

친화성 막모듈에 의한 단백질 크로마토그래피 특성

이 광 진 · † 엄 경 호

충북대학교 공과대학 화학공학부

(접수 : 1997. 8. 2., 게재승인 : 1998. 3. 5.)

Characteristics of Protein Chromatography by Affinity Membrane Module

Kwang-Jin Lee and Kyung-Ho Youm†

School of Chemical Engineering, College of Engineering, Chungbuk National University,

Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

(Received : 1997. 8. 2., Accepted : 1998. 3. 5.)

Protein affinity membrane was prepared via the coating of chitosan gel on the porous flat polysulfone membrane surface, followed by the immobilization of the reactive dye (Cibacron Blue 3GA) to the chitosan gel. The maximum protein binding capacity of affinity membrane was about $70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ determined by the batch adsorption experiments of human serum albumin (HSA). Using module of this membrane, the characteristics of protein chromatography were investigated through the experiments of elution and frontal chromatography of HSA. This membrane module promises as a chromatography column, since it represented a lower pressure drop and a greater reproducibility. The protein separation ratio was significantly influenced by the flow rate of mobile phase and the injection quantity of HSA. The dynamic protein binding capacity of module decreased from the equilibrium binding capacity with increasing flow rate and approached the value of $15 - 20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ for flow rates above $6 \text{ mL}/\text{min}$.

Key Words : affinity membrane, affinity chromatography, membrane module, human serum albumin

서 론

생물기술의 발전에 따라 다양한 생물제품들이 산업적 규모로 생산되면서, 이들 의약품 및 식·음료품에서 요구하는 순도로까지 정제하기 위한 효율적인 생산규모적 분리정제법 개발이 요구되고 있다. 생물제품의 생산시 분리정제는 통상 다단계의 공정을 거쳐 이루어지며, 이 분리정제의 후류공정 비용이 제품 생산비의 상당부분을 점유한다(1). 즉, 생물반응에 의한 제품의 산업적 생산이 경제성을 갖기 위해서는 생물제품을 보다 효율적·경제적으로 분리정제할 수 있는 후류공정의 확립이 필수적이다.

특히 생물제품의 대표적 물질인 단백질, 효소, 아미노산 등은 열과 유기용매에 민감하기 때문에 이들의 고순도 분리정제에는 종래의 감압증류, 용매추출 및 결정화법 보다 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)법이 유리하다(2). 친화성 크로마토그래피는 Sepharose, Sephadex와 같은 마이크론 크기의 hydrogel bead에 친화성 리간드(ligand)를 결합시킨 고정상 입

자를 채운 충전관을 분리관으로 사용하여 분리 대상물(ligate)과 리간드와의 상호작용에 의해 물질을 분리정제하는 방법이다(3). 충전관 크로마토그래피법은 용출(elution) 및 전열(frontal) 크로마토그래피의 2가지 방식으로 운전하여 생화학적 물질들의 분석 및 실험실적 고순도 정제에 널리 활용되고 있으며, 이를 분석규모에서 생산규모로 규모확대시키고자 하는 연구도 시도되고 있다(4,5). 그러나 충전관 크로마토그래피는 마이크론 크기의 입자를 사용하므로 공극률이 낮아 높은 압력강하(약 $3 \text{ atm}/\text{cm}$ depth)를 유발하며, hydrogel bead의 압축에 의한 관 막힘(plugging)과 오염 현상 때문에 이동상의 유속이 작아 분리정제의 생산성이 낮다는 단점이 있다. 이러한 단점 때문에 충전관을 규모확대시켜 생산규모에 적용하는 데는 상당한 어려움이 있다(6,7).

최근 충전관이 갖는 단점을 개선하기 위한 방안으로서 다공성의 평판막(flat membrane) 또는 실관막(hollow-fiber membrane)에 리간드를 결합시켜 친화성 막을 제조한 후, 이 막을 compact하게 집적시킨 막모듈(membrane module)을 분리관으로 사용하고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 친화성 막모듈을 분리관으로 사용하면 이동상의 흐름이 원활해 압력강하가 작고 물질전달을 촉진시키므로 분리정제의 생산성이 높아져 규모확대가 용이하다는 장점이 기대된다(8). 친화성 막모듈을 사용한 분리정제법은 친화성 막 여과(affinity membrane filtration)법과 친화성 막 크로마토그래피(affinity membrane chromatography)법으로

† Corresponding Author : School of Chemical Engineering, College of Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea
Tel : 0431-61-2491, Fax : 0431-62-2380
e-mail : khyoum@cbucc.chungbuk.ac.kr

구분한다. 막 여과법은 친화성 막의 세공을 통해 분리대상 용액을 여과시킨 후, eluent로 리간드와 결합된 목적물을 용출시켜 막 세공을 통해 다시 투과시키는 운전방식이며, 반면 막 크로마토그래피법은 용액을 막 세공을 통해 투과시키지 않고 단지 막의 축방향으로만 흘러 보낸 후, 리간드와 결합된 목적물을 다시 막의 축방향으로 용출시키는 운전방식이다. 막 여과법에 비해 막 크로마토그래피법은 막의 표면에 존재하는 리간드만이 목적물 결합에 사용되므로 결합용량(binding capacity)은 낮으나, 막 세공의 오염을 방지할 수 있으므로 장시간 운전 시에도 원래의 막 성능을 기대할 수 있으며, 또한 용액이 막모듈의 축방향으로만 흐르므로 압력강하가 낮아 규모확대가 용이하다는 장점이 있다(9).

막에 의한 친화성 물질분리의 원리는 1987년 Brandt 등(10)이 최초로 제안하였으며, Champluvier와 Kula(11, 12)는 nylon 다공성 막에 반응성 염료를 고정화시킨 친화성 막을 사용한 효소 정제법에 대해 연구하였다. Kubota 등(13)은 친화성 실관막 모듈과 hydrogel bead 충전관의 bovine serum albumin에 대한 결합용량과 생산성을 비교하여, 동일한 조작조건에서 친화성 실관막은 충전관에 상응하는 단백질 결합용량을 나타내며, 또한 용액의 대류흐름에 의한 물질전달이 촉진되어 충전관보다 생산성이 높음을 제시하였다. 또한 Zeng와 Ruckenstein(8)은 키토산 피막에 반응성 염료를 결합시킨 막으로 human serum albumin(HSA)의 친화성 막 여과를 수행하여 HSA의 결합용량에 대해 연구하였다.

본 연구에서는 polysulfone 재질의 평판막 표면에 키토산을 도포시켜 친수성 피막을 형성시킨 후, 여기에 단백질에 대한 친화력이 우수한 반응성 염료를 고정화시켜 친화성 막을 제조하고, 이 막이 장착된 막모듈을 사용하여 단백질의 크로마토그래피 실험을 수행하였다. 피막 형성제인 키토산의 농도에 따른 염료 고정화량을 측정하고, HSA의 흡착실험을 통해 제조된 친화성 막의 단백질에 대한 평형 결합용량(equilibrium binding capacity)을 측정하여 최적의 친화성 막 제조조건을 결정하였다. 친화성 막모듈을 분리관으로 사용하여 단백질의 용출 및 전열 크로마토그래피 실험을 수행하여 단백질에 대한 용출 분리율(separation ratio; SR) 및 동적 결합용량(dynamic binding capacity)을 크로마토그래피의 조작조건(이동상 유량과 단백질 부하량) 변화에 따라 실험하여 친화성 막모듈의 크로마토그래피 분리관으로서의 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

막으로는 polysulfone(PS) 재질인 Millipore사의 PTMK 다공성 막(분획분자량 300,000 달톤)을 사용하였다. PS 막 표면에 도포시킬 피막 물질로는 키토산(chitosan, 평균 분자량 750,000, Fluka)을 사용하였는 바, 키토산은 다양한 고분자 물질들 표면의 피막형성이 우수한 물질로 알려져 있다(8). 리간드로는 반응성 염료인 Cibacron Blue 3GA(CB3GA, Sigma)를 사용하였다. CB3GA는 직물의 염색에 널리 사용되는 triazine 염료의 한 부류인 Procion H 계열의 반응성 염료로서 그 구조가 NAD(nicotinamide adenine dinucleotide)와 흡사하여, 'dinucleotide fold'를 갖고 있는 단백질들(예, dehydrogenase류, kinase류,

nucleotide-binding 효소류 및 serum albumin 등)과 강한 친화성 작용을 갖는 것으로 알려져 있다(14). 단백질로는 HSA(fraction V, Sigma)를 사용하였다. 크로마토그래피 실험시 이동상으로는 0.06 M universal buffer를 사용하였으며, 이동상의 pH는 0.2 M NaOH 용액으로 조절하였다. 이외의 기타 시약들은 모두 특급 시약을 사용하였으며, 순수로는 Millipore사의 Milli-RO²/Q³로 제조된 순수(resistivity 18.2 MΩ-cm)를 사용하였다.

친화성 막의 제조

PS 막의 단백질 친화성화 작업은 Atkinson 등(15)이 제시한 hydrogel bead에의 반응성 염료 고정화 방법을 준용하여, ① 1단계: PS 막표면의 키토산 피막층의 형성 ② 2단계: 키토산 피막층에의 반응성 염료의 고정화 ③ 3단계: 세척의 절차로서 수행하였다.

1단계로 3 cm × 15 cm 크기로 절단한 PS 막을 순수 중에서 30분간 초음파 세척하고 건조시킨다. 이 막을 유리판 위에 부착시킨 다음, 막표면에 키토산 용액 5 mL를 붓고 캐스팅시켜 키토산 피막층을 형성시킨다. 이때 키토산 용액은 1% (wt/vol) 아세트산 용액 100 mL에 0.2 ~ 1.8 g의 키토산을 녹인 후 glass filter로 불용분을 여과시켜 제조하였다. 이 막을 대기중에서 30분간 풍건한 후 60°C에서 2시간 건조시킨 다음, 알칼리 용액(3 g NaOH/100 mL 순수)에 12시간 동안 담가 키토산 피막층을 형성시키고 과량의 순수로 세척한다.

2단계 작업인 키토산 피막층에의 반응성 염료 고정화는 CB3GA 0.53 g을 80 mL 순수에 용해시킨 후 60°C로 가열하고, 여기에 키토산 피막층이 형성된 막을 1시간 동안 침적시킨 후, 4 M NaCl 용액 40 mL를 첨가시킨다. 2시간 후 이 용액에 약 알칼리인 2 M Na₂CO₃ 용액 25 mL를 첨가시키고 80°C에서 2시간 동안 탈수 축합반응시킨다. 키토산과 반응성 염료의 결합 반응은 Figure 1에 나타낸 바와 같이 약알칼리 조건에서 CB3GA의 triazine 고리에 있는 염소기(-Cl)가 키토산의 수산기(-OH)나 아민기(-NH₂)와 친핵성 치환반응을 통해 공유결합을 형성하는 반응으로 알려져 있다(16, 17).

3단계로 염료 용액으로부터 막을 꺼내 순수 → 1 M

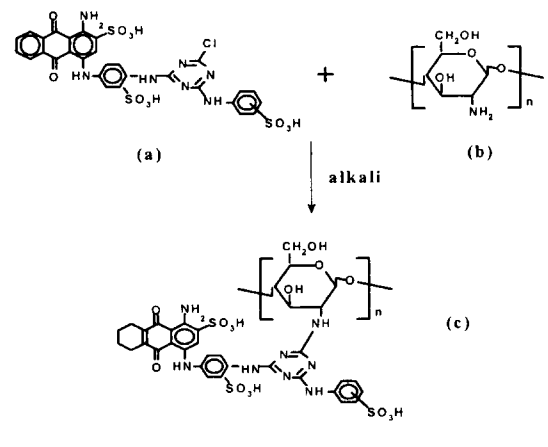


Figure 1. Reaction scheme of the coupling of Cibacron Blue 3GA(a) with Chitosan(b).

NaCl/25% EtOH 용액 → 순수 → 1 M NaCl/0.2 M phosphate buffer(pH 7) → 순수 → 1.2 M universal buffer(pH 7) → 순수의 단계로 연속적으로 세척시켜 친화성 막을 완성하였다. 제조된 친화성 막은 미생물에 의해 손상되지 않도록 0.4 wt % NaN₃ 용액중에 보관하였다.

반응성 염료의 고정화량 측정

키토산 피막층에 고정화된 반응성 염료의 양은 제조된 친화성 막의 단백질 결합용량을 좌우하는 척도가 된다. 고정화된 염료의 양은 강산을 사용하여 염료를 담체로부터 탈리시키는 Chambers (18)법을 사용하여 측정하였다. 서로 다른 농도의 키토산 용액을 사용하여 제조된 친화성 막들을 4 cm × 4 cm 크기로 절단하여 농염산(12 N) 용액 15 mL 내에 넣고 80°C에서 15분 동안 가열하여 키토산을 가수분해시켜 염료를 탈리시키고, 25°C로 냉각한 후 5 mL의 순수를 첨가시킨다. 이 염료가 탈리되어 있는 용액의 흡광도를 CB3GA의 최대 흡수파장인 515 nm에서 측정하여 고정화된 염료의 양을 계산하였다.

HSA의 흡착실험

제조된 친화성 막의 최대 단백질 결합용량(평균 결합용량)을 결정하기 위해 HSA의 흡착실험을 수행하였다. 친화성 막을 4 cm × 4 cm 크기로 절단하여 5 mL의 완충용액에 30분간 침적시킨 후, 서로 다른 농도의 HSA 용액 5 mL를 첨가하고, 25°C, 60 rpm에서 12시간 동안 진탕시켜 흡착평형에 도달하도록 한다. 용액으로부터 막을 꺼내 완충용액에서 서서히 흔들어 약하게 결합된 HSA를 제거한 후, 이 막을 다시 1 M KCl이 첨가된 pH 10의 universal buffer 10 mL에 담가 25°C, 60 rpm에서 6시간 동안 진탕시켜 HSA를 탈착시킨다. 이렇게 하여 얻어진 용액의 흡광도를 HSA의 최대 흡수파장인 280 nm에서 측정하여 HSA의 평형 흡착량(평균 결합용량)을 계산하였다.

반응성 염료의 고정화량 및 HSA의 흡착량 측정 실험을 통해 최적의 친화성 막 제조조건을 결정하였으며, 이 최적 조건에서 제조된 막을 막모듈에 장착시켜 단백질 크로마토그래피 특성 실험을 수행하였다.

크로마토그래피 장치

친화성 막모듈의 크로마토그래피 특성 실험에 사용된 장치는 Figure 2에 나타난 바와 같이 펌프(M510), 시료 주입밸브(U6K), UV/Vis 검출기(M486)와 크로마토그램 workstation(Baseline 810)으로 구성된 Waters사의 LC 장치에 막모듈을 연결시킨 구조이며, 막모듈 전후에 압력 게이지를 설치하여 압력강하를 측정할 수 있게 하였다. 막모듈은 Figure 2의 (A)와 같이 실리콘 고무판에 유효 막면적이 11 cm²(길이 11 cm × 폭 1 cm)이 되도록 높이 0.23 cm의 긴 유로를 내고, 그 밑에 친화성 막을 삽입한 후 상하의 perspex 판을 볼트로 결합시킨 평판형 구조이다.

용출 크로마토그래피 실험

친화성 막모듈의 크로마토그래피 분리관으로의 활용 가능성과 크로마토그래피 조작조건에 따른 단백질의 용출 분리율 변화를 측정하기 위해 용출 크로마토그래피 실험을 수행하였다. 먼저 pH 5의 buffer로 막모듈을 안정시킨 후 HSA를 일정량 주입하고, 이동상을 1 M KCl이 함유된 pH 10의 buffer로 바꾸어 리

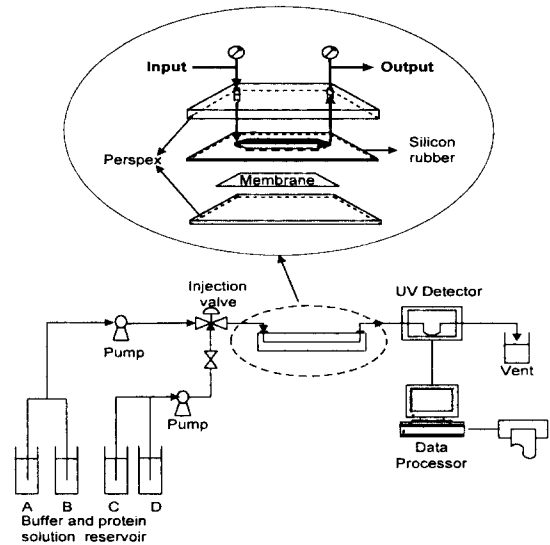


Figure 2. System setup of affinity chromatography.

간드와 결합된 HSA를 용출시켜 막모듈로부터 배출되는 용액의 흡광도를 UV/Vis 검출기로 280 nm에서 연속 측정하여 injection/overload/elution으로 구성된 용출 크로마토그램을 얻고, 이로부터 단백질에 대한 용출 분리율을 계산하였다.

용출 크로마토그래피 실험의 조작조건으로는 HSA의 주입량을 12.5 μg으로 일정하게 유지한 상태에서 이동상의 유량을 0.5~4 mL/min로 변화시켰으며, 또한 이동상 유량을 1 mL/min로 일정하게 유지한 상태에서 HSA의 주입량을 0.2~100 μg으로 변화시켜 용출 분리율에 미치는 이동상 유량 및 단백질 주입량의 영향을 검토하였다. 또한 막모듈의 사용에 따른 성능변화(재현성)를 검토하기 위해 HSA 주입량 12.5 μg, 이동상 유량 1 mL/min의 상태에서 막모듈의 사용 횟수에 따른 용출 분리율 변화를 검토하였다.

전열 크로마토그래피 실험

친화성 막모듈의 크로마토그래피 조작조건에 따른 동적 단백질 결합용량을 측정하기 위해 전열 크로마토그래피 실험을 수행하였다. 먼저 pH 5의 buffer로 막모듈을 안정시킨 후, 일정 농도의 HSA 용액을 막모듈에 연속적으로 흘려보내 파과곡선(breakthrough curve)이 얻어질 때까지 HSA를 loading시킨 다음 리간드와 결합되지 않은 HSA를 washing시키고, 1 M KCl이 함유된 pH 10의 buffer로 친화성 막과 결합된 HSA를 용출시켜 loading/washing/elution으로 구성된 일련의 전열 크로마토그램을 얻어, 이로부터 친화성 막의 동적 단백질 결합용량을 계산하였다. 전열 크로마토그래피 실험의 조작조건으로는 washing 및 elution시의 이동상의 유량을 1 mL/min로 일정하게 유지시킨 상태에서, loading 용액의 HSA 농도를 50 ~ 500 μg/mL, loading 용액의 유량을 0.5 ~ 8 mL/min로 변화시켜 실험하였다.

결과 및 고찰

반응성 염료의 고정화량

피막 물질로 사용한 키토산 용액의 농도를 달리하여 제조된

친화성 막의 반응성 염료 고정화량을 측정하여 Figure 3에 나타내었다. 이 결과 키토산 용액의 농도가 클수록 막 단위 면적당의 염료 고정화량은 증가하나, 형성된 키토산 피막층 단위 질량당의 염료 고정화량은 감소하였다. 이는 키토산 용액의 농도가 크면 용액의 점도가 높아 상대적으로 두꺼운 피막이 형성되며, 또한 키토산 피막에의 염료 고정화가 주로 피막층 표면에서 이루어지기 때문으로 사료된다. 친화성 막의 단백질 결합용량을 증가시키기 위해서는 염료 고정화량을 높게 유지시켜야 한다. 그러나 Figure 3에서 보는 바와 같이 막 단위 면적당 및 피막층 단위 질량당의 염료 고정화량은 서로 상반되는 결과를 나타내고 있다. 즉, 이 결과만으로서 최적의 친화성 막 제조조건을 결정할 수 없으며, 따라서 다음에 나타낸 흡착실험을 통해 얻어진 HSA의 평형 흡착량 결과까지를 고려하여 최적의 친화성 막 제조조건을 결정하였다.

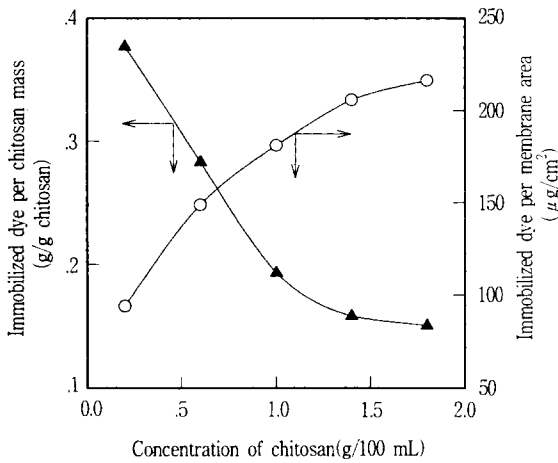


Figure 3. Quantities of immobilized dye with change of the concentration of chitosan solution.

HSA의 평형 결합용량

피막 물질로 사용한 키토산 용액의 농도를 달리하여 제조된 각각의 친화성 막들에 대해 HSA의 평형 결합용량(흡착량)을 측정하여 그 결과를 Figure 4에 HSA 용액의 농도에 따라 나타내었다. 이 결과 막 단위 면적당 흡착된 HSA의 양은 400 μg/mL 이하의 낮은 농도에서는 HSA 용액의 농도가 증가함에 따라 거의 직선적으로 증가하며, 그 이상의 농도에서는 증가율이 점차 감소하여 평형에 도달하는 전형적인 Langmuir 흡착 거동을 나타내었다. 따라서 이 결과들은 아래의 Langmuir 흡착 등온식으로 해석할 수 있다.

$$q = q_m C / (K + C) \tag{1}$$

여기서, C는 HSA 용액의 농도(μg/mL), q는 친화성 막에의 HSA의 평형 결합용량(μg/cm²), q_m은 최대 평형 결합용량(μg/cm²), K는 Langmuir 상수(μg/mL)이다.

위의 실험 결과들에 식(1)을 적용시켜 키토산 용액의 농도를 달리하여 제조된 각각의 친화성 막들에 대한 HSA의 최대 평형 결합용량 q_m 값을 구하여, 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. 이 결과 키토산 용액의 농도가 커질수록 HSA의 최대 결합용량

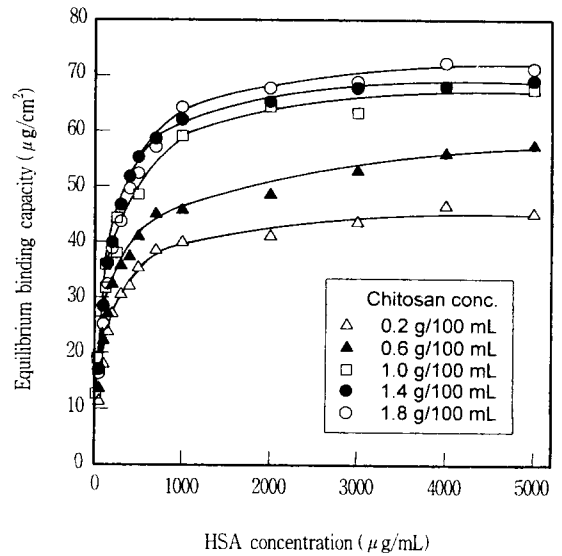


Figure 4. Equilibrium binding capacity of HSA on the affinity membrane.

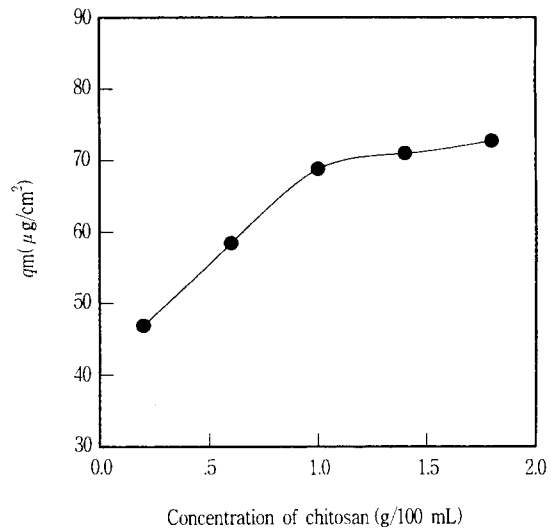


Figure 5. Maximum equilibrium binding capacity with change of the concentration of chitosan solution.

이 증가하나, 키토산 용액의 농도가 1 g/100 mL 이상이 되면 약 70 μg/cm² 정도로서 일정하게 유지되었다. 따라서 본 연구에서는 키토산 피막층을 균일하고 안정하게 형성시킬 수 있으면서 동시에 HSA의 결합용량을 높게 유지시킬 수 있는 최적의 키토산 농도로서 1 g/100 mL를 선정하였다. 이 조건에서 제조된 친화성 막의 단면 SEM 사진을 Figure 6에 나타내었는 바, 키토산 피막층이 두께 약 14 μm로서 PS 막표면에 균일하게 퇴적되었음을 알 수 있다. 이후의 모든 실험에는 농도 1 g/100 mL의 키토산 용액을 사용하여 피막층을 형성시킨 후 제조된 친화성 막을 사용하였다.

본 연구에 사용한 친화성 막의 HSA 결합용량을 다른 연구자

들이 제시한 CB3GA를 리간드로 사용한 친화성 막들의 단백질 또는 효소 결합용량과 비교하여 Table 1에 나타내었다. 이 결과 막의 재질과 단백질/효소류의 종류에 따라 결합용량이 크게 달라지긴 하나, 본 연구에서 제조한 키토산-CB3GA 친화성 막의 HSA 결합용량은 문헌에 제시된 범위의 값을 나타내었다.

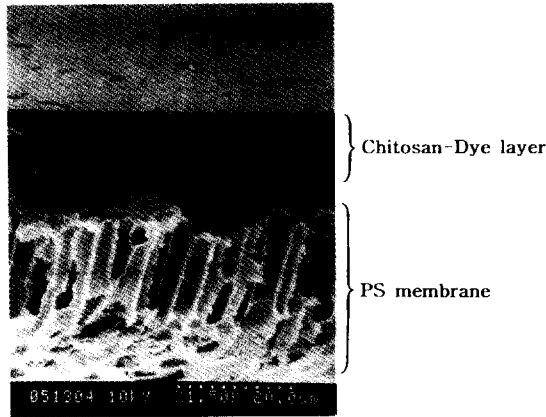


Figure 6. Cross sectional SEM view of the affinity membrane.

Table 1. Protein or enzyme binding capacities on different affinity membranes with CB3GA as a ligand.

Membrane type ^a	Protein or enzyme ^a	Binding capacity ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Ref.
Modified nylon	MDH	200-400	(11)
Modified nylon	Lysozyme	87-122	(12)
PEI on titania	HSA	40	(19)
Chitosan on PES	HSA	265	(8)
Sartobind Blue 2	G6PDH	17.5	(20)
Chitosan on PS	HSA	70	this work

^aPEI: polyethyleneimine, PES: polyethersulfone, PS: polysulfone, MDH: malate dehydrogenase, HSA: human serum albumin, G6PDH: glucose-6-phosphate dehydrogenase.

막모듈의 HSA 크로마토그래피 특성

용출 크로마토그래피 : 용출 크로마토그래피 실험을 통해 얻은 전형적인 크로마토그램의 한 예(HSA 주입량 12.5 μg , 이동상 유량 1 mL/min)를 Figure 7에 나타내었다. 여기서 a)점은 HSA의 주입 시점, b)점은 친화성 막에 결합된 HSA를 용출시키기 위해 이동상을 1 M KCl이 함유된 pH 10의 buffer로 교체한 시점이다. 이 크로마토그램에서 첫 번째 피크는 주입한 HSA중 친화성 막에 결합하지 못하고 그대로 이동상을 따라 막모듈 밖으로 유출된 과부하 피크(overload peak), 두 번째 피크는 용출 피크(elution peak)를 나타내며, 이들 피크의 면적으로부터 아래의 식으로 용출 분리율(SR)을 계산하였다. 이때 용출 분리율이 1이면 주입시킨 HSA 모두가 친화성 막에 결합됨을 의미하며, 1보다 작으면 HSA의 일부만이 결합됨을 의미한다.

$$SR = \frac{\text{Elution Peak Area}}{\text{Overload Peak Area} + \text{Elution Peak Area}} \quad (2)$$

HSA의 주입량이 12.5 μg , 이동상 유량이 1 mL/min인 조건에서의 친화성 막모듈의 사용 횟수에 따른 용출 분리율 변화를 Figure 8에 나타내었다. 이 결과 막모듈을 제작한 후 최초 사용으로부터 3회까지 사용할 때는 사용 횟수가 증가함에 따라 키토산 피막에 약하게 고정화된 반응성 염료의 유출로 인해 용출 분리율이 감소하나 4회 이상에서는 거의 일정한 값을 나타내었는바, 따라서 막모듈을 크로마토그래피 분리관으로 사용할 경우 충분한 재현성과 안정성이 있음을 확인하였다. 이 결과로부터 막모듈에 새로 제작한 친화성 막을 장착시킨 경우에는 항상 4회 이상 크로마토그래피 실험을 수행한 후 얻어진 측정값만을 결과로서 택하였다.

Figure 9에 HSA의 주입량을 12.5 μg 으로 일정하게 유지한 상태에서 이동상의 유량에 따른 용출 분리율 변화를 나타내었는바, 유량이 증가함에 따라 용출 분리율은 93 %에서 26 %로 급격히 감소하였다. 이는 이동상의 유량이 증가하면 막표면에 작용하는 전단응력이 커져 반응성 염료에 결합되는 HSA의 양이 감소하기 때문으로 사료된다. 또한 Figure 10에 나타난 바와 같이 이동상 유량을 1 mL/min로 일정하게 유지한 상태에서 HSA의 주입량을 0.2 ~ 100 μg 으로 변화시켜 실험한 결과 주입량 2 μg 까지는 95 % 이상의 높은 용출 분리율을 나타내나, 그 이상의 주입량에서는 결합용량 범위를 벗어나기 때문에 용출 분리율이 감소하였다. 한편 이동상 유량의 전 범위(0.5 ~ 4 mL/min)에 대해 막모듈 전후의 압력을 측정한 결과 막모듈의 압력강하는 0.5 atm 이하이었다.

이상의 용출 크로마토그래피 실험을 통해 친화성 막모듈은 분리관으로 사용시 압력강하가 낮으며 재현성이 우수한 구조임을 확인하였다. 그러나 친화성 막모듈의 분리관으로서의 성능을 보다 명확히 확인하기 위해서는 조작조건 변화에 따른 동적 단백질 결합용량에 대한 결과가 요구되며, 다음의 전열 크로마토그래피 실험을 통해 이를 측정하였다.

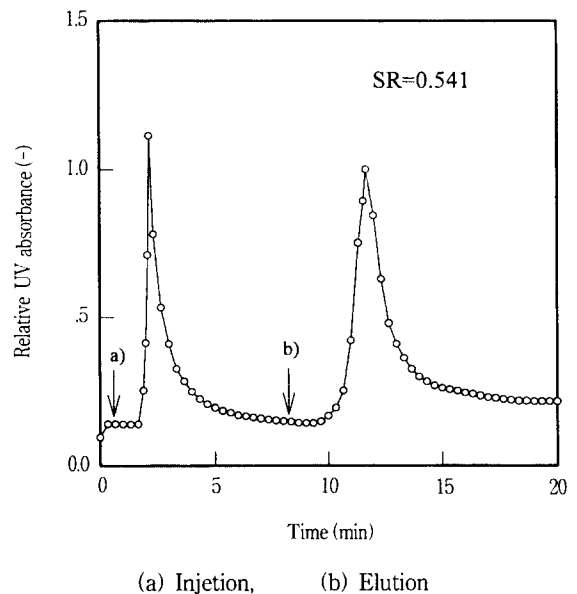


Figure 7. Typical elution chromatogram of HSA. (HSA injection : 12.5 μg , mobile phase flow rate : 1 mL/min)

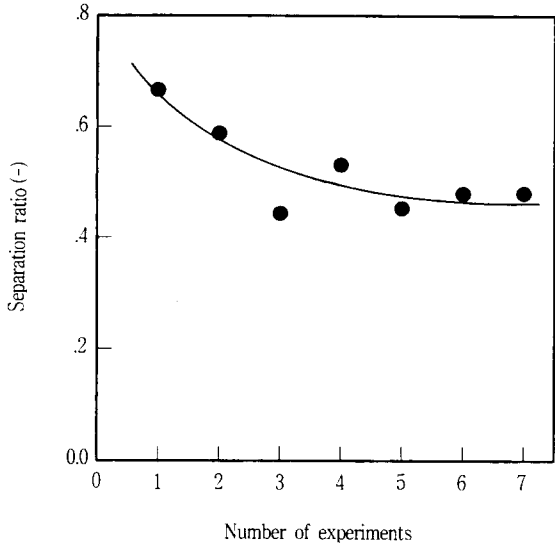


Figure 8. Separation ratio with change of the number of experiments. (HSA injection : 12.5 μg , mobile phase flow rate : 1 mL/min)

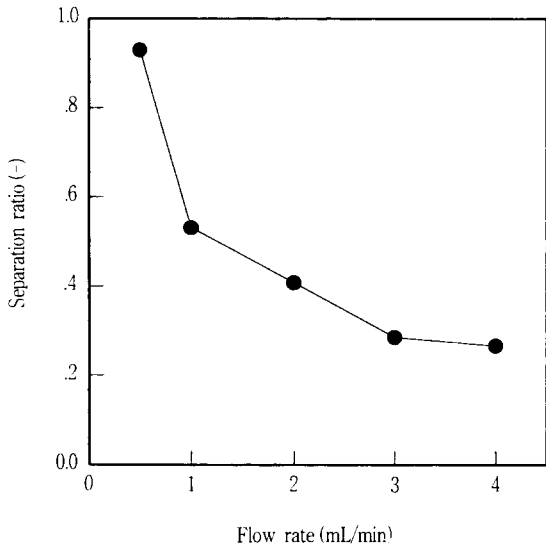


Figure 9. Separation ratio with change of the mobile phase flow rate. (HSA injection : 12.5 μg)

전열 크로마토그래피 : 친화성 막모듈의 동적 단백질 결합용량을 측정하기 위한 전열 크로마토그래피 실험은 loading 용액의 HSA 농도를 50, 100 및 500 $\mu\text{g/mL}$ 로 달리한 조건에서 그 유량을 0.5 ~ 8 mL/min로 변화시켜 수행하였다.

전열 크로마토그래피 실험을 통해 얻은 크로마토그램으로부터 아래의 절차로서 친화성 막모듈의 동적 단백질 결합용량을 계산하였다. Figure 11의 전열크로마토그램 모식도에 나타낸 바와 같이 파과곡선 상의 빗금친 면적 A는 친화성 막에 흡착된 단백질의 양을 나타내며, 빗금친 면적 B는 막모듈의 세척에 의해 약하게 흡착된 단백질이 탈착된 양을 나타낸다. 따라서 이 두 면

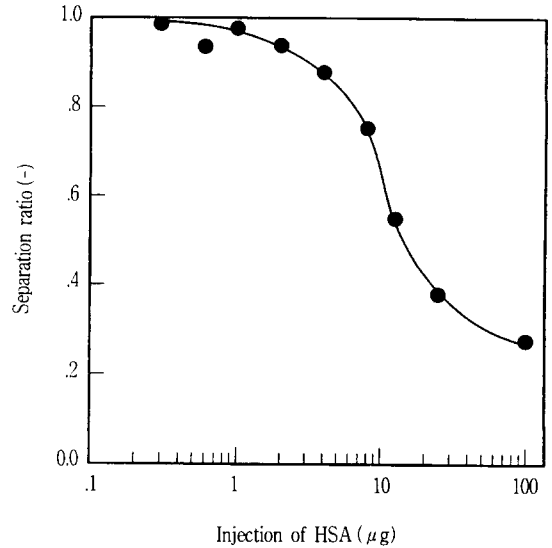


Figure 10. Separation ratio with change of HSA injection. (mobile phase flow rate : 1 mL/min)

적의 차(A - B)는 친화성 막에 결합된 단백질의 양(동적 결합용량)에 해당한다. 한편 용출단계에서 친화성 막에 결합된 단백질이 모두 용출된다면 용출 면적 E는 (A - B)의 면적과 같아야 한다. A, B 및 C의 면적은 각각 아래의 식으로서 계산하였다.

$$A = C_0 Q_1 \int_{\alpha}^{\beta} \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) dt / \text{Membrane Area} \quad (3)$$

여기서, A는 친화성 막에의 단백질 흡착량($\mu\text{g/cm}^2$), C_0 는 loading 용액의 단백질 농도($\mu\text{g/mL}$), C는 유출용액의 단백질 농도($\mu\text{g/mL}$), Q_1 은 loading 용액의 유량(mL/min), α 는 loading 용액의 도입시점(min), β 는 파과시점(min)이다.

$$B = C_0 Q_2 \int_{\beta}^{\gamma} \frac{C}{C_0} dt / \text{Membrane Area} \quad (4)$$

여기서, B는 세척단계에서 탈착된 단백질의 양($\mu\text{g/cm}^2$), Q_2 는 washing 용액의 유량(mL/min), γ 는 세척 완료시점(min)이다.

$$E = C_0 Q_3 \int_{\gamma}^{\delta} \frac{C}{C_0} dt / \text{Membrane Area} \quad (5)$$

여기서, E는 용출된 단백질의 양($\mu\text{g/cm}^2$), Q_3 는 eluent 용액의 유량(mL/min), δ 는 용출 완료시점(min)이다.

전열 크로마토그램의 전형적인 한 예로서 loading 용액의 HSA 농도가 50 $\mu\text{g/mL}$, 유량이 1 mL/min인 상태에서 얻은 크로마토그램을 Figure 12에 나타내었다. 모든 전열 크로마토그램들에 대해 식(3)~식(5)에 의해 각각의 빗금친 부분의 면적을 계산한 결과 (A - B) 면적의 값과 E 면적의 값이 거의 일치하였으며, 따라서 E 면적의 값을 친화성 막모듈의 동적 결합용량으로 간주하였다.

위의 계산을 통해 얻은 HSA의 동적 결합용량을 크로마토그래피 조작조건에 따라 Figure 13에 나타내었다. 이 결과 동적 결합용량은 유량이 증가함에 따라 평형 결합용량 값들[식(1)로

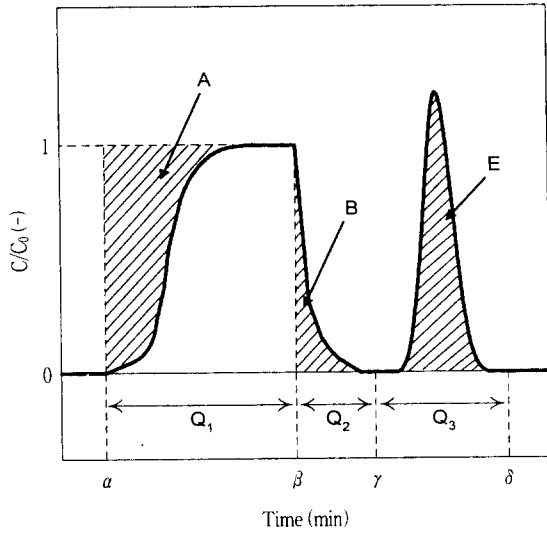
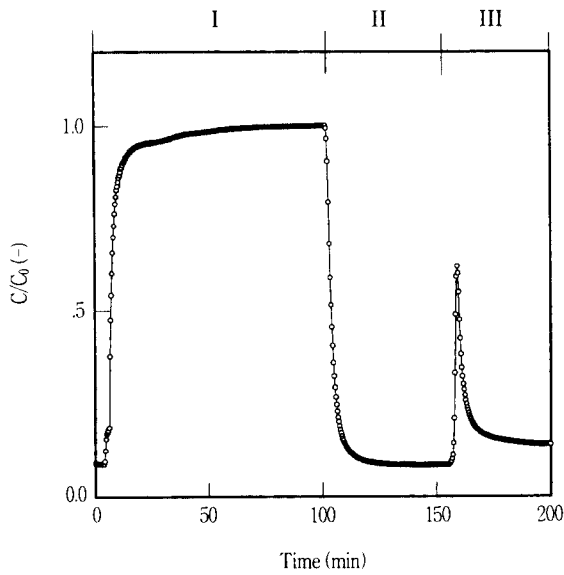


Figure 11. Schematic representation of the frontal chromatogram.



I : Loading, II : Washing, III : Elution

Figure 12. Typical frontal chromatogram of HSA. (HSA conc. : 50 $\mu\text{g/mL}$, Q_1 : 1 mL/min)

서 계산한 유량이 0인 상태에서의 HSA 결합용량; 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 경우 17 $\mu\text{g/cm}^2$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 경우 27 $\mu\text{g/cm}^2$, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 경우 53 $\mu\text{g/cm}^2$ 로부터 점차 감소하여 유량이 6 mL/min 이상이 되면 초기 결합용량의 약 35 - 70 % 정도인 15 - 20 $\mu\text{g/cm}^2$ 값에 접근하였다. 이처럼 동적 결합용량이 평형 결합용량 값으로부터 크게 감소하는 일차적 이유는 유량이 증가함에 따라 막표면에 작용하는 전단력이 커지고 용액의 체류시간이 작아져 반응성 염료에의 HSA 결합량이 작아지기 때문이나, 본질적으로는 본 연구에 사용된 막모듈이 평판형이기 때문에 모듈 단위 부피당의 친화성 막의 면적(막의 집적도)이 낮기 때문으로

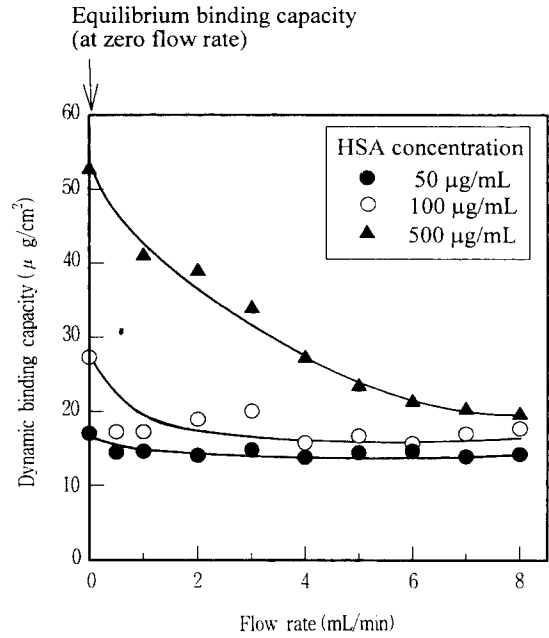


Figure 13. Dynamic binding capacity of HSA determined by frontal analysis with changes of flow rate and HSA concentration.

사료된다(13,21). 따라서 친화성 막의 동적 결합용량을 높게 유지시키기 위해서는 막의 집적도가 높은 막모듈(예, 실관막 모듈)을 분리관으로 사용한 단백질 크로마토그래피에 대한 연구가 필요하다.

요 약

Polysulfone 재질의 평판막 표면에 키토산 피막층을 형성시킨 후 반응성 염료를 고정화시켜 단백질 친화성 막을 제조하고, 이 막이 장착된 친화성 막모듈의 HSA에 대한 크로마토그래피 특성을 연구하였다. 농도 1 g/100 ml의 키토산 용액을 사용하여 polysulfone 막 표면에 키토산 피막층을 형성시킨 후, 리간드인 Cibacron Blue 3GA를 고정화시킴으로서 HSA 결합용량이 최대 70 $\mu\text{g/cm}^2$ 인 단백질 친화성 막을 제조하였다. HSA에 대한 용출 및 전열 크로마토그래피 실험을 통해 친화성 평판막 모듈은 압력강하가 낮으며 재현성이 우수하여 기존의 충전관을 대체할 수 있는 분리관 구조임을 확인하였다. 친화성 막모듈의 단백질 용출 분리율은 이동상의 유량과 단백질 주입량의 변화에 영향을 받았으며, 동적 단백질 결합용량은 loading 용액의 유량이 증가함에 따라 평형 결합용량 값으로부터 점차 감소하여 유량이 6 mL/min 이상인 경우 15 - 20 $\mu\text{g/cm}^2$ 정도의 값을 나타내었다. 단백질의 동적 결합용량을 높게 유지시키기 위해서는 실관막 모듈과 같이 막의 집적도가 높은 모듈을 친화성 분리관으로 사용할 필요가 있다.

감 사

본 연구는 교육부의 1995년도 학술연구조성비(생물화공분야,

과제번호 : G-17) 지원에 의해 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Belter, P. A., E. L. Cussler, and W. S. Hu (1988), *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology*, pp. 1-9, John Wiley & Sons, Singapore.
2. Kennedy, J. F. and J. M. S. Cabral (1993), *Recovery Processes for Biological Materials*, pp. 1-10, John Wiley & Sons, Chichester.
3. Dean, P. D. G., W. S. Johnson, and F. A. Middle (1985), *Affinity Chromatography: A Practical Approach*, pp. 1-30, IRL Press, Washington, D.C.
4. Lowe, C. R. and P. D. G., Dean (1974), *Affinity Chromatography*, pp. 52-70, John Wiley & Sons, Chichester.
5. Gibbs, S. J. and E. N. Lightfoot (1986), *Scaling Up of Gradient Elution Chromatography*, *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, **25**(4), 490-498.
6. Ladisch, M. R., M. Voloch, and B. Jacobson (1984), *Bioseparations: Column Design Factors in Liquid Chromatography*, *Biotech. & Bioeng. Symp.* No. 14., 525-541.
7. Briefs, K. G. and M. R. Kula (1992), *Fast Protein Chromatography on Analytical and Preparative Scale Using Modified Microporous Membranes*, *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 141-149.
8. Zeng, X. and E. Ruckenstein (1996), *Supported Chitosan-Dye Affinity Membranes and their Protein Adsorption*, *J. Memb. Sci.*, **117**, 271-278.
9. Lee, K. J. (1997), "Separation Characteristics of Protein by Affinity Chromatography Using Membrane Modules", Master Thesis, Dept. of Industrial Chem. Eng., Chungbuk Nat. Univ., Chungbuk.
10. Brandt, S., R. A. Goffe, S. B. Kessler, J. L. O'Connor, and S. E. Zale (1988), *Membrane-Based Affinity Technology for Commercial Scale Purifications*, *Bio/Technology*, **6**, 779-782.
11. Champluvier, B. and M. R. Kula (1990), *Modification of Microfiltration Membrane as Dye-Ligand Adsorbents for the Isolation of Enzymes from Crude Extracts, Separations for Biotechnology* (D. L. Pyle, ed), pp. 295-304, Elsevier, New York.
12. Champluvier, B. and M. R. Kula (1991), *Microfiltration Membranes as Pseudo-Affinity Adsorbents: Modification and Comparison with Gel Beads*, *J. Chromatogr.*, **539**, 315-325.
13. Kubota, N., S. Miura, K. Saito, K. Sugita, K. Watanabe, and T. Sugo. (1996), *Comparison of Protein Adsorption by Anion-Exchange Interaction onto Porous Hollow-Fiber Membrane and Gel Bead-Packed Bed*, *J. Memb. Sci.*, **117**, 135-142.
14. Scopes, R. K. (1987), *Protein Purification*, 2nd ed., pp. 42-145, Springer-Verlag, New York.
15. Atkinson, T., P. M. Hammond, R. D. Hartwell, P. Hughes, M. D. Scawen, R. F. Sherwood, D. A. P. Small, C. J. Bruton, M. J. Harvey, and C. R. Lowe (1981), *Triazine-Dye Affinity Chromatography*, *Biochem. Soc. Trans.*, **9**, 290-293.
16. 남성석, 서보영, 이대수 (1993), *염료화학*, pp. 261-262, 보성문화사, 서울.
17. Angel, S. and P. D. G. Dean (1977), *The Effect of Matrix on the Binding of Albumin to Immobilized Cibacron Blue*, *Biochem. J.* **167**, 301-303.
18. Chambers, G. K. (1977), *Determination of Cibacron Blue F3GA Substitution in Blue Sephadex and Blue Dextran-Sepharose*, *Anal. Biochem.*, **83**, 551-556.
19. Li, Y. and H. G. Spencer (1994), *Dye-Grafted, Poly(ethylene imine)-Coated, Formed-in-place Class Affinity Membranes for Selective Separation of Proteins, Polymers of Biological and Biomedical Significance* (W. Shalaby et al., eds), pp. 297-305, ACS, Washington, D.C.
20. Champluvier, B. and M. R. Kula (1992), *Dye-Ligand Membranes as Selective Adsorbents for Rapid Purification of Enzymes: A Case Study*, *Biotech. & Bioeng.*, **40**, 33-40.
21. Ding, H., M. C. Yang, D. Schisla, and E. L. Cussler (1989), *Hollow-Fiber Liquid Chromatography*, *AIChE J.*, **35**(5), 814-820.