

키토산 및 키틴 막에 의한 단백질의 친화 여과 크로마토그래피:

1. 다공성 친화 막의 제조와 특성 평가

육영재·염경호[†]

충북대학교 공과대학 화학공학부

(2006년 2월 20일 접수, 2006년 3월 10일 채택)

Affinity Filtration Chromatography of Proteins by Chitosan and Chitin Membranes:

1. Preparation and Characterization of Porous Affinity Membranes

Yeong Jae Yuk and Kyung Ho Youm[†]

School of Chemical Engineering, College of Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Chungbuk, Korea

(Received February 20, 2006, Accepted March 10, 2006)

요약: 실리카 입자를 기공 형성제로 사용하여 다공성 키토산 및 키틴 막을 제조하였다. 다공성 막의 제조는 다음의 3단계 절차로서 수행되었다: (1) 키토산 용액에 실리카 입자를 첨가시켜 필름을 형성시킨 후, (2) 이 필름을 알칼리 용액에 침지시켜 실리카 입자를 제거하여 다공성의 키토산 막을 제조하였으며, (3) 다공성 키토산 막을 acetic anhydride를 사용하여 아세틸화시킴으로서 다공성 키틴 막을 제조하였다. 물리적 강도가 우수하고, 적절한 순수 투과량을 갖는 다공성 키토산 막과 키틴 막의 최적 제작조건이 제시되었다.

단백질 친화성을 부여하기 위해 다공성 키토산 막에 반응성 염료인 Cibacron Blue 3GA를 고정화시켰으며, BSA 단백질 및 lysozyme 효소의 흡착실험을 수행하여 친화 키토산 막 및 키틴 막의 단백질 결합용량을 측정하였다. 친화 키토산 막의 BSA 단백질 결합용량은 약 22 mg/mL이었으며, 친화 키틴 막의 lysozyme 효소 결합용량은 약 26 mg/mL로서 이는 키토산 또는 키틴을 기반으로 하여 제조된 hydrogel bead의 단백질 결합용량보다 수~수십 배 큰 값으로서, 향후 막여과 크로마토그래피용 친화 막으로의 효과적인 활용이 기대된다.

Abstract: Porous chitosan and chitin membranes were prepared by using silica particles as porogen. Membrane preparation was achieved via the following three steps: (1) chitosan film formation by casting an chitosan solution containing silica particles, (2) preparation of porous chitosan membrane by dissolving the silica particles by immersing the film into an alkaline solution and (3) preparation of porous chitin membrane by acetylation of chitosan membrane with acetic anhydride. The optimum preparation conditions which could provide a chitosan and chitin membranes with good mechanical strength and adequate pure water flux were determined.

To allow protein affinity, a reactive dye (Cibacron Blue 3GA) was immobilized on porous chitosan membrane. Binding capacities of affinity chitosan and chitin membranes for protein and enzyme were determined by the batch adsorption experiments of BSA protein and lysozyme enzyme. The maximum binding capacity of affinity chitosan membrane for BSA protein is about 22 mg/mL, and that of affinity chitin membrane for lysozyme enzyme is about 26 mg/mL. Those binding capacities are about several~several tens times larger than those of chitosan and chitin-based hydrogel beads. Those results suggest that the porous chitosan and chitin membranes are suitable in affinity filtration chromatography for large scale separation of proteins.

Keywords: porous membrane, affinity membrane, affinity filtration chromatography, chitosan, chitin, protein separation

[†]주저자(e-mail : khyoum@chungbuk.ac.kr)

1. 서론

단백질, 효소 등의 생리활성 물질은 열과 유기용매에 민감하기 때문에 이들의 고순도 분리정제에는 전통적 분리정제 기술인 감압증류, 용매추출 및 결정화법보다 친화 관 크로마토그래피(affinity column chromatography)법이 유리하다[1]. 친화 관 크로마토그래피는 마이크론 크기의 hydrogel bead 담체에 리간드(ligand)가 결합된 고정상 입자를 채운 충전관을 사용하여 분리대상 목적물인 리게이트(ligate)와 리간드와의 친화작용에 의해 물질을 분리정제하는 방법이다[2]. 그러나 충전관은 공극률이 낮아 압력강하가 크며(약 3 atm/cm depth), 관을 통한 이동상의 유동량이 작아 확산저항이 커서 분리정제의 생산성이 낮다는 문제와 공극 막힘(plugging)의 발생이 쉽기 때문에 이를 규모 확대시켜 생산규모에 적용하는데 어려움이 있다[3,4].

충전관이 갖는 문제점을 개선하기 위한 방안의 하나로 다공 막을 리간드의 고정화 담체로 사용하는 친화 막(affinity membrane)에 대한 연구가 고안되었다. 1987년 Brandt 등[5]이 처음으로 제안한 친화 막 크로마토그래피 기법은 관 크로마토그래피의 장점과 막분리의 장점을 결합시킨 분리기법이다. Fig. 1의 친화 막 모식도에 나타낸바와 같이 MF 또는 UF 막의 세공 내에 리간드를 고정화시킴으로서 통상의 여과 막에 분자특이성 또는 선택성을 부여하고, 친화 막이 장착된 막 모듈을 hydrogel bead 충전관 대신 사용하면 막 세공을 통한 이동상 흐름이 커서 분리정제의 생산성 증대와 규모 확대를 기대할 수 있다[6,7].

Brandt 등의 제안 이후 다양한 고분자 막 소재를 대상으로 한 친화 막 제조에 대한 연구가 이루어져 왔다. 일반적으로 친화 막 제조에 사용될 다공 막의 소재는 리간드와의 반응성, 생체적합성, 우수한 기계적 강도, 적절한 세공특성(다공도와 세공크기), 극성 용매에의 안정성을 동시에 갖추어야하므로 선택의 폭이 매우 제한되어 있다[8]. 예를 들어 nylon과 polysulfone 소재의 막은 세공특성 조절과 기계적 강도 및 용매 안정성은 우수하나 리간드와의 반응성이 낮으며, 반면 cellulose류 소재의 막은 리간드와의 반응성은 우수하나 기계적 강도와 용매 안정성이 낮다는 단점이 있다.

키토산[poly(2-amino-2-deoxy-D-glucose)]은 지구상에서 cellulose 다음으로 풍부한 천연 고분자인 키틴[poly

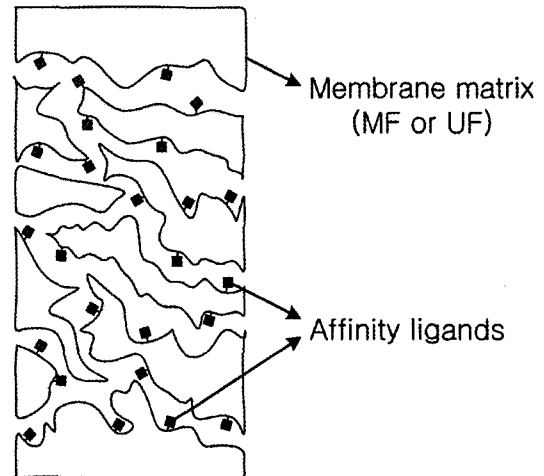


Fig. 1. Schematics of affinity membrane.

(N-acetyl-D-glucosamine)]을 탈아세틸화 시켜 얻을 수 있는 물질로서 기계적 강도가 적절하고, 필름형성이 용이하며, 분자구조에 수산기(-OH) 및 아민기(-NH₂)를 갖고 있어 리간드와의 결합력이 우수하여[9], 친화 막 제조의 소재로서 활용할만한 가치가 있다. 그러나 키토산은 제막(製膜)은 용이하나 막 세공특성 조절이 쉽지 않은 것으로 알려져 왔다. 근래 Zeng과 Ruckenstein [10]은 키토산 용액에 기공 형성제(porogen)로서 실리카 입자를 사용하여 세공특성 조절이 가능한 키토산 및 키틴 막의 제조법을 발표하였다. 이들은 알칼리에 실리카 입자는 용해되나 키토산은 용해되지 않는 특성을 이용해 먼저 키토산 용액에 실리카 입자를 첨가시켜 필름을 형성시킨 후 이를 NaOH 용액에 침지시켜 실리카 입자를 제거하여 다공성의 키토산 막을 제조하였으며, 이때 실리카 입자의 크기 및 함유량을 달리함으로써 키토산 막의 세공특성 조절이 가능하다. 또한 이들은 제조된 키토산 막을 아세틸화시킴으로써 적절한 가용성 용매가 없어 필름형성이 불가능한 것으로 알려진 키틴의 다공 막 제조법도 제시하였다.

본 연구에서는 키토산 및 키틴 친화 막을 제조하기 위해 먼저 Zeng과 Ruckenstein[10]이 제시한 방법을 사용하여 세공특성이 다른 다공성의 키토산 및 키틴 막을 제조한 후 막의 물리적 특성을 평가하여 최적의 다공 막 제조조건을 결정하였다. 다음으로 반응성 염료인 Cibacron Blue 3GA를 결합시킨 키토산 친화 막을 제조하여 BSA (bovine serum albumin) 단백질의 흡착실험을 통해 평형 흡착량을 측정하고, 또한 키틴 친

화 막에의 lysozyme 효소의 평형 흡착량을 측정함으로써 향후 본 연구의 후속 과제인 단백질(BSA)과 효소(lysozyme)의 친화 막 크로마토그래피 연구에 활용될 키토산과 키틴 다공 막의 친화 막으로서의 기본 특성을 평가하였다.

2. 실험

2.1. 실험재료

다공 막의 소재로는 평균 분자량이 750,000인 키토산(Fluka Chemi AG, 스위스)을 사용하였다. 기공형성제로 사용된 실리카 입자로는 (주)보광화학(한국)의 평균 입자경이 각각 3 μm , 5 μm , 10 μm 인 3가지 종류를 사용하였다. 키토산 막의 가교제로는 epichlorohydrin (Aldrich Co., 미국)을 사용하였으며, 키토산 막을 아세틸화시켜 키틴 막으로 전환하기 위해 acetic anhydride (Mallinckrodt Baker Co., 네덜란드)를 사용하였다.

키토산 막에 결합시킬 친화성 리간드로는 Cibacron Blue 3GA (CB3GA, 염료 함량 55%, Sigma Co., 미국)를 사용하였다. CB3GA는 직물 염색에 사용되는 triazine 염료의 한 부류인 Procion H 계열의 반응성 염료로서 그 구조가 NAD (nicotinamide adenine dinucleotide)와 흡사하여, 'dinucleotide fold'를 갖고 있는 단백질(serum albumin, dehydrogenase류, kinase류, nucleotide-binding 효소류 등)과의 친화력이 우수한 물질이다[11].

키토산 친화 막에의 흡착 용질로는 BSA (Fraction V, 96~99% albumin, $M_w = 69,000$, Sigma Co., 미국) 단백질을, 키틴 친화 막에의 흡착 용질로는 lysozyme (EC 3.2.1.17, 3 times crystallized, dialyzed and lyophilized from hen egg white, Sigma Co., 미국) 효소를 사용하였다. 이외의 기타 시약들은 모두 특급 시약을 사용하였으며, 순수로는 Milli-RO⁺/Milli-Q⁺ Water Purification System (Millipore Co., 미국)을 통해 제조된 초순수를 사용하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 다공성 키토산 및 키틴 막의 제조

다공성 키토산 막의 제조절차는 다음과 같다; 먼저 1 vol % acetic acid 용액 50 mL에 키토산 0.5 g을 용해시킨 용액에 키토산에 대한 실리카 입자의 함유량 질량비(ratio of silica to chitosan; S/C)가 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2가 되도록 입자 크기가 다른 3종류 실리카 입자

(평균 직경 3 μm , 5 μm 및 10 μm)를 첨가하여 격렬히 교반하면서 현탁시켰다. 이 실리카 입자 함유 키토산 용액을 깨끗한 유리판 위에 붓고 Film Applicator (YBA-3 type, Yoshimitsu Co., 일본)를 사용하여 360 μm 의 일정한 두께로 캐스팅하여 후드 내에서 하루 동안 자연건조 시킨다. 건조된 필름을 유리판에서 떼어낸 후 80°C 온도의 5 wt% NaOH 용액에 2시간 동안 침지시켜 실리카 입자를 녹여낸 다음 다량의 물로 수차례 세척하여 잔존하는 NaOH를 제거하여 다공성 키토산 막을 제조하였다. 이 단계에서 얻어진 다공성 키토산 막은 예비실험 결과 dead-end 막모듈에 설치 시 O-ring과의 접촉부위가 파손되는 문제가 발생하였으며, 또한 키토산은 알카리에는 강하나 산에는 용해되는 특성이 있어 친화 막으로서의 사용에 문제가 있다. 따라서 이러한 문제점을 개선하기 위해 다공성 키토산 막을 0.067 M NaOH 용액을 사용하여 pH가 10으로 조절된 50°C 온도의 0.02 M epichlorohydrin 용액에 침지시켜 2시간 동안 가교시킨 다음 과량의 순수로 세척하여 최종의 가교 결합된 다공성 키토산 막을 제조하였다. Epichlorohydrin에 의한 키토산의 가교화 반응을 Fig. 2-(a)에 나타내었다.

다공성 키틴 막은 가교시키기 전 단계에서 얻어진 다공성 키토산 막을 acetic anhydride가 5 vol% 농도로 용해되어 있는 메탄올 용액 중에 침지시켜 50°C 온도에서 1시간 동안 아세틸화시킨 후 메탄올, 순수, 5 wt% NaOH 용액으로 순차적으로 세척시켜 제조하였다. 키틴 막 제조의 아세틸화 반응을 Fig. 2-(b)에 나타내었다.

2.2.2. 다공성 막의 특성 평가

키토산 용액에 함유시킨 실리카 입자의 크기 및 키토산에 대한 실리카 입자의 함유량 비율을 달리하여 제조된 다공성 키토산 및 키틴 막의 물리적 특성치로는 순수 투과량, 인장강도, 산(acid) 안정성, 물폴로지, 다공도와 BET 비표면적을 측정하였으며, 측정된 물리적 특성치를 비교 평가하여 다공성 키토산 및 키틴 막의 최적 제조조건을 결정하였다.

2.2.2.1. 순수 투과량 측정

막의 순수 투과량(PWF, pure water flux)은 dead-end 막모듈(내용적 0.25 L, 유효 막면적 14.5 cm^2)을 사용하여 TMP (transmembrane pressure) 변화(0.2~2 atm)

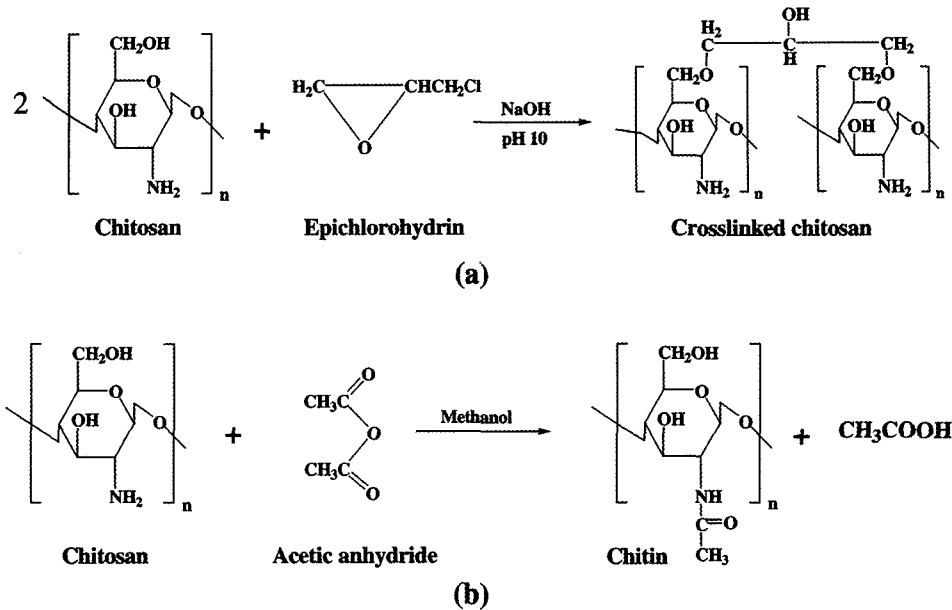


Fig. 2. Reaction scheme for (a) cross-linking of chitosan membrane with epichlorohydrin, (b) preparation of chitin membrane by acetylation of chitosan membrane with acetic anhydride.

에 따라 측정하였다. 압축질소를 이용하여 25°C의 온도를 유지하고 있는 순수 저장조에 일정한 압력을 가하고, dead-end 막모듈에 설치된 다공성 키토산 및 키틴 막을 투과한 순수의 양을 전자저울로 30분 동안 측정하여 PWF를 계산하였다.

2.2.2.2. 인장강도 측정

막의 인장강도(tensile strength)는 막을 길이 5 cm × 폭 2 cm의 크기로 절단하여 완전히 건조시킨 후, UTM (LR-30K, Lloyd Instrument Co., 미국)을 사용하여 cross-head speed 20 mm/min, gauge length 20 mm의 조건에서 측정하였다.

2.2.2.3. 산(acid) 안정성 측정

일반적으로 키토산은 알카리에는 강하나 산에는 용해되는 특성이 있다. 다공성 키토산 막의 용매 안정성과 물리적 강도를 높이기 위해 epichlorohydrin으로 키토산 막을 가교시켰다. 가교시켜 얻어진 키토산 막 및 키틴 막의 산 안정성은 막을 2 cm × 2 cm의 크기로 절단하여 5 vol% acetic acid 용액(pH 2.5) 내에 24시간 동안 침지시킨 후, 산에 의한 막의 손상 여부로서 판단하였다.

2.2.2.4. 물폴로지 관찰

다공성 키토산 및 키틴 막의 물폴로지(세공크기와 분포)는 주사전자현미경(SEM, S-2500C, Hitachi Co., 일본)을 사용하여 관찰하였다. 막 시료는 완전히 건조시킨 후 금을 진공 증착시켜 SEM 이미지를 관찰하였다.

2.2.2.5. 다공도 측정

다공성 키토산 및 키틴 막의 다공도(porosity)는 막의 물에 대한 팽윤도를 측정하여 평가하였다. 가로 2 cm × 세로 2 cm 크기의 완전히 건조시킨 다공성 키토산 및 키틴 막 시료의 무게(W_1)를 측정 후, 이를 20°C의 수중에서 충분히 팽윤시킨 상태에서의 무게(W_2)를 측정하여 아래의 식으로 다공도(porosity)를 계산하였다.

$$\text{Porosity (\%)} = \frac{100(W_2 - W_1)}{\rho V_{wet}} \quad (1)$$

여기서, ρ 는 물의 20°C에서의 밀도, V_{wet} 는 팽윤된 막의 부피이다.

2.2.2.6. BET 측정

가로 2 cm × 세로 2 cm 크기의 다공성 키토산 및

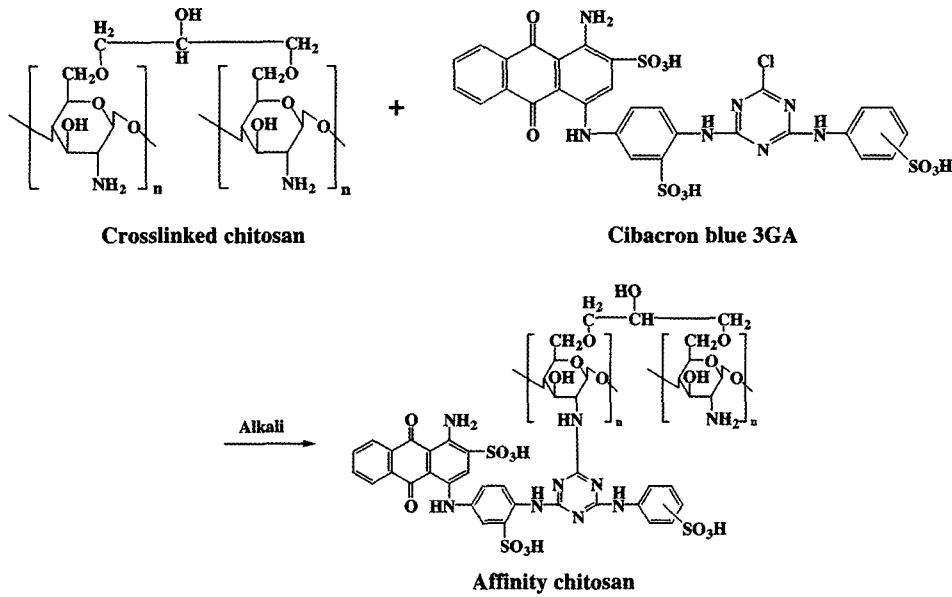


Fig. 3. Reaction scheme for preparation of affinity chitosan membrane by coupling of CB3GA and cross-linked chitosan membrane.

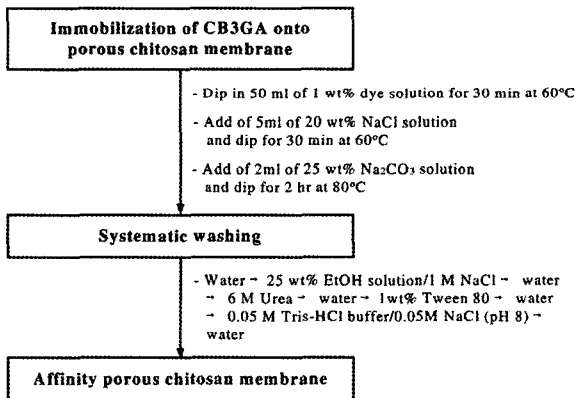


Fig. 4. Procedure for preparation of affinity chitosan membrane.

키틴 막 시료를 대상으로 BET 장치(Autosorb-1, Quanta Chrome Co., 미국)를 사용하여 질소의 흡착·탈착 실험을 수행하여 비표면적을 측정하였다.

2.2.3. 키토산 친화 막의 제조

키토산 친화 막의 제조는 Fig. 3의 반응을 통해 epichlorohydrin으로 가교시켜 얻어진 다공성 키토산 막에 반응성 염료인 CB3GA를 고정화시켜 제조하였다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이 약알카리 분위기에서 CB3GA의 triazine 고리에 있는 염소기(-Cl)는 키토산

의 아민기(-NH₂)와 친핵성 치환반응을 통해 공유결합을 형성한다[12,13]. 이 친화 작업은 Atkinson 등[14]이 제안한 hydrogel bead에의 반응성 염료 고정화 방법을 약간 변경한 것으로서 구체적인 절차는 아래와 같다.

Fig. 4에 나타낸 바와 같이 먼저 가교 결합시킨 다공성 키토산 막을 60°C 온도의 40 mL 염료용액(10 mg dye/mL)에 30분 동안 침지시킨다. 다음으로 이 염료용액에 5 mL의 NaCl 수용액(20 wt%)을 첨가시켜 염료 분자가 키토산의 분자사슬에 흡착되도록 30분 동안 방치시킨 후, 2 mL의 Na₂CO₃ (25 wt%) 수용액을 첨가시키고 용액의 온도를 80°C로 높여 2시간 동안 반응시켜 다공성 키토산 막에 반응성 염료를 고정화시켰다. 다음 단계로 염료 용액을 서서히 순수로 대체시켜 염료의 파란 색이 없어질 때까지 과량의 염료를 제거한 후, 막을 꺼내 다단계의 세척 과정[순수 → 25 wt% EtOH 용액/1 M NaCl → 순수 → 6 M Urea → 순수 → 1 wt% Tween 80 → 순수 → 0.05 M Tris-HCl buffer/ 0.05 M NaCl (pH 8) → 순수]을 거쳐 키토산 친화 막을 완성하였다. 제조된 막은 미생물의 번식을 막기 위해 0.4 wt% Na₃N 용액 중에 보관하였으며, 사용 시에는 과량의 순수로 세척하였다.

키틴은 그 자체로서 lysozyme에 대한 친화력을 갖고 있기 때문에 다공성 키틴 막의 친화 작업은 행하지 않

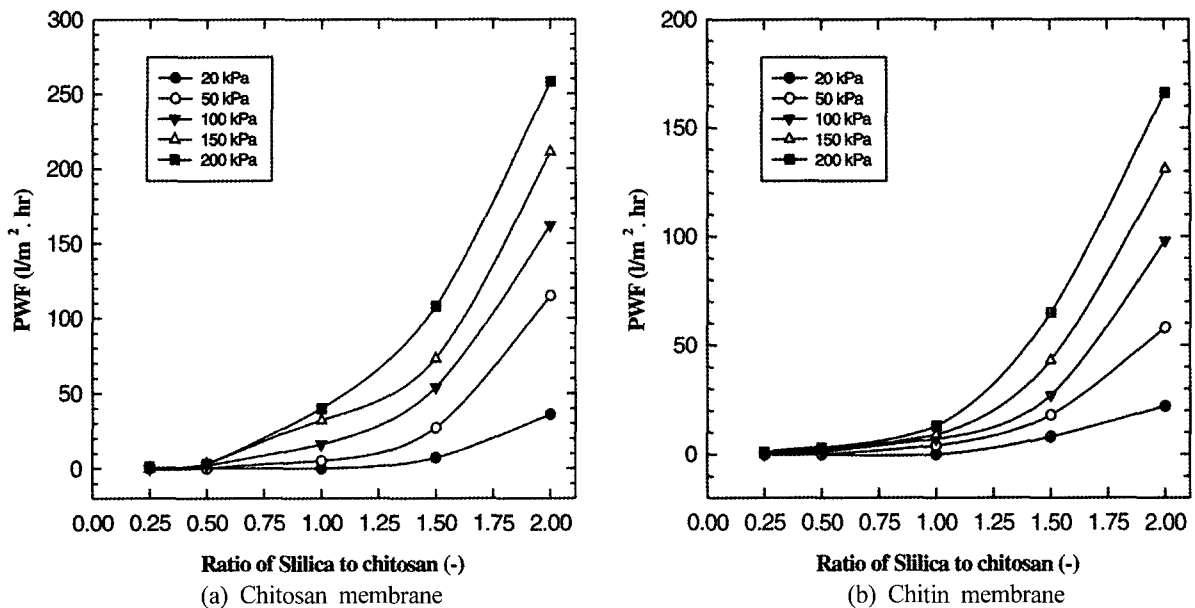


Fig. 5. Trends of pure water flux (PWF) with change of S/C (ratio of silica to chitosan) for the porous (a) chitosan and (b) chitin membrane [Size of silica particle = 5 μm].

았다[15].

2.2.4. 친화 막의 특성 평가

2.2.4.1. 키토산 친화 막의 CB3GA 염료 고정화량

키토산 친화 막에 고정화된 CB3GA 염료의 양은 친화 막의 단백질 결합용량을 결정하는 중요한 인자이다. 고정화된 염료의 양은 강산을 사용하여 염료를 키토산으로부터 탈착시키는 Chambers[16]법을 사용하여 측정하였다. 먼저 제조된 키토산 친화 막을 가로 4 cm \times 세로 4 cm 크기로 잘라 농염산(12 N) 용액 15 mL 내에 넣고 80°C에서 15분 동안 가열하여 키토산을 가수분해시켜 염료를 탈착시키고, 25°C로 냉각한 후 5 mL의 순수수를 첨가한다. 염료가 탈착되어 있는 용액의 흡광도를 CB3GA의 최대 흡수파장인 515 nm에서 UV/Vis 분광광도계(UVIKON 860, 미국 Kontron Instruments Co.)로 측정하고, 미리 작성된 검량선 으로부터 고정화된 염료의 양(μmol 염료/mL membrane)을 계산하였다.

2.2.4.2. 친화 막의 BSA 및 lysozyme 평형 흡착량

키토산 친화 막에 대해서는 BSA 단백질의 평형 흡착량을, 키토산 친화 막에 대해서는 lysozyme 효소의 평형 흡착량을 측정하여, 향후 본 논문의 후속 연구인 BSA와 lysozyme의 친화 막 크로마토그래피에 사용될

키토산 및 키토산 친화 막의 기본 특성(단백질과 효소 결합용량)을 평가하였다. 친화 막에의 BSA 및 lysozyme 평형 흡착량 측정은 아래의 절차로서 수행하였다. 먼저 최적 조건에서 제조된 친화 막을 가로 4 cm \times 세로 4 cm 크기로 잘라 5 mL의 완충용액[BSA의 완충용액 0.05 M Tris-HCl/0.05 M NaCl (pH 8)과 lysozyme의 완충용액 0.1 M phosphate buffer/1 M NaCl (pH 8)]에 30분간 침적시킨 후, 여기에 농도를 알고 있는 BSA 및 lysozyme 용액 5 mL를 첨가하고, 25°C, 60 rpm에서 12시간 동안 진탕시켜 흡착평형에 도달하도록 한다. 친화 막에의 BSA 및 lysozyme 흡착량(mg/mL membrane)은 용액의 흡광도를 280 nm에서 UV/Vis 분광광도계로 측정하여 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 다공성 키토산 및 키토산 막의 최적 제조조건

3.1.1. 실리카 입자의 최적 함유량

기공 형성제로서 키토산 용액에 함유시킨 실리카 입자(평균 입경 5 μm)의 함유량 변화(키토산에 대한 실리카 입자의 함유량 비, S/C)에 따라 제조된 다공성 키토산 막과 키토산 막의 PWF 변화를 막간 압력차(transmembrane pressure; TMP)에 따라 Fig. 5에 나타내었으

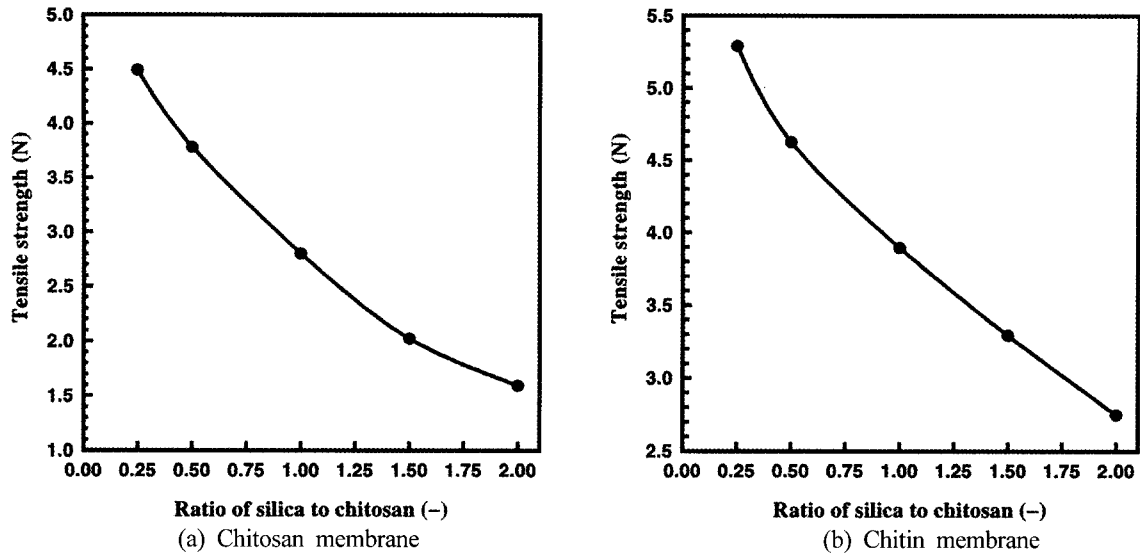


Fig. 6. Trends of tensile strength with change of S/C (ratio of silica to chitosan) for the porous (a) chitosan and (b) chitin membrane [Size of silica particle = 5 μm].

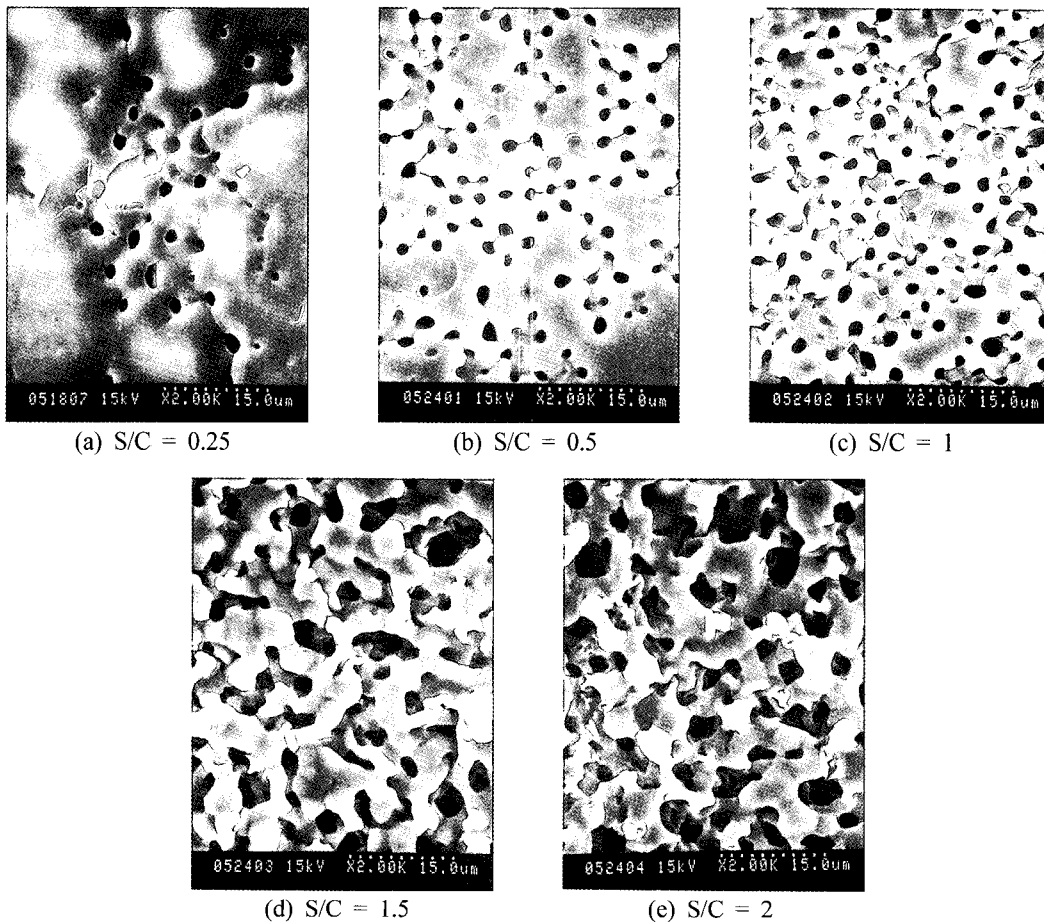
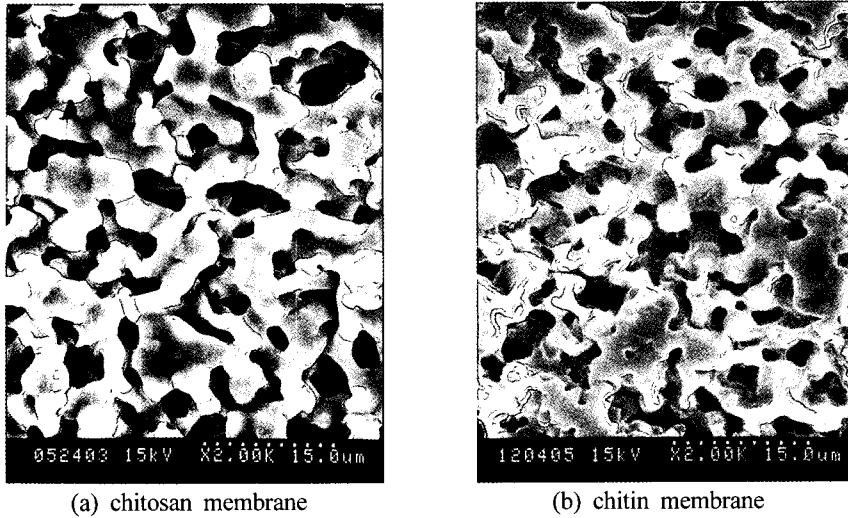


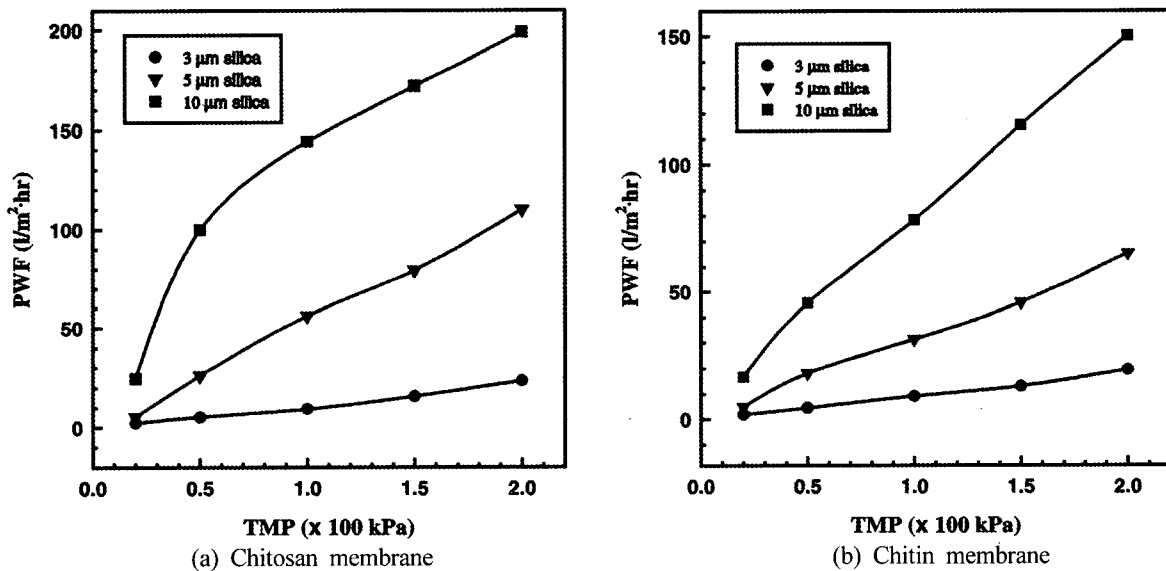
Fig. 7. Surface morphology of the porous chitosan membranes with change of S/C (ratio of silica to chitosan) [Size of silica particle = 5 μm].



(a) chitosan membrane

(b) chitin membrane

Fig. 8. Surface morphology of the porous (a) chitosan and (b) chitin membrane [Size of silica particle = 5 μm , S/C (ratio of silica to chitosan) = 1.5].



(a) Chitosan membrane

(b) Chitin membrane

Fig. 9. Trends of pure water flux (PWF) with change of transmembrane pressure (TMP) and silica particle size for the porous (a) chitosan and (b) chitin membrane [S/C (ratio of silica to chitosan) = 1.5].

며, 인장강도 변화를 Fig. 6에 나타내었다. 이 결과 키토산과 키틴 막 모두에 대해 제막 시 키토산 용액에 함유시킨 실리카 입자의 함유량이 증가할수록 PWF는 증가하였으며, 인장강도는 감소하였다. 이는 Fig. 7의 키토산 막의 표면 SEM 이미지에서 볼 수 있는 바와 같이 실리카 입자의 함유량이 증가함에 따라 막에 더 많은 세공이 형성되기 때문에 PWF는 증가하며, 인장강도는 감소한 것으로 사료된다.

또한 키토산 막과 키틴 막의 PWF [Fig. 5(a)와 (b)] 및 인장강도[Fig. 6(a)와 (b)]를 서로 비교해 보면, 실리카 입자의 함유량이 동일한 조건에서 키틴 막은 키토산 막에 비해 PWF는 낮고, 인장강도는 크게 나타났다. 키틴 막은 가교시키지 않은 다공성 키토산 막을 아세틸화시켜 제조하였는바, Fig. 8에 나타낸바와 같이 막 세공의 상당부분이 아세틸화 반응으로 인해 크기가 줄어들어 다공도가 감소하였기 때문으로 생각된다. 평

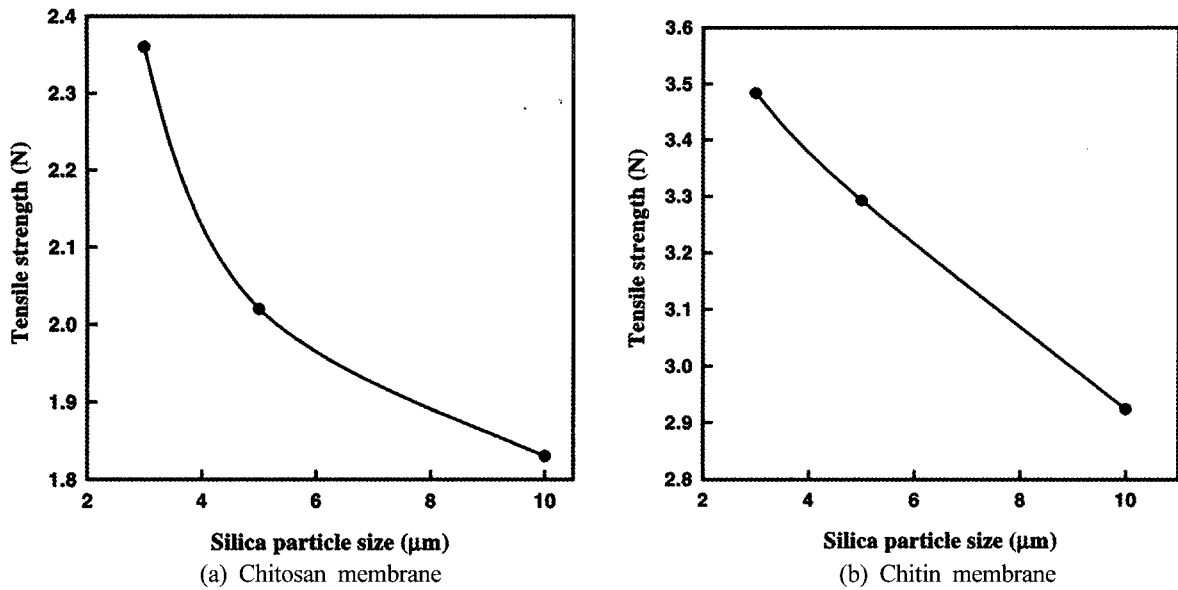


Fig. 10. Trends of tensile strength with change of silica particle size for the porous (a) chitosan and (b) chitin membrane [S/C (ratio of silica to chitosan) = 1.5].

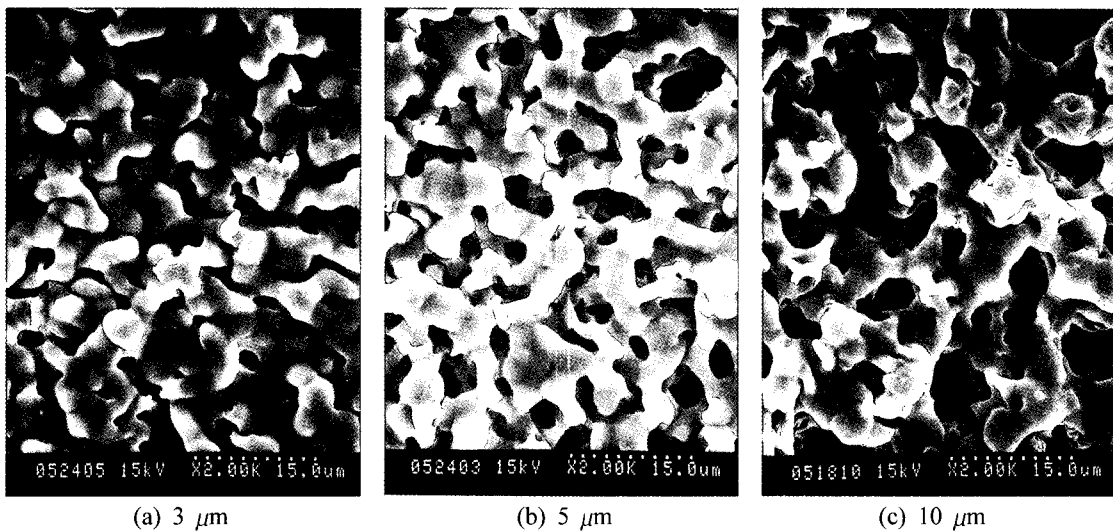


Fig. 11. Surface morphology of the porous chitosan membranes with change of silica particle size [S/C (ratio of silica to chitosan) = 1.5].

균 입경 5 μm인 실리카 입자를 S/C = 1.5의 비율로 함유시킨 상태에서 제조된 키토산 막의 다공도는 32.4%, 키틴 막의 다공도는 28.7%로 측정되었다.

다공성 키토산 막 및 키틴 막의 제조에 있어 기공 형성제인 실리카 입자의 최적 함유량 비율로는 S/C = 1.5로 결정하였는데, 실리카의 함유량 비율이 1.5보다 크면 막의 인장강도가 낮아 막모듈에 막을 장착할 때

O-ring과의 접촉부위가 파열되는 문제가 발생하며, 함유량 비율이 1.5보다 작으면 PWF가 20 L/m² · hr 이하로 낮아져 기공 형성제인 실리카 입자의 사용 효과가 없어지게 되기 때문이다.

3.1.2. 실리카 입자의 최적 입경

키토산 용액에 함유시킨 실리카 입자의 함유량 비율

Table 1. Physical Properties of Porous Chitosan and Chitin Membranes

Physical property	Chitosan membrane	Chitin membrane
Stability in 5 vol% acetic acid solution (pH 2.5)	Insoluble (for the crosslinked chitosan membrane)	Insoluble
Pure water flux at 100 kPa	52 L/m ² · hr	30 L/m ² · hr
Porosity	32.4%	28.7%
Pore volume	0.002 cc/g	0.00185 cc/g
Specific surface area	2.66 m ² /g	2.01 m ² /g

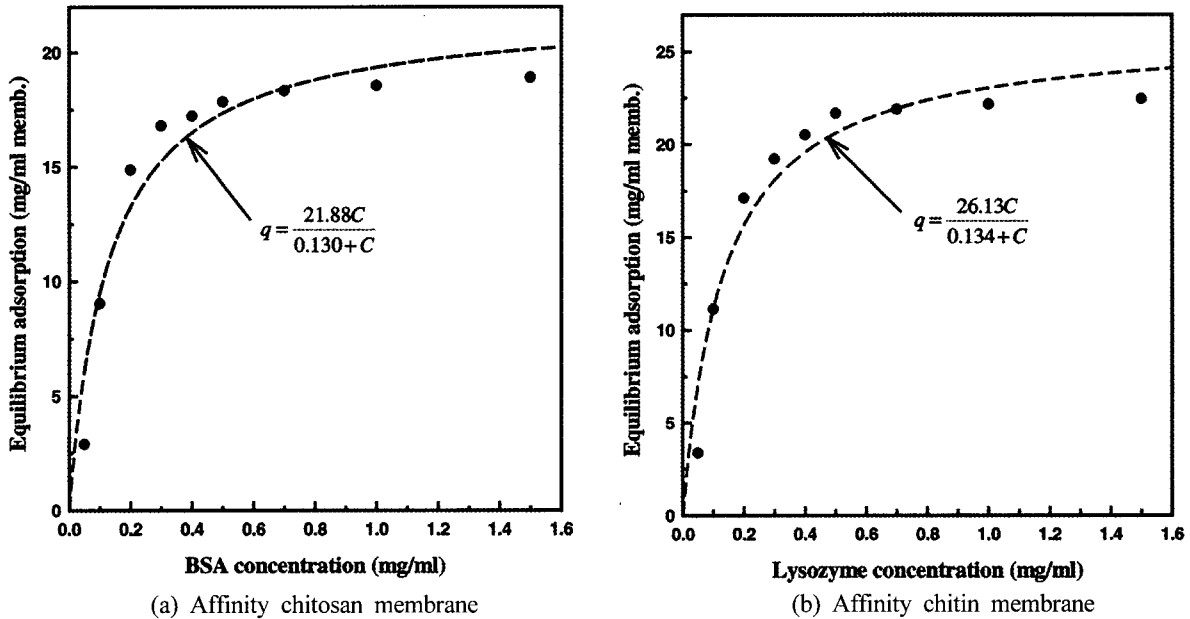


Fig. 12. Equilibrium adsorption isotherms of (a) BSA on affinity chitosan membrane and (b) lysozyme on affinity chitin membrane.

을 1.5로 일정하게 유지시킨 상태에서 실리카 입경의 변화에 따라 제조된 다공성 키토산 막과 키틴 막의 막간 압력차(transmembrane pressure; TMP)에 따른 PWF 변화를 Fig. 9에 나타내었으며, 인장강도 변화를 Fig. 10에 나타내었다. 이 결과 키토산과 키틴 막 모두에 대해 함유시킨 실리카 입자의 크기가 커짐에 따라 PWF는 증가하였으며, 인장강도는 감소하였다. 이는 Fig. 11의 키토산 막의 표면 SEM 이미지에서 볼 수 있는 바와 같이 함유시킨 실리카 입자의 입경이 증가함에 따라 막에 형성된 세공의 크기가 커지기 때문에 PWF는 증가하며, 인장강도는 감소한 것으로 생각된다.

다공성 키토산 막 및 키틴 막의 제조에 있어 기공형성제인 실리카 입자의 최적 입경으로는 5 μm 크기를 결정하였는바, 실리카의 최적 함유량 결정 때와 같은 이유로써 실리카의 입경이 5 μm보다 크면 인장강도가 낮아 막의 파열이 발생하며, 입경이 5 μm보다 작

으면 PWF가 20 lmh 이하로 낮아지기 때문이다. 결론적으로 다공성 키토산 막 및 키틴 막의 제조 시 키토산 용액에 입경 5 μm인 실리카 입자를 S/C = 1.5의 비율로 함유시켜 막을 제조하였을 때 가장 적절한 투과량 수준과 물리적 강도를 나타내었다.

위의 실험을 통해 다공성 키토산 막 및 키틴 막의 제막 시 기공형성제인 실리카 입자의 크기 및 함유량을 달리함으로써 막의 세공특성 조절이 가능함을 확인하였다. 최적의 제막조건(실리카 입경 = 5 μm, S/C = 1.5)에서 제조된 다공성 키토산 및 키틴 막의 물리적 특성치를 총괄하여 Table 1에 나타내었다. 이 결과 키토산 막(가교결합시킨 막)과 키틴 막 모두 5 vol% 아세트산 용액(pH 2.5)에 불용으로서 충분한 정도의 산안정성을 나타내었으며, 키틴 막의 PWF, 다공도, 세공부피 및 비표면적은 키토산 막에 비해 모두 작은 값을 나타내었다.

3.2. 친화 막의 특성

친화 키토산 막에 결합된 CB3GA 염료의 양(막 단위 부피당 결합량)을 Chambers법[16]을 사용하여 측정 한 결과 40.2 μmol/mL이었다. 이 염료 결합량 값은 관 크로마토그래피의 고정상 입자로 널리 사용되고 있는 agarose hydrogel bead에 결합되는 반응성 염료의 양이 1~10 μmol/mL인 것[17]과 비교할 때, 수~수십 배 큰 값이다.

또한 친화 키토산 막에의 BSA 단백질의 흡착량과 친화 키틴 막에의 lysozyme 효소의 흡착량을 측정하여 이를 Fig. 12에 나타내었다. 이 결과 두 종류 막에 흡착된 BSA의 양과 lysozyme의 양은 단백질 및 효소 용액의 농도가 낮은 영역에서는 용액의 농도가 증가함에 따라 거의 직선적으로 증가하며, 약 0.2 mg/mL 이상의 농도 영역에서는 용액의 농도가 증가하여도 흡착량의 증가가 거의 없이 평형상태에 도달하는 전형적인 Langmuir 흡착 거동을 나타내고 있다. 일반적으로 리간드인 CB3GA와 BSA 단백질, 키틴의 아세트아미드기와 lysozyme 효소는 1 : 1 결합을 하는 것으로 알려져 있으며[14], 따라서 Fig. 12의 흡착실험 결과를 다음의 단분자 흡착에 대한 Langmuir 흡착 등온식으로 해석하였다.

$$q = q_m \cdot C / (K + C) \tag{2}$$

- 여기서, C : 용액의 농도(mg/mL)
- q : 친화 막에의 흡착량(mg/mL membrane)
- q_m : 최대 평형 흡착량(mg/mL membrane)
- K : Langmuir 상수(mg/mL)

이 결과 친화 키토산 막의 Langmuir 상수(K) 값은 0.130 mg/mL이었고, BSA 단백질의 최대 평형 흡착량(결합용량, q_m)은 21.83 mg/mL membrane이었다. 또한 친화 키틴 막의 Langmuir 상수 값은 0.134 mg/mL, lysozyme 효소의 평형 결합용량은 26.13 mg/mL membrane이었다. 이 평형 결합용량 값들은 관 크로마토그래피 용도로서 키토산 또는 키틴을 기반으로 하여 제조된 hydrogel bead의 단백질(효소 포함)에 대한 평형 결합용량이 2~5 mg/mL인 것[18,19]과 비교할 때, 수~수십 배 큰 값이다.

본 연구에서 제조된 친화 키토산 막과 키틴 막의 반

응성 염료 고정화량 및 단백질과 효소에 대한 평형 결합용량 값이 관 크로마토그래피용 hydrogel bead와 비교하여 수~수십 배 큰 이유는 실리카 입자를 기공 형성제로 사용함으로써 다공도와 비표면적인 큰 다공성 키토산 및 키틴 막의 제막이 가능하였기 때문이다. 따라서 본 연구를 통해 제조된 친화 키토산 막과 키틴 막은 단백질과 효소의 친화 막 크로마토그래피에 효과적인 사용이 기대된다.

4. 결 론

기공 형성제로 실리카 입자를 사용하여 단백질 및 효소에 대한 친화력이 우수한 다공성 키토산 및 키틴 막을 제조하였다. 제조된 막의 물리적 특성을 검토하여 최적의 제막 조건을 결정하였으며, BSA와 lysozyme의 평형 결합용량을 측정하여 막여과 크로마토그래피용 친화 막으로서의 특성을 검토한 결과 다음의 결론을 얻었다.

- 1) 다공성 키토산 막 및 키틴 막의 제조 시 기공 형성제인 실리카 입자의 크기 및 함유량을 달리함으로써 막의 세공특성 조절이 가능하였으며, 평균 입경 5 μm의 실리카 입자를 키토산에 대한 실리카 입자의 함유량 비(S/C)가 1.5인 조건에서 제막하였을 때 가장 적절한 물리적 강도와 투과량을 갖는 다공성 키토산 막과 키틴 막을 제조할 수 있었다.
- 2) 다공성 키토산 막에 단백질 친화성을 부여하기 위해 Cibacron Blue 3GA 반응성 염료를 40 μmol/mL의 농도로 고정화하였으며, 이 고정화 양은 통상의 hydrogel bead에의 염료 고정화 양에 비교하여 수~수십 배 큰 값이다.
- 3) 친화 키토산 막의 BSA 단백질 결합용량은 약 22 mg/mL이었으며, 친화 키틴 막의 lysozyme 효소 결합용량은 약 26 mg/mL로서 제조된 막의 단백질과 효소에 대한 결합 용량이 우수하여, 막여과 크로마토그래피용 친화 막으로서의 효과적인 활용이 기대된다.

감 사

이 논문은 2004학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음(This work was supported by the research grant of the Chungbuk

National University in 2004).

참 고 문 헌

1. J. F. Kennedy, "Recovery Processes for Biological Materials", John Wiley & Sons, New York, NY (1993).
2. P. D. G. Dean, W. S. Johnson, and F. A. Middle, "Affinity Chromatography; a Practical Approach", IRL Press, Oxford (1985).
3. F. H. Arnolds, H. W. Blanch, and C. R. Wilke, "Analysis of affinity separation", *Chem. Eng. J.*, **30**, B9 (1985).
4. R. P. W. Scott, "Liquid Chromatography Column Theory", John Wiley & Sons, New York, NY (1992).
5. S. Brandt, R. A. Goffe, S. B. Kessler, J. L. O'Conner, and S. E. Zale, "Membrane-based affinity technology for commercial scale purification", *Biotech.*, **6**, 779 (1988).
6. K. G. Brief and M. R. Kula, "Fast protein chromatography on analytical and preparative scale using modified microporous membrane", *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 141 (1992).
7. K. J. Lee and K. H. Youm, "A study on affinity chromatography of protein by flat and hollow-fiber membrane module", *Membrane J.*, **8**, 50 (1998).
8. X. Zeng and E. Ruckenstein, "Membrane chromatography: preparation and applications to protein separation", *Biotechnol. Prog.*, **15**, 1003 (1999).
9. S. Hirano and S. Tokura, "Chitin and Chitosan", Proceedings of 2nd International Conference on Chitin and Chitosan, Sapporo, Japan (1982).
10. X. Zeng and E. Ruckenstein, "Control of pore sizes in macroporous chitosan and chitin membranes", *Ind. Eng. Chem. Res.*, **35**, 4169 (1996).
11. R. K. Scopes, "Protein Purification", 2nd ed., Springer-Verlag, New York, NY (1987).
12. S. S. Nam, B. Y. Seo, and D. S. Lee, "Dye Chemicals", Boseong Publication Co., Seoul, pp. 261 (1993).
13. S. Angel and P. D. G. Dean, "The effect of matrix on the binding of albumin to immobilized Cibacron Blue", *Biochem. J.*, **167**, 301 (1977).
14. T. Atkinson, P. M. Hammond, R. D. Hartwell, P. Hughes, M. D. Scawen, R. F. Sherwood, D. A. P. Small, C. J. Bruton, M. J. Harvey, and C. R. Lowe, "Triazine-dye affinity chromatography", *Biochem. Soc. Trans.*, **9**, 290 (1981).
15. E. Ruckenstein and X. Zeng, "Macroporous chitin affinity membranes for lysozyme separation", *Biotech. Bioeng.*, **56**, 610 (1997).
16. G. K. Chambers, "Determination of Cibacron Blue F3GA substitution in Blue Sephadex and Blue Dextran-Sepharose", *Anal. Biochem.*, **83**, 551 (1997).
17. C. R. Lowe and J. C. Pearson, "Affinity chromatography on immobilized dyes", *Methods In Enzymol.*, **104**, 97 (1994).
18. T. Imoto and K. Yagishita, "Chitin coated cellulose as an adsorbent of lysozyme-like enzymes: preparation and properties", *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 465 (1973).
19. I. Safarik and M. Safarikova, "Batch isolation of hen egg white lysozyme with magnetic chitin", *J. Biochem. Biophys. Methods*, **27**, 327 (1993).