

Modified Microsphere를 이용한 Lysozyme의 연속식 분리 특성에 관한 고찰

장용수, 최성욱, 함승주, 김우식
연세대학교 공과대학 화학공학과

Study on the Continuous Separation of Lysozyme using Modified Microspheres

Yongsu Chang, Sung-Wook Choi, Seungjoo Haam, Woo-Sik Kim

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Yonsei University

서론

Microsphere는 입자 크기 분포가 균일하며 비 다공성이면서도 넓은 비표면적을 제공한다. 또한 기존의 분리 매체에 비해 지속적인 화학적, 물리적 안정성을 유지할 수 있으며, 합성고분자이기에 표면 특성의 조절이 용이하여 다양한 기능성기를 도입시킬 수 있는 장점이 있다. 따라서 다양한 microsphere에의 단백질 흡착에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔으며 특히 생의학적인 응용분야에서 주목을 받고 있다.

본 연구실에서는 다양한 modified microsphere를 이용하여 단백질과 microsphere 간의 상호작용력들의 관계를 규명하였으며, 기능성 microsphere를 물에 분산된 상태의 라텍스 형태로 만들어 stirred cell에 도입하는 새로운 연속식 분리장치를 고안하였다. 그동안 이루어진 흡착 및 분리 실험의 연구결과 낮은 표면전하밀도의 microsphere가 높은 선택도를 나타내었으며 주 구동력은 소수성 상호작용력임을 밝혀 내었다.

이러한 연구결과를 바탕으로 stirred cell 에서 poly(styrene/methacrylic acid) microsphere를 이용한 혈청단백질 (BHb)과 Lysozyme 혼합액의 연속식 분리를 시도하였으며, 연속식 분리공정에 있어서 단백질 농도변화에 따른 분리 경향을 고찰하고자 한다.

이론

고분자 물질에의 단백질 흡착은 단순하지 않다. 단백질이 거대 분자인 탓에 활성점과 1:1 결합이 이루어지지 않으며, 그 결합에도 여러 상호작용력들이 동시에 관여한다. 결합력도 인력과 척력이 동시에 작용하며, 탈착에 있어서도 일반 흡착에서처럼 용이하게 이루어지지 않는다. 이러한 복잡함 때문에 그 체계가 명확히 규명되지는 못하였으나 다양한 조건에서의 실험이 진행되고 있다. 단백질 흡착에 영향을 미치는 인자들로는 pH, 이온강도, 전해질의 종류, 단백질의 종류, 농도, 고분자물질의 종류, 입자 크기 및 고형량 등이라 할 수 있으며 단백질과 modified microsphere 사이의 상호작용력에는 소수성 상호작용력, 정전기적 상호작용력, 수소결합력 등이 있다. 본 실험에서 단백질 흡착에 관련된 상호작용력에는 크게 소수성 상호작용력과 정전기적 상호작용력을 흡착구동력으로 간주한다. 소수성상호작용력에 의해 흡착된 단백질의 양은 표면전하밀도의 증가에 따라 감소하고, 정전기적 상호작용력에 의해 흡착된 단백질의 양은 표면전하밀도의 증가에 따라 증가한다. 소수성 상호작용력과 정전기적 상호작용력 간의 전이점이 존재하며 소수성 상호작용력에 의해 흡착된 단백질의 양은 등전점 부근에서 최대이며 pH에 의해 민감하게 반응한다. 이에 반하여 정전기적 상호작용력에 의해 흡착된 단백질의 양은 pH에 영향을 받지 않는다. 본 실험에서는 분리의 구동력으로 소수성 상호작용력과 정전기적 상호작용력을 고려하였다. 이때 소수성 상호작용력은 흡착의 주 구동력으로 작용하며 정전기적 반발력은 흡착을 방해하는 힘으로 작용한다.

본 분리실험은 BHb와 Lysozyme 혼합용액에서부터 Lysozyme을 흡착시키고 BHb를 용출시키는 과정이다. 또한 본 실험은 낮은 표면전하밀도를 지닌 microsphere를 이용하여

실험이 진행되며 소수성 상호작용력이 주 구동력으로 작용한다. 즉, 흡착시킬 Lysozyme의 등전점인 pH 11에서 최대흡착이 일어나고 BHB는 주어진 pH에서 음전하를 띄게 되어 음이온성 microsphere와 정전기적 반발을 일으켜 그대로 용출하게 된다.

실험

1. 실험 재료

단백질은 Sigma chemical co.의 Bovine Serum Hemoglobin (BHB, H-2500)과 Lysozyme (Lysozyme, L-6876)을 탈이온 증류수에 용해시켜 사용하였다.

Microsphere는 주 단량체로 styrene을 사용하였으며 공단량체로 MAA(음이온성)을 사용하여 무유화제 회분식 공중합을 행하였다. 중합된 microsphere는 이온교환, 세럼교환의 과정을 통하여 세척한 후, SEM으로 입자 크기 및 분포를 결정하였고, 전도도적정으로 표면기능성기의 양을 결정하였다.

2. Stirred cell에서의 연속식 분리실험

완충용액은 Lysozyme의 등전점인 pH 11의 phosphate buffer를 제조하여 사용하였으며, 이온강도를 0.01로 고정하여 사용하였다. phosphate buffer와 라텍스를 0.2 μ m 정밀여과막(Orange Scientific Co.)을 장착한 stirred cell에 넣어 전체부피는 30ml, 비표면적은 0.19m²/ml로 만들었다. stirred cell을 교반기 위에 놓고, 약 1m 위의 높이에서 같은 buffer를 흘려주어 permeate를 정상상태로 만든 다음 완전히 투과 플럭스가 정상상태로 된 후에 단백질을 step input 하였다.

파과곡선을 얻기 위해서 실험하기 전에 반응부피의 10배 이상의 양에 해당하는 buffer를 흘려주어 평형화를 충분히 유지시켰다. 단백질 용액은 저장용기를 이용하여 step input 시키고 stirred cell을 통하여 빠져 나오는 유출액을 autosampler로 받았으며 채취한 유출액을 UV spectrophotometer로 분석하였다. 280nm와 405nm에서 흡광도를 측정하여 간단한 행렬을 사용한 프로그램을 써서 각 성분의 농도를 분석하고 수치적분을 통하여 유출총량을 산출하였다. 위와 같은 실험을 표면전하의 도입비율이 적은 microsphere에서 시행하였으며 single component 및 binary component의 breakthrough curve를 얻기 위해 BHB와 Lysozyme의 농도를 (0.05, 0.1, 0.22, 0.5g/L)로 변화시켜 실험을 반복하였다.

결론

1. 유속의 고찰

1m의 저장용기 높이에서 전체 농도 및 혼합 비율을 변화시켜가며 연속식 분리실험을 했을 때 유속은 0.53~4.2mL/min 사이를 나타내었다.

2. Single component의 breakthrough curve 고찰

Poly(styrene/methacrylic acid) microsphere에 single component의 step input을 통한 breakthrough curve에서는 Lysozyme의 흡착조건인 pH 11의 등전점 하에서 Lysozyme은 표면에 완전히 흡착된 후 유출되며 BHB는 곧바로 유출됨을 볼 수 있다.

Fig. 1에서 보듯이 Lysozyme의 농도가 0.1 g/L인 경우는 180ml에서 파과가 이루어지며, 0.22g/L는 90ml, 0.5g/L는 45ml, 0.5g/L에서는 25에서 각각 파과가 이루어진다.

3. Binary component의 breakthrough curve

Binary component에서는 혼합비율을 1:1로 고정하고 전체 농도를 변화시키면서 step input 시켰을 때 breakthrough curve는 single component의 breakthrough curve와 일치함을 보인다. 또한 0.22g/L 이상의 농도에서는 Lysozyme이 BHB의 과과점 이전에 용출됨을 보이며, 0.1g/L 이하의 저농도에서는 BHB의 과과점 이후에 과과가 이루어져 제대로 분리가 이루어짐을 보인다.

참고문헌

1. H. Kawaguchi, F. Hoshinon, and Y. Ohtsuka, Makromol. Chem. Rapid Commun., 7,109 (1986)
2. J. H. Lee et al, biomed. chromatogr., 12, 330 (1998)
3. A. Rembaum and Z. A. Tokes (Eds.), "Microsphere: Medical and Biological Applications", CRC Press, 1988.
4. Suki, A. B et al., J. Membr. Sci., 21, 269 (1984)
5. L.B. Bangs. Pure Appl. Chem. 68, 1873 (1996)
6. J.-Y. Yoon, Ph.D. thesis. Yonsei University, Seoul (1998)
7. J.-Y. Yoon, J.-H. Kim and W-S. Kim. colloids Surf. A 153, 415 (1999)

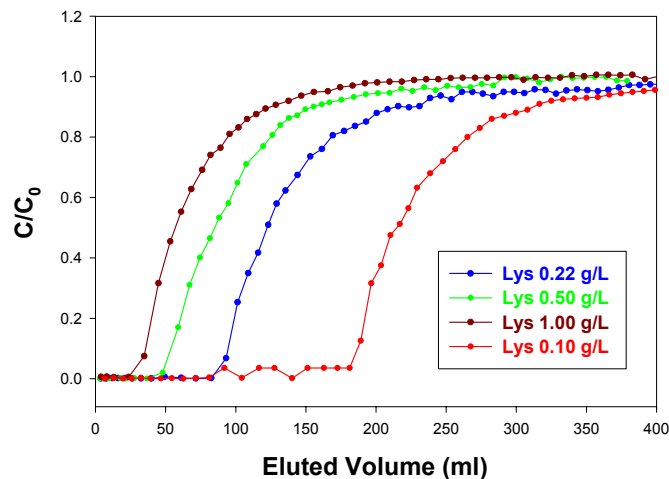


fig.1 Single component breakthrough curve of Lysozyme at pH 11

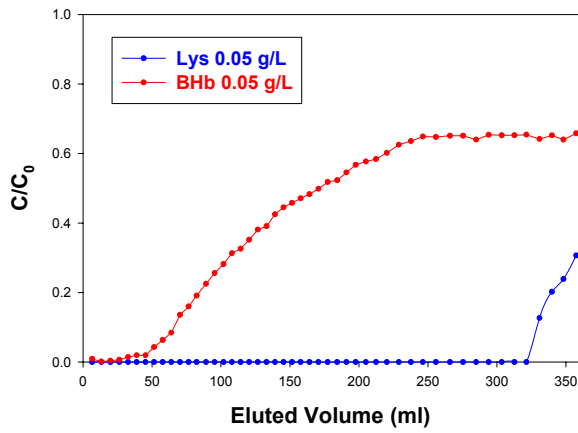


fig.2 Binary component breakthrough curve of BHB-Lysozyme solution at pH 11 (BHB 0.05g/L, Lysozyme 0.05g/L)

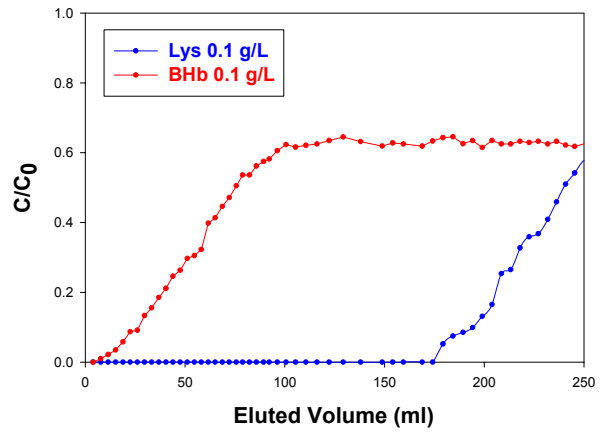


fig.3 Binary component breakthrough curve of BHB-Lysozyme solution at pH 11 (BHB 0.1g/L, Lysozyme 0.1g/L)

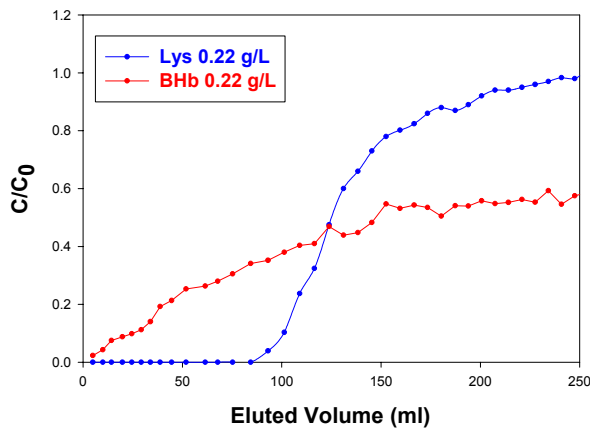


fig.4 Binary component breakthrough curve of BHB-Lysozyme solution at pH 11 (BHB 0.22g/L, Lysozyme 0.22g/L)

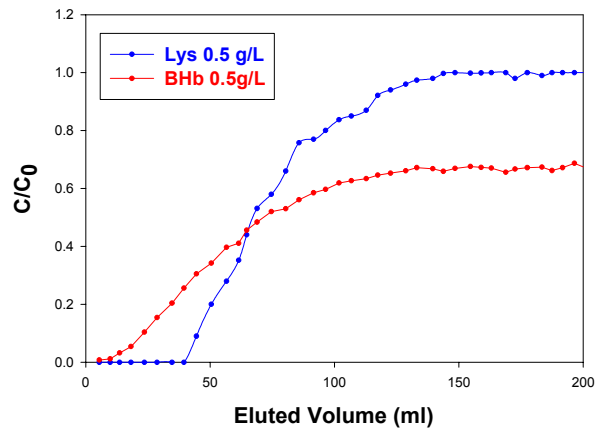


fig.5 Binary component breakthrough curve of BHB-Lysozyme solution at pH 11 (BHB 0.5g/L, Lysozyme 0.5g/L)