

일반강연 II-8

키토산 및 키틴 친화성 막에 의한 단백질의 크로마토그래피 분리

육영재, 엄경호
충북대학교 공과대학 화학공학부

Chromatography Separation of Proteins by Chitosan and Chitin Affinity membranes

Yeong-Jae-Yuk, Kyung Ho Youm
School of Chemical Engineering, Chungbuk National University,
Cheongju 361-763, Chungbuk, Korea

1. 서론

생물기술의 발전에 따라 다양한 생물제품들이 산업적 규모로 생산되면서 이를 고순도로 정제하기 위한 효율적인 생산규모적 분리정제법 개발이 시급히 요구되고 있다. 특히 생물제품의 대표적 물질인 단백질, 효소, 펩타이드 등은 열과 유기용매에 민감하기 때문에 이들의 분리정제에는 종래의 감압증류, 용매추출 및 결정화법 보다 친화성 크로마토그래피법이 유리하다. 친화성 크로마토그래피는 마이크로 크기의 담체에 친화성 리간드를 결합시킨 고정상 입자를 채운 충전관을 사용하여 분리대상 목적물(리게이트)과 리간드의 상호작용에 의해 물질을 분리정제하는 방법이다. 그러나 충전관은 높은 압력강하 유발, hydorgel 입자의 압축에 의한 관 막힘과 오염현상으로 인한 이동상 유속의 저하, 생산규모로의 확대가 어렵다는 단점이 있다.

최근 충전관이 갖는 단점을 개선하기 위한 대안으로서 다공성 막을 리간드의 결합담체로 사용하는 친화성 막에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 충전관 대신 리간드가 결합된 다공성 막의 모듈을 분리관으로 사용하면 이동상의 흐름이 원활해 압력강하가 작고 물질전달을 촉진시키므로 생산성이 높아져 규모확대가 용이하다는 장점이 기대된다.

친화성 막 모듈을 사용한 분리정제 조작은 크게 친화성 막여과 크로마토그래피와 친화성 막 크로마토그래피로 구분된다. 본 실험에서는 막여과 크로마토그래피를 사용하게 되는데, 이것은 친화성 막으로 분리대상 용액을 여과시킨 후, 적절한 이동상으로 리간드와 결합된 목적물을 용출시켜 막 세공을 통해 투과시키는 방식이다.

본 연구에서는 단백질과의 우수한 결합능력을 갖는 키토산을 기초로하여 macroporous 키토산 및 키토산 친화성 막의 제조조건을 결정하여, 친화성 키토산 및 키토산 막의 단백질 흡착 특성을 규명하고 친화성 키토산 및 키토산 막모듈을 사용해 단백질의 크로마토그래피 분리특성을 규명하고자 하였다.

2. 실험

막소재인 키토산으로는 중분자량($M_w \sim 750,000$)의 것을 사용하였고, 키토산 막에 다공성을 부여하기 위한 porogen으로서 3가지 종류의 실리카 입자를 사용하였다. 제조된 키토산 막에 친화성을 부여하기 위한 염료로서는 Cibacron Blue 3GA, 키토산 막을 키토산 막으로 전환시키기 위해 acetic anhydride를 사용하였다. 친화성 키토산 막에 의한 분리대상 단백질로는 BSA(Sigma Co., fraction V, 96~99% albumin, $M_w=69,000$, USA)을 사용하였고, 키토산 막에 의한 분리대상 물질로는 lysozyme(Sigma Co., EC 3.2.1.17, hen egg white)을 사용하였다.

Fig. 1와 Fig. 2는 막카트리지와 막카트리지를 장착한 친화성 막여과 크로마토그래피의 개략도이다. BSA를 분리대상으로 하는 친화성 키토산 막은 8개의 적층구조로 사용하였고, washing buffer로는 0.05M Tris-HCl/0.05M NaCl(pH 8), elution buffer로는 0.05M Tris-HCl/0.5N NaSCN을 사용하였다. Lysozyme을 분리대상으로 하는 키토산 막은 4개의 적층구조로 사용하였고, washing buffer로는 0.1 M phosphate buffer/1M NaCl(pH 8), elution buffer로는 0.1 M acetic acid solution을 사용하였다. 펌프를 사용하여 막카트리지에의 도입 유속과 elution 유속을 변화시켰으며, 각 단백질의 농도와 주입량에 변화를 주어 이들 각각에 대한 막여과 크로마토그램을 UV-Vis 분광광도계로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 3은 친화성 키토산 막여과 크로마토그래피에서 도입되는 유속변화에 따른 용출양과 수율을 나타낸 결과이다. 도입되는 유속이 작으면 염료와의 결합되는 체류시간이 길어지기 때문에 흡착량이 많아지게 되어 용출양도 증가한다. 이와 반대로 유량이 커지면 염료와의 결합되는 체류시간이 짧아지기 때문에 용출양이 작아진다.

Fig. 4는 친화성 키토산 막여과 크로마토그래피에서 elution 유속에 따른 용출양과 수율을 나타낸 결과이다. elution 유속이 빠르면 염료와 결합된 BSA의 탈리가 더 신속히 이루어지며, elution 유속이 느리면 염료와 결합된 BSA의 탈리가 완만히 이루어지고 완전히 탈리가 되지 않기 때문에 용출양도 적어지게 된다.

4. 참고문헌

- 1) R. J. Leatherbarrow, P. D. D. Dean, Studies on Mechanism of Binding of Serum Albumin to Immobilized Cibacron Blue F3GA, *Biochem. J.* 189(1980) 27.
- 2) Arnolods, F. H., H. W. Blanch and C. R. Wilke, Analysis of Affinity Separation, *Chem, Eng. J.*, 30, B9(1985)
- 3) Bradt, S., R. A. Goffe, S. B. Kessler, J. L. O'Conner and S.E. Zale, Membrane-Based Affinity Technology for Commercial Scale Purification, *Biotech*, 6, 779(1988).
- 4) Zeng, X. and E. Ruckenstein, Supported Chitosan-Dye Affinity Membranes and Their Protein Adsorption, *J. Memb. Sci*, 117, 271(1996)

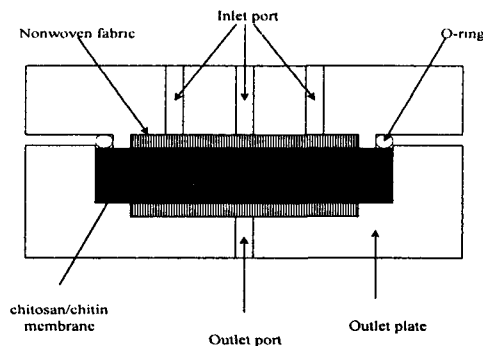


Fig. 1. Membrane cartridge.

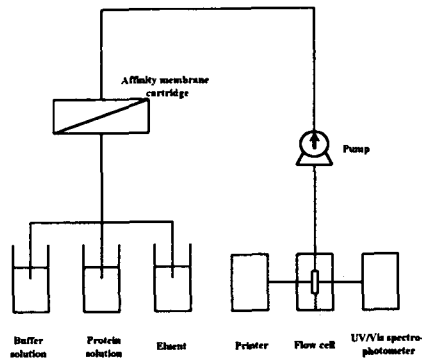


Fig. 2. Scheme of affinity membrane filtration chromatography.

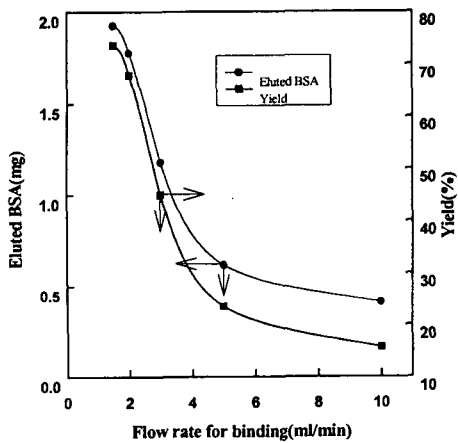


Fig. 3. Relationship between the amount of eluted BSA and yield from the affinity chitosan membrane. (BSA concentration - 0.5mg/ml, loading amount - 12ml, washing and elution flow rate - 5ml/min, 8 stacked membrane, solvent - 0.05M Tris/0.05M NaCl, pH 8)

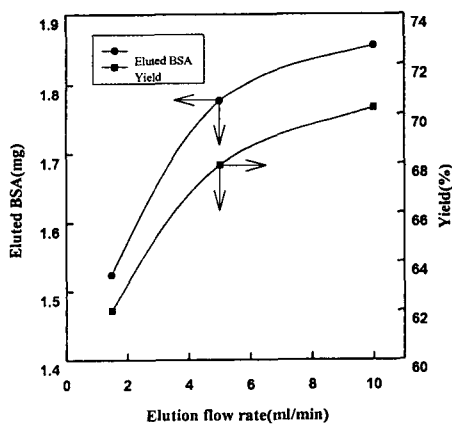


Fig. 4. Relationship between the amount of eluted BSA and yield from the affinity chitosan membrane. (BSA concentration = 0.5mg/ml, loading amount = 12ml, loading flow rate = 2ml/min, washing and elution flow rate = 5ml/min, 8 stacked membrane, solvent - 0.05M Tris/0.05M NaCl, pH 8)