

## 축방향과 반경방향흐름 크로마토그래피의 단백질 분리속도와 분리능에 대한 비교

김 윤 하 · †이 은 규  
한양대학교 화학공학과

### Comparison of Axial and Radial Flow Chromatography on Protein Separation Speed and Resolution

Yun-Ha Kim, Eun-Kyu Lee<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering Hanyang University, Ansan 425-791, Korea

#### ABSTRACT

The relationship between pressure drop and liquid flow rate, for an axial and a radial flow chromatographic column packed with compressible porous media was theoretically analyzed using modified Kozeny-Carman equation. The results were compared with experimental observations obtained using compressible DEAE-agarose as a model medium. At 2-9 psi range studied, the theoretical derivation accounting for 'gel compression' effect predicted simple Langmuirian type response of volumetric flow rate to changes in pressure drop. On the other hand, the experimental response was more or less sigmoidal. At the same pressure drop, radial column showed 2-3 times higher flow rates than those of axial column both theoretically and experimentally. Using r-HBsAg crude extract, protein resolution effects between the two types of columns at different flow rates were compared side-by-side. It turned out that, though general chromatographic behavior was very similar, axial column was somewhat superior in terms of r-HBsAg recovery yield and specificity. However, the number of theoretical plates analysis indicated the protein resolution effects were comparable.

#### 서 론

최근의 연이은 생물공학제품의 시장진입은 단백질 등 고가의 생물학적 제품을 보다 높은 순도와 수율로써 대규모적이고 경제적인 방법으로 분리정제하는 기술개발을 필요로 하고 있다. 다른 생물분리공정에 비해 액체 크로마토그래피공정은 높은 정제율 (purification factor)을 얻을 수 있기 때문에 생물분리공

정에 광범위하게 적용되고 있고, 이 공정에 대한 새로운 분리기술개발, 기존기술향상, scale-up기술개발 등에 대한 꾸준한 연구가 진행되고 있다(1). 그러나 분석용 크로마토그래피 결과를 직접 생산공정용 크로마토그래피로 scale-up시키는 것은 비효율적일 뿐 아니라 종종 순도와 수율의 급격한 저하를 동반한다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 충전제의 biospecificity를 개량하여 분리능(resolution)을 향상시키는 방법, 충전제의 입자크기를 3~5 $\mu$ m수준으로 줄임으로써 분리용량(capacity)을 증가시키고

<sup>†</sup> Corresponding Author

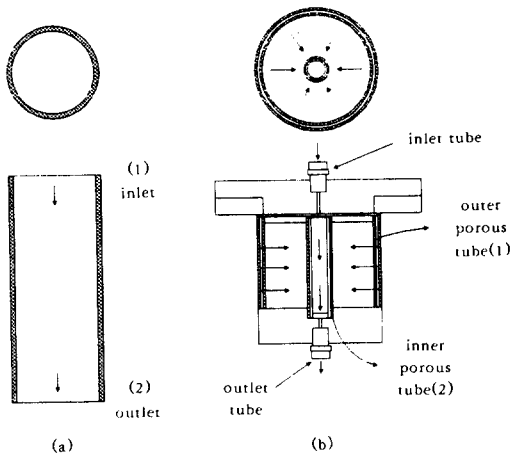


Fig. 1. Top and Plan Views of (a) Axial and (b) Radial Columns.

또한 입자내부 확산속도를 증가시키는 방법, 충전제 내에 비교적 큰 직경을 가진 'throughpore'와 작은 직경의 'diffusive pore'를 동시에 마련하여 상당히 높은 유속에서도 분리능과 분리용량을 유지시키는 perfusion chromatography 방법 (2) 등이 연구되어 왔다.

흔히 크로마토그래피공정의 평가분석에 분리능, 분리용량, 분리속도 (throughput)의 서로 상충되는 세 가지 척도를 사용한다. 위에 열거한 여러 방법들은 주로 분리능과 분리용량을 향상시키는데 초점을 맞추는 접근방법이다. 분리속도 또는 throughput 역시 중요한 척도이다. 특히 최소체재시간에 제한받는 크로마토그래피 (예를 들어 gel permeation chromatography)가 아니고 용질과 충전제의 상호작용이 비교적 빠른 이온교환이나 친화성크로마토그래피의 경우에는 생산공정규모에서 높은 throughput을 얻는 것은 동시에 공정순환시간을 축소시키는 효과를 가져오므로 공정경제성을 높이는 데 있어 매우 중요한 역할을 한다.

전형적인 칼럼설계는 작은 직경과 긴 길이의 원통형으로 이동상의 유체가 축방향으로 흐르는 축방향 칼럼이다. 이러한 칼럼형상은, 특히 규모가 커지는 경우, back pressure가 높아지면서 젤압축 (gel compression)현상에 의해 급격한 유속감소를 초래한다. 유속이 낮아지면서 체재시간이 길어짐에 따라 non-specific binding같은 부작용도 종종 초래되어 scale-up의 문제점으로 대두되어 왔다. 수년전 개발되어 성공적으로 사용되어 온 반경방향흐름 크로마

토그래피 칼럼 (radial flow chromatography column)은 유체흐름을 반경방향으로 유도하여 흐름의 단면적을 현저히 증가시키고 따라서 충전길이 (bed height)를 감소시킴으로써 압축성이 높은 soft gel의 경우에도 젤압축현상을 극소화하여 높은 유속을 얻을 수 있게끔 설계되었다 (3). 이같은 칼럼을 이용한 trypsin (4), anti-melanoma IgG<sub>2</sub>A antibody, riboflavin (5), egg white protein (6) 등의 성공적인 분리정제가 발표되었다.

본 연구에서는 반경방향 칼럼에서의 분리속도증가 효과를 유체역학적으로 설명할 수 있는 근거를 제시하기 위하여 축방향과 반경방향 칼럼내의 유체이동 현상을 유체의 압력강하와 유속, 즉 분리속도와와의 상관관계에 초점을 맞추어 유체역학적으로 고찰 비교하고 그 결과를 압축성 충전제를 이용하여 얻은 실험치와 비교하여 보았다. 또 축방향과 반경방향 칼럼의 단백질 분리능을 동일한 조건에서의 실험을 통하여 비교하였고 이 결과를 이론단수 분석을 통해 해석해 보았다.

### 크로마토그래피에서 유속과 압력강하에 대한 이론적 고찰

Fig 1은 축방향과 반경방향 칼럼내의 유체이동을 도시한 평면도와 입면도이다. 축방향흐름 칼럼 (Fig 1(a))에서의 유체는 펌프에 의해 칼럼입구에 가해진 압력에 의해 일정한 단면적의 충전제를 통과해 압력강하를 수반하며 출구로 빠져나온다. 반면 반경방향 흐름 칼럼에서의 유체는 펌프에 의해 칼럼중앙에 위치한 inlet tube로 이송된 후 flow distributor를 통해 annulus에 충전된 충전제의 바깥부분에 위치한 outer porous tube로부터 안쪽에 위치한 inner porous tube방향으로 이동하며, 유체이동에 따라 흐름 단면적 (flow cross-sectional area)이 변함을 알 수 있다. 따라서 반경방향흐름 칼럼은 축방향칼럼과 비교해서 흐름 단면적이 매우 높고 상대적으로 충전길이 작기 때문에 충전제 압축, 압력강하 등의 부작용을 최소화하여 보다 높은 유속을 얻을 수 있다.

마찰력을 포함하는 유체이동에 있어 기계적에너지 보존에 대한 Bernoulli식은 아래 식(1)로 표현할 수 있다.

$$\frac{P_1}{\rho} + \frac{v_1^2}{2g_c} + \frac{g}{g_c}z_1 = \frac{P_2}{\rho} + \frac{v_2^2}{2g_c}z_2 + F \quad (1)$$

여기서 P는 압력, ρ는 유체의 밀도, v는 유체의

선형속도 (linear velocity),  $g_c$ 는 환산인자,  $g$ 는 중력 가속도,  $z$ 는 높이,  $F$ 는 마찰에 의한 저항력을 나타낸다. 또한 첨자 1,2는 각각 칼럼입구와 출구를 나타낸다. 축방향 칼럼에서 입구와 출구의 흐름 단면적이 같으므로 중력효과를 무시하면 저항력,  $F$ 는 식(2)로 표현될 수 있다.

$$\frac{\Delta P}{\rho} = -F \tag{2}$$

반경방향 칼럼에서의 저항력,  $F$ 는 중력효과를 무시하면 식(3)으로 표현된다.

$$\frac{\Delta P}{\rho} + \frac{\Delta v^2}{2g_c} = -F \tag{3}$$

비압축성 고체 충전제가 충전된 칼럼을 통과하는 비압축성 유체흐름의 마찰인자(friction factor)는 Ergun 상관관계식으로 표현할 수 있다(7).

$$f = \frac{150(1-\epsilon)}{Re} + 1.75 \tag{4}$$

따라서, 비압축성 다공성 고체 충전제가 충전된 칼럼을 통과하는 비압축성 유체흐름의 마찰인자(friction factor),  $f_{PM}$ 과 Reynolds number,  $Re_{PM}$ 은 식(5),(6)으로 표현할 수 있다.

$$f_{PM} = \frac{150}{Re_{PM}} + 1.75 \tag{5}$$

$$Re_{PM} = \frac{D_p V_s \rho}{\mu(1-\epsilon)} \tag{6}$$

여기서  $D_p$ 는 충전제의 입자직경이고,  $v_s$ 는 superficial velocity,  $\rho$ 는 유체의 밀도,  $\mu$ 는 유체의 점도,  $\epsilon$ 은 충전칼럼의 공극률을 의미한다.

한편,  $f_{PM}$ 은 마찰에 의한 저항력  $F$ 와 다음의 관계식이 성립한다.

$$f_{PM} = F \cdot \frac{D_p}{L} \cdot \frac{\epsilon \cdot 3}{(1-\epsilon)} \cdot \frac{1}{V_s^2} \tag{7}$$

여기서  $L$ 은 유체흐름방향으로의 충전제의 충전길이 이를 의미한다.

식(5),(6),(7)으로부터 다음의 Erugun 식이 유도된다.

$$F = 1.75 \cdot \frac{V_s^2}{D_p} \cdot \frac{(1-\epsilon)L}{\epsilon^3} + 150 \cdot \frac{V_s \mu (1-\epsilon)^2 L}{D_p^2 \epsilon^3 \rho} \tag{8}$$

층류흐름인 경우 식(8) 우변의 첫째 항을 무시할 수 있으며, 식(2)와 식(8)에서 압력강하와 유속의 상관관계인 Kozeny-Carman식에 의해 식(9)와 같이 표현된다.

$$-\Delta P = \sim 150 \frac{L \mu (1-\epsilon)^2}{D \epsilon^3 g_c} \cdot v_s \tag{9}$$

식(9)로부터 축방향칼럼에서 전체압력강하(total pressure drop)와 부피유속(volumetric flow rate)과의 상관관계를 유추할 수 있다.

또 층류흐름인 경우 식(8) 우변의 첫째 항을 무시할 수 있으며, 식(3)과 식(8)에서 반경방향 칼럼에서의 상관관계를 구할 수 있다. 이 경우에는 입구와 출구에서의 선형속도,  $v_1$ 과  $v_2$ 는 질량보존법칙, 즉  $v_1 A_1 = v_2 A_2 = v_s A_{1,M}$ (여기서  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_{1,M}$ 는 각각 입구 단면적, 출구 단면적, 로그평균단면적을 뜻한다)에 의해  $v_s$ 의 함수로 표현될 수 있으므로 아래의 식(10)이 유도된다.

$$-\Delta P = \rho \left[ \frac{1}{2g_c} v_s^2 A_{1,M}^2 \left( \frac{1}{A_2^2} - \frac{1}{A_1^2} \right) + \frac{150 d \mu (1-\epsilon)^2}{g_c D_p^2 \epsilon^3 \rho} \cdot v_s \right] \tag{10}$$

(10) 여기서  $d$ 는 outer porous tube와 inner porous tube 사이의 거리로서, 반경방향 칼럼에서의 유체의 흐름이 반경방향이므로 충전제의 충전길이이라 할 수 있다.

Kozeny-Carman식(식(9))은 비압축성 고체 충전제에 대한 식이므로 압축성 충전제로 충전된 칼럼에서의 압력증가에 따른 충전길이와 공극률의 감소는 실험을 통해 별도로 결정하였고 (Fig. 2참조) 그 결과식을 식(9)와 (10)에 대입하고, 또 식(9)와 (10)에 해당 물성치를 대입하여 각각 축방향과 반경방향 칼럼에서의 전체압력강하와 부피유속과의 상관관계를 이론적으로 유추하였고 그 결과치를 실험치와 비교하여 보았다. 유체압력에 따라 변하는 충전길이와 공극률을 제외한 물성치 및 제원의 값을 Table 1에 정리하였고 유체의 밀도와 점도는 물의 그것들을 사용하였다.

형상비(aspect ratio)에 따른 유속과 압력강하에 대한 이론적 고찰

축방향흐름 칼럼에 있어서 칼럼 형태는 형상비(aspect ratio)로 표현된다. 형상비는 통상 다음과 같이 정의된다.

Table 1. Physical Properties and Dimensions used in Eq.(9) and (10)

$\Delta p$	: pressure drop [ $N/m^2$ ]
$\rho$	: density of fluid [ $1g/cm^3$ ]
$L$	: bed height [cm]
$v_s$	: superficial velocity [ $cm/s$ ]
$\mu$	: viscosity of fluid [ $0.01g/cm \cdot s$ ]
$\epsilon$	: porosity [-]
$g_c$	: conversion factor [ $9.80665kg \cdot m/kg \cdot s^2$ ]
$A_{1,M}$	: log mean of cross-sectional area [ $cm^2$ ]
$A_1$	: cross-sectional area of inlet [ $cm^2$ ]
$A_2$	: cross-sectional area of outlet [ $cm^2$ ]
$D_p$	: particle diameter [ $10^{-3}cm$ ]

$$AR = L/D \quad (11)$$

여기서, L은 칼럼의 충전길이, D는 칼럼의 내경을 의미한다.

축방향 칼럼에서 정의된 형상비를 반경방향 칼럼에 그대로 적용시키면, 반경방향 칼럼의 기하학적 형태를 제대로 표현할 수가 없다. 따라서, 축방향칼럼과 반경방향 칼럼에 똑같은 개념을 적용하기 위해서 새로운 형상비 (AR')를 다음과 같이 정의하였다.

$$AR' = \frac{L^2}{\left(\frac{\pi}{4}\right)D^2} \quad (\text{축방향칼럼}) \quad (12)$$

$$AR' = \frac{d^2}{\left(\frac{l_o + l_i}{2}\right)z} \quad (\text{반경방향 칼럼}) \quad (13)$$

여기서, L은 축방향칼럼의 충전길이이고, D는 축방향칼럼의 내경, d는  $(d_o - d_i)/2$ 로서  $d_o$ 는 outer porous tube 직경,  $d_i$ 는 inner porous tube 직경,  $l_o$ 는 outer porous tube의 원주길이,  $l_i$ 는 inner porous tube의 원주길이, z는 칼럼의 반경방향이나 축방향의 높이를 의미한다. 식(12)와 (13)을 보면, 새로운 형상비, AR'은 무차원수로서 축방향칼럼의 경우 기존 형상비, AR의 제곱에 비례한다. 반경방향 칼럼의 경우 AR'은 충전제길이, d의 제곱을 유체 흐름 단면적으로 나눈 것으로 AR'의 값이 증가할수록 칼럼의 반경방향으로의 충전제길이는 늘어나고 축방향의 높이는 줄어드는 것을 의미한다. 이 새로운 형상비는 형상이 전혀 다른 두 종류의 칼럼에 모두 적용가능하므로 서로 다른 형상의 칼럼들내의 압력강하와 부피유속사이의 상관관계를 동일한 조건하에서

비교할 수 있다. Table 2에 여러 형상비에 따른 축방향칼럼과 반경방향 칼럼의 제원을 나타내었다. 실험에 사용된 칼럼을 통하여 얻은 압력강하에 따른 충전길이, 공극률의 상관관계식을 다른 형상비를 가진 칼럼에 적용할 수 있는 식으로 변형시킨 후, 그 결과식과 각 형상비에 따른 칼럼의 해당 물성치를 식(9)와 (10)에 대입하여 각각 축방향과 반경방향 칼럼에서의 전체압력강하와 부피유속과의 상관관계를 이론적으로 유추하였다.

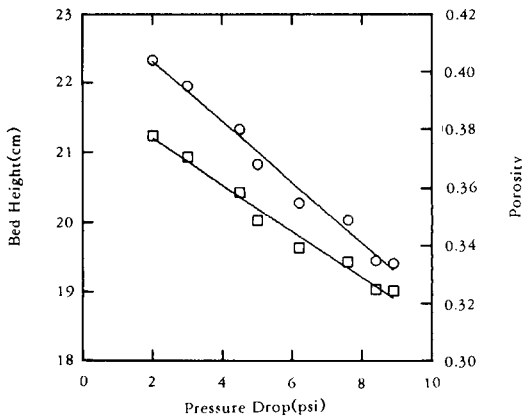
## 재료 및 방법

축방향흐름 칼럼의 내경은 2.54cm, 충전길이는 19.74cm로서 충전부피 (bed volume)는 100ml이었다. 반경방향흐름 칼럼으로는 SuperFlo™ 100 (Sepragen Corp., San Leandro, CA, USA)로서 (주)청록산업을 통하여 구입하였다. 이 칼럼은 외경 8.56cm, 내경 1.56cm, 높이 1.8cm로서 충전부피 역시 100ml이었다. 충전제로는 DEAE-agarose계통의 평균직경 100 $\mu$ m인 Toyopearl-650M™ (Tosoh Corp, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 충전칼럼의 공극률은 펌프압력을 2~9psi에서 변화시키면서 충전제를 충전시킨 후 excess liquid를 유출시킨 후 pore volume내의 유체를 고압의 공기로 purge시킨 후 purge된 액체의 부피를 측정하여 결정하였다.

분리대상 단백질로는 (주)녹십자에서 제공받은 r-HBsAg (recombinant hepatitis B surface antigen) crude extract를 사용하였다. R-HBsAg정제 공정의 하나인 음이온교환 크로마토그래피공정에 축방향흐름과 반경방향흐름 칼럼실험을 동일한 운전조건에서 side-by-side로 수행하여 r-HBsAg분리성능을 비교하였다. Toyopearl-650M™이 각각 100ml 충전된 칼럼에 crude extract를 100ml loading한 후 50mM TrisHCl 완충용액, pH8.5로 세척한 뒤 각각 0.2M NaCl과 0.5M NaCl를 함유한 완충용액들을 단계적 구배 (step gradient)로 baseline elution시켰다. 세척 및 용출시 유속을 35, 70, 140ml/min으로 변화시키며 유속변화에 따른 압력강하현상과 분리성능변화를 관찰하였다. 펌프로는 Digi-Staltic™ peristaltic pump (model 7526-00, MasterFlex Inc., Barlington, IL, USA), 용출액 검출기로는 Econo UV monitor (Bio-Rad Lab, model EM-1, Hercules, CA, USA)를 사용하여 280nm에서 흡광도를 측정하였다. 용액내 총단백질(total protein) 분석은 Bradford 및 Lowry 분석법에 의하였고,

**Table 2. Dimensions of axial and radial column with various aspect ratios.**  
( Bed volume is set constant at 100ml)

Axial column			Radial column		
Aspect Ratio	L (Bed Height)	D (Diameter of Column)	Aspect Ratio	d(=d <sub>o</sub> -d <sub>i</sub> )/2	Z (Vertical length of column)
0.11	2.24cm	7.54cm	0.03	1.42cm	7.55cm
1.65	5.48cm	4.82cm	0.11	2.24cm	3.73cm
10.0	10.0 cm	3.57cm	0.43	3.5 cm	1.8 cm
28.3	14.14cm	3.0 cm	0.89	4.47cm	1.18cm
76.9	19.74cm	2.54cm	1.65	5.48cm	0.83cm



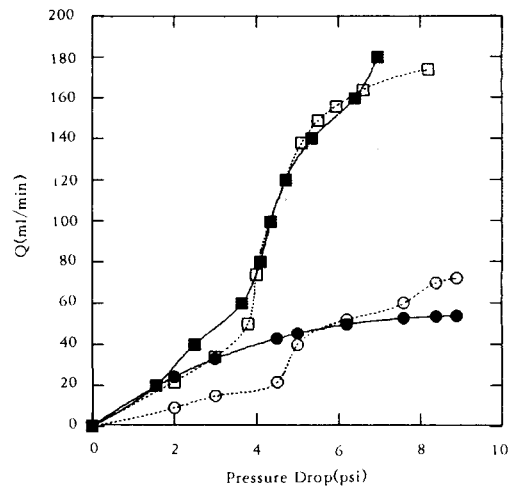
**Fig. 2. Effect of Pressure Drop on Bed Height(□) and Porosity(○).**  
(Porosity = -0.0104△P + 0.424, Bed Height = -0.3308△P + 21.9)

r-HBsAg 분석은 Sandwich ELISA 를 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**압력강하가 유속에 미치는 영향**

DEAE-agarose처럼 압축성 충전제는 칼럼에 걸리는 압력이 증가함에 따라 젤압축현상이 일어나며 이에 따라 충전길이의 감소와 젤 공극률의 감소현상을 초래한다. 본 연구에서는 이같은 현상을 정량적으로 측정하여 그 결과치를 식(9), (10)에 대입하기 위하여 펌프압력을 2에서 9psi로 변화시켜가며 각 압력에서의 충전길이와 공극률을 측정하였다. Fig. 2에 그 결과를 도시하였다. 그래프에서 보듯이 2psi에서 9psi로 압력이 증가됨에 따라 DEAE 충전길이



○ Axial(Expt) ● Axial(Theo)  
□ Radial(Expt) ■ Radial(Theo)+Expt(Empty)

**Fig. 3. Relationship Between Total Pressure Drop and Volumetric Flow rate.**

는 21.2cm에서 19.1cm로 약 10%의 수축을 보였으며, 공극률은 약 0.403에서 0.334로 약 17% 감소하였다. 압력증가에 따른 충전길이와 공극률의 감소는 모두 선형적이었고 least-square line에 의해 비교적 정확하게 (regression coefficient는 충전길이의 경우 0.9909, 공극률의 경우 0.9923) 나타낼 수 있었다. 이렇게 얻은 least-square line 관계식을 식(9)와 (10)에 대입하여 v<sub>s</sub>를 구한 후 부피유속을 계산하였다.

각 압력에서의 부피유속, Q 및 실험적으로 얻은 축방향과 반경방향 칼럼에서의 Q값을 Fig. 3에 나타내었다. 축방향 칼럼의 경우 식(9)에 의하면 Q는 △P에 정비례하나 압축성 충전제의 경우 압력증가에

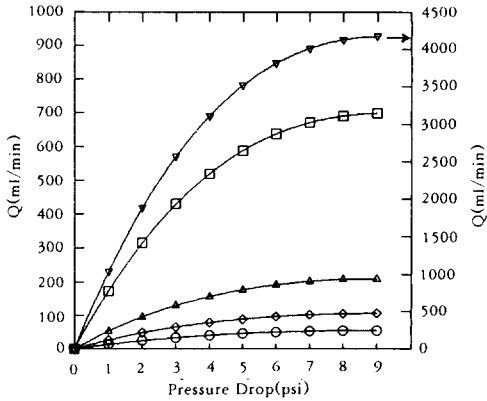


Fig. 4. Flow Rate vs. Pressure Drop in Axial columns with Various Aspect Ratios.  
 ○: AR'=76.9   ◇: AR'=28.3   △: AR'=10.0  
 □: AR'=1.65   ▽: AR'=0.11

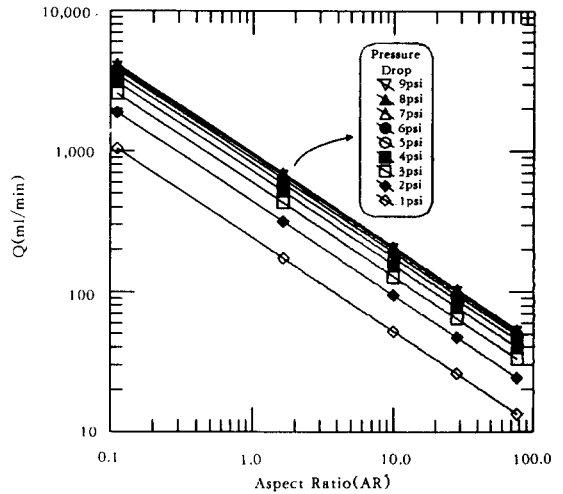


Fig. 6. Flow Rate vs. Aspect Ratio in Axial columns at Various Pressure Drops.

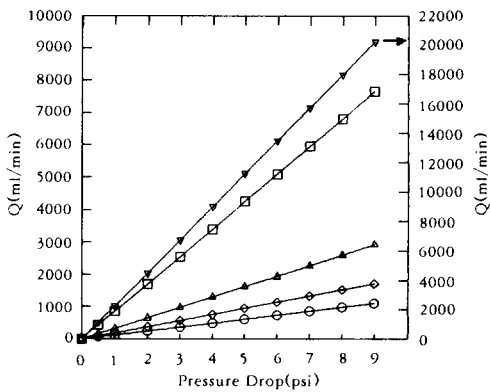


Fig. 5. Flow Rate vs. Pressure Drop in Radial columns with Various Aspect Ratios.  
 ○: AR'=1.65   ◇: AR'=0.89   △: AR'=0.43  
 □: AR'=0.11   ▽: AR'=0.03

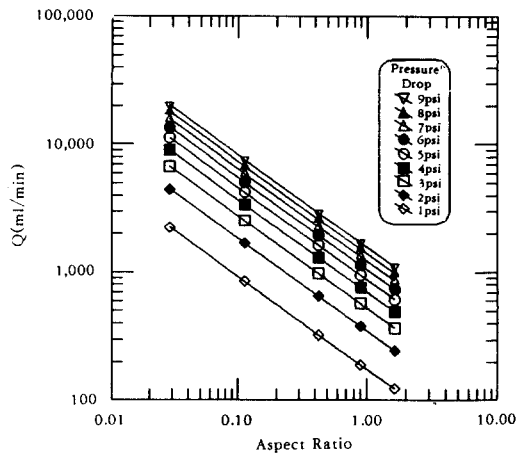


Fig. 7. Flow Rate vs. Aspect Ratio in Radial columns at Various Pressure Drops.

다른 젤압축때문에 Q의 증가속도가 감소함을 확인하였다. 약 6psi 이하에서는 이론예상치가 실험치 Q를 overestimate하였으나 약 8psi 이상에서는 실험치가 이론예상치를 초과하였다. 약 5~8psi 범위에서는 실험치와 이론예상치가 비교적 잘 일치함을 알 수 있었다. Radial 칼럼의 경우 'superficial'(또는 empty-column) 압력강하에 이론예상치 압력강하를 더한 값이 실험치와 매우 잘 일치함을 볼 수 있었다. Superficial 압력강하는 반경방향 칼럼 입출구에 설치된 20micron polyethylene filter에 의한 것으로

판명되었다. 또 같은 압력하에서는 특히 5psi 이상 범위에서는 반경방향 칼럼의 Q값이 축방향칼럼의 그것보다 2~3배 높음을 알 수 있었고 이는 Sephrose CL-4B로 충전된 100ml 부피의 축방향(4.4cm 직경×12cm 높이)과 반경방향 칼럼에서의 실험결과와 잘 일치하였다(5). 따라서 반경방향 칼럼의 장점, 즉 확대된 흐름단면적과 축소된 충전길이에 의하여 젤압축과 back pressure를 감소시킴으로써 보다 높은 유속을 얻을 수 있다는 것을 이론적 유추와 실험적 검증을 통하여 확인하였다.

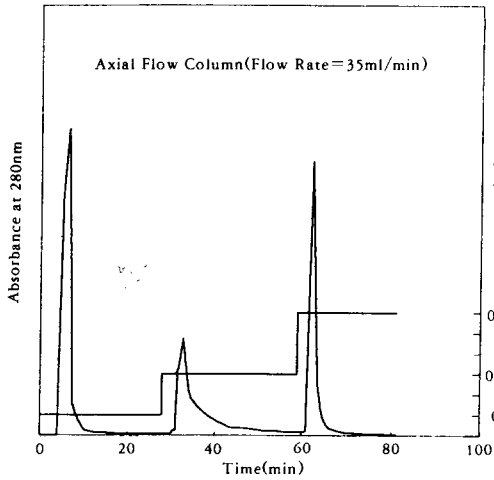


Fig. 8. Chromatogram of Axial Flow Column (Flow Rate=35ml/min).

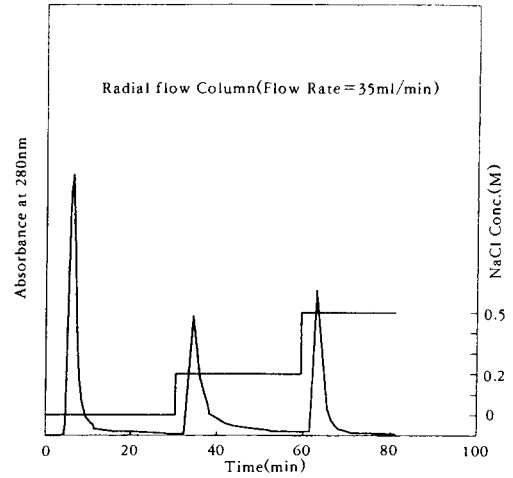


Fig. 10. Chromatogram of Radial Flow Column (Flow Rate=35ml/min).

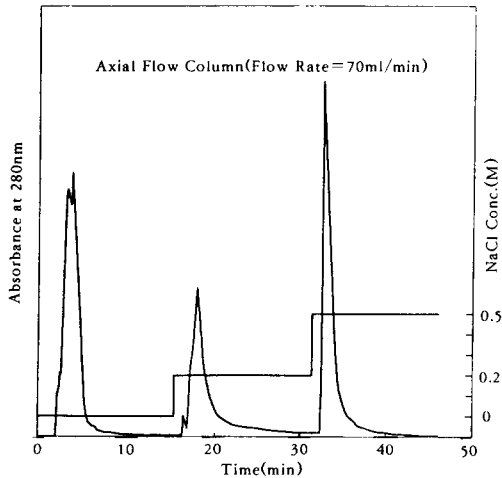


Fig. 9. Chromatogram of Axial Flow Column (Flow Rate=70ml/min).

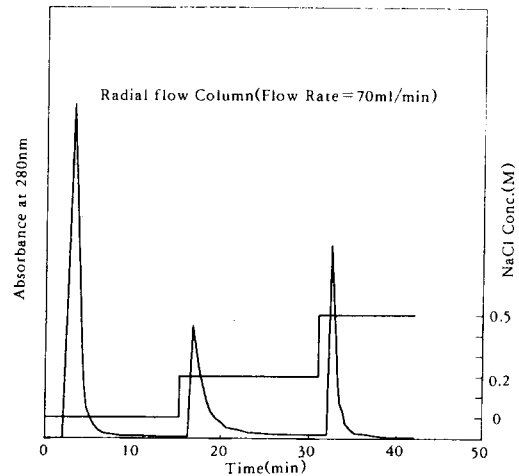


Fig. 11. Chromatogram of Radial Flow Column (Flow Rate=70ml/min).

한편, 각기 다른 형상비를 가지는 여러 칼럼에 있어서의 압력강하대 유속과의 이론적 상관관계를 축방향칼럼은 Fig. 4, 반경방향칼럼은 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 4에서 AR'이 증가한다는 것은 충전칼럼의 길이가 증가하고 내경이 감소함을 의미하고, 그래프에서 보듯이 압력강하가 증가할수록 부피유속이 증가하였고, 일정한 압력강하조건에서는 AR'이 작아질수록 부피유속은 증가함을 알 수 있었다. Fig. 5에서 AR'이 증가한다는 것은  $d = (d_o - d_i) / 2$ 가 증가하고  $z$ (칼럼의 반경방향이 아닌 축방향의 높이)

가 감소함을 의미하므로 축방향흐름칼럼의 경우에서처럼 압력강하가 증가할수록 부피유속이 증가하였고, AR'이 작아질수록 부피유속은 증가함을 알 수 있었다. Fig. 4와 Fig. 5에서 보면, 동일한 AR'에서는 거의 비슷한 Q(부피유속)를 나타냄을 알 수 있었다. 참고로, 반경방향흐름 칼럼의 경우에 있어서, AR'=0.43이 표준형인 반면, 축방향흐름 칼럼의 AR'이 0.43이면 충전길이가 3.5cm이고, 내경이 6.1cm인 칼럼이 된다. 새로운 형상비, AR'과 부피유속의 상관관계를 축방향칼럼의 경우 Fig. 6, 반경

Table 3. Recovery Yield and Specificity of r-HBsAg in Column Eluate Fractions.

Fraction	Axial				Radial					
	35(ml/min)		70(ml/min)		35(ml/min)		70(ml/min)		140(ml/min)	
	Yield (%)	Specificity (µg/mg)	Yield (%)	Specificity (µg/mg)	Yield (%)	Specificity (µg/mg)	Yield (%)	Specificity (µg/mg)	Yield (%)	Specificity (µg/mg)
Wash	3.7	*	5.3	*	4.5	*	10.6	*	15.2	*
Salt Eluate	58.2	197	62.9	242	42.7	134	55.6	180	50.5	169

\* The amount of total proteins detected was insignificant

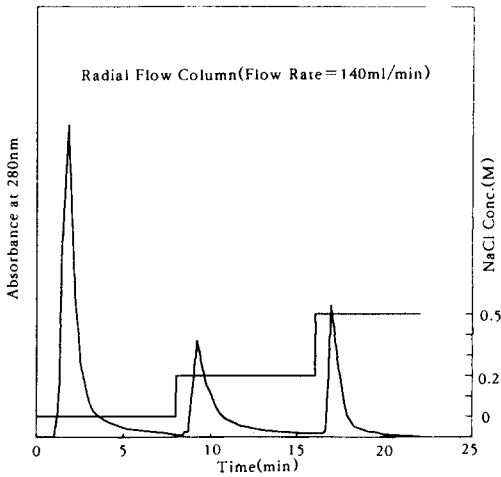


Fig. 12. Chromatogram of Radial Flow Column (Flow Rate = 140ml/min).

반향칼럼의 경우 Fig. 7에 도시하였다. 일정한 압력 강하조건에서 ln AR'과 ln Q사이에는 선형관계가 성립함을 알 수 있었고, 각각의 압력강하에서의 기울기가 거의 일치하였다. 따라서 AR'과 Q는 아래의 식으로 표현할 수 있다.

$$\ln Q = a \ln AR + b \tag{14}$$

이 같은 관계식은 반경방향칼럼에도 적용될 수 있다(Fig. 7 참조). 두 칼럼에서의 기울기, a값은 거의 일치하였다(축방향칼럼 경우 약 -0.666, 반경방향칼럼 경우 약 -0.718).

DEAE 크로마토그래피에 의한 r-HBsAg 정제성능 비교

축방향과 반경방향흐름 칼럼에 각각 100ml의 r-HBsAg crude extract을 loading한 후 35, 70, 140ml/min 유속에서 0.2M과 0.5M NaCl로 단계적 용출 (stepwise elution)시켰다. Fig. 8부터 12까지

는 각각 축방향 35, 70ml/min, radial 35, 70, 140ml/min에서의 크로마토그램이다. 축방향 칼럼의 경우 너무 고압의 펌프압이 요구되어서 140ml/min의 유속을 얻지 못했다. 그래프에서 보듯이 각각의 크로마토그램사이엔 큰 차이를 발견할 수 없었고 특히 유속증가에 따른 띠넓어짐현상 역시 미미하였다.

Table 3에 세척용출액 (washing eluate)과 0.2와 0.5M NaCl eluate pool의 r-HBsAg 회수율과 specificity를 표기하였다. Specificity는 총단백질대비 r-HBsAg의 질량비로서 µg/mg의 단위로 나타내었다. 표에서 보듯이 유속증가에 따른 specificity 및 r-HBsAg 회수율의 변화는 뚜렷한 경향을 보이지 않았으나 세척과정에서 유속증가에 따라 r-HBsAg 손실이 증가하는 경향은 뚜렷하였다. 이는 loading 후 DEAE에 아직 흡착되지 않은 r-HBsAg가 유속이 증가함에 따라 더욱 많이 wash-off된다고 설명할 수 있다. 같은 유속에서 비교시 축방향칼럼이 반경방향 칼럼보다 다소 높은 회수율과 specificity를 보였고, 이 차이를 보다 확실하게 규명하기 위해 각각 조건에서의 이론단수를 실험적으로 결정하여 비교하여 보았다.

크로마토그래피분리에 있어서 이론단수, N은 분리 성능평가 척도로 흔히 쓰이며, 일반적으로 이론단수는 아래의 식에 의해 구할 수 있다(9).

$$N \sim 16 \left( \frac{t_R}{t_w} \right)^2 \tag{15}$$

여기서, tR은 체류시간으로서 time zero에서의 단계변화 (step change) 후 돌출하는 peak 중앙까지의 시간 또는 거리이고, tw는 baseline에서의 peak width로서 peak 중앙점에서의 양쪽으로의 tangential line과 baseline과의 교점들사이의 시간 또는 거리로써 나타낼 수 있다. Fig 8에서 12까지의 0.2와 0.5M NaCl eluate peak에서 N을 결정하여 Table 4에 정리하였다. 유속이 증가함에 따라 축방향과 반



Table 4. Number of Theoretical Plates Analysis on NaCl Eluate Pools.

Column/Flow Rate	0.2M	0.5M
Axial/ 35ml/min	31.9	46.3
70ml/min	20.4	29.6
Radial/ 35ml/min	24.6	41.6
70ml/min	25.9	36.1
140ml/min	19.0	26.7

경방향 칼럼경우 모두 N값이 감소함을 확인할 수 있었고, 35ml/min에서는 축방향칼럼의 N값이 반경방향칼럼의 경우보다 다소 높았고, 70ml/min의 경우에는 반대로 나타났다. 그러나 N값의 결정과정에서의 오차 등을 감안할 때 두 칼럼사이의 분리성능에는 큰 차이가 없는 것으로 사료된다.

### 결 론

재래적인 축방향흐름 칼럼과 근래 개발된 반경방향흐름 칼럼내의 유체역학적 거동을 유체의 압력강하와 유속간의 상관관계에 초점을 맞추어 Bernoulli 식과 Kozeny-Carman식에 근거하여 분석한 결과 이론예상치와 실험치가 비교적 잘 일치함을 확인하였다. 동일한 압력강하조건에서는 표준형상의 칼럼 경우 반경방향 칼럼이 축방향칼럼보다 약 2~3배의 높은 부피유속을 얻을 수 있었다. 다시 말하면 같은 부피유속을 얻기 위해서는 반경방향 칼럼의 경우 필요한 펌프압력이 약 2~3배 낮음을 알 수 있었다. 다른 형상의 칼럼들을 동일조건하에서 비교하기 위해 새로 정의된 형상비와 부피유속간에는 기하학적 선형관계가 존재함을 알 수 있었고, 동일한 형상비의 칼럼사이에는 부피유속이 거의 비슷함을 확인하였다. r-HBsAg를 이용한 단백질 분리 실험결과 축방향칼럼이 단백질의 회수율, specificity면에서 다소 우월하였으나 이론단수결정에 의한 비교시 두 종류의 칼럼에서 큰 차이를 보지 못하였다.

### 감 사

본 실험에 r-HBsAg용액을 제공한 (주)녹십자에 감사하며 특히 ELISA분석 및 총단백분석에 협조해 주신 생물공정팀 박경남, 안상집 제위께 감사합니다.

### 참고문헌

1. Cramer, S. M. and Jayaraman, G. (1993), *Current Opinion in Biotechnology*, **4**, 217-225.
2. Afeyan, N. B., Fulton, S. P. and Regnier, F. E. (1991), *J. Chromatography*, **544**, 267-279.
3. Saxena, V. and Weil, A. E. (1987), *Biochromatography*, **2**, 2, 90-97.
4. Lee, W. C., Tsai, G. J. and Tsao, G. T. (1990), "Protein Purification : from Molecular Mechanisms to Large-Scale Processes", Ladisch et al. ed., 104 (ACS Symposium Series, 427)
5. Saxena, V., Weil, A. E., Kawahata, R. T., McGregor, W. C. and Chandler, M. (1987), *American Laboratory News*, October 1987, p. 112-120.
6. Saxena, V., Subramanian, K., Saxena, S. and Dunn, M. (1989), *Biopharm*, March 1989.
7. Ergun, S. (1952), *Chem. Eng. Progr.*, **48**, 89.
8. McCabe, W. L., J. C. and P. Harriott (1992), *Unit Operations of Chemical Engineering*, 5th ed., McGraw-Hill, New York.
9. Mant, C. T. and Hodges, R. S. (1991), *High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation*, CRC Press, Boca Raton, FL, U. S. A.