

IgY (Immunoglobulin Yolk) 분리를 위한 3-영역 SMB (Simulated Moving Bed)와 4-영역 SMB 비교전산모사

윤상희 · 김인호[†]

충남대학교 화학공학과
305-764 대전시 유성구 궁동 220
(2012년 2월 29일 접수, 2012년 7월 10일 채택)

Comparative Simulation of 3-zone SMB (Simulated Moving Bed) and 4-zone SMB for IgY (Immunoglobulin Yolk) Purification

Sang Hee Yun and In Ho Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea
(Received 29 February 2012; accepted 10 July 2012)

요 약

난황에 포함된 IgY는 포유동물에 있는 바이러스나 항원에 반응하는 항체와 같은 역할을 한다. 난황을 전처리한 후 3-zone와 4-zone SMB를 이용하여 지질단백질들로부터 IgY를 분리하는 전산모사연구를 수행하였다. 회분식 크로마토그래피에서 전산모사 매개변수와 흡착 등온식 SMB 전산모사 변수를 얻었다. Aspen simulator를 이용하여 전산모사를 수행하여 IgY를 분리할 수 있는 3-zone과 4-zone SMB 운전조건을 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다. IgY와 다른 단백질의 농도와 순도를 모두 고려할 때, 꼭지점인 좌표($m_2, m_3=0.1, 1.1$)에서 3-zone SMB가 최적의 조건으로 생각된다. IgY 만을 고려하면 4-zone SMB가 좌표($m_2, m_3=0.06, 0.5$)에서 가장 높게 IgY를 분리할 수 있었다. recycle이 없는 3-zone SMB는 꼭지점 좌표에서 좌표이동이 extract의 지질 단백질 농도에 큰 영향을 주었다.

Abstract – IgY (Immunoglobulin Yolk) is a specific antibody in egg yolk, and it protects human body from virus and antigen. There are a lot of egg yolk components such as lipoprotein and protein. To separate IgY, HPLC (High Performance Liquid Chromatography) and precipitation were used in a batch mode and SMB (Simulated Moving Bed) was adopted for continuous purification of yolk proteins. IgY and other proteins in yolk were separated by using three-zone and four-zone SMB chromatography. Before performing SMB experiments, batch chromatography simulation parameters and adsorption isotherms were obtained. The parameters of batch chromatography were used to simulate SMB using Aspen chromatography. To compare three-zone and four-zone SMB chromatography, simulations in m_2 - m_3 plane on the triangle theory were carried out. In terms of concentration and purity of both IgY and other lipoproteins, 3-zone SMB process is considered as ideal at the vertex of triangle ($m_2, m_3=0.1, 1.1$). 4-zone SMB yields the highest IgY purity at the coordinate ($m_2, m_3=0.06, 0.5$), which is the pure raffinate region. In 3-zone SMB without recycle, other lipoproteins in extract are largely affected in purity by small shift from the vertex of triangle ($m_2, m_3=0.1, 1.1$).

Key words: 3-zone SMB (Simulated Moving Bed), 4-zone SMB, ASPEN Chromatography, IgY (Immunoglobulin Y)

1. 서 론

IgG (immunoglobulin G)는 포유동물을 면역시킨 후에 혈청으로부터 분리된 항원특이성항체로 생물학적 연구 및 진단 분야에 사용되어 왔다. 이 특이성 항체를 얻기 위해서는 많은 양의 항체원료가 필요하지만, 포유동물의 채혈을 통해 다량의 특이항체를 얻기에는 어려움이 많다. 기존의 포유동물의 혈청으로부터 IgG를 얻는 방법 대

신, 최근에 간단히 닭의 난황으로부터 얻어지는 IgY가 많은 관심을 받고 있다. IgY는 쉽게 생산되는 항체로서 주목을 끌고 있으며 병원균을 효과적으로 예방하거나 통제하는데 사용된다[1]. IgY는 포유류의 IgG 분류의 항체에 해당되나 단백질의 성분이 약간 다르고 난황 유래의 항체라고 하여 만들어진 명칭이다. IgY는 암탉에 특이 항원을 면역시켜 특정 항체가 닭의 난황에 전달되어 생긴 면역항체이다. 채란이라는 간단한 작업을 통해 항체원료의 생산비를 절감할 수 있다[2,3].

계란의 난황은 α -livetinin, β -livetinin, γ -livetinin이라는 수용성 단백질과 인지질 성분으로 구성되어 있는데, 이 중 IgY는 특히 γ -livetinin이

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: ihkim@cnu.ac.kr

[‡]이 논문은 KAIST 박선원 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

라고도 불리며 분자량 64 KDa인 heavy chain과 분자량 28 KDa의 light chain으로 구성되어 있다. 한 마리의 암탉으로부터 획득할 수 있는 IgY는 매달 1500 mg 정도이며 이 중 특이 항체는 2~10% 정도인데, 이것은 IgG의 특이 항체가 5%인데 비하면 더 높은 비율이다 [4,5]. 산란계 한 마리가 1년간 생산하는 난황에서 약 50 g IgY가 얻어지며, 이 생산성은 토끼의 경우보다 120배 높은 것으로 보고되었다. IgY는 80도의 열에 15분을 가열하여도 안정하며, pH 3까지는 IgY의 활성이 안정한 것으로 나타났다[3]. 조류와 포유류와의 계통 발생학적인 차이로 인해 닭의 IgY는 포유동물의 IgG와 교차반응을 하지 않으므로, 닭을 이용하면 포유류 항원에 대해 특이성이 높은 IgY 항체를 생산할 수 있는 잠재력을 가지고 있다[5]. IgY는 다른 여러 단백질과 난황을 구성하므로 순수한 IgY를 얻기 위해 크로마토그래피로 분리하는 연구가 필요하다.

IgY와 같은 단백질 분리정제에 크로마토그래피가 많이 사용되어 왔다. 다른 분리방법에 비해 낮은 에너지를 사용하는 장점이 있으며 특히 상온에서 분리가 주로 이루어져 열에 민감한 의약품 분리에 적합하다[6]. 크로마토그래피의 주된 운전 방식은 회분식 공정이지만, 생산성이 낮고 이동상의 소비가 많으며, 용질의 회석과 흡착제(adsorbent)의 효율성이 낮다[7].

제품의 생산성과 수율을 동시에 높이고 이동상의 소비를 보다 절감할 수 있는 대표적인 크로마토그래피 공정이 SMB 공정이다. SMB 공정은 1960년대 초 미국의 UOP의 C8 hydrocarbon에서 para-xylene을 분리하는데서 개발되기 시작했다. 이어 silica gel이나 이온교환수지를 충전물질로 이용하여 석유화합물 등 다양한 화합물을 분리하는데 널리 적용되어왔다.

SMB 크로마토그래피 기술은 흡착력이 다른 두 물질을 분리하는 연속식 공정기술의 하나로 용매 소비량이 적고 고정상의 질량당 생산량이 높은 것으로 알려져 있다[8]. SMB는 분석 스케일에서 제조용 스케일로의 스케일 업이 단시간에 이루어지는데 이는 동일한 고정상과 이동상을 사용하기 때문이다. 이런 장점은 신약의 개발에서부터 시장에 나아가기까지의 시간을 줄여준다. SMB를 이용해 난황 단백질인 IgY를 높은 순도로 얻기 위해 최적의 SMB 공정 조건이 연구되어야 한다.

따라서 본 연구에서는 고순도의 IgY 생산을 위한 연구로 전산모사를 통하여 이에 필요한 최적의 SMB 공정을 찾는 것이 목적이다. 이를 위해 역상 C18 칼럼을 이용한 IgY의 회분식 크로마토그래피 실험 결과를 이용하여 [8], 3-zone과 4-zone 중 어느 공정이 IgY의 분리에 최적 공정인지 연구하는 비교전산모사를 수행하였다.

2. 이 론

SMB 크로마토그래피는 보통 4개의 영역(Fig. 1B)으로 구성되어 있다[9,10]. 이 4영역은 이동상의 재순환(recycling)으로 인해 소비를 줄일 수 있지만 그에 따른 시료의 오염현상이 생길 수 있고 특히 단힌 게이기 때문에 고압의 HPLC 칼럼을 사용할 경우 펌프 및 연결튜브에 고압이 가해지며 기계적 손상이 발생하기도 한다. 이와 같은 문제점들을 보완하기 위해 재순환영역을 제거하고 고정상의 양을 3/4줄여 열린 계로 만든 3영역(Fig. 1A)의 SMB 크로마토그래피가 개발되었다. 이 3영역은 비록 이동상의 소비가 많은 단점이 있지만 고압의 HPLC 칼럼을 사용해도 기계적 손상이 발생하지 않는다[11,12].

SMB 공정 전산모사 운전에 앞서 결정해야 할 변수로 화합물의 흡

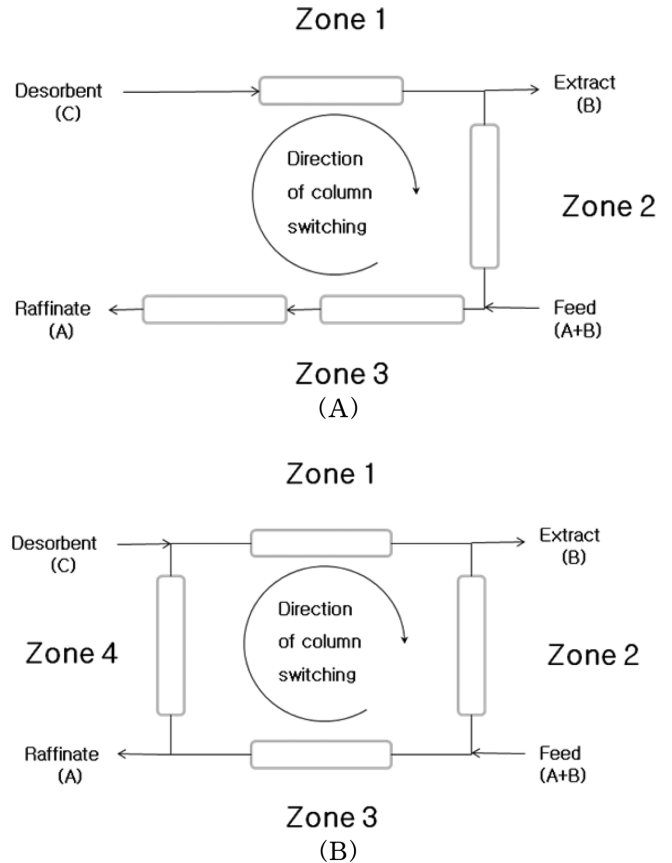


Fig. 1. (A) Schematic diagrams of open-loop 3-zone SMB; (B) Schematic diagrams of closed-loop 4-zone SMB.

착평형 변수가 있다. 흡착평형을 연구함으로써 고정상과 이동상 사이에 물질이 분배되는 정도를 이해할 수 있고 액체크로마토그래피 분리를 설계할 때 이용할 수 있다. HPLC에서 실험을 통해 얻은 체류시간 값들을 Eq. (1)과 (2)에 대입하여 분리 성분의 분리도와 선택도를 계산한다.

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (1)$$

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_2 - W_1} \quad (2)$$

Eq. (1)에서, α 는 선택도, t_{R2} , t_{R1} 는 성분 1,2의 체류시간, t_0 는 dead time이다. Eq. (2)에서, R_s 는 분리도, W_1 , W_2 는 성분 1,2의 피크 너비이다.

흡착 분리공정을 개발하기 위한 가장 중요한 전 단계의 하나는 화합물이 분리되는 흡착 평형을 결정하는 것으로 흡착 공정을 설계하거나 분석하는데 중요한 역할을 한다. PIM (Pulse Input Method)을 통해 흡착평형식을 결정하는데 농도 증가에 따른 피크의 크기 변화를 관찰함으로써 얻은 체류시간으로부터 Eq. (3)을 이용해 헨리 평형상수를 추산하여 Eq. (4)와 같은 흡착등온식을 얻어 낼 수 있다.

$$H = \frac{t_R - t_0}{t_0} \cdot \frac{\epsilon}{1 - \epsilon} \quad (3)$$

$$C_s = H \cdot C_M \quad (4)$$

이 식에서 H는 Henry 상수, t_0 는 dead time, t_R 는 체류시간, ϵ 는 공극률, C_s 는 고정상의 농도, C_M 은 이동상의 농도이다. IgY의 회분식 크로마토그래피를 통해 얻은 체류시간들로부터 SMB 크로마토그래피의 연속 공정에 대한 설계가 이루어진다. SMB 공정에서 중요한 쟁점은 여러 zone에서 흐름속도와 switching time (Δt)을 결정하는 것이며, 많은 문헌에서 SMB 공정의 설계방법이 보고되고 있다[8-12]. 3-zone SMB 공정에서 zone 1, 2, 3에서의 각 흐름속도와 desorbent, extract, feed, raffinate의 흐름속도는 다음과 같은 식을 따른다.

$$Q_{input} = Q_{output} \tag{5}$$

$$Q_{desorbent} + Q_{feed} = Q_{extract} + Q_{raffinate} \tag{6}$$

$$Q_1 = Q_{desorbent} \tag{7}$$

$$Q_2 = Q_1 - Q_{extract} \tag{8}$$

$$Q_3 = Q_2 + Q_{feed} = Q_{raffinate} \tag{9}$$

반면에 4-zone SMB 공정에서 zone 1, 2, 3, 4에서의 각 흐름속도와 desorbent, extract, feed, raffinate의 흐름속도는 다음과 같은 식을 따른다.

$$Q_{input} = Q_{output} \tag{10}$$

$$Q_{eluent} + Q_{feed} = Q_{extract} + Q_{raffinate} \tag{11}$$

$$Q_1 = Q_{eluent} + Q_4 \tag{12}$$

$$Q_2 = Q_1 - Q_{extract} \tag{13}$$

$$Q_3 = Q_2 + Q_{feed} \tag{14}$$

$$Q_4 = Q_3 - Q_{raffinate} \tag{15}$$

평형이론을 이용한 삼각형 이론(Fig. 2)은 공정설계에 기본이 되는 이론이며 각 zone j에서의 이동상과 고정상의 부피유속의 비, 즉 m_j 는 컬럼의 부피(V), 공극률(ϵ), switching time (Δt)에 의해 다음과 같이 정의된다.

$$m_j = \frac{Q_j \cdot \Delta t - V \cdot \epsilon}{V \cdot (1 - \epsilon)} \tag{16}$$

이상의 운전에 필요한 변수들을 이용하여 SMB 공정을 최적화하기 위한 Aspen chromatography 전산모사 프로그램을 이용하면, 실험을 하지 않고도 분리 결과를 확인함으로써 생산물의 순도를 예측할 수 있고 여러 조건의 공정모사가 가능하다.

3. 전산모사

보고된 문헌[8]을 통해 $t_0 = 0.81$ min, $t_{R1} = 0.95$ min, $t_{R2} = 2.67$ min을 측정하고 Eq. (3)을 통해 흡착평형상수(H)를 구하였다. Aspen Chromatography simulator (ver.2006, Aspen Tech., USA)를 사용하여 SMB 크로마토그램을 얻기 위한 전산모사를 수행하였다. 크로마

토그래피 실험 결과를 바탕으로 얻은 두 H 값을 이용하여 삼각형 이론에 의한 m_2 - m_3 diagram을 작성한 후, 여러 쌍의 m 값에서 SMB 공정을 전산모사하기 위한 각 zone의 유량과 switching time을 계산하였다. 3-zone과 4-zone의 조건으로 feed의 유량을 모두 0.2 ml/min로 고정하였다. 전산모사에서 유량 값을 입력할 때, 3-zone에서 recycle영역이 존재하지 않으므로 $Q_4 = Q_{recycle} = 0$ ml/min으로 설정하고, 4-zone에서는 $Q_4 = Q_{recycle}$ 값을 설정한다.

삼각형 이론에서 가장 이상적인 조건인 왼쪽상단 꼭지점 좌표 값에서 Fig. 1A의 3-zone raffinate 영역에 칼럼 하나가 추가된 4개 칼럼 3-zone과 Fig. 1B의 4-zone SMB 비교전산모사를 수행하였다. 이상적인 꼭지점 좌표 조건 외에도 5개의 다른 m_j 좌표에서 extract와 raffinate의 순도변화를 3-zone과 4-zone에서 비교하였다. 꼭지점 좌표 주위에 있는 대각선 방향 좌표 2개를 추가하여 비교 전산모사를 추가로 수행하였다.

4. 결과 및 토의

SMB 크로마토그래피의 전산모사에 사용될 변수들을 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 H_1 과 H_2 는 Fig. 2의 삼각형을 그리는데 수직선과 수평선이 되며 왼쪽 상단 꼭지점의 좌표는 $m_2 = 0.1$, $m_3 = 1.1$ 이 된다.

삼각형 이론을 토대로 순수 raffinate 영역, pure extract 영역, 그리고 삼각형 내부에 5개의 점을 선택하여 Fig. 3에 도시하였다. 그에

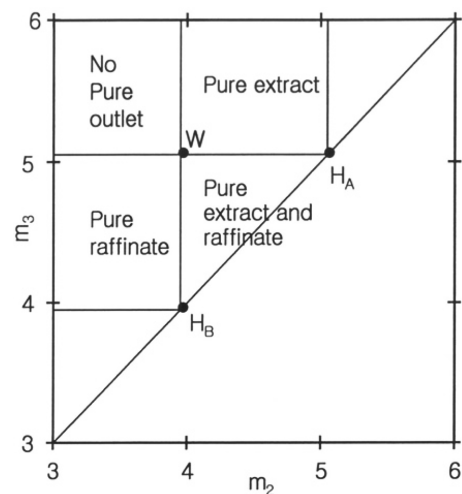


Fig. 2. Triangle diagram shows various regions of separation; Both pure extract and raffinate are inside the triangle of H_A , H_B and W. Left region of the triangle for pure raffinate and the upper region is pure extract.

Table 1. Data for SMB chromatography simulation

Name	Value	Unit	Description
H_L	15	cm	Height of adsorbent layer
D_b	0.46	cm	Internal diameter of adsorbent layer
E_i	0.32	void/bed	Inter-particle voidage
MTC (IgY)	10	l / min	Mass transfer coefficient
MTC (Other lipoproteins)	5000	l / min	Mass transfer coefficient
H_1 (IgY)	0.1	N / A	Isotherm parameter
H_2 (Otherlipoproteins)	1.1	N / A	Isotherm parameter

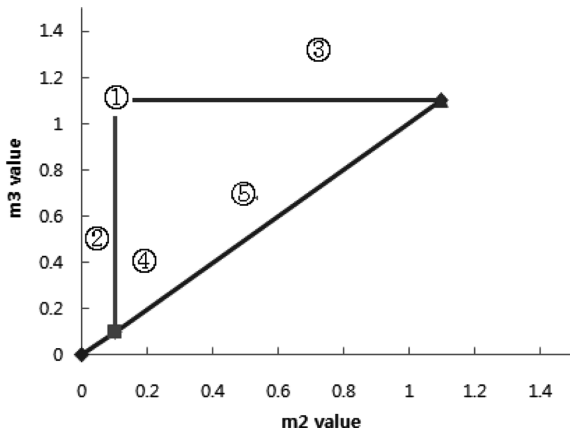


Fig. 3. The m_2 - m_3 diagram plane based on triangle theory and selected five points for simulation.

따른 m_2 와 m_3 값과 $Q_{desorbent}$, $Q_{raffinate}$, $Q_{extract}$, Δt 값을 Table 2와 3에 표시하였다. SMB 크로마토그래피의 전산모사를 수행하여 raffinate 영역과 extract 영역에서의 IgY와 다른 단백질의 농도 및 순도와 전체칼럼 내부의 농도분포를 파악하였다.

삼각형의 꼭지점 ①인 $m_2, m_3=0.1, 1.1$ 에서 삼각형이론을 통하여 feed의 유량을 0.2 ml/min으로 고정시키고 m_2, m_3 에 의해 $Q_{desorbent}$, $Q_{raffinate}$, $Q_{extract}$, Δt 를 Table 2와 3 같이 설정하여 칼럼의 개수가 4개인 3-zone과 4-zone의 SMB 크로마토그래피 전산모사를 수행하였다.

Raffinate와 extract의 농도변화는 Fig. 4에 나타내었고, 칼럼내부 농도 비교는 Fig. 5에 제시하였다. Fig. 4 크로마토그램에서 하나의 피크는 508초에 해당하는 한 사이클을 의미한다. 또한, raffinate와 extract인 두 개 피크의 넓이 비에 따라 순도가 결정된다. Fig. 5에서 3-zone이 4-zone 보다 IgY가 더 넓은 폭을 나타내었지만, other lipoproteins도 3-zone이 4-zone 보다 더 넓은 폭을 나타내고 있다. IgY가 3-zone에서는 98.89%, 4-zone에서는 98.21% 순도로 분리되었다(Table 4). 그러므로 raffinate 영역에서의 3-zone과 4-zone의 IgY의 순도가 거의 동일함을 알 수 있다.

Fig. 4(B)에서는 4-zone에서 IgY의 피크가 계속 기준선 보다 위에

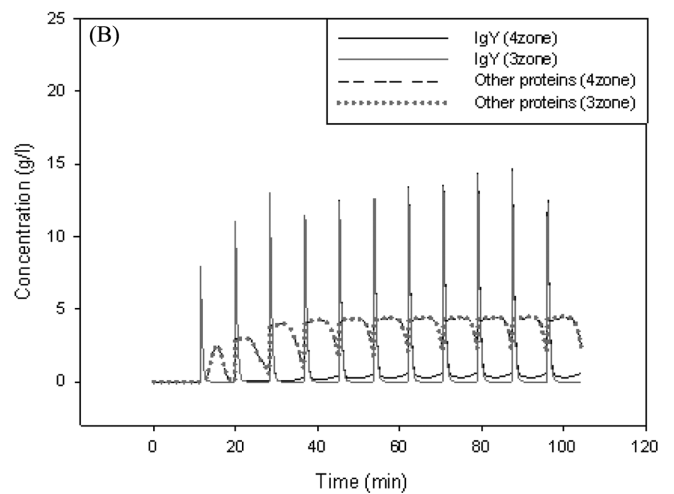
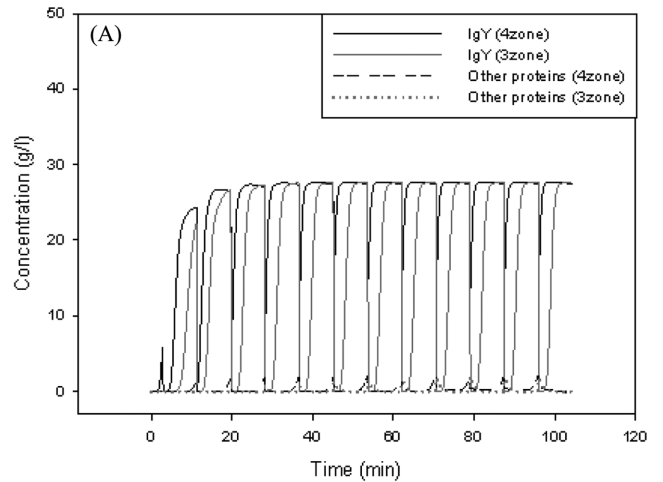


Fig. 4. Comparative graphs between 3-zone and 4-zone SMB, which are composed of 4 columns both, when $m_2=0.1$ and $m_3=1.1$. (A) Concentration history of raffinate, (B) Concentration history of extract.

있는 것을 볼 수 있다. 그 이유는 4-zone에서 raffinate로부터 일부 IgY가 recycle되어 extract 부분에 흐르기 때문이다. 그 결과 다른 단

Table 2. Operating parameters for 3-zone SMB depending on randomly selected points in triangle

Point No.	m values		Internal flow rates (ml/min)				Flow rates of zones (ml/min)				Switching time (sec)	
	m_2	m_3	Q_{fe}	Q_{de}	Q_{ra}	Q_{ex}	Q_1	Q_2	Q_3	Q_4	Q_{re}	t
1	0.10	1.10	0.20	0.31	0.31	0.20	0.31	0.11	0.31	0.00	0.00	508
2	0.06	0.50	0.20	0.57	0.39	0.38	0.71	0.24	0.44	0.00	0.00	279
3	0.75	1.30	0.20	0.57	0.64	0.13	0.57	0.44	0.64	0.00	0.00	279
4	0.20	0.40	0.20	1.57	0.87	0.90	1.57	0.67	0.87	0.00	0.00	101
5	0.50	0.70	0.20	1.57	1.17	0.60	1.57	0.97	1.17	0.00	0.00	101

Table 3. Operating parameters for 4-zone SMB depending on randomly selected points in triangle

Point No.	m values		Internal flow rates (ml/min)				Flow rates of zones (ml/min)				Switching time (sec)	
	m_2	m_3	Q_{fe}	Q_{de}	Q_{ra}	Q_{ex}	Q_1	Q_2	Q_3	Q_4	Q_{re}	t
1	0.10	1.10	0.20	0.20	0.20	0.20	0.31	0.11	0.31	0.11	0.11	508
2	0.06	0.50	0.20	0.36	0.18	0.38	0.71	0.24	0.44	0.26	0.26	279
3	0.75	1.30	0.20	0.36	0.43	0.13	0.57	0.44	0.64	0.21	0.21	279
4	0.20	0.40	0.20	1.00	0.30	0.90	1.57	0.67	0.87	0.57	0.57	101
5	0.50	0.70	0.20	1.00	0.60	0.60	1.57	0.97	1.17	0.57	0.57	101

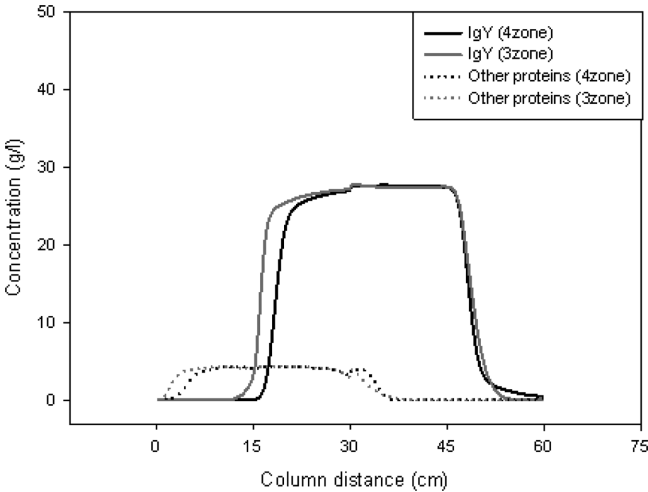


Fig. 5. Comparative graph of concentration profile along columns for 3-zone and 4-zone when $m_2=0.1$ and $m_3=1.1$.

Table 4. Purities (%) of IgY and other lipoproteins for ①-⑤ from Aspen simulation

Point No.	Raffinate (IgY)		Extract (Other lipoproteins)	
	3-zone	4-zone	3-zone	4-zone
1	98.89	98.21	83.15	77.18
2	98.32	99.25	59.74	49.86
3	93.24	93.29	99.99	88.27
4	97.24	98.99	69.71	46.96
5	96.69	97.86	97.31	73.06

백질이 3-zone에서 83.15%, 4-zone에서 77.18% 순도로 분리되었다 (Table 4). 4-zone은 3-zone 보다 IgY의 농도가 높으므로, extract에서 배출된 다른 단백질의 순도를 낮추는 것을 알 수 있었다.

m_2 - m_3 diagram에서 삼각형 외부 왼쪽 지점 ② $m_2, m_3=0.06, 0.5$ 을 가지고 전산모사를 수행하였다. 그 결과 raffinate는 IgY의 feed 농도 28 g/l 양까지 높은 농도에 도달했지만, extract는 다른 단백질의 feed 농도 4.8 g/l의 55% 수준만 분리되었다(Figs. 6, 7). IgY는 3-zone에서 98.32%, 4-zone에서 99.25% 순도로 분리되었고, 다른 단백질은 3-zone에서 59.74%, 4-zone에서 49.86% 순도로 분리되었다(Table 4).

이는 앞에서 언급한 SMB 공정 모델인 Eq. (5)-Eq. (15)으로 설명할 수 있다. 조건 ②는 m_3 에 비해서 상대적으로 m_2 가 작다. 이에 따라 Eq. (16)에 의해서 Q_2 도 작은 값을 갖게 된다. 3-zone에서는 Eq. (9), 4-zone에서는 Eq. (14), Eq. (15)에 의해 $Q_{Raffinate}$ 가 감소하여 배출속도가 느려진다. 그러므로 칼럼 내에 존재하는 농도가 높아 raffinate 영역에서 높은 순도의 IgY를 분리할 수 있게 된다.

반대로 작은 Q_2 로 인해 3-zone에서는 Eq. (8), 4-zone에서는 Eq. (13)에 의해 상대적으로 $Q_{Extract}$ 가 증가하여 보다 많은 양이 배출되기 때문에 칼럼 내부에서의 extract 농도는 작아지고 두 성분이 겹쳐지는 부분이 많아지게 되므로 extract 쪽에서 다른 단백질의 순도는 감소한다.

조건 ③은 삼각형 외부에서 위쪽 지점인 $m_2, m_3=0.75, 1.3$ 이다. 이 지점에서 raffinate 농도는 IgY feed 농도의 50%에 해당하는 14.8 g/l 까지 도달하며 extract는 다른 단백질 feed 농도의 80%인 3.8 g/l까지 도달하는 것을 볼 수 있다(Figs. 8, 9) IgY는 3-zone에서 93.24%, 4-zone에서 93.29% 순도로 분리되었고, 다른 단백질은 3-zone에서

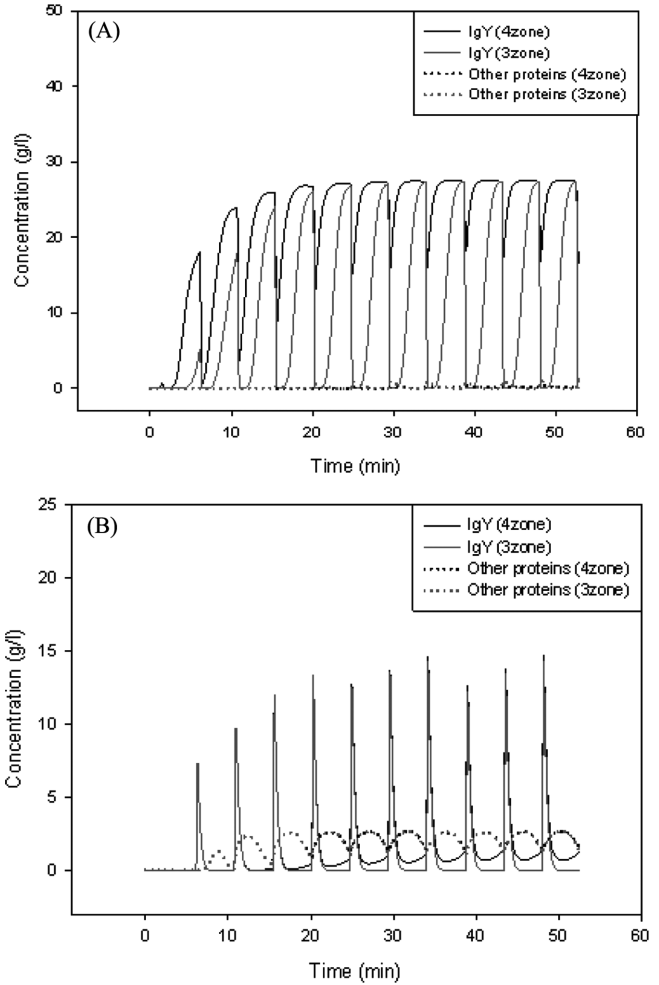


Fig. 6. Comparative graphs between 3-zone and 4-zone SMB when $m_2=0.06$ and $m_3=0.5$. (A) Concentration history of raffinate, (B) Concentration history of extract.

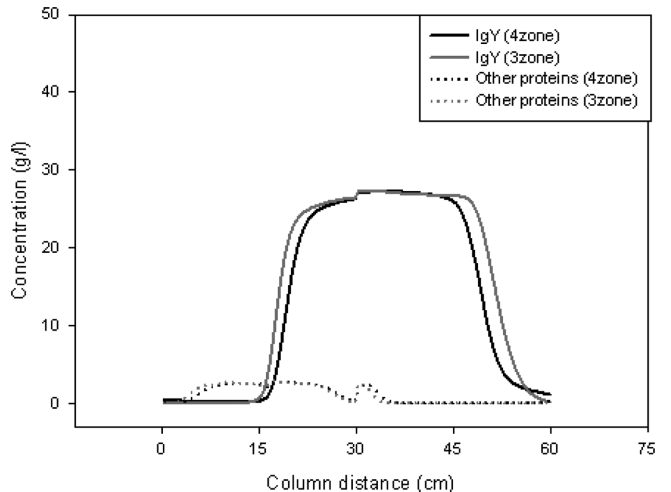


Fig. 7. Comparative graph of concentration profile along columns when $m_2=0.06$ and $m_3=0.5$.

99.99%, 4-zone에서 88.27% 순도로 분리되었다(Table 4).

이 조건에서는 m_3 가 상대적으로 큰 값을 가지므로 Eq. (16)에 의해서 Q_3 도 커지게 된다. 3-zone에서는 Eq. (9), 4-zone에서는 Eq. (15)

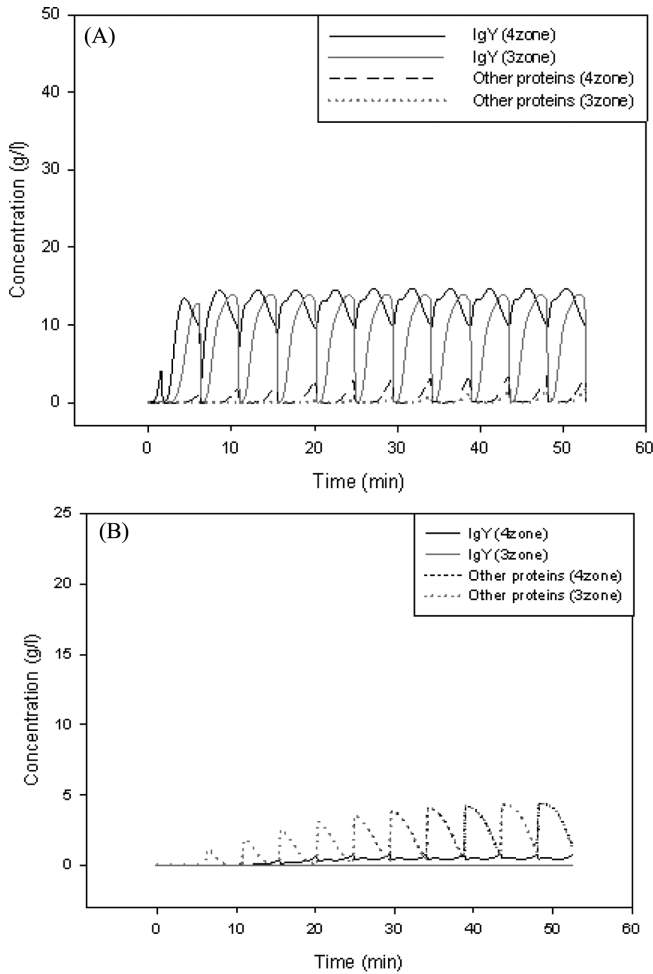


Fig. 8. Comparative graphs between 3-zone and 4-zone SMB when $m_2=0.75$ and $m_3=1.3$. (A) Concentration history of raffinate, (B) Concentration history of extract.

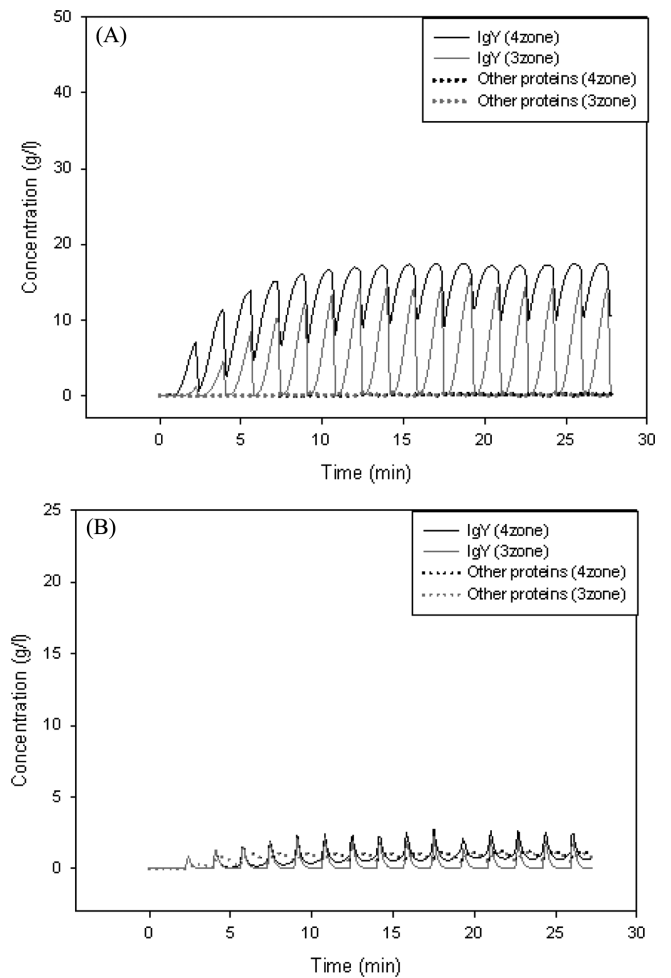


Fig. 10. Comparative graphs between 3-zone and 4-zone SMB when $m_2=0.2$ and $m_3=0.4$. (A) Concentration history of raffinate, (B) Concentration history of extract.

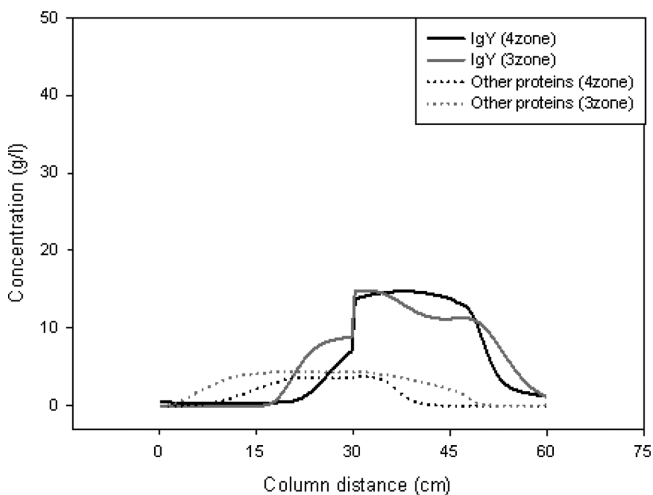


Fig. 9. Comparative graph of concentration profile along columns when $m_2=0.75$ and $m_3=1.3$.

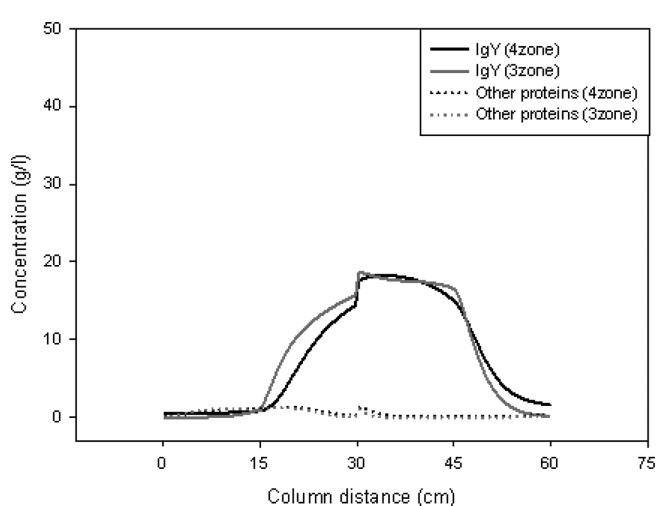


Fig. 11. Comparative graph of concentration profile along columns when $m_2=0.2$ and $m_3=0.4$.

에 의해 $Q_{Raffinate}$ 가 증가하여 빠른 속도로 배출된다. 결국 칼럼 내에 존재하는 농도가 낮아지게 되어, raffinate 영역에서 분리가 잘 이루어지지 않기 때문에 IgY의 순도가 떨어지는 것을 알 수 있다. 높은 Q_3 는 3-zone에서는 Eq. (9), 4-zone에서는 Eq. (14)에 의해 Q_2 를 증

가시킨다. 그러므로 Eq. (8), Eq. (13)에 따라 $Q_{Extract}$ 가 감소하여 다른 단백질이 높은 농도와 높은 순도를 가지게 된다.

조건 ④는 삼각형 내부에 있는 $m_2, m_3=0.2, 0.4$ 인 지점이다. 이 때

raffinate의 농도는 3-zone에서 15.1 g/l, 4-zone에서는 17.1 g/l까지 도달하였고, 이 농도는 IgY feed 농도의 55~60%에 해당한다. Extract의 농도는 3-zone에서 2.1 g/l, 4-zone에서는 2.7 g/l로 비슷한 값까지 도달하였으며, 이는 다른 단백질 feed 농도의 40~55% 정도 밖에 미치지 못한 것을 볼 수 있다(Figs. 10, 11). IgY는 3-zone에서 97.24%, 4-zone에서 98.99% 순도로 분리되었고, 다른 단백질은 3-zone에서 69.71%, 4-zone에서 46.96% 순도로 분리되었다(Table 4).

조건 ④는 이전에 조건 ②에서 수행된 것처럼 m_3 에 비해서 상대적으로 m_2 가 작은 값을 갖게 된다. 이에 따라 Eq. (16)에 의해서 Q_2 도 작은 값을 갖게 된다. 3-zone에서는 Eq. (9), 4-zone에서는 Eq. (14)와 Eq. (15)에 의해 $Q_{Raffinate}$ 가 감소한다. 이로 인해 raffinate의 배출속도가 느려지기 때문에 칼럼 내에 존재하는 농도가 높아 raffinate 영역에서 순수한 IgY를 생산할 수 있게 된다. 하지만 조건 ④에서 raffinate와 extract 모두 유량이 높기 때문에 높은 농도와 순도의 IgY를 생산하기엔 어렵다.

작은 Q_2 로 인해 3-zone에서는 Eq. (8), 4-zone에서는 Eq. (13)에 의해 상대적으로 $Q_{Extract}$ 가 증가한다. 칼럼 내부에서의 extract 농도는 작아지고 Fig. 11과 같이 두 성분이 겹쳐지는 부분이 크게 되므로 extract 쪽에서 다른 단백질의 순도가 낮게 된다.

조건 ⑤는 삼각형의 꼭지점 ①에서 대각선으로 내려온 지점 m_2 ,

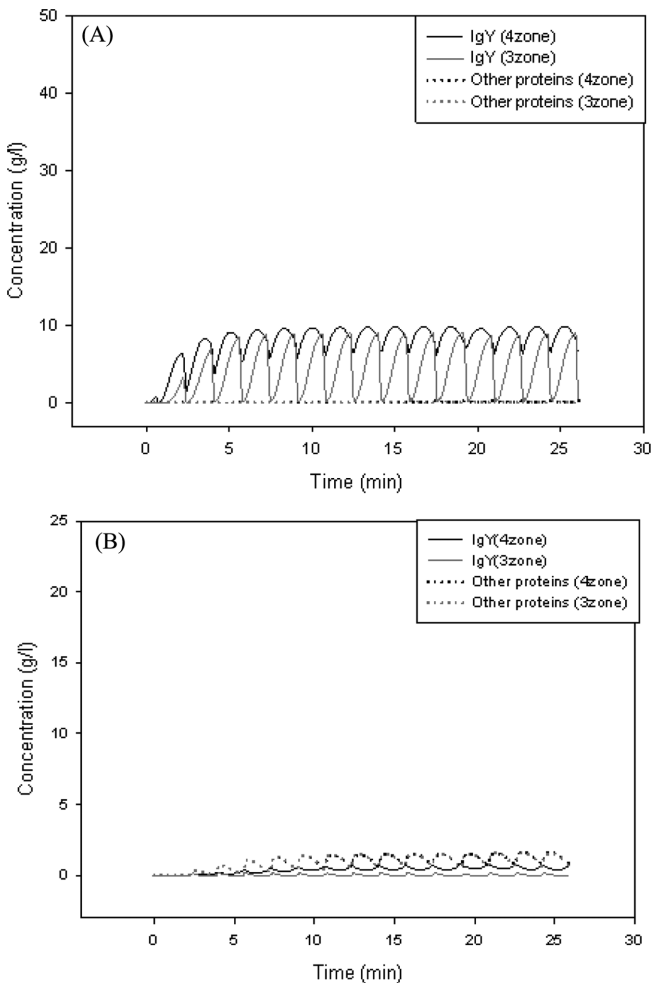


Fig. 12. Comparative graphs between 3-zone and 4-zone SMB when $m_2=0.5$ $m_3=0.7$. (A) Concentration history of raffinate, (B) Concentration history of extract.

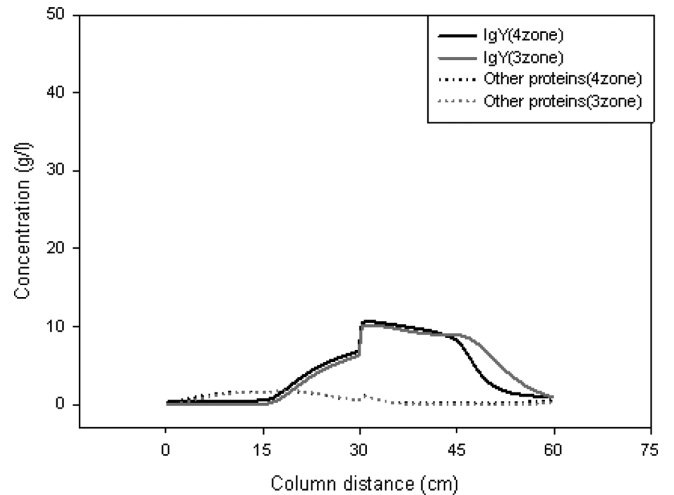


Fig. 13. Comparative graph of concentration profile along columns when $m_2=0.5$ and $m_3=0.7$.

$m_3=0.5, 0.7$ 로 raffinate에서의 IgY의 feed 농도의 30~35% (3-zone, 4-zone=9.0, 9.6 g/l)에 도달하고 extract는 다른 단백질의 feed 농도의 30% 정도(1.4 g/l) 밖에 미치지 못하였다(Figs. 12, 13). 꼭지점 ①과 유사한 경향을 보이지만, 조건 ④와 마찬가지로 모든 영역의 유량이 높아 가장 낮은 농도를 가지는 것을 알 수 있다. 이를 통해 삼각형 내부에서 꼭지점으로부터 멀어질수록 raffinate와 extract의 농도가 감소하는 것을 알 수 있다. 그리고 m_2 값이 증가할수록 순수 raffinate와 멀어지기 때문에 raffinate 순도가 떨어지는 것을 알 수 있다. 이것은 m_2 값이 두 번째로 큰 조건 ⑤가 두 번째로 낮은 raffinate 순도를 가지는 것으로 설명할 수 있다(3-zone, 4-zone=96.69%, 97.86%).

4-zone에서 m_3 값이 감소할수록 순수 extract와 멀어지기 때문에 순도가 낮아지는 것을 알 수 있다. 이것은 m_3 값이 세 번째로 작은 조건 ⑤가 세 번째로 낮은 순도를 가지는 것으로 설명할 수 있다(3-zone, 4-zone=97.31%, 73.06%).

m_2 - m_3 diagram에서 삼각형의 5개 점을 통해서 3-zone과 4-zone의 전산모사 결과를 비교하면, 3-zone SMB와 4-zone SMB 공정의 차이점은 3영역에서 recycle의 유무인 것을 알 수 있다. 3-zone은 raffinate가 분리되면서 한 사이클이 마무리되지만, 반면에 4-zone은 raffinate에서 IgY가 분리되고 일부는 recycle이 되어 desorbent와 합해진다. 이것이 4-zone 공정에서 raffinate와 extract의 순도에 영향을 미치게 된다. 먼저 4-zone 공정의 raffinate에서는 $Q_{recycle}$ 이 존재하기 때문에, 3-zone 보다 $Q_{Raffinate}$ 가 작게 되어 상대적으로 배출속도가 느려 4-zone이 raffinate에서 IgY 분리에서 더 좋은 것을 알 수 있다. Table 4을 보면 삼각형의 좌표가 ②일 때, 4-zone 공정에서 가장 높은 순도(99.25%)로 IgY가 분리됨을 알 수 있었다.

Extract에서는 3-zone의 $Q_{desorbent}$ 가 4-zone의 $Q_{desorbent}$ 와 $Q_{recycle}$ 의 합친 것과 같아 결국 3-zone과 4-zone 공정의 $Q_{Extract}$ 는 같게 된다. 하지만 4-zone에서 $Q_{recycle}$ 가 흐르면서 $Q_{desorbent}$ 와 합쳐져 일부 IgY가 Q_1 에 잔류한다. 순수한 $Q_{desorbent}$ 가 흐르는 3-zone에 비해 IgY 농도가 높아 extract에서 다른 단백질의 순도가 상대적으로 떨어지게 된다. 그러므로 extract에서 다른 단백질 분리는 3-zone이 더 좋은 것을 Table 4을 통해 알 수 있다. 다른 단백질의 분리에서는 삼각형의 좌표 ③에서 3-zone 공정일 때 가장 높은 순도(99.99%)인 것을 알 수 있었다.

Table 5. Purities (%) of IgY and other lipoproteins for A-C from Aspen simulation

Point No.	Raffinate (IgY)		Extract (Other lipoproteins)	
	3-zone	4-zone	3-zone	4-zone
A	98.36	97.30	97.47	89.97
B	98.89	98.21	83.15	77.18
C	98.84	98.68	56.77	54.09

참고문헌

Table 4을 보면 3-zone일 때 가장 높은 순도는 raffinate (IgY)에서 98.89%, extract(다른 단백질)에서 83.15%이다. 따라서 raffinate와 extract에서 IgY와 다른 단백질 순도가 동시에 높으므로 조건 ①일 때 3-zone 공정이 가장 최적인 것을 알 수 있다.

좌표(B: $m_2, m_3=0.1, 1.1$)이외에 대각선 평행 방향으로 두 개의 좌표(A: $m_2, m_3=0.2, 1.2$, C: $m_2, m_3=0.0, 1.0$)를 추가하여 SMB 크로마토그래피 전산모사를 수행하였다. 좌표 A, B, C에서 전산모사를 통해, 이상적인 지점 B에서 조금씩 대각선평행방향으로 이동할 때 raffinate와 extract 순도에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. Table 5에 보면 B에서 A로 위로 올라갈수록 순수 extract의 영역에 가깝게 되어 extract에서의 다른 단백질의 농도와 순도가 올라가고 raffinate에서의 IgY의 농도와 순도가 떨어지게 된다. 반면에 B로부터 C로 아래로 내려갈수록 순수 raffinate의 영역에 가깝게 되어 raffinate에서 IgY의 농도와 순도는 올라가고, extract에서 다른 단백질의 농도와 순도가 내려가는 것을 알 수 있다.

꼭지점 주변에서의 작은 변화가 4-zone에서 recycle되어 나가는 IgY의 영향 때문에, 3-zone보다 recycle이 이루어지는 4-zone의 raffinate 순도에 더 큰 영향을 주는 것을 알 수 있다. Extract의 다른 단백질 순도에 4-zone 보다 3-zone이 더 많은 변화가 있음을 알 수 있다(Table 5).

5. 결 론

3-zone과 4-zone의 SMB 비교 전산모사를 통하여 m_2 - m_3 좌표 값에 따른 raffinate, extract, 칼럼내부 농도 값의 변화를 조사했다. 먼저 m_2 - m_3 좌표 값에 따라 각 존에서 유량의 변화가 발생하고, 특히 3-zone과 4-zone의 차이인 recycle 흐름의 유무가 각 존의 농도 분포에 큰 영향을 주는 것을 알았다.

삼각형 이론에 따라 m_2 - m_3 값으로 5개의 지점을 선택하여 전산모사를 수행한 결과, IgY의 분리에 좌표($m_2, m_3=0.06, 0.5$)에서 4-zone SMB가 가장 농도와 순도면에서 우수하였다. IgY와 다른 단백질을 같이 고려할 때 꼭지점 좌표($m_2, m_3=0.1, 1.1$)의 3-zone SMB가 농도와 순도면에서 최적의 조건으로 생각된다.

왼쪽 상단 삼각형 꼭지점 부근에서는 작은 유량 변화에 대해 4-zone SMB 보다 3-zone SMB가 민감하였다.

감 사

연구재단의 기초연구지원사업에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

- Zhen, Y.-H., Li, Z., Fang, R., Xu, Y.-P., Jin, L.-J., Guo, J. and Li, X.-Y., "Characterization of Specific Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) Against Mastitis-causing *Staphylococcus aureus*," *J. Appl. Microbiol.*, **105**(5), 1529-1535(2008).
- Jin, W., Yoon, B. I. and Han, J. H., "Protective Effects of IgY against Diarrhea in Suckling Piglets II. Clinical Sign, Histopathological Lesion and Immunohistochemical Finding," *Kor. J. Veterinary Ser.*, **31**(1), 113-128(2008).
- Kim, M., Rho, J., Kim, Y. B., Shon, D. H. and Jung, S. H., "Antimicrobial Activity of Specific IgY against *Salmonella gallinarum*," *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **39**(5), 552-557(2007).
- Shim, W. B., Kim, H. J., Park, S. J., Kang, D. H., Kang, J. S. and Chung, D. H., "Production and Specificity of Immunoglobulin Yolk (IgY) on *Vibrio parahaemolyticus*," *J. Food Hyg. Safety*, **18**(2), 61-66(2003).
- Lee, S. B., Choi, S. H., Ko, T. S., Jang, M. J. and Han, S. H., "Studies on the Production and Properties of IgY Antibody in Hen Egg Yolk," *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, **16**(1), 85-88 (1996).
- Yoon, J. Y., Lee, J. K., Suh, S. S., Choi, M. H. and Park, T. J., "Chiral Separation of Bupivacaine by Simulated Moving Bed (1) Optical Separation Conditions for Preparative Chromatography," *Korean. Chem. Eng. Res.(HWAHAK KONGHAK)*, **41**(6), 736-743(2003).
- Lee, K. N., "Continuous Separation of Glucose and Fructose at High Concentration Using Two-Section Simulated Moving Bed Process," *Korean. Chem. Eng. Res.(HWAHAK KONGHAK)*, **20**(3), 532-537(2003).
- Song, S. M. and Kim, I. H., "Simulation of IgY (Immunoglobulin Y) Purification by SMB (Simulated Moving Bed)," *Korean. Chem. Eng. Res.(HWAHAK KONGHAK)*, **49**(6), 798-803(2011).
- Lee, C. H. and Koo, Y. M., "Simulated Moving Bed," *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, **20**(3), 192-196(2005).
- Kim, B. L. and Kim, I. H., "CSP(Chiral Stationary Phase) for SMB Chromatography," *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, **20**(3), 177-182 (2005).
- Kebler, L. C., Gueorguieva, L., Rinas, U. and Seidel-Morgenstern, A., "Step Gradients in 3-zone Simulated Moving Bed Chromatography: Application to the Purification of Antibodies and Bone Morphogenetic Protein-2," *J. Chromatogr. A*, **1176**(1-2), 69-78(2007).
- Zang, Y. and Wankat, P. C., "Three-Zone Simulated Moving Bed with Partial Feed and Selective Withdrawal," *Ind. Eng. Chem. Res.*, **41**(21), 5283-5289(2002).