

단백질 흡착성을 갖는 막 크로마토그래피용 재생 셀룰로오스 기반 음이온 교환 다공성 분리막의 제조

서 정 현*,** · 이 흥 태* · 김 태 경* · 조 영 훈* · 오 택 근**,† · 박 호 식*,†

*한국화학연구원 화학공정연구본부 그린탄소연구센터, **충남대학교 농업생명과학대학 농화학과
(2022년 10월 13일 접수, 2022년 10월 18일 수정, 2022년 10월 18일 채택)

Preparation of Protein Adsorptive Anion Exchange Membrane Based on Porous Regenerated Cellulose Support for Membrane Chromatography Application

Jeong-Hyeon Seo**, Hong-Tae Lee*, Tae-Kyung Kim*, Young-Hoon Cho*, Taek-Keun Oh**,†, and HoSik Park*,†

*Green Carbon Research Center, Chemical and Process Technology Division,
Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 34114, Korea

**Department of Bio-Environmental Chemistry, College of Agriculture and Life Science,
Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

(Received October 13, 2022, Revised October 18, 2022, Accepted October 18, 2022)

요약: 바이오산업의 발전으로 의약품, 식품 등의 생산 과정의 분리/정제 공정에 사용되어 왔던 기존의 컬럼 크로마토그래피를 대체하여 더 높은 처리효율을 갖는 막 크로마토그래피가 부상하고 있다. 본 연구에서는 서로 다른 기공 크기의 두 가지 상용 셀룰로오스 아세테이트(Cellulose acetate, CA) 분리막을 탈아세틸화 과정을 통해, 리간드의 개질이 용이한 다공성 재생 셀룰로오스 지지체를(Regenerated cellulose, RC) 제조하였다. 음이온 교환능을 부여하고자 grafting을 수행하였으며, 구체적으로는 UV 중합법을 통해 4차 암모늄을 포함하는 음이온 교환 리간드(MAPTAC)를 부착하여 음이온 교환용 흡착막을 제조하였다. 단백질 흡착 용량은 정적 흡착 용량(Static binding capacity, SBC)시험을 통해 총 단백질 흡착 용량을 측정했고, 동적 흡착 용량(Dynamic binding capacity, DBC)을 측정하여 상용막과 비교 평가하였다. 성능 평가 결과 단백질 흡착량은 넓은 표면적에 의해 리간드 밀도가 높은, 기공 크기가 작은 순서로 높게 측정되었고, 상용 CA분리막을 탈아세틸화하고 리간드를 부착시킨 분리막(RC 0.8 + MAPTAC 43.69 mg/ml, RC 3.0 + MAPTAC 36.33 mg/ml)이 상용 막 크로마토그래피 제품(28.38 mg/ml) 대비 높은 흡착 용량을 보였다.

Abstract: With the development of the bio industry, membrane chromatography with a high adsorption efficiency is emerging to replace the existing column chromatography used in the downstream processes of pharmaceuticals, food, etc. In this study, through the deacetylation reaction of two commercial cellulose acetate (CA) membranes with different pore sizes, the porous regenerated cellulose (RC) supports for membrane chromatography were obtained to attach the anion exchange ligands. The adsorptive membranes for anion exchange were prepared by attaching an anion exchange ligand ([3-(methacryloylamino) propyl] trimethylammonium chloride) containing quaternary ammonium groups on the RC supports by grafting and UV polymerization. The protein adsorption capacities of the prepared membranes were obtained through both the static binding capacity (SBC) and the dynamic adsorption capacity (DBC) measurement. As a result, the membrane chromatography with the smaller the pore size, the larger the surface area showed the highest protein adsorption capacity. Membrane chromatography which was prepared by using deacetylated commercial CA support with MAPTAC ligand (i.e., RC 0.8 + MAPTAC: 43.69 mg/ml, RC 3.0 + MAPTAC: 36.33 mg/ml) showed a higher adsorption capacity compared to commercial membrane chromatography (28.38 mg/ml).

Keywords: ion-exchange membrane chromatography, cellulose membrane, UV polymerization, protein binding capacity

†Corresponding author(Teak-Keun Oh: e-mail: ok5382@cnu.ac.kr; <http://orcid.org/0000-0003-0215-0427>

HoSik Park: e-mail: hspark@kriect.re.kr; <http://orcid.org/0000-0002-5151-1113>)

1. 서 론

바이오산업이 발전함에 따라 의약, 식품, 에너지 생산 등의 분야로부터 고부가가치 생산물이 산업적 규모로 다양하게 생산되고 있다. 특히 의약품이나 식품 분야에서 생물반응공정을 통해 생산되는 혼합물로부터의 유용성분 분리/정제는 생산공정에 있어 매우 중요하다. 따라서 분리/정제에 대한 수요 또한 급격히 증가하고 있는 추세다. 바이오 제품 생산은 업스트림, 다운스트림의 다단계 공정을 통해 이루어지며, 특히 분리/정제 과정은 공정이나 비용적 측면에서 상당한 중요도를 가진다. 따라서 효율적이며, 경제적인 생산 공정을 위해 분리/정제 공정에 대한 기술개발은 매우 중요하다[1,2].

크로마토그래피는 우수한 선택성을 바탕으로 다양한 분리/정제 공정에 활용되었으나, 소량의 정제에 국한되는 기술이었다. 하지만 고순도 정제 기술을 필요로 하는 바이오산업에 적용되기 시작하면서, 대규모 공정에 대한 기술 개발이 활발히 이루어지고 있다[3,4]. 기존의 크로마토그래피는 주로 레진이 충전되어 있는 컬럼 크로마토그래피로 고순도의 정제에 널리 사용되었으나, 충전물 사용으로 인한 낮은 공극률과 컬럼 내부의 오염, 그리고 낮은 유속 등으로 인해 분리/정제의 효율이 낮다는 단점을 가진다. 이 때문에 대량생산을 위한 생산 규모 확장에 상당한 어려움이 있다[5].

컬럼 크로마토그래피의 단점을 보완하기 위해 다공성 평막이나 중공사 막이 대체수단으로 부각되고 있고, 이들 분리막에 리간드를 결합시킨 막 크로마토그래피에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 막 크로마토그래피는 기존의 크로마토그래피 기술에 분리막 여과 기술을 응용한 분리/정제 공정 기술이다. 막 크로마토그래피는 1마이크로미터 내외 크기의 기공을 가지며, 이로 인해 용질이 대류에 의해 이동을 하게 된다. 이로

인해 물질전달저항이 컬럼 크로마토그래피에 비해 작고, 빠른 유속으로 운전이 가능하다. 따라서 막 크로마토그래피는 분리/정제 과정의 시간을 단축시킴과 동시에 높은 생산성을 보이며, 최근 바이오산업에서 빠르게 도입되고 있는 일회성(Single-use, disposable) 또는 연속식 다운스트림 공정에 적합한 측면에서 장점이 있다 [6,7].

막 크로마토그래피는 분리막의 다공성으로 인해 높은 유속을 가지며, 대류 이동을 통해 목적 생체분자가 리간드에 쉽게 접근할 수 있다. 다공성 막의 제조를 위해 일반적으로 재생 셀룰로오스(RC), 폴리에테르설폰(PES) 등의 고분자가 사용된다. 특히, 셀룰로오스의 경우 친수성 물질로 반응성이 좋은 풍부한 하이드록시 그룹을 가지고 있어 리간드 부착에 용이하여 막 크로마토그래피용의 고분자 소재로 많이 사용된다[8,9]. 이들 고분자 막의 기공 크기는 0.1 μm 부터 5 μm 정도이며, 두께는 매우 얇아서 기공 내 용액 흐름에서의 물질전달저항이 매우 작다. Sartorius사의 Sartobind 막 크로마토그래피 제품의 경우 3~5 μm 급 기공의 셀룰로오스 멤브레인을 생산하고 있고 다양한 모듈 형태로 막 크로마토그래피 공정에 적용되고 있다.

셀룰로오스는 본래 용매에 잘 용해되지 않는 성질을 가지고 있기 때문에 N-methylmorpholine-N-oxide에 용해시켜서 자기가수분해 방법을 통해 재생 셀룰로오스를 얻을 수 있다. 다른 방법으로는 셀룰로오스 아세테이트와 같은 일반적인 유기용매에 잘 용해되는 유도체를 이용하여 제막을 한 후, 탈아세틸화 과정을 통해 재생 셀룰로오스 분리막을 쉽게 얻을 수 있다[10].

막 크로마토그래피는 다공성 분리막의 리간드 기능화를 통해서 목적하는 생체분자를 분리/정제한다. 때문에 고분자 분리막을 제조하고, 분리막이 분리/정제 공정에서 크로마토그래피로의 흡착성을 확보 및 유지하

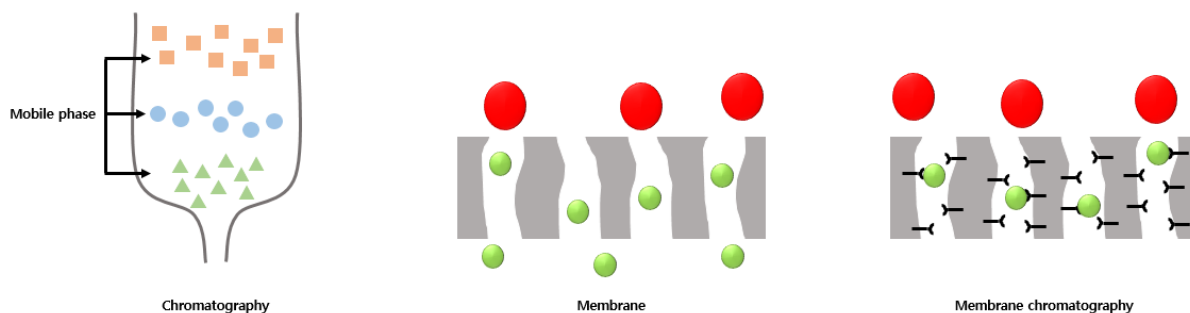


Fig. 1. Schematic diagram of chromatography, membrane and membrane chromatography.

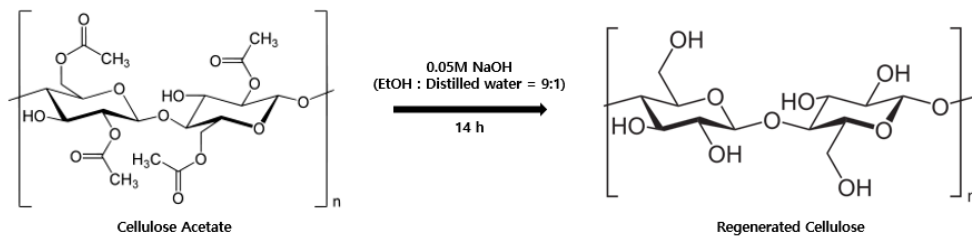


Fig. 2. Deacetylation process of cellulose acetate.

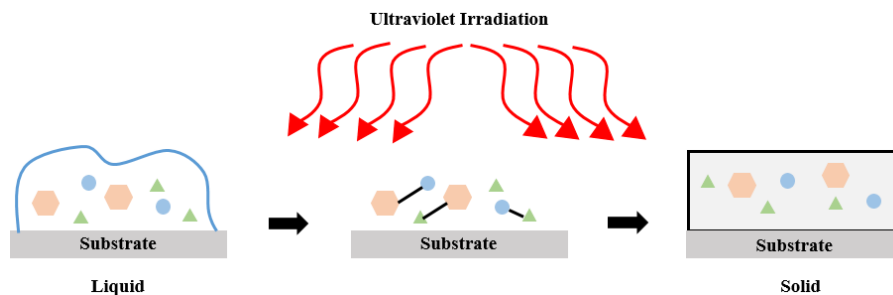


Fig. 3. MAPTAC grafting via UV polymerization.

기 위해 화학적으로 개질된 분리막이 필요하다[11]. 분리막의 개질은 coating, patterning, roughening, multi-layer 그리고 grafting 등 매우 다양한 방법이 존재한다. 이 중에서 특히 grafting 방법은 공유 결합을 통해 리간드가 표면에 부착하도록 하는 화학적 개질 방법이다. 따라서 복잡한 구조의 리간드도 쉽게 부착이 가능해서, 리간드가 고분자 막에 높은 밀도로 부착이 되고, 동시에 리간드의 안정성이 높아서 막 크로마토그래피에 적용하기 유리한 개질 방법이다[12]. Grafting에서 일반적으로 많이 사용되는 방법으로 UV중합이 있는데, 자외선을 이용해 액체 상태의 모노머나 올리고머를 순간적으로 중합체로 만드는 방법이다. 리간드 용액에 함유된 광개시제가 자외선 조사로 인해 광중합이 개시되고, 이로 인해 순간적으로 중합체를 이루어 경화가 이루어진다.

따라서 본 연구에서는 서로 다른 기공 크기를 가진 상용 셀룰로오스 아세테이트 분리막으로부터 재생 셀룰로오스를 분리막을 합성하고, 음이온 리간드 부착을 위해 [3-(methacryloylamino)propyl]-trimethylammonium chloride (MAPTAC)를 활용하여 UV중합으로 리간드를 grafting 후, bovine serum albumin (BSA) 흡착 실험을 통해 상용 이온 교환용 막 크로마토그래피와 성능을 비교평가 하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 재료

음이온 교환막 제조에 사용된 다공성 셀룰로오스 아세테이트 지지체는 기공크기 $3.0\ \mu\text{m}$ Advantec MFS로부터 구매하여 사용했고, 기공 크기 $0.8\ \mu\text{m}$ 은 Whatman로부터 구매하여 사용했다. 음이온 교환 리간드를 도입하기 위한 단량체로 MAPTAC를 사용하였고, 가교제로 N,N-methylene bisarylamide를 사용했다. 개시제는 2-hydroxy-2-methylpropiophenone를 사용했고, 분산제로 PEG 400을 사용했다. PEG 400을 제외한 모든 시약은 Sigma-Aldrich에서 구입하였으며, PEG 400은 SAMCHUN에서 구매하여 사용하였다. 단백질 흡착 실험에서 사용한 Tris 버퍼는 Roche의 Tris를 구매하였고, 세척 및 용출에 사용된 NaOH와 NaCl은 OCI사로부터 구매하였다. 목적 단백질 BSA는 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 탈아세틸화

음이온 교환용 막 크로마토그래피를 제조하기 위한 지지체로, 셀룰로오스 아세테이트 지지체로부터 탈아세틸화 과정을 통해 재생 셀룰로오스를 얻었다. 셀룰로오스 아세테이트 분리막은, 에탄올과 증류수를 9:1 부피 비율로 제조한 후, 0.05 M NaOH을 첨가하여 만든 용

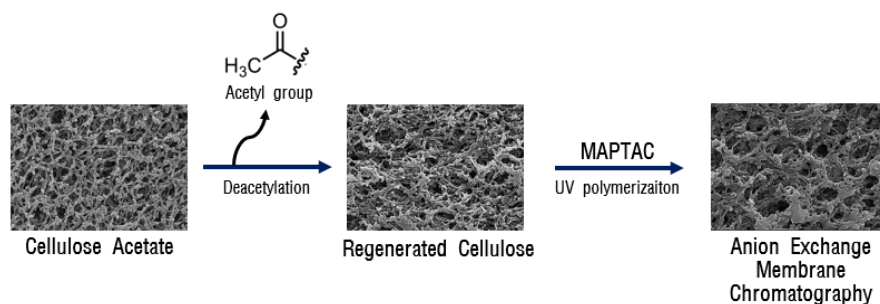


Fig. 4. Schematic diagram of deacetylation and UV polymerization process.

액에 16시간 동안 교반하였다. 탈아세틸화가 완료된 후, 증류수로 세척 후, 드라이 오븐에서(60°C) 충분히 건조시켜 주었다. 셀룰로오스 아세테이트 분리막과 재생 셀룰로오스 분리막의 형태학적 변화를 확인하기 위해 Gas liquid porometry (POROLUX™ 1000 model, POROMETER NV, America), FE-SEM (Field emission scanning electron microscopy, Quattro S, Thermo Fisher, America), FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy, IRTracer-100, SHIMADZU, Japan)을 이용하여 비교 분석하였다.

2.3. UV 중합

음이온 교환용 막 크로마토그래피를 제조하기 위해 MAPTAC를 UV중합 방법으로 grafting하였다. 이 때, MAPTAC 혼합 용액은 단량체 MAPTAC를 35 wt%, 가교제 MBA는 0.5 wt%, 개시제 Darocur 1173은 1.3 wt%, 분산제 PEG 400은 1 wt%, 그리고 증류수를 62 wt%를 첨가하여 교반기에서 혼합시켰다. 준비된 재생 셀룰로오스에 MAPTAC 용액을 침지시킨 후, 롤러를 통과시켜 충분히 grafting 용액에 함침시켰다. 그 후, 2분 동안 80°C 에서 건조하였다. UV조사는 Hg 1000 W UV Lamp를 사용하였고, lamp power는 $80\text{ W}/\text{cm}^2$ 이며, 파장대 321 nm^{-1} 에서 막 크로마토그래피를 1분동안 앞/뒷면을 UV 조사하였다. 조사 후, 30°C 의 증류수에서 30분 동안 세척을 진행 후, 건조시켜 음이온 교환용 막 크로마토그래피를 제조하였다.

2.4. 특성 평가

개질된 분리막의 형태학적 변화를 확인하기 위해, CA, RC, RC + MAPTAC의 무게, 기공 크기, 두께 측정을 하였다. 무게는 전자 저울(Quintix analytical balances, QUINTIX224-1SKR, Sartorius AG, Germany)을

이용하여 측정하였고, 기공 크기는 Gas liquid porometry (POROLUX™ 1000 model, POROMETER NV, America)를 통해 측정하였다. 두께는 전자 두께 측정기(Digimatic thickness gauge, 547-401, Mitutoyo, Japan)를 이용하여 측정하여 비교 분석하였다. 그리고 표면의 형태학적 변화를 보기 위해 FE-SEM (Field emission scanning electron microscopy, Quattro S, Thermo Fisher, America)을 이용하여 분리막 표면을 촬영하여 비교하였다. 샘플은 백금으로 코팅하였으며, 가속전압 20 kV, 배율 10,000배 조건 하에서 분석을 진행하였다. 분리막의 개질 전/후 리간드 도입으로 인한 변화는 FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy, IRTracer-100, SHIMADZU, Japan)을 이용하여 건조된 시료를 분석하였다. 측정 범위 스펙트럼은 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 범위에서, 4 cm^{-1} 간격으로 총 128회 반복하여 측정하였다.

2.5. 정적 흡착 용량(Static binding capacity, SBC)

음이온 교환용 막 크로마토그래피의 단백질 흡착량을 측정하기 위해, 정적 결합 용량(SBC)을 측정하였다. 완충용액은 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 버퍼를 사용했고, 단백질 용출 단계에서 사용하기 위해 Tris 버퍼에 1 M NaCl을 첨가하여 용출 용액을 제조하였다. 목적 단백질인 BSA 용액은 Tris 버퍼에 2000 ppm으로 제조하였다. SBC 측정을 위해 페트리디시에 막 크로마토그래피(7 cm^2)를 넣어주고, $2.0\text{ ml}/\text{cm}^2$ 의 Tris 버퍼를 넣어서 침지시켜준 후, 80 rpm에서 5분씩 3회 반복하여 완충시켜주었다. 완충이 완료된 후, 버퍼 용액을 제거하고 BSA 용액을 $2.0\text{ ml}/\text{cm}^2$ 넣어주어 80 rpm에서 12~18시간 동안 단백질을 충분히 흡착시켜주었다. 흡착이 완료된 후, BSA 용액을 제거하고 Tris 버퍼를 $2.0\text{ ml}/\text{cm}^2$ 넣어서 80 rpm에서 15분씩 2회 반복하여 불활성 BSA에 대한 세척을 진행하였다. 세척 후, Tris 버퍼를 제거

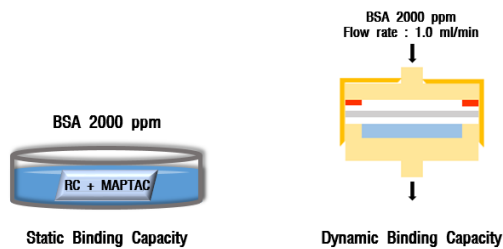


Fig. 5. Schematic diagram of static binding capacity and dynamic binding capacity.

해주고, 1 M NaCl을 10 ml 넣어주어 80 rpm에서 1시간 동안 막 크로마토그래피에 흡착된 BSA의 용출을 진행하였다. 용출이 완료된 후, 용출 용액을 채취하여 UV 280 nm에서 단백질 흡착량을 측정해주었다.

2.6. 동적 흡착 용량(Dynamic binding capacity, DBC)

음이온 교환 막 크로마토그래피 공정에서의 단백질 흡착 성능을 평가하기 위해 동적 흡착 용량을 측정하였다. SBC에서 사용한 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 버퍼를 사용하였고, 전처리 단계와 단백질 용출 단계에서 사용하기 위해 1 M NaOH와 1 M NaCl을 각각 사용하였다. BSA 용액은 2000 ppm 농도로 제조하였다. 측정을 위해 시린지 펌프를 사용하였고, 각 과정에 해당하는 용액을 시린지에 채운 뒤 분리막(0.3 ml)을 모듈에 장착 후, 1 ml/min의 유속으로 용액을 흘려주었다. 완충단계에서 1 M NaOH를 20 MV (Membrane volume), 1 M NaCl을 20 MV, Tris 버퍼를 50 MV만큼 투과시켜 완충을 시켜주었다. 완충 완료 후, BSA 용액을 흘려주어 단백질을 흡착시키고, 3 ml마다 용액을 받아서 UV 280 nm에서 측정하여 단백질 흡착량을 확인했다. BSA 흡착 후, Tris 버퍼 30 ml로 세척을 해주었고, 마지막으로 1 M NaCl 30 ml을 흘려주어 막에 흡착된 BSA를 용출시켜 주었다. DBC는 흡착 대상 단백질이 리간드에 결합하지 못하고 전체 단백질의 10%의 농도가 흘러나오기 시작할 때의 동적 흡착 용량인 $DBC_{10\%}$ 값을 기준으로 한다.

3. 결과 및 고찰

음이온 교환용 막 크로마토그래피 제조를 위한 지지체로 재생 셀룰로오스를 사용했고, 상용 셀룰로오스 아세테이트로부터 재생 셀룰로오스를 얻기 위하여 탈아세틸화 과정을 수행했다. Table 1에 나타난 바와 같이 탈아세틸화가 진행됨에 따라 무게, 기공 크기, 두께가 모두 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 Fig. 6의 FE-SEM 이미지에서 볼 수 있듯이 재생 셀룰로오스 분리막 표면이 약간 수축하여 변형된 것을 확인할 수 있다. 이 같은 변화는 탈아세틸화로 인해, $-OC=OCH_3$ 가 $-OH$ 로 전환되고 셀룰로오스 고분자 사슬 간 수소결합이 강화되면서 기공 구조가 전체적으로 감소, 수축하였기 때문인 것으로 판단된다. 수축 정도는 무게가 44% 정도 감소하였고, 기공 크기는 34%, 두께는 25% 정도 감소되는 것이 확인되었다.

탈아세틸화 반응으로 셀룰로오스 아세테이트기가 하이드록시기로 전환되는 것을 확인하기 위해 FT-IR spectrum 분석을 진행했다. Fig. 7에서 볼 수 있듯이 셀룰로오스 아세테이트의 카보닐기($C=O$, 1741 cm^{-1}), 메틸기(CH_3 , 1368 cm^{-1}), 그리고 에테르($C-O-C$, 1220 cm^{-1})가 탈아세틸화 후 대부분 하이드록시기($-OH$, 3475 cm^{-1})로 치환된 것을 볼 수 있다. 이를 통해 탈아세틸화로부터 하이드록시기가 풍부한 재생 셀룰로오스 분리막을 제조할 수 있음을 확인할 수 있다.

탈아세틸화를 통해서 얻은 재생 셀룰로오스 분리막에 MAPTAC를 부착하여 음이온 교환능을 부여하였고, Fig. 7에서 확인할 수 있듯이 RC + MAPTAC 분리막의 FT-IR결과에서, N-H 결합(1528 cm^{-1})이 나타나며, MAPTAC의 4차 암모늄에 기인하여 1648, 1479, 1378, 1314 cm^{-1} 에서 quaternary amine peak를 확인할 수 있었다[13,14]. 또한 Fig. 6에서 볼 수 있듯이 막 표면에 MAPTAC가 grafting되어 분리막 외부 및 기공 내부에 부착되었음을 확인할 수 있다. 때문에 Fig. 8에서 보듯이 CA에서 RC, RC에서 RC + MAPTAC로 진행됨에

Table 1. Comparison of Weight, Pore Size, and Thickness Before and after Deacetylation

Membrane	CA 0.8	RC 0.8	RC 0.8 + MAPTAC	CA 3.0	RC 3.0	RC 3.0 + MAPTAC
Weight (mg)	77.8	44.2	91.9	21.1	11.7	23.5
Pore size (μm)	0.68	0.44	0.41	1.65	1.11	1.00
Thickness (μm)	115~125	85~95	90~95	110~115	75~90	80~90

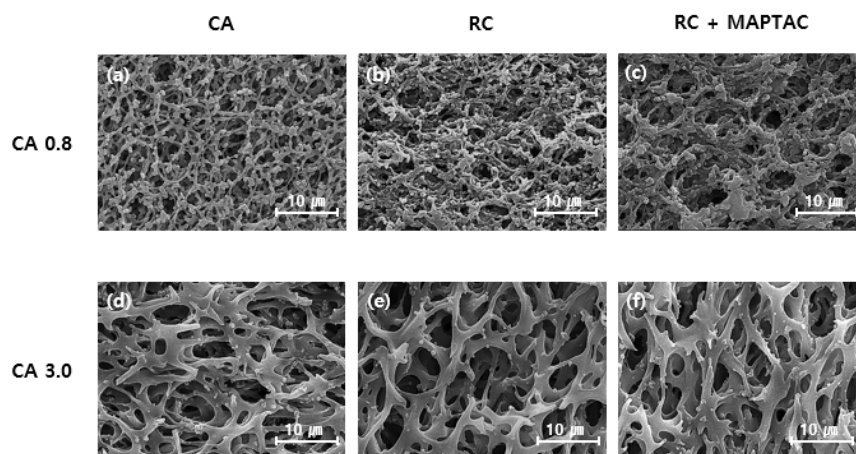


Fig. 6. FE-SEM images of comparison of membrane morphology by deacetylation and ligand functionalization. SEM images of surface (a) CA 0.8, (b) RC 0.8, (c) RC + MAPTAC, (d) CA 3.0, (e) RC 3.0, and (f) RC 3.0 + MAPTAC.

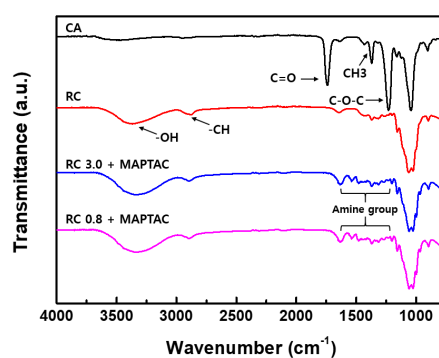


Fig. 7. ATR-FTIR peaks before and after deacetylation of cellulose acetate.

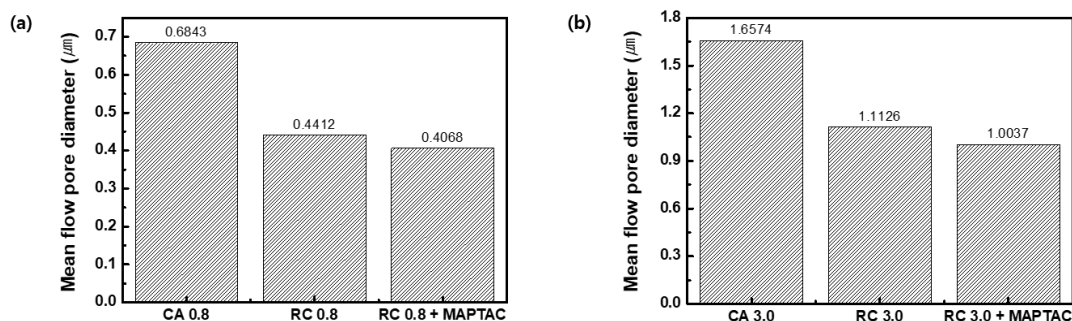


Fig. 8. Mean pore diameter with deacetylation and MAPTAC grafting (a) CA 0.8, RC 0.8, RC 0.8 + MAPTAC, (b) CA 3.0, RC 3.0, RC 3.0 + MAPTAC.

따라 기공의 크기는 점점 감소하는 것을 볼 수 있었다. 기공의 크기는 각각 CA 0.8가 0.68 μm, RC 0.8이 0.44 μm, RC 0.8 + MAPTAC가 0.41 μm이고, CA 3.0이 1.66 μm, RC 3.0이 1.11 μm, RC 3.0 + MAPTAC가 1.00 μm로, 탈아세틸화 및 리간드 부착 과정에서 기공

의 크기가 감소하는 경향을 보이지만 마이크로 단위의 기공 크기는 유지하고 있기 때문에 막 크로마토그래피 공정 적용 시 차압이 걸리거나, 유체가 통과하지 못하는 문제는 없을 것으로 판단이 되며, 음이온 교환용 막 크로마토그래피의 기능을 하는데 크게 영향을 주지 않

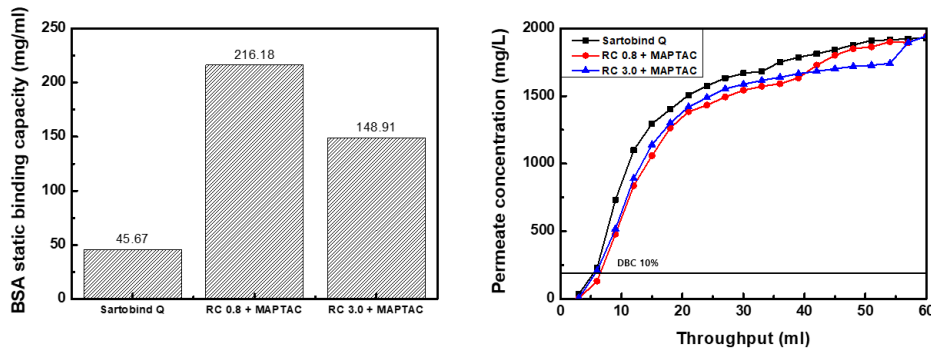


Fig. 9. BSA static binding capacity and dynamic binding capacity at 10% (DBC_{10%}) breakthrough. The feed concentration is 2000 ppm and the flow rate for the DBC test is 1.0 ml/min.

을 것으로 판단되었다.

기공 크기와 더불어서 단백질 흡착 용량에 영향을 줄 수 있는 형태학적 변수로 공극률 또한 영향을 줄 수 있다. 따라서 개질된 분리막의 공극률을 측정하였고, RC 0.8 + MAPTAC가 82.23%, RC 3.0 + MAPTAC가 76.47%의 공극률을 보였다.

개질된 음이온 교환용 막 크로마토그래피의 단백질 흡착 용량 측정을 위해, Sartorius사의 음이온 교환용 막 크로마토그래피 제품(Sartobind Q)을 대조군으로 하여, RC 0.8 + MAPTAC와 RC 3.0 + MAPTAC까지 총 3가지 음이온 교환용 막 크로마토그래피의 SBC와 DBC를 측정하였다. Fig. 9에서 볼 수 있듯이 SBC 측정 결과, MAPTAC 개질을 한 RC 0.8 + MAPTAC의 SBC값은 216.18 mg/ml, RC 3.0 + MAPTAC는 148.91 mg/ml로 45.67 mg/ml의 Sartobind Q에 비해 훨씬 높은 SBC 값을 확인할 수 있었다. 이는 MAPTAC를 통해 개질된 분리막에서 대상 단백질의 최대 흡착 용량이 크다는 것을 의미한다. MAPTAC는 4차 암모늄 기능기의 양이온성 그룹이 있는 친수성 단량체이다. 따라서 정전기적 인력으로 인해 음이온성 단백질 같은 생체분자가 양이온성 그룹에 의해 유도된다. 따라서 음전하를 띤 생체분자의 흡착에 유리하다[15,16]. 그리고 최대 흡착 용량이 크다는 것은 상용 막 크로마토그래피 제품인 Sartobind Q보다 제조된 흡착막에서 막에 결합된 음이온 교환 리간드가 더 높은 밀도로 존재한다는 것을 간접적으로 보여주는 결과이다.

SBC값을 토대로 음이온 교환 흡착용 멤브레인으로서 충분한 단백질 흡착 용량을 가지는 것으로 판단했고, 실제 막 크로마토그래피 공정 적용성을 확인하기 위해 동적 흡착 용량 DBC_{10%}값을 측정하였다[17,18]. Fig. 9

에서 볼 수 있듯이 RC 0.8 + MAPTAC의 DBC_{10%} 값은 43.69 mg/ml, RC 3.0 + MAPTAC의 값은 36.33 mg/ml로 SBC결과와 같이 MAPTAC 개질막이 Sartobind Q의 DBC_{10%} 값 28.38 mg/ml보다 높았다. DBC_{10%} 결과를 통해 MAPTAC를 grafting한 음이온 교환용 막 크로마토그래피가 단백질 흡착 기능이 우수하다는 것을 알 수 있다.

Fig. 9의 SBC와 DBC_{10%} 값을 비교하여 볼 때, RC 0.8 + MAPTAC, RC 3.0 + MAPTAC 그리고 Sartobind Q 순서로 흡착 용량이 크게 측정되었다. 순서로 볼 때, 기공 크기 순서와 일치하는 것을 알 수 있다. 기공 크기가 작을수록, 막의 표면적이 증가하고, 높은 표면적으로 인해 많은 양의 리간드가 부착되어 리간드 밀도가 높아진다. 리간드 밀도가 높으면 단백질이 흡착할 수 있는 영역이 증가하기 때문에 단백질 흡착에 유리하다. 또한 용액이 통과될 때, 기공 크기가 작고 스펀지 구조를 가질 경우 기공이 큰 단백질보다 막 내부에서의 유로가 길어지기 때문에, 리간드와 접촉 시간이 더 많을 수 있다[19]. 기공 크기와 더불어 공극률 또한 단백질 흡착 용량에 영향을 준다. 공극률이 높을수록 리간드 모노머 용액의 확산이 더 잘 이루어지기 때문에 리간드 부착이 유리할 수 있고, 높은 리간드 밀도를 가질 수 있다[20]. 즉, 단백질 결합 용량의 차이가 기공 크기와 공극률에 의한 리간드 밀도와 접촉 시간의 차이에 의한 결과임을 알 수 있다.

Fig. 9의 결과에서 SBC값에 비해 DBC_{10%}값이 낮은 수준으로 측정되는 것을 볼 수 있다. 이는 단백질 용액에 장시간 침지되어 포화 흡착이 일어나는 SBC에 반하여[21], DBC의 경우 막 크로마토그래피의 실제 운전 조건에서 진행되기 때문에 단백질 용액이 투과되면서

음이온 교환 리간드에 흡착되지 못하고 유체의 흐름에 따라 처리수 쪽으로 배출되기 때문인 것으로 알려져 있다. 따라서 $DBC_{10\%}$ 값을 실제 운전 조건의 단백질 흡착능을 예측하기 위한 매개변수로 사용할 수 있다[22]. 또한 유속이나, 배치 수, 버퍼 등의 운전 조건에 따라 DBC 값의 변동이 발생할 수 있기 때문에 각 조건들을 잘 고려하여 최적의 운전 조건을 찾아야 한다[23]. 또한 제조된 분리막의 경우 상용 제품에 비해 SBC 대비 $DBC_{10\%}$ 의 비율이 상대적으로 낮은 것을 알 수 있으며, 이는 제조된 분리막이 리간드 밀도는 높더라도, 유체가 흐르는 상태에서의 흡착 효율이 다소 낮은 것으로 보인다. 흡착 효율 향상을 위해 막 크로마토그래피 공정에 적합한 전용 지지체 제조 기술 개발, 분리막의 구조적 개선, 리간드 작용 효율 향상 등의 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

4. 결 론

본 연구에서는 음이온 교환용 막 크로마토그래피 응용을 위해 반응성이 좋은 서로 다른 기공 크기의 다공성 상용 셀룰로오스 아세테이트 막을 지지체로 사용하고 탈아세틸화 과정을 통해 얻은 재생 셀룰로오스 분리막에 음이온 교환 리간드인 MAPTAC를 grafting 하여 음이온 교환용 흡착성 멤브레인을 제조하였다. 음이온 교환 리간드인 MAPTAC를 분리막에 부착하기 위해서 grafting 방법을 사용했고, UV 중합을 이용하여 MAPTAC를 높은 밀도로 부착하였다. 제조된 음이온 교환용 막 크로마토그래피로의 기능을 확인하기 위해 정적 흡착 용량(SBC)과 동적 흡착 용량(DBC)을 측정한 결과, SBC 와 $DBC_{10\%}$ 모두 RC 0.8 + MAPTAC, RC 3.0 + MAPTAC, 그리고 Sartobind Q 순서로 단백질 흡착 용량이 높았다. 기공 크기가 작고, 공극률이 높을수록 단백질 흡착 용량이 높았는데, 이는 작은 기공 크기와 높은 공극률로 인한 넓은 표면적과 이로 인해 리간드 밀도가 높아졌기 때문이다. 결과적으로 탈아세틸화를 거친 재생 셀룰로오스 지지체를 이용하여 UV중합과 기공 크기 조절로, 안정적이면서 리간드 밀도가 높은 막 크로마토그래피를 제조할 수 있었고, 음이온 교환용 막 크로마토그래피로써 상용막에 비해 우수한 단백질 흡착 용량을 가짐을 확인할 수 있었다.

감 사

본 연구는 한국화학연구원 주요사업(SI2211-40)과 산업통상자원부 소재부품기술개발사업(20017410)을 통해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Reference

1. A. C. Fisher, M. H. Kamga, C. Agarabi, K. Brorson, S. L. Lee, and S. Yoon, "The current scientific and regulatory landscape in advancing integrated continuous biopharmaceutical manufacturing", *Trends Biotechnol.*, **37**, 253-267 (2019).
2. M. C. Flickinger, "Downstream industrial biotechnology: recovery and purification", *John Wiley and Sons* (2013).
3. A. Mehta, "Downstream processing for biopharmaceuticals recovery", *Pharmaceuticals from Microbes*, pp.163-190, Springer, Cham (2019).
4. A. Jungbauer, "Continuous downstream processing of biopharmaceuticals", *Trends Biotechnol.*, **31**, 479-492 (2013).
5. K. H. Youm, and Y. J. Yuk, "Affinity filtration chromatography of proteins by chitosan and chitin membranes: 1. Preparation and characterization of porous affinity membranes", *Membr. J.*, **16**, 39-50 (2006).
6. S. Krause, K. H. Kroner, and W. D. Deckwer, "Comparison of affinity membranes and conventional affinity matrices with regard to protein purification", *Biotechnol. Tech.*, **5**, 199-204 (1991).
7. C. K. Chiam, R. Sarbatly, "Purification of aquacultural water: conventional and new membrane-based techniques", *Sep. Purif. Rev.*, **40**, 126-160 (2011).
8. C. Charcosset, "Principles on membrane and membrane processes", *Membrane Processes in Biotechnology and Pharmaceutics*, pp. 1-41, Elsevier (2012).
9. I. Park, S. Y. Yoo, and H. B. Park, "How to design membrane chromatography for bioseparations: A short review", *Membr. J.*, **31**, 145-152 (2021).
10. Y. X. Bai and Y. F. Li, "Preparation and charac-

- terization of crosslinked porous cellulose beads”, *Carbohydr. Polym.*, **64**, 402-407 (2006).
11. Z. Liu, “Membrane chromatography for bioseparations: Ligand design and optimization”, Ph.D. Dissertation, Univ. of Arkansas, Fayetteville, Arkansas (2016).
 12. M. B. Mellott, K. Searcy, and M. V. Pishko, “Release of protein from highly cross-linked hydrogels of poly (ethylene glycol) diacrylate fabricated by UV polymerization”, *Biomater.*, **22**, 929-941 (2001).
 13. Y. Ji, X. Yang, Z. Ji, L. Zhu, N. Ma, D. Chen, X. Jia, J. Tang, and Y. Cao, “DFT-calculated IR spectrum amide I, II, and III band contributions of N-methylacetamide fine components”, *ACS omega*, **5**, 8572-8578 (2020).
 14. T. Hoshika, Y. Nishitani, M. Yoshiyama, W. O. Key III, W. Brantley, K. A. Agee, L. Breschi, M. Cadenaro, F. R. Tay, F. Rueggeberg, and D. H. Pashley, “Effects of quaternary ammonium-methacrylates on the mechanical properties of unfilled resins”, *Dent Mater*, **30**, 1213-1223 (2014).
 15. W. Wei, X. Qi, J. Li, Y. Zhong, G. Zuo, X. Pan, T. Su, J. Zhang, and W. Dong, “Synthesis and characterization of a novel cationic hydrogel base on salectan-g-PMAPTAC”, *Int. J. Biol. Macromol.*, **101**, 474-480 (2017).
 16. R. K. Mishra, K. Ramasamy, N. N. Ban, and A. B. A. Majeed, “Synthesis of poly 3-(methacryloylamino) propyl trimethylammonium chloride-co-methacrylic acid. copolymer hydrogels for controlled indomethacin delivery”, *J. Appl. Polym. Sci.*, **128**, 3365-3374 (2013).
 17. P. M. Gupte, M. Gavasane, A. Kambli, T. Bhadal, and S. Cheulkar, “Dynamic binding capacities of protein a resins for antibody capture”, *Bioprocess Int*, **18**, 34-38 (2020).
 18. T. Bergander, K. Nilsson-Välímäa, K. Öberg, and K. M. Lacki, “High-throughput process development: determination of dynamic binding capacity using microtiter filter plates filled with chromatography resin”, *Biotechnol. Prog.*, **24**, 632-639 (2008).
 19. J. Schwellenbach, S. Zobel, F. Taft, L. Villain, and J. Strube, “Purification of monoclonal antibodies using a fiber based cation-exchange stationary phase: parameter determination and modeling”, *Bioeng.*, **3**, 24 (2016).
 20. A. M. Clemments, P. Botella, and C. C. Landry, “Protein adsorption from biofluids on silica nanoparticles: corona analysis as a function of particle diameter and porosity”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **7**, 21682-21689 (2015).
 21. Y. Yao, and A. M. Lenhoff, “Pore size distributions of ion exchangers and relation to protein binding capacity”, *J. Chromatogr. A*, **1126**, 107-119 (2006).
 22. P. R. Gavara, N. S. Bibi, M. L. Sanchez, M. Grasselli, and M. Fernandez-Lahore, “Chromatographic characterization and process performance of column-packed anion exchange fibrous adsorbents for high throughput and high capacity bio-separations”, *Processes*, **3**, 204-221 (2015).
 23. K. H. Youm, and Y. J. Yuk, “Affinity filtration chromatography of proteins by chitosan and chitin membranes: 2. separation of BSA and lysozyme”, *Membr. J.*, **19**, 113-121 (2009).