

## 11.4.7 크로마토그래피

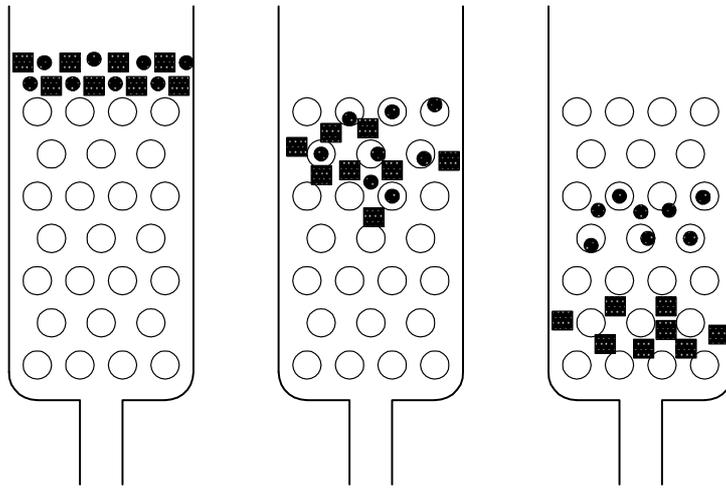
크로마토그래피(chromatography)란 다공성 흡착제 입자를 일정한 길이만큼 충전시킨 관(column)에 분리하려는 용질이 들어 있는 혼합물을 통과시켜 흡착제 입자에 대한 용질의 흡착 특성 차이에 근거하여 분리하는 방법이다. 즉, 시간이 지나면서 흡착제에 잘 흡착되지 않는 용질은 관의 멀리까지 이동하고 쉽게 흡착되는 용질은 이동하는 속도가 느리다.

크로마토그래피 공정은 이동상(mobile phase)과 고정상(stationary phase)으로 이루어진다. 고정상은 흡착제, 이온교환수지, 다공성 물질, 또는 겔 등이며, 이들은 원통형 관에 충전되어 있다. 이동상에는 분리하려는 용질이 포함된 용액과 용액을 고정상으로 운반하는 용출액이 있다. 시료성분은 고정상과 이동상으로 분배(partition)를 반복하면서 고정상 내를 이동하는데 각 성분에 따라 그 분배의 비율이 다르고, 고정상 내의 이동속도에 차이가 생겨 각 성분은 분리된다. 이동상의 종류에 따라 가스 혹은 액체 크로마토그래피로 분류된다. 가스 크로마토그래피는 열적으로(thermally) 안정된 휘발성 물질에 대한 분리능이 높고, 고감도이고, 빠르고, 간편하지만 비휘발성 물질의 분석에는 직접 적용할 수 없기 때문에 생물공정에서 얻어지는 생성물을 분리 정제 하는 데는 유용하지 않다. 그러나 액체 크로마토그래피는 적당한 용매에 용해되는 비휘발성 물질의 분석에 적합하다. 크로마토그래피는 다성분 혼합시료의 분리와 분석에 특히 위력을 발휘한다.

### 크로마토그래피의 몇 가지 형태

- 1) 이온교환 크로마토그래피(ion-exchange chromatography)는 이온 또는 전기적으로 전하를 띠는 화합물이 정전기적인 힘에 의해 이온교환수지에 흡착되어 평형을 이루는 것에 기초한다.
- 2) 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)는 용질분자와 지지체 위에 결합되어 있는 리간드(ligand) 사이의 특이한 화학적 상호작용에 기초한다. 리간드와 용질 사이의 친화성 결합은 특이적이다.
- 3) 겔 크로마토그래피(gel chromatography)는 용질분자의 크기와 모양에 따른 체류시간의 차이를 이용한다. 즉, 충전입자의 미세한 구멍으로 용질분자가 침투하여 긴 기간 동안 고체와 접촉하는 작은 입자와 구멍에 들어가지 못하여 고체와 짧은 시간만 접촉하는 큰 분자를 분리한다.
- 4) 고압액체 크로마토그래피(high-pressure liquid chromatography, HPLC)는 일반적인 크로마토그래피와 같은 원리에 기초하는 데, 충전관에 가해지는 높은 액체압력만 다르다. 고압의 액체와 조밀한 관 충전 때문에 HPLC는 용질분자에 분리능이 높고 분리가 빠르다.

이온교환과 친화성 크로마토그래피는 단백질과 다른 생물분자를 분리하는 데 가장 널리 사용되는 크로마토그래피 법이다. 이외에도 흡착 크로마토그래피(adsorption chromatography), 액-액 분배 크로마토그래피(liquid-liquid partition chromatography), 소수성 상호반응 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography), 종이 크로마토그래피(paper chromatography), 얇은 막 크로마토그래피(thin layer chromatography) 등이 있다.



기호설명 : ○ = 겔 입자, ■ = 큰 분자, ● = 작은 분자

그림 11.9 겔 크로마토그래피의 개념도

### 겔 크로마토그래피

겔 크로마토그래피(gel chromatography)는 겔 여과(gel filtration) 또는 겔 침투(gel permeation) 크로마토그래피라고도 한다. 겔 크로마토그래피는 정지상에 분자체(molecular sieve)를 사용하는데 이들은 세파덱스(Sephadex), 폴리아크릴아미드(polyacrylamide) 또는 아가로오스(agarose) 겔로서 친수성이므로 물을 흡수할 수 있고 팽윤된다(그림 11.9).

시료분자의 크기가 팽윤된 겔의 최대 구멍(pore)보다 크면 그 분자는 겔 입자를 통과하지 못하므로 정지상 입자 사이의 공간을 통하여 비교적 빨리 관 밖으로 나온다. 구멍보다 작은 분자는 그 크기와 모양에 따라 겔 입자의 미세한 구멍 속을 각기 다른 속도로 통과한다. 그러므로 가장 큰 분자가 먼저 관 밖으로 나오고 가장 작은 분자가 마지막에 나타난다.

겔 크로마토그래피에서 겔 베드(gel bed)의 총부피는 다음과 같은 식으로 표시된다.

$$V_t = V_0 + V_x \quad (11.37)$$

여기서,  $V_t$ ,  $V_0$ ,  $V_x$ 는 각각 겔 베드의 총부피, 보이드 부피(void volume)와 겔 분자체의 부피이다. 보이드 부피  $V_0$ 는 관에서 겔 분자체가 차지한 공간을 제외한 나머지 공간으로 일반적으로 겔 베드 총부피  $V_t$ 의 약 35%를 차지한다. 이 부피  $V_0$ 는 대개 분자량  $2 \times 10^6$  달톤의 blue dextran으로 측정한다.

여기서 시료 분자가 관을 통과하여 밖으로 나올 때까지 사용된 용리액의 양을 말하는 용리부피(elution volume,  $V_e$ )를 도입하면 시료분자가 관 내에서 지연되는 정도는 다음 식으로 표현된다.

$$REV = \frac{V_e}{V_0} \quad (11.38)$$

$$R = \frac{1}{REV} = \frac{V_0}{V_e} \quad (11.39)$$

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_x} \quad (11.40)$$

여기서,  $REV$ 는 상대적인 용리부피(relative elution volume),  $R$ 은 지연상수(retention constant),  $K_{av} = K_d$ 는 분배계수(partition constant)를 의미한다. 이미 분자량을 알고 있는 여러 물질에 대하여  $K_{av}$ 와 분자량의 관계를 도시해 놓은 그래프를 이용하여 미지의 물질에 대해  $K_{av}$ 를 측정하며 분자량을 알아낼 수 있다.

겔 크로마토그래피는 단백질, 펩티드, 핵산, 호르몬, 다당류들의 분리에 이용된다. 또한 겔 크로마토그래피는 고농도의 염으로 염석되어 분리된 단백질 분획으로부터 염을 제거하는 데 유용하다. 세파덱스 G-25와 같은 배제한계가 작은 겔을 사용하면, 단백질은 관을 통과하는 데 비하여 염은 겔에 들어 있다. 배제한계란 겔에 침투될 수 있는 최대 분자량이다. 이 값은 겔마다 다르며 1,000~수백 만 사이이다. 겔은 사용 전에 수시간 내지 수일 간 사용하고자 하는 용매 중에서 평형상태에 도달시켜야 한다.

#### 이온교환 크로마토그래피

이온교환 크로마토그래피(ion-exchange chromatography)는 이온 또는 하전된 화합물이 정전기적인 힘에 의해 이온교환수지에 결합되어 평형을 이루는 것을 이용한다. 이온교환 크로마토그래피의 정지상은 다양한 종류의 기능이 부착된 지지체인 이온교환수지이다(표 11.1). 이동상에 있는 반대 전하를 띤 용질은 정전기적 인력 때문에 정지상에 이끌린다. 음이온 교환수지에는 양으로 대전된 기능기(예: 트리에틸아미노에틸, 디에틸아미노에틸 등)가 지지체에 공유 결합으로 붙어 있으며 양이온 교환수지는 음으로 대전된 기능기(예: 술포메틸, 카르복시메틸 등)가 결합되어 있다. 지지체로 사용되는 물질로서는 폴리스티렌(polystyrene), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 셀룰로오스, 세파셀(Sephacel), 텍스트란, 아가로오스, 토요펄(Toyopearl) 등이 있다.

단백질 용액을 양이온 교환수지인 카르복시메틸-셀룰로오스가 충전된 관을 통과시키면 양이온 단백질들은 교환수지에 결합된다. 그리고 나서 완충액으로 세척하여 pH 또는 이온력을 증가시키면 결합이 약해져서 단백질들이 교환수지로부터 분리된다.

글리신(glycine), 아스파르테이트(aspartate)와 리신(lysine)의 세 가지 아미노산의 혼합물을 분리하는 경우를 생각해 보자. 우선 양이온 교환수지를 이용하여 pH 3.5에서 분리하

표 11.1 이온 교환수지의 종류

		이온 교환수지	기능기 명	약어
양이온 교환수지 (Cation exchangers)	강	-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -PO <sub>3</sub> H <sup>-</sup>	Sulfo- Sulfomethyl- Sulfoethyl- Phospho-	S- SM- SE- P-
	약	-COO <sup>-</sup> -CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>	Carboxy- Carboxymethyl-	C- CM-
음이온 교환수지 (Anion exchangers)	강	-CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sup>+</sup> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub>	Trimethylaminomethyl- Triethylaminoethyl-	TAM- TEAE-
	약	-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sup>+</sup> H <sub>3</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sup>+</sup> H(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> <sup>+</sup> H <sub>3</sub>	Aminoethyl- Diethylaminoethyl- Para-aminobenzyl-	AE- DEAE- PAB-

는 경우 아스파르테이트는 음전하를 띠지만 양전하를 띠는 글리신과 리신은 교환수지에 결합된다. 그러나 음이온 교환수지를 이용하면 pH 8.5에서 Gly는 관을 빠져 나오지만 Asp는 교환수지에 단단히 결합되어 있다. 이와 같이 교환수지에 원하는 물질이 결합되면 pH나 염 농도의 변화같은 적절한 처리를 하여 회수한다.

#### 친화성 크로마토그래피

친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)는 용질분자와 지지체 위에 결합되어 있는 리간드(ligand) 사이의 특이한 친화성에 기초한다(그림 11.10). 리간드와 용질분자의 상호작용은 효소와 기질 또는 항원과 항체의 상호작용처럼 매우 특이적이다. 즉, 관(column) 내 정지상에 단지 한 용질과만 고유하게 결합하는 리간드를 공유결합으로 붙힌 후 혼합액을 이 관에 통과시키면 단지 그 용질만 정지상에 붙게 된다. 그 다음 다른 성분들을 관으로부터 잘 씻어 버린 후, 리간드에 결합된 성분은 용질과 리간드의 결합을 약화시키는 조건으로 바꾸어서 분리한다. 리간드에 결합된 단백질을 분리하는 방법에는 두 가지가 있다. 첫 번째는 지지체에 리간드보다 친화성이 더 큰 물질을 포함하는 용리액으로 분리해내는 방법이다. 다음으로 pH를 변화시키거나 온도, 이온세기 등을 변화시키는 방법이다.

예를 들어 공유결합된 리간드가 특정한 단백질에 대한 항체인 경우를 보자. 여러 종류의 단백질을 포함한 혼합물이 관을 통과할 때, 단지 항체와 반응하는 하나의 단백질만 관에 결합된다. 다른 모든 단백질이 관으로부터 씻겨 나간 후, pH를 변화시키거나 이온세기를 변화시킴으로써 결합되어 있는 특정한 단백질을 항체로부터 떨어지게 하여 회수한다. 이러한 방법은 효소, 항원, 특이적 핵산, 비타민 결합 단백질, 의약품, 호르몬 수용체 같은 물질을 순수 분리할 때 자주 이용된다. 친화성 크로마토그래피가 생체 고분자의 분리에 사용된 예는 표 11.2와 같다.

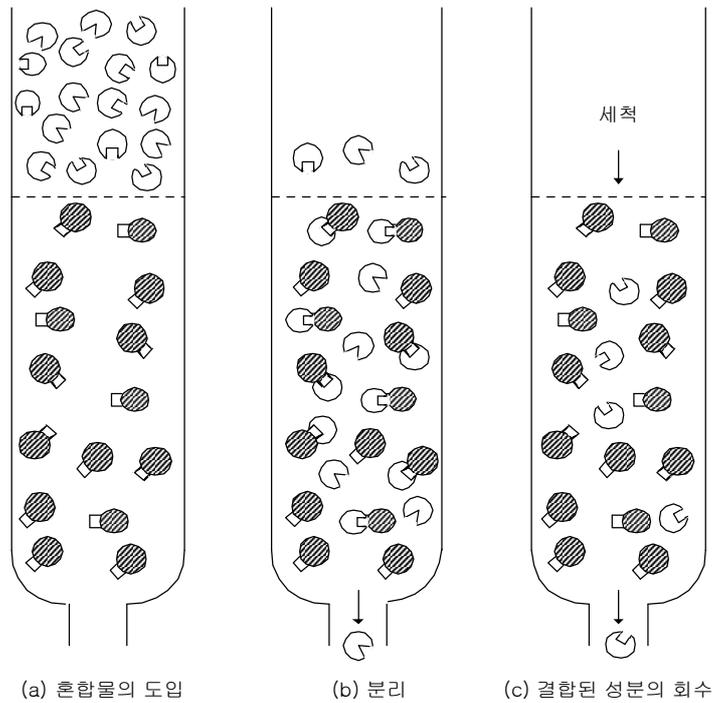


그림 11.10 친화성 크로마토그래피의 모식도

표 11.2 친화성 크로마토그래피를 이용한 생체 고분자의 분리

생체 고분자	사용한 리간드
Amino peptidase	Hexamethylenediamine
Avidin	Biocytin
Chroismate mutase	Tryptophan
$\alpha$ -Chymotrypsin	Tryptophan
Thrombin	Benzamidine
Coagulation factor	Heparin
Follicle-stimulating hormone	Concanavalin A
Interferon	Antibody

친화성 크로마토그래피용 지지체로는 아가로오스 담체(beads)가 가장 많이 쓰인다. 그러나 용리시킬 때 변성제(denaturant)가 응축되기 쉽다는 단점이 있다. 폴리아크릴아미드 담체는 여러 조건을 충족시키기는 하지만 다공성이 부족하다. 다공성 유리 담체는 물리화학적으로 안전해서 다양한 조건에서 전개속도가 좋다. 그러나 비특이적 단백질 흡착이 많으며 기능이 적다는 단점이 있다. 이 문제는 유리 표면에 덱스트란 등의 물질로 표면처리함으로써 극복할 수 있다.

리간드가 지지체에 바로 결합되어 있으면 거대 분자인 경우 입체장애(steric hindrance) 때문에 리간드에 접근할 수 없다. 그래서 지지체와 리간드 사이에 팔(arm)을 붙인다.

#### 11.4.8 전기영동

전기영동(electrophoresis)은 생체 고분자들의 성질을 연구하고, 그것들을 분석, 분리, 정제하는

중요한 방법 중에 하나이다. 전기영동법으로 DNA, RNA나 단백질 등을 분리할 수 있는 것은 이들 분자가 고유의 전하를 띠고있어 전기장(electric field)에 놓이게 되면 서로 다른 속도로 이동할 수 있다는 것에 근거하고 있다.

### 전기영동의 원리

완충용액 속에서 거대분자(macromolecule)들은 전하를 띠게 된다. 예를 들어 DNA는 음전하를 띠며 단백질은 용액의 pH가 등전점(pI)보다 높으면(즉, 수소이온의 농도가 낮으면) 음전하를 띠고, pH가 pI보다 낮으면(즉, 수소이온 농도가 높으면) 양전하를 띤다. 용질 혼합물에 전기장을 걸면 양전하를 띤 물질은 음극으로 이동하며 음전하를 띤 물질은 양극으로 이동한다.

이 거대분자들을 전기장( $E$ )에 놓으면 분자의 전하( $q$ )에 따라 힘( $F=qE$ )을 받아 이동한다. 이 운동에 대한 항력(drag force)과 이 전기장의 힘이 균형을 이루면 분자는 일정한 속도( $v$ )로 이동하게 된다. 즉, 전기장에서 종단속도( $v$ )로 이동하는 하전된 입자에 대한 힘의 균형은 다음 식으로 표시된다.

$$qE = 6\pi\mu r v \quad (11.41)$$

여기서,  $r$ 은 입자의 반지름,  $\mu$ 는 용액의 점도이다. 이 식을 변형하면

$$v = \frac{qE}{6\pi\mu r} \quad (11.42)$$

즉, 거대분자가 움직이는 속도는 전하의 크기 및 전기장의 세기에 비례하고, 분자의 크기와 용액의 점도에 반비례한다.

현재 널리 쓰이는 전기영동법은 겔(gel) 전기영동법으로 아가로오스 겔, 폴리아크릴아미드 겔 및 SDS-PAGE 겔을 사용한다.

### 아가로오스 겔 전기영동

아가로오스 겔(agarose gel)은 해상도는 낮으나 아주 넓은 범위(200 bp~50 kb)의 DNA나 RNA 시료를 간편하게 분리할 수 있기 때문에 가장 흔히 사용된다(그림 11.11). 아가로오스는 해초에서 추출되는 선형중합체 형태의 물질이다. 아가로오스를 적당한 완충용액에 녹여서 원하는 크기의 틀에 부어서 겔이 굳은 후에 사용한다.

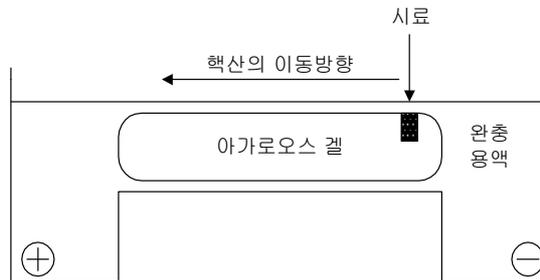


그림 11.11 아가로오스겔을 이용한 핵산의 전기영동

전기장하에서 음전하를 띠는 DNA가 양극으로 이동하는 데 일반적으로 DNA의 크기와 전기장에서의 이동성(mobility)은 로그함수로 반비례한다. 왜냐하면 큰 분자는 작은 분자보다 겔의 구멍을 지나가기 어렵기 때문이다.

같은 크기의 DNA 분자라도 아가로오스의 농도가 커지면 이동속도가 작아진다. 따라서 아가로오스의 농도에 따라 DNA의 분리범위가 다르다. 아가로오스의 농도가 0.3%(w/v)로 낮을 때는 5~60 kb의 비교적 큰 DNA를 분리하며, 아가로오스 농도가 2.0%(w/v)로 높을 때는 0.1~2 kb의 작은 DNA를 분리한다.

같은 분자량의 DNA라도 형태에 따라 이동속도가 다르다. 0.1~0.5 mg/mL의 EtBr (ethidium bromide) 존재하의 아가로오스 겔에서 초나선 환상형(supercoiling circular) DNA는 열린 환상형(nicked circular) DNA나 선형(linear) DNA보다 빨리 이동한다.

전기장에서 DNA의 이동성은 완충용액의 이온 강도와 조성에 영향을 받는다. 이온 강도가 너무 낮으면 DNA 이동이 너무 느리고, 이온 강도가 너무 높으면 열이 발생하여 심한 경우 겔이 녹거나 DNA의 구조가 변형된다. 실험실에서 많이 사용하는 완충용액으로는 Tris-acetate(TAE)와 Tris-borate(TBE)가 있다.

RNA는 단일가닥이면서 2차 구조를 갖는 경우가 많으므로 주로 포름알데히드로 변성시킨 겔을 이용하여 전기영동을 한다.

### 폴리아크릴아미드 겔 전기영동

폴리아크릴아미드(polyacrylamide)는 크기가 작은 DNA(6~2000 bp)를 높은 해상도로 구분할 수 있다. 아크릴아미드 농도에 따라서 1개의 염기쌍 차이도 구분할 수 있다. 또한 많은 양의 시료를 다루어도 해상도에 영향이 적고, 겔로부터의 DNA 회수가 쉽고 깨끗한 DNA를 얻을 수 있다.

폴리아크릴아미드는 아크릴아미드(acrylamide)를 단량체(monomer)로 하고 이중기능 작용제(bifunctional agent)로 N', N'-메틸렌비스아크릴아미드(N', N'-methylenebisacrylamide)를 사용하여 중합하여 만든다. 염기서열용 겔에 쓰이는 아크릴아미드의 농도는 DNA 단편의 크기가 클수록 낮은 값을 사용한다. 프라이머(primer)로부터 50개 염기정도의 핵산을 읽고 싶을 경우에는 15~20% 농도를 사용하며 20~400개 염기정도의 핵산에는 6% 아크릴아미드를 포함하는 겔을 사용한다.

### 기타 겔 전기영동

SDA-PAGE는 음이온성 세척제(anionic detergent)인 sodium dodecyl sulfate(SDS)를 사용하여 단백질이 각각의 단위체로 분리되게함으로써 단백질의 분자량이나 단백질의 단위체를 분석할 때 사용한다.

DNA의 크기가 50 kb 이상이 되는 경우에는 일반적인 전기장에서는 분리가 어려우며 간헐 전기장(pulsed-field) 전기영동법을 사용한다. 간헐 전기장 전기영동법은 거의 수직관계의 두 전기장을 걸어놓고 전기장력의 크기를 변화시키거나 전기장을 간헐적으로 공급해 준다. DNA 분

자가 겔의 구멍으로 들어가 어느 한 방향으로 이동하다가 전기장의 방향이 바뀌면 이동방향을 바꿔야하는 데 DNA 분자가 길수록 새로운 방향을 찾는 데 더 많은 시간이 소요되는 현상을 이용하여 분자 크기에 따라 분리하는 방법이다. 이 방법은 2 Mb 크기까지 분리할 수 있다.

## Isotachopheresis와 Isoelectric focusing

존 전기영동법 이외에 사용되는 방법에는 Isotachopheresis(ITP)와 Isoelectric focusing (IEF)이 있다. ITP는 두 개의 다른 전해액(선도 전해액과 마감 전해액)을 사용한다. IEF는 단백질 전기영동법 중 가장 최근에 발전한 방법으로 단백질을 분리, 정제하는 데 가장 효과적인 방법이다. 전기영동과 IEF의 차이점은 전기영동은 단백질의 크기와 일정한 pH에서 전체 전하에 의해 결정되는 이동속도에 따라 단백질을 분리하지만 IEF는 단백질의 등전점(isoelectric point)을 이용하여 단백질을 분리한다는 점이다. 등전점(pI)이란 단백질의 순전하(net charge)가 0이 되는 pH 값이다.

## 11.5 정제의 마무리 단계

### 11.5.1 결정화

결정화(crystallization)란 균일한 액상으로부터 일정한 모양과 크기를 갖는 고체입자를 형성하는 것이다. 대부분의 대량 생산되는 의약품과 유기정밀 화학제품들은 결정화된 형태로 판매된다. 정제의 마무리 단계로서 결정화가 이렇게 중요한 역할을 하는 이유는 무엇보다도 결정의 순수성 때문이다. 생물 분리공정에서 이 점은 무엇보다도 중요한데 그 이유는 결정화를 적용할 단계가 되었을 때는 이미 제품 속에 포함되어 있는 불순물의 양은 많지 않기 때문이다. 결정화는 또한 일정한 크기의 결정을 만들어 내기 때문에 뒤이어 수행되는 여과 또는 건조 같은 마무리 단계가 잘 이루어지게 한다.

실험실 규모에서 결정화를 수행하는 것은 비교적 쉽다. 용해도 한계 가까이 용질이 녹아 있는 투명한 농축 용액을 먼지가 없는 환경에서 서서히 냉각하면 작은 결정이 형성된다. 흔히 'seeds' 라고 하는 더 작은 결정을 가하여 결정의 형성을 돕는다. 냉각을 계속하면 더 많은 결정이 형성되고 원래 있었던 결정은 더욱 커진다. 결정화를 마친 후에는 결정 생성물을 여과나 원심분리에 의하여 분리해 내서 세척하고 건조하면 된다.

결정화는 침전과 유사하지만 결정화는 모양과 크기가 일정한 입자를 생성하는 데 비하여 침전은 모양과 크기가 일정하지 않은 무정형(amorphous) 고체입자를 생성한다. 결정이란 고도의 정돈된 입자로서 공간격자라는 규칙적인 3차원 배열(array)로 이루어져 있다.

결정화에 관계되는 네 가지 개념(포화, 순도, 핵 생성, 단일 결정성장)을 살펴 보자.

### 포화

포화(saturation)란 용액 내에 열역학적으로 안정되게 녹아 있을 수 있는 용질의 최대 농도이다. 포화는 고체결정상과 주변의 용액이 동일한 화학포텐셜(chemical potential)을 가짐으로

이루어지는 상평형(phase equilibrium)의 결과이다. 이러한 평형 데이터는 보통 용해도-온도 그림으로 표시된다(그림 11.12). 과포화용액은 고체석출과 같은 결정화 현상이 일어날 수 있으므로 이와 같은 상태의 용액을 불안정용액(unstable solution)이라고 한다. 그러나 과포화 상태의 용액이면서도 안정한 상태를 유지하는 용액을 준안정용액

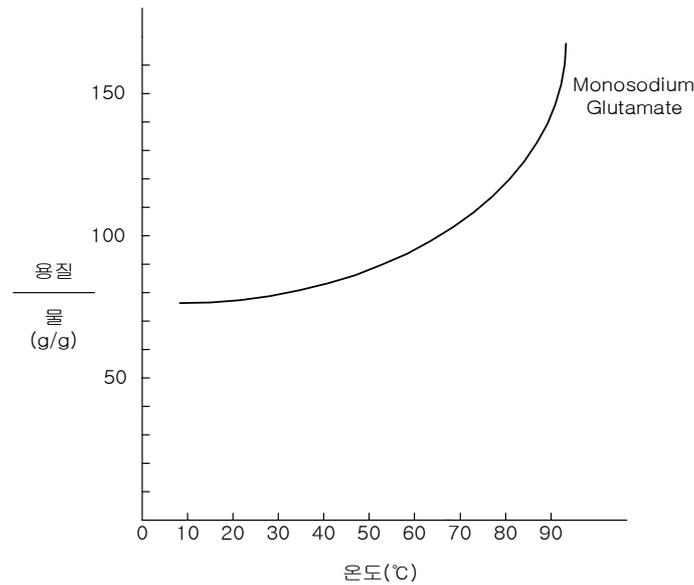


그림 11.12 Monosodium glutamate의 용해도 곡선

(metastable solution) 이라고 한다. 준안정용액의 특징은 용액 내에서 스스로 결정화하는 현상을 유발하지는 않지만 외부에서 결정입자를 제공하였을 경우에는 결정입자가 성장한다.

### 순도

추출에서 사용되는 분배계수(distribution coefficient)와 유사한  $K_A$ 를 분리 대상물질  $A$ 에 대하여 도입하면

$$K_A = \frac{\text{결정 중에 포함된 용질 } A \text{의 질량}}{\text{결정형성 후 남은 여액 중에 포함된 용질 } A \text{의 질량}} \quad (11.43)$$

불순물  $B$ 에 대한 추출인자  $K_B$ 는

$$K_B = \frac{\text{결정 중에 포함된 용질 } B \text{의 질량}}{\text{결정형성 후 남은 여액 중에 포함된 용질 } B \text{의 질량}} \quad (11.44)$$

분리인자(separation factor)  $\beta$ 는 두 추출인자의 비(ratio)로서  $\beta$ 가 크면 효과적인 분리가 된다.

$$\beta = \frac{K_A}{K_B} \quad (11.45)$$

### 결정핵 생성속도

새로운 결정이 형성되는 속도(nucleation rate)를 설명하기 위하여 공학적인 관점에서 쉽게 적용할 수 있는 것이 power law model이다. 이 모델은 일종의 경험식으로서 핵 생성속도( $J$ )를 과포화도의 지수승으로 표시한다.

$$J = k_N S^n \quad (11.46)$$

여기서,  $k_N$ 은 핵 생성속도 상수,  $n$ 은 핵 생성속도의 지수승으로서 결정물질에 따라 고유하며 교반과 같은 물리적 상황에 영향을 받는다.  $S$ 는 과포화도로서 다음과 같이 정의되어 있다.

$$S = \frac{C}{C_s} = \frac{\text{용액의 농도}}{\text{포화 농도}} \quad (11.47)$$

### 단일 결정성장

기존의 단일 결정(single crystal)이 성장하는 속도를 수학적으로 묘사하기 위하여 Karpinski가 제안한 2단계 성장 모델(two step growth model)을 소개한다. 이 모델은 결정 입자가 성장하는 과정을 크게 두 단계로 이루어진 것으로 가정하였다. 첫 단계는 물질전달 단계(mass transfer step)로서 용액 내에 용존해 있는 분자가 농도차에 의해 결정입자의 표면으로 확산하여 이동한다고 본다. 두 번째 단계는 입자표면으로 이동한 분자가 표면의 격자에 최종적으로 고정되는 과정인 표면반응 단계(surface reaction step)로 구성되어 있다. 표면반응 단계에서 Karpinski는 표면에서의 현상을 간단한 지수승의 반응식으로 묘사하였다.

$$\frac{dM}{dt} = k_c A_c (C - C_i) \quad (11.48)$$

$$\frac{dM}{dt} = k_r A_c (C_i - C_s)^n \quad (11.49)$$

여기서,  $M$ 은 결정입자 한 개의 질량,  $k_c$ 는 결정입자 주위에서의 물질전달 계수,  $k_r$ 은 표면 반응상수,  $n$ 은 표면 반응차수,  $A_c$ 는 결정입자 표면적,  $C$ 는 용액의 농도,  $C_i$ 는 결정표면 근처의 계면에서의 농도,  $C_s$ 는 용액의 포화 농도를 나타낸다.

많은 경우, 특히 교반을 하지 않는 경우에는 성장속도는 물질전달, 즉 확산에 의하여 제한된다. 이 경우 위의 두 식을 간단히 다음과 같이 하나로 표현할 수 있다.

$$\frac{dM}{dt} = k_c A_c (C - C_s) \quad (11.50)$$

보통 결정화는 항생제와 같이 고도로 정제된 생성물의 생산에 있어서 마지막 단계에 사용된다.

### 11.5.2 건조

정제된 젖은 생성물로부터 용매(물 또는 유기용매)를 제거하는 것은 보통 건조(drying)에 의해 이루어진다. 건조를 하는 일반적인 목적은 제품의 운반 경비를 줄이고, 제품의 취급과 포장에 용이하게 하며, 보존시 안정성을 높이기 위함이다. 생물 제품의 건조 목적은 위의 목적 외에도

박테리아 세포 내의 효소활성을 보존하며 고가의 용매를 회수하는 것이 포함된다. 다른 제품을 건조할 때와는 달리 생물 제품은 열에 민감하기 때문에 주의하여야 한다.

건조를 하기 위해서는 현재 고체 내에 포함되어 있는 수분의 양, 수분이 제거되는 속도, 제품이 변성되는 속도에 대한 정보가 필요하다.

고체 내에 포함된 수분의 양은 고체-증기의 증기 평형에 관한 열역학적인 정보이다. 고체 내의 수분은 두 가지로서 비결합수(자유수)와 결합수가 있다. 결합수는 물질의 내부에 포함되어 있는 것으로 일반적인 물과 달라서 유동적이지 못하며, 증발시키는 데에도 많은 열을 필요로 하고, 비결합수보다 작은 증기압을 갖는다. 각 고체물질은 일정한 온도 및 습도의 공기 중에 오래 놓아두면 일정량의 수분을 잃거나 얻어서 주변의 공기와 평형에 도달한다. 비결합수에 대해 기액 평형은 보통 습도 도표에 주어진다. 습도란 건조공기 단위질량당 포함되어 있는 수분의 질량이다.

### 건조속도의 계산

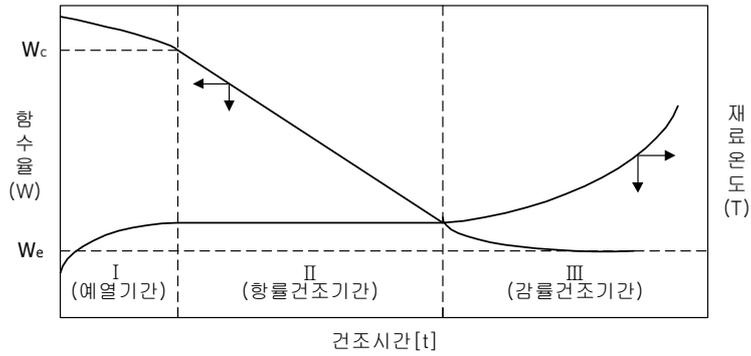
건조란 열이 전달되는 속도(가열속도)에 대응되는 수분의 증발이 일어나는 열 및 물질전달 현상이다. 온도가  $T$  이고 습도가  $H$ 인 열풍 공기로 건조시키며 항률 건조기간 중에 대상물질의 표면온도가  $T_m$ , 습도가  $H_m$  이라 할 때 항률 건조속도는 다음과 같이 표현된다.

$$R_c = k(H_m - H) = \frac{h_t}{\lambda_m} (T - T_m) \quad (11.51)$$

여기서,  $h_t$ 는 총괄 열전달 계수,  $k$ 는 물질이동 계수,  $\lambda_m$ 는  $T_m$ 에 대응되는 증발 잠열이다.

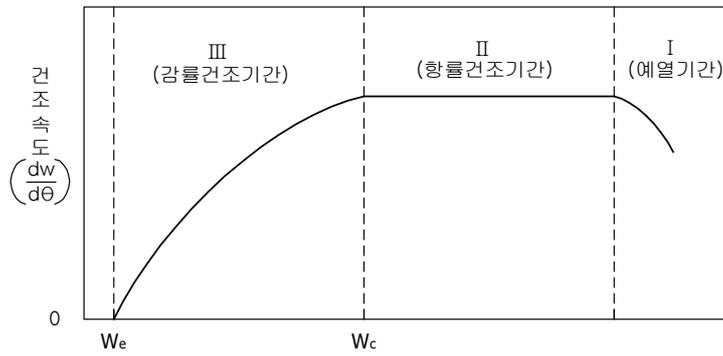
건조 대상물질을 건조하면서 재료의 중량 감소를 그래프로 그리면 그림 11.13과 같다. 이 그림에서 I 은 예열기간, II는 항률(constant rate) 건조기간, III는 감률(falling-rate) 건조기간을 나타낸다. 함수율의 변화 곡선의 각 부분에 대한 기울기로부터 건조속도의 변화를 알 수 있고 이것을 도시하면 그림 11.14와 같다.

건조속도를 그림 11.15와 같이 표현할 수도 있다. 시간이 지남에 따라 수분함량  $X_T$ 는 그래프 A처럼 공급원료가 기화온도까지 가열되는 짧은 기간 후에는 직선적으로 감소하며, 수평방향으로 곡선을 그리다가 평평해진다. 건조속도는 그래프 B와 같다. 처음에 건조속도가 약간 증가하다가 중간부분에서 수평을 나타내는데 이것은 건조속도가 일정함을 나타낸다. 그 후 감소하다가 물질이 평형 수분함량에 이르렀을 때에는 건조속도가 0에 도달한다.



( $W_e$  : 평형함수율,  $W_c$  : 한계함수율)

그림 11.13 건조실험 곡선



( $W_e$  : 평형함수율,  $W_c$  : 한계함수율)

그림 11.14 건조 특성 곡선

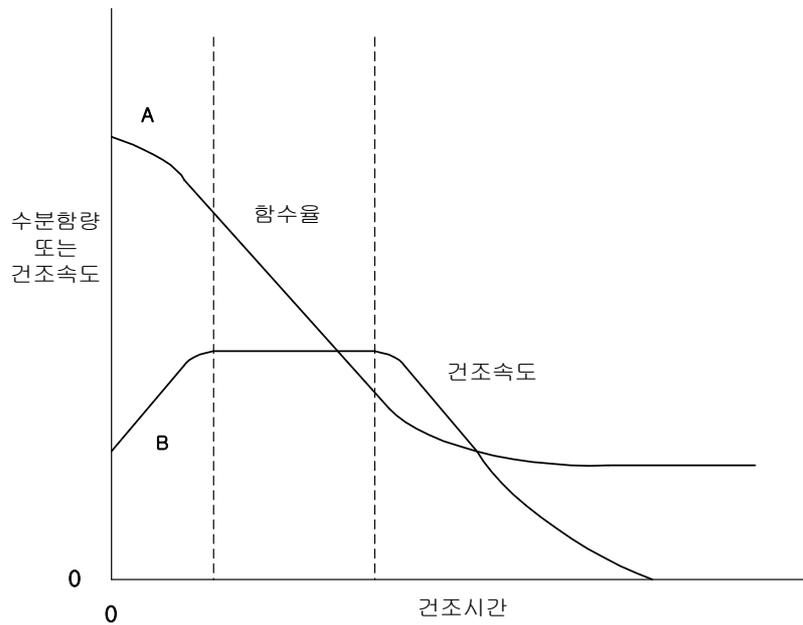


그림 11.15 건조시간에 따른 총수분함량(A) 및 건조속도(B)의 변화

생물 공정제품을 건조할 때 흔히 생기는 문제점은 표면경화(surface hardening), 화학적 탈수(chemical dehydration) 및 단백질 변성(protein denaturation)이다. 초기에 건조가 너무 빠르게 진행되어 건조된 겉껍질이 형성된 것이 표면경화인데 그 결과 내부가 미처 건조되지 않은 상태에서 건조가 중지된다. 이 문제는 초기 건조속도를 늦추면 해결될 수 있다. 화학적 탈수는 국부적으로 지나치게 가열이 되어 생기는 현상이다. 이 문제 역시 건조속도를 천천히 해주면 된다. 생물 제품의 건조시 가장 심각한 문제인 단백질 변성인데 변성속도는 건조온도, 시간 및 수분함량의 함수로서 흔히 1차 속도식을 따른다고 가정한다.

$$\frac{d[P]}{dt} = k_0 e^{-E/RT} [P] \quad (11.52)$$

변성을 줄이기 위해 고온에서 짧은 시간을 건조하던가, 저온에서 오랜 시간을 건조할 수 있는데 대개 후자의 경우가 더 효과적이다.

### 건조장치

건조장치는 사용되는 에너지를 어떻게 공급하는가에 따라 분류할 수 있다. 열전도에 의한 에너지 공급을 사용하는 경우가 진공건조(vacuum drying)와 동결건조(freeze drying)이다. 순환되는 액체의 단열 냉각에 의한 에너지 공급 방법을 사용하는 경우는 공기건조(air drying)와 분무건조(spray drying)이다.

발효 생성물의 건조에 사용되는 건조기의 주요 형태는 다음과 같다.

- 1) 진공판 건조기(vacuum tray dryer)는 가열된 선반을 사용하며 보통 제약 생성물에 사용된다.
- 2) 동결건조(freeze drying)는 얼어 있는 용액으로부터 승화에 의해 수분을 제거하는 방법으로 항생제, 효소액, 박테리아 현탁액 등에 사용된다.
- 3) 회전통 건조기(rotary-drum dryer)는 증기 가열된 회전통의 표면 위에 있는 얇은 용액 막으로의 열전도에 의해 수분이 제거된다. 결정용액에 사용하기에 좋지 않다.
- 4) 분무 건조기(spray dryer)는 생성물용액을 분사구를 통해 가열된 용기로 분무된 시키는 것으로 용기 내의 뜨거운 기체가 액체를 증발시킨다.
- 5) 기류수송식 건조기(pneumatic conveyor dryer)는 입자를 부유시키고 이동시키는 데 뜨거운 공기의 흐름을 사용한다. 이 시스템은 표면건조에는 잘 적용되지만, 확산에 의한 수분제거가 필요한 큰 다공성 입자의 건조에 필요한 건조시간을 제공하지 못한다.