

Poly(ethyleneglycol)과 인산염용액이 형성하는 2상계에서의 단백질 분획에 관한 연구

이삼빈·이철호

고려대학교 식품공학과

Protein Partition in an Aqueous Poly(ethyleneglycol)-salt Two-phase System

Sam-Pin Lee and Cherl-Ho Lee

Department of Food Technology, Korea University, Seoul

Abstract

The partition behavior of proteins in an aqueous two-phase system of poly(ethyleneglycol)-potassium phosphate buffer (PEG/PPB) was investigated. The proteins of different surface hydrophobicity, i.e. Bovine serum albumin (BSA), β -lactoglobulin, ovalbumin, moved to the PPB-rich bottom phase in a PEG (12%)/PPB (12%) two-phase system resulting in very low partition coefficients. When the concentration of PPB increased to 15% level, the electric potential of bottom phase changed from +50 mV to zero and the partition coefficient tended to increase. The change in the molar ratio of K_2HPO_4/KH_2PO_4 in PPB from 1.43 to 9.55 caused the volume ratio of top to bottom phase (V_t/V_b) to be decreased and protein partition coefficient increased. When the concentration of PPB was elevated from 14% to 26%, the V_t/V_b decreased from 1.5 to 0.39 and the partition coefficient of proteins increased drastically; β -lactoglobulin 74 fold, BSA 32 fold, ovalbumin 12 fold and lysozyme 5 fold.

서 론

액상 2상계를 이용한 생물 활성물질들의 분리를 위하여 현재까지 연구된 친수성 중합체들의 조성에는 여러가지가 있으며 dextran/poly(ethylene glycol), dextran/Ficoll, Ficoll/poly(ethylene glycol), poly(vinyl alcohol)/dextran, dextran/methyl cellulose, poly(ethylene glycol)/salt 등 여러가지 조성이 사용될 수 있다.⁽¹⁾ 저자들은 poly(ethylene glycol)/dextran 액상 이상계에서 소수성이 다른 기준 단백질들의 분획 현상을 관찰 보고 하였으며⁽²⁾, 이들 분획현상에 영향을 미치는 계의 pH 변화와 금속염 첨가 효과에 관하여 보고한바 있다.⁽³⁾

Poly(ethylene glycol)과 일정 농도 이상의 염용액이 형성하는 액상 2상계는 염용액이 dextran보다 비용이 저렴하게 들며, 분리물의 제거와 재생산이 용이하다는 점에서 산업적 가치가 크다. 또한 poly(ethylene glycol)/salt 액상 2상계는 phase간의 특이성이 크고, 상층부와 하층부의 소수성 차이가 비교적 크게 나타나므로 소수성 단백질과 친수성 핵산의 분리에 이용될 수 있다.⁽⁴⁾ 또한 세포내 효소의 분리 농축공정에서 세

포벽 파편들을 제거하는 동시에 특정 단백질과 효소를 선택적으로 추출 분리하는데 이용될 수 있다.^(5,6) 특히 이러한 액상 2상계를 이용한 분리공정은 겔크로마토그래피나 이온교환기와 같은 고체-액체 분리계와는 달리 대규모 연속 공정으로 발전시킬 수 있는 가능성이 있으므로 최근 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.⁽⁷⁾

본 실험에서는 Poly(ethylene glycol)과 인산칼륨 완충용액(PPB)이 형성하는 2상계에서 유효 소수성이 서로 다른 기준 단백질의 분획 거동을 관찰하고, 계의 조성에 따른 분획계수의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

재료

Poly(ethylene glycol) 6000, 4000, 2000 은 Fluka Chemicals (CH-9470 Buchs, Switzerland)에서 구입했으며, Potassium phosphate는 Kanto Chemical(Japan)에서, 정제된 단백질 Albumin bovine, β -lactoglobulin, lysozyme, ovalbumin들은 Sigma Chemicals(St.Louis, MO, U.S.A.)에서 구입했다.

Phase diagram 작성

2상계는 Poly(ethylene glycol) 40% (w/w)와 potassium phosphate buffer(pH 7.4, 32.8%, 몰비율, $K_2HPO_4/KH_2PO_4 = 1.43$) 저장용액을 사용하였으며, PEG/PPB 2상계의 binodial line은 40% 수용액 10g에 32.7%의 PPB를 소량씩 혼합시키면서 형성되는 상의 혼탁도에 의해서 결정하였다. 또한 PEG의 여러 종류, 분자량에 따른 phase diagram의 변화를 조사하였다.

전위차 측정

20°C 실온에서 PEG 12%와 PPB(12%, 15%)가 형성하는 액상 2상계에서 계면사이의 전위차가 NaCl 1.0M을 첨가시에 전위차를 Reitherman⁽⁸⁾ 등에 의한 방법으로 측정하였다.

단백질 분획실험

PEG 6000 일정 농도(10%)에서 PPB(pH7.4; 몰비율 9.55)를 12%~26%까지 변화시킨 조성에서 상형성 혼합물을 각각 30ml 씩 제조하여 15ml cap tube에 5ml를 넣고, 실온(20°C)에서 단백질액(5%, w/w)을 0.1ml 주입한 후 20회 혼합하였다. 이것을 2400 rpm에서 5분 원심분리시킨후 형성된 2상계에서 상·하층부의 단백질 농도를 각각 280mm에서 흡광도를 측정하여 분획계수 K를 결정하였다.⁽²⁾

결과 및 고찰

PEG/PPB의 phase diagram 으로서 PEG와 PPB의 일정 혼합농도에서 혼탁도를 나타내는 조성을 연결시켜 binodial line을 얻었으며, 이 binodial line의 윗부분의 조성에서는 2상계(two-phase system)를 이루면서 상층부는 주로 PEG-rich phase, 하층부는 PPB-rich phase로 형성되며, 반면에 아래 조성에서는 PEG와 PPB가 혼합된 일상계를 나타낸다. Fig.1의 점 A, B, C와 같이 일정 PEG농도에서 PPB 농도를 증가시키면 binodial line에서 멀어지게 되어 상층부의 부피가 감소되어 부피비(V_t/V_b)는 A에서 1.27, B에서 0.63, C에서 0.4로 감소하며 tie line은 길어진다. 이때 상층부의 PEG와 하층부의 PPB농도는 binodial line과 tie line이 만나는 한 쌍의 점(node)의 조성으로 구할 수 있다.⁽⁹⁾ Fig.2에서 2상계 형성을 위해 사용된 PEG의 평균 분자량의 감소는 phase diagram에서 형성되는

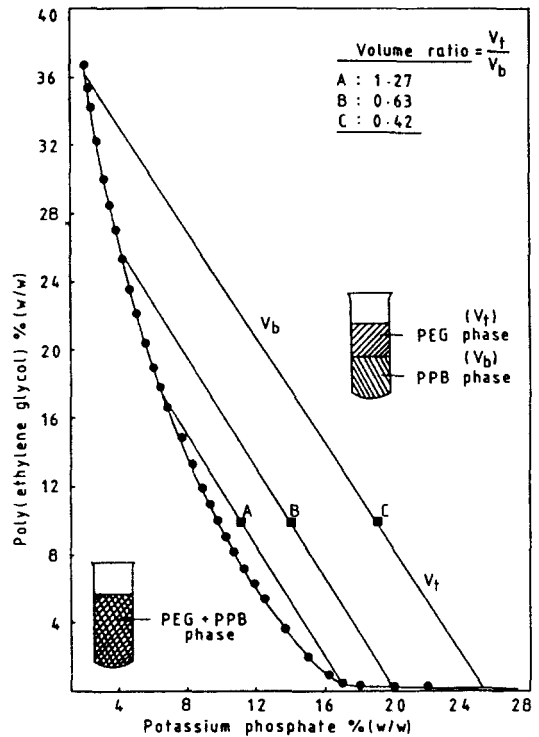


Fig. 1. Phase diagram showing the volume ratios and tie lines obtained near and far away from the binodial line (PEG 6000, Fluka, $K_2HPO_4/KH_2PO_4 = 1.43$ molar ratio, 32.8, pH7.4) at 20°C

binodial line을 위로 이동시킴을 알 수 있다.

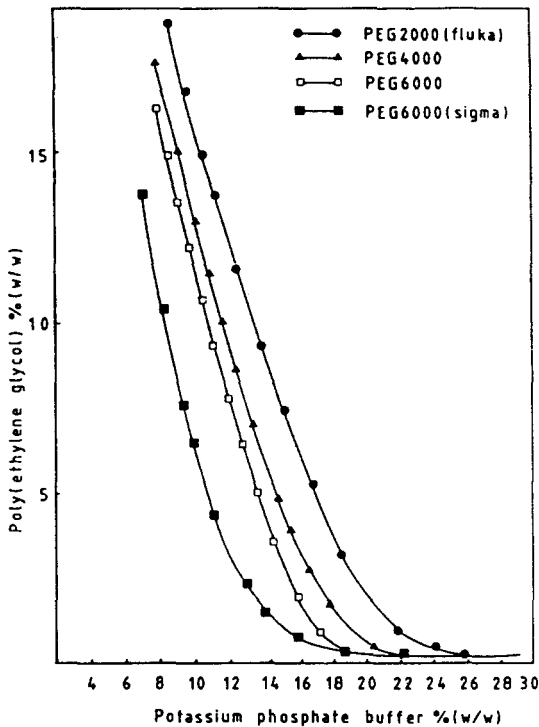
PEG-PPB 이상계에서 형성된 전위차와 분획계수와 의 관계

Table1을 보면 PEG-PPB 이상계에서 대부분 기준 단백질들(BSA, Ovalbumin, β -lactoglobulin)은 거의 하층부로 이동하면서 분획계수가 매우 낮았다. 한편 PEG-dextran이상계에서는 조성이 binodial line에 접근하면서 단백질들이 상층부로 이동하는 경향을 보였었다.⁽²⁾ PEG-PPB 이상계 사이에서 측정된 전위차는 PEG 12%, PPB 12%의 조성일 때 하층부(PPB-rich phase)가 +50mV의 높은 전위를 나타내었다. 따라서 pH 7.4의 이상계에서 표면에 음전하를 띠는 단백질들은 하층부로 이끌린다. 또한 하층부는 상층부에 비해 많은 이온들을 포함하고 있어서, 단백질의 분획은 이들의 표면 소수성보다 전하에 의해서 영향을 받는 것으로 사료된다. 즉 표면소수성이 큰 BSA와 표면소수성이 작은 ovalbumin⁽¹⁰⁾간에 분획계수의 큰 차이를 발견할 수 없었다. 이때 binodial line에서 멀어지는 조성으로 변화시키면 즉 PEG 12%, PPB

Table 1. Changes in partition coefficient (K) of proteins with increasing concentration of PPB (12%, 15%) in the PEG-PPB two phase system at 20°C (PEG 6000 sigma, $K_2HPO_4/KH_2PO_4=1.43$ molar ratio, pH 7.4)

Conc. of PPB	Protein	BSA	OA	β -lacto-globulin	Vol. ratio
PPB 12%	t	0.002	0.003	0.005	1.0
	electrical potential	0.225	0.244	0.309	
	(+50 mV: bottom)	K	0.008	0.012	
PPB 15%	t	0.037	0.044	0.012	0.67
	electrical potential	0.151	0.158	0.12	
	(zero: bottom)	K	0.24	0.278	

t, b: Protein concentrations at top and bottom phases

**Fig. 2. Phase diagram of PEG-PPB system as a function of the average molecular weight of PEG at 20°C ($K_2HPO_4/KH_2PO_4=1.43$ molar ratio, pH 7.4)**

15%로 하면 하층부의 전위는 낮아져 0에 가까워지며 단백질을 상층부로 일부 이동하여 BSA, Ovalbumin, β -lactoglobulin의 분획계수는 0.08, 0.012, 0.016에서 0.24, 0.278, 0.10으로 각각 증가하게 된다. (Table 1) 또한 1M NaCl을 첨가할 경우 Table 2와 같이 상·하층부의 전위차는 크게 감소하며 따라서 단백질의 분획계수가 증가하는 것을 볼 수 있다. 이러한 현상은 저자들이 PEG/dextran 2상계에 금속염을 첨가하였을

Table 2 Partition coefficient (K) of various proteins in the PEG-PPB two phase system containing 1.0 M NaCl (PEG 12%, PPB 12%, $K_2HPO_4/KH_2PO_4=1.43$)

Protein		Salt concentration	
		0	1.0M
BSA	t	0.005	0.017
	b	0.213	0.166
	K	0.23	0.102
Ovalbumin	t	0.001	0.032
	b	0.21	0.164
	K	0.004	0.195
β -lactoglobulin	t	0.004	0.07
	b	0.284	0.176
	K	0.014	0.036
Electrical potential (bottom phase)		+ 50 mV	+ 5 mV

t, b: Protein concentrations at top and bottom phases

때 관찰된 것과 같은 결과를 보이는 것이다.⁽³⁾**PEG/PPB 조성의 변화에 따른 단백질들의 분획현상**

Fig. 3과 4에서 보면 PPB의 몰비율 (K_2HPO_4/KH_2PO_4)이 1.43 (pH 7.4)과 9.55 (pH 8.35)인 두 경우에 일정 PEG 농도에서 PPB 농도가 증가하면 2상계의 상층부 부피는 감소되며 PPB 농도가 20% 이상에서 BSA, ovalbumin, β -lactoglobulin 모두 분획계수 1.0 이상을 기록하게 된다. 또한 상(phase)의 pH가 7.4에서 8.35로 증가하면 2상계 부피비(상층부 부피/하층부 부피)는 다소 감소되면서 비교적 높은 분획계수를 보인

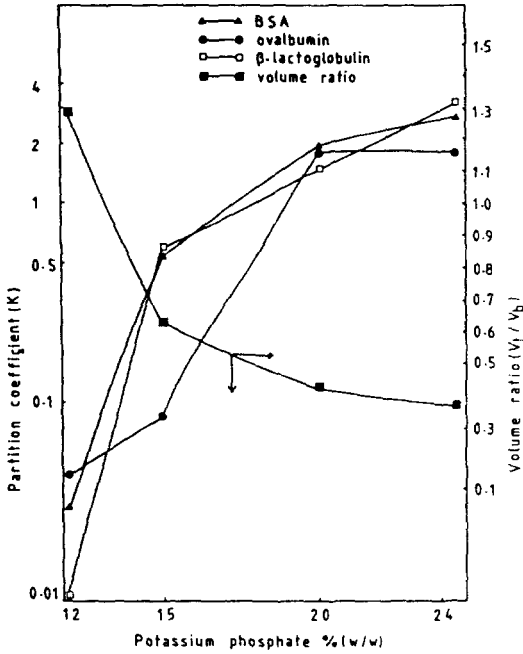


Fig. 3. Comparison of partition coefficient and volume ratio as a function of the concentration of potassium phosphate (PEG 6000, Fluka, 10% (w/w), $K_2HPO_4/KH_2PO_4 = 1.43$ molar ratio, pH 7.4)

다. Kula⁽¹⁾ 등은 PEG-PPB 이상계에서 salting out 효과가 binodial line에서 떨어지는 조성에서 나타나며, 이때 단백질들이 하층부에서 상층부로 이동한다고 하였으며, 상층부에서 용해도가 충분하지 않으면 단백질들은 계면에서 침전될 수 있다고 보고했다. Fig. 5와 Table 3은 일정 PEG 농도(10%)에서 PPB 농도가 14 ~

Table 3. Partition coefficient (K) of proteins obtained near and far away from the binodial line in PEG-PPB two phase system at 20°C (PEG 6000, Fluka; $K_2HPO_4/KH_2PO_4 = 1.43$ molar ratio, pH 7.4)

Protein	Phase position			
	A	B	C	D
BSA	0.042	0.037	0.843	1.388
OA	0.128	0.079	1.970	1.50
β -lacto-globulin	0.049	0.061	1.343	3.62
Lysozyme	0.634	0.265	0.359	3.547
Vol. ratio (V_1/V_2)	1.5	0.66	0.43	0.39

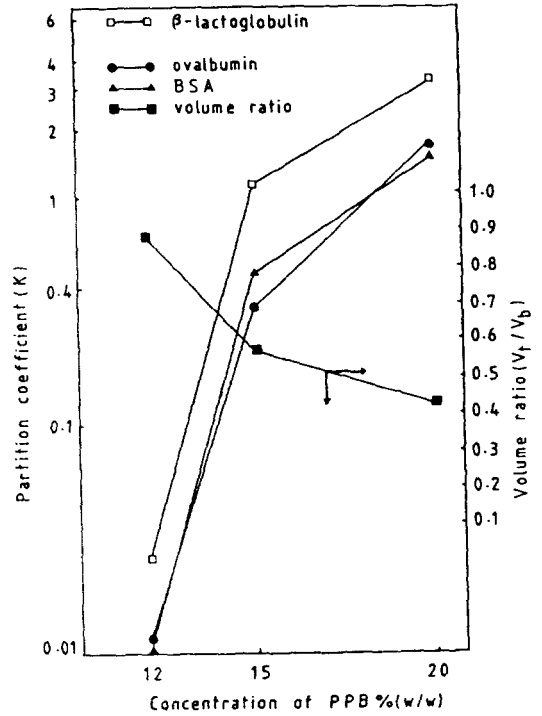


Fig. 4. Partition coefficient (K) of various proteins in the PEG-PPB two-phase system at 20°C with the increasing concentration of PPB. ($K_2HPO_4/KH_2PO_4 = 9.55$ molar ratio, PH 8.35; PEG 6000, 10%, Fluka)

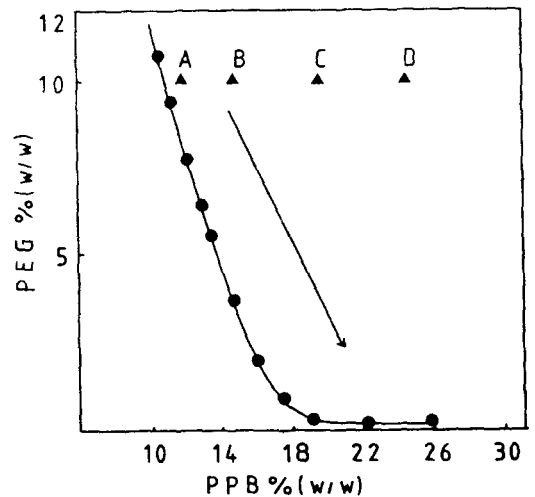


Fig. 5. Phase diagram of the PEG-PPB two-phase system at 20°C

26%로 증가할 때 상층부의 부피비는 1.5에서 0.39로 감소하며 기준 단백질들의 분획계수는 BSA 32배, ovalbumin 12배, β -lactoglobulin 74배, lysozyme

5.6배로 증가되었다. 따라서 PEG-PPB 이상계에서 단백질들의 분획계수를 높이기 위해서는 상층부의 부피를 줄이는 것이 중요한 것으로 사료되며, PEG 농도를 감소 시키면서 PPB농도를 증가시키는 조성(Fig5의 화살표 방향)이 단백질들을 상층부로 이동시키는 조건으로 생각된다.

위와 같은 실험 결과로 PEG/PPB 액상 이상계는 PEG/dextran 액상 이상계보다 상형성을 위하여 높은 농도가 필요하며, 기준 단백질들의 표면 소수성 차이는 상층부(PEG-rich phase)로 거의 이동되지 못하며, PPB-rich phase(하층부)의 전하효과 때문에 대부분 하층부로 단백질들이 이동된다.

또한 PEG/PPB 이상계에 binodial line에 접근하는 조성에서 PEG/dextran 이상계와는 반대로 단백질의 분획계수는 감소하며, 상층부(PEG-rich phase)의 부피가 감소하면서 PEG 농도가 증가할 때 분획계수는 증가하였다. 즉 단백질 분획에 상층부의 부피가 크게 관여하는 것으로 사료되며 단백질의 표면 소수성에 따른 분리를 위해서는 하층부의 전하 효과를 상쇄시키는 조건의 설정이 필요하며, 이러한 조건에서 표면 소수성이 매우 큰 소수성 단백질들이 효과적으로 분리될 것을 예측할 수 있다.

사 의

본 연구는 한국 과학재단 일반 연구조성비의 보조로 수행 되었으며 이 자리를 빌어 감사 드립니다.

요 약

Poly(ethylene glycol)과 인산염 용액(PPB)이 형성하는 액상 이상계에서 단백질의 분획 거동을 관찰하였다. PEG(12%)/PPB(12%) 액상 이상계에서 단백질의 표면 소수성이 다른 BSA, β -lactoglobulin, ovalbumin 모두 PPB-rich phase인 하층부로 몰려 그 분획계수는 대단히 낮았다. PPB의 농도를 15%로 증가시키면 하층부의 전위는 +50mV에서 0으로 낮아져 단

백질의 분획계수가 다소 증가하는 경향을 나타내었다.

PPB의 제2인산염과 제1인산염의 몰 비율을 1.43에서 9.55로 증가시키면 이상계의 상·하층부 부피비(Vt/Vb)가 다소 감소되면서 분획계수는 증가하였다.

PPB농도를 14~26%로 증가시키면 이상계의 부피비는 1.5에서 0.39로 현저히 감소하면서 단백질의 분획계수는 β -lactoglobulin의 경우 74배, BSA 32배, ovalbumin 12배, lysozyme 5배로 크게 증가하였다.

문 헌

1. Kula, M-r., Kroner, K.H. and Hustedt, H.: *Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, D-3300 Braunschweigstockheim, Mascheroder Weg 1.* p. 75
2. 이삼빈, 이철호, 한국식품과학회지, 19(2), 140 (1987)
3. 이삼빈, 이철호, 한국식품과학회지, 19(2), 146 (1987)
4. Hustedt, H., Kroner, K.H., Menge, U. and Kula, M-r.: *in Trend in Biotechnology*, Elsevier Science, Cambridge (1985)
5. Veide, A., Smeds, A.L. and Enfors, S.O.: *Biotechnology and Bioengineering*, 25, 1789 (1983)
6. Veide, A., Lindback, T. and Enfors, S.O.: *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 325 (1984)
7. Hustedt, H., Kroner, K.H., Stach, W. and Kula, M-R.: *Biotechnology and Bioengineering*, 20, 1989 (1978)
8. Reitherman, R. and Flanagan, S.D.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 297, 193 (1973)
9. Albertsson, P.A.: *Partition of cell particles and macromolecules*, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, (1971)
10. 김성구, 이삼빈, 이철호·한국생화학회지, 18(2), 129(1985)

(1987년 1월 17일 접수)