

## 친화성 고분자 및 한외여과 분리막을 이용한 트립신의 선택적 분리에 관한 연구

이 제 권 · 정 응 섭\* · 홍 석 인\*\*

대림엔지니어링(주)

\*전북대학교 식품공학과

\*\*고려대학교 화학공학과

(1993년 10월 13일 접수, 1993년 12월 18일 채택)

### Selective Separation of Trypsin by Affinity Polymer and Ultrafiltration Membranes

Je-Gueon Lee, Yong-Seob Jeong\*, and Suk-In Hong\*\*

Daelim Eng., Co., Ltd., Seoul 150-010, Korea

\*Dept. of Food Sci. and Tech., Chonbuk Nat'l Univ., Chonju 560-756, Korea

\*\*Dept. of Chem. Eng., Korea Univ., Seoul 136-705, Korea

(Received October 13, 1993, Accepted December 18, 1993)

**요 약 :** 트립신과 키모트립신 혼합물은 분자량 및 화학적 구조가 유사하여 기존의 분리방법으로는 분리가 쉽지 않다. 그러므로 우수한 선택적 분리 기능이 있는 친화성 크로마토그래피와 막분리 공정의 장점을 결합한 유가식 분리공정이 연구되었다. 트립신에 대하여 더 친화성이 있는 수용성 고분자와 제조된 셀룰로오스 아세테이트 한외여과막에 의해 트립신-친화성 고분자 복합체가 시스템 내에 유지되었으며, 결합되지 못한 효소들은 제거되었다. 사용된 한외여과막의 기공크기는 막 제조시 에탄올 농도에 의해 조절했으며, 친화성 고분자는 4°C에서 아크릴아마이드와 N-아크릴로일-m-아미노벤자미딘으로 중합에 의해 제조하였다. 트립신은 친화성 고분자와 제조된 UF-50 한외여과막을 이용하여 용출 완충용액으로 여과한 결과 순도 86%를 얻을 수 있었다.

**Abstract:** The fed-batch process which combined high selectivity of affinity chromatography and membrane process was developed. The mixture of trypsin and chymotrypsin, having almost the same molecular weight and the chemical structure, were used as model enzymes. The water soluble polymer having more affinity for trypsin and cellulose acetate membrane gellated in 50vol.% ethanol for removing free enzymes and retentating trypsin-affinity polymer complex simultaneously were used in this system. The membrane pore size was controlled by ethanol concentration in the gellation bath, and the affinity polymer was prepared by polymerization of acrylamide with N-acryloyl-m-aminobenzamidine at 4°C. The trypsin could be effectively concentrated by utilizing an affinity polymer and a prepared UF-50 ultrafiltration membrane. As a result, 86% purity trypsin was recovered by the current purification process.

## 1. 서 론

1970년대 이후 폐수처리, 화학약품, 석유화학, 제약, 생명공학 및 기타 여러 분야에서 더 효과적인 분리 및 정제에 대한 요구가 증가됨에 따라, 막을 이용한 분리 기술의 응용분야는 최근 들어 급속히 발전하게 되었다[1-3].

막 분리 공정은 물질의 상변화없이 분리하기 때문에 장치 비용이 저렴하며, 열 안정성이 약한 물질을 저온에서 분리할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 따라서 미생물, 효소 및 단백질 등과 같이 열 및 화학적으로 민감한 물질인 생물물질 등을 다루기에 적합한 공정이다[4]. 정밀여과(microfiltration, MF)나 한외여과(ultrafiltration, UF) 또는 역삼투(reverse osmosis, RO)는 중요한 하류(down stream)공정이다. 이러한 공정들은 물질 분리의 구동력(driving force)으로 수압(hydrostatic pressure)을 사용하여, 분자의 크기가 서로 다른 물질을 분리한다. 이는 종래의 섬유여과(fiber filtration)보다 단지 분리되는 입자의 크기가 작고, 적용되는 수압이 다를 뿐(역삼투에서는 최소한 기존의 여과방법에서보다 10배 이상의 큰 수압이 작용된다) 분리되는 방법은 동일하다. 한외여과의 경우 역삼투보다 낮은 압력에서 물질의 분리 및 농축이 가능하기 때문에 에너지의 소비가 적다. 또한 효과적으로 콜로이드를 제거할 수 있고, 단백질과 같은 거대 분자를 농축할 수 있으며, 공정에 소요되는 시간이 짧기 때문에 주위 환경변화에 민감한 물질을 다루는데 적합하다. 한외여과는 공정수의 처리, 화학, 식품, 의약 산업 등에서 거대분자의 분리, 정제 및 농축에 사용되며, 역삼투공정은 바닷물의 담수화 등 여러 분야에 적용되고 있다[5]. 다양한 용도와 대량 생산성에도 불구하고 막을 이용한 분리공정의 문제점은 유사한 분자량을 갖는 물질의 분리가 어렵다는 것이다. 이를 개선하기 위한 여러 방법 중 친화성 물질을 이용하는 방법이 점차 연구되고 있다.

최종 생성물질을 정제하는 방법으로는 이온교환 크로마토그래피, 전기영동 및 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)가 있다. 마지막으로 언급한 친화성 크로마토그래피는 가장 선택적이고, 단일 장치로서 기존의 분리방법보다 약 1000배 가까이 생성물을 정제할 수 있다[6]. 친화성 크로마토그래피 및 관련기술의 급속한 발전은 1959년 Porath와 Flodin

[7]에 의해 Sephadex가 도입된 후부터이며, 모체물질로 1962년 Hjerten[8]에 의해 도입된 beaded agarose도 급속한 발전에 기여하였다. Axen 등[9]에 의해 시안화 브롬(CNBr)으로 활성화된 다당류 모체가 일차 아미노기를 포함하는 분자와 결합할 수 있음이 발견되어 다양한 친화성 크로마토그래피 공정이 개발되었다. Robinson 등[10]은 Sepharose에 트립신 억제제로서 chicken ovomucoid(CHOM)를 결합시켜 bovine trypsin 및 porcine trypsin 등을 분리하였으며, Turkova 등[11]은 hydroxyalkyl methacrylate gel(Spheron 300)에 ovomucoid 및 aminobenzamidine을 포함하는 합성된 억제제들을 각각 결합시켜 트립신을 분리하였다. Ovomucoid와 같이 자연에 존재하는 억제제들은 단백질과 같은 성질을 나타내므로 취급하기 어려우나, 합성된 억제제들은 분리조건에 대해 비교적 안정함을 보여주었다. 하지만 친화성 크로마토그래피는 생산성이 떨어지며, 공정의 규모확대(scale-up)에 어려움이 있기 때문에 친화성 크로마토그래피의 우수한 선택성과 막 분리 공정이 가지는 대량 생산성을 결합하고자 하는 시도가 많이 연구되었다. Matiasson 등[12]은 친화성 십자호름여과(cross-flow filtration)를 이용하여 jack beans (*Canavalia ensiformis*)에서 concanavalin A를 정제하였다. 친화성 거대 리간드로는 열을 가해 비활성화된 *Sarcharomyces cerevisiae* 세포를 사용하였다. 전 공정을 통한 순도는 약 70% 정도였다.

Adamski-Medda 등[13]은 dextran-p-aminobenzamidine을 이용하여 트립신과 키모트립신(chymotrypsin)을 분리하였으며, 순도가 약 76%인 트립신이 회수되었다. Choe 등[14]은 dextran에 soybean trypsin 억제제를 결합시켜 트립신과 키모트립신을 회분공정으로 분리하였으며 유입 트립신의 55%를 순도 81%로 회수하였다. 앞의 두 실험에서 볼 수 있듯이 dextran-inhibitor complex는 트립신 정제시 트립신과 특이적으로 결합하지 못함을 알 수 있다. Power 등[15, 16]은 단일층 리포솜에 각각 biotin과 PAB(p-aminobenzamidine)를 리간드로 결합시켜 avidin과 트립신을 분리하였다. 회수된 트립신의 수율은 68%이고 순도는 98%였다. Luong 등[17-21]은 polyacrylamide에 m-aminobenzamidine을 결합시킨 친화성 고분자를 이용하여 트립신과 urokinase를 연속적으로 분리하였다. 수율은 트립신과 urokinase가 각각 90% 및 86%이며 트립신의 순도는

98%였다.

일반적으로 친화성 정제공정은 특정한 리간드가 결합된 모체(matrix)를 이용하여 물질을 분리한다. 트립신을 분리하는 경우 모체에 트립신 억제제(trypsin inhibitor)를 결합시켜 트립신과 모체와의 선택적인 결합이 일어나도록 한다. 이때 트립신과 선택적으로 결합하는 억제제가 생체에서 추출된 것일 경우, 단백질과 같은 성질을 갖고 있어 변성(denaturation)되기 쉽다. 이 친화성 고분자를 이용하면 단백질 소화 혼합물에서 트립신을 제거하여 반응을 중단시킬 수 있다. 또한 트립신은 정제 및 보관시 자소화(autodigestion) 경향이 있기 때문에 간단하고 빠른 정제방법이 필요하다.

따라서 본연구에서는 모델 단백질로서 분자량이 유사한 트립신(trypsin)과 키모트립신(chymotrypsin)을 사용하였으며, 이 두 단백질을 혼합한 용액에서 트립신을 선택적으로 분리하고자 합성된 트립신 억제제인 아미노벤자미딘기(aminobenzamidine group)를 포함하는 고분자를 제조하였다. 이 실험에 사용한 막은 실험실적 제조가 용이하고 현재 상용화되어있는 셀룰로오스 아세테이트(cellulose acetate, CA)로 제조하였다. 트립신 분리시 트립신의 자소화를 줄일 수 있는 분리 최적조건에서 트립신-친화성 고분자 복합물의 분리 및 트립신을 농축하고자 분리 목적에 맞게 세공크기를 조절하여 제조한 셀룰로오스 아세테이트 한외여과막 선정과 선정된 막을 분리에 적용하는 것이 본 연구의 목적이다.

## 2. 실험 장치 및 방법

### 2.1. 사용 시약

Trypsin(type II, from bovine pancreas),  $\alpha$ -chymotrypsin(type I-S, from bovine pancreas), m-aminobenzamidine, dimethyl sulfoxide(DMSO), N-benzoyl-L-arginine ethyl ester(BAEE), N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester(BTEE), N-benzoyl-L-arginine p-nitroanilide(L-BAPNA), tris buffer, acryloylchloride, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine(TEMED)는 Sigma사 제품을 사용하였고, 분리막 제조에 사용한 셀룰로오스 아세테이트(cellulose acetate, CA)는 아세틸 함유량이 39.8%인 Eastman Kodak사 제품을 사용하였다. 아크릴 아마이드(acrylamide), 과염소산 마그네슘(magnesium per-

chlorate), 과황산 암모늄(ammonium persulfate), 아세트산 나트륨(sodium acetate), 아세톤(acetone)과 에탄올(ethanol) 등은 일급시약을 사용하였다.

### 2.2. 한외 여과막의 제조

고분자 용액의 조성 및 분리막 제조방법을 Table 1에 나타냈다. 고분자 용액은 마개가 있는 유리병에 넣고 밀봉하여 상온, 상압에서 24시간 이상 교반시킨다. 완전히 용해된 용액은 5°C로 보관한다. 준비된 고분자 용액을 유리판 위에 붓고 유리막대를 이용하여 5초 이내에 얇게 편다. 얇게 편 분리막을 공기중에 60초간 방치하여 용매인 아세톤을 증발시킨 후, 에탄올-증류수 용액에 넣어 1시간 동안 겔화(gelation)시킨다. 겔화 매질의 에탄올 농도가 30vol.%, 40vol.% 및 50vol.%일 때 제조한 분리막을 각각 UF-30 및 UF-40 및 UF-50이라 하였다. 제조한 분리막은 실험하기에 편리한 적절한 크기로 잘라 20vol.% 에탄올 용액에 넣어 4°C 냉장고에 보관하였다[22, 23].

Table 1. Details of Cellulose Acetate Membrane Preparation

	UF Membrane
Casting solution composition, wt %	
1. Cellulose acetate(E-398-3)	17.0
2. Acetone	69.2
3. Magnesium perchlorate	1.45
4. Water	12.35
Temperature of casting solution, [°C]	
Temperature of casting atmosphere	room
Humidity of casting atmosphere	room
Solvent evaporation period, [s]	60
Ethanol/Wate volume ratio in gelation medium	30/70-50/50
Gelation period, [min]	60
Temperature of gelation emdium, [°C]	0

### 2.3. 친화성 고분자의 제조

수용성인 친화성 고분자를 제조하기 위해 사용되는 N-acryloyl-m-amino benzamidine은 acryloyl chloride와 m-aminobenzamidine으로부터 제조되었다. 반응은 0°C에서 과량(8.5g)의 아세트산 나트륨 존재 하에서 0.5g의 m-aminobenzamidine을 포함한 50ml 수용액에 1ml acryloyl chloride를 한 방울씩

간첨가하여 수행하였다. Acryloyl chloride는 30초 내에 첨가하며 반응은 30분 동안 진행시킨다. 반응 생성물은 진한 질산으로 pH 4에 맞추면 침전된다. 생성물을 뜨거운 물에서 용해시킨 후 맑은 질산을 첨가하여 재결정화한다. 고분자는 1g 아크릴 아미드를 포함하는 35ml 수용액에 N-acryloyl-m-amino-benzamidine(0.2g을 1ml dimethyl sulfoxide에 용해시킨)을 첨가하여 얻는다. 5 $\mu$ l TEMED(N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)를 첨가한 후 용액 내 산소를 제거하기 위해 질소가스로 용액을 충분히 세척(flushing)하며, 고분자중합(polymerization)은 농도가 5g/l 인 과황산 암모늄 용액 4ml를 첨가하여 시작한다. 2시간 후 결과용액을 4배 묽혀, 트립신 분리에 사용할 UF-50 분리막이 장치된 한외여과장치로 여과한다. 트립신 분리에는 단지 UF-50 분리막으로 retentate된 친화성 고분자 용액만 사용하였다. Retentate된 친화성 고분자 용액은 99vol.% 에탄올 용액에 첨가하여 침전시킨 후 침전된 친화성 고분자를 분리하여 30 $^{\circ}$ C에서 항량이 될 때까지 건조시켰다. 제조된 친화성 고분자의 분자량을 대략적으로 산출하기 위해 건조된 친화성 고분자 55mg을 100ml의 증류수에 용해시켜 Ubbelohde 점도계를 이용하여 25 $^{\circ}$ C에서의 점도를 측정하였다.

#### 2.4. 효소 분석

트립신은 Schwert와 Takenaka[24]에 의해 개발된 방법에 기초하여 분석하였다. pH 8.15인 50mM Tris, 10mM CaCl<sub>2</sub> 완충용액으로 0.5mM N-benzoyl-L-arginine ethyl ester(BAEE) 용액을 만들어 수정 큐벳(cuvette)에 3.15ml을 넣고, 50 $\mu$ l의 분석하려는 트립신 용액을 첨가한다. 2~3분간 25 $^{\circ}$ C, 254nm에서의 흡수변화율을 Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV240을 이용하여 측정하였다. 이 조건하에서 1 BAEE unit는 0.001/min의 흡수변화율을 일으키는 효소 양으로 정의된다.

키모트립신은 Hummel[25]에 의해 개발된 방법에 기초하여 분석하였다. pH 8.15인 50mM Tris, 10mM CaCl<sub>2</sub> 완충용액 1.55ml을 혼합하였을 때의 농도가 0.5mM인 N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester(BTEE) 용액이 되도록 BTEE를 취하여 1.4ml의 50% 메탄올 용액에 용해한다. 이 용액 2.95ml을 수정큐벳에 넣고, 분석하려는 키모트립신용액의 일부인 50 $\mu$ l를 첨가한다. 25 $^{\circ}$ C, 256nm에서의 흡수변화율을 Shim-

adzu UV-visible spectrophotometer UV240으로 측정하여 BTEE의 가수분해 속도를 결정한다. 이러한 조건하에서 1 BTEE unit는 0.001/min의 흡수변화율을 일으키는 효소의 양으로 정의된다.

Erlanger 등[26]에 의해 개발된 방법에 기초한 트립신 억제 반응(trypsin inhibition kinetics)은 발색 기질(chromogenic substrate)인 L-BAPNA를 이용하여 연구되었다. 미리 정해진 양의 억제제(inhibitor, pH 8.15인 50mM Tris 완충용액에 용해된 m-aminobenzamidine), 기질(substrate, 10mM DMSO용액에 용해된 L-BAPNA) 및 트립신을 큐벳에 가하고, 총 부피가 3ml가 되도록 적정량의 pH 8.15인 50mM Tris, 10mM CaCl<sub>2</sub> 완충용액과 섞는다. 트립신을 가한 후 활성도는 Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV240을 이용하여 410nm에서 3분 이상 측정하였다.

#### 2.5. 실험 장치

막 분리 여과 장치(cell)는 TOYO Roshi UHP43을 사용하였으며, Fig. 1에 나타내었다. 여과장치 내의 압력은 질소가스로 조절하였으며, 용액의 농도 분극(concentration polarization)현상을 억제하기 위하여 여과장치 내의 분리막 상부에서 자석젓개를 이용하여 용액을 교반시켜 주었다. 용액이 통과하는 분리막의 유효투과 면적은 10.5cm<sup>2</sup>였으며, 냉각장치의 냉

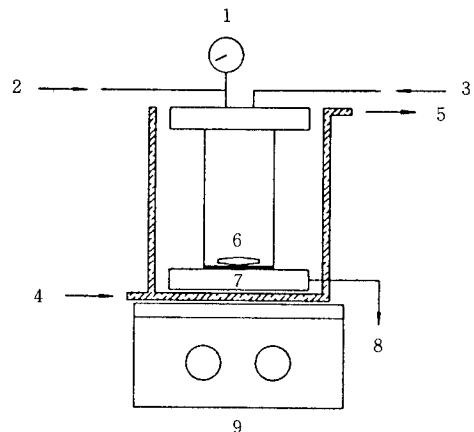


Fig. 1. Schematic diagram of the membrane cell.

- |                             |                     |
|-----------------------------|---------------------|
| 1. Pressure gage            | 6. Stirrer bar      |
| 2. N <sub>2</sub> gas inlet | 7. Membrane         |
| 3. Feed inlet               | 8. Permeate         |
| 4. Coolant inlet            | 9. Magnetic stirrer |
| 5. Coolant outlet           |                     |

매로는 isopropyl alcohol(IPA)를 사용하여 cell의 온도를 4℃로 유지하였다.

**2. 6. 트립신-키모트립신 및 친화성 고분자 혼합용액의 제조**

트립신과 키모트립신의 모델용액에 친화성 고분자 용액을 첨가하였다. 트립신용액과 키모트립신 용액은 pH 8.15인 50mM Tris, 10mM CaCl<sub>2</sub> 완충용액 200ml에 각각 20mg의 효소를 용해시켜 제조하였다. 제조한 용액을 각각 25ml씩 취하여 혼합하였으며, 이 용액에 친화성 고분자 5ml를 혼합한 후 4℃에서 5시간 동안 숙성하였다. 숙성이 끝난 용액은 UF-50 분리막을 이용하여 TOYO Roshi UHP-43 막 분리장치로 여과하였으며, 1차 여과 후 농축된 용액에 다시 새로운 완충용액 50ml로 희석하여 2차 여과를 하였다. 연속해서 같은 방법으로 3차 여과를 수행하였다. 이때 분리장치 내 적용압력은 15psig였으며 온도는 4℃로 유지하였다.

**3. 실험 결과 및 고찰**

**3. 1. 배제계수**

막 분리 공정에 있어서 배제(rejection)는 유입류에서 제거되는 용질의 양을 의미한다. 따라서 배제계수는 어떤 농도의 유입류에 대한 막을 통해 빠져나가지 못하는 용질 양의 비로 정의되며, 다음과 같이 표현한다.

$$\text{배제계수} = \frac{C_f - C_p}{C_f} = 1 - \frac{C_p}{C_f}$$

여기서, C<sub>p</sub> : permeate에서 용질의 농도  
C<sub>f</sub> : feed에서 용질의 농도

**3. 2. 효소 활성도**

트립신은 자소화(autodigestion) 경향이 있기 때문에 이를 방지하기 위하여 트리스 완충용액(tris buffer)에 염화칼슘(CaCl<sub>2</sub>)의 농도가 10mM이 되도록 첨가하였다. Fig. 2는 4℃에서 각각 염화칼슘을 첨가하지 않은 트리스 완충용액과 염화칼슘을 첨가한 트리스 완충용액에 트립신을 보관하였을 때의 시간에 따른 효소 활성도 변화를 나타낸 것이다. 염화칼슘을 첨가하지 않은 경우 효소 활성도가 초기에 급격히 감소하는 반면, 염화칼슘을 첨가한 경우 초기 효소활

성도의 90%가 150시간 이상 유지됨이 관찰되었다. 온도 또한 효소 활성도 변화에 영향을 미치는 중요한 인자이다. 염화칼슘을 첨가한 트리스 완충용액에 트립신을 첨가한 후 4℃ 및 25℃에서 보관하였을 때 시간에 따른 효소 활성도 변화를 측정된 결과, 25℃에서 보관한 경우 150시간 경과 후 초기 효소활성도의 약 50% 정도 감소하였으나 4℃에서 보관한 용액인 경우에는 150시간 경과 후에도 활성도가 계속 유지됨을 알 수 있었다. 따라서 본 실험은 트리스 완충용액에 10mM의 염화칼슘을 첨가하여 사용하였으며, 실험장치의 온도를 4℃로 유지하여 시간에 따른 효소의 활성도 저하를 억제한 상태에서 실시하였다. Fig. 3은 50mM tris, 10mM CaCl<sub>2</sub> 완충용액에 친화성 고분자와 트립신을 함께 첨가하였을 때의 시간에 따른 트립신 활성도 변화를 측정된 결과이다. 친화성

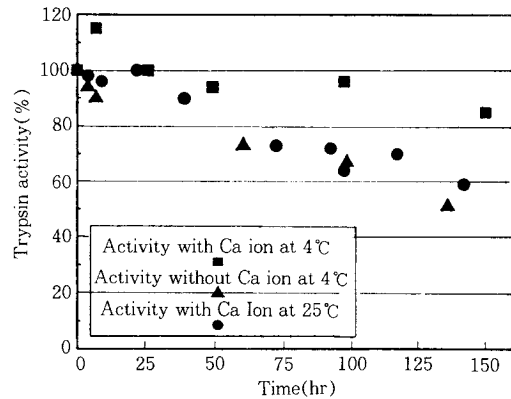


Fig. 2. Effect of Ca ion and temperature on trypsin activity.

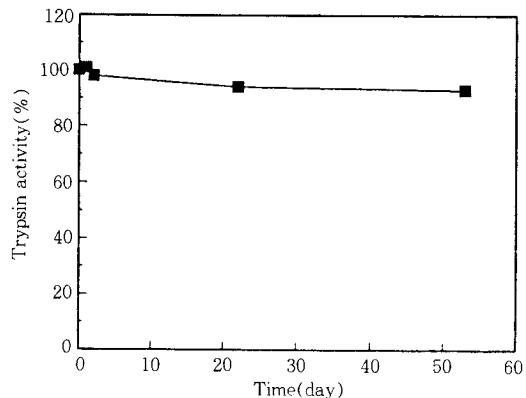


Fig. 3. Persistency of trypsin activity in the presence of affinity polymer (T=4℃, Conc. of trypsin = 100mg/ℓ, 50mm tris, 10mm CaCl<sub>2</sub>).

고분자에 흡착된 트립신은 약 50일이 경과한 후에도 초기 활성도에 약 90% 이상 유지됨이 관찰되었다. 그러므로 제조된 친화성 고분자와 트립신 복합물은 대단히 안정함을 알 수 있다.

3.3. 분리막 선택

단순한 막분리 공정만으로는 분자량이 24,000 정도로 비슷한 트립신 및 키모트립신의 혼합용액에서 어느 한 물질만을 분리하는 것이 어렵다. 그러므로 사용된 한외여과 고분자 분리막은 다음의 두 가지 유가식(fed-batch) 공정에서 서로 다른 목적을 만족시키기 위해 제조되었다. 첫번째 공정은 평균분자량이 10<sup>5</sup> 이상인 친화성 고분자와 결합된 단백질을 다른 불순물로부터 분리한 후, 고분자-단백질 착물로부터 적당한 완충용액을 사용하여 단백질을 분리하는 공정이다. 따라서 사용되는 분리막은 친화성 고분자와 결합된 단백질 복합체를 제외한 단백질 및 다른 불순물들을 통과시키기에 충분한 기공크기를 가져야 한다. 즉, 본 실험에서 이용하고자하는 이상적인 분리막은 친화성 고분자에 대한 배제계수가 1이며, 단백질 및 다른 불순물에 대한 배제계수는 0이어야 한다. 두번째 분리막공정의 목적은 단백질 탈착 후 원하는 단백질과 탈착시 사용했던 완충용액을 분리하는 것이다. 이러한 기능을 만족시키는 분리막을 제조하기 위해 겔화 매질(gelation medium)의 조성이 각각 30%(UF-30), 40%(UF-40) 및 50%(UF-50)인 에탄올 용액을 사용하여 막의 기공 크기를 조절하였다.

Fig. 4에는 제조한 각각의 분리막을 이용하여 증류수 투과실험 수행 및 분리하고자 하는 두 단백질 중 트립신 투과율 실험을 수행하여 그 결과를 나타냈다. 사용한 고분자 막의 두께는 130 $\mu$ m였고, 적용압력은 15psig였다. 또한, 트립신용액은 1 $l$ 의 50mM tris, 10mM CaCl<sub>2</sub> 완충용액에 100mg의 트립신을 첨가하여 제조하였으며, 여과장치의 온도는 4 $^{\circ}$ C로 유지하였다. 증류수의 투과유속은 전공정에서 거의 일정하게 유지되었으며, 트립신 투과유속은 초기용액 부피의 10%가 투과할 동안의 투과유속을 평균한 값이다. 그 결과 고분자막 제조시 겔화매질의 에탄올농도가 50%에서 30%로 감소할수록 증류수 및 트립신 용액의 투과율이 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 일반적으로 같은 겔화조건에서 겔화매질 내의 에탄올 농도가 높을수록 기공의 크기도 증가한다는 보고

와 일치하는 것이다[23, 27].

Fig. 5는 제조된 분리막의 트립신 배제계수를 나타냈다. UF-30인 경우 0.95~1, UF-40인 경우 0.05~0.1 정도, UF-50인 경우 0~0.05 정도이었다. 이는 UF-40, 50 두 분리막으로는 트립신을 분리할 수 없음을, 트립신의 분리로는 UF-30막이 제조된 막 중에서는 최적임을 의미한다.

실제 retentate 용액과 permeate 용액에서의 트립신 활성도를 측정함으로써 농축 여부 판단이 가능하겠다. UF-40인 경우 retentate용액 및 permeate용액에서의 트립신 활성도가 거의 일정하게 유지되었으며 두 용액간의 트립신 활성도의 차가 약간 존재

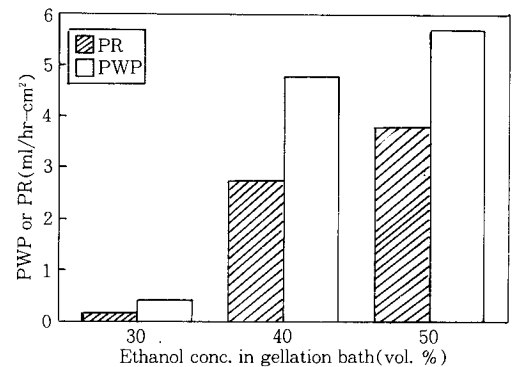


Fig. 4. The pure water permeability(PWP) and trypsin permeation rate(PR) of UF-membranes (P=15psig, T of PWP=25 $^{\circ}$ C, T of PR=4 $^{\circ}$ C, Conc. of trypsin=100mg/l, 50mm tris, 10mm CaCl).

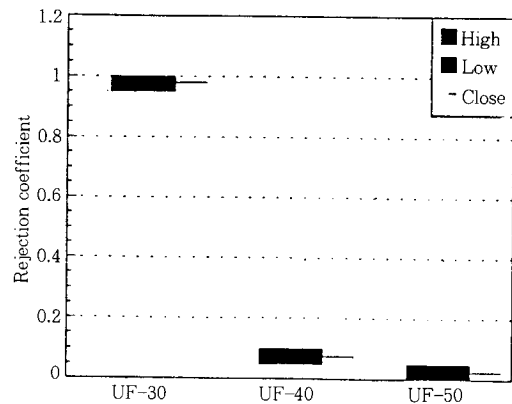


Fig. 5. UF-membrane performance data for trypsin separation.

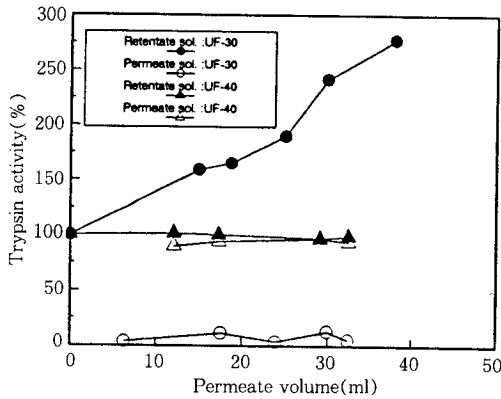


Fig. 6. Trypsin activity (%) in retentate and permeate solution through UF-membranes (P=15psing, T=4°C)

하였다. 그리고 UF-50인 경우에는 결과를 그림에 나타내지는 않았지만 두 용액간의 활성도 차는 거의 없었다. 한편 UF-30 분리막을 이용한 트립신 정제 시 UF-40, 50 분리막과는 달리, retentate 용액에서의 트립신 활성도는 급격하게 증가한 반면, permeate 용액에서의 트립신 활성도는 거의 무시할 정도의 수치로 낮게 일정하게 유지됨을 알 수 있었다. 이 결과는 UF-30 분리막을 이용하여 트립신 정도 크기의 물질을 분리할 수 있음을 의미한다. 결과를 Fig. 6에 나타냈다. 위의 실험은 모두 4°C에서 수행하였으며, 트립신 용액의 농도는 100mg trypsin/1ℓ 50mM tris, 10mM CaCl<sub>2</sub>였다.

투과막 선택을 위한 실험으로부터 트립신-키모트립신-친화성 고분자 혼합물에서 트립신-친화성 고분자 착물의 분리공정과 트립신-친화성 고분자착물에서 트립신을 분리하는 공정에 트립신이 통과되며 투과유속이 큰 UF-50 분리막이 최적임을 알 수 있었다. 또한, 트립신의 탈착시 사용하였던 완충용액과 트립신의 분리에는 거의 모든 트립신이 배제되는 UF-30 분리막이 사용 가능함을 알 수 있었다.

### 3. 4. 트립신-키모트립신 혼합용액에서 트립신의 선택적 분리

트립신-키모트립신-친화성 고분자 혼합용액을 UF-50 분리막으로 여과한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 분리 초기에 UF-50 분리막을 사용하여 트립신 및 키모트립신을 분리하였음에도 불구하고 트립신은

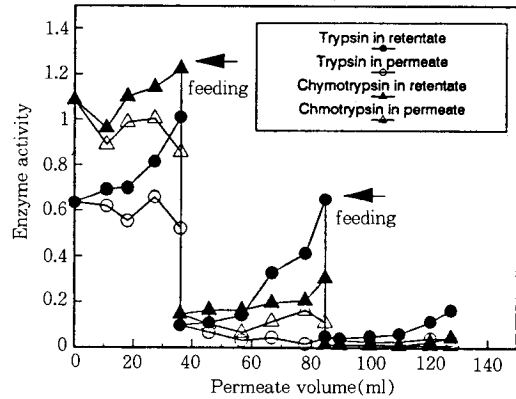


Fig. 7. Activity change of trypsin and chymotrypsin in retentate and permeate solution during intermittent feeding fed-batch ultrafiltration (P=15psing, T=4°C, UF-50, Vol. of buffer solution=50ml/each feeding)

retentate 용액에서 계속 농축된 반면, 키모트립신 활성도는 공정을 통해 거의 일정하게 유지되었다. Permeate 용액에서 키모트립신 및 트립신의 활성도가 계속 나타났으며, 이는 트립신 중 친화성 고분자에 결합되지 않은 일부와 키모트립신이 분리막을 통과하기 때문이라고 사료된다. 1차 여과 시 트립신의 순도는 약 58%였다. 1차 여과 후 retentate 용액에 50ml의 50mM tris 10mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여 같은 방법으로 2회에 걸쳐 여과한 결과, 2차 및 3차 여과에서도 1차 여과시와 마찬가지로 retentate 용액에서의 트립신 농도는 급격히 증가하였으나 키모트립신의 농도는 거의 일정하게 유지되었다. 트립신의 순도는 2차 여과시 78%였으며, 3차 여과시 순도는 86%로 증가하는 경향을 보였다. 분리된 트립신-친화성 고분자 혼합용액에 50mM arginine이나 2M KCl과 같은 용출 완충용액(elution buffer)을 첨가하여 친화성 고분자로부터 트립신을 탈착시켰으며, UF-50 막을 통과한 트립신-용출 완충용액 혼합물은 트립신에 대한 배제계수가 1에 근사했던 UF-30 막을 이용하여 트립신을 분리, 농축할 수 있었다.

## 4. 결 론

트립신은 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하였을 때와 4°C에서 보관하였을 때 활성도를 오래 유지하였다. 그리고 친화성

고분자와 결합한 트립신의 활성도는 약 50일 후에도 90% 이상 안정적으로 유지되었다.

제조된 셀룰로오스 아세테이트 분리막은 겔화매질의 에탄올 농도가 증가할수록 순수 투과율이 증가하는 경향을 나타내었으며, UF-50 분리막의 트립신 배제계수는 0~0.05 정도였다. 따라서 트립신-키모 트립신 혼합물에서 친화성 고분자 물질을 사용하여 트립신을 선택적으로 분리하기 위하여 UF-50 분리막이 사용되었으며, 트립신의 탈착시 사용하였던 완충용액과 트립신의 분리에는 거의 모든 트립신이 배제되는 UF-30 분리막이 이용되었다.

친화성 고분자 수율은 77%였으며, m-aminobenzamidine을 포함한 친화성 고분자용액과 CA막이 복합된 시스템에서 순도가 86%인 트립신을 얻을 수 있었다.

### 참고 문헌

1. J. Haggin, *C & EN*, **66**, 25(1988).
2. H. Strathmann, *Trend in Biotechnol.*, **3**, 112 (1985).
3. H. K. Lonsdale, *J. Mem. Sci.*, **10**, 81(1982).
4. J. Haggin, *C & EN*, **66**, 7(1988).
5. L. E. Applegate, *Chemical Engineering*, **91**, 64 (1984).
6. R. K. Scopes, in "Protein Purification-Principle and Practice", 100, Springer-Verlag, New York (1987).
7. P. Mohr and K. Pommerening, in "Affinity Chromatography; Practical and Theoretical Aspect", Chap. 2, Marcel Dekker, New York (1985).
8. S. Hjerten, *Arch. Biochem. Biophys.*, **99**, 466 (1962).
9. R. Axen and S. Ernback, *Eur. J. Biochem*, **18**, 351(1971).
10. N. C. Robinson, R. W. Tye, H. Neurath, and K. A. Walsh, *Biochemistry*, **10**, 2743(1971).
11. J. Turkova and A. Seifertova, *J. Chromatog.*, **148**, 293(1978).
12. B. Mattiasson and M. Ramstorp, *J. Chromatog.*, **283**, 323(1984).
13. D. Adamski-Medda, Q. T. Nguyen, and E. Dellacherie, *J. Mem. Sci.*, **9**, 337(1981).
14. T. P. Choe, P. Masse, and A. Verdier, *Biotech. Letters*, **8**, 163(1986).
15. J. D. Power, P. K. Kilpatrick, and R. G. Carbonell, *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 173(1989).
16. J. D. Power, P. K. Kilpatrick, and R. G. Carbonell, *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 506(1990).
17. J. H. T. Luong, A. L. Nguyen, and K. B. Male, *Bio/Technology*, **5**, 564(1987).
18. J. H. T. Luong, A. L. Nguyen, and K. B. Male, *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 439(1988).
19. J. H. T. Luong, A. L. Nguyen, and K. B. Male, *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 516(1988).
20. J. H. T. Luong, A. L. Nguyen, and K. B. Male, *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 451(1988).
21. J. H. T. Luong, A. L. Nguyen, and K. B. Male, *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 87(1990).
22. L. Pageau and S. Sourirajan, *J. Appl. Polym. Sci.*, **16**, 3185(1972).
23. Y. S. Jeong, W. R. Vieth, and T. Matsuura, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **28**, 231(1989).
24. G. W. Schwert and Y. Takenaka, *Biochim. Biophys. Acta.*, **16**, 570(1955).
25. B. C. Hummel, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 1393(1959).
26. B. F. Erlanger, N. Kokowsky, and W. Cohen, *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 271 (1961).
27. R. E. Kesting, in "Synthetic Polymeric Membranes", Chap. 7, John Wiley & Sons, New York (1985).