

자유유동 전기이동법에 의한 대두단백질 분리

한 재 갑 · 류 화 원
전남대학교 생물화학공학과

Separation of Soybean Protein by Free-flow Electrophoresis

Jai-Gab Han and Hwa-Won Ryu

Department of Biochemical Engineering
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

ABSTRACT

The effect of operating conditions on separation of soybean proteins in a home-made free-flow electrophoresis apparatus was investigated. Measurement of the pH, conductivity, and UV-absorbance (280 nm) were carried out at each run and the purity of the sample was tested with SDS-PAGE analysis.

The soybean extract pretreated with Tris and boric acid was mixed with the amino acids composed of glutamic acid, histidine, arginine, glycine(1 mM each) with glycyl-glycine(2mM) and KCl(1mM).

When the cellulose acetate was used as a compartment between the electrode and the buffer solution in the cell, pH distribution in the separation cell varied from 3.0 at the anodic side to 8.0 at the cathodic side and had two inflection point. The applied voltage was from 300V to 1000V and the separation was better at a higher voltage but the voltage was limited by the capability of the cooling system due to Joule heat. The proteins focused near the middle of the channel. From the change of pH and conductivity it was found that the ions in the channel moved out to the electrodes through the membrane. In the case when the concentration of the buffer solution was increased 5 times, proteins were focused at 300V. We could not increase up to the ten times of the concentration since the temperature difference between inlet and outlet was more than 25°C and denaturation of proteins was expected. When ion-exchange membranes were used U-type pH distribution was set up due to the ionic polarization near the membrane. The commercial ampholytes, instead of the mixed amino acids showed not much improvements in purity of the separated sample.

서 론

전기이동에 의한 단백질 분리 방법은 19세기 중반에 Wiedemann(1)이 전하를 띤 입자들이 전기장하에서 이동하게 되는 현상을 발견하게 된 것이 시초가 되어 그 연구가 진행되어 오다가 1905년에

Hardy(2)가 단백질의 전기이동도가 전해액의 pH에 크게 의존한다는 것을 발견하게 됨으로써 그 연구가 더욱 활발해지게 되었다. 1930년에는 전기이동법에 의해 Tiselius(3)가 혈청으로부터 α -, β -, γ -globulin을 분리하는데 성공하였다.

현대에 이르러서 전기이동은 생화학이나 분자생물

학, 유전공학 등의 학문의 발전과 함께 생체물질(아미노산, 단백질, 핵산 등)의 혼합물을 분리하여 분석, 정제하는 방법으로 가장 많이 사용하게 되었고, 제약이나 식품학 분야에서도 널리 이용되고 있다 (4, 6).

기존의 전기이동방법은 전기이동시 발생하는 대류(Joule열에 의한)와 확산의 효과를 방지하고 분리된 단백질의 고정화를 위해 아가로오스나 폴리 아크릴 아마이드 등을 포함하는 여러 가지 지지매체를 사용하고 있는데(7, 9) 이러한 방법은 스케일-업(scale-up)이 어렵고, 고가의 지지매체들의 수명이 제한되어 있으며, 다른 분석 방법에 비해 시간이 많이 걸린다. 또한 지지매체로서 겔을 사용할 경우 겔과 단백질 간의 흡착으로 인한 단백질의 손실 등 여러 가지 단점들이 지적되고 있다.

이러한 이유로 최근 들어 M. Bier 등에 의해 자유유동을 이용한 전기이동장치에 관한 연구(10-15)가 활발히 진행되어져 오고 있다. 따라서 본 연구에서는 겔 등의 지지매체를 사용하지 않는 자유유동하에서 전기이동을 이용하여 대우단백질을 사용, 등전점을 이용한 전기이동(12, 13)을 행함으로써, 단백질 분리 효과를 살펴 보고 운전 파라미터의 변화에 따른 분리의 최적 조건을 찾고자 하였다.

장치 및 실험 방법

장치

본 연구에 사용된 실험장치는 전보에서 소개한 것과 동일하다(16). 즉, 분리조는 마주보는 30mm 두께의 아크릴판에 평평한 홈을 파서 유로를 만든 후 1mm 두께의 유리를 부착하여 유체의 마찰에 의한 교란을 최소로 줄이도록 하였다. 그 결과 두 유리판 사이의 간격, 즉 형성되는 유로의 깊이는 0.75mm가 되게 하였다. 유로의 전체폭은 가로 40mm, 세로 180mm이고 가로 40mm를 유체의 출입구에서 폭 1.00mm의 30개의 작은 유로로 세분하여 유체가 출입하도록 함으로써 분리조 내에서 균일한 속도 분포를 가질 수 있도록 제작하였다. 이 유로들을 30개의 실리콘 튜브(내경 1mm)에 각각 연결하여 유체를 순환시켰다. 그리고 유체 흐름에 직각으로 전압을 가해 주기 위해 유로의 좌우편에 백금전극을 설치하였다. 전극에 직접 접촉하는 전해액과 분리조 내의 완충용액 사이에 셀룰로오스 아세테이트 막 또는 이온교환막을 설치하였다. 분리조의 구조와 그 안에서

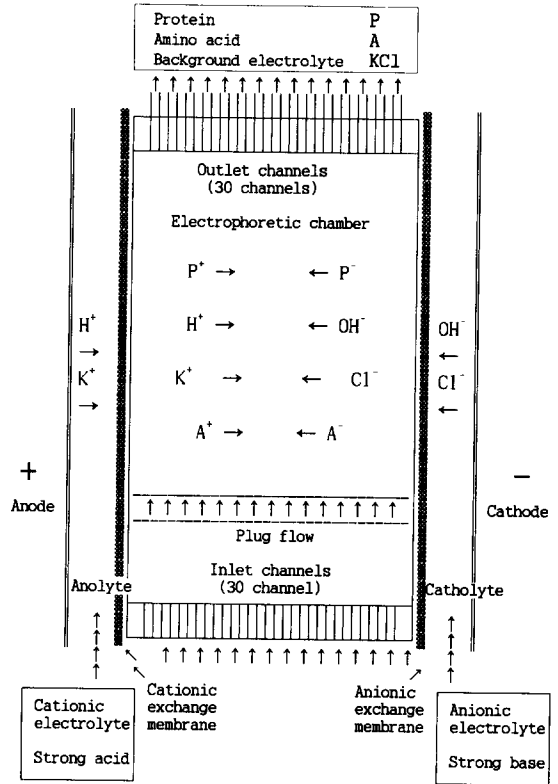


Fig. 1. Details of the electrophoretic chamber.

의 이온의 이동방향은 Fig. 1과 같다.

30개의 유로에 독립적으로 유체를 순환시키기 위해 40개의 채널을 갖는 연동펌프(peristaltic pump)를 자체 제작하였고 Jolue열을 제거하기 위해 가로 30cm, 세로 50cm의 냉각조를 설치하여 30개의 독립된 튜브들이 냉각조를 거치도록 하였다. 또한 분획수집기와 분리조의 뒷면에도 유로를 만들어 냉각을 하였다.

시료의 전처리

실험에 사용한 대두는 전남 보성지역에서 수확한 채래 품종을 사용하였으며 시약은 SIGMA사에서 구입한 것을 그대로 사용하였다.

대두 50g을 Tris 85mM(10.3g/l)과 boric acid 293mM(18.12g/l), sodium ammonium phosphate 15mM(2.06g/l)로 만든 완충용액 150ml에 담가 4°C에서 하룻밤 동안 저장한 후 완충용액 100ml로 가정용 믹서기를 사용하여 2분간 파쇄하였다. 파쇄하여 얻어진 현탁액을 실험실 온도에서 1시

간동안 잘 저어준 후 나이론 체를 사용하여 여과하였고, 여과후의 고형물을 완충용액 200ml로 2회 세척한 후 같은 방법으로 다시 여과하였다. 얻어진 용액을 원심분리기(한일, 모델 H50A-6)를 사용하여 12,000rpm에서 30분 동안 원심분리하였다. 산성 단백질을 침전시키기 위해 인산(85%, w/v)을 이용하여 pH 5.0으로 적정하여 4°C에서 하룻밤 동안 저장한 후 12,000rpm에서 30분 동안 다시 원심분리하였다. 원심분리한 용액을 여과지를 이용하여 여과하였으며, histidine 10mM 용액으로 투석시킨 후 하룻밤 동안 저장하였다가 12,000rpm에서 30분간 원심분리하였다. 이렇게 얻어진 대두 시료의 pH는 6.1이었으며, 이 시료를 본 실험에 사용하였다.

방법

공급액에 포함되어진 완충액으로는 glutamic acid(Glu), histidine(His), arginine(Arg), glycine(Gly)등의 아미노산과 dipeptide로 glycyL-glycine(Gly-Gly)을 사용하였고, 배경 전해액으로는 KCl을 사용하였다. 그리고 양전해액(anolyte)으로는 강산(HCl 또는 H₂SO₄)과 glutamic acid를, 음전해액(catholyte)으로는 강염기(KOH)와 arginine을 사용하였다. 각 물질의 pK값과 pI값은 Table 1과 같다.

공급액은 완충액 300ml에 준비된 대두시료 20ml를 첨가하여 사용하였고, 분리조 및 30개의 튜브에 용액이 다 채워지고 나면 다시 80ml를 뽑아낸 후 나머지 240ml를 가지고 실험을 행하였다.

공급액에 포함되어진 완충액의 조성과 양전해액 및 음전해액의 완충용액 조성에 따른 분리효과를 살펴보고자 양전해액 및 음전해액의 완충액 조건과 공급액의 아미노산 농도를 변화시켜 주면서 실험을 행하였고, 시간에 따른 분리효과를 살펴 보기 위해 분리시간을 증가해 가면서 실험을 행하였다. 그리고 전압을 500V, 1000V로 변화시키면서 적용된 전압의 차이에 따른 분리효과를 살펴 보았다. 또한 양전해액과 공급액, 그리고 음전해액과 공급액을 분리시키기 위해 셀룰로오스막을 사용하였을 경우와 이온교환막을 사용하였을 경우의 분리효과를 살펴 보았으며, 상품화된 합성 carrier ampholyte(Bio-Rad, Biolyte pH3-10)를 사용하여 분리한 경우와 아미노산 완충액을 사용하였을 경우를 서로 비교하였다.

각각의 실험에 대해 pH(Orion Research Inc., 720A) 및 전기전도도(ECO Instrument Co., Model

Table 1. Dissociation constants in aqueous solutions at 298K(17).

Species	pK ₁	pK ₂	pK ₃	pI
<i>Peptide</i>				
Gly-Gly	3.06	8.13	—	5.60
<i>Amino acids</i>				
Glu	2.10	4.07	9.47	3.09
Gly	2.34	9.60	—	5.97
His	1.82	6.04	9.12	7.58
Arg	2.02	9.04	12.48	10.76
<i>Soybean Protein</i>				
Glycinin	—	—	—	5.02

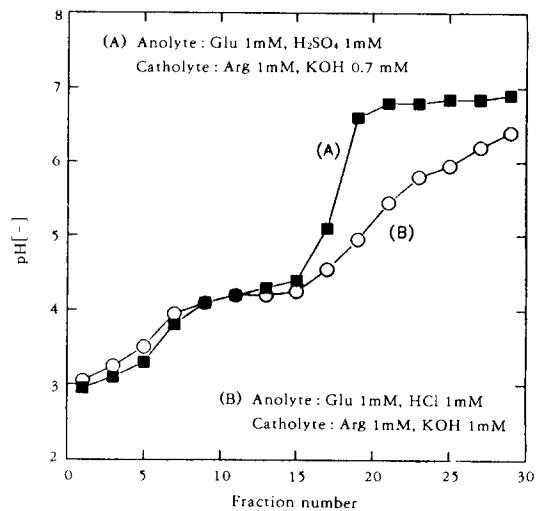


Fig. 2. Dependence of pH distribution upon buffer composition of the anolyte and the catholyte (Feed : KCl 1mM, Glu 1mM, Gly 1mM, His 1mM, Arg 1mM, GlyGly 2mM, $\Delta V = 500V$, $t = 1hr$).

C-525), UV-흡광도(280nm)(Hewlett Packard 8452A Spectrophotometer)를 측정하였으며, SDS-PAGE(18)를 행하여 Coomassie Brilliant Blue R250으로 염색한 후 다시 탈색하여 대두 단백질의 분리 정도를 살펴 보았다.

결과 및 고찰

완충액의 변화에 따른 pH 분포

양전해액과 음전해액의 완충용액 조건을 달리 하면서 500V 전압하에서 1시간 동안 실험을 행한 결

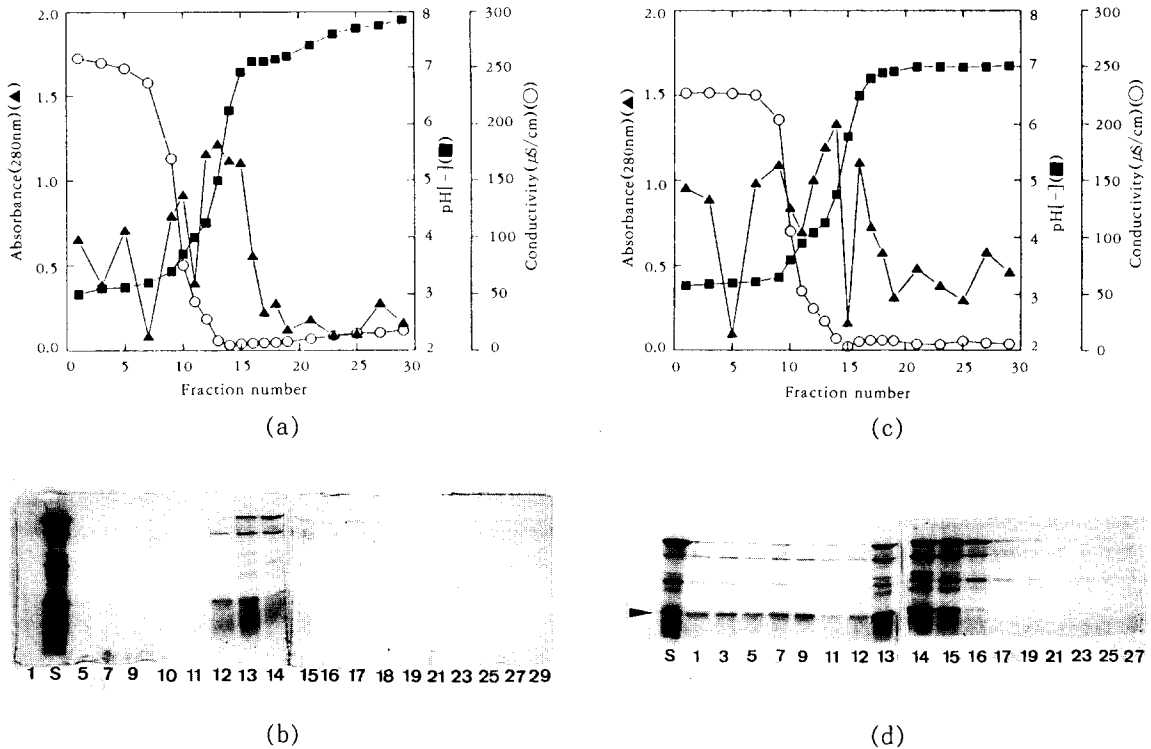


Fig. 3. Effect of run time on separation (Anolyte:Glu 1 mM, HCl 1mM, pH=3.4, K=135.0 μ S/cm, Feed : KCl 1mM, Glu 1mM, Gly 1mM, His 1mM, Arg 1mM, GlyGly 2mM, Sample 20cc, pH=6.5, K=113.5 μ S/cm, Catholyte:Arg 1mM, KOH 1mM, pH=10.8, K=77.0 μ S/cm). (a) t=2hr, \mathcal{N} =500V. (b) Coomassie Brilliant Blue R250 stained SDS-PAGE analysis of selected fractions from the experiment of (a). (c) t=3hr, \mathcal{N} =500V. (d)Coomassie Brilliant Blue R250 stained SDS-PAGE analysis of selected fractions from the experiment of (c).

과는 Fig. 2와 같다. 이때 전해액의 분리막으로는 셀룰로오스막을 사용하였다. Fig. 2 중의 (A)는 양전해액으로 Glu 1mM과 H₂SO₄ 1mM를 사용하고 음전해액으로 Arg 1mM과 KOH 0.7mM을, 그리고 (B)는 양전해액으로 Glu 1mM과 HCl 1mM를 사용하고 음전해액으로 Arg 1mM과 KOH 1mM를 사용하여 실험한 것이다. 그 결과 (B)의 pH 분포가 더 완만한 구배를 갖는 곡선으로 얻어졌다. 이후의 실험에서 완충용액의 조성은 특별한 언급이 없으면 (B)와 동일한 것을 사용하였다.

시간에 따른 분리효과
시간에 따른 분리효과를 살펴 보기 위해 실험시간

을 2시간, 3시간으로 바꾸어 주면서 실험한 결과는 Fig. 3(a)-(d)와 같다. pH 분포는 양극쪽에서 3, 음극쪽에서 8 정도의 값을 가졌으며 분리조의 채널 14번과 20번 부근에서 변곡점을 가졌고 그림에는 포함되지 않았으나 시간이 지남에 따라 음극쪽(그림의 우측)의 pH는 8에서 7로 약간 떨어짐을 관찰할 수 있었다.

전기전도도는 pH 분포와 반대로 양극쪽에서 257.3 μ S/cm로부터 음극쪽에서 21.2 μ S/cm의 값으로 지속적으로 변화하였으며 3시간이 지난 후에는 각각 200.0, 10.5 μ S/cm로 약간 감소함을 볼 수 있었다. 이것은 분리조내의 이온들이 점점 전극쪽으로 빠져나가고 있음을 보여준다. 중심 부근에서 흡광도는

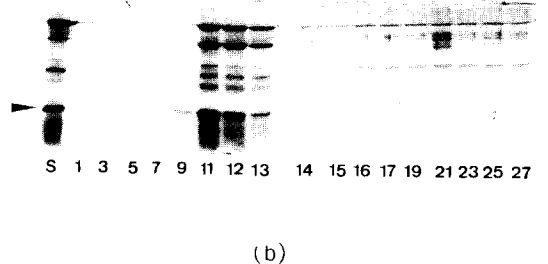
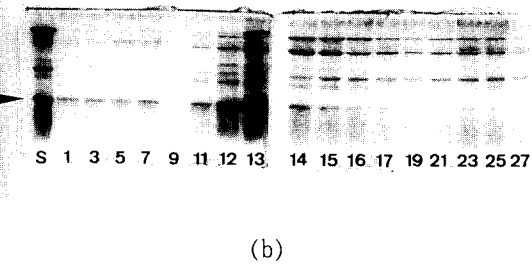
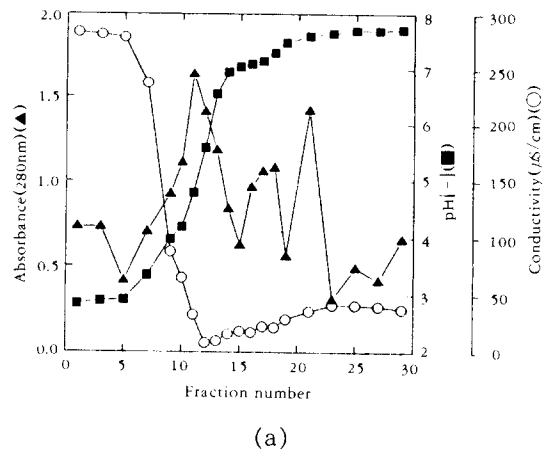
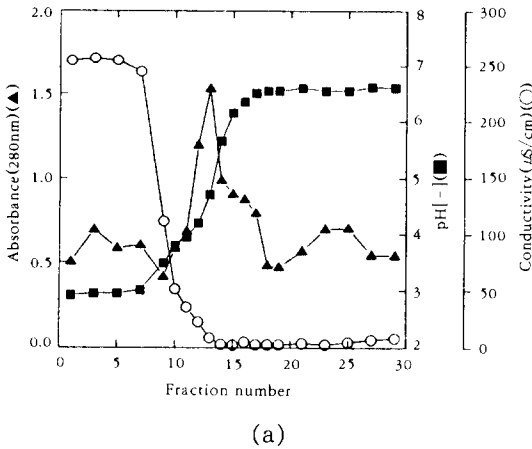


Fig. 4. Separation of soybean protein at a higher voltage applied. (a) Anolyte:Glu 1mM, HCl 1mM, pH=3.4, K=135.0 μS/cm, Feed:KCl 1mM, Glu 1mM, His 1mM, Arg 1mM, GlyGly 2mM, Sample 20cc, pH=6.5, K=113.5 μS/cm, Catholyte:Arg 1mM, KOH 1mM, pH=10.8, K=77.0 μS/cm (Initial voltage 500V, Voltage was changed to 1000V after 10min, t=3hr). (b) Coomassie Brilliant Blue R250 stained SDS-PAGE analysis of selected fractions from the experiment of (a).

Fig. 5. Separation of soybean protein at a higher buffer concentration. (a) Anolyte:Glu 5 mM, HCl 5mM, pH=2.7, K=1.04mS/cm, Feed :KCl 5mM, Glu 5mM, His 5mM, Arg 5mM, GlyGly 10mM, Sample 20cc, pH = 6.8, K=246.6 μS/cm, Catholyte :Arg 5mM, KOH 5mM, pH=11.1, K=227.3 μS/cm (Initial voltage 300V, Voltage was changed to 500V after 10 min, t=3hr). (b) Coomassie Brilliant Blue R250 stained SDS-PAGE analysis of selected fractions from the experiment of (a).

시간이 지남에 따라 더욱 증가하였는데 이것은 SDS-PAGE 분석에서 볼 수 있듯이 단백질의 집속이 더 진행된 것을 나타낸다. 실험시작시 분리조 전체에 고루 혼합되어 있던 단백질들이 분리조 중심 부근에서 집속이 되는 이유는 이 부근에서 pH 변화와 전기전도도 변화가 있기 때문으로 보인다. 즉 전기전도도가 낮은 영역에는 높은 전압이 가해지고 있어

음극쪽에 있던 낮은 pI를 갖는 단백질들이 양극쪽으로 이동하다가 전기전도도가 갑자기 높아지는 부분에 이르게 되면 전압이 낮아져 이동속도가 현저히 감소하게 됨으로써 이 부근에 단백질이 모이게 되는 것이다. 한편 대두단백질 중 낮은 pI를 갖는 glycinin (pI=5.02, 그림에서 화살표시)은 더 양극쪽으로 진행하여 분리가 이루어지게 된다.

전압의 변화에 따르는 분리효과

Fig. 4(a), (b)는 처음 10분 동안만 500V를 가한 후 즉시 1000V로 전압을 2배로 증가시켜 3시간 동안 실험한 결과를 나타낸 것이다. 분획번호 13번을 중심으로 단백질의 집속이 일어났으며 500V에서 얻은 결과인 Fig. 3(c), (d)와 비교해 볼 때 glycinin은 분획번호 1번부터 7번까지에서 훨씬 순수하게 정제된 것을 얻을 수 있었다. 그러나 전압을 더 이상 높일 경우 Joule열의 발생이 심해져 전압을 높이는 데는 한계가 있었다.

완충용액의 농도 증가에 따른 분리효과

완충액의 농도를 증가 시킬 경우, 이에 따른 분리효과를 알아 보고자 양전해액과 음전해액 및 공급액의 완충액 농도를 각각 5배로 증가 시킨 후 초기에 300V 전압으로 시작하여 10분 후에 500V로 전압을 증가시켜 3시간 동안 실험을 행한 결과를 보면 Fig. 5(a), (b)와 같다. 이처럼 전압을 높게 할 수 없었던 이유는 Joule열의 발생이 심해 분리조 내의 유체의 온도가 높아지기 때문이다. 그런데 낮은 전

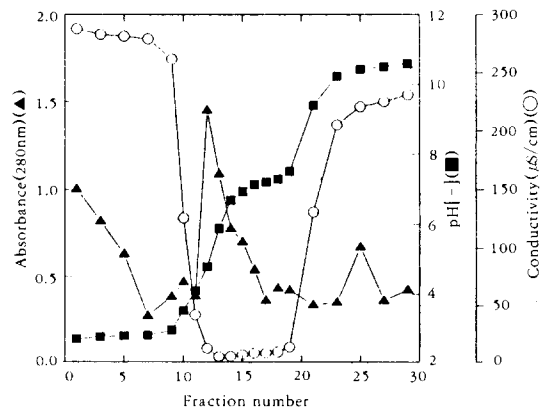
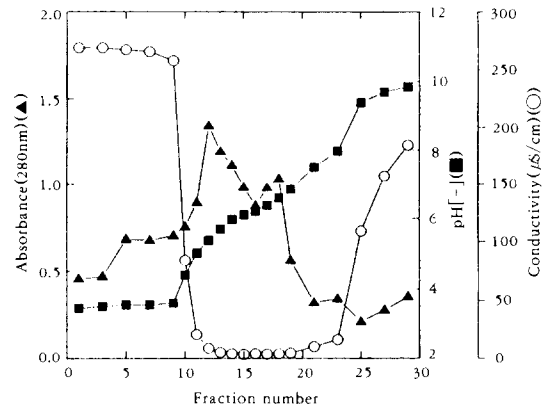
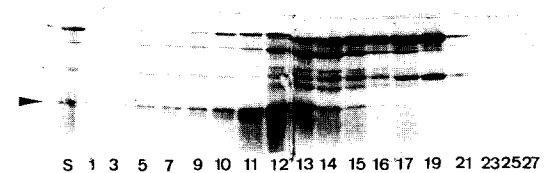


Fig. 6. Effect of ion exchange membrane on pH, conductivity and absorbance in the separation chamber (Anolyte:Glu 1mM, HCl 1mM, pH=3.4, K=135.0 μ S/cm, Feed:KCl 1mM, Glu 1mM, Gly 1mM, His 1mM, Arg 1mM, GlyGly 2mM, Sample 20cc, pH=6.5, K=113.5 μ S/cm, Ca-tholyte:Arg 1mM, KOH 1mM, pH=10.8, K=77.0 μ S/cm. Voltage was changed from 500V to 1000V after 30 min, t=3 hr).

압을 가했음에도 불구하고 집속이 대체로 잘 이루어졌으며 높은 분자량을 갖는 단백질들이 분획 14번에서 27번까지에서 분리되어지고 있음을 볼 수 있다. 순수한 glycinin은 분획번호 9번에서만 얻을 수 있었다. 그러나 완충액의 농도를 더 높여 10배로 증가시킬 경우 같은 조건에서 분리조 출입 전후의 온도차가 25 $^{\circ}$ C 가까이 되어 단백질의 변성이 우려되므로 전압을 낮추어야 했고 그 경우 분리효과는 훨씬 더 떨어짐으로 완충용액의 농도를 과도하게 높게 해서는 안됨을 알 수 있었다.



(a)



(b)

Fig. 7. (a) Effect of commercial synthetic carrier ampholyte (Biolyte, pH 3-10) on separation (Anolyte:Glu 5mM, HCl 5mM, pH=2.7, K=1.04mS/cm, Feed:Biolyte 0.1%, Sample 20cc, pH=6.7, K=75.0 μ S/cm, Catholyte:Arg 5mM, KOH 5mM, pH=11.1, K=227.3 μ S/cm. Voltage was changed from 500V to 1000V after 30 min, t=3 hr). (b) Coomassie Brilliant Blue R250 stained SDS-PAGE analysis of selected fractions from the experiment of (a).

이온교환막을 사용하였을 경우의 분리효과

분리조 내에서의 완충용액과 전극이 있는 전해액을 분리해 주기 위하여 사용한 셀룰로오스막 대신 이온교환막을 사용할 경우 500V, 3시간 후의 pH, 전기전도도, 흡광도의 분포는 Fig. 6과 같다. 먼저 pH 분포를 보면 이온교환막의 경우에서는 2개의 변곡점이 뚜렷이 나타나고 있고 pH값에 있어서도 3에서부터 약 11까지 매우 넓은 분포를 이루고 있음을 볼 수 있다. 전기전도도의 분포는 매우 독특한 것을 볼 수 있는데 음극쪽과 양극쪽의 높은 전기전도도가 중앙에서 낮아짐으로써 그 모양이 U자 형태를 이루고 있음을 알 수 있다. 이것은 이온교환막을 통해 전해액으로부터 전하를 띤 이온들이 분리조 내로 들어와 분극화 현상을 일으키고 있음을 보여 준다.

상용의 합성 Carrier Ampholyte를 사용하였을 경우의 분리효과

공급액의 완충용액으로 상업용 합성 carrier ampholyte인 Biolyte 0.1%와 이온교환막을 사용하여 500V 전압으로 시작하여 30분 후에 전압을 1000V로 증가시켜 3시간 동안 실험을 행한 결과를 보면 Fig. 7(a), (b)와 같다.

분리효과에 있어서 공급액 완충액으로 아미노산 등을 사용하였을 경우와 별다른 차이가 없음을 알 수 있었으며, 이는 고가의 상용 ampholyte를 사용하지 않고서도 본 실험에서와 같이 적절한 범위의 pI 값을 갖는 아미노산을 사용함으로써 동일한 분리효과를 가져올 수 있음을 보여 주고 있다.

요 약

실험실에서 자체 제작한 자유유동 전기이동 장치에서 등전집속법을 이용한 대두 단백질의 분리를 통해 운전 조건들이 분리에 미치는 영향을 조사하였다. 매 실험마다 pH, 전기전도도, UV-흡광도(280nm) 등을 측정하였고 시료의 순도는 SDS-PAGE 분석을 통해 점검하였다.

Tris와 boric acid로 처리한 대두단백질 추출액에 glutamic acid, histidine, arginine, glycine 등 아미노산 각 1mM과 dipeptide로 glycyl-glycine 2mM, 배경 전해액으로서 KCl 1mM로 구성된 시료의 완충액을 혼합하여 시료로 사용하였다.

분리막을 셀룰로오스 아세테이트를 사용할 경우 pH는 양극쪽에서 3, 음극쪽에서 8 정도의 값을 보

였으며 2개의 변곡점을 나타내었다. 가해진 전압은 300V에서 1000V의 범위였으며 전압이 높을수록 더 나은 분리도를 얻었으나 전압을 더 높일 경우 과도한 Joule열의 발생으로 인해 한계가 있었다. 시간이 지남에 따라 단백질들은 분리조 중앙 부근에서 집속이 일어났으며 pH와 전기전도도의 변화로부터 분리조내의 이온들이 막을 통해 전극쪽으로 이동해 가고 있음을 알 수 있었다. 완충용액의 농도를 5배로 증가시킬 경우 300V에서 좋은 집속을 얻었으나 10배 이상으로 농도를 높일 경우에는 분리조 입구와 출구의 유체 온도차가 25°C 이상이 되어 단백질의 변성이 일어날 수 있어 더 높일 수 없었다. 이온교환막을 사용할 경우 이온의 분극화현상을 일으켜 U자 형태의 전기전도도 분포를 나타내었다. 아미노산 혼합물 대신 상용의 ampholyte를 사용하더라도 분리도에 있어 큰 차이가 없었다.

감 사

본 연구는 생물공정연구센터의 지원과 한국과학재단 일반목적기초연구비(911-1005-030-2)의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 대하여 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. G. Wiedemann(1858), *Pogg. Ann.*, 104, 166.
2. W. B. Hardy(1905), *J. Physiol.*(London), **33**, 251.
3. A. Tiselius(1930), *Nova Acta Regiae Soc. Sci. Ups.*, Ser.IV, 7, No 4, 1.
4. J. Caslavská, W. Thormann and P. Gebauer (1991), *J. of Chromatogr.*, **585**, 145.
5. F. Kilar and S. Hjerten(1989), *J. of Chromatogr.*, **480**, 351.
6. S. Nath, H. Schutte, G. Weber, H. Hustedt and W. D. Deckwer(1990), *Electrophoresis*, **11**, 937.
7. A. T. Andrews(1986), *Electrophoresis: Theory, Techniques, and Biomedical and Clinical Applications*, Clarendon, Oxford.
8. B. D. Hames and D. Rickwood(1990), *Gel Electrophoresis of Proteins*, IRL, Oxford.
9. R. K. Scopes(1988), *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag.

10. M. Bier, G. E. Twitty and J. E. Sloan(1989), *J. of Chromatogr.*, **470**, 369.
11. M. Bier, T. Long(1992), *J. of Chromatogr.*, **604**, 73.
12. H. W. Ryu, M. Bier and T. Long(1990), *Sep. Sci. Tech.*, **25**, 997.
13. J. E. Sloan, W. Thormann, G. E. Twitty and M. Bier(1988), *J. of Chromatogr.*, **457**, 137.
14. S. N. Zheng, T. Yonemoto and T. Tadaki (1991), *J. Chem. Eng. Japan*, **22**, 471.
15. S. A. Shukun, A. V. Gavryushkin, V. N. Brezgunov and V. P. Zavyalov(1988), *J. of Chromatogr.*, **432**, 137.
16. 류화원, 이동일, 장호남(1994), *한국생물공학회지*, **9**, 114.
17. G. W. V. Kortum and K. Andruss(1961), *Dissociation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*, Butterworth Pub., London, 381.
18. D. M. Bollag and S. J. Edelstein(1991), *Protein Methods*, Wiley-Liss.