

섬유층을 이용한 단백질의 크로마토그래피적 분리에 관한 연구(I) - 흡착성 섬유제조 및 자료처리 -

박 돈 회 · 박 주 정 · 허 영 란 · *Charles L. Cooney · *A. Edward Osawa
전남대학교 공과대학
*Massachusetts Institute of Technology, U. S. A.

A Study on the Chromatographic Separation of Proteins Using Fibrous Beds(I) - Adsorbent Fiber Manufactures and Data Handling -

Don-Hee Park, Ju-Jung Park, Young Rahn Huh, *Charles L. Cooney and *A. Edward Osawa
College of Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea.
*Massachusetts Institute of Technology, U. S. A.

ABSTRACT

A bed configuration wherein sheets of modified fibrous polyethylene are potted within a Millipore Filter Cartridge matrix has been developed. Polyethylene fibers form sturdy beds, but the native hydrophobicity and inertness of polyethylene have precluded their use in protein chromatography. The polyethylene fibers used in this system were modified by plasma oxidation and further derivatization. The resulting fibers are hydrophilic, bind protein reversibly and serve as an anion-exchange stationary phase. Separation of Bovine Serum Albumin on this bed, as well as results of basic studies on capacity and reversibility of binding within a fibrous bed and experimental data handling system are shown.

서 론

최근 들어 유전자조작법, rDNA기법 그리고 세포 융합기술과 같은 생물공학기술의 발달로 단백질 생산이 가능해졌다. 상기 방법으로 생산된 단백질은 생산공정상에서 분자량이 비슷한 것과 혼합된 상태의 묽은 용액으로 있거나 어떤 때는 오염된 상태로 있다. 대부분의 생물공학자들은 단백질 분리공정에서 묽은 용액 속의 원하는 단백질을 분리하기 위하여 묽은 용액상태를 변화시키지 않고 처리해야 하는 부담을 안고 있다. 1989년 미국의 Membrex회사(1)의 보고에 의하면 세계적으로 단백질 분리산업의

시장을 25억 US\$으로 추정하였으며, 생물학적 생 원료에 의한 분리공정은 오늘날 770백만 US\$의 가치가 있고, 이 시장은 단백질 분리기술이 실험실 단계가 아니라 공장규모로 대량생산이 가능할 때 매년 20~25% 증가를 기대하고 있다.

생분자물의 분리는 식품, 농업, 제약 그리고 기타 산업에서도 관심이 집중되고 있다. 단백질의 정제단계는 특이한 생분자 단백질에 대해서는 특별한 과정이며, 이 단계가 최종 제품가격의 90% 이상을 차지하고 있다고 Kadam(2)의 논문에서 지적했다. 생분리 공정에 있어서 최종 정제단계와 특별성이 어려운 문제를 안고 있지만 수준 높은 질의 생산품을 만들

고 공정의 비용을 최소화시키는 것이 최종목표이기 때문에 그 문제를 해결해야만 한다.

어떤 분리기술은 경제적인 타당성이 있는 것보다도 더 많은 것을 필요로 할 때도 있다. 대부분의 정제법은 예를 들면 재래적인 크로마토그래피적 과정과 같이 연속적이며 몇 개의 초기 농도단계로 구성되어 있다. Wheelright(3)는 다시 upstream과 downstream의 필수단계를 합치고, 전체의 공정단계를 최적화하기 위하여 재수정하였다.

상기공정을 이해하는 것은 강도 높은 공정이 높은 투자비와 운전비뿐만 아니라 수율손실의 비용을 가져오기 때문에 필수적이다. 질 좋은 정제된 제품을 생산하기 위해서 갖는 까다로운 분리와 정제 공정의 높은 비용은 의학, 농업, 산업의 응용을 하는데 생물공학 기술공정의 몇 가지 장애가 되고 있다.

단백질정제기술은 간단해야 하며, 쉽게 대형화할 수 있어야 하고 연속적이어야 하며 저렴한 비용과 과정을 거쳐야 하며, 비활성적(non-inactivating)이어야 한다. 활성적인 단백질을 처리하기 위해서는 대부분의 단백질은 그들의 생물학적 활성도와 고유성에 대한 특별한 3차원 형태를 가져야만 한다. 그런 것들 중에 하나가 Katoh(4)가 개발한 친화성 단백질분리법이다. 친화성 크로마토그래피법은 Dean 등(5)에 의해서 1970년대에 실제적인 기술로 탄생되었으며 분석법으로도 사용되어 오고 있다.

친화성법은 원하는 단백질을 제거하는데 높은 고유도(degree of specificity)때문에 가치가 있다. 그 친화성법은 현재 생물분리과정의 약 3% 정도 차지하고 있으나 Roy연구팀(6)은 십년 안에 8%로 증가될 것으로 전망했다. 단백질의 친화성법은 단백질의 정제법으로 상용화 규모에서 사용되고 있다.

지금까지 여러 가지 방법으로 단백질 정제법을 시도하고 있으나 아직도 최종상품에 대한 여러 가지 측면에서 개선할 점과 연구할 점이 많다. 특히 단백질 분리에 있어서 가장 중요한 것은 "계면(interface)"이며 이 계면과 단백질의 상호작용에 대한 연구가 최종제품의 질뿐만 아니라 정제비용까지도 개선시킬 수 있다. 단백질의 흡착은 단백질의 물리적, 화학적 물성과 흡착제 표면 그리고 용매에 의해서 지배되는 상호작용의 범위와 강도에 따른 거의 전현상을 나타내고 있다. Lee와 Ruckenstein(7)은 단백질 흡착은 엔트로피 그리고 구동적이라고 지적했다. Norde연구팀(8)은 단백질 흡착은 전형적으로 등전점(isoelectric point) 근처에 도달되어질 때 최대 흡착이 되는 정전기적 상호작용에 대한 높은 영향을

설명하였다.

본 연구팀의 연구목적은 상기에서 지적한 점들을 토대로 하여 의학에서 대형수술을 할 때 임의로 투여되는 혈액비용고체인 헤파린계통의 약품 속에 있는 효소인 헤파리나제를 경제적으로 재차 제거하는 공정개발의 기초실험이다. 대형수술 때 투여된 헤파린 계통의 약품이 체내에 있을 경우 대형사고 특히 교통사고 때 그 출혈을 막을 수 없어 생명에 큰 위험을 안고 있어 실용적인 제품의 개발이 요구되고 있다.

본 실험은 가격이 가장 저렴하고, 재생이 가능하고, 다루기 쉬운 섬유 즉 폴리에틸렌섬유를 화학적 처리하여 단백질의 흡착, 탈착이 용이롭게 하여 단백질 분리 및 정제공정을 경제적으로 수행하며, 또한 액체크로마토그래피에 의한 단백질 분리장치에서 컴퓨터로 이용한 자료처리를 온라인화하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

액체크로마토그래피와 자료처리

본 실험을 수행하기 위하여 Pharmacia FPLC 액체크로마토그래피(모델 LCC-500)를 사용했다. FPLC는 시료 속의 단백질 정량을 위해서 UV-1 단일흐름셀모니터를 이용하였으며, 파장 280nm로 고정시켰다.

단백질 분리 섬유층을 통과하는 연속흐름시료는 UV-1 흐름셀모니터로 전압신호를 얻으며, 이것은 곧 아날로그를 디지털신호로 전환하는 카드가 내장되어 있는 Leading Edge 컴퓨터로 연결되어 Omega WB-ASC를 이용하여 실험자료를 얻는다. 자료 획득 소프트웨어는 일반적인 자료획득 프로그램인 Labtech Acquire(Wilmington, MA)를 사용했다.

섬유 원재료

본 실험에서 사용한 섬유 원재료는 미국 Du Pont사의 Tyvek T-980형이며, 이것은 고밀도의 폴리에틸렌섬유의 부직포이며 그 특성은 Table 1과 같다.

폴리에틸렌섬유의 전처리

(산화단계) 폴리에틸렌섬유 표면을 산화시켜 산소 플라즈마(9)가 되도록 하였다. 플라즈마의 산화는 섬유표면을 케톤, 알코올, 과산화물 그리고 카복실산기(基)가 포함되어 있는 여러 가지 군(群)이 되도록 한다.

Table 1. Property of Polyethylene Fiber TYVEK T-980*

Basis weight	Thickness	MD/CD tensile	ND/CD Elmendorf tear
0.9 (oz/yd ²)	4.2 (mil.)	26.9 (lb/in ²)	0.2/0.2 (lb)

*Data Source from Du Pont Co.

(표면활성화단계) 플라즈마산화폴리에틸렌(POPE)은 섬유 표면이 더욱 활발한 반응성을 갖도록 산기(基)로 전환시키는 단계다. 에틸에테르 80ml이 들어 있는 크리스탈용기에 POPE 1 내지 2g을 넣은 후 SOCl_2 10ml 첨가하여 처리한다.

(폴리에틸렌이민 유도체화) 산염화물로 처리된 POPE는 제1, 제2 아민과 신속하게 반응하여 섬유 표면이 공유결합으로 흡착될 수 있게 된다. 폴리에틸렌이민(PEI)은 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 단위를 반복적으로 갖는 고분자이다. 섬유 표면에 PEI가 견고하게 부착되도록 epoxy cross linker된 폴리에틸렌이민-플라즈마산화폴리에틸렌(PEI-POPE)섬유를 사용하였다.

실험방법

본 실험에서 사용한 섬유층장치는 미국 Millipore 사 제품인 Swinnex-47(미국특허번호 3386585)의 디스크 여과 Cartridge에 직경 47mm 이내의 원형 형태의 전처리된 섬유(PEI-POPE 섬유) 7장 정도(약 0.37~0.39g)를 충전하여 액체크로마토그래피 FPLC에 연결한다. 그 후 섬유층을 완충용액과 염액으로 실험을 시작하기 전에 세척과 평형상태를 만든다. 섬유층 Cartridge 속에 공기방울을 제거하기 위하여 Cartridge에 고무망치로 약간의 충격을 가한다. 섬유 표면에 흡착과 탈착관계를 연구하기 위하여 완충액은 pH 6.8, 10mM NaH_2PO_4 , pH 5.0 10mM Acetate 그리고 pH 8.2 10mM tris용액을 사용하였다.

단백질 시료는 Sigma 제품인 Bovine Serum Albumin(BSA) 5%를 제조하여 냉장고에 보관하고 필요에 따라 적당량을 사용하였다. 섬유층을 통과하는 모든 용액의 유속은 5ml/min이었다. 섬유층에 BSA의 흡착 및 탈착관계를 측정하기 위해서 Omega 프로그램이 내장된 Leading Edge 컴퓨터로 전압 $\pm 0.1\text{mV}$ 안에서 읽을 수 있도록 장치한다.

Leading Edge 컴퓨터로 얻은 전압자료를 맥킨토시 컴퓨터의 Kaleidagraph 소프트웨어를 이용하여 자료를 분석했다.

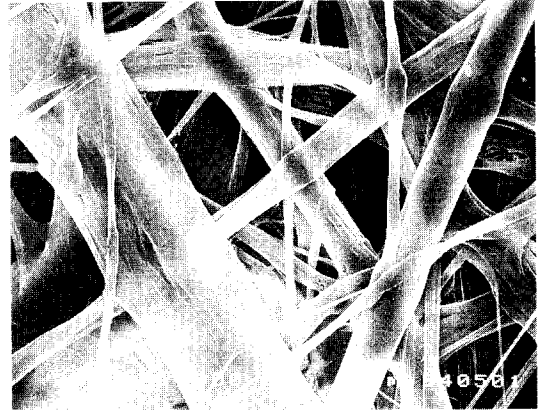


Fig 1. Scanning electron micrographic photo of unmodified Tyvek T-980.

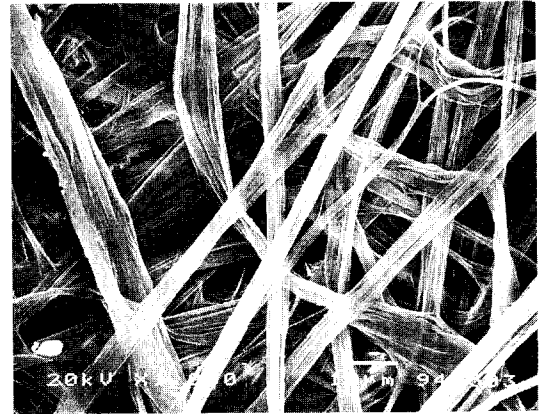


Fig 2. Scanning electron micrographic photo of polyethylene fibers chemically treated before using fibrous beds.

결과 및 고찰

폴리에틸렌섬유의 화학적 처리 효과

Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3은 폴리에틸렌섬유의 전처리 효과를 고찰하기 위하여 섬유상태별로 전자현미경(SEM: Scanning Electron Microscope, JSM-5400, JEOL, Japan)으로 찍은 사진이다. Fig. 1은 Du Pont사의 폴리에틸렌섬유 Tyvek T-980섬유의 원형상태를 전자현미경으로 1000배 확대하여 본 것이다. Fig. 2와 Fig. 3은 화학적인 전처리를 통하여 얻은 Tyvek T-980섬유를 전자현미경으로 1000배 확대하여 본 것이며, 특히 Fig. 3은 실험을 수행한



Fig. 3. Scanning electron micrographic photo of polyethylene fibers chemically treated after using fibrous beds.

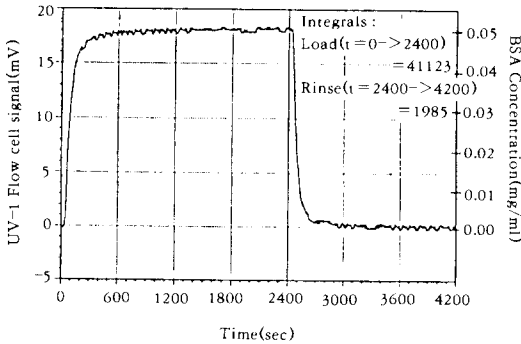


Fig. 4. UV absorbance signal as a function of time for a BSA binding study on sheets of PEI-PORE (Conditions: phosphate buffer 10mM, pH=6.8).

후의 사진이다. Tyvek T-980 섬유의 원섬유와 화학적 처리후의 현미경사진을 비교할 때 Fig. 1에 비하여 Fig. 2와 Fig. 3은 섬유 표면이 보다 더 거칠고, 섬세화된 것으로 관찰되어진다. Rasmussen(10)의 보고에 의하면 낮은 힘의 플라즈마를 섬유에 처리하면 크롬산 산화에 의한 acid site의 농도가 훨씬 낮다고 한다. 그러나 크롬산 산화처리를 하였을 경우 섬유 표면에 의하여 분리 성능이 좌우되므로 매우 중요한 것이다. 또한 섬유 표면이나 섬유 자체의 파괴는 섬유 표면 처리과정의 산화단계에서 오는 것이다.

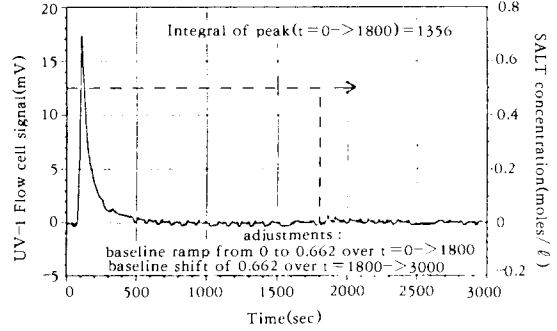


Fig. 5. Elution of BSA from PEI-POPE fibrous packing bed using salt solution (Conditions: phosphate buffer 10mM, pH=6.8).

산화된 섬유의 친수성 표면은 단백질 용질과 상호작용할 수 있는 기능성 기군(基群)이 제공되도록 변형되어야 하기 때문에(Kopaciewicz and Regnier, 11) 양이온 고분자 전해질인 PEI를 POPE섬유와 가교결합시킨 결과의 전자현미경 사진이 Fig. 2이다.

Fig. 4와 Fig. 5는 단백질 분리용 섬유층 장치를 통과한 BSA용액의 섬유층에 흡착 및 탈착을 보여준 그림이다. Fig. 4는 BSA용액의 섬유층에 시간변화에 따른 흡착과정을 보여주고 있으며, 흡착개시 1200초 정도면 섬유층 전표면에 완전히 포화결합된 상태를 알 수 있으며, 2400초 후에 완충용액으로 세척할 때 사역(dead zone)에 있었던 약간의 BSA용액이 검출되다가 세척시작 1000초 후에는 충전층 내부에 유리BSA가 없음을 알 수 있다. Fig. 5는 섬유층에 결합된 BSA를 0.5mole/l 염액으로 탈착시키는 과정이며, 이것은 본 실험장치에서 BSA단백질을 액체크로마토그래픽 방법으로 쉽게 분리하는 것을 보여주고 있다. 섬유층에 흡착된 BSA단백질이 염액으로 세척될 때 세척개시 1000초면 탈착이 완전히 종결된 것으로 보인다. Fig. 4와 Fig. 5의 그림에서 볼 수 있듯이 폴리에틸렌섬유를 약품처리하여 특정단백질을 분해하는데 유용하게 사용할 수 있으리라 사료된다.

자료 획득 및 분석

본 실험장치에 의하여 자료를 획득하고, 또 자료를 분석하기 위하여 컴퓨터 사용한 온-라인 시스템을 사용한 결과가 Fig. 6이다. Fig. 6은 FPLC액체 크로마토그래피를 이용하여 5mole/l의 BSA용액을 섬유층 충전장치에서 실험자료 획득을 하기 위한 바

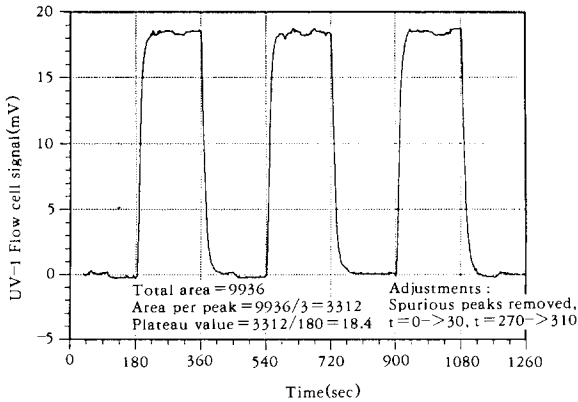


Fig. 6. Voltage measurements are performed using labtech acquire software.

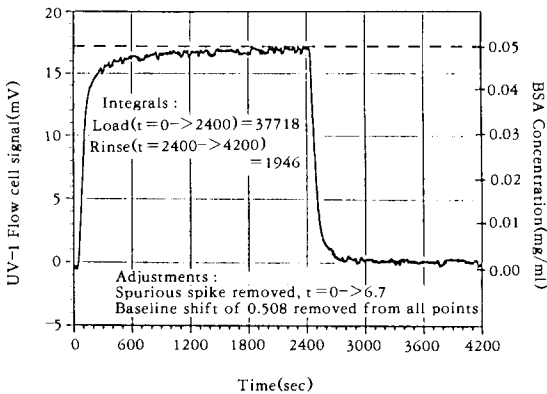


Fig. 7. UV absorbance signal as a function of time for a BSA binding study on sheets of PEI-POPE (Conditions: acetate buffer 10mM, pH=5.0).

탕선(baseline)을 만들어 주기 위한 Labtech Acquire의 소프트웨어에 의한 전압측정결과이다. 이 그림은 본 실험장치에서 3번의 공실험에 의한 정확한 바탕선을 잡을 수 있도록 자료처리를 한 것이다. Fig. 6 그림뿐만 아니라 일반적으로 X축 0점선에서 실험자료가 약간씩 올라가는데 그 이유는 UV의 모니터 흐름셀 안에 미량의 BSA용액이 "sticking" 현상에 기인되는 것으로 사료된다.

Fig. 7과 Fig. 8은 섬유층 충전장치실험에 완충용액을 아세테이트완충액을 사용하여 BSA단백질 분리를 수행한 실험자료를 Leading Edge 컴퓨터에서 Labtech Acquire 소프트웨어 프로그램에 의해 얻은

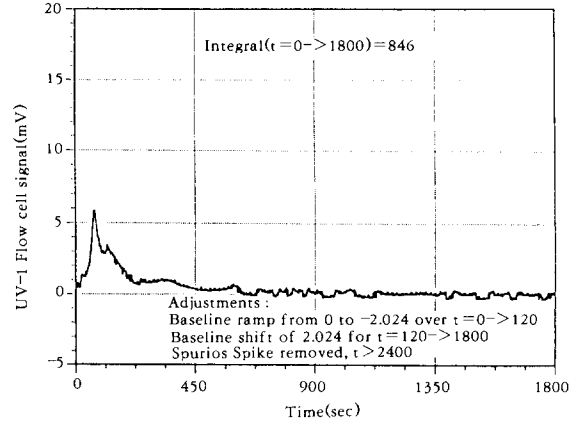


Fig. 8. Elution of BSA from PEI-POPE fibrous packing bed using salt solution(Conditions: acetate buffer 10mM, pH=5.0).

것이며 이것을 Kaleidagraph의 Macintosh 프로그램으로 처리한 것이다. Fig. 4와 Fig. 5 그리고 Fig. 7과 Fig. 8은 완충용액이 phosphate완충액 pH=6.8과 acetate완충액 pH=5.0으로 다르나 충전층을 통과하는 BSA농도의 파과곡선 유형이 똑같다. 실험 결과는 유형이 유사하여 제시하지 않았으나 Tris완충액 pH=8.2에서도 비슷하였다. 그러므로 본 실험에서의 연구결과는 섬유층을 이용한 pH=5.0부터 pH=8.2까지 분리가 가능한 것으로 판명되었으며 또한 실험의 온라인화가 되어 규모화 실험을 수행하는데도 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 크로마토그래피적 방법에 의한 단백질 분리를 규모화시키기 위한 기초적인 실험을 행한 것이다. 단백질 분리를 위해서 화학적 처리된 폴리에틸렌섬유를 미국 Millipore사의 여과 Cartridge에 장착시키고, 그 시스템에서 단백질인 5%의 Bovine Serum Albumin을 통과시켜 섬유 표면의 단백질 흡착능력과 결합 가역성 등을 관찰하였다. 또한 실험 자료들을 Omega 프로그램이 내장된 컴퓨터와 맥킨토시의 Kaleidagraph로 자료처리 한 것을 보여주었다.

감 사

이 논문은 1992년도 교육부지원 한국학술진흥제

단의 지방대학육성과제 학술연구조성비와 미국 M. I. T. 대학의 Biotechnology Process Engineering Center의 후원으로 이루어졌으며, 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Membrex Corporate Information(1989), Piscataway, NJ.
2. K. L. Kadam(1986), *Enz. Microb. Technol.*, **8**, 226.
3. S. M. Wheelright(1989), *Biotechnology Research and Applications*, 120. Elsevier Applied Science Publisheres, London.
4. S. Katoh(1987), *Trends Biotechnol.*, **5**, 328.
5. P. D. G. Dean, W. S. Johnson and F. A. Middle (1985) (Eds.), *Affinity Chromatography. A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, U. K.
6. S. Roy, W. C. McGregor and S. T. Orichowsky(1985), *J. Chromatogr.*, **327**, 189.
7. S. H. Lee and Ruckenstein (1988), *J. Colloid Interface Sci.*, **125**, 365.
8. W. Norde, F. MacRitchie, F. G. Nowicka and J. Lyklema(1986), *J. Colloid Interface Sci.*, **112**, 447.
9. A. Edward Osawa(1992), Ph. D. Thesis Dept. of Chemical Engineering, M. I. T., U. S. A.
10. J. R. Rasmussen, E. R. Stedronsky and G. M. Whitesides(1977), *JACC.*, **99**, 4736.
11. W. Kopaciewicz and F. Regnier(1986), *J. Chromatogr.*, **358**, 119.