

반회분식 반응기에서 Polyacrylic Acid를 이용한 Lysozyme Precipitation 연구

김운수 · 김우식[†]

경희대학교 화학공학과/재료과학연구소
(1999년 6월 20일 접수, 1999년 11월 2일 채택)

Lysozyme Precipitation with Polyacrylic Acid in Semi-batch Reactor

Woon-Soo Kim and Woo-Sik Kim[†]

Department of Chemical Engineering/Institute of Materials Science & Technology,
Kyunghee University, Suwon 449-701, Korea
(Received 20 June 1999; accepted 2 November 1999)

요 약

Rushton type의 반회분식 표준반응기에서 여러 가지 분자량의 PAA(polyacrylic acid)로 lysozyme 침전반응을 실시하여, 교반세기, 교반시간 및 PAA 첨가량 등과 같은 조업조건이 침전반응에 미치는 영향을 실험적으로 연구하였다. 분자량 4,000,000의 PAA를 침전제로 사용하였을 경우가 PAA 분자량 450,000과 2,000인 경우보다 동일한 조업조건에서도 lysozyme 침전입자 크기가 크게 나타났으며, lysozyme의 회수율도 높게 나타났다. 반응기내의 교반세기는 PAA 분자량 2,000을 제외하고는 침전입자의 입자크기에는 영향을 주었지만, lysozyme의 회수율에는 PAA 분자량에 관계없이 아무런 영향을 미치지 않았다. 그리고 lysozyme 침전입자의 형태는 PAA 분자량에 관계없이 모두 무정형을 나타내었으며, PAA 분자량에 따른 침전입자의 형태변화는 발견되지 않았다.

Abstract – Experimental investigation on the effects of operational conditions, such as agitation intensity, agitation time and PAA dosage, on the precipitation of lysozyme and PAA(polyacrylic acid) with several molecular weights in Rushton type standard semi-batch reactor was carried out. When PAA with a molecular weight of 4,000,000 was used as a precipitant, the larger particle size of lysozyme precipitate as well as the higher recovery ratio of lysozyme were obtained than when PAA with a molecular weight of 450,000 and 2,000 were used. The agitation intensity in the reactor influenced the particle size of the precipitate, except for in PAA with a molecular weight of 2,000, but had no influence on the recovery ratio of lysozyme regardless of the molecular weight of PAA. The morphology of lysozyme precipitate was amorphous, the morphology change was not observed with change of the molecular weight of PAA.

Key words: Precipitation, Lysozyme, Polyacrylic Acid, Polymer Bridging, Power Input

1. 서 론

현재 실용화되고 있는 단백질 분리정제기술은 크게 크로마토그래피법, 분리막법 그리고 단백질 침전법 등 세 가지로 집약된다. 이중 단백질 침전법(protein precipitation)은 단백질 용액내에 단백질의 용해도를 인위적으로 감소시킬 수 있는 침전제(precipitant)를 첨가하여 단백질을 고체상태로 응집시켜 분리 회수하는 단백질 분리정제기술이다[1].

단백질 침전법은 다른 방법에 비하여 공정확대가 용이하고, 장치비와 재료비가 저렴하며, 회수된 단백질의 활성이 저하될 가능성이 낮다는 장점이외에도 특별히, 단백질이 회수되는 동안 원하는 단백질만의 선택적인 분리(fractionation)와 농축(concentration)이 동시에 가능하다[2]. 이 때문에 단백질 침전법은 오래 전부터 식품 및 의약품에서

bovine serum albumin, catalase, lysozyme, soy protein 및 canola 등과 같은 고부가가치의 효소단백질 생산에 많이 이용되어 왔다[3-13].

단백질 침전법에서 단백질의 회수율, 회수된 단백질의 크기분포 등, 그 반응특성은 단백질 용액에 첨가되어 단백질의 용해도를 감소시키는 핵심물질인 침전제의 종류에 의해 결정된다. 고분자전해질 침전법(polyelectrolyte precipitation)은 단백질 용액내에서 단백질 전하의 상대이온으로 이온화되는 고분자전해질을 침전제로 첨가해서 단백질 용액을 불안정하게 만들고, 단백질과 고분자전해질 사이의 정전기적 인력에 의해 상분리된 단백질 침전입자들을 교반으로 응집시켜 분리하는 방법이다[1, 2]. 이 방법은 단백질과 고분자전해질간의 전하 중화(charge neutralization)뿐만 아니라 단백질 침전입자간의 고분자 가교(polymer bridging)와 같은 고분자전해질만이 나타내는 특성을 이용할 수 있기 때문에 회수된 단백질 입자의 결합력이 강하고, 입자크기도 다른 방법에 비하여 크게 나타나서 지금까지 많은 연구의 관심대상이 되어왔다.

[†]E-mail: wskim@nms.kyunghee.ac.kr

Clark과 Glatz[4, 9]는 반회분식 반응기를 이용한 계란 흰자위 단백질 침전반응에서 침전제로 CMC(carboxymethylcellulose)를 사용하여 침전제의 첨가방법이 계란 흰자위 단백질의 회수율에 미치는 영향을 조사하였다. 그들은 이 연구에서 단백질의 회수율은 CMC의 첨가횟수에 관계없이 최종적으로 반응기에 첨가된 CMC의 양에 의해 결정되는 것을 관찰하였다. 그리고 혼합 단백질 용액의 침전반응에서는 반응기내의 단백질 용액의 pH에서 더 큰 전하세기(charge density)를 띄는 단백질이 전하세기가 작은 단백질보다 우선적으로 먼저 회수되는 것을 발견하였고, CMC의 첨가량은 단백질의 전하세기에는 비례하지만 단백질 용액의 이온강도에는 영향이 없다고 보고하였다.

이러한 연구결과를 Chen과 Berg[3, 6], Hill과 Zadow[11]가 실시하였던 lysozyme, whey protein 실험에서도 관찰되었는데, 이들 연구에서도 단백질의 회수율은 고분자전해질의 분자량에 관계없이 첨가량에 비례하는 것으로 나타났다. 그리고 Shieh와 Glatz[8]는 반회분식 반응기를 사용한 lysozyme-PAA(polyacrylic acid) 침전반응에서 PAA의 전하세기는 단백질과 마찬가지로 용액의 pH에 따라 달라지지만 PAA의 분자량에는 무관함을 발견하였다.

한편, Chen과 Rohani[7]는 반회분식 반응기로 canola와 CMC, HCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 각각 침전반응시켜 동일한 반응조건에서 침전제의 종류별로 회수된 단백질 침전입자크기를 조사하였다. 이 연구에서 단백질 침전입자크기는 침전제의 분자량에 비례하였는데, CMC를 사용했을 때 입자크기가 가장 크게 나타났다. 이들은 이러한 이유를 고분자 가교로 설명하였는데 이러한 현상은 Chan 등[10], Nelson과 Glatz[12]의 연구결과에서도 유사하게 나타났다. 그리고 Fisher와 Glatz[13], Chen 등[3, 5]는 반응기내의 교반세기가 단백질 침전입자크기에 미치는 영향을 조사하였는데, 이들의 연구결과에 따르면 고분자전해질 침전반응으로 회수된 단백질 침전입자크기는 교반세기가 커짐에 따라서 입자크기가 증가하다가 특정 교반세기 이상에서는 입자크기가 감소하는 것으로 나타났다.

고분자전해질 침전법으로 분리되는 단백질은 미세한 크기의 침전입자(precipitate)로 되어 있기 때문에 침전반응 종료후 효율적이고, 경제적으로 단백질을 분리정제하기 위해서는 단백질 회수율뿐만 아니라 단백질 침전입자의 강도 및 크기조절도 필수적이다. 따라서, 침전반응의 조업조건이 단백질 침전입자의 조성뿐만 아니라 물성에 미치는 영향도 매우 중요하게 다루어져야 한다. 그러나 앞서 언급한 대부분의 연구에서는 단백질 용액의 pH, 이온강도, 온도, 점도 및 고분자전해질의 첨가량과 같이 주로 단백질 침전입자의 조성에 영향을 미칠 수 있는 단백질 용액의 화학적 환경(chemical environment)의 변화가 단백질 침전반응에 미치는 영향을 조사하였다. 이로 인해 교반세기, 교반시간 및 고분자전해질의 분자량 등과 같이 단백질 침전입자의 물성에 영향을 미칠 수 있는 침전반응의 기계적인 환경(mechanical environment)변화가 단백질 침전반응에 미치는 영향에 대한 체계적인 연구가 부족한 실정이다.

본 연구에서는 반회분식 반응기에서 여러 가지 분자량의 PAA를 침전제로 계란 흰자위에 다량 함유되어 있는 lysozyme의 고분자전해질 침전반응을 실시하여, 교반세기, 교반시간, PAA 분자량 및 첨가량 등 침전반응의 조업조건변화가 lysozyme 침전입자크기 및 형태와 같은 입자특성과 lysozyme 회수율에 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구에서는 특히, 반응기내의 교반세기를 동력투입량으로 정량화할 수 있는 Rushton type 표준반응기를 반회분식 반응기로 사용하여, 교반에 의한 기계적인 환경변화가 lysozyme 침전반응에 미치는 영향을 체계적으로 규명하였다.

2. 이 론

2-1. 고분자전해질 침전반응 메커니즘

고분자전해질 침전반응은 반응이 진행되는 동안 반응기내에서 입자간의 충돌원인에 따라 크게 perikinet적 응집, orthokinet적 응집으로 나뉘어진다. Perikinet적 응집은 단백질과 고분자전해질 분자들간의 확산에 의한 충돌로 protein-polyelectrolyte complex 형태의 단백질 침전입자가 형성되는 단계를 말한다. Orthokinet적 응집은 perikinet적 응집 단계에서 형성된 protein-polyelectrolyte complex가 교반에 의한 충돌로 floc 또는 aggregate로 성장하는 단계를 말하며, 이 두 가지의 메커니즘은 경쟁적으로 일어난다[2].

2-1-1. Perikinet적 응집

단백질 용액에 고분자전해질을 첨가하면 단백질과 고분자전해질 분자는 브라운 확산에 의해 자신이 가지고 있던 열에너지를 방출하면서 끊임없이 미소운동을 하며 서로 충돌한다. 이 충돌로 인해 고분자전해질과 단백질은 서로 흡착되어 단백질 주위의 이온을 제거시켜 단백질 입자간의 정전기적 척력을 떨어뜨리고, 단백질입자와 정전기력, 수소결합, 소수성결합으로 불용성의 protein-polyelectrolyte complex를 형성한다[1, 9].

브라운 확산 하에서 protein-polyelectrolyte complex는 용액의 교반에 의한 유체역학적인 힘의 영향을 받는 최소단위인 0.1-1 μm 정도의 primary particle까지 성장하는데, 이 성장은 매우 빠르게 진행된다.

Smoluchowski 이론에 따르면 perikinet적 응집에서 단백질과 고분자전해질간의 확산에 의한 충돌빈도수(충돌속도)는 단백질과 고분자전해질 분자의 분자량과 농도, 용액의 온도 및 점도 등 주로 단백질 용액의 용해도에 변화를 주는 화학적 특성에 의존한다[14, 15].

2-1-2. Orthokinet적 응집

단백질과 고분자전해질 분자의 확산에 의한 충돌로 primary particle까지 성장한 단백질 침전입자는 입자크기가 커짐에 따라 확산보다는 용액의 기계적인 교반에 의한 유체의 운동으로 서로 충돌하여 floc 또는 aggregate로 성장한다. 이와 같이 perikinet적 응집으로 생성된 입자들이 교반의 영향을 받아 성장하는 과정을 orthokinet적 응집이라고 한다. 이때 입자간의 충돌빈도수는 교반세기에 비례하고, 이 단계가 고분자전해질 침전반응을 주도한다[13, 16].

고분자전해질 침전반응에서는 특별히 orthokinet적 응집단계에서 입자들의 충돌이 일어나는 동안, 서로 다른 입자사이에 단백질과 고분자전해질이 흡착되는 고분자 가교효과를 기대할 수 있기 때문에 회수된 단백질 침전입자크기가 크게 나타난다[6, 16].

2-2. 교반세기의 정량화

기계적으로 교반되고 있는 반응기에서 교반에 의해 반응기내로 투입되는 동력량의 정량화는 교반기 날개(impeller tip)에서 반응기내의 유체에 전달되는 동력량을 나타내는 동력소비량(power consumption, P_t)이 이용된다[17, 18]. 즉, 동력소비량은 정상상태의 교반속도에서 용액에 투입되는 동력량으로, 여기에 사용되는 반응기는 용액내에 강한 축방향 흐름으로 난류를 발생시켜 macromixing과 micromixing에 최적으로 알려져 있는 Rushton type 표준반응기를 주로 사용한다. 이 Rushton type 표준반응기는 교반으로 생성된 전단력의 크기를 동력투입량으로 쉽게 정량화할 수 있기 때문에 교반효과의 해석이 용이하다[19].

일반적으로 반응기에 투입되는 동력소비량은 반응기내의 유체가 Newtonian 유체라고 가정하면 식 (1)과 같이 표현된다.

$$P_t = \frac{N_p n_r^3 D_a^5 \rho}{g_c} \quad (1)$$

여기서 동력수 N_p 는 용액의 특성, 반응기의 규격, 교반기의 회전속도 등을 무차원화시켜서 나타나는데, Reynolds수, Froude수, 반응기의 shape factor들의 함수로 표현된다. 그러나 반응기로 Rushton type 표준반응기와 같이 반응기의 규격이 일정하고, 방해판이 있는 경우에는

Table 1. Mixing parameters in Rushton type standard reactor

rpm[sec ⁻¹]	N _{Re} [-]	N _p [-]	P _d [W]	ϵ [m ² /s ³]	V _g [s ⁻¹]	λ [μ m]	τ_s [N/m ²]
100	1,650	5	0.000911	0.00123	33.4	181.4	0.037
300	4,950	6	0.0294	0.0397	190.0	76.1	0.209
500	8,250	6	0.136	0.184	351.6	51.9	0.387
750	12,375	6	0.459	0.62	646.0	38.3	0.710
1,000	16,500	6	1.09	1.47	1,156.0	30.8	1.272
1,200	19,800	6	1.88	2.54	1,519.6	26.9	1.672
1,500	24,750	6	3.67	4.96	2123.5	22.8	2.336

Froude수, 반응기의 shape factor의 영향은 무시되어 동력수는 Reynolds 수와의 상관관계에서 얻어진다.

Kolmogoroff 평형이론에 의하면 반응기내에서 교반에 의한 유체의 상대속도는 동력소비량을 유체의 질량으로 나눈 평균동력투입량(power input, ϵ)을 기본단위로 사용하여 표현하는데, 이 평균동력투입량은 교반에 의해 용액이 유동되는 난류의 정도를 나타내는 지표이다. 그리고 일단 기계적인 교반으로 반응기에 투입된 동력소비량을 알게 되면 평균동력투입량이 결정되기 때문에 교반에 의해 특성지어지는 전단속도(shear rate, V_g), eddy 크기(eddy size, λ), 평균전단응력(mean shear stress, τ_s) 등도 평균동력투입량으로 쉽게 구해진다.

본 연구에서 사용된 Rushton type 표준반응기에서 교반세기를 정량화하여 얻어진 Reynolds수, 동력수, 총괄동력소비량, 평균동력투입량, 전단속도, eddy 크기, 평균전단응력을 요약하면 Table 1과 같다. 이때 반응용액의 밀도, 점도 및 교반기의 지름은 각각 1,000 kg/m³, 0.0011 kg/m·s 및 0.033 m를 기준으로 하였다[15].

3. 실험

3-1. 반응물의 조제

Lysozyme 침전반응에 사용된 lysozyme과 PAA 용액은 pH 5.2, 3 M sodium acetate buffer solution(SIGMA, ACS grade)원액을 3차 증류수로 0.07 M까지 희석시킨 희석액에 분자량 143,000의 lysozyme(SIGMA, ACS grade)과 PAA(Aldrich, ACS grade)를 분자량별로 용해시켜 조제하였다. 이때 lysozyme 용액은 계란 흰자위에서 lysozyme의 물성을 고려하여 모델용액을 사용하였다.

먼저, lysozyme 용액은 0.01 wt%(6.99*10⁻⁵ mol/l)로 일정하게 조제하였고, 침전반응 전에 기공크기가 0.45 μ m인 membrane filter(Gelman science, SUPOR-450)로 여과하여 lysozyme 용액내에 잔류하는 고형물이 침전반응에 영향을 미치지 못하도록 완전히 제거하였다. 그리고 PAA 용액은 분자량이 4,000,000, 450,000, 2,000인 세 가지를 사용하였으며, PAA 용액의 농도는 반응기내에서 lysozyme과의 반응비를 고려하여 5*10⁻⁴~2.0*10⁻³ wt%(1.25*10⁻⁹~1.0*10⁻⁴ mol/l)로 조정하였다. PAA 용액은 별도로 여과하지 않고 침전반응에 사용하였다[13].

본 연구에서 사용된 lysozyme과 PAA의 농도, PAA의 첨가량은 PAA 용액의 투입이 종료된 후, 반응기내에서 lysozyme과 PAA의 농도와 그때의 lysozyme과 PAA의 질량비(P_d =g PAA/g lysozyme)를 각각 기준으로 하였다.

3-2. 침전반응기 제작

반회분식 침전반응기로 사용한 Rushton type 표준반응기는 반응용액의 working volume이 740 ml가 되도록 pyrex유리로 자체 제작하였고, 교반시 용액의 소용돌이 현상을 방지하고 반응물의 혼합을 효과적으로 하기 위하여 아크릴로 된 4개의 baffle을 반응기 내벽에 설치하였다. 그리고 교반기로는 six-bladed disk turbine impeller를 스테인레스 강판으로 제작하였으며, 그 표면을 매끄럽게 처리하고 교반

장치(Caframo Ltd., BDC 1850)에 장착하여 사용하였다.

3-3. 실험방법

Lysozyme 침전반응은 먼저, 반응기내에 lysozyme 용액 640 ml를 넣고, 교반장치를 이용하여 교반속도를 조절한 후, 정량펌프로 PAA 용액 100 ml를 10분 동안 반응기내에 첨가하여 수행하였다. 그리고 교반시간은 실험조건에 따라 10-40분까지 변화를 주었으며, 침전반응이 종료된 후 곧바로 시료를 채취하여 결과를 분석하였다. 대략적인 실험장치의 개형은 Fig. 1과 같다.

그리고 침전반응이 일어나는 동안 반응용액의 화학적 특성을 일정하게 하기 위하여 반응용액의 온도는 실온으로 일정하게 유지시켰다.

3-4. 분석

Lysozyme 침전반응으로 생성된 lysozyme 침전입자의 평균입자크기와 입자크기분포는 침전반응이 종료된 후, 즉시 입자분석기(particle size analyzer, Marvern Co., Mastersizer/E)를 이용하여 측정하였다. 이때 침전반응이 종료된 후부터 입자분석에 걸리는 시간을 최소화하기 위하여 측정 전에 입자분석기의 모든 조건을 미리 맞추어 대기상태로 준비하였다가 분석을 수행하였다.

그리고 lysozyme 회수율은 침전반응이 끝난 후, 즉시 반응용액을 WATMAN 여과지(WATMAN 3: pore size<6 μ m)로 여과시켜 lysozyme 침전입자를 제거시킨 후, 용액 중에 용해되어 있는 lysozyme의 농도를 분석하여 환산하였다. Lysozyme의 농도분석에는 lysozyme과 M.

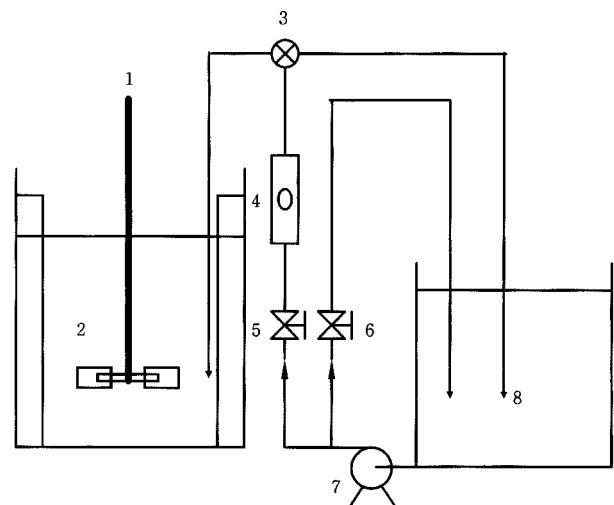


Fig. 1. Schematic diagram of semi-batch experimental apparatus.

- | | |
|---|---------------------------|
| 1. Six-bladed disk turbine impeller | 4. Flow meter |
| 2. 4-baffle-Rushton type standard reactor | 5. Needle valve |
| 3. 3-way valve | 6. By-pass valve |
| | 7. Peristaltic pump |
| | 8. PAA solution reservoir |

lysodeikticus cell의 용해반응속도론을 응용한 Kim 등[20]의 방법을 이용하였다.

이외에도 ZETAPHOREMETER II(FRANCE)와 주사전자현미경(SEM: Leica, Stereoscan 440)으로 lysozyme 침전입자의 제타전위와 형태를 조사하였다.

4. 결과 및 고찰

4-1. 교반세기의 영향

Lysozyme 침전반응에 미치는 교반세기의 영향은 PAA 첨가량을 일정하게 유지시킨 후 0.00123-4.96 m²/s³의 교반세기로 침전반응을 실시하여 lysozyme의 침전입자크기와 회수율의 변화로 살펴보았다. 이때 PAA의 첨가량(g PAA/g Lysozyme)은 PAA 분자량에 관계없이 0.2를 유지하였다. 이 첨가량은 PAA 분자량 4,000,000에서 lysozyme을 100% 회수하는데 쓰여진 최소량으로, 본 연구에서 사용한 세 가지 분자량의 PAA 중에서 PAA를 각 분자량별로 동일량을 투입하였을 때 가장 먼저 100%의 lysozyme을 회수하는데 필요한 양이었다.

먼저 Fig. 2는 여러 가지 lysozyme 침전반응으로 얻어진 대표적인 lysozyme 침전입자의 크기분포를 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 회수된 lysozyme 침전입자 크기분포는 peak가 1개 나타나는 monomodal의 형태를 나타내었으며, 조업조건에 따라 좌우로 전이되었다. 이것은 조업조건의 변화가 침전반응을 통해 침전입자크기분포에 영향을 미친 결과로 본 연구에서는 이 영향을 정량화하기 위하여 입자분석기로 분석된 각각의 입자크기분포에서 부피평균입자크기($L_{4,3}$)를 계산하여 lysozyme 침전입자크기로 사용하였다.

Fig. 3은 교반세기에 따른 lysozyme 침전입자의 크기변화를 PAA 분자량별로 나타낸 것이다. Lysozyme 침전입자크기는 대체적으로 교반세기에 관계없이 PAA의 분자량에 비례하였으나, 교반세기에 대해서는 다양한 경향을 나타내었다. 우선 PAA 분자량이 4,000,000인 경우에는 평균입자크기가 1.47 m²/s³까지는 교반세기에 비례하여 급격히 증가하다가, 그 이상에서는 반대로 급격히 감소하다 서서히 일정해지는 경향을 나타내었다. 그리고 PAA 분자량이 450,000에서는 0.0397 m²/s³까지는 평균입자크기가 약간 증가하다가 그 이상에서는 입자크기가 다시 약간 감소하다가 일정해졌다. 이에 반해서 PAA 분자량 2,000에서는 교반세기에 관계없이 입자크기가 일정하게 나타났다.

이러한 현상은 PAA 분자량에 따른 전하중화와 고분자 가교효과의 차이로 설명할 수 있다. Lysozyme 침전반응에서 lysozyme의 표면이

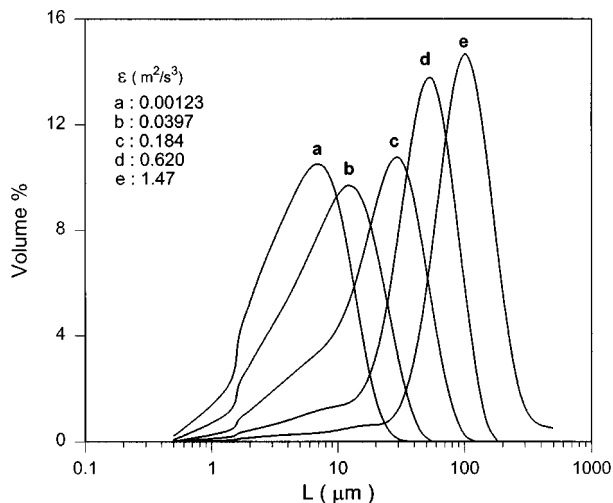


Fig. 2. Typical particle size distribution of lysozyme precipitation(Mw of PAA=4,000,000, $P_a=0.2$).

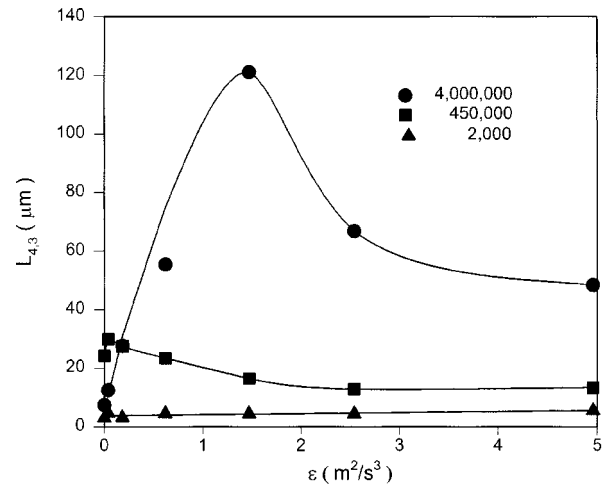


Fig. 3. The mean particle size of lysozyme precipitate with power input at various Mw of PAA.

흡착되어 그 표면전하를 중화시키는데 필요한 PAA 주쇄(main chain)의 길이는 PAA의 분자량에 관계없이 언제나 일정하다. 그러나 PAA 분자의 엉킴현상(entanglement)과 주쇄의 전체길이는 그 분자량에 영향을 받는다. 즉 PAA의 분자량이 낮아지면 PAA 주쇄의 길이가 짧아져 엉킴현상이 약하고 PAA 분자의 개수는 늘어나기 때문에 Brown 운동에 의한 충돌에 유리해진다. 이러한 경우, perikinet적 응집단계에서 lysozyme에 PAA가 조밀하게 흡착되기는 하지만 PAA의 낮은 분자량으로 하나의 PAA가 여러 개의 lysozyme과 동시에 흡착이 이루어질 수 있는 가능성이 줄어든다. 이로 인해 orthokinetic 응집단계에서 교반에 의한 입자간의 충돌이 일어난다고 할지라도 서로 다른 입자사이의 lysozyme과 PAA간의 흡착이 원활하지 못하고, PAA 분자에 의한 고분자 가교효과도 미미하여 입자가 크게 성장하지 못하게 되는 것이다.

반면에 PAA 분자량이 커지면, PAA 분자의 개수는 줄어들지만 엉킴현상이 우세하고 주쇄의 길이도 길어져 perikinetic 응집단계에서 lysozyme이 PAA 분자 전체에 골고루 분산되어 흡착되어도 여전히 lysozyme이 흡착되지 않은 PAA에서 lysozyme과 강하게 흡착이 이루어질 수 있는 PAA 주쇄길이가 존재하게 된다. 그래서 교반에 의한 입자간의 충돌이 일어나면, 서로 다른 입자사이의 lysozyme과 PAA간의 흡착이 원활해지고, PAA 분자에 의한 입자와 입자를 연결하는 고분자 가교효과도 우수하여 입자가 크게 성장하게 된다.

이와 같이 침전반응에 투입된 PAA 분자량에 따라 고분자 가교효과가 다르게 나타나기 때문에 고분자 가교효과가 가장 많이 나타나는 PAA 분자량 4,000,000에서 lysozyme 침전입자크기가 가장 크게 나타났고, PAA 분자량 2,000에서 입자크기가 가장 작게 나타난 것이다.

그리고 교반은 용액내에서 입자들간의 충돌을 유도하여 입자가 성장하도록 도와주기도 하지만, 교반세기에 비례하여 입자와 용액사이의 전단응력(shear stress)으로 입자의 쪼개짐(breakage)도 일으키는 이중성을 가지고 있다. 이때 입자의 쪼개짐은 입자의 크기와 입자간의 결합력에 크게 영향을 받는다[21]. 이것은 Fig. 3에서 교반세기에 의한 침전입자크기의 변화를 살펴봐도 잘 알 수 있다.

PAA 분자량이 2,000인 경우, 교반에 의한 충돌로 침전입자들이 성장할 수 있는 기회는 있었지만 고분자 가교효과를 기대할 수 없고, 입자크기가 너무 작아 입자의 쪼개짐도 일어나지 않아서 교반세기에 관계없이 침전입자크기가 일정하게 나타난 것이다. 이에 반해 PAA 분자량 450,000에서는 고분자 가교효과가 나타나 PAA 분자량 2,000에 비하여 입자크기가 크게 성장하였지만, 여전히 PAA 주쇄의 길이

가 lysozyme의 크기에 비하여 상대적으로 길지 못하기 때문에 고분자 가교효과가 미미하여 PAA 분자량 4,000,000보다는 입자크기가 훨씬 작게 나타난 것이다. 이와 같이 약한 고분자 가교효과로 인해 침전입자간의 결합력이 약하여 $0.0397 \text{ m}^2/\text{s}^3$ 의 낮은 교반세기에서부터 용액의 전단응력에 의해 입자의 쪼개짐이 발생하여 침전입자가 더 이상 성장하지 못하고 작아진 것이다. 그러나 $0.0397 \text{ m}^2/\text{s}^3$ 이하의 poor mixing 구간에서는 오히려 교반세기보다는 용액내 존재하는 입자의 농도가 충돌빈도수에 영향을 더 많이 미치기 때문에 PAA 분자량이 4,000,000인 경우보다 침전입자크기가 더 크게 나타난 것으로 생각된다.

한편 PAA 분자량이 4,000,000인 경우에는 $0.0397 \text{ m}^2/\text{s}^3$ 이하의 poor mixing 구간에서 PAA 분자량 450,000보다 입자크기가 작게 나타나기도 했지만, PAA 분자량 2,000과 450,000보다는 고분자 가교효과가 매우 뚜렷하여 입자크기가 크게 나타났다. 또한 PAA 주쇄의 길이가 길기 때문에 침전입자간의 충돌이 일어나는 경우 충돌반지름이 커지는 효과도 동시에 발생하여 침전입자가 더 큰 floc으로 성장할 수 있었다[6, 16]. 그리고 PAA 분자량 450,000에서는 침전입자의 쪼개짐이 $0.0397 \text{ m}^2/\text{s}^3$ 이상에서 나타난 반면, PAA 분자량 4,000,000에서는 침전입자의 쪼개짐이 $1.47 \text{ m}^2/\text{s}^3$ 이상에서 우세하게 일어나 침전입자의 물리적 강도는 고분자 가교효과에 크게 영향을 받는 것으로 판단되었다.

따라서 고분자 가교효과가 우세하게 일어나는 반응조건에서 생성된 lysozyme 침전입자가 입자크기도 크고, 입자간의 결합력도 강해지는 사실을 알 수 있었다.

Fig. 4는 교반세기에 따른 lysozyme의 회수율을 PAA 분자량별로 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 lysozyme의 회수율은 PAA의 분자량이 높아질수록 크게 나타났고, 교반세기의 변화에는 거의 영향을 받지 않았다. 이러한 현상은 lysozyme에 흡착되어 lysozyme의 표면전하를 중화시키는데 필요한 PAA의 첨가량이 PAA의 분자량에 따라 달라졌기 때문이다.

앞서 언급한 것처럼 PAA 분자량이 낮아지면 주쇄길이는 짧아지지만 분자수는 늘어난다. 이런 경우 lysozyme과 흡착된 PAA의 나머지 부분에서 또 다른 lysozyme과 흡착되어 그 표면전하를 중화시킬 가능성이 낮아지기 때문에 lysozyme의 표면전하 중화는 주로 Brown 운동에 의한 충돌로 흡착된 PAA 분자의 재배열에만 의존하게 되어 lysozyme 표면전하를 중화시키는 PAA의 전하중화효율을 떨어뜨린다[14, 16]. 하지만 PAA의 분자량이 높아지면 분자수는 줄어들지만 주쇄 길이가 늘어나 PAA의 분자량이 낮은 경우에 비하여 더 많은 lysozyme

이 흡착되어 PAA 분자가 lysozyme의 표면전하를 중화시키는 효율이 올라가게 된다. 이와 같이 lysozyme의 표면전하를 중화시키는 PAA의 중화효율이 분자량에 비례하기 때문에 Fig. 4처럼 PAA 첨가량을 0.2로 일정하게 유지시키는 경우 lysozyme 회수율은 PAA 분자량에 비례하는 것이다.

하지만 반응기내의 교반세기는 lysozyme과 PAA의 흡착반응으로 생성된 침전입자간의 충돌에는 관여하지만, lysozyme-PAA 침전입자가 형성되는 perikinet적 응집단계에는 영향을 미치지 못하기 때문에 lysozyme의 회수율이 교반세기에는 영향을 받지 않는 것이다[4, 13]. 따라서 lysozyme 침전반응에서 lysozyme의 회수율은 perikinet적 응집단계에서 결정됨을 알 수 있었다.

이와 같이 lysozyme 회수율이 PAA 분자량에 따른 중화효율에는 영향을 받지만 교반세기에 영향을 받지 않는 것은 Fig. 5에 나타난 것처럼 lysozyme 침전입자에 대한 제타전위(ξ)를 측정하면 명확히 확인할 수 있다[14]. 그림에서 보는 바와 같이 lysozyme 침전입자의 제타전위의 절대값은 lysozyme 회수율과는 정반대로 PAA 분자량 2,000에서 가장 크게 나타난 반면 4,000,000에서 가장 작았고, 교반세기에는 거의 영향을 받지 않았다.

이처럼 PAA 분자량 2,000인 경우가 4,000,000에서 보다 제타전위가 크게 나타났다는 것은 침전입자 하나에 더 많은 PAA가 흡착되어 전하세기가 커졌다는 것으로 PAA 분자량 2,000의 중화효율이 PAA 분자량 4,000,000에 비하여 떨어지는 것으로 해석할 수 있다. 또한 제타전위가 교반세기에는 영향을 받지 않는 것으로 보아 교반세기는 침전입자간의 충돌에는 영향을 미치지 않지만 PAA와 lysozyme의 결합양식에는 영향을 주지 못하는 것을 다시 한번 확인할 수 있었다.

4.2. PAA 첨가량의 영향

Lysozyme 침전반응에 미치는 PAA 첨가량의 영향은 PAA 분자량 4,000,000에서 입자크기가 가장 크게 나타나는 $1.47 \text{ m}^2/\text{s}^3$ 을 기준으로 교반세기를 일정하게 유지시킨 후 PAA 첨가량을 0.05-0.5로 달리하여 침전반응을 실시하여 lysozyme 침전입자크기와 회수율의 변화를 조사하여 알아보았다.

Fig. 6은 PAA 첨가량에 따른 lysozyme 침전입자의 크기변화를 PAA 분자량별로 나타낸 것이다. 그림에 나타난 것처럼 PAA 분자량 2,000에서는 침전입자크기가 PAA의 첨가량에 무관하였고, 450,000에서는 PAA의 첨가량에 비례하여 입자크기가 일정하게 증가하였다. 하지만 PAA 분자량 4,000,000인 경우에는 PAA의 첨가량이 증가함에 따라

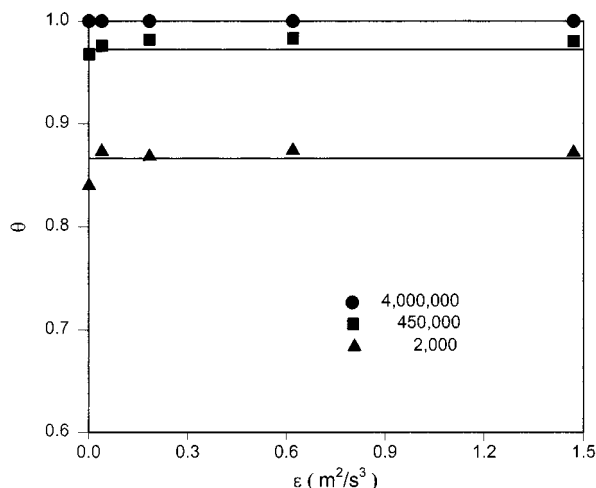


Fig. 4. The recovery ratio of lysozyme with power input at various Mw of PAA.

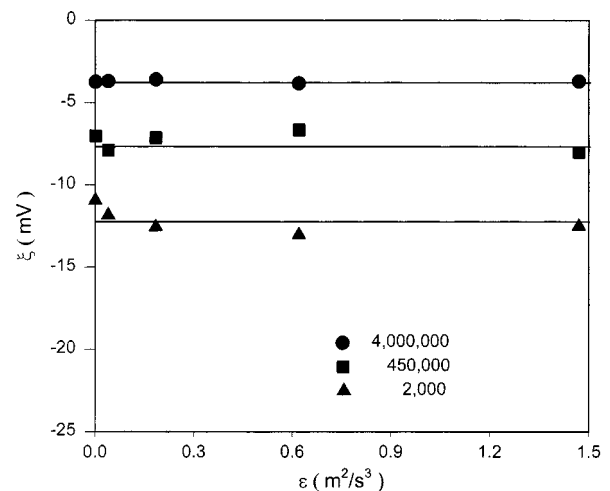


Fig. 5. The zeta potential of lysozyme precipitate with power input at various Mw of PAA.

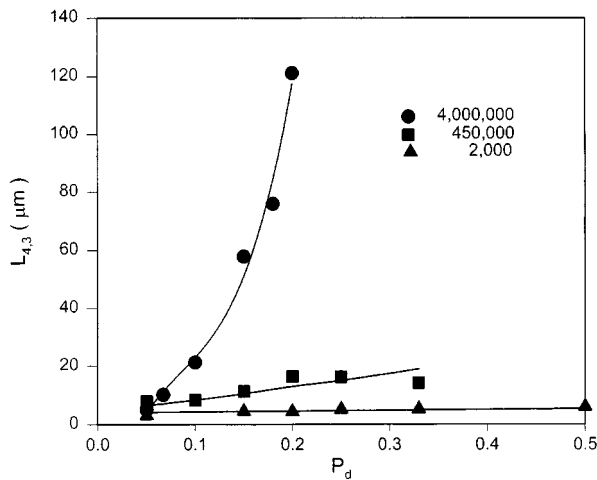


Fig. 6. The mean particle size of lysozyme precipitate with PAA dosage at various Mw of PAA.

침전입자크기가 급격하게 증가하였고, 전체적으로는 PAA의 첨가량과는 무관하게 PAA 분자량에 비례하는 경향을 보였다.

먼저 PAA의 첨가량 0.05에서 PAA 분자량에 관계없이 침전입자크기가 일정하게 나타난 것은 투입된 PAA에 비해 lysozyme의 양이 훨씬 많아 반응기에 투입된 PAA가 perikinet적 응집단계에서 모두 lysozyme으로 흡착되었기 때문이다. 이로 인해 PAA 분자량 변화에 따른 침전입자간의 고분자 가교효과를 기대할 수 없어서 단백질 입자크기의 변화가 나타나지 않은 것이다.

그러나 PAA의 첨가량이 증가함에 따라 첨가된 PAA는 lysozyme 표면전하를 중화시키는 것 이외에 침전입자와 입자를 연결하는 고분자 가교에도 사용되어 입자크기가 증가하게 된다. 하지만 고분자 가교효과는 PAA의 주쇄가 긴 높은 분자량에서만 우세하기 때문에 PAA의 첨가량이 증가하여도 가교효과를 크게 기대할 수 없는 분자량 2,000에서는 입자크기 변화가 나타나지 않았다. PAA 분자량 450,000에서는 고분자 가교효과가 일부 나타나 침전입자크기가 첨가량에 비례하여 일정하게 증가하였으나, 고분자 가교효과가 그리 크지 않아서 증가정도는 미미하였다. 이에 반해 PAA 분자량이 4,000,000에서는 첨가량이 증가함에 따라 고분자 가교효과가 저분자량의 PAA보다 좀더 빨리 우세해져서 lysozyme 침전입자크기가 급격하게 증가한 것이다. 따라서 PAA 분자량이 높아지면 낮은 첨가량에서도 고분자 가교효과로 인하여 lysozyme 침전입자가 크게 생성됨을 알 수 있었다.

Fig. 7은 PAA 첨가량에 따른 lysozyme 회수율의 변화를 PAA 분자량별로 나타낸 것이다. Lysozyme 회수율은 PAA 분자량과 첨가량에 비례하였으며, 특별히 분자량에 관계없이 lysozyme이 100% 회수되었을 때의 PAA 첨가량에서 PAA와 lysozyme의 결합비보다 그 이하의 첨가량에서 PAA와 lysozyme의 결합비가 증가하는 것으로 나타났다.

이처럼 PAA의 첨가량이 적을수록 lysozyme과 PAA의 결합비가 증가하는 것은, 침전반응으로 생성되는 침전입자의 농도가 PAA 첨가량에 의존하기 때문이다. 즉, PAA 첨가량이 적은 경우에는 첨가량이 많은 경우에 비하여 생성되는 침전입자의 농도가 작아진다. 이로 인해 PAA 첨가량이 많은 경우에 비하여 lysozyme 침전입자간의 반발력은 상대적으로 줄어들게 되어 lysozyme과 침전입자간의 정전기적 인력이 우세해져, 더 많은 lysozyme이 침전입자에 흡착되어 lysozyme과 PAA의 결합비가 증가하는 것으로 생각된다.

4-3. Aging의 영향

PAA가 첨가되는 전후에 교반에 의한 aging이 lysozyme 침전반응에

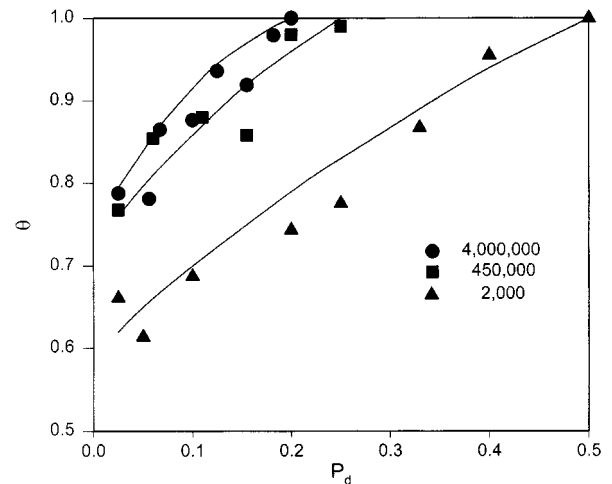


Fig. 7. The recovery ratio of lysozyme with PAA dosage at various Mw of PAA.

미치는 영향을 알아보기 위하여 PAA의 첨가량은 0.2, 교반세기는 $1.47 \text{ m}^2/\text{s}^3$ 으로 일정하게 유지시키고 침전반응을 실시하여 lysozyme 침전입자의 크기변화를 조사하였다. 이때 PAA의 투입시간은 총 10분이었고, 반응기내의 교반시간은 총 40분이었다. 그 결과는 Fig. 8과 같다.

그림에서 보는 바와 같이 PAA 분자량 2,000인 경우에 lysozyme 침전입자크기는 PAA가 첨가되는 여부와 관계없이 일정하게 나타났고, PAA 분자량이 450,000과 4,000,000에서는 PAA가 공급되는 동안에는 PAA의 첨가량에 따라 입자크기가 증가하다가 다시 감소하여 일정해지는 경향을 나타내었다. 그러나 Fig. 6과 비교해 보면 PAA 분자량 4,000,000에서는 동일량의 PAA를 반응기에 투입했을 경우 투입시간이 짧은 경우가 입자크기가 크게 나타났다.

앞에서도 언급한 것처럼 PAA 분자량 2,000에서 침전입자크기의 변화가 나타나지 않은 것은 PAA의 가교효과가 매우 낮아서 침전반응으로 생성된 입자크기가 작아져 교반에 의한 aging 효과가 나타나지 않았기 때문이다. 그리고 PAA 분자량 450,000에서는 부분적인 고분자 가교효과 때문에 PAA가 공급되는 동안에는 lysozyme 침전입자크기가 PAA의 첨가량에 비례하였으나 PAA의 공급이 중단된 이후에는 입자의 조개집이 우세해져 곧 평형상태의 입자크기에 도달하였다. 그러나 PAA 분자량 2,000에서와 마찬가지로 고분자 가교효과가 우세

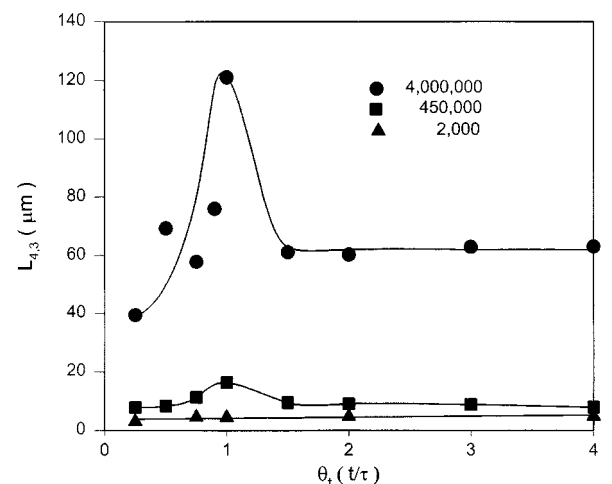


Fig. 8. The mean particle size of lysozyme precipitate with mixing time at various Mw of PAA.

하지 못해서 입자가 크게 성장하지는 못하였다.

PAA 분자량 4,000,000에서도 450,000과 마찬가지로의 이유로 입자크기가 증가하다가 일정해지는 경향을 나타냈다. 그렇지만 PAA 분자량 4,000,000에서는 PAA 첨가가 끝난 이후 교반에 의한 입자의 쪼개짐 이외에, 교반으로 인한 침전입자간의 충돌이 침전입자의 빈자리를 채워주는 infilling과 이로 인한 입자의 재배열을 촉진시켜 입자와 입자가 서로 근접하여 결합하는 closer packing 현상도 우세하게 나타나 침전입자크기가 PAA 분자량 450,000에 비하여 입자크기가 급격히 감소한 것이다[12, 22, 23]. 그러나 이처럼 PAA 분자량 4,000,000에서 침전입자크기가 저분자량의 PAA에 비하여 훨씬 크에도 불구하고, PAA의 첨가가 중단된 이후의 계속되는 교반에도 침전입자의 크기가 변함없이 일정하게 유지되는 것으로 보아 PAA의 분자량과 lysozyme 침전입자간의 결합력은 서로 비례함을 알 수 있다.

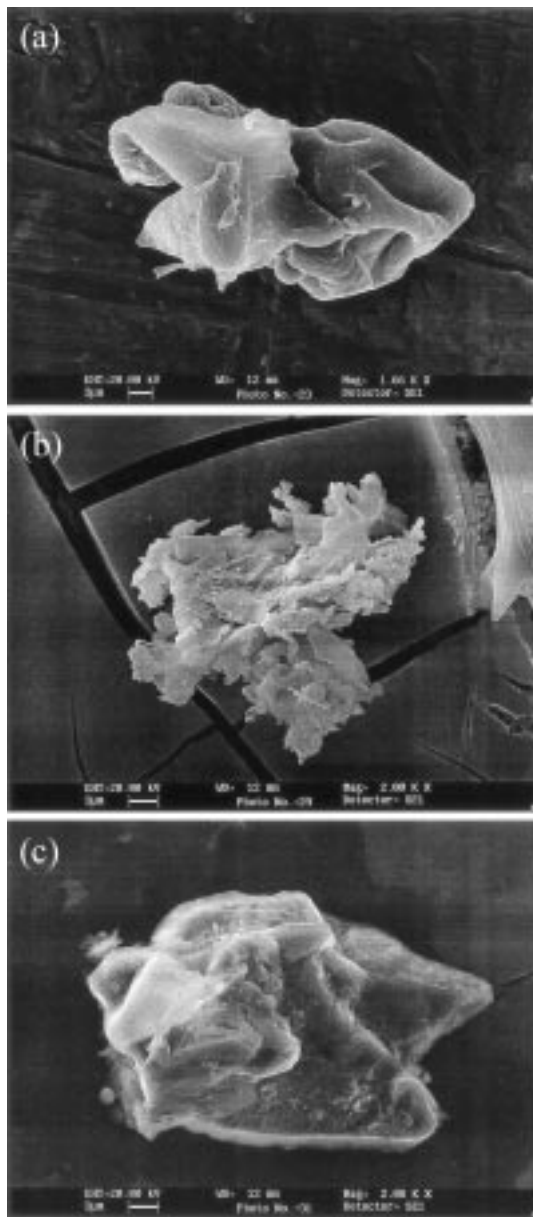


Fig. 9. Typical morphology of lysozyme precipitate in semi-batch reactor.

(a) Mw of PAA=4,000,000, $\theta_F=1$, (b) Mw of PAA=450,000, $\theta_F=1$, (c) Mw of PAA=2,000, $\theta_F=1$

또한 PAA가 첨가되는 동안에는 입자의 쪼개짐 현상이 많이 상쇄되기는 하지만 PAA를 투입하는 시간이 길어지면 교반에 의한 입자의 쪼개짐의 영향도 크게 나타나기 때문에 Fig. 8에서처럼 투입시간이 짧은 경우가 입자크기가 크게 나타난 것으로 판단된다[13].

4-4. Lysozyme 침전입자의 형태

Lysozyme 침전반응으로 생성된 대표적인 lysozyme 침전입자의 형태는 Fig. 9, 10과 같다. Fig. 9는 PAA 첨가량 0.2와 1.47 m^2/s^3 의 교반세기로 침전반응을 실시하여 PAA의 첨가가 종료되었을 때의 침전입자의 형태를 PAA 분자량별로 나타낸 것이다. Fig. 10은 PAA 분자량 450,000에서 Fig. 9와 같은 조업조건으로 침전반응을 실시하였을 때 PAA가 투입되는 과정과 PAA의 투입이 종료된 이후의 침전입자의 형태를 나타낸 것이다.

그림에서 보는 바와 같이 lysozyme 침전입자는 PAA 분자량에 관계없이 입자들이 서로 조밀하게 뭉쳐있는 무정형을 나타냈으며, PAA 분자량에 따른 침전입자의 형태변화는 발견되지 않았다. 그러나 Fig. 9와 10을 비교해 보면 PAA가 공급되는 동안에는 PAA의 첨가량이 작은 경우에는 작은 입자들이 서로 엉성하게 엉겨 붙어 있는 형태를 나타내었으며[Fig. 10(a)], PAA의 첨가량이 증가함에 따라 좀더 큰 입자들이 강하게 결합된 형태[Fig. 9(b)]를 나타내었다. 그리고 PAA의 공급이 중단되고 aging 효과만이 나타나면 침전입자표면의 작은 입자들이 떨어져 나가고 비교적 매끄럽고 조밀한 형태[Fig. 10(b)]로 바뀌었다.

이처럼 PAA가 첨가되는 동안에 lysozyme 침전입자가 작은 입자들이 서로 엉성하게 붙어있는 형태를 나타내는 것은 첨가된 PAA 양에 비하여 lysozyme이 상대적으로 훨씬 많아 투입된 PAA가 lysozyme으로 대부분 흡착되어 작은 침전입자를 생성하여 유체의 전단력에 의

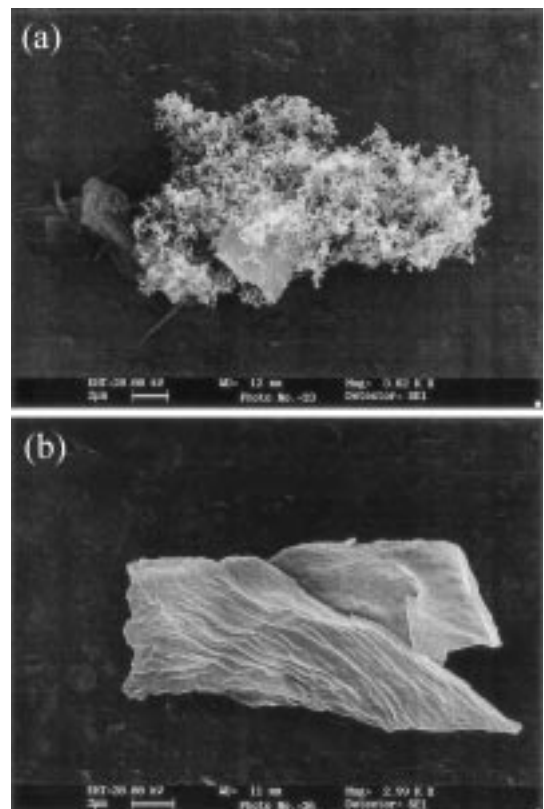


Fig. 10. The morphology of lysozyme precipitate during and after feeding PAA with a molecular weight of 450,000.

(a) $\theta_F=0.5$, (b) $\theta_F=2$

한 충돌효율이 떨어졌기 때문이다. 그러나 점차 PAA의 첨가량이 증가함에 따라서 생성되는 입자의 개수가 늘어나고 고분자 가교효과도 우세해져 전단력에 의한 입자충돌로 입자크기가 커져서 PAA가 투입되는 초기단계의 침전입자에 비해 크고 조밀한 입자들이 생성된 것이다. 그리고 PAA의 공급이 중단된 이후에는 전단력에 의한 입자의 쪼개짐과 같은 aging 효과에 의하여 lysozyme 침전입자의 표면이 조밀해지고 매끄러워지는 polishing 현상이 나타난 것으로 생각된다.

5. 결 론

Rushton type의 반회분식 표준반응기를 이용한 lysozyme 침전반응에서 교반세기, 교반시간, PAA 첨가량과 같은 조업조건의 변화는 PAA의 분자량에 따라 lysozyme 침전입자크기 및 형태와 같은 입자특성과 lysozyme 회수율에 미치는 영향이 다르게 나타났다.

침전반응이 일어나는 동안 고분자 가교가 가장 우세하게 발생하는 PAA 분자량 4,000,000을 침전제로 사용하였을 때, 동일한 조업조건에서도 저분자량의 PAA를 사용했을 때 보다 lysozyme 침전입자크기가 크게 나타났으며, lysozyme의 회수율도 높게 나타났다. 그리고 PAA가 반응기로 투입되는 동안 PAA 분자량 4,000,000에서 더 강한 교반세기까지 침전입자가 성장하는 등, 교반세기의 변화는 침전입자의 입자크기에는 영향을 주었지만, PAA 분자량에 관계없이 lysozyme의 회수율에는 영향을 미치지 않았다.

이것은 PAA의 분자량에 따른 고분자 가교효과가 lysozyme 침전입자의 물리적 강도 및 조성에도 영향을 미치는 것으로, 고분자 가교효과가 우세하게 일어나는 반응조건에서 생성된 침전입자가 입자크기도 크고, 입자간의 결합력이 강해 쪼개짐에 저항하는 힘도 강해지는 사실을 알 수 있었다. 그리고 lysozyme 표면전하에 대한 PAA의 중화효율도 그 분자량에 비례하고, 반응기내의 교반세기는 lysozyme 침전입자간의 충돌에는 영향을 미치지만 lysozyme과 PAA 분자간의 충돌에는 관여하지 못하기 때문에 lysozyme의 회수율은 perikinetetic 응집단계에서 결정됨을 확인하였다.

아울러 PAA가 첨가되는 동안에 고분자 가교가 우세하여 침전입자의 쪼개짐 현상이 상쇄되기는 하지만 PAA를 투입하는 시간이 길어지면 교반세기에 따라 침전입자가 쪼개지는 경향이 커짐을 알 수 있었으며, lysozyme 침전입자의 형태는 특별한 형태가 존재하지 않는 무정형을 나타내었고, PAA 분자량에 따른 침전입자의 형태변화는 발견되지 않았다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 핵심연구과제(951-1103-047-1과 961-1107-044-2)의 지원으로 수행되었습니다.

사용기호

D_a	: diameter of impeller [m]
g_c	: Newton's-law proportionality factor
L	: diameter of precipitate [μ m]
$L_{4,3}$: volume mean particle size [m]
N_p	: power number
N_{Re}	: Reynolds number
n_r	: rotational speed [#s]

P_c	: power consumption [W]
P_d	: PAA dosage(=g PAA/g Lysozyme)
t	: total agitation time [s]
V_g	: shear rate [s^{-1}]

그리스 문자

ϵ	: power input [m^2/s^3]
θ	: lysozyme recovery ratio
θ_t	: ratio of feeding time to agitation time(= t/τ)
λ	: eddy size [μ m]
ρ	: solution density [kg/m^3]
τ	: total feeding time [s]
τ_s	: mean shear rate [N/m^2]
ξ	: zeta potential [mV]

참고문헌

1. Garcia, F. A. P.: in J. F. Kennedy and J. M. S. Cabral(Ed.), "Recovery Processes for Biological Materials : Protein Precipitation," John Wiley & Sons(1993).
2. Clark, K. M. and Glatz, C. E.: *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 215(1992).
3. Chen, W., Walker, S. and Berg, J. C.: *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 1039(1992).
4. Clark, K. M. and Glatz, C. E.: *Biotechnology Progress*, **3**, 241(1987).
5. Rohani, S. and Chen, M.: *Can. J. Chem. Eng.*, **71**, 689(1993).
6. Chen, W. and Berg, J. C.: *Chem. Eng. Sci.*, **48**, 1775(1993).
7. Chen, M. and Rohani, S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 63(1992).
8. Shieh, J. and Glatz, C. E.: *Polymer Preprints*, **32**, 606(1991).
9. Clark, K. M. and Glatz, C. E.: in J.-F. Hammel, J. B. Hunter and S. K. Sikdar(Ed.), "ACS Symposium Series : Downstream Processing and Bioseparation," ACS, Washington, **419**, 170(1990).
10. Chan, M. Y. Y., Hoare, M. and Dunnill, P.: *Biotechnol. Bioeng.*, **XXVIII**, 387(1986).
11. Hill, R. D. and Zadow, J. G.: *J. Dairy Research*, **41**, 373(1974).
12. Nelson, C. D. and Glatz, C. E.: *Biotechnol. Bioeng.*, **XXVII**, 1434(1985).
13. Fisher, R. R. and Glatz, C. E.: *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 777(1988).
14. Gregory, J.: *Colloids & Surface*, **31**, 231(1988).
15. Levich, V. G.: "Physicochemical Hydrodynamics," Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey(1962).
16. Walles, W. E.: *J. Colloid Interface Sci.*, **27**, 797(1968).
17. McCabe, W. L., Smith, J. C. and Harriott, P.: "UNIT OPERATIONS OF CHEMICAL ENGINEERING," 4th ed., McGraw-Hill, New York, NY(1985).
18. Harnby, N., Edwards, M. F. and Nienow, A. W.: "Mixing in the Process Industry," Butterworth-Heinemann, Oxford(1992).
19. Rutherford, K., Lee, K. C., Mahmoudi, S. M. S. and Yianneskis, M.: *AIChE J.*, **42**, 332(1996).
20. Kim, W.-S., Kim, Y.-W. and Kim, W.-S.: *J. of Korean Ind. & Eng. Chemistry*, **9**, 857(1998).
21. Petenate, A. M. and Glatz, C. E.: *Biotechnol. Bioeng.*, **XXV**, 3059(1983).
22. Fisher, R. R., Glatz, C. E. and Murphy, P. A.: *Biotechnol. Bioeng.*, **XXVIII**, 1056(1986).
23. Bailey, J. E. and Ollis, D. F.: "Biochemical Engineering Fundamentals," 2nd ed., McGraw-Hill, New York, NY(1986).