

역류분배에 의한 모델단백질의 분리정제시 염화칼륨의 영향에 관한 연구

이창호·이부용·이철호
고려대학교 식품공학과

Effect of Potassium Chloride on the Separation and Purification of Model Proteins using Counter Current Distribution

Chang-Ho Lee, Boo-Yong Lee and Cheri-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 (CCD) for the protein fractionation and concentration. The protein distribution pattern in CCD with 30 tubes varied with the pH (4.5, 5.5, 6.5, 9.0, 12.0) and KCl concentration (0 mM, 50 mM, 250 mM, 500 mM) of the system. From the mixture of model proteins, pure myoglobin was appeared at the upper-phase of 14th tube having 50 mM of KCl at pH 5.5 and the upper-phase of 13th tube having 250mM of KCl at pH 6.5. Similarly pure BSA was obtained at the 14th tube having KCl 250mM with pH 4.5, pure lysozyme at the 19th tube having 500mM of KCl at pH 4.5 and the upper-phase of 16th tube 50mM of KCl at pH 5.5.

Key words: counter current distribution, protein separation, aqueous two-phase system

서 론

Albertsson 에⁽¹⁻³⁾ 의해 개발된 수용성액체 2상계 (aqueous two-phase system)를 이용한 생리활성 물질의 분리법은 단백질, 효소, 핵산, 세포 및 세포내 여러 가지 물질들의 활성을 유지한 상태로 거의 순수하게 분리할 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 수용성액체 2상계를 이용한 물질분리에서는 2상계를 형성하는 중합체들의 성질과 pH, 첨가되는 염의 종류나 농도, 분리되는 물질의 크기나 표면특성에 따라 분리되는 물질이 고유한 분획계수 (partition coefficient, K)를 갖게 된다^(2,4). 전보⁽⁵⁾에서 저자들은 2상계 분리법을 기존의 단일분배추출 (single-step extraction) 방식이 아니라 다중분배추출 (multi-step extraction) 방식으로 적용시키는 역류분배 (Counter Current Distribution, CCD) 방법을 이용하여 모델단백질의 분리 정제를 시도하였으며, 이 때 2상계의 pH에 따라 단백질 분획들

의 분리현상이 다르게 나타남을 관찰하였다.

본 연구는 수용성액체 2상계 추출을 다중분배추출 방식으로 적용하는 역류분배 방법을 단백질의 분리, 정제에 이용하기 위한 모델시스템 연구로서 전보에서의 pH에 의한 영향 뿐 아니라 1가염인 염화칼륨을 농도별로 첨가하여 2상계의 이온강도 변화에 따른 4가지 모델단백질 (lysozyme, myoglobin, conalbumin, bovine serum albumin)들의 분리현상을 이론적 분포곡선과 실험적 분포곡선으로 비교하고, 전기영동을 실시하여 각 분획들의 순도를 정성적으로 관찰하였다.

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 horse skeletal muscle), conalbumin

Corresponding author: Cheri-Ho Lee, Department of Food Technology, Korea University, Anam-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-701

(from chicken egg white), bovine serum albumin(BSA)의 4가지로서 모두 Sigma Chemicals의 제품을 사용하였다. 나머지 시약들은 모두 생화학 분석용의 일급시약을 사용하였다.

중합체의 Stock 용액 제조

0.1M Universal buffer⁽⁶⁾를 pH 4.5, 5.5, 6.5, 9.0, 12.0으로 5가지를 만든 후, 각 pH에 대해 PEG 6000과 Dextran 70,000으로 15% 농도로 제조하였다.

시료 단백질 용액 제조

염화칼륨(KCl)을 첨가하지 않고 pH 변화에 따른 각 단백질의 분획계수(K)값을 구하기 위하여 4가지 단백질(lysozyme, myoglobin, conalbumin, BSA)을 증류수를 사용하여 1% 농도로 제조하였다.

수용성액체 2상계 제조

PEG 6000 stock 용액 2.0g에 Dextran 70000 stock 용액 2.0g을 넣고, KCl을 넣고 잘 혼합한 후 단백질 용액 0.5g을 넣고, 증류수를 첨가하여 전체가 5.0g이 되도록 하였다. 이 때 KCl은 전체 5.0g에 대하여 첨가하지 않은 것과 50, 250, 500mM의 4가지 농도가 되도록 첨가하여서 각 농도에 대해서 5가지의 pH를 모두 비교하였다.

단백질의 분획계수(K) 측정

단일분배에서 4가지 단백질의 pH 변화 및 KCl 농도에 따른 분획계수 값을 알아보기 위한 과정은 전보⁽⁶⁾와 동일하다.

이론적 분포곡선

전보⁽⁶⁾와 동일한 방법으로 4가지 시료 단백질에 대해서 pH 변화 및 KCl 농도에 따라 단일분배추출에서 구한 분획계수(K)값을 컴퓨터를 이용하여 29회까지 다중분배추출을 하였을 때 각 튜브에 존재하는 단백질의 분포를 이론적으로 계산하였다.

실험적 분포곡선

Fig. 1과 같이 직접 실험적으로 다중분배추출을 행하여 튜브 위치에 따른 실험적인 단백질 분포곡선을 작성하였다. 총 튜브 갯수는 30개이며 이동횟수는 29회이다.

Disc PAGE 분석

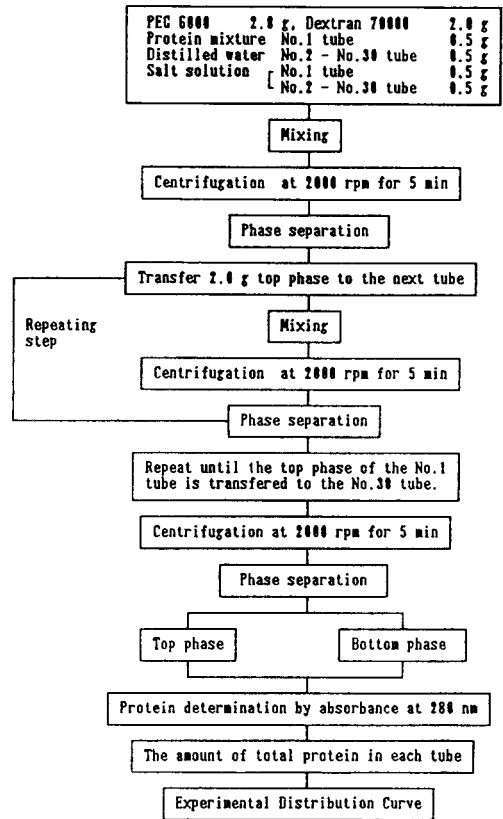


Fig. 1. Procedure of counter current distribution of model proteins

Davis⁽⁷⁾의 방법에 따라 7.5% acrylamide gel을 이용하여 다중분배추출을 행한 30개 튜브의 상층부와 하층부 용액에 대해 전기영동을 실시한 후 각 층의 단백질 분획들을 정성적으로 확인하였다.

결과 및 고찰

pH 및 KCl 농도에 따른 단백질의 분획계수(K) 변화

Table 1은 4가지 모델단백질에 대해 pH 및 KCl의 농도에 따라 구한 분획계수 값을 나타낸 것이다. Table 1에서 보면 KCl을 첨가하지 않은 경우보다 KCl을 첨가했을 때 대체적으로 lysozyme과 myoglobin의 분획계수 값은 크게 증가하지만 conalbumin과 BSA의 K 값은 약간 증가하는데 그쳐서 역류분배방법을 이용한 단백질을 분리정제시 구동력이 되는 단백질간의 분획계수 차이가 KCl을 적당량 첨가함에 따라 크게 증가함을 알 수 있었다. 따라서

pH 변화만으로 분리가 잘 안되는 단백질들을 KCl을 첨가하여 분획계수의 차이가 나도록 하면 단백질 분획들간의 분리가 가능할 것으로 판단되었다. 한편, 같은 pH에서는 KCl의 농도가 증가할 수록 단백질들간의 분획계수 차이가 크게 나타나고 있다. 따라서 pH 변화만으로는 분획계수 차이가 별로 나타나지 않는 경우 KCl과 같은 금속염을 소량 첨가하여 분획계수의 차이를 나타내게 하면 역류분배를 이용한 단백질 분리정제가 더 효율적으로 이루어질 수 있음을 알 수 있었다.

이와 같이 금속염을 첨가하면 2상계 내에서 단백질들의 분획계수가 변화한다는 사실은 여러 실험에서 확인된 바 있다^(8,9). 특히 Johansson⁽¹⁰⁾에 의하면 이런 효과는 금속염과 원충용액의 양이온과 음이온들이 2상계 내에서 불균일하게 분포됨으로 인하여 형성되는 전기적 전위차에 기인한다고 하였다.

KCl 50 mM 농도에서 pH에 따른 모델단백질의 역류분배현상

KCl 50 mM 농도에서 pH 변화에 따른 모델단백질들의 역류분배현상 관찰은, 단일분배 방식에 의해 구한 분획계수 값을 가지고, 29회 옮겼을 때 각 튜브에 존재할 수 있는 단백질의 양과 분포를 이론적으로 계산하여 이론적 분포곡선을 먼저 작성하였다. 또한 실제 30개의 튜브에서 다중분배추출 방식으로 29회 옮겼을 때 각 튜

브에 존재하는 단백질의 양을 측정하여 실험적 분포곡선을 그리고 이것을 이론적 분포곡선과 비교하였다.

Fig. 2는 모델단백질들의 이론적인 분포곡선과 실험적인 분포곡선을 비교한 것으로서, 두 곡선은 잘 일치하고 있음을 볼 수 있으며, 실험적 분포곡선은 전기영동 패턴과도 일치하고 있다. 8번 튜브와 12번 튜브의 경우 분포곡선상에 단백질들이 혼합상태로 나타나 있는데, 전기영동 사진으로도 여러 단백질 band가 나타나며, 19번 튜브와 23번 튜브의 경우 분포곡선상에는 상당량의 lysozyme이 존재하는 것으로 되어 있으나, 전기영동 사진상에는 나타나지 않고 있다.

이는 전기영동시 running buffer의 pH가 8.3이고 lysozyme의 pI가 11.0으로서 lysozyme 분자가 (+)전하를 띠게되어 전기영동상에서 이동되지 못하기 때문이다. 따라서 19번과 23번 튜브에서는 다른 단백질들은 섞이지 않고 lysozyme만이 순수하게 분리된다고 보여진다. Fig. 3은 KCl 농도 50 mM, pH 5.5에서의 역류분배현상이다. 이론적 분포곡선과 실험적인 분포곡선이 잘 일치하고 있으며, 전기영동 패턴에서 볼 때 14번 튜브의 상층부에서는 myoglobin만이 순수하게 분리되고 있음을 보여주고 있다. Myoglobin 분획은 KCl 50 mM, pH 6.5, 14번 튜브 상층부와 pH 9.0의 14번 튜브 상층부에서도 같은 현상을 보여주었다. 16번 튜브의 상층부와 하층부 역시 단백질 band가 나

Table 1. Changes in the partition coefficients of proteins by pH and concentrations of salts

		Lysozyme	Myoglobin	Conalbumin	BSA	
No Salt	pH 4.5	0.864	0.192	0.133	0.189	
	5.5	0.660	0.324	0.116	0.202	
	50 mM	6.5	0.569	0.344	0.121	0.245
		9.0	0.598	0.485	0.205	0.492
		12.0	0.889	1.110	1.287	2.181
KCl 50 mM	pH 4.5	1.659	0.620	0.339	0.348	
	5.5	1.155	0.524	0.244	0.238	
	6.5	1.040	0.447	0.200	0.207	
	9.0	0.980	0.559	0.241	0.333	
	12.0	0.018	0.692	0.377	0.492	
KCl 250 mM	pH 4.5	2.172	1.913	0.613	0.577	
	5.5	1.776	0.597	0.445	0.248	
	6.5	1.896	0.510	0.134	0.096	
	9.0	1.506	0.489	0.211	0.187	
	12.0	1.241	0.589	0.238	0.278	
KCl 500 mM	pH 4.5	2.822	0.188	1.104	0.761	
	5.5	2.279	0.494	0.204	0.296	
	6.5	2.658	0.362	0.127	0.105	
	9.0	1.972	0.463	0.215	0.200	
	12.0	1.717	0.438	0.216	0.223	

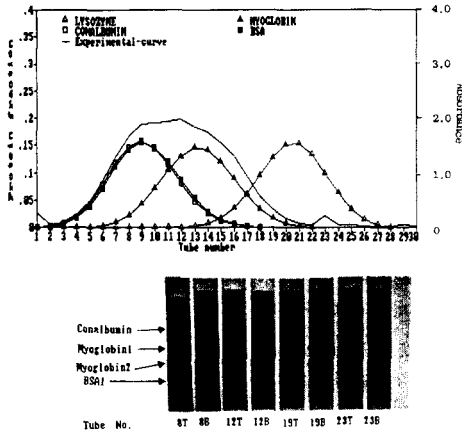


Fig. 2. Comparison of theoretical distribution curve and experimental distribution curve, and PAGE patterns of counter current distributed fractions (T: top phase, B: bottom phase, KCl 50 mM, pH 4.5)

타나지 않은 것으로 보아 lysozyme 이 순수하게 분리되고 있다고 보여진다.

KCl 250 mM 농도에서 pH에 따른 모델단백질들의 역류분배현상

Fig. 4는 KCl 250mM, pH 4.5의 경우로서 전기영동 사진에서 볼 때 4번 튜브의 상층부와 하층부에서 BSA 만이 순수하게 분리되고 있음을 알 수 있다, Fig. 5는 13번 튜브의 상층부에서 myoglobin만이 거의 순수하게 분리되는 것을 나타내주고 있다. pH 9.0의 13번 튜브 상층부와 pH 12.0의 12번 튜브 상층부에서도 역시 myoglobin만이 분리되고 있음을 알 수 있었다. 20번 튜브에서는 band 가 나오지 않는 것으로 보아 lysozyme 만이 분리되는 것을 나타내주고 있다.

KCl 500 mM 농도에서 pH 변화에 따른 모델단백질들의 역류분배현상

Fig. 6에서 보면 이론적 분포곡선과 실험적인 분포곡선은 상당한 차이를 보여주고 있으며 사진상에서도 거의 BSA band만이 나타나고 있다. 이런 현상은 2상계에 첨가하는 KCl 과 pH 가 각각의 모델단백질에 대해 영향을 미치는 정도가 틀려서 나타나는 현상으로, myoglobin은 육안으로 관찰될 정도의 침전물을 형성하였으나 BSA는 사진으로 볼 때 영향을 덜 받고, 수용성 상태를 유지하여 분배가 되고 있음을 알 수 있다. 이와 같은 기작을 좀 더 연구하면 단백질의 선택적 분리조건을 수립하는데 많은 도움이 되리라 생각한다.

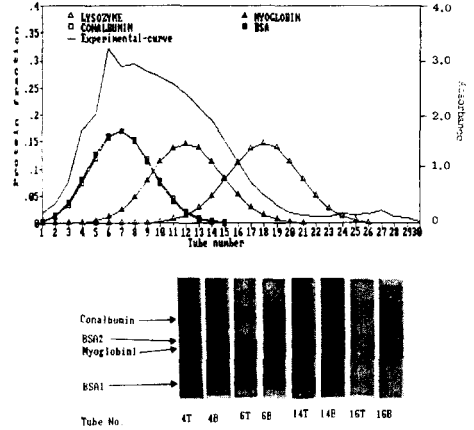


Fig. 3. Comparison of theoretical distribution curve and experimental distribution curve, and PAGE patterns of counter current distributed fractions (T: top phase, B: bottom phase, KCl 50 mM, pH 5.5)

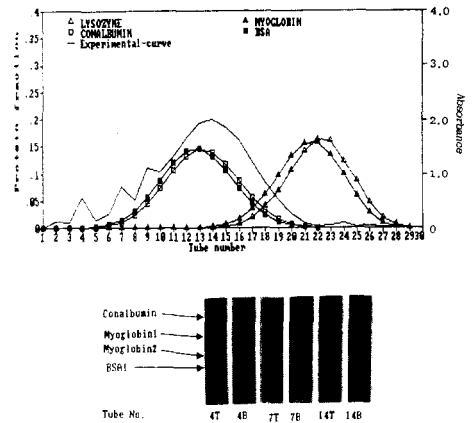


Fig. 4. Comparison of theoretical distribution curve and experimental distribution curve, and PAGE patterns of counter current distributed fractions (T: top phase, B: bottom phase, KCl 250 mM, pH 4.5)

Fig. 7에서는 같은 KCl 농도라 할 지라도 pH가 6.5에서 대부분의 단백질들이 수용성 상태를 유지하여 분배가 되는 것을 볼 수 있으며 13번 튜브의 상층부에서는 myoglobin이 거의 순수하게 분리되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 동일한 KCl 농도일지라도 pH에 따라서 또는 동일 pH 일지라도 KCl 농도에 따라서 모델단백질들의 역류분배현상은 모두 틀리게 됨으로, 이 기작을 좀 더 연구하여 분리하고자 하는 단백질에 따라 최적 분리조건을 수립한다면 역류분배방법을 생리활성 물질의 분리농축에 유용한 공정으로 발전시킬 수 있을 것으로 사료된다.

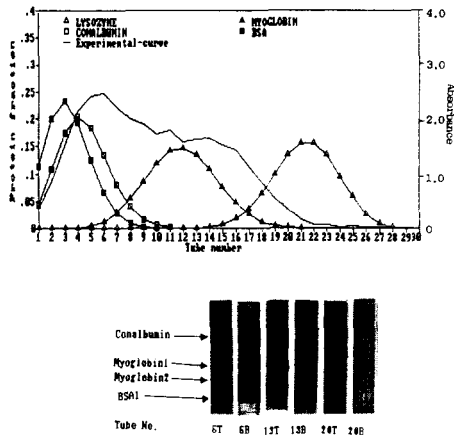


Fig. 5. Comparison of theoretical distribution curve and experimental distribution curve, and PAGE patterns of counter current distributed fractions (T: top phase, B: bottom phase, KCl 250 mM, 6.5)

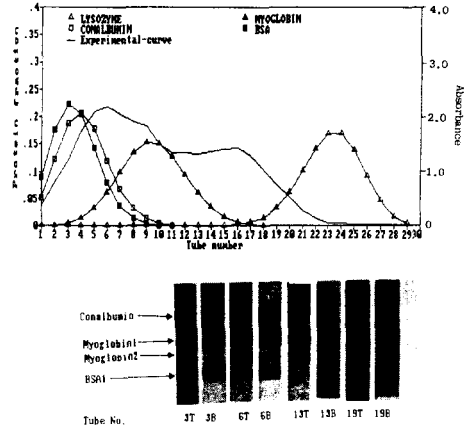


Fig. 7. Comparison of theoretical distribution curve and experimental distribution curve, and PAGE patterns of counter current distributed fractions (T: top phase, B: bottom phase, KCl 500 mM, pH 6.5)

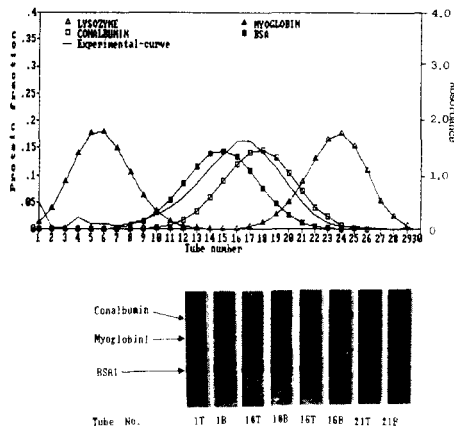


Fig. 6. Comparison of theoretical distribution curve and experimental distribution curve, and PAGE patterns of counter current distributed fractions (T: top phase, B: bottom phase, KCl 500 mM, pH 4.5)

요 약

역류분배방법을 이용한 단백질의 분리정제 효율을 높이기 위하여, 4가지 모델단백질에 대하여 수용성액체 2상계에서의 분획계수를 KCl 농도와 pH 변화에 따라 조사하였다. 또한, 역류분배방법을 이용한 다중분배 추출방식으로 모델단백질의 혼합물을 KCl 농도(0, 50, 250, 500 mM)와 pH(4.5, 5.5, 6.5, 9.0, 12.0)를 달리한 20가지 조건에서 분획하였다. 그 결과 KCl 농도와 pH에 따라 단백질들의 분획계수(K)값이 다르게

나타나서, KCl을 첨가함으로써 역류분배방법을 이용한 단백질 분리효율을 향상시킬 수 있는 가능성을 보여 주었다. 단백질에 따라 분리가 잘 일어나는 KCl 농도와 pH는 다르게 나타나서 myoglobin의 경우 KCl 50 mM, pH 5.5조건의 14번 튜브 상층부와 KCl 250 mM, pH 6.5조건의 13번 튜브의 상층부에서 잘 분리가 되었으며, BSA의 경우는 KCl 250 mM, pH 4.5 조건의 14번 튜브에서 분리되었고, lysozyme의 경우는 KCl 50 mM, pH 4.5조건의 19번 튜브와 KCl 50 mM, pH 5.5의 16번 튜브 상층부에서 분리가 되었다.

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. 이부용, 이창호, 이철호: Counter current distribution을 이용한 모델단백질의 분리정제시 pH의 영향에

- 관한 연구, 한국식품과학회지, 22(1), 56(1990)
6. Perrin, D.D. and Dempsey, B.: *Buffers for pH and metal ion control*, Science Paperbacks, p.155(1974)
 7. Hames, B.D. and Rickwood, D.: *Gel electrophoresis of proteins*, IRL Press, p.1(1981)
 8. Zaslavsky, B.D., Miheeva, L.M. and Rogozhin, S.V.: Possibility of analytical application of the partition in aqueous biphasic polymeric systems technique, *Biochimica et Biophysica Acta*, 510, 160(1978)
 9. 이삼빈, 이철호: Poly(ethylene glycol)-dextran 수용액 2상계에서 단백질 분획계수에 미치는 금속염의 효과, 한국식품과학회지, 19(2), 146(1987)
 10. Johansson, G.: Partition of salts and their effects on partition of proteins in a dextran-poly(ethylene glycol)-water two-phase system, *Biochimica et Biophysica Acta*, 221, 387(1970)
-
- (1990년 1월 12일 접수)