

고분자 전해질에 의한 단백질 침전분리 메카니즘에 관한 연구

김운수(학), 김우식(정), 김용욱(정)
경희대학교 화학공학과

A Study on the Mechanism of Protein Separation by Polyelectrolyte Precipitation

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

서론

고분자전해질 결정화법(polyelectrolyte precipitation)은 단백질 용액내에서 단백질과 반대의 전하를 띄는 고분자전해질을 첨가하여 단백질과 고분자전해질 사이의 전하 중화(charge neutralization)와 고분자 가교(polymer bridging)등의 메카니즘을 통하여 단백질을 불용화시켜 응집하여 분리하는 대표적인 단백질 분리법이다.[1]

이러한 단백질 결정화법은 단백질의 고순도 분리 및 농축이 가능하고 특히 분리된 단백질이 변성될 가능성이 적고 단백질의 활성을 유지할 수 있다는 잇점으로 식품, 의약분야에서 고부가 가치산업으로 최근들어 많이 이용되고 있다.[2]

단백질의 고순도 분리에 이용되는 고분자 전해질은 단백질의 특성에 따라 polyethylene imine, chitosan등의 polycation과 polyacrylic acid, carboxymethylcellulose, polymethacrylic acid등의 polyanion류의 고분자 물질이 선택적으로 이용된다.[3]

본 연구에서는 계란 흰자위에 다량 함유되어 있는 대표적인 용균효소(溶菌酵素, bacteriolytic enzyme)인 라이소자임(lysozyme)의 분리를 목표로 여러 분자량의 polyacrylic acid를 고분자 전해질로 첨가하여 반회분식 반응기에서 polyelectrolyte precipitation을 실시하였다. 이때 polyacrylic acid의 분자량, polyacrylic acid와 라이소자임의 비, 동력투입량(power input)등이 라이소자임 제거율과 분리된 단백질의 particle size distribution, mean particle size에 미치는 영향을 검토하여 고분자 전해질이 polyelectrolyte precipitation의 mechanism에 미치는 영향을 알아보하고자 하였다.

이론

대표적인 친수성 콜로이드인 단백질 입자는 수용액 중에서 단백질 표면에 붙어있는 아미노기(NH_3^+)와 카르복실기(COO^-)의 side chain의 이온화에 의해 전하를 띄게 된다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 단백질은 단백질의 표면전하전위가 0인 등전점(isoelectric point, pI)을 기준으로 pI보다 낮은 pH에서는 + 전하, pI보다

높은 pH에서는 - 전하를 띄게 되는데, 단백질의 등전점은 단백질마다 고유한 값을 나타낸다. 단백질이 pH에 따라서 전하를 띄는 성질을 이용하여 외부에서 단백질 용액내에 단백질과 반대의 전하를 띄는 고분자 전해질을 첨가하여 단백질과 고분자 전해질을 반응시켜 단백질을 분리하는 것이 고분자 전해질 결정화법 (polyelectrolyte precipitation)이다.[4,5]

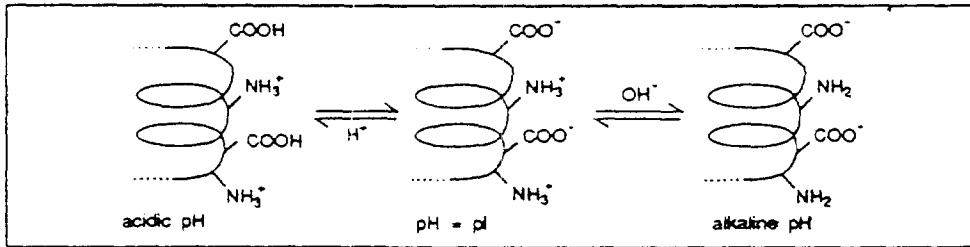


Fig.1. The change of the the net charge of protein with pH

본 연구에서 관심을 두고 있는 라이소자임은 그 등전점이 pH 10.5-11로 알려져 있는데 등전점이 강알칼리인것을 이용하여 단백질 용액의 pH를 산성으로 하여 외부에서 polyacrylic acid와 같은 polyanion polyelectrolyte를 첨가하면 쉽게 분리된다.

고분자전해질 결정화법에 따른 단백질과 고분자 전해질과의 반응으로 인한 단백질 입자의 결정화메카니즘은 크게 Perikinetic aggregation(Formation of protein - polyelectrolyte complexes), Orthokinetic aggregation (Formation of flocs)등 두가지로 나눌 수 있다.[1, 5]

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 μ m의 insoluble protein-polyelectrolyte complex를 형성하는데 이러한 과정을 Perikinetic aggregation 또는 formation of protein-polyelectrolyte complexes으로 부르고, 이렇게 형성된 complex를 primary particle이라 하며 Smoluchowski 이론에 따라 2차 반응식으로 나타낼 수 있다고 알려져 있다.

단백질 결정화가 진행됨에 따라 primary particle은 확산보다는 입자간 충돌에 의한 convective transport에 의해 1 μ m이상의 floc 또는 aggregate로 성장하게 되는데, 이러한 과정을 Orthokinetic aggregation 또는 formation of flocs이라 한다. Floc formation단계에서 floc size, floc strength등과 같은 precipitate 특성이 결정되고 더 나아가 단백질 회수 및 정제등에 큰 영향을 미친다.

실험

본 연구에서는 working volume(V_T)이 740ml인 pyrex 유리로 자체제작한 반회분식 1L-4-baffle-Rushton type standard reactor와 스테인레스 스틸로 된 six-bladed

disk turbine impeller를 사용하여 교반을 실시하며 단백질 결정화를 실시하였다.

단백질 결정화에 이용한 라이소자임 용액과 polyacrylic acid용액은 모두 용매로 sodium acetate buffer sol.을 사용하여 제조하였고, 라이소자임 용액은 0.01wt%로 제조한 후, $0.45\ \mu\text{m}$ membrane filter로 여과하여 용액내에 잔류하는 고형물을 완전히 제거하였고, polyacrylic acid용액은 여과하지 않고 정량펌프를 통하여 반응기 내로 투입하였다. 또한 flow fluctuation을 방지하고 일정량의 유량이 공급되도록 별도의 by-pass line을 설치하였다.

Polyacrylic acid가 라이소자임의 polyelectrolyte precipitation mechanism에 미치는 영향을 알아보기 위하여 particle size analyzer(Mastersizer/E, Marvern社)를 이용하여 mean particle size, particle size distribution을 측정하였고, 반응 종결후, 라이소자임 제거율은 Parry등이 제안한 방법을 응용하여 Lysozyme과 ML cell (Micrococcus lysodekitus cell)과의 용해반응에서 초기 투과율의 변화속도를 ML cell의 변화속도로 전환시켜 얻어진 라이소자임의 초기반응속도로부터 구하였다.

결과 및 토론

Polyacrylic acid의 분자량이 단백질 결정화 결정화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 분자량이 각각 2,000, 450,000, 4,000,000인 PAA(polyacrylic acid)를 이용하여 PAA:Lysozyme=1:5, 이온강도 $I=0.07\text{M}$, 주입속도 $Q=10\text{ml/min}$, $\text{pH}=5$ 인 조건에서 10분간 단백질 결정화를 실시하였다. 이때 반응기의 교반속도는 100 - 1,000rpm을 유지하였으며, 이에 따른 각 조건에서 얻어진 mean particle size와 라이소자임 제거율은 Fig. 2와 3과 같다.

Fig. 2에서 보는바와 같이 분리된 라이소자임의 mean particle size는 PAA의 분자량이 4,000,000인 경우에는 교반속도가 증가함에 따라서 늘어나는 동력투입량

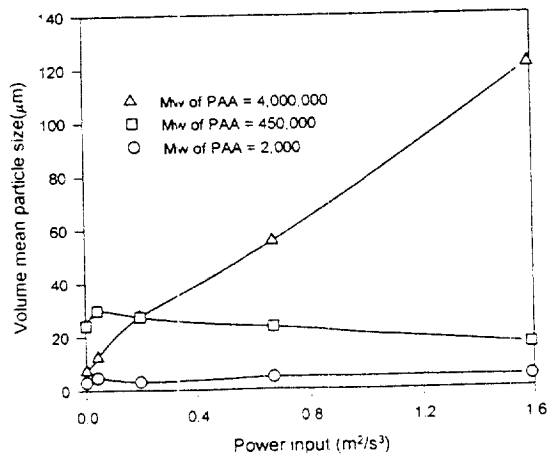


Fig. 2. The change of particle size with power input at various Mw of PAA
($I=0.07\text{M}$, PAA:Lysozyme=1:5, $\text{pH}=5$, $Q=10\text{ml/min}$)

에 일차적으로 증가하는 경향을 보였고, PAA의 분자량이 450,000인 경우에는 교반속도가 300rpm까지는 mean particle size가 증가하다 그 이상에서는 서서히 감소함을 나타냈고, 500rpm 이하에서는 PAA의 분자량이 4,000,000인 경우보다 오히려 mean particle size가 크게 나타났다. PAA의 분자량이 2,000으로 매우 작은 경우에는 동력투입량에 관계없이 거의 일정하게 나타났으며 전체적으로 가장 작은 mean particle size를 나타냈다.

또한 라이소자임의 제거율에 있어서는 Fig. 3에서 알 수 있듯이 전체적으로 동력투입량에 관계없이 PAA의 분자량에 비례적으로 증가하는 것으로 나타났다.

이처럼 PAA의 분자량이 높은 경우에 일정 교반속도이상에서 particle size가 커지고 제거율이 우수하게 나타나는 현상은 PAA분자량이 높으면 라이소자임과 PAA사이의 charge neutralization으로 형성된 particle이 PAA간의 polymer bridging 효과가 우세하게 나타나고, 고분자간의 엉킴으로 인하여 보다 많은 단백질 입자를 제거할 수 있고, particle breakage영향을 덜받기 때문에 size가 커지게 되기 때문으로 사료된다.

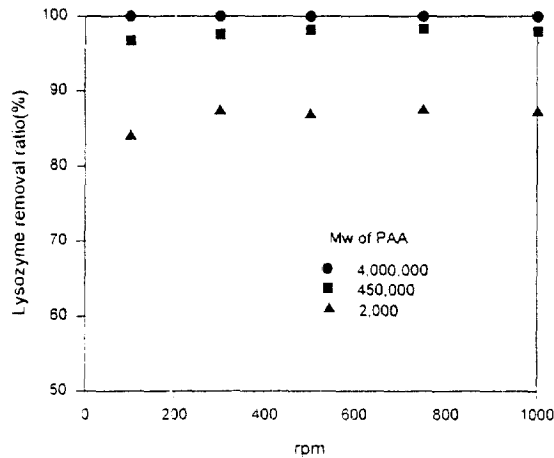


Fig. 3 Lysozyme removal ratio with Mw of PAA
(PAA:L,sozyme=1:5, I=0.07M, Q=10ml/min, pH=5)

참고문헌

1. J. F. Kennedy & J. M. S. Cabral : "Recovery Processes for Biological Materials", John Wiley & Sons, New York, 1993
2. K. M. Clark & C. E. Glatz : Chem. Engng Sci., **47(1)**, 215(1992)
3. M. Q. Niederauer, I. Suominen, M. A. Rougvie, C. F. Ford & C. E. Charles : Biotechnol. Prog., **10(3)**, 237(1994)
4. P. A. Belter, E. L. Cussler & W.-S. Hu : "Bioseparations", John Wiley & Sons, New York, 1988
5. Wen Chen & John C. Berg : Chem. Engng Sci., **48(10)**, 1775(1993)