한국생물공학회지 제 11 권 제 5 호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 11. No. 5. 606-612(1996)

결정화 반응이 결합된 글루탐산의 이온교환

이 기 세
명지대학교 화학공학과

Ion Exchange of Glutamic Acid Coupled with Crystallization

Kisay Lee
Department of Chemical Engineering, Myong-Ji University, Yongin, Kyongki 449-728, Korea

ABSTRACT

A specific amino acid in a mixture can be crystallized inside an ion exchange column when displacer concentration is high enough to concentrate the amino acid in a pure band beyond its solubility limit. Glutamic acid formed a discrete crystal layer in a cation exchanger column by operating displacement development mode and using a high concentration of displacer NaOH. The glutamic acid crystal formed was eluted from the column with the effluent stream and collected in a fraction collector. When 1.0 M of NaOH was used as a displacer, more than 60% of the loaded glutamic acid was recovered as crystal. The continuous crystallization and dissolution of crystal occurred, resulting in apparent movement of the crystal along the column without clogging or pressure increase. NaOH was proved a better displacer than NaCl because hydroxide ions neutralized hydrogen ions released from the resin and thus reduced the number of hydrogen ion competing with sodium ion for re-adsorption. The displacement development process coupled with crystallization provided higher concentration and recovery of glutamic acid than conventional chromatography.

서 론

미생물 발효에 의한 아미노산의 생산은 이온교환, 결정화 등이 포함된 다단계 분리·정제 공정을 거치게 된다. 고정상 이온교환 공정은 아미노산, 핵산, 단백질 등 유전생물공학 산물의 분리정제에 있어서 고순도의 생산물을 얻을 수 있으며 연속적인 운전이 가능한 반면 운전도중 컬럼내에서 용질의 결정화 또는 침전 반응이 발생할 수 있다는 결점이 있다(1-3). 결정화 또는 침전 현상은 컬럼내에서 이동하는 용질이 용해도 이상으로 그 농도가 증가할 때 발생하게 되는데 분석용 elution chromatography나 HPLC에서는 드물지만 process chromatography, displacement development, 또는 수지재생 과정에서는 그 특성상 빈번히 발생하게 된다(1-3). 컬럼내에서 침전이나 결정화로 인하여 고체입자가 형성되면 이들이 interstitial space 또는 pore space를 이동하는 유체의 흐름을 어렵게 하여 컬럼 양단에 걸리는 압력차를 증가시키고 또한 수지 functional group으로의 counter-ion 접근을 방해하여 이온교환 용량을 저하시킨다. 이에 따라 용질들의 비이상적인 거동과 운전결과의 예측 및 해석을 어렵게 하는 결과가 초래되며 심한 경우 정체된 난용성 염이 형성되면 더 이상의 운전이 불가능하게 되어 결국 설비를 해체시켜 새 수지로 교환해야 하는 사태에 이를 수 있다. 따라서 생화학물질의 분리·정제에는

이러한 결정화 및 침전반응이 가급적 발생하지 않도록 운전하는 것이 일반적이다.

이온교환 크로마토그래피의 운전방식은 크게 elution 방식, 전열분석(frontal analysis) 방식, 치환전개(displacement development) 방식으로 나누어지는데 이중 치환전개 방식은 elution 방식에 비해 한번에 많은 양의 feed를 loading할 수 있으며 생산물의 농축효과를 얻을 수 있다는 장점 때문에 preparative 및 process chromatography에 많이 사용되고 있다(5-9). 치환전개에서는 혼합물 feed를 컬럼에 주입시켜 입구근처에 equilibriation시킨 후 사용하는 이온교환 수지에 대해 feed 성분들보다 강한 선택도(selectivity)를 가진 치환유도성분(displacer)을 선정하여 연속적으로 주입한다. Feed 성분들은 치환유도성분의 유입에 밀려 컬럼을 따라 이동하면서 선택도의 크기 순으로 재배열하게 되며 결과적으로 pure band를 이루면서 일정한 속도로 이동하는 등속상태(isotachic condition)가 이루어져 선택도가 작은 성분부터 순서대로 컬럼으로부터 배출된다. 분리되어 배출되는 pure band의 농도는 사용한 치환유도성분의 선택도의 크기와 농도에 의해 feed에서의 농도에 비해 증가할 수 있는데 이 농축효과가 과잉으로 큰 경우 용해도가 작은 성분은 컬럼내에서 이동도중 용해도 한계 이상으로 농축되어 침전 내지는 결정화 현상이 발생할 수 있다. 따라서 치환전개에 의한 분리·정제의 경우 결정화 또는 침전 현상을 피하기 위해서는 적절한 치환유도성분을 선정해 놓고도 그 사용농도를 제한해야 한다(3, 8).

하지만 만일 컬럼상에서 feed 혼합물중 어떤 특정 성분이 선택적으로 결정화가 일어날 수 있고 동시에 이로 인한 수지의 fouling 문제가 심각하지 않다면 이러한 결정화 현상이 이온교환의 분리효율을 증진시킬 수 있으며 추후 거쳐야 할 정제조작의 부담을 줄일 수도 있을 것이다. 본 연구에서는 양이온 교환수지 컬럼에서 치환전개에 의해 glutamic acid가 이동할 때 displacer의 농도를 조절하여 인위적으로 결정화를 유도함으로써 이러한 결정화 반응의 발생 기작과 glutamic acid의 이온교환 및 치환전개에 의한 이동에 미치는 영향을 고찰하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 분석

강산성 양이온 교환수지로 가교도 8%의 100~200 mesh Dowex 50W-X8(Dow Chemical)를 사용하였다. 이 수지는 divinylbenzene으로 공중합시킨 polystyrene matrix에 sulfone기(SO_3^-)가 관능기로 공유결합되어 있는 고분자성 수지이다. 1M HCl로 H형으로 전환한 후 105℃의 dry oven에서 15시간 건조시킨 건조수지를 실험에 사용하였다. 회분식 평형실험에 의해 밝혀진 건조수지의 이온교환용량은 5.1 meq/g이었으며 모든 실험은 25℃에서 수행하였다. 아미노산은 L-form의 tissue culture grade(Fisher Scientific)를 사용하였으며 단일 성분의 아미노산 분석에는 구리착물법(10)을, 그리고 Na^+ 이온의 농도는 AAS(Perkin Elmer 430)를 사용하여 분석하였다.

실험방법

아미노산의 흡착평형 등온선을 구하기 위해 1 g의 H형 수지에 농도를 알고 있는 10여개 서로 다른 농도의 50 mL 아미노산 용액을 가하여 6시간 동안 부드럽게 교반하였다. 평형도달시간은 4~5시간이면 충분하였다. 평형에 도달하면 상등액을 여과하여 수지를 제거한 후 액상의 아미노산 잔류농도를 측정하였다. 수지에 결합된 수지상 아미노산의 양은 실험에 사용한 초기 아미노산의 양에서 액상 잔류량을 뺌으로써 계산하였다. 고정상 이온교환을 위하여는 내경 14 mm의 컬럼에 6 g의 H형 건조수지를 충진하여 사용하였으며 모든 실험에서 1.0 mL/min의 일정한 유속을 사용하였다. Na^+를 이용한 파과실험(breakthrough analysis)을 통하여 측정된 이온교환 컬럼의 총용량은 약 30 meq였으며 건조수지의 용량이 약 2% 저하되었음을 알 수 있었다. 아미노산의 치환전개를 위한 displacer로는 Na^+를 사용하였다. Displacer로 사용한 NaCl 용액의 pH는 7.0 ±0.4였으며 NaOH 용액의 pH는 12 이상이었다. 컬럼내 수지를 H형으로 재생하기 위해서는 1M HCl을 사용하였다. 이온교환 도중 생성된 결정이 fraction collector에 회수된 경우 얻어진 결정의 양은 먼저 상등액의 농도를 측정하고 너무 높지 않은 온도로 가열-vortexing을 반복하여 결정을 재용해시킨 후 총농도를 재어 두 양의 차이로써 계산하였다.

결과 및 고찰

등온선과 결정화 조건

컬럼내에서 결정화가 발생하는 현상은 가상적인 등온선 Fig. 1의 예로 설명할 수 있다. C_e와 Q_e는 이온교환 평형시 액상과 수지상에 존재하는 용질 농도

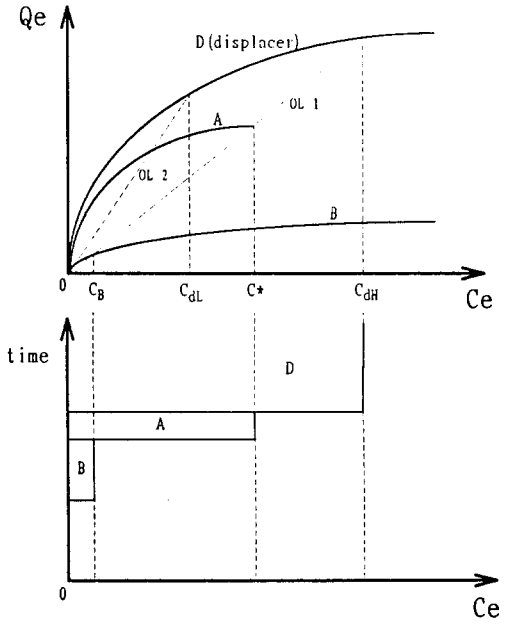

Fig. 1. Hypothetical isotherms and crystallization constraint. OL_1 and OL_2, operating lines; C_{dL}, lower limit of displacer concentration; C_{dH}, upper limit of displacer concentration; C*, solubility limit of solute A; C_B, eluting concentration of solute B when displacer is at C_{dH}.

를 의미한다. Fig. 1에서 볼 때 실험범위에서 용질 D와 B의 용해도는 충분히 크나 용질 A는 C*라는 낮은 용해도를 갖고 있다. 만일 A와 B의 용해도가 충분히 크다면 A와 B로 구성된 혼합물을 D를 displacer로 사용하여 길이가 충분한 컬럼에서 치환전개할 때 D의 농도를 증가시킬수록 A와 B의 농축효과도 증가하여 D 앞에서 A, B의 순으로 나란히 배출될 것이다. 그러나 A의 용해도가 C*라는 제한된 값을 가지므로 D의 사용농도는 하한값 C_{dL}, 상한값 C_{dH}의 범위로 국한해야 한다. C_{dH}를 결정하는 OL_1은 용질 A 곡선의 용해도 한계를 지나는 직선이며 C_{dL}을 결정하는 OL_2는 선택도가 작은 용질 B 곡선에 대한 원점에서의 접선이다. 만일 displacer D의 농도를 C_{dH}로 사용하면 이상적인 경우에 D 앞에서 A가 C*의 농도로, 그리고 A 앞에서 B가 CB의 농도로 직각의 band를 이루어 차례로 컬럼으로부터 배출된다(Fig. 1 아랫그림). 그러나 C_{dH}보다 큰 displacer D의 농도를 사용하게 되면 A가 C* 이상으로 농축되며 그 초과분만큼 결정 내지는 침전이 형성될 것이다. 반면 C_{dL}보다 작은 농도의 D를 사용하면 A는 displacer와 무관하게 이동하여 농축효과없이 컬럼으로부터 배출된다.

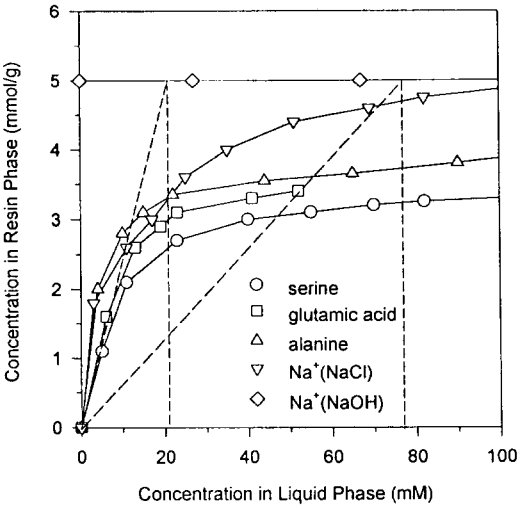

Fig. 2. Ion exchange isotherms of amino acids and displacers at 25℃. ---, operating lines.

Fig. 2는 회분식 평형실험에 의해 얻어진 실제 아미노산과 displacer의 이온교환 수지에 대한 등온선을 나타내었다. 아미노산 용액은 중성 pH의 수용액에 용해하여 제조하였으므로 매 data point마다 pH는 일정하지 않다. 그림에서 glutamic acid의 용해도는 약 52 mM로써 문헌(11)에 보고된 수용액상에서의 용해도 49 mM보다 약간 높게 관찰되었다. Alanine은 glutamic acid보다 높은 선택도를, serine은 낮은 선택도를 보였다. NaCl을 displacer로 사용할 때 Na^+는 30 mM 이상에서는 아미노산들보다 충분히 큰 선택도를 보였으며 NaOH를 사용한 경우의 Na^+의 등온선은 수직증가를 하여 계단모양의 등온선을 보이며 전체 농도범위에서 큰 선택도를 보였다. 만일 glutamic acid, alanine, serine이 포함된 혼합물을 NaOH로 치환전개할 경우 C_{dH}는 약 78 mM, C_{dL}은 약 21 mM임을 알 수 있다.

Displacer co-ion의 영향

Fig. 2의 등온선에서도 암시하는 바와 같이 NaCl과 NaOH를 displacer로 사용할 때 sulfone기에 H^+가 결합되어 있는 양이온 교환수지에 대한 co-ion인 Cl^-과 OH^-는 치환전개 효율에 큰 차이를 보인다. Fig. 3은 30 mM glutamic acid 100 mL를 컬럼에

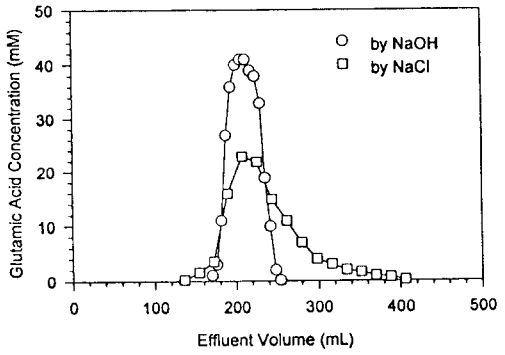

Fig. 3. Effect of co-ion on the displacement development of glutamic acid driven by 70 mM NaOH and NaCl. Feed: 100 mL of 30 mM glutamic acid.

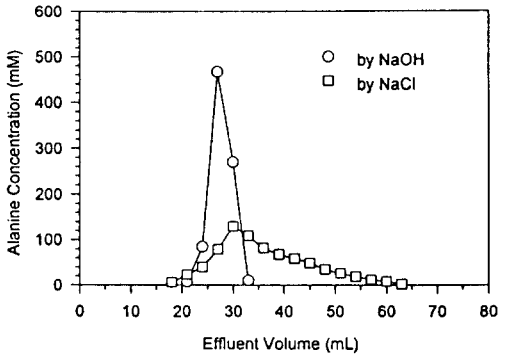

Fig. 4. Effect of co-ion on the displacement development of alanine driven by 1.0 M NaOH and NaCl. Feed: 100 mL of 30 mM alanine.

feeding한 후 70 mM NaOH와 70 mM NaCl로 치환전개했을 때 얻어진 elution profile이다. Na^+ 농도 70 mM은 glutamic acid 농도가 용해도 한계 이내로 유지되는 값이기 때문에 실제로 실험도중 결정화 현상은 관찰되지 않았다. Fig. 4는 30 mM alanine 100 mL를 1M NaCl과 1M NaOH로 각각 치환전개한 결과이다.

Fig. 3과 4에서 보면 NaOH를 displacer로 사용한 경우에 배출되는 아미노산의 농축효과가 NaCl의 경우보다 현저하게 컸으며 더 sharp한 band를 형성했는데 이는 유입되는 Na^+에 의해 수지로부터 치환되어 나오는 H^+가 OH^-에 의해 중화됨으로써 Na^+와 경쟁하여 수지에 재결합하려는 용존 H^+가 줄어든 때문이라고 볼 수 있다. 그리고 glutamic acid와 alanine 두 경우 공통적으로 feed 농도에 비해 배출 band의 농도가 증가한 것은 실제 아미노산이 displacer에 의한 치환전개 기작에 의해 이동했다는 증거이다. 또한 glutamic acid의 등전점(pI=3.22)보다 높은 pH는 glutami acid를 음이온화시킴으로써 양이온 교환수지에 대한 선택도를 떨어뜨리게 되며 이것이 glutamic acid의 탈착과 농축을 더욱 촉진한다고 볼 수 있다. 반면 NaCl의 경우에는 치환된 H^+가 해리된 H^+Cl^-을 형성함으로 다시 Na^+와 경쟁하여 수지에 재결합할 수 있으므로 그만큼 Na^+의 치환효과가 저하된다고 볼 수 있다. 따라서 long tail을 가진 broad한 band를 보이며 Fig. 2에서 예측할 수 있는 배출농도보다 낮은 peak를 보였다. 즉 H형 이온교환 수지에 대한 아미노산 치환전개에 있어서는 NaOH가 NaCl보다 훨씬 효율적인 displacer라고 할 수 있다. Fig. 3과 Fig. 4 모두 아미노산의 결정화 현상은 관찰되지 않았다. 참고로 Fig. 4의 실험과 동일한 조건에서 수행한 serine의 실험은 alanine과 비슷한 elution curve를 보였으며 역시 결정화 현상은 관찰되지 않았다(Data 생략).

결정화가 수반된 이온교환

Glutamic acid에 대한 상한농도 C_{dH}(Fig. 2에서 약 78 mM)보다 큰 농도의 NaOH를 displacer로 사용한 경우 glutamic acid의 치환전개 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Feed로 30 mM glutamic acid 100 mL을 사용하였고 NaOH의 농도는 0.1 M, 0.5 M, 1.0 M를 사용하여 그 차이를 비교하였다. NaOH가 연속적으로 주입됨에 따라 컬럼 입구 근처에서부터 glutamic acid의 결정입자가 서서히 형성되기 시작하였으며 시간이 지나면서 일정한 두께의 결정층이 이루어져 컬럼을 따라 이동하였다. 이 결정입자들은 최종적으로 컬럼으로부터 배출되어 fraction collector에 모여졌으며 얻어진 결정의 양은 먼저 상등액의 농도를 측정한 후 가열시켜 재용해한 후 총농도를 재서 그 차이로써 계산하였다. Fig. 5b와 5c에서 점선은 회수된 결정의 농도를 나타낸다. 0.1 M NaOH를 사용한 경우(Fig. 5a)에는 컬럼내에서 이동도중 약간의 결정 생성이 관찰되었으나 fraction collector로 회수되지는 않았다. Fig. 5b와 5c에서는 확연한 결정층이 생겨 컬럼을 이동하였으며 0.5 M NaOH에 의해서는 약 28%(Fig. 5b), 1.0 M NaOH에 의해서는 약 62%(Fig. 5c)의 glutamic acid가 결정으로 fraction collector에 회수되었다.

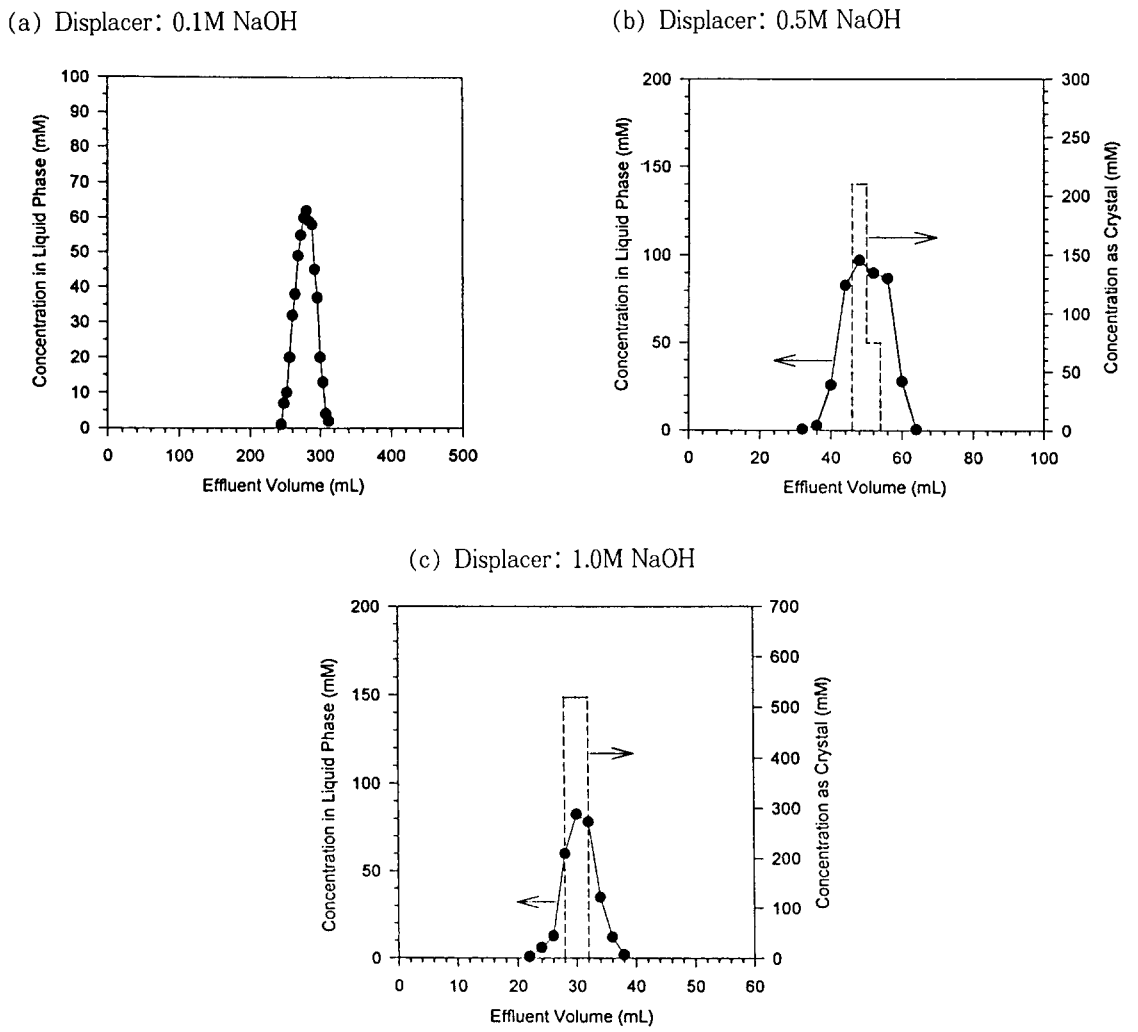

Fig. 5. Effect of displacer concentration on the crystallized elution of glutamic acid driven by (a) 0.1 M, (b) 0.5 M, and (c) 1.0 M NaOH. Feed: 100 mL of 30 mM glutamic acid.

한편 Fig. 5b와 5c에서 최대 결정농도가 얻어지는 배출부피의 위치가 최대 액상농도를 보이는 위치와 비슷한 값을 나타내는 것으로 보아 glutamic acid 결정층의 이동속도는 displacer 이동속도와 동일함을 알 수 있다. 그 이유는 결정이 이동하는 기작이 단순히 고정상내 interstitial fluid를 따라 이동하는 것이 아니라 일정한 두께의 결정층이 형성된 뒤에 앞경계면에서는 계속 새로운 결정화가, 그리고 뒷경계면에서는 기존결정의 재용해가 일어나면서 컬럼을 이동하는 소위 이동결정층(moving crystal layer)이 형성되기 때문이며 또한 이 결정화 속도와 재용해 속도가 비슷하게 균형을 이루고 있기 때문이라고 설명할 수 있다. Fig. 6에 이러한 결정층 이동의 개념을 도시하였다. 또한 컬럼운전도중 심각한 압력강하 현상이 관찰되지 않았는데 그 이유도 이러한 결정화-재용해가 반복되는 기작으로 말미암아 결정화 현상이 수지 fouling 문제점을 일으키지 않기 때문이라고 판단된다. 참고로 혼합형 이온교환 수지를 이용한 바닷물의 탈염공정이나 양이온수지를 이용한 중금속 함유 폐수처리 공정에서 수지를 재생할 때는 무기염 침전에 의한 이동성이 없는 정체침전층(stationary precipitate layer)이 형성되어 clogging 및

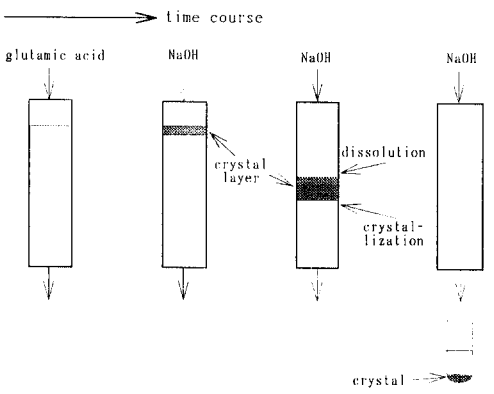

Fig. 6. Schematic mechanism of crystal movement by displacement development for glutamic acid on a cation exchanger column.

이온교환 용량저하 현상이 심각해진다(12, 13).

한가지 특기할 사항은 얻어지는 액상 glutamic acid의 농도는 Fig. 2에 보이는 용해도 한계값(52 mM)보다 크게 증가할 수 있다는 점이다. 0.1 M NaOH(Fig. 5a)의 경우에는 약 65 mM까지 증가하였고 0.5 M NaOH(Fig. 5b)와 1.0 M NaOH(Fig. 5c)를 사용한 경우 공통적으로 peak 농도는 각각 80 mM, 100 mM로 이론상 용해도 한계인 52 mM보다 약 2배 가까이 증가하였다. 아미노산의 용해도는 주변의 pH, ionic strength, 그리고 다른 아미노산의 존재 등에 의해 영향을 받을 수 있는데 특히 NaOH를 사용하는 경우 interstitial space의 pH는 glutamic acid의 등전점인 pI=3.22보다 커지므로 glutamic acid의 용해도가 증가한 것(14-17)이라고 설명할 수 있다. 용해도 측면에서 볼 때 이러한 결정화를 억제하는 high pH 환경에서도 다량의 결정이 얻어진다는 사실은 그만큼 NaOH에 의한 치환전개의 농축효과가 탁월하다는 증거이다. 또한 등전점보다 높은 pH는 glutamic acid를 음이온화시킴으로써 양이온 교환수지에 대한 선택도를 떨어뜨리게 되며 이것이 glutamic acid의 탈착과 농축을 더욱 촉진한다고 볼 수 있다. 그러나 결정회수율이 displacer NaOH 농도증가에 상응해서 언제까지 증가할 것인지는 본 연구에서 확인해 보지 않았으며 이와 같이 NaOH 농도를 증가시키면 농축효과는 증가하나 pH는 등전점으로부터 멀어짐으로 인해 용해도가 증가하는 서로 상반된 작용을 하므로 결정회수율을 높이

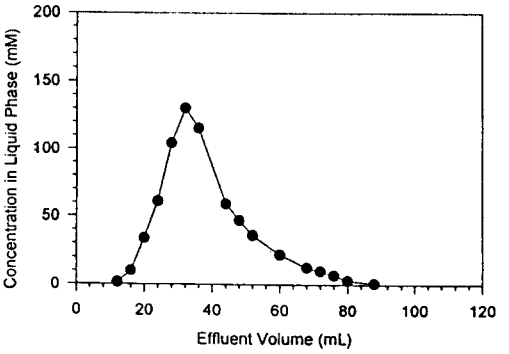

Fig. 7. Elution of glutamic acid driven by 1.0M NaCl as a displacer. Feed: 100 mL of 30 mM glutamic acid.

기 위해서는 이 두 인자에 대한 최적화 연구가 필요할 것으로 본다.

대조적으로 0.1 M, 0.5 M, 1.0 M NaCl을 displacer로 사용한 경우에서는 모두 결정이 형성되지 않았으며 long tail을 가진 broad한 배출분포를 보였다. Fig. 7은 1.0 M NaCl을 사용한 결과이다. Peak 농도가 약 130 mM이나 되었음에도 결정화 현상이 관찰되지 않은 것은 NaCl에 의한 높은 ionic strength 환경이 조성되어 용해도가 증가했기 때문이라고 볼 수 있다(15).

요 약

H형 Dowex 50W-X8 강산성 양이온 교환수지 컬럼을 이용하여 glutamic acid를 치환전개하면서 displacer의 농도를 증가시켜 인위적으로 결정화를 유도하였다. Displacer로 사용한 NaOH 농도를 증가시킴으로써 glutamic acid가 그 용해도 한계 이상으로 농축되면서 컬럼내에서 이동도중 결정층이 형성되었고 생성된 결정은 effluent stream을 따라 fraction collector로 회수되어졌다. 결정층이 이동하는 동안 clogging이나 압력강하의 문제점이 발생하지 않았으며 1.0 M NaOH를 사용할 때 62%의 glutamic acid가 결정으로 회수되었다. 수지로부터 치환되어 나오는 H^+에 의한 OH^-의 중화작용으로 인해 NaCl 보다는 NaOH가 효과적인 displacer임을 알 수 있었으며 보다 sharp하고 농축된 band를 얻을 수 있었다. Glutamic acid 결정층의 이동속도는 displacer 이동속도와 동일하였는데 그 이유는 결정이 이동하는 기작이 고정상의 interstitial fluid를

따라 이동하는 것이 아니라 일정한 두께의 결정층이 형성된 뒤에 앞경계면에서는 계속 새로운 결정화가, 그리고 뒷경계면에서는 기존결정의 재용해가 일어나면서 컬럼을 이동하는 것이며 또한 이 결정화 속도와 재용해 속도가 비슷하게 균형을 이루고 있기 때문이라고 설명할 수 있다. 이와 같은 이온교환중의 결정화 현상은 수지에 대한 선택도와 함께 용해도라는 부가적 분리인자를 동시에 사용함으로써 특정성분의 분리효율을 높일 수 있으며 이온교환 후 추가로 거쳐야 할 결정화 공정의 부담을 줄일 수 있을 것이다. 결정화-재용해가 비슷한 속도로 반복되는 이동결정층이 형성된다는 관찰은 본 실험에서 사용된 glutamic acid에만 적용할 수 있는 특이한 현상일 수 있으며 aspartic acid 등 다른 저용해도 아미노산에도 일반화할 수 있는 현상인지를 밝히기 위해서는 보충 연구가 필요하다. 더우기 이러한 결정화 현상은 단순히 용질의 용해도와 displacer 농도뿐만 아니라 pH, ionic strength, 사용하는 수지의 가교도, mobile phase의 유속, 사용하는 컬럼의 제원에도 영향을 받을 것이라고 사료되므로 결정회수율을 극대화하기 위한 최적조건의 도출 및 그 적용범위의 확대에 대한 연구가 필요하다.

감 사

이 논문은 1995년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비(과제번호: 04E0259)에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

1. S. M. Partridge and R. G. Westall(1949), *Biochem. J.*, **44**, 418.
2. F. Helfferich(1961), Ion Exchange, p. 165, McGraw-Hill, NY.
3. K. Popper, R. J. Bouthillet, and V. Slamecka (1963), *Science*, **141**, 1038.
4. R. Powell(1968), Monosodium Glutamate and Glutamic Acid, Noyes, NJ.
5. S. Claesson(1949), *Discuss. Faraday Soc.*, **7**, 34.
6. F. Helfferich and D. B. James(1970), *J. Chromatogr.*, **46**, 1.
7. H. K. Rhee and N. R. Amundson(1982), *AIChE J.*, **28**, 423.
8. C. Horvath, J. Frenz, and Z. Rassi(1983), *J. Chromatogr.*, **255**, 273.
9. K. Lee(1996), *Kor. J. Chem. Eng.*, **13**(2), 181.
10. R. Spies(1952), *J. Biol. Chem.*, **195**, 65.
11. J. P. Greenstein and M. Winitz(1984), Chemistry of the Amino Acids, Vol. 1, p. 564, Krieger, FL.
12. B. W. Page, G. Klein, F. Golden, and T. Vermeulen(1975), *AIChE Symp. Ser.*, **71** (152), 121.
13. K. Lee and J. Hong(1995), *AIChE J.*, **41**(12), 2653.
14. K. K. Nass(1988), *AIChE J.*, **34**, 1257.
15. C. C. Chen, Y. Zhu, and L. B. Evans(1989), *Biotechnol. Progr.*, **5**, 111.
16. R. B. Gupta and R. A. Heidemann(1990), *AIChE J.*, **36**, 333.
17. M. G. Brown and R. W. Rousseau(1994), *Biotechnol. Progr.*, **10**, 253.