

발효산물의 분리공정

인하대학교 생물공학과 구 윤 모



1. 서 론

유전과학의 발달과 함께 최근 학문적, 산업적으로 그 중요성을 더해가고 있는 생물공학은 그 동안의 획기적인 기술혁신으로 미래 인류생존과 복지에 크게 이바지할 것이다. 여타의 유망 과학기술의 발전이 많은 경우 단지 보다 편리한 인류생활을 위한 것이라면, 질병, 에너지, 자원, 환경 등 인류생존에 직결되는 과제의 해결을 위한 생물공학의 발달은 필연적이라 하겠다.

생물물질의 생성은 크게 생물반응과 생물분리로 나눌 수 있다. 생물반응의 결과로 얻어진 생성물은 일반 화학반응에 의한 물질과는 달리 대부분 낮은 농도의 불안정한 형태로 많은 유사물질과 함께 존재한다. 특히 효소를 비롯한 여러 단백질 생성물은 온도, pH, 이온세기 등의 아주 제한된 범위에서 그 생물학적 활성을 유지하기 때문에 이들의 분리, 정제는 여러 단계의 복잡한 과정을 거치게 된다. 그러므로 이들 반응생성물의 효율적인 분리, 정제는 upstream을 포함하는 전 생물공정의 산업화와 그 경제성에 큰 영향을 미친다. 실제 여러 생물공학제품에 있어서 분리비용이 최종생산가의 50~80%에 이르는 것으로 보고되고 있다(1).

대부분의 생물분리기술은 주로 생화학 등 기초과학연구실에서 분석용으로 고안 개발되어 왔으며 그 원리 및 특성은 비교적 잘 알려져 있다(2,4). 이들 분리기술은 생물공학의 산업화에 따라 생산용으로 사용·시도되었고 이들을 이용한 분리공정에 대한 정량적 해석도 화학공학에서 사용하는 전통적인 방법에 의해 완성되고 있다(5,6). 이러한 분리기술은 원래 소규모, 회분식으로 개발되어 대규모 분리에는 적합하지 않으나, 그동안 여러 연구자들에 의하여

변형·개선되어 많은 기술들이 현재 산업적으로 사용되고 있다. 표 1에 생물물질분리에 흔히 사용되는 기술들의 특성과 현황을 나타내었다. 생물분리기술의 일반적 특성과 최근 개발 등은 이미 소개한 바 있으므로(7,8) 본 고에서는 생물분리의 일반적 특성, 공정적 측면에서의 생물분리기술에 대한 비교, 서술 그리고 현재 많이 사용되는 기술에 대해 간략히 설명하고자 한다.

2. 생물분리의 특성

화학반응에서는 주어진 반응조건에서 대부분 순수한 반응물을 사용하며 그 결과로 비교적 순수한 생성물을 고농도로 얻게 된다. 따라서 화학반응 생성물에 대한 분리과정은 어렵지 않아 제품 생산에 있어 분리의 상대적 중요성은 크지 않다. 그러나 생물반응은 생물체에 의해 반응이 진행되므로 그 발효액의 조성은 매우 복잡하고 특히 세포내 생성물의 경우 생물체를 이루는 성분조성만큼이나 많아지게 된다. 전형적인 발효액의 성분은 다음과 같다.

- 다른 형태, 나이, 크기 모양의 세포혼합물
- 가용성 세포외 대사물
- 가용성, 불용성 세포내 대사물
- 비발효성 당과 다당류 등 미반응물질
- 생물고분자, 단백질 등 부산물
- 자유 또는 염형태의 이온성물질
- 합성계면제 등 소포제
- 핵산, 펩타이드, 지질 등 세포분해물

이와 같이 생물반응에 의한 발효액이 여러 성분의 혼합물을 이루기 때문에 생물분리 기술은 다양하고 어려워지며, 더욱이 생물물질의 주종을 이루는 단백질의 경우 화학적·구조적으로 불안정하여 분리

표 1. 생물 분리 기술들의 특성과 현황

Technique	Property exploited	Capacity	Resolution	Yield	Cost	Current status	Developmental potential
Precipitation	solubility, charge	high	very low	medium	low	advanced	low
Centrifugation	density	medium	low	high	medium	advanced	low
Extraction							
org./aqu.	solubility	high	low	high	low	advanced	medium
aqu./aqu.	solubility	high	low	high	medium	medium	high
Membrane	size	medium	low	high	medium	medium	high
Chromatography							
liq./liq.	solubility	low	medium	medium	medium	medium	low
ion exchange	charge	low	medium	medium	medium	advanced	high
size exclusion	size	medium	medium	medium	medium	advanced	high
hydrophobic interaction	hydrophobicity	low	medium	medium	medium	medium	high
affinity	bio-affinity	low	very high	low	high	medium	very high
Electrophoresis	charge, size	low	high	high	medium	advanced	high

과정과 저장 중 단백질 변성에 의한 활성도 저하는 수율에 큰 영향을 미치게 된다. 세포내 단백질의 경우 분리, 정제과정 중 세포밖으로 나오게 되면 산화성 분위기에 접하게되고, 특히 세포파괴시 lysosome이 파괴되어 proteolysis 문제도 심각하게 된다. 세포의 단백질은 외부환경에 영향을 덜 받는다.

1) Denaturation

분리시 극단적인 pH, 온도, 유기용매 등은 단백질 변성의 요인이 된다. 완충용액은 세포내의 pH와 같은 6~8의 범위를 맞추어 주어야 하나 대부분의 단백질이 pH 5~9에서 안정하다. 생물분리의 초기 단계에서는 proteolysis를 방지하기 위해 4℃를 유지하나 후기 단계에서는 20℃ 정도에서도 단백질은 안정하다. 40℃ 이상에서도 변성되지 않는 단백질이 있는가 하면 저온에서 분자내 수소성 결합의 약화로 변성되는 단백질도 있다. 추출과정 등 유기용매 사용시에는 온도를 내려 변성을 최소화해야 한다.

2) Inactivation

변성과 달리 비활성화는 sulphhydryl 기와 같이 반응성이 강한 단백질 활성부위의 화학적 변화에 기인한다. 세포파괴 후 단백질의 실화를 막기 위해 dithiothreitol 등 환원제를 완충용액에 첨가하여 사용하고 금속이온에 의한 비활성화를 막기 위해서는

metal complexing agent인 EDTA를 사용한다. 많은 단백질은 이들의 cofactor나 기질의 첨가로 안정성이 증가된다.

3) Proteolysis

초기 분리단계는 protease에 의한 분해를 막기 위해 저온(4℃)에서 짧은 시간 동안 진행시킨다. proteolysis를 막기위해 protease 저해제를 첨가할 수 있고, 세포파괴시 lysosome의 membrane을 안정시키기 위하여 sucrose, maltose를 첨가하기도 한다. 그 후에 잔류하는 protease에 의한 용액의 산성화를 막기 위해 충분한 용량의 완충용액이 필요하다.

저농도 용액에서 단백질은 흡착이나 subunit의 분해에 의해 불안정하기 때문에 되도록 고농도로 저장하고 흡착을 막기위해 소량의 비이온성 세제를 첨가할 수 있고 유리나 polystyrene 제의 용기는 피하는 것이 좋다. Glycerol은 물의 활성도를 감소시켜 변성을 줄이며 얼어서는 안되는 단백질은 20% 이상의 glycerol 용액으로하여 저온(-20℃) 저장시킨다. 고농도 ammonium sulfate도 단백질을 안정시키기 때문에 ammonium sulfate 침전은 흔히 저장직전 실시한다.

생물분리 기술의 선택과 운전은 항상 상기 단백질 변성을 고려하여 수행되어야 한다.

3. 생물분리 공정의 선택

생물분리 공정의 궁극적 목표는 주어진 발효액으로부터 최저의 가격으로 최고(순도), 최다(수율)의 생물공학 제품을 얻는 것이다. 이러한 성공적인 생물분리 공정을 설계하기 위해서는 우선 제품의 최종용도를 결정하여 제품의 quality, 즉 허용가능한 불순물의 양을 정한다. 이는 마지막 몇 퍼센트의 불순물을 제거하기 위하여 추가로 여러 단계의 정제공정이 필요하며 이는 막대한 수율의 감소 및 비용의 증가를 수반하기 때문이다. 다음은 필요한 제품의 양을 결정하여 분리공정의 규모와 수율의 범위를 정하고 산업적 생산에서는 물론이고 실험실 규모에서도 재료비, 인건비, 감가상각비 등의 경제성을 고려하게 된다. 이상과 같이 생물공학 제품에 대하여 경제성의 측면에서 제품의 quality, quantity가 정해지면 이제는 이 목적을 달성하기 위해 필요한 분리단계와 각 단계에 있어 적절한 분리기술의 선택과 이들의 최적배열(순서)이 이루어 진다. 각 기술의 선택은 다음 사항에 의해 검토된다.

1) 용량 : 분리기술의 용량은 그 기술이 처리할 수 있는 부피나 농도를 의미한다. 초기단계에서는 부피감소 효과가 큰 침전 등의 기술이 유리하며, 소량 정밀분리에 사용되는 크로마토그래피 등의 기술은 불리하다.

2) 분리능 : 분리능이란 한 물질을 다른 물질로부터 분리시키는 효율성을 나타낸다. 예를 들어 침전은 낮은 분리능을 갖고 크로마토그래피는 높은 분리능을 갖는다. 높은 분리능의 기술은 정밀분리를 위한 후기단계의 수를 줄일 수 있어 특히 중요하다.

3) 수율 : 한 분리기술의 실시 후 얻게 되는 목적물의 실시 전에 대한 상대적인 양을 의미한다. 후기단계의 정밀분리 기술일수록 수율이 떨어져 침전, 추출 등의 초기단계 기술들이 80% 이상의 수율을 보이는데 반해 affinity 크로마토그래피 기술은 보통 60% 정도의 낮은 수율을 보인다.

4) 비용 : 초기단계에서는 값싼 분리기술을 이용하여 입자성 물질, 지질 등을 분리한다. 이는 후기 정밀분리에 필요한 값비싼 affinity column 등의 보호에 필요하다. 분리기술들의 비용 대 분리특이성을 그림 1에 나타내었다.

분리기술의 선택 및 시행순서는 상기요건들이 서

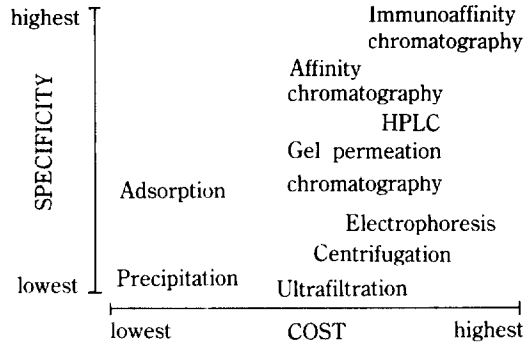


그림 1. 분리기술들의 비용-분리특이성 관계(9)

로 균형있게 검토되어야 하며 이를 중심으로 생물분리 공정의 설계방법을 열거하면 다음과 같다.

- 1) 서로 다른 물리적 특성을 이용하는 분리공정들의 조합을 선택한다.
- 2) 생성물과 부산물에 있어서 차이가 가장 큰 물리적 특성을 이용하는 공정을 선택한다.
- 3) 회석과 농축공정을 교대로 배열한다.
- 4) 가능하면 비슷한 driving force를 사용하는 기술들을 연이어서 실시한다.
- 5) Mass가 큰 물질부터 분리한다.
- 6) 용량이 크고 저가의 기술을 먼저 실시한다.
- 7) 분리능이 높고 고가인 기술을 후에 실시한다.

생물반응에 의해 얻어진 발효액으로부터 원하는 형태의 제품을 생산하기까지의 일반적인 분리·정제과정을 그림 2에 나타내었다. 분리공정의 제1단계로 발효액에 혼재하는 불용성물질(미생물세포) 등 입자체를 그외의 수요성물질로부터 분리하게 되며 이에선 전통적인 침강, 원심분리 여과기술 등이 사용된다. 효소를 반응매체(고정화효소 반응기)로 사용한 경우 세포분리 단계를 거치지 않고 직접 정제공정(1)에 들어간다. 또 목적하는 생성물이 세포 밖으로 배출되는 경우(extracellular products) 전 단계의 여액을 수기하여 직접 정제공정(2)에 들어간다. 핵산, 비타민 등 생성물이 세포체내에 존재할 경우(intracellular products)는 milling, ult-rasonication, homogenization 등 물리적인 방법이나 lysis 등 생물학적인 방법으로 세포를 깨뜨린 후 수용액 상으로 하여 정제한다. 세포파괴 후 남게 되는 cell debris를 제거하기 위해 여러 방법이 사용되고 있

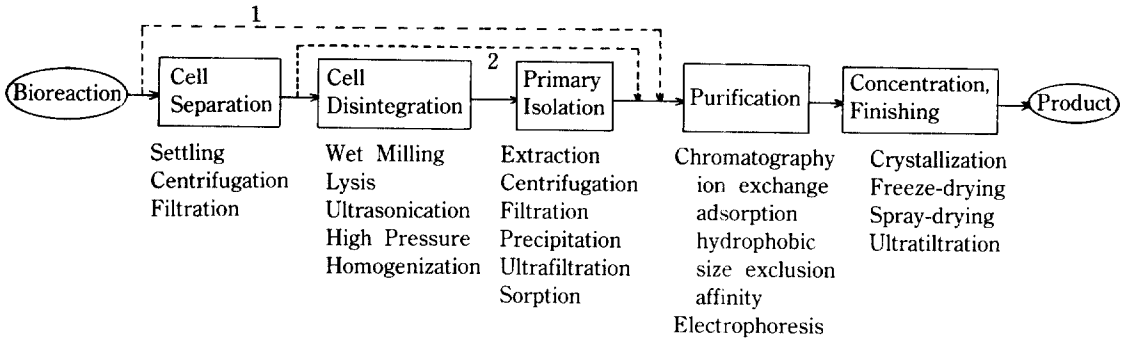


그림 2. 생물분리공정

으며 추출의 경우 단백질 등 유기용매에 의해 쉽게 변성되는 물질의 분리를 위해 수상2성분계 추출이 효율적이다. 정제과정에서는 비교적 농축된 물질의 순도를 높이기 위하여 resolution이 뛰어난 분리기술을 사용하게 되며 이 중 대표적인 것으로 크로마토그래피법을 들 수 있다. 정제과정 후 얻어진 고순도의 생성물은 이용하기 편리한 형태로 만들어져 상업화하게 된다.

그림 1에 도시한 일반적인 분리공정을 다시 단백질의 생성특성에 따라 분류하면 그림 3과 같다. 그림 3의 특징으로는 정제기술로 주로 크로마토그래피를 사용하며, ammonium sulfate 침전으로 생기는 과다한 이온세기의 용액은 hydrophobic interaction 크로마토그래피로 처리하며 ion exchange는 사용하지 않는다. 이는 이온세기가 높을 경우 대상 물질의 이온이 masking되기 때문이다. 또 어느 경우든 gel permeation 크로마토그래피를 최종단계로 사용하여 전 분리공정 중 첨가된 완충용액 등 이온성 물질을 제거하고 있다. 그림 4는 1984년 학술지에 발표된 100편의 생물분리정제 관련 논문에서 가장 많이 사용된 5가지 분리 기술을 사용순서대로 나열한 것이다(10). 침전은 초기에 발효액의 부피를 크게 줄일 수 있고, ion exchange는 비싼 affinity column에 해를 줄 수 있는 이온성 불순물을 제거하기 위해 먼저 사용한다. 또 이 논문에서는 0.016%의 초기농도로부터 순수한 형태로 정제하기까지 평균 4~5 단계의 분리과정을 거치며, 각 단계에서 8배로 정제되고, 평균 수율은 74%로 총수율은 28%인 것으로 나타났다. 그리고 분리기술에 대한 연구개발로 각 단계의 수율과 정제도가 증가하여 결과적으로 필요한 분리단계수가 감소하고 있음이 확

인되었다.

4. 생물분리 기술

본 절에서는 현재 활발히 연구개발 및 사용되고 있는 크로마토그래피, 전기영동 그리고 막분리 법의 특성에 대하여 설명한다. 크로마토그래피와 막분리는 생물정제에 있어 주종을 이루는 기술들이며 최근 전기영동법이 이에 포함되고 있다. 표 2에 이들의 종류와 응용예를 들었다.

1) 크로마토그래피법

크로마토그래피 분리는 1950년대까지는 주로 기체분리에만 사용되었으나 1960년대 이후 생물공학의 발달과 함께 액체분리에 사용되었으며 뛰어난 분리능으로인하여 생물분리 정제에 있어서 중요한 위치를 차지하고 있다. 분리는 대부분 column 형태로 이루어지며 용질의 고정상(충전물)과 이동상(용액)에 대한 분배도에 의해 용질이동 속도가 정해지고 이의 결과로 서로 분리되어진다.

크로마토그래피의 분리특성은 분리하고자 하는 물질과 충전물 사이의 상호작용 기작에 따라 달라지며 표 3에 여러가지 크로마토그래피 기법과 그 작용 기작을 나열하였다. 근래에는 속도(높은 유속)와 분리능이 뛰어난 HPLC가 액체 크로마토그래피의 핵심을 이루고 있다. 표 3에 나타나 전통적인 크로마토그래피 기법 외에도 ion exchange column에서 단백질들의 등전점속 효과를 이용하는 chromatofocussing, 용질들의 등온흡착 곡선이 서로 독립이 아닌 coupled solute 계에서 상호탈착·흡착 현상에 의해 고농도의 연속적인 띠를 형성하여 분리·용출되는 displacement 크로마토그래피, 종래의 축방향

발효산물의 분리공정

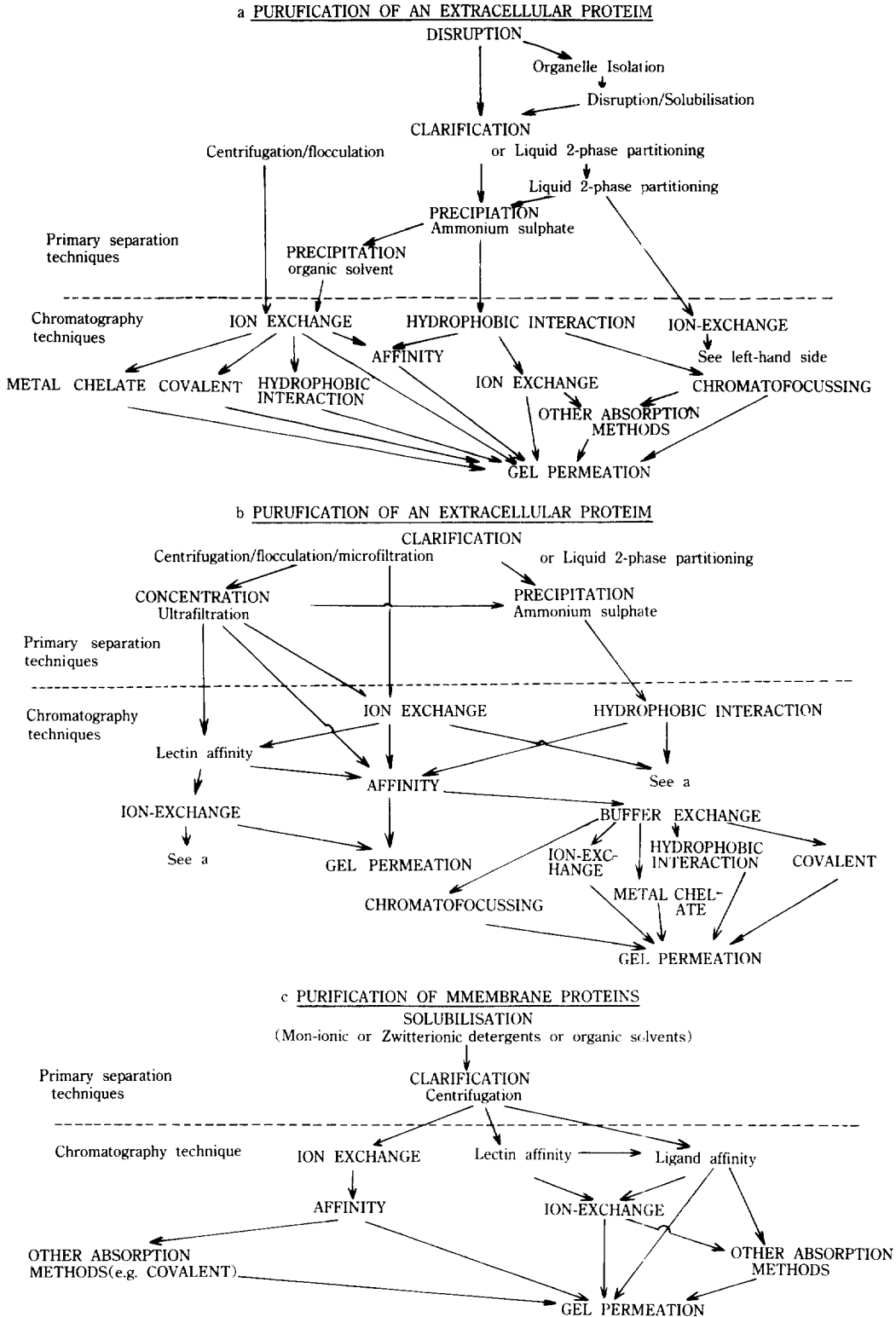


그림 3. 생물분리·정제 공정(3)

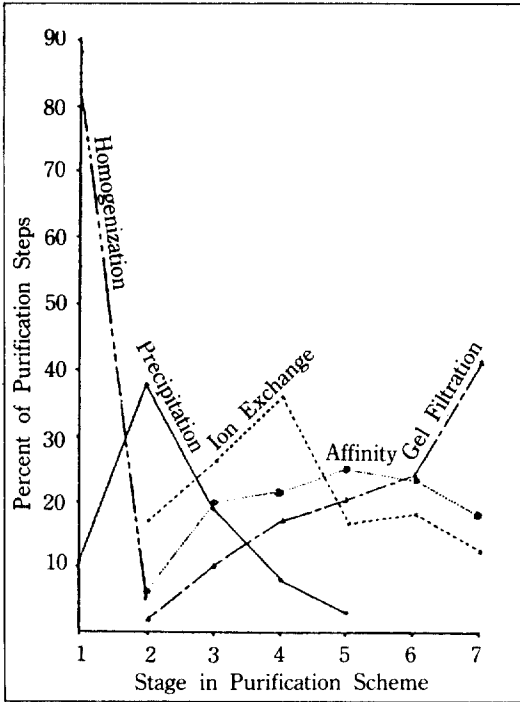


그림 4. 생물분리기술의 시행순서(10)

유체흐름을 방사방향으로하여 저압력에서 조업이 가능하고 scale-up이 용이한 radial flow 크로마토그래피, 초임계 유체의 특성(liquid-like solubility, gas-like mass transfer)을 이용하여 유속이 높고 단위시간당 분리능이 높은 Supercritical fluid 크로마토그래피 등 새로운 기법의 크로마토그래피가 연구·개발되고 있다.

크로마토그래피법은 이론적으로 100% 분리가 가능하다는 장점이 있어 고가물질의 정밀분리에 사용되고 있으나, 충전물의 일부만 분리에 참여한다는 것, 분리매체로 외부의 용리액을 사용하기 때문에 용질이 항상 희석된다는 것, 회분식으로 사용된다는 것 등의 단점이 있다. 그러나 크로마토그래피의 이러한 제한성들도 아직 경제성의 문제가 있지만 여러 가지 독창적인 개발에 의해 해결되고 있다. 상부의 고정된 port를 통하여 회전하는 annulus로 feed가 연속적으로 유입되고 하부에서는 물질의 분리특성(breakthrough)에 따라 특정한 port에서 분리된 물질을 연속적으로 수거하는 rotary annulus 크로마토그래피(그림 5)와 column 크로마토그래피에서

표 2. 생물 정제 기술과의 그 특징(II)

	Separation Method	Basis of Separation	Application
CHROMATOGRAPHY	Ion Exchange	Ionic Charge	Proteins
	Gel Filtration	Size	Desalting, Large Molecules
	Affinity Chromatography	Specific Binding	Antibodies, Antigens
	Reverse Phase	Hydrophobicity	Peptides
	Hydrophobic Interaction	Hydrophobicity	Proteins
	Chromatofocusing	Isoelectric Point	Proteins
	Adsorption	Surface Interactions	Proteins
ELECTROKINETIC PROCESSES	Molecular sieve	Size	Proteins
	Electrophoresis		
	Isoelectric Focusing	Isoelectric Point	Proteins
	Moving Boundary	Electric Mobility	Proteins
	Continuous Flow Electrophoresis	Electric Mobility	Proteins
MEMBRANE PROCESSES	Microfiltration	Size	Cell Removal
	Ultrafiltration	Size	Concentration
	Electrodialysis	Ionic Charge	Desalting
	Dialysis	Size	Buffer Exchange, Desalting

표 3. 여러 가지 크로마토그래피 기법과 그 특성(I)

Method	Effect
Distribution	Differential solubility in unmixed liquid phases
Gel permeation	Size exclusion with differential retention according to adsorbent pore size
Adsorption(Normal phase)	Non-specific adsorption, e.g., polarity differential between relatively non-polar solute and solvent on a polar stationary phase
Ion-exchange	Electrostatic interaction with surface modified by quarternary aminoethyl (QAE), diethylaminoethyl(DEAE), sulfopropyl(SP), and carboxymethyl (CM) surface groups
Chromatofocusing	Separates according to isoelectric point
Charge-transfer	Electron donor/acceptor interaction
Reversed phase	Stationary phase coated to give non-polar, hydrophobic surface. Retention is proportional to hydrophobic reactions between solute and surface. Common packings include octadecylsilyls(C 18 or ODS), dodecylsilyl(C 22), or smaller carbon chains. Retention is roughly proportional to the length of the bonded carbon chain
Ion suppression	Acids(phosphoric, sulfuric, perchloric) or bases (ammonia or ammonium carbonate) suppress ionization and resulting diffuse peaks of weak bases and acids in neutral solvent
Ionization control	Buffered mobile phase controls pH to control degree of solute ionization for precise control of elution
Ion-pair	To separate organic ions, and ion of opposite charge is added, so target species is eluted as one member of the ion-pair
Non-aqueous	Non-soluble targets may combine with solvents such as acetone, acetonitrile, dimethyl sulfoxide, dichloromethane, methanol, and tetrahydrofuran
Affinity	Chemical reaction specific to target species
Biosorption	Site recognition(e.g., monoclonal antibody, protein A)
Hydrophobic Interaction	Contacts between non-polar regions in aqueous solutions. Similar to reversed phase method, but under milder process conditions
Dye-ligand	Specific binding of macromolecules to triazine and triphenylmethane dyes
Metal chelate	Matrix-bound chelate complexes with target molecule by exchanging low-molecular-weight metal-bound ligands
Covalent(chemisorption)	Disulfide bonding reversible under mild conditions

Sotirce ; P. Mohr, K. Pommerening, 1986. *Affinity Chromatography*. Marcel Dekker, New York. C.K. Lim, 1986. "Introduction." in *HPLC of Small Molecules*, C.K. Lim, ed IRL Press Oxford and Washington, D.C.

feed port와 sample port를 순환적으로 옮기는 방법으로 고정상과 이동상의 countercurrent 조업의 효과를 피하는 moving feed(port) 크로마토그래피는 크로마토그래피의 회분적 제한성을 탈피하는 기법들이다. Parametric pumping과 크기 배제 크로

마토그래피를 조합한 size exclusion 순환분리법은 (13) 동시 분리·농축의 효과를 가지며 column switching의 기법(그림 6)은 크로마토그래피의 극소적 제한성을 탈피하는 기법이다.

근래 크로마토그래피 기법의 추세로는 용매의 증

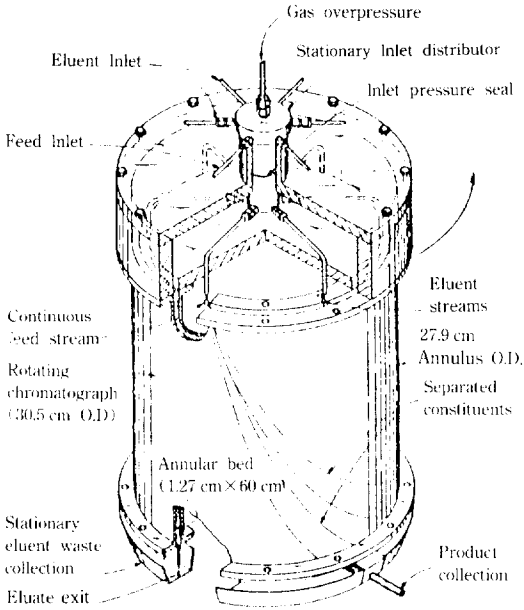


그림 5. Rotary Annulus Chromatography(12)

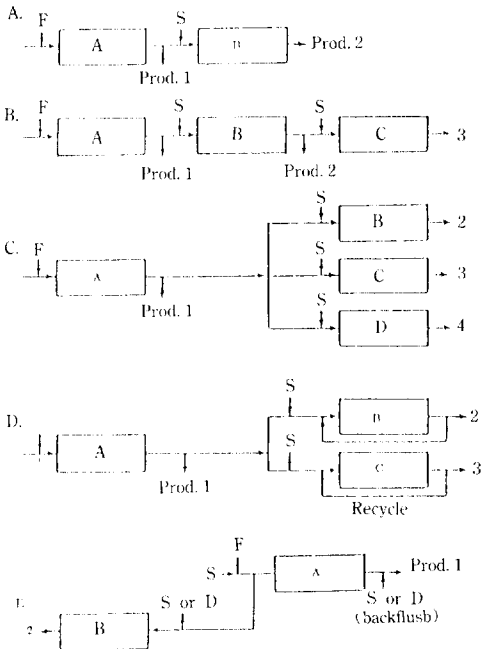


그림 6. Column Switching 기법(14)

발성, 인화성, 고가성 그리고 적합한 충전물의 개발 제한 등으로 normal phase(고정상은 극성, 이동상은 비극성) 대신 reverse phase가 절대적으로 쓰이고 있다는 것을 들 수 있고, 또 높은 분리능으로 각광을

받고 있는 affinity 크로마토그래피에서는 고가의 natural affinity ligand를 대신하여 molecular imprinting 등 pseudobiospecific ligand의 개발이 추진되고 있다.

근본적인 어려운 크로마토그래피의 scale-up에도 꾸준한 연구가 진행되고 있으며 이는 주로 column의 길이, 직경 그리고 충전물의 직경에 대해서 이루어지고 있다(15). 표 4에 크로마토그래피에 있어서 여러 공정변수의 분리능에 대한 영향을 나타내었다. 분리능이 뛰어난 HPLC에서는 물질전달 저항을 줄이기 위해 충전물의 직경을 작게하여 column이 소형화되는 추세인데 반해 대규모 크로마토그래피에서는 과도한 압력강하를 피하기 위해 pan-cake형(직경(2~2m)이 길이보다 큼), 또는 이들을 stack으로 쌓는 module이 많이 등장하고 있다. 대규모 크로마토그래피는 주로 gel permeation 크로마토그래피에 대해 적용되고 있다.

2) 막분리법

막분리는 다공성의 분리매체를 통과하는 물질들의 크기 및 확산속도 차이에 의해 분리하는 방법으로 근래에 들어 역제분리에 많이 사용되고 있다. 막분리는 다음과 같은 장점을 가지고 있다.

- (1) 상변화를 수반하지 않아 에너지가 적게 들며, 온도에 민감한 물질의 분리에 적합하다.
- (2) 무균조역이 가능하다.
- (3) 분리효율이 크며(ultrafiltration > ultra centrifugation) 빠르다.

단점으로는 농도분극현상, fouling, 많은 면적 필요, 온도 및 산·알칼리에 대한 불안정성 등이 있으나 급속히 개선되고 있다.

막분리의 여러 가지 기법을 표 5에 소개하였다. 전통적 여과, MF, UF, RO 등은 거의 비슷한 원리에 의해 분리가 진행되며, 단지 분리되는 물질의 크기와 이에 따른 분리매체의 pore 크기가 열거한 순서대로 작아진다. MF과 UF은 겔보기로는 cake의 유무로 가려지며 MF은 실제 현장에서 원심분리법과 경쟁적으로 상요된다. 근래에 개발된 cross-flow(tangential flow)법은 모액의 흐름방향과 여액의 막통과 방향을 직각으로 하는 방법으로 종래의 dead-end 여과에서 문제되는 농도분극현상, cake 축적 등을 해결할 수 있는 획기적인 방법으로 주로 MF의 연속 조업을 가능케 하고 있다.

표 4. 크로마토그래피 공정 변수들의 영향(16)

Effects of Process Parameters on Resolution and Throughput		
Parameter	Resolution varies with	Throughput varies with
Column length(L)*	L	1/L
Column radius(r)**	Some effect	r ²
Temperature(T)	Positive effect	T
Viscosity(η)	Negative effect	1/ η
Sample volume(V)	1/ V-V _{optimum}	V
Flow rate(J)	1/ J-J _{optimum}	J

Bench-level purifications tend to be optimized only for resolution, while pilot and production scale purifications must also maximize throughput.

*For gel filtration and isocratic elutions, column length is a critical factor. For gradient elution in adsorption chromatography, however, resolution is relatively independent of column length.

**Wall effects on resolution are pronounced in short-radius columns, and decrease as column length increases.

표 5. 막분리 기술

NAME	UPSTREAM	DOWNSTREAM	DRIVING FORCE	PERMEANT	REJECTED SPECIES
	MIXTURE	MIXTURE			
Gas Permeation	Gas	Gas	Concentration or Partial Pressure	Gas	
Pervaporation	Liquid Solution	Gas	Concentration or Partial Pressure	Gas	
Dialysis	Liquid Solution	Liquid solution	Concentration	Microsolutes	
Electrodialysis	Liquid Solution	Liquid solution	Electrical Potential	Ions	
Filtration					
Reverse Osmosis (Hyperfiltration)	Liquid Solution	Liquid Solution	Pressure and Concentration	Solvent	Microsolutes
Ultrafiltration	Liquid Solution	Liquid Solution	Pressure and Concentration	Microsolutes	Microsolutes
Microfiltration	Liquid Suspension	Liquid Solution	Pressure and Concentration	Microsolutes	Colloidal Particles
Particle Filtration	Liquid Suspension	Liquid Suspension	Pressure and Concentration	Colloidal Particles	Macroscopic Particles

막분리에 있어서 새로운 시도로는 혼합물 중의 분리하려는 물질을 분자량이 아주 큰 macroligand와 affinity 결합시켜 결합하지 않은 다른 물질들만 통과시켜 분리하는 affinity-ligand membrane법, 막분리와 추출을 조합한 perfusion법, 막분리와 증발을 조합한 방법으로 비점이 비슷한 물질이나 공기혼합물의 분리에 사용되는 pervaporation 등이 있다.

대규모 막분리에서는 막의 재질에 못지않게 막의 형태도 큰 영향을 끼치며, 많은 분리면적을 확보하기 위해 hollow fiber, spiral wound cartridge 등이 개발되었다. Hollow fiber는 여러 개의($\sim 10^2$) 가는(< 1 mm) 대롱형의 막을 한 cartridge에 넣어 막면적을 극대화한 것으로 분리 뿐 아니라 고정화 세포(효소), 나아가서는 크로마토그래피 용도로도 개발

되고 있다. 최근에 ceramic membrane이 개발되어 온도, 압력, 산·알칼리에 강한 내성을 갖게 되었다. 이 membrane은 현 추세인 멸균가능, 균일한 pore 크기, 높은 유량, biocompatible한 표면 등을 고루 만족시키나 아직 가격이 비싸고 성형이 제한되어 있다는 단점이 있다.

상기의 다양한 재질, 형태 및 공정성을 갖춘 막 분리법은, 최근 연구되고 있는 촉매적 요소를 조합하여(촉매를 부착하거나 막자체를 촉매적으로 제조) 선택적이고 조절적인 화학반응, 분리기능을 얻게 되면 동시 반응·분리 등 생물분리에 있어서 가장 유용한 기술로 발전할 것이다.

3). 전기영동법

전기영동법은 가장 오래되고 확실한 분석방법으로 거대분자, 특히 단백질의 분리에 사용되고 있으며, 전기장에서 하전된 물질들이 전하, 확산속도, 크기 등의 차이에 의해 분리한다. 전기영동은 HPLC와 경쟁적으로 쓰이고 있으며, 이는 크로마토그래피와 같이 높은 분리능을 보이면서도 분리매체가 non-mass인 전류이기 때문에(크로마토그래피에서는 외부로부터의 용리액) 확산이나 분산외에는 회석의 요인이 없고, 적절한 기법을 사용하면 물질의 농축도 가능하기 때문이다. 전기영동의 가장 큰 단점은 물질분리 후 일어나는 mixing으로 이를 최소화하기 위하여 gel을 사용하는 전기영동법이 많이 사용되고 있다.

전기영동의 기법으로는 흔히 사용되는 moving boundary법, zone 전기영동법 등의 등용매(isocratic) 전기영동이 있고, 높은 분리능을 얻기 위한 비등용매(nonisocratic) 전기영동에는 등전집속(isoelectric focussing), isotachopheresis 등이 있다. 등전집속법은 단백질들이 각기 고유한 등전점에서는 전하를 갖지 않아 전기장에서 mobility가 없음을 이용하여 등전점에 집속하는 현상을 이용한 것으로 분리 및 농축이 가능하고 대규모 분리에도 응용될 수 있다. Isotachopheresis는 특히 하전차가 큰 단백질들의 분리에 많이 쓰이는 기법으로, 분리기작은 다르나 외관상 여러 단백질들이 연속하는 띠를 이루며 움직여 분리되는 것은 displacement 크로마토그래피와 유사하다. 이외에도 보다 좋은 분리능을 얻기 위한 분석용 분리법으로 등전집속법에 의해 일차분리하고 이것을 SDS-PAGE에 얹어 물질크기

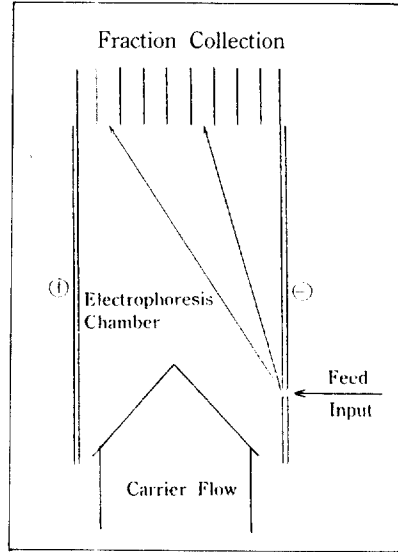


그림 7. 연속식 전기영동법(17)

에 따라 다시 분리하는 2-dimensional법, capillary를 사용하여 Joule heat dissipation에 의한 mixing을 최소화하고 electrophoretic mobility와 electroosmotic mobility를 이용하여 분리능을 증가시키는 capillary 전기영동법들이 있다.

대부분의 전기영동법이 소규모 회분식이나 대규모 분리를 위한 연속식 전기영동이 개발되었다(그림 7). 이 방법에서는 feed port에서 연속적으로 유입되는 각 성분들이 전기량에서 전기적 mobility에 따라 움직이는 동시에, 전류흐름과는 직각인 축류의 영향을 받아 각각의 trajectories를 따라 출구의 특정한 port에서 분리·수거된다.

생물분리분야에서 흔히 쓰이는 약자를 표 6에 표시하였다.

5. 결 언

생물분리공정은 downstream 공정의 일부로서 생물반응에 의해 생성된 유용한 물질을 회수·정제하는 공정이며 균형있는 생물공학의 발전을 위해 필수 불가결한 분야이다. 특히 유전자조작 기술 등에 의해 개발된 생물체로부터 얻어지는 물질들을 경제적으로 생산하기 위해서는 대규모 기술들이 효율적으로 사용되어야 한다. 생물반응생성물의 주류를 이루는 단백질의 경우 불안정한 거대분자를 이루고 있어

표 6. 분리기술의 약자명

BPC	Bond Phase Chromatography
CE	Capillary Electrophoresis
CZE	Capillary Zone Electrophoresis
FFE	Forced(Free) Flow Electrophoresis
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FSCE	Free Solution Capillary Electrophoresis
GFC	Gel Filtration Chromatography
GPC	Gel Permeation Chromatography
HIC	Hydrophobic Interaction Chromatography
HPCE	High Performance Capillary Electrophoresis
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEC	Ion Exchange Chromatography
IEF	Iso Electric Focusing
IPC	Ion Pair Chromatography
LLC	Liquid Liquid Chromatography
LPLC	Low Pressure Liquid Chromatography
LSC	Liquid Solid Chromatography
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography
MZE	Multiphasic Zone Electrophoresis
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PC	Paper Chromatography
PIEF	Recycling IsoElectric Focusing
RPC	Reverse Phase Chromatography
SCFC	SuperCritical Fluid Chromatography
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-PAGE
SEC	Size Exclusion Chromatography
TLC	Thin Layer Chromatography

분리·정제과정 중 쉽게 변성되어 그 최종수율이 30%에 못미치고 있다. 효율적인 분리·정제를 위해서는 생성물과 분리매체 사이의 생화학적 상호작용을 규명하여, 적절한 방법으로 생물물질의 활성도를 최대한으로 유지하는 것이 바람직하다. 또한 분리능이 뛰어난 생물분리기술들이 대부분 소규모·회분식 방법에 의존하기 때문에, 생물물질의 대규모

생산을 위해서는 분리공정의 연속화 최적화 및 scale-up 기술의 개발에 많은 연구가 필요하다.

참고문헌

1. Knight, P., *Bio/Technology*, 7, March, 243-249 (1989).
2. Scopes, R.K., *Protein Purification : Principles and Practice*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York, 1987.
3. Harris, E.L.V. and Angal, S(eds.), *Protein Purification Methods : A Practical Approach*, IRL Press, New York, 1989.
4. Deutscher, M.P.(ed.), *Guide To Protein Purification, Methods In Enzymology, Vo.182*, Academic Press, New York, 1990.
5. Belter, P.A., Cussler, E.L. and Hu, W.-S, *Bio-separations : Downstream Processing for Biotechnology*, John Wiley & Sons, New York, 1988.
6. Schweitzer, P.A.(ed.), *Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers*, McGraw-Hill, Inc., New York, 1979.
7. 구윤모, *생물화학*, 2(1), 봄, 23-29(1988).
8. 구윤모, *생물화학*, 3(3), 여름, 17-36(1989).
9. Ratafia and Kevin, *Amer. Biotech. Lab.*, 4(6), 40-47(1986).
10. Bonnerjea, J., Oh, S., Hoare, M. and Dunill, P., *Bio/Technology*, 4, 954(1986).
11. Scott, M., *Bio/Technology*, 5, December, 789-793(1988).
12. Sisson, W.G., Begovich, J.M., Byers, C.H. and Scott, C.D., *CHCMTECH*, August, 498-502(1988).
13. 구윤모, *생물화학*, 3(4), 가을, 35-50(1989)
14. Wankat, P.C., *Large-Scale Adsorption and Chromatography—hy*, CRC Press, Inc., Boca Raton, 1986.
15. Wankat, P.C. and Koo, Y.-M., *AIChE J.*, 34(6), 1006-1019(1988).
16. Sofer, G. and Mason, C., *Bio/Technology*, 5, March, 239(1987).
17. Noble, P.T., *Biotech. Progress*, 1(4), 237-249 (1985)