

특성화된 poly(hydroxyethyl-methacrylate) 비드를 이용한 human immunoglobulin G의 흡착분리에 관한 연구(I)

— Thiophilic poly(hydroxyethyl-methacrylate) 비드의 제조 —

임재홍 · 장우진 · 장순호 · 조영일[†]

연세대학교 공과대학 화학공학과
(1998년 10월 27일 접수, 1999년 1월 4일 채택)

A Study on Adsorptive Separation of Human Immunoglobulin G with the Characterized Poly(hydroxyethyl-methacrylate) Beads(I)

— Preparation of Thiophilic Poly(hydroxyethyl-methacrylate) Beads —

Jae-hong Im, Woo-jin Jang, Soon-ho Jang and Yung-il Joe[†]

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Yonsei University
(Received 27 October 1998; accepted 4 January 1999)

요 약

Divinylsulfone(DVS)과 β -mercaptoethanol을 이용한 일련의 반응을 통해, 흡착담체 조건에 맞게 제조된 poly(hydroxyethyl-methacrylate)(PHEMA) 비드를 thiophilic-특성화하고자 하였다. 실험변수들은 Na_2CO_3 농도, pH, 반응시간 그리고 각 반응물의 농도로 하였으며, 반응물의 결합량이 최대값을 얻을 때 변수를 고정하였다. DVS를 통한 PHEMA의 활성화 반응에 있어서, PHEMA 비드들의 가교현상없이 얻을 수 있는 최대 결합량은 Na_2CO_3 0.5 mol/L, pH 12.5, 반응 시간 8 시간 그리고 DVS 2 mol/L에서 약 16.2 mmol DVS/g PHEMA이었다. 또한 활성화된 PHEMA(APHEMA)와 β -mercaptoethanol을 반응시킨 결합반응에서는 Na_2CO_3 0.25 mol/L, pH 9, 반응 시간 36시간 그리고 β -mercaptoethanol 4 mol/L에서 최대값인 약 514.4 μmol β -mercaptoethanol/g APHEMA를 얻었다.

Abstract— Poly(hydroxyethyl-methacrylate)(PHEMA) beads, prepared in accordance with the standards of adsorptive matrix, were tried to have the thiophilic characters by a series of reactions with divinylsulfone(DVS) and β -mercaptoethanol. The experiments parameters were Na_2CO_3 concentration, pH, reaction time and the concentration of the reactants. When the bound mass was maximum, the parameter fixed. In the activation step of PHEMA with DVS, the maximum bound quantity of DVS was 16.2 mmol DVS/g PHEMA at Na_2CO_3 0.5 mol/L, pH 12.5, reaction time 8 hr and DVS 2 mol/L. And in the coupling reaction with the activated PHEMA(APHEMA) and β -mercaptoethanol, the fixed parameters were Na_2CO_3 0.25 mol/L, pH 9, reaction time 36 hr and β -mercaptoethanol 4 mol/L for the upmost mass of about 514.4 μmol β -mercaptoethanol/g APHEMA.

Key words: Thiophilic Adsorbents, polyHEMA Beads, Divinylsulfone, β -Mercaptoethanol

1. 서 론

Thiophilic 흡착은 1985년에 Porath 등에 의해서 제안된 새로운 크로마토그래피법으로서 혈청, 복막액, 조직배양 부양액, 초유 유청, 치즈 유청 등에서 Immunoglobulin G(이하 IgG)를 직접 정제하는데 사용되었다. 이러한 형태의 흡착체는 화학적 안정성, 리간드의 높은 특성결합 등의 성질들을 갖고 있어, IgG 정제에 사용되어지는 Protein A, G와 같은 기존의 고가 천연단백질 리간드의 대체물질로서 관심을 갖게 하였다. 기존의 thiophilic 흡착체(이후 T-gel)는 agarose를 기본 담체로 하여 제조되나 이러한 agarose는 천연 물질이 갖게 되는 단

점인 물리·화학적 내구성 부족, 제조·성형의 불균일성, 미생물에 대한 취약성 그리고 고가라는 문제점들을 갖고 있다[1-8].

1970년대초 2-hydroxyethylene methacrylate와 ethylene dimethacrylate의 불균일 현탁중합에 의해 제조된 poly(2-hydroxyethyl-methacrylate, 이하 PHEMA)는 1,000 psi(최대 4,400 psi)와 같은 고압과 170 °C의 고온에서도 분해되지 않고 견딜 수 있으며, 미생물에 강하다는 장점 이외에도, 우수한 생체 친화성으로 정밀회공, 생물공학 및 의·약학분야에서 많은 관심을 받고 있다[9, 10]. 현재 이는 혈액투과제의 충전물, soft lense 등에서 사용되고 있으며 의학분야에서는 색전물질과 약물방출 시스템 측면 등에서 다양한 연구가 진행되고 있다[11-13].

따라서 본 연구에서는 위와 같이 우수한 담체 특성을 갖는 PHEMA 비드를 thiophilic특성화하고자 하였다. 이를 위해서 선행 연구

[†]E-mail: biorxn@bubble.yonsei.ac.kr

들[14, 15]에서 얻은 결과를 토대로 흡착 담체로 알맞다고 판단되어 지는 구조 및 형태를 갖는 PHEMA 비드를 제조하였으며 이를 thiophilic 특성화 반응에 사용하였다. 이때 특성화 반응은 T-gel 제조에서 agarose에 적용되었던 반응을 참고[9, 16-20]로 하였으며, PHEMA와 특성화반응물들(divinylsulfone, β -mercaptoethanol) 사이의 반응량을 기준으로 최대 반응량을 얻을 때 해당 반응 변수를 고정하는 방법으로 특성화 반응실험들을 수행하였다. 이러한 일련의 실험들을 통하여 PHEMA thiophilic 특성화에 있어서 반응변수들의 역할과 영향성을 알아보고, 반응변수 값들을 최적화함으로써, 이후 human immunoglobulin G(HIgG) 흡착실험용 담체 생산의 기초자료로서 이용하고자 하였다.

2. 실험방법

2-1. 재료

기본 담체로서 사용한 PHEMA 비드의 제조와 관련된 구체적인 내용은 선행 연구물[14, 15]에서 잘 나타나 있으며, 본 연구에서 사용한 PHEMA 비드의 특징, 형태 그리고 제조조건 등을 Fig. 1과 Table 1에 보였다. Divinylsulfone(DVS), β -mercaptoethanol을 Sigma로부터, Na_2CO_3 는 동양화학공업주식회사, 아세톤은 덕산약품 그리고 sodium azide는 Junsei Chem.으로부터 구입하였다. 또한 전체 실험에 사용된 물은 Millipore 여과장치(ELGA STAT, UHQ)로 제조한 초순수를 이용하였다.

2-2. PHEMA의 특성화

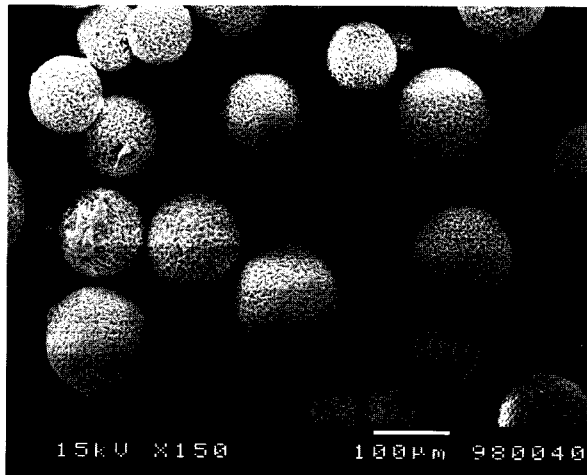


Fig. 1. SEM of PHEMA beads used in the thiophilic characterizations.

Table 1. Specification of PHEMA beads used in thiophilic characterization

Physical characters			
Diameter, μm	Porosity, %	Density, g/ml	Surface area, m^2/g
~150	35.0	0.40	60.0
Preparing conditions			
HEMA ^a	9.5 ml	PVP ^d	75 ml(3 wt%)
EDMA ^b	0.5 ml	CyOH ^c	12 ml
AIBN ^e	0.1 g	OcOH ^f	3 ml
temp.=70 °C	reaction time=8 h		stirring rate=200 rpm

^a2-hydroxyethyl methacrylate, ^bethylene dimethacrylate, ^cazobis(isobutyronitrile), ^dpoly(N-vinyl-2-pyrrolidone), ^ecyclohexanol, ^f1-octanol.

중류수로 충분히 세척한 PHEMA를 wet cake 상태로 0.5 g씩 썰리 큰 마개를 갖춘 30 ml 바이알 병내의 Na_2CO_3 5 ml에 분산시켰다. 병내에 PHEMA가 충분히 분산된 후 DVS 일정량을 주입하여 특정 시간동안 반응을 진행하였다. 항온조를 사용하여 반응온도를 25 °C로 유지하였으며, 반응 병내의 교반은 속도조절기를 이용하여 교반속도 약 200 rpm으로 마그네틱 스피너로 하였다. 그 외의 구체적인 실험조건들은 Table 2에 보였다. 각 반응 이후 제조물은 중류수로 충분히 세척하여 잔류 미반응물이 없도록 하였으며, DVS로 활성화된 PHEMA는 아세톤에 분산시켜 4 °C로 보관하거나, 연이어 β -mercaptoethanol 결합과정에 사용하였다. 일정농도의 Na_2CO_3 로 충분히 세척된 활성화-PHEMA(이하 APHEMA)를 wet cake 상태로 0.5 g씩 썰리 큰 마개를 갖춘 30 ml 바이알병 내의 Na_2CO_3 5 ml에 분산시켰다. APHEMA가 충분히 분산된 후 β -mercaptoethanol 일정량을 주입하여 특정 시간동안 반응을 진행하였다. 이 후 실험 방법은 활성화 과정과 동일하며, 구체적인 실험조건들을 Table 2에 보였다. 반응물은 중류수로 충분히 세척한 후, 0.02 % NaN_3 에 분산시켜 4 °C에서 보관하였다.

DVS에 의한 활성화 과정과 β -mercaptoethanol에 의한 결합과정을 거친 PHEMA는 보존 전에 일정량을 추출하여 80 °C, 1기압으로 24 시간 동안 건조하여, CHNSO analyzer(FISONS INS. EA 1108 CHNSO)를 이용하여 황의 농도를 측정하여 결합량을 알아보았다.

3. 실험결과

3-1. Divinylsulfone(DVS)을 통한 PHEMA의 활성화 반응

DVS에 의한 PHEMA 활성화 과정에 있어서 활성화 완충액으로서 사용된 Na_2CO_3 농도, 완충액의 초기 pH, 반응시간 그리고 DVS 농도가 반응에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. T-gel 제조에서 agarose에 적용되었던 반응들의 초기 값들이[9, 16-20] 각 경우마다 차이를

Table 2. The experimental parameters for thiophilic PHEMA characterization

Parameters	Values							
	step 1. activation							
Buffer concentration(Na_2CO_3)	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0			
Buffer pH	7.0	8.5	10.0	11.5	12.5			
Reaction time(h)	0.5	1	2	4	8	12	16	
DVS concentration(mol/L)	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	7.0	10.0
	step 2. coupling							
Buffer concentration(Na_2CO_3)	0.1	0.25	0.5					
Buffer pH	7.0	8.5	10.0	11.5	12.5			
Reaction time(h)	6	12	18	24	36	48		
β -Mercaptoethanol concentration(mol/L)	0.5	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0		

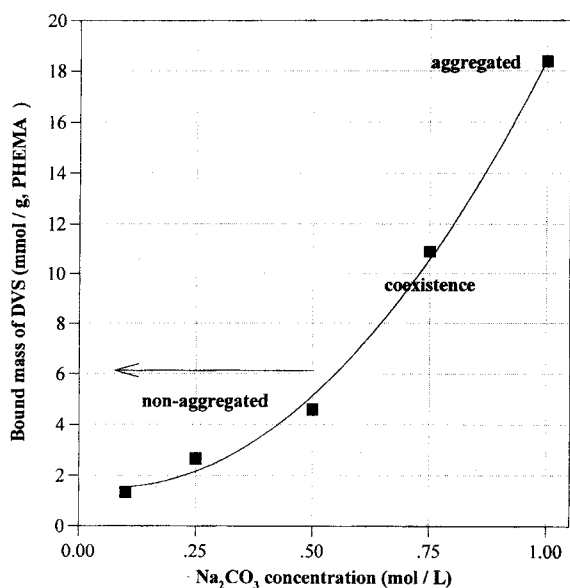


Fig. 2. The effect of Na_2CO_3 concentration on the bound mass of DVS to the PHEMA beads (pH=11.5, time=4 h, DVS=2.0 mol/L, temp.=25 °C).

보이고 있어, 이들 각 변수들의 영향성의 규명과 변수값이 수정이 선행되어야 하였다.

3-1-1. Na_2CO_3 농도의 영향

DVS에 의한 활성화 과정에 있어서 사용된 완충액 Na_2CO_3 용액 농도의 영향을 Fig. 2에 보였다. Na_2CO_3 농도를 제외한 나머지 변수들은 그림 하단에 나타나 있으며, 이들은 agarose 활성화에 사용되는 문헌값들[9, 16-20]이며, 반응의 출발점이다. 0.5 mol/L까지는 Na_2CO_3 농도가 증가함에 따라 PHEMA에 결합된 DVS의 농도가 약 1.3 mmol/g PHEMA에서 4.6 mmol/g PHEMA로 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 PHEMA 비드들이 서로 엉기는 현상을 보였다. 즉 Na_2CO_3 농도가 0.75 mol/L에서부터 나타나는 가교현상은, DVS가 18.4 mmol/g PHEMA 결합한 1.0 mol/L에서는 확연하였다. 이 실험의 목적상 DVS가 갖고 있는 이중결합 구조 중 하나만이 PHEMA의 하이드록시기와 반응을 하고 더 이상의 반응이 없어야 하는데, PHEMA와 반응된 DVS에 남아있는 이중결합이 미반응 하이드록시기를 갖고 있는 PHEMA와 반응을 함으로써 가교결합이 유발된 것으로 생각된다. 이러한 현상이 완충액으로서 사용된 Na_2CO_3 의 농도 변화에 의해 발생했다는 것은 Na_2CO_3 가 완충액으로서 뿐만 아니라 반응 활성화 물질로서도 작용하고 있음을 알게 해주며, 활성 완충액으로 사용된 근거가 될 것이다. DVS의 가교제적인 반응을 막고, PHEMA의 활성화 반응만을 일으키는 농도로는 0.5 mol/L가 적당함을 알 수 있었으며, 이 값은 agarose를 특성화 반응에서 얻어진 값과 동일하였다. 이러한 결과를 뒤의 반응시간 및 DVS 농도의 영향성 평가 실험을 통해 얻은 결과들과 비교해 보면, 활성화 반응에서 Na_2CO_3 농도의 중요성을 재차 확인할 수 있다. 즉 Na_2CO_3 0.75 mol/L 경우 DVS 결합량이 약 10.9 mmol/g PHEMA 임에도 가교결합이 나타나는데 비해, Na_2CO_3 농도를 0.5 mol/L로 고정된 반응시간 및 DVS 농도실험에서는 DVS이 약 16.2 mmol/g PHEMA에 달하여도 가교결합이 일어나지 않는다.

3-1-2. pH의 영향

Fig. 3은 Na_2CO_3 농도를 0.5 mol/L로 정한 가운데 반응에 대한 계내의 pH 영향을 보여준다. 농도 변화에 따른 pH의 측정을 통해서 Na_2CO_3 는 0.1-1.0 mol/L의 농도 영역에서 약 pH 11.1-11.5 정도로 거의 일정한 값을 갖음을 알 수 있었다. 이러한 Na_2CO_3 의 pH 완충액

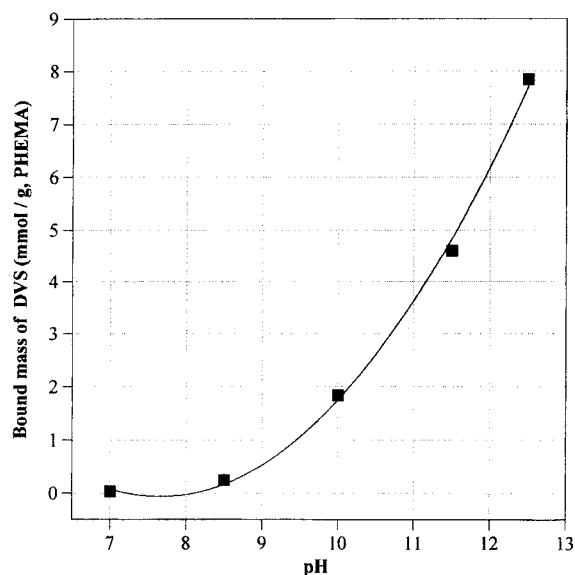


Fig. 3. The effect of pH on the bound mass of DVS to the PHEMA beads (time=4 h, DVS=2.0 mol/L, Na_2CO_3 =0.5 mol/L, temp.=25 °C).

적 성질은 반응계내 pH의 급격한 변화를 막아주고 거의 일정한 pH를 유지시켜 주는데, Na_2CO_3 용액이 갖는 pH가 반응에 과연 최적화된 것이며, 이 값의 변화가 반응에 어떠한 영향을 주는 가를 알아보고자 하였다. 또한 반응이 되어감에 따라 일어날 계내의 pH의 변화에 따른 결합량 및 반응추이를 간접적으로 알아 보고자 하였다. Fig. 3과 같은 pH는 NaOH와 HCl를 Na_2CO_3 용액에 주입함으로써 얻을 수 있었다. pH가 증가됨에 따라 결합하는 DVS의 양은 급격하게 증가하였으나, Na_2CO_3 농도 증가에서와 같은 비드 엉김 현상은 관찰되지 않았다. 특히 pH가 7.0에서는 결합된 DVS의 양이 약 0.03 mmol/g PHEMA로서 거의 반응이 일어나지 않았으며, 이와는 대조적으로 Na_2CO_3 자체의 pH에 해당하는 11.5에서는 4.6, pH 12.5에서는 결합된 DVS 양이 약 7.9 mmol/g PHEMA까지 증가하여 반응에 있어서 pH의 역할이 매우 큼을 알 수 있었다.

Porath 등은 DVS가 기본적으로 아미노 그룹들과 반응을 일으키나 강 알칼리성에서는 페놀류, 알코올류, 그리고 carbohydrate류와 반응을 한다고 보고하였다[10, 21, 22]. 실험이 종료된 후 pH 11.5인 반응계의 pH를 측정해 본 결과 약 8.3 정도로 떨어진 상태가 되어, PHEMA에 대한 DVS 결합반응은 반응계의 pH를 낮추는 효과를 일으키는 것으로 고찰된다. 이러한 반응이 계속되어 계내의 pH가 점차 낮아지게 되면, 반응계의 환경은 강 알칼리성이 필요한 DVS와 PHEMA의 반응조건에 부적합하게 될 것이다. 그러므로 그러한 환경에서는 PHEMA와 DVS 반응속도 및 반응정도가 낮아질 것으로 예상된다. Na_2CO_3 용액은 이러한 pH의 변화를 완충해 주는 역할을 하게 되는데, 이때 Na_2CO_3 용액이 갖는 약 11.2 정도의 pH 보다 더 낮은 강 알칼리성으로 반응환경을 만들어 줌으로써 반응계의 pH는 더 오랜동안 반응에 알맞은 환경을 유지하게 되고, 그에 따라 반응량이 증가된 것으로 고찰되어 진다.

3-1-3. 반응시간의 영향

Fig. 4는 반응시간에 따른 DVS의 PHEMA에 대한 결합량의 변화를 보여준다. 2시간까지 시간의 변화에 따른 결합량의 변화는 1.67-2.83 mmol/g PHEMA로 크지 않았으나, 반응시간을 8 시간으로 증가시키면서 결합한 DVS 양이 16.2 mmol/g PHEMA로 증가하여 그 증가분이 0.5 시간의 결과에 비해 약 10배에 이른다. 그러나 그 이상의

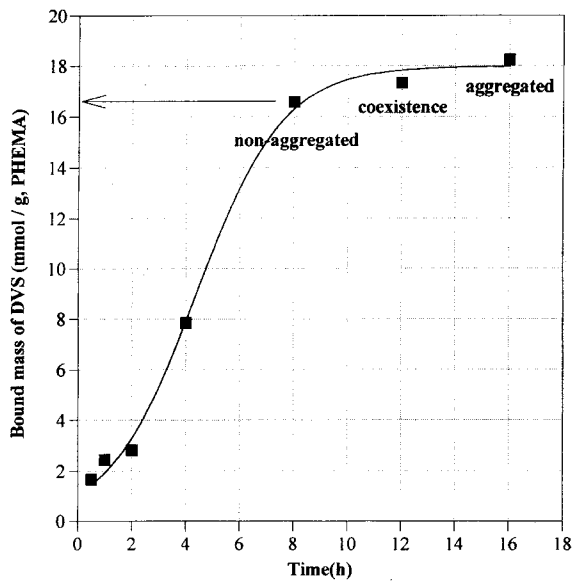


Fig. 4. The effect of reaction time on the bound mass of DVS to the PHEMA beads(DVS=2.0 mol/L, pH=12.5, Na_2CO_3 =0.5 mol/L, temp.=25 °C).

로 반응시간이 증가됨에 따라서는 결합량은 약 18.2 mmol/g PHEMA로서 큰 증가없이, PHEMA 비드들의 가교현상이 관찰되었다. 따라서 반응의 조건이 잘 정비된 경우, PHEMA비드들과 DVS 사이의 충분한 반응을 유발시키기 위해서는 약 8시간 정도가 필요한 것으로 생각된다. 그러나 이러한 반응시간은 참고자료값[9, 16-20]의 반응시간인 1시간과는 매우 차이가 큰 것이며, 이는 agarose와 PHEMA 사이의 물리·화학적 차이와 반응목적의 차이로 볼 수 있다. 즉 팽윤도가 PHEMA보다 큰 agarose의 경우 반응물의 침투속도가 빨라 반응이 더욱 급속히 진행되었을 것이며 또한 DVS가 agarose의 T-gel 화에서는 가교제 그 자체로도 사용되었기 때문에 발생하는 결과로 고려된다. 따라서 agarose에 비해 견고하고, 팽윤도가 낮은 PHEMA가 반응물인 DVS와 충분한 반응을 하기 위해서는 더 많은 반응시

간이 필요한 것으로 고찰된다.

3-1-4. DVS(divinylsulfone) 농도의 영향

Fig. 5는 앞의 3가지 변수들이 고정된 가운데 DVS의 농도변화에 따른 PHEMA에 대한 결합량을 보여준다. 이 실험은 그림의 변수 이외에 4, 5, 7, 10 mol/L의 경우에도 행하였으나, 사용된 PHEMA 비드 전체가 반응용기 형태로 가교되는 현상을 보여서, 이에 해당하는 영역을 Fig. 5에 bulk cross-linking으로 표시하였다. 이에 준하는 현상이 3 mol/L에서도 나타나 PHEMA 비드의 약 50 % 정도가 가교되었으나, DVS 2 mol/L일 경우는 가교현상이 관찰되지 않았고, DVS 결합량은 약 16.2 mmol DVS/g PHEMA이었다. 즉 적정농도 이상으로 존재한 DVS는 가교제로서 PHEMA에 작용하므로, DVS 적정농도의 설정이 매우 중요하다.

위의 실험들을 통해서 약 16 mmol DVS/g PHEMA가 PHEMA 비드들의 가교현상을 배제하며 얻을 수 있는 최대 DVS 농도로 고찰된다. 그 이유는 반응시간 및 DVS 농도의 영향 실험결과들을 보면 약 17 mmol DVS/g PHEMA에서 가교현상이 발현되기 시작하여 약 18 mmol DVS/g PHEMA에서는 전체적인 가교현상을 관찰할 수 있었기 때문이다.

3-2. β -Mercaptoethanol과 활성화된 PHEMA의 결합반응

T-gel 제조에서 agarose에 적용되었던 변수값들의 수정이 필요함을 앞의 활성화 반응을 통하여 확인하였는 바, β -mercaptoethanol과의 결합과정에서도 이들의 영향성을 알아보고자 하였다.

3-2-1. Na_2CO_3 농도의 영향

Fig. 6은 앞의 실험들을 통하여 얻어진 조건들로 제조되어진 활성화 PHEMA(이후, APHEMA)와 β -mercaptoethanol과의 결합과정에서 Na_2CO_3 용액의 농도 영향을 보여준다. Na_2CO_3 농도를 제외한 나머지 변수들은 그림 하단에 나타나 있으며, 이들은 agarose를 이용한 T-gel 제조에 적용되었던 값들과 동일하게 함으로써 반응의 출발점으로 하였다. Na_2CO_3 농도가 증가함에 따라 DVS 결합량 증가 및 PHEMA 입자들간의 가교현상을 보이던 활성화 반응과는 달리, 0.25 mol/L에서의 흡착량 40.8 μmol β -mercaptoethanol/g APHEMA을 기준으로 전후의 농도 0.05, 0.5 mol/L에서는 β -mercaptoethanol의 흡착량 증가와 감소의 현상이 확실하였다. 이는 고농도의 Na_2CO_3 가 β -

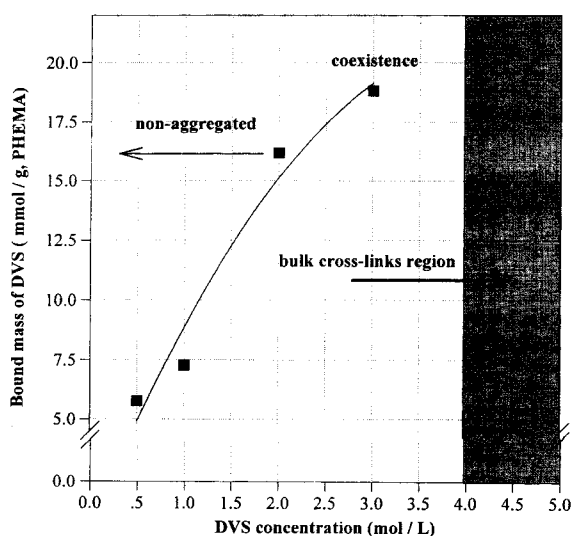


Fig. 5. The effect of the DVS concentration on the bound mass of DVS to the PHEMA beads(time=8 h, Na_2CO_3 =0.5 mol/L, pH=12.5, temp.=25 °C).

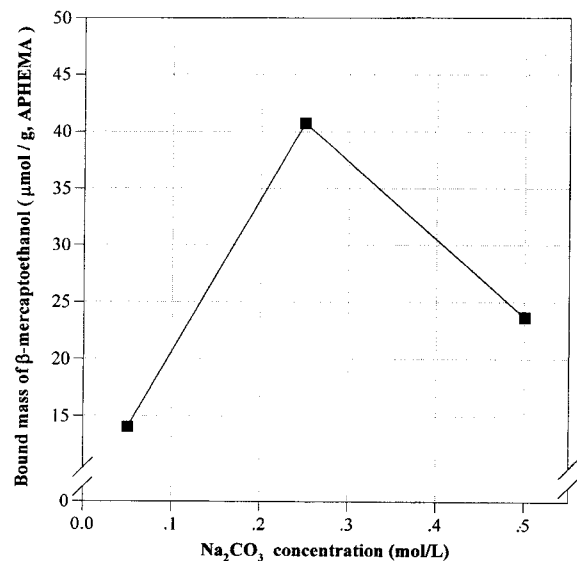


Fig. 6. The effect of Na_2CO_3 concentration on the bound mass of β -mercaptoethanol to the APHEMA beads(pH=11.5, time=12 h, β -mercaptoethanol=2 mol/L, temp.=25 °C).

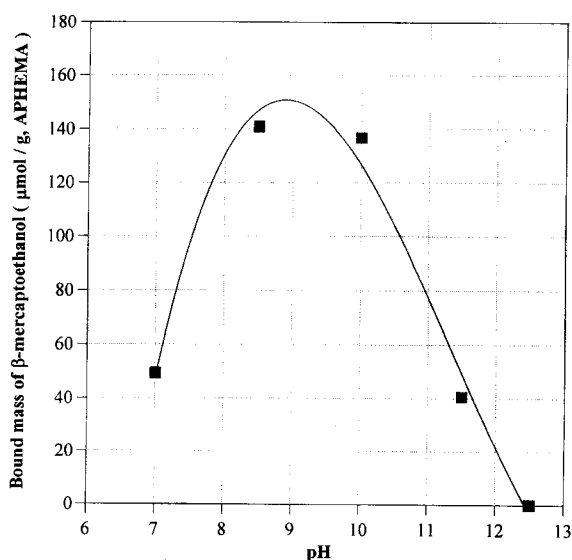


Fig. 7. The effect of pH on the bound mass of β -mercaptoethanol to the APHEMA beads (time=12 h, β -mercaptoethanol=2 mol/L, Na_2CO_3 =0.25 mol/L, temp.=25 °C).

mercaptoethanol의 산화작용을 유발시키고, 그에 따라 APHEMA로의 결합이 아닌 disulfide화하기 때문으로 고찰된다. 따라서 β -mercaptoethanol의 반응에 있어서 결합 완충제로서 Na_2CO_3 농도는 0.25 mol/L가 알맞음을 알 수 있었으며, 이 값은 T-gel의 제조에서 제안되는 값인 0.1 mol/L 보다 고농도의 값이다.

3-2-2. pH의 영향

Fig. 7은 Na_2CO_3 농도를 0.25 mol/L로 정한 가운데 Na_2CO_3 용액 pH의 영향을 보여준다. Na_2CO_3 농도의 영향과 마찬가지로 활성화 과정의 경향성과는 매우 다른 현상을 보이고 있다. pH에 비례하여 DVS의 결합량이 증가하는 활성화 과정의 경향과는 달리 β -mercaptoethanol 결합이 특정한 pH에서 가장 활발해지는 것이다. pH 8.5와 10.0에서 각각 140.9, 136.8 μmol β -mercaptoethanol/g APHEMA의 결합으로 최고 피크를 보이다가 pH를 12.5로 증가시키자 결합이 거의 일어나지 않았으며, pH 11.5에서 결합량은 오히려 pH 7.0에서의 결합량보다 못하였다. 이러한 값들을 이용하여 얻어진 적정 pH는 9이며, 앞서와 같은 pH의 영향성은 다음과 같이 고찰된다. 즉 pH 9를 기준으로 산성일 경우 APHEMA의 이중결합과의 반응이 우선하지만, 강염기성으로 pH가 증가하면 β -mercaptoethanol 사이의 산화 반응을 자극하여 disulfide를 형성하려는 반응이 우선하기 때문인 것이다 [23]. 따라서 pH는 이러한 반응의 상호연계성을 고려하여 결정되어야 하는 것이다.

3-2-3. 반응시간의 영향

Fig. 8에서 반응시간에 따른 APHEMA에 대한 β -mercaptoethanol의 결합량의 변화를 보였다. 36시간까지 증가를 보이던 결합량은 42시간에서부터는 더 이상의 변화를 볼 수 없었다. 6시간의 반응시 약 155 μmol 이던 반응량은 18시간에서 322.3, 36시간에서 410.5 μmol β -mercaptoethanol/g APHEMA를 보여 거의 선형적 증가를 보이다가, 정상상태로 들어가는 형태를 보이는 것이다. 이는 agarose를 이용한 T-gel 제조에 적용되었던 24시간에 비하여 더 길어진 값으로서, 이는 활성화 반응 시간 실험에서 고찰한 바와 같이, agarose와 PHEMA 사이의 물리적 구조의 차이로 볼 수 있다. 즉 agarose에 비해 견고하고, 팽윤도가 낮은 APHEMA와 반응물인 β -mercaptoethanol의 충분한 반응을 하기 위해서는 더 많은 반응시간이 필요한 것으로 고찰된다.

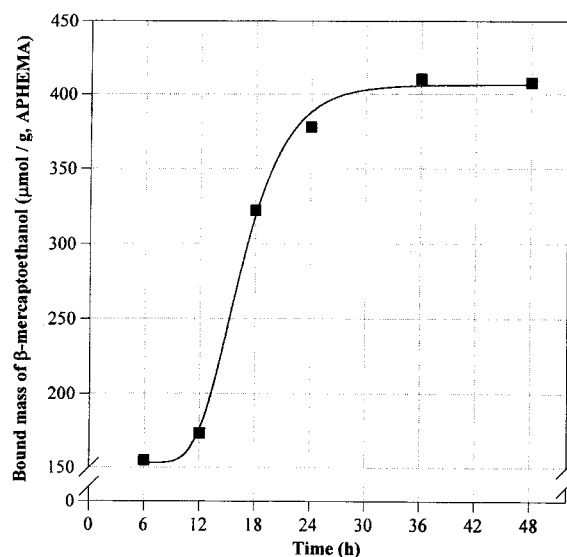


Fig. 8. The effect of reaction time on the bound mass of β -mercaptoethanol to the APHEMA beads (Na_2CO_3 =0.25 mol/L, pH=9.0, temp.=25 °C, β -mercaptoethanol=2 mol/L).

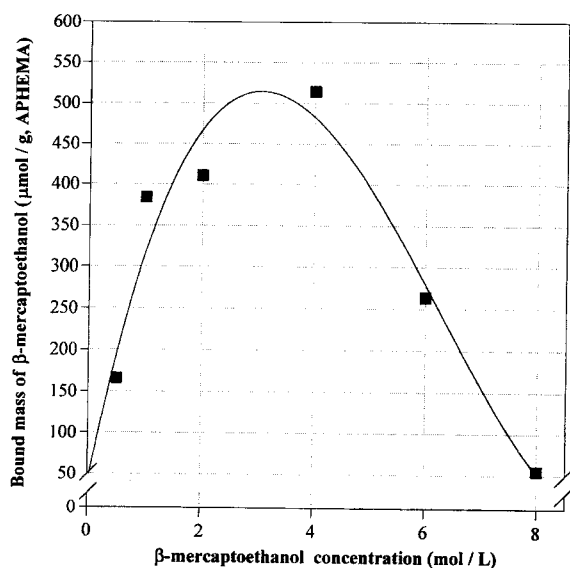


Fig. 9. The effect of β -mercaptoethanol concentration on its bound mass to the APHEMA beads (pH=9.0, time=36 h, Na_2CO_3 =0.25 mol/L, temp.=25 °C).

3-2-4. β-mercaptoethanol 농도의 영향

Fig. 9는 앞의 실험들을 통하여 3가지 변수들이 고정된 가운데 β -mercaptoethanol 농도에 따른 APHEMA에 대한 β -mercaptoethanol의 결합량의 변화를 보였다. DVS 활성화 반응에서 PHEMA 비드의 가교 현상 전까지 반응물 농도에 선형적으로 비례하던 경향과는 달리 4 mol/L에서 514.4 μmol β -mercaptoethanol/g APHEMA로서 흡착량의 최대값을 보이고 더 높은 농도인 8 mol/L에서는 저농도인 1.0 mol/L의 384.1 μmol 보다 더욱 낮은 54.9 μmol β -mercaptoethanol/g APHEMA의 결합량을 보였다. 이러한 결과는 앞의 실험들과 유사한 원인에서 유발된 것으로 보인다. 즉 β -mercaptoethanol의 산화반응을 지양하는 적정 pH로서 설정된 값이 9이지만, 과량의 β -mercaptoethanol 농도에서는 APHEMA의 이중결합과의 반응보다는 그들간의 산화반응이 더 우선되어 β -mercaptoethanol의 결합량이 급감하는

것이다. 따라서 APHEMA에 대한 β -mercaptoethanol의 결합반응에 서는 이 물질이 쉽게 산화 반응을 일으켜 disulfide를 형성할 수 있다는 점을 고려하여 반응조건 및 특성을 이해해야 할 것으로 고찰된다.

4. 결 론

Divinylsulfone(DVS)과 β -mercaptoethanol을 이용한 일련의 반응을 통해, 흡착담체 조건에 맞게 제조·선별된 poly(hydroxyethylmethacrylate)(PHEMA) 비드를 thiophilic-특성화 하고자 하였다. 이때 Na_2CO_3 농도, pH, 반응시간 그리고 각 반응물의 농도를 반응변수로 하여 실험을 행하였으며, 반응물의 PHEMA 비드에 대한 결합량이 최대가 되도록 변수를 결정하였다.

DVS를 통한 PHEMA의 활성화 반응에 있어서 얻어진 최대 결합량은 약 16.2 mmol DVS/g PHEMA이었으며, 이때의 반응변수 값은 Na_2CO_3 농도 0.5 mol/L, pH 12.5, 반응시간 8시간 그리고 DVS 농도 2 mol/L이었다. 이러한 반응조건을 결정함에 있어 가장 중요한 측면은 DVS 최대 결합 유도와 PHEMA 비드들의 가교현상 억제였다.

또한 활성화된 PHEMA(APHEMA)와 β -mercaptoethanol의 결합반응에서는 Na_2CO_3 0.25 mol/L, pH 9, 반응시간 36시간 그리고 β -mercaptoethanol 4 mol/L에서 약 514.4 $\mu\text{mol/g}$ APHEMA를 얻을 수 있었다. 활성화 반응에서 유의해야 할 점은 β -mercaptoethanol 상호간의 산화작용의 방지로 고찰되었다.

감 사

이 논문은 "교육부, 1997년도 학술연구조성비; 생물화학공학 분야"를 통한 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Porath, J., Maisano, F. and Belew, M.: *FEBS*, **185**, N.2, 306(1985).
2. Lihme, A. and Heegaard, M. H.: *Anal. Biochem.*, **192**, 64(1991).
3. Konecny, P., Brown, R. J. and Scouten, W. H.: *J. Chrom. A*, **673**, 45(1994).
4. Huchens, T. W., Magnuson, J. S. and Yip, T. T.: *J. Immunol. Methods*, **128**, 89(1990).
5. Sulk, B., Birkenmeier, G. and Kopperschlä, G.: *J. Immunol. Methods*, **149**, 165(1992).
6. Hutchens, T. W. and Porath, J.: *Anal. Biochem.*, **159**, 217(1986).
7. Porath, J. and Belew, M.: *Trends in Biotech.*, **5**, 225(1987).
8. Finger, U. B., Brümmer, W., Kneips, E., Thömmes, J. and Kula, M.-R.: *J. Chrom. B*, **675**, 197(1996).
9. Hermanson, G. T.: "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press Inc., San Diego(1992).
10. Turkova, J.: "Bioaffinity Chromatography", Elsevier, Amsterdam (1993).
11. Skely, P. J. and Tighe, B. J.: *Polym. Commun.*, **20**, 1051(1979).
12. Piskin, E.: *Int. J. Artif. Org.*, **9**, 401(1986).
13. Horák, D., Svec, F., Kálal, J., Adamyan, A., Skuba, N., Titova, M., Dan, V., Varava, B., Trostenyuk, N., Vorankova, O., Gumargalieva, K. and Timochina, V.: *Biomaterial*, **9**, 367(1988).
14. Im, J. H., Park, J. H., Jang, S. H., Han, H. S. and Joe, Y. I.: *HWAHAK KONGHAK*, **36**, 669(1998).
15. Im, J. H., Jang, W. J., Kim, H. S., Chun, K. Y., Han, H. S. and Joe, Y. I.: in press *HWAHAK KONGHAK*.
16. Porath, J., Låås, T. and Janson, J.: *J. Chrom.*, **103**, 49(1975).
17. Oscarsson, S. and Porath, J.: *Anal. Biochem.*, **176**, 330(1989).
18. Marcus, S. L. and Balbinder, E.: *Anal. Biochem.*, **48**, 448(1972).
19. Knudsen, K. L., Hansen, M. B., Henriksen L. R., Andersen, B. K. and Lihme, A.: *Anal. Biochem.*, **201**, 170(1992).
20. Noel, R. J., O'Hare, W. T. and Street, G.: *J. Chrom. A*, **734**, 241 (1996).
21. Lowe, C. R. and Dean, P. D. G.: "Affinity Chromatography", John Wiley & Sons, London(1974).
22. Porath, J. and Sunbderg, L.: *Nature New Biol.*, **238**, 261(1972).
23. Solomons, T. W. G.: "Organic Chemistry 6th edit.", John Wiley & Sons, Inc., New York(1996).