

HPMC와 GFC에 의한 유청 단백질의 분리

홍승범 · 최두영 · 노경호[†]

조정밀분리기술센터, 인하대학교 공과대학 화학공학과
(2001년 7월 20일 접수, 2001년 8월 29일 채택)

Separation of Whey Proteins by High Performance Membrane Chromatography and Gel Filtration Chromatography

Seung Bum Hong, Du Young Choi and Kyung Ho Row[†]

Center for Advanced Bioseparation Technology, Dept. of Chem. Eng., Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received 20 July 2001; accepted 29 August 2001)

요 약

본 연구에서는 유청 단백질 중에서 α -lactalbumin과 β -lactoglobulin을 HPMC(High Performance Membrane Chromatography)와 GFC(Gel Filtration Chromatography)를 이용하여 분리하였다. 이동상 조성과 구배용매 조성법에 따른 각기 유청 단백질의 분리도를 고찰하여 최적 이동상을 구하였다. HPMC의 분리 메커니즘은 음이온 교환작용이며 고정상은 CIM DEAE, QA disk (16×3 mm), 이동상은 buffer A(20 mM Tris-HCl, pH 7.3)와 buffer B(buffer A+1 M NaCl)을 사용하였다. 최적 이동상은 Buffer A/Buffer B=100/0-30/70 vol%, gradient time 1 min, 30/70-10/90 vol%, gradient time 2 min을 실험적으로 얻었고, 4 ml/min의 이동상 유속에서 5분내에 α -lactalbumin과 β -lactoglobulin을 분리할 수 있었다. 분자량의 차이가 분리 메커니즘인 GFC에 의해서는 이동상으로 물(100%)인 일정용매 조성법과 buffer A(water+0.1% v/v TFA)와 buffer B(ACN+0.1% v/v TFA)를 사용하여 구배용매 조성법으로 분리하였다. 음이온교환 메커니즘에 의한 HPMC가 크기배제의 원리에 의한 GFC 보다 α -lactalbumin과 β -lactoglobulin을 더 잘 분리하였다.

Abstract – α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey proteins were separated by HPMC(High Performance Membrane Chromatography) and GFC(Gel Filtration Chromatography). The separation mechanism of HPMC was anion-exchange, and the stationary phases were anion CIM(Convective Interaction Media) DEAE and QA disks(16×3 mm). Two types of mobile phase were used, buffer A(20 mM Tris-HCl, pH 7.3) and buffer B(buffer A+1 M NaCl). The optimum mobile phase and operating condition were buffer A/Buffer B=100/0-30/70 vol%, gradient time 1 min, 30/70-10/90 vol%, gradient time 2 min. In this experimental condition, α -lactalbumin and β -lactoglobulin were separated within 5 min at a mobile phase flow rate of 4 ml/min. In GFC, characterized by size exclusion, water in isocratic mode and water with TFA in gradient mode were utilized as mobile phases. Separation of the two whey proteins was performed better by HPMC than by GFC.

Key words: HPMC, GFC, Anion-Exchange, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin

1. 서 론

우유를 이용해 치즈를 제조할 때 함께 생산되는 유청 단백질의 항균 항 바이러스 효과는 면역증강을 유도해 암 발생을 억제하는 등의 생리 활성 기능을 나타낸다는 연구결과가 발표되면서 이를 이용한 기능성제품 개발이 활기를 띠고 있다[1]. 유청 단백질의 근 단백질 반응 연구에서 유청에 함유된 락토펜, 락토펜리신, 글루타치온의 항 산화력은 산화적인 운동대사의 증가로 발생된 반응물질의 손상효과를 감소시키는 것으로 발표했고, 또한 유청 속의 비피더스인과 글리코마크로펩타이드는 건강한 장을 만들어 운동선수들이 느끼는 증상 및 위장의 통증을

경감시키며, 유단백질 클루타민 등의 영양공급으로 근육손상과 상부 기도감염의 가능성을 감소시키고 빠른 회복을 돕는다는 사실을 알아냈다고 덧붙였다. 그 중에서도 유청 단백질의 acid stability, gelation, film formation, aeration, 그리고 emulsification과 같은 기능적 특성과 우수한 영양적 가치에 의해 식품 재료로서 사용하기 위해 이들 자체 성질의 연구와 이용을 위한 여러 기술을 연구 및 응용하게 되었다. 예전에는 대부분 그냥 버려졌던 유청이 이러한 효과를 인식하고 난 후 큰 연구과제가 되었다[1].

유청을 구성하는 주요 단백질은 α -lactalbumin, β -lactogloblin, bovine serum albumin(BSA), immunoglobulin(IgG)이다. 또한 소량의 lactoferrin, lactollin, glycoprotein, 그리고 blood transferrin 등의 단백질이 존재한다 [2]. 유청 구성 단백질들의 각각의 성질과 함량 등은 Table 1과 같다. α -lactalbumin은 14,000 달톤으로 주로 유아의 소화촉진제로 사용되고 있

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: rowkho@inha.ac.kr

Table 1. Molecular masses and isoelectric points for whey proteins

Protein	Proportion of skim milk protein(%)	Concentration in whey(g/l)	Proportion of total whey protein(%)	Isoelectric point (pI)	Molecular mass
β-lactoglobulin	7-12	3.0	50	5.35-5.49	18,300
α-lactalbumin	2-5	0.7	12	4.2-4.5	14,000
Immunoglobulins(IgG)	1.9-3.3	0.6	10	5.5-8.3	150,000-1,000,000
Bovine serum albumin	0.7-1.3	0.3	5	5.13	69,000
Proteose-peptone fraction	2-6	1.4	23		4,100-40,800
Total whey proteins	15-22	6.0	100		

다[3]. β-lactoglobulin은 유청 단백질의 반을 차지하고 이의 단위체의 분자량은 18,300 달톤이고 pH 3.5-7.5 사이에서는 dimer로 존재한다. 유청 단백질은 단백질의 특성상 열에 굉장히 민감하고 변성의 정도는 단백질의 구성 및 농도, pH, 이온의 세기, 그리고 온도와 노출시간에 달려 있다. 유청 단백질은 여러 종류와 다양한 분자량을 갖은 물질들로 구성되어 있기 때문에 분석을 하기 전에 다양한 전처리 과정을 거쳐서 분석을 하게 된다. 여러 가지 방법 중에서도 한외여과(ultrafiltration)는 가장 일반적인 전처리 과정으로 널리 사용하고 있다. 이는 유청을 적절한 온도와 pH에서 각 분자의 분자량 차이로 걸러 다양한 비율로 분리할 수 있다. 일반적으로 한외여과에 의한 농축된 유청 잔류물에는 18-22%의 단백질이 함유되었다[4].

고성능 막 크로마토그래피(High-Performance Membrane Chromatography, HPMC)는 최근 들어 많은 연구가 진행되고 있는 크로마토그래피의 기술 중에 하나로 생 고분자물질의 분리와 정제에서 탁월한 효과가 있다[5, 6]. 막은 세공크기와 흡착에 의한 물질의 분리가 이루어지는 반면 기존의 HPLC에서는 컬럼에 충전된 흡착제와 이동상간의 확산, 입자사이의 흡착과 탈착의 메커니즘으로 분리가 되는데 상용되는 흡착제의 대부분은 다공성 입자이다. 현재 가장 효율적인 HPMC 분리 기술에서 사용하고 있는 막의 형태는 미세공 조적을 가진 평막과 중공사막, membrane stacks, radial flow cartridge 등의 고정상을 사용하여 분리한다[7]. 순도가 높고 더 많은 양의 생물학적 분자를 분리해 내기 위해서는 공정 시간을 단축할 필요가 있다. 이러한 측면에서 볼 때 HPMC의 빠른 분리 시간은 커다란 이점을 가지고 있다. HPMC의 분리 메커니즘은 친화성 상호작용, 이온교환 작용, 소수성 상호작용과 역상이다[8]. 적당한 buffer의 선택은 이온교환 분리방법의 성공에 있어서 상당히 중요한 부분을 차지하고 있다. HPMC의 주요 응용 분야로는 단백질 정제와 의학분야이다[9]. 최근 HPMC의 응용 범위는 plasmid DNA, peptides, oligonucleotides와 polynucleotides, 분자들의 분리에 응용되고 있다. 현재 사용되고 있는 막의 분리기능은 대부분 물리적 기능으로 분리 정도가 낮기 때문에 현재 응용되고 있는 것이 막 크로마토그래피이다. 또한 기존의 컬럼 크로마토그래피와의 호환성이 좋아서 효율적으로 단백질 분석에 응용될 수 있다[10]. 본 연구에서는 Monolithic Convective Interaction Media(CIM) DEAE(diethylaminoethyl), QA(quaternary amine) disk를 사용하였다. 단백질은 이온교환 작용에 의해서 분리가 되며, DEAE와 QA는 음이온 교환 disk로 사용하였다. CIM disk의 음이온 교환 작용기와 단백질 분자들이 이동상조성에서 해리가 되면서 단백질 분자들은 음이온의 성질을 가지게 되고, disk의 활성화된 작용기(DEAE, QA)는 양이온의 극성을 가지게 되면서 분리가 일어나게 된다[11]. 이때 단백질 분자의 등전점(isoelectric point)와 buffer인 염의 농도가 중요한 분리 메커니즘의 인자로 작용하게 된다. 따라서 구매용매 조성으로 최적의 분리 조건을 찾는 것이다[12].

크기배제의 한 종류인 겔 여과 크로마토그래피(gel-filtration chromatography, GFC)는 용질분자의 크기와 모양에 따라서 충전입자의 작은 구멍으로 용질분자가 침투하는 것에 기초한다. 컬럼 선택을 위해 고려할 사항은 sample의 물에 대한 용해도, sample에서 분자 크기 분포, packing에 대한 용매의 적합성이다. 겔 여과에 사용되는 겔 비드의 biogel(폴리아크

릴아마이드), bioglass(다공성 규산염유리), 그리고 폴리스티렌 비드가 있다[13]. GFC의 특징은 분리 중 반응이나 파괴가 없다는 것이다. 그 외에 GFC는 다른 정제 방법에서 문제되던 시간의 길이를 최소화할 수 있고, 식품이나 환경, 의약품 산업에서 사용되는 복잡한 혼합물을 분석하는데 있어 전처리 방법으로 사용한다.

본 연구에서는 유청 단백질 중에서 α-lactalbumin과 β-lactoglobulin를 HPMC와 GFC에 의해서 분리하는 실험조건을 구하는 것이다. 유청 단백질을 HPMC로 분리하기 위한 메커니즘은 이온교환 작용이며 정지상은 CIM disk를 사용하였다. 실험을 통해서 이동상 조성과 조업방법에 따른 각기 유청 단백질의 분리도를 고찰하여 최적 이동상을 구하는 것이 연구목적이다.

2. 실험

2-1. 실험재료

유청과 표준시료인 α-lactalbumin과 β-lactoglobulin은 Sigma에서 구입하였고, 이동상으로 Tris(base)는 J. T. Baker(USA), NaCl은 동양화학에서 구입하였다. GFC에서 buffer로 사용한 TFA(Tri-Fluoroacetic Acid)는 Sigma에서, 아세트나이트릴은 덕산화학에서 구입하였다. 증류수는 감압 펌프(Division of Millipore, Waters)와 필터(HA-0.5 μm, Division of Millipore, Waters)를 이용하여 여과한 후에 사용하였다.

2-2. 실험기기

2-2-1. Convective Interaction Media(CIM)

고정상으로는 BIA Separations(Slovenia)사에서 구입한 직경이 16 mm, 두께가 3 mm인 Monolithic Convective Interaction Media(CIM)인 DEAE(diethylaminoethyl), QA(quaternary amine)를 사용하였고, 재질은 poly(glycidyl-methacrylate-co-ethyleneglycol dimethacrylate)이다.

2-2-2. Gel Filtration Chromatography(GFC)

GFC에 사용된 컬럼은 Phenomenex(USA)사에서 구입한 PolySep-GFC-P series를 사용하였고, 여과 한계가 5×10^4 달톤인 PolySep-GFC-P3000(300×7.8 mm)을 사용하였다.

2-2-3. 한외여과

한외여과 장치는 Amicon 8400(USA) model을 사용하였고, 필터는 분자량 10,000과 30,000을 사용하였다. HPLC는 Waters사의 600E 펌프(multisolvent delivery system), 490 UV-visible tunable wavelength absor- bance(280 nm로 고정), Rheodyne 주입기(50 μl sample loop), 데이터 저장 시스템은 Chromate(ver. 3.0, Interface Eng.)를 사용하였다.

2-3. 실험방법

본 실험에서는 CIM은 약 음이온 교환막인 DEAE와 강 음이온 교환막 QA disk를 고정상으로 사용하였고, 이동상은 buffer A(Tris-HCl, pH 7.4)와 buffer B(buffer A+1 M NaCl)를 사용하였고 이동상의 유량은 4 ml/min으로 실험하였다. Disk는 아크릴로 된 housing에 장착하여 HPLC에 연결하여 사용하였다. GFC에서는 물 100%를 이동상으로 사용하는 방

법과 buffer A(water+0.1%v/v TFA)와 buffer B(ACN+0.1%v/v TFA)를 이동상으로 하는 구배용매 조성법을 적용하였고 이동상의 유량은 1 ml/min으로 하였다. HPMC나 GFC로 유청 단백질을 분리하기 위해서는 유청 단백질의 특성상 전처리 과정이 필요하다. 유청 파우더 10g을 DI Water 100 ml에 녹인 용액을 Amicon 8400(USA) model의 Ultrafiltration(Operation condition-max. 75 psi)을 사용하였다. 한외여과로 분자량의 크기에 따라, 분자량 10,000에서 α -lactose를 여과한 후, 분자량 30,000 제거용 막을 사용하여 lactose가 제거된 α -lactalbumin과 β -lactoglobulin을 여과하여 20 μ l씩 주입하였다.

3. 결과 및 고찰

유청 단백질 중 α -lactalbumin과 β -lactoglobulin을 분리하기 위해서 CIM monolith 컬럼인 약 음이온 교환막(DEAE)과 강 음이온 교환막(QA)을 사용하여 분리하였다. 먼저 유청 파우더를 DI water에 녹여 한외여과 필터 10,000을 통과하여 α -lactose를 제거한 후 30,000 필터를 통과하여 분자량이 비슷한 α -lactalbumin과 β -lactoglobulin을 포집하여 샘플로 사용하였다. 또한 단백질의 크기와 모양에 따라 충전입자의 작은 구멍으로 용질분자가 침투하는 원리를 이용한 GFC의 분리특성을 HPMC와 비교하였다.

3-1. CIM에 의한 분리

Fig. 1은 강 음이온 막인 QA(quaternary amine)을 고정상 disk로 사용하여 분리한 크로마토그램이다. 이동상은 buffer A(Tris-HCl, pH 7.4)와 buffer B(buffer A+1 M NaCl)을 사용하였으며, buffer B의 양이 증가할수록 체류시간이 빨라졌다. 이온 교환 작용에 의한 Na^+ 와 Cl^- 이온들이 이동상에서 해리되고, Cl^- 성분이 QA 막에 빠르게 흡착하면서 단백질 분자의 용출이 신속하게 용출되기 때문이다. Buffer B의 양이 선형적 증가 후에 α -lactalbumin과 β -lactoglobulin이 용출되었으며, 처음 50초까지 buffer B의 양을 급격하게 증가시켰다. 그러나 용출이 빨리 된 반면 α -lactalbumin과 β -lactoglobulin간의 분리도는 좋지 않았다. Fig. 2에서는 이동상으로 buffer A/buffer B=100/0(vol.%), gradient time이 1분 후에 각기 30/70(vol.%), 10/90(vol.%)이었다. 고정상으로는 DEAE와 QA을 동시에 순서대로 사용하였으며, 서서히 buffer B의 양을 증가시켜서 두 단계로 구배용매 조성법을 사용하여 분리하였다. Disk의 두께가 분리도에 영향을 미치며, Fig. 1과 비교해 볼 때 두 단계의 구배용매 조성

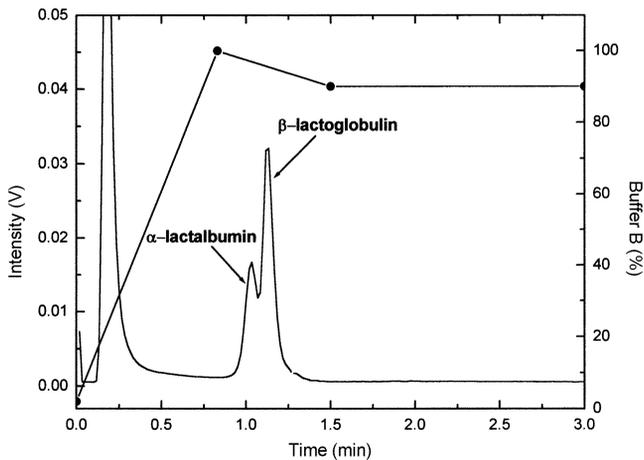


Fig. 1. Separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin by HPMC. (Buffer A/Buffer B=98/2-0/100(vol%), gradient time of 0.83 min, 0/100-10/90(vol%), gradient time of 1.5 min, column CIM disk: QA, injection volume of 20 μ l, flow rate of 4 ml/min)

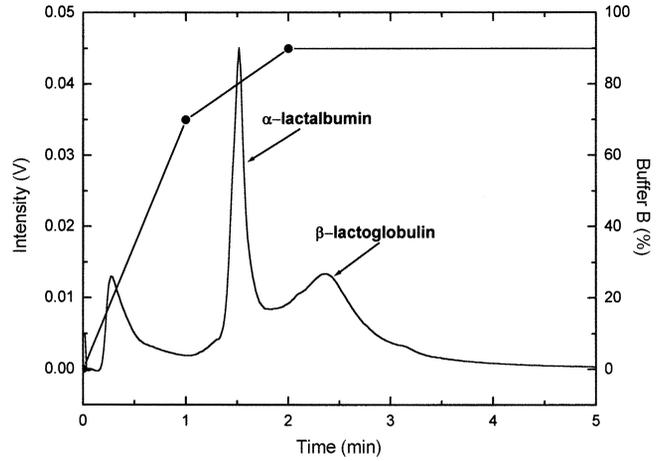


Fig. 2. Separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin by HPMC. (Buffer A/Buffer B=100/0-30/70(vol%), gradient time of 1 min, 30/70-10/90 gradient time of 2 min CIM disk: DEAE+QA, injection volume of 20 μ l, flow rate of 4 ml/min)

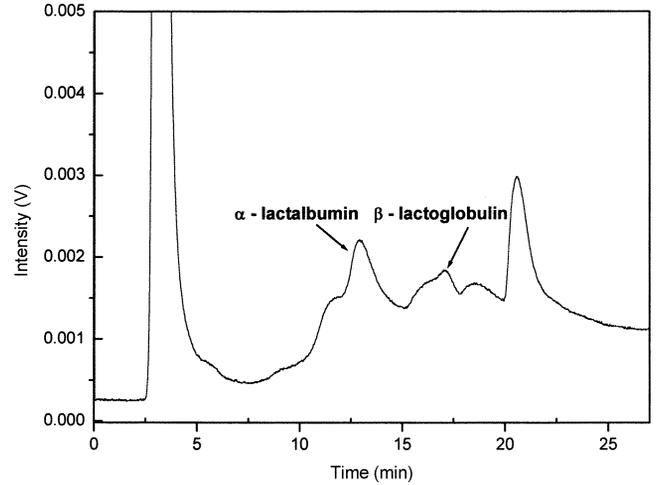


Fig. 3. Separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin by GFC. (GFC-P 3000, water 100%, flow rate of 1 ml/min)

법에 의한 NaCl 양의 증가속도와 체류시간의 조절, buffer B의 선형적 증가로 두 유청 단백질의 분리가 이루어졌다.

3-2. GFC에 의한 분리

Fig. 3은 유청 단백질을 한외여과 필터로 전처리 한 시료를 GFC 컬럼을 사용하여 분리한 크로마토그램이다. 이동상으로는 순수한 물을 사용하여 일정용매 조성법으로 분리하였다. CIM에 비해 분리도가 좋지 않았다. 일정용매 조성법은 이동상이 일정조성으로 컬럼내를 이동하기 때문에 분리는 시료의 분자량에 의해서만 이루어지기 때문에 간단하지만 일정한 이동상의 조성으로 음이온인 α -lactalbumin과 β -lactoglobulin을 정지상 표면의 체류시간을 조절하는데 한계가 있다. CIM이 5분 이내의 체류시간에 비해서 GFC는 20-30분 정도의 분석 시간이 걸린다. PolySep-GFC-P 3000 컬럼은 pH는 3-12 범위에서 메탄올이나 아세트나이트릴을 최대한 70%가량 사용할 수 있다. 그리고 M. C. Garcia의 연구[14]에 의하면 물이나 아세트나이트릴에 0.1%v/v TFA를 섞어 이동상으로 사용할 수 있다. 그래서 Fig. 4는 GFC컬럼에 TFA를 사용하여 구배용매 조성법에 의해 분리한 크로마토그램이다. Fig. 3과 마찬가지로 PolySep-GFC-P 3000(300 \times 7.80 mm)이지만 α -lactalbumin과 β -lactoglobulin의 체

4. 결 론

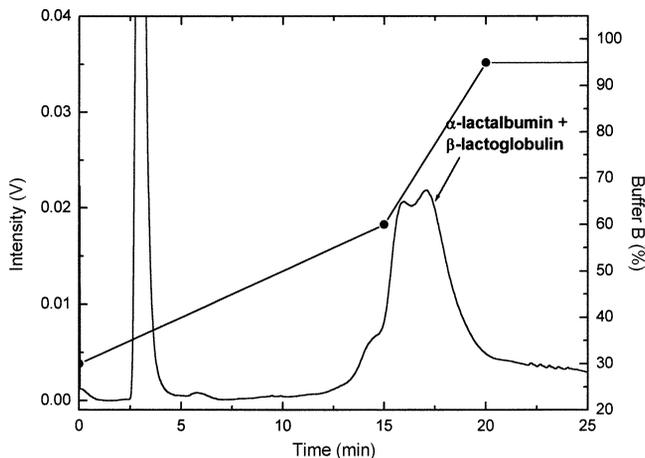


Fig. 4. Separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin by GFC.

(Buffer A/Buffer B=70/30-40/60(vol%), gradient time of 15 min, 40/60-5/95(vol%) gradient time of 20 min, flow rate of 1 ml/min)

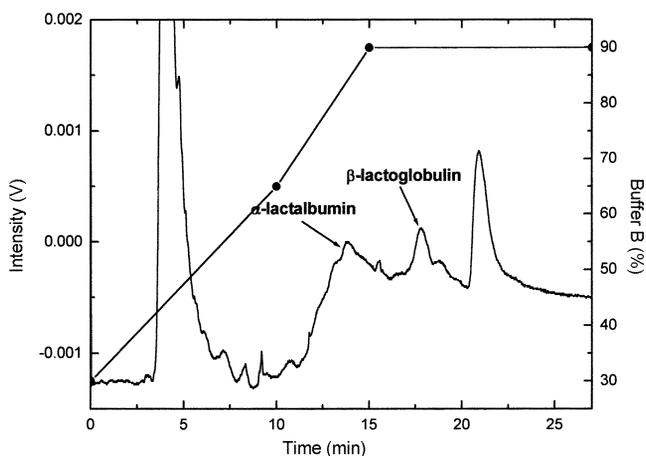


Fig. 5. Separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin by GFC.

(Buffer A/Buffer B=70/30-35/65(vol%), gradient time of 15 min, 35/65-10/90(vol%), gradient time of 15 min, flow rate of 1 ml/min)

류 시간이 5분 가량 늦춰졌다. 또한 TFA의 사용으로 인해서 α -lactalbumin와 β -lactoglobulin의 분리도가 이전 보다 낮아져서 거의 동시에 용출하였다. 이는 TFA의 농도가 낮아서 두 유청 단백질을 효과적으로 분배를 하지 못하기 때문이다. 따라서 buffer B의 농도를 증가시켰다. 최적화된 조업 조건을 찾기 위해 buffer의 비율을 조절해 보았다. 구배용매 조성은 buffer B를 기준으로 Y₂축에 나타내었다. Buffer B(%)을 기준으로 60%, 95%로 구배용매를 주어 분리하였지만 분자량이 서로 비슷한 두 물질이 분리가 되지 않고 함께 용출이 되었다. 한편 buffer B가 선형적으로 증가하는 시간을 5분 가량 줄여 급격하게 증가시킨 결과가 Fig. 5에 나타났다. Fig. 4와 비교해서 같은 시간대에 buffer B의 비율이 30% 가량 증가하여 α -lactalbumin와 β -lactoglobulin이 분리도가 증가하였다.

HPMC와 GFC를 이용하여 유청 단백질을 분리를 비교해 본 결과 이온 교환 메카니즘에 의해 분리한 HPMC가 분자량의 크기에 의해 분리되는 GFC 보다 더 나음을 실험을 통하여 알 수 있었다. CIM은 여러 용매를 사용해 여러 실험 조건을 통해 최적화를 할 수 있다. 또한 단백질을 분리하기 위해서는 buffer의 양을 조절하기 위해서 구배용매 조성법으로 분리해야 한다.

본 연구목적은 유청 단백질 중에서 α -lactalbumin와 β -lactoglobulin을 HPMC와 GFC를 이용하여 분리하는 것이다. 유청 단백질을 HPMC로 분리하기 위한 메카니즘은 단백질 분자는 음이온의 전하를 가지고 양이온 막에 흡착되고 높은 염의 농도에서 탈착이 되면서 분리가 일어난다. 반면 GFC 컬럼을 사용하여 분자량의 크기에 의한 메카니즘으로 전하를 가지고 있는 단백질 분자를 분리하는데는 한계가 있음을 알 수 있었다. Monolith 컬럼에 의해 분리도에 관한 어떠한 손실 없이 거대 분자를 분리하는 것은 상당히 중요하다. Monolith 컬럼을 사용하면 압력 강하가 작고, 컬럼 모양으로 인한 샘플의 층분치 못한 흡·탈착이나 검출기의 불충분한 감도 등의 문제를 충분히 개선할 수 있다. 컬럼이 짧고 선형변화가 좋지 않다면, 용질 속도가 용출 속도에 도달하지 못하는 것이다. 그리고 disk의 두께가 증가할수록 분리도는 증가하게 된다. 따라서 컬럼이 disk 모양이라면 선형 구배용매 조성법에 의해 높은 분리도를 얻을 수 있다. 실험을 통해서 이동상 조성법과 조업방법에 따른 각기 유청 단백질의 분리도를 고찰하였고, 최적 이동상은 Buffer A/Buffer B=100/0-30/70 vol%, gradient time 1 min, 30/70-10/90 vol%, gradient time 2 min을 실험적으로 얻었고, 4 ml/min의 이동상 유속에서 5분내에 α -lactalbumin와 β -lactoglobulin을 분리할 수 있었다. 본 연구결과는 유청에 포함된 원료물질로부터의 α -lactalbumin와 β -lactoglobulin을 분리하는 공정 개발의 기초자료로 활용될 수 있다. HPMC를 이용한 분리방법에 대해 좀 더 많은 연구가 요구되며, 분리 메카니즘에 대한 이론적 적용에 대해 연구가 앞으로 이루어질 예정이다.

감 사

본 연구는 인하대학교 고순도 분리연구실에서 수행하였으며, 초정밀 분리기술센터의 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. <http://agsearch.snu.ac.kr/thinkfood/221/news/221milk01.htm>
2. Gererding, S. J. and Byers, C. H.: *J. Chromatogr. A*, **808**, 141(1998).
3. Muller, A., Daufin, G. and Chaufer, B.: *J. of Membrane Science*, **153**, 9(1999).
4. Splitt, H., Mackenstedt, I. and Freitag, R.: *J. Chromatogr. A*, **729**, 87(1996).
5. Zhou, D., Zou, H., Ni, J., Wang, H., Tang, L. and Zhang, Y.: *Chromatographia*, **50**, 27(1999).
6. Thommes, J. and Kula, M. R.: *Biotech. Prog.*, **11**, 357(1995).
7. Charcosset, C.: *J. Chem. Tech. Biotech.*, **71**, 95(1998).
8. Zeng, X. and Ruckenstein, E.: *Biotech. Prog.*, **15**, 1003(1999).
9. Josic, D., Buchacher, A. and Junhbauer, A.: *J. Chromatogr. B*, **752**, 191(2001).
10. Sridhar, P.: *Chem. Eng. Technol.*, **19**, 398(1996).
11. Shan, L. and Anderson, J. D.: *J. Chromatogr. A*, **909**, 191(2001).
12. Zeng, X. and Ruckenstein, E.: *J. of Membrane Science*, **148**, 195(1998).
13. Stryer, L.: "Biochemistry," 4thed., W. H. Freeman, 50(1999).
14. Garcia, M. C., Marina, M. L. and Torre, M.: *J. Chromatogr. A*, **822**, 255(1998).