

단백질의 기포분리에 영향을 미치는 요소들에 관한 연구

이 부용 · 이 철호

고려대학교 식품공학과

Factors Affecting Foam Separation of Proteins

Boo Young Lee and Cheri Ho Lee

Department of Food Technology, Korea University, Seoul

Abstract

The concentration ranges forming surface excess of bovine serum albumin(BSA) and ovalbumin solutions were determined, and the factors affecting the foam separation of BSA were investigated. The surface tension of BSA solution decreased from 72 to 61 *dyne/cm*, when the concentration changed from 5×10^{-3} to $3 \times 10^{-2}\%$, and the critical micelle concentration was appeared to be at 0.03% of BSA. At the isoelectric point (pH 4.9) of BSA, the foamate volume was maximum, but enrichment ratio was minimum, resulting in the maximum recovery rate. When the pH deviated from the isoelectric point, the foamate volume decreased and the enrichment ratio increased. The enrichment ratio increased, while the foamate volume decreased drastically as the temperature was elevated above 20°C, resulting in the decrease in recovery rate. As the gas flow rate increased, the enrichment ratio decreased and the foamate volume increased. When $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was added, the enrichment ratio decreased, but the maximum foamate was obtained at ionic strength 7. The concentration to form the surface excess of ovalbumin, which has lower surface hydrophobicity than BSA, was 200 times higher than that of BSA. This fact indicates the possibility of selective foam separation by hydrophobicity difference of proteins.

서 론

생물공학이 발전진보함에 따라 생물학적 활성을 갖는 단백질이나 효소등의 생산이 크게 증가하였으나 생리활성 물질의 대부분이 매우 낮은 농도로 발견되고 있기 때문에 이들 물질의 분리 농축이 중요한 문제로 대두되고 있다.

최근까지 여러 생리활성 물질이 섞여있는 균일한 액체 혼합물의 분리에 많은 방법들이 이용되어 왔지만 혼합물에서 분리하고자 하는 성분의 농도가 낮아짐에 따라 분리효율은 급격히 떨어지는 실정이다. 이온교환기나 크로마토그래피등에 의한 흡착기술등이 이런 문제에 어느 정도의 해결을 제시하고 있으나 여러 분리단계를 거치며 많은 장치가 필요하고 시간이 오래 걸리며 경제적으로 상당한 비용이 들어가는등 여러가지 문제점을 갖고 있다.

이러한 문제점들을 해결해보고자 낮은 농도의 성분도 분리가 가능하며 복잡한 여러 단계나 장치를 필요로 하지않는 새로운 방법을 시도하게 된 것이 기포분리기술이다. 기포분리 기술은 표면활성 물질이 액체와 기체사

이의 경계면, 즉 액체의 표면에 모이는 표면흡착 현상을 이용하는 것이다^(1,2). 표면흡착 현상은 기포분리 조작의 기본 원리로서 액체-기체 경계면의 효과적인 생성과 표면활성 물질이 경계면에 모이도록 하는 수단을 제공한다^(3,6).

표면활성을 갖는 단백질이나 효소등의 액체-기체 경계면에서의 물질흡착은 Gibbs equation⁽⁷⁾에 의해 정량적으로 설명될 수 있다. 즉

$$d\gamma = RT \sum_i T_i d \ln a_i \text{로서,}$$

γ 는 용액의 표면장력이고, a_i 는 성분 i 의 활동도(activity), T_i 는 성분 i 의 표면과잉(surface excess)이다.

물은 용액일 경우 성분 i 의 활동도를 농도로 나타내면 Gibbs equation은 다음과 같이 간단히 표시된다.

$$(T/C)_i = -\frac{1}{RT} (d\gamma/dc_i),$$

C_i 는 성분 i 의 농도를 나타내며, $(T/C)_i$ 는 성분 i 의 분포요소(distribution factor), R 은 기체상수, T 는 절대온도이다.

이와같이 표면활성 물질이 포함된 수용액이 질소가

스나 탄산가스등의 불활성 가스에 의해 기포가 형성될 때 기포속의 표면활성 물질 농도가 밑에남는 잔류모액 (bulk solution)에서 보다 높아 표면활성 물질의 기포분리가 가능해지는 것이다.

단백질의 표면활성은 단백질 분자내의 친수성기와 소수성기의 균형에 의하여 결정되며 일반적으로 표면소수성 혹은 유효소수성이 큰 단백질일수록 유화형성 능력, 기포형성 능력등이 큰 것으로 관찰되고 있다.⁽⁸⁻¹²⁾

본 연구는 소수성의 크기가 서로 다른 bovine serum albumin과 ovalbumin의 두가지 모델 단백질을 사용하여 단백질의 기포분리 조작에 영향을 미치는 여러 요소들을 관찰하고 각 요소들의 변화에 따른 기포분리 현상을 연구하여 단백질의 소수성 차이에 의한 기포분리 가능성을 알아 보았다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 bovine serum albumin(fatty acid free), ovalbumin(from egg white)은 Sigma Chemicals(U.S.A)에서 구입하였고, 실험에 사용한 시약들은 모두 일급 생화학 실험용을 사용하였다.

기포분리 장치의 제작 및 조작

실험에 사용한 기포분리 장치는 실험실에서 자체 제작한 것으로 Fig. 1과 같다. 분리탑의 직경은 4.5cm이고 전체길이가 40cm로서, 조작은 분리하고자 하는 성분이 담긴 용액을 분리탑내에 주입한 다음 질소가스를 유입시켜 기포를 발생시켰다. 형성된 기포는 분리탑을 따라 배출되어 용기에 모이게 되며 자석젓개에 기포를 파괴시켜 농축된 기포분리액(foamate)을 만들었다.

단백질 용액의 제조 및 농도 측정

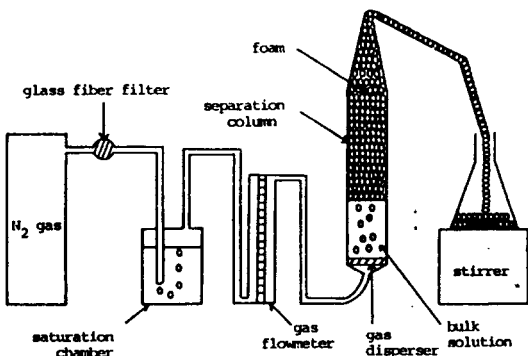


Fig. 1. Schematic diagram of foam separator

실험에 사용한 단백질 시료용액은 2 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 사용하여 제조하였고, 기포를 일으키는데 사용한 용액과 기포분리액 잔류모액의 단백질 농도 측정은 Bradford⁽¹³⁾의 dye-binding방법을 이용하였다.

단백질 용액의 표면장력 측정

액체-기체 경계면인 용액의 표면에 표면과잉이 형성되어 표면장력의 변화가 일어나는 단백질 농도 범위에서 단백질 농축효과가 나타나므로⁽¹⁴⁾ 기포분리가 가능한 단백질 농도를 알기 위하여 Fisher-tensiometer (Fisher Surface tensiometer model 20)를 사용하여 여러가지 농도로 만들어진 단백질 용액의 표면장력을 측정하였다.

pH, 온도 및 가스 유입속도 조절

시료용액의 pH는 0.1N HCl 과 0.1N NaOH 용액을 사용하여 조절하였으며 기포분리 조작온도는 분리탑에 물자켓을 부착하여 일정온도의 물을 공급, 조절하였다. 질소가스 유입속도는 기포분리 장치에 부착된 유량계를 통하여 조절하였다. 위의 조작에서 얻어진 기포분리액의 부피는 배출된 기포를 용기에 모아 자석젓개에 의해 기포를 파괴시켜 용액상태로 만든뒤 부피를 측정하였다. 단백질 농축율과 단백질 회수율은 다음과 같이 정의하였다.

$$E.R = \frac{C_r}{C_o}$$

E.R = 농축율(Enrichment ratio)

C_r = 기포분리액의 단백질농도

C_o = 모액의 단백질농도

$$\text{회수율(\%)} = \frac{\text{기포분리액으로 회수된 단백질량}}{\text{모액의 총 단백질량}} \times 100$$

결과 및 고찰

기포분리가 이루어지는 BSA농도

Fig. 2에 의하면 BSA용액의 단백질 농도가 0.005%에서 0.03%로 변할때 표면장력은 72dyne/cm에서 61dyne/cm로 감소하였으며 이 농도범위에서 표면과잉이 형성됨을 알수 있었다. Fig. 2에서 볼때 0.05%이상의 단백질 농도에서는 농도가 증가하여도 표면장력의 변화가 없는 범위이며 이 범위 이상에서는 농축율이 1.0으로서 기포분리가 일어나지 않음을 알수 있다. Charm⁽¹⁴⁾은 표면장력의 변화가 없이 일정한 값을 나타내기 시작하는 경계점의 단백질 농도를 임계마이셀농도(critical micelle concentration)라 칭하고, 임계농도 이상에서는 용액의

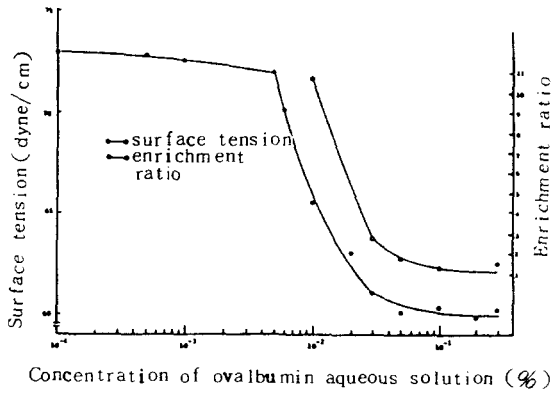


Fig. 2. Concentration of surface excess formation and resultant enrichment ratio by foam separation

단분자층이 단백질 분자로 포화되어 더 이상의 표면과잉이 형성되지 않으므로 기포분리에 의한 단백질 농축이 이루어지지 않는다고 보고하고 있다. 한편 가장 안정한 기포는 임계농도에서 형성되므로 본 실험에서는 BSA의 단백질 농도를 0.03%로 선택하여 기포분리 현상에 영향을 미치는 제 요인에 대하여 조사하였다.

pH의 영향

Fig. 3은 BSA의 등전점인 pH4.9를 기준으로 하여 용액의 pH가 양극단으로 갈수록 얻을 수 있는 기포분리액의 부피는 감소하고 단백질 농축율은 증가하는 경향을 나타내고 있다. 이 결과는 London⁽¹⁵⁾과 Buckingham⁽¹⁶⁾의 결과와도 일치하는 것으로 BSA의 등전점에서 BSA의 총전하(net charge)가 0이 되어 분자간의 정전기적인 영향을 받지않고 안정한 기포를 형성하기 때문에 기포분리액의 부피가 최고에 달하는 것으로 생각된다. 한편 단백질 회수율은 pH 4.9에서 가장 높은 약97.5% 정도이고, pH 11에서는 약 76% 정도만이 기포분리액으로 회수되고 있음을 알수 있었다.

온도의 영향

Fig. 4에서 기포분리 조작시 용액의 온도가 증가할수록 얻는 기포분리액의 부피는 감소하나 단백질 농축율은 증가하고, 단백질 회수율은 20°C 까지는 약 96.5%로 거의 모든 BSA가 기포로 회수되나 30°C 이상에서는 단백질 회수율이 상당히 감소함을 보여주었다. Buckingham⁽¹⁶⁾은 높은 온도에서 형성된 기포의 강도가 더 커서 안정한 기포를 형성하므로 많은 양의 기포가 배출되어 기포분리액의 부피가 증가한다고 보고하였다.

가스 유입속도의 영향

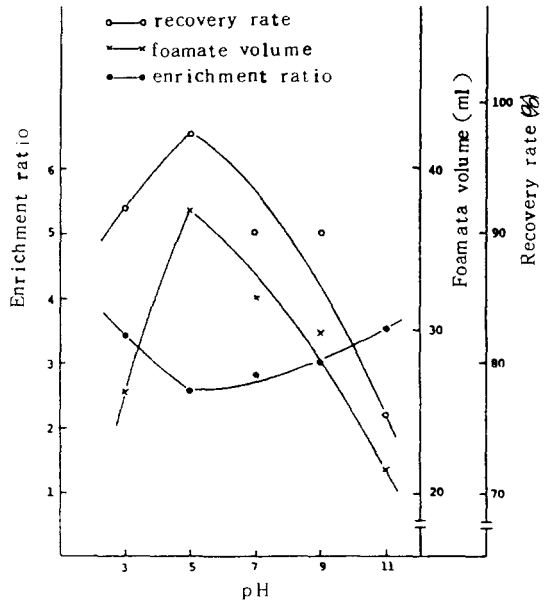


Fig. 3. The effect of pH on recovery rate and foaming property of 0.03% BSA solution (temp : 20°C, gas flow rate: 100ml/min)

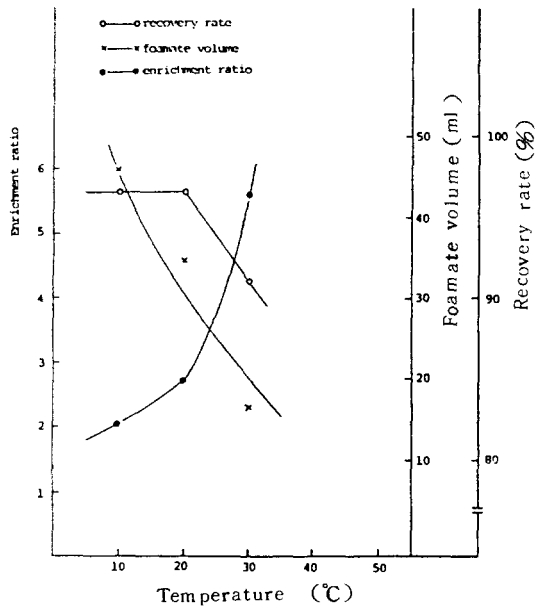


Fig. 4. The effect of temperature on recovery rate and foaming property of 0.03% BSA solution (gas flow rate: 100ml/min, pH: 4.9)

Fig. 5는 질소가스 유입속도가 커질수록 기포분리액의 부피는 24ml에서 51ml정도로 증가하고 단백질 농축율은 2.3에서 1.4정도로 감소함을 나타내고 있다. 이러한

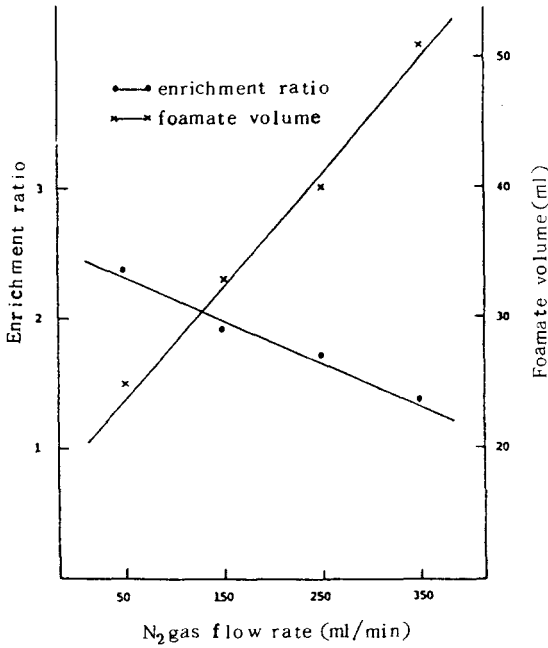


Fig. 5. The effect of gas flow rate on foaming property and enrichment ratio of 0.03% BSA solution (temp : 20°C, pH: 4.9)

현상은 London⁽¹⁵⁾의 경향과도 일치하는 것으로 유입속도가 증가할수록 기포가 분리담내에 머무는 시간은 줄어들고 이에 따라 기포로부터 충분히 용액이 빠져나가지 못한 상태로 배출되어 수분이 많이 포함된 기포분리액이 되므로 단백질 농축율이 감소하는 경향을 보여주는 것으로 사료된다.

(NH₄)₂SO₄ 첨가효과

Fig. 6은 (NH₄)₂SO₄ 첨가에 의해 용액의 이온강도가 증가할 때 이온강도 7까지는 기포분리액의 부피가 63ml로 증가하나 단백질 농축율은 계속 감소하는 경향을 보여주고 있다. 이온강도 9이상에서는 기포분리액의 부피와 단백질 농축율도 감소하는데, 이는 높은 염농도의 용액에서 단백질이 aggregate를 형성하여 용액이 뿌엩게 되는 것으로 보아 salting-out 효과에 의해 단백질이 변성되어 기포형성이 잘 되지 않고 농축율도 감소하는 것이라 생각된다.

단백질의 소수성에 의한 영향

단백질의 표면활성은 단백질 분자의 소수성에 직접적인 영향을 받는 것으로 알려져 있으며 일반적으로 소수성이 큰 단백질일수록 유효력 및 기포형성 능력이 큰 것으로 보고되고 있다.⁽⁸⁻¹²⁾ 김등⁽¹⁰⁾ 및 김과 이⁽¹¹⁾의 실험

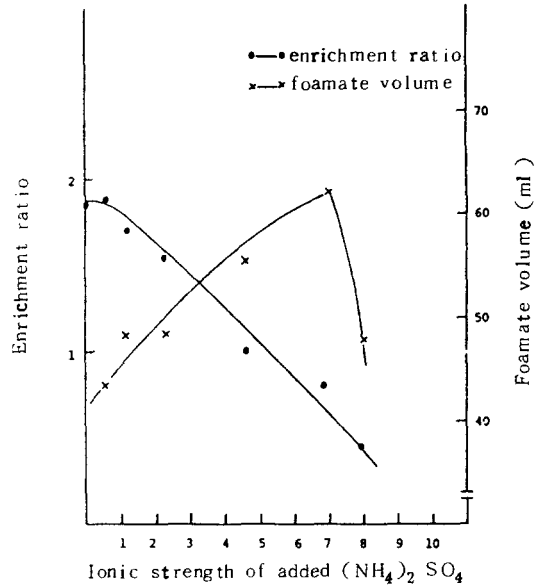


Fig. 6. The effect of ionic strength of foaming property and enrichment ratio of 0.03% BSA solution (temp: 20°C, gas flow rate: 100ml/min, pH: 7)

에서 소수성이 특히 낮은 것으로 나타난 ovalbumin의 농도에 따른 표면장력 저하와 표면과잉 현상을 관찰한 결과는 Fig. 7과 같다. Fig. 2의 BSA의 경우와 비교해 볼 때 BSA는 표면과잉을 형성하는 농도가 0.005~0.03% 인데 반하여 ovalbumin은 0.1~0.5% 범위인 것을 알수 있다. 이러한 차이는 단백질의 혼합물이나, 단백질과 핵산, 기타 세포내 물질 혼합물에서 소수성 크기에 따른 선택적인 기포분리가 가능함을 시사하고 있다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 기포분리 조작을 이용

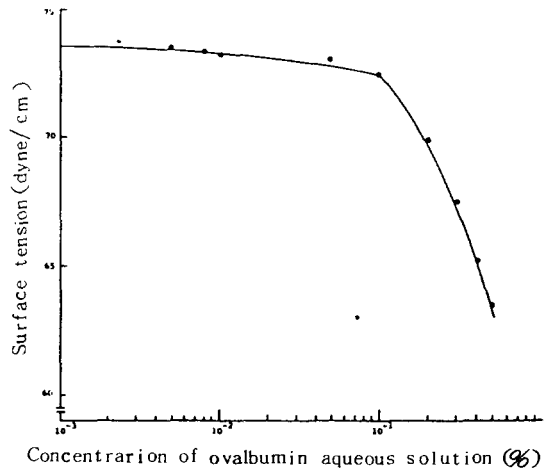


Fig. 7. Concentration range of ovalbumin solution for surface excess formation

하여 단백질, 효소 및 특정 생리활성물질의 분리농축이 가능할 것으로 판단된다. 그러나 기포분리액의 부피와 농축율이 일반적으로 역비례하므로 분리효과를 극대화시킬 수 있는 조건을 설정하기 어려운 점이 있다. 따라서 농축율과 회수율을 동시에 높일 수 있는 조건에 대한 연구가 요구되고 있다.

요 약

기포분리 조작에 영향을 미치는 제요소를 조사하기 위하여 bovine serum albumin과 ovalbumin의 표면과잉을 형성하는 농도범위를 결정하고, BSA용액의 기포분리에서 pH, 온도, 가스유입속도, 염농도 등이 미치는 영향에 대하여 관찰하였다. BSA의 임계미셀농도인 0.03%에서 용액의 pH가 등전점 4.9부근일때 농축율은 최소치를 나타내나 기포분리액의 부피가 최대가 되어 회수율은 최대치를 가지게 된다. 등전점에서 벗어날수록 기포분리액의 양은 감소하나 농축율은 증가하였다. 기포분리온도가 20°C 이상으로 상승하면 농축율은 증가하나 분리액의 양은 급격히 감소하여 회수율이 감소하였다. 가스 유입속도가 커질수록 농축율은 감소하고 분리액의 양은 증가하였다. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 첨가에 따라 농축율은 감소하나 분리액의 양은 이온강도 7에서 최대치를 나타내었다. 소수성이 작은 ovalbumin은 표면과잉을 형성하는 농도범위가 BSA에 비하여 200배 이상 높게 나타났다. 이러한 현상은 단백질의 소수성에 따른 기포분리 농축이 가능함을 시사하고 있다.

사 의

본 연구는 한국과학재단 일반연구 조성비의 보조로 수행되었으며, 이 자리를 빌어 감사를 표하는 바이다.

문 헌

1. Rubin, E., and Gaden, E.L. Jr., *New Chemical Engineering Separation techniques*. Interscience Publishers, New York.(1962)
2. Pinfold, T.A., *Separation science*, 5(4), 379(1979)
3. Lemlich, R., Principles of foam separation in *Progress in separation and purification, vol. 1* Interscience Publishers, New York(1968)
4. Karger, B.L., and Devivo, D.G., *Separation Science*. 3(5), 393(1968)
5. Somasundaran, P., *Separation and purification Methods*. 1(1), 117(1972)
6. Somasundaran, P., *New developments in separation methods*. Marcel Dekker, Inc., New York, Separation using foaming technique.(1976)
7. Adamson, A.W., *Physical chemistry of surfaces. 2nd ed.*, Interscience Publishers, New York(1967)
8. Kato, A.M. Matsuda, T, Matsudomi, N. and Kobayashi, K., *J. Agric. Food Chem.* 32(1), 284(1984)
9. Keshavarz, E., and Nakai, S., *Biochimica et Biophysica Acta*. 576, 269(1979)
10. 김성구, 이삼빈, 이철호 : 한국생화학회지, 18(2), 129(1985)
11. 김성구, 이철호, 한국생화학회지. 17(4), 373(1984)
12. 이철호, 제 9 차 국내의 한국과학기술자 종합학술대회 논문집 (I), 251(1984)
13. Bradford, M.M., *Analytical Biochemistry*. 72, 248(1976)
14. Charm, S.E., Morningstar, J. Matteo, C.C. and Paltiel, B., *Analytical Biochemistry*, 15, 498(1966)
15. London, M., Cohen, M. and Hudson, P.B., *Biochimica et Biophysica Acta*, 13, 111(1954)
16. Buckingham, J.H., *J. Sci. Fd. Agric.*, 21, 441(1970)

(1987년 1월 28일 접수)