



Supported Liquid Membrane을 이용한 Short Peptide의 추출

이재흥·박기문*

성균관대학교 식품생명공학과

Extraction of Short Peptide Using Supported Liquid Membranes

Jae-Heung Lee and Ki-Moon Park*

Department of Food Science and Biotechnology, Sungkyunkwan University

Abstract

The objective of this work was to study separation of short peptide (glycine-tyrosine) by using supported liquid membranes (SLMs) containing Aliquat as a cationic carrier. In the present investigation, the influence of pH of doner phase, concentrations of carrier and salt concentrations of acceptor phase on separation flux rate were investigated. Below pH 7.0 the flux rate was not affected by NaCl concentration or carrier concentration. However, the rate was increased significantly above pH 7.0. The rate with Hossain's SLM(H-SLM) containing 20% Aliquat was about 3-fold higher with pH 9.0 at 0.25 M NaCl and 10-fold higher with pH 8.0 at 1.0 M NaCl than that with Duggan's SLM(D-SLM) containing 8% Aliquat, respectively. Furthermore, the rate with H-SLM was 10-fold higher at 1.0 M NaCl than the rate with 0.25 M NaCl. In conclusion, it would appear that the rate of separation was facilitated by using high salt concentrations together with high carrier concentrations above pH 7.0.

Key words : short peptide, supported liquid membrane, Aliquat.

서론

Peptides는 호르몬 및 세포의 신호 전달자, DNA 합성 조절작용 등 매우 중요한 생화학적 기작에 관여하고 있기 때문에 인체의 질병을 치료하거나 생체 기관을 활성화시키는 물질 등으로 사용되고 있다. 따라서 의약 및 기능성 식품의 소재로 사용하기 위한 peptides의 수요가 증가하면서 우유단백 가수 분해물과 같이 복합물질이 함유된 식품으로부터 필요한 peptides를 분리하는 방법들이 연구되고 있다(Drapala and Wiczorekl., 2002). 일반적으로 peptides를 분리하기 위하여 ion exchange 및 chromatography, ultrafiltration, evaporation, reverse osmosis, electro dialysis 방법들이 사용되고 있으나, 이러한 방법들은 수지를 재생하기 위해 많은 폐수가 발생되거나 농축과정에

서 많은 에너지가 요구되는 단점을 가지고 있다.

Supported liquid membrane(SLM)을 이용한 amino acids나 peptides의 선택적인 추출은 저비용, 단일 공정, carrier 변경에 따른 선택성 및 유연성을 가지고 있어 활용 가능성이 높은 것으로 알려져 왔다. SLM 분리법은 유기물질의 농축이나 선택적 추출을 위한 새로운 방법 중의 하나로 30년 전부터 연구되어 왔으며 최근, 유기용매 추출법과 결합시켜 에너지 절감형이면서 저가격으로 single step 추출이 가능하여 그 중요성이 증가되고 있다. 또한, 막의 제조가 간단하고, 유기용매의 사용이 극소량이며, support의 종류와 phase의 구성, pH 등의 처리조건을 조정함으로써 높은 선택성을 가질 수 있어 amines(Lindegard *et al.*, 1992), amino acids(Dzygiel *et al.*, 1998), aromatic aminophosphonates(Rak *et al.*, 2001), organic acids(Shen *et al.*, 1994)의 선택적인 추출을 위한 유용한 방법으로 활용되어 왔다. Liquid membrane은 membrane module에 polymer support(carrier)를 정착시켜 제조하며 donor와 acceptor phase 사이에 위치한다. 막을 통한 물질의 이동은 통과하는 물질의 농도 차에 의해 발생되고 막에 스며들면서

* Corresponding author : Ki-Moon Park, Department of Food Science and Biotechnology, Sungkyunkwan University, 300 Chunchun-dong, Jangan-gu, Suwon, Gyeonggi-do, 440-746, Korea. Tel: +82-331-290-7806, Fax: +82-331-290-7816, E-mail: pkm1001@skku.edu

용해, 확산되며 농도 구배가 유지되는 동안 추출은 계속된다 (Drapala and Wieczorek, 2002). Peptides나 amino acids의 경우, support로 음이온 carrier인 di(ethylhexyl)-phosphoric acid 이나 양이온 carrier인 Aliquat 336(quaternary ammonium salt) 를 사용하여 pH의 조절과 donor 및 acceptor phase의 성분을 조절함으로써 높은 추출효율을 얻은 것이 보고되어 있다 (Wieczorek *et al.*, 1997; Dzygiel *et al.*, 1998; Drapala and Wieczorek, 2002). 따라서 SLM을 통한 short peptide 이동에 donor phase의 pH와 acceptor phase의 NaCl 농도, carrier의 농도가 미치는 영향을 실험하였다.

재료 및 방법

Supported Liquid Membrane 장치

Stolwijk 등(1987)에 의해 고안된 2개의 cylindrical water-jacketed glass half cell로 이루어진 thin flat sheet SLM 장치를 사용하였으며, cell의 내부 용량은 33 ± 1 mL, 막의 면적은 $5 \sim 16$ cm² 정도로 cell 외부에서 magnetic overhead stirrer로 각 cell의 turbine stirrer를 200rpm으로 교반하였다. Membrane은 2개의 cylindrical, water-jacketed glass half -cells 사이에 장착하고 25°C로 유지하면서 가동하였다.

Membrane 제조

Gardiner 등(1999)의 방법에 따라 8%(w/w)의 carrier가 첨가된 Duggan's SLM(D-SLM)을 제조하였다. 즉, 2-nitro phenoxyethylether(Sigma, USA) 0.24 mL와 carrier로서 Aliquat (methyltrioctylammonium chloride, Sigma, USA) 20.4 mg을 5 mL chloroform 넣은 후 50°C water bath상에서 수기에 넣고 회전하면서 용해시켰다. 여분의 chloroform은 진공 하에서 증발시켰으며 여액은 직경 5.3 cm petridish에 놓여 있는 SLM support(accurel membrane, average pore diameter: 0.04 μ m, porosity: 60 vol %, thickness: 100 μ m, Akzo Nobel, Germany)에 펼쳐 부은 후 진공 desiccator내에서 over night 하였다. 그리고 Ma 등(2000)의 방법에 따라 Aliquate 0.1026 g을 0.6 mL n-Heptane에 넣은 후 water bath상에서 20분간 교반하고 SLM support에 펼쳐 부은 후 진공 desiccator내에서 90~120 분간 방치하여 20%(w/w)의 carrier가 첨가된 Hossain's SLM (H-SLM)을 제조하였다.

Donor 및 Acceptor Phase 제조

0.5 g의 Glycine-Tyrosine(Gly-Tyr, Sigma, USA)을 60 mL의 증류수에 용해한 후 HCl과 NaOH로 pH를 조정하고 100 mL로 제조하여 donor phase로 사용하였고, acceptor phase는 0.25 M 및 1.0 M NaCl 용액을 사용하였다.

Peptide 정량

Nielsen 등(2001)의 방법에 따라 o-phthaldialdehyde를 사용하여 Spectrophotometer(U-3210, Hitachi, Japan)로 340nm에서 측정하였다.

이동속도

단위 시간 및 면적당 막을 통과하는 peptide의 이동속도 즉, Flux rate는 5시간 동안 SLM 장치를 운전하면서 1시간 간격으로 peptide를 분석하여 slope과 acceptor phase의 용량을 곱한 후 총 침투면적으로 나누어 계산하였고, slope은 시간에 대한 acceptor phase의 peptide 농도를 plot하여 계산하였다.

$$\text{Flux rate} [10^{-8} \text{ mol/ m}^2 \cdot \text{sec}]$$

$$= (\text{Slope} \times \text{volume of acceptor phase}) / \text{area}$$

결과 및 고찰

0.25 M NaCl Acceptor Phase에서 Short Peptide 추출

Acceptor phase로 0.25 M NaCl을 사용하고, D-SLM을 통한 Gly-Tyr의 이동속도를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 즉, donor phase의 pH가 1.0에서 7.0까지는 거의 변화하지 않았으나 pH 7.0부터 이동속도가 증가하기 시작하여 pH 9.0에서는 $120 \times 10^{-8} \text{ mol/m}^2 \cdot \text{sec}$ 으로 pH 7.0에서 보다 10배 정도 빠르게 이동하였고, 그 후 pH 11.0까지 이동속도는 크게 증가하지 않는 것으로 나타났다. 그리고 20% Aliquat로 제조한 H-SLM을 통한 Gly-Tyr의 이동속도는 Fig. 2와 같이 D-SLM과 동일하게 pH 1.0에서 7.0까지는 peptide의 이동속도가 거의 변화하지 않았으나, pH 7.0에서부터 증가하기 시작하여 pH 9.0에서는 $332 \times 10^{-8} \text{ mol/m}^2 \cdot \text{sec}$ 로 급격히 증가하는 것

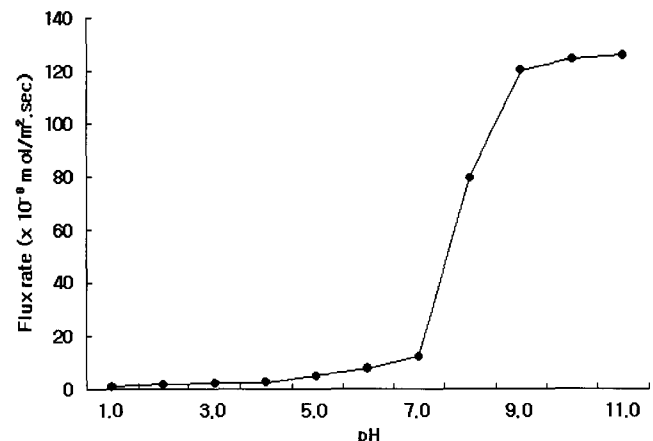


Fig. 1. Flux rate of Glycine-Tyrosine transport through D-SLM at different pHs. Donor phase is 0.5 g/100 mL in water and acceptor phase is 0.25 M NaCl.

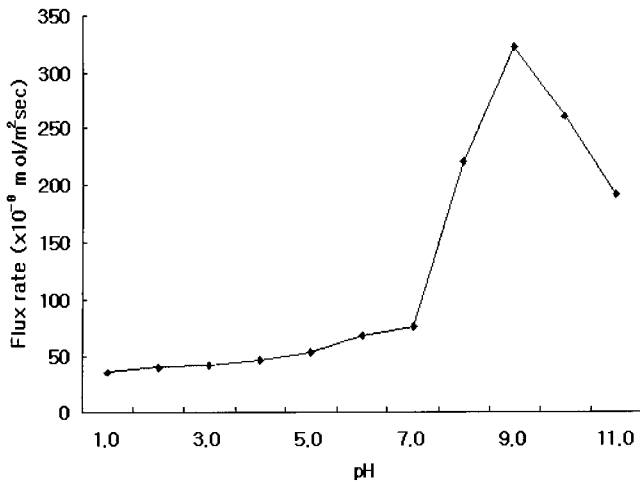


Fig. 2. Flux rate of Glycine-Tyrosine transport through H-SLM at different pHs. Donor phase is 0.5 g/100 mL in water and acceptor phase is 0.25 M NaCl.

으로 나타났다. 그리고 pH 9.0 이상에서는 그 속도가 감소하기 시작하여 pH 11.0에서는 191×10^{-8} mol/m² · sec로 저하되는 것으로 나타났다. pH 7.0 이상에서 Gly-Tyr의 이동속도가 증가하는 이유는 membrane의 carrier로 사용한 Aliquat가 양이온 carrier이기 때문에 donor phase의 Gly-Tyr이 음전하를 가져야만 이동이 가능하고, Gly-Tyr이 등전점을 초과하여 음전하를 띄기 시작하는 pH 7.0 이상에서 이동속도가 증가하는 것으로 판단된다. Liquid membrane의 carrier인 Aliquat 사용량 차이에 따른 D-SLM과 H-SLM에서의 이동속도를 확인한 결과 pH 9.0에서 H-SLM을 사용했을 때 약 3배 정도 빠르게 이동하는 것으로 나타나 carrier의 함량이 높을수록 이동속도도 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 SLM에서의 물질이동이 donor phase의 추출물질(peptide, P⁻)과 membrane의 carrier(양이온 carrier, C⁺)와 결합(C⁺ · P⁻)한 후 acceptor phase의 음이온(Cl⁻)과 교환(C⁺ · Cl⁻)을 통해 acceptor phase에 추출물질(P⁻)를 이동시키기 때문에 carrier 농도가 높을수록 결합(C⁺ · P⁻)되는 양이 많아 이동속도가 빨라지게 된 것으로 판단된다. 그리고 donor phase의 pH를 9.0에서 11.0까지 증가시켰을 때 D-SLM의 경우는 이동속도가 증가하는 경향을 보였으나 H-SLM의 경우 감소하는 것으로 나타나 그 원인에 대해서는 좀 더 연구가 필요한 것으로 생각된다.

1.0 M NaCl Acceptor Phase에서 Short Peptide 추출

Acceptor phase로 1.0 M NaCl을 사용하고, D-SLM을 통한 Gly-Tyr의 이동속도를 측정 한 결과는 Fig. 3과 같다. 즉, pH 1.0에서는 1×10^{-8} mol/m² · sec, 그리고 pH 6.0에서는 5×10^{-8} mol/m² · sec로 거의 변화가 없었으나 pH 6.0 이상에서 증가하기 시작하여 pH 7.0에서는 21, pH 8.0에서는 320×10^{-8}

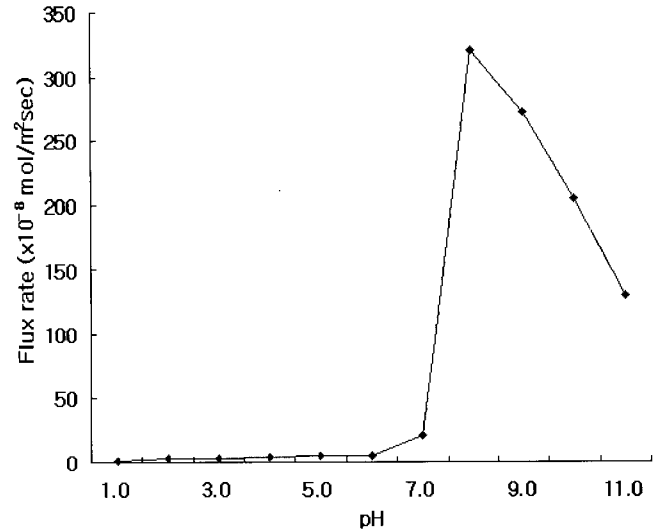


Fig. 3. Flux rate of Glycine-Tyrosine transport through D-SLM at different pHs. Donor phase is 0.5 g/100 mL in water and acceptor phase is 1.0 M NaCl.

mol/m² · sec로 급격히 증가함을 알 수 있었다. 그러나 pH 8.0 이상에서는 peptide의 이동속도가 감소하기 시작하여 pH 9.0에서는 273, pH 11.0에서는 130×10^{-8} mol/m² · sec로 저하되는 것으로 나타났다. H-SLM을 통한 Gly-Tyr의 이동속도는 Fig. 4와 같이 pH 1.0에서도 341×10^{-8} mol/m² · sec의 속도로 이동되었으며 pH 6.0에서는 542, pH 7.0에서는 754×10^{-8} mol/m² · sec으로 이동속도가 서서히 증가하였으나 pH 8.0에서는 $3,312 \times 10^{-8}$ mol/m² · sec으로 급격히 상승함을 알 수 있었다. 그리고 pH 11.0에서는 $3,427 \times 10^{-8}$ mol/m² · sec로 pH 8.0 이상에서는 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. D-SLM에 비해 H-SLM을 사용했을 때 pH 8.0에서 약 10배 이상 빠르게 Gly-Tyr가 liquid membrane을 통하여 이동함을 알 수

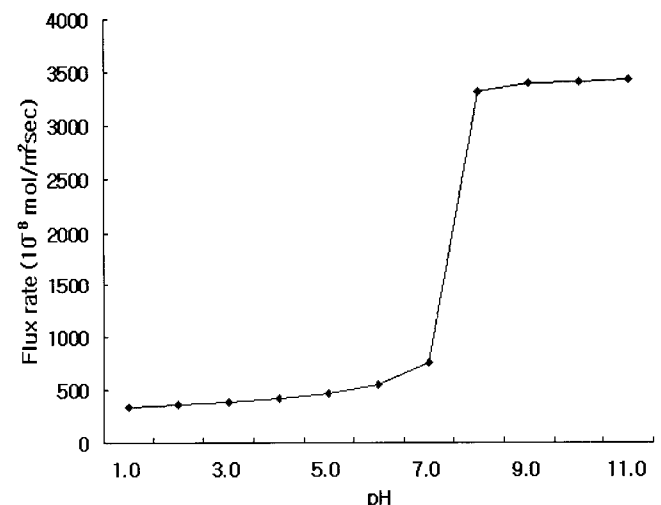


Fig. 4. Flux rate of Glycine-Tyrosine transport through H-SLM at different pHs. Donor phase is 0.5 g/100 mL in water and acceptor phase is 1.0 M NaCl.

있었다. 또한, acceptor phase의 염 농도가 높을수록 이동속도가 빠르게 나타난 것은 acceptor phase의 음이온(Cl^-)이 추출 물질(P^-)의 counter ion으로 SLM을 통한 물질 이동의 driving force로 작용하기 때문이다(Dzygiel and Wieczorek, 2001). 또한 D-SLM의 경우 pH 9.0 이상에서는 이동속도가 급격히 감소하였으나 H-SLM의 경우 차이 없이 약간 상승하는 것으로 나타나 0.25 M NaCl을 acceptor phase로 사용한 경우와 상이한 결과를 보여 주었다.

요 약

SLM을 이용한 short peptide의 분리를 목적으로 donor phase의 pH 및 acceptor phase의 염농도, membrane의 carrier 농도 차에 따른 peptide의 이동속도를 확인한 결과는 다음과 같다. 즉, pH 7.0 이하에서는 acceptor phase의 NaCl 농도나 carrier 농도에 상관없이 Gly-Tyr의 이동속도는 거의 영향을 끼치지 않았고, pH 7.0 이상에서는 이동속도가 급격히 증가함을 알 수 있었다. 그리고 Aliquat가 8% 함유된 D-SLM과 20% 함유된 H-SLM의 경우 Gly-Tyr의 이동속도는 H-SLM이 D-SLM보다 pH 9.0, 0.25 M NaCl 용액에서는 약 3배, pH 8.0, 1.0 M NaCl용액에서는 10배 정도 빠르게 이동하였다. 또한 H-SLM에서 acceptor phase의 NaCl 농도가 1.0 M 인 경우 0.25 M에 비해 10배 정도 이동속도가 빠른 것으로 나타났다. 따라서, short peptide인 Gly-Tyr의 SLM을 이용한 추출에서 donor phase의 pH 7.0 이상, carrier 농도가 높은 H-SLM 사용, acceptor phase의 염 농도가 높을수록 이동속도가 빠른 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Drapala, A. and Wieczorek, P. (2002) Extraction of short peptides using supported liquid membranes. *Desalination*. **148**, 235-239.
2. Dzygiel, P. and Wieczorek, P. (2001) Supported liquid membrane extraction of glyphosate metabolites. *J. Sep. Sci.* **24**, 561-566.
3. Dzygiel, P., Wieczorek, P., Jonsson, J. A., and Mathiasson, L. (1998) Enrichment of amino acids by su-

pported liquid membrane extraction using Aliquat 336 as a carrier. *Anal. Lett.* **31**, 1261-1274.

4. Gardiner, S. J., Smith, B. D., Duggan, P. J., Karpa, M. J., and Griffin, G. J. (1999) Selective fructose transport through supported liquid membranes containing diboronic acids or conjugated monoboronic acid-quaternary ammonium carriers. *Tetrahedron*. **55**, 2857-2864.
5. Lindegard, B., Jonsson, J. A., and Mathiasson, L. (1992) Liquid membrane work-up of blood plasma samples applied to gas chromatographic determination of aliphatic amines. *J. Chromatogr.* **573**, 191-200.
6. MA, P., Chen, X. D., and Hossain, M. (2000) Lithium extraction from a multicomponent mixture using supported liquid membranes. *Separ. Sci. Technol.* **35**, 2513-2533.
7. Nielsen, P. M., Petersen, D., and Dambmann, C. (2001) Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J. Food Sci.* **66**, 642-646.
8. Rak, M., Dzygiel, P., and Wieczorek, P. (2001) Supported liquid membrane extraction of aromatic aminophosphonates. *Anal. Chim. Acta.* **433**, 227-236.
9. Shen, Y., Gronberg, L., and Jonsson, J. A. (1994) Experimental studies on the enrichment of carboxylic acids with tri-n-octylphosphine oxide as extractant on a supported liquid membrane. *Anal. Chim. Acta.* **292**, 31-39.
10. Stolwijk, T. B., Sudholter, E. J. R., and Reinhout, D. N. (1987) Crown ether mediated transport : A kinetic study of potassium perchlorate transport through a supported liquid membrane containing dibenzo 18 crown 6. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 7042-7047.
11. Wieczorek, P., Jonsson, J. A., and Mathiasson, L. (1997) Concentration of amino acids using supported liquid membrane with di-2-ethylhexylphosphoric acid as a carrier. *Anal. Chim. Acta.* **346**, 191-197.

(2005. 2. 22. 접수 ; 2005. 6. 30. 채택)