

저분자량 히아루론산 정제 및 분자량 조절

김현국, 김원철, 이은규
한양대학교 화학공학과

Purification and control of low molecular weight hyaluronic acid

Hyun Kuk Kim, Won Chol Kim¹, Eun Gyu Lee

Bioprocessing Reseach Laboratory, Depart of Chemical Engineering, Hanyang University,
Ansan 425-791, Korea, ¹Depart of Chemical Engineering, Hannam University

서론

히아루론산(Hyaluronic acid)은 N-acetylglucosamine과 D-glucuronic acid가 번갈아 연결되어 있는 다당류로서 이 히아루론산은 사람의 눈조직(초자체), 혈관벽, 피부, 땀줄, 연결근육, 관절등에 널리 분포하고 있다. 이 히아루론산은 물에 녹아 매우 점성을 띠는 액체를 이루며 어느곳으로부터 유래하는가에 따라 분자량은 $10^3 \sim 10^7$ dalton에 이르는 높은 분자량의 다당류이다[1].

산업적으로 히아루론산을 얻는 방법은 크게 두가지가 있는데 한 경우는 닭의 비슬에서 추출하는 것과 *streptococcus* 발효를 통하여 생산하는 경우인데 이렇게 만들어진 히아루론산은 수양액, 관절염 치료제, 상처치료제, 조직공학등 광범위하게 사용되고 있다[2,3]. 또한, 히아루론산은 강한 보습효과가 있으며 물리적 마찰에 대한 윤활효과 및 세균등의 침입에 대한 보호 효과가 있어 피부 노화 방지용 고급 화장품 첨가제 등의 용도로도 사용되고 있다 [4,5]. 또한, 히아루론산의 불안정성을 개선하기 위하여 히아루론산의 유도체에 대한 연구도 많아지고 있는데, 히아루론산의 분자량을 낮추어 화장품으로 응용하려는 연구도 진행되고 있다 [6].

일반적으로 히아루론산을 정제하기 위해서는 에탄올을 반복하여 침전시켜 정제를 하였다.[9] 이 방법은 에탄올을 다량사용하여 분리정제함으로 비용이 많이 들고 에탄올을 재사용을 해야되는 공정이 추가로 필요하는 단점을 가지고 있다. 그래서, 기존의 에탄올 공정을 대체할 수 있는 새로운 공정 가능성에 대한 기초적인 실험을 하였다. 또한, 1.5×10^6 이상의 고분자의 히아루론산은 entanglement가 있어서 유도체하기가 어렵다[7]. 그래서, 저분자량의 히아루론산이 유도체응용에 용이함으로 분자량을 낮추어 정제하는 방법에 대해서 연구하였다 .

재료 및 방법

Hyaluronic acid(HA)는 한남대로부터 발효액을 받아서 정제를 하였다. 한남대에서 발효한 균주는 *Streptococcus zooepidemicus*(AT CC35246)를 기본 균주로 하였고 돌연변이의 유발은 NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)를 이용한 화학적인 방법으로 진행하였다. 비용혈성 균주를 확인하기 위한 blood agar plate와 히아루론산 생산량을 확인하기 위한 Todd-hewitt agar plate를 사용하였다. 비용혈성 고생산 균주를 선택하여 히아루론산을 발효하였다.

히아루론산 정제방법

먼저, 배양액에서 셀을 제거하기 위하여 원심분리방법으로 9000 rpm, 4°C에서 셀을 제거하였다. 원심분리기는 한일의 Mega 17R을 사용하였다. 원심분리하여 셀이 모두 제거되지 않아 0.8 μm Advantec NA-300 filter를 사용하여 여과하였다. 셀 제거를 한 후, HA의 분자량을 조절하기 위하여, french press로 고분자량의 HA를 degradation을 하였다.

셀 제거한 배양액에 있는 단백질을 제거하기 위하여 활성탄 및 이온교환 칼럼을 이용하여 불순물을 제거하였다. 칼럼공정을 선택한 이유는 batch방법으로 불순물을 제거를 할 경우에는, 불순물을 흡착한 활성탄이나 이온교환수지를 다시 제거해야되는 공정이 추가로 필요하며 재생하기가 어려운 단점이 있다. 그래서, 칼럼에 활성탄, 이온교환을 채워서 정제를 하였다.

활성탄 칼럼에는 입자형 활성활성탄 (Activated carbon) CALGON F-400, CALGON CPC, NORIT ROX 08 75 g을 각각 사용하여 실험을 진행하였다. 활성탄, 이온교환칼럼공정은 높이 30 cm, 직경 3 cm의 glass 재질의 open 칼럼에 각각 resin 75 g을 넣어 실험을 하였다. 실험조건은

발효액 100 ml을 open 칼럼에 넣은 후, eluent 속도 6~7 ml/min으로 조절하여 흘려주었다. 활성탄공정에서 cleanig eluent는 DIW(deionized water)로 500 ml을 6~7 ml/min으로 흘려주었고, 이온교환공정에서는 cleanig eluent는 DIW로 300ml을 6~7 ml/min으로 흘려주었다.

Ultra filtration(UF)는 칼럼공정에 의해 희석된 액을 농축하기 위한 공정으로, UF는 Amicon사의 stirred cells 8050을 사용하였다. Figure 1은 한남대 샘플을 분리정제하기 위한 히아루론산의 정제 공정도이다.

HA 분자량 조절

히아루론산의 분자량을 조절하는 방법은 초음파, 압력차에 의해 히아루론산 degradation이 가능하다. 그 중에서 압력차에 의해 degradation하는 것이 분자량 분포를 균일하게 하고 스케일-업이 유리한 장점이 있어서 이 방법을 이용하였다[8]. HA 파쇄기는 homoginizer(french press)를 사용하였으며, 파쇄압력은 french press에서 cell distruption pressure 4000 psi, 8000 psi, 12000 psi에서 20 Pass까지 진행하였다. 파쇄샘플은 GPC로 분자량 및 분자량분포를 분석하여 파쇄정도를 분석하였다. 한남대 발효 샘플의 농도는 0.4%의 샘플을 제조하여 실험을 하였다.

단백질 함량 측정

단백질은 Bio-Rad 사의 bradford의 micro-assay 법으로 측정하였다. Bladford 단백질분석법에 사용된 표준물질은 BSA(Bovine serum albumin)이다. 표준물질을 DIW에 녹여서 샘플을 제조하였다.

DNA분석

핵산은 260 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 히아루론산 용액중에 존재하는 핵산은 double strand DNA로 260 nm에서 흡광도가 1.0일 때 50 $\mu\text{g/ml}$ 에 해당된다. 분석장비는 Pharmacia Biotech ultra 2000을 사용하였다.

히아루론산 분자량 분석

HA의 분자량 및 분자량분포를 분석하기 위하여 GPC를 이용하였다. GPC 분석시스템의 칼럼은 2개의 shodex Ohpak SB-805HQ, 검출기는 showa denko. K.K RI-71을 사용하였다. 분석조건은 eluent 0.1 M NaNO_3 , flow rate 1 ml/min, 온도는 30 $^{\circ}\text{C}$ 이고, sample loading은 100 μl 이다. GPC standard는 PEO를 사용하였으며, standard 분자량은 26,000, 95,000, 170,000, 913,000을 Sigma에서 구입하여 분석하였다.

결과 및 고찰

Shear stress에 의해 HA파쇄

파쇄 결과, 8000 psi, 12000 psi인 경우는 10 pass에서 분자량이 '5백만'에서 '백만'까지 degradation이 되었고 12000 psi · 20 pass인 경우는 500 kDa까지 degradation이 되었다. 예상되리 파쇄압력이 높아질수록 파쇄가 잘 되는 경향이 있고 4000 psi인 경우는 다른압력에 비해서 파쇄정도가 떨어짐을 알 수가 있었다. 한남대 발효샘플은 점도가 낮아서 희석하지 않는 조건에서도 파쇄가 가능하였다 (Figure 2).

고순도 HA 정제공정

균체제거 및 파쇄공정을 거친 후, 기존공정인 에탄올침전공정을 대체하기 위하여 활성탄 및 이온교환수지를 open column에 채워 불순물제거 비교실험을 하였다. 그래서, Column공정이 에탄올공정을 대체가능한지 실험을 진행하였다. 불순물제거에 가장좋은 활성탄을 선택하기 위하여 여러가지 활성탄을 가지고 실험한 결과, CALGON F-400, CALGON CPC가 발효배지 흡착능이 가장 좋았고 resin 75 g당 발효액 200 ml를 처리할 수가 있었다. CALGON F-400이 CALGON CPC보다 가격이 저렴함으로 CALGON F-400으로 불순물제거실험을 하였다.

활성탄 칼럼실험은 파쇄공정을 거친 발효액을 활성탄칼럼에 100 ml을 흘려준후, 100 ml씩 cleanig eluent을 흘려주어 샘플링을 하여 HA와 단백질과 핵산 및 색소의 변화량을 측정한 결과, HA는 약 5%의 손실이 생겼지만, 단백질은 73%, 핵산은 96%가 제거되었다 (Figure 3). 활성탄 칼럼공정에서 cleanig eluent을 흘려줄 경우 HA는 세척액에 따라 흘러나와서 수율이 높아진 반면, 다른 불순물은 흡착되어 흘러나오지 않았다. 그 이유는 HA는 불순물과는 달리 분자량이 커서 활성탄에 흡착이 안되고 cleanig eluent에 의해 세척액과 함께 나오기 때문이라 생각된다. 그리고, 활성탄으로 화장품수준까지 불순물 함량을 낮출 수가 없어서, DNA 제거에 효과가 좋은 Amberlite IRA 402-CL 이온교환(Ion exchange)칼럼으로 DNA 제거 실험을 하였다. 음이온교환

칼럼공정으로 불순물제거를 한 경우, 활성탄공정과 비슷하게 HA는 elution과 함께 흘러나왔지만, 불순물은 흡착되어 흘러나오지 않았다. 그 이유는 활성탄공정과 비슷한 이유라고 생각된다. 불순물 제거정도는 Table 1에 표현하였다.

결론

결론적으로, shear stress에 의해 히아루론산의 분자량을 조절하여 500 kDa까지 조절이 가능하였다. 그리고, 칼럼공정으로 저분자량의 히아루론산을 정제하여 수율은 91.2%을 얻을 수 있었고 불순물인 단백질은 0.11 mg/g HA, 핵산은 0.05 mg/g HA의 기준이하로 낮추었다. 다만, 발효액 부피 대비 10배가 희석이 되어서 농축공정이 필요하게 되었다. 이 정제방법은 수율이나 불순물제거에서 에탄올침전 공정보다 더 우수하고 에탄올을 사용하지 않고 정제함으로써 경제적인 공정이라 생각된다.

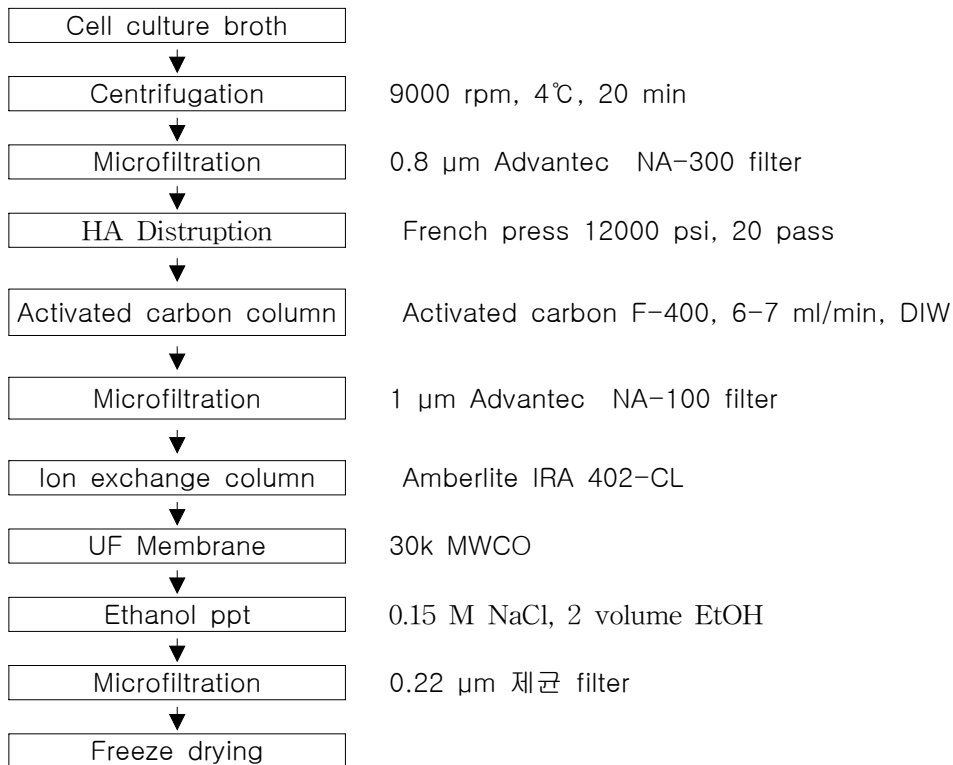


Figure 1. Purification process of hyaluronic acid

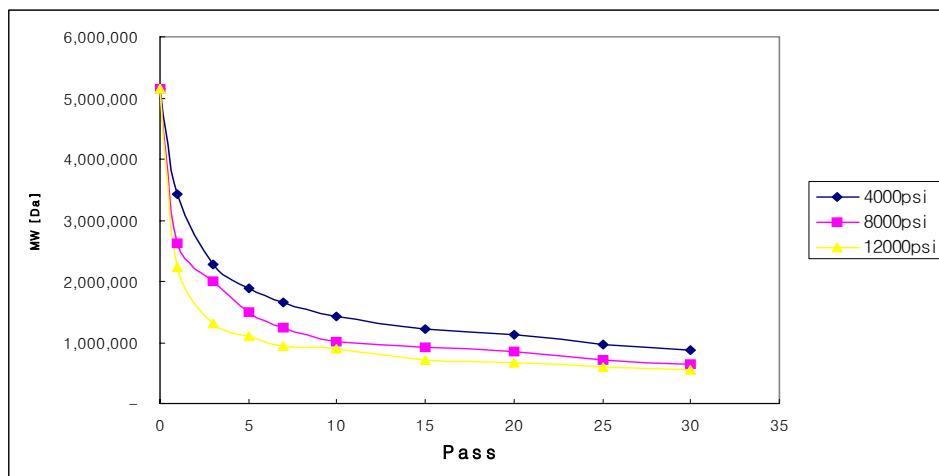


Figure 2. HA degradation by Frech press in constant pressure
 Cell destruction pressure : 4000 psi, 8000 psi, 12000 psi
 sample concentration : 0.4% filtrate of fermentation broth

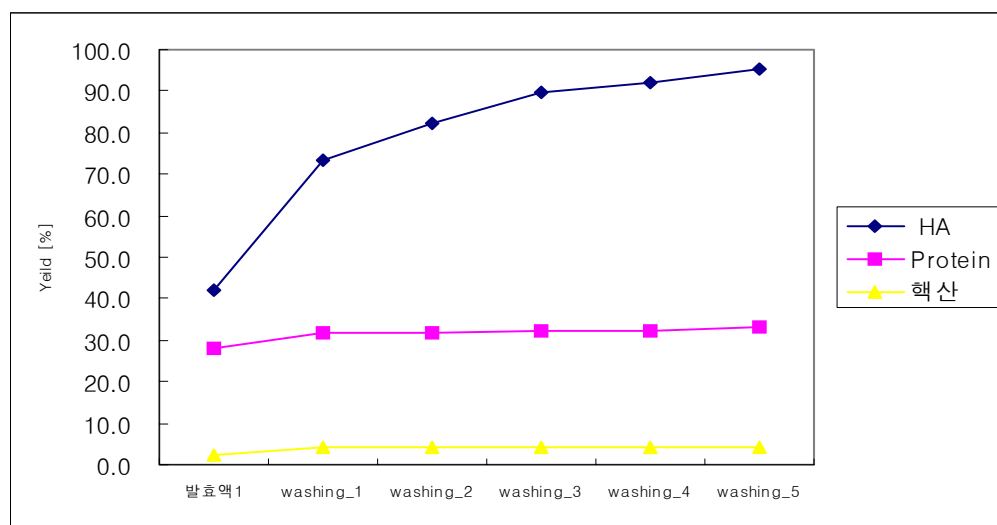


Figure 3. Relation of HA yield and impurity in activated carbon column process
 Activated carbon : F-400, Elution : 6~7ml/min

Table 1. Content change of impurity and hyaluronic acid during purification in ethanol precipitation process and column process

Purification step	Recovery of HA (%)	Protein ($\mu\text{g/g}$ 1%HA)	Nucleic acid ($\mu\text{g/g}$ 1% HA)
Filtration of fermentation broth	95.7	276.3	2269.9
Filtration of activated carbon	92.8	46.1	43.2
Filtration of ion exchange	91.2	1.1	0.5
Control data of ethanol precipitation	40.7	7.7	18.1

Reference

- [1] T.C Laurent, U.B.G. Laurent, J.R.E. Fraser, Functions of hyaluronan, *Ann. Rheum. Dis* 54 (1995) 429-432
- [2] J. Entwistle, C.L. Hall, E.A. Truley, Hyaluronan receptors, regulators of signalling to the cytoskeleton, *J. Cell Biochem.* 61 (1996) 569-577
- [3] N.E. Larsen, E. Leshchiner, E.A. Balaz, Biocompatibility of Hylan polymers in various tissue compartments, *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 394 (1995) 149-153
- [4] E. A. Balaz and D. A. Gibbs, *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix*, 3 (1970) 1241
- [5] R. H. Pearce and B. J. Geimmer, *Advances in the Biology of Skin*, 3 (1970) 89
- [6] Garrido, Ricardo, Aqueous gel, usable in cosmetics, based on hyaluronic acid and deoxyribonucleic acid, and a preparation process, US Patent 5,194,253
- [7] Young-S00 Soh, Hyaluronic acid: properties and applications, *polymer(korea)* 12 (1988)
- [8] T. Miyazaki, C. Yomota, S. Okada, Ultrasonic depolymerization of hyaluronic acid, *polymer degradation and stability* 74 (2001) 77-85
- [9] Deok-kun Oh, purification of biosynthesized hyaluronic acid for its medical application, *J. Biotechnol. Bioeng.* 11 (1996) 15-21