

단백질의 치환 크로마토그래피

윤태호 · 김인호

충남대학교 공과대학 화학공학과

요약

새로운 분리공정으로써 크로마토그래피를 이용하고자 하는 노력들이 활발하게 진행되어지고 있는 가운데, 기존의 전통적인 크로마토그래피를 더욱 발전시킨 시도들이 행하여지고 있다. 여기에 부합하여 약 20여년 전부터 연구되기 시작한 Displacement ion-exchange chromatography는 현재 활발한 연구가 진행되어지고 있으며, 전형적인 preparative chromatography에 비해 많은 장점을 가지고 있다. Displacement ion-exchange chromatography는 displacer를 사용하여, 고농도의 원료 물질을 효율적으로 단시간내에 처리할 수 있는 공정으로 기존의 preparative chromatography의 문제점이었던 꼬리끌기 현상과 희석현상을 대폭 감소시킬 수 있게 되었다. 따라서, displacement ion-exchange chromatography 공정에서의 가장 큰 과제인 비선형 등온선 영역에서의 거동과 분리공정 조작선의 결정 및 고성능의 displacer에 대한 연구가 요구되어지고 있으며, 본 총론에서는 이온교환 크로마토그래피 공정에서 displacement ion exchange chromatography를 이용한 단백질의 분리에 대하여 고찰하고자 한다.

1. 서론

생체 활성물질의 분리하기 위하여 현재까지 수많은 분리기술들이 개발되어져 왔으며, 최근 30여년 동안 preparative chromatography를 이용한 분리기술이 눈부시게 발전하였다(1). 이 중에서도 preparative ion-exchange chromatography는 단백질을 좀더 효율적으로 분리하기 위하여 일반적으로 선형 구배와 계단형구배의 방법을 채택하였는데, 단백질을 용출시키기 위하여 사용하는 높은 염 농도로 인하여 물질 간의 분리 인자 효율을 감소시키는 문제점이 대두되었다(2,3). 이러한 문제점을 극복하기 위하여 계단형구배와 유사한 조건을 가진 displacement ion-exchange chromatography가 연구되기 시작하였다.

1906년에 처음으로 Tswett에 의해 displacement chromatography가 알려지게 되었으며, 1926년에 Gurwitsch가 강한 친화력을 가지는 화합물이 이동상에 약하게 결합된 물질과 치

환되는 것을 발견하고 displacement chromatography의 기초를 세웠다. 초기의 연구는 American Petroleum Institute에서 원유로부터 포화 또는 불포화 탄화수소 화합물과 질소 및 황 화합물의 분리에 사용되었다(4)

1943년 Tiselius는 생체 고분자 물질의 분리에서 처음으로 당의 정제에 displacement chromatography를 사용하였으나, 1950년대에는 주로 frontal, elution, displacement chromatography를 체계화하는 등 주로 금속 화합물의 분리 분야에서 연구가 진행되었고, 1950년대 중반에 들어서 아미노산의 분리에 대한 연구가 시작되었다(5). 그 중에서 단백질의 분리·정제를 목적으로 이온교환 칼럼을 이용한 displacement chromatography가 새롭게 발전하기 시작하였고, 기존의 preparative chromatography가 갖는 단점을 극복하고자 하였다(2). Displacement chromatography는 elution chromatography에 비하여 약 10%의 이동상 유속으로 혼합물의 분리가 가능하며, 이것은 단위 생산량에 비례하는 이동상의 비용을 감소시킬 수 있다. 그리고, preparative chromatography가 갖는 전형적인 꼬리끌림 현상을 현저하게 감소시킬 수 있는데, displacer가 갖는 강한 친화력으로 인하여 축방향 분산을 현저하게 감소시켜 self-sharpening을 유도시킬 수 있다(3,4).

2. Displacement chromatography의 원리

Displacement chromatography는 step-gradient chromatography와 상당히 유사한 방식으로 칼럼에 유입되는 이동상의 조성이 단계적으로 변하면서 혼합물의 분리가 일어난다. Fig. 1에 보인 바와 같이 칼럼은 친화력이 상대적으로 약한 이온 강도를 가지고 있는 이동상으로 평형이 된 상태로 혼합물이 주입되고, 그 후에 고정상과 매우 강한 친화력을 갖고 있는 displacer의 전면이 혼합물을 이동시키면서 혼합물의 각 성분들은 고정상과 서로 경쟁적으로 치환이 일어나면서 분리공정이 이루어진다(1).

Fig. 2는 고정상에 대한 각 성분들의 친화력과 용출 경향에 대하여 나타낸 그림이다. Fig. 2(A)는 각 성분들의 고정상에 대한 등온 흡착 곡선과 displacer의 조작선을 그린 것이며, 조작선은 원점으로부터 displacer의 용출 농도를 연결한 선이다.

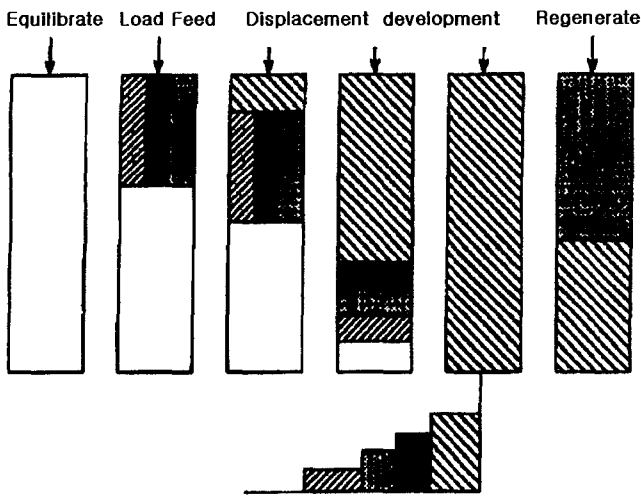


Fig. 1. Operation of a column in the displacement mode

이때 등온선과 조작선이 교차하는 지점의 농도는 원하는 성분을 용출시키고자 할 때 결정되어질 displacer의 농도를 나타낸다. Fig. 2(B)는 Fig. 2(A)에서 그려진 등온선과 조작선으로부터 각 성분들이 연속적으로 용출되는 경향을 보여주는데, 각 성분들에 displacement zone의 폭은 물질수지에만 관련이 있다. 만일 혼합물중 한성분의 농도가 높은 경우에 그 성분의 displacement zone의 폭은 넓어지게 되고, 모든 조작 매개 변수가 일정한 경우 칼럼에 주입되는 성분의 양에 상관없이 displacement zone의 농도는 등온선과 조작선의 교차점에 의해 미리 계산되어진 농도와 일치하게 된다. 이러한 과정을 거쳐 연속적으로 용출되는 각 성분들은 분획별로 회수를 하고 displacer에 의해 용출이 끝난 후에는 다시 적절한 이동상으로 평형공정을 수행한다(6).

Fig. 3은 displacement chromatography에 의하여 단백질이 용출되는 개략적인 상황을 나타내고 있다. 용출액의 처음에 나타나는 불순물 단백질 피크는 염농도의 구배로 인하여 분리가

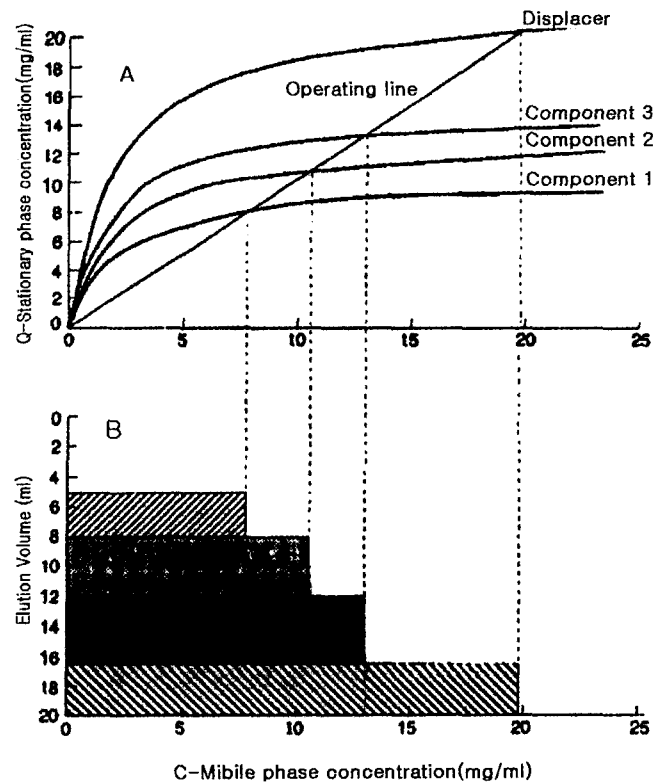


Fig. 2. (A) Schematic representation of isotherms for displacer and three feed components, (B) The idealized displacement train for these isotherms.

일어나지만 그 후면에 고정상과 약하게 결합하고 있는 잔여 단백질은 이보다 친화력이 큰 단백질-분리하고자 하는 단백질-에 의해 용출이 일어나게 된다. 한편, 분리하고자 하는 단백질 성분은 칼럼을 따라 이동하는 displacer에 의하여 용출이 일어나며 displacer의 이동속도와 동일하게 분리가 일어나고 그 후면에서 고정상과 더욱 결합력이 강한 잔여 불순물 단백질이 용출된다(2,7).

Table 1. Comparison between the three chromatography development modes in preparative HPLC(13)

Mode	Column size	Flow rate	Sample dilution rate	Production rate	Need to regenerate column	Experimental condition
Displacement	Analytical (30-50 × 0.4-0.6cm I.D)	Low	Can concentrate minor component	High	○	Very different from analytical
Overloaded elution	Large size (30-50 × 2-10cm I.D) Large size	High	Dilute slightly	High	×	Similar to analytical
Linear elution	(30-50 × 2-10cm I.D)	High	Dilute strongly	Low	×	Similar to analytical

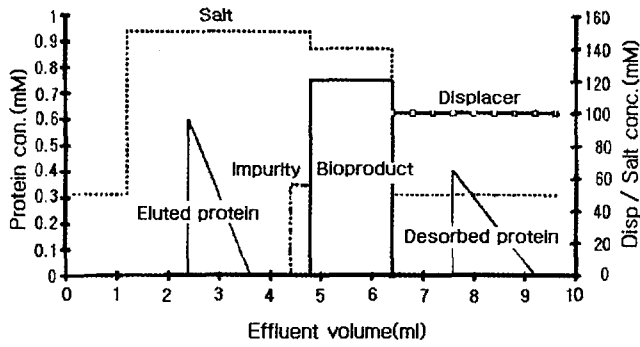


Fig. 3. A schematic of a displacement process.

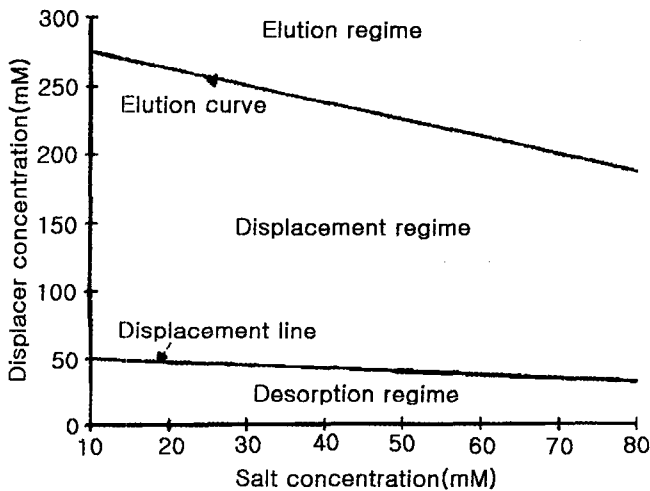


Fig. 4. Operating regime plot for a displacement process.

3. Displacement chromatography의 이론적 접근

Brooks와 Cramer는 입체질량 거동(Steric Mass Action)에 대한 이론을 정립하고, dynamic affinity를 정의하였는데 이것은 displacement chromatography의 조작 조건을 결정하는데 매우 중요한 역할을 수행하였다(8). 그러나, dynamic affinity plot으로부터 displacer의 조성과 칼럼의 고정상과 친화력이 약한 불순물 단백질을 용출시키기 위한 염의 농도를 알 수는 없다. Gallant와 Cramer는 원하는 단백질을 선택적으로 분리하기 위하여 불순물 단백질의 친화력에 따라 염의 농도와 displacer의 조성을 예측할 수 있는 operating regime plot을 발표하였다(9).

Brooks는 dynamic affinity가 평형상태에서 고정상에 대한 단백질의 친화력이라고 정의하였으며, 다음과 같은 식으로 표현하였다(6).

$$\lambda_i = \left(\frac{K_i}{\Delta}\right)^{\frac{1}{\nu_i}} \quad (1)$$

여기서, λ_i = dynamic affinity

ν_i = characteristic charge

K_i = Steric Mass Action 평형상수

Δ = 조작선의 기울기

앞에서 언급한 조작선의 기울기는 이동상중의 displacer 농도에 대한 고정상의 displacer의 농도로써 displacer의 분배계수가 된다(식 (2)).

$$\Delta \equiv \frac{Q_d}{C_d} \quad (2)$$

여기서, Q_d 는 고정상의 displacer 농도

C_d 는 이동상의 displacer 농도

Displacer에 의해 고정상에 결합된 단백질이 용출되기 위해서는 displacer의 dynamic affinity가 단백질에 대한 dynamic affinity보다 커야 하는데, displacer에 의해 용출이 일어나는 순간에 수지식은 다음과 같다.

$$\left(\frac{K_p}{\Delta}\right)^{\frac{1}{\nu_p}} = \left(\frac{K_d}{\Delta}\right)^{\frac{1}{\nu_d}} \quad (3)$$

여기서, 하첨자 p는 단백질을, d는 displacer를 의미한다. (2) 식의 양쪽에 log를 취하여 정리하면,

$$\nu_d \log \left(\frac{K_p}{\Delta}\right) = \nu_p \log \left(\frac{K_d}{\Delta}\right) \quad (4)$$

또는,

$$\log \Delta = \frac{\nu_d \log K_p - \nu_p \log K_d}{(\nu_d - \nu_p)} \quad (5)$$

로 표현된다.

평형상태에서 Brooks는 displacer와 낮은 친화력을 갖는 단백질을 용출하는데 필요한 이동상의 염농도를 다음과 같은 평형식으로 표현하였다(6, 10).

$$K_d = \left(\frac{Q_d}{C_d}\right) \left(\frac{C_{salt}}{\Delta - (\nu_d + \sigma_d)Q_d}\right)^{\nu_d} \quad (6)$$

여기서, C_{salt} = displacer zone 내에서의 이동상의 염농도

Δ = ionic bed capacity

σ_d = steric factor

(2)식으로부터 $Q_d = \Delta C_d$ 이므로 (6)에 대입하여 정리하면,

Table 2. Example of the use of displacement HPLC for the purification of proteins

Compound	Stationary phase	Particle size (μm)	Mobile phase	Displacer	Flow rate (ml/min)	Column size (mm \times mm)	Sample size (mg)
β -Lactoglobulin A and B	DEAE-5PW,	10	0.2M KH ₂ PO ₄ (pH 6.0)	1% Carboxymethyl dextran (CMD)	0.1	45 \times 2.1	3.2
	Synchropak, AX-300,					45 \times 2.1	6.4
	DEAE Spherogel-					45 \times 2.15	12.8
β -Lactoglobulin A and B	TSK TSK gel, DEAE-5PW	10	0.025M Phosphate buffer	10ml/ml Chondroitin sulfate	0.1	75 \times 7.5	60-100
Ovalbumin, α -lactalbumin, Soybean trypsin inhibitor	DEAE-5PW	10	0.02M Tris-Phosphate (pH 7.0)	1% CMD in carrier	0.5	75 \times 7.5	25

$$Cd = \frac{A - C_{\text{salt}} \left(\frac{A}{K_d} \right)^{\nu_d}}{(\sigma_d + \nu_d) A} \quad (7)$$

과 같은 식을 얻을 수 있다. 식 (7)은 식(5)에서 구해진 Δ 값으로부터 C_d 와 C_{salt} 의 선형적인 관계식을 나타내고 있으며, 이것을 displacement line이라고 정의한다(Fig. 4). Displacement line은 단백질을 분리하고자 할 때 사용되어질 displacer와 이동상의 염농도에 대한 경계를 나타내며, 만일 이동상의 염의 농도가 그림 4의 displacement line 하단부에 위치하고 있으면, 불순물 단백질은 완전히 치환이 일어나지 않게 되어 displacer에 의한 파과가 일어날 때 displacer의 전면에서 단백질이 용출될 것이다. 반면에 displacement 영역에서는 불순물 단백질이 이동상의 염에 의하여 완전히 치환이 일어난 후 displacer에 의하여 원하는 단백질이 분리되게 된다(11).

4. Displacement chromatography의 특징

일반적으로 생체물질을 생산하는데는 전체 공정 중 제품의 회수 및 정제에 있어서 상당히 많은 부분을 차지하게 되고, 경우에 따라서는 전체 생산비용의 약 80%까지 차지하는 경우도 있다(12). 또한, 단백질과 같은 생체물질들은 생산원료 상태가 매우 희석된 상태로 유입되는 경우가 많으므로, 이러한 조건을 해결하는 방안으로 displacement chromatography가 효율적으로 사용되어질 수 있고, 이러한 특징을 Table 1에 열거하였다(13).

Displacement chromatography가 갖는 장점은 이동상의 유속을 기존의 전통적인 크로마토그래피의 유속에 약 10에서 20% 정도의 유량으로 조업이 가능하므로, 생체 고분자 물질을 고효율로 얻을 수 있다. 또한 displacer의 강한 친화력에 기인하여 preparative chromatography에서 시료의 과량주입시 발생하는 꼬리클립 현상을 방지할 수 있다. 그리고, 적절한 이

생물산업

동상의 설정과 displacer의 선택으로 분리와 재생을 단시간내에 수행할 수 있으며, Table 2에 몇 가지 연구에 사용된 displacer와 분리조건을 나열하였다(14,15).

참고문헌

1. F. D. Antia, I. Fellegv ri, and C. Horv th, Displacement of protein in hydrophobic interaction chromatography, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **34**, 2796-2804, 1995.
2. A. Kundu, K. A. Barnthouse, and S. M. Cramer, Selective displacement chromatography of proteins, *Biotechnol. Bioeng.*, **56-2**, 119-129, 1997.
3. S. D. Gallant, and S. M. Cramer, Salt effect in anion exchange displacement chromatography: Comparaision of penlosan ploysulfate and dextran sulfate displacer, *Chromatographia*, **39**, 409-418, 1994.
4. Y. J. Kim, Metal affinity displacement chromatgraphy of proteins, Rensselaer polytechnic Institute, Troy, New York, Thesis of Ph. Doctor, 1993.
5. Tiselius, A study on adsorption analysis, *Kolloids Z*, **105**, 101-111, 1943.
6. C. A. Brooks and S. M. Cramer, Solute affinity in ion-exchange displacement chromatography, *Chem. Eng. Sci.*, **51**, 3847-3860, 1996.
7. J. A. Gerstner, P. Pedrose, J. Morris and B. J. Bergot, Gram-scale purification of phosphorothionate oligonucleotides using ion-exchange displacement chromatography, *Nucleic Acid Research*, **23**, 12, 2292-2299, 1995.
8. C. A. Brooks and S. M. Cramer, Steric mass action ion exchanger displacement profiles and induced salt gradient, *AIChE J.*, **38**, 1969-1978, 1992.
9. S. R. Gallant and S. M. Cramer, Productivity and operation regime in protein chromatography using low

- molecular weight displacer, *J. Chrom.*, **771**, 9-22, 1997.
10. S. Vennum, S. Gallant and S. Cramer, Immobilized affinity chromatography: Displacer characteristics of traditional mobile phase modifiers, *Biotechnol. Prog.*, **12**, 1, 84-91, 1996.
 11. S. Guhan and S. M. Cramer, Displacement chromatography of proteins under elevated flow rate and crossing isotherm conditions, *Biotechnol. Prog.*, **5**, 3, 92-97, 1989.
 12. G. C. Viscomi, C. Longboardi and M. Verdini, A large scale purification of the sythetic peptide fragment 163-171 of human interleukin- β by multi-dimensional displacement chromatography, *J. Chromatogr.*, **549**, 175, 1991.
 13. J. X. Huang, G. Guiochon, Application of preparative high-performance liquid chromatography to the separation and purification of peptides and proteins, *J. Chrom.*, **492**, 431-469, 1989.
 14. J. Frenz and C. Horvath, in High Performance Liquid Chromatography Advanced and Perspectives, Academic Press, Orlando, 8, 211, 1988.
 15. J. Gerstner, S. Cramer, Cation exchange displacement chromatography of proteins with protamine displacer: Effect of induced salt gradient., *Biotechnol Prog.*, **8**, 540, 1992.