

## Poly(ethylene glycol)-Dextran 수용액 2상계에서 단백질들의 소수성에 따른 분획계수

이 삼빈 · 이 철호  
고려대학교 식품공학과

### Partition Coefficient of Proteins of Different Surface Hydrophobicity in Poly (ethylene glycol)—Dextran Aqueous Two Phase System.

Sam-Pin, Lee and Cherl-Ho, Lee

Department of Food Technology, Korea University, Seoul

#### Abstract

The partition coefficient of the proteins of known effective hydrophobicity was determined in a poly (ethylene glycol)-dextran aqueous two-phase system. The changes in the partition coefficient was also determined when a fraction of PEG-palmitate (PEG-P) was added to the system. The partition coefficient of the proteins increased as the concentrations of PEG and dextran increased at a constant phase volume ration irrespective of the effective hydrophobicity of the proteins. When small amounts of PEG-P were added to the PEG phase, the partition coefficients of BSA and  $\beta$ -lactoglobulin, which had relative hydrophobicity (RI) of 700 and 120, respectively, increased more than ten-fold, whereas ovalbumin whose RI was 5 showed little change. The drastic increases in the partition coefficient were observed by the addition of PEG-P in 2% level to the PEG system. Addition of PEG-P over 5% level resulted in a slight further increase in the partition coefficient of all proteins tested.

#### 서 론

친수성 고분자물질의 비혼합성에 의한 수용액 2상계 분리 현상은 1896년 Beijerinck에 의하여 알려졌으나 이러한 현상을 이용한 생리활성 물질의 분리 조작에 관한 연구는 최근들어 그 중요성이 점차 인식되고 있다.<sup>(1-5)</sup> 현재 공업적으로 사용되고 있는 대부분의 분리 조작은 고체-액체 분리기작에 근거를 두고 있는데 여과나 원심분리등은 일차적으로 분리되는 물질의 입자 크기에 의존하는 것으로 단세포 물질의 크기 이하로 작아질 경우 분리조작은 매우 어렵게 된다. 초여과법에 의한 단백질의 분리는 비교적 대량으로 효과적인 분리가 가능하나 입자 크기에만 의존하므로 생리활성 물질의 특이성에 따른 분리가 불가능하다. 크로마토그래피에 의한 분리는 가장 예민하게 입자크기와 특이성에 따라 분리할 수 있는 방법이지만 하나 연속식 공정이 될 수 없는 결함을 가지고 있다. 이러한 이유로 자연계에서 추출되거나 생물 공학적인 방법으로 생산되는 효소 및 생리활성 물질의 산업적 경제성은 적당한 추출분리 공정이 적용 될 수 있는나에 의하여 결정되

는 경우가 많다.

친수성 중합체들이 형성하는 수용액 2상계에서 단백질, 효소, 기타 생리활성 물질들을 추출 분리하는 방법은 몇가지 이점을 가지고 있다. 첫째로 수용액 2상계 분획 공정은 다른 크로마토 그래피 방법보다 단위 용적에서의 결합 능력이 훨씬 크며, 용적내에서 결합평형에 도달하는 시간이 대단히 짧다. 둘째로 이 방법은 연속공정이 가능한 방법인것이다.

액상 2상계에서 생물 고분자 물질들의 분획을 지배하는 기구는 아직 명확하지 않으나 2상계를 형성하는 중합체들의 종류, 평균 분자량, 및 분자량 분포와 binodial 선상에서 형성되는 tie-line의 길이, 계에 존재하는 이온의 종류, 이온 강도, pH, 온도 등이 중요한 변수로 작용하는 것으로 알려져 있다. Albertsson<sup>(6)</sup>은 수용액 2상계에서 나타나는 단백질의 분획계수는 아래의 5가지 요소를 포함한다고 제시하고 있다.

$\ln K = \ln K_{el} + \ln K_{hphob} + \ln K_{hphil} + \ln K_{conf} + \ln K_{lig}$  즉 분획계수(K)는 정전기적인 힘(el), 소수성(hphob), 친수성(hphil), 분자구조(conf) 및 부착된 친화기(lig)들에 의하여 기여되는 분획계수 증가분의 합과

같다. 여기서 특히 단백질의 소수성은 단백질 분자의 일차 구조와 기하학적 구성에 의하여 나타나는 성질로서 단백질의 여러가지 생리활성과 식품학적 기능성에 크게 영향을 미치는 요소이다. 단백질의 소수성을 이용한 크로마토 그래피 분리방법들은 상당히 확립되어 있으며<sup>(7, 8)</sup> 표면 소수성의 측정법과 이와 관련된 식품 기능성에 관하여도 이미 연구된 바 있다<sup>(9, 10, 11)</sup>

본 연구는 poly(ethylene glycol)(PEG)과 dextran의 혼합 수용액이 형성하는 수용액 2상계에서 소수성이 서로 다른 표준 단백질들의 분획 현상을 관찰하고 PEG에 소수성 친화기인 palmitate를 ligand로 부착시킨 PEG-palmitate-Dextran 2상계에서 단백질 분획계수의 변화를 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 재 료

Dextran과 PEG 6000은 Sigma Chemicals(St. Louis, Mo, U.S.A.)로부터 구입했으며, PEG 6000, 4000, 2000등은 Fluka Chemicals(Switzerland)에서 구입했다. 표준 단백질들 즉, albumin bovine(fatty acid free),  $\beta$ -lactoglobulin(from milk lyophilized powder), ovalbumin (from egg white)들은 Sigma Chemicals(St. Louis, Mo, U.S.A.)에서 구입하였다.

#### Phase diagram 작성

2상계는 dextran 20% (w/w), PEG 40% (w/w)의 저장용액을 사용하였으며 2상계의 binodial line은 18% dextran 수용액 4g에 40% PEG용액을 소량씩 혼합시키면서 형성되는 상의 혼탁도에 의해서 결정하였다. 또한 상(phase)형성 중합체들의 분자량들이 binodial line의 위치에 미치는 영향을 조사하였다.

#### 단백질 분획실험

수용액 2상계를 만드는 조성으로 혼합된 중합체들은 일정 농도가 있는 cap tube(15ml)에 5ml를 넣고, 실온(18~20°C)에서 단백질액(5%, (w/w))을 0.1ml 주입한 후 20회 혼합하였다. 이것을 2400 r.p.m에서 5분 원심분리시킨 후 형성된 2상계에서 상, 하층부의 단백질 농도를 280nm에서 흡광도를 측정하여 분획계수(partition coefficient) K를 결정하였다.(Fig.1) ( $K = C_t/C_b =$  상층부의 단백질 농도/하층부의 단백질 농도)

#### 소수성 ligand의 치환 및 치환율 결정

소수성 분획법에 사용되는 poly(ethylene glycol)-

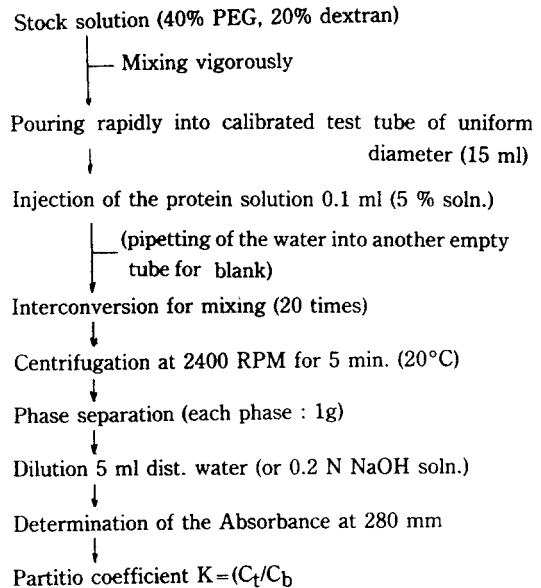


Fig. 1. Procedure for the measurement of partition coefficient

palmitate(PEG-P)는 100g의 PEG를 600ml의 toluene에 녹인 뒤 잔여 수분을 제거하기 위해 100ml의 toluene을 증류시켰다. 촉매제로서 2g의 trimethylamine을 첨가하고, 5g의 palmitoyl chloride를 50ml의 toluene에 첨가 혼합한 뒤 방울방울 PEG용액에 첨가하면서 교반시켰다. 반응이 끝난뒤 반응용액을 3°C로 냉각하여 생긴 침전물을 진공 여과하여 에탄올로 재결정 시켜서 PEG-P를 합성했다.<sup>(12)</sup> 합성물의 순도는 Johansson<sup>(13)</sup>의 방법으로 측정된 결과 78%였다.

### 결과 및 고찰

Fig.2는 20°C 상온에서 폴리에틸렌 글라이콜과 덱스트란이 만드는 전형적인 phase diagram으로써 형성된 binodial line을 경계로 하여 윗 부분의 조성에서 층분리가 일어난다. 또한 2상계를 형성하는 중합체인 PEG의 평균분자량의 감소에 따라서 형성되는 binodial line의 위치는 위로 이동하였다.

#### PEG/dextran 이상계에서의 표준 단백질 분획

수용액 2상계에서 표준 단백질들의 분획은 이들 단백질 분자의 표면성질(hydrophilic-hydrophobic)에 의해서 영향을 받는다.<sup>(14)</sup> Fig.3에서 binodial line에 위치한 A'A". 두 mode를 연결하는 tie line에 있는 점들은 상, 하층부가 같은 조성을 지니며, 단지 상, 하층부의

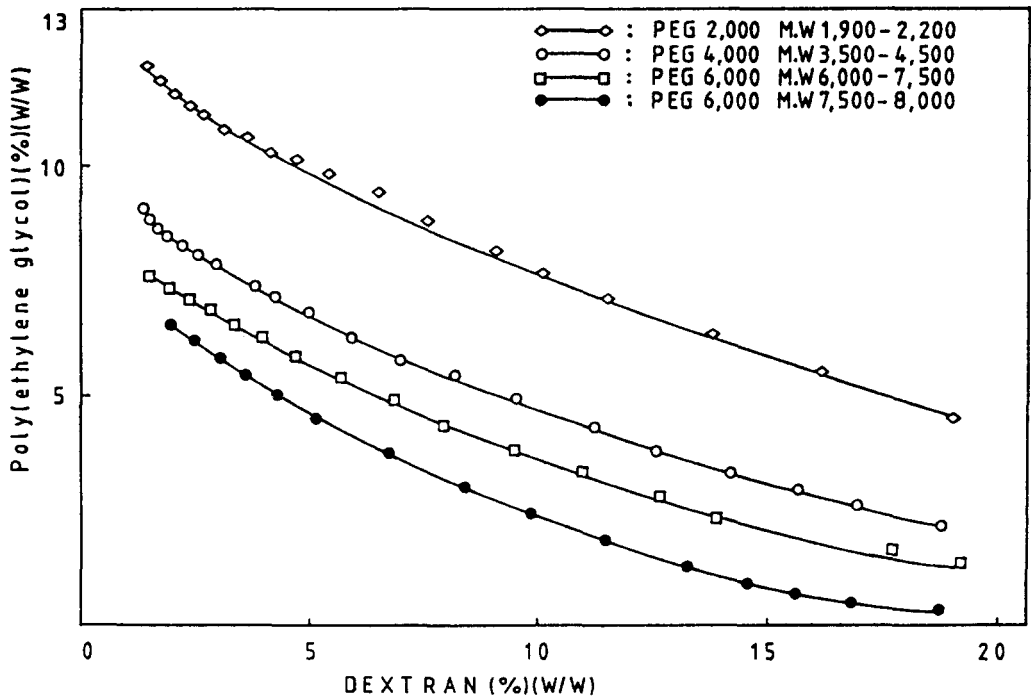


Fig. 2. Phase diagram of the dextran-poly (ethylene glycol) system with various Molecular weight of the PEG at 20°C

부피비는 tie line에서 AA'와 AA"의 거리 비로써 나타낼 수 있다<sup>(15)</sup> 즉, 조성 A의 용적비(vt/vb)는 1.0이며 B,C,D,E도 같은 용적비가 되는 점을 도식한 것이다.

Table.1에 의하면 상, 하층부의 동일 부피하에서 binodial line에 접근하는 폴리에틸렌글라이콜/덱스트란 조성이 되면 표준 단백질들의 분회계수는 증가되며,

ovalbumin보다 BSA이 PEG/dextran 2상계에서 하층부(dextran-rich phase)보다 소수성이 큰 상층부(PEG phase)로 적게 이동하는 것으로 나타났다. Binodial line에 가장 가까이 위치한 A 조성에서 각 단백질들의 분회계수는 BSA 0.64,  $\beta$ -lactoglobulin 1.02, ovalbumin 1.00이었다. <sup>9, 10)</sup> 등의 형광법을 이용한

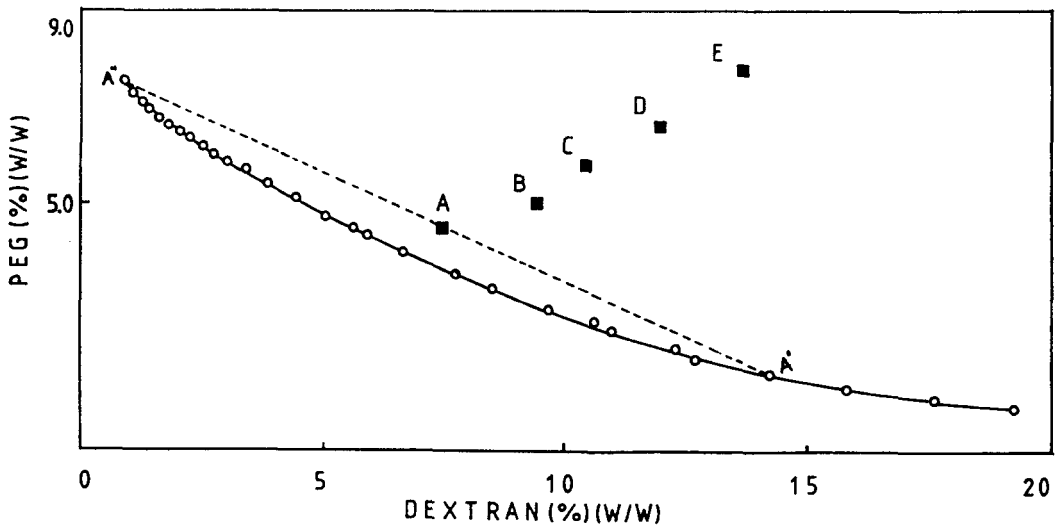


Fig. 3. Phase diagram of the dextran-poly (ethylene glycol) system at 20°C. (5mM sodium phosphate, pH 7.0) PEG 6,000; DEX.M.W 70,000

**Table 1. Partition coefficient (K) of proteins of different effective hydrophobicity with increasing concentration of PEG and dextran**

Protein	Effective hydrophobicity RI <sup>(9)</sup>	K at phase compositions of				
		A	B	C	D	E
BSA	700	0.64	0.30	0.19	0.09	0.01
Ovalbumin	5	1.00	0.81	0.64	0.49	0.27
$\beta$ -lactoglobulin	120	1.02	0.80	0.70	0.49	0.27

Phase compositions (A,B,C,D,E) are shown in Fig. 3.

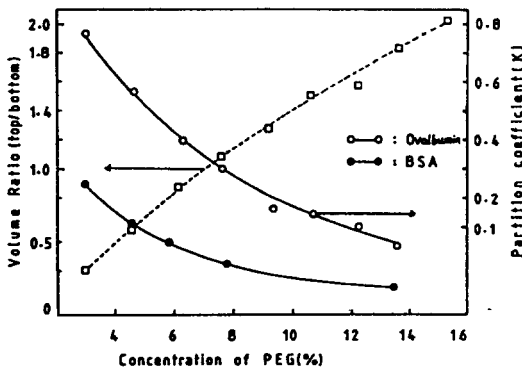
표면 소수성 측정치는 BSA 700,  $\beta$ -lactoglobulin 120, ovalbumin 5.0로 BSA가 표면 소수성이 가장 크고, ovalbumin이 가장 작은 것으로 보고 되었다. 따라서 기준 단백질들의 액상 그상계에서 분획은 단백질들의 표면 소수성 차이 보다는 친수성(정전기적 효과)에 의한 단백질 분자들의 용해도에 의해서 크게 영향을 받는 것으로 사려된다.

또한 Fig.4에서 보면 표면 소수성이 비교적 큰 BSA가 ovalbumin보다 낮은 분획계수를 나타내며, 상층부의 부피가 줄어들 수록 단백질의 분획계수는 증가되었다. Fig.5에 의하면 그상계를 형성하는 PEG의 평균 분자량이 작아질 수록 단백질들의 분획계수는 증가하는데, 이는 PEG분자량 감소에 따라 binodial line의 위치가 위로 이동하는 것과 관련이 있는 것으로 판단된다. PEG분자량의 감소는 상층부의 소수성이 감소하는 것으로 기대되나<sup>(15)</sup> 단백질의 분획계수는 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 PEG/dextran 2상계에서 표준 단백질들의 분획시 이들의 표면 소수성의 차이에도 불구하고 대부분은 물에 잘 녹는 단백질이기 때문에 상층부(PEG-rich phase)보다는 하층부(dextran-rich phase)로 더 이동하게 된다. 이때 PEG분자량이 작아

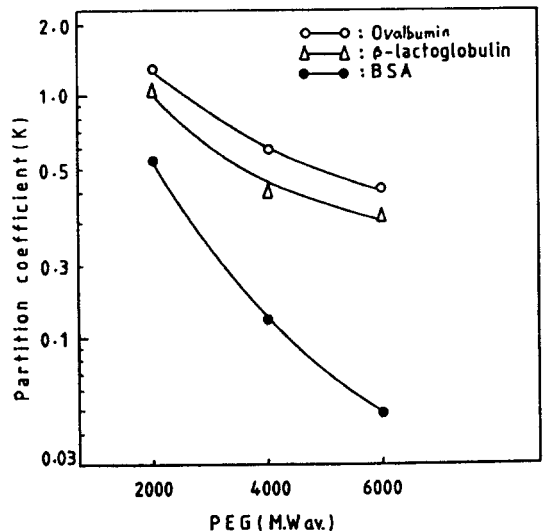
지면서 상층부의 친수성은 증가되고 표준 단백질들은 상층부로 이동되어 분획계수는 커지는 것으로 사려된다.

**PEG-P/dextran 2상계에서의 단백질 분획계수**

Fig.6은 PEG에 소수성 ligand인 palmitoyl chloride를 부착시킨 PEG-P를 PEG 용액에 첨가하였을때 단백질 분획계수의 변화를 보여주고있다. PEG/dextran 2상계에서 PEG에 palmitoyl chloride를 78% 치환시킨 PEG-P를 2~ 20% 첨가하여 상층부(PEG-rich phase)의 소수성을 증가시킬때 BSA의 분획계수가 ovalbumin의 분획계수보다 커지는 것을 볼 수 있었다. PEG-P를 2% 수준으로 첨가할때 소수성이 큰 BSA,  $\beta$ -lactoglobulin의 분획계수는 0.05, 0.1,에서 0.7과 1.2로 각각 10배 이상 급격히 증가하였으며 소수성이 가장 작은 ovalbumin은 거의 변화가 없었다. 한편 표



**Fig. 4. Comparison of partition coefficient and phase volume ratio as a function of the concentration of PEG 6,000. (5mM Na-buffer, pH 7.0; DEX 13.8%)**



**Fig. 5. Partition coefficient of BSA, OA, and  $\beta$ -lactoglobulin as a function of the average molecular weight of PEG. (10mM Na-phosphate, pH 7.0; PEG 9% (w/w), DEX. 9.5% (w/w))**

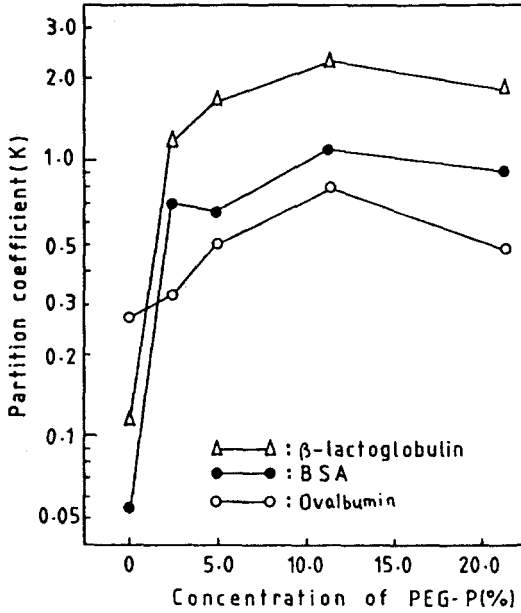


Fig. 6. Changes in the partition coefficient of various proteins as a function of the amount of PEG-palmitate added. (10% DEX, 7% PEG, 100mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10mM K-phosphate, pH 7.0)

면 소수성이 BSA보다 작은  $\beta$ -lactoglobulin이 높은 분획계수를 보이는 이유는 albumin보다는 globulin의 용해도가 작아서 PEG 수용액에서 변성없이 쉽게 aggregation을 형성하게 되며<sup>(16)</sup> 이들이 수용액 2상계에서 분획시 계면과 상층부에 모이게 되면서 분획계수 값이 증가되는 것으로 사려된다. 이때 10% dextran, 7% PEG 조건에서 10% 이상 PEG-P 첨가시에는 거의 일정한 분획계수 값을 보여주었다 따라서 PEG/dextran 2상계에서 단백질들의 선택적인 분리를 위해서는 특정 ligand를 부착시키는 것이 효과적이었으며, 소량의 첨가에 의해서 단백질 분획에 큰 효과를 관찰할 수 있었다.

요 약

폴리에틸렌 글라이콜-덱스트란 혼합수용액이 형성하는 수용액 2상계에서 표면 소수성의 크기를 알고 있는 표준 단백질들의 분획계수를 관찰하였다. 또한 폴리에틸렌 글라이콜(PEG)에 palmitate를 부착시킨 PEG-P를 첨가함으로써 상층부의 소수성을 증가시켰을 때 단백질들의 분획계수 변화를 조사하였다. PEG/dextran 2상계에서 단백질의 분획계수는 단백질의 유효 소수성에 관계없이 2상계의 용적비가 동일한 조건

에서 PEG와 dextran의 농도가 함께 증가함에 따라 분획계도 증가하였다. 그러나 PEG에 78%친화도를 가지는 PEG-P를 소량 첨가하여 만든 2상계에서는 유효 소수성이 큰 bovine serum albumin과  $\beta$ -lactoglobulin의 분획계수가 10배 이상 증가하였고, 유효 소수성이 작은 ovalbumin은 큰 변화를 보이지 않았다. 이러한 분획계수의 급격한 증가는 PEG-P의 첨가량이 아주 낮은 2% 수준일때 나타났으며 그 이상 첨가시에는 모든 단백질이 공히 10% 첨가될때까지 완만히 증가하는 경향을 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 한국 과학재단 일반 연구조성비의 보조를 수행되었으며, 이 자리를 빌어 감사 드립니다.

문 헌

- Hustedt, H., Kroner, K.H., Menge, U. and Kula, M.: in *Trends in Biotechnology*, Elsevier Science Publishers B.V., Cambridge, (1985)
- Albertsson, P.A.: *Partition of cell particles and macromolecules*, 1st ed., John Wiley & Sons, New York, p. 20, (1960)
- Kroner, K.H., Hustedt, H., Granda, S. and Kula, R.: *Biotechnology and Bioengineering*, **20**, 1967 (1978)
- Albertsson, P.A., Andersson, B., Larsson, C. and Akerland, H.E.: *Methods of Biochemical Analysis*, **28**, 115 (1982)
- Albertsson, P.A.: *Partition of cell particles and macromolecules*, 2nd edn., Wiley Interscience, New York, (1971)
- Albertsson, P.A.: *Endeavour*, **1**, 69 (1977)
- Zaslavsky, B.Y., Mestechkina, N.M., Miheeva, L.M. and Rogozhin, S.V. *J. of chromatography*, **256**, 49 (1983)
- Johansson, G.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **221**, 387 (1970)
- 이철호, 김성구. 한국생화학회지 **18**(2), 129(1985).
- 이철호, 김성구. 한국생화학회지 **17**(4), 373(1984).
- 이철호, 제 9 차 국내외 한국과학기술자 종합학술대회 논문집 (1) p.251, (1984).
- Shanbhag, V.P. and Johansson, G.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **61**(4), 1141 (1974)
- Johansson, G.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **451**, 517 (1976)

14. Albertsson, P.A.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **27**, 378 (1958)
  15. Albertsson, P.A.: *Partition of cell particles and macromolecules*, 3rd edn., John Wiley & Sons, New York, p. 17 (1986)
  16. Scopes, R.K.: *Protein purification*, Springer-Verlag, New York Heidelberg Berlin p. 60 (1982)
- 
- (1987년 1월 17일 접수)