

액막법을 이용한 IGF- I 회수

최 광 수 · 문 용 일

우석대학교 동물자원학과

Recovery of IGF-I Using Liquid Emulsion Membranes

Choi, K. S. and Y. L. Moon

Department of Animal Resource Science, WooSuk University

SUMMARY

A study was made to investigate the effects of concerning factors with IGF- I recovery on the final IGF- I concentration in the effluent and to establish recovery conditions of IGF- I using liquid emulsion membranes (LEM).

D₂EHPA was best carrier among Amberlite LA2, Aliquat 336 and D₂EHPA for recovery rate of IGF- I. Recovery rate of IGF- I by D₂EHPA volume in the oil phase was increased as increasing D₂EHPA volume, and optimal volume of D₂EHPA was 5% in this experiment. The recovery rate of IGF- I by D₂EHPA was increased by the decreasing from pH 7 to pH 4 of external phase. Therefore, optimal pH value was 4.0. Optimal concentrations of sulfuric acid in internal phase, paraffin oil in oil phase and Span 80 for recovery rate of IGF- I were 0.1M, 2.0% and 5%, respectively, and optimal W/O rate was 2.

These results suggested that optimal conditions for recovery of IGF- I were D₂EHPA(5%) as carrier, pH 4.0, 0.1M sulfuric acid, 2% paraffin oil, 2.0 W/O rate and 5.0% Span 80.

(Key Words: IGF- I, Liquid emulsion membranes, D₂EHPA, Sulfuric acid, Paraffin oil, W/O rate, Span 80)

I. 서 론

Liquid emulsion membrane(LEM)에 의한 분리 농축 기술은 Li(1968)가 처음 소개한 이후 여러 학자들이 증금속, phenol, 우라늄 및 크롬추출 그리고 폐수처리 등에 많이 활용해 왔다. 이 liquid emulsion membrane 방식을 통하여 Thien 등(1988)이 처음 아미노산 분리를 시도하였으며, 그들은 tricapryl quaternary ammonium salt(Aliquat 336)인 단백질 담체(protein carrier)를 이용하여 L-phenylalanine을 분리 추출하였다. 그러나 이 방법은 이온 농도

의 변화, 액막의 재생 등에 의한 여러 가지 어려움이 있어서 Hong과 Yang(1994) 및 Itoh 등(1990)은 새로이 양이온에 친화력을 가지고 있는 di-2-ethylhexyl phosphoric acid(D₂EHPA)라는 단백질 담체를 이용하여 L-phenylalanine의 분리에 성공하였다. 따라서 최근 액막에 의한 분리방법은 고분 자막을 이용한 방법보다 막의 접촉면이 크고 막의 두께가 얇아 기존의 분리방법과 비교하여 불 때 추출속도가 매우 빠르며, 역추출 조장이 필요치 않는 장점을 가지고 있다. 특히 각종 단백질 담체를 이용한 액막분리기술은 고선택성과 고농축성을 동시에 가지고 있으므로 그 실용화에 기대를 모으고 있다. 따라서 본 연구는 실험실에

이 논문은 1998년도 우석대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

서 IGF- I tracer를 이용하여 이제까지 중금속이나 아미노산 등의 저분자에서 이용하고 있는 LEM방식을 IGF- I의 정제에 적용함으로써 기존 정제방법을 통하여 얻은 것에 비하여 고순도를 유지하며 보다 저렴하게 생산할 수 있는 회수조건을 찾고자 본 연구를 실시하게 되었다.

II. 재료 및 방법

1. 실험장치 및 시약

본 실험에 사용한 추출 교반조는 외경 40mm, 내경 36mm, 높이 40mm인 반응조로서 pyrex glass를 사용하였고, 교반기는 길이 20mm, 높이 10mm의 2개의 날개가 달린 것을 사용하였다(Fig. 1). 교반속도 조절을 위해서 속도조절계를 제작하여 사용하였고, 에멀전 제조를 위해서 X-620 CAT homogenizer를 사용하였다. 추출 실험을 위해 사용한 추출제는 D₂EHPA (di-2-ethylhexyl-phosphoric acid: Mobil Chemical Co.)와 계면활성제인 Span 80(sorbitan monooleate: (주)순정화학)을 사용했으며 또한 희석제로 사용한 등유(kerosene: (주)순정화학)는 모두 특급시약을 사용했으며, 기타 실험에 사용한 시약도 모두 특급시약을 사용하였다. IGF- I은 본 실험실에서 사용 중인 IGF- I tracer를 사용하였다.

2. 실험 방법

1) W/O 에멀전 제조

일정량의 산성용액으로 산도를 맞춘 내부 수용액과 유기상에 추출제(D₂EHPA)와 계면활성제(Span 80)을 일정량 혼합한 다음 실험용 고속 교반기로(high speed homogenizer) 5,000 rpm에서 15분간 교반하여 사용하였다.

2) IGF- I 추출

IGF- I추출을 하기 위해 미리 제조한 IGF- I의 pH를 조절한 다음 추출반응조(Fig. 1)에 넣고 속도 조절계(speed controller)를 서서히 조절하여 교반속도가 20~30 rpm이 되도록 교반한다. 이어서 미리 제조한 에멀전을 마이크로 피펫을 사용하여 추출반응조에 서서히 적정 후 반응속도가 150 rpm이 되도록 조

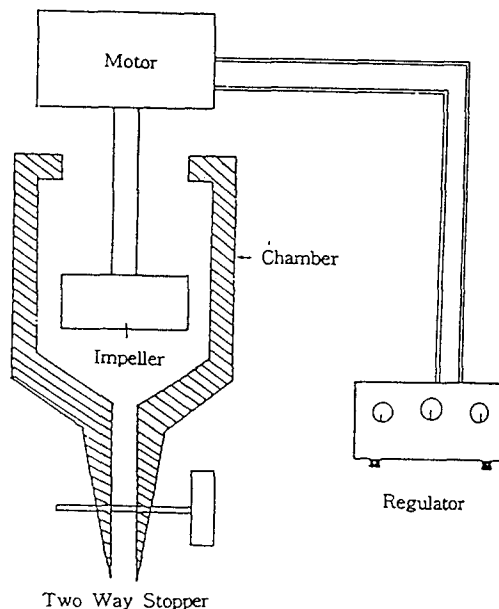


Fig. 1. Schematic diagram of extractor

절하였다. 시료는 일정한 시간이 경과후 교반을 중지하여 외부 수용액상과 에멀전상을 여과하여 분리한 다음 외부 수용액상과 내부 수용액상의 IGF- I의 농도를 동위원소 측정법으로 측정하였다. Table 1은 추출 실험에 사용한 실험조건을 나타낸 것이다.

Table 1. Experimental conditions of W/O/W type emulsion for IGF- I recovery

| Items | Ranges |
|-----------------------|---|
| 1. W/O emulsion | |
| 1) Internal phase pH | 0.01M~0.1M H ₂ SO ₄ |
| 2) Oil phase | Span80 : 1~5 VOL% D ₂ EHPA : 1~5 VOL% |
| 3) W/O ratio | 0.5~3.0 |
| 2. External phase | |
| 1) pH | 2~7 |
| 2) IGF- I unit | 20,000~200,000 CPM |
| 3. Stirring condition | |
| 1) Speed | 100~500 rpm |
| 2) Temperature | 20~30℃ |
| 3) O/W ratio | 5~30 |

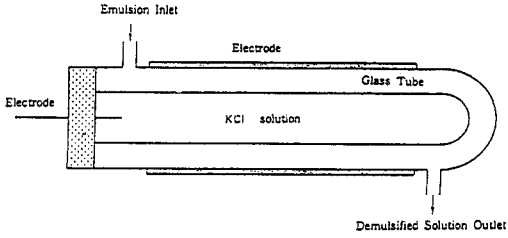


Fig. 2. Demulsification apparatus

3) 액막의 파괴

IGF- I의 단백질 활성을 유지하기 위해 화학적 액막파괴 방법을 사용하지 않았고, 고전압 상분리 장치에(Fig. 2) 의해 액막을 파괴한 후(Lorbrch, 1986) 내부 수용액을 유기상과 수상으로 분리하여 내부 수용액상의 IGF- I의 농도를 동위원소 측정법으로 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 추출 담체의 농도

여러 추출제를 이용하여 추출율을 조사한 바 그 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 본 실험에서 IGF- I을 추출함에 있어 D₂EHPA가 여러 추출제 중에서 가장 좋은 추출율을 보였다. 액막의 장점은 추출 및 역추출이 동시에 진행되므로 추출시약이 적게 들어간다. Fig. 4는 추출 담체인 D₂EHPA 농도를 유기상의 1

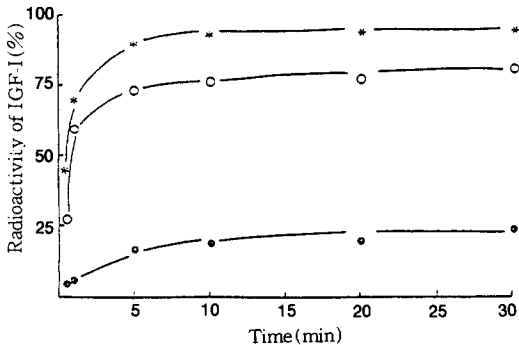


Fig. 3. IGF- I recovery rate with different carrier in LEM

* ; D₂EHPA, ○ ; Aliquit 336, ● ; Amberlite LA2

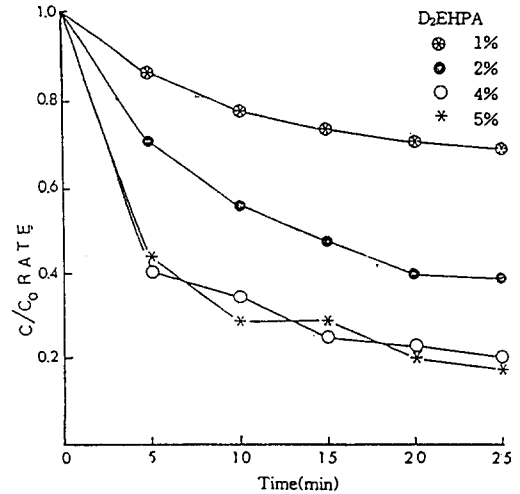


Fig. 4. The effect of D₂EHPA concentration on IGF- I recovery rate

~5%까지 변화시킨 결과인데, 추출 담체의 농도 증가에 따라 추출율 및 추출속도가 증가함을 알 수 있었고, 추출 담체의 농도가 5% 이상에서는 추출율의 증가가 별로 진척되지 않음을 관찰할 수 있었다(Fujinawa와 Morshita, 1984). 따라서 용매추출법에서는 추출제를 보통 20~50% 범위를 사용하나 액막법의 경우는 5% 정도도 충분한 것을 알 수 있었다.

2. 외부 수용액상의 산도 변화

IGF- I은 양, 음이온임으로 다른 유기산이나 금속이온처럼 전하가 결정되어 있는 것이 아니라 주변의 용액 상태에 의해 전하 상태가 결정되고, 외부 수용액상과 내부 수용액상의 수소이온(H⁺)의 농도 구배 및 IGF- I의 전하 상태가 액막 수송의 주된 구동력이 되므로 먼저 외부 수용액상의 pH 변화에 의한 영향을 조사하였다. Fig. 5은 내부 수용액의 황산농도를 0.1M로 일정하게 유지하고 외부 수용액상의 pH를 변화시키려면 IGF- I 추출 결과를 그림으로 표시하였다. 그림에서 보는 바와 같이 외부 수용액상의 pH가 7, 6, 5, 4로 변함에 따라 IGF- I의 추출율은 증가하고 추출 평형은 약 20분 후에 도달됨을 알 수 있었다. pH 7, 6, 5, 4에서의 추출율은 각각 38%, 62%, 73%, 81%로 IGF- I은 외부의 pH에 의해 추출율의 정량적 변화를

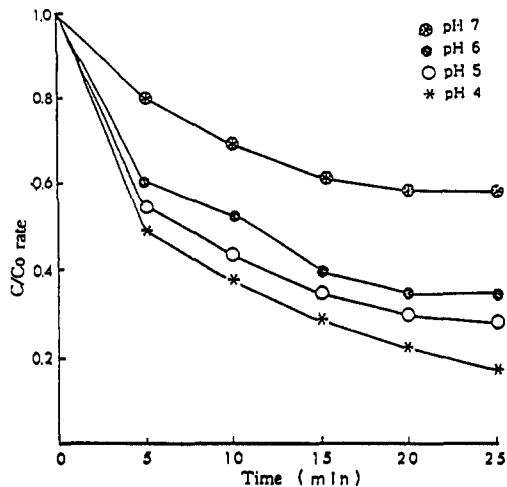


Fig. 5. The effect of pH on IGF-I recovery rate in external phase

관찰할 수 있었으며, pH가 4일 때 추출율이 제일 높았다. 따라서 외부 수용액상의 산도가 반응의 주된 구동력임을 알 수 있었다.

3. 내부 수용액상의 산도 변화

액막법은 전술한 바와 같이 용매추출법에 비하면 추출 및 역추출 반응이 동시에 진행되기 때문에 반응이 간단하다는 장점이 있다. 일반적으로 용매추출에서 역추출 기작은 반응의 속도를 결정하는 것으로 추출전체 속도에 큰 영향을 주며, 액막의 내부상과 유기상의 계면 반응 또한 전체반응 속도를 결정하는 요인으로 볼 수 있기 때문에, 본 실험에서는 H_2SO_4 의 농도를 0.01M, 0.02M, 0.05M, 0.10M로 하여 실시하였고, 이에 대한 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 그림에서 알 수 있듯이 내부 수용액의 H_2SO_4 농도가 증가함에 따라 역추출 속도가 빨라져 IGF-I의 추출 속도가 빨라짐을 알 수 있다. 따라서 본 실험에서는 H_2SO_4 가 0.1M일 때 좋은 것으로 나타났다.

4. Paraffin oil의 농도

액막의 안정성에 영향을 미치는 요인은 액막을 구성하는 성분과 제조방법이다. IGF-I의 경우 배지 용액에 소수성 고분자 물질들이 상당수 존재해 있으면서

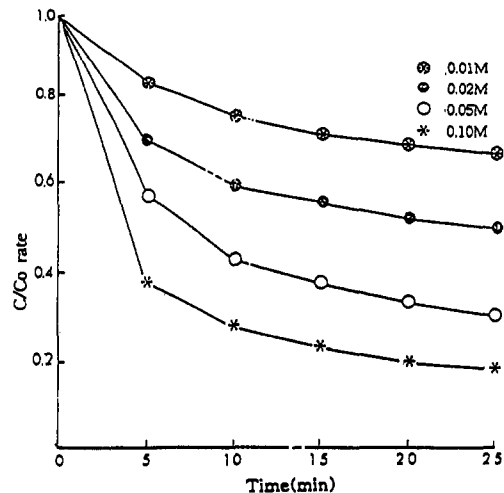


Fig. 6. The effect of H_2SO_4 concentration on IGF-I recovery rate in external phase

액막계에 영향을 끼쳐 에멀전의 팽윤현상 및 추출속도에 영향을 주는 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 에멀전의 파괴 및 팽윤속도를 감소시킬 수 있는 방법으로 에멀전을 구성하는 유기상에 막 강화로 paraffin oil을 첨가하여 실험하였다. Fig. 7는 paraffin oil의 농도증가에 따라 IGF-I의 추출율이 계면에서 막

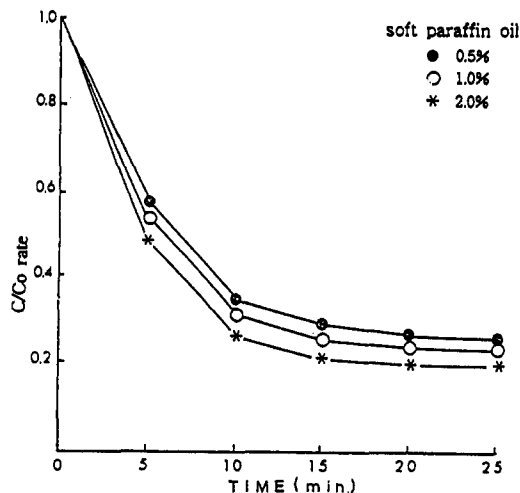


Fig. 7. The effect of paraffin oil concentration on IGF-I recovery rate

의 활성을 증진시키는 것으로 판단된다. 따라서 본 실험에서는 paraffin oil의 농도가 2.0%일 때가 제일 좋은 것으로 나타났다.

5. 내부 수용액상 대 유기상 부피의 비율

에멀전의 W/O 비율변화는 에멀전의 점성 및 액막계의 내부 수용액상의 크기 등을 변화시켜 주므로써 실제로 에멀전의 안정성 및 물질의 추출에 큰 영향을 주는 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서 W/O 비율이 액막 팽윤율에 미치는 영향을 조사하였던 바 그 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 W/O 비율 변화는 에멀전의 팽윤에 영향을 미치므로 적절한 W/O 비율이 액막계의 중요한 요소로 생각된다. 본 실험 결과 시간이 경과함에 따라 에멀전 팽윤율이 증가하였으나 W/O이 2/1일 때 제일 낮았는데 그것은 내부 수용액상의 부피 증가로 내부 수용액상의 계면에서의 계면활성제 성분 및 유기상의 상대적인 감소로 막의 안정성이 낮아지기 때문으로 생각된다.

6. 계면활성제의 농도

액막계에서 물질의 교환 및 막의 안정성, 액막의 파괴 등과 관련된 것으로 가장 중요한 요소는 계면활성제이다. 일반적으로 알려진 바에 의하면 계면활성제의

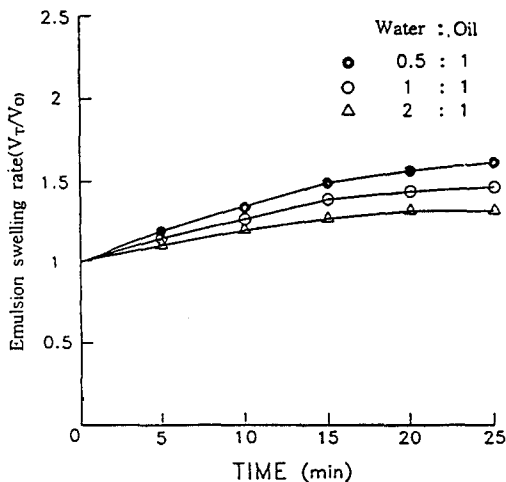


Fig. 8. Effect of W/O ratio on emulsion swelling rate

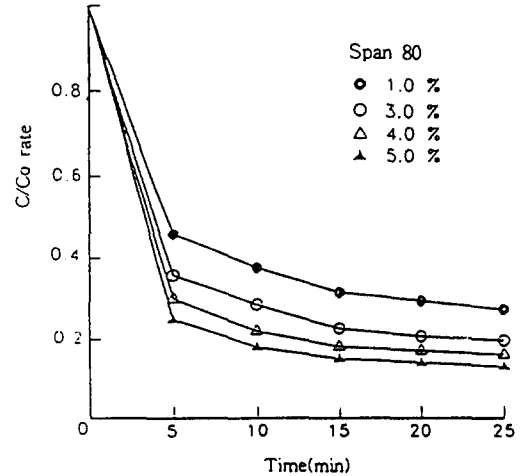


Fig. 9. Kinetics of IGF-I extraction at various Span 80 concentration

농도가 증가하면 액막의 안정성이 증가하고 액막의 파괴속도는 감소하게 된다. 한편 액막의 팽윤현상은 계면활성제로서 Span 80을 사용하였으며, Fig. 9는 Span 80의 농도 변화에 따른 IGF-I의 추출 정도를 나타내었다. 따라서 본 연구에서 IGF-I에 대한 구동력이 제일 좋았다. 또한 이 때 다른 유기화합물계를 추출하는 것보다 팽윤 정도가 심한 것을 알 수 있었는데 Ding과 Xie(1991)의 보고와 같이 IGF-I 배지용액 중의 고분자 물질들이 액막계의 유기상에 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

IV. 적 요

액막(liquid emulsion membrane)법에 의한 IGF-I의 추출조건을 수립하기 위해 여러 요인들의 IGF-I 추출에 미치는 영향을 조사하였다.

Amberlite LA2, Aliquot 336 및 양이온 추출제인 D₂EHPA 중에서 가장 좋은 추출율은 보인 추출 담체는 D₂EHPA였고, 추출 담체인 D₂EHPA의 양이 증가할수록 IGF-I 추출율이 증가했으며, D₂EHPA의 양이 5% 수준에서 가장 효과적이었다. 외부상의 pH가 7에서 4까지 감소함에 따라 IGF-I의 추출율이 증가하였고, 따라서 외부수상의 적정 pH는 4로 관찰되

었다.

IGF- I의 추출에 적합한 내부 수용액의 황산 농도, 유기상내 paraffin oil의 농도, W/O 비율 그리고 Span 80농도는 각각 0.1M, 2.0%, 2.0 그리고 5.0% 이었다.

따라서 본 연구는 IGF- I 회수조건으로 담체로는 D₂EHPA(5%), 외부 pH는 4.0, 내부 황산의 농도는 0.1M, paraffin oil 농도는 2.0%, W/O 비율은 2.0 그리고 Span 80농도는 5%일 때 가장 좋은 결과를 얻을 수 있음을 제시하였다.

V. 인용문헌

1. Ding, Xuan-cai and Fu-quan Xie. 1991. Study of the swelling phenomena of liquid surfactant membranes. J. of Membrane Science, 59: 183.
 2. Fujinawa, K. and T. Morshita, 1984. Demulsification of W/O emulsion by use of high voltage of A. C. fields. J. of Chemical Engineering of Japan, Vol. 17, No. 6: 632.
 3. Hong, S. A. and J. W. Yang. 1994. Process development of amino acid concentration by a liquid membrane technique. J. Membrane Sci., 86: 181-192.
 4. Itoh, H., M. P. Thien, T. A. Hatton and D. I. C. Wang. 1990. A liquid emulsion membrane process for the separation of amino acids. Biotechnol. Bioeng., 35: 853.
 5. Li, N. N. 1968. Separating hydrocarbons with liquid membrane. U. S. Pat., 3: 410-794
 6. Lorbrch, D. H. , J. Bart and R. Marr. 1986. Mass transfer in liquid membrane permeation. Ger. Chem. Eng., 9: 321.
 7. Thien, M. P. and T. A. Hatton. 1998. Liquid emulsion membrane and their application in biochemical processing. Sep. Sci. Technol., 23: 819.
- (접수일자 : 1998. 2. 23. /채택일자 : 1998. 3. 22.)