

키토산 및 키틴 막에 의한 단백질의 친화 여과 크로마토그래피: 2. BSA 및 Lysozyme의 분리

육 영 재 · 엄 경 호*[†]

(주)퓨리캠, *충북대학교 공과대학 공업화학과
(2009년 6월 1일 접수, 2009년 6월 15일 수정, 2009년 6월 15일 채택)

Affinity Filtration Chromatography of Proteins by Chitosan and Chitin Membranes: 2. Separation of BSA and Lysozyme

Yeong Jae Yuk and Kyung Ho Youm*[†]

PureeChem Co. Ltd., Industrial Technology Research Park in Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763,
Korea

*Department of Industrial Engineering Chemistry, College of Engineering, Chungbuk National University, Cheongju,
Chungbuk 361-763, Korea

(Received June 1, 2009, Revised June 15, 2009, Accepted June 15, 2009)

요 약: 실리카 입자를 기공 형성제로 사용하여 물리적 강도와 단백질 결합용량이 높은 다공성 키토산 및 키틴 친화 막을 제조하였다. 키토산 친화 막의 BSA 단백질 결합용량은 최대 21.8 mg/mL이었으며, 키틴 친화 막의 lysozyme 효소 결합용량은 최대 26.1 mg/mL이었다. 제조된 다공성 키토산 및 키틴 친화 막을 사용하여 단백질 용액의 loading 유량, loading 양 및 농도 변화에 따른 BSA와 lysozyme의 친화 막 여과 크로마토그래피 분리 실험을 수행하였다. 친화 막 여과 크로마토그래피 분리 실험을 통해 얻어진 loading/washing/elution의 단계로 구성된 일련의 크로마토그램으로부터 단백질 용출량과 결합수율을 구하였다. 키토산 및 키틴 친화 막에의 BSA 및 lysozyme 단백질의 결합량과 결합수율은 loading 용액의 유량이 작을수록, 주입량 및 농도가 클수록 증가하였다. 이 결과로부터 실리카 입자를 기공 형성제로 사용하여 제조된 다공성 키토산 및 키틴 막은 단백질의 대규모 여과 크로마토그래피 분리를 위한 친화 막으로서 효과적인 활용이 기대된다.

Abstract: Porous affinity chitosan and chitin membranes with good mechanical strength and high protein binding capacity were prepared by using silica particles as porogen. The maximum binding capacity of affinity chitosan membrane for BSA protein is 21.8 mg/mL, and that of affinity chitin membrane for lysozyme enzyme is 26.1 mg/mL. Chromatographic separations of BSA and lysozyme proteins using the porous affinity chitosan and chitin membranes were performed with change of the flow rate, loading amount and concentration of protein loading solutions. Protein eluted amount and binding yield were calculated from the filtration chromatograms consisted of loading/washing/elution sequences. Protein binding amount and yield were increased with decreasing of flow rate, increasing of loading amount and concentration of protein loading solutions. Those results suggest that the porous chitosan and chitin membranes prepared by using silica particles as porogen are suitable in affinity filtration chromatography for large scale separation of proteins.

Keywords: affinity membrane, affinity membrane chromatography, chitosan, chitin, protein separation

[†]주저자(e-mail : khyoum@cbnu.ac.kr)

1. 서 론

생물산업의 대표적 물질인 다당류, 단백질, 효소, 펩타이드 등은 열과 유기용매에 민감하기 때문에 이들의 고순도 분리정제에는 증류, 추출 등 전통적인 단위조작적 분리법보다는 친화 크로마토그래피(affinity chromatography) 기술 및 막분리법의 적용이 고려되고 있다[1-3].

친화 관 크로마토그래피(affinity column chromatography)는 마이크론 크기의 hydrogel bead 담체에 리간드(ligand)가 결합된 고정상 입자를 채운 충전관을 사용하여 분리대상 목적물인 리게이트(ligate)와 리간드와의 친화작용에 의해 물질을 분리정제 하는 방법이다[4]. 그러나 충전관은 공극률이 낮아 압력강하가 크며, 관을 통한 이동상의 유동량이 작음에 따라 확산저항이 커서 분리정제의 생산성이 낮다는 문제와 공극 막힘(plugging)의 발생이 쉽기 때문에 이를 규모 확대시켜 생산규모에 적용하는데 어려움이 있다[5,6].

근래에 들어 충전관이 갖는 이러한 문제점을 개선하기 위한 방안의 하나로서 다공 막을 리간드의 고정화 담체로 사용하는 친화 막(affinity membrane)에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 1987년 Brandt 등[7]이 처음으로 제안한 친화 막 크로마토그래피 기법은 관 크로마토그래피의 장점과 막분리의 장점을 결합시킨 분리기술로서 다공 막 세공을 통한 이동상 흐름량을 크게 할 수 있어 압력강하가 작고, 생산성 증대와 규모 확대가 용이하다[8,9]. 이후 다양한 고분자 막 소재를 대상으로 한 친화 막 제조에 대한 연구가 이루어져 왔다. 일반적으로 친화 막 제조에 사용될 다공 막의 소재는 리간드와의 반응성, 생체적합성, 우수한 기계적 강도, 적절한 세공특성(다공도와 세공크기), 극성 용매에의 안정성을 동시에 갖추어야 하므로 선택의 폭이 매우 제한되어 있다[10].

지구상에서 cellulose 다음으로 풍부한 천연 고분자인 키틴[poly(N-acetyl-D-glucosamine)]을 탈아세틸화시켜 얻어지는 키토산[poly(2-amino-2-deoxy-D-glucose)]은 기계적 강도가 적절하고, 필름형성이 용이하며, 분자구조에 수산기(-OH) 및 아민기(-NH₂)를 갖고 있어 리간드와의 결합력이 우수하여[11], 친화 막 제조의 소재로서 활용할만한 가치가 매우 크다. 그러나 키토산은 제막(製膜)은 용이하나 막 세공특성 조절이 어려운 것으로 알려져 있다. 1996년 Zeng과 Ruckenstein[12]은

키토산 용액에 기공 형성제(porogen)로서 실리카 입자를 사용하여 세공특성 조절이 가능한 키토산 및 키틴 막의 제조법을 발표한바 있다. 이들은 알칼리에 실리카 입자는 용해되나 키토산은 용해되지 않는 특성을 이용해 먼저 키토산 용액에 실리카 입자를 첨가시켜 필름을 형성시킨 후 이를 NaOH 용액에 침지시켜 실리카 입자를 제거함으로써 다공성의 키토산 막을 제조하였으며, 이때 실리카 입자의 크기 및 함유량을 달리 함으로써 키토산 막의 세공특성 조절이 가능하다. 또한 이들은 제조된 키토산 막을 아세틸화시킴으로써 적절한 가용성 용매가 없어 필름형성이 불가능한 것으로 알려진 키틴의 다공 막 제조법도 제시하였다.

본 연구는 Zeng과 Ruckenstein[12]이 제안한 제막법을 사용하여 본 연구진이 1단계 논문[13]을 통해 최적의 제막조건에서 제조된 다공성 키토산 및 키틴 막을 사용하여 반응성 염료인 Cibacron Blue 3GA를 결합시킨 키토산 친화 막과 키틴 친화 막을 대상으로 단백질(BSA)과 효소(lysozyme)의 친화 막 여과 크로마토그래피 기법에 의한 분리 특성을 평가하였다.

2. 실험

2.1. 실험재료

다공 막의 소재로는 평균 분자량이 750,000인 키토산(Fluka Chemi AG, 스위스)을 사용하였다. 기공형성제로는 평균 입자경 5 μm 인 (주)보광화학(한국)의 실리카 입자를 사용하였다. 키토산 막의 가교제로는 epichlorohydrine (Aldrich Co., 미국)을 사용하였으며, 키토산 막을 아세틸화시켜 키틴 막으로 전환하기 위해 acetic anhydride (Mallinckrodt Baker Co., 네덜란드)를 사용하였다.

키토산 막에 결합시킬 친화성 리간드로는 Cibacron Blue 3GA (CB3GA, 염료 함량 55%, Sigma Co., 미국)를 사용하였다. CB3GA는 식물 염색에 사용되는 triazine 염료의 한 부류인 Procion H 계열의 반응성 염료로서 그 구조가 NAD (nicotinamide adenine dinucleotide)와 흡사하여, 'dinucleotide fold'를 갖고 있는 단백질(serum albumin, dehydrogenase류, kinase류, nucleotide-binding 효소류 등)과의 친화력이 우수한 물질이다[14].

키토산 친화 막 크로마토그래피의 분리대상 물질로는 BSA (Fraction V, 96~99% albumin, $M_w = 69,000$,

Sigma Co., 미국) 단백질을, 키틴 친화 막 크로마토그래피의 분리대상 물질로는 lysozyme (EC 3.2.1.17, 3 times crystallized, dialyzed and lyophilized from hen egg white, Sigma Co., 미국) 효소를 사용하였다. 친화성 막 여과 크로마토그래피에 의한 단백질 분리 실험 시, BSA의 경우에는 이동상으로서 0.05 M Tris-HCl/ 0.05 M NaCl (pH 8) buffer와 eluent로서 0.05 M Tris-HCl/0.5 N NaSCN 용액을 사용하였고, lysozyme의 경우에는 이동상으로서 0.1 M phosphate/1 M NaCl (pH 8) buffer와 eluent로서 0.1 M acetic acid 용액을 사용하였다.

이외의 기타 시약들은 모두 특급 시약을 사용하였으며, 순수로는 Milli-RO⁺/Milli-Q⁺ Water Purification System (Millipore Co., 미국)을 통해 제조된 초순수를 사용하였다.

2.2. 실험장치 및 방법

2.2.1. 다공성 키토산 및 키틴 친화 막의 제조

다공성 키토산 막의 제조절차는 본 연구진의 1단계 논문[13]에 제시된 방법에 따라 수행되었으며, 그 제조절차를 Fig. 1에 나타내었다; 먼저 1 vol% acetic acid 용액 50 mL에 키토산 0.5 g을 용해시킨 용액에 키토산에 대한 실리카 입자의 함유량 질량비(ratio of silica to chitosan; S/C)가 1.5가 되도록 평균 입자경 5 µm인 실리카 입자를 첨가하여 격렬히 교반하면서 현탁시켰다. 이 실리카 입자 함유 키토산 용액을 깨끗한 유리판 위에 붓고 Film Applicator (YBA-3 type, Yoshimitsu Co., 일본)를 사용하여 250 µm의 일정한 두께로 캐스팅하여 후드 내에서 하루 동안 자연건조 시킨다. 건조된 필름을 유리판에서 떼어낸 후 80°C 온도의 5 wt% NaOH 용액에 2시간 동안 침지시켜 실리카 입자를 녹여낸 다음 다량의 물로 수차례 세척하여 잔존하는 NaOH를 제거하여 다공성 키토산 막을 제조하였다. 이 단계에서 얻어진 다공성 키토산 막의 물리적 강도를 향상시키기 위해 0.067 M NaOH 용액을 사용하여 pH가 10으로 조절된 50°C 온도의 0.02 M epichlorohydrin 용액에 침지시켜 2시간 동안 가교시킨 다음 과량의 순수로 세척하여 최종의 가교 결합된 다공성 키토산 막을 제조하였다. 다공성 키틴 막은 가교시키기 전 단계에서 얻어진 다공성 키토산 막을 acetic anhydride가 5 vol% 농도로 용해되어 있는 메탄올 용액 중에 침지시켜 50°C 온도에서 1시간 동안 아세틸화시킨 후 메탄올, 순수, 5 wt% NaOH 용액으로 순차적으로 세척시

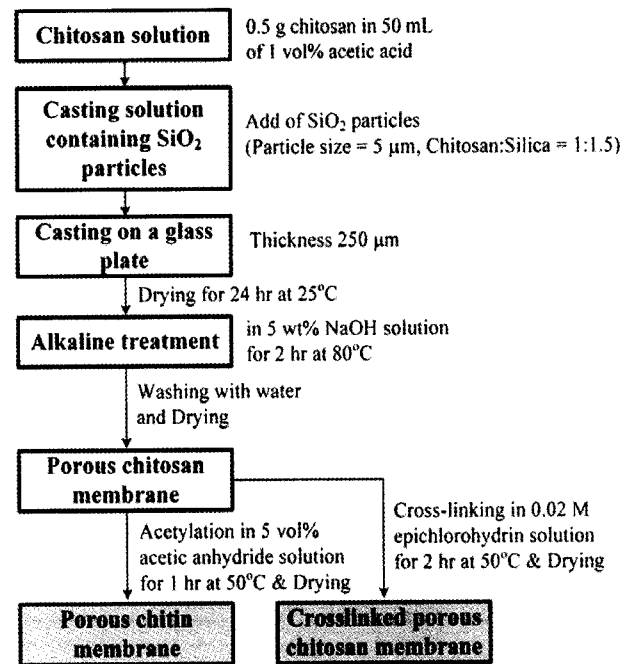


Fig. 1. Procedure for preparation of porous chitosan and chitin membranes.

켜 제조하였다.

키토산 친화 막의 제조는 epichlorohydrin으로 가교시켜 얻어진 다공성 키토산 막에 반응성 염료인 CB3GA를 고정화시켜 제조하였다. 제조절차는 다음과 같다[10]; 먼저 가교 결합시킨 다공성 키토산 막을 60°C 온도의 40 mL 염료용액(10 mg dye/mL)에 30분 동안 침지시킨다. 다음으로 이 염료용액에 5 mL의 NaCl 수용액(20 wt%)을 첨가시켜 염료 분자가 키토산의 분자사슬에 흡착되도록 30분 동안 방치시킨 후, 2 mL의 Na₂CO₃ (25 wt%) 수용액을 첨가시키고 용액의 온도를 80°C로 높여 2시간 동안 반응시켜 다공성 키토산 막에 반응성 염료를 고정화시켰다. 다음 단계로 염료 용액을 서서히 순수로 대체시켜 염료의 파란 색이 없어질 때까지 과량의 염료를 제거한 후, 막을 꺼내 다단계의 세척 과정[순수 → 25 wt% EtOH 용액/1 M NaCl → 순수 → 6 M Urea → 순수 → 1 wt% Tween 80 → 순수 → 0.05 M Tris-HCl buffer/0.05 M NaCl (pH 8) → 순수]을 거쳐 키토산 친화 막을 완성하였다. 제조된 막은 미생물의 번식을 막기 위해 0.4 wt% Na₃N 용액 중에 보관하였으며, 사용 시에는 과량의 순수로 세척하였다. 키틴은 그 자체로서 lysozyme에 대한 친화력을 갖고 있기 때문에 다공성 키틴 막의 친화 작업은 행하지 않았다[15].

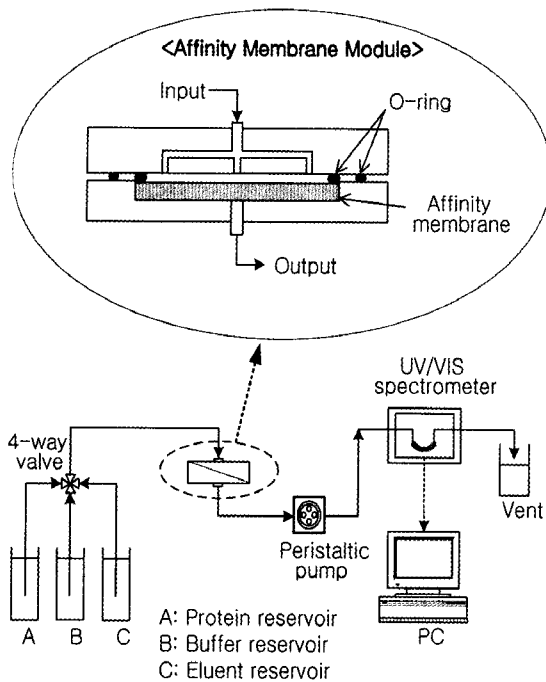


Fig. 2. System setup for affinity membrane filtration chromatography.

2.2.2. 친화 막 여과 크로마토그래피 장치

다공성 키토산 및 키틴 친화 막에 의한 BSA 단백질과 lysozyme 효소의 여과 크로마토그래피 분리실험에 사용된 장치의 구성은 Fig. 2에 나타난 바와 같이 저장조, 친화 막 module, 정량 펌프(Peristaltic pump, Fluid Metering Co., Model QSY, 미국), 석영재질의 flow cell이 장착된 UV/Vis 분광광도계로 구성되어 있으며, 장치의 배관재료는 Teflon 튜브를 사용하였다. 친화 막 module은 정사면체 형태로서 perspex 판(재질 PMMA)으로 자체 제작하였다. 막의 지지체로는 폴리프로필렌 다공판을 사용하였다. 친화 막 module에서 실제로 여과가 행해지는 부분의 유효 막면적은 10 cm^2 이다. 막 module의 윗 판과 아래 판은 나사로 고정하였으며, 용액의 누수 방지와 막 module의 완전한 밀착을 위해 Teflon O-ring을 삽입하였다.

2.2.3. 친화 막 여과 크로마토그래피에 의한 단백질 분리 실험

친화 막 여과 크로마토그래피에 의한 BSA 단백질과 lysozyme 효소의 분리 실험은 다음의 절차로 수행하였다. 먼저 Fig. 2의 막 module에 다공성의 BSA 친화 키토산 막 또는 lysozyme 친화 키틴 막을 장착한 후 이를 여과 크로마토그래피 장치에 연결하여 이동상인 완충용액(BSA 분리 실험의 경우 0.05 M Tris-HCl buffer

+ 0.05 M NaCl , lysozyme 분리 실험의 경우 $0.1 \text{ M phosphate buffer} + 1 \text{ M NaCl}$, pH 8)을 일정한 유량으로 연속적으로 보내주어 막 module을 안정화시킨다. 다음으로 BSA 또는 lysozyme 용액을 주입시켜 파과 곡선(breakthrough curve)이 얻어질 때까지 친화 막에 BSA 또는 lysozyme을 loading시킨 후 완충용액으로 친화 막과 약하게 결합된 단백질을 washing시키고, eluent 용액(BSA 분리 실험의 경우 0.05 M Tris-HCl buffer + 0.5 N NaSCN , lysozyme 분리 실험의 경우 $0.1 \text{ M acetic acid}$)을 주입시켜 친화 막에 결합된 BSA 또는 lysozyme을 용출시키는 과정을 통해 배출 흐름의 흡광도를 UV/Vis 분광광도계로 280 nm 에서 연속적으로 측정하여 loading/washing/elution으로 구성된 일련의 크로마토그램을 얻고, 이로부터 친화 막의 BSA 및 lysozyme 결합량을 계산하였다. 여과 크로마토그래피 실험의 조작조건으로는 BSA 및 lysozyme loading 용액의 유량을 $1 \sim 10 \text{ mL/min}$, loading 용액의 주입량을 $2 \sim 16 \text{ mL}$, loading 용액의 BSA 및 lysozyme 농도를 $0.1 \sim 1.5 \text{ mg/mL}$ 로 변화시켜 실험하였다. Washing 및 elution 단계에서의 유량은 5 mL/min 로 일정하게 유지시켰다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 다공성 키토산 및 키틴 친화 막의 특성

본 연구진의 1단계 논문[13]에서 제시된 최적의 제작조건(실리카 입경 = $5 \mu\text{m}$, S/C = 1.5)에서 제조된 다공성 키토산 및 키틴 막의 막표면 SEM 사진을 Fig. 3에 나타내었으며, 키토산 및 키틴 친화 막의 특성 값들을 Table 1에 나타내었다. Fig. 3과 Table 1에 나타난 것과 같이 기공 형성제인 실리카 입자를 사용함으로써 다공도가 잘 조절된 막의 제조가 가능하였으며, 키토산 막과 키틴 막 모두 5 vol\% 아세트산 용액(pH 2.5)에 불용으로서 충분한 정도의 산안정성을 나타내었다. 또한 단백질 용액의 흡착 실험을 통해 얻어진 키토산 친화 막의 BSA 단백질에 대한 평형 결합용량은 최대 $21.8 \text{ mg/mL membrane}$ 이었으며, 키틴 친화 막의 lysozyme 효소에 대한 평형 결합용량은 최대 $26.1 \text{ mg/mL membrane}$ 이었다.

3.2. 친화 막 여과 크로마토그래피에 의한 단백질 분리 키토산 및 키틴 친화 막에 의한 단백질 분리 특성을

Table 1. Properties of Porous Chitosan and Chitin Affinity Membranes[10]

Physical property	Chitosan membrane	Chitin membrane
Stability in 5 vol% acetic acid solution (pH 2.5)	Insoluble	Insoluble
Pure water flux at 100 kPa	52 L/m ² · hr	30 L/m ² · hr
Porosity	32.4%	28.7%
Pore volume	0.002 cc/g	0.00185 cc/g
Specific surface area	2.7 m ² /g	2.0 m ² /g
Membrane thickness (μm)	272	133
Protein binding capacity (mg/mL membrane)	21.8 (for BSA)	26.1 (for lysozyme)

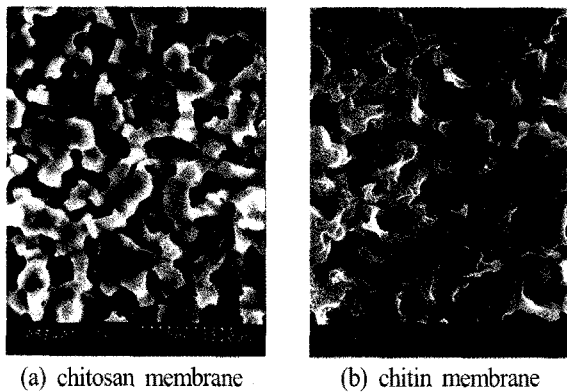


Fig. 3. Surface morphology of the porous affinity (a) chitosan and (b) chitin membrane.

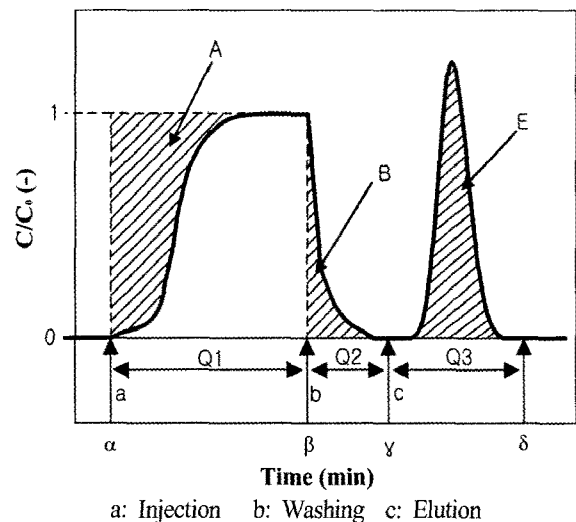


Fig. 4. Typical filtration chromatogram.

규명하기 위한 여과 크로마토그래피 실험을 통해 얻어진 loading/washing/elution으로 구성된 전형적인 크로마토그램의 모식도를 Fig. 4에 나타내었다. 이 모식도에서 a점은 단백질을 함유한 완충용액을 각기 다른 유량(Q₁)으로 도입시킨 시점이며, b점은 단백질의 파과곡선이 얻어진 후 막모듈을 세척시키기 위해 완충용액을 5 mL/min (Q₂)의 유량으로 도입시킨 시점이며, c점은 친화성 막과 결합된 단백질을 용출시키기 위해 eluent 용액을 5 mL/min (Q₃)로 도입시킨 시점이다. 크로마토그램의 모식도로부터 아래의 절차로서 친화 막에의 단백질 결합량을 계산하였다[12]. Fig. 4의 파과곡선상의 빗금친 부분의 면적 A는 친화 막에 결합된 단백질의 양을 나타내며, 빗금친 면적 B는 친화 막의 세척에 의해 약하게 결합된 단백질이 탈착되는 양을 나타낸다. 따라서 이들 면적의 차(A - B)가 친화 막에 결합된 총 단백질의 양에 해당한다. 한편 용출 단계에서 친화 막에 결합된 단백질이 모두 용출된다면 용출 면적 E는 이론적으로 (A - B)의 면적과 같아져야 한다. A, B 및 E의 면적 값은 다음의 식으로서 계산하였다.

$$A = C_0 Q_1 \int_{\alpha}^{\beta} \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) dt \tag{1}$$

여기서, A : 친화 막에의 단백질 결합량(mg)
 C₀ : loading 용액의 단백질 농도(mg/mL)
 C : effluent 용액에서의 단백질 농도(mg/mL)
 Q₁ : loading 용액의 유량(mL/min)
 α : loading 용액의 도입시점(min)
 β : 파과 시점(min)

$$B = C_0 Q_2 \int_{\beta}^{\gamma} \frac{C}{C_0} dt \tag{2}$$

여기서, B : washing 과정에서 탈착된 단백질의 양(mg)
 Q₂ : washing 용액의 유량(mL/min)
 γ : 세척 완료 시점(min)

$$E = C_0 Q_3 \int_{\gamma}^{\delta} \frac{C}{C_0} dt \tag{3}$$

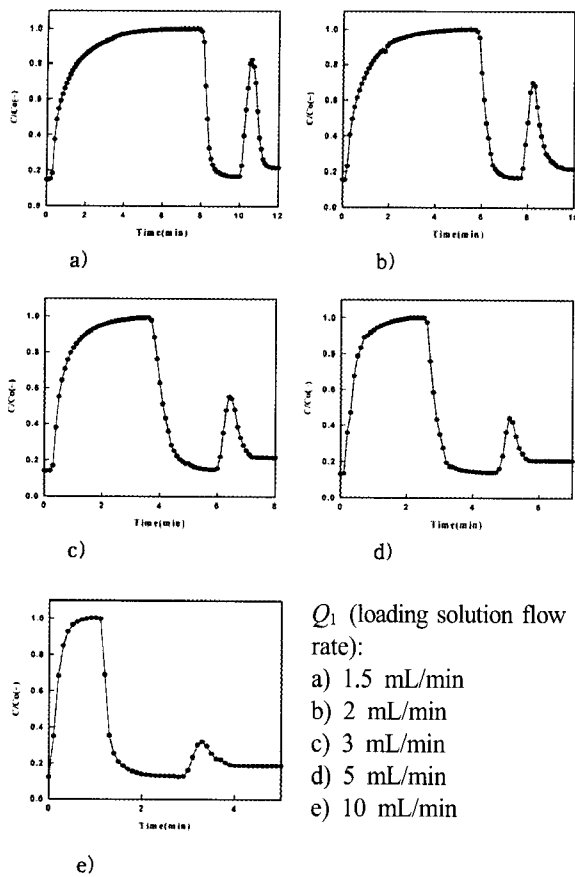


Fig. 5. Filtration chromatograms for BSA by chitosan affinity membrane with change of loading solution flow rate. [BSA concentration in loading solution = 0.5 mg/mL, loading amount of solution = 12 mL, $Q_2 = Q_3 = 5$ mL/min].

여기서, E : 용출된 단백질의 양(mg)
 Q_3 : eluent의 유량(mL/min)
 δ : 용출 완료 시점(min)

3.2.1. 키토산 친화 막에 의한 BSA의 분리

키토산 친화 막을 사용하여 얻어진 BSA의 여과 크로마토그래피 분리 실험 결과 중 loading 용액의 유량 변화에 따른 크로마토그램 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5에 나타난 각각의 크로마토그램으로부터 식 (1)과 식 (2)을 사용하여 (A - B) 면적 및 식 (3)을 사용하여 E 면적을 계산한 결과 (A - B) 값과 E 값은 거의 일치하였다. 이는 loading 단계에서 키토산 친화 막과 결합된 BSA는 eluent에 의해 모두 용출되었음을 의미한다. Fig. 6은 Fig. 5의 각 크로마토그램으로부터 계산된 용출 BSA의 양 E 값과 결합수율(binding yield)을 나타내었다. 결합수율은 E 값을 키토산 친화 막의 BSA 최대 결합량 5.93 mg (= 평형 결합용량 21.8 mg/

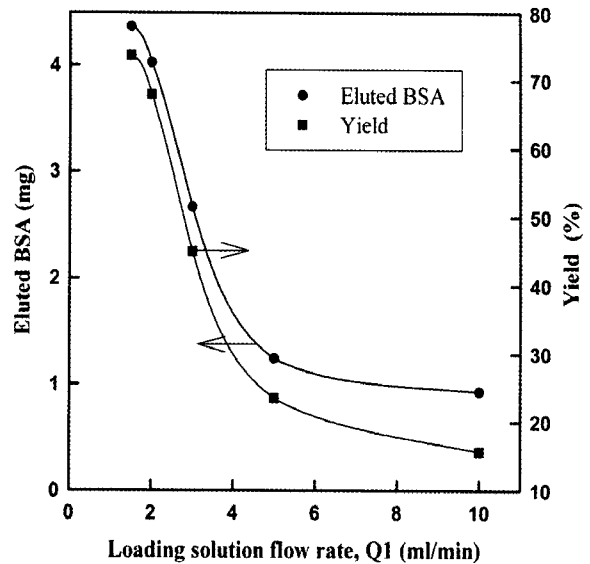


Fig. 6. Eluted BSA amount and binding yield by chitosan affinity membrane with change of loading solution flow rate. [BSA concentration in loading solution = 0.5 mg/mL, loading amount of solution = 12 mL, $Q_2 = Q_3 = 5$ mL/min].

mL × 막의 두께 0.0272 cm × 유효 막면적 10 cm²)으로 나눈 값이다. 이 결과 BSA loading 용액의 유량이 1.5 mL/min에서 10 mL/min로 증가함에 따라 크로마토그램에서 용출피크가 감소하였고, 결합수율은 80%에서 20%로 급격히 감소하였다. 이는 loading 용액의 유량이 증가함에 따라 BSA가 리간드인 CB3GA와 결합할 수 있는 접촉시간이 감소하기 때문으로 사료된다.

BSA loading 용액의 주입량을 2 mL에서 16 mL로 변화시킴에 따른 용출된 BSA의 양과 결합수율 Fig. 7에 나타내었으며, loading 용액의 BSA 농도 변화에 따른 용출된 BSA의 양과 결합수율을 Fig. 8에 나타내었다. 이 결과 loading 용액의 주입량과 BSA 농도가 증가할수록 용출된 BSA의 양과 결합수율이 증가하였으며, 이는 리간드인 CB3GA와 결합하는 BSA의 양이 증가하기 때문이다.

3.2.2. 키틴 친화 막에 의한 lysozyme의 분리

키틴 친화 막을 사용하여 얻어진 lysozyme의 여과 크로마토그래피 분리 실험 결과 중 loading 용액의 유량 변화에 따른 크로마토그램 결과를 Fig. 9에 나타내었다. Fig. 9의 각 크로마토그램으로부터 계산된 (A - B) 면적의 값과 E 면적의 값 역시 거의 일치하였다. 각각의 크로마토그램으로부터 계산된 용출 lysozyme의 양 E 값과 lysozyme 결합수율을 loading 용액의 유량, 주

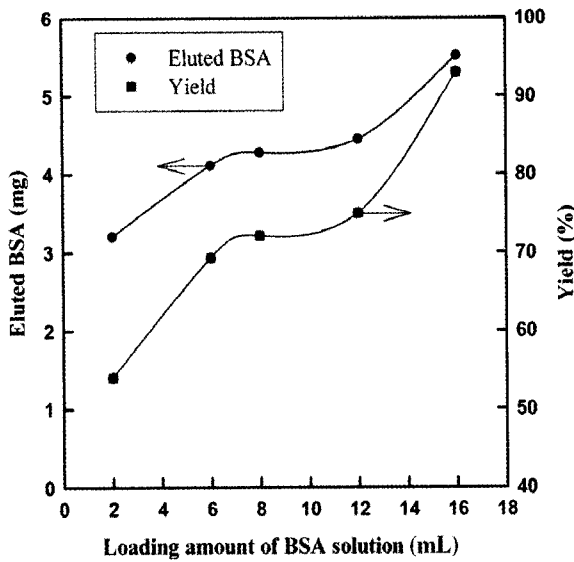


Fig. 7. Eluted BSA amount and binding yield by chitosan affinity membrane with change of loading amount of sloution. [BSA concentration in loading solution = 0.5 mg/ mL, $Q_1 = 2$ mL/min, $Q_2 = Q_3 = 5$ mL/min].

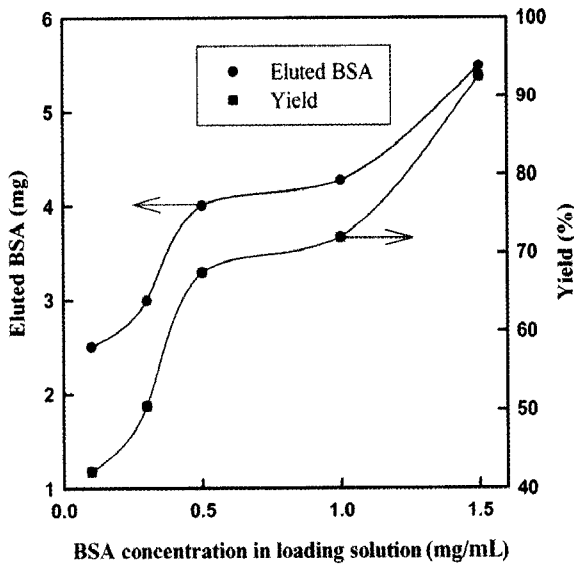


Fig. 8. Eluted BSA amount and binding yield by chitosan affinity membrane with change of concentration in loading sloution. [loading amount of solution = 12 mL, $Q_1 = 2$ mL/min, $Q_2 = Q_3 = 5$ mL/min].

입량 및 lysozyme 농도 변화에 따라 Figs. 10~12에 나타내었다. 이때 결합수율은 E 값을 키틴 친화 막의 lysozyme 최대 결합량 3.47 mg (= 평형 결합용량 26.1 mg/mL \times 막의 두께 0.0133 cm \times 유효 막면적 10 cm²)으로 나눈 값이다. 이 결과 키틴 친화 막에의 lysozyme 효소의 결합량과 결합수율은 loading 용액의 유량이

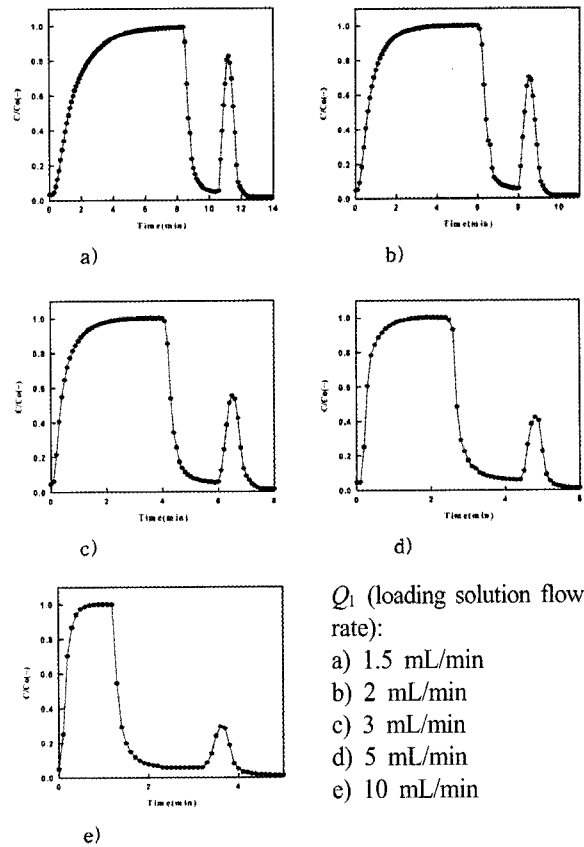


Fig. 9. Filtration chromatograms for lysozyme by chitin affinity membrane with change of loading solution flow rate. [lysozyme concentration in loading solution = 0.5 mg/mL, loading amount of solution = 12 mL, $Q_2 = Q_3 = 5$ mL/min].

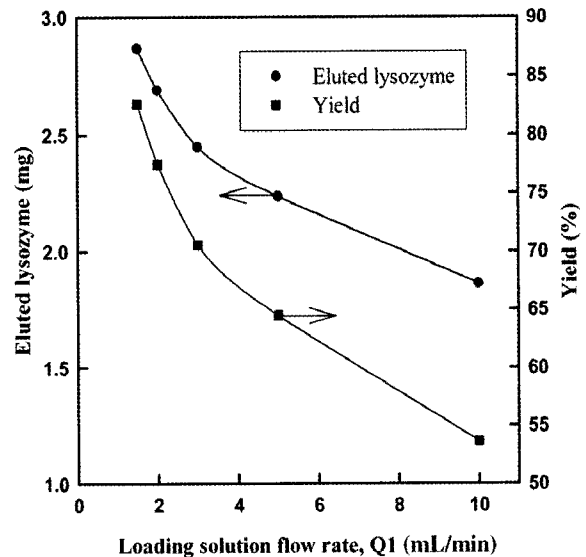


Fig. 10. Eluted lysozyme amount and binding yield by chitin affinity membrane with change of loading sloution flow rate. [lysozyme concentration in loading solution = 0.5 mg/mL, loading amount of solution = 12 mL, $Q_2 = Q_3 = 5$ mL/min].

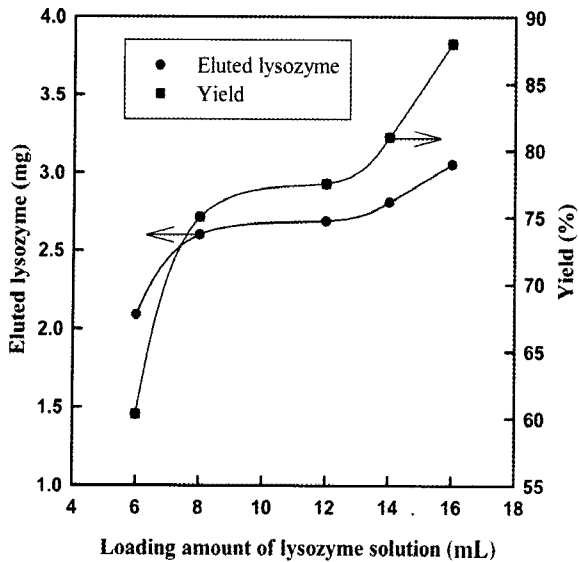


Fig. 11. Eluted lysozyme amount and binding yield by chitin affinity membrane with change of loading amount of solution. [lysozyme concentration in loading solution = 0.5 mg/mL, $Q_1 = 2$ mL/min, $Q_2 = Q_3 = 5$ mL/min].

감소할수록, 주입량 및 농도가 클수록 증가하였다.

이상의 결과를 종합하면 실리카 입자를 기공 형성제로 사용하여 제조된 다공성 키티산 및 키티산 막은 산에 안정한 물리·화학적 특성을 갖추었으며, 향후 단백질의 여과 크로마토그래피 분리를 위한 친화 막으로서의 효과적인 활용이 기대된다.

4. 결론

키티산을 기초로 하여 실리카 입자를 기공형성제로 사용하여 다공성 키티산 및 키티산 친화 막을 제조하였으며, 이들 친화 막을 사용하여 BSA 및 lysozyme 단백질의 여과 크로마토그래피 분리 실험을 수행한 결과 다음의 결론을 얻었다.

1) 다공성 키티산 친화 막의 BSA 단백질 결합용량은 최대 21.8 mg/mL이었으며, 키티산 친화 막의 lysozyme 효소 결합용량은 최대 26.1 mg/mL이었다.

2) 키티산 및 키티산 친화 막을 사용하여 BSA와 lysozyme 용액의 loading 유량, loading 양 및 농도 변화에 따른 BSA와 lysozyme의 친화 막 여과 크로마토그래피 분리 실험을 수행한 결과 BSA와 lysozyme 단백질의 결합량과 결합수율은 loading 용액의 유량이 작을수록, 주입량 및 농도가 클수록 증가하였다.

3) 실리카 입자를 기공 형성제로 사용하여 제조된

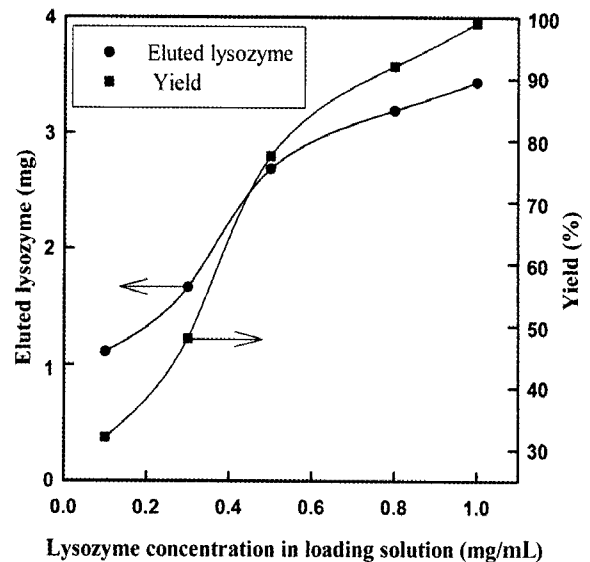


Fig. 12. Eluted lysozyme amount and binding yield by chitin affinity membrane with change of concentration in loading solution. [loading amount of solution = 12 mL, $Q_1 = 2$ mL/min, $Q_2 = Q_3 = 5$ mL/min].

다공성 키티산 및 키티산 막은 단백질의 대규모 여과 크로마토그래피 분리를 위한 친화 막으로서 효과적인 활용이 가능함을 확인하였다.

감사

이 논문은 2007년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었음(This work was supported by the research grant of the Chungbuk National University in 2007).

참고 문헌

1. G. Belfort, "생물공학에서의 합성막: 현실과 가능성", *멤브레인(Membrane Journal)*, **2(2)**, 91 (1992).
2. 구자경, 손동호, 전회진, 이윤희, 조남준, 장동일, "한외여과를 통한 난백 중 라이소자임의 분리정제", *멤브레인(Membrane Journal)*, **15(2)**, 121 (2005).
3. 김인철, 이규호, 박주영, 정보름, 권지영, 이기훈, "한외여과막을 이용한 단백질 정련액으로부터 단백질 분리", *멤브레인(Membrane Journal)*, **17(4)**, 375 (2007).
4. P. D. G. Dean, W. S. Johnson, and F. A. Middle, "Affinity Chromatography; a Practical Approach",

- IRL Press, Oxford (1985).
5. F. H. Arnolds, H. W. Blanch, and C. R. Wilke, "Analysis of affinity separation", *Chem. Eng. J.*, **30**, B9 (1985).
 6. R. P. W. Scott, "Liquid Chromatography Column Theory", John Wiley & Sons, New York, NY (1992).
 7. S. Brandt, R. A. Goffe, S. B. Kessler, J. L. O'Conner, and S. E. Zale, "Membrane-based affinity technology for commercial scale purification", *Biotech.*, **6**, 779 (1988).
 8. K. G. Brief and M. R. Kula, "Fast protein chromatography on analytical and preparative scale using modified microporous membrane", *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 141 (1992).
 9. 이광진, 염경호, "평판막 및 실관막 모듈에 의한 단백질의 친화성 크로마토그래피에 관한 연구", *멤브레인(Membrane Journal)*, **8(1)**, 50 (1998).
 10. X. Zeng and E. Ruckenstein, "Membrane chromatography: preparation and applications to protein separation", *Biotechnol. Prog.*, **15**, 1003 (1999).
 11. S. Hirano and S. Tokura, "Chitin and Chitosan", Proceedings of 2nd International Conference on Chitin and Chitosan, Sapporo, Japan (1982).
 12. X. Zeng and E. Ruckenstein, "Control of pore sizes in macroporous chitosan and chitin membranes", *Ind. Eng. Chem. Res.*, **35**, 4169 (1996).
 13. 육영재, 염경호, "키토산 및 키틴 막에 의한 단백질의 친화 여과 크로마토그래피: 1. 다공성 친화막의 제조와 특성 평가", *멤브레인(Membrane Journal)*, **16(1)**, 39 (2006).
 14. R. K. Scopes, "Protein Purification", 2nd ed., Springer-Verlag, New York, NY (1987) .
 15. E. Ruckenstein and X. Zeng, "Macroporous chitin affinity membranes for lysozyme separation", *Biotech. Bioeng.*, **56**, 610 (1997).