

막모듈의 친화성 크로마토그래피 컬럼으로의 활용

이광진, 김민정, 염경호
충북대학교 공과대학 화학공학부

Application of Membrane Modules to Affinity Chromatography Column

Kwang Jin Lee, Min Joung Kim and Kyung Ho Youm
School of Chemical Engineering, Chungbuk National University,
Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

1. 서론

생물기술이 급속히 발전함에 따라 다양한 생물제품들(예, 단백질, 효소, 항생제 등)이 생산되고 있으나, 그 생산량은 극단적으로는 기질용액 1 g당 10^{-8} g 정도 로까지 낮아[1], 이를 고순도로 정제하기 위해서는 다단계의 공정이 필요하여 분리정제의 비용이 크다. 따라서 생물제품의 산업적 생산이 경제성을 갖기 위해서는 생물제품을 보다 경제적으로 분리정제 할 수 있는 효율적인 공정개발이 필수적이다.

친화성 관 크로마토그래피(affinity column chromatography)법은 분리효율이 높아 단백질 및 효소류의 정제에 널리 사용되고 있는 기술이다[2]. 그러나 관 크로마토그래피는 단분산 입자가 충전된 막을 사용함에 따라 압력강하가 크고(약 3 atm/cm depth), 충전입자의 압축에 의한 관막힘과 오염 현상 때문에 이동상의 흐름량이 작아 분리정제의 생산성이 낮다는 단점이 있다. 따라서 충전관을 규모 확대시켜 생산규모에 적용하는 데는 한계가 있다[3]. 충전관이 갖는 단점들을 개선하고자 최근 다공성 막모듈을 이용한 친화성 크로마토그래피의 개념이 제안되었다. 막모듈을 친화성 크로마토그래피의 컬럼으로 사용하면 통상의 충전관에 비해 이동상의 흐름이 원활해 압력강하가 작고 또한 이동상의 원활한 흐름이 물질 전달을 촉진시켜 생산성이 높아져 규모확대가 용이하다는 장점이 있다[4,5].

본 연구에서는 polysulfone(PS) 재질의 평판막과 실관막에 키토산을 도포시킨 후, 여기에 단백질에 대한 친화성이 우수한 반응성 염료인 Cibacron Blue 3GA를 고정화시켜 제조된 막모듈을 크로마토그래피 컬럼으로 사용하여 human serum albumin(HSA)에 대한 친화성 막 크로마토그래피를 연구하였다. 친화성 막모듈의 단백질에 대한 용출 분리율과 결합용량을 eluent 용액의 환경조건(완충액의 농도, pH, 염의 종류와 농도)과 크로마토그래피 조작조건(이동상 유량과 단백질 부하량)의 변화에 따라 검토하여 막모듈의 친화성 크로마토그래피 컬럼으로서의 활용 가능성을 체계적으로 검토하였다.

2. 실험

평판막으로는 분획 분자량 300,000 달톤인 PTMK 막(PS 재질, Millipore Co.)

을, 실관막으로는 Superane 막[PS 재질, 외경 1300 μm , 내경 800 μm , 다공도 약 30 %, 세공크기 약 0.05 μm , (주)선경인더스트리]을 사용하였다. 다공성 막에 도포시킬 피막 물질로는 키토산을 사용하였으며, 단백질의 리간드로는 Cibacron Blue 3GA(CB3GA)를 사용하였다. CB3GA는 triazine 염료의 한 부류인 Procion H 계열의 반응성 염료로서 그 구조가 NAD와 흡사하여, 'dinucleotide fold'를 갖고 있는 단백질들(예, dehydrogenase류, kinase류, serum albumin 등)과 강한 친화성 작용을 나타낸다[6]. 키토산과 CB3GA와의 반응을 Fig. 1에 나타내었다. 분리대상 단백질로는 HSA(fraction V)을 사용하였다. 순수로는 Milli-RO'/Milli-Q' 순수 제조기(Millipore Co.)로부터 생산된 순수를 사용하였다.

막모듈이 장착된 크로마토그래피 실험 장치도를 Fig. 2에 나타내었다. 평판막 모듈은 perspex 판 사이에 실리콘 고무로 유효 막면적이 11 cm^2 (길이 11 cm \times 폭 1 cm)이 되도록 높이 0.23 cm의 유로를 만들고, 여기에 막을 삽입한 구조이다. 실관막 모듈은 25 cm 길이의 테프론 튜브 내에 50가닥의 실관막을 에폭시 수지로 포팅(potting)시켜 제작하였다.

막모듈의 단백질 친화성화 작업은 ① 1단계: 막표면에의 키토산 피막의 형성, ② 2단계: 키토산 피막에의 CB3GA의 고정화, ③ 3단계: 세척의 절차로서 수행하였다. 이 친화성화 작업은 Atkinson 등[7]이 제안한 hydrogel bead에의 반응성 염료 고정화법을 준용한 것이다. 제조된 친화성 평판막을 대상으로 HSA의 흡착 실험을 수행하여 친화성 막에 대한 단백질의 평형 결합용량(equilibrium binding capacity)을 측정하였다.

친화성 평판막 및 실관막 모듈을 Fig. 1의 장치에 연결시킨 후 HSA에 대한 용출(elution) 및 전열(frontal) 크로마토그래피 실험을 수행하여 2종류 막모듈의 친화성 크로마토그래피 컬럼으로서의 활용 가능성과 단백질에 대한 동적 결합용량(dynamic binding capacity)을 검토하였다.

3. 결과 및 토론

제조된 친화성 막의 최대 단백질 평형 결합용량은 약 70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이었다. 친화성 평판막 및 실관막 모듈 각각을 사용하여 얻은 전형적인 전열 크로마토그램을 Fig. 3에 나타내었다. 이 크로마토그램에서 첫 번째 곡선은 HSA의 파과곡선이며, 두 번째 곡선은 세척곡선, 세 번째 곡선은 리간드와 결합된 HSA의 용출곡선이다. 용출곡선의 면적은 리간드와 결합된 HSA의 양에 해당하며, 이로부터 2종류 막모듈의 동적 단백질 결합용량을 계산하였다. 친화성 평판막 및 실관막 모듈의 동적 단백질 결합용량을 크로마토그래피 조작조건에 따라 Fig. 4에 나타내었다. 이 결과 평판막 모듈의 경우는 이동상의 유량이 증가함에 따라 동적 결합용량이 급격히 감소하였다. 이처럼 평판막 모듈의 동적 결합용량이 평형 결합용량 값으로부터 크게 감소하는 일차적 이유는 유량이 증가함에 따라 막표면에 작용하는 전단력이 커지고 체류시간이 작아져 리간드에의 단백질 결합량이 작아지기 때문이나, 본질적으로는 막모듈이 평판형이기 때문에 모듈 단위 부피당 충전된 막면적이 작기 때문이다. 그러나 실관막 모듈의 경우에는 loading 용액의 HSA

농도와 유량에 관계없이 동적 결합용량은 항상 평형 결합용량 수준을 유지하였는바, 따라서 실관막 모듈이 평판막 모듈보다 단백질 친화성 크로마토그래피 컬럼으로서 보다 더 효과적이었다.

4. 참고문헌

- 1) Belter, P. A., E. L. Cussler and W. S. Hu, "Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology", John Wiley & Sons, Singapore(1988).
- 2) Dean, P. D. G., W. S. Johnson and F. A. Middle, "Affinity Chromatography: A Practical Approach", IRL Press, Washington, D.C.,(1985).
- 3) Ding, H., M.C. Yang, D. Schisla and E.L. Cussler, *AIChE J.*, 35(5), 814(1989).
- 4) Brandt, S., et. al., *Bio/Technology*, 6, 779(1988).
- 5) Kubota, N., et. al., *J. Memb. Sci.*, 117, 135(1996).
- 6) Zeng, X. and E. Ruckenstein, *J. Memb. Sci.*, 117, 271(1996).
- 7) Atkinson, T., et. al., *Biochem. Soc. Trans.*, 9, 290(1981).

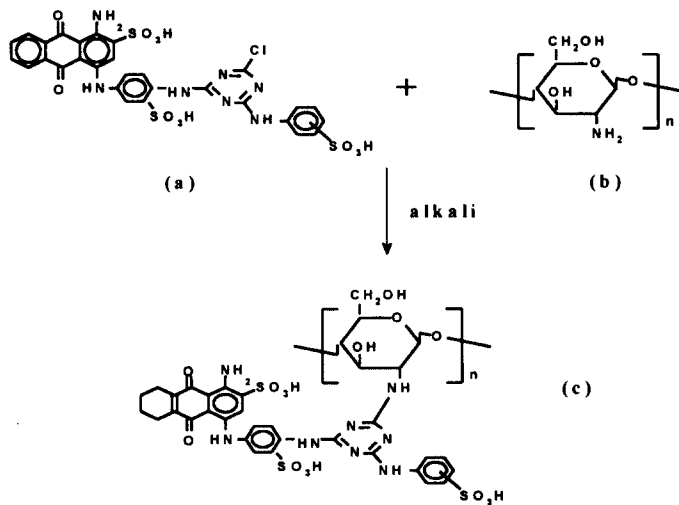


Fig. 1. Reaction scheme of CB3GA(a) with chitosan(b).

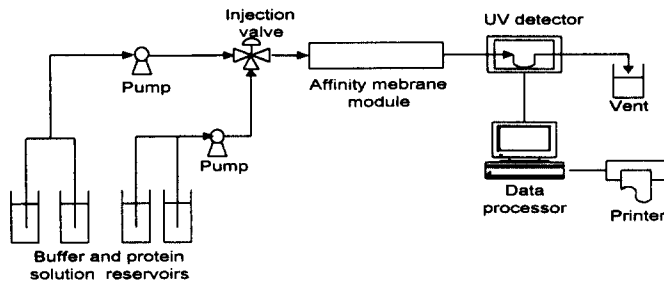
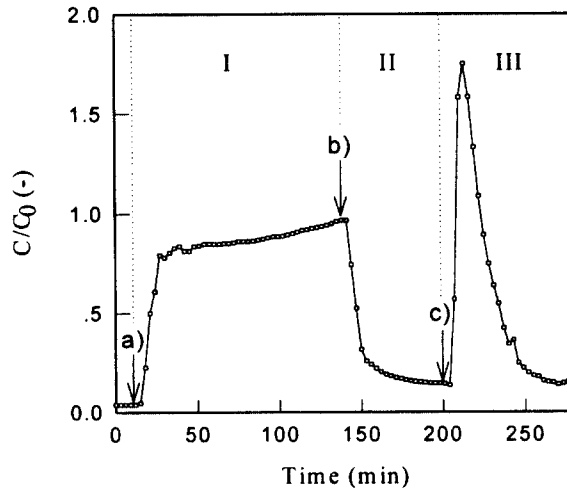
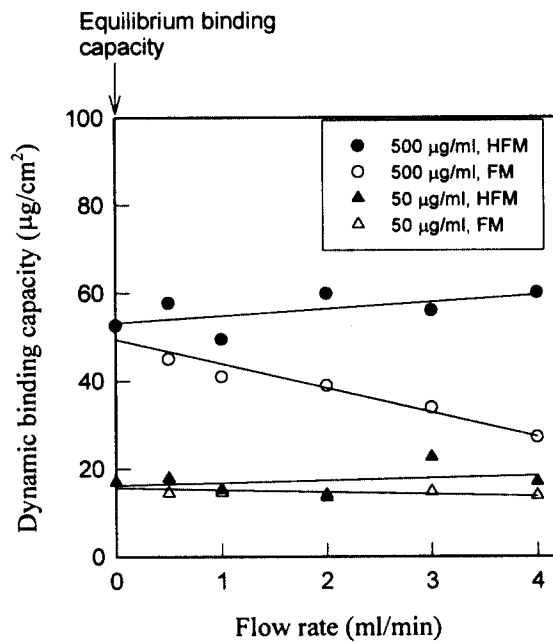


Fig. 2. Setup of Affinity Chromatography System.



I : Loading, II : Washing, III : Elution

Fig. 3. Typical Frontal Chromatogram.



HFM = Hollow-fiber module, FM = Flat module

Fig. 4. Dynamic Protein Binding Capacity.