

단백질의 분리정제를 위한 한외여과막의 응용에 대한 연구

손동호, 전희진, 조남준, 구자경

충남 천안시 병천면 가천리 307 한국기술교육대학교 응용화학공학과

A Study on the Application of Ultrafiltration Membranes for Separations and Purifications of Proteins

Dong-Ho Sohn, Hoe-Jin Chun, Namjun Cho and Ja-Kyung Koo

Korea University of Technology and Education, 307 Byungchun-Myon, Gajeon-Ri Choongnam Korea

1. 서론

최근에 이루어지고 있는 생명공학의 성장에 따라 단백질을 대량으로 정제할 수 있는 공정 개발에 대한 필요성이 부각되고 있다. 이러한 목적으로 기존에 이루어지고 있는 침전법, 결정화법 그리고 원심분리법과 같은 방법은 선택도가 매우 떨어지는 단점이 있으며, 반면 크로마토그래피 및 전기영동과 같은 방법은 탁월한 선택도에 비해 그 규모가 매우 작은 경우에 알맞은 방법으로서 대량생산 체계에서는 적합하지 못하다는 것이 그 단점이다. 이러한 기존의 재래식 분리정제법의 단점에 대하여 한외여과법이 대표적인 대안으로 부각되고 있다. 한외여과법은 실험실 규모의 실험결과로부터 스케일-업 하기가 매우 용이하므로 대량생산체제에 가장 적합한 방안이며, 한외여과공정에 사용하는 분리막의 공극의 크기, 분리정제되는 용액의 pH 및 막분리공정의 TMP 등의 변수를 최적화 함에 따라 매우 높은 선택도 까지도 얻을 수 있는 방법으로 알려져 있다. 본 연구의 목적은 한외여과공정을 통하여 단백질을 분리정제하기 위한 기본 자료를 마련하는 것이다. 최근 단백질의 분리정제를 위하여 한외여과공정을 응용하는 분야로는 주로 난단백(egg white)으로부터 라이소자임을 분리정제 하는 분야에서 가장 널리 연구되어 왔다. 본 연구에서도 Millipore 사의 한외여과막을 이용하여 난단백으로부터 라이소자임을 분리 정제하기 위한 최적의 분리막 및 막분리공정의 조건에 대하여 연구하였다.

2. 실험

본 연구에서는 Millipore 사 제품인 교반형 막분리장치(Stirred Cell 5122)를 이용하여 막분리를 수행하였다. 막분리장치는 외부로부터 장치 내에 연결된 질소에 의해 가압되어 TMP 가 형성되도록 하였으며, TMP 의 범위는 0.5 - 3.0 bar의 범위로 채택 하였다. 막분리장치 내의 용액은 magnetic stirrer 에 의해 교반하여 막 상류부 용액의 농도분극 현상을 방지하였다. 투과실험이 이루어지는 동안 분리막을 통하여 투과된 용액의 질량은 전자저울을 통하여 측정, 기록되었으며 투과유속은 시간에 따른 투과용액의 질량 증가율에 의하여 산출 되었다. 분리막은 Millipore 사에서 제조한 cellulose 재질의 막을 사용하였으며 사용된 막의 MWCO 는 각각 100,000(PLHK04310), 30,000(PLTK04310), 10,000(PLGC04310) 및 5,000(PLCC04310)을 선택하여 실험 하였다. 난단백 용액은 시판되는 계란을 구입하여 그 흰자위를 1%로 희석하여 만들었으며, 용액의 pH는 phosphate 완충용액을 이용하여 그 pH 가 각각 6, 7, 8 이 되도록 조절하여 사용하였다. 한외여과가 이루어지기 이전의 용액과 한외여과막을 통해 투과된 용액 내의 성분별 함량은 HPLC(HP series1100) 에 의해 측정되었으며, 사용된 column으로는 Waters 제품인 Shodex KW-802.5를 사용하였다.

3. 결과 및 토론

본 연구와 같이 한외여과를 통하여 단백질을 분리하는 공정의 효율은 되도록 투과유속과 라이소자임의 transmission을 높게 유지하는 데에 달려 있다. 동시에 분리, 정제된 라이소자임의 순도를 최대로 하기 위하여서는 알부민과 같은 난단백 내의 여타의 성분에 대한 transmission은 되도록 낮게 유지하여야 한다. 한외여과공정에서의 투과유속과 용질의 transmission에 대하여 가장 직접적인 영향을 끼치는 것은 분리막의 공극직경에 의하여 결정되는 MWCO(Molecular Weight Cut Off)이며 본 연구에서는 각각 MWCO 100,000, 30,000 및 10,000으로 변화시켜 가면서 분리막의 효율을 측정하였다. Fig 1. 은 이들 각각의 분리막을 통한 용액에서의 라이소자임과 알부민의 농도를 나타낸다. MWCO 100,000 분리막의 경우 난단백 내에 알부민이 워낙 많이 함유되어 있으므로 막을 통하여 한외여과된 용액 내에서도 라이소자임에 비해 매우 높은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. 그러나 알부민은 그 분자량이(45,000) 라이소자임(14,300)에 비해 매우 높으므로 MWCO 가 줄어들면서 투과된 용액내의 함량이 라이소자임에

배해 매우 급격하게 감소하는 것을 볼 수 있으며 MWCO 가 10,000에 도달해서는 알부민의 함량이 라이소자임의 함량보다 낮아지는 것을 볼 수 있다. Fig. 2 는 MWCO 30,000의 한외여과막에서 TMP 의 증가에 따른 투과용액 내의 알부민과 라이소자임의 농도의 변화를 보여준다. TMP 의 증가에 따라서 투과액 내의 알부민의 농도는 크게 감소하는 반면 라이소자임의 용액은 크게 변화하지 않는 것을 볼 수 있다. 이는 TMP 가 더 높은 범위에서는 분리막의 MWCO를 변화하지 않고도 매우 라이소자임의 선택도를 크게 높일 수도 있다는 가능성을 내포한다. 그림 3. 은 MWCO 30,000의 한외여과막에서 원료용액의 pH가 투과용액의 알부민과 라이소자임의 농도에 끼치는 영향을 보여준다. 그림에서 볼 수 있듯이 원료용액의 pH가 증가하면서 투과용액에서의 알부민의 농도는 감소하면서 반면 라이소자임의 농도는 서서히 증가하는 것을 볼 수 있다. 이러한 현상은 알부민과 라이소자임의 등전점으로 설명을 할 수 있다. 알부민은 그 등전점이 4.0 - 5.0 의 사이에 존재하며, 라이소자임은 그 등전점이 11.0 이다. 그러므로 실험구간 내에서는 pH 가 증가하면서 알부민의 경우 pI로부터 멀어지며 옴으로 더 높은 하전을 띄게 된다. 반면 라이소자임의 경우에는 pH 가 증가하면서 pI 에 접근하게 되며 결과적으로 하전량이 떨어지게 된다. 이는 한외여과공정에서의 농도분극에 영향을 끼치게 된다. 하전량이 높은 용질은 분자 상호간에 정전기적인 영향으로 밀치는 힘이 작용하며 이로 인해 투과과정을 통해 막 표면에 용질 분자가 축적되는 이른바 농도분극 현상을 억제하게 된다. 반면 하전량이 낮아지면서 용질분자 상호간에 작용하는 정전기적 척력이 약화되고 농도분극현상은 원활하게 진행되게 된다. 용질분자에 대한 농도분극 현상이 진행되면서 막 상류부 표면에는 용질 분자가 모여들며 용질의 농도는 높아지고 결과적으로 투과되는 용액에는 높은 함량의 용질 분자가 존재하게 된다.

본 연구의 결과로 한외여과를 통하여 단백질을 분리정제 하는 데에 있어서 선택도를 높이는 가장 직접적인 방법은 분리막의 MWCO를 조정하는 것이지만, 원료용액의 pH와 투과공정에서의 TMP를 최적화 하여 분리막의 MWCO를 변화하지 않고도 선택도를 높일 수 있다는 결론을 얻을 수 있었다.

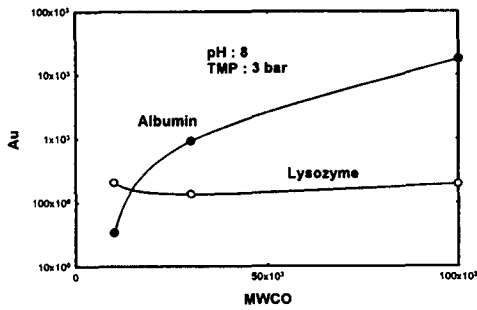


Fig 1. Effect of MWCO of membrane on the concentrations of albumin and lysozyme in permeate solution

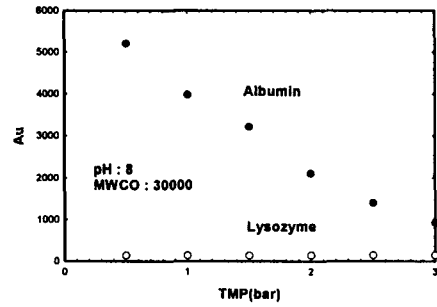


Fig 2. Effect of TMP on the concentrations of proteins in permeate solutions

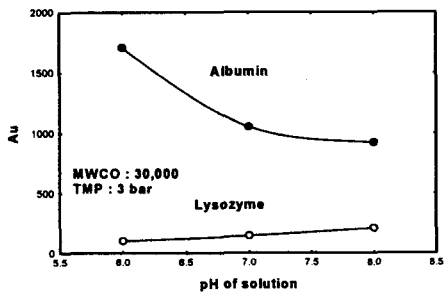


Fig 3. Effect of pH on concentration of albumin and lysozyme in permeate solutions

4. 참고문헌

1. R.Ghosh and Z.F.Cui, Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane, J. Membr.Sci., 167, 2000, 47-53
2. R. Ghosh and Z.F.Cui, Purification of Lysozyme Using Ultrafiltration, Biotech.Bioeng. 68(2), 2000,191-203