 제조하기 어려우며 산업적으로 이용하기에 가격이 너무 비쌀뿐 아니라 일반적으로 난백을 회석시켜야 하는 단점이 있는 것이다.

그래서 다른 방법으로 시도한 것이 이온교환수지 방법이다. 지금까지 Amberlite IRC-50이나 CG-50<sup>11)</sup>, CMC<sup>12)</sup>, Biogel CM-30<sup>13)</sup> 등 여러 종류의 수지로 시도된 바 있다. 이중 근래에 Duolite C-464를 이용하여 batch식으로 lysozyme을 분리한 바 있고<sup>14)</sup> batch식 대신 column식으로 하여 작동의 편이성과 높은 회수율의 lysozyme을 분리한 바<sup>15)</sup> 있다. 그러나 이들은 효소의 역가나 순도 확인에 대한 연구가 부족하고 분리후 침전, 투석, 건조과정을 거친 최종 lysozyme에 대한 특성 구명도 없었다.

그러므로 본 연구는 여러 양이온 교환수지에 의한 lysozyme의 흡착, 분리에 따른 수지선택과 선택한 수지에 의해 생산된 등전점형 lysozyme의 특성과 순도 범위를 구명코자 실시하였다.

### II. 재료 및 방법

#### 1. 재 료

Lysozyme 을 추출하기 위한 난백은 하이라인 산란계에서 생산한 신선한 백색란을 이용하였다.

이온교환 수지는 강 또는 약산성 양이온 수지로 Sigma chem.社의 Amberite IR-122, Dowex MSG-1, Amberite CG-50, Amberite IRP-64와 Pharmacia fine chem.社의 CM-Sephadex C-25, Fluka社의 Duolite C-464를 각각 이용하였다.

## 2. 수지 및 난백의 전처리

모든 수지는 1~2N HCl과 NaOH로 처리하여 이온교환기를 활성화 시켰다.

알끈 등을 제거한 난백을 교반기에서 20초간 교반한 후 균질기에 옮겨 3,000rpm에서 30초간 균질시켰다. 균질시킨 난백액을 다시 초음파 발생기(경일社, 200 watts)에서 30분간 작동시킨 후 난백 상층부에 덮여 있는 포립 유사물을 제거한 다음 최종 시료로 사용하였다.

## 3. 수지 능력시험과 lysozyme의 분리 건조

Lysozyme 용액의 자외선 파장별 흡광성질을 구명하기 위해 표준 lysozyme(Sigma chem.社)을 0.05M phosphate buffer(pH 6.5)에 녹여 0.01, 0.05, 0.1%로 각각 만들어 190-370nm 영역에서 스캐닝(scanning) 시험을 실시하였다.

여러 종류의 수지중에서 lysozyme의 흡착 및 분리능력이 좋은 수지선택 시험을 실시하였다. 0.5% 표준 lysozyme(Sigma chem.社) 용액을 각 수지별로 통과시켜 흡착시킨 후 다시 0.05M phosphate buffer(pH 6.5)로 비흡착성 단백질 등을 세척시켰다. 이어서 5% NaCl 용액을 흘려보내 흡착된 lysozyme을 분리하여 280nm에서 O.D. 값에 따라 수지의 능력정도로 판단하였다. 이때 사용한 컬럼은 직경 1.5cm였고 수지 높이는 6cm였으며 분당 유출량은 1ml로 하였다.

표준 lysozyme 대신 난백으로부터 lysozyme 추출시험은 직경 5cm, 높이 9cm의 컬럼에 0.05M phosphate buffer(pH 6.5)로 평형시킨 수지위에 균질시킨 난백 180g을 넣어 분당 8ml의 속도로 흡착시켜 분리하였다. 여기서 이미 수지능력이 좋은 CM Sephadex C-25, Duolite C-464, Amberite IRP-64를 선발하여 분리액의 량과 280nm 상의 O.D. 값에 따라 분리능력을 비교분석 하였다.

분리된 lysozyme 용액을 pH 9.5에서 침전시키고 투석망에 옮겨 염을 제거시킨 다음에 동결건조와 90°C 열풍건조를 각각 시켰다. 이때 투석망은 직경 64mm의 Spectrum社(M. W. 6,000-8,000)의 것을 사용하였다.

## 4. lysozyme의 역가측정

추출 건조한 lysozyme의 역가는 Li-Chan 등<sup>15)</sup>의 방법을 약간 변형시켜 실시하였다. 즉, lysozyme을 0.066M phosphate buffer(pH 6.3) 1ml당 0.01g을 녹여 37°C에서 2시간 동안 활성화시켰고 *Micrococcus lysodeikticus*(Sigma chem.社)도 동일한 인산염 완충액에 녹여 37°C에서 30분간 활성화시켜 흡광도가 0.8 전후가 되도록 하였다. 이어서 *M. lysodeikticus* 용액 2.5ml와 lysozyme 용액 0.1ml를 분광 광도계의 큐벳(cuvette)에 넣어 즉시 혼합한 다음 450nm에서 20초 간격으로 2분간 측정하였다. 역가는 lysozyme 1mg을 기준으로 1분당 O.D. 감소량으로 하였는데 O.D. 0.001 감소량을 1 unit으로 결정하였다.

## 5. 아미노산 함량과 전기영동 분석

소형 앰플병에 lysozyme과 6N HCl을 넣고 N<sub>2</sub> 가스를 불어 넣은 후에 가수분해 시켰다. 가수분해물은 일정 용량으로 정용하여 여과한 다음 자동 아미노산분석기(LKB-4151)를 이용하여 아미노산 조성을 조사하였다.

전기영동 분석은 Weber 등<sup>16)</sup> 방법을 기초로 한

Sigma Tech. Bulletin<sup>17)</sup> 방법으로 실시하였다. 10% gel을 직경 1cm, 길이 10cm의 원형 유리관에 넣어 10~20분에 응고시켰다. 완충액 1ml 당 시료 단백질이 1~3mg 함유된 표준 시료액을 gel 위에 10 $\mu$ l를 넣고 개당 8mA의 전류를 흘려 보냈다. 전기영동에 사용한 표준단백질은 분자량이 14,000~70,000되는 MW-SDS-70 kit(Sigma chem.社)를 사용하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 수지별 lysozyme의 흡착 및 분리능력

Lysozyme의 자외선 파장별 흡광 경향은 그림 1에서 보는 바와 같이 370~310nm까지는 전혀 O.D.가 없었으나 310nm를 기준으로 O.D.가 증가하기 시작하여 280nm에서 최고치에 달하였다. 그후 250nm까지 서서히 감소하다가 다시 증가하여 완만한 최고치의 O.D. 값을 보인 다음 200nm 부근에서 다시 떨어지는 경향을 보였다. Lysozyme 용액의 농도별 흡광도도 280nm에서 동일하였기 때문에 수지로부터 회수한 lysozyme 함량의 확인도 280nm에서 측정하는 것이 바람직한 것으로 나타났다.

각 수지별 lysozyme의 흡착, 분리능력을 검증한 결과는 그림 2, 3과 같다. 0.5% 표준 lysozyme 용액을 각 수지별로 흡착시킨 결과 CM Sephadex C-25 수지가 가장 우수하였다. 이어서 Duolite C-464구로 반포화점(half-point saturation)이 43ml였고 Amberlite IRP-64는 17ml, 기타 수지는 7-15ml 였다.

각 수지별로 흡착된 lysozyme을 5% NaCl로 분리시킨 경향을 보면 그림 3과 같이 CM Sephadex 구가 포화용액을 다량 회수하고 있음을 알 수 있다. 그리고 Duolite C-464, Amberlite IRP-64, Amberlite CG-50구도 초기에 포화용액으로 회수되다가 70~80ml에서 흡광도가 떨어지는 유사한 분리경향을 보였다. 총 흡착된 lysozyme 량에 대한 분리되는 량과 속도를 각 수지별로 비교하여 우열을

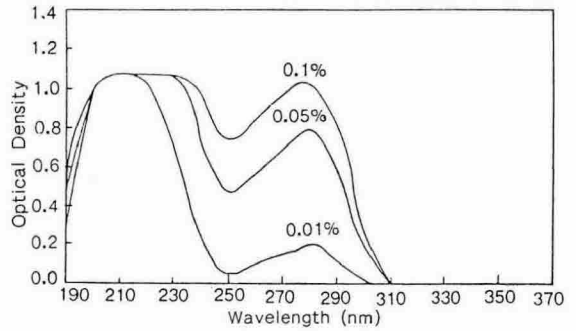


그림 1. Ultraviolet spectra of lysozyme by different solution concentration.

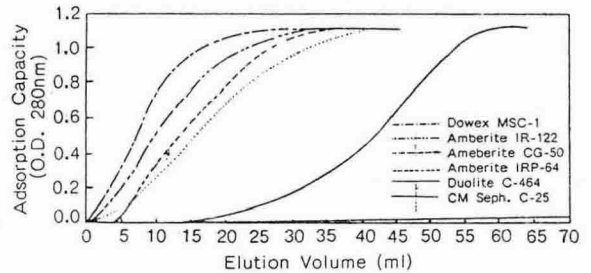


그림 2. Adsorption curves of 0.5% standard lysozyme(Sigma chem. co.) on various resins.

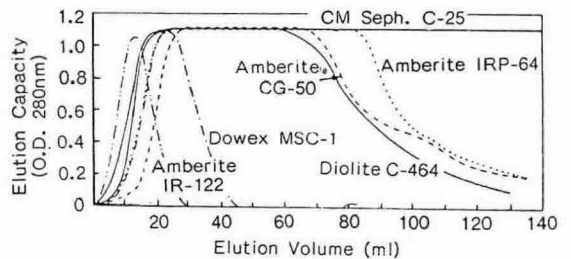


그림 3. Elution curves of 0.5% standard lysozyme(Sigma chem. co.) on various resin.

가리기는 지난하지만 흡착 정도로만 판단한다면 CM-Sephadex C-25, Duolite C-464, Amberlite

IRP-64 순으로 우수하였고 흡착에 비해 분리능력이 양호한 것은 Duolite C-464 였다.

## 2. 난백의 판 크로마토그래피 시험

균질화시킨 난백을 컬럼에 걸어 각 수지별로 흡착시킨 후에 5% NaCl 용액으로 분리한 곡선은 그림 4이고 수지별 작동특성과 생산한 lysozyme 의 역가 및 수율은 표 1과 같다. 응용된 6종류의 수지중에서 Dowex MSC-1은 난백에 대한 작동특성이 양호하나 회수율이 매우 낮았고, Amberite IR-122와 Amberite CG-25는 시료의 유동성이 극히 나쁘고 회수율도 낮은 단점이 있다. Amberite IRP-64는 회수율이 약 50% 였으나 시료의 유동성이 나빠서 문제가 되고 있다. 수지내에서 시료의 엉김현상을 개선하기 위해 컬럼에 압력장치를 부착하는 방안<sup>18)</sup>도 앞으로 고려되어야 할 것이다. 수율과 수지의 작동 특성면에서만 보면 Duolite C-164가 가장 우수하였다. 그러나 흡착능력에 따른 흡착량이 CM Sephadex C-25가 양호하고 시료의 유동성과 회수

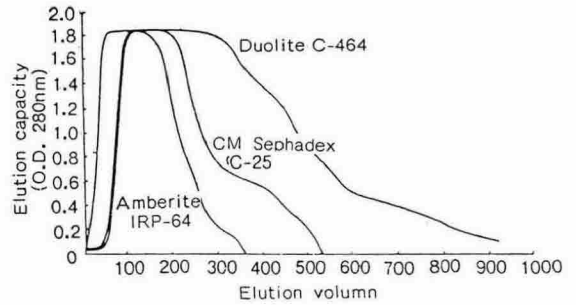


그림 4. Elution curves of egg white lysozyme on the various resin(Column diameter: 5cm, Height: 9cm, 180g of egg white was added).

율도 비교적 높았다. 이들중 우수한 3종류의 수지를 선별하여 난백으로부터 lysozyme 을 분리한 곡선을 보면 그림 4와 같다. 즉, O. D. 1.0 이상이 Duolite C-464가 480ml, CM Sephadex C-25가 290ml, Amberite IRP-64가 220ml 였는데 이 량은 최종 lysozyme 의 수율과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다.

표 1. Comparison of resin for separation and recovery of lysozyme from egg white in ion-exchange chromatography\*

Resins	Characteristics**			Appro. recovery*** (%)	Activity (units/mg)	
	volume change	Clogging	Loss		Freeze drying	90°C drying
Amberite CG-50	+	+++	+	45	32,500	22,000
Amberite IR-122	+	+++	+	30	30,000	25,000
Dowex MSG-1	-	-	-	15	30,500	26,000
Amberite IRP-64	+	+++	+	50	32,000	26,000
CM Sepha, C-25	+++	+	+	80	36,000	30,000
Duolite C-464	-	-	-	95	30,000	25,000

\* Chromatographic conditions: 180ml homogenized egg white were applied to 177ml resin in 5.0cm(i.d) column

\*\* Resins were rated as negligible(-), slight(+), moderate(++), and severe(+++)

\*\*\* Appro. lysozyme recovery was calculated as percent lysozyme content in the pooled fractions compared to the lysozyme content of the starting egg white

표 2. The amino acid composition of isolated lysozyme\*(%)

Amino acid	Standard** lysozyme	CM Seph. C-25	Duolite C-464	Amber. IRP-64
Aspartic acid	8.9	14.5	13.2	9.5
Threonine	2.8	2.5	2.6	3.0
Serine	3.4	3.3	3.4	3.7
Glutamic acid	6.0	6.1	6.9	6.5
Proline	4.1	3.5	2.6	4.7
Glycine	3.8	5.3	4.2	5.2
Alanine	6.7	7.1	6.3	6.9
Cystine	6.3	7.4	11.1	6.2
Valine	7.1	4.2	4.3	2.9
Methionine	4.3	2.2	1.6	5.5
Isoleucine	5.6	4.9	5.8	5.6
Leucine	9.5	7.4	8.7	7.8
Tyrosine	5.3	3.5	2.1	2.5
Phenylalanine	9.4	4.0	5.9	4.7
Histidine	4.5	8.8	7.9	5.2
Lysine	3.9	1.3	1.5	6.8
Arginine	8.4	14.4	11.9	13.3
Total(%)	100	100	100	100

\* Tryptophan was not detected

\*\* Sigma chem. co. L-6876

분리하여 건조한 lysozyme의 역가는 수지의 종류와 건조방법에 따라 영향을 받았다. 90°C에서 열풍건조시킨 lysozyme은 동결건조한 것보다 약 20% 만큼 역가가 떨어졌다. 이와 같은 결과는 온도 상승에 따른 효소의 부분적인 불활성화 때문인 것으로 사료되었다. 이 외에도 원래 lysozyme은 일반 효소에 비해 열에 강한 편이고 특히 중성이나 알칼리 영역보다 산성영역에서 저항성이 강한 것으로 알려져 있다<sup>19)</sup>. 본 실험용 lysozyme은 열에 가장 강한 pH 4~5 범위보다 높은 pH 6.5 상태에서 90°C로 건조되었기 때문에 효소적 활성도가 다소 열 손상을 받았으리라 생각되었다.

추출한 lysozyme의 아미노산 조성을 보면 수지별 함량의 차이는 있었으나 대체로 유사한 조성비를 보였다(표 2). 여러 아미노산 중에서 aspartic acid와 arginine이 10% 이상 다량 함유하고 있었고, 반면 methionine, tyrosine, lysine이 상대적으로 낮았다. 표준 lysozyme에 비해 glutamic acid, leucine, arginine 등이 소량 함유하고 있었으나 전

체 조성비를 비교하면 역시 유사한 경향을 보였다. Ahvenainen 등<sup>14)</sup>이나 長況佳熊 등<sup>20)</sup>의 보고에도 aspartic acid, glycine, alanine, arginine 등이 많았다고 한 바 있다.

### 3. 전기영동상의 순도

표준단백질중 lysozyme의 상대적 이동도(Rf)는  $0.79 \pm 0.02$ 로써 추출한 lysozyme의 Rf와 동일 여부를 비교함으로써 순도 정도를 확인할 수 있었다(그림 5). 특히 이온교환 수지를 이용한 lysozyme 추출시에 혼입될 가능성이 있는 avidin의 Rf  $0.68 \pm 0.01$ 과 비교함으로써 lysozyme과 확실히 구분할 수 있도록 하였다(그림 6).

그림 7은 각 수지별로 추출한 lysozyme을 전기영동에 걸어 나타난 밴드를 densitometer로 그린 것이다. Peak 상에서 CM Sephadex C-25는 lysozyme 외에 어떠한 peak도 나타나지 않아 매우 순도가 높은 것으로 판정되었고 기타 수지에서는 혼

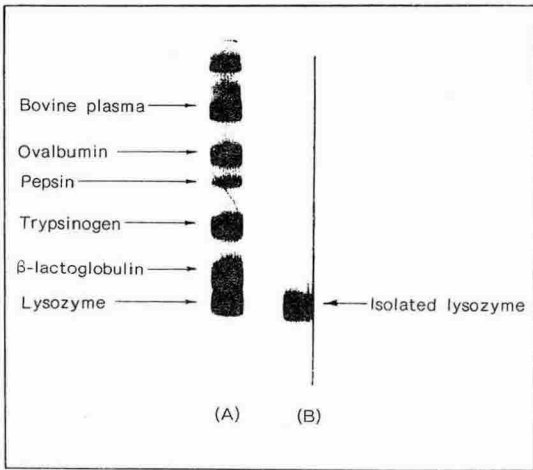


그림 5. SDS-PAGE patterns of standard protein(A) for identifying the isolated lysozyme(B).

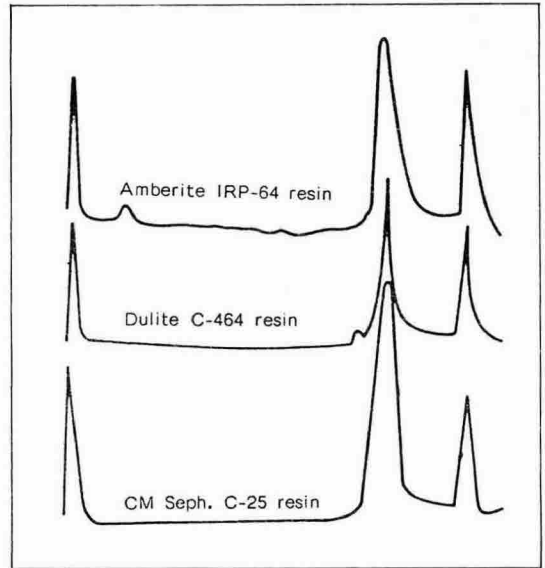


그림 7. Densitometric trace of SDS-PAGE profile of isolated lysozyme.

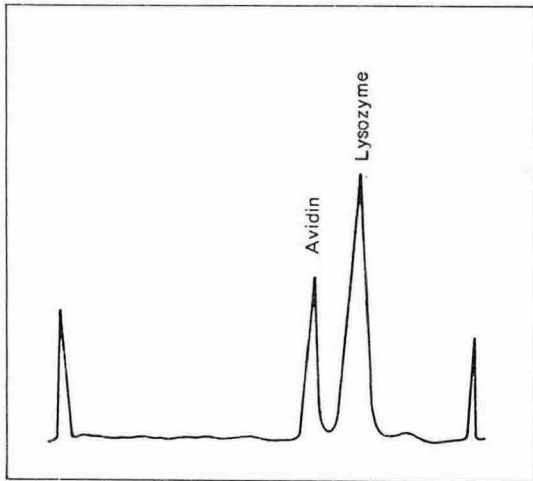


그림 6. Densitometric trace of standard SDS profile for identifying avidin and lysozyme.

입 단백질의 peak 가 나타나 순도가 떨어짐을 알 수 있었다. Duolite C-464에 의해 추출된 lysozyme 은 Rf 가  $0.68 \pm 0.01$ 인 avidin 이 소량 혼입되었고 Amberite IRP-64인 경우 avidin 은 없었으나 Rf

$0.15 \pm 0.01$ 인 conalbumin 과 Rf 가 약 0.5인 밝혀 지지 않는 단백질이 혼입되었다. 전기영동에 의한 밴드의 분포를 보면 동일한 수지에서 추출한 같은 lysozyme 일지라도 그것의 순도가 완벽한 100%가 아닌 이상 겔 위에 접종한 시료의 농도가 많고 적음 에 따라 혼입 밴드가 나타날 수 있기 때문에 순도를 정량적으로 측정하기는 지난하다.

Weaver 등<sup>5)</sup>도 추출한 lysozyme 의 순도는 시료 전처리나 역가 등에 따라 달라질 수 있고 전기영동 상의 밴드와 아미노산 조성으로 순도를 정성적으로 판단할 수 밖에 없다고 하였다. 그러므로 추출한 동 일 lysozyme 을 접종농도를 달리하여 여러 densitometer 상의 peak 를 얻은 다음 전체 peak 면적 에서 lysozyme peak 면적이 차지하는 비율들의 평균값을 가지고 순도의 정도를 간접적으로 예측하여 보았다(그림 8). Densitometer 상의 평균 면적비 가 94, 90, 88%로 CM Sephadex C-25구가 가장 높은 비율을 나타내었으나 표준 lysozyme(Sigma chem.社)의 98%와 비교하면 모두 상대적으로 떨

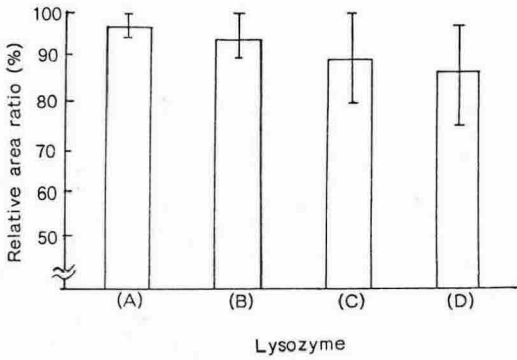


그림 8. Relative area ratio of densitometric traces for estimating purity of isolated lysozyme(A: Standard lysozyme, B: CM Seph C-25 C: Duolite C-464, D: Amber IRP 64).

어짐을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 Yoshimoto 등이 지정한 pH 와 염농도에 따른 순도증진 시험을 실시하지 않았기 때문이다. 그러므로 분리한 lysozyme 을 건조전에 순도증진 시험이 향후 계속해서 요구된다 하겠다.

#### IV. 요약

여러 종류의 양이온 교환수지를 이용하여 난백으로부터 lysozyme 의 추출실험을 실시하였다. 균질된 난백을 수지에 흡착시킨 다음 5% NaCl 로 분리하여 등전점에서 침전시킨 후 탈염, 건조시켰다.

Lysozyme 의 흡착능력과 SDS-PAGE 상에 나타난 순도는 CM Sephadex C-25가 양호하나 컬럼 작동의 편이성면에서 Duolite C-464가 우수하였다.

회수율은 Duolite C-464에서 추출할 경우 약 95%였고 효소적 활성도는 CM Sephadex C-25에서 추출할 경우 36,000 units/mg 으로 가장 높았다.

#### V. 참고 문헌

1. Fleming, A.: Pro. Roy. Soc. Lond. Ser. B., **93**, 306(1922)
2. Alderton, G., Ward W.H. and Fevold H.L.:

- J. Biol. Chem. **157**, 43(1945)
3. Alderton, G. and Fevold H.L.: J. Biol. Chem., **164**, 1(1946)
4. Cherkasov, I.A. and Kravchenko, N.A.: Biochimiya, **34**, 1089(1969)
5. Weaver, G.L., Kroger, M. and Kats, F.: J. Food Sci., **42**, 1084(1977)
6. Imoto, T. and Yagishita, K.: Agri. Biol. Chem., **37**, 1191(1973)
7. Imoto, T. and Yagishita, K.: Agri. Biol. Chem., **37**, 463(1973)
8. Reid, L.S.: United State Patent 4, **552**, 845(1985)
9. Yoshimoto, T., Hayashida, S., Tobilishi, M., Kado, K. and Tsuru, D.: J. Biochem., **78**, 253(1975)
10. Muzzarelli, R.A., Barontini, A.G. and Rocchetti, R.: Biotechnol. Bioeng., **20**, 87(1978)
11. Chielmetti, G. and Trinchera, C.: Brit. Patent. 1, **110**, 466.
12. Notarianni, A.F. and Chielmetti, G.: Brit. 1, **155**, 793(1968)
13. Matsuki, A., Fujita, Y. and Nomoto, M.: Kokai, 45590(1974)
14. Ahvenainen, R., Heikonen, H., Kreula, M., Linko, M. and Linko, P.: Food Process Engr., **2**, 301(1980)
15. Li-Chan, E., Nakai, S., Sim, J., Bragg, D.B. and Lo, K.V.: J. Food Sci., **51**, 1032(1986)
16. Weber, K. and Osborn, M.: J. Biol. Chem., **244**, 4406(1969)
17. Sigma Tech. Bulletin.: No. MWS-877, 1(1986)
18. Durance, T.D. and Nakai, S.: J. Food Sci., **53**, 1096(1988)
19. Beychok, S. and Warner, R.C.: J. Am. Chem. Soc., **81**, 1892(1959)