

실크 피브로인의 대규모 투석 공정의 단위 모듈의 개발

Development of a Unit Module for the Process of Large Scale Dialysis for Silk fibroin

김 동 우^{***} 하 성 진^{**} 임 건 빈^{**} 허 원^{*}
Kim, Dong-Woo Ha, Sung-Jin Lim, Gun-Bin Hur, Won

Abstract

For the development of a large-scale dialysis process for silk fibroin solution, a batch and continuous dialysis chamber was designed and built, which are to be used as a unit module for the process. A series of dialysis experiments were carried out to estimate the kinetic parameters for dialysis using the solutions of salt-solubilized silk fibroin. The solution was dialyzed by distilled water either batch-wise or continuously. Dialysis kinetics was monitored by measuring refractometry at high salt concentration and conductivity at lower salt concentration. The apparent dialysis coefficients were 5.4 g/m²-hr and 1.8 g/m²-hr, for well mixed batch and continuous dialysis, respectively. The alteration of molecular weight distribution of dialyzed silk fibroin solution was monitored.

키워드 : 실크 피브로인, 투석, 투석공정, 물질전달

Keywords : silk Fibroin, dialysis, dialysis process, mass transfer

1. 서론

실크는 누에고치(*Bombyx mori*)가 자기 몸을 보호하기 위해 분비하는 단백질로 인류는 오래 전부터 고형화된 단백질을 천연섬유로서 이용해 왔다. 실크 섬유 한 가닥은 그 중심부에는 두가닥의 피브로인(Fibroin)과 이를 보호하기 위하여 둘러싸고 있는 세리신(sericin)으로 구성되어있다[1]. 실크 단백질인 피브로인과 세리신의 화학적 조성은 각각 72.6 %와 22.3 %이다[2]. 실크 피브로인은 섬유상

결정을 형성하여 실크의 중심 섬유 가닥을 구성하는 단백질로서 실크 피브로인 1분자는 약 4000개 이상의 아미노산으로 연결되어 있으며 글리신(35%), 알라닌(27%), 세린(13%), 티로신(10%)등으로 구성되어 있다[3]. 비교적 크기가 작은 글리신, 알라닌 및 세린의 조성 비율이 약 75%에 해당하고 있다. 실크 피브로인은 인체에 필요한 8가지 필수 아미노산(발린, 이소로이신, 스레오닌 등)을 포함한 20여 종류의 아미노산으로 구성되어 있고, 동물 실험을 통해서 알라닌은 알코올 대사를 촉진하는 작용이 있음이 알려지고 있다. 또한, 글리신 및 세린은 혈중 콜레스테롤 농도를 저하시키는 작용이 있으며, 티로신은 치매를 예방하는 작용이 있는 것으로 보고되고 있다[4]. 최근에는 실크 피브로인의 생물 의학적, 물리 화학적 특성으로서 생체 조직이나 기관과 잘 교합하는 겔 또는 다공성 물질

* 강원대학교 생물공학과 교수, 공학박사
** (주) 화인코 대표이사, 공학박사
** (주) 화인코 대리, 석사
*** 강원대학교 대학원 생물공학과, 석사과정

들을 약물 전달 시스템에서 전달체로서 개발하고 있고 인공피부, 생물 의약품 등으로 사용되어 질 것으로 기대되고 있다[3-4]. 또한 효소 고정화 물질, 동물 세포 배양 기질로서 사용되어지고 있으며 산소 투과성을 이용한 바이오 센서와 바이오 필름 등에 사용되어지고 있다[5-9].

위와 같은 목적의 순수한 피브로인 용액은, 실크를 염으로 용해시킨 후 투석을 통한 염의 제거로 얻을 수 있다[5]. 일반적으로 투석은 소규모로 단백질을 분리할 때 사용되어 왔으나 본 실험에서는 실크로부터 피브로인 용액을 대량으로 얻기 위한 투석공정을 개발하기 위한 기초 연구를 수행하였다.

대량의 실크 피브로인 용액을 투석할 수 있는 장치를 여러 개의 단위 모듈로 구성하여 제작할 수 있으므로 단위모듈이 될 투석 장치를 개발하고 이 투석 장치에서 물질전달 계수와 장치의 운전에 관한 기초실험 및 검증 절차를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실크 피브로인 수용액의 제조

천원 실크를 탄산나트륨 수용액(0.3 %)에서 100 °C로 30분간 끓여 세리신을 제거한 후 염화칼슘 수용액(37.5 %)으로 수분간 100 °C에서 끓여 실크를 용해시켰다. 얻어진 실크 피브로인 수용액의 농도는 11~12 %이었다.

2.2 투석 방법

MWCO(molecular weight cut off)가 6000~8000 Dalton인 셀룰로오스 투석막(Cellu-Sep, USA)의 내부에 피브로인이 용해된 염화칼슘 용액을 넣고 밀폐시킨 후 2차 증류수에 넣어 용출되는 염화칼슘의 농도를 측정하여 회분식으로 투석되는 속도를 관찰하였다. 투석 속도를 향상시키기 위하여 셀룰로오스 투석막 외부에 증류수를 연속적으로 공급시키는 연속 투석을 실시하였다.

2.3 염농도의 측정 방법

투석액의 염화칼슘의 농도가 0.1 %이하 일 때는 전도도계(Corning CD-55 Sensor, USA)를 사용하고 0.1 %이상의 농도에서는 굴절계(ATAGO NI, JAPAN)를 사용하여 측정하였다. 염화칼슘 표준용액을 만들어 전도도계와 굴절계의 측정 범위를 결정하고 환산표를 만들어 사용하였다.

2.4 분자량 분포 측정

Gel filtration chromatography (LKB-PRODUKT ER AB, SWEEDEN)로 투석 전후의 분자량 분포를 측정하였다. 분획용 겔은 TSK3000을 사용하였고 260 nm에서의 흡광도를 측정하여 단백질의 양

을 모니터 하였다. 분자량을 알기 위한 표준 물질로는 Blue dextran (Mw=2,000,000), β -Amylase (Mw=2,000,000), Albumin (Mw=66,000), Carbonic anhydrase (Mw=29,000)을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

투석장치의 단위모듈을 다음의 Fig. 1(A)와 같이 설계하였다. 본 장치에서의 주안점은 약 3 liter의 실크 피브로인 용액을 투석할 수 있도록 길이 1 m에 직경 66 cm의 투석막을 사용할 수 있도록 아크릴로 장치를 구현하였다. 투석의 진행에 따라 투석막의 내부에 압력이 증가하게 되는데 이때 투석막이 훼손되지 않고 연결부위에서 내부의 용액이 누출되지 않도록 하여야한다. 이를 위하여 투석막의 양 말단을 고정시키는 부위를 Fig. 1(B)와 같이 설계하였다. 투석막의 내부의 압력이 증가하면 투석막을 고정시키는 연결부위에 압력이 가해져 연결부위가 더 치밀하게 연결되어 투석막 내부의 용액의 누출을 막는 구조로 설계 제작하였다.

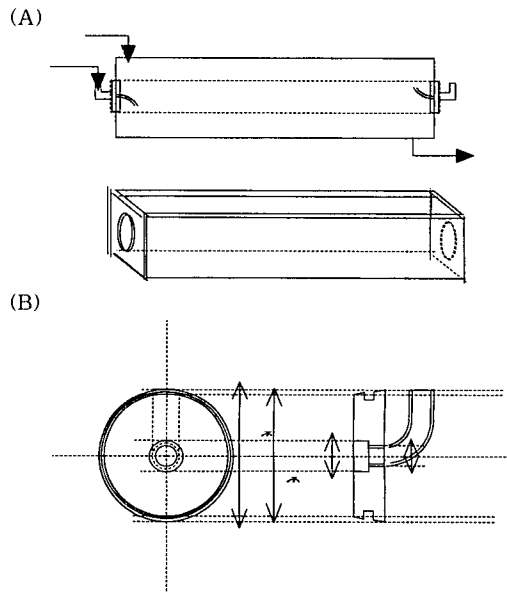


Fig. 1. Schematic view of dialysis module (A) and magnification of membrane joint part (B)

실크 피브로인 12 % 용액을 사용하여 투석을 실시하여 내부용액의 누출을 효과적으로 방지하면서 투석과정의 진행 여부를 관찰하였다. 투석막의 고정 부위에서의 다소의 누출은 있었으나 사용방법이 익숙해짐에 따라 성공적으로 투석을 실시할 수 있게 되었다. 투석장치의 단위 모듈에서의 투석 속도를 측정하여 대용량의 투석장치의 구성에 필요한 기본 자료를 얻고자 하였다. 이를 위하여 수차

레 실크 피브로인 염용액의 투석을 실시하였다. 투석된 용액 속의 염의 농도를 굴절계와 전도도계를 측정하면서 투석 속도를 모니터링 하였다.

투석액의 유량의 변화 및 염농도의 변화 등 다양한 조건에서의 투석 공정이 진행될 수 있으므로 투석 모듈에서의 투석계수를 유도하였다. 이를 위해서는 투석과정을 수학적으로 해석하여야 한다. Fig. 1과 같이 투석 모듈이 구성되어 있고 초기에 실크 피브로인 염용액을 증류수로 투석할 경우 염의 물질 수지와 물질전달식을 활용하여 다음과 같이 투석 과정에서의 투석막의 내부와 외부의 염의 농도의 변화를 나타낼 수 있다.

$$\frac{dC_2}{dt} + (k_L \cdot A + \frac{F}{v}) \times C_2 = K_L \cdot A \cdot C_1(t) \quad (1)$$

$$V_1 \cdot C_0 = V_1 \cdot C_1(t) + F \cdot \int_0^t C_2(t) \cdot dt \quad (2)$$

C_0 : initial concentration of salt,

C_1 : Salt in membrane,

C_2 : Salt outside of membrane,

k_L : dialysis coefficient,

A : surface area of dialysis tubing,

F : flow rate,

V_1 : volume of dialysis tubing,

V_2 : volume of dialysis solution

식(1)과 식(2)로부터 수치 해석으로 투석막의 내부와 외부의 염의 농도를 구하고 이를 회분식 및 연속식의 투석 결과와 비교하여 셀룰로오스 투석막의 물질 전달 저항 계수를 각각 측정하였다.

Fig. 2에서 볼 수 있듯이 회분식 투석시에는 투석 외액을 교반하여 6 시간 후에는 평형값의 95%에 도달하였다. 식(1)과 식(2)로부터 얻은 투석막 내부 및 외부의 염의 농도의 계산치와 실험을 통하여 측정한 값을 Fig. 2에서와 같이 비교하였다. 실험을 통하여 얻은 염농도의 변화와 식(1)과 식(2)로부터 투석계수를 변화시켜 가면서 계산되는 염농도의 변화가 가장 잘 일치하는 점을 찾아내었다. 교반이 잘되는 조건하에서 실험을 수행한 회분식 투석 시스템에서의 물질전달계수는 $5.4 \text{ g/m}^2\text{-hr}$ 이었다.

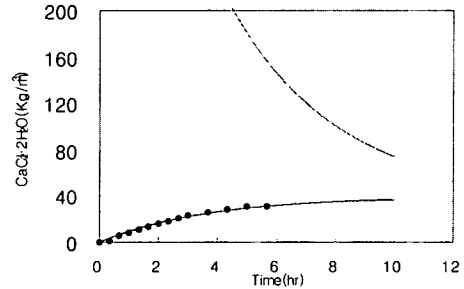


Fig. 2 Batch kinetics of dialysis of silk protein-salt solution and its comparison to experimental data. (-●-; experimental data, — the estimated salt concentration, ···· the estimated salt concentration inside the membrane)

본 연구에서 개발된 모듈에서 연속적으로 증류수를 공급하여 투석을 할 경우의 투석 외액의 염화칼슘의 농도를 굴절계와 전도도계로 측정하였다. Fig. 3에서는 연속적으로 공급되는 증류수에 의한 투석 시스템에서 염화칼슘의 농도의 변화를 나타내었다. 동시에 실험치와 가장 잘 맞는 투석계수를 적용하여 계산된 투석막 내외부의 염의 농도의 변화를 같이 나타내었다. 연속식 투석 시스템에서의 물질전달계수는 $1.8 \text{ g/m}^2\text{-hr}$ 이었다.

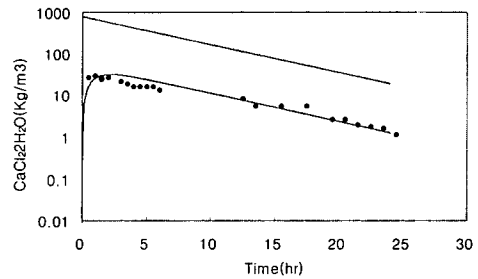


Fig. 3 Determination of dialysis coefficient during continuous dialysis and estimation of the internal concentration of salt. (-●-; experimental data, — the estimated salt concentration, ···· the estimated salt concentration inside the membrane)

연속식 시스템에서는 따로 교반하지 않아 겉보기 물질전달계수가 측정되어 회분투석보다 낮은 것으로 나타난 것으로 판단된다. 연속적으로 투석할 때 교반을 병행하면 약 3배정도의 투석속도를 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.

동시에 외부의 투석액의 염의 농도를 측정하여 투석막의 내부의 염의 농도를 추정할 수 있어 투

석 공정의 모니터링에 중요한 방법이 될 수 있다. 투석과정에서의 실크 피브로인의 분자량의 변화가 예측되므로 분자량의 분포를 Gel permeation chromatography로 측정하였다. Fig. 4는 실크 피브로인의 투석 전후 분자량 분포도이다. 투석후에는 분자량 20,000 Dalton 이하 부분이 상당히 감소하였다. 이것은 분자량이 작은 실크 프로테인이 염화칼슘과 함께 제거되었기 때문이다. 투석후의 분자량의 분포는 분획 한도보다 큰 2,000,000 dalton 이상에서 피크의 크기가 증가하는 것이 관찰 된다. 이것은 시간의 경과에 따라 실크피브로인 분자들이 서로 결합하여 고분자화되는 것으로 판단된다.

본 연구에서는 대규모의 투석을 가능하게 하기 위한 투석 공정의 규모를 크게 만들기 위하여 투석 공정의 수학적 모델을 세우고 투석 과정의 물질전달 계수를 결정하였으며 투석 전후의 분자량 분포도로 투석 전후의 분자량 분포를 알 수 있었다.

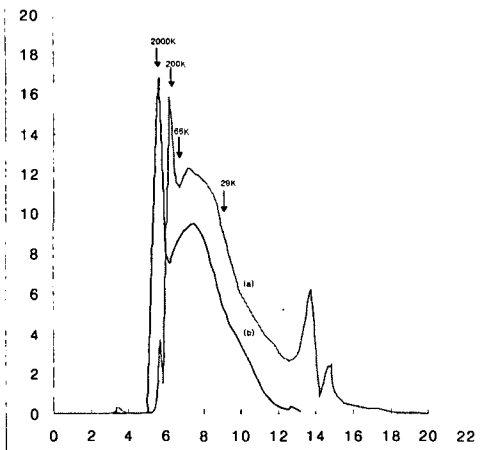


Fig. 4 Molecular weight distribution of silk fibroin solution before(a) and after(b) dialysis

참 고 문 헌

[1] 이대규, "실크를 이용한 바이오 소재의 개발", *신기술*, Vol.12, pp.1-11, 1998
 [2] D. K. Kim, Y. H. Kim, K. B. Kim, Y. G. Chin, "The changes of Molecular Weight and Structure in the Preparation Process of Silk Fibroin Powder", *Journal of the Korean Fiber Society*, Vol.38, No.3, pp.105-110, 2001
 [3] Y. Gotoh, M. Tsukada, N. Minoura, "Chemical modification of the arginyl residue in silk fibroin: 2. Reaction of 1,2-cyclohexanedione in aqueous alkaline medium", *International*

journal of biological macromolecules, Vol.19, no.1, pp.41-44, 1996
 [4] N. Minoura, *Biochemical Applications of Polymeric Materials*. CRC Press, Boca Raton, pp. 128, 1993
 [5] J. Chen, N. Minoura, A. Tanioka, "Transport of pharmaceuticals through silk fibroin membrane", *Polymer*, Vol.35, No.13, pp. 2853-2856, 1994
 [6] Liu, H, Y. Liu, J. Qian, T. Yu and J. Deng, "Fabrication and feature of a methylene greenmediating sensor for hydrogen peroxide based on regenerated silk fibroin as immobilization matrix for peroxidase", *Talanta* Vol.43, pp.111, 1996
 [7] Minoura, N, M. Tsukada and M. Nagura, "Fine structure and oxygen permeability of silk fibroin membrane treated with methanol", *Biomaterials* Vol.11, pp.430, 1990
 [8] D. G. Kang, J. H. Nahm, J. Park and J. Y. Moon, "Effects of poloxamer on the gelation of silk fibroin Macromol", *Rapid Commun.* Vol.21 pp.788-791, 2000
 [9] G. Yang, L. Zing, Y. Liu, "Structure and microporous formation of cellulose/silk fibroin blend membranes I.Effect of coagulants", *Journal of Membrane Science*, Vol.177, pp.153-161, 2000
 [10] G. Forlani, A. M. Seves, O. Ciferri, "A bacterial extracellular proteinase degrading silk fibroin", *International Biodeterioration & Biodegrading* Vol.46, pp.271-275, 2000
 [11] K. Inouye, M. Kurokawa, "Use of *Bombyx mori* silk fibroin as a substratum for cultivation of animal cells", *Journal of biochemical and biophysical methods*, Vol.37, pp.159-164, 1998