

Q Sepharose 강 음이온 교환막을 이용한 유청에 포함된 단백질 분리

최두영* · 노경호†

인하대학교 공과대학 화학공학과, *조정밀분리기술센터
(2002년 3월 20일 접수, 2002년 5월 30일 채택)

Separation of Proteins in Whey by Strong Anion-Exchange Membrane of Q Sepharose

Du Young Choi* and Kyung Ho Row†

*Center for Advanced Bioseparation Technology,
Dept. of Chem. Eng., Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received 20 March 2002; accepted 30 May 2002)

요 약

선형 구배 용매 조성법을 이용하여 강 음이온 교환막으로 유청 단백질 중에 있는 α -lactalbumin, BSA, β -lactoglobulin A와 B를 분리하였다. 전처리 방법으로 사용한 원심분리형 UF 필터의 분자량 한계가 30,000인 막이 10,000에 비해 효과적이었다. NaCl의 농도는 유청 단백질 분리에 적합한 이동상의 조성에 맞게 변화되었다. 이동상은 buffer A(20 mM piperazine-HCl pH 6.4), buffer B(buffer A+1 M NaCl)를 사용하였다. 최적 이동상의 조성은 buffer A/buffer B(vol%)=95/5-90/10(0-5 min), 90/10(5-10 min), 90/10-70/30(10-45 min), 70/30(45-55 min), 70/30-10/90(55-60 min)이었다. 위의 조건으로 실험을 수행한 결과 4개의 주요 유청 단백질을 만족스럽게 분리하였다.

Abstract – Strong anion-exchange membrane in the linear gradient elution method was experimented for the separation of the major whey proteins of α -lactalbumin, BSA, β -lactoglobulin(A, B). This centrifugal UF filters were used for the pretreatment of proteins. The membrane with nominal molecular weight limit 30,000 was more effective than that with 10,000. The salt concentrations were changed to determine the mobile phase composition for separating the whey proteins. The mobile phase was composed of buffer A(20 mM piperazine-HCl pH 6.4) and buffer B(buffer A+1 M NaCl). The optimum mobile phase composition was determined as buffer A/buffer B(vol%)=95/5-90/10(0-5 min), 90/10(5-10 min), 90/10-70/30(10-45 min), 70/30(45-55 min), 70/30-10/90(55-60 min). With this experimental condition of the linear-gradient elution mode, four major whey proteins were satisfactorily separated.

Key words: Whey Proteins, Anion Exchange Membrane, Buffer, Mobile Phase Composition

1. 서 론

우유에는 물, 지방, 당류 그리고 미네랄뿐만 아니라, 2-6%가량의 여러 단백질들이 함유되어있다. 이 우유 단백질들은 굉장히 효용성이 높은 중요 생리활성 펩타이드들이다[1]. 우유 단백질은 필수아미노산을 많이 함유해 소화 흡수가 빠르고, 각종 질병에 대한 면역 조절 작용에 효과적이다[2]. 일반적으로 우유 단백질을 구성하는 두 종류의 주요 단백질인 caseins와 유청 단백질은 생물학적, 물리화학적 특성에서 큰 차이를 보인다. 우유의 30-35 g/L 단백질 중 80% 가량을 차지하는 caseins는 우유 단백질을 pH 4.6에서 침전시켜 얻어 식용, 사료용, 점착제, 인공섬유, 종이 가공 등에 널리 사용된다[3]. 우유 단백질 중 caseins를 제외한 6-7 g/L 정도가 유청 단백질이다[4]. 유청은 치즈 생산 공정의 부

산물에서 얻을 수 있으며, 대개 락토오스, 여러 단백질, 미네랄 등이 액체 형태로 회석되어있다. 유청은 가격이 저렴해 세로 배양 배지로 사용될 뿐만 아니라, 유산균 생장을 향상시키는데 필수적이다[5]. 오랫동안 유청의 기능적 유용성에 관심을 갖지 않다가 과학적으로 중요한 물질이란 것이 알려지며 20여년 이상 유청 단백질에 대한 연구가 진행되고 있다[6]. 유청에는 약 6%의 고체와 70% 이상의 락토오스가 있으며, 단백질은 0.7% 정도 있다[7]. 하지만, 한외여과에 의해 농축된 whey retentate에는 18-22% 단백질 함량을 보인다[8]. 이 유청 단백질의 구성은 α -lactalbumin, β -lactoglobulin, immunoglobulins A, M 그리고 G, bovine serum albumin(BSA), lactoferrin과 lactoperoxidase이다. 유청 단백질의 대부분을 차지하는 β -lactoglobulin의 분자량은 18.4 kDa이며, 162개의 아미노산 잔기로 구성되어있고, 2-4 g/L정도 함유되어있다. α -lactalbumin은 123개의 아미노산 잔기로 구성되어있으며, 분자량은 14.2 kDa이고, 보통 우유에 0.6-1.7 g/L정도 함유되어있다[9]. α -lactalbumin은 생장에 필요한 트립토판이 많이 함유되어있기 때문에, 유아용 분유제조나 기능성

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

건강식품에 사용된다. β -lactoglobulin은 당류 제품 생산에 사용된다[4]. 유청 단백질은 수의학이나, 분유, 치즈, 버터 등 유제품 식품 산업에 이용된다. 특히, 우유 단백질 속에 함유된 IgG, IgA, lactoferrin and lactoperoxidase는 의학적으로 유용하다[11]. 그리고 IgG는 유아들의 다양한 감염 치료에 효과적인 것으로 알려졌다[12]. Lactoferrin과 lactoperoxidase는 항균 물질로 사용된다[13]. 오래 전부터 유가공 제품분야에서 유청 단백질의 분리 및 정제, 수성 2-상계 방법을 이용한 유청 단백질의 분획에 대한 연구가 진행되어왔다[14-16]. 또, 막 여과를 이용한 유청 단백질의 분리가 다양하게 시도되고 있다[17-19]. 교환막의 장점은 큰 규모에서의 생물학적 분자들을 몇 분 안에 분리할 수 있고 작은 유속에서도 높은 분리도를 나타내며 낮은 압력에서 조업이 가능하다. 또한, 장치를 scale-up하기가 쉽다. 그래서 막 여과를 단백질 정제와 의학 분야에 사용한다[20]. 이온 교환막을 이용한 유청 단백질 분리의 다양한 방법이 연구되고, 지금까지 보고 되고 있다[7-9, 21-22]. 이온 교환의 분리 메커니즘은 생물질 표면간의 정전기적 상호 작용에 의해 일어난다. 아미노산이나 세포막에 있는 단백질의 전자 집단이 이동상조성에서 해리가 되면서 단백질 분자들은 음이온의 성질을 가지게 되고, 활성화된 작용기는 양이온의 극성을 가지게 되면서 단백질이 작용기에 흡착하게 된다[23]. 흡착된 생물질 분자는 buffer의 염과 다른 이온에 의해 탈착되거나 방전된다. pH 변화에 적응하기 위한 표면 변형이나, 수축에 의한 pH 효과가 유도된 단백질 구조 변화를 보호하기 위해 적당한 buffer가 요구된다. 적당한 buffer의 선택은 이온 교환 막 공정의 성공에 중요한 요인이다[24]. 이때 단백질 분자의 등전점(isoelectric point)과 buffer인 염의 농도가 중요한 분리 메커니즘의 인자로 작용하게 된다. 그래서 구배 용매 조성(gradient elution)을 이용하여 최적의 분리 조건을 찾는 것이다[25].

본 연구의 목적은 유청 단백질 중에서 α -lactalbumin, β -lactoglobulin A와 B, BSA를 음 이온 교환막을 이용하여 분리하는 것이다. 실험적으로 이동상 조성과 조업방법에 따른 유청 단백질의 분리에 대해 고찰하고자 한다.

2. 실험

2-1. 실험재료

본 실험에 사용된 유청 단백질 및 표준시료인 α -lactalbumin(type III: deplete, form Bovine Milk Approx. 85%), β -lactoglobulin, β -lactoglobulin A 그리고 β -lactoglobulin B(form Bovine Milk Approx. 90%), bovine serum albumin(BSA), buffer에 첨가한 piperazine, 모두 sigma에서 구입하였다. 모든 시료들은 주입하기 전에 막 여과지(PVDF 0.45 μ m, Waters)를 이용해 전처리를 하였다. buffer B에 용해시켜 사용한 NaCl은 동양화학에서 구입하였다. 물은 감압 펌프(Division of Millipore, Waters, Milford, MA 01757, U.S.A.)와 필터(HA-0.5 μ m, Division of Millipore, Waters)를 이용하여 여과한 증류수를 사용하였다. 본 실험에서는 모든 시료들을 PVDF 0.45 μ m 필터로 전처리 한 후 사용했다. 이동상은 다음과 같은 조성으로 사용하였다. Buffer A는 pH 6.4인 20 mM piperazine-HCl, buffer B는 buffer A와 1M NaCl을 섞어 만들었다.

2-2. 실험기기

본 실험에서는 부피가 1 ml인 교환막 HiTrap Q HP(Pharmacia)를 사용하였다. HiTrap Q HP는 고정능 Q Sepharose를 resin으로 사용하는 강 음이온 교환막이다. 분석용 HPLC 장치로는 Waters 515 multi-solvent delivery system과 486 tunable absorbance analytical detector, 그리고 Rheodyne injector(50 μ l sample loop)를 포함한 Waters model 600S liquid chromatography(Waters Associates, Milford, MA, U.S.A.)를 사용했다. 데이터 수집 장치는 Chromate(Ver. 3.0, Interface Eng., Korea)를 장착한 PC이다. 또 다른 분석용 HPLC 장치는 영린기기의 M930D solvent

delivery module, UV 730D detector, Rheodyne 7725i loop injector(20 μ l sample loop)와 영린기기 M930 solvent delivery pump, UV 720 absorbance detector, 영린기기 Autochro data module을 사용하였다. 유청 단백질을 분자 크기에 따라 전처리를 하기 위해 원심분리기를 사용했는데 이 원심분리기는 한일회사의 MF 550이며, 원심분리형 UF 필터는 Amicon 회사의 centriprep centrifugal filter YM-10, YM-30(15 ml)을 사용했다.

2-3. 실험방법

본 실험에서는 표준시료 물질인 α -lactalbumin, β -lactoglobulin과 BSA 등을 10 mg/ml의 농도를 가진 혼합물로 만들어 실험하였다. 유청 단백질 역시 막을 통과한 증류수에 200 mg/ml의 농도로 용해시킨 후 시료로 사용하였다. 표준시료에서 β -lactoglobulin 대신 β -lactoglobulin(A, B)을 사용했던 실험에서도 10 mg/ml의 농도를 사용했다. 용해된 유청 단백질 속의 거대 분자들을 제거해 목적 단백질인 α -lactalbumin, β -lactoglobulin(A, B)과 BSA의 분율을 높이기 위해 분자량 한계 10,000(YM-10)과 30,000(YM-30)의 원심분리형 UF 필터를 사용해 시료를 전처리 하였다. 유청 수용액 시료의 같은 양을 YM-10과 YM-30을 장착한 두 개의 시험관에 나누어 담고 원심분리기에서 3,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 여기서 목적 단백질의 분자량이 모두 10,000 이상이기 때문에 분자량 한계 10,000 막을 통과하지 않고 남은 액을 시료로 채취했다. 분자량 한계 30,000인 막에서는 α -lactalbumin, β -lactoglobulin의 분자량이 각각 14.0 kDa, 18.3 kDa임을 고려하여 막을 통과한 여과액을 시료로 사용했다. 단백질의 용출을 감지하기 위한 detector의 wavelength는 260 nm로 HiTrap Q HP를 통과하는 시료의 유속은 1 ml/min으로 고정하였다.

3. 결과 및 고찰

이온 교환막의 원리는 확산 이동성의 차이와 불균일한 표면 작용에너지로 인한 것이다. 칼럼에 충전된 다공성 입자들 사이의 다공 확산과 흡착에 의해서 분리가 되는 HPLC와는 달리 짧은 시간동안에 분리를 할 수 있으며 낮은 압력과 유량 조절이 가능하다. 그러므로 이온 교환막의 장점을 이용하면 좋은 분리 효과를 기대할 수 있다. 특히 체류 지수를 감소시키는 염을 사용하여 원하는 물질을 분리하는데 가장 많이 사용된다. pH를 조절하는 용리 방법은 중간에 buffer 교환의 간섭 없이 계속적인 이온교환 흡착을 할 수 있게 해준다. 이동상과 buffer는 이온교환 분리에서 친수성인 단백질을 변성시키지 않도록 선택되어야 하며 이온교환을 사용하는 생물학적 정제에서는 첨가물질의 효과와 유속 등이 적절히 고려되어야 한다. 이동상 조성의 선형 또는 단계적 변화에 의한 용출은 농축된 용질의 다양한 이동을 초래한다. 탈착된 용질들의 평균 속도는 이동상 농도의 부분적 평형에 비례한다. 즉, 단백질과 이동상의 이온이 음이온 교환막에 경쟁적으로 흡, 탈착을 반복하면서 분리가 일어나는데 이때 분리가 일어나는 속도는 각각의 분자들이 평형을 이루는 속도에 비례한다. 그래서 흔히 구배 용매법은 막에서 단백질 성분을 탈착시킬 때 사용된다. 또한, 선형적으로 특정 종류 물질을 선택적으로 용출시킬 최적 조건을 찾기가 어려울 때 구배 용매를 사용하는 것이 편리하다[26].

유청 단백질 중 α -lactalbumin, β -lactoglobulin과 BSA를 분리하기 위하여 기존의 HPLC에 음이온 교환막을 칼럼으로 장착해 NaCl의 농도를 변화시키는 구배 용매 조성법으로 실험하였다. 처음에는 각 유청 단백질의 표준 시료를 혼합하여 이동상은 buffer A(20 mM piperazine-HCl pH 6.4)와 buffer B(buffer A+1 M NaCl)를 사용하였다. 단백질 분자가 용출되어 나오는 순서는 단백질 음전하 정도의 척도인 등전점(pI) 차이와 연관이 있다. 단백질 고유의 pI보다 이동상의 pH가 크면 단백질 자체적으로 수소이온(H⁺)을 방출하여 상대적으로 하이드록시기(OH⁻)가

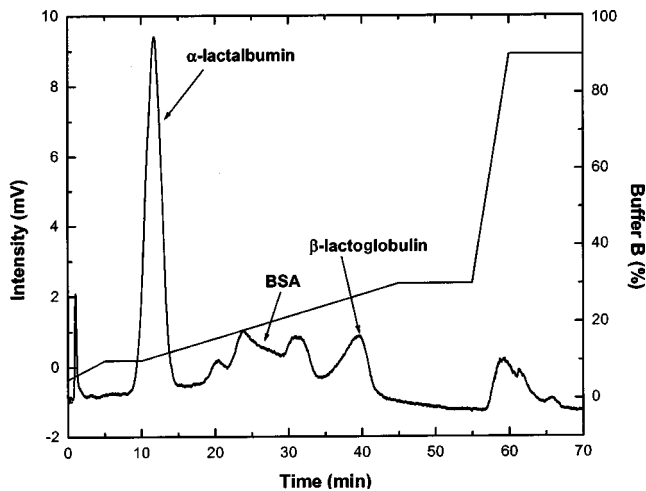


Fig. 1. Separation of the standard chemicals of the whey proteins by anion-exchange membrane(buffer A/buffer B(vol%)=95/5-90/10(0-5 min), 90/10(5-10 min), 90/10-70/30(10-45 min), 70/30(45-55 min), 70/30-10/90(55-60 min), 20 μ l)

많아져 음이온을 띄게 된다. 이렇게 음이온을 띤 단백질들은 표면이 양이온의 작용기로 된 음이온 교환막에 흡착하게 되는 것이다. 단백질의 pI와 이동상 pH사이의 차이가 크면 클수록 단백질은 더 큰 음이온이 되어 더 빨리 교환막에 흡착하게 된다[27]. 따라서 Fig. 1에서 보는 바와 같이 pI가 가장 낮은 α -lactalbumin이 가장 빨리 흡착되었다가 용출되고, BSA 그리고 β -lactoglobulin 순서가 된다. Buffer B에 포함된 NaCl 양을 증가함으로써 단백질의 체류시간은 짧아진다. Fig. 1에서 사용한 이동상 조성은 선형적으로 변화하였고, buffer A/buffer B가 95/5-90/10(0-5 min), 90/10(5-10 min), 90/10-70/30(10-45 min), 70/30-70/30(45-55 min), 70/30-10/90(55-60 min) vol%이었다. Fig. 2에서 단백질 표준 시료에서 β -lactoglobulin대신 β -lactoglobulin(A, B)을 첨가한 표준시료로 실험한 결과이다. 실제 유청 속에 있는 β -lactoglobulin은 A와 B가 혼합되어있다. 그 분율은 β -lactoglobulin A가 64%, β -lactoglobulin B는 36%이다[4]. Fig. 2에서는 Fig. 1과 비교하면 BSA에 대한 관의 효율이 떨어졌지만, β -lactoglobulin의 피크 모양이 β -lactoglobulin(A, B)으로 분리되었다. β -lactoglobulin(A, B)의 분리도를 증가하기 위해 이동상 조성을 변화시켜 실험하여 Fig. 3과 같은 이동상 조성을 실험적으로 얻었다. Buffer A/

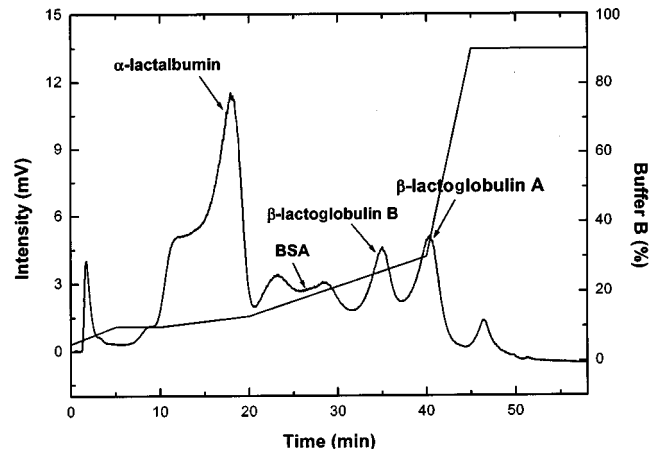


Fig. 3. Separation of the standard chemicals of the whey proteins by anion-exchange membrane(buffer A/buffer B(vol%)=95/5-90/10(0-5 min), 90/10(5-10 min), 90/10-87/13(10-20 min), 87/13-70/30(20-40 min), 70/30-10/90(40-45 min), 20 μ l).

buffer B가 95/5-90/10(0-5 min), 90/10(5-10 min), 90/10-87/13(10-20 min), 87/13-70/30(20-40 min), 70/30-10/90(40-45 min) vol%인 이동상 조성에서 Fig. 3의 결과처럼 α -lactalbumin 피크의 효율이 떨어지고, 모든 단백질들의 피크 기준선이 불안정하였다. 하지만 β -lactoglobulin(A, B)의 분리도는 Fig. 2의 결과와 비교해 볼 때 증가하였다.

표준 시료 혼합물에서 얻은 이동상 조건들을 유청 분말을 2차 증류수에 용해시킨 시료에 적용하여 실험하였다. 유청 분말에는 수백에서 수백만까지 다양한 분자량의 물질들이 포함되어있다. 따라서 우리가 목적으로 하는 단백질들의 분율을 높이기 위해 유청 수용액을 전처리 하였다. 거대 분자량 물질과 물에 채 녹지 않은 고체덩어리들은 PVDF 0.45 μ m 필터로 거른 후 원심분리형 UF 필터를 이용해 분자량 차이에 따라 여과하는 물리적인 방식으로 유청 수용액을 전처리를 하였다. α -lactalbumin, β -lactoglobulin과 BSA의 분자량이 Table 1에서 볼 수 있듯이 수만이기 때문에 목적단백질의 분율을 높이기 위해서는 분자량이 수천 이하인 물질이나, 수십만 이상인 분자들을 제거할 필요가 있어서 분자량 한계가 10,000과 30,000인 원심분리형 UF 필터를 사용하였다. Fig. 3과 동일한 이동상 조성으로 각 필터의 한계 분자량에 따른 결과가 각각 Fig. 4와 Fig. 5이다. Fig. 4는 분자량 한계가 10,000인 막을 통과하지 않은 시료

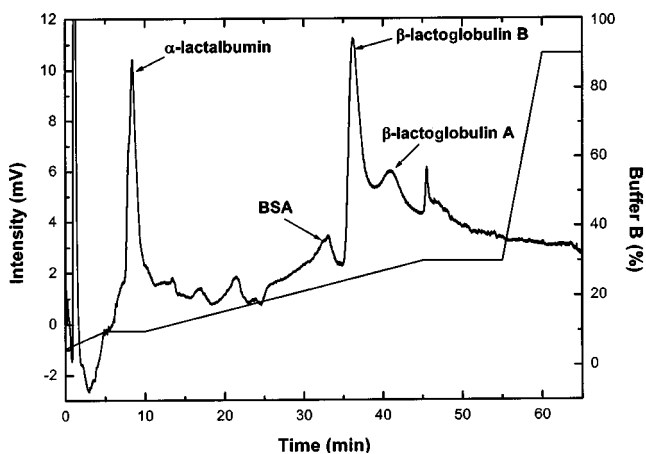


Fig. 2. Separation of the standard chemicals of the whey proteins by anion-exchange membrane(mobile phase composition same as in Fig. 1, 20 μ l).

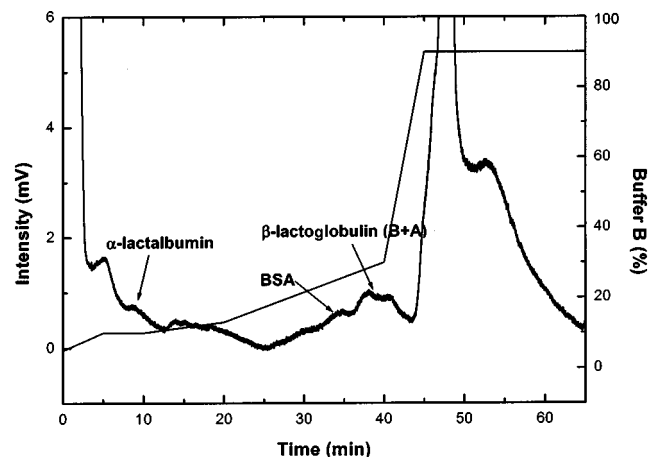


Fig. 4. Separation of the proteins contained in whey by anion-exchange membrane(mobile phase composition same as in Fig. 3, 20 μ l, molecular weight limit 10,000 centrifugal UF filters retentated).

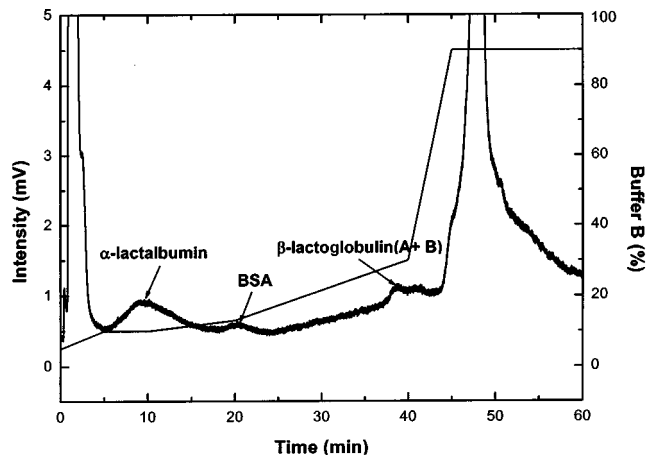


Fig. 5. Separation of the proteins contained in whey by anion-exchange membrane(mobile phase composition same as in Fig. 3, 20 μ l, molecular weight limit 30,000 centrifugal UF filter permeated).

를, Fig. 5는 30,000인 막을 통과한 같은 양의 시료로 분석한 결과이다. 모든 단백질에 대한 관의 효율과 분리도가 감소하고, β -lactoglobulin(A, B)이 서로 섞여서 한꺼번에 용출되었다. 특히 한계 분자량이 10,000인 막을 사용했던 Fig. 4에서는 α -lactalbumin은 다른 피크와 같이 용출되었고, BSA와 β -lactoglobulin은 거의 분리되지 않았다. Fig. 4, 5에서 분리도와 관의 효율이 낮은 이유는 유청에 포함된 목적 단백질들이 고정 상으로부터 탈착되는 과정에서 buffer B에 용해되어있는 염화 이온(Cl^-)과의 이온교환이 원활하게 일어나지 못하고 적은 양만 탈착되었기 때문이다. 두 그림에서 보는 바와 같이 40분 이후 급격한 염화 이온(Cl^-)의 증가로 음 이온 교환막에 잔류한 단백질들이 한꺼번에 용출되었다. BSA와 β -lactoglobulin이 분리가 잘 이루어지도록 buffer B에 포함된 NaCl의 변화를 실험적으로 조절하였다. NaCl양이 30분 동안 20%정도 완만하게 증가 되도록 buffer B의 공급에 변화를 주었다. 그 결과 이동상의 조성은 Fig. 1과 같은 buffer A/buffer B를 95/5-90/10(0-5 min), 90/10(5-10 min), 90/10-70/30(10-45 min), 70/30-70/30(45-55 min), 70/30-10/90(55-60 min) vol%가 되었다. 이 결과는 Fig. 6에 나타냈으며, 원심분리형 UF 필터로 전처리 하지 않은 유청 시료 20 μ l 주입한 실험 결과이다. 전처리를 하지 않은 시료에는 분자량이 다양한 물질들이 존재하고 있어 목적 단백질들의 양이 상대적으로 적기 때문에 분리도가 감소되었다. BSA와

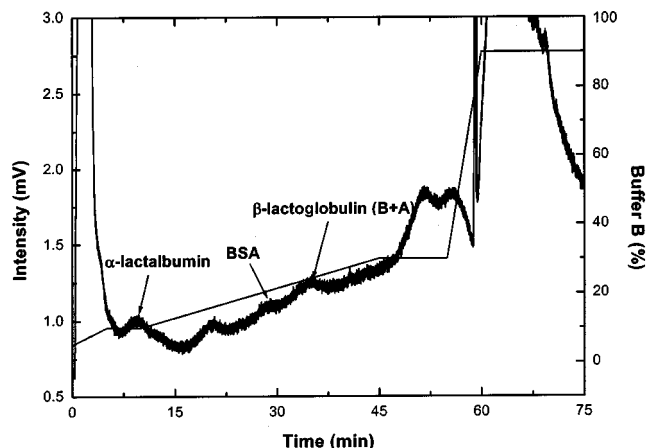


Fig. 6. Separation of the proteins contained in whey by anion-exchange membrane(buffer A/buffer B(vol%)=95/5-90/10(0-5 min), 90/10(5-10 min), 90/10-70/30(10-45 min), 70/30(45-55 min), 70/30-10/90(55-60 min), 20 μ l, no use centrifugal UF filter).

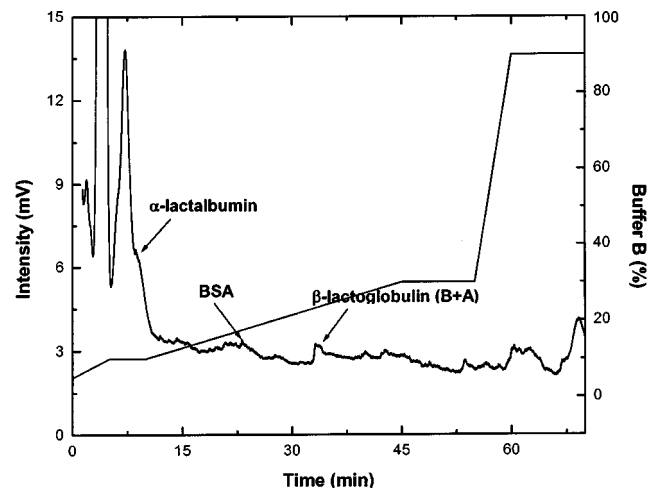


Fig. 7. Separation of the proteins contained in whey by anion-exchange membrane(mobile phase composition same as in Fig. 6, 20 μ l, molecular weight limit 10,000 centrifugal UF filter retentated).

β -lactoglobulin이 거의 비슷한 시점에 용출되었으며 낮은 피크의 효율과 기준선이 상당히 불안정하였다. 하지만 Fig. 4와 5에 비해 α -lactalbumin과 BSA의 체류 시간이 길어졌고, 시료를 전처리하여 분자량 한계 10,000 막을 사용한 Fig. 7과 비교하면 α -lactalbumin의 분리도는 감소하였지만, 다른 단백질들의 분리도와 용출량은 증가되었다. 분자량 한계가 30,000인 막을 사용한 Fig. 8에서는 목적 단백질들이 비교적 분리가 잘 되었다. Fig. 9-11에서는 주입량을 50 μ l로 늘려 실험해 본 결과들이다. 주입량을 증가시키면 당연히 분리도가 줄어들지만, 용출되는 목적단백질량을 분취 목적으로 주입량을 증가하였다. 이동상의 조성은 이전 Fig. 6-8과 같은 buffer A/buffer B를 95/5-90/10(0-5 min), 90/10(5-10 min), 90/10-70/30(10-45 min), 70/30-70/30(45-55 min), 70/30-10/90(55-60 min) vol%로 하였다. Fig. 9에서는 시료를 전처리 하지 않았고, 같은 조건의 Fig. 6과 비교하면 유청 단백질들의 양이 증가된 것을 볼 수 있다. 이에 비해서 원심분리형 UF 필터를 사용하여 전처리 한 실험결과인 Fig. 10, 11에서는 주입량이 20 μ l인 이전 결과들(Fig. 7, 8)에 비해 유청 단백질의 양이 비교적 적게 증가하였고 분리도는 큰 차이가 없었다. 특히 Fig. 8, 11을 비교하면 시료가 함께 용출되어 분리도가 낮아지고, α -lactoglobulin(A, B)의 분리는 거의 이루어지지 않았다. 우선 NaCl의 적

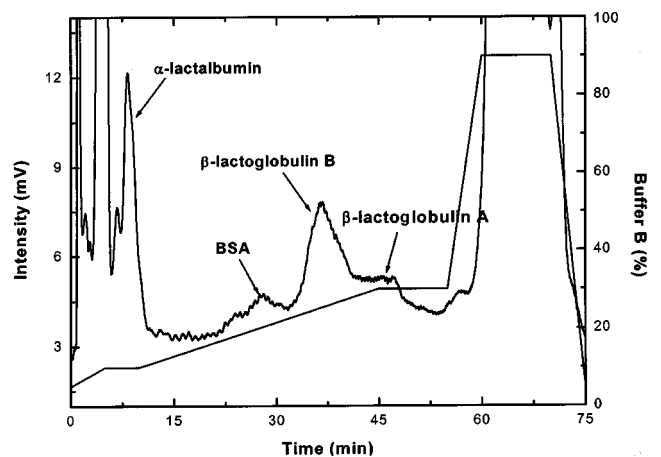


Fig. 8. Separation of the proteins contained in whey by anion-exchange membrane(mobile phase composition same as in Fig. 6, 20 μ l, molecular weight limit 30,000 centrifugal UF filter permeated).

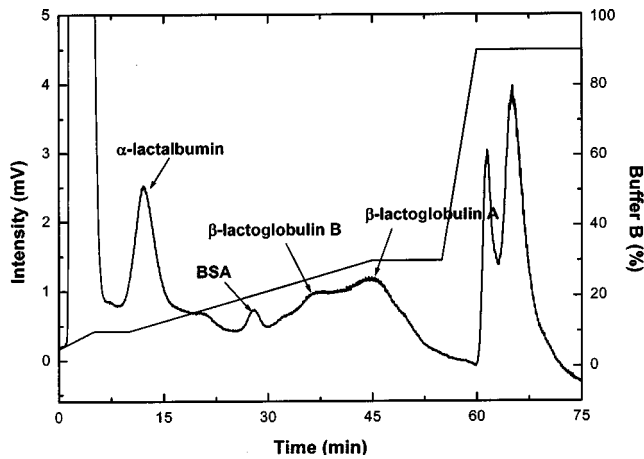


Fig. 9. Separation of the proteins contained in whey by anion-exchange membrane(mobile phase composition same as in Fig. 6, 50 μ l, no use centrifugal UF filter).

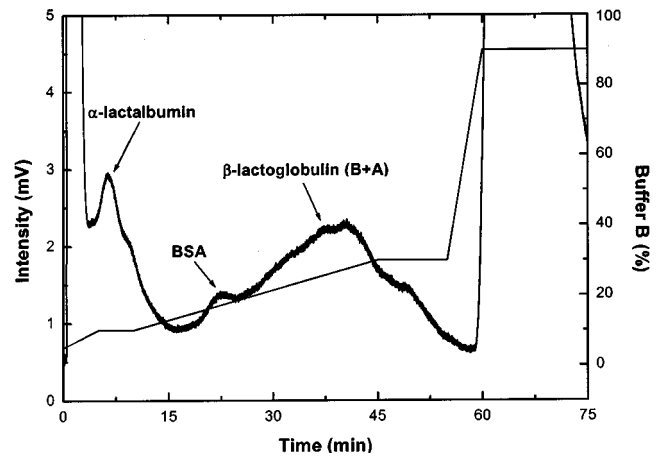


Fig. 11. Separation of the proteins contained in whey by anion-exchange membrane(mobile phase composition same as in Fig. 6, 50 μ l, molecular weight limit 30,000 centrifugal UF filter permeated).

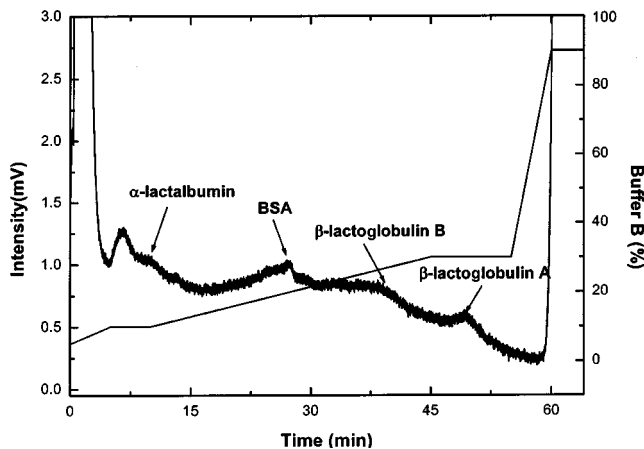


Fig. 10. Separation of the proteins contained in whey by anion-exchange membrane(mobile phase composition same as in Fig. 6, 50 μ l, molecular weight limit 10,000 centrifugal UF filter retentated).

절한 양과 증가 비율이 이온 교환막을 사용하여 유청 단백질을 분리하는데 중요한 요인으로 작용한다. 실험 시간이 10분과 40분 사이에 NaCl의 증가 기울기가 buffer A/buffer B, 95/5-90/10(0-5 min), 90/10(5-10 min), 90/10-70/30(10-45 min), 70/30-70/30(45-55 min), 70/30-10/90(55-60 min) vol%에서 가장 우수한 이동상의 조성임이었다. 또 유청 단백질들은 분자량 한계가 30,000인 막이 10,000에 비해 전처리 결과가 좋다는 것을 확인하였다. 분자량 한계가 10,000인 막을 통과하지 않은 시료는 거대 분자들이 다량으로 혼합되고 유청 시료를 전처리 하더라도 β -lactoglobulin과 pI가 비슷한 immunoglobulins가 α -lactalbumin과 비슷한 양으로 포함되어 있어 분리도를 감소시킨다. 따라서 30,000 이상의

immunoglobulins는 분자량 한계 30,000인 막에서 여과되어 10,000인 막에 비해 비교적 효율적이었다. 그러나 전처리의 여부는 여러 면에서 큰 차이를 보이지 않았다. 부분적으로 분리도나 용출량이 증가하였지만, 전처리에 사용된 시간과 비용을 고려하면 상대적으로 효과적인 결과를 기대하기 곤란하였다. 또한 원심분리형 UF 필터의 성능이 떨어지는 이유는 원심분리의 회전 속도로 인해 막에 명시된 것보다 한계 분자량이 다소 큰 분자들을 통과시켜 필터 효과를 저하시켰다.

4. 결 론

유청 단백질 중에 함유된 α -lactalbumin, BSA, β -lactoglobulin(A, B)을 분리하기 위해서 강 음이온 교환막과 구배 용매 조성법을 이용하였다. 음이온 교환막을 사용해 pH조절과 염의 선형적 용출법을 이용하여 유청으로부터 단백질을 분리하는데 매우 효과적이었고, 두 개의 단백질로 이뤄진 β -lactoglobulin을 분리할 수 있었다. 유청 단백질은 음이온 교환막에 선택적으로 흡착되고 높은 염의 농도에서 탈착이 되면서 분리가 일어난다. 따라서 선형 구배 용매와 buffer의 사용은 매우 중요하다. 실험을 통해서 최적 이동상 조건을 관찰한 결과 1 ml/min의 이동상 유량과 Buffer A/Buffer B(vol%)=95/5-90/10(0-5 min), 90/10(5-10 min), 90/10-70/30(10-45 min), 70/30(45-55 min), 70/30-10/90(55-60 min)의 구배 조성 단계를 실험적으로 얻었다. 유청의 유용한 단백질들은 고순도의 단백질 분말로 제조하거나, 락토오스를 제거하기 위해서는 한의 여과법이나, 분무 건조방식에 의한 과정들이 필요하다. 본 연구결과는 유청에 포함된 원료물질로부터의 α -lactalbumin, BSA 그리고 β -lactoglobulin A, β -lactoglobulin B를 분리하는 공정 개발의 기초 자료로 활용될 수 있다. 앞으로 교환막을 이용한 분리방법과 메카니즘에 대한 이론적 고찰이 심도 있게 이루어져야 한다.

Table 1. Molecular masses and isoelectric points for the whey proteins

Protein	Proportion of skim milk protein(%)	Concentration in whey(g/l)	Proportion of total whey protein(%)	Isoelectricpoint (pI)	Molecular mass
α -lactalbumin	2-5	0.7	12	4.2-4.5	14,000
Bovine serum albumin(BSA)	0.7-1.3	0.3	5	5.13	69,000
β -lactoglobulin	7-12	3.0	50	5.35-5.49	18,300
Immunoglobulins	1.9-3.3	0.6	10	5.5-8.3	15,000-1,000,000

감 사

본 연구는 인하대학교 고순도 분리 연구실에서 수행하였으며, 학술진흥재단 선도연구자지원(2001-041-E00305) 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Meisel, H.: Dtsch. *Milchwirtschaft*, **31**, 967(1991).
2. McIntosh, G. H., Regester, G. O., Le Leu, R. K., Royle, P. J. and Smithers, G. W.: *J. Nutr.*, **125**, 809(1995).
3. <http://100.empas.com/entry.html/?i=150267&Ad=epson>.
4. Ye, X., Yoshida, S. and Ng, T. B.: *The Int. J. of Biochem. & Cell Biology*, **32**, 1143(2000).
5. Korhonen, H., Pihlanto-Leppala, A., Rantamaki, P. and Tupasela, T.: *Trends in Food Science & Technology*, **9**, 307(1998).
6. Bury, D., Jelen, P. and Kimura, K.: *Dairy Journal*, **8**, 149(1998).
7. Lieske, B. and Konrad, G.: *Dairy Journal*, **6**, 13(1996).
8. Gerberding, S. J. and Byers, C. H.: *J. Chromatogr. A*, **808**, 141(1998).
9. Splitt, H., Mackenstedt, I. and Freitag, R.: *J. chromatogr. A*, **729**, 87(1996).
10. Zydney, A. L.: *Dairy J.*, **8**, 243(1998).
11. Hahn, R., Schulz, P. M., Schaupp, C. and Jungbauer, A.: *J. Chromatogr. A*, **795**, 277(1998).
12. Hutchens, T. W., Magnuson, J. S. and Yip, T.: *J. Immunol. Methods*, **128**, 98(1990).
13. Strange, E. D., Malin, E. L., Van Hekken, D. L. and Basch, J. J.: *J. Chromatogr.*, **624**, 81(1992).
14. Alves, J. G. L. F., Chumpitaz, L. D. A., da Silva, L. H. M., Franco, T. T. and Meirelles, A. J. A.: *J. Chromatogr. B*, **743**, 235(2000).
15. Rito-Palomares, M. and Hernandez, M.: *J. Chromatogr. B*, **711**, 81(1998).
16. da Silva, L. H. M. and Meirelles, A. J. A.: *Carbohydrate Polymer*, **42**, 279(2000).
17. Konrad, G., Lieske, B. and Faber, W.: *Int. Dairy J.*, **10**, 713(2000).
18. Lucas, D., Rabiller-Baudry, M., Millesime, L., Chaufer, B. and Daufin, G.: *J. Membrane Sci.*, **148**, 1(1998).
19. Punidadas, P. and Rizvi, S. S. H.: *Food Research Int.*, **31**, 265(1998).
20. Josic, D., Buchacher, A. and Junhbauer, A.: *J. chromatogr. B*, **752**, 191(2001).
21. Splitt, H., Mackenstedt, I. and Freitag, R.: *J. Chromatogr. A*, **729**, 87(1996).
22. Manji, B., Hill, A., Kakuda, Y. and Irvine, D. M.: *J. Dairy Sci.*, **68**, 3176(1985).
23. Shan, L. and Anderson, D. J.: *J. Chromatogr. A*, **909**, 191(2001).
24. Keith Roper, D. and Lightfoot, E. N.: *J. Chromatogr. A*, **702**, 3(1995).
25. Koo, Y. M. and Row, K. H.: *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **11**, 807(2000).
26. <http://100.empas.com/entry.html/?i=52227&Ad=kfc>.