

일반강연 II-5

실관막 모듈 분리관에 의한 단백질의 친화성 분리

Affinity Separation of Proteins by Hollow-Fiber Membrane Module Column

이 광진 · 염경호

충북대학교 공과대학 화학공학부

I. 서론

근래들어 생물기술이 급속히 발전함에 따라 생물반응을 통해 다양한 생물제품들의 생산이 이루어지고 있다. 생물반응에 의한 생물제품들의 생산량은 극단적으로는 기질 1 g당 10^{-8} g 정도로서 극히 낮아 이를 상업제품이 요구하는 순도(95 % 이상)로 까지 정제하기 위해서는 여러 단계를 거치는 복잡하고 지루한 분리·정제 과정이 필요하며, 이 분리·정제의 후류공정(downstream process) 비용이 생물제품 생산비의 상당부분을 점유케 되어 생물공정의 경제성을 낮게 한다. 따라서 생물공정을 이용한 생물제품 생산이 산업적으로 경제성을 갖기 위해서는 생물제품을 보다 효율적·경제적으로 분리·정제할 수 있는 후류공정의 확립이 요구된다.

본 연구에서는 산업적 규모로 생산되는 생물제품들을 효율적으로 분리·정제하는데 응용 가능한 방법의 하나로서 관심의 대상이 되고 있는 액체 크로마토그래피 기법을 연구의 대상으로 하였다. 일반적으로 흡착성의 입자(고정상)를 채운 충전관형 분리관을 사용하는 통상의 액체 크로마토그래피는 현재 생체물질의 분석 및 의 실험실적 소규모 분리·정제에 널리 사용되고 있다. 이때 충전된 입자의 화학적 특성, 크기 및 입경분포가 분리능을 좌우하는 주요 요소로서, 일반적으로 micron 크기의 단분산(monodisperse) 입자가 주로 사용된다. 따라서 충전형 분리관을 사용하는 액체 크로마토그래피의 규모를 확대시켜 상업적으로 생산되고 있는 생물제품의 분리·정제에 적용할 경우, 작은 입자크기는 필연적으로 높은 압력강하(약 수 atm/cm depth)를 유발시키므로 운전비용(고압으로의 pumping이 필요)이 높아지게 되며, 단분산 입자의 사용은 분리관 제작비용을 상승시키므로 충전형 분리관의 규모확대는 경제적인 면에서 타당성이 작은 것으로 알려져 있다[2]. 즉, 액체 크로마토그래피 기법이 상업적 규모로 생산되는 생물제품의 분리공정에 효율적·경제적으로 활용되기 위해서는 보다 경제성이 있고 규모확대가 용이한 새로운 분리관의 개발이 필요하다.

이러한 대안의 하나로서 막분리 공정에 널리 사용되고 있는 실관막 모듈을 액체 크로마토그래피의 분리관으로 이용하고자 하는 연구가 시도되고 있다[1,2]. 충전형 분리관 대신 실관막 모듈을 분리관으로 사용하면, 실관막의 구조상 이동상이 실관막의 내부 또는 외부로 직선적으로 흐르게 되므로 압력강하가 적고, 실관막의 세공에 분리능을 갖는 고정상을 고정화시킴으로서 단분산 입자의 충전효과를 낼 수 있어 규모확대가 용이한 장점이 기대된다.

이에 본 연구에서는 현시점에서 고가(高價)이면서 또한 규모확대(scale-up)에 어려움이 있는 통상의 충전관형 크로마토그래피 분리관 대신, 상대적으로 제작 및 운전비용이 적게 소요되며 또한 규모확대가 용이한 구조적 특성을 갖는 실관막 모듈

(hollow-fiber membrane module)을 분리관으로 사용한 실관막 모듈 액체 크로마토그래피를 제작하고, 이를 이용하여 단백질 및 당류의 크로마토그래피 실험을 수행하여 실관막 모듈의 액체 크로마토그래피용 분리관으로서의 활용 가능성에 대한 기본 자료를 제시하였다.

II. 실험

- 1) 실관막 모듈 제작: 실관막 모듈 분리관의 제작에 사용된 실관막으로는 (주)코오롱에서 제조한 Hifil^R 막을 주로 사용하였으며, 비교를 위해 때로는 (주)선경인더스트리의 Superane^R 막, 미국 Celanese의 Celgard^R X20-240 막도 사용하였다. 실관막 모듈은 외경 12.7 mm ($\frac{1}{2}$ in), 길이 26 cm 또는 54 cm 크기의 테프론 PFA 재질의 투명 튜브내에 실관막 묶음을 넣고 양 끝을 에폭시 수지(Ciba-Geigy, AW136/HW953J)로 포팅시켜 실관막의 유효 길이가 각각 20 cm 또는 50 cm가 되도록 제조하였다. 실관막 모듈은 30 ~ 85 % 범위에서 포팅 밀도를 달리하여 제작하였다.
- 2) 실관막 모듈 분리관 제작: 제조한 실관막 모듈의 막세공 내에 고정상을 고정화시켜 단백질 및 당류의 분리를 위한 분리관을 제작하였는 바, 이때 고정상으로는 액상 및 hydrogel(PVA 겔) 고정상의 두가지 종류를 사용하였다. 액상의 고정상으로는 isooctane에 음이온 계면활성제인 Aerosol OT를 0.05 M 농도로 용해시킨 용액을 사용하였으며[3], hydrogel 고정상으로는 먼저 PVA 겔을 막세공 내에 고정화시킨 후 겔에 Reactive Blue 4를 고정화시켜[2] 사용하였다.
- 3) 단백질의 크로마토그래피 실험: 실관막 모듈 분리관을 사용한 단백질의 elution 크로마토그래피 실험은 20 cm 길이의 분리관을 $\frac{1}{2}$ in- $\frac{1}{8}$ in Sewagelok^R 튜브피팅으로서 분석용 HPLC(Waters Co., Model 470)에 연결시켜 수행하였다. 실관막 분리관에 의한 크로마토그래피 실험의 모델 물질로는 등전점이 다른 BSA(등전점 = pH 4.5), myoglobin(등전점 = pH 6.5), cytochrome-c(등전점 = pH 10)의 세종류 단백질의 혼합 용액을 분리대상으로 하였다. 크로마토그래피 실험은 포팅 밀도를 달리하여 제작된 분리관들을 사용하여 이동상의 유량을 0.2 ~ 3 ml/min 범위로 변화시키면서 실험하였다. Fig. 1에 장치 구성도를 나타내었다.

III. 결 과

PVA 겔에 Reactive Blue 4가 코팅된 고정상이 고정화된 실관막 모듈 분리관을 이용한 단백질 용액의 전형적인 elution 크로마토그램 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 역미셀을 고정상으로 사용한 경우에는 이동상인 완충용액의 pH를 변화시킴으로서 단백질의 분리는 가능하나, 분리관을 몇차례 사용하여 역미셀의 고정상이 막세공으로부터 유출되면 더 이상 사용이 불가능한 반면 막세공에 형성시킨 PVA 겔에 Reactive Blue 4를 고정화시킨 분리관을 사용한 경우에는 수차례 사용하여도 재현성 있는 크로마토그램 결과를 얻을 수 있었다.

이상의 실관막 모듈 분리관에 의한 단백질의 크로마토그래피 실험 결과, 막세공 내에 다양한 종류의 고정상들을 고정화시킴으로서 실관막 분리관은 생물제품 분리의 효율적 활용 가능성이 높은 구조임을 확인하였다.

References

1. S. Brandt, R.A. Goffe, S.B. Kessler, J.L. O'Connor and S.E. Zale, "Membrane-Based Affinity Technology for Commercial Scale Purifications", *Bio/Technology*, 6, 779(1988)
2. H. Ding, M.-C. Yang, D. Schisla and E.L. Cussler, "Hollow-Fiber Liquid Chromatography", *AIChE J.*, 35(5), 814(1989)
3. K.E. Göklen and T.A. Hatton, "Liquid-Liquid Extraction of Low Molecular Weight Proteins by Selective Solubilization in Reversed Micelles", *Sep. Sci. Tech.*, 22, 831(1987)

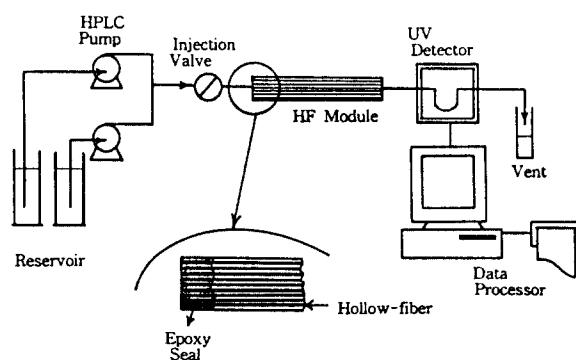


Fig. 1. Setup of hollow-fiber liquid chromatography experimental system.

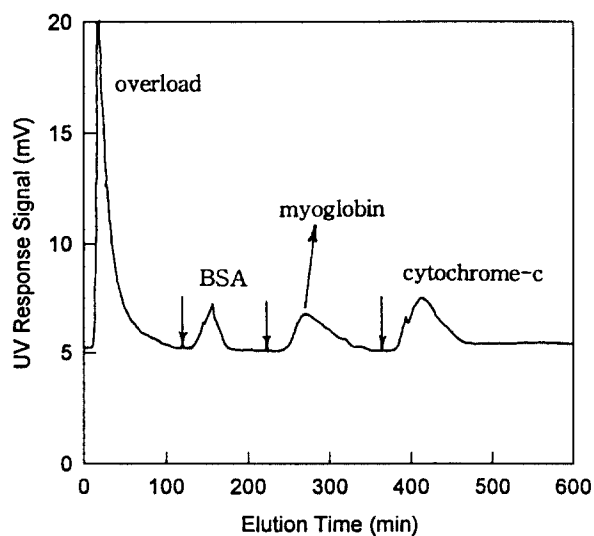


Fig. 2. Typical chromatogram for protein mixture.