

## 친화막의 L-tryptophan 흡착특성

홍 병 표 · 변 홍 식<sup>†</sup>

계명대학교 화학시스템공학과

(2008년 8월 25일 접수, 2008년 9월 23일 채택)

### Adsorption Characteristic of L-tryptophan of Affinity Membrane

Byungpyo Hong and Hongsik Byun<sup>†</sup>

Department of Chemical System Engineering, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

(Received August 25, 2008, Accepted September 23, 2008)

**요 약:** 전기방사를 이용하여 polyethersulfone (PES)-bovin albumin serum (BSA) 단백질 친화막을 제조하였으며, 이때 전기방사에 의한 공정상의 문제점을 용해도가 높고, 끓는점이 높은 2,2,3,4,4,4-Hexafluoro-1-butanol (HFB)를 공용매로 사용함으로써 해결하였다. 또한 공용매는 최적의 온도, 습도 범위를 확대시켜줌으로써 친화막의 대량 생산이 용이하리라 생각한다. 제조된 친화막은 biuret test를 통하여 친화막의 색깔이 무색에서 보라색으로 변함으로써 PES 섬유 내 BSA가 존재함을 확인할 수 있었다. 완충용액의 조성 성분 중 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 세척과정에서 BSA와 L-tryptophan사이의 해리를 제어함으로써 용출과정에서 비교실험보다 약 5배의 높은 용출량을 보여주었다.

**Abstract:** Protein affinity membranes based on PES-BSA was prepared by the electrospinning method. The process problem caused by the electrospinning was solved by using HFB having high solubility and boiling point. It was expecting that the mass production of protein affinity membrane would be possible with broad range of optimized temperature and humidity. BSA in the PES nanofiber was confirmed by the color change from colorless to violet during the biuret test. The buffer solution with DMSO showed that the amount of elution was 5 times higher than the one when the buffer solution without DMSO was used. This is due to the restriction effect of DMSO on the dissociation of L-tryptophan from BSA during the washing step.

**Keywords:** protein affinity membrane, PES, BSA, electrospinning

#### 1. 서 론

필수 아미노산인 L-tryptophan은 발육, 성장과 같은 생명유지에 반드시 필요한 아미노산이며, 의약품 및 식품첨가제로서 용도가 매우 높음에도 고가를 유지하고 있어 이를 경제적으로 생산하기 위한 공정이 요구된다. 현재 가장 경제적인 tryptophan의 산업적 생산방법에는 화학적 합성공정이 주를 이루지만, 이 공정에서는 D, L-tryptophan이 함께 합성된다. 이를 고순도로 정제하기 위해서는 다단계의 분리공정이 요구되어져 비용의 증가를 발생시켜 제품의 경제성을 갖기 위해서는 보다 효

율적인 분리공정이 필요하겠다[1,2]. Tryptophan과 같은 키랄화합물을 분리하기 위하여 크로마토그래피 기술이 발전하게 되었으며[3], 최근 키랄 약품의 중요성이 부각됨에 따라 고부가가치의 의약품을 고순도로 분리하는 기술의 개발이 의약 및 정밀화학 생산 공정에 커다란 기술적, 경제적 파급효과를 가져오리라 예상된다[4].

친화크로마토그래피를 이용한 단백질, 아미노산의 분리는 특이적인 친화력에 의하여 목적 생체물질만을 흡착함으로써 고순도의 목적물을 분리할 수 있다. 하지만, 충전관은 마이크론 크기의 단분산 입자를 사용함에 따라 압력강하가 높고, 고정상인 hydrogel bead의 압축에 의한 막힘과 오염 현상 때문에 이동상의 흐름이 작아 생산성이 낮다는 단점을 갖고 있다. 이러한 이유 때문

<sup>†</sup>주저자(e-mail : hsbyun@kmu.ac.kr)

에 충전관을 이용하여 scale-up시켜 생산하는 방법은 생산규모의 적용에 한계가 있다[5].

이러한 문제점을 해결하기 위하여 다공성 막에 친화 리간드를 고정시킨 친화막(Affinity membrane)을 이용하는 방법이 연구되어져 왔다. 현재까지의 친화막 제조는 총 3단계의 공정(① 기질막 제조 ② 기질막 활성화 ③ 활성화된 기질막에 친화 리간드를 결합시켜 제조)을 요구함으로써 많은 비용과 시간을 필요로 하여 왔다. 따라서, 본 연구에서는 공정의 단순화를 통하여 대량생산이 가능한 친화막을 제조하고 이의 단백질분리흡착 특성을 살펴보고자 하며, 기존의 전기방사로 제조하는 방법에서 발생된 문제점인 clogging 현상을 제어하고자 한다[6].

## 2. 실험

### 2.1. 실험재료

친화막 제조에는 Solvay 사의 Radel H-3000 (PES)을 180°C에서 3시간 건조하여 사용하였으며, BSA는 Sigma-Aldrich사의 A8022를 정제없이 사용하였다. 용매로는 Aldrich사의 HFP (1,1,1,3,3-Hexafluoro-2-propanol)과 HFB을 사용하였다.

완충용액은 Aldrich 사에서 공급받은 시약으로 제조하였으며, Sodium tetraborate, DMSO, Acetic acid를 정제없이 사용하였다. 흡착특성을 분석하기 위하여 사용된 단백질은 L-tryptophan이다.

Biuret test 용액 제조에는 Potassium hydroxide (KOH), Copper(II) sulfate (CuSO<sub>4</sub>)를 사용하였다.

### 2.2. 친화막 제조

전기방사를 하기 위한 고분자 용액은 고분자, good solvent, poor solvent로 이루어지나 기존 연구에서는 사용된 고분자의 특성으로 인하여 한 가지 용매만을 사용하였다. 하지만 용매의 낮은 끓는점으로 인하여 방사과정 중에 주사기 끝에서 clogging 현상을 초래하였다. 이를 해결하기 위하여 온도와 습도를 조절하여 개선시킬 수 있었으나 적극적인 대안은 될 수 없었다. 이에 본 연구에서는 용질에 대하여 용해도가 뛰어나고, 끓는점이 높은 HFB를 사용하여 이를 해결하고자 하였고, 방사 중에 발생하는 clogging 현상의 비교를 위하여 방사 후 clogging 발생시간을 측정하여 비교하였다.

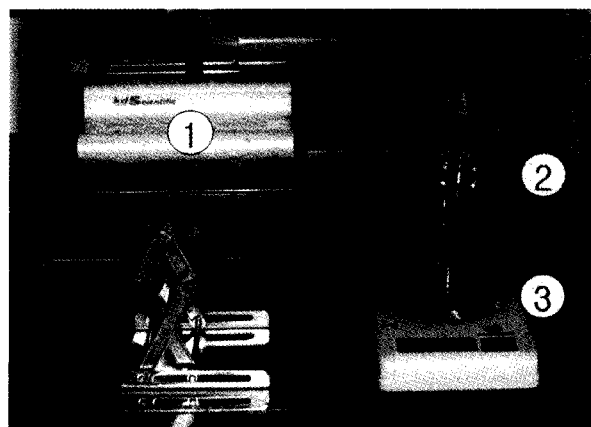


Fig. 1. Experimental apparatus for the L-tryptophan adsorption; ① Syringe pump ② Membrane holder ③ Permeate measurement.

### 2.3. Biuret Test

펩타이드 결합을 확인하는 화학적인 방법이며, 알칼리 용액에서 펩타이드 결합내의 질소가 구리이온(II)과 결합하여 구리이온(I)으로 변하면서 용액의 색깔이 푸른색에서 보라색으로 변하게 된다[7]. Biuret test 용액에 친화막이 반응하여 색깔의 변화를 관찰할 수 있다면 이것은 친화막 내 BSA가 존재하고 있음을 확인할 수 있는 방법이 된다. 따라서, 본 연구에서는 고체상태의 친화막에 biuret test를 실시하여 펩타이드 결합에 의한 색깔 변화를 확인하여 PES 섬유 내 BSA의 존재를 확인하고자 하였다.

### 2.3. 친화막의 단백질 흡착특성

먼저 제조된 친화막을 borate 완충용액을 이용하여 완충용액의 pH, L-tryptophan 농도 및 투과속도를 변화시켜 흡착특성을 분석하였다. 완충용액의 pH는 acetic acid를 이용하였다. 그리고, 완충용액 제조 시 DMSO의 첨가에 따른 흡착특성도 분석하였다. Fig. 1과 같은 장치를 제작하여 투과된 용액에 대하여 UV/visible spectrophotometer (UV-1650PC, Shimadzu, Japan)을 이용하여 280 nm에서 흡광도를 비교분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 친화막 제조

친화막 제조 시 구성 용액 중 HFB 첨가에 따른 clogging 발생시간을 비교하였으며, Table 1에 나타내었다. 전기방사용액의 구성은 고분자 용질, good solvent,

**Table 1.** Clogging Occurrence Time by Electrospinning Condition

Sample code	Occurrence time		Composition			Remarks
	Good humidity	Bad humidity	PES	BSA	Solvent (HFP : HFB)	
#700	< 5 min	< 1 min 30 s	7	0	100:0	
#711	< 4 min	< 1 min	7	0.7	100:0	
#721	< 3 m 45 s	< 1 min	7	1.4	100:0	
#811	< 4 min	< 1 min	8	0.8	100:0	
#821	< 4 min	< 1 min	8	1.6	100:0	1. optimized temp. condition
#611	> 1 hr	< 5 min	6	0.6	85:15	
#612	> 1 hr	< 5 min	6	0.6	80:20	2. same spinning condition
#613	> 1 hr	< 5 min	6	0.6	75:25	
#621	> 1 hr	< 5 min	6	1.2	85:15	
#622	> 1 hr	< 5 min	6	1.2	80:20	
#623	> 1 hr	< 5 min	6	1.2	75:25	

poor solvent로 나누어지나, 본 연구에서 사용된 용매 (HFB + HFP)는 모두 고분자 용질을 용해시키는 good solvent로서 사용되었다. 전기방사에서 용매의 역할은 고분자용액의 점도를 조절하여 나노섬유의 크기를 제어함과 동시에 나노섬유의 발생조건을 용이하게 한다. 이러한 관점에서 용매는 good solvent와 poor solvent의 최적의 조성을 파악하여 사용하여야 하나, 본 연구에서 사용된 용매는 HFP와 HFB 모두 good solvent로 사용되어 나노섬유의 제조에서 poor solvent의 역할이 제한됨으로써 제조공정에서 문제점이 발생되리라 예상되어졌다. 그러나 본 연구에서는 HFB 용액이 poor solvent와 같은 역할, 즉 용매의 휘발을 제어함으로써 최적의 온도, 습도 조건(20~27°C, 45~65%)에서 방사 중에 발생하는 clogging 발생을 느리게 하여 친화막 제조용 나노섬유가 지속적으로 생산되었다. 따라서 본 연구에서 사용된 공 용매로 인하여 온도, 습도의 최적 조건 범위가 확대됨으로써 친화막의 대량생산이 가능하리라 생각한다.

### 3.2. Biuret Test

Biuret test는 단백질의 함량이 5~160 mg/mL까지 검출할 수 있는 방법으로 용액상태에서 단백질의 함량을 정성, 정량적으로 분석하는 방법이다[7]. 본 연구에서 제조된 막은 고체상태지만 biuret test를 시도하였으며, 그 결과 고체상태에서도 분석이 가능하다는 것을 알 수 있었다. Fig. 2의 결과처럼 용액에 침지 후 24시간 이내에 흰색의 막이 보라색으로 변하는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 PES 나노섬유에 BSA가 존재함을 biuret test를 통하여 확인 할 수 있었다.

### 3.3. 친화막의 L-tryptophan 흡착특성

제조된 친화막을 sodium tetraborate 완충용액을 이용하여 완충용액의 pH, L-tryptophan 농도 및 투과속도를 변화시켜 흡착특성을 분석하였다. 흡착과과곡선은 DEV (용출부피/막 부피) 또는 sequence number에 대하여 UV spectrophotometer의 측정된 흡광도 값을 Cp/Co (Cp: 투과용액의 농도, Co: 초기농도)로 나타내었으며, Fig. 3과 Fig. 4(a)의 완충용액에는 DMSO가 포함되어 있지 않으며, Fig. 4(b)의 완충용액에는 DMSO가 포함되어 있다.

Fig. 3의 결과를 보면 완충용액의 pH를 변화시킨 조건(a)에서는 초기 흡착능은 pH가 낮을 때 우수하나, 전체적으로는 비슷한 결과를 보였다. pH 8.5~9.46까지는 L-tryptophan의 흡착능에 큰 차이가 없음을 알 수 있었고, 이때 pH는 sodium tetraborate 용액에 HCl을 첨가하여 조절하였다. 두 번째, L-tryptophan의 초기농도를 변화시켜 흡착능을 분석한 결과 Cp/Co의 비율에는 큰 변화가 없으나, Cp/Co가 같은 값을 가질 경우 정량적인 비교에서 초기 농도가 높을 때 더 많은 흡착량을 보이는 것으로 분석할 수 있다. 이것은 초기농도가 높을수록 L-tryptophan의 함량이 높아서 리간드와 리게이트간의 상호작용이 빈번하게 일어난 결과로 생각된다. 세 번째, 투과유속에 따른 흡착능을 분석한 결과 투과유속

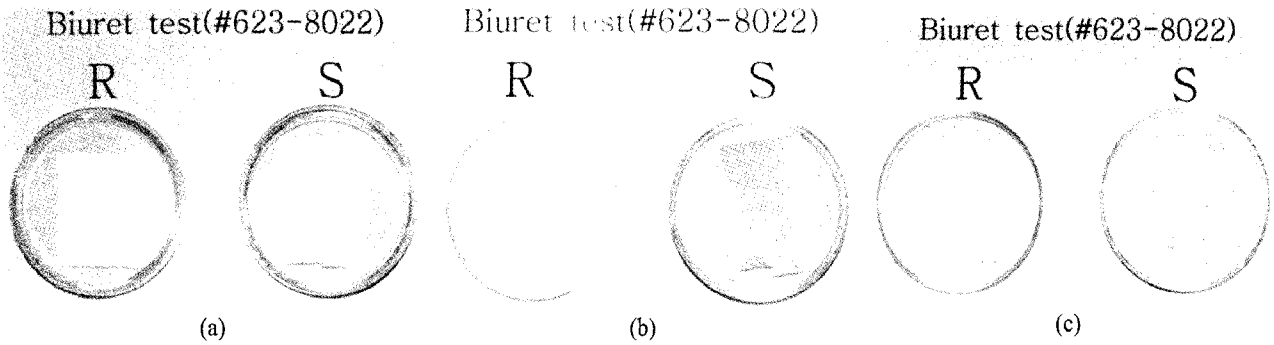


Fig. 2. Biuret test, R: Membrane in water, S: Membrane in biuret solution ; (a) initial condition, (b), (c) Color change to violet confirms BSA exists in the membrane.

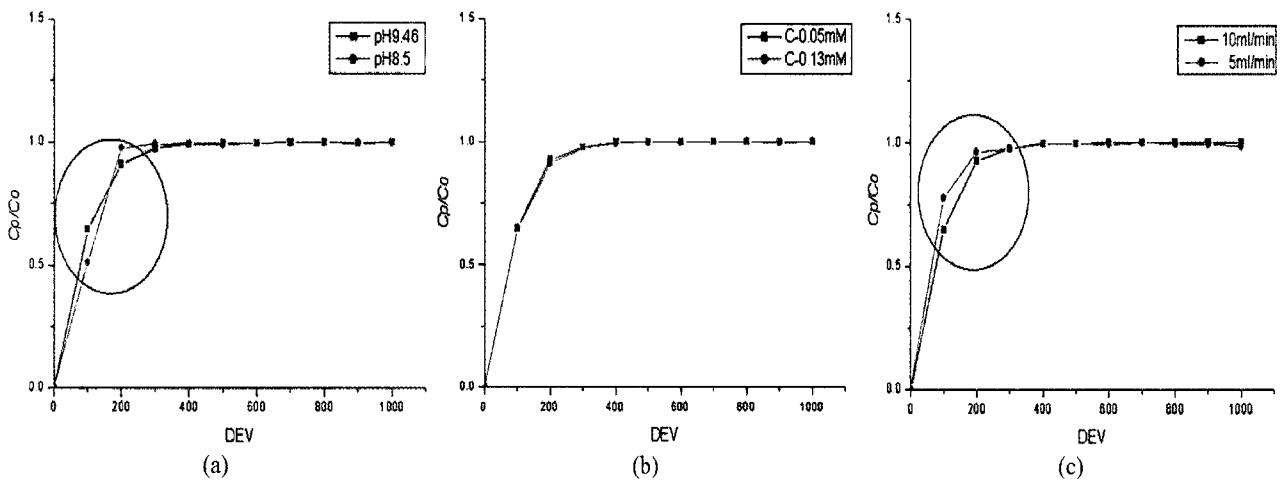


Fig. 3. Breakthrough curves of adsorbed L-tryptophan; changed condition of (a) pH, (b) concentration of L-tryptophan, (c) flow rate (\*DEV = effluent volume/membrane volume).

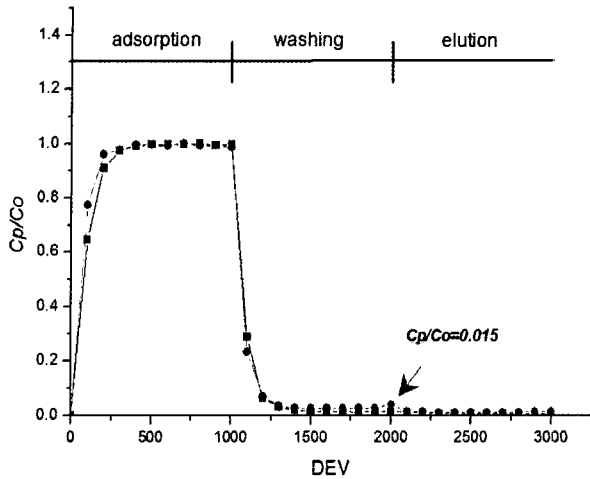
이 빠른 것(10 mL/min)이 늦은 것(5 mL/min)보다 더 많은 흡착이 일어나는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 일반적으로 알려진 BSA의 흡착능력이 투과유속과 관련이 없다는 것과 상이한 결과이다[8]. 본 연구에서는 빠른 유속으로 인한 리간드와 리게이트와의 빈번한 반응과 리게이트의 분리에 따른 새로운 흡착이 신속하게 일어나는 결과로 투과유속에 따라 흡착능의 변화가 발생되었다고 생각한다. 그러나, 이 경우에도 투과시간을 동일하게 하여 비교할 경우 흡착능력이 투과유속에 따라 큰 변화가 없다는 것을 알 수 있다.

친화막의 흡착과 세척, 용출과정은 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4(a)과 같이 친화막의 흡착, 세척, 용출과정에서 흡착이 일어남을 확인하였으나, 세척과정에서 BSA와 L-tryptophan과의 해리가 일어나 용출과정에서 매우 낮은 양(약 1.5%)의 L-tryptophan 용출되는 것을 알 수 있었다. 반면에 완충용액을 변화시킨 경우 Fig. 4(b)와 같

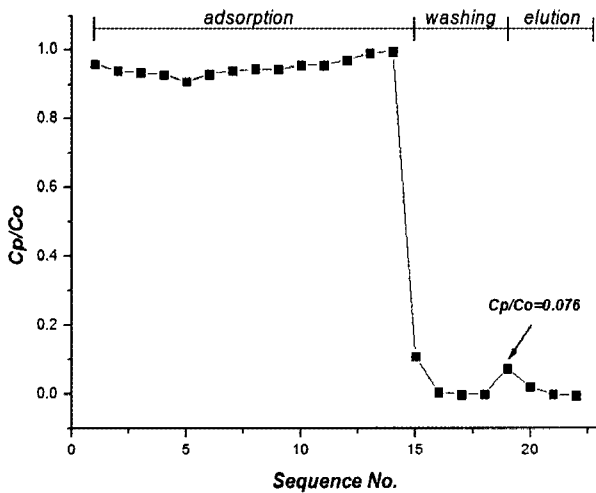
이 용출과정에서 용출량의 차이를 보여주었다. 이때 흡착, 세척과정에 사용된 완충용액은 10 mM의 sodium tetraborate와 1% DMSO를 사용하였고, 용출과정에서는 10 mM sodium borate와 0.1 M의 acetic acid를 사용하였다. Fig. 4(a)과 비교하면, 흡착과정에서는 DMSO 사용 시 낮은 값을 보이나, 세척과정에서 BSA와 L-tryptophan의 해리되는 것을 제어함으로써 용출과정에서 약 7.6%의 L-tryptophan이 용출되는 것을 알 수 있었다.

#### 4. 결 론

전기방사 시 사용된 고분자의 특성으로 단일용매 사용에 따른 문제점이 발생하였다. 이를 해결하기 위하여 용질에 대하여 용해도가 높고, 높은 끓는점을 가지는 HFB를 공용매로 사용하여 clogging을 제어하였으며, 이는 전기방사법에 의한 친화막 제조 시 대량생산의 가



(a)



(b)

**Fig. 4.** Breakthrough curves of adsorbed L-tryptophan at the PES-BSA membranes (a) Buffer solution without DMSO, (b) Buffer solution with DMSO.

능성을 보여 준다. 일반적으로 biuret test는 단백질 용액에서의 단백질을 정성, 정량분석하는 화학적인 방법이지만, 본 연구에서는 고체상태의 막에 적용하여 정성적인 분석이 가능함을 보였고, biuret test의 결과는 섬유 내 PES와 BSA가 공존하고 있음을 보여주었다. 완충용액의 pH, L-tryptophan의 농도, 투과유속을 변화시켜 흡착특성을 분석한 결과, pH의 변화에 따라 흡착능력은 차이가 없었으며, L-tryptophan의 초기농도가 높을수록 정량적인 흡착능력이 우수한 것을 알 수 있었다.

투과유속의 경우 높은 투과유속에서 흡착능력이 더 우수하게 나왔으나, 투과시간을 일정하게 할 경우에는 BSA의 흡착능력이 투과유속에 영향을 받지 않는 결과를 보여주었다. 또한 완충용액의 조성을 변화시켜 관찰하였는데, 완충용액 내 DMSO는 흡착과정에서의 낮은 값을 보였지만, 세척과정에서 BSA와 L-tryptophan과의 해리 작용을 제어함으로써 용출과정에서 DMSO가 없는 경우(Fig. 4(a))와 비교할 때 약 5배의 높은 용출량을 보여주었다.

참 고 문 헌

1. S. Aiba, H. Tsunekawa, and T. Imanaka, "New Approach to Tryptophan Production by Escherichia coli: Genetic Manipulation of Composite Plasmids *In Vitro*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 289 (1982).
2. I. Shiio, S. I. Sugimoto, and K. Kawamura, "Production of L-tryptophan by Azaserine-resistant Mutants of *Brevibacterium flacum*", *Agric. Biol. Chem.*, **46(7)**, 1849 (1982).
3. W. L. Hinze *et al.*, "Liquid chromatographic separation of enantiomers using a chiral. beta-cyclodextrin-bonded stationary phase and conventional aqueous-organic mobile phases", *Anal. Chem.*, **57(1)**, 237 (1985).
4. O. S. Cho and O. D. Kim, "Research on the Development of High Efficiency Separation System", KIST annual report UCE1526-6343-6 (1999).
5. 이광진, 염경호, "평판막 및 실관막 모듈에 의한 단백질의 친화성 크로마토그래피에 관한 연구", *멤브레인*, **8(1)**, 50 (1998).
6. 홍병표, 변홍식, "전기방사법에 의한 친화막 제조", *멤브레인*, **17(1)**, 23 (2007).
7. [http://en.wikipedia.org/wiki/Biuret\\_test](http://en.wikipedia.org/wiki/Biuret_test)
8. 김재훈, 나운재, 김병식, 김민, "BSA고정막에 의한 Tryptophan 이성질체의 분리", *멤브레인*, **16(2)**, 133 (2006).