

역류분배를 이용한 모델단백질의 분리정제시 pH의 영향에 관한 연구

이부용 · 이창호 · 이철호
고려대학교 식품공학과

Effects of pH on the Separation and Purification of Model Protein using Counter Current Distribution

Boo-Yong Lee, Chang-Ho Lee, Cherl-Ho Lee
Department of Food Technology, Korea University, Seoul

Abstract

The changes in the partition coefficient of model proteins (lysozyme, myoglobin, conalbumin, bovine serum albumin) in an aqueous two-phase system formed by polyethylene glycol and dextran were examined in order to improve the capacity of counter current distribution for the protein fractionation and concentration. The protein distribution patterns in CCD with 30 tubes varied with the pH of the system, and both theoretical and measured values agreed well. From the mixture of model protein, pure BSA fraction was appeared at the upper-phase of 14th tube having pH 4.5, pure myoglobin at the lower-phase of the 16th tube with pH 6.5 and conalbumin at the lower-phase of 4th tube with pH 12. The result indicated the possible use of CCD method for protein fractionation, if the partition coefficient of proteins was manipulated by pH and other means.

Key words: counter current distribution, proteins, pH effects, separation process

서 론

생물공학이 발전 진보함에 따라 생물학적 활성을 갖는 단백질이나 효소 등의 생산이 크게 증가하고 있으나, 생리활성물질들의 대부분이 낮은 농도로 생산되며 여러가지 주위 환경에 민감함으로 이들 물질을 농축, 정제하는 것은 고도의 기술과 경비가 소요되는 어려운 문제이다. Albertsson⁽¹⁻³⁾에 의해 개발, 시도되고 있는 수용성 액체 2상계 (aqueous two-phase system)를 이용한 생리활성물질의 분리법은 단백질, 효소, 핵산, 세포 및 세포내 여러가지 물질들이 활성을 유지한 상태로 거의 순수하게 분리할 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 수용성 액체 2상계를 이용한 물질분리에서 2상계를 형성하는 중합체들의 성질과 pH, 염의 종류나 농도, 분리되는 물질의 크기나, 표면특성 등에 따라 분리되는 물질들은 고유의 분획계수 (Partition coefficient, K)를 갖게 된다⁽⁴⁾.

따라서 기존의 여러가지 분리공정에서 많이 이용되는 복잡한 설비나, 까다로운 기술이 없이도, 2상계의 환경

을 적당히 조절하여 분리하고자 하는 물질의 분획계수를 변화시킬 수 있으며 분획계수가 변함에 따라, 그 물질이 어느 한쪽상으로 몰려서 효과적인 분리가 이루어질 수 있다. 그러나 분리하고자 하는 물질들의 분획계수가 서로 비슷하여 차이가 나지 않는 경우에는, 한번의 상(phase)분리만 일으키는 단일분배추출 (Single-step extraction) 방법으로는 순수하게 효율적인 분리가 이루어지지 않는다.

이와 같이 물질들의 특성차이가 별로 나지 않는 경우에는 여러번의 상분리를 일으켜 주는 다중분배추출 (multi-step extraction) 방법을 적용시켜, 분리특성의 차이가 작은 물질들도 효과적으로 분리시킬 수 있다^(1,5-8). 이러한 다중추출 방법의 대표적인 예는 역류분배 (Counter Current Distribution, CCD) 방법에서 찾아볼 수 있다. 역류분배에서 물질들을 분리시키는 원리는 2상계의 용액이 담겨진 여러 개의 튜브에서 첫번째 튜브에 물질들을 넣고 분획시킨 후, 상층부 또는 하층부 전체를 두번째 튜브로 옮겨주어 다시 분획시키는 작업을 반복한다.

이 과정에서 각각의 분획들을 분획계수에 따라 모여지는 튜브번호가 다르게 나타나게 되어 혼합물의 분리

Corresponding author: Dr. Cherl-Ho Lee, Dept. of Food Technology, 1 Anamdong, Sungbukku, Seoul, Korea. 136-701

가 이루어지게 된다. 한편 분리되는 물질들은 각 단계마다 이항분포(binomial distribution)를 하게 되므로 임의의 튜브에 존재하는 물질의 양을 이론적으로 계산해 낼 수 있다. 즉 n번을 옮겨서 r 번째 튜브에 나타나는 물질의 전체 양, F(r)은 다음과 같다.

$$F(r) = \frac{n!}{r!(n-r)!} \cdot p^r \cdot q^{n-r}$$

p: 상층부에 존재하는 분획의 분율

q: 하층부에 존재하는 분획의 분율

본 연구는 수용성 액체 2상계 추출을 다중추출 방법으로 적용하는 역류분배 방법을 단백질의 분리, 정제에 이용하기 위한 모델시스템 연구로서, 2상계의 pH를 변화시킴에 따라 4가지 모델 단백질(lysozyme, myoglobin, conalbumin, bovine serum albumin)들의 분획계수가 각각 틀려지게 되는 특성을 이용하여 여러 pH에서 각 단백질들의 분리 정도를 이론적 분포곡선과 실험적 분포곡선으로 비교하고, 전기영동을 실시하여 각 분획들을 정성분석하였다.

재료 및 방법

실험재료

수용성 2상계를 형성하는 중합체는 polyethylene glycol(PEG) 6000(Fluca Chemicals)과 dextran 70000(Sigma Chemicals)을 사용하였다. 모델단백질은 lysozyme(from chicken egg white), myoglobin(from horseskeletal muscle), conalbumin(form chicken egg white), bovine serum albumin(BSA)의 4가지로서 모두 Sigma Chemicals의 제품을 사용하였다.

중합체의 stock 용액제조

0.1M universal buffer⁽⁹⁾를 pH 4.5, 5.5, 6.5, 9.0, 12.0으로 5가지를 만든 후, 각 pH에 대해 PEG 6000과 Dextran 70000을 15% 농도로 제조하였다.

시료단백질 용액제조

pH에 따른 각 단백질의 분획계수(K)값을 구하기 위하여 4가지 단백질(lysozyme, myoglobin, conalbumin, BSA)을 증류수를 사용하여 1% 농도로 제조하였다. 역류분배를 행하기 위한 4가지 단백질 혼합용액을 같은 비율로하여 10%농도로 제조하였다.

수용성 액체 2상계 제조

PEG 6000 stock 용액 2.0g에 Dextran 70000 stock 용액 2.0g을 넣고, 증류수 0.5g을 첨가한 뒤 잘 혼합한 후, 측정하고자 하는 단백질 용액 0.5g을 넣어서 전체가 5.0g되는 수용성 액체 2상계를 제조하였다.

단백질의 분획계수(K) 측정

단일분배에서 4가지 단백질의 pH(4.5, 5.5, 6.5, 9.0, 12.0)에 따른 분획계수값을 알아보기 위한 과정은 Fig. 1과 같다.

이론적 분포곡선

4가지 시료단백질에 대해서 pH에 따라 단일분배에서 구한 분획계수(K)값을 컴퓨터를 사용하여 29회까지 다중분배추출을 하였을 때 각 튜브에 존재하는 단백질의 양을 이론적으로 계산하였다. Fig. 2는 이론적 분포곡선을 알아보는 flow chart이다.

실험적 분포곡선

Fig. 3에 나타낸 바와 같이 직접 실험적으로 다중분배추출을 행하여 튜브번호에 따른 실험적인 단백질 분포곡선을 작성하였다. 총 튜브갯수는 30개이며 이동횟수는 29번이다.

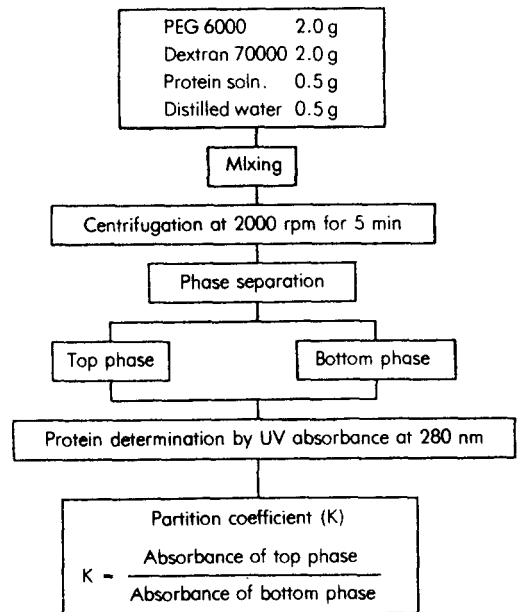


Fig. 1. Procedure of partitioning in aqueous two phase system

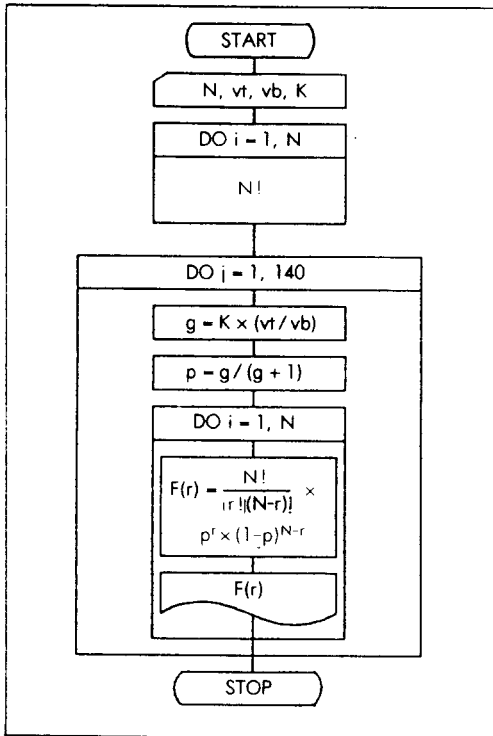


Fig. 2. Flow chart of theoretical CCD-curve drawing
 N: the number of transfer, K: partition coefficient, vt: the volume of top phase, vb: the volume of bottom phase, g: partition ratio, r: the number of tube, p: the amount of protein in top phase, F(r): the amount of protein in rth tube

Disc PAG 전기영동 분석

Davis⁽¹⁰⁾의 방법에 따라 7.5% acrylamide gel 을 이용하여 다중분배추출을 행한 30개 튜브의 상층부와 하층부 용액에 대해 전기영동을 실시한 후 각 층의 단백질 분획들을 정성적으로 확인하였다.

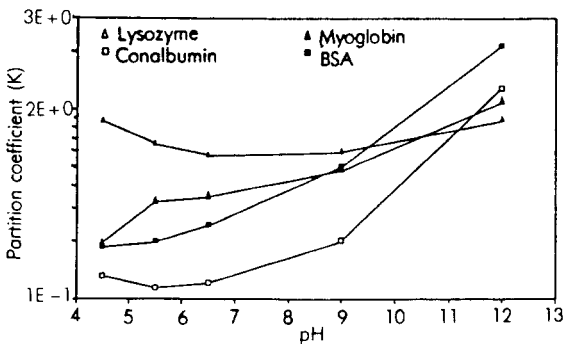


Fig. 4. Changes in the partition coefficient of proteins by pH

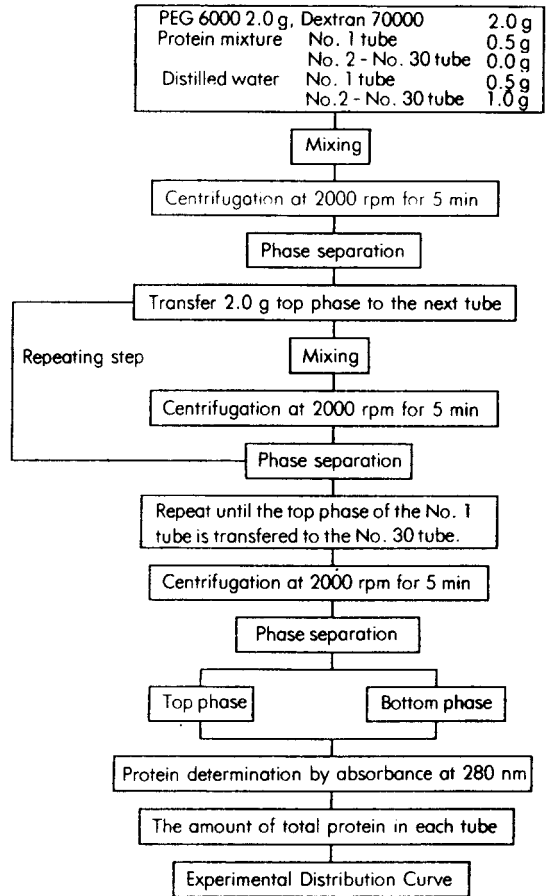


Fig. 3. Procedure of counter current distribution

결과 및 고찰

pH에 따른 단백질의 분획계수(K)의 변화

Fig. 4는 4가지 모델단백질에 대해 각각의 pH에서 구한 분획계수값을 그래프로 나타낸 것이다. 역류분배 방법을 이용한 단백질의 분리 정제시 분획의 추진력이 되는 단백질간의 분획계수 차이가 pH에 따라 다르게 나타나고 있음을 알 수 있다.

pH 4.5를 보면 myoglobin, conalbumin, BSA의 분획계수가 비슷하여 별차이가 없으므로 역류분배를 이용한 다중분배 추출시 3가지 단백질의 분리가 잘 일어나지 않지만 pH 5.5, 6.5, 12.0과 같이 각 단백질간의 분획계수 차이가 나타나는 pH는 역류분배 방법을 이용한 단백질 분획들의 분리정제가 가능한 지점이 된다. 수용성 액체 2상계 (PEG-DEX system) 단백질 분획의

상층부 또는 하층부로의 이동은 각 상(phase)의 이온 조성에 의해 크게 영향을 받으며^(11,11,12), universal buffer 제조시 들어가는 phosphate 이온의 경우는 PEG 층보다 DEX 층에 더 우세하게 분포한다고 보고 되고 있다⁽¹³⁾. 따라서 하층부(Dextran-rich phase)는 전체적으로 음전하를 띠게 되므로 정전기적 반발력에 의해 단백질 등이 상층부(PEG-rich phase)로 이동하게 된다. 이러한 정전기적인 힘의 차이와 각 단백질의 소수성에 따라 각 단백질은 고유의 분획계수값을 갖는 것이다⁽¹⁴⁾.

pH 에 따른 모델단백질의 역류분배 현상

pH 변화에 따른 모델단백질들의 역류분배 현상 관찰은, 각각의 pH 에서 단일분배 방식에 의해 구한 분획계수값을 가지고, 29회 이동시켰을 때 각 튜브에 존재하는 단백질의 양과 분포를 이론적으로 계산하여 작성한 이론적 분포곡선과, 실제 30개의 튜브에서 다중분배 추출 방식으로 29회 이동시켰을 때 각 튜브에 존재하는 단백질의 양을 측정하여 작성한 실험적 분포곡선을 비교하였다. 또한 전기영동 분석에 의하여 모델단백질들의 분획들을 검증하였다.

Fig.5는 pH 4.5에서 역류분배를 행하였을 때 모델 단백질들의 분리현상을 관찰한 것이다. 그림에서 보면 각각의 단백질이 위치하는 튜브번호를 나타내는 이론적인 분포곡선과 실험적인 분포곡선이 비교적 잘 일치하고 있음을 알 수 있다.

전기영동 사진에서 각 단백질의 분리현상은 튜브번호에 따라 다르게 나타났다. 이론적인 분포곡선으로부터 볼 때 6번 튜브에서는 conalbumin과 myoglobin, BSA 가 섞여 나오게 되지만, 하층부에서는 나타나는 myoglobin 분획이 상층부에서는 나타나지 않고 있어서 같은 튜브에서도 상층부와 하층부의 단백질분포에 상당한 차이가 있음을 알 수 있다. Fig.6의 단백질 분포곡선을 보면, Fig.5의 분포곡선에서 겹쳐있는 myoglobin과 BSA의 분포곡선이 분리되고 있다. 이는 단백질 분획들의 이동이 pH에 따라 다르게 나타나고 있음을 보여주는 것이다. Fig.7에서는 이론적인 분포곡선과 실험적인 분포곡선이 잘 일치하지 않고 있는데 이는 극단의 pH에서 단백질들간의 상호작용에 의한 표면특성의 변화 때문에 개개의 단백질에서 분획계수를 구하여 작성한 이론적 분포곡선과 4개의 모델단백질의 혼합물에서 구한 실험적 분포곡선은 일치하지 않는 것으로 생각된다. 전기영동 사진에서 보면 4번 튜브 하층부에 다량의 conalbumin이 분리되면서 소량의 BSA 등이 섞여 나오고 있으며 21번 튜브의 상층부

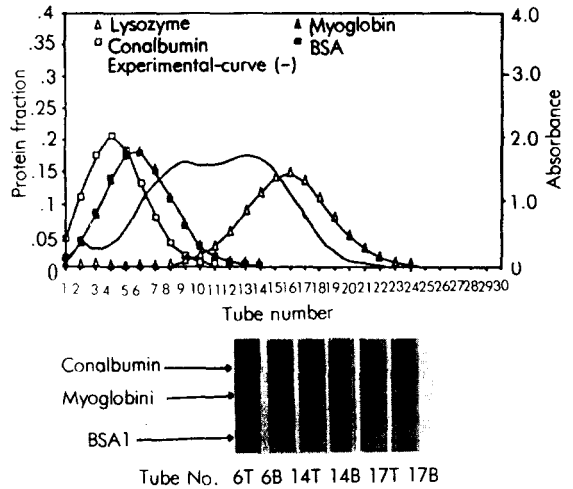


Fig. 5. Comparison of theoretical distribution curve and experimental distribution curve, and PAG electrophotogram of counter current distributed fractions (T: top phase, B: bottom phase, pH 4.5)

에서는 BSA가 분리되고 있음을 알 수 있다.

이상에서 관찰한 바를 종합하면 pH 변화에 의해 나타나는 각 단백질들의 분획계수 차이에 따라 역류분배를 행하였을 때 그 단백질분획이 위치하는 튜브번호는 다르게 나타나서 역류분배를 이용한 단백질의 분리가능성을 보여주고 있으나 각각의 단백질에 대해 단일분배 방식으로 구한 이론적 분포곡선대로 반드시 전기영동 패턴이 나타나지는 않는다. 이것은 여러 단백질이 혼합되어서 역류분배가 행하여질 때 각 단백질 분획간의 상

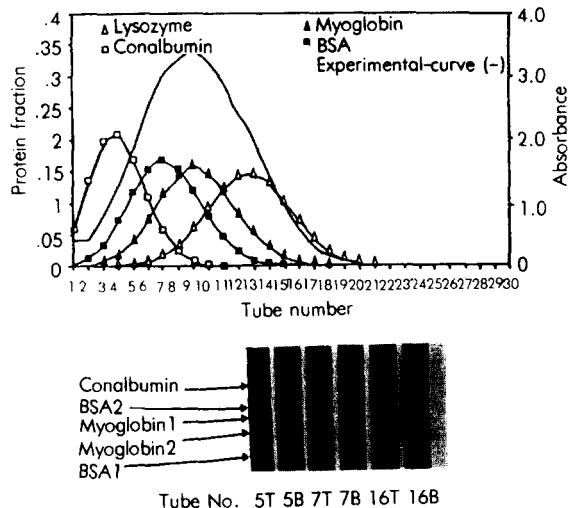


Fig. 6. Comparison of theoretical distribution curve and experimental distribution curve, and PAG electrophotogram of counter current distributed fractions (T: top phase, B: bottom phase, pH 6.5)

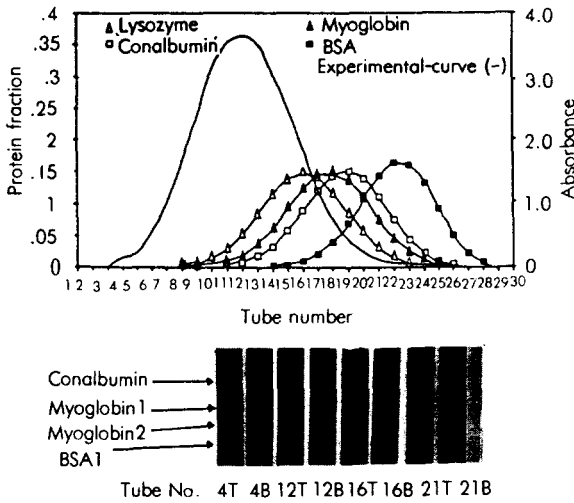


Fig. 7. Comparison of theoretical distribution curve and experimental distribution curve, and PAG electrophotogram of counter current distributed fractions (T: top phase, B: bottom phase, pH 12.0)

호작용이라든가 각 단백질의 등전점이 다르므로 pH에 의한 영향 정도가 서로 다르게 나타나기 때문인 것으로 판단되어 이와 같은 기작에 대한 연구가 좀 더 이루어진다면 역류분배 방법을 이용한 단백질의 분리정제는 매우 높은 가능성을 갖는다고 생각된다.

요 약

역류분배 방법을 이용한 단백질의 분리정제 가능성을 높이기 위하여 4가지 모델단백질에 대하여 수용성 액체 2상계에서의 분획계수를 pH 변화에 따라 조사하였다. 또한 역류분배를 이용한 다중분배추출방식으로 모델 단백질의 혼합물을 5수준의 pH(4.5-12.0)에서 분획하였다. 그 결과 pH에 따라 단백질들의 등전점 차이로 인한 분획계수(K)값이 다르게 나타나서, 다중분배를 행할 때 각 단백질 분획들이 위치하는 튜브번호가 다르게 되므로 역류분배 방법을 통한 단백질의 분리 가능성을 보여주었다.

문 헌

1. Albertsson, P.A.: *Partition of cell particles and macromolecules* (3rd ed), Wiley, New York (1986)
2. Albertsson, P.A.: History of aqueous polymer two-phase partition. In *Partitioning in aqueous two-*

phase systems. Theory, methods, uses, and applications to biotechnology, Academic Press, Inc., p.1 (1985)

3. Albertsson, P.A.: Thin-layer countercurrent distribution. *Anal. Biochem.*, 11, 121 (1962)
4. 이삼빈, 이철호: Poly(ethylene glycol)-Dextran 수용성 2상계에서 단백질들의 소수성에 따른 분획계수, 한국식품과학회지, 19(2), 140(1987).
5. Tavel, P.V. and Singer, R.: *Advances in protein chemistry*, Wiley, New York, Vol. 11, p.237 (1956)
6. King, T.P. and Craig, L.C.: *Methods of biochemical analysis*, Vol. 10, p.201 (1962)
7. Morris, C.J.O.R. and Morris, P.: *Separation method in biochemistry* (2nd ed), Pitman Publishing, p.639 (1976)
8. Treffry, T.E.: Thin-layer countercurrent distribution apparatus. In *Partitioning in aqueous two-phase systems. Theory, methods, uses, and applications to biotechnology*, Academic Press, Inc., p.131 (1979)
9. Perrin, D.D. and Dempsey, B.: *Buffers for pH and metal ion control*, Science Paperbacks, p.155 (1974)
10. Hames, B.D. and Rickwood, D.: *Gel electrophoresis of proteins*, IRL Press, p.1 (1981)
11. Albertsson, P.A.: Partition of proteins in liquid polymer-polymer two-phase systems. *Nature[London]*, 182, p.709 (1958)
12. Albertsson, P.A. and Nyns, E.J.: Partition of proteins in an aqueous phase system of dextran and polyethylene glycol influence of the electrolyte content. *Ark. Kemi.*, 17, p.197 (1961)
13. Walter, H., Krob, E.J. and Brooks, D.E.: Membrane surface properties other than charge involved in cell separation by partition in polymer, aqueous two-phase systems. *Biotechnology*, 15, p.2959 (1976)
14. 이삼빈, 이철호: Poly(ethylene glycol)-dextran 수용액 2상계에서 단백질 분획계수에 미치는 금속염의 효과, 한국식품과학회지, 19(2), 146(1987).

(1989년 10월 30일 접수)