HWAHAK KONGHAK Vol. 39, No. 2, April, 2001, pp. 217-220
(Journal of the Korean Institute of Chemical Engineers)

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

Divinylsulfone-poly(hydroxyethyl-methacrylate) 비드의 human immunoglobulin G의 흡착에 대한 염과 pH의 영향

임재홍*† · 박종호 · 장순호 · 조영일

연세대학교 공과대학 화학공학과
*일본 물질공학 공업기술 연구소
(2000년 9월 27일 접수, 2001년 1월 3일 채택)

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

Effect of Salts and pH on the Adsorption of Human Immunoglobulin G by Divinylsulfone-poly(hydroxyethyl-methacrylate) Beads

Jaehong Im*†, Jongho Park, Soonho Jang and Yung-il Joe

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Yonsei University, Shinchondong 134, Seodaemunku, Seoul 120-749, Korea
**Chemical Systems Division, National Institute of Materials and Chemical Research, AIST, MITI, 1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8565, Japan*
(Received 27 September 2000; accepted 3 January 2001)

요 약

Divinylsulfone(DVS)을 특성기로 갖는 poly(hydroxyethyl-methacrylate, HEMA) 비드의 human immunoglobulin G(HIgG) 흡착에 대한 sodium sulfate, ammonium sulfate, potassium sulfate의 sulfate 계열 염들과 sodium chloride의 농도와 완충액 pH의 영향을 고찰하였다. Sulfate 계열의 염들은 완충액에 첨가되는 농도에 비례하여 DVS-polyHEMA 비드의 HIgG 흡착을 증가시켰으나, sodium chloride 농도 변화의 영향은 없었다. 동일한 sulfate 염에서도 양이온의 종류에 따라 HIgG 흡착량이 달라졌으며, 0.5 M 농도에서 Na^+, K^+, $(NH_4)^+$ 순으로 흡착을 촉진시켰다. 완충액의 pH 변화는 DVS-polyHEMA 비드의 HIgG 흡착에 영향을 주었으나, 염에 따른 경향성은 일정하지 않았다.

Abstract – It was were estimated how the buffer pH, the salt concentration and the salt species such as sodium sulfate, ammonium sulfate, potassium sulfate and sodium chloride affected on the human immunoglobulin G(HIgG) adsorption by using poly(hydroxyethyl-methacrylate, HEMA) beads reacted with divinylsulfone(DVS). Salts of sulfate series promoted the HIgG adsorption according to their concentrations but sodium chloride did not. In the sulfate salts, the adsorption tendencies were different with cation species and were increased in the order of Na^+, K^+, $(NH_4)^+$. There was the effect of pH on the adsorption of HIgG, but a constant tendency with salts was not observed.

Key words: Specific Adsorption, Human Immunoglobulin G, PolyHEMA Beads, Divinylsulfone

1. 서 론

21세기의 핵심 산업이라 할 수 있는 바이오 테크놀러지는 순수한 생체물질의 사용을 기본으로 하게 되나, 이러한 생체물질을 분리하기 시작한 것은 비교적 최근의 일이다[1-3]. 특히 세포융합기술에 의하여 동물 또는 생물반응기에서 균일하게 생산할 수 있게 된 항체 분자들은 면역 진단, 약물운반, 바이오 센서, 생체 분리와 같은 의료・생명 과학에서 핵심적인 물질이다. 항체는 면역 글로불린(Immunoglobulin, Ig) 단백질로서, 면역 글로불린 G(IgG)가 전체 면역 글로불린의 약 75%를 차지하고 있다[3-6]. 그러나 총 생산비의 약 50-80%에 이르는 분리・정제비로 인해 순수한 항체의 확보와 이용에 많은 어려움을 겪고 있다[7].

1985년에 Porath 등에 의해 제안된 새로운 흡착 메커니즘인 thiophilic 흡착은 황 원자와 thioether기를 갖는 물질이 혈청 단백질 특히 면역 글로블린에 대해 뚜렷하게 흡착하는 특성을 배경으로 한다[8-10]. 화학적

†E-mail: Jaehong@nimc.go.jp

안정성, 리간드의 높은 특성결합으로 현재 IgG 정제에 주로 사용되는 Protein A, G와 같은 기존의 고가 천연단백질이 리간드의 대체물로서 주목을 받고 있다. 현재까지 thiophilic 흡착 특성과 응용에 관련된 많은 연구가 이루어져 왔으며, 특히 Porath, Hutchens 등은 소수성 흡착과의 비교를 통해서 thiophilic 흡착만의 특성들을 밝히고 그 흡착 성능을 강화시킬 수 있는 조건들을 제시하는 등 흡착 메커니즘을 밝히고자 하였다[8, 9, 12-16]. 또한 Noel, Schwarz, Oscarsson 등은 리간드에 mercaptopyridine, ethanedithiol 등을 도입하는 등 리간드 구조의 영향성을 알아보고자 하였다[2, 3, 9, 16]. 그러나 이러한 많은 연구들에도 불구하고, thiophilic 흡착에 관한 메커니즘과 리간드의 영향성은 몇 가지 가설로만 존재하고 있고, 대부분의 연구들이 agarose를 기본 담체로 하고 있어 천연 물질이 갖게 되는 단점인 물리 · 화학적 내구성 부족, 제조 · 성형의 불균일성, 미생물에 대한 취약성 등의 문제점들을 갖고 있다.

본 연구에서는 thiophilic 담체화 과정 중간 물질의 human immunoglobulin G(HIgG) 흡착 특성을 고찰함으로써, thiophilic 흡착 메커니즘을 간접적으로 알아보고, 그 자체의 흡착제 이용 가능성을 평가해보고자 하였다. 먼저 선행 연구들[17-19]에서 얻은 결과를 토대로 우수한 물리 · 화학적 및 생물학적 특성을 갖는 친수성 고분자인 polyHEMA 비드와 thiophilic 특성화 중간 반응물인 divinylsulfone을 결합한 DVS-polyHEMA 비드를 제조하였다. 이 후 제조된 DVS-polyHEMA 비드를 이용해서 염의 종류와 농도, 완충액의 pH 변화에 따른 HIgG 흡착수율 변화 측정을 통해 그 영향성 등을 알아보았다.

2. 실험방법

2-1. 재료

담체로서 사용한 polyHEMA 비드의 제조와 관련된 구체적인 내용은 선행 연구물[17, 18]에 잘 나타나 있으며, polyHEMA 비드의 특징과 형태를 Fig. 1과 Table 1에 보였다. Human immunoglobulin G(HIgG, reagent grade), divinylsulfone(DVS), potassium sulfate, sodium sulfate, ammonium sulfate를 Sigma(St. Louis, USA)로부터, sodium azide는 Junsei Chem. (Tokyo, Japan)으로부터 구입하였다. Sodium phosphate, potassium phosphate, sodium chloride는 Yakuri pure chem.(Osaka, Japan), sodium carbonate를 동양화학공업주식회사(서울, 한국) 그리고 아세톤은 덕산 약품(경기, 한국)으로부터 각각 구입하였다. Polypropylene(PP) 재질의 셀(10 mL)은 IEC(Massachusetts, USA)로부터, effendorf tube 형태의 마이크로 튜브(1.7 mL)는 AxyGen(California, USA)로부터, 그리고 syringe filter(0.45 μm, PTFE)는 Whatman(New Jersey, USA)으로부터 구입하였다. 또한 전체 실험에 사용된 물은 Millipore 여과장치(ELGA STAT, UHQ)로 제조한 초순수를 이용하였다.

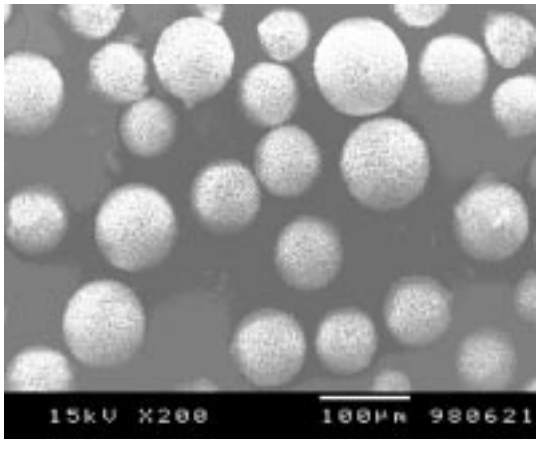

Fig. 1. SEM of the polyHEMA beads used as a basic adsorbent.

Table 1. Physical properties of polyHEMA beads

Property parameters			
Average diameter, μm	Porosity, %	Density, g/ml	Surface area, m^2/g
53	34.8	0.4	60.0

2-2. Divinylsulfone에 의한 polyHEMA 비드의 특성화

실험에 사용한 DVS-polyHEMA 비드의 divinylsulfone 결합량은 CHNSO analyzer 분석 결과 16.7 mmol DVS/g polyHEMA이었다. Thiophilic polyHEMA 반응과 관련된 구체적인 내용은 선행 연구물[19]에 보이고 있으나, 간단히 살펴보면 다음과 같다.

증류수로 충분히 세척한 polyHEMA 비드를 wet cake 상태로 일정 농도의 Na_2CO_3 5 ml에 분산시켰다. 병 내에 polyHEMA 비드가 충분히 분산된 후 DVS 일정량을 주입하여 25 °C에서 특정 시간동안 반응을 진행하였다. 반응 이후 제조물은 증류수로 충분히 세척하여 잔류 미반응물이 없도록 하였으며, DVS-polyHEMA 비드는 아세톤에 분산시켜 4 °C로 보관하였다. DVS에 의한 활성화 과정을 거친 polyHEMA는 보존 전에 일정량을 추출하여 80 °C, 1 기압으로 24시간 동안 건조하여, CHNSO analyzer (FISONS INS. EA 1108 CHNS-O)를 이용하여 황의 농도를 측정하여 결합량을 알아보았다.

2-3. Human Immunoglobulin G 흡착 실험

회분식 흡착 실험은 동일한 실험조건으로 polyHEMA와 DVS-polyHEMA에 대하여 이루어졌다. 보존되던 담체들은 증류수로 충분히 세척하여 wet cake 상태에서 0.1 g 씩 PP 재질의 튜브에 분산시키고 각 농도 · 종류별 염 용액을 1 mL씩 주입하였다. 활성화 poly HEMA의 wet cake 된 상태의 질량은 −48 °C, 0.6 bar로 24 h 동안 냉동건조하여 건조질량을 확인하였다. Shaker(KMC-1205SW1, Vision Scientific co.)를 통해 용액으로 담체를 충분히 분산시키고 HIgG를 주입하였으며, 이를 다시 shaker를 이용하여 상온에서 200 rpm으로 4 h 동안 교반하고, 원심분리기(himac CF 15D2, Hitachi)에서 분리하였다. 분리된 상층액을 UV(UV-160A UV Visible Recording Spectrophotometer, Shimadzu)로 280 nm에서 흡광도를 측정하고, 표준곡선으로 해석함으로써 용액내의 단백질 농도를 계산할 수 있었고 담체에 흡착된 양을 확인하였다.

3. 실험결과

3-1. 염 종류의 영향

Fig. 2에 ammonium sulfate, sodium sulfate, potassium sulfate, sodium

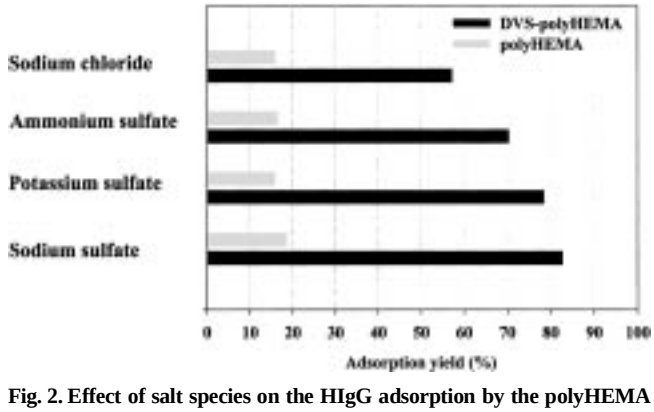

Fig. 2. Effect of salt species on the HIgG adsorption by the polyHEMA and the DVS-polyHEMA beads(salt conc.=0.5 M, pH=7.0, polyHEMAs=100 mg wet cake/ml, HIgG conc.=1.0 mg/ml).

chloride가 HIgG의 흡착에 미치는 영향을 보였다. 4가지 염을 선택한 것은 sulfate와 chloride 염들이 thiophilic 흡착에 대한 판단 기준이 되기 때문이며, 다양한 sulfate 염을 사용함으로써 양이온의 종류에 따른 흡착도의 차이를 알아보고자 하였다. 또한 이러한 고찰과 더불어 동일한 양이온인 sodium을 포함한 sulfate와 chloride 음이온을 사용함으로써 간접적으로나마 두 음이온들간의 영향성 차이를 알아보고자 하였다.

polyHEMA의 HIgG 흡착 수율에 대한 염의 종류의 영향은 거의 무시할 만하였으며, 수율은 약 10-20%의 범위에 존재하였다. 따라서 polyHEMA에 대한 HIgG의 흡착은 주로 polyHEMA 자체의 기공도, 표면장력 등 형태학적 원인과 염 첨가 석출 등 용매와 단백질 사이의 상호작용 등으로 발생하는 것으로 나타나, 단백질 종류에 관계 없이 일어나는 비특성적 물리 흡착으로 고찰된다.

DVS-polyHEMA의 흡착 수율에 대한 영향은 polyHEMA와 달리 완연하였다. 먼저 동일한 양이온인 sodium을 포함한 sodium sulfate와 sodium chloride의 흡착 수율은 약 27%의 차이를 보이고 있어, chloride 음이온 보다 sulfate 음이온의 영향성이 큼을 확인할 수 있었다. 또한 동일한 sulfate 음이온에 대응하는 양이온의 종류에 따른 흡착 수율의 차이는, 이들 양이온 역시 HIgG의 흡착에 역할을 한다는 것을 의미한다. 결국 sulfate와 chloride 같은 음이온들뿐만 아니라 양이온들 역시 단백질의 상대적인 용해도에 영향을 미치기 때문으로 고려된다. 단백질의 용해도는 Hofmeister 염 계열의 순서를 따르는데, 이때 음이온들 중 sulfate의 영향성이 chloride 보다 크고, 그에 따라 상대적으로 더 많은 양의 HIgG가 흡착되었을 것으로 고찰된다. 수용액내의 양이온이 단백질의 용해도에 미치는 영향성을 물의 표면장력으로 해석하고 그에 따른 염 첨가 석출 상수와 연관 지은 연구들은 이러한 영향을 물 구조 형성(water-structuring) 효과의 차이로 보고 있다. 즉 이들 양이온과 물 분자 간의 상호 작용력의 차이가 단백질의 용해도에 영향을 미친다는 것이다[20-23].

3-2. 염 농도의 영향

Fig. 3에 DVS-polyHEMA의 HIgG 흡착에 대한 염의 농도 영향을 보였다. Sulfate 염의 경우 사용한 염 모두에 대해 흡착 수율이 염 농도에 비례하여 증가하였다. 상온에서 potassium sulfate는 농도가 0.5 M을 넘을 경우, 염 석출이 계속되는 이유로 최대 농도를 0.5 M로 하였다. Sodium sulfate와 ammonium sulfate 1.0 M의 경우 흡착 수율은 각각 93%와 100%로서, 농도 변화 영향성이 거의 관찰되지 않는 sodium chloride 1.0 M의 수율 53%와 큰 대비를 이루고 있다. 또한 sodium chloride는 sulfate 염들과 달리 염이 없는 경우보다 수율이 떨어지는 현상을 보이기도 하였다.

단백질의 용해도는 Hofmeister 염 계열의 저농도에서는 증가하지만 고농도로 이동함에 따라 감소하게 된다. 이러한 영향력의 차이는 Hofmeister 염 계열의 순서를 따르는데, 이때 음이온들 중 sulfate의 영향성이 chloride 보다 크다고 알려져 있다[21, 23]. 그러나 본 실험에서 sodium chloride는 농도에 따른 흡착에 대한 영향성을 볼 수 없었다. DVS-polyHEMA의 이러한 sulfate 염 의존적 HIgG 흡착 형태와 sodium chloride에 대한 미반응성은 thiophilic 흡착의 대표적인 특성으로서, 활성화 polyHEMA의 구조에 기존의 thiophilic 흡착체에 존재하는 β-mercaptoethanol의 결합으로부터 유래한 황 원자가 없음에도 thiophilic 특성을 나타내고 있음을 보여준다. 이는 polyHEMA에 결합된 divinylsulfone 기의 말단에 있는 자유 vinyl기가 thiophilic 담체의 β-mercaptoethanol과 유사한 작용을 함으로써, 단백질과 결합을 이루는 것으로 고찰된다. 유사한 결과가 Noel 등에 의해서도 얻어졌다[16].

3-3. pH의 영향

Fig. 4에 각 염들의 농도를 1.0 M로 고정한 상태에서 HIgG에 대한 DVS-polyHEMA 흡착에 있어서 pH의 영향을 보였다.

Sodium chloride의 경우 pH의 영향이 없었으나, sulfate 염의 경우 영향이 관찰되었다. Sodium sulfate와 ammonium sulfate는 각각 pH 7.0에서 최대 흡착 수율을 보였으나 potassium sulfate는 오히려 최소 수율을 보였다. 3가지 pH에서 측정한 sodium sulfate에서의 수율은 평균 94%로서 ammonium sulfate의 91%, potassium sulfate의 83%보다 우수하였다. DVS-polyHEMA의 HIgG에 대한 흡착 수율에 대한 pH의 변화가 미치는 영향은 각 염들의 해당 농도에 따라 조금씩 관찰되었지만, 뚜렷한 경향성을 찾을 수 없었으며 그 변화 폭 역시 전체적인 흡착 수율에 비하면 유의할 만한 수준이 아니었다.

4. 결 론

Divinylsulfone(DVS)를 특성기로 갖는 poly(hydroxyethyl-methacrylate, HEMA) 비드의 human immunoglobulin G(HIgG) 흡착에 대한 sodium sulfate, ammonium sulfate, potassium sulfate의 sulfate 계열 염들과 sodium chloride의 농도와 완충액 pH의 영향을 고찰하였다.

PolyHEMA의 HIgG 흡착은 수율에 대한 염의 영향이 거의 없어 단백질 종류에 관계없이 일어나는 비특성적 물리 흡착으로 고찰되었으며, 수율은 10-20%의 범위에 존재하였다. Sulfate 계열의 염들은 완충액에

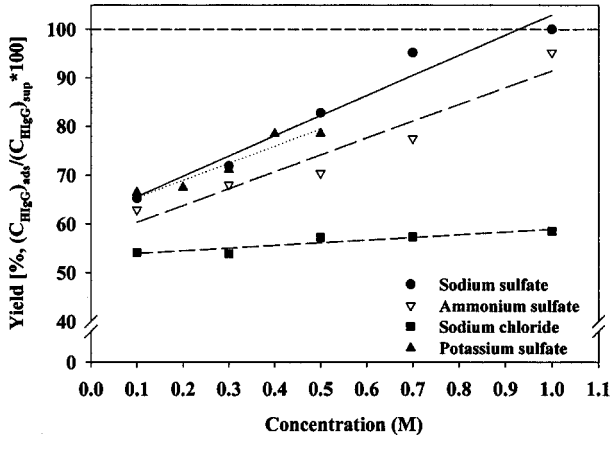

Fig. 3. Effect of salt concentrations on the HIgG adsorption by the DVS-polyHEMA beads(salt conc.=0.5 M, DVS-polyHEMA=100 mg wet cake/ml, pH=7.0, HIgG conc.=1.0 mg/ml).

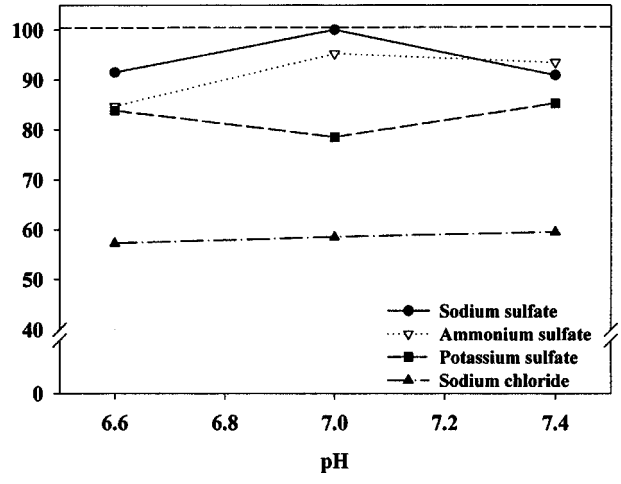

Fig. 4. Effect of pH on the HIgG adsorption by the polyHEMA/DVS (DVS-polyHEMA=100 mg wet cake/ml, HIgG conc.=1.0 mg/ml).

첨가되는 농도에 비례하여 DVS-polyHEMA 비드의 HIgG 흡착을 증가시켰으나, sodium chloride 농도 변화의 영향은 없었다. 이는 Hofmeister 염 계열의 순서를 따르는 수용액에 대한 단백질 용해도 차이의 영향성으로 고찰되며, sulfate의 영향성이 chloride 보다 크다는 Hofmeister 계열의 순서와 잘 일치하고 있다. DVS-polyHEMA의 이러한 sulfate 염 의존적 HIgG 흡착 형태와 sodium chloride에 대한 미반응성은 thiophilic 흡착의 대표적인 특성으로서, DVS-polyHEMA의 구조에 기존의 thiophilic 흡착체에 존재하는 β-mercaptoethanol의 결합으로부터 유래한 황 원자가 없음에도 thiophilic 특성을 나타내고 있음을 보여준다. 이는 polyHEMA에 결합된 divinylsulfone 기의 말단에 있는 자유 vinyl기가 thiophilic 담체의 β-mercaptoethanol과 유사한 작용을 함으로써, 단백질과 결합을 이루는 것으로 고찰된다. 동일한 sulfate 염에서도 양이온의 종류에 따라 HIgG 흡착량이 달라졌으며, 0.5 M 농도에서 Na^+, K^+, $(NH_4)^+$ 순으로 흡착을 촉진시켰다. 또한 수용액내의 양이온이 단백질의 용해도에 미치는 영향성은 물 구조 형성(water-structuring) 효과의 차이로 고찰되었다.

완충액의 pH 변화는 DVS-polyHEMA 비드의 HIgG 흡착에 영향을 주었으나, 염에 따른 경향성은 일정하지 않았다.

감 사

이 논문은 "교육부, 1998년도 학술연구조성비; 생물화학공학 분야"를 통한 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Nopper, B., Kohen, F. and Wilchek, M.: *Anal. Biochem.*, **180**, 66 (1989).
2. Schwarz, A., Kohen, F. and Wilchek, M.: *Reactive Polymer*, **22**, 259 (1994).
3. Schwarz, A., Kohen, F. and Wilchek, M.: *J. Chrom. A*, **664**, 83(1995).
4. Juan, A. A.: "Separation Processes in Biotechnology," Marcel Dekker, Inc., New York(1990).
5. John, F. K. and Joaquim, M. S. C.: "Recovery Processes for Biological Materials," John Wiley and Sons, Chichester(1993).
6. McGregor, W. C.: "Membrane Separation in Biotechnology," Marcel Dekker, Inc., New York(1986).
7. Knight, P.: *Biotech.*, **7**, 243(1989).
8. Porath, J., Maisano, F. and Belew, M.: *FEBS*, **185**, 306(1985).
9. Oscarsson, S., Medin, A. and Porath, J.: *J. Coll. Int. Sci*., **152**, 114 (1992).
10. Porath, J.: *J. Chrom.*, **376**, 331(1986).
11. Lihme, A. and Heegaard, M. H.: *Anal. Biochem.*, **192**, 64(1991).
12. Konecny, P., Brown, R. J. and Scouten, W. H.: *J. Chrom. A*, **673**, 45 (1994).
13. Huchens, T. W., Magnuson, J. S. and Yip, T. T.: *J. Immunol. Methods*, **128**, 89(1990).
14. Hutchens, T. W. and Porath, J.: *Anal. Biochem.*, **159**, 217(1986).
15. Finger, U. B., Brömmer, W., Kneips, E., Thömames, J. and Kula, M.-R.: *J. Chrom. B*, **675**, 197(1996).
16. Noel, R. J., O'Hare, W. T. and Street, G.: *J. Chrom. A*, **734**, 241(1996).
17. Im, J. H., Park, J. H., Jang, S. H., Han, H. S. and Joe, Y. I.: *HWAHAK KONGHAK*, **36**, 669(1998).
18. Im, J. H., Jang, W. J., Kim, H. S., Chun, K. Y., Han, H. S. and Joe, Y. I.: *HWAHAK KONGHAK*, **6**, 887(1998).
19. Im, J. H., Jang, W. J. and Joe, Y. I.: *HWAHAK KONGKAK*, **37**, 330 (1999).
20. Jenks, W. P.: "Catalyst in Chemistry and Enzymology," McGraw Hill Book, Co., New York(1969).
21. von Hippel, P. T. and Wong, K. Y.: *Sicence*, **15**, 577(1964).
22. Tomac, S., Sarkar, M., Ratilainen, T., Wittung, P., Nielsen, B. and Gröslund, A.: *J. Am. Chem. Soc*., **118**, 5544(1996).
23. Arakawa, T. and Timasheff, S. N.: *Biochem*., **3**, 5912(1984).