

분리막을 이용한 단백질 가수분해 용액의 탈염

김인철[†]·권자영·박주영·정보름·이기훈*

한국화학연구원 신화학연구원 환경에너지연구센터, *서울대학교 바이오시스템공학부
(2008년 11월 18일 접수, 2009년 5월 11일 수정, 2009년 6월 22일 채택)

Removal of Salts from Hydrolyzed Protein Solution by Membrane

In-Chul Kim[†], Ja-Young Kwon, Joo-Young Park, Bo-Reum Jeong, 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 Engineering, Seoul National University, 599 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea

(Received November 18, 2008, Revised May 11, 2009, Accepted June 22, 2009)

요약: 본 연구의 목적은 나노복합막을 제조하여 가수분해된 세리신 용액에 함유되어 있는 염의 제거 거동을 살펴보는 것이다. 계면중합법으로 나노복합막을 제조하고 상용화되어 있는 나노복합막과 탈염 거동을 비교하였다. 세리신 용액은 단백질 분해효소에 의해서 분해하여 저분자화하였고 전기영동에 의해 분자량 분포를 살펴보았다. 상대투과유량을 조사하여 나노복합막의 막오염 정도를 살펴보았다. 기공크기가 큰 나노복합막이 탈염에 효율적인 것을 확인하였다.

Abstract: The aim of this paper is to investigate removal of salts in hydrolyzed sericin solution by a prepared nanofiltration membrane. The nanofiltration membrane was prepared by the interfacial polymerization method, and then compared with commercialized nanofiltration membrane in terms of salts removal. The sericin solution was hydrolyzed by a protease. The molecular weight distribution of the hydrolyzed sericin was determined by electrophoresis method. Relative flux measurements were carried out to investigate membrane fouling.

Keywords: hydrolyzed sericin, nanofiltration membrane, interfacial, protease, fouling

1. 서론

실크단백질은 필라멘트를 구성하는 피브로인과 피브로인을 둘러싸고 있는 또 하나의 단백질인 세리신으로 구성되어 있다. 섬유로서 실크의 사용에 있어 외부 둘러싸고 있는 단백질인 세리신은 정련과정에서 제거가 되고 내부의 피브로인만이 이용되고 있다. 그러므로 정련과정에서 제거되는 세리신은 환경오염뿐만 아니라 자원의 재활용 측면에서 사용이 요구되고 있다. 또한 세리신 단백질의 생체 적합성, 생분해성 등이 밝혀짐으로써 이에 대한 이용이 기대되고 있다[1,2].

최근 저분자 세리신 단백질을 각종 단백질 분해 효소

등을 촉매로 하여 가수분해를 통해 얻고자 하는 연구들이 활발히 진행되고 있으며 이처럼 효소가 산업에 적극적으로 이용되고 있는 것은 여러 가지 면에서 장점을 가지고 있기 때문이다. 그 첫째는 효소가 자연산물이기 때문에 생분해되며, 중성에 가까운 pH에서 반응하므로 화학약품과는 달리 그 처리액이 환경문제를 유발하지 않는다는 것이다. 둘째로 효소는 기질특이성을 가지고 있어서 매우 선택적으로 반응하므로 부반응으로 인한 섬유 손상이 적다는 것이다. 마지막으로, 효소는 촉매물질로 반응에 참가하기 때문에 소량으로도 그 효과를 볼 수 있으며 반응속도가 빨라 처리시간이 단축될 뿐만 아니라 화학반응보다 저온에서 반응하므로 에너지 절약에도 기여한다고 할 수 있다는 점이다[3,4].

따라서 본 연구에서는 세리신 단백질을 분해하기 위

[†]주저자(e-mail : ickim@kRICT.re.kr)

해 반복적 사용이 가능하고, 생성물과 효소의 분리가 용이하여 효소의 단점을 극복할 수 있는 고정화 효소를 이용하여 세리신 용액을 분해하고자 하였다.

세리신 단백질은 온도, 용매 등의 작용으로 인하여 변성되기 쉬우며 물에 대한 용해도가 높지 않아 응집이 발생하여 보관 안정성과 정제가 힘들다. 따라서 저농도의 염을 첨가하여 단백질의 물에 대한 용해도를 증가하고자 하였다. 그러나 세리신의 용해도를 증가시키기 위하여 사용된 염은 최종 생성물로부터 제거되어야 하며 탈염 방법으로는 분리막, 전기 투석법, 겔 여과장치 등의 여러 가지 방법이 있다[5-12].

본 연구에서는 분리막을 사용하여 세리신 용액으로부터 염을 제거하고자 하였으며 2가 이온에 대해서는 90% 이상의 높은 염 배제율과 1가 이온에 대해서도 40% 이상의 비교적 넓은 범위의 배제율을 지니고 있는 나노복합막을 제조하여 효율적인 탈염을 이루고자 하였다[13-15].

2. 실험

2.1. 재료 및 시약

단백질 가수분해를 위하여 (주) 흥진에서 공급받은 생사(raw silk)에서 세리신 단백질을 추출하였다. 단백질 가수분해는 단백질 분해효소 트립신(Sigma)을 사용하였다. 단백질 용해도를 높이기 위해 Na_2CO_3 (Junsei)를 사용하였고 중화를 위해 1 M HCl (Junsei)를 사용하였다. 나노복합막을 제조하기 위해 단량체로는 piperazine (PIP, Aldrich)과 trimesoyl chloride (TMC, Aldrich)를 사용하였고 계면중합시 발생하는 산을 중화시키기 위해 triethylamine (TEA, Aldrich)을 사용하였다. TMC는 ISOL-C (SK-Chemical, Korea)에 용해하였다. 계면중합을 위한 지지체를 제조하기 위해 부직포(SANCO, Japan) 위에 polysulfone (PSf, Udel-P 3500, Amoco)과 dimethylformamide (DMF, Aldrich) 혼합용액을 도포하였다. 단백질 가수분해 용액의 탈염을 위해 NE-70 (WoongJin Chem, Korea), NF-270 (Filmtec, USA)과 직접 제조된 나노복합막을 사용하였다.

2.2. 나노복합막 제조

수용액으로는 PIP와 TEA를 3차 증류수에 녹여 사용하였고, 유기용액으로는 TMC를 ISOL-C에 녹여서 사용하였다. 기공크기를 제어하기 위해 PIP와 TMC 농도

를 변화시켰다. PIP 1 wt%, TMC 0.05 wt% (NF-1)과 PIP 0.5 wt%, TMC 0.025 wt% (NF-2)를 제조하였다.

PSf/DMF (18/82 wt/wt%) 용액을 부직포(SANCO, Japan) 위에 150 μm 두께의 casting knife로 도포한 후, 3차 증류수에 응고시켜서 지지체를 제조하였다. 제조된 지지체 위에 수용액을 1분간 침지한 후, 롤러를 사용하여 표면에 남아있는 용액을 제거하고 유기용액에 1분간 침지하여 나노복합막을 제조하였다.

2.3. 세리신 가수분해 용액 제조

생사 4 g을 3차 증류수 100 g에 첨가한 후, 95°C에서 3시간동안 가열하여 세리신을 추출하였다. 추출된 세리신 용액의 응축현상을 해결하기 위해 용액 내에 Na_2CO_3 1 wt%를 첨가한 후, 단백질 분해효소인 트립신의 활성조건을 위해 1 M HCl로 적정하여 pH를 6~8로 조절하였다. 그 후, 트립신을 첨가하여 상온에서 12시간동안 반응시켜 세리신 가수분해 용액을 제조하였다. 세리신의 분자량은 전기영동(HTTO, Japan)법을 사용하였다.

2.4. 탈염

단백질 가수분해 용액 내에 함유되어 있는 1 wt%의 Na_2CO_3 제거를 위해 나노복합막을 사용하였다. 압력은 100 psi, 유량은 3 L/min, 온도는 25°C로 유지하였다. 사용된 막면적은 18 cm^2 이었다. 염의 제거율은 전도도계(LaMotte, USA)를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 나노복합막 제조

계면중합법에 의한 폴리아미드 나노복합막을 제조하였다. 사용된 PSf 지지체의 분획분자량은 poly(ethylene glycol) 100,000이었다. 단량체 농도를 변화시키면서 염 제거 특성을 살펴보았다. 사용된 염들의 농도는 1 wt%로 고정하였다. Table 1에 결과를 나타내었다. SO_4^{2-} 와 CO_3^{2-} 같은 2가 음이온을 함유하는 염들(MgSO_4 , Na_2CO_3)은 폴리아미드 나노복합막 표면의 카르복시산과의 강한 반발력에 의해서 높은 제거율을 나타내었다. NE-70과 제조된 나노복합막의 경우 2가 양이온과 1가 음이온을 함유하는 염(CaCl_2)은 1가 양이온과 1가 음이온을 함유하는 염(NaCl)에 비해서 더 많이 제거되었다. 반면에 NF-270의 경우는 반대의 경우에 해당된다. 이러한 현상은 도난 평형에 의해서 설명이 될 수 있다. NF-270의

Table 1. Removal Efficiencies of Nanofiltration Membranes

Nanofiltration membranes	Salt rejection rate (%)			
	MgSO ₄	NaCl	CaCl ₂	Na ₂ CO ₃
NF-270	98.8	74.3	43.1	97.1
NE-70	98.8	62.1	76.3	96.3
NF-1	97.6	42.3	72.8	95.4
NF-2	72.3	12.3	21.6	65.9

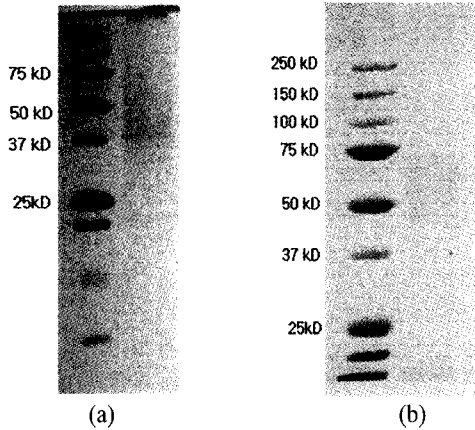


Fig. 1. Photograph of electrophoresis of precipitated sericin. (a) sericin, (b) sericin + trypsin.

경우 다른 막들에 비해서 막 표면의 카르복시산에 의한 음전하가 크기 때문에 2가 양이온인 Ca²⁺가 막을 통해서 투과되는 속도가 더 크므로 NaCl이 CaCl₂보다 높은 제거율을 갖는다[16]. 단량체의 농도를 줄임으로써 염의 제거율을 낮출 수 있었다. 특히 Na₂CO₃의 제거율을 크게 낮출 수 있었다. 본 연구의 경우 세리신 용액을 용해시키기 위하여 Na₂CO₃을 사용한다. 일반적인 2가 양이온의 제거율이 높은 나노복합막을 사용할 경우, 본 연구에서와 같이 CO₃²⁻같은 2가 음이온의 제거가 어렵기 때문에 2가 양이온의 제거율이 낮은 나노복합막이 필요하게 된다.

3.2. 가수분해된 세리신 용액의 염 투과 거동

일반적으로 단백질은 물에 대한 용해도가 높지 않아서 작은 변화(온도, 유기용매 등)에도 응집이 발생한다. 응집이 발생할 경우 단백질 분해효소에 의한 분해가 어려워진다. 이러한 현상을 줄이기 위하여 염을 첨가하게 된다. 본 연구에서는 단백질 분해효소인 트립신을 이용하여 세리신의 분해 실험을 한 결과 세리신이 분해되면서 단백질의 소수성 그룹이 물 쪽으로 노출되면 용해도가 감소하고 응집이 일어나는 것을 확인하였다. Fig. 1은 응집된 세리신의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

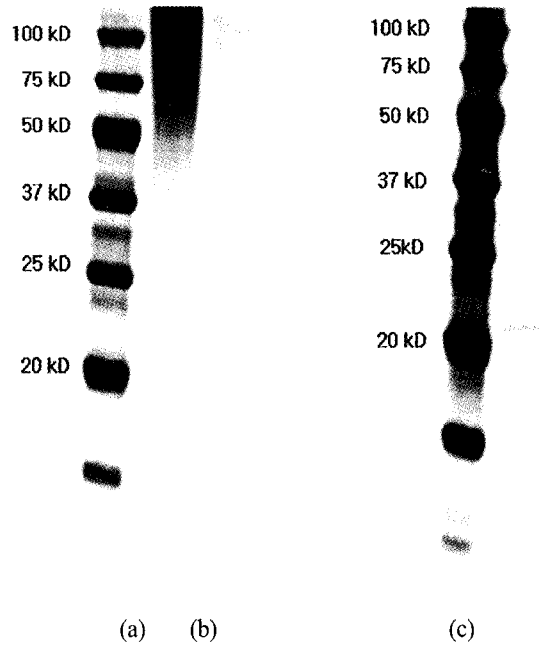
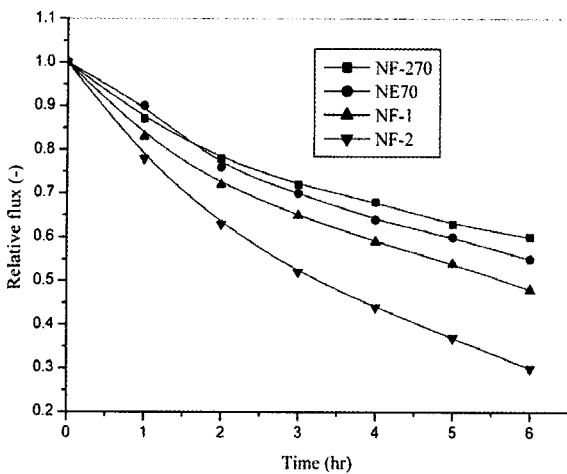


Fig. 2. Photograph of electrophoresis of dissolved sericin. (a) sericin, (b) sericin + Na₂CO₃ + HCl, (c) sericin + Na₂CO₃ + HCl + trypsin.

전기영동은 15% gel 농도에서 시행된 것으로 전기영동의 결과 세리신은 넓은 범위의 분자량 대 분포를 보이는 것을 알 수 있다. 이러한 결과로부터 세리신은 어떤 특정적인 하나의 단백질로 구성된 것이 아니라 다양한 단백질 군으로 형성되어 있음을 확인할 수 있다. 또한, 단백질 분해효소인 트립신을 첨가하였음에도 불구하고 단백질 분해효소에 의해 단백질 분해가 많이 일어나지 않은 것을 알 수 있다. 시간이 경과함에 따라 단백질 용액내에 단백질의 고형화가 일어나서 트립신에 의한 단백질 분해가 어려워졌기 때문으로 사료된다. 단백질의 용해도를 높이기 위한 염석 현상에 최적의 염을 조사한 결과 Na₂CO₃나 K₂CO₃가 적당한 것을 확인하였다. 이러한 염들을 사용할 경우, 단백질 분해효소에 의한 응집 현상이 일어나지 않는다. 그러나 이러한 염들은 약한 염기(pH 11)를 띠기 때문에 단백질 분해효소를 사용할 경우 효소의 변성이 발생하여 활성화를 잃게 된다. 따라서 산을 이용하여 중화를 해주어야 한다. 일반적으로 강염기를 사용할 경우 단백질의 무작위 분해가 일어나기 때문에 본 연구에서는 약염기를 사용하였다. 단백질의 분자량을 조사한 결과 분자량에 큰 변화를 보이지 않았다. Fig. 2는 Na₂CO₃ 첨가 후, 단백질 분해효소에 의해 분해된 세리신의 전기영동과 단백질 분해효소를 사용하기 전의 결과를 나타낸 것이다. 수단 정도

Table 2. Salt Removal Property of Mixed Salts

Nanofiltration membranes	Salt rejection rate (%)	
	Na ₂ CO ₃ + HCl	sericin + Na ₂ CO ₃ + HCl
NF-270	75.2	81.1
NE-70	81.0	85.5
NF-1	61.3	71.5
NF-2	23.1	39.9

**Fig. 3.** Relative Flux of Nanofiltration Membranes, 100 mg/L; Feed Pressure, 100 psi; Feed Flow Rate, 3 L/min; Temperature, 25°C.

의 분자량을 갖는 피크가 발견되지 않았다. 제조된 저분자량의 세리신과 염이 함유된 용액에 나노여과를 실시하여 염을 제거하였다. Table 2는 Na₂CO₃를 HCl로 중화시킨 용액과 실제 가수분해된 세리신 용액의 염 제거 거동을 나타낸 것이다. 모든 나노복합막에서 Na₂CO₃ 단독의 염 제거율에 비해 HCl에 의해 중화된 혼합용액에서 염 제거율이 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 나노여과를 할 경우 CO₃²⁻ 이온은 도난 평형에 의해 분리막 표면의 농도분극층에서 멀어지고 상대적으로 Na⁺, H⁺ 및 Cl⁻ 이온들은 분리막 표면에서 가까워지게 된다. 이온크기가 작고 분리막 표면의 하전과 반대인 양이온들의 투과속도가 커지고 이에 따라 이온평형을 맞추기 위하여 CO₃²⁻ 이온의 투과속도도 단일염으로 존재할 때보다도 증가하게 되는 것으로 사료된다. NF-270이나 NE-70보다도 상대적으로 기공크기가 큰 NF-1과 NF-2 나노복합막의 경우가 염 제거율이 더 크게 감소하는 것을 확인할 수 있다. 1가 이온들의 투과속도가 훨씬 크기 때문에 이온평형을 맞추기 위한 CO₃²⁻ 이온의 투과속도가 더 커지게 되는 것으로 사료된다.

가수분해된 세리신 용액에 함유되어 있는 이온들의 제거율의 경우 세리신 용액이 함유되지 않은 용액에 비해서 더 높아지게 된다. 이것은 가수분해된 세리신이 막오염을 일으키고 기공크기를 줄이기 때문으로 사료된다. 또한 기공크기가 큰 NF-2의 경우 막오염이 더 심하게 일어나고 상대적으로 기공이 더 작아지기 때문에 염 제거 증가율이 더 높아지게 된다. Fig. 3은 나노복합막들의 상대투과속도를 나타낸 것이다. 기공크기가 가장 큰 NF-2의 경우가 막오염이 가장 심한 것으로 나타나고 있다. Fig. 3은 기공크기의 관점에서 막오염 현상을 보고 있지만 다음 논문에서는 표면특성 및 구조적 차이에 의한 해석을 통하여 막오염 현상을 구체적으로 규명해 나갈 필요가 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 나노복합막을 이용하여 가수분해된 세리신에 함유되어 있는 염을 제거할 수 있는 가능성을 살펴보았다. 나노복합막은 계면중합법에 의하여 제조되었다. 함유되어 있는 혼합염과 세리신에서 염의 제거 거동을 살펴보았다. 혼합되어 있는 염이 단일 염에 비해서 낮은 제거율을 나타내었다. 상용화되어 있는 나노복합막의 경우는 2가 양이온의 제거율이 높아서 탈염에 적합하지 않았다. 2가 양이온의 제거율을 낮추기 위하여 제조된 폴리아미드 나노복합막을 사용하여 효율적인 염 제거가 이루어졌다. 기공이 큰 나노복합막이 가수분해된 세리신에 의해 막오염이 심하게 발생하는 것을 확인하였다.

감 사

본 연구는 환경부 차세대 핵심환경기술개발사업의 지원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. C. Fabiani, M. Pissichini, M. Spadoni, and G. Zeddita, "Treatment of waste water from silk degumming processes for protein recovery and water reuse", *Desalination*, **105**, 1 (1995).
2. J. H. Wu, Z. Wang, and S. Y. Xu, "Preparation and characterization of serici powder extracted

- from silk industry wastewater”, *Food Chem.*, **103**, 1255 (2007).
3. G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, and D. L. Kaplan, “Silk-based bionaterials”, *Biomaterials*, **24**, 401 (2003).
 4. R. B. Bhatia and C. J. Brinker, “Aqueous Sol-Gel process for protein encapsulation”, *Chem. Mater.*, **12**, 2434 (2000).
 5. L. Copolovici and U. Niinemets, “Salting-in and salting-out effects of ionic and neutral osmotica on limonene and linalool Henry’s law contents and octanol/water partition coefficients”, *Chemosphere*, **69**, 621 (2007).
 6. M. Alaei, R. Whital, and M. Strachan, “The effect of water temperature and composition on Henry’s law constant for various PAH’s”, *Chemosphere*, **32**, 1153 (1996).
 7. J. Art, M. Chelkowska, K. Kasiura, and P. Pietrzykowski, “The fatty acids as penetration enhancers of amino acids by ion pairing”, *In. J. Cosmetic. Sci.*, **24**, 313 (2002).
 8. Y. Lee, “Silk Reeling and Sericulture”, *FAO Agricultural Services Bulletin*, **136**, 1 (2005).
 9. J. Y. Jang, Y. S. Chung, Y. M. Lee, and S. Y. Nam, “Preparation and Properties of Membranes for the Application of Desalting, Refining and Concentration for Dye Processing”, *Membrane Journal*, **16**, 213 (2006).
 10. D. H. Son, Y. H. Lee, J. K. Koo, N. J. Cho, and D. I. Jang, “Effect of Electrical Field on Ultrafiltration for Protein Separation”, *Membrane Journal*, **15**, 132 (2005).
 11. D. H. Son, H. J. Jun, Y. H. Lee, J. K. Koo, N. J. Cho, and D. L. Jang, “Separation and Purification of Lysozyme from Chicken Eggwhite Through Ultrafiltration”, *Membrane Journal*, **15**, 121 (2005).
 12. I. C. Kim, K. H. Lee, J. Y. Park, B. R. Jeong, J. Y. Kwon, and K. H. Lee, “Separation of Protein from Degumming Solution By Ultrafiltration Membrane”, *Membrane Journal*, **17**, 375 (2007).
 13. J. Wang, D. Qu, M. Tie, H. Ren, X. Peng, and Z. Luan, “Effect of coagulation pretreatment on membrane distillation process for desalination of recirculating cooling water”, *Separation and Purification Technology*, **64**, 108 (2008).
 14. J. Belal, D. Abutarboush, T. Matsuura, H. A. Arafat, and R. M. Narbaitz, “Preparation of thin-film-composite polyamide membranes for desalination using novel hydrophilic surface modifying macromolecules”, *Journal of Membrane Science*, **325**, 166 (2008).
 15. A. S. Jonsson, A. K. Nordin, and O. Wallberg, “Concentration and purification of lignin in hardwood kraft pulping liquor by ultrafiltration and nanofiltration”, *Chemical Engineering Research and Design*, **86**, 1271 (2008).
 16. I. C. Kim, I. H. Choi, B. R. Min, and K. H. Lee, “Investigation of photocatalytic process on removal of natural organic matter in nanofiltration process”, *Membrane Journal*, **17**, 375 (2007).