

## 소 혈청 단백질 분획들의 기포분리 현상에 관한 연구

이부용 · 이철호

고려대학교 식품공학과

### Foam Separation of Bovine Serum Protein Fractions

Boo Yong Lee and Cheri Ho Lee

Department of Food Fechnology, Korea University, Seoul

#### Abstract

The foam separation of bovine serum proteins was investigated and the protein fractionation by foam separation was analyzed by PAG electrophoresis. The protein concentration for the surface excess formation of bovine serum was in the range of 20-800  $\mu\text{g/ml}$ . At pH 5, the foamate volume was maximum, but the enrichment ratio minimum. As the temperature was elevated, the foamate volume decreased and the enrichment ratio increase. As the gas flow rate increased from 25 to 100  $\text{ml/min}$ , the foamate volume decreased and the enrichment ratio increased. The enrichment ration became maximum when the added ionic strength of serum solution was in the range of 1-3 by the addition of different types of salts, and this was related to the reduction of surface tension of the solution. In general, BSA,  $\alpha_1$ , and  $\alpha_2$ -globulins, which have relatively small molecular weight and high hydrophobicity, moved easily to the foam, and the separation of protein fractions in the serum varied with the changes in pH, temperature, gas flow rate and ionic strength of the solution.

#### 서 론

단백질의 기포형성 능력을 이용한 분리농축 공정을 개발하기 위하여 저자들은 전보<sup>(1)</sup>에서 소수성이 현저하게 다른 bovine serum albumin과 ovalbumin이 표면과잉을 형성하는 농도를 비교하였으며 BSA의 기포분리 공정에 관여하는 pH, 온도, gas유입속도, 염농도 등의 영향을 관찰하였다. 상기 실험에서 단백질의 소수성 크기에 따라 표면과잉이 형성되는 농도 범위는 크게 달라짐을 관찰하였고 이러한 사실은 기포분리 조작으로 소수성이 서로 다른 단백질을 혼합물에서 선택적으로 분리 농축할 수 있음을 밝혔다.

소의 혈액으로부터 분리한 혈청 단백질의 조성과 각 단백질들의 성질에 관하여는 비교적 많이 연구되어 있다<sup>(2-10)</sup>. 소 혈청중의 단백질 농도는 6~8%에 달하여, 100ml의 소 혈청속에는 4~5g의 albumin(총 단백질의 50~60%)과 2~3g의 globulin이 존재한다.<sup>(2,3)</sup> Globulin은 다시  $\alpha_1$ (총 단백질의 4.7~7.2%),  $\alpha_2$ (6.8~12%),  $\beta$ (9.3~15%), 및 gamma-globulin(13~23%)으로 구분된다.

serum albumin의 분자량은 68,000이며 globulin중에서 가장 큰  $\gamma$ -globulin은 분자량이 16,000정도이다. 이들 각 분획의 소수성에 관한 측정치를 보면 팔미틴

산 결합력에서 BSA를 100으로 했을때  $\alpha_1$ -globulin은 66.6%,  $\alpha_2$ 는 27.3%,  $\beta$ 는 15.4%  $\gamma$ 는 0%라고 보고되고 있다<sup>(5)</sup>. 또한 butyl epoxy-sepharose 4b column에서의 retention coefficient는 BSA 10.33,  $\gamma$ -globulin은 4.82로 보고된 바 있다<sup>(6)</sup>.

Heptane결합력과 SDS결합력으로 추정된 표면소수성은 각각 BSA가 100% 및 2729일때  $\gamma$ -globulin은 7.3%, 83으로 BSA보다 globulin분획들의 소수성이 현저히 낮으며  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 의 순으로 낮아지는 것이 분명하다<sup>(7-10)</sup>.

본 실험에서는 소의 혈액에서 혈청을 분리하여 만든 혈청액이 표면과잉을 형성하는 농도범위를 측정하고 pH, 온도, 가스 유입속도,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도 및 여러가지 염류첨가에 따른 분리현상과 분리된 농축액의 단백질 조성을 전기영동법으로 분획 관찰 하였다.

#### 재료 및 방법

##### 소 혈청액의 제조

도살된 직후의 혈액을 상온에서 응고시킨 후 냉장고에서 충분히 냉각시켜 원심분리(1500×g)에 의해 혈청을 분리 수거 하였다.

기포분리 조작

실험에 사용한 기포분리 장치 및 조작법, pH, 온도, 가스 유입속도 조절과 염류첨가((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl, KCl, LiCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>), 농축율 및 회수율계산, 단백질 농도측정 방법은 전보<sup>(1)</sup>에 따랐다.

표면장력 측정

액체-기체 경계면인 용액의 표면에 표면과잉이 형성되어 표면장력의 변화가 일어나는 농도범위에서 단백질 농축 효과가 나타나므로<sup>(1,3)</sup> 기포분리가 가능한 단백질 농도를 알기 위하여 Fisher-tensiometer(Fisher Surface tensiometer, model 20)를 사용하여 여러가지 농도로 만들어진 혈청 용액의 표면장력을 측정하였다.

Disc PAG전기 영동 분석

Davis<sup>(11)</sup>의 방법에 따라 7.5%의 acrylamide gel(pH 9.4)을 이용하여 기포분리액과 잔류 모액에 대해 전기 영동을 행하였다. 전극액으로서는 pH 8.3의 Tris-glycin buffer를 사용하였고 gel column하나당 약 3mA의 전류가 흐르도록 하여 실온에서 약 4시간 동안 수직영동 시켰다. 영동후 gel을 분리하여 coomassie brilliant blue R-250으로 염색한후 다시 7% 초산용액으로 탈색시켰다.

결과 및 고찰

표면과잉 형성농도

분리한 혈청의 단백질 농도는 7.5gprotein/100ml bovine serum이었고 혈청은 적당히 희석시켜 여러 농도의 용액을 만들어 표면장력을 측정한 결과를 Fig.1에

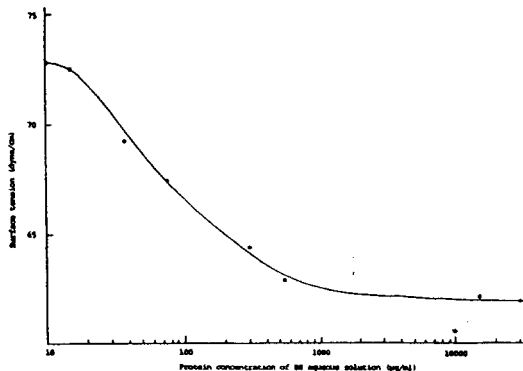


Fig. 1. Changes in surface tension by the protein concentration of BS aqueous solution

나타내었다. Fig.1에서 표면장력을 저하시키는 단백질 농도범위는 20μg/ml ~800μg/ml이며 이 농도 범위에서 표면과잉이 형성되어 단백질의 기포분리가 가능한 것으로 판단된다.<sup>(1)</sup>

본 실험에서는 소 혈청 원액을 희석시켜 1%용액 (750μg/ml bovine serum)을 만들어 시료 용액으로 사용하였다.

pH의 영향

Fig.2에 의하면 소 혈청 단백질중 대부분을 차지하는 BSA의 등전점인 pH4.9를 기준으로 하여 pH가 양극단으로 갈수록 기포분리액(foamate)의 부피는 줄고 단백질 농축율은 증가하여 pH11에서는 약 2.2배의 농축율을 나타내었다.

Fig.3은 pH변화에 따라 얻은 기포분리액과 잔류모액(bulk solution)속에 남아 있는 소 혈청 단백질 분획들의 분리 현상을 전기영동 분석에 의해 관찰한 것으로 pH3에서는 BSA보다 α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>, β-globulin분획들이 기포분리액으로 거의나 분리되고, pH4.9에서는 BSA와 α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>-globulin 분획이 기포분리액으로 잘 분리되었다. pH가 더 높아질수록 잔류모액에 BSA와 α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>-globulin 분획이 많이 남는 것을 보여주고 있으며, β-globulin은 알칼리액에서 대부분 기포로 이전하는

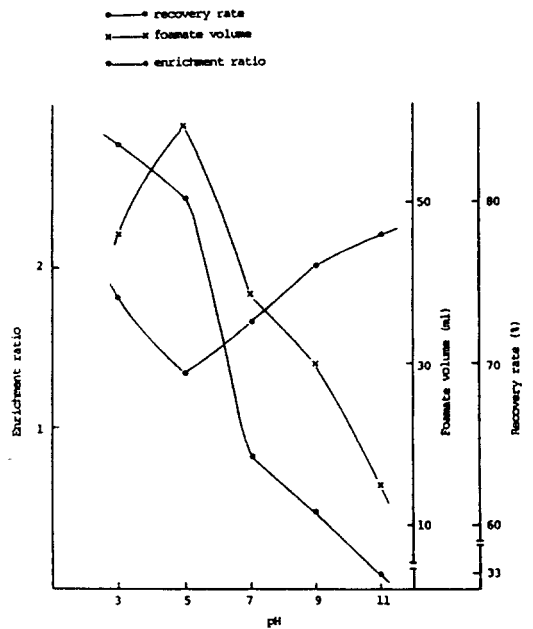
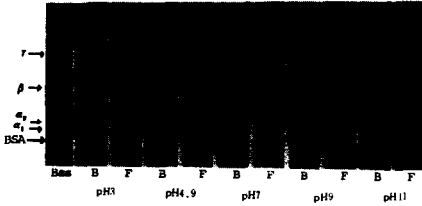


Fig. 2. The effect of pH on foaming property and enrichment ratio of 1% BS solution (temp:10°C, N<sub>2</sub> gas flow rate: 50ml/min)



**Fig. 3. Changes in PAG electrophoretic pattern of bulk solution and foamate by pH**

- B : Bulk solution
- F : Foamate
- BSS : Bovine Serum Solution
- BSA : Bovine Serum Albumin
- $\alpha_1$  :  $\alpha_1$ -globulin
- $\alpha_2$  :  $\alpha_2$ -globulin
- $\beta$  :  $\beta$ -globulin
- r : r-globulin

현상을 나타내었다.

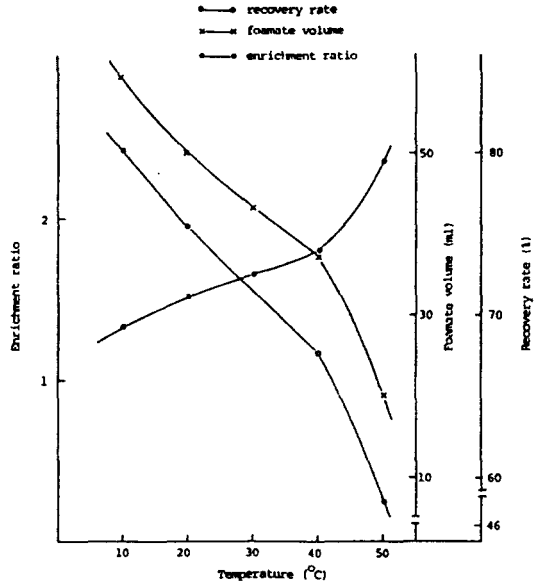
위의 결과로 볼때 각단백질 분획들의 분리정도는 소 수성이 크고 분자량이 작은 BSA와  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ -globulin 분획이 pH4.9에서 선택적으로 기포로 잘 분리된다고 사료된다. 이와같은 현상은 pH3~5범위에서 기포분리에 의한 단백질 회수율이 80%이상이었으나 pH7이상에서는 60% 수준으로 급격히 감소하는 것과 같은 경향을 나타내는 것이다.

**온도의 영향**

Fig.4는 10°C부터 50°C까지 온도 변화에 따른 기포분리 현상을 조사한 것으로서 온도가 높아짐에 따라 단백질 회수율과 기포분리액의 부피는 줄어들고 단백질 농축율은 10°C의 1.3정도에서 50°C의 2.3정도로 증가하였다. pH변화와 마찬가지로 전기영동 분석을 한 결과 40°C와 50°C의 기포분리액은 소 혈청용액의 기준 band pattern과 다른 band가 나타나는 것을 Fig.5에서 볼 수 있으며 기포분리 조작시에도 40°C와 50°C에서는 분리탑의 기벽에 단백질들이 응고되어 부착되는 현상을 관찰할 수 있었다. 위의 결과들로 볼때 온도는 20°C 이하가 좋으며 역시 수성이 크고 분자량이 작은 BSA와  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ -globulin 분획이 기포로 잘 분리되고 있음을 알 수 있었다.

**가스 유입속도의 영향**

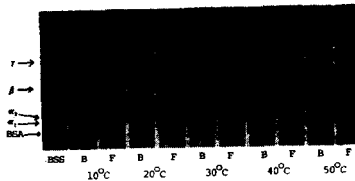
Fig.6은 질소가스 유입속도가 증가할 수록 얻는 기포분리액의 부피는 증가하지만 단백질 농축율은 감소함을 나타내며, 질소가스 유입속도 25ml/min과 50



**Fig. 4. The effect of temperature on foaming property and enrichment ratio of 1% BS solution (pH:4.9, N<sub>2</sub> gas flow rate:50ml/min)**

ml/min를 비교할 때 단백질 회수율은 54%에서 80%로 크게 증가함을 보여주고 있다.

기포분리액과 잔류모액의 전기영동 pattern을 비교하여 보면 가스 유입속도 25ml/min에서는 50ml/min에 비해 상당량의 BSA가 잔류모액에 남아 있었으나  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ -globulin분획은 기포로 잘 분리 되었으며, 50 ml/min에서는 BSA와  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ -globulin 분획들이 주



**Fig. 5. Changes in PAG electrophoretic pattern of bulk solution and foamate by temperature**

- B : Bulk solution
- F : Foamate
- BSS : Bovine Serum Solution
- BSA : Bovine Serum Albumin
- $\alpha_1$  :  $\alpha_1$ -globulin
- $\alpha_2$  :  $\alpha_2$ -globulin
- $\beta$  :  $\beta$ -globulin
- r : r-globulin

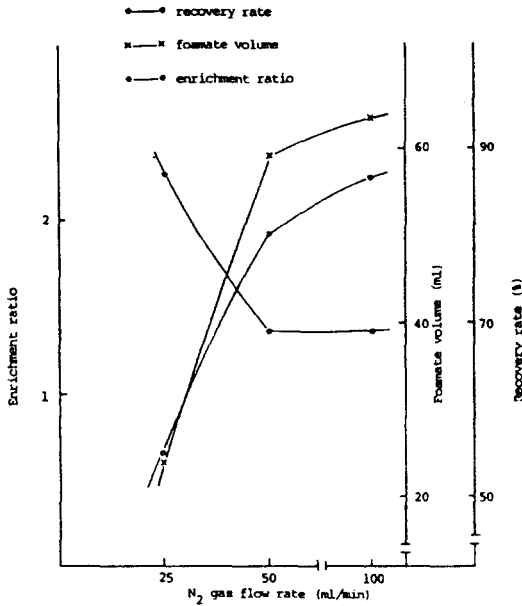


Fig. 6. The effect of gas flow rate on foaming property and enrichment ratio of 1% BS solutin (pH: 4.9, temp: 10°C)

로 기포로 분리되었다(Fig.7).

이온강도의 영향

염류 ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl, KCl, LiCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>)

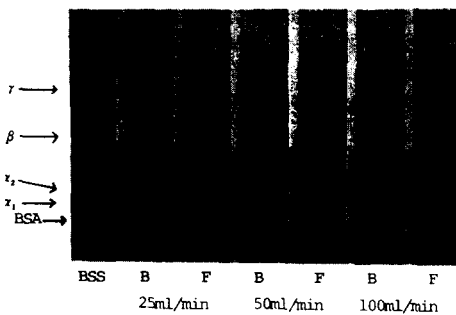


Fig. 7. Changes in PAG electrophoretic pattern of bulk solution and foamate by N<sub>2</sub> gas flow rate.

- B : Bulk solution
- F : Foamate
- BSS : Bovine Serum Solution
- BSA : Bovine Serum Albumin
- α<sub>1</sub> : α<sub>1</sub>-globulin
- α<sub>2</sub> : α<sub>2</sub>-globulin
- β : β-globulin
- r : r-globulin

를 첨가하여 용액의 이온강도 변화에 따른 단백질 분획들의 기포분리 현상을 살펴 보았다. 대표적으로 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 효과를 살펴보면 Fig.8은 이온강도를 5까지 변화시킬 때 이온강도 3에서는 2.1정도의 가장 높은 단백질 농축율을 나타내며 기포분리액의 부피는 가장 적어 약36ml 정도임을 보여주고 있다. Fig.9는

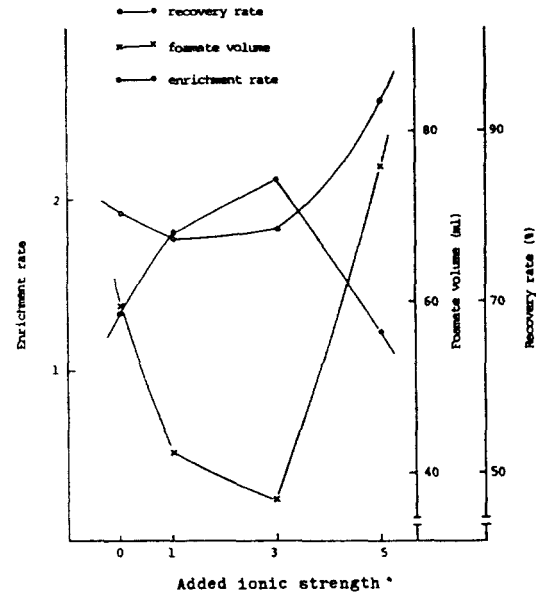


Fig. 8. The effect of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on foaming property and enrichment ratio of 1% Bovine Serum Solution (pH:4.9 temp: 10°C, N<sub>2</sub> gas flow rate: 50ml/min)

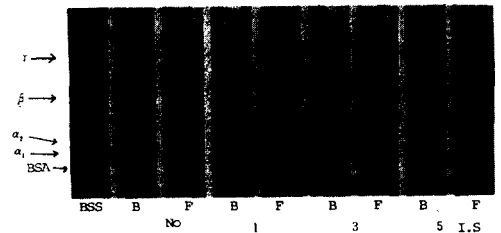


Fig. 9. Changes in PAG electrophoretic pattern of bulk solution and foamate by added ionic strength of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

- B : Bulk solution
- F : Foamate
- BSS : Bovine Serum Solution
- BSA : Bovine Serum Albumin
- α<sub>1</sub> : α<sub>1</sub>-globulin
- α<sub>2</sub> : α<sub>2</sub>-globulin
- β : β-globulin
- r : r-globulin

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 이온강도가 증가할수록 잔류모액속에 BSA가 더 적게 남는 것을 보여주며 특히 염을 전혀 첨가하지 않았을 때 보다 적당히 첨가한 이온강도 3이상에서 훨씬 적은양의 BSA와  $\gamma$ ,  $\beta$ -globulin 분획이 남아 전체적으로 단백질 회수율이 증가하는데 크게 기여함을 나타내며, 모든 이온강도 범위에서 소수성이 크고 분자량이 작은 BSA와  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ -globulin 분획들이 기포로 잘 분리됨을 알 수 있었다. 다른 염을 첨가한 경우도 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 경우와 유사한 결과를 보여주었으며 NaCl, KCl의 경우 첨가된 이온강도 1에서 기포분리액과 잔류모액속에 상당한 양의 aggregate가 형성되어 단백질 정량이 불가능 하였다. 전체적으로 Table 1에서 볼때 염을 전혀 첨가하지 않았을 때 보다 소량의 염을 첨가한 1~3이온강도에서 단백질 농축율이 더 높은 것을 알 수 있으며 단백질 회수율은 염의 종류에 관계없이 이온강도가 증가할 수록 계속 증가하여 이온강도 3이상에서는 약 99%의 회수율을 나타내었다.

염류 첨가에 따른 단백질 농축율과 표면장력과의 관계  
여러가지 염을 첨가할때 1이온강도 정도에서 가장 높은 단백질 농축율을 나타내는 현상은 용액의 이온강

도 변화에 따른 표면장력의 변화와 관계가 깊은데 Fig. 10은 최대 농축율을 보이는 1이온강도 정도에서 최소의 표면장력을 나타내고 있다. 이와같은 현상은 적당한 양의 염의 존재가 단백질 분자들이 용액의 표면으로 몰려 표면과임을 형성하는데 도움을 주고 있기 때문인 것으로 판단되며 염을 전혀 첨가하지 않았을 때 보다 적당한 염을 첨가하여 최소의 표면장력을 나타내는 염농도에서 가장 높은 단백질 농축율을 나타낼 것으로 사료된다. 이<sup>(12)</sup>의 액상 이상계에서 단백질 분획 계수에 대한 금속염의 효과에서 관찰된 바와 마찬가지로 금속염의 존재에 의하여 단백질 분자의 정전기적 효과를 상쇄시킴으로서 표면과임을 쉽게 형성하여 기포분리 효과가 커지는 것으로 해석된다.

이상에서 관찰된 바를 종합하면 기포분리 조작에 의하여 소 혈청액 단백질의 농축분리가 가능하나 아직도 많은 양의 다른 단백질들이 기포분리액에 포함되므로 이들 단백질들의 선택적 분리 기구에 대한 연구가 더 진행되어야 하며 특정 단백질의 특징적인 친화성 및 반응성을 이용한 선택적 분리 조건의 수립이 요구되고 있다.

요 약

Table 1. The effect of salts on enrichment ratio and recovery rate in foamate

Added I.S.		0	1	2	3	4	5	6	7
Slats									
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	E.R	1.35	1.81	-	2.12	-	1.23	-	-
	R.R	80.12	77.19	-	78.37	-	93.30	-	-
NaCl	E.R	1.35	-	-	1.53	1.27	1.17	-	-
	R.R	80.12	-	-	95.69	99.20	99.86	-	-
KCl	E.R	1.35	-	2.52	2.20	1.43	-	-	-
	R.R	80.12	-	67.95	71.63	76.24	-	-	-
LiCl	E.R	1.35	1.64	-	1.32	-	1.11	1.08	1.05
	R.R	80.12	87.78	-	96.05	-	99.52	99.54	99.93
CaCl <sub>2</sub>	E.R	1.35	1.60	-	1.30	-	1.21	1.10	1.08
	R.R	80.12	85.36	-	94.64	-	98.03	99.03	99.36
MgCl <sub>2</sub>	E.R	1.35	1.63	-	1.43	-	1.23	1.20	1.13
	R.R	80.12	85.49	-	93.51	-	96.97	98.29	99.10

I.S: Ionic Strength, E.R.: Enrichment Ration, R.R.: Recovery Rate (%)

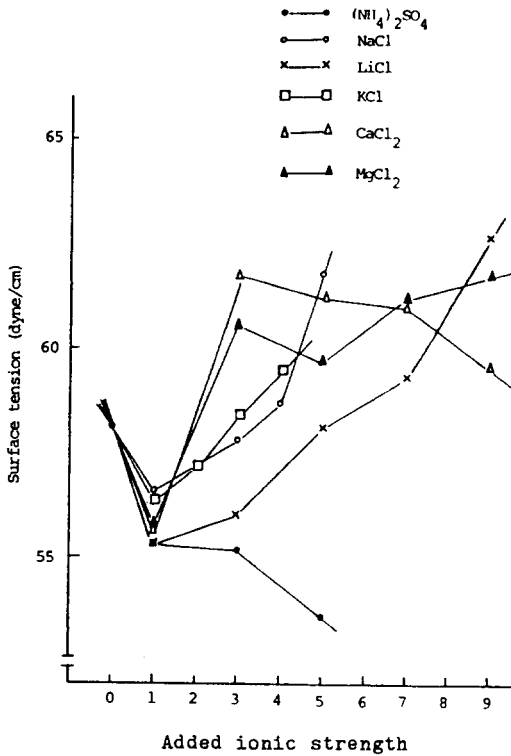


Fig. 10. The effect of salts on surface tension of 1% BS solution

기포분리 조작을 이용하여 소 혈청 단백질의 분리 농축 현상을 전기영동 패턴에 의하여 분석하였다. 기포분리가 이루어지는 소 혈청 단백질 농도범위는  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$   $800 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었으며 용액의 pH5부근에서 기포분리액의 부피는 최대가 되며 단백질 농축율은 최소치를 기록하였다. 기포분리 온도가 높아질수록 분리액의 부피는 감소하고 농축율은 증가하였으며, 가스유입 속도가  $25 \text{ml}/\text{min}$ 에서  $100 \text{ml}/\text{min}$ 으로 증가 할 수록 기포분리액의 부피는 감소하고 농축율은 증가하였다. 염을 첨가할 때 이온강도 1~3부근에서 농축율은 최대치를 나타내었으며 이는 표면장력의 저하효과와 관계가 있었다. 일반적으로 소수성이 크고 분자량이

작은 BSA,  $\alpha_1$  및  $\alpha_2$ -globulin 분획이 선택적으로 기포 분리 되는 경향을 나타내었으며 단백질 분획의 이동은 pH, 분리온도 가스유입속도, 첨가한 염의 이온강도 등에 따라 다르게 나타났다.

## 사 의

본 연구는 한국과학재단 일반연구 조성비의 보조로 수행된 것입니다.

## 문 헌

1. 이부용, 이철호, 한국식품과학회지 19, 220, (1987)
2. 대한생화학회, 생화학실습부록, 광문사(1977)
3. Charm, S.E., Morningstar, J., Matteo, C.C. and Patiel, B., *Analytical Biochemistry*, 15, 498, (1966)
4. 김성구, 이삼빈, 이철호, 한국생화학회지, 18 (2), 129(1985)
5. Peters, T. Jr. Taninuchi, H. and Anfinsen, C.B., *J. Bio. Chem.*, 248 (7), 2447, (1973)
6. Keshavarz, E. and Nakai, S., *Biochimica et Biophysica Acta*, 576, 269, (1979)
7. Kato, A.M., Matsuda, T., Matsudomi, N. and Kobayashi, K., *J. Agric. FoodChem.* 32 (1), 284, (1984)
8. Bigelow, C.C., *J. Theoret. Biol.* 16, 187, (1967)
9. Malander, W. and Horvath, C., *Arch. Biophys.* 183, 200, (1977)
10. Mohammadzadeh, A.K., Smith, L.M. and Feeney, R.E., *Biochimica et Biophysica Acta*, 194, 256, (1969)
11. David, B.H. 1983. Gel electrophoresis of proteins. B.D. Hames and D. Rickwood, ed. IRL Press, Oxford.
12. 이삼빈, 이철호, 한국식품과학회지 19(2), 146(1987)

(1987년 1월 28일 접수)