

## Poly(ethylene glycol)-dextran 수용액 2상계에서 단백질 분획계수에 미치는 금속염의 효과

이 삼빈 · 이 철호  
고려대학교 식품공학과

### Effects of Salts on the Partition of Proteins in Poly (ethylene glycol)-Dextran Aqueous Two Phase System

Sam-Pin, Lee and Cheri-Ho, Lee

Department of Food Technology, Korea University, Seoul

#### Abstract

The effects of pH and added salts on the partition coefficients of proteins in a poly(ethylene glycol)-dextran aqueous two-phase system were investigated. The partition coefficients attained the lowest value at the isoelectric point of proteins in an equal volume aqueous two-phase system containing 5% PEG and 9.5% dextran in 5 mM phosphate buffer solution. The coefficients increased dramatically at pH 11; BSA which had highest effective hydrophobicity marked 50-fold increase, while  $\beta$ -lactoglobulin and ovalbumin which had low hydrophobicity 10-fold increase, respectively. The effect of added salts varied with the pH. The partition coefficient increased by the addition of salt at pH 3.0 but decreased drastically at pH 7.0. The partition coefficient increased in the order of added Li < Na < K at pH 3.0 and decreased in the order of added Li > Na > K at pH 11.0.

#### 서 론

단백질 및 생리활성 물질들을 공업적으로 회수, 분리하기 위한 새로운 방법으로 수용액 2상계에 관한 연구가 최근 활발하게 이루어지고 있으며, 저자들은 단백질들의 소수성에 따른 Poly(ethylene glycol)-dextran 수용액 2상계에서의 분획계수를 조사한바 있다.<sup>(1)</sup> 상기 실험에서 PEG-dextran 2상계의 단백질 분획에는 소수성이외의 다른 요인이 주로 작용하는 것으로 관찰되었고 그 중 단백질들의 정전기적 성질에 의한 이동 현상이 크게 작용하는 것으로 판단되었다. Zaslavsky<sup>(2,3)</sup> 등에 의하면 비 혼합 수용액 2상계에서 측정된 단백질들의 분획계수는 주로 이들 분자들의 소수성, 수소 및 이온 결합을 통한 주위계와의 다양한 상호 작용으로 얻어진 값으로 정의하였다. 또한 2상계에 존재하는 작은 이온들(금속염)은 단백질 분획에 크게 영향을 미치는데 Johansson<sup>(4)</sup>에 의하면 이런 효과는 금속염과 완충용액의 양이온 음이온들이 2상계에서 불균일하게 분획됨으로 인하여 형성되는 전기적 전위차에 기인한다고 보고했으며, Albertsson<sup>(5)</sup>은 이런 계면의 전위차와 단백질들의 분획에 관한 상호작용을 아래와 같이 정의했다.

$$\ln K_p = \ln K_{p+} + (Z_p F/RT) \psi$$
$$\psi = (RT/(Z^+ + Z^-) F) \ln (K^+ / K^-)$$

여기서  $\psi$ 는 계면전위(interfacial potential),  $Z_p$ 는 단백질의 총 전하,  $Z^+$ ,  $Z^-$ 는 양이온, 음이온의 총 전하,  $K_p$ 는 단백질 분획계수,  $R$ 은 기체상수,  $F$ 는 Faraday 상수,  $T$ 는 절대온도,  $K_p^+$ 는 계면전위차가 0이거나 등전점에서의 단백질의 분획계수이다.

본 실험에서는 NaCl과 인산 완충용액을 포함하는 PEG-dextran 수용액 2상계에서 계면사이의 전위차를 측정하고 pH변화, 첨가되는 금속염의 종류와 농도에 따른 표준 단백질들의 분획계수의 변화를 관찰하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

덱스트란(Dextran)과 폴리에틸렌글라이콜(PEG)6000은 Sigma Chemicals(St. Louis, MO.U.S.A)로부터 구입했으며, 일부 PEG6000은 Fluka Chemicals(Switzerland)에서 구입했다. 표준 단백질들 즉, albumin bovine(fathy acid free),  $\beta$ -lactoglobulin(from milk, lyophilized powder), lysozyme(from egg white) 및 ovalbumin(from egg white)들은 Sigma Chemicals (St.Louis.MO.U.S.A)에서 구입하였다.

##### Phase diagram 작성

2상계는 dextran 20% ( $\omega/\omega$ ), PEG 40% ( $\omega/\omega$ )의 저

장용액을 사용하였으며 2상계의 binodial line은 18% dextran 수용액 4g에 40% PEG용액을 소량씩 혼합시키면서 형성되는 상의 혼탁도(turbidity)에 의해서 결정하였다. 또한 상의 pH, 완충용액 이온들이 binodial line의 위치에 미치는 영향을 조사하였다.

#### 단백질 분획실험

상층부와 하층부의 용적비가 1.0이 되는 수용액 2상계를 만들기 위하여 PEG 5%, dextran 9.5%를 포함하는 0.5mM 인산 완충용액을 일정 눈금이 있는 cap tube (15ml)에 5ml를 넣고, 실온(18~20°)에서 단백질액(5%  $\omega/v$ )을 0.1ml 주입한 후 20회 혼합하였다. 이것을 2400rpm. 에서 5분 원심분리 시킨후 형성된 2상계에서 상, 하층부의 단백질 농도를 280mm에서 흡광도를 측정하여 분획계수(K)를 결정하였다.<sup>(1)</sup>

#### 금속염의 첨가

수용액 2상계에 사용한 금속염의 종류는 KCl, NaCl, LiCl이며, 이들의 저장용액을 각각 5M, 5.5M, 6M씩 만들어 2상계에 2.0M까지 첨가하였다.

#### 전위차 측정

NaCl과 인산 완충용액을 포함하는 수용액 2상계에서 계면 사이의 전위차를 Reitherman<sup>(6)</sup>등에 의한 방법으로 측정했으며 이때 모든 측정은 20° c 실온에서 형성된 계면을 경계로 상, 하층부의 중심부에 전극을 장치

하고 Oscilloscope(TRIO, 20MHZ, Model, CS1566A)로써 전위차를 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

Fig.1에 의하면 2상계의 pH가 산성을 띠는 수로 binodial line이 위로 이동하며, Fig.2에 의하면 일정 중합체 농도에서 첨가되는 인산 완충용액의 농도 증가는 binodial line을 아래로 이동시키는 것을 알 수 있다. Vide<sup>(7)</sup>등에 따르면 수용액 2상계 분획에서 형성되는 binodial line의 정확한 위치는 단백질 분획실험에서 중요하다고 보고하였으며, Bamberger<sup>(8)</sup>등은 PEG/Dextran 2상계에서 인산 완충용액의 농도가 증가하면 2상계를 형성하기 위한 임계조성이 점차로 낮아진다고 보고하였다.

#### pH의 영향

Fig.3은 일정 농도의 PEG/dextran 2상계에서 상(phase)의 pH변화에 따른 표준 단백질들의 분획계수를 나타내는 것으로서 단백질들의 분획 양상은 크게 변하는 것을 관찰할 수 있었다. 사용한 표준 단백질들은 등전점 부근인 pH4~6에서 가장 낮은 분획계수를 나타내었으며, 등전점이 높은 lysozyme경우는 pH9~10정도에서 가장 낮은 분획계수를 보였다. pH가 등전점에서 벗어날 수록 단백질의 분획계수는 증가하였으며, 특히 pH11에서는 분획계수가 크게 증가하여 소수성이

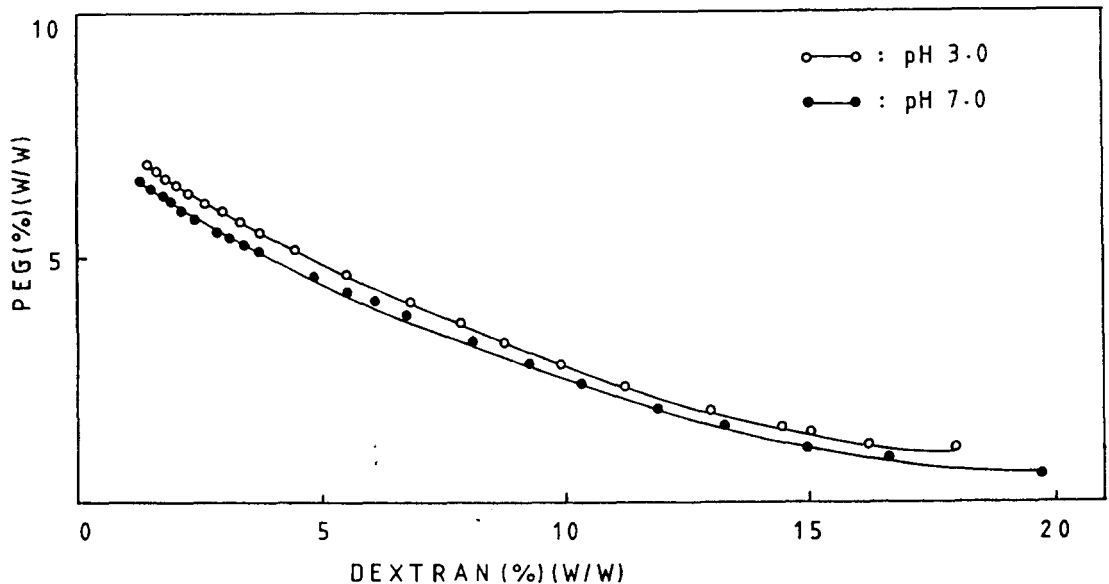


Fig. 1. Phase diagram of the PEG-DEX system at various pH (0.1M sodium phosphate, pH 7.0, PEG M.W. 7,500-8,000 DEX M.W. 70,000)

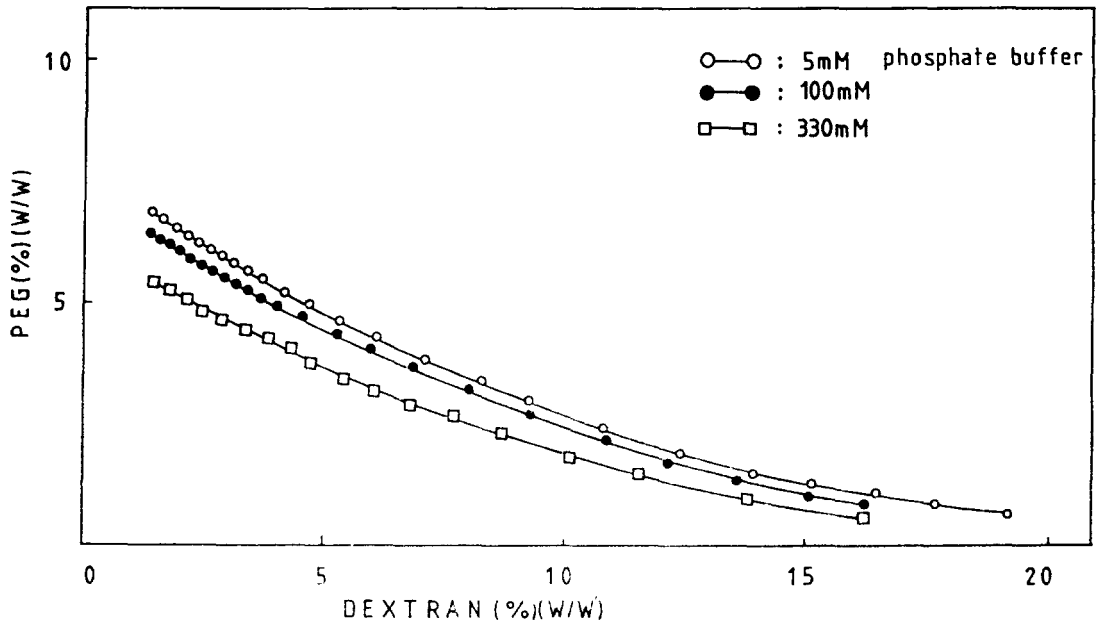


Fig. 2. Phase diagram of the dextran-poly (ethylene glycol) system on the various concentration of the sodium phosphate buffer, pH 7.0

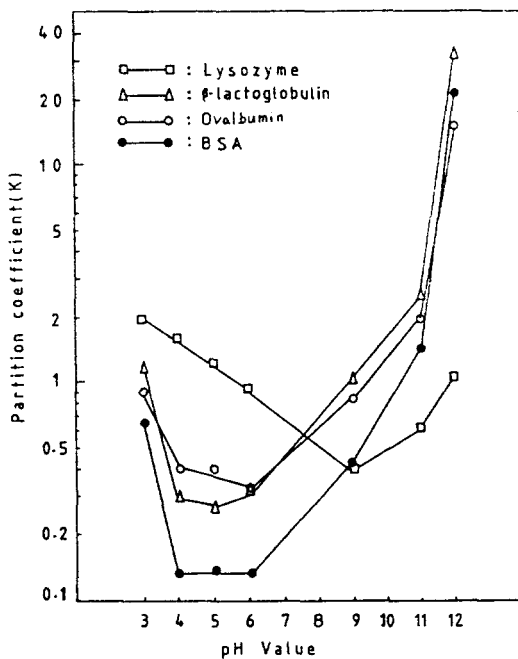


Fig. 3. The partition coefficient(K) of various proteins at different pH value in an aqueous two-phase system containing 5mM Na-buffer (PEG 6,000 5%; DEX 9.5%)

가장 큰 BSA<sup>(9)</sup>는 50배,  $\beta$ -lactoglobulin과 소수성이 비교적 낮은 ovalbumin은 각각 10배 정도 증가하는 것을 볼 수 있었다. 또한 pH4~5부근에서  $\beta$ -lactoglobulin은 2상계의 계면에 모이는 농축현상을 보였다. 등전점보다 높은 pH에서는 PEG/dextran 2상계속에 존재하는 인산 이온들이 하층부 (dextran-rich phase)와의 친화력때문에 하층부로 이동하면서, 상층부가 비교적 높은 전위를 띠게되며, 이때 음전하를 띠는 단백질 분자들이 정전기적 이끌림에 의하여 상층부(PEG-rich phase)로 크게 이동하는 것으로 생각된다.

Kula<sup>(10)</sup>등에 의하여 pH7.0이상의 PEG/dextran 이상계에서 존재하는  $HPO_4^{2-}$  음이온의 분획계수가 0.74정도로 낮기 때문에 2상계의 계면사이에서 전위차가 형성되며, 이 결과로써 하층부는 낮은 전위를 띠게된다고 보고했다. 이때 금속염의 첨가는 계면사이의 전위차를 상쇄시킨다.<sup>(11)</sup> 상(phase)의 pH가 4~6사이에서 ovalbumin의 분획계수가 더 컸으나 pH가 강 알칼리로 변하면서 ovalbumin보다 표면 소수성이 큰 BSA,  $\beta$ -lactoglobulin이 높은 분획계수를 나타내는 것은 단백질의 표면 소수성에 의한 영향으로 사려된다.<sup>(11)</sup> Ishino<sup>(12)</sup>등은 대두 단백질들이 알칼리 처리시 높은 pH에서 구조변화를 일으켜서 내부의 소수성 잔기들이 노출되어 증가된 표면 소수성을 갖는다고 보고했다.

금속염 첨가 효과

Table.1에서 보던 PEG/dextran 2상계에서 상층부는 높은 전위를 띠며 이들에 금속염(LiCl)을 소량 첨가하게 되면 상층부의 전위는 상쇄되어 낮아지는 것을 볼 수 있다.

Fig.4에 나타난 바와 같이 PEG/dextran 2상계에서 계의 pH변화에 따라 단백질의 분획계수는 첨가되는 금속염에 의해서 크게 상이하게 영향을 받는것을 알 수 있다. pH7.0에서 금속염이 첨가되지 않을 경우 ovalbumin의 분획계수는 BSA의 분획계수보다 더 컸던 것이 pH가 산성 알칼리로 갈수록 단백질의 구조변화에 기인한 노출된 소수성 잔기의 증가와 단백질 표면의 전하의 증가는 단백질을 상층부(PEG-rich phase)로 이동시키며, 분획에 소수성의 역할이 커지면서 분획계수는 단백질의 유효 소수성 크기에 따라 증가하였다. 이때 금속염을 첨가하게 되면 pH7.0 이상에서 총 음전하를 띠고있던 단백질들은 계의 상층부의 높은 전위가 상쇄되면서 분획계수는 감소된다. 반면에 pH3.0 부근에서 금속염의 첨가는 상층부의 높은 전위로 총 양전하를 띤 단백질들을 상층부로 이동시킴으로써 분획계수는 증가되었다. 특히 pH11.0이상의 계에서 소수성 영역이 노출되어 있던 단백질들은 소량의 금속염 첨가에 의해서 급격하게 하층부로 이동하게 되는대 이는 단백질 분획에 정전기적 효과가 크게 작용함을 나타낸다. Fig.5에 의하면 0.1M 금속염을 포함하는 PEG/dextran 2상계에서 단백질들의 분획계수는 단백질 표면이 양전하를 띠는 pH3.0에서는  $Li^+ < Na^+ < K^+$  순으로 감소하는 것을 나타낸다. 이것을 비슷한 조건

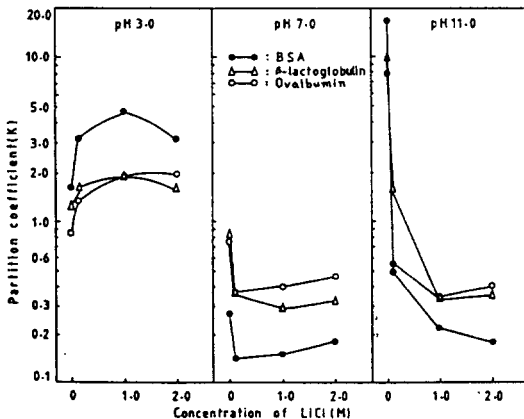


Fig. 4. Changes in the partition coefficient of proteins with increasing concentration of LiCl at various pH (3.0, 7.0, 11.0)

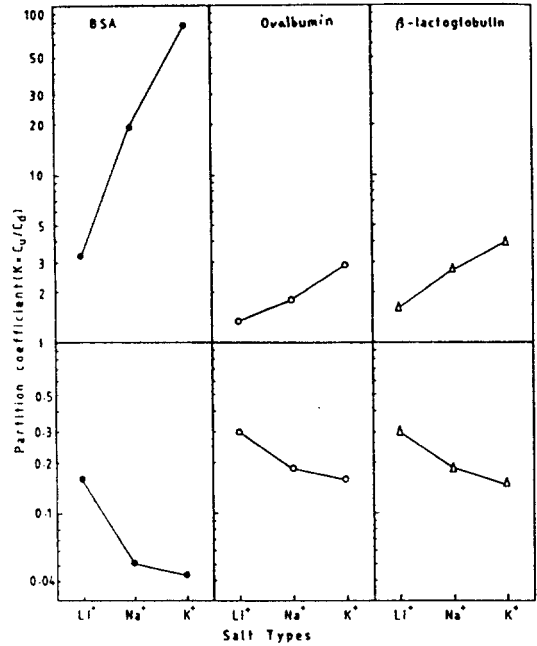


Fig. 5. Changes in the partition coefficients of the proteins by the addition of different ions to the PEG-dextran aqueous two-phase system at pH 3.0 (top) and 7.0 (bottom)

에서 Johansson<sup>(4)</sup>의 실험 결과와 일치하는 것으로 PEG/dextran 2상계에서 계의 pH변화와 첨가되는 금속염에 의해서 단백질들은 상층부와 하층부로 이동시킬 수 있음을 시사하는 것이다. 또한 2상계를 형성하는 중합체에 적당한 이온화기를 부착시켜서 단백질의 표면에 형성되는 정전기적 친화력에 따라 분리하는 액상 이온교환기(liquid ion exchanger)로 발전시킴으로서 생리활성 물질들을 연속식 공정으로 분리할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

요 약

폴리에틸렌 글라이콜(PEG)-덱스트란 수용액 혼합물이 형성하는 2상계에서 단백질의 분획현상에 대한 pH와 금속 이온의 영향을 검토하였다. PEG(5%)/dextran(9.5%)을 포함하는 5mM 인산 완충용액으로 된 수용액 2상계에서 상층부와 하층부의 용적비율 1.0으로 하였을 때 분획계수는 각 단백질들의 등전점에서 최소치를 나타 내었으며, pH가 등전점에서 벗어날 수록 단백질 분획계수는 증가하였다. 특히 pH11.0에서는 분획계수가 크게 증가하였으며 소수성이 가장 큰 BSA는 50배, beta-lactoglobulin과 소수성이 비교적 적은

ovalbumin은 각각 10배 증가하였다. 금속염 첨가는 pH3.0에서 단백질과 분획계수를 증가시키나, pH7.0과 pH11.0에서는 급격하게 감소시켰다. 단백질의 총전하가 양전하를 띠게 되는 pH3.0에서는  $Li < Na < K$  순으로 분획계수는 증가되며 단백질의 음전하를 띠게 되는 pH11.0에서는  $Li > Na > K$ 의 순으로 분획계수는 감소하였다.

### 감사의 말

본 연구는 한국 과학재단 일반 연구조성비의 보조로 수행되었으며, 이 자리를 빌어 감사의 뜻을 표하는 바이다.

### 문 헌

1. 이삼빈, 이철호 : 한국식품과학회지, **19**, (1987)
2. Zaslavsky, B.Y., Miheeva, L.M. and Rogozhin, S.V.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **510**, 160 (1978)
3. Zaslavsky, B.Y., Mestechkina, N.M., Miheeva, L.M. and Rogozhin, S.V.: *J. of Chromatography*, **256**, 49 (1983)
4. Johansson, G.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **221**, 387 (1970)
5. Albertsson, P.A.: *Partition of cell particles and macromolecules*, 2nd end., Wiley Interscience, New York, (1971)
6. Reitherman, R. and Flanagan, S.D.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **297**, 193 (1973)
7. Veide, A., Lindback, T. and Enfors, S.O.: *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 325 (1984)
8. Bamberger, S. and Seaman, G.V.F.: *J. of colloid and interface science*, **99**, 187 (1984)
9. 김성구, 이삼빈, 이철호 : 한국식품과학회지 **18**(2), 129(1985)
10. Kula, M-R., Kroner, K.H. and Hustedt, H.: Gesellschaft fur Biotechnologische Forschung mbH, D-3300 Braunschweig Stockheim, Mascheroder Wet 1. p. 75
11. Johansson, G.: *Molecular cellular biochemistry*, **4**, 169 (1974)
12. Ishino, K. and Okamoto, S.: *Cereal Chem.*, **52**, 10 (1974)

(1987년 1월 17일 접수)