

고성능 막 크로마토그래피에 의한 유청 단백질의 분리특성

홍 승 범 · 노 경 호

초정밀분리기술센터, 인하대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 2001. 10. 5., 게재승인 : 2001. 12. 6.)

Separation Characteristics of Whey Protein by High Performance Membrane Chromatography

Seung Bum Hong and Kyung Ho Row[†]

Center for Advanced Bioseparation Technology, Dept. of Chem. Eng., Inha University, Inchon 402-751, Korea
(Received : 2001. 10. 5., Accepted : 2001. 12. 6.)

α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey proteins were separated by high performance membrane chromatography (HPMC). The separation mechanism involved anion-exchange, and the stationary phase was anion CIM (Convective Interaction Media) DEAE, QA disk and cation exchanger $SO_3(16 \times 3 \text{ mm})$. Two types of mobile phase were used, buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.3) and buffer B (buffer A + 1 M NaCl). As the amount of NaCl dissolved in buffer linearly increased, which enabled a gradient elution mode. The optimum mobile phase and operating condition (Buffer A/Buffer B = 100/0 - 30/70 vol%, gradient time 1 min, 30/70 - 10/90 vol%, gradient time 2 min) were experimentally determined. In this experimental condition, α -lactalbumin, β -lactoglobulin were separated within 5 min at a mobile phase flow rate of 4 mL/min.

Key Words : HPMC, monolith, anion-exchange, whey protein α -lactalbumin, β -lactoglobulin, buffer concentrationL

서 론

유청 단백질은 acid stability, gelation, film formation, aeration, 그리고 emulsification과 같은 기능적 특성과 우수한 영양적 가치에 의해 식품 재료로서 사용하기 위해 이들 자체 성질의 연구와 이용을 위한 여러 기술을 연구 및 응용하게 되었다. 치즈나 casein 제조 과정에서 나오는 부산물인 유청은 그 처리가 문제가 되었다. 예전에는 대부분 그냥 버려졌던 유청은 유청 안에 포함된 단백질과 락토오스의 영양소 가치 인식에 의하여 더 이상 버려지지 말아야 한다는 인식의 증대되었다. 유청을 구성하는 주요 단백질은 α -lactalbumin, β -lactoglobulin, bovine serum albumin(BSA), immunoglobulin(IgG)이다. 또한 소량의 lactoferrin, lactollin, glycoprotein, 그리고 blood transferrin 등의 단백질이 존재한다(1). 유청 구성 단백질들의 각각의 성질과 함량 등은 Table 1과 같다. 유청 단백질은 주로 거대 구형 단백질들이다. β -lactoglobulin은 유청 단백질의 반을 차지하고 이의 단위체의 분자량은 18,300 달톤이나 되는 거대 분자로 pH 3.5-7.5 사이에서는 dimer로 존재한다. α -lactalbumin

은 14,000 달톤으로 주로 유아의 소화촉진제로 사용되고 있다. Immunoglobulin은 여러 가지 다른 크기의 glycoproteins들로 구성되어 있고 일반적으로 antibody activity를 갖는다(2). 유청 단백질은 60°C 이상의 열에 민감하다. 또한 변성의 정도는 단백질의 구성, 전체 단백질과 solid의 농도, pH, 이온의 세기, 그리고 온도와 노출시간에 달려 있다. 유청 단백질은 큰 분자량을 가지고 있는 물질로 구성되어 있기 때문에 분석을 하기 전에 다양한 전처리 과정을 거쳐서 분석을 하게 된다. 그 중 한외여과(ultrafiltration)는 가장 일반적인 전처리 과정으로 널리 사용하고 있다. 한외여과는 온화한 조건의 온도와 pH 하에서 유청 단백질을 락토오스나 열, 그리고 분자량의 차이로 다양한 비율로 분리할 수 있다. 일반적으로 한외여과에 의한 농축된 유청 잔류물에는 18-22% 단백질 함량을 보인다(3).

고성능 막 크로마토그래피(High-Performance Membrane Chromatography, HPMC)는 최근 들어 많은 연구가 진행되고 있는 크로마토그래피의 기술 중에 하나로 생 고분자물질의 분리 및 정제에서 탁월한 효과가 있다(4,5). 막은 세공크기와 흡착에 의한 물질의 분리가 이루어지는 반면 기존의 High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)에서는 컬럼에 충전된 흡착제와 이동상간의 확산, 입자사이의 흡착과 탈착의 메커니즘으로 분리가 되는데 상용되는 흡착제의 대부분은 다공성 입자이다. 현재 가장 효율적인 HPMC 분리 기술에서

[†]Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Inha University, Inchon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7470, Fax : +82-32-872-0959
E-mail : rowkho@inha.ac.kr

Table 1. Molecular masses and isoelectric points for whey proteins.

Protein	Proportion of skim milk protein(%)	Concentration in whey(g/L)	Proportion of total whey protein(%)	Isoelectric point (pI)	Molecular mass
β -lactoglobulin	7~12	3.0	50	5.35~5.49	18,300
α -lactalbumin	2~5	0.7	12	4.2~4.5	14,000
Immunoglobulins (IgG)	1.9~3.3	0.6	10	5.5~8.3	150,000~1,000,000
Bovine serum albumin	0.7~1.3	0.3	5	5.13	69,000
Protease-peptone fraction	2~6	1.4	23		4,100~40,800
Total whey proteins	15~22	6.0	100		

사용하고 있는 막의 형태는 미세공 조직을 가진 평막과 중공 사막, membrane stacks, radial flow cartridge 등의 고정상을 사용하여 분리한다(6). 생물학적인 수주 환경에서 변하기 쉬운 생 고분자 물질을 분리하기 위해서는 그들의 독특한 성격 때문에 상당한 주의가 필요하다. 시간이 많이 소비되는 공정은 많은 유전자 생산물의 분해를 야기한다. 단백질과 nucleic acids의 변이체는 공정 중에 탈아민화, 산화, 단백질 가수분해, nicking과 응집 현상이 일어난다. 이러한 변이체들은 공정 시간이 길수록 더 증가하게 된다(7). 따라서 순도가 높고 더 많은 양의 생물학적 분자를 분리해 내기 위해서는 공정 시간을 단축할 필요가 있다. 이러한 측면에서 볼 때 HPMC의 빠른 분리 시간은 커다란 이점을 가지고 있다. HPMC의 분리 메카니즘은 친화성 상호작용, 이온교환 작용, 소수성 상호작용과 역상이다(8). 적당한 buffer의 선택은 이온교환 분리방법의 성공에 있어서 상당히 중요한 부분을 차지하고 있다. HPMC의 장점은 큰 규모에서의 생물학적 분자들을 몇 분 안에 분리할 수 있고 유속의 영향이 작아 높은 분리도를 나타내며 매우 높은 유속에서도 낮은 압력을 갖는다. 또한, 장치를 scale-up하기가 쉬우며, 분석용 CIM disk와 같은 물질로 구성된 튜브로 정제와 모니터링 프로세스가 비슷한 조건하에서 가동이 가능하다. HPMC에서는 흡착제의 작용과는 구별되는 얇은 막을 통해서 쉽게 물질전달이 되므로 분리시간을 단축할 수 있고 낮은 압력으로 분리가 가능하다. HPMC의 주요응용 분야로는 단백질 정제와 의학분야 이다(9). 최근 HPMC의 응용 범위는 plasmid DNA, peptides, oligonucleotides와 polynucleotides, 분자들의 분리에 응용되고 있다. 현재 사용되고 있는 막의 분리기능은 대부분 물리적 기능이다. 따라서 그 분리 정도가 낮다. 일반적인 화학 분리 공정에서 물리적인 분리 방법은 분리 인자 (separation factor)가 2-4 정도인데 반해 화학적 분리법은 10-30 정도이며 생물학적인 분리 방법은 100-수천에 이른다(10). 따라서 분리도를 높이기 위해서는 막에 화학이나 생물학적인 분리가능 방법을 도입하는 것이 필요하게 되었다. 그래서 현재 응용되고 있는 것이 막 크로마토그래피 이다. 또한 기존의 컬럼 크로마토그래피와의 호환성이 좋아서 효율적으로 단백질 분석에 응용될 수 있다(11). Monolithic Convective Interaction Media(CIM) DEAE (diethylaminoethyl) disk, QA(quaternary amine) 그리고 SO₃ (sulfonyl)을 사용하였다. 단백질은 이온교환 작용에 의해서 분리가 되며, DEAE와 QA는 음이온교환 disk로 사용되었다. CIM disk의 음이온 교환 작용기와 단백질 분자들이 이동상 조성에서 해리가 되면서 단백질 분자들은 음이온의 성질을

가지게 되고, disk의 활성화된 작용기 (DEAE, QA)는 양이온의 극성을 가지게 되면서 분리가 일어나게 된다(12). 이때 단백질 분자의 등전점(isoelectric point)과 buffer인 염의 농도가 중요한 분리 메카니즘의 인자로 작용하게 된다. 그래서 구배 용매 조성(gradient elution)으로 최적의 분리 조건을 찾는 것이다(13).

본 연구에서는 유청 단백질 중에서 α -lactalbumin, β -lactoglobulin 을 고성능 막 크로마토그래피를 이용하여 분리하는 것이다. 유청 단백질을 HPMC로 분리하기 위한 메카니즘은 이온교환 작용이며 정지상은 CIM disk를 사용하였다. 실험을 통해서 이동상 조성과 조업방법에 따른 각기 유청 단백질의 분리도를 고찰하여 최적 이동상을 구하고자 한다. 따라서 유청 단백질 중에 α -lactalbumin, β -lactoglobulin을 HPMC를 적용하여 분리하고, 유청 단백질의 기능적 성질, 분리 방법에 대해 알아보려 한다.

재료 및 방법

실험재료

유청과 표준시료인 α -lactalbumin와 β -lactoglobulin은 Sigma에서 구입하였고, 이동상으로 사용된 용매로 Tris(base)는 J. T. Baker(USA), NaCl은 동양화학, 그리고 Sodium Acetate는 덕산화학에서 구입하였다. 증류수는 감압 펌프(Division of Millipore, Waters)와 필터(HA-0.5 μ m, Division of Millipore, Waters)를 이용하여 여과한 후에 사용하였다.

실험기기

1) Convective Interaction Media (CIM)

고정상으로는 BIA Separations(Slovenia)사에서 구입한 직경이 16 mm, 두께가 3 mm인 Monolithic Convective Interaction Media 약 음이온 disk DEAE(diethylaminoethyl)와 강 음이온 disk QA(quaternary amine), 양 이온 disk SO₃(sulfonyl)을 사용하였고 재질은 poly(glycidylmethacrylate-co-ethyleneglycoldimethacrylate)이다.

2) 한외여과(Ultrafiltration)

한외여과 장치는 Amicon 8400(USA) model을 사용하였고, 필터는 분자량 10,000과 30,000을 사용하였다. HPLC는 Waters사의 600 E 펌프(multisolute delivery system), 490 UV-visible tunable wavelength absorbance (280 nm로 고정), Rheodyne 주입기(50 μ L sample loop), 네이더 저장 시스템은 Chromate(ver. 3.0, Interface Eng.)를 사용하였다.

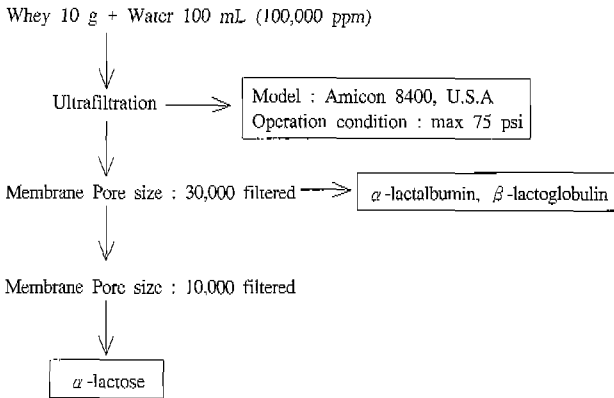


Figure 1. Flow diagram of Pretreatment whey power by Ultrafiltration.

실험방법

본 실험에서는 CIM은 약 음이온 교환막인 DEAE와 강 음이온 교환막 QA disk 그리고 양이온 교환막 SO₃를 고정상으로 사용하였고, 이동상은 buffer A(Tris-HCl, pH 7.4 or Sodium Acetate, pH 5.1)와 buffer B(buffer A + 1M NaCl)를 사용하였고 이동상의 유량은 4 mL/min으로 실험하였다. Disk는 아크릴로 된 housing에 장착하여 HPLC에 연결하여 사용하였다. HPMC로 유청 단백질을 분리하기 위해서는 유청 단백질의 특성상 전처리 과정이 필요하다. 유청 파우더 10 g을 DI Water 100 mL에 녹인 용액을 Amicon 8400(USA) model의 한외여과 장치(Operation condition-max. 75 psi)을 사용하였다. 한외여과로 분자량의 크기에 따라, 분자량 10,000에서 α-lactose를 여과한 후, 분자량 30,000 제거용 막을 사용하여 lactose가 제거된 α-lactalbumin과 β-lactoglobulin을 여과하여 20 μL씩 주입하였다.

결과 및 고찰

유청 단백질 중 α-lactalbumin, β-lactoglobulin을 분리하기 위해서 CIM monolith 컬럼인 약 음이온 교환막(DEAE), 강 음이온 교환막(QA), 양이온 교환막(SO₃)을 사용하여 분리하였다. CIM monolith 컬럼을 이용한 단백질의 분리에서 사용된 이동상으로 buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.3 or Sodium Acetate, pH 5.1)와 buffer B (buffer A + 1 M NaCl) 사용 하였다. 유청 단백질을 분리하기 위한 시료를 컬럼에 주입하기 위해서 한외여과 장치를 사용하여 전처리 하였으며 (Figure 1), 주입량은 20 μL 주입하였다. CIM 컬럼에서 유속은 4 mL/min, UV 파장은 280 nm로 실험하였다.

Figure 2 에서는 고정상으로 강 음이온 교환막(QA)을 사용하였고, 이동상으로 buffer A/buffer B = 100/0 (vol.%) gradient time 1min 후에는 67/33 (vol.%)로 분리하였다. 가장 먼저 용출되는 피크는 용매 피크라는 것을 실험적으로 확인하였고, α-lactalbumin과 β-lactoglobulin가 분리되지 않았다. α-lactalbumin은 앞의 용매 피크 뒤에서 용출되었고, β-lactoglobulin은 체류시간 1.3 min에서 아주 적게 용출되었다. 유청 단백질을 HPMC로 분리하기 위한 메카니즘은 단백질 분자는 음이온의 전하를 가지고 양이온 막에 흡착되고 높은 염의 농도에서 탈착이 되면서 분리가 일어난다.

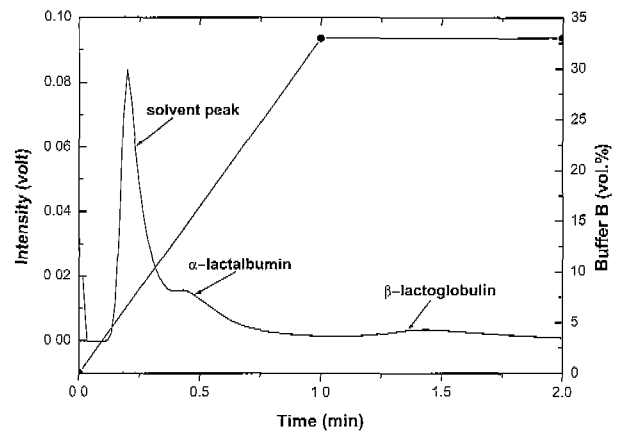


Figure 2. Separation of α-lactalbumin and β-lactoglobulin by HPMC. (Buffer A/Buffer B = 100/0 - 67/33 (vol.%), gradient time 1 min, injection volume = 20 μL, column CIM disk : QA, flow rate 4 mL/min, UV wavelength at 280 nm).

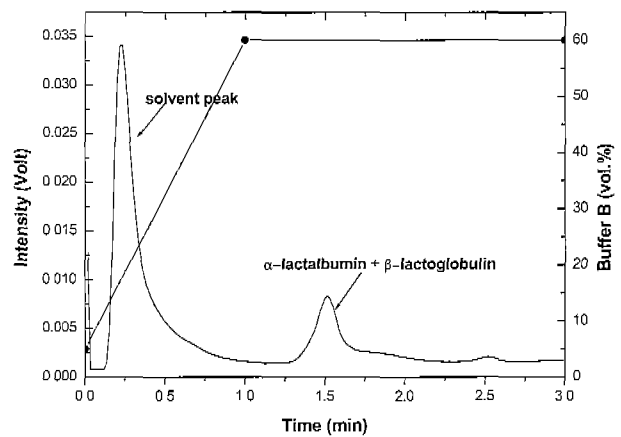


Figure 3. Separation of α-lactalbumin and β-lactoglobulin by HPMC. (Buffer A/Buffer B = 95/5 - 40/60 (vol.%), gradient time 1 min, injection volume = 20 μL, column CIM disk : DEAE+QA).

Figure 3에서는 Figure 2의 분리도가 좋지 않아서 고정상으로 약 음이온 교환막(DEAE)과 강 음이온 교환막(QA)을 동시에 사용하였다. Disk 막의 두께에 따른 분리도 영향을 보기 위해서 실험을 하였다. 이동상 조성은 buffer A/buffer B = 95/5 (vol.%) gradient time 1 min 후에 40/60 (vol.%) 하였고, buffer B의 양이 증가할수록 체류시간이 빨라졌다. 이온 교환 작용에 의한 Na⁺와 Cl⁻이온들이 이동상에서 해리되고, Cl⁻성분이 DEAE, QA 막에 빠르게 흡착하면서 단백질 분자의 용출이 신속하게 용출되기 때문이다. 그러나 α-lactalbumin과 β-lactoglobulin 함께 용출되었다. 이것은 두 물질의 분자량 크기와 물리적 성질이 비슷하기 때문이다.

Figure 4은 고정상으로 3개의 monolith disk (DEAE+QA+SO₃)를 사용하여 분리하였다. 순서대로 약 음이온 위에 강 음이온 교환막을 넣고 맨 위에 양이온 교환막을 넣어 고정상으로 사용하였다. 음이온 교환막으로는 α-lactalbumin과 β-lactoglobulin가 분리가 되고, 나머지 성분인 BSA와 IgG가 양이온 교환막으로 분리가 되기 때문에 3개의 disk를 사용하였으나 BSA, IgG는 양이 너무 적어서 검출이 되지 않았다. Figure 3에서 2개의 disk (DEAE+QA)를 사용하여 분리한 것

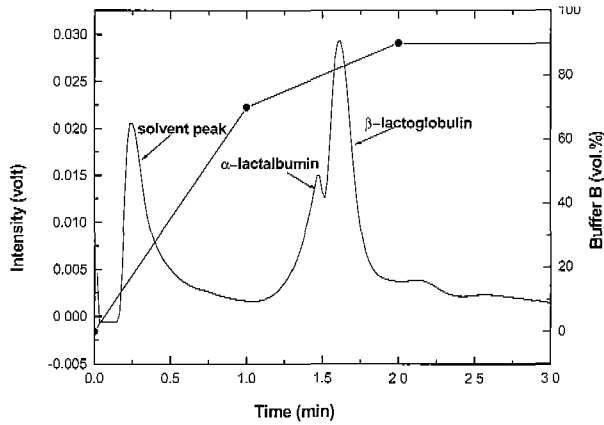


Figure 4. Separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin by HPMC. (Buffer A/Buffer B = 100/0 - 30/70 (vol.%), gradient time 1 min, 30/70 (vol.%), 10/90 (vol.%) gradient time 2min column CIM disk : DEAE+QA+SO₃).

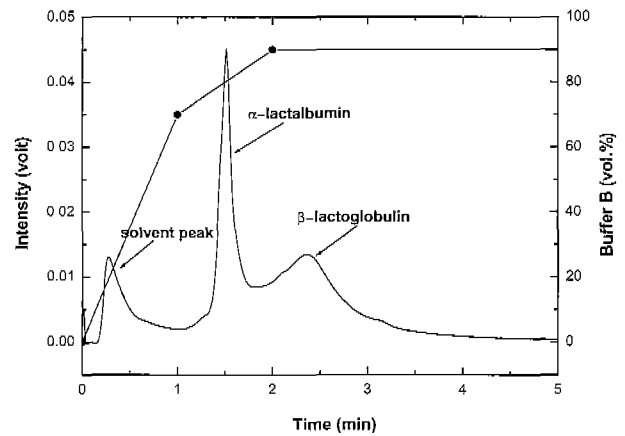


Figure 6. Separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin by HPMC. (Buffer A/Buffer B = 100/0 - 30/70 (vol.%), gradient time 1 min, 30/70 - 10/90 gradient time 2 min CIM disk : DEAE+QA).

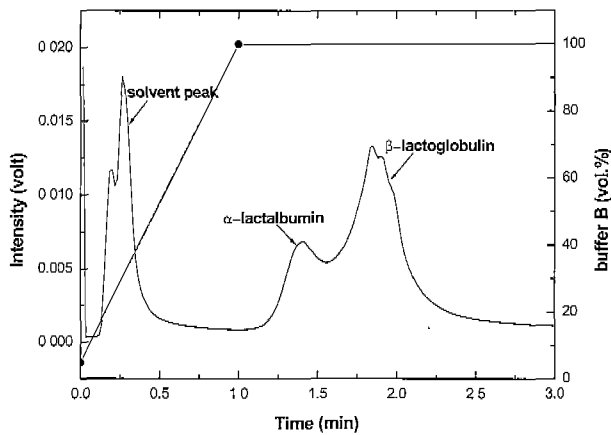


Figure 5. Separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin by HPMC. Buffer A of 0.01 M Sodium acetate (pH 5.14), Buffer B of 0.5 M NaCl in buffer A. (Buffer A/Buffer B = 95/5 - 0/100 (vol.%), gradient time 1 min, column CIM disk : DEAE+QA).

과 비교해 볼 때 α -lactalbumin와 β -lactoglobulin이 분리되려 하는 것을 볼 수 있다. 이동상으로 buffer A/buffer B : 100/0 (vol.%) gradient time 1 min 후에 30/70 (vol.%), 1 min 후에 10/90 (vol.%)으로, buffer B의 양을 두 번에 걸쳐 선형적으로 증가 시켰다. 하지만 α -lactalbumin은 처음과 마찬가지로 계속 분리되지 않은 채 함께 용출되었다.

Figure 5에서는 이동상으로 사용되는 buffer A로 0.01 M sodium acetate을 사용하였다. buffer A/buffer B = 95/5 (vol.%) gradient time 1min 후에 0/100 (vol.%)으로 하였고, 고정상으로 DEAE와 QA을 사용하였다. Buffer B의 양을 100%까지 올려 실험한 결과 Figure 3 보다 β -lactoglobulin의 분리도는 약간 떨어졌지만, 분리가 되었다. Figure 6에서는 이동상으로 buffer A/buffer B = 100/0 (vol.%) gradient time 1min 후에 30/70 (vol.%), 10/90 (vol.%) 이었다. 이 조건에서 α -lactalbumin와 β -lactoglobulin가 분리가 되었다. 유청 단백질은 분자량이 매우 크기 때문에 기존의 실리카 또는 무기질 충전제를 사용하는 HPLC 컬럼으로 분리하는 것은 한계가 있다. 그러므로 충전제 대신 다공성 막에 이온교환 리간드를

가진 분리막을 사용하여 분리하는 것이 효과적이다. CIM disk의 음이온 교환 작용기와 단백질 분자들이 이동상조성에서 해리가 되면서 단백질 분자들은 음이온의 성질을 가지게 되고, disk의 활성화된 작용기 (DEAE, QA)는 양이온의 극성을 가지게 되면서 분리가 일어나게 된다. 이때 단백질 분자의 등전점(isoelectric point)와 buffer인 염의 농도가 중요한 분리 메카니즘의 인자로 작용하게 된다. 그래서 구배용매 조성(gradient elution)으로 최적의 분리 조건을 찾는 것이다. 단백질 분리에서는 조압변수인 온도, pH, 구배용매 조성의 변화에 따라 이온 교환막을 선택하여 분리특성에 대해서 알아보았다. 특히 단백질을 제조용 단계까지 scale-up 하기 위해서는 monolith 컬럼의 개발과 함께 단백질과 막간의 흡착 용량, 선택성, 흡착-탈착 속도를 높이기 위한 다공성 막의 구조와 다양한 리간드의 형태가 개발되어야 한다.

요 약

유청 단백질 중에서 α -lactalbumin, β -lactoglobulin를 고정능 막 크로마토그래피를 이용하여 분리하는 것이다. 분리 메카니즘은 음이온 교환작용이며 고정상은 CIM DEAE, QA, SO₃ disk (16×3 mm)을 사용하였다. 이동상은 buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.3)와 buffer B (buffer A + 1 M NaCl)를 사용하였으며 α -lactalbumin, β -lactoglobulin를 분리하기 위해서 구배용매 조성법을 사용하였다. 각 이동상의 조성에 따른 최적의 이동상 조성(Buffer A/Buffer B=100/0 - 30/70 vol%, gradient time 1 min, 30/70 - 10/90 vol%, gradient time 2 min)을 실험적으로 얻었고 4 ml/min의 이동상 유속에서 3분내에 α -lactalbumin, β -lactoglobulin를 분리 할 수 있었다. 유청 단백질 중에 α -lactalbumin, β -lactoglobulin을 HPMC을 적용하여 분리하였고, 유청 단백질의 기능적 성질, 분리 방법에 대해 알아보았다.

감 사

본 연구는 학술진흥재단 선도연구자지원 (2001-041-E00305) 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. S. J. Gererding and C. H. Byers (1998), Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey, *J. chromatogr. A*, **808**, 141-151.
2. Arabelle Muller, Georges Daufin, Bernaed Chaufer (1999), Ultrafiltration modes of operation for the separation of α -lactalbumin from acid casein whey, *J. of Membrane Science*, **153**, 9-21.
3. Heiner Splitt, Ina Mackenstedt, Ruth Freitag (1996), Preparative membrane adsorber chromatography for the isolation of cow milk components, *J. chromatogr. A*, **729**, 87 -97.
4. Dongmei Zhou, Hanfa Zou, Jianyi Ni, Hailin Wang, Li Tang, and Yukui Zhang (1999), Membrane Affinity Chromatography for Analysis and Purification of Biopolymers, *Chromatographia*, **50**, 27-34.
5. J. Thommes and M-R. Kula (1995), Membrane Chromatography- An Integrative Concept in the Downstream Processing of Proteins, *Biotech. Prog.*, **11**, 357-367.
6. Catherine Charcosset (1998), Purification of Proteins by Membrane chromatography, *J. Chem. Tech. Biotech.*, **71**, 95-110.
7. X. Zhang, R. D. Whitley, and N.-H. L. Wang (1991), presented at the *AIChE Annual Meeting, Los Angeles, CA, November*, 17-22.
8. Xianfang Zeng and Eli Ruckenstein (1999), Membrane chromatography: Preparation and Applications to Protein separation, *Biotech. Prog.*, **15**, 1003-1019.
9. Djuro Josic, Andrea Buchacher, and Alois Junhbauer (2001), Monoliths as stationary phases for separation of proteins and polynucleotides and enzymatic conversion, *J. chromatogr. B*, **752**, 191-205.
10. Xianfang Zeng and Eli Ruckenstein (1999), Membrane chromatography: Preparation and Applications to Protein separation, *Biotech. Prog.*, **15**, 1003-1019.
11. P. Sridhar (1996), Design of Affinity Membrane Bioseparations, *Chem. Eng. Technol.*, **19**, 398-404.
12. Lian Shan and David J. Anderson (2001), Effect of buffer concentration on gradient chromatofocusing performance separating proteins on a high-performance DEAE column, *J. Chromatogr. A*, **909**, 191-205.
13. Xianfang Zeng and Eli Ruckenstein (1998), Cross-linked macroporous chitosan anion- exchange membrane for protein separations, *J. of Membrane Science*, **148**, 195-205.