

한외여과막을 이용한 단백질 분리에 관한 연구

최 원 영 · *임 균 택 · **이 규 현 · 박 돈 희

전남대학교 공과대학 화학공학과

*전남대학교 공과대학 고분자공학과

**선경건설연구소 (주) Membrane 사업부

The Study on Protein Separations Using Ultrafiltration Membranes

Won-Young Choi, Gyun-Taek Lim*, Kyu-Hyen Lee**, Don-Hee Park

Department of Chemical Engineering, Chonnam National University

**Department of Polymer Engineering, Chonnam National University*

***Sunkyong Engineering and Construction Co., Ltd.*

ABSTRACT

The experimental investigations about ultrafiltration(UF) of bovine serum albumin(BSA) solutions were conducted with a batch stirred cell. This study was investigated on the permeate flux. The experiment was carried out at pH 4.8. Protein concentrations were measured spectrophotometrically. For very dilute samples, a Lowry method was used.

In the ultrafiltration of dilute BSA solutions, the permeate flux according to working time was decreased smoothly and at isoelectric point, concentration polarization of BSA solution was ignored at limited working pressures by magnetic stirring.

서 론

막분리 공정이란 반투과성 막을 이용하여 기상, 액상의 혼합물질 중에서 목적물질 만을 분리 농축 분별해 내는 공정을 말한다(1).

막을 이용한 물질의 분리기술은 그 원리 및 공정이 단순하므로 적용범위에 제한을 받지 않아 거의 모든 액체 및 기체상의 분리공정에 이용될 수 있다. 또한 에너지 소비가 적으며 용매등이 필요치 않아 경제적이고 상변화와 고온처리 등이 수반되지 않는 장점을 가지고 있다.

막분리는 1) 막의 특성, 2) 막분리 대상물질의 특성, 3) 추진력 등의 세가지요소를 이용하여 분리조작을 행하는 것이다. 이러한 세가지 요소에 의해서 서로 다른 분리기구와 응용분야를 갖는다(2, 3). 또한 분리 대상

물질의 크기를 기준으로 정밀여과, 한외여과 그리고 역삼투로 구분된다(1-5).

막분리 공정중 한외여과는 정밀여과와 역삼투압의 중간에 위치하는 것으로 고분자 용액으로 부터 저분자물질을 제거하는 점에서는 확산투석과 유사한 관계가 있다. 그러나 농도차가 아닌 압력차를 이용하는 것은 역삼투법과 근본적으로 동일하다(6).

역삼투법은 고압을 이용하여 염류 및 고분자물질 모두를 배제시킬 수 있는 반면, 한외여과법은 저압을 이용하여 염류와 같은 저분자 물질은 막을 투과시키고, 단백질과 같은 고분자물질은 투과시키지 못한다. 또한 고분자 물질중에서도 저·중·고 분자량 물질을 분리시킬 수 있는 특징을 지니고 있다(6).

한외여과는 분자크기가 10-1000Å에 달하는 분자나 콜로이드 입자를 분리하는데 사용하는데, 한외여과막의

공경은 20–500Å 범위이며 압력차 10–100psig에서 분리하고 있다(3). 초기의 한외여과의 응용(7–9)은 하수오나의 유출물 중 불순물을 제거하는 것이었으나 최근에는 효소와 세포의 농축(9), 식품, 폐수처리, 인공장기(10) 및 생물반응기(11)에 널리 응용되고 있다.

1748년 Abbe Nollet(12)는 알콜이 담긴 돼지의 방광이 물속에서 팽창하는 현상을 관찰하였으며, 그로부터 100년 이상이 지난 1860년 Van't Hoff(4) 법칙에 의해 삼투현상으로 설명되어졌다.

1939년 Dobry(13)는 cellulose acetate로 다공성막을 제조하였다. 1959년 Reid와 Breton(12)이 cellulose acetate가 탈염에 효과적인 막제조 대상물질임을 발견하였으며 그 이후 1960년 Loeb와 Sourirajan(9)이 종래의 cellulose acetate막이 염채거울은 좋으나 flux가 적어서 실용성이 없는것에 착안하여 비 대칭형 cellulose acetate막이 개발되었다(14). 이 막은 주로 해수를 역삼투에 의하여 담수화하는 공정에 쓰여졌다(15).

산업계에서는 미생물을 이용한 순수한 단백질 제품의 생산이 큰 비중을 차지한다. 최근 균주의 개량과 생물반응기의 발달에 힘입어 단백질 제품은 대량 생산 단계에 들어가게 되었다(16–18). 이에 따라 효율이 높은 분리 정제 기술의 필요성이 대두되었다. 기존의 분리방법인 침전, 침강, 증류, 추출, 크로마토그래피, 전기영동 및 원심분리법 등이 환경에 예민한 단백질의 경우 적합하지 않으므로 새로운 분리기술을 찾게 되었다. 최근 분자량 차이를 원리로 하는 막분리 기술은 생물공학자의 큰 관심을 끌게 되었으며 단백질 분리에 많이 이용되고 있다. 본 연구에서는 단백질 분리에 여러가지 조업조건이 분리 성능에 미치는 영향을 관찰하기 위해 조업조건을 변화시켜 가며 투과액의 농도변화를 관찰 하였다.

재료 및 방법

시약

Table 1. Characteristics of ultrafiltration membranes(9)

Type	Chemical Composition	Geometry	Water Permeability ($m^3/day \cdot m^2 \cdot atm$)	Molecular weight cut-off	Resistance		
					pH	Temp ($^{\circ}C$)	Pressure (atm)
PM30	Polysulfon	Flat	30	30,000	1.5 ~13	75	4
XM50	Dynel	Flat	6	50,000	1.5 ~13	50	4

본 연구에서 사용한 용질의 단백질 용액은 BSA(Bovine serum albumin) (시그마 약품 회사제 No. A-7906, Lot No. 78F-0066)를 증류수에 녹여 사용하였다. 실험에서는 단백질 농도를 McIlvain's citric acid-phosphate 완충용액(19)으로 부터 단백질이 전기를 띠지않는 등전점(isoelectric-point)(20)인 pH 4.8에서 알부민 농도를 0.05%(W/V), 0.1%(W/V)로 변화시켜 실험을 수행하였다.

한외여과막

한외여과막은 미국 Amicon사의 평막 PM30, XM50을 시중에서 구입하여 사용하였으며 각각의 특성은 Table 1.과 같다.

PM30의 재질인 polysulfon(21)은 60 $^{\circ}C$ 이상의 고온에서도 사용할 수 있는 수지로 세정 및 살균작용을 할 수 있으며 내약품성이 우수해 산·알칼리에도 잘 견딘다. 또한 XM50의 재질인 dynel(22)은 40%의 아크릴로니트릴과 60%의 비닐클로라이드의 공중합체로서 만들어진 물질이다.

실험에 사용할 막의 전 처리는 증류수에 3시간 담근 후, 담구었던 막을 다시 cell에 설치한 후 3.7atm에서 증류수를 5분 동안 통과시킨 후 실험을 행하였다.

한외여과장치

한외여과장치는 회분식 투과장치를 사용하였으며, 개요도는 Fig. 1과 같다. 투과cell의 재질은 스테인레스 스틸을 사용하였으며 용액실험부피는 150ml, 유효표면적은 14.52 cm^2 이다.

Fig. 1과 같이 투과cell은 두 부분으로 되어있다. Cell의 하부에는 스테인레스 스틸로 된 다공성 판을 지지대로 놓고 그 위에 여과지를 놓은후 막을 설치한다. 두 투과 cell 부분은 테프론 o-ring을 사용하여 밀폐하고 cell에 알부민 용액을 채워 용액과 막을 접촉하게 하였다. 장치내에는 자석 교반기를 회전시켜 투과에 따른

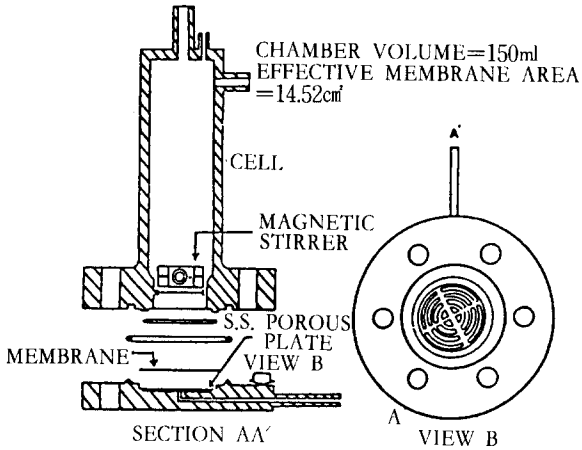


Fig. 1. Schematic diagram of liquid permeation cell.

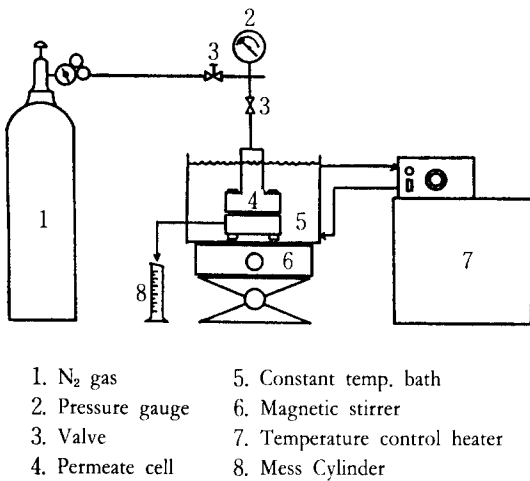


Fig. 2. Schematic diagram of Ultrafiltration experimental apparatus.

농도 불균일화를 방지하였다. 압력조절은 가압밸브로 압력이 조정된 150atm의 질소가스를 사용하였다.

실험방법

한외투과분리 cell속의 스테인레스 지지대위에 여과지와 분리막을 차례로 올려놓은 다음 cell을 결합하여 설치한다. 항온조의 온도계를 원하는 온도 30℃에 맞추어 놓고 수조속에 결합된 cell을 넣는다. 투과시킬 알부민

용액 0.05%(w/v)와 0.1%(w/v) 시료를 cell내에 150ml 넣고 자석 교반기를 회전시킨 후 압력조절호스를 연결시킨다. 항온조가 측정하려는 온도에 도달하면 가압밸브로 압력을 2.46atm, 1.41atm 및 0.70atm 순으로 조절하며 한외여과를 시작한다. 여과가 시작되면 1분간격으로 투과액을 채취하여 투과량을 측정하고 투과액의 단백질 농도를 측정하였다.

분석방법

단백질 시료농도는 Lowry 분석법(23)으로 정량하였다.

단백질 표준용액으로 부터 그려진 표준곡선으로 부터 단백질 시료의 농도를 결정하였다.

결과 및 고찰

투과시간에 따른 BSA용액의 투과 플럭스 영향

본 실험에서 사용한 미국 Amicon사의 분리막 PM30과 XM50의 투과시간에 따른 BSA용액의 투과 플럭스에 대한 결과는 Fig. 3-Fig. 6에 나타냈다.

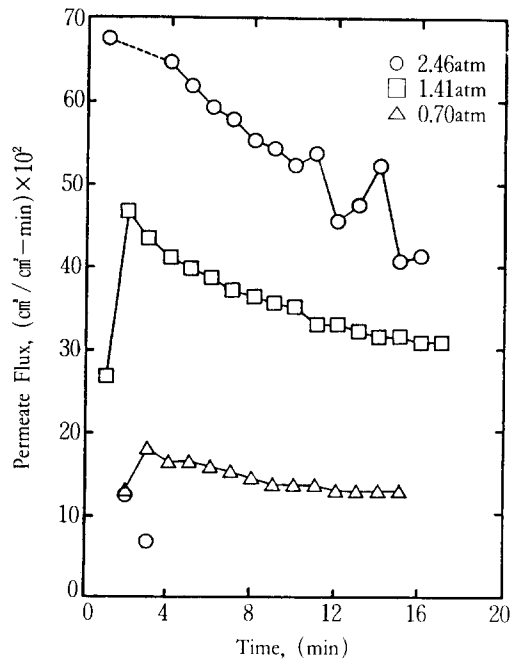


Fig. 3. Permeate flux to working time on several pressures. (BSA solution:0.05%, Membrane:PM30)

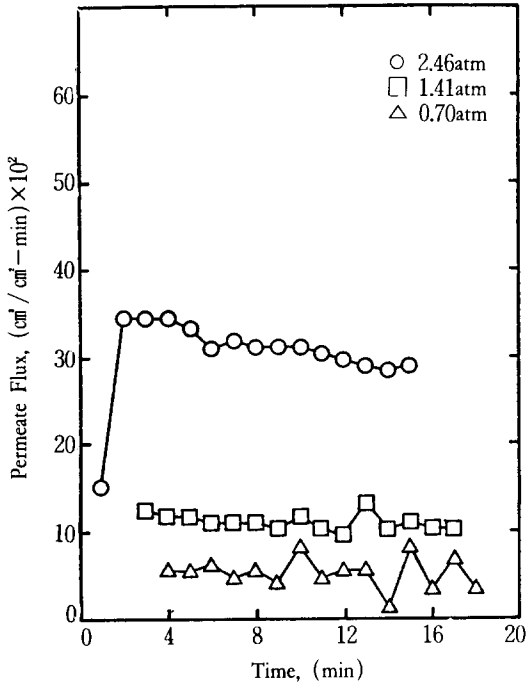


Fig. 4. Permeate flux to working time on several pressures. (BSA solution:0.05%, Membrane:XM50)

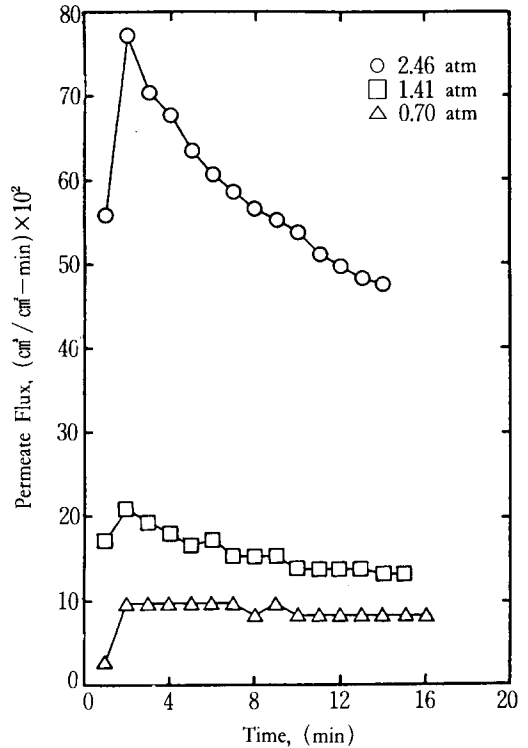


Fig. 5. Permeate flux to working time on several pressures. (BSA solution:0.1%, Membrane:PM30)

Fig. 3은 BSA용액 0.05%를 Amicon사의 PM30에 투과한 결과로서 사용압력이 0.7, 1.41, 2.46 atm으로 상승시킴에 따라 투과플럭스는 완만하게 감소되는 경향을 나타내고 있다. 또한 사용압력의 차이에 따라서 투과플럭스도 비례하고 있음을 알 수 있다. 그러나 동일한 실험조건에서 분리막을 XM50으로 교체하였을 때 전반적인 경향은 비슷하나 PM30에 비하여 투과플럭스가 매우 낮음을 보여주고 있으며, Fig. 4와 같다. 이것은 PM30이 XM50에 비해서 분리막 특성상 몰투과도가 약 5배 정도로 높기 때문에 나타난 결과로 생각된다.

Fig. 5는 BSA용액을 0.1%로 증가시켜 분리막을 PM30으로 실험을 한 투과플럭스이다. 또한 분리막 XM50으로 실험한 결과는 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 5와 Fig. 6에서도 이전의 결과와 유사한 경향을 나타내고 있으며 단지 Fig. 5에서 압력의 차이에 따라 비함수적으로 투과됨을 나타내고 있다. 이것은 XM50과 PM30과의 분리막 특성에서 오는 차이로 사료된다.

특히 본 실험에서 사용압력 2.46atm을 제외하고는 분리막 PM30과 XM50 그리고 알부민용액 농도가 0.0

5%(w/v)와 0.1%(w/v)에 상관없이 실험시작 4분을 경과한 후에 투과시간에 따라 플럭스가 대략 정상상태임을 알 수 있었다. 이러한 현상은 Alexander와 Johnson (24)이 설명하였듯이 pH값 4.8에서 단백질 용액은 등전점이 되어 농도분극현상이 일어나지 않거나, 농도분극현상이 일어나더라도 자석교반의 힘에 의하여 무시되고 있는 듯 하다. 그러나 사용압력이 2.46atm에서는 투과플럭스가 감소 경향을 보여 압력에 의한 농도분극현상이 생기는 것으로 사료된다.

사용압력에 따른 BSA용액의 투과플럭스 영향

사용압력을 0.7atm, 1.41atm, 2.46atm으로 고정시켜 실험을 행한 결과는 Fig. 7~Fig. 10에 나타내었다. Fig. 7은 BSA용액 0.05%, 분리막 PM30의 실험한 결과이며 그림에서 보여주는 것 처럼 압력 0.7atm, 실험시간이 4분일 때는 투과량 플럭스가 대동소이하며 압력 2.46atm일때는 시간에 따라서도 큰 차이를 보여주고 있다.

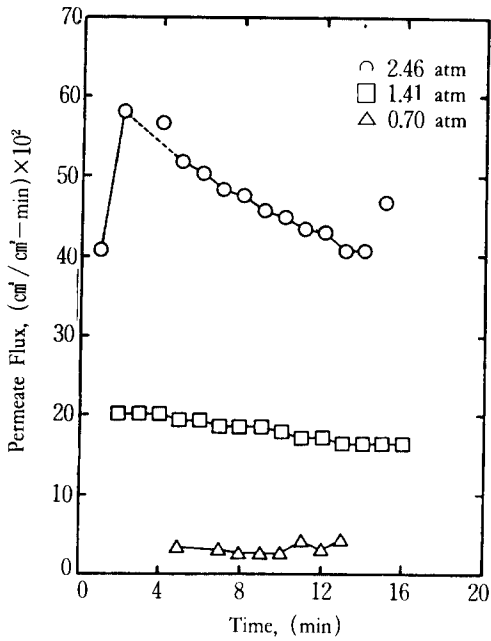


Fig. 6. Permeate flux to working time on several pressures.
(BSA solution:0.1%, Membrane: XM50)

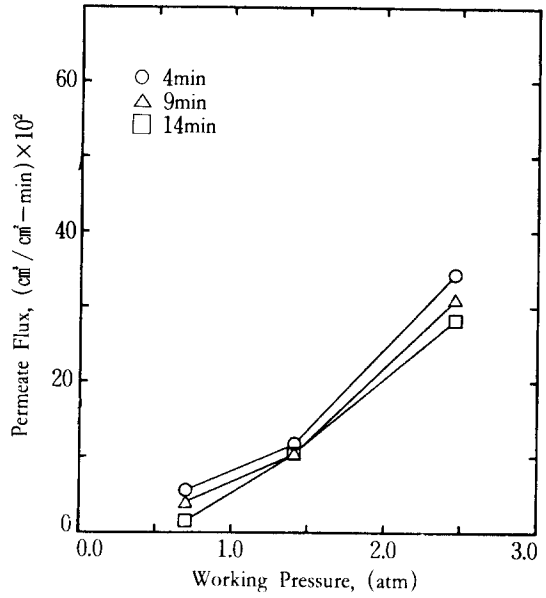


Fig. 8. Permeate flux to working pressure on several times.
(BSA solution:0.05%, Membrane: XM50)

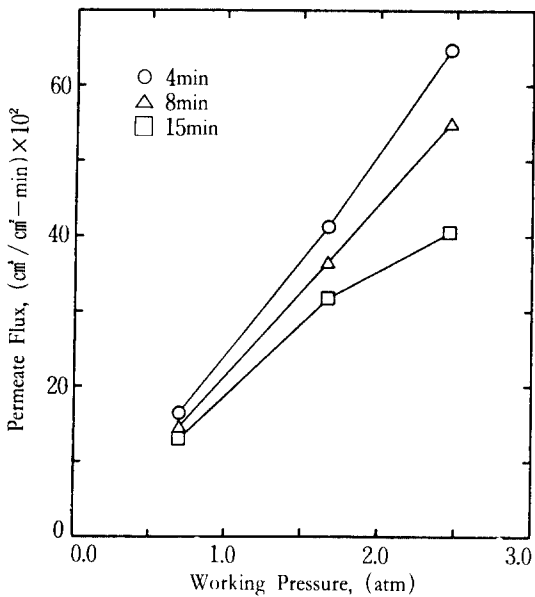


Fig. 7. Permeate flux to working pressure on several times.
(BSA solution:0.05%, Membrane: PM30)

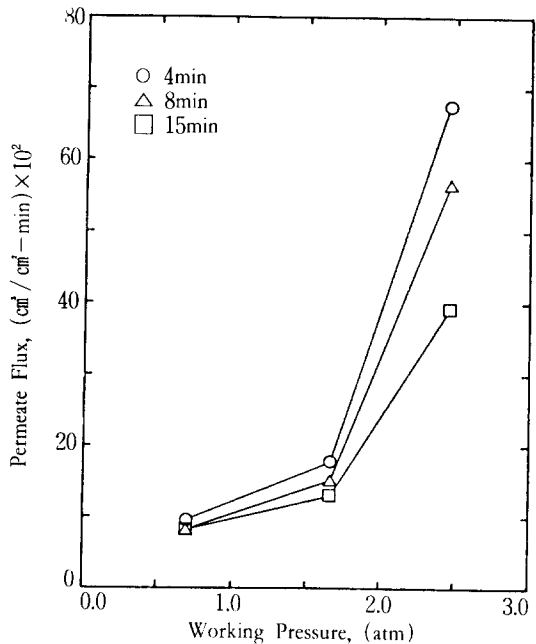


Fig. 9. Permeate flux to working pressure on several times.
(BSA solution:0.1%, Membrane: PM30)

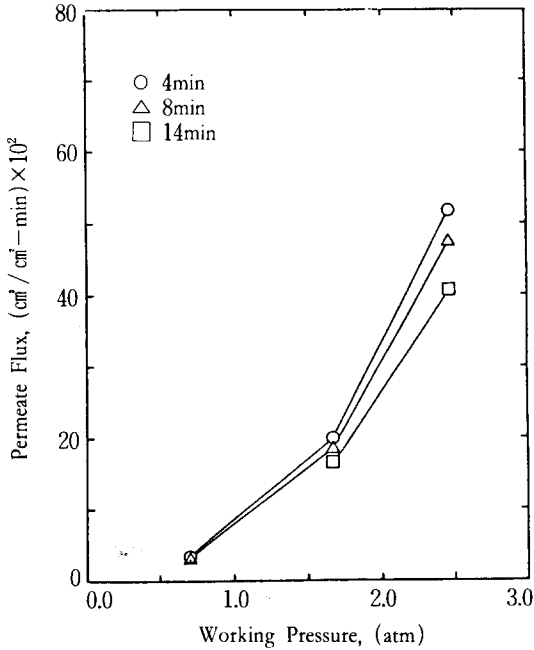


Fig. 10. Permeate flux to working pressure on several times.
(BSA solution:0.1%, Membrane: XM50)

Fig. 8도 BSA용액 0.05%, 분리막 XM50으로 실험한 결과이며, Fig. 7과 유사하지만 사용압력 1.41atm에서 시간에 따른 투과량 플럭스가 완전하게 선형이 되었다고 볼 수 없다.

Fig. 9나 Fig. 10은 BSA용액 0.1%를 분리막 PM30에 투과시켜 단백질 분리 현상을 보여준 것이다. Fig. 9와 Fig. 10에서 나타낸 것과 같이 압력을 증가시키므로서 PM30 분리막은 투과량 플럭스가 급격하게 증가되고 있음을 알 수 있다. 특히 Fig. 9에서 사용압력 2.46atm에서 조작시간 4분과 8분을 비교할 때 플럭스는 약 1.7배의 차이를 보이고 있다.

투과시간에 따른 투과량의 영향

Fig. 11-14는 투과시간에 대한 투과량의 부피에 대한 그림이다. 투과시간이 증가함에 따라서 투과량이 직선적으로 증가함을 보여주고 있다. PM30이 XM50에 비해 투과시간에 따라 투과량이 많은 것은 분리막 특성상 PM30이 XM50에 비해서 물 투과도가 약 5배정도 높기 때문에 나타난 결과로 생각된다. BSA용액을 0.1%로 증가시켜 분리막으로 실험한 결과 0.05%에서 0.1%보다

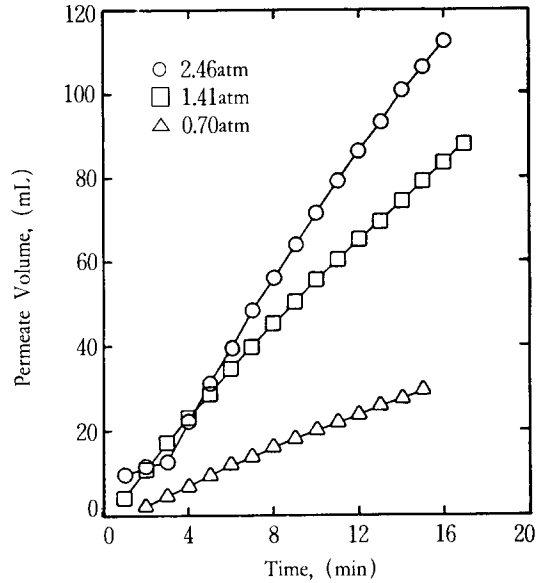


Fig. 11. Permeate volume to working time on several pressures.
(BSA solution:0.05%, Membrane: PM30)

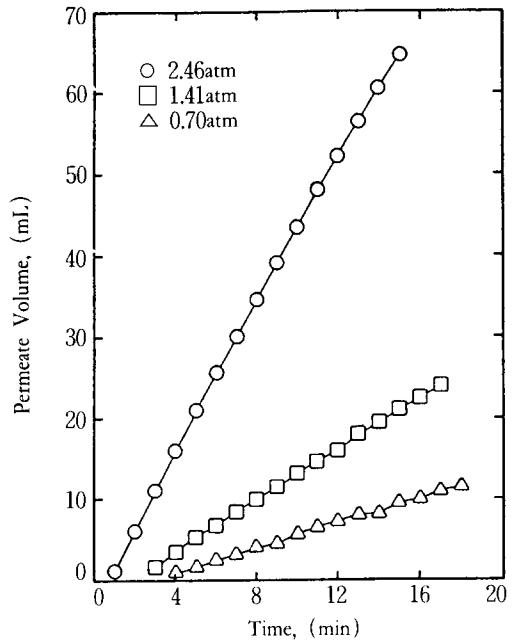


Fig. 12. Permeate volume to working time on several pressures.
(BSA solution:0.05%, Membrane: XM50)

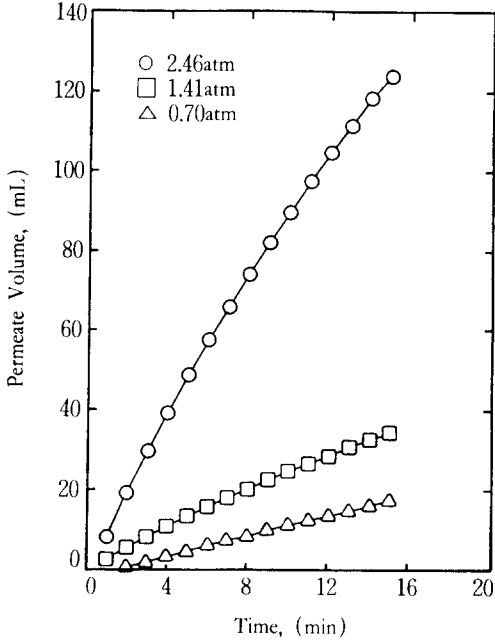


Fig. 13. Permeate volume to working time on several pressures.
(BSA solution:0.1%, Membrane:PM30)

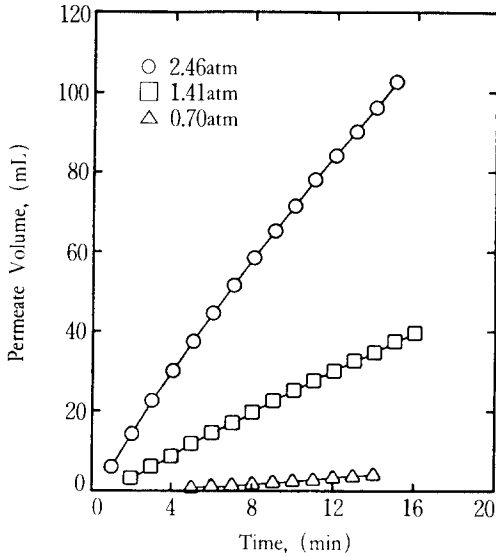


Fig. 14. Permeate volume to working time on several pressures.
(BSA solution:0.1%, Membrane:XM50)

같은 시간에 2배정도 많은양이 투과된 것을 보여 준다. Fig. 13과 Fig. 14의 사용압력 1.41atm에서는 시간에 따른 투과량 부피가 거의 같음을 보여주고 있다.

결 론

고분자분리막 PM30과 XM50을 가지고 단백질 용액인 BSA용액을 분리실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 시판되고 있는 고분자 분리막 PM30과 XM50의 투과량 플럭스를 비교할 때 PM30의 투과량 플럭스가 더 크다.
2. 고분자 분리막으로 BSA용액을 농축할 때 작업시간에 따라 투과량 플럭스는 완만하게 감소한다.
3. 고분자 분리막으로 BSA용액을 농축할 때 압력의 증가에 따라 투과량 플럭스는 급격하게 증가되었다.
4. 제한된 사용압력에서 BSA용액의 농도분극현상은 자석교반의 힘에 의해 제거될 수 있었다.

요 약

한외여과막을 이용하여 알부민 용액을 회분식 혼합분리기에서 분리하는 현상들을 연구하였다. 본 연구는 작업 시간과 작업압력에 따라 변하는 투과플럭스에 대한 것이다. 또한 실험은 pH 4.8에서 수행되었다. 알부민의 정량은 광학적으로 측정하였으며, Lowry법을 사용하였다. 본 연구 결과는 회막 알부민 용액의 한외여과는 작업 시간에 따라 투과량 플럭스가 완만하게 감소되며, 제한된 사용압력에서 알부민 용액의 농도분극 현상은 자석교반에 의해 제거 되었다.

참 고 문 헌

1. S. T. Hwang, K. Kammermeyer(1975), Membranes in Separations, Wiley-interscience, New York.
2. 김재진(1987), *Chemical Industry and Technology*, 5, 1.
3. 민병렬(1987), 화학공학특론, p. 22-24. 한국화학공학회.
4. A. E. Humphrey(1985), *Comprehensive Biotechnology* (Moo-Young M., ed.), p. 384-385, 2nd ed., Pergamon Press, New York.
5. Thomas D. Brock(1983), *Membrane Filtration, A User's Guide and Reference Manual*, Springer verlag, New

- York.
6. 탁대문(1989), *Polymer Membrane Technology*, p. 161-168, KAIST.
 7. W. C. McGregor(1985), *Membrane Separations in Biotechnology*, p. 356-359, Marcel Dekker, New York.
 8. D. C. Sammon and B. Stinger(1975), *The Application of Membrane Processes in the Treat of Sewage*, *Process Biochem.*, **28**, 3.
 9. P. M. Bungay, H. K. Lonsdale and M. N. De Pinho (1983), *Synthetic membranes: Science, Engineering and Applications*, P. 256-261. NATO ASI Series, Vol. 181, Mathematical and Physical Sciences.
 10. L. W. Henderson(1980), *Artificial Kidney, Artificial Liver, and Artificial Cells*, (Chang T. M. S., ed.), p. 39-46.
 11. W. C. McGregor(1985), *Membrane Separations in Biotechnology*, p. 258-261, Marcel Dekker, New York.
 12. MunirCheryan(1986), *Ultrafiltration Handbook*, p. 8-9, Technomic Publishing Corporation, Lancaster.
 13. M. C. Porter(1990), *Handbook of Industrial Membrane Technology*, p. 136-259, Noyes Publications, New Jersey.
 14. Loeb and S. Sourirajan(1960), *UCLA Engineering Report*.
 15. S. B. Tuwiner(1962), *Diffusion and Membrane Technology*, Reinhold Publishing Corporation, New York.
 16. S. Chandrasekaran and S. C. Dhar(1983), *A Low-Cost Method for the Production of Extracellular Alkaline Proteinase Using Tapioca Starch*, *J. Ferment. Technol.*, **61**, 5, 511-514.
 17. M. Nomoto, T. Lee, C. Su, C. Liao, T. Yen and C. Yang(1984), *Alkaline Proteinase from Alkalophilic Bacteria of Taiwan*, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 6, 1627-1628.
 18. F. G. Heineken and R. J. O'connor(1972), *Continuous Culture Studies on the Biosynthesis of Alkaline Protease, Neutral Protease and α -Amylase by *Bacillus subtilis* NRRL-B3411*, *J. General Microbiology* **73**, 35-44.
 19. T. Swaminathan(1978), Ph. D. thesis, *Experimental studies on stirred ultrafiltration of proteins*, Indian Institute of Technology, Kanpur.
 20. A. G. Waters and A. G. Fane(1981), *Initial flux and rejection characteristics of partially permeable ultrafiltration membranes*, *J. Appl. Polym. Sci.*, **26**, 3007-3014.
 21. 맹기석, 김공수, 송해영, 김재문, 공편저(1984), *현대 고분자화학*, 재판, p. 35-36. 형설출판사.
 22. 맹기석, 김공수, 송해영, 김재문, 공편저(1984), *현대 고분자화학*, 재판, p. 522-534. 형설출판사
 23. G. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall(1951), *Protein measurement with the folin-phenol reagent*, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
 24. A. E. Alexander and P. Johnson(1950), *In Colloid Science*, p. 158 Oxford University Press, Oxford.

(Received; July 25, 1991, Accepted; August 12, 1991)