

Affinity Membrane의 개발

동국대학교 산업안전공학과

김 민

방사선 graft 중합법을 이용하여, microfiltration hollow fiber (MF)에 affinity ligand로서 소수성 아미노산 (tryptophan) 을 고정하였다. affinity 막에 압력차를 주어 막의 안쪽으로 부터 바깥쪽으로 단백질 용액을 투과시키면서, 단백질의 흡착 성능을 알아보았다. affinity 막이 확산이동 저항이 없는 우수한 분리 기능 재료인 것을 나타내었다.

1. 서론

affinity 흡착체를 ligand에 의해 분류하면, biospecific ligand와 pseudobiospecific ligand로 나누어진다¹⁾. bio-specific ligand로서는, 항체, 항원, 기질 등이 있고, pseudobiospecific ligand로서는 아미노산, 금속chelate, 염료 등이 있다. 예를들어, agarose beads에 ligand로서 Protein-A를 고정시킨 affinity 흡착체는 항체의 정제로 사용되고 있다. 또, polyvynyl alcohol beads에 ligand로서 소수성 아미노산(phenylalanine, tryptophan)을 가지는 affinity 흡착체는, 중병근무력증, rheumatism등의 치료에 사용되고 있다.

다공성 막을 이용하는 affinity chromatography는 1968년 Brandt등²⁾에 의해 제안 되었다. 그림 1에 affinity 막에 의한 단백질 분리의 원리를 나타냈다. 이 기술은 기존의 beads를 사용하는 chromatography에 비교하여 다음과 같은 장점이 있다.

- (1) 중공시막 이나 평상막을 충전한 module은 beads충전층 보다 낮은 압력으로 조작할 수 있다.
- (2) 다공성 막의 내부, 즉 구멍의 표면에 고정되어 있는 ligand에 단백질이 대류 이동하므로, 흡착 속도가 빠르다.

Brandt는 gelatin과 Protein-A이 고정되어 있는 affinity 막을 사용하여, 각각 fibrinogen과 IgG의 효율 높은 분리를 하였다. 그러나, affinity 막의 합성법, ligand 밀도, pore의 구조에 대해서는 서술하고 있지 않다.

여기서는, polyethylene microfiltration hollow fiber 을 基材로하는 affinity 막의 합성법과 그의 성능을 소개하기로 한다. affinity pair로서 tryptophan과 γ -globline을 선택하였다³⁾.

2. 소수성 아미노산을 ligand로 하는 affinity 막의 합성

소수성 아미노산을 ligand로서 가지는 affinity 막의 화학 구조를 그림 2에 나타냈다. polyethylene microfiltration hollow fiber에 glycidyl methacrylate (GMA)를 graft 중합을 한 후에, 얻어진 막중의 에폭시기와 아미노산을 결합 시켰다⁴⁾.

基材는 평균 pore 직경 0.2 μ m, porosity 70%, 내경,외경이 각각 2.13, 3.23mm이다. hollow fiber 에 전자선을 200kGy 照射한 후, GMA를 역상법으로 graft 중합하였다. 이때 얻어진 막을 GMA graft막 이라한다. GMA graft 막의 중량 증가율 (graft율)을 다음 식으로 정의하였다.

$$\text{graft율(d.g)} = (W_1 - W_0) / W_0 \times 100 \quad [\%]$$

여기서, W_0 , W_1 은 각각 基材, graft 중합 후 막의 중량이다.

얻어진 GMA graft 막 중의 에폭시기와 소수성 아미노산인 tryptophan을 결합 시키기 위해, GMA graft 막을 80°C의 tryptophan 수용액중에서 넣은 후, 24시간 반응시켰다 (coupling 반응). 그 다음에 막을 1M의 H₂SO₄중에 넣어, 남아 있는 에폭시기를 diol기로 변화시켰다 (blocking 반응). 반응 종료후, 진공 건조시켜 중량을 측정하였다. 이때 얻어진 막을 tryptophan 막이라 한다. 다음식에 의해 coupling율(X) 및 ligand밀도(d.l.)을 산출하였다.

$$X = (142 (W_2 - W_0) / (W_1 - W_0) - 160) / 186$$

$$d.l. = X (W_1 - W_0) / (142 \times W_2)$$

여기서 W_2 는 tryptophan 막의 중량이다.

얻어진 affinity 막의 물성을 표 1에 나타냈다. affinity 막의 투과유속(flux)와 비표면적은 starting hollow fiber에 비해 약75%, 60%정도 감소하였다. graft율이 120%의 GMA graft 막의 경우, tryptophan의 coupling율은 12.3%로 나타났다. 이때, ligand의 밀도는 0.4mmol/g으로 산출된다. 막의 겔보기 밀도가 0.35g-dry/mL 이므로, ligand밀도는 0.14mmol/mL로 환산된다. 이 값은 현재 시판되고 있는 흡착제와 비교 할 때 1 차수 정도 크다⁵⁾. coupling반응 후, 남아 있는 에폭시는 diol기로 변환 시켰다. 여기서, diol기는 막표면에 친수성을 부여하여, 비선택적인 흡착을 억제할 수 있다⁶⁾. 또, coupling된 tryptophan은 γ -globline을 선택적으로 흡착한다.

3. membrane affinity chromatography

단백질로서 γ -globline를 사용하였다. 이때, γ -globline의 농도는 1-4mg/mL의 범위에서 phosphate buffer saline (PBS: pH=7.4, 0.14M NaCl)액 중에 용해시켰다. 길이 12cm의 follow fiber를 U자형태 로하여, 단백질용액을 10-40mL/h의 일정 유량으로 막 내면에서 외면으로 투과 시켰다. 막을 통과한 용액을 1mL씩 채취하여, 투과된 액 중의 γ -globline의 농도를 추적하였다. 흡착액을 30mL 투과 시킨후, 세척액으로서 PBS용액을 20mL투과 시켰다. 그 다음에 용출액을 20mL 투과 시켰다. 용출액으로 1M NaCl + 50% ethylen glycol을 사용하였다.

투과유량을 변화 시켜, tryptophan막에 γ -globline의 흡착 breakthrough curve (BTC)를 그림 3에 나타냈다. 여기서 투과유량을 다음식에 의해 평균치 시간 t_R 로 환산하였다.

$$t_R = \varepsilon (d_o^2 - d_i^2) / 4 d_i u_i$$

여기서, d_i 는 내경, d_o 는 외경, u_i 는 투과유속이다. 막의 posity ε 는 함수율로 부터 구했다.

투과유량이 10-40mL/h의 범위에서는, 체류시간이 22-220sec가 된다. 이 결과, 투과 유량에 관계 없이, 즉 체류시간에 관계없이 BTC는 일치하고 있다. 이것은, 확산 이동 저항이 무시되고 있다는 것을 알 수 있다. 비교를 위해, 그림 3중에 이상적인 BTC곡선을 나타냈다. 여기서, 이상적인

breakthrough점은, 다음 식에 의해 정의 된다.

$$t_b = (d_0^2 - d_1^2) \rho_a q_0 / 4 d_1 u C_0$$

여기서, ρ_a 는 막의 겉보기 밀도, C_0 는 γ -globline의 초기 농도 이다. BTC곡선의 분산는 막의 pore size의 분포에 의한 것이라고 생각된다.

affinity 막을 사용하여, γ -globline의 흡착, 세척, 용출의 조작을 반복하였다. 조작중의 농도 변화를 그림 4에 나타냈다. 흡착과 용출의 msaa balance는 잘 일치 하고 있다. tryptophan막의 경우 γ -globline의 초기 농도 1mg/mL가 용출에 의해 peak약 7mg/mL까지 농축 되었다. 또, 2회의 반복 조작에도, 흡착의 성능에는 변화가 없었다.

4. affinity membrane의 투과유속(flux)

일정 압력(0.01 MPa)으로 γ -globline용액, PBS용액, 1M NaCl + 50% Ethylen glycole을 affinity 막의 내면에서 외면으로 투과시켜, 막의 내면적을 기준으로 투과유속을 계산하여 그림 5에 나타냈다. tryptophan막의 투과유속은 약 0.1m/h로 나타났다. 그러나, 단백질 용액을 투과 시키므로써, 투과유속은 약 30% 저하 하였다. 이것은 pore표면에 흡착한 단백질이 액의 흐름을 방해하기 때문이다. 용출액과 세척액을 차례로 투과시키면, 투과 유속은 원래의 값으로 돌아왔다.

5. 결론

다공성재료, 즉 microfiltration membrane을 base로한 affinity 막은 물질이동 입장에서 볼때, 매우 유효한 흡착 속도를 주는 재료이다. 중공시막이나 평막상의 microfiltration membrane에는 polyethylene이나 polypropylene이 많으므로, 비선택적 흡착량을 저하 시킬 필요가 있다. 고분자 표면의 신수화및 ligand밀도 균일하게 고정하기 위해 방사선 graft 중합법은 유효한 방법이다. 방사선 graft 중합법을 사용한 affinity 막은 앞으로 여러 각 분야에서 응용 될 수 있도록, 더욱 새로운 재료 설계를 해 나가야 할 것이다.

문헌

1. M.A. Vijayalakshmi, Trends in Biotechnology, 17,71 (1989)
2. S.Brandt, R.A.Goffe, S.B.Kessler, L.O'Conor, J.S.E.Zale, BIO/TECHNOLOGY,6, 779 (1989)
3. B.H.J.Hofstee, Biochem. Biophys. Res. Commum., 63, 618 (1975)
4. Min Kim, K.Saito, S.Furusaki, T.Sugo, I.Ishigaki, J.Chromatogr., 586, 27 (1991)
5. Sigma Chemical Co. Catalogue, 1990, p.1453
6. Min Kim, K.Saito, S.Furusaki, T.Sugo, J.Okamoto, J.Membr., Sci., 56,289 (1991)

표 1. tryptophan 막의 물성

Property	Trp-T	Starting hollow fibre
Degree of GMA grafting (%)	120	-
Coupling efficiency (%)	12.3	-
Ligand density (mol/kg)	0.40	-
Inner diameter (mm)	2.43	2.02
Outer diameter (mm)	4.08	3.28
Specific surface area (m ² /g)	13.9	23.9
Apparent density (kg/l)	0.35	0.24
Porosity (-)	0.60	0.71
Pure water flux ^a (m/h)	0.090	0.12

^a At a filtration pressure of $1.0 \cdot 10^4$ N/m².

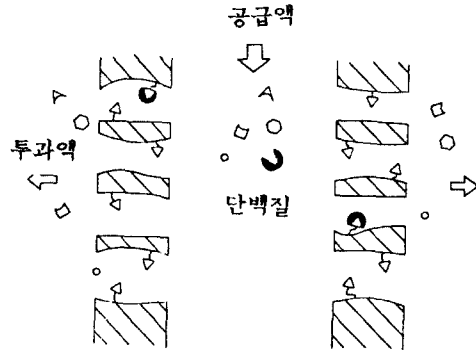


그림 1. affinity 막의 분리원리

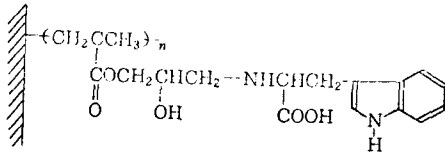


그림 2. affinity 막의 화학구조 (tryptophan)

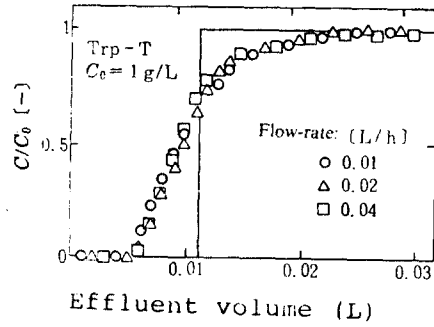


그림 3. Flux의 의존성

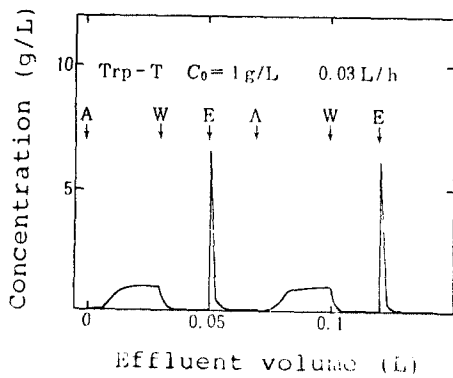


그림 4. membrane affinity chromatography

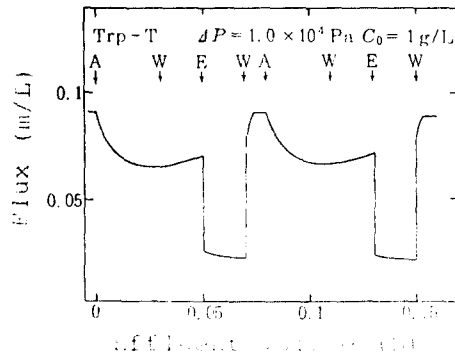


그림 5. Flux의 변화