

Enhancement of Protein Separation by Electric Field Applied to Ultrafiltration

Chunhwa Shin, Dongho Son, Yunhee Lee, Ja-Kyung Koo, Dong Il Jang¹, Namjun Cho
Dept. of Applied Chemical Engineering, Korea Univ. of Tech. & Edu., ¹Cotde Co. Inc.
TEL: +82-41-560-1342, FAX: +82-41-560-1224

Abstract

Ultrafiltration has been performed to separate proteins, which is almost unique method of protein separation in mass production scale. The problems of its low selectivity and decline in permeation flux resulted from gel formation on the membrane surface have been greatly improved by an applied electric field across the membrane. The applied electric field promoted or hindered the permeation of protein through membranes depending on the electric charge of protein molecules in aqueous solution. With the effects of electric field, the permeation flux and the selectivity of the ultrafiltration could be improved significantly.

서론

단백질을 분리하기 위하여 원심분리, 추출, 전기영동 등의 방법이 널리 사용되고 있으며 실험실 규모에서 높은 분리선택도를 나타내고 있지만, 이들 방법은 대량생산에 부적합한 단점을 가지고 있다. 이에 반해 한외여과공정은 단백질을 대량으로 분리정제하기 위한 매우 적합한 방안으로 알려져 왔다. 그러나 한외여과공정은 막 표면에서의 케이크층 형성과 막 오염으로 인한 투과유속 감속과, 다른 분리공정에 비하여 선택도가 낮다는 문제점이 있다.¹⁾ 단백질 분리정제를 위하여 한외여과공정을 사용할 경우 분리선택도를 높이기 위한 방안으로 한외여과막의 공극직경 혹은 MWCO등을 조정하는 방안이 있으며 이외에 용액의 pH, TMP등의 변수를 조정하는 등의 방법²⁾으로 분리선택도를 어느 정도 높일 수 있지만 한외여과공정에서의 문제를 근본적으로 해결할 수는 없다. 한외여과공정에서의 단백질의 분리선택도를 높이는 또 하나의 방법으로 전기한외여과법(elector-ultrafiltration)을 들 수가 있다. 전기한외여과법은 분리막의 상류부와 하류부에 각각 전극을 설치하고 전압을 가하는 방법으로써 단백질 농축시에 막의 fouling을 방지하는데 주로 사용되어온 방법

이다. 본 연구에서는 전기여과법을 통하여 분리 막 오염방지 뿐만 아니라 용액의 pH에 따라 난단백의 주요성분인 albumin과 lysozyme의 수용액에서 각 성분의 등전점 차이로 인한 전하의 변화를 이용하여 분리막의 선택도를 개선하는 방안을 연구하였다.

재료 및 방법

실험에 사용된 단백질 용액으로는 난단백의 주요 성분인 albumin과 lysozyme을 Sigma에서 구입하였으며 이를 증류수에 용해시켜 제조하였다. 한외여과막은 Millipore사의 MWCO 30kDa의 재생 셀룰로즈 재질을 구입하였으며 실험장치는 Figure 1과 같은 내경 4cm, 높이 5cm의 투과셀을 제작하여 실험하였다. 투과셀 상부에는 질소로써 가압하여 3.5bar의 TMP가 작용하도록 하였다. 투과셀의 막 상류부와 하류부에 각각 백금 재질의 전극판을 설치하였으며 막 상류부에는 양전극을, 막 하류부에는 음전극을 설치하여 0~80V 구간의 전압을 걸면서 실험하였다.

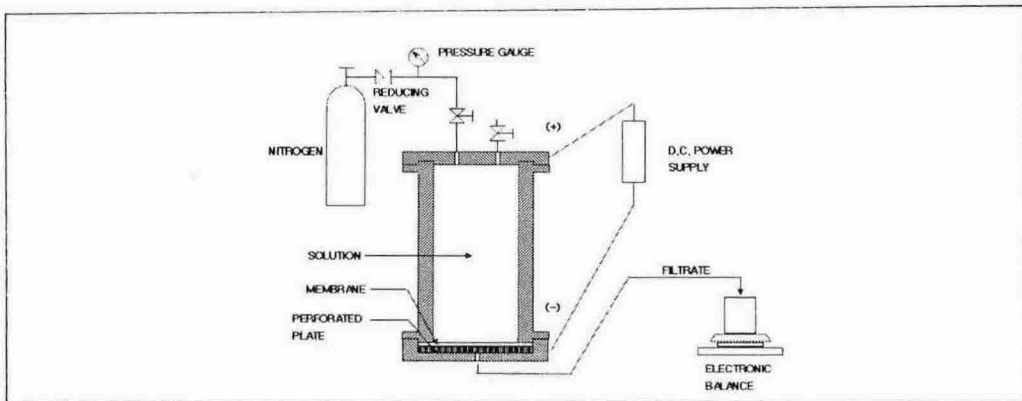


Figure 1. Experimental set-up for ultrafiltration with applied electric field

결과 및 고찰

Figure 2는 pH 7의 albumin 용액에 전압을 걸어주었을 때 전압이 걸리기 전과 후에 막을 통한 투과유속의 변화를 나타낸다. 용액의 pH가 albumin의 등전점(4.5, 6.1) 보다 높으므로 pH 7용액 내에서는 음으로 하전 된 albumin이 막 하류부의 음전극과 정전기적인 척력이 작용하므로 albumin 분자들은 여과조 상단부로 이동 할 것이다. 따라서 막 상류부 표면의 케이크층은 상당부분 제거되며 그 결과로 케이크층에 의해 작용하는 투과저항도 사라지게 되어서 결과적으로 투과유속이 급증하는 것이다.

Figure 3은 pH 7의 albumin 용액을 한외여과 하였을 경우의 여과계수비 (전압 v가 걸린 이후의 특정 두 단백질의 분리 농도비/전압이 걸리기 전의 특정 두 단백질의 분리 농도 비)에 대한 전압의 영향을 나타낸다. 이 그림에서 전압이 상승하면서 albumin의 여과계수비는 감소하는 것을 볼 수 있다. pH 7 용액에서 하류부에 설치된 음전극과 척력이 작용하여 albumin의 분리막으로의 투과가 방해받게 되며, 상류부에 설치한 양전극 주변으로 모여들게 되어 분리막 표면에서의 알부민의 농도가 크게 감소하게 된다. 따라서 한외 여과 과정에서 albumin의 여과계수비 또한 용액에 걸리는 전압의 증가에 따라 반비례하여 줄어들게 되는 것이다. Figure 4는 pH 7의 lysozyme 용액에 전압을 걸어주었을 때 전압이 걸리기 전과 후에 막을 통한 투과유속의 변화를 나타낸다. 전압이 걸리면서 투과유속은 변화가 거의 없는 것을 알 수 있다. 이는 용액의 pH가 lysozyme의 등전점(11)보다 낮으므로 용액 내에서는 양전하를 띠게 되며 막 하류부의 음전극과는 인력이 작용하여 막을 통한 투과가 촉진되기 때문이다. 여기서 양으로 하전된 lysozyme 분자는 분리막 표면에 모이게 되며 농도분극 현상이 촉진될 것으로 예측되나 lysozyme 분자가 분리막 공극을 비교적 자유롭게 통과할 정도로 작으므로³⁾ 농도분극 현상이 심하게 일어나지 않는다. Figure 5는 pH 7의 lysozyme 용액을 한외여과 하였을 경우 여과계수비에 대한 전압의 영향을 나타낸다. Albumin 용액의 과정과는 반대로 lysozyme 용액을 한외여과 하였을 경우에는 전압이 걸리지 않았을 경우에 가장 작은 여과계수비 값을 가지며 전압의 상승에 따라 lysozyme의 여과계수비는 증가하였다. pH7 용액에서 양으로 하전된 lysozyme은 막 상류부에 설치된 양전극과 척력이 작용하고 분리막 하류부에 설치된 음전극과 인력이 작용하여 막 하류부로 당겨지게 된다. 결과적으로 투과용액 내의 lysozyme의 함량과 한외여과과정의 lysozyme 여과계수비는 전압이 증가함에 따라서 증가하게 된다.

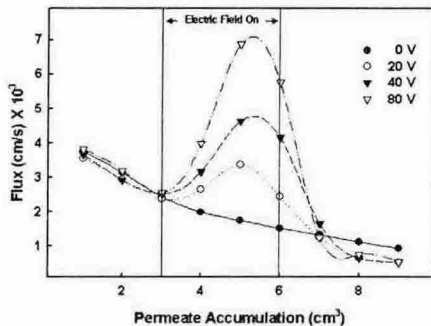


Fig 5. Permeation flux Albumin solution at pH 7 before and after the electric field applied.

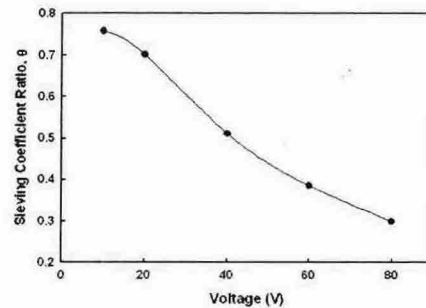


Fig 6. Effect of voltage on the sieving coefficient ratio of albumin (in the electrofiltration of albumin solution at pH7)

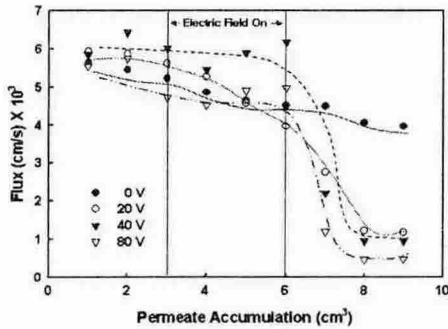


Fig 7. Permeation flux Lysozyme solution at pH 7 before and after the electric field applied.

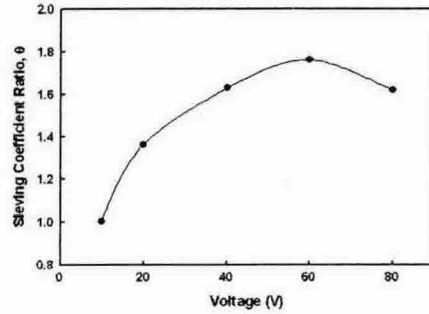


Fig 8. Effect of voltage on the sieving coefficient ratio of lysozyme (in the electrofiltration of lysozyme solution at pH7)

요 약

한외여과분리를 이용해 albumin과 lysozyme의 혼합용액 중 두 단백질을 분리하는데 대한 전기장의 효과를 조사하였다. albumin 용액을 pH7에서 분리한 결과, 전기장의 의해 투과유속은 증가하나 albumin의 여과계수비는 감소하였다. lysozyme 용액을 pH7에서 분리한 결과, 전기장의 의해 투과유속이 소폭 감소하며 여과계수비는 증가함을 볼 수 있었다. 한외여과에서의 lysozyme의 albumin에 대한 선택도는 전기장에 의해 대폭 향상되었다. 전기한외과법을 사용하여 lysozyme과 albumin을 효율적으로 분리하기 위한 기초를 확립하였으며 기존 한외여과법의 단점을 크게 개선하였다.

감 사

본 연구는 지역전략산업 석박사 연구인력 양성사업의 일환으로 수행되었으며 산업자원부의 연구비 지원에 감사드립니다.

References

1. R. Ghosh and Z.F. Cui, "Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane" (2000), J. Membrane Sci., Vol. 167, 47
2. C.K. Lee, W.-G. Chang, Y.-H. Ju, "Air slugs entrapped cross-flow filtration of bacterial suspensions" (1993), Biotech. Bioeng., Vol. 41, 525
3. M. Balakrishnan, G.P. Agarwal, "Protein fractionation in a vortex flow filter I : Effect of system hydrodynamics and solution environment on single protein transmission" (1996), J. Membrane Sci., Vol. 112, 47.