

## 고분자 전해질을 이용한 라이소자임 단백질 침전분리에 관한 연구

김운수(학), 김우식(정), 김용욱(정)  
경희대학교 화학공학과

### A study on lysozyme separation by polyelectrolyte precipitation

Woon-Soo Kim, Woo-Sik Kim and Yong-Wook Kim  
Dept. of Chem. Eng., Kyung Hee University

#### 서론

단백질 결정화법(Protein precipitation)은 단백질 용액에 단백질과 단백질 용매사이의 Energy balance를 변화시키는 물질을 첨가해 단백질의 용해도를 인위적으로 조절하여 단백질을 침전 분리시키는 대표적인 Downstream processing으로, 단백질의 고순도 분리 및 농축이 가능하고 단백질의 변성의 우려가 없이 단백질의 활성을 유지할 수 있는 장점으로 식품, 의약산업에 많이 이용되고 있다. [1]

단백질 결정화법은 단백질의 용해도를 조절하는 방법에 따라 Salting-out precipitation, isoelectric point precipitation, non-ionic hydrophilic polymer precipitation, polyelectrolyte precipitation 등으로 나눌 수 있으며, 이중 단백질이 용액내에서 전하를 띄는 성질을 이용하여 단백질과 반대의 전하를 띄는 CMC(carboxymethyl cellulose, PEI(polyethylene imine), PAA(Polyacrylic acid) 등의 고분자 전해질을 첨가하여 단백질을 분리하는 것이 고분자전해질 결정화법(polyelectrolyte precipitation)이다. [2]

한편, 라이소자임(Lysozyme)은 동,식물조직등 여러가지 자연물에 포함되어 있지만 특히 계란의 흰자위(卵白, Egg white)에 3.5%가량 포함되어 있는 알칼리성 효소 단백질로서 세균의 세포막을 용해(Lysis)하는 특별한 효소로 세균 및 바이러스 등을 불활성 시키는 항생작용으로 의약품이나 식품첨가제로써 많이 사용되고 있다. [3]

본 연구에서는 고분자 전해질로 PAA(Polyacrylic acid)를 사용하여 라이소자임을 Polyelectrolyte precipitation에 의해 침전 분리하였다. 이때 고분자 전해질의 농도, 주입속도, 단백질 용액의 pH, 이온강도 및 교반속도등이 Lysozyme의 회수율, Particle size distribution, Mean particle size에 미치는 영향을 검토하여 고분자 전해질 결정화법에 의한 단백질의 고순도 분리 정제에 관한 연구를 체계적으로 수행하고자 하였다.

#### 이론

고분자전해질 결정화법의 반응메카니즘은 크게 Perikinetic aggregation(

Formation of protein - polyelectrolyte complexes), Orthokinetic aggregation (Formation of flocs)등 두가지로 나눌 수 있다.[4, 5]

1. Perikinetic aggregation (Formation of protein-polyelectrolyte complexes)

단백질용액에 고분자전해질을 첨가하면 초기 결정화단계에서 단백질과 고분자 전해질사이의 정전기력(Electrostatic forces), 수소결합(Hydrogen bondings), 소수성결합(Hydrophobic bondings) 및 Brownian diffusion에 의해 Particle size 0.1-1 μm의 Insoluble protein-polyelectrolyte complex를 형성하는데 이렇게 형성된 complex를 Primary particle이라 하고 Smoluchowski 이론에 따라 2차 반응식으로 표현된다.

$$-\frac{dN}{dt} = \frac{K_a}{W} N^2 \tag{1}$$

- 여기서 N = the number of particle existing at the instant t
- K<sub>a</sub> = Specific rate constant
- W = Stability ratio
- D = Diffusivity
- d = Particle diameter

2. Orthokinetic aggregation (Formation of flocs)

결정화가 진행됨에 따라 Primary particle은 확산보다는 입자간 충돌에 의한 Convective transport에 의해 1 μm이상의 Floc 또는 Aggregate로 성장하게 된다. Floc formation단계에서 Floc size, floc strength등과 같은 Precipitate 특성이 결정되고 더 나아가 단백질 회수 및 정제등에 큰 영향을 미친다. 만약 단백질 용액내 Shear rate이 일정하면 Floc 생성속도식은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\frac{dN}{dt} = \frac{2}{3} A d^3 \left[ \frac{P/V}{\mu} \right]^{1/2} N^2 \tag{2}$$

- 여기서 A = Efficiency for the collisions
- P = Agitation power
- V = Reactor volume
- μ = Viscosity of solution

**실 험**

본 연구에서 사용한 라이소자임 용액과 PAA용액은 모두 용매로 Sodium acetate buffer sol.을 사용하여 제조하였고, 라이소자임 용액은 0.01wt%로 제조하여, 0.45 μm membrane filter로 여과하여 사용하였고, PAA용액은 여과하지 않고 정량펌프를 통하여 반응기내로 투입하였다.

단백질 결정화는 Pyrex 유리로 자체제작한 1L-4-baffle-Rushton type standard reactor로 수행하였으며, 이때 Working volume(V<sub>T</sub>)은 740ml이었고, 스테인레스 스

틸로 된 six-bladed disk turbine impeller를 사용하여 교반하였다.

반응 종결후, 단백질 회수율은 Parry등이 제안한 방법을 응용하여 Lysozyme과 ML cell (Micrococcus lysodekitus cell)과의 용해반응에서 초기 투과율의 변화량을 ML cell의 변화량으로 전환시켜 초기반응속도로 구하였다. 그리고 Particle size analyzer를 이용하여 Mean particle size, particle size distribution을 조사하였다.

## 결과 및 토론

단백질 결정화가 일어나서 Steady state에 도달할 때 까지 Particle size distribution과 mean particle size의 변화를 살펴보고 생성된 Precipitate간의 aggregation이 Particle size distribution과 mean particle size에 미치는 영향을 살펴 보기 위하여 Particle size analyzer내에서 직접 단백질 결정화를 실시한 후 Particle size distribution과 mean particle size를 조사하였다. 이때의 Working volume은 500ml이었고, PAA는 5분간 5ml/min의 투입속도로 반응기내에 투입하였으며 그 결과는 Fig. 1, 2와 같다.

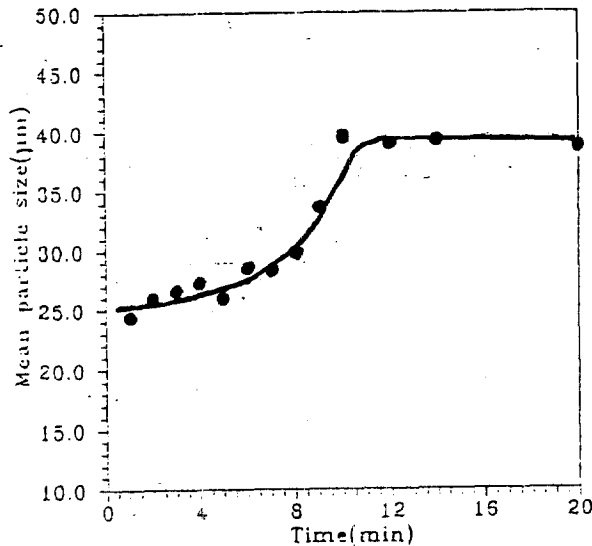


Fig. 1. The change of particle size distribution during precipitation in PSA  
( I = 0.07M, Impeller rpm in PSA = 1,000, Feeding rate = 10ml/min )

Fig. 1에서 보는 바와 같이 PAA가 투입되는 동안 Mean particle size는 계속 증가하다 PAA투입이 끝난 후 곧 일정해져 변화가 없는 것으로 나타났다. 이는 Fig. 2의 Particle size distribution의 변화에서도 같은 경향을 보여주고 있는데 이와 같은 현상을 통해서 PAA가 투입되는 동안에는 계속해서 Particle간의 Aggregation이 일어나다 PAA투입 후 바로 Steady state에 도달함을 알 수 있었고, Steady state에 도달한 이후에는, Precipitate간의 aggregation의 효과는 무시할 수 있음을 알 수 있었다.

PAA/Lysozyme의 비율이 Mean particle size에 미치는 영향을 알아보기 위하여 PAA/Lysozyme의 비율을 각각 0.05, 0.07, 0.10, 0.20으로 Precipitation을 실시한 후

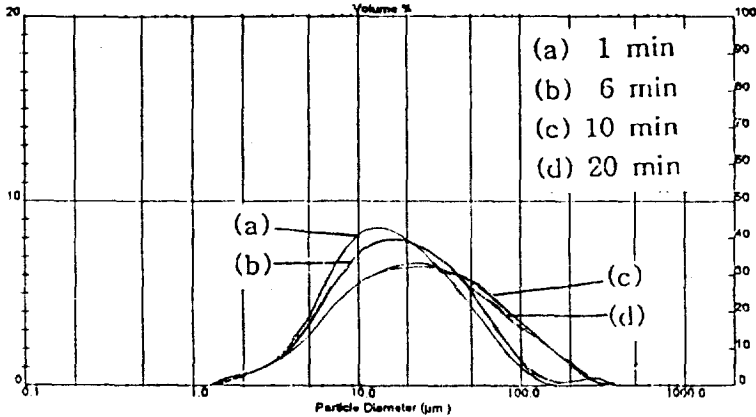


Fig. 2. The change of mean particle size during precipitation in PSA  
 ( I = 0.07M, Impeller rpm in PSA = 1,000, Feeding rate = 10ml/min )

Mean particle size의 변화를 살펴보았다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 PAA/Lysozyme의 비율이 0.1까지는 Mean particle size가 비례적으로 증가하였지만 그 이상에서는 거의 영향을 미치지 않았다. 그리고 PAA/Lysozyme의 비율이 0.4 이상에서는 뚜렷한 상분리가 일어났으며 Mean particle size가 급격히 증가하였다.

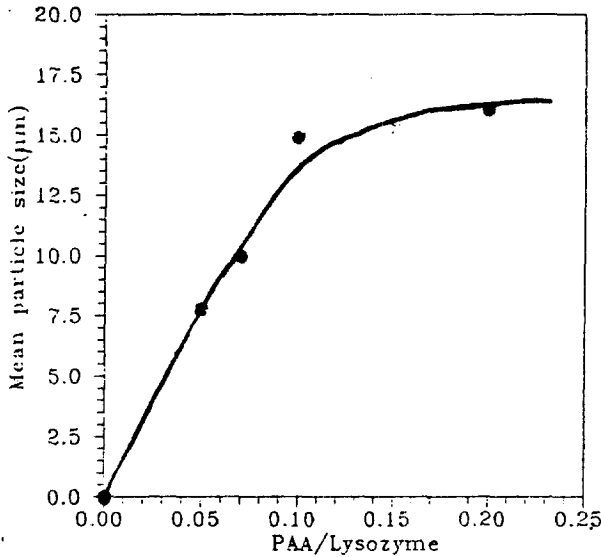


Fig. 3. Mean particle size with PAA/Lysozyme ratio  
 ( I=0.07M, Impeller rpm=1,000, Feeding rate 10ml/min )

**참고문헌**

1. K. M. Clark & C. E. Glatz : Chem. Engng Sci., 47(1), 215(1992)
2. R. R. Fisher & C. E. Glatz : Biotechnol. Bioengng., 32, 777(1988)
3. V. A. Proctor & F. E. Cunningham : CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 26(4), 359(1988)
4. J. F. Kennedy & J. M. S. Cabral : "Recovery Processes for Biological Materials", John Wiley & Sons, New York, 1993
5. Wen Chen & John C. Berg : Chem. Engng Sci., 48(10), 1775(1993)