멤브레인(Membrane Journal)
Vol. 17, No. 4 December, 2007, 375-380

한외여과막을 이용한 단백질 정련액으로부터 단백질 분리

김 인 철† · 이 규 호 · 박 주 영 · 정 보 름 · 권 자 영 · 이 기 훈*

한국화학연구원 신화학연구단 환경에너지연구센터, *서울대학교 바이오시스템공학부
(2007년 12월 5일 접수, 2007년 12월 28일 채택)

Separation of Protein from Degumming Solution by Ultrafiltration Membrane

In-Chul Kim†, Kew-Ho Lee, Joo-Young Park, Bo-Reum Jeong, Ja-Young Kwon, and Ki-Hoon Lee*

Advanced Chemical Technology Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, 100 Jang-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-343, Korea

*Department of Biosystems & Biomaterials Science and Engineering
(Received December 5, 2007, Accepted December 28, 2007)

요 약: 실크 생산공정 중 발생하는 부산물인 세리신을 회수하기 위하여 제조된 폴리에테르술폰 중공사 한외여과 모듈을 운전하였다. 부산물에 함유되어 있는 비누를 염화칼슘을 이용하여 침진시킨 후 침전된 비누가 함유된 세리신 용액의 침지형 및 가압형 모듈 운전 시 막오염 거동을 살펴보았다. 또한 가압형 모듈 운전 시 비누와 단백질이 막오염에 미치는 영향을 조사하였다. 비누를 제거함으로써 막오염이 줄어드는 경향을 보였다. 이로부터 비누가 침전될 때와 침전되기 전에 단백질 상호간에 영향을 끼치며 분리막에도 영향을 미침을 보여주고 있다.

Abstract: To recover sericin protein from by-product in silk production process, a polyethersulfone hollow fiber ultrafiltration membrane module was used. The soap in the degummed solution was precipitated by calcium chloride. The influence of membrane module of submerged and external type on membrane fouling was investigated. The effect of soap and protein on the membrane fouling in the external type membrane module was also studied. The removal of soap resulted in decreasing the membrane fouling. It was shown that the protein and the membrane were affected by the soap.

Keywords: *sericin protein, silk, polyethersulfone, soap, fouling*

1. 서 론

분리막 공정은 식품 산업의 분리공정에 널리 사용이 되고 있다[1-4]. 특히 낙농 분야에서는 박테리아 살균, 우유 정제 등의 공정에서 채택이 되거나 개발 중이다. 이러한 분리막 공정에서 단백질 용액이 함유된 용액에서 막오염 현상이 문제가 된다. 단백질이 막오염에 미치는 영향 및 메커니즘이 널리 연구되어 오고 있으나[5-10] 실제 공정에서는 단백질 이외의 여러 성분과의 상호관계에 의해서 많은 차이를 보이고 있다. 본 연구는 단백질 정련공정에서 함유되어 있는 단백질, 비누 등 여러 성분 중에서 단백질을 선택적으로 분리하고자 하는 것이다.

실크는 세리신과 피브로인 단백질로 이루어진 천연 단백질이다. 세리신은 실크 단백질의 20~30%를 차지하며 피브로인을 둘러싸고 있다. 세리신 단백질은 화장품 및 의약품에 사용될 수 있는 가치 있는 바이오고분자이다. 저분자량의 세리신 펩타이드나 세리신 가수분해 수용체는 피부나 두피보호를 포함한 화장품과 식품 및 의약품에 사용되며 고분자량의 세리신 펩타이드는 의약용 바이오재료, 생분해성 바이오재료, 구조용 고분자, 기능성 바이오분리막, 하이드로젤 및 기능성 섬유 등에 주로 사용된다[11]. 실크의 품질을 좌우하는 것은 생사로부터 세리신 단백질을 제거하는 정련공정이다.

†주저자(e-mail : ickim@krict.re.kr)

일반적으로 일정량의 비누용액을 첨가하고 고온에서 처리함으로써 적정량의 세리신 단백질을 제거하게 된다. 이 때 생성되는 대부분의 세리신이 매우 유용한 단백질임에도 불구하고 대부분 폐수처리를 통하여 버려지게 된다[12]. 버려지는 단백질을 회수하여 재이용한다면 경제적으로나 사회적으로 큰 이익이 될 수 있을 것이다. 세리신 정련액은 비누를 함유하고 있고 비누와 단백질이 마이셀을 형성하여 분리막을 이용하여 단백질만 선택적으로 분리가 어려우며 또한 비누가 함유되어 있을 경우 pH가 높아서 효소의 활성을 잃어버리게 된다. 효소에 의한 세리신 펩타이드를 제조하기 위해서는 단백질만 선택적으로 분리해 낼 필요가 있다.

본 연구에서는 세리신 정련액으로부터 세리신과 비누를 분리하기 위하여 염화칼슘을 이용하여 비누성분을 염석을 시키고 폴리에테르술폰 중공사 한외여과막을 제조하여 순수한 세리신 단백질을 투과시켰다.

2. 실 험

2.1. 재료 및 시약

중공사막 제조에 사용된 폴리에테르술폰(Ultrason E6020, BASF)는 사용하기 전에 80°C에서 24시간 건조하여 수분을 제거하였다. 용매로는 N,N′-dimethylacetamide (DMAc, Aldrich)를 사용하였다. 비용매로는 methyl cellosolve (2-methoxyethanol) (MC, Aldrich)를, 기공형성제로는 polyvinylpyrrolidone K-30 (PVP, Wako)을 사용하였다.

세리신 추출을 위하여 생사(raw silk)와 마르세이유 비누를 (주)홍진에서 공급받아 사용하였으며 비누 침전을 위하여 $CaCl_2$ (Junsei)를 사용하였다.

2.2. 폴리에테르술폰 중공사막의 제조 및 특성평가

도프용액을 제조하기 위하여 DMAc 57 wt.%와 MC 15 wt.%를 섞은 후, PVP 10 wt.%를 녹이고 PES 18 wt.%를 첨가하여 온도를 40°C로 유지하였다. 제조된 균일용액을 100미크론 SUS 필터로 필터한 후, 탈포하였다. 도프용액을 기어펌프로 방사노즐까지 이송시키고 내부응고욕으로는 25°C 10 wt% DMAc 수용액을 사용하여 성형하였다. Air gap은 10 cm로 고정하였고 외부응고욕은 25°C 증류수를 사용하였다. 권취속도는 4 m/min이었다. 최종 용매 제거 후 중공사막의 외경/내경비는 1.0/0.6이었다.

제조된 중공사막의 표면특성을 평가하기 위하여 FE-SEM (JEOL, Japan)을 사용하였고 분획분자량을 측정하기 위하여 고성능액체크로마토그래프(Waters, Korea)를 이용하였다. 투과성능은 막면적 70 cm^2 정도의 간이 모듈을 제조하여 흡입펌프를 사용하여 평가하였다. 흡입압력은 -70 cmHg로 고정하였다.

2.3. 세리신 추출 및 세리신 분리

생사 4 g에 물 100 g과 마르세이유 비누 0.3 g을 첨가하여 95°C에서 2시간 동안 가열하였다. 세리신과 비누가 혼합된 마이셀에서 세리신만 분리하기 위하여 염화칼슘을 1 wt.% 첨가하여 교반하였다. 혼탁한 입자들이 형성되면 교반을 중지하였다. 위에서 제조된 폴리에테르술폰 중공사막을 가압형(막면적, 1 m^2)과 침지형모듈(막면적, 70 cm^2)로 제조하여 투과성능을 살펴보았다. 가압형 모듈의 경우 중공사 내부 홀을 통하여 피드용액을 주입하였다.

세리신과 비누함량을 분석하기 위하여 혼합용액 50 mL에 1 N 황산용액 1.5 mL를 첨가하여 4시간 교반 후, 50 mL 헥산을 첨가하여 헥산에 녹아 있는 지방산과 물에 녹아 있는 세리신을 분별깔대기를 이용하여 분리하여 건조함으로서 농도를 측정하였다. 또한 세리신 농도의 정확성을 위하여 UV 분광도계(Mecasys, Korea)를 이용하였다. 세리신 용액을 10배 희석한 후, 파장 280 nm에서의 흡광도를 측정하여(흡광도/0.79) 농도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 폴리에테르술폰 중공사막 제조

일반적으로 상전환법에 의한 중공사막의 기공크기를 조절하기 위하여 도프용액 내에 적절한 비용매를 첨가하는 방법이 있다. 도프용액의 온도, 외부 및 내부응고욕의 변화, 권취속도 등 다양한 방법이 사용될 수 있지만 도프용액 내의 비용매의 변화를 통하여 용이하게 기공크기가 조절되는 것이다. 본 연구에서는 MC를 사용하였다. 사용되는 고분자마다 기공크기를 조절할 수 있는 비용매가 다르며 폴리에테르술폰에는 MC가 적절하였다. 폴리에테르술폰의 농도는 18 wt%로 고정하였다. Table 1은 MC와 PVP의 변화에 따른 투과유량과 분획

Table 1. Effect of Additives on Membrane Performance

MC (wt%)	PVP (wt%)	Flux (L/m^{2}hr)	MWCO (Da)
0	0	62	50,000
0	5	78	100,000
0	10	150	300,000
5	0	85	100,000
10	0	92	100,000
20	0	120	200,000
20	10	350	1,000,000

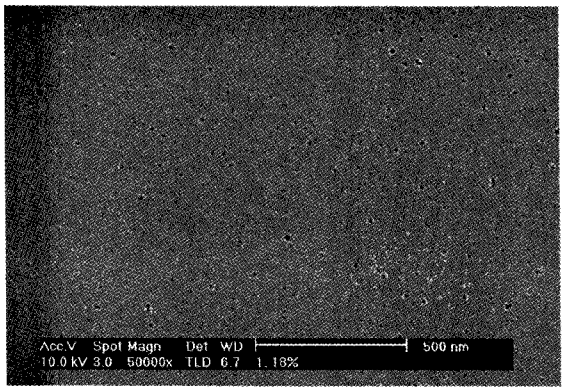


Fig. 1. SEM photographs of PES membrane.

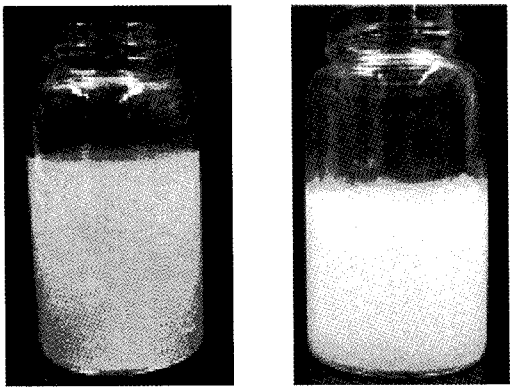
분자량을 나타낸 것이다. 투과유량은 40°C에서 측정하였다. MC의 함량을 증가시킬수록 기공이 커지는 것을 확인할 수 있다. MC와 PVP 각각은 기공크기를 증가시키는데 기여를 하여 두 물질을 동시에 사용했을 때 상승효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다. Fig. 1은 세리신 분리를 위해서 사용된 중공사막의 SEM 표면사진을 나타낸 것이다. 본 연구에서는 분획분자량 200,000의 한외여과막을 사용하였다. 정밀여과막을 사용할 경우에는 단백질의 투과되는 수율이 높지만 단백질의 분자량이 높아 용해도가 떨어지고 쉽게 침전되는 경향이 있다. 이에 분획분자량을 낮추어 분자량이 큰 단백질은 제거하고 분자량이 작은 단백질은 투과시켰다.

3.2. 분리막에 의한 세리신 분리

실크의 품질을 높이기 위해서는 약 50~70% 정도의 세리신을 제거해야 한다. 비누를 첨가하지 않고 세리신을 추출할 경우에는 추출되는 양이 적기 때문에 정련과정에서 비누 성분을 첨가하게 된다. Table 2는 마르세이유 비누의 농도변화에 따른 추출된 세리신의 양을 나타낸 것이다. 본 연구에서는 마르세이유 비누를 약

Table 2. Effect of Soap Concentration on Amount of Extracted Sericin

Soap (wt%)	Sericin (wt%)
0.1	1.59
0.3	3.81
0.5	4.15



(a) (b)

Fig. 2. Photographs of (a) solution of sericin / soap and (b) solution of sericin / soap / $CaCl_2$.

0.3% 첨가하여 정련을 실시하였다. 단백질의 올리고펩타이드화를 위한 효소반응을 위해서는 중성의 pH 조건이 필요하다. 단백질 용액 내에 비누성분이 과량 존재할 경우 pH가 높아져서 효소가 비활성을 갖는다. 본 연구에서는 비누를 제거하기 위하여 2가의 양이온을 갖는 염화칼슘을 사용하였다. 마르세이유 비누는 40°C 이하에서 용해도가 감소하여 불투명해지므로 비누가 함유된 용액은 40°C를 유지하였다. Fig. 2는 염화칼슘에 의해 염석된 세리신/비누 용액과 염석되기 전 용액의 사진을 나타낸 것이다. 비누를 사용하여 추출된 세리신 용액에 염화칼슘을 첨가하게 되면 하얀색의 입자들이 형성되어 분산되어 있는 것을 확인할 수 있었다. Table 3은 염화칼슘의 농도에 따른 용액의 pH와 단백질 및 마르세이유 비누의 함량을 나타낸 것이다. 염화칼슘의 농도가 증가할수록 pH가 중성에 가까워지며 용액 내에서의 단백질 농도에는 거의 영향을 주지 않고 비누농도만 선택적으로 감소하는 것을 확인할 수 있다. 즉, 마르세이유 비누에 존재하는 카르복시산과 칼슘이온이 이온결합하여 마르세이유 비누의 용해도를 감소시켜 염석이 일어나는 것으로 사료된다.

한외여과막에 의한 비누 성분의 분리 정도를 살펴보

Table 3. Effect of Calcium Chloride on Soap Removal

$CaCl_2$ (wt%)	pH	Sericin (wt%)	Soap (wt%)
0	10.51	3.86	0.3
0.015	9.85	3.82	0.21
0.03	9.14	3.79	0.13
0.045	8.23	3.81	0.05
0.06	7.60	3.83	0.01
0.07	7.65	3.81	0.01

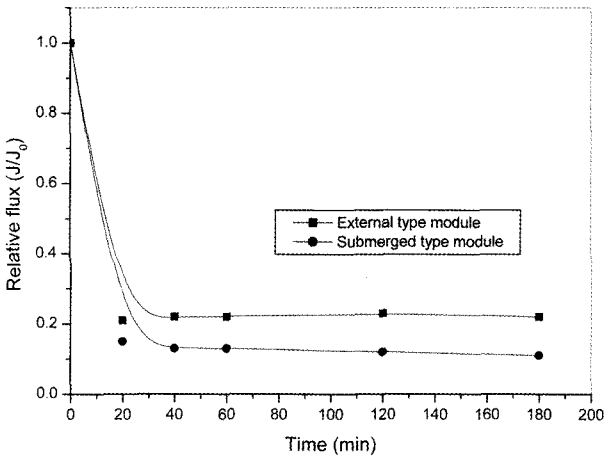


Fig. 3. Comparison of membrane modules for separation of sericin in sericin solution containing precipitated soap.

기 위하여 세리신/비누/염화칼슘 용액으로 비누를 염속시킨 후에 침지형과 가압형 모듈을 이용하여 투과성능을 살펴보았다. 또한 가압형 모듈의 경우는 염화칼슘을 첨가하기 전의 세리신/비누 혼합용액을 이용하여서 투과성능을 살펴보고 염화칼슘에 의한 염석이 투과성능에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 3은 염화칼슘으로 세리신/비누용액을 염석시킨 후의 투과성능을 살펴본 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 가압형 모듈을 이용하여 염석용액을 투과시킨 경우가 침지형 모듈을 이용하여 운전한 경우보다 상대적 투과유량 감소율이 적은 것을 알 수 있다. 일반적으로 침지형 분리막 모듈의 경우 특히 분리막결합형 활성슬러지법의 경우 하단에서 공기방울을 주입하여 막표면의 오염층을 줄여 막오염을 줄이는 운전을 많이 선택한다. 하지만, 단백질과 비누성분은 공기방울을 주입할 경우 거품이 발생하여 운전이 불가하다. 본 연구에서는 공기방울의 주입 없이 흡입하여 운전하였다. 가압형모듈의 경우 피드용액의 흐름에 의해서 분리막 표면에 흡착되는 단백질과 염석된 입자의 농도분극층이 감소하여 막오염이 줄어드는

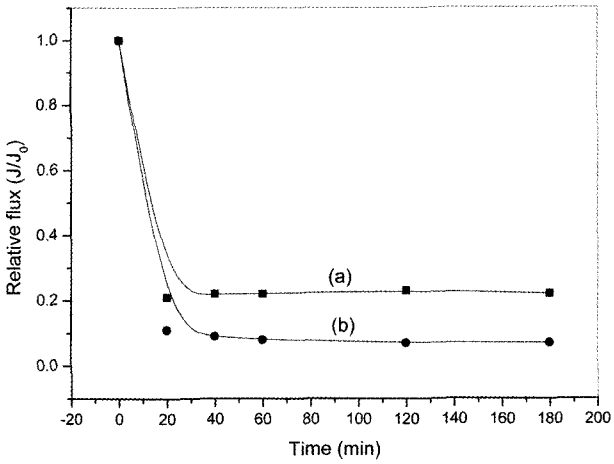


Fig. 4. Effect of soap precipitation on membrane performance: (a) sericin solution containing precipitated soap and (b) sericin solution containing soap.

것으로 사료된다. 피드용액의 단백질 함량은 3.7 wt%이고 염석 후, 비누함량은 0.01 wt% 이하이며 pH는 7.1로 측정되었다. 투과된 용액의 단백질 함량과 비누함량을 측정한 결과 침지형의 경우는 2.12 wt%이고 가압형의 경우는 1.59 wt%로 측정되었다. 두 모듈 모두 투과된 용액에서 비누는 측정이 되지 않았으며 pH는 7.0~7.3으로 유지되었다. 침지형 모듈과 가압형 모듈의 투과된 용액 내에서의 단백질 농도에서 차이를 보이는 이유는 침지형 모듈의 경우 농도분극이 심하게 일어나고 막표면에서의 단백질 농도가 가압형 모듈보다 높으므로 투과되어 나오는 단백질의 함량도 높아지는 것으로 사료된다.

Fig. 4는 Fig. 3의 결과를 바탕으로 가압형 모듈을 선정하고 염화칼슘에 의한 염석이 막성능에 미치는 영향을 살펴본 것이다. 즉, 가압형 모듈을 이용하여 세리신/비누 혼합용액과 세리신/비누/염화칼슘 혼합용액을 운전하여 투과성능을 살펴보았다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 염화칼슘에 의하여 염석을 시킨 용액이 막오염이 적게 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 세리신과 비누 및 염석된 입자들 모두 막오염에 영향을 미친다. 염화칼슘에 의하여 염석을 시킨 용액이 막오염을 적게 발생시키는 것은 비누 성분이 분리막 표면 및 기공 내부에 흡착을 일으키고 흡착된 비누성분이 단백질의 흡착을 가속화시키기 때문으로 사료된다. 염화칼슘에 의하여 염석된 입자들은 기공 내부로 기공폐쇄를 시키지는 못하고 표면에서만 기공을 막으므로 막오염에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 여겨진다. 염석을 시키지 않

Table 4. Rejection Rate of Sericin, Soap and Mixture Solution by PES Membrane

Solution		Rejection rate (%)
Pure sericin		35
Pure soap		10
Mixture	Sericin	47
	Soap	30

은 세리신/비누 용액은 pH가 약 10.8 정도 되며 투과된 비누용액의 pH는 약 8.7로서 약간 감소한다. 즉 비누성분이 세리신과 마이셀을 형성하여 투과되지 못하고 또한 분리막 표면 및 기공 내부에 흡착되어 제거되기 때문일 것이다. 실제 비누성분의 제거율은 약 30% 정도로 측정되었다.

Table 4는 위에서 나온 결과를 검증하기 위하여 본 연구에서 사용된 한외여과막을 이용하여 세리신 단백질과 비누성분 단독으로 운전할 경우의 제거율과 세리신/비누 혼합용액을 사용했을 경우의 제거율을 나타낸 것이다. 세리신 단백질은 분자량이 수만~수십만 사이에서 존재하며 분획분자량 200,000의 폴리에테르술폰 중공사막을 이용하여 운전할 경우 약 35%의 제거율을 보였다. 비누성분의 경우는 분자량이 수백으로서 이론상으로는 제거가 안 되어야 하지만 본 연구에서는 약 10%의 제거를 보였다. 즉, 분리막 표면 및 기공 내부에 강하게 흡착이 일어난 것으로 보인다. 세리신/비누 혼합용액을 이용하여 운전할 경우에는 세리신 단백질 제거율이 47%이고 비누성분의 제거율은 약 30% 정도이다. 이는 비누성분이 세리신과 마이셀을 형성하여 세리신 단백질 단독으로 운전 시 투과되었던 부분들이 분자량이 커지고 분자 크기가 커지기 때문에 분리막에 의해서 제거되는 것으로 사료된다.

4. 결 론

실크 정련공정에서 생산되는 부산물을 분리막 공정을 이용함으로써 유용한 단백질인 세리신의 회수가 가능하였다. 사용된 분리막은 폴리에테르술폰 중공사 한외여과막이었으며 고분자 용액에 첨가제를 사용하여 분획분자량 200,000으로 맞출 수 있었다. 단백질의 추출률을 높이기 위해 사용된 비누성분을 염화칼슘을 이용하여 염석시킴으로서 거의 완전한 제거가 가능하였고 pH도 중성으로 낮출 수 있었다. 고분자량의 세리신 단백질은 제거되었고 대부분의 비누도 제거되었다. 침지형과 가압형 모듈을 이용하여 염석된 단백질 용액을 운전한 결과 가압형 모듈에서 막오염이 적게 발생하였다. 또한 가압형 모듈에서 비누를 염석시킴으로써 더 높은 투과율을 얻을 수 있었다.

감 사

본 연구는 환경부 차세대 핵심환경기술개발사업의 지원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. D. H. Son, H. J. Jun, Y. H. Lee, J. K. Koo, N. J. Cho, and D. I. Jang, "Separation and purification of lysozyme from chicken eggwhite through ultrafiltration", *Membrane J.*, **15**(2), 121 (2005).
2. F. Beolchini, F. Veglio, and D. Barba, "Microfiltration of bovine and ovine milk for the reduction of microbial content in a tubular membane: a preliminary investigation", *Desalination,* **161**, 251 (2004).
3. S. A. M. Mourousis and A. J. Karabelas, "Whey protein fouling of microfiltration ceramic membranes-pressure effects", *J. Membr. Sci.*, **282**, 124 (2006).
4. M. Cheryan, "Ultrafiltration and Microfiltration Handbook", pp. 349-368, Technomic, Lancaster (1998).
5. A. D. Marshall, P. A. Munro, and G. Tragardh, "The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity: a literature review", *Desalination*, **91**, 65 (1993).
6. S. T. Kelly and A. L. Zydney, "Protein fouling during microfiltration: comparative behavior of different model proteins", *Biotechnol. Bioeng.*, **55**(1), 91 (1997).
7. C. Herrero, P. Pradanos, J. I. Calvo, F. Tejerina, and A. Hernadez, "Flux decline in protein microfiltration: influence of operative parameters", *J. Colloid Interface Sci.*, **187**, 344 (1997).

8. C. Velasco, M. Ouammou, J. I. Calvo, and A. Hernadez, "Protein fouling in microfiltration: deposition mechanism as a function of pressure for different pH", *J. Membr. Sci.*, **266**, 148 (2003).
9. C.-C. Ho and A. L. Zydney, "A combined pore blockage and cake filtration model for protein fouling during microfiltration", *J. Colloid Interface Sci.*, **232**, 389 (2000).
10. C. C. Ho and A. L. Zydney, "Protein fouling of asymmetric and composite microfiltration membranes", *Ind. Eng. Chem. Res.*, **40**, 1412 (2001).
11. Y. Q. Zhang, "Applications of natural silk protein sericin in biomaterials", *Biotech. Advances*, **20**, 91 (2002).
12. C. Fabiani, M. Pizzichini, M. Spadoni, and G. Zeddita, "Treatment of waste water from silk degumming processes for protein recovery and water reuse", *Desalination*, **105**, 1 (1996).