

Ch. 11 생성물의 회수와 정제

- 생성물: 세포자체, 세포외 성분, 세포내 성분
 - 회수와 정제
 - 어떤 산업공정에서도 필수적
 - 많은 공정단계 필요
 - 많은 경우 생성물 생산보다 더 큰 비용
- ex) 세포내 생산물: 전체 생산비용의 50% 이상 차지
- 구연산: 100 g/L 시작 → \$1-2/kg 판매
- 치료용 단백질: 0.00001 g/L 시작 → \$100,000,000/kg 판매

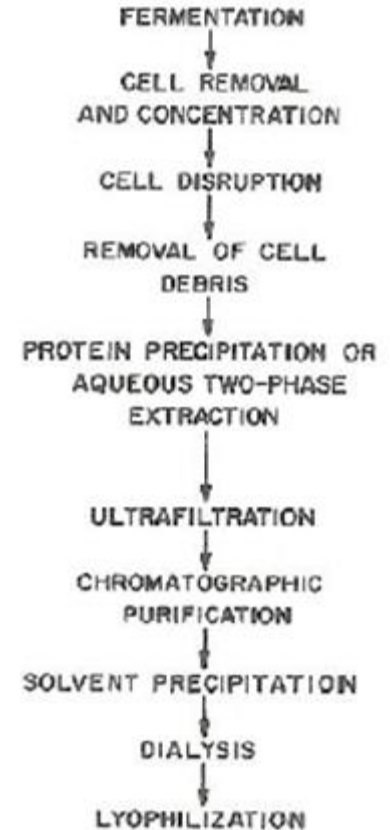
생성물의 회수와 정제 방안

네 가지 기본적 기능

1. 불용성 생성물과 다른 고체의 분리
2. 생성물의 1차분리 또는 농축과 대부분의 수분제거
3. 오염화학물질의 정제 또는 제거
4. 건조와 같은 생성물의 제조

공정상의 수분: 초기제거

→ 후속과정 시설규모 최소화



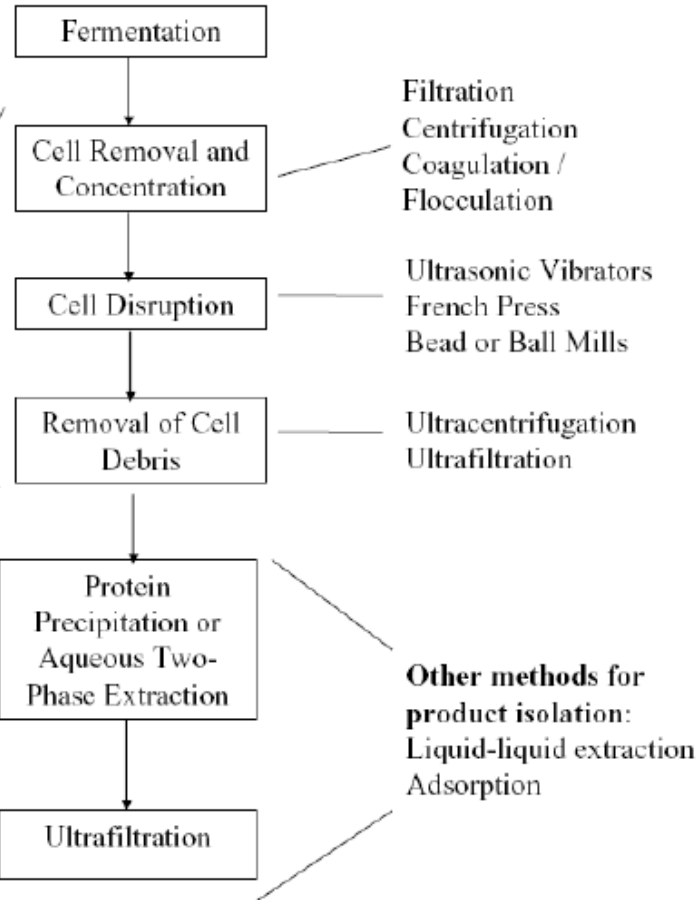


Major steps in separating a protein product

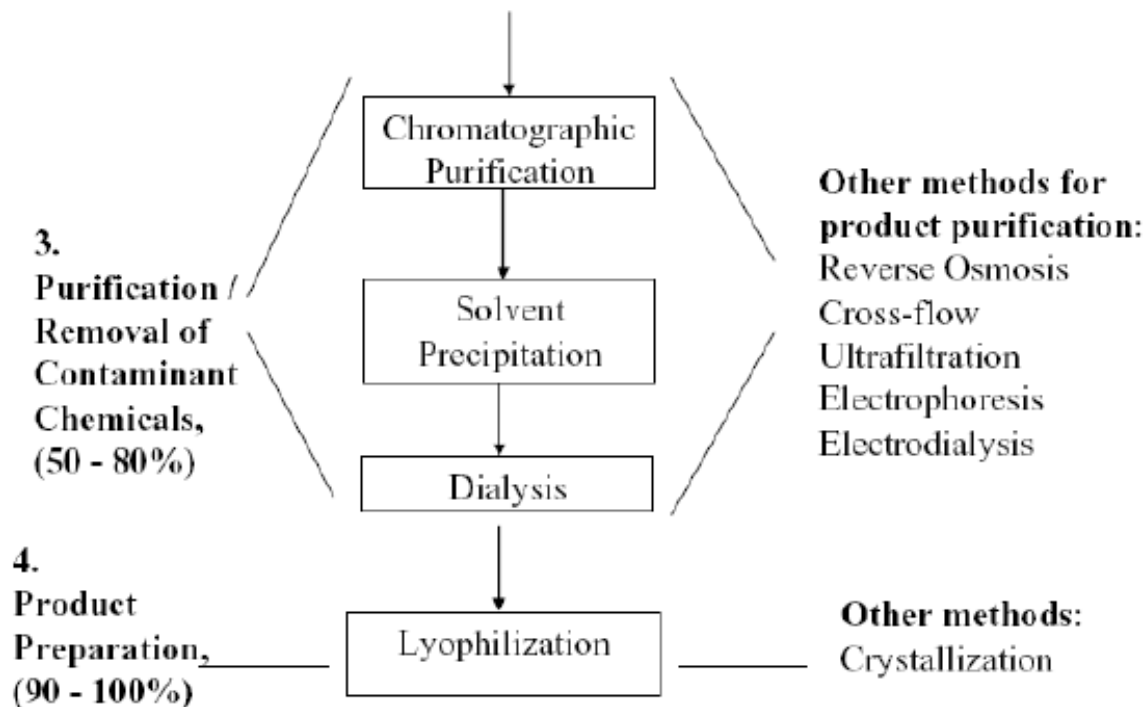
Product : intracellular protein

1.
Separation
of Insoluble
Products,
Product
Concentration
(0.2 - 2.0%)

2.
Product
Isolation,
(removal of
water)
(1 - 10%)



Major steps in separating a protein product



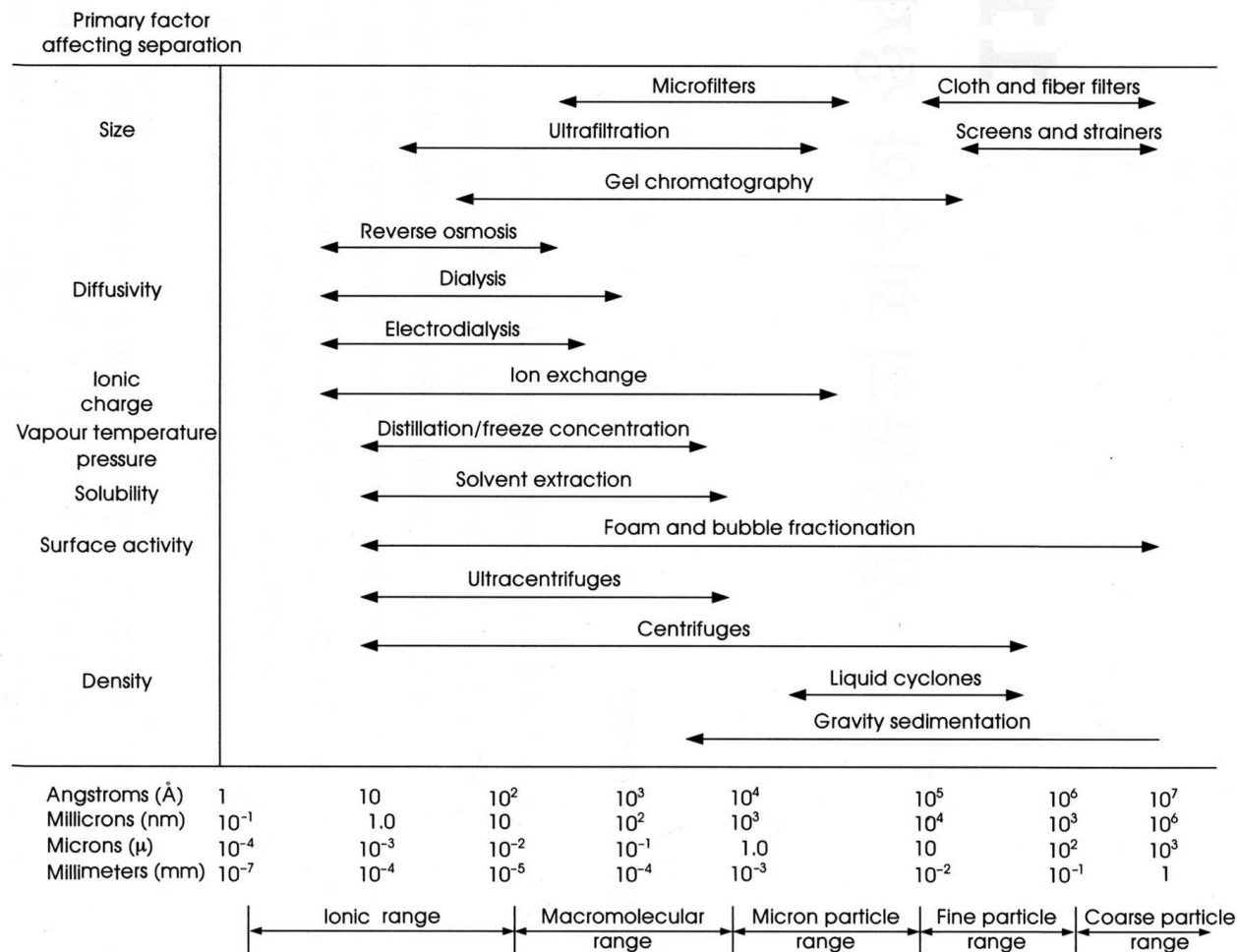


Figure 11.1 Ranges of applications of some standard unit operations. (With permission, from B. Atkinson and F. Mavituna, *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, Macmillan, Inc., New York, 1983.)

불용성 생성물의 분리: 첫번째 단계

발효액 전처리 필요

- 열처리
- pH와 이온세기 조절
- 응고제와 응집제의 첨가

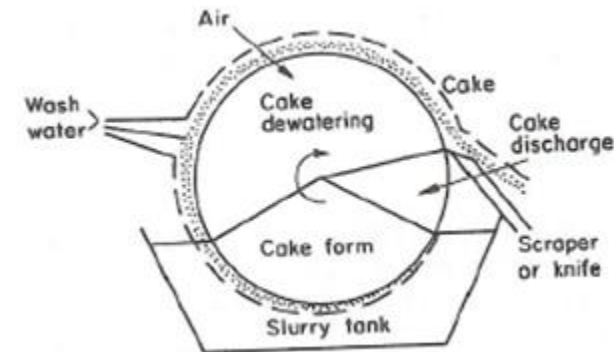
1. 여과

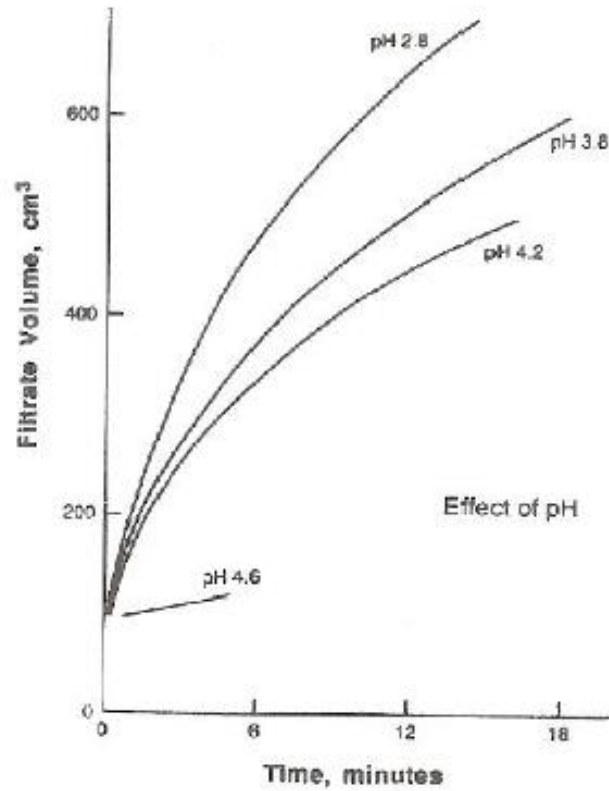
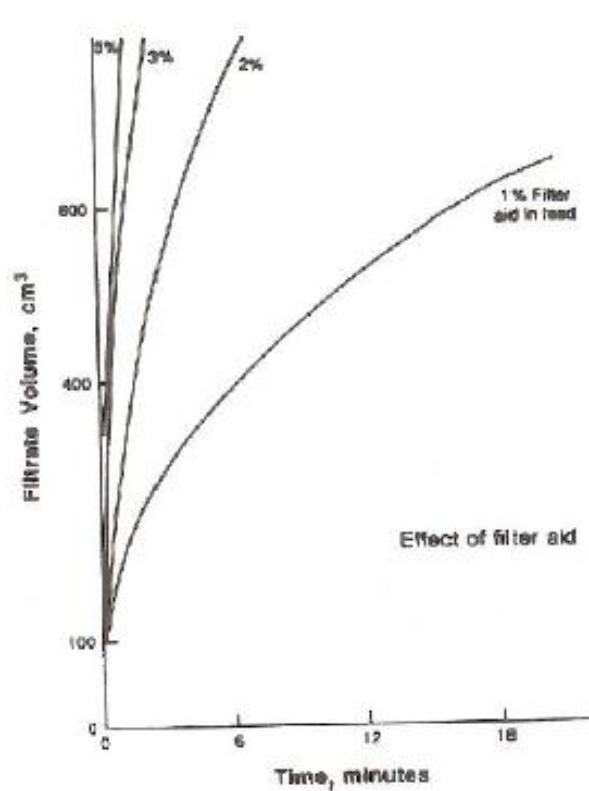
2. 원심분리

3. 응고와 응집

여과

- 비용면에서 가장 효과적
- 발효액을 여과매체를 통해 흘려보내면 여과체 표면에서 고체 침적 -> 여과케이크 형성
- 구조토인 피복층으로 덮음
- 발효액에 적은 양의 응고제 또는 여과보조제 첨가
- 진공상태에서 통이 회전됨에 따라 얇은 세포층이 통에 부착
- 세포층의 두께는 케이크 형성을 위해 설계된 부분에서 증가
- 칼날이 케이크를 베어내는 배출지점까지 도달하는 동안 고체층은 세척, 탈수
- 항생제 발효에서 발효액으로부터 균사분리에 흔히 사용





Bioprocess Engineering I

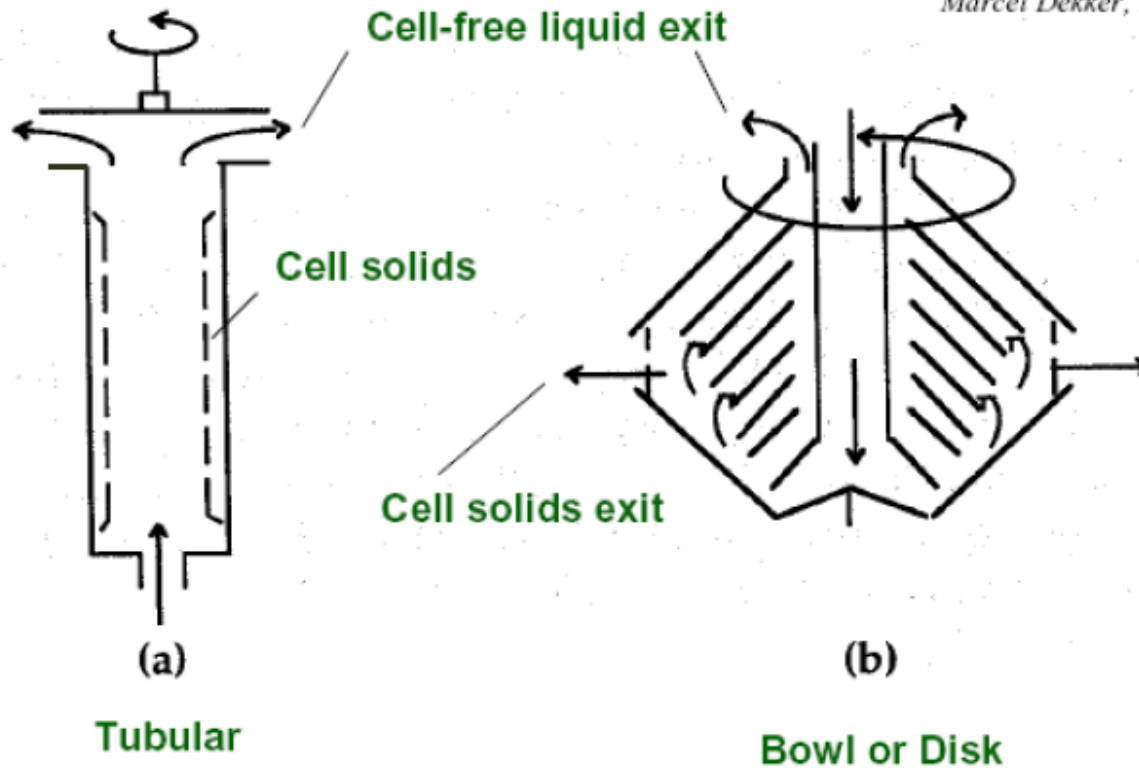
원심분리

- 원심력에 의해 액체로부터 100 – 0.1 μm 크기 입자 분리
- 중력침강: 종단 침전속도 (terminal settling velocity) 도달
→ 전체 힘 = 0
$$F_G = F_D + F_B$$
- $Re_p < 0.3$ 일 때, Stokes 방정식
- 원심력장: 중력가속을 원심가속으로 치환
- 원심분리기 설계: 먼저 주어진 발효액의 유량을 처리할 수 있는 원심분리기 용량 고려

Centrifugation

Continuous Centrifuges

"Biochemical Engineering"
Blanch and Clark,
Marcel Dekker, 1997



응고와 응집

- 원심분리, 중력침강, 여과 이전에 성능 개선 위해 세포 덩어리 형성에 이용
- 응고 (coagulation): 간단한 전해질인 응고제 사용, 분산된 콜로이드로부터 작은 덩어리 형성
- 응집 (flocculation): 다전해질 또는 CaCl_2 같은 염 사용, 작은 덩어리를 침강될 수 있는 보다 큰 입자로 집적 (agglomeration)

세포파쇄: 세포내 생성물의 경우

기계적 방법

액체배지

1. 초음파 진동기 (ultrasonic vibrator, sonicator)

- 세포내 성분 (효소, 대사물질)은 세포파쇄에 의해 발효액으로 방출
- 민감한 효소를 변성시키거나 세포조각을 파편화
- 열 발생

2. French 압착기

- 스테인레스 스틸로 된 속이 빈 실린더
- 세포죽 (cell paste)을 채운 후 고압을 가하는 장치
- 세포죽을 실린더 바닥에 있는 니들 밸브를 통해 대기압 상태로 압출 -> 세포 파쇄

3. Dyno-Mill

- 작은 비드 이용
- 80% 정도의 비드가 채워져 수평으로 놓여 있는 분쇄실로 세포 현탁액 통과

세포파쇄: 세포내 생성물의 경우

기계적 방법

고체배지

1. Ball mill
2. Hughes, X-압착기

세포파쇄: 세포내 생성물의 경우

비기계적 방법

1. 삼투충격: 배지의 삼투압을 변화시키면 특히 그람 음성균의 주변세포질 (periplasmic space) 단백질이 방출
2. 얼음결정을 이용한 파쇄: 세포죽을 천천히 얼린 다음 다시 녹이면 세포벽과 세포막이 깨져서 효소가 배지로 방출
3. 열 충격
4. 아세톤, 부탄올, 완충용액으로 처리후 동결건조
5. Lysozyme (탄화수소 분해효소): 박테리아의 세포벽 용해 (lysis), 고가, 산업 용으로 널리 사용하지 않음
6. 고농도 EDTA: 세포외피 구성물질 2가 이온 추출
7. 항생제 처리: 페니실린, 사이클로세린, 세포벽 합성 방해

Cell disruption

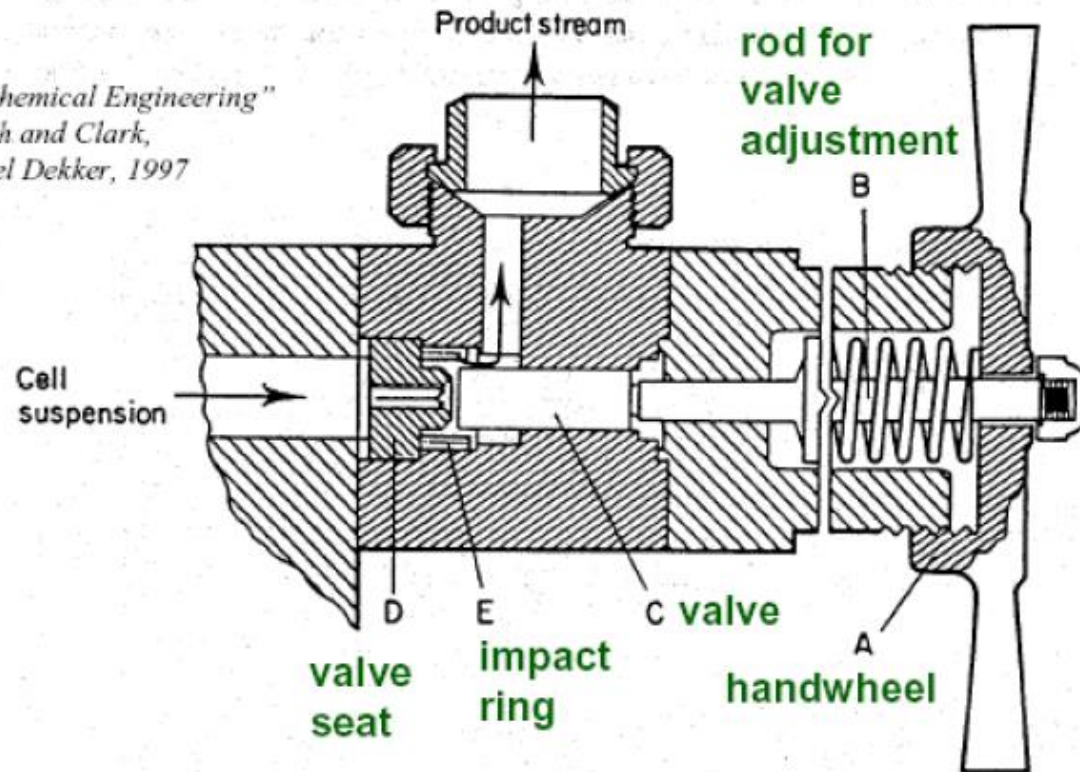
If the desired product is intra-cellular, an effective method to break open the cell wall is needed in order to release the products.

<u>Microbial Cell Breakage</u>	Physical Methods	Freeze/Thaw
		Ultrasound
	Liquid Medium	Dyno & Colloid Mills
		Gaulin/Manton & French Presses
	Solid Medium	Ball Mill
		X Press & Hughes Press
Chemical Methods	Osmotic pressure change	
	Treatment with acid	
	Detergents	
Biological Methods	Extraction with acetone/toluene	
	Phage	
	Cell-wall digesting enzymes	
	Agents which inhibit cell wall synthesis	

Cell disruption equipment

Exposure of cells to high liquid shear rates by passing cells through a restricted orifice under high pressure

"Biochemical Engineering"
Blanch and Clark,
Marcel Dekker, 1997



가용성 생성물의 분리

1. 액체-액체 추출
2. 수성 이성분계 추출
3. 침전
4. 흡착
5. 투석 (dialysis)
6. 역삼투
7. 한외여과와 미세여과
8. 교차흐름 여과 (cross-flow filtration)
9. 크로마토그래피
10. 전기영동 (electrophoresis)
11. 전기투석 (electrodialysis)

Concentration of product

Separation Objectives

- Remove water from fermentation broth
- Dilute solute (product) → more concentrated solute
- Often these steps concentrate chemically similar byproducts (other proteins / biomolecules)

Separation Methods

- A. Extraction (liquid-liquid)
- B. Adsorption
- C. Precipitation



not very selective
for desired product

None the less, these methods are often applied prior to purification

가용성 생성물의 분리

- 항생제, 유기산, 용매, 아미노산, 세포외효소 등
대부분의 미생물 생성물은 가용성 : 추출, 흡착, 한외여과, 크로마토그래피

(1) 액-액 추출

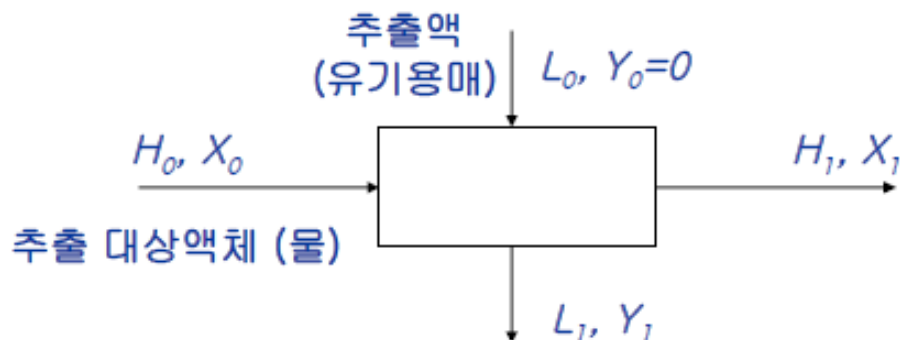
- ❖ 에탄올, 아세톤, 부탄올, 항생제 등의 추출
- ❖ 액체 추출제의 조건: 무독성, 선택성, 저가, 분리되는 상, 높은 분배계수
- ❖ 분리 근거: 용해도 차이
- ❖ 분배계수 : 두 상에서의 농도 비 (식 11.27) - 식 11.31

$$K_D = \frac{Y_L}{X_H}$$

Bioprocess Engineering I

(1) 액-액 추출

- ❖ 물질수지식: L, H: 유량, Y, X: 농도, 0, 1: 단의 전후,
- ❖ E: 추출인자, 무계비 (유기용매로 추출된)



$$K_D = \frac{Y_L}{X_H}$$

$$H(X_0 - X_1) = LY_1$$

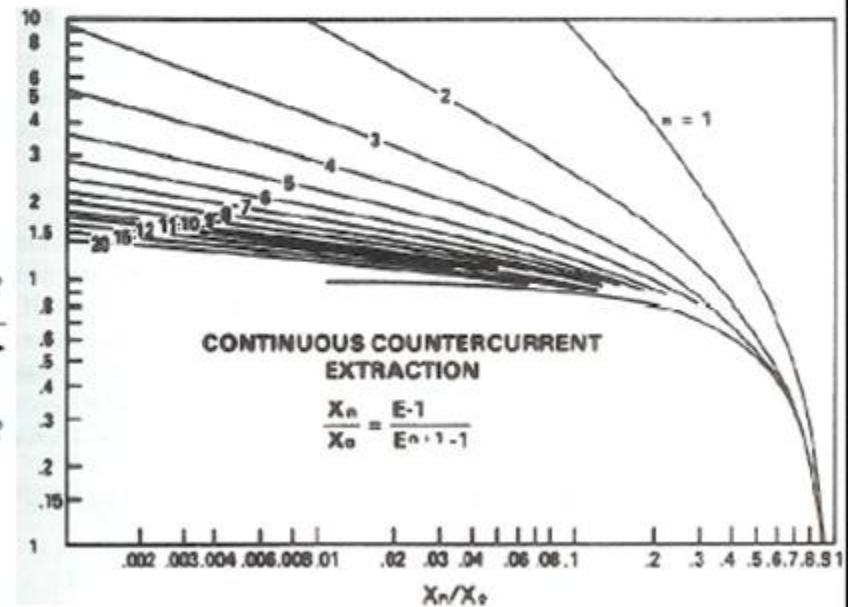
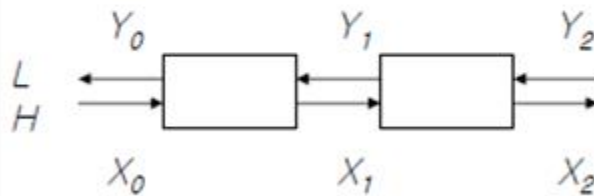
$$X_1 = X_0 - \frac{LK_D}{H} X_1$$

$$\frac{X_1}{X_0} = \frac{1}{1 + (LK_D / H)} = \frac{1}{1 + E}$$

Bioprocess Engineering I

(1) 액-액 추출

❖ 단수결정 : 주어진 계 (E),
정해진 추출 정도 (X_n/X_0)
--> 그림 11.9



Bioprocess Engineering I

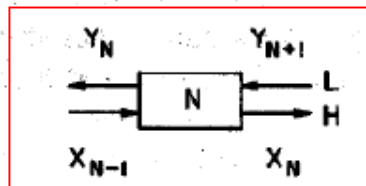
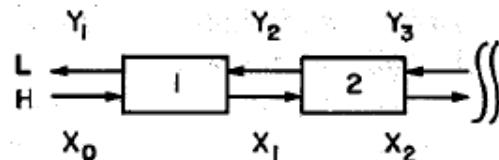
Liquid-liquid extraction

Mass balance on a multiple equilibrium stages

Assumptions: dilute solute and immiscible phases (negligible change in H and L) and constant K_D .

$$\text{Stage } N, H(X_{N-1} - X_N) = L(Y_N - Y_{N+1}) \text{ or } X_{N-1} = X_N + \frac{L}{H}Y_N$$

$$\text{Since } K_D = \frac{Y_N}{X_N}, \quad X_{N-1} = X_N + \frac{LK_D}{H}X_N, \text{ or } X_{N-1} = (1+E)X_N$$



$$\text{Stage } N-1, H(X_{N-2} - X_{N-1}) = L(Y_{N-1} - Y_N) \text{ or}$$

$$X_{N-2} = X_{N-1} + \frac{L}{H}(Y_{N-1} - Y_N), \quad \text{Since } K_D = \frac{Y_{N-1}}{X_{N-1}} = \frac{Y_N}{X_N},$$

$$X_{N-2} = X_{N-1} + \frac{LK_D}{H}(X_{N-1} - X_N), \text{ with } X_{N-1} = (1+E)X_N$$

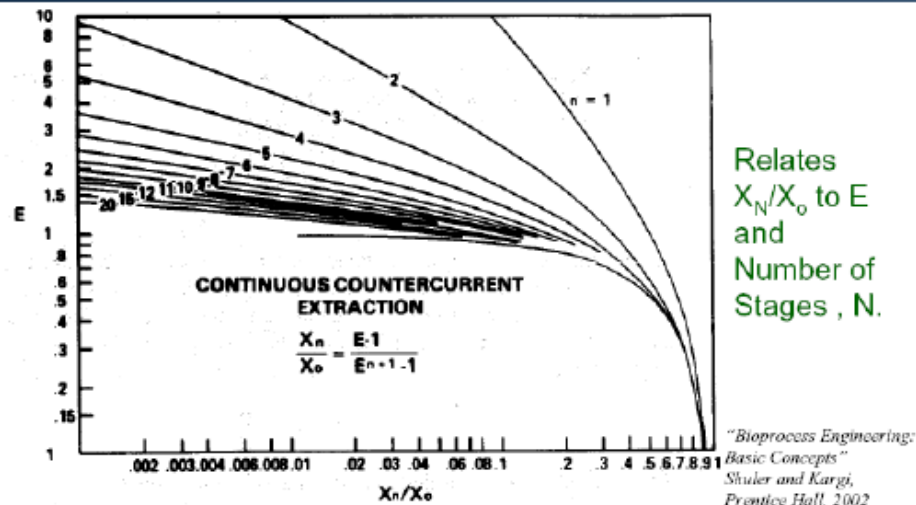
$$X_{N-2} = X_{N-1} + \frac{LK_D}{H}(X_{N-1} - X_N) = (1+E)X_{N-1} - EX_N$$

$$X_{N-2} = (1+E)(1+E)X_N - EX_N = (1+E)^2X_N - EX_N$$

$$X_{N-2} = (1+E+E^2)X_N$$

$$\text{All Stags, } X_o = \left(\frac{E^{N+1} - 1}{E - 1} \right) X_N \quad \text{see Figure 11.9}$$

Liquid-liquid extraction



Example 11.2 Penicillin Extraction using Isoamylacetate

L = isoamylacetate flow rate = 10 L/min

H = aqueous broth flow rate = 100 L/min

$K_D = 50$, $X_o = 20$ g/L, $X_N = .1$ g/L

How many stages are required to achieve this separation?

Solution: $X_N / X_o = 0.1/20 = .005$

$$E = LK_D/H = (10)(50)/100 = 5$$

From Figure 11.9, we see that the required number of stages is between 3 and 4, call it 4 equilibrium stages.

(1) 액-액 추출

- ❖ Podbielniak 원심추출기: --> 그림 11.11
- ❖ 페니실린의 추출: 아밀아세테이트,
낮은 pH에서 중성-->유기용매에 잘 녹음
- ❖ pH 조절로 추출효율 증대

- ❖ 선택도 (selectivity): 여러 용질이 있을 경우,
분배계수의 비, 클수록 분리가 쉬움, 식 (11.35)

$$\beta_{ij} = \frac{K_i}{K_j}$$

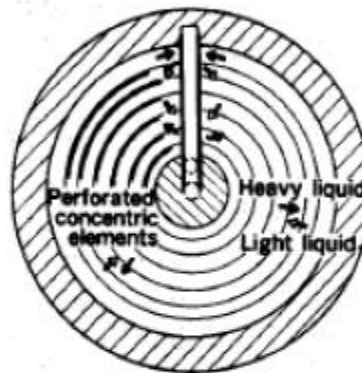
Bioprocess Engineering I

Liquid-liquid extraction

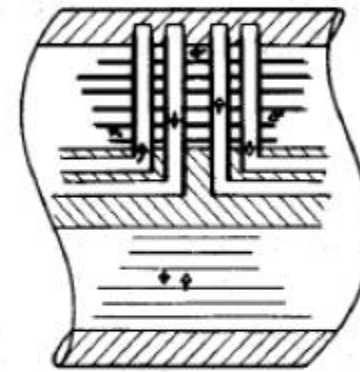
Podbielniak
centrifugal
extractor

The separation
is very rapid,
allowing for short
residence times
which benefits
unstable products

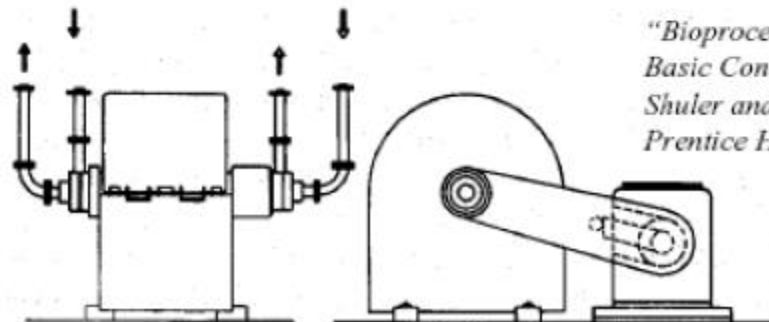
(especially pH-
sensitive antibiotics.



(a) Sectional view of rotor.



(b) Sectional view (cont'd).

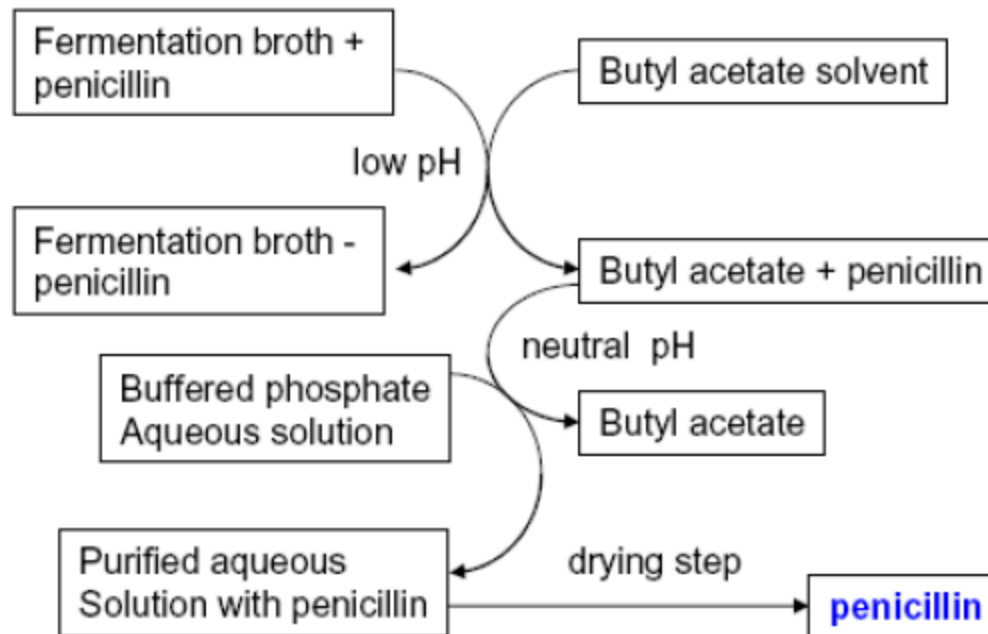


(c) Side view of Podbielniak.

*"Bioprocess Engineering:
Basic Concepts"
Shuler and Kargi,
Prentice Hall, 2002*

Liquid-liquid extraction

Liquid-liquid extraction is commonly used, especially in antibiotic fermentations to recover products from fermentation broth





Liquid-liquid extraction

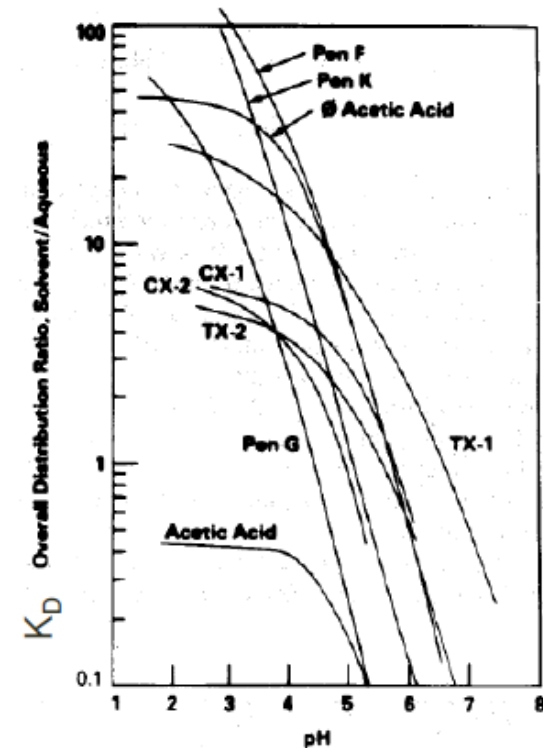
Liquid-liquid extraction takes advantage of solute equilibrium partitioning between the fermentation broth (heavy, H) phase and a light (L) extractant phase.

$$K_D = \frac{Y}{X}, \text{ where } K_D \text{ is a distribution coefficient}$$

Y is the concentration, mass or mole fraction of solute in the light phase

X is the concentration, mass or mole fraction of solute in the heavy phase

Higher K_D , higher selectivity (partitioning)



Partitioning is a function of pH for many solutes

(2) 수성 이성분계 추출

분배계수의 증가

- ❖ 서로 섞이지 않는 고분자를 포함하는 두개의 상에서 단백질 추출
- ❖ PEG-물/덱스트란-물, PEG-물/K 인산염-물
- ❖ PEG/DEX 의 분배계수: 1 ~ 3.7 (다단분리 필요)
- ❖ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 와 같은 염 첨가하여 개선 → 그림 11.12 (10배 이상 증가)
- ❖ 염석 (salting-out) : 수용액에 무기염류 등을 가하여 용질을 석출시키는 일
- ❖ 이온교환수지,
- ❖ 친화성 리간드 (PEG-NADH, PEG-cibacron blue, 수성이성분계 친화성 분배),
- ❖ 덱스트란과 PEG의 가수분해 (저분자 고분자가 단백질과 더 잘 결합),
- ❖ 두 종류의 PEG (400-4000)
- ❖ 기타 분배계수: 세포와 DNA (~100), 단백질 (~10), 작은 이온 (~1)
- ❖ 추출 후 공정: 원심분리 및 경사분리로 상분리,
PEG는 한외여과로 회수하여 재사용

Bioprocess Engineering I

(3) 침전

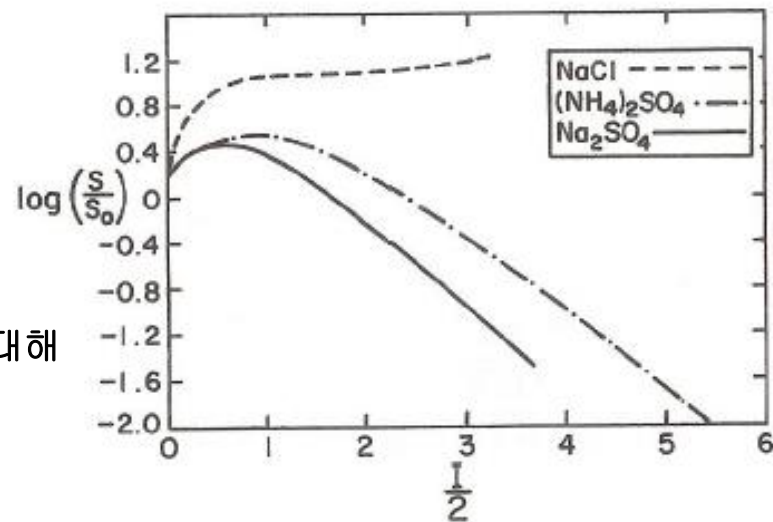
- 세포파괴 후 단백질 침전

□ 침전방법

- 1) 높은 이온세기에서 무기염($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 등) 첨가에 의한 염석
 - 단백질 용해도 식 11.39)
 - 이온세기 \rightarrow 그림 11.14

$$\log \frac{S}{S_0} = -K'_S(I)$$

높은 이온세기에서
단백질의 용해도는 이온세기에 대해
대수적으로 감소



Bioprocess Engineering I

(3) 침전

2) 낮은 온도에서 ($T < -5\text{ }^{\circ}\text{C}$) 유기용매 첨가에 의한 용해도 감소

- 유기용매 첨가: 용액의 유전상수 (dielectric constant) 감소

- 유전상수:

감소(절연화)하면 단백질간의 인력을 증가시켜 침전 촉진

3) 등전침전

- 단백질이 아무 전하도 띠지 않는 pH인 등전점에서 침전

- 등전점: $pI = 1/2(pK_1 + pK_2)$

- 비극성 단백질에 효과적, 저렴한 비용, 낮은 pH에서 변성

4) 기타

- 이온성 다전해질 (이온성 다당류, 다인산염, 폴리아크릴산): 이온세기 변화에 의한 구조손상

- 비이온성 고분자: 덱스트란, PEG

Bioprocess Engineering I

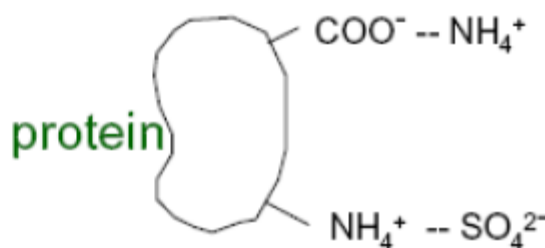
Concentration of product ; Precipitation

A very common first step after cell disruption for recovery of intracellular proteins.

Water-protein interactions are key to understanding protein precipitation / solubility in water.

Salting-Out

addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ or Na_2SO_4 up to high concentrations \rightarrow 1 to 3 Molar!



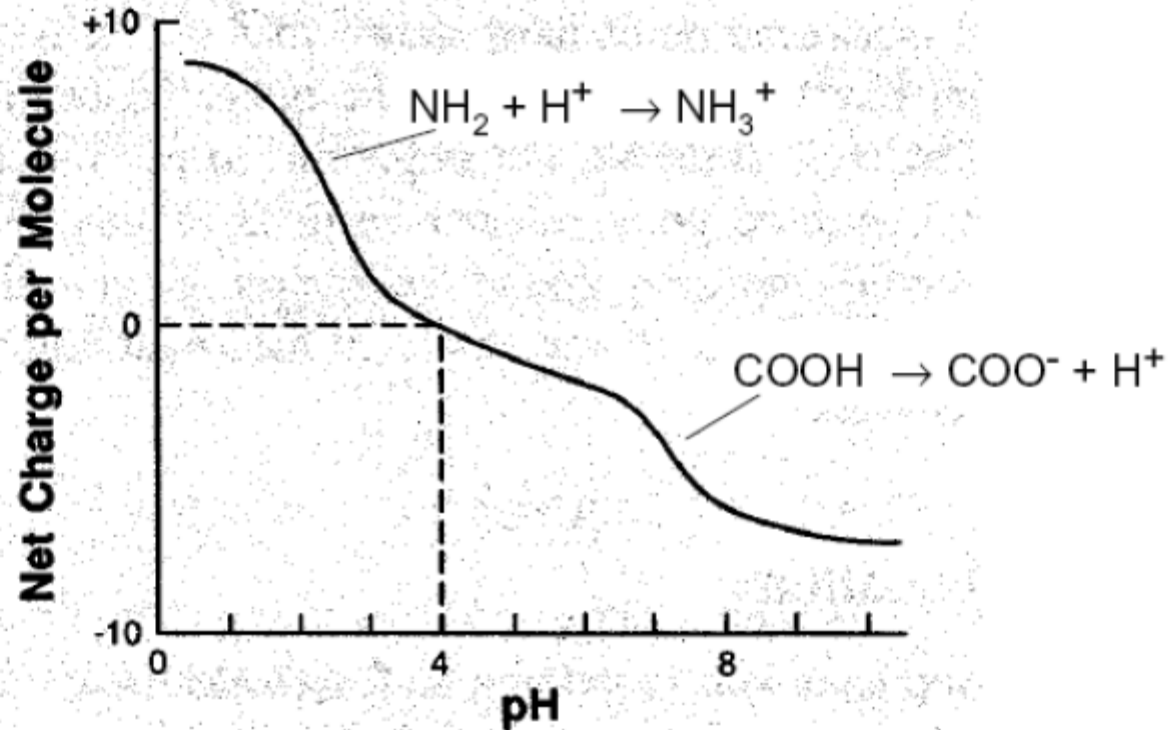
salts exclude water from the surface leading to protein-protein interactions and precipitation



Concentration of product ; Isoelectric precipitation

Belter, Cussler & Hu, 1988

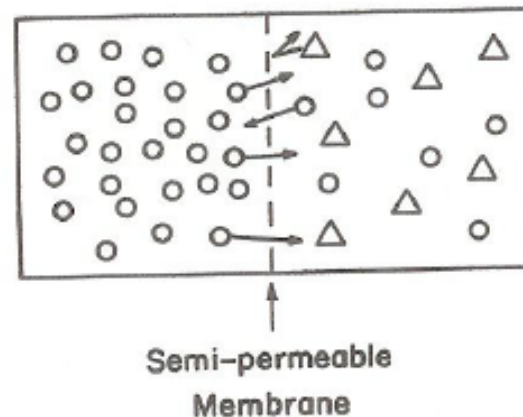
*Effects of pH on the charge
of protein functional groups*



(5) 투석 (dialysis)

유기산 ($100 < MW < 500$), 무기이온 ($10 < MW < 100$)

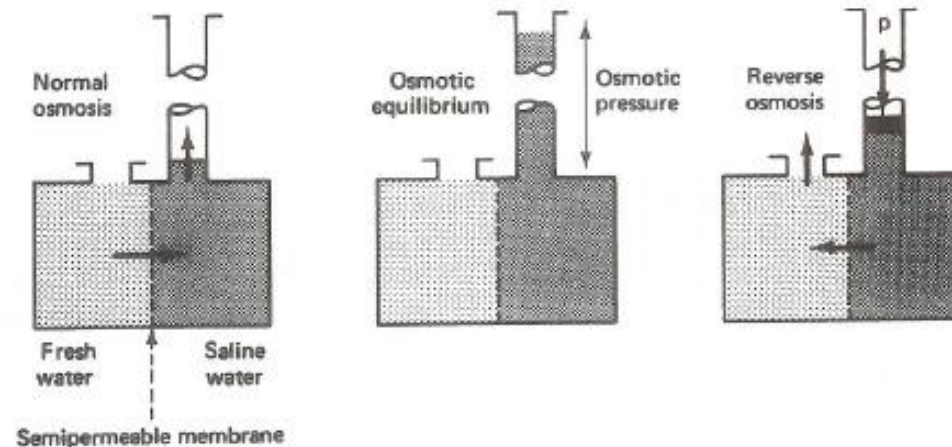
- 투석: 반투과성막을 통해 저분자물질이 농도차에 의해 통과됨으로써 분리 → 그림 11.18
- 인공장기: 요소를 투석막을 통해 제거
- 단백질 용액에서 염제거에 활용
- 두 용액사이의 화학적 퍼텐셜은 같다 (활동도, 몰농도)
- 저분자량 용질이 고농도에서 저농도 영역으로 이동



Bioprocess Engineering I

(6) 역삼투 (reverse osmosis)

- 삼투 : 저농도 용액에서 고농도 용액으로 물분자 이동 → 고농도 용액의 압력 증가 (삼투압) → 그림 11.19
- 반사계수 (reflection coefficient): 1이면 완전 반사 (용질이 전혀 통과하지 않음), 0이면 완전 통과
- 고압 필요, 수처리, 수분제거 및 농축에 활용, 단백질 분리에는 보통 사용되지 않음
- 농도 분극: 막표면 위에 용질 침적



Bioprocess Engineering I

역삼투

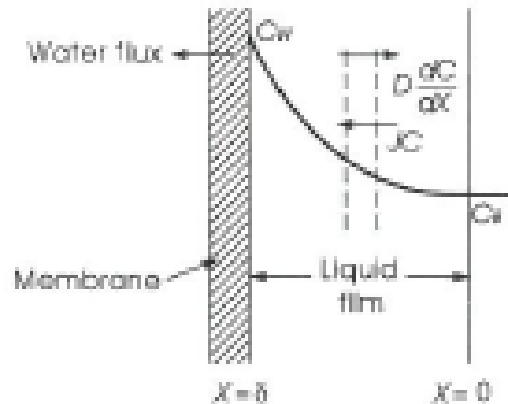
- 순수한 물 → 염포함 수용액으로 물분자 이동
- 물은 쉽게 막을 통과, 염은 통과 X
- 물이 염 용액으로 이동됨에 따라 압력 증가
- 삼투압 $\Phi = CRT(1+B_2C+B_3C^2+\dots)$
- 매우 묽은 용액 (이상용액): $B_2=B_3=0$, $\Phi = CRT$
- 역삼투: 염을 포함하는 상에 압력을 가함
 - 막의 한 면에 용질(염)분자 농축
 - $\Delta P > \Phi$ 일 때 용매선속(flux)은 농도구배와 반대방향
- 0.6M 염용액: 30-40기압의 압력 필요 → 고압 요구
- 생물분리에서 응용 제한, 수분제거와 농축 목적
- 농도분극 (concentration polarization): 막 표면 위에 용질분자 침적
용매흐름에 저항, 막 표면 위의 난류정도 증가로 극복

(7) 한외여과(UF)와 미세여과(MF)

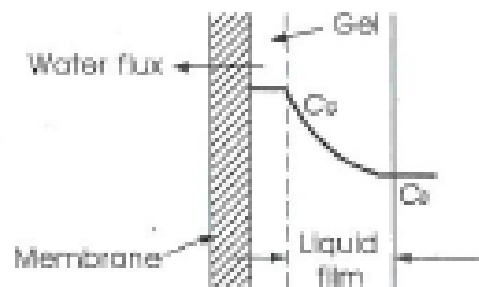
- 막: 분자체 (molecular sieve)
- 미세여과 (MF): 0.1~10um 박테리아, 효모 분리
- 한외여과 (UF): MW 2,000 ~ 500,000 거대분자 분리
- 비등방성 구조: 얇은 층-선택성, 두꺼운 층-지지층
- 고분자막: cellulose acetate, nylon, PTFE, PVDF, polysulfone..
- 세라믹막: 화학적 저항성, 긴 수명, 열적 안정성, 고비용 깨지기 쉬움
- 농도분극 : 막표면에 존재하는 용질에 의한 농도 구배
- 막을 향한 대류전달속도 = 농도분극에 의한 반대방향 용질확산속도 (식 11.62)
- 그림 11.20
- 단백질 농도 증가 → 젤층 형성, 추가된 막 효과, 수력저항 야기 (0.1% 초과)
- 액체전속은 액체 본체에서 용질농도 증가에 따라 대수적으로 감소 (그림 11.16)

Bioprocess Engineering I

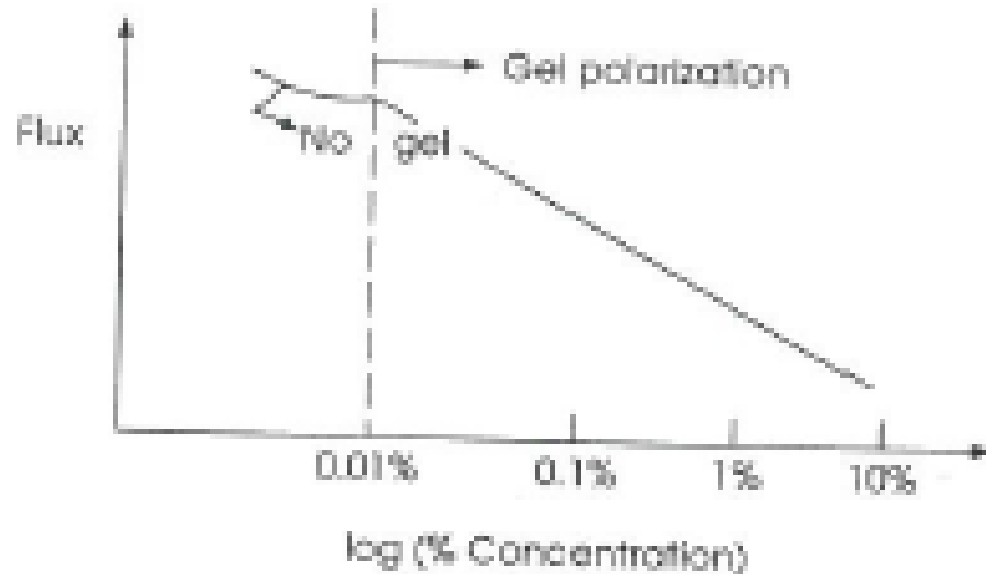
한외여과와 미세여과



(a)

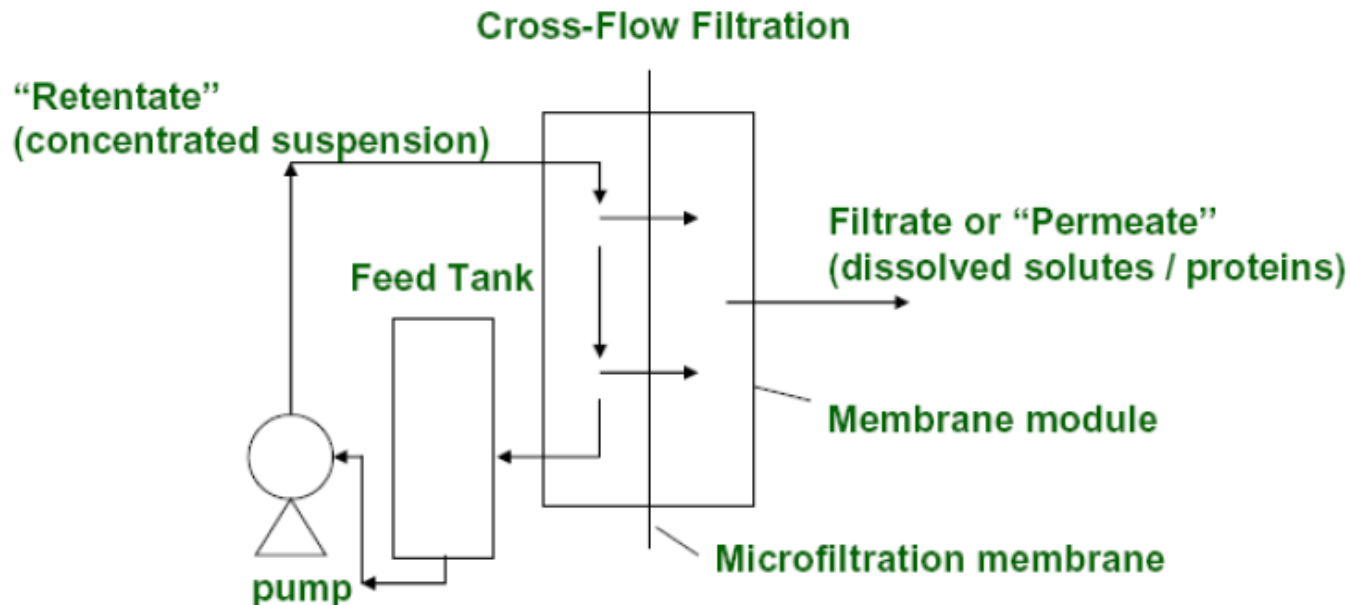


(b)



Microfiltration / Ultrafiltration

- for particle size range $\sim 10^{-9}$ to 10^{-5} m = d_p
- purpose → to concentrate a cell suspension
→ to recover dissolved solutes / proteins

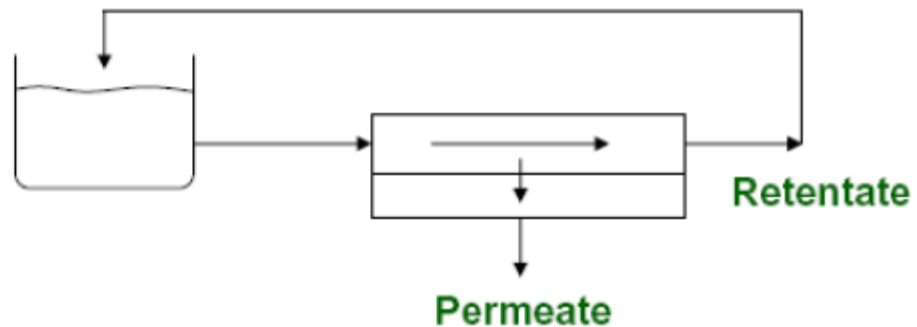


4

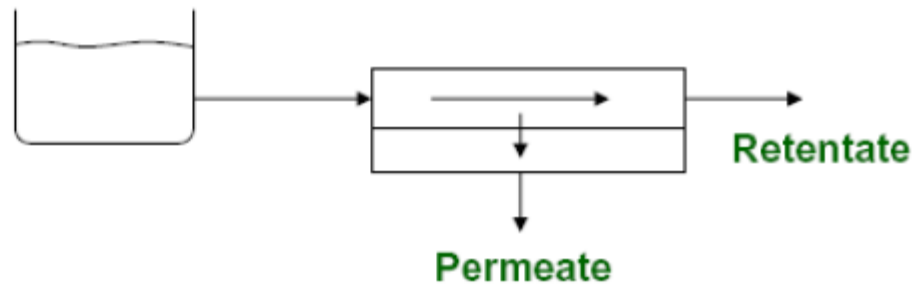
Microfiltration / Ultrafiltration

Modes of Operation

1. Concentration



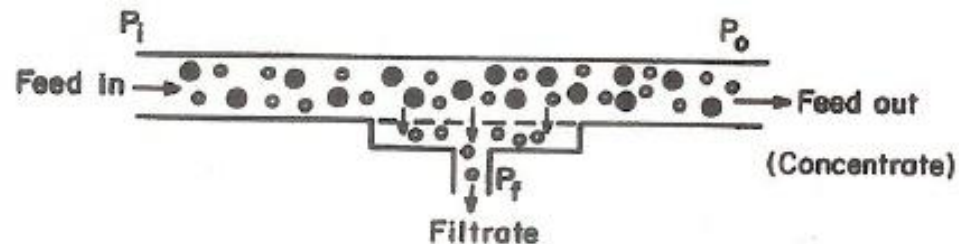
2. One-Pass



(8) 교차흐름 UF, MF

- 교차흐름 여과, 접촉류 여과: 막표면에 수평 흐름 → 젤 형성 부분적 제거
- 압력강하 (유체흐름 유발) 식 11.67) → 그림 11.22

$$\Delta P = P_i - P_o$$



- 평균 막횡단 압력강하: 식 11.70, 11.71
- 여과선속: 식 11.72

$$J = \frac{\Delta P_M}{R_G + R_M}$$

$$\begin{aligned} \Delta P_M &= \frac{P_i + P_o}{2} - P_f \\ &= P_i - \frac{1}{2} \Delta P \end{aligned}$$

ΔP_M 의 최대값은 P_i
세라믹 막: P_i 를 아주 높은 값까지 올릴 수 있음

(8) 교차흐름 UF, MF

★ 최적 유체속도 존재함

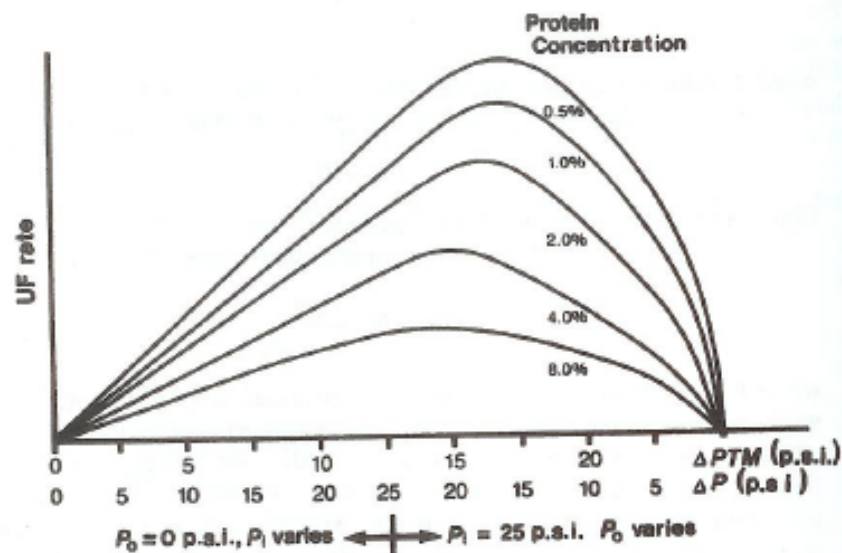
- 낮은 속도 → 높은 젤저항 → 낮은 여과속도

- 높은 속도 → 높은 압력강하 → 낮은 막횡단 압력강하 → 낮은 여과속도

$$\Delta P = P_i - P_0$$

$$\Delta P_M = P_i - \frac{1}{2} \Delta P$$

$$J = \frac{\Delta P_M}{R_G + R_M}$$



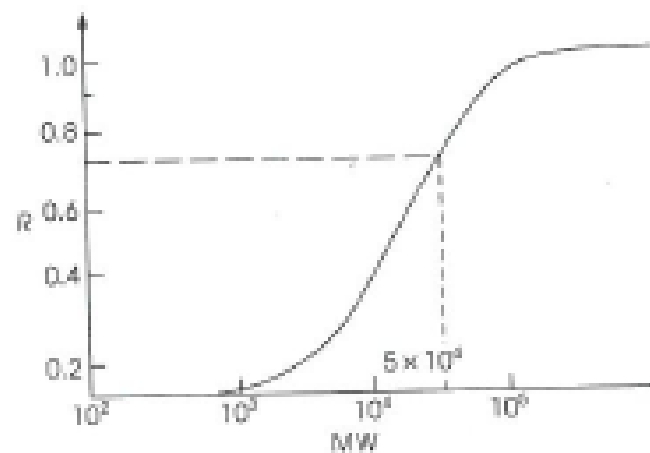
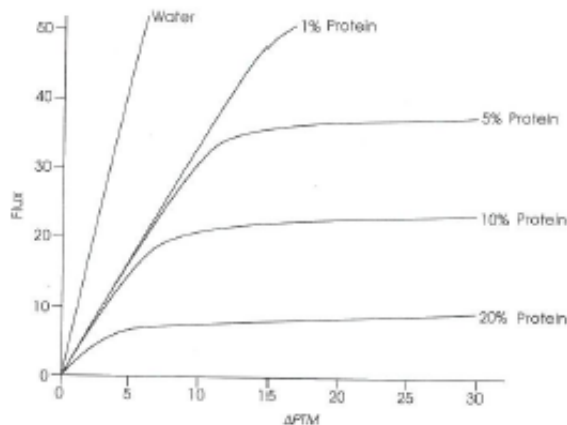
Bioprocess Engineering I

(8) 교차흐름 UF, MF

❖ 배제계수 (rejection coefficient): 식 11.73)

$$R = \frac{C_B - C_F}{C_B}$$

- $0 < R < 1$, $R = 1$: 완전배제, $R = 0$: 비배제, 선택성의 척도
- 분자량이 클수록 R 값 증가 → 그림 11.25

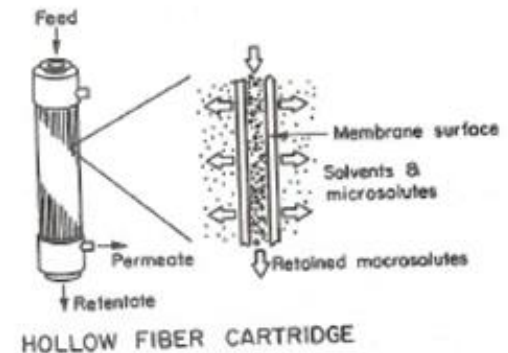
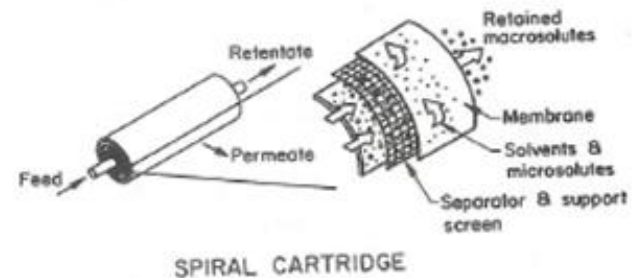
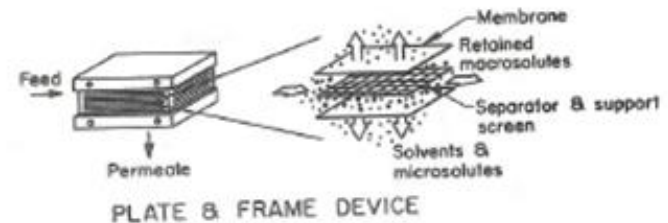


Bioprocess Engineering I

교차흐름여과 (cross-flow filtration)

주요 막 형태

- 실관형 (hollow fibers): 부피에 대해 큰 표면적, 더 쉽게 막힘
- 평판형 (flat sheets): 제조 및 막 교체 용이, 더 높은 압력에서 운전 위해 막 지지체 첨가, 부피에 대해 낮은 표면적
- 나선 감김형 (spiral wound): 부피대 표면적을 증가시키기 위해 구성된 평판 시스템



교차흐름여과 (cross-flow filtration)

주요 응용

- 농축: 용질 수용액으로부터 물 제거
- 정제: 용매와 저분자량 생성물을 고분자량 화합물로부터 분리
- 투석여과 (diafiltration): 염, 당, 알코올 등 저분자량 용질은 여과기 통과, 생성물은 잔류액에 남음, 계를 떠나는 투과액은 탈이온수로 대체

한외여과 (ultrafiltration)

- 단백질, 효소, 발열원 (pyrogen, 박테리아 세포벽의 지질다당류), 세포잔해, 바이러스 분리
- 온건한 조건 ($T=20-30^{\circ}\text{C}$, $P=5-50\text{ psi}$)에서 운전
- 에너지 효율적, 저렴, 비파괴적, 운전 용이

미세여과 (microfiltration)

- 박테리아와 효모 현탁액 농축, 세포를 제거한 상등액 마련
- 원심분리 대체

(4) 흡착

- 기체 또는 액체 상의 어떤 물질이 고체에 농축되는 현상
- 물리흡착 : 반데르발스 힘 (전기적으로 중성인 분자간의 인력), 가역적
- 화학흡착: 이온결합, 공유결합, 비가역적
- 흡착 (adsorption): 2차원적, 흡수 (absorption): 3차원적
- 흡착제 (sorbent), 흡착질 (sorbate)
- 흡착제: 활성탄 (숯, 활성화 → 미세기공), 이온교환수지, 무기광물질
- 활성탄 흡착제: micropore (< 2nm), mesopore (2 - 50nm), macropore (>50nm)
- 액상에서의 전형적인 평형관계식: Freundlich isotherm

$$C_s = K_f C_L^{1/n}$$

- Langmuir isotherm : 흡착질 상호인력 없음, monolayer 흡착

$$C_s = \frac{abC_L}{1+bC_L}$$

- 고체와 액체의 접촉장치: 충전층, 이동층, 유동층, 교반용기 접촉장치

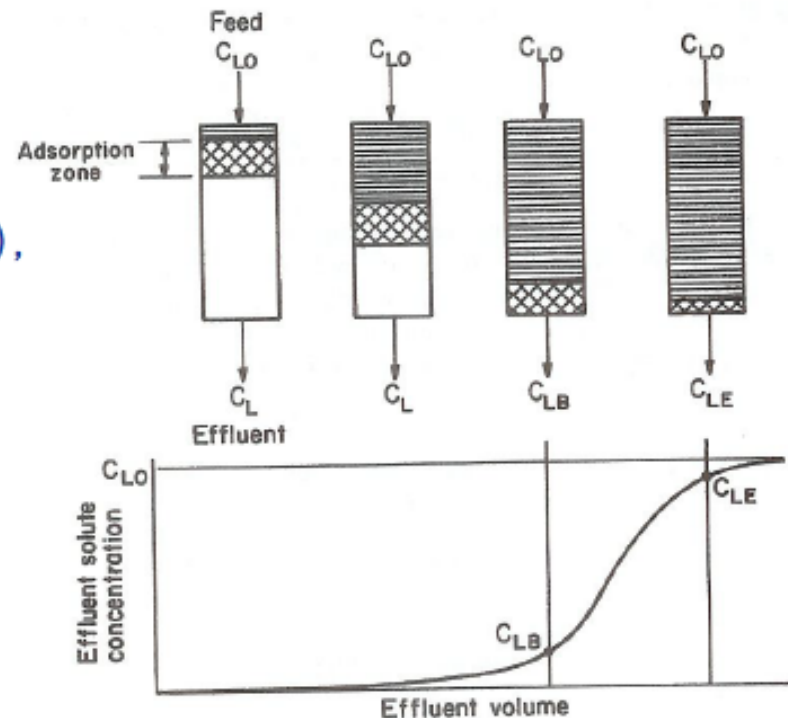
(4) 흡착

❖ 흡착거동:

- 포화구역(saturated zone),
- 흡착구역(adsorption zone, MTZ),
- 미흡착구역(virgin zone)

→ 그림 11.17

- 파과곡선 (breakthrough curve)

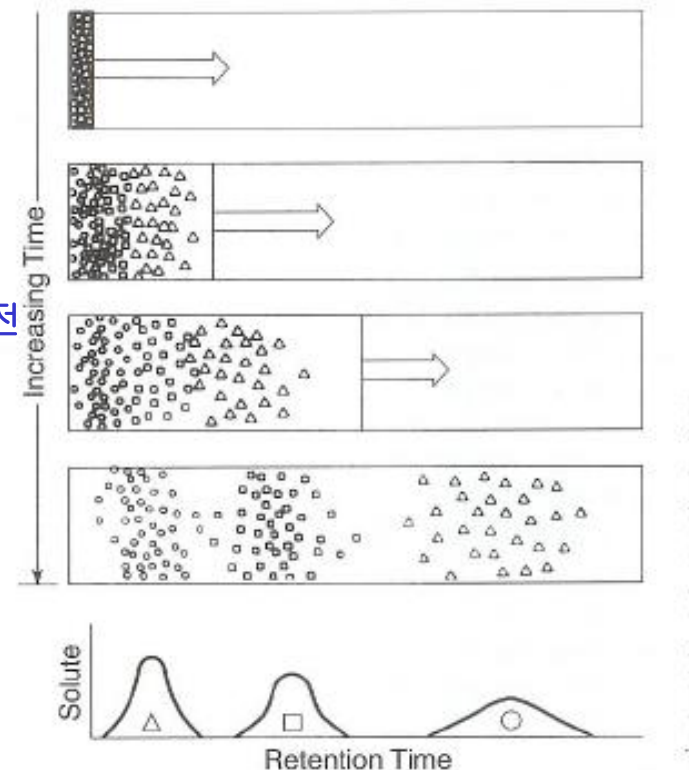


Bioprocess Engineering I

(9) 크로마토그래피

(mobile, stationary phase)

- 이동상, 고정상
- 고정상 담체와 강하게 작용:
느린 속도로 이동 → 체류시간 김
- 체류시간에 따라 분리
→ 그림 11.27
- 연속적, 반연속적, 대부분 회분식 운전



Bioprocess Engineering I

크로마토그래피

종류

- 흡착 크로마토그래피 (adsorption chromatography, ADC): 약한 van der Waals 힘과 같은 입체적인 상호작용에 의해 알루미나, 실리카 같은 고체입자 위에 용질분자 흡착
- 액체-액체 분배 크로마토그래피 (liquid-liquid partition chromatography, LLC): 흡착된 액상과 통과하는 용액 사이에서 용질 입자의 분배계수 (용해도) 차이에 기초
- 이온교환 크로마토그래피 (ion-exchange chromatography, IEC): 정전기적인 힘에 의해 이온교환수지 입자에 이온 또는 전하를 띠는 화합물 흡착
- 젤여과 (분자체, 크기배제) 크로마토그래피 (gel filtration chromatography, molecular sieving chromatography, size exclusion chromatography): 용질분자의 크기와 모양에 따라서 충전 입자의 작은 구멍으로 용질분자 침투, 거대분자의 분자량 결정

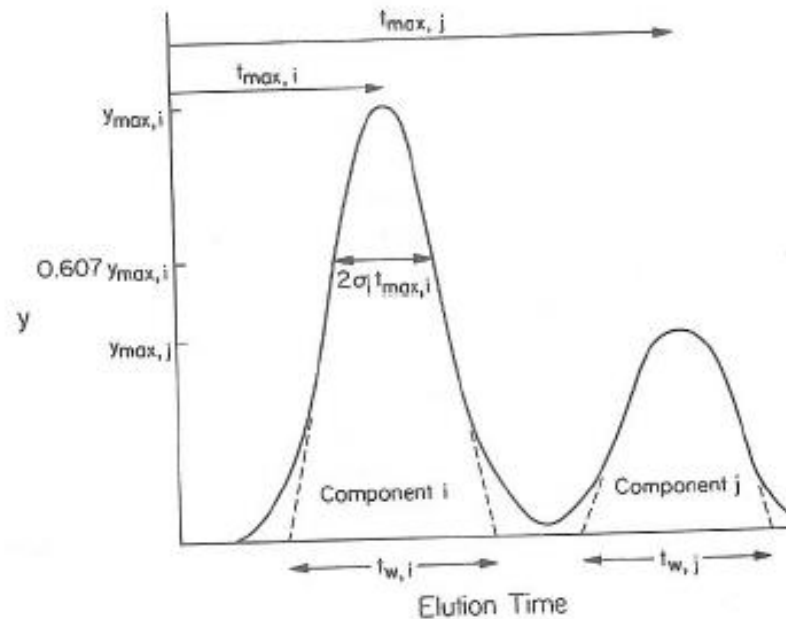
크로마토그래피

- 친화성 크로마토그래피 (affinity chromatography, AFC): 용질분자와 지지입자 위에 결합되어 있는 리간드 (기능성 분자) 사이의 특이한 화학적 상호작용,
담체: 보통 agarose,
간격팔 (spacer arms): 선형 지방족 탄화수소, 입체장애 감소,
리간드: 효소저해제 또는 기질 (효소분리), 단일군 항체 (항원분리)
 - IMAC (immobilized-metal-affinity chromatography): 지지체 표면에 착화되어 있는 금속 이온에 대해 용질의 서로 다른 친화력 이용, 금속의 낮은 비용, 정지상의 재생 용이
 - 소수성 크로마토그래피 (hydrophobic chromatography, HC): 용질분자 (예: 단백질)와 지지입자 위의 작용기 (예: 알킬잔기) 사이의 소수성 상호작용
 - 고압액체 크로마토그래피 (high-pressure liquid chromatography, HPLC): 충전관에 높은 액체 압력 가함, 고압의 액체 (높은 액체 유속)와 조밀한 관 충전으로 용질분자에 대한 빠르고 높은 분리능
- IEC, AFC: 생물공정에서 단백질 회수를 위해 가장 널리 이용

(9) 크로마토그래피

★ 분리능: 식 11.85 → 그림 11.31

$$R_s = \frac{t_{\max,j} - t_{\max,i}}{1/2(t_{w,i} + t_{w,j})}$$



Bioprocess Engineering I



Product purification : Chromatography

Contaminants often remain with product after primary isolation.

Chromatography: is the most important separation method for biochemical products.

Basic Concepts:

1. Separation is based on differential affinities of solutes toward a solid adsorbent material.



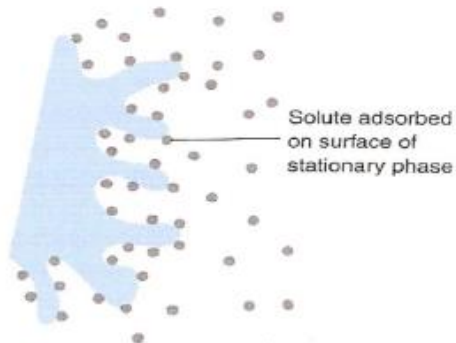
Chromatography

2. Different kinds of affinity

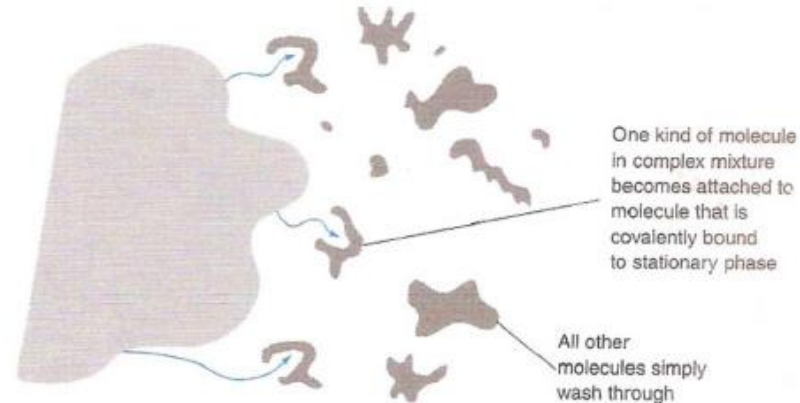
- * → electric charge ... ion exchange chromatography
- van der Waals force ... adsorption chromatography
- solubility in liquid ... liquid-liquid partitioning chromatog.
- solute size/diffusion ... gel filtration chromatography
- * → receptor - ligand ... affinity chromatography
- hydrophobic interactions ... hydrophobic chromatography
- * most common usage



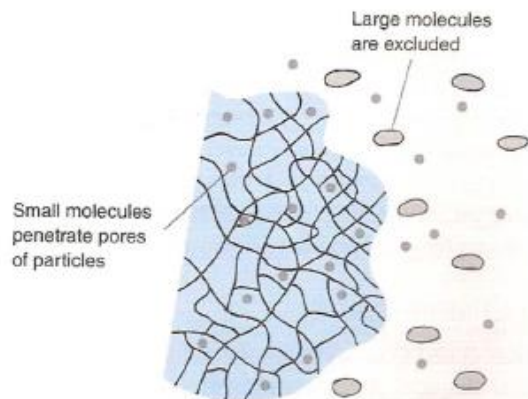
Chromatography



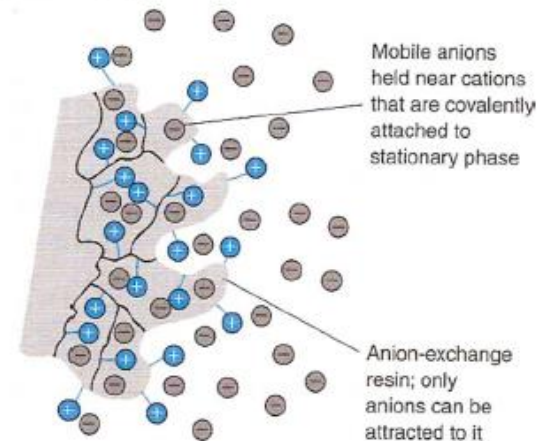
Adsorption chromatography



Affinity chromatography



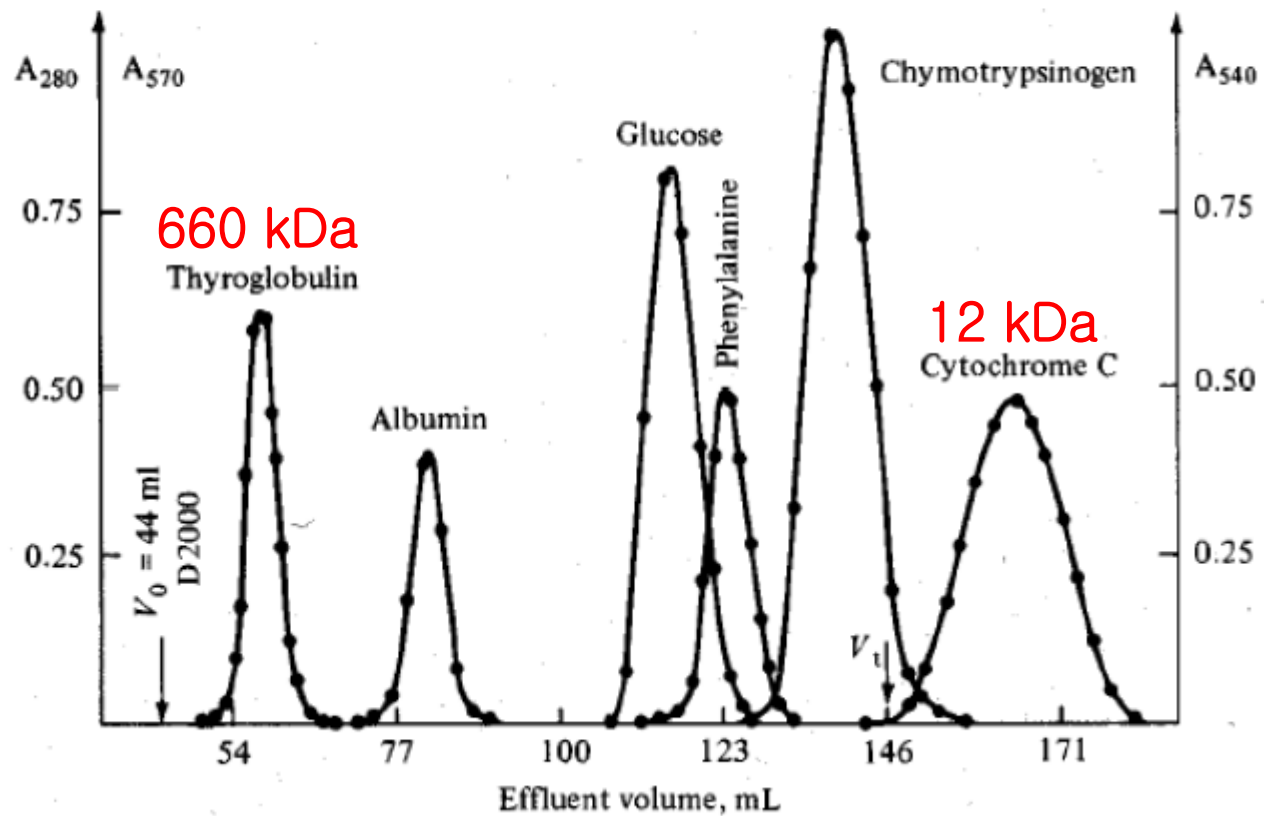
Molecular exclusion chromatography



Ion-exchange chromatography

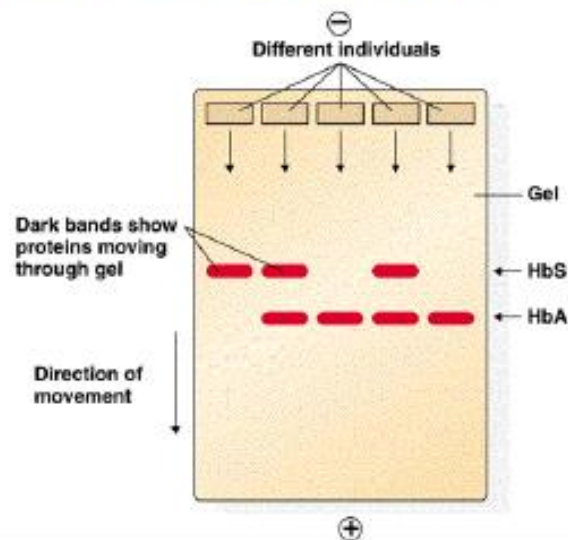
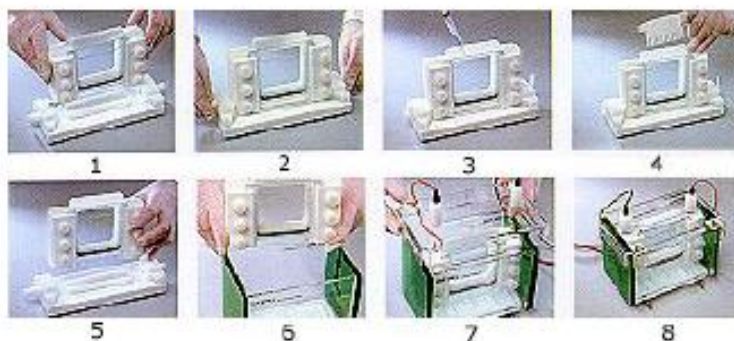
Chromatography

Bailey
and Ollis,
1986,
Fig. 11.22
molecular
sieve
chromato-
graphy



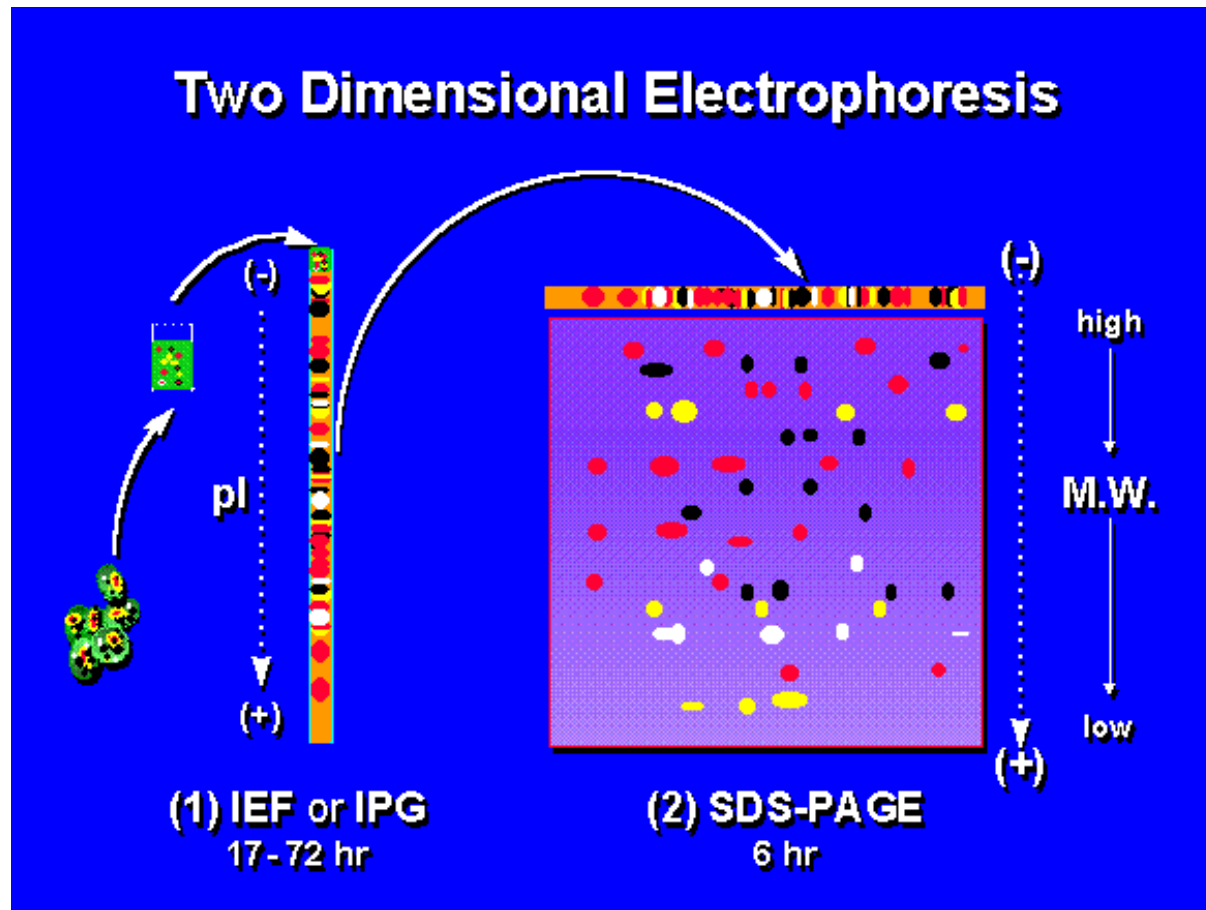
(10) 전기영동(electrophoresis)

- 전기장에서 생물분자의 크기와 전하에 따라 분리
- $pH > pI$: 단백질은 음전하, $pH < pI$: 단백질은 양전하, $pH = pI$: 단백질 침전 (등전 집속)
- 분석용에 사용, 대규모 문제 (열대류)
- 2차원 전기영동: 전하에 따라 등전집속 후 음이온 계면활성제로 코팅하여 크기별로 분리
- 분리능: 다른 분석보다 100배 이상, 아미노산 서열 결정에 사용



Bioprocess Engineering I

2차원 전기영동



(11) 전기투석(electrodialysis)

- 직접적인 전류를 가하여 전하입자를 분리하여 농축 및 희석, 효과적인 탈염기술

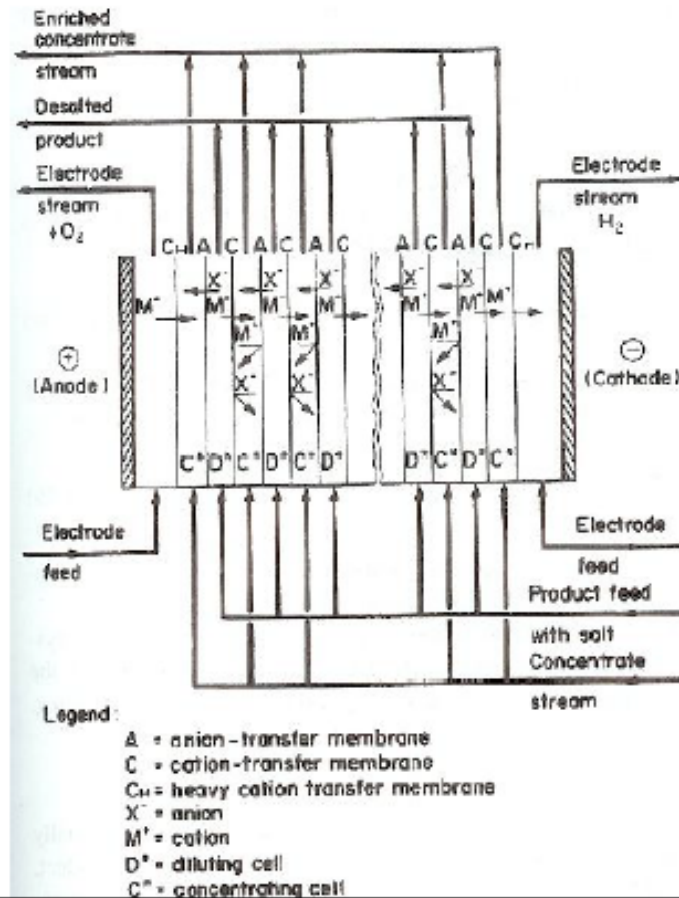
→ 그림 11.32

-음 이온 막 (음 이온 통과) 과 양이온막(양이온 통과)의 교대 배열

→ 농축격실, 희석격실

- 전해질과 단백질 농축
- 투석보다 훨씬 빠르고 더 효과적인 탈염방법
- 이온교환막 (ion-exchange membrane, IEM): 얇은 판 형태의 이온교환수지

Bioprocess Engineering I

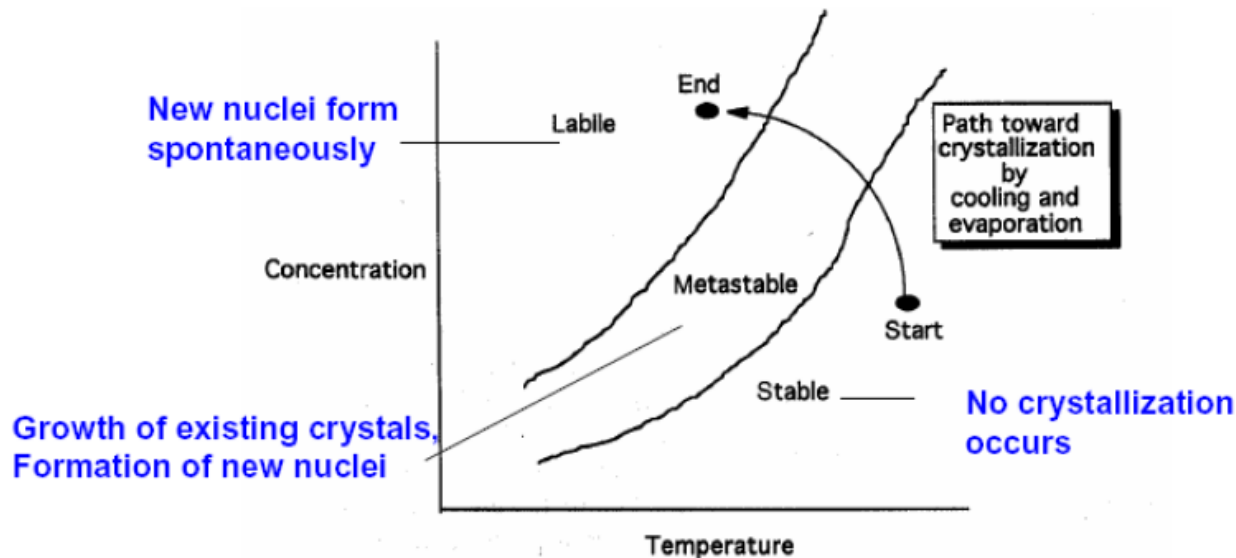


정제의 마무리 단계 (결정화, 건조)

결정화 (crystallization)

- 고도로 정제된 생성물 생산에 있어 마지막 단계
- 열에 민감한 물질의 열변성을 최소로 하는 저온에서 운전
- 최적 결정화 조건의 결정은 실험에 의해 경험적으로 이루어짐

Characteristic zones of crystallization



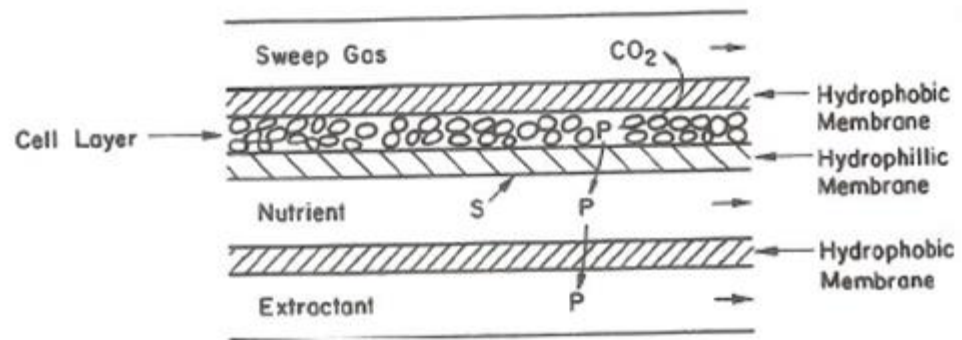
정제의 마무리 단계 (결정화, 건조)

건조: 정제된 젖은 생성물로부터 용매 제거

- 진공판 건조기 (vacuum-tray dryer): 한 용기 내의 가열된 선반들로 구성, 작은 회분식
- 동결건조 (freeze drying, lyophilization): 얼어 있는 용액으로부터 승화 (얼음으로부터 증기로)에 의해 수분 제거
- 회전통 건조기 (rotary-drum dryer): 증기가열된 회전통 표면 위에 있는 얇은 용액막으로의 열전도에 의해 수분 제거, 건조된 생성물은 배출지점에서 통으로부터 칼로 긁어 모음
- 분무 건조기 (spray dryer): 생성물 용액이 분사구를 통해 가열된 용기로 분무
- 기류수송식 건조기 (pneumatic conveyor dryer): 입자를 부유시키고 이동시키는데 뜨거운 공기흐름 사용, 입자 체류시간: 수 초

반응과 분리의 결합

- 전통적으로 균주개발, 발효, 회수기술 전문가들은 실제 독립적으로 연구 수행
 - 반응기에 회수와 정제의 관점 결합: 생성물 저해를 감소시켜 반응속도 증가, 더 농축된 공급액 사용 가능 → 원하는 생성물에 대한 선택성, 원래 세포내 생성물의 세포외 생성물로 전환, 생성물의 변성 방지
 - 진공발효, 막공정, 고체 흡착제 첨가, 액체 추출제
- ex) 발효액의 에탄올 추출제로서 트리부틸인산염 (TBP) 사용 반응기 시스템 → 상독성 (phase toxicity): 유화된 용매방울과 효모의 직접적 작용 → 용매방울을 배제하면서 영양분 유입, 생성물 유출, 세포 고정화 → 다막 생물반응기 (multimembrane bioreactor)



- 적절히 구성된 플라스미드 사용, 대장균으로부터 세포외 구역으로 단백질 분비