

생합성 히아루론산의 의료용을 위한 정제

오 덕 근
우석대학교 식품공학과

Purification of Biosynthesized Hyaluronic Acid for Its Medical Application

Deok-Kun Oh

Department of Food Science and Technology, Woosuk University, Chonju 565-800, Korea

ABSTRACT

Purification of hyaluronic acid produced by *Streptococcus equi* was carried out to obtain clinical grade hyaluronic acid. The removal method of the bacteria was selected as filtration because filtration was the most effective method in removing impurities such as protein and nucleic acid of the fermentation broth. The removal efficiencies of protein and nucleic acid of hyaluronic acid solution were increased to 75% and 67%, respectively, by filtration with adding 0.6% of activated carbon and 1.0% celite. Hyaluronic acid solution was precipitated by mixing with 2 volumes of ethanol. Effects of pH and conductivity on ethanol precipitation of hyaluronic acid were investigated. Protein and nucleic acid of hyaluronic acid were remained almost constant regardless of pH and conductivity, and the recovery of hyaluronic acid was optimum as about 85% at pH 7 and 100mS of conductivity. Protein of hyaluronic acid was completely removed by three serial filtration and ethanol precipitation, however, nucleic acid was not removed. Hyaluronic acid solution was passed through a column of Duolite A7 to remove its nucleic acid, where 65% of nucleic acid was removed at pH 7 and 40mS of conductivity. The residual nucleic acid of hyaluronic acid solution was completely removed by treatment of 0.2% hydroxyapatite and the clinical grade hyaluronic acid could be obtained.

서 론

히아루론산은 D-glucuronic acid와 N-acetyl glucosamine이 1-3 결합과 1-4 결합이 반복적으로 연결된 분자량이 5만-1,300만인 고분자량의 직쇄상 다당류이다(1). 히아루론산은 보습성과 점도특성이 뛰어나 피부노화 방지용 고급 화장품 첨가제, 안과 수술시 눈조직 보호제, 관절염 치료제로 사용되고 있고, 분자량과 순도가 높을수록 화장품용(저순도, 저분자량)에서 관절염용, 안과용(고순도, 고분자량)

으로 사용되고 있다(2, 3).

히아루론산은 Meyer와 Palmer에 의하여 1934년 소년의 초자액으로부터 처음 발견되었으며 태반, 피부, 관절액, 눈의 수정체, 닭벼슬같은 생체조직에 많이 존재한다. 또한 *Streptococcus hemolyticus*의 A 및 C군의 세포 외층에서도 존재한다(4, 5).

지금까지 히아루론산을 주로 생체 조직으로부터 추출하여 얻었으나 이러한 방법은 많은 단점을 지니고 있다. 즉, 생산수율이 낮고, chondroitin과 glycosamine glycan 등의 불순물이 혼입되어 있고

제조 및 정제과정에서 비용이 많이 소요된다. 이에 비하여 미생물에 의한 히아루론산의 생산방법은 생산비가 저가이며 생산수율이 높고, 생산된 히아루론산이 주사시 반응성이 낮고, 높은 평균 분자량을 갖고, 단백질 및 핵산과 같은 불순물이 거의 존재하지 않는 등 여러 가지 장점을 지녔다고 보고 되었다(6).

히아루론산은 눈의 초자액 및 포유류의 관절의 활액에서 발견되므로 눈 및 관절의 병리상태를 치료하기 위한 대용액으로서 사용된다. 의약품용 히아루론산은 인체 주사시 거부 반응이 없어야 하므로 가능한 한 고순도로 얻는 것이 매우 중요하다. 의약품으로 사용하는 고순도 히아루론산의 단백질 함량은 0.01% 이하, 핵산의 함량은 0.02% 이하이어야 하는 것으로 알려져 있다(7).

의약품용 히아루론산은 고가의 제품이므로 많은 연구가 이루어지고 있다고 생각되나 지금까지 정제에 관한 문헌은 일부 적은 수의 문헌에서만 보고되고 있다(7, 8).

그러므로 본 연구에서는 미생물 *Streptococcus equi*가 생성한 히아루론산을 여러 가지 정제방법을 사용하여 의약품용 히아루론산의 규격 중 일부인 단백질 함량 0.01% 이하 핵산 함량 0.02% 이하인 히아루론산을 얻는 과정을 검토하였다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 배양방법

본 연구에 사용된 균주는 *Streptococcus equi* ATCC 6580이었다. 균을 50ml의 Brain heart infusion broth(Difco)가 함유된 250ml 플라스크에 접종하고 회전 진탕 배양기(Rotary shaker, NBS)에서 100rpm으로 14시간 배양하였다. 이 배양액 100ml를 발효배지가 2ℓ인 5ℓ 발효조(한국발효기)에 접종하여 배양하였다. 이때 발효배지는 포도당 80g/ℓ, 효모 추출물 10g/ℓ, 대두박 추출액 35g/ℓ, 이인산칼륨 10g/ℓ, 일인산칼륨 10g/ℓ, 황산마그네슘 0.7g/ℓ, 황산암모늄 0.6g/ℓ, 황산망간 0.6g/ℓ 등을 포함한다(9). 발효조건은 배양 중 배지의 pH가 7.0이었고 배양온도가 37℃, 통기량이 1.0vvm, 교반속도가 400~1,200rpm, 배양시간이 24시간이었다.

히아루론산 분석

히아루론산의 분석을 위해 배양액을 회석한 후 원

심분리하여 균체를 제거한 용액 또는 정제과정 중의 용액 1ml에 0.75unit의 hyaluronidase(Sigma)를 37℃에서 4시간 동안 반응시켰다. 이 액을 Toyo Soda TSK 5000 PW column이 장착된 HPLC (Shimadzu C-R7A-Plus, Japan)를 이용하여 측정하였다(10).

단백질 및 핵산 분석

단백질은 Bio-Rad micro-assay법으로 측정하였으며, 핵산은 OD(260nm)에서 측정하였으며, 히아루론산 용액 중에 존재하는 핵산은 double strand DNA로 260nm에서 흡광도가 1.0일 때 50μg/ml에 해당된다.

결과 및 고찰

최적 균체 제거 방법의 조사

히아루론산 정제과정 중 히아루론산의 회수율과 주 불순물인 핵산과 단백질의 제거율을 기준으로 하여 여러 가지 균체제거 방법을 비교 실험을 수행하였다(Fig. 1). 여기서 원심분리법(Centrifugation)은 발효액을 10,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 사용하는 방법이고, 에탄올 침전법(EtOH ppt)은 발효액과 에탄올을 1:2 비율로 혼합하여 히아루론산만 침전시켜 균체를 제거하고 침전된 히아루론산을 건조시킨 후 용해하는 방법이고, 여과법(Filtration)은 발효액을 여과(pore size가 4μm인 Advantec NA-050 필터사용)하여 균체를 제거하는 방법이다. 균체제거 실험을 수행한 결과 히아루론산의 회수율은 3방법간의 차이가 거의 없었으나, 히아루론산 용액 중의 핵산과 단백질의 함량은 원심분리법이 상대적으로 높게 나타났다. 이것은 히아루론산은 고점도성 다당류이므로 원심분리에 의한 불순물 제거효과가 상대적으로 떨어지기 때문으로 생각된다. 균체제거 방법 중 여과법이 히아루론산 용액 중의 핵산과 단백질의 함량이 원심분리법에 비교하여 각각 78%와 58%로 가장 낮았다.

균체제거는 핵산과 단백질의 함량이 가장 잘 제거된 여과법을 사용하였고, 보다 효과적으로 핵산과 단백질을 제거하기 위하여 활성탄(제일탄소사)과 규조토(삼순사, 200호)를 첨가하여 여과하였다. 규조토의 농도를 1.0%로 하고 활성탄의 농도를 변화시켜 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 여과시 활성탄의 함량이 높을수록 핵산과 단백질이 잘 제거되었으나, 활성탄 농도 1.0% 이상에서는 여과가 잘되지 않았

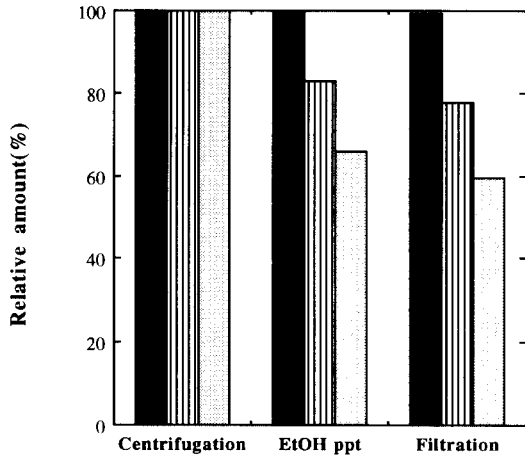


Fig. 1. Removal methods of microorganisms. Hyaluronic acid(■), nucleic acid(▨), protein (▩).

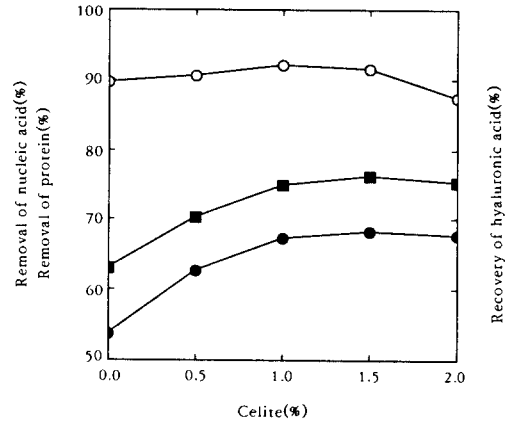


Fig. 3. Effect of celite concentration on filtration of fermentation broth. Recovery of hyaluronic acid(○), removal of protein (●) and nucleic acid(■).

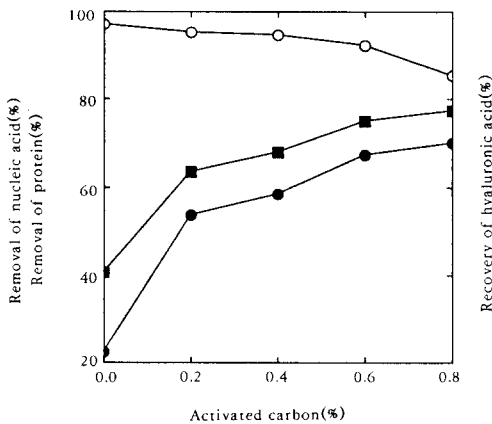


Fig. 2. Effect of activated carbon concentration on filtration of fermentation broth. Recovery of hyaluronic acid(○), removal of protein(●) and nucleic acid(■).

다. 히아루론산 회수율은 활성탄의 함량이 높을수록 감소하였다. 히아루론산의 회수율과 핵산 및 단백질 제거율과 여과효율을 종합하여 활성탄 농도 0.6%를 최적 여과조건으로 선정하였다.

활성탄의 농도를 0.6%로 하고 규조토의 농도를 변화시키는 실험을 수행하였다(Fig. 3). 여과속도는 규조토를 첨가할 경우 현저히 증가하였고, 여과시 규조토의 함량이 1.0%까지 증가할 경우 핵산 및 단

백질의 제거율은 증가하였으나 1.0% 이상에서는 비교적 일정하였다. 히아루론산의 회수율은 큰 차이는 없었지만 1.0% 규조토에서 92%로 가장 높았다. 그러므로 규조토 농도 1.0%를 최적 여과조건으로 선정하였다.

에탄올 침전 조건 최적화

에탄올 첨가 방법을 다르게하여 히아루론산을 침전시키는 과정 중의 히아루론산 회수율, 불순물 제거율 및 결정 모양을 조사하였다(Table 1). 히아루론산 용액에 에탄올을 첨가할 경우 히아루론산이 fiber 형태로 침전되지 않고 부유상태 존재하므로 여과지로 여과하여 히아루론산을 회수하였다. 이 방법은 핵산과 단백질의 제거율은 좋았으나 히아루론산의 회수율이 떨어지고 침전이 제대로 이루어지지 않아 좋은 방법이라고 할 수 없었다. 에탄올에 히아루론산 용액을 투입하는 경우에는 히아루론산이 fiber 형태로 침전되었고 회수율도 좋았으나 핵산과 단백질은 상대적으로 잘 제거되지 않았다. 에탄올과 히아루론산 용액을 동시 투입하는 경우에는 핵산과 단백질 제거가 가장 좋았으며, 히아루론산이 fiber 형태로 침전되었고 회수율도 좋았다. 동시에 투입하면 에탄올과 발효액 사이에 접촉기회가 많아 일어난 결과로 생각된다.

에탄올에 의한 히아루론산의 침전시 최적 조건을 찾기 위해 pH와 전도도를 변화시키는 실험을 수행

Table 1. Effect of mixing methods with ethanol and hyaluronic acid on ethanol precipitation of hyaluronic acid.

Mixing methods	Recovery of hyaluronic acid(%)	Removal of protein(%)	Removal of nucleic acid(%)
Simultaneous addition of ethanol and hyaluronic acid	84.0	93.0	91.8
Addition of hyaluronic acid to ethanol	84.6	89.0	79.4
Addition of ethanol to hyaluronic acid	75.8	92.9	89.1

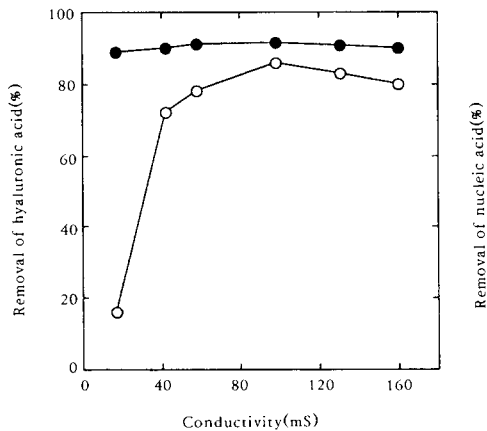


Fig. 4. Effect of conductivity on ethanol precipitation of hyaluronic acid. Recovery of hyaluronic acid(○) and removal of nucleic acid(●).

하였다. 이때, 핵산 및 단백질의 제거율은 pH와 전도도의 변화에 대하여 큰 차이가 나타나지 않아 히아루론산의 회수율을 중점적으로 살펴 보았다. 전도도는 NaCl을 첨가하여 조절하였다. pH를 변화시킨 결과 히아루론산의 회수율이 pH가 3에서 11까지 큰 변화는 없었으나 pH 3 이하에서는 급격히 감소하였고, 결정 모양도 부유상태로 존재하였다. 회수 조건을 pH 7로 하였다. 전도도의 변화에 따른 에탄올 침전시 히아루론산의 회수율을 조사하였다(Fig. 4). 전도도에 따른 히아루론산의 회수율은 40mS와 160mS 사이에서는 큰 차이가 없었지만 100mS에서 최대를 보여주었고, 40mS 이하에서는 급격히 감소하였고 히아루론산이 fiber 형태로 침전되지 않고 부유상태 존재하였다. 히아루론산의 최적 침전 조건은 pH 7, 전도도 100mS(1.0M NaCl 정도에 해당)이었으며 이때 회수율은 약 85% 정도이었다.

수지 처리 조건 최적화

발효액을 여과 후 에탄올로 히아루론산을 침전시켰다. 침전된 히아루론산을 건조시킨 후 완전히 용해된 용액을 다시 여과하였다. 이 과정(여과→침전→건조→용해)을 계속 반복하여 3회 이상할 경우 히아루론산 용액 중의 단백질은 거의 제거되었으나 핵산은 완전히 제거되지 않고 어느 정도 포함되어 계속 존재하였다. 그러므로 핵산 제거를 위하여 에탄올 침전 여과를 2회 처리하고 여러 가지 수지들을 조사하였다. 그중 Duolite A7 수지(Diamond Shamrock사)는 비교적 높은 양의 핵산이 함유된 히아루론산 용액에서 핵산 제거율이 높았으며, hydroxyapatite (Bio-Rad사)는 아주 작은 양의 핵산까지 잘 제거하였기 때문에 Duolite A7 수지 처리 후에 hydroxyapatite 수지를 처리하여 핵산제거를 시도하였다. Duolite A7 수지에서 최대 핵산 제거조건을 찾기 위하여 pH와 전도도를 변화시키는 실험을 수행하였다. 히아루론산 용액에 pH를 변화시키면서 Duolite A7 수지를 통과시킨 결과 히아루론산의 제거율은 pH가 증가 할수록 감소하였고, 핵산 제거는 pH 7 부근에서 65%로 가장 잘 되었다. 핵산 함량이 0.15%, 히아루론산의 농도가 3.0g/l, pH가 7인 히아루론산 용액에 전도도를 변화시키면서 Duolite A7 수지를 통과시킨 결과(Fig. 5) 전도도 40mS에서 히아루론산의 회수율과 핵산제거율이 가장 좋았다.

Duolite A7 수지를 통과시킨 결과 히아루론산 중 핵산 함량이 0.06%로 의약품 규격인 0.02%보다 높아 Duolite A7 수지를 반복하여 통과시켰어도 핵산 함량이 0.02% 이하로는 감소되지 않았다. 히아루론산 중 핵산 함량을 의약품 규격인 0.02% 이내로 하기 위하여 hydroxyapatite 수지작업을 수행하였다. 히아루론산이 고점도인 관계로 hydroxyapatite 수지의 경우 column작업이 불가능하여 히아루론산 용액(핵산함량 0.05%, 히아루론산 농도 2.0g/l, pH 7.0, 전도도 0.2mS)에 첨가하여 30℃에서 2시간 동

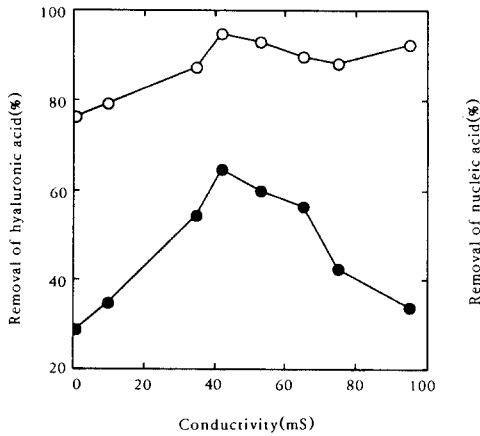


Fig. 5. Effect of conductivity on Duolite A7 column. Recovery of hyaluronic acid(○) and removal of nucleic acid(●).

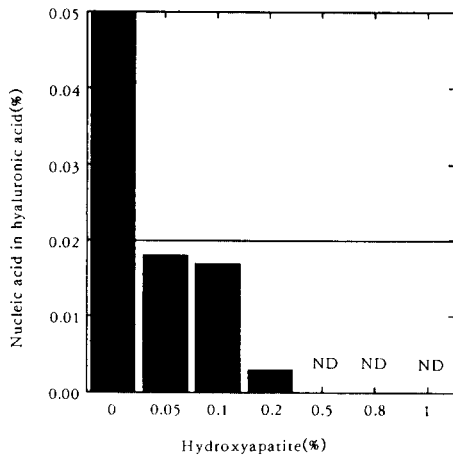


Fig. 6. Effect of hydroxyapatite concentration on removal of nucleic acid. ND=not detectable.

안 반응시킨 후 여과하여 수지를 제거한 후 핵산함량을 측정하였다(Fig. 6). Hydroxyapatite 농도를 0.2% 이상 첨가하면 핵산은 거의 제거되었다. 이 용액을 0.2 μ m의 cellulose acetate filter를 사용하여 제균여과를 하였고 무균적으로 히아루론산을 1M NaCl 용액으로 만든 후 2배의 에탄올 용액과 함께 처리하여 침전시킨 후, 에탄올로 세척하여 NaCl을 제거하였다. 침전된 히아루론산을 제균된 질소가스로 건조시켰다.

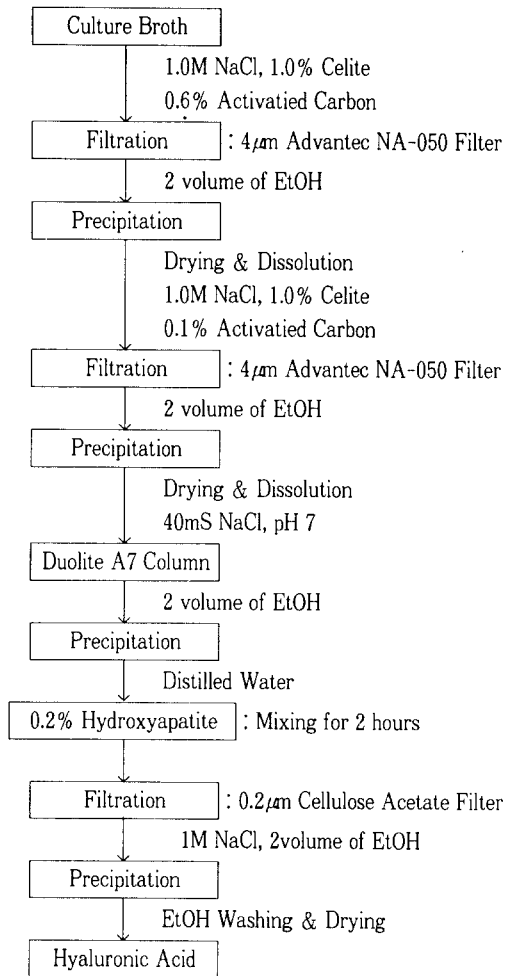


Fig. 7. Purification process of biosynthesized hyaluronic acid for its medical application.

정제 과정 중의 핵산과 단백질의 함량변화

정제과정을 요약하면 Fig. 7과 같다. 발효 배양액을 1.0M NaCl과 0.6%의 활성탄과 1.0%의 규조토를 첨가한 후 1시간 이상 혼합하여 필터(Advantec NA-050, pore size 4 μ m)를 사용하여 여과하였다. 이 여과액과 에탄올을 Y관을 이용하여 1:2 비율로 섞어 히아루론산을 침전시켰다. 침전된 히아루론산을 건조시킨 후 1.0M NaCl과 0.1%의 활성탄과 1.0%의 규조토를 첨가한 후 완전히 용해되면 필터(NA-050)를 사용하여 여과하였다. 이 여과액과 에탄올을 Y관을 이용하여 1:2 비율로 섞어 히아루론

Table 2. Content change of protein and nucleic acid of hyaluronic acid during purification.

Purification step	Recovery of hyaluronic acid(%)	Content of protein(%)	Content of nucleic acid(%)
Filtrate of fermentation broth	98.0	2.260	0.410
Filtrate after the first ethanol precipitation	82.4	0.284	0.050
Filtrate after the second ethanol precipitation	64.5	0.172	0.016
Solution after passing Duolite A7 column	56.6	0.060	0.002
Filtrate after the third ethanol precipitation	50.7	0.050	ND
Filtrate after treatment of 0.2% hydroxyapatite	48.0	ND	ND

ND=not detectable

산을 침전후 건조시켰다. 건조된 히아루론산을 증류수에 녹이고 NaCl을 첨가하여 전도도 50mS, pH 7이 되게 하여 Duolite A7 수지를 통과시켰다. 수지 통과된 액을 2배의 에탄올과 함께 처리하여 침전시켰다. 침전된 히아루론산을 증류수에 녹인 후, hydroxyapatite 수지를 0.2% 첨가하여 2시간 반응시켰다. 용액 중 수지를 제거한 후, 제균여과(0.2 μ m의 cellulose acetate filter)를 하였고 무균적으로 히아루론산을 1M NaCl 용액으로 만든 후 2배의 에탄올 용액과 함께 처리하여 침전시킨 후, 에탄올로 세척하여 NaCl을 제거하였다. 세척한 히아루론산을 건조시켰다.

정제과정 중 핵산과 단백질의 함량을 조사한 결과 Table 2와 같았다. 에탄올처리와 여과 과정 중에 많은 부분의 핵산과 단백질이 제거되었고 보다 완전하게 제거하기 위하여 수지작업을 수행하였다. Duolite A7 수지를 통과한 이후에는 단백질이 거의 제거되었고 hydroxyapatite 수지를 처리한 이후에는 불순물인 핵산과 단백질이 거의 제거(분석방법으로 측정이 안되는 수준)되었다.

요 약

히아루론산 정제과정 중 불순물인 핵산과 단백질을 제거하기 위하여 여러 가지 균체제거 실험을 수행한 결과 여과에 의한 방법이 히아루론산 용액 중의 단백질과 핵산이 가장 잘 제거되었다. 보다 효과적으로 핵산과 단백질을 제거하기 위하여 활성탄과 규조토를 첨가하여 여과하였다. 여과시 히아루론산의 회수율과 핵산 및 단백질 제거율을 살펴 본 결과 활성탄 농도 0.6%와 규조토 농도 1.0% 첨가하는 경우를 최적 여과조건으로 선정하였다. 에탄올 첨가는 에탄올과 히아루론산 용액을 동시에 첨가하는 경

우에 히아루론산의 회수율과 핵산 및 단백질 제거율이 가장 좋았다. 에탄올에 의한 히아루론산의 침전시 최적조건을 찾기 위해 pH와 전도도를 변화시키는 실험을 수행하였다. pH와 전도도에 따른 핵산과 단백질의 제거 정도는 큰 차이를 보이지 않았고 에탄올에 의한 히아루론산의 침전은 pH 7, 전도도 100mS(1.0M NaCl 정도에 해당)에서 최적이었으며, 이때 히아루론산의 회수율은 약 85% 정도이었다. 에탄올 침전과 여과 과정에서 히아루론산 용액 중의 단백질은 거의 제거되었으나, 핵산은 완전히 제거되지 않았다. 핵산을 완전히 제거하기 위하여 Duolite A7 수지를 통과시킨 결과 pH 7, 전도도 40mS 부근에서 핵산제거율이 65%로 가장 좋았다. 히아루론산 용액 내의 잔존 핵산은 hydroxy-apatite 0.2%를 처리하여 거의 제거할수 있어 그 결과 불순물인 핵산과 단백질이 각각 0.02%, 0.01% 이하인 의료용 히아루론산을 만들 수 있었다.

감 사

본 연구는 제일제당(주) 종합연구소에서 수행된 연구결과로서 이에 깊이 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. E. A. Balazes and P. Band(1984), *Cosmet. Toilet.*, **99**, 65.
2. V. B. Jennifer(1986), *Bio/Tehnology*, **4**, 780.
3. 김태진(1990), *생물화공*, **4(1)**, 56.
4. K. Meyer and J. W. Palmer(1934), *J. Bio. Chem.*, **107**, 629.
5. A. Markovitz, J. A. Cifonelli and A. Dorfman(1959), *J. Bio. Chem.*, **234**, 2343.

6. D. A. Swann(1970), *Arch. Ophthalm.*, **88**, 544.
7. A. Nimrod, B. Greenman and D. Kanner (1988), *US Patent*, 4,780,414.
8. O. Schmut and H. Hofmann(1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **673**, 192.
9. 김태진, 현상원, 강엽(1990), 한국특허, 90-5774.
10. H. Saari, Y. T. Kontinen and S. Santavirta (1989), *Med. Sci. Res.*, **17**, 99.