# 증기 확산법에 의한 Lysozyme 결정 형상 변화에 대한 연구

오명원, 함승주, 김예훈
연세대학교 화학공학과

# Morphology control of Lysozyme crystals produced by Vapor diffusion

Myungwon Oh, Seungjoo Haam, Yehoon Kim
Yonsei University Department of Chemical Engineering,

## 서론

Bio-industry에서 발효나 합성에 의해 생산되는 기능성 효소는 의약품, 정밀화학 제품, 식품의약품, 화학제품 제조시에 쓰이며, 이런 관련 물질의 대부분은 결정 형태이며 결정은 결정격자를 형성하여 획일화된 모양을 갖고 있어 무정형보다 훨씬 더 순수하다. 따라서 분리 기술중 하나인 결정화는 수많은 화학공정에 널이 쓰이고 있다. 고순도의 물질을 얻을 수 있기 때문에 결정화는 특히 제약산업에 마지막 정제 단계로 사용된다. 또한 적은 비용의 장점이 있기도 하다[1]. 이러한 결정화의 장점이 있음에도 불구하고 효소의 결정화에서는 효소 분자의 복잡한 성질 때문에 결정화 공정은 많은 시행착오를 겪는다. 이런 공정을 거쳐 상업적으로 제약산업분야에서 시판되는 것도 있으나 대부분이 이런 효소 분자 구조를 결정하기 위한 연구를 위해 단결정을 얻는데 목적이 있다[2,3]. 특히, 효소는 체내에서 신진대사에 매우 중요한 역할을 하므로 이를 이용해 신약물질들이 개발되어 지고 있다. 이들 효소의 결정화를 위한 일반적인 효소 침전 방법으로는 염석법, 유기 용매법, 등전점법, 탈염법, 증기 확산법(Vapor Diffusion)등이 있다[4,5]. 이런 결정화는 증류 및 끓는점이 높은 혼합물, 끓는점이 비슷한 혼합물들 사이의 분류가 어려울 때 그리고 효소와 같이 온도와 pH에 민감한 물질에서 적합한 분리 기술이다.

여기서는 넓은 범위에서의 결정화 조건을 갖는 증기 확산법(setting drop)을 사용하였다. 이 방법은 장치가 간단하며, 양질의 결정을 얻을 수 있으며, 다른 방법에서 결정화가 곤란한 경우에도 성공 가능성이 높으므로 여러 효소에 적용 가능성이 있다. 기본적인 원리로는 drop보다 더 높은 농도의 reservoir에서의 NaCl로 인해 증기 확산이 일어남으로 해서 효소용액의 수분은 증발을 하고 drop의 농도가 증가함으로 해서 효소의 용해도가 저하되고 결정이 생성되는 원리로써 효소에 따라 수 시간에서 수일이 걸리기까지 한다. 결정화의 온도로는 저온실(0℃~4℃) 또는 실온에 방치를 하는데 온도가 낮으면 확산속도가 낮아지는 반면 침전제의 용해도가 낮아지기도 하므로 과포화 조건이 형성되어 결정화에 이른다.

시약으로는 물에 완전히 녹고 효소와 반응하지 않으며 침전효과가 좋은 NaCl과 PEG(Polyethylene glycol)이 많이 쓰이고 있다[6]. 그리고 완충용액의 pH는 효소 활성의 최적 pH 또는 안정 pH에서 활성이 높아지므로 본 연구에서는 pH와 NaCl의 농도에 따른 Lysozyme의 형상 변화를 고찰하였다.

## 본론

1) Material and Apparatus

Lysozyme(From Chicken Egg White, lyophilized, SIGMA), Micro-Bridge(Hampton Research), 22mm Plain circle cover slide(Hampton Research), VDX plate clarified polypropylene(Hampton Research)과 4.0M NaCl수용액을 0.2M의 pH 4.0과 pH 4.4의 Acetate buffer에 첨가하여 NaCl이 각각 0.8, 1.0, 1.2, 1.4M의 Reservoir 용액를 제조하였다.

실험 장치는 Fig.1과 같이 Reservoir에 약 1ml의 Reservoir 용액을 넣고 Micro-Bridge를 세운 후 Micro-Bridge위에 droplet(2㎕ sample(Lysozyme(30mg/ml)) / 2㎕ reagent (Reservoir 용액))놓는다. plain circle cover slide를 High vacuum grease로 밀폐를 시킨 후 4℃에 방치한다.

2) Method

증기 확산법을 이용한 결정화 방법에는 Sitting Drop Crystallization, Sandwich Drop Crystallization, Free Interface Diffusion, Batch, MicroBatch Under Oil, Microdialysis Crystallization가 있는데 이중 Sitting Drop Crystallization을 이용하였다. Sitting Drop Crystallization의 장점은 실험 장치 설치가 용이하고 Sample의 양을 적게 사용하여 비용을 적게 하며, 장치가 간단하다는 장점등을 갖고 있다. 그리고 이들의 결정 형상의 변화를 위해 여러 변수(pH, NaCl)에 대해 실험하였다.

결정이 형성되는 원리로는 drop에서 reagent로 염, 중합체, 비휘발성 유기물을 사용하여 결정화를 할 경우 reagent을 reservoir 용액보다 더 낮은 농도로 하는 것이 일반적이다[6]. $H_2O$가 drop에서 제거됨에 따라 Lysozyme 용액의 상대적인 과포화도가 증가한다. 그리고 drop에서의 Lysozyme과 reagent의 농도는 증가를 함으로 해서 평형이 이루게 된다. 만약 Lysozyme을 결정화 하는데 있어 휘발성 reagent를 사용한다면 drop은 reservoir 보다 더 낮거나 더 높은 농도로 결정화를 시도 할 수 있다. 다시 말하면, drop보다 reservoir에서 휘발성 reagent가 더 높은 농도의 경우 reservoir에서 drop으로 증기 확산이 일어나며, 반대로 reservoir가 drop보다 reagent의 농도가 더 낮다면 reagent는 drop에서 reservoir로 확산이 일어난다.

효소의 농도가 높으면 결정화가 되기 좋은 반면 미결정이 생성될 우려가 있으며, 낮으면 확산속도가 낮아지므로 결정이 되기 어렵다[6]. 또한 효소의 농도가 일정할 때 기질의 농도가 높으면 결정화 속도가 높아지므로 변수로 NaCl의 농도를 0.8, 1.0, 1.2, 1.4로 하였고, 적정 pH범위에서 pH에 따라서 결정의 형상 변화를 보기 위해 pH 4.0, 4.4로 실험을 하였다.

## 결론

Fig. 2에서는 재결정화 하기전의 SEM으로 촬영한 사진으로 판상형을 나타나는 것을 볼 수 있으나 Fig. 3에서는 증기 확산법에 의한 재결정화한 것으로 정방 정계형으로 형상이 변화하였다.

Fig. 3에서 보면 pH 4.0에서의 NaCl에 대한 영향을 보면 농도가 낮을 경우에는 결정의 형태가 정방 정계 형태를 취하고 있으나 결정 성장면에서 완전히 성장이 되지 않음을 확인 할 수 있었으며, 농도가 1.2에서는 완전한 정방 정계형으로 성장을 하여 형상의 변화를 확인 할 수 있었다. 그러나 그 이상의 농도가 되면 짧은 시간에 응집이 일어나 일정한 형태의 결정으로 자라지 못한다. pH 4.4에서는 pH 4.0에서보다 낮은 NaCl의 농도인 1.0에서 정방 정계형으로 결정 격자가 형성이 되었고 pH 4.4에서 고농도의 NaCl 첨가시 짧은 시간에 응집이 나타나 여기서도 마찬가지로 일정한 형태의 결정을 얻을 수 없었다. Fig. 4에서 NaCl의 농도에 따른 결정이 생성되는데 소요된 시간은 NaCl의 농도가 1.0, 1.2M에서 과포화 된 후 각각 약 10일, 4일이 걸리며, 농도가 높아질수록 결정이 생기는 시간은 짧으나 일정한 형태의 결정성장을 하지 못하였다. 또한 NaCl의 농도에 따른 결정

의 수를 보면, 저농도 일수록 단결정의 결정수가 적어지며 고농도로 갈수록 결정의 수는 많아진다. 그리고 결정의 크기는 NaCl이 1.0, 1.2에서 가장 크게 성장하였고, 이를 Fig. 5에서 보면 결정 격자는 NaCl의 영향을 받아 적정농도 즉 pH 4.0에서는 1.2, pH 4.4에서는 1.0에서 각각 결정이 각을 이루면서 성장하였음을 알 수 있다. 그리고 각각의 크기는 Lysozyme결정이 pH 4.0에서는 약 280㎛, pH 4.4에서는 약 420㎛의 단결정으로 성장하였다. 이와 같이 각각의 NaCl농도와 pH에서 형상변화는 각 변수에서 drop의 용해도가 저하되는 차이에 따라 과포화를 형성시켜 결정의 양과 질에 영향을 준다.

Lysozyme 농도변화에 의해 결정화에 영향을 주는 요인으로는 drop에서의 $H_2O$과 reservoir사이의 물질이동과 용액에서의 Lysozyme의 핵생성 과정 그리고 Lysozyme의 결정의 성장을 들을 수 있다. 농도의 증가는 Lysozyme의 setting drop으로부터 $H_2O$가 제거되기 때문이다. Droplet에서의 $H_2O$의 감소는 drop과 NaCl/buffer reservoir 사이의 이온 강도의 차이에 의해서 이루어지며, 이것으로 $H_2O$ 증발비율 또는 drop 과포화 비율은 생성된 효소 결정의 수와 질에 영향을 준다[7]. 결정이 형성되기까지의 과정은 초기에 Lysozyme의 분자가 일정한 구조가 없는 구형의 모양을 하고 있는 점과 같은 모양에서 NaCl의 영향으로 시간이 지남에 따라 정전기력과 쌍극자 반데르발스 힘으로[6] 인해 개개의 분자가 결합을 하여 짧은 실과 같이 Lysozyme 분자가 배열을 하다가 용액이 과포화 된 후 일정한 크기와 모양을 갖는 결정으로써 성장을 하며 이것은 이전에 형성된 짧은 실과 같은 응집으로부터 만들어 졌다고 여겨진다[2]. 이 결정은 시간이 지남에 따라 성장을 하여 Fig. 3(b)에서와 같이 점차 각을 이루는 단결정으로 성장을 한다. 결정이 생기기까지의 induction time은 NaCl의 농도가 높을수록 짧아지는 경향을 가지고 있다.

## 참고문헌

[1] M.F Chplin And A.Bucke, Enzyme Technology (1990)
[2] M.Michnomae, M.Mochizuki, M.Ataka, J. Crystal Growth 197(1999)257
[3] M.V.Saikumar, C.EGlarz, M.A.Larson, J. Crystal Growth 187(1998)277
[4] F.Bonnete, D.Vivares, Ch.Robert, N.Colloc`h, J. Crystal Growth 232(2001)330
[5] Alexander McPherson, Preparation And Analysis Of Protein Crystal (1982)
[6] 이갑상, 신용서 공저, 應用 酵素學 1996
[7] Albert M.Schwartz, Kris A.Berglund, J. Crystal Growth 210(2000)753

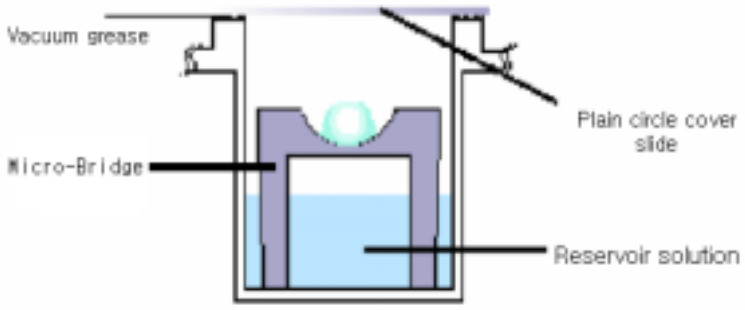


Fig. 1 실험 장치

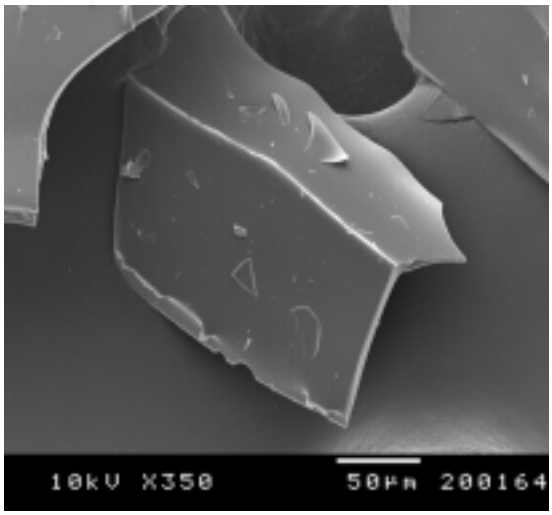


Fig. 2 재결정화전의 Lysozyme 결정 morphology

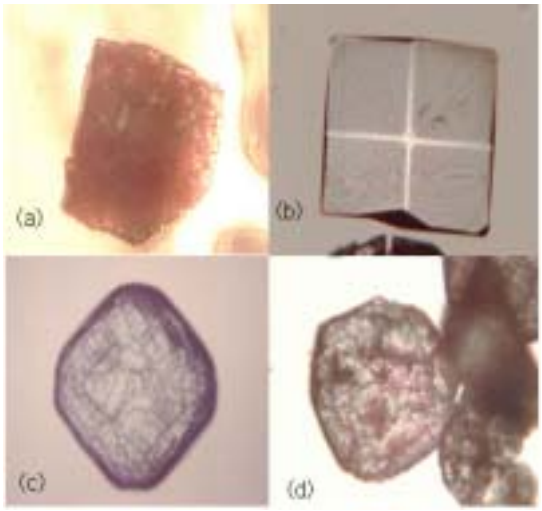


Fig. 3 Vapor diffusion에 의한 결정 morphology 변화
(a:NaCl 1.0(pH4.0), b:NaCl 1.2(pH4.0)
c:NaCl 1.0(pH4.4), d:NaCl 1.2(pH4.4)
a,b,d : X200 , c : X125)

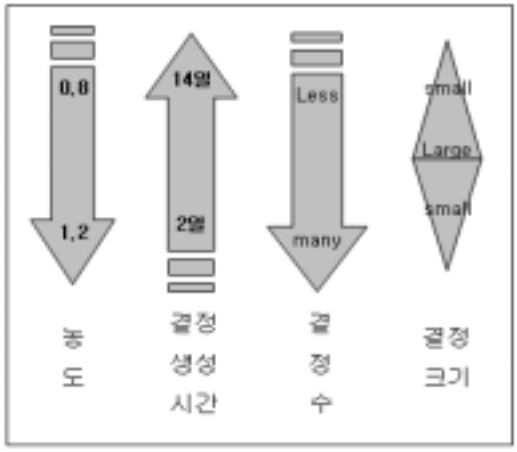


Fig. 4 NaCl 농도에 따른 결정생성 시간, 수,크기의 관계

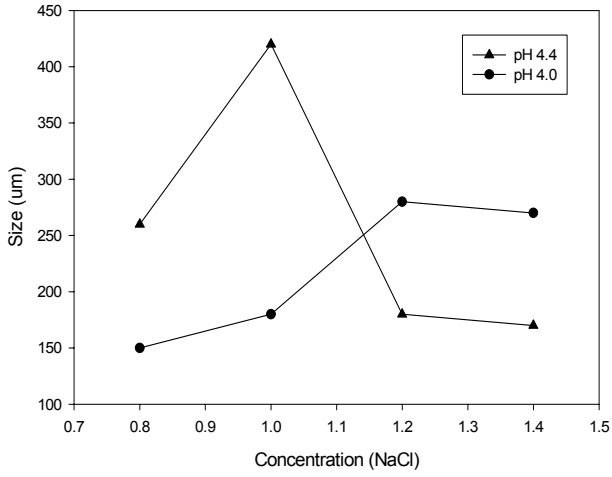


Fig. 5 NaCl 농도에 따른 결정 Size 변화