

비용매 첨가법을 이용한 Dextran 분별침전에 관한 연구

최 성 우 · 구 윤 모
인하대학교 생물공학과

Studies on the Fractional Precipitation of Dextran by Nonsolvent Addition Method

Sung-Woo Choi and Yoon-Mo Koo[†]

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

ABSTRACT

Fractional precipitation of "native" dextran by the method of nonsolvent addition was studied. Precipitational phenomenon of fractioned dextran was characterized with the quantitative determination of the precipitational capacity of nonsolvents with different dielectric constants. Based upon this characterization, the fractional precipitation process for the dextran production was developed. From the precipitational characteristics, a first-order relationship between the molecular weight of fractioned dextran and the content of nonsolvents was formulated. The slopes of the first-order equation were correlated with the dielectric constants of the nonsolvents. A modified fractionation process was constructed on the basis of refractionation method and employed to increase the efficiency of the controlled production of dextran.

서 론

최근 미생물 유래의 생물고분자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 고분자 물성을 좌우하는 분자량연구는 초보단계이며 생물고분자의 산업화에서의 조절은 중요과제이다(1, 2). 본 실험은 대표적인 생물고분자인 dextran을 대상으로 하였다. Dextran은 평균분자량 및 분자량분포에 따라 용도가 규정되어 있어, 이의 효과적인 조절은 dextran의 용도개발 및 산업화의 관건으로서 저분자량 및 좁은 분자량 분포를 갖는 상업용 혹은 의료용 dextran의 생산을 주목적으로 한다. 약전에서는 *Leuconostoc*

mesenteroides NRRL B512F 변이주에 의한 dextran의 사용을 규정하고 있는데, 이유는 생성 dextran분자의 $\alpha(1\rightarrow6)$ glycosidic 결합이 전체의 95%로 용해도가 높고, 멸균이 용이하며, 체내투여 시 혈액과의 반응이 없으며, 부작용이 적어 의료목적에 적합하기 때문이다(3).

기존의 dextran 생산방식인 발효는 scale-up이 용이하며 고생산성이라는 장점이 있으나, 그 이후의 공정에서 분자량조절을 위한 공정제어 및 사용된 비용매의 회수와 재사용을 위한 공정개선이 필요하다. 특히 생성 dextran의 평균분자량이 높고 분자량 분포가 넓어서 상업적가치가 낮으므로, 상품화하기 위한 분별(fractionation)과정이 중요하다. 본 실험은 발효에 의한 생산 방식에 있어서 dextran의 침전특성을 고찰

[†] Corresponding Author

하고, 이를 근거로 재분별(refractionation)에 의한 분별침전 과정의 방법론적인 개선을 제시하였다.

재료 및 방법

Dextran 생산 및 시료의 제조

Dextran 생산에는 *Leuconostoc mesenteroides* B512F 변이주를 ATCC(No. 10830A)에서 분양받아 사용하였고, yeast extract 2g/l, peptone 5g/l, K_2HPO_4 10g/l, salt solution 5ml/l ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 40g/l, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 2g/l, NaCl 2g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g/l)을 기본조성으로 배양시간 및 sucrose 농도를 변화시키며, pH 6.7, 26°C에서 진탕배양(180rpm)하였다. 그리고 broth상태에서 크게 2단계로 정제하였다. Methanol첨가에 의한 dextran 침전 및 용해의 반복으로 균체 및 저분자물질 제거와 흡착제에 의한 단백질 제거로서 전체적인 공정은 Fig. 1과 같다. 실험목적에 부합하는 고르고 넓은 분자량분포를 갖는 시료제조를 위해 열가수분해법을 이용하였다. 고분자체의 말단부위를 불규칙하게 끊은 뒤에 혼합하여 시료를 제조하였고 그 과정은 Table 1에 나타났다.

비용매의 선정

Dextran의 분류 침전용 비용매는 기존의 생산공정에 이용되는 ethanol을 중심으로 하여, 물리화학적 특성상 비교가 될 수 있는 비용매로 선정하였다.

그리고 비용매의 유전상수(dielectric constant, D)를 분류침전을 유도하는 주요 매개변수가 될 것으로 예상하고 이를 중심으로 실험을 전개하였다. 실험에 사용한 비용매는 methanol, ethanol, acetone, isopropanol로서 이들의 유전상수는 각각 32.6, 24.3, 21.4, 그리고 18.3이다.

비용매 첨가에 의한 분별침전

분별침전법(fractional precipitation)은 고분자물질-용매-비용매로 구성된 계에서 용매의 solvent power를 단계적으로 감소시켜 평균 분자량이 감소하는 방향으로 분별하는 기법이다(4). 본 실험에서는 비용매 첨가법에 의한 분별침전법을 사용하였다. 이 방법은 turbidity end point-숙성-온도상승하강 조작과정으로 이루어진다. Turbidity end point는 비용매의 첨가에 따른 용액의 탁도증가가 더 이상 일어나지 않는 점, 즉 비용매 첨가종말점을 의미한다. 본 실험에서는 이 방법을 기초로 단순분별 및 재분별에 의한 분별침전법으로 나누어 실행하였다.

단순 분별침전

단순 분별침전법은 분별침전하여 하나의 fraction을 얻은 후에 비용매 함량을 증가시켜 재침전하는 순차적인 방법이다. 본 실험에서는 변형된 단순 분별침전법을 사용하였다(Fig. 2). 이는 한 시료에서 하나의 fraction만을 얻는 방법으로서 n개의 fraction을 얻기 위해서 동일한 시료가 (n-1)배 분량 필요하다. Solution S_{10} 를 1차 분별침전하여 S_{11} 및 fraction F_1 을 얻은 후에 비용매의 함량을 증가시켜 재분별침전하여 S_{21} 과 F_2 를 얻게 된다. 또한 S_{20} 에서 1차 분별침전하여 $F_{(1+2)}$ 를 제거한 후에 S_{21} 에서 비

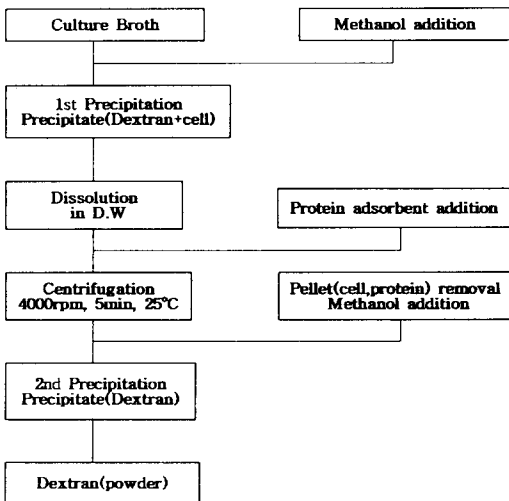


Fig. 1. Schematic procedures of dextran purification.

Table 1. Procedures of acid hydrolysis of dextran to prepare the sample of even MWD.

1. (8wt% dextran-용액)+(1.0 N HCl)
2. Acid hydrolysis (90°C)
(Reaction time : 15, 30, 40, 50, 60, 90min.)
3. Rapid cooling
4. Sampling and purification
5. MWD determination (GPC)
6. Chromatogram analysis
7. Mixing several dextran solutions (trial & error method)
8. Solution with even MWD dextran

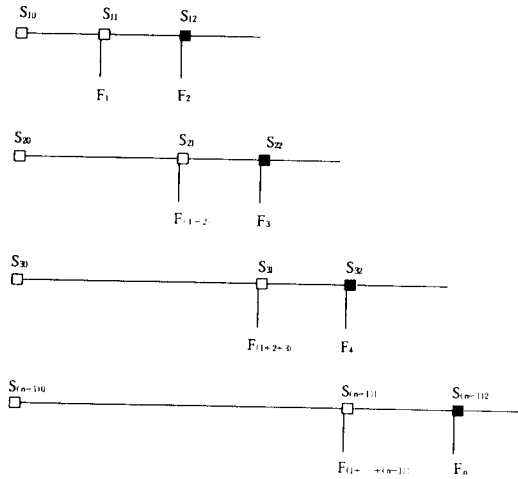


Fig. 2. Schematic procedures of simple method of fractional precipitation (modified). S(solution) : $S_{10} \sim S_{(n-1)0}$, F(fraction) : $F_1 \sim F_n$.

용매의 함량을 증가시켜 재분별침전하여 S_{22} 및 F_3 를 얻게 된다. 이후 S_{n0} 에서 $F_{(1+2+\dots+(n-1))}$ 을 제거한 후에 $S_{(n-1)1}$ 에서 $S_{(n-1)2}$ 와 F_n 을 얻게 된다. 참고로 solution 표기에 사용한 두 자리의 아래첨자는 시행 번호와 침전상태를 의미한다. 실험 목적은 기존의 방법에서 발생하는 tail effect 및 reverse order fractionation 현상을 방지하는 것이다. Tail effect는 fraction 내에 저분자량의 성분이 혼재하는 현상이다. 이는 침전중에 작은 분자가 끼어드는 경우(inclusion)와 침전체의 상분리가 불안정한 경우에 발생하는데, 용매의 선정과 관련이 있다. Reverse order fractionation은 용액의 초기농도가 높을 때 발생하는 현상으로, 중간 분자량대가 먼저 침전되고 비교적 낮은 분자량대가 높은 분자량대보다 먼저 침전되어 정상적인 분별이 어렵게 된다. 이는 용액의 초기농도 및 intrinsic viscosity와 관련되어 있다. 순차적인 분별과정에서는 분별횟수가 증가하므로 용액내 농도감소로 발생한다. 이로 인한 침전체의 부피감소와 침전 소요 시간의 증가는 reverse order fractionation 현상과 동시에 고려해야 한다. 따라서 침전횟수를 단축하며 용질의 농도를 일정수준 이상 확보하여 실험 후반 fraction에서의 오차를 줄이고 소요시간을 단축하는 목적으로 상기의 방법을 시행하였다.

재분별에 의한 분별침전

재분별에 의한 분별침전에 의하여, tail effect 및

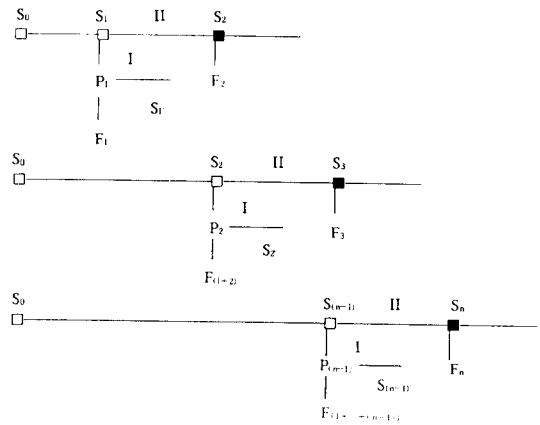


Fig. 3. Schematic procedures of refractionation method of fractional precipitation (modified). S(solution) : $S_0 \sim S_n$, P(precipitate) : $P_1 \sim P_n$, F(fraction) : $F_1 \sim F_n$.

reverse order fractionation 현상을 해결하고 polydispersity면에서의 개선도 시도한다. Dextran은 극단의 침전조건(예, 비용매 90%, -30°C)에서도 중합도 5 이하의 oligomer는 침전이 되지 않으므로(5), 저분자 dextran의 침전에 영향을 미칠 것으로 판단되었다. 이를 고려하여 Fig. 3의 과정을 구성하였다. 이 방법은 기존의 재분별방식을 원용하되 동일한 시료로 동시에 여러 단계의 fraction을 얻으려는 의도이다. Fraction F_1 (비용매 함량 0~20%)을 획득하는 과정은, 우선 시료처리 I 단계에서 분별침전을 하여 solution S_1 과 precipitates P_1 을 획득한 후에, P_1 을 건조시키고 칭량한 뒤, 초기 농도로 용해하여 S_1 및 F_1 을 얻는다. 시료처리 II 단계에서는 S_1 및 S_1 에 용해된 dextran을 침전 건조하여 S_2 와 동일한 농도로 용해한 뒤 분별침전하여 S_2 및 F_2 를 얻는다.

GPC On-Line System

본 실험에서는 GPC(Gel Permeation Chromatography)에 의하여 분자량분석을 하였다. Column (Amicon Co., $10 \times 500\text{mm}$)에 Sephacryl S-300HR(Pharmacia Sweden, 크기배제범위: $1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$)을 충전하였다. Peristaltic pump(Watson & Marlow Co.)와 three-way valve로 시료주입 및 용리하였고, 유속은 0.46ml/min 로 column 온도는 25°C 로 유지하였다. Flow-cell 장착형 분광광도계(Spectronic 601, Milton Roy Co.)에서 15초

주기로 용출액의 광학밀도값을 연속측정하였으며, 이와 연결된 PC에 의하여 용리곡선을 얻었다.

분자량 분석 및 표준물질

Dextran의 평균분자량 결정은 Sun과 Wong의 면적분석법(area method)(6)을 사용하였다. 이 방법은 용리곡선이 정상분포로 간주되나 대칭성의 Gaussian curve가 아닌 경우에 적용 가능하며, 체류부피 결정의 경우에 신뢰도가 높고, 용리곡선만으로 평균분자량 및 분자량분포를 계산할 수 있다는 장점이 있다. GPC에 의한 dextran의 분자량 분석에는 Dextran T-10, 40, 70(Pharmacia Co.)을 표준물질로 사용하였다. 이들의 평균분자량은 각각 10,200, 39,100, 66,700이었다. Void volume과 total volume 결정에는 Blue Dextran(평균분자량 2×10^6 , Sigma Co.)과 Nickel Nitrate ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 분자량 290.18, Junsei Chemical Co.)를 사용했다. Scanning에 의해 dextran의 최적 흡수파장은 200nm(7), Blue Dextran 및 Nickel Nitrate는 280nm로 결정하였다. 표준물질로 사용한 dextran의 분자량과 체류시간 사이에는 다음의 관계가 성립되었다. $\text{Log}(\text{분자량}) = 7.05 - 0.049(\text{체류시간, 분})$.

결과 및 고찰

단순 분별침전

변형된 단순분별침전법을 이용하여 실험을 수행한

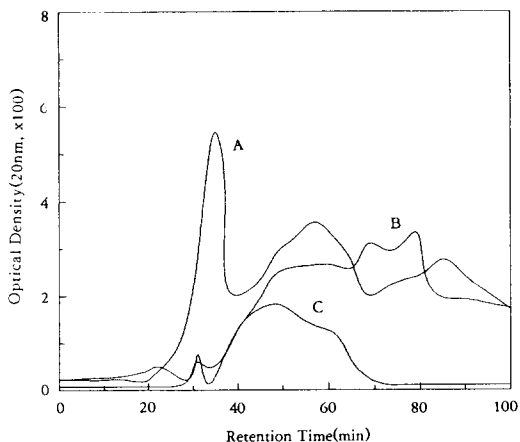


Fig. 4. Chromatograms of the fractionated dextran by the simple method. Nonsolvent: Methanol, Fractionation range : A(0-20), B(20-30), C(30-40).

결과를 Fig. 4에 나타내었다. 실험의 결과로서 기존의 단순분별침전법에서 발생하는 tail effect 및 reverse order fractionation 현상이 관찰되었다. Tail effect는 용매선정과 관련이 있는 현상으로서, 비용매 첨가종말점의 결정을 위해서 용질에 대한 용해도가 낮은 貧(poor)용매를 사용하는 것이 일반적이다. 본 실험의 용매인 물은 dextran과 같은 다당류에는 豊(good)용매로서, 비용매 첨가 종말점 결정에 어려움이 있음을 확인하였다. 이는 비용매 첨가 종말점에서 탁도가 일시적으로 유지되었다가 감소하는 false cloud point가 관찰되기 때문이다. Boyer(8)에 의하면, 貧용매가 아닌 경우에 용해된 고분자는 extended form을 취하게 되며 어느 정도 cross-linking 되기 쉬운 상태로 존재하게 된다. 이때 비용매가 첨가되면 고분자는 coil form을 형성하기 시작하며, 비용매의 비율이 높아지면서 이 coil이 좀더 강성을 띠게 된다. 그러나 이 상태에서 비용매를 급히 가하는 경우 고분자가 coil을 형성하기에 앞서 서로 유리될 충분한 시간을 갖지 못하므로, 정상적인 침전을 유도하는 separate tight coil상태를 지나쳐(overshot) coil들이 서로 뒤섞이는 상태(interwoven state)가 된다. 이 결과로 각 분별체에 저분자량대 성분이 혼재하는 현상인 tail effect가 관찰되는 것이다. 그리고 Matsumoto 등(9)에 의하면 tail effect는 분별침전의 고유한 특성이다. 따라서 豊용매를 사용한 단순분별 침전 과정에서 tail effect는 필연적인 현상으로 판단한다. Reverse order fractionation은 고분자 용액의 초기농도와 관련한 현상으로서 용액중의 solute intrinsic viscosity값이 높은 경우에 발생하게 된다. Scott(10)에 의하면, 분별횟수는 10회 정도이고 초기농도는 1(W/V)% 정도가 일반적이며 분별횟수를 증가시켜 침전체의 부피가 감소하는 경우에 고분자의 특성결정이 어려워지며 반대로 초기농도가 낮은 경우에는 침전시간이 증가한다. 또한 고분자 중합도(segment number of molecule)와 초기농도와의 관계식에서 분자량이 10,000 이상일 때 상기의 현상을 발견하고 있다. 침전횟수의 단축 및 용질농도의 일정 이상 확보라는 목적으로 수행한 변형된 단순침전법은 본래의 목적을 달성하지 못하고 있는데, 이는 Fn획득과정에 선행하는 $F_{(1+\dots+(n-1))}$ 획득이 기존의 반복침전 결과와 유사한 것으로 확인되기 때문이다. 따라서 재분별을 이용한 분별침전법이 합리적이라고 판단한다.

침전용량조사

분별침전시에 비용매 첨가량과 시료의 적정농도를 결정하기 위하여 비용매에 의한 침전 용량을 조사하였다. 고른 분자량 분포를 갖는 dextran시료의 농도 변화에 따른 침전도 실험에서는 ethanol을 비용매의 기준으로 하고 전체용액의 65%를 비용매로 하여, 상온(25℃)과 저온에서 각기 실험하였다. 실험결과, dextran농도와 침전 수율은 비례관계를 보였으며 (Table 2), 상온보다는 저온에서의 상대적으로 높은 수율을 보였다. 분별침전에서의 dextran시료의 초기 농도는 2%로 정하였다. 이를 근거로 비용매 함량에 따른 침전도를 조사하였는 바(Table 3), 저온(0℃)에서는 비용매 함량의 증가에 따라 침전수율이 증가하나, 상온(25℃)에서는 65% 이상의 비용매 함량 증가는 침전수율에 주는 영향이 작은 것으로 나타났다. 침전용량 조사의 결과로 dextran 2% 용액에 대하여 비용매 함량 85%까지 6개의 범위에서 실험을 수행하였다.

Table 2. Degree of dextran (even MWD) precipitation with different concentrations of dextrans. Nonsolvent: ethanol (65%, total content).

Dextran concentration (wt%).	0℃		25℃	
	dextran (g)	yield (%)	dextran (g)	yield (%)
1	0.0700	70.0	0.0669	66.9
2	0.1466	73.3	0.1398	69.9
3	0.2254	75.1	0.2149	71.6
6	0.3546	78.8	0.3296	73.2

Table 3. Degree of dextran (even MWD) precipitation with different contents of nonsolvent. Sample : 2 wt% dextran solution.

Ethanol content (vol.%)	0℃		25℃	
	dextran (g)	yield (%)	dextran (g)	yield (%)
60	0.1466	73.3	0.1398	69.9
65	0.1618	80.9	0.1657	82.9
70	0.1711	85.6	0.1715	85.8
75	0.1722	86.1	0.1722	86.1
80	0.1818	90.9	0.1744	87.2
85	0.1878	93.9	0.1696	84.8

재분별에 의한 분별침전

재분별에 의한 분별침전법을 이용하여 실험을 수행한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 단순 분별침전법에서의 단점으로 지적되었던 tail effect 및 reverse order fractionation현상이 극복되었다. 다만 각 fraction의 용리곡선상에서 tailing현상이 공통적으로 나타나는데 이는 dextran자체가 점성이 높고 실험상에서 설정온도조건의 유지의 문제로서, 비용매 첨가종말점과 관련한 온도조건 및 온도유지가 분별 침전결과에 영향을 주는 변수임을 증명하는 것이다.

분별침전된 Dextran의 분자량분석

단순분별침전에서 나타났던 tail effect 및 reverse order fractionation현상은 refractionation방법을 통해 개선하였으며, 평균 분자량 분석은 앞서 언급한 면적분석 방법에 의하여 오차범위 ±5% 이내에서 계산하였다. 비용매 함량에 따른 평균 분자량과의 관계를 계산하였고(Table 4), 이들의 관계를 linear fitting(Fig. 6)하여 Table 5와 같은 관계를 계산할 수 있었다. 그 결과 계수값과 유전상수에 대해 일차식이 성립되는 구간을 발견하였다. 단 isopropanol에서 나타난 결과는 다른 3가지 비용매와는 일치하지 않는데 이는 일반적으로 침전성능(precipitation power)이 높은 비용매의 경우 분별침전 과정 전반에 걸쳐 특히 연속조작의 경우에 있어서 침전체의 분리 중에 비용매가 증발하여 침전체의 재

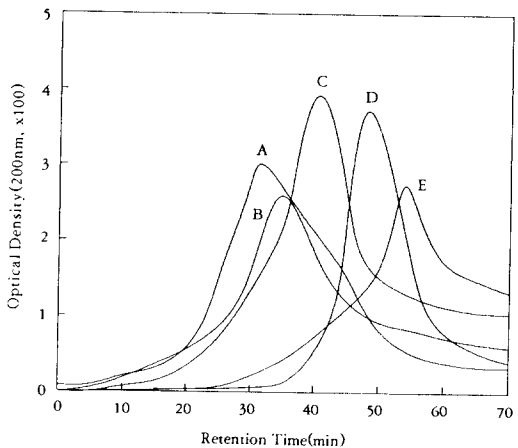


Fig. 5. Chromatograms of the fractionated dextran by the refractionation method. Nonsolvent: Methanol, Fractionation range: A(0-20), B (20-30), C(30-40), D(40-50), E(60-).

Table 4. Average logarithmic molecular weight of the fractioned dextran by refractionation method (modified).

Nonsolvent	Dielectric constant	Contents of nonsolvent(%)					
		0-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-
Methanol	32.6	5.60	5.36	4.95	4.84	4.63	4.44
Ethanol	24.3	5.60	5.35	4.90	4.80	4.64	4.35
Acetone	21.4	5.57	5.28	4.77	4.72	4.52	4.21
Isopropanol	18.4	5.52	5.19	4.66	4.53	4.41	4.08

Table 5. Linear relationships between the molecular weight of dextran(log) and the content of nonsolvents. The relationships between the coefficients and the dielectric constants of nonsolvents. ($Y=aX+b$, X:the M. W. of Dextran(log), Y:the total contents of nonsolvents(%)).

Nonsolvent	Dielectric constant	a	b
Methanol	32.6	-0.01805	5.83
Ethanol	24.3	-0.01907	5.85
Acetone	21.4	-0.01956	5.78
Isopropanol	18.4	-0.02163	5.76

용해 혹은 침전체의 증대가 발생하기 때문으로 판단된다. 이를 고려하여 3가지 비용매에서의 침전능과 유전상수(D)에 대한 관계를 선형 fitting한 결과 다음과 같은 1차식을 얻을 수 있었다. $Y=(0.1322(D)-22.34)/1,000$. 실제 Fig. 6의 실험자료들은 2차식과 같은 비선형 fitting이 더욱 적합할 것이나, 응용에 있어서 간단한 선형 fitting을 선택하였다. 이 식에 의하여 유전상수를 알고 있는 특정한 비용매를 dextran의 분별침전에 사용하고자 할 때, 얻을 수 있는 기울기 값으로부터 Table 5에 있는 일차식을 적용하여 특정 분자량대를 선택적으로 침전시킬 수 있다. 또한 이 식에 근거하여 침전시에 소요되는 비용매의 함량, 즉 절대량을 산정할 수 있을 것이다. 또한 pullulan이나 xanthan gum같은 생물고분자의 생산에 있어서 분자량의 조절은 dextran과 같이 산업화의 관건인 상황에서 본 실험과 같은 방법론적인 접근이 효율적이라고 판단한다.

요 약

본 연구는 비용매첨가법에 의한 "native" dextran의 분별침전에 관한 내용으로, 첫째, 유전상수값이 다른 비용매들에 의한 dextran의 침전 특성을 조사하였다. 둘째, dextran생산에서 분별침전 과정의 방법적인 개선을 시도하였다. 침전특성을 조사한 결과, 침전된 dextran은 비용매 함량과 일차함수관계를 보였고, 그 일차식의 기울기는 비용매의 유전상수값과 상관관계를 보이므로서, dextran의 침전을 유도하는 주요특성이 비용매의 유전상수임을 알았다. 그리고 재분별에 의한 침전방법을 원용하여 dextran의 분별침전 과정을 구성하였으며, dextran의 침전 특성 결과와 조합하여 일정한 분자량 및 분자량 분포를 갖는 dextran을 효율적으로 생산할 수 있는 근거를 마련하였다.

참고문헌

1. D. Byrom (1987), *TIBTECH*, **5**, 246.
2. M. Yalpani (1987), *Progress in Biotechnology*, Vol. 3, Elsevier, New York.
3. A. Jeanes (1976), *A. C. S. Symp. Ser.*, **45**, 284.
4. M. T. R. Cantow (1967), *Polymer Fractionation*, Academic press, New York.
5. A. M. Basedow, K. H. Ebert and H. J. Ederer

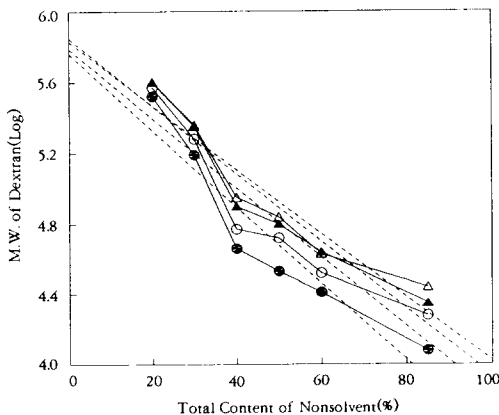


Fig. 6. Molecular weight of the fractioned dextran as a function of total content of nonsolvent. ---: Linear fitting, Nonsolvent : \triangle (methanol), \blacktriangle (ethanol), \circ (acetone), \bullet (isopropanol).

- (1978), *Macromolecules*, **11**, 4, July.
6. S. E. Sun, E. Wong (1981), *J. Chromatogr.*, **208**, 253.
 7. M. Kobayashi, H. Utsugi and K. Matsuda (1986), *Agric. Biol. Chem.*, **50**(4), 1051.
 8. R. F. Boyer (1952), *J. Polymer Sci.*, **9**, 197.
 9. S. Matsumoto and Y. Ohyanagi (1954), *Kobayashi Kagaku*, **11**, 7.
 10. R. L. Scott (1953), *Ind. Eng. & Chem.*, **45**, 2532.