Systems biology and engineering (SBE)

임영일

6. 생물분리공정의 분류와 특성

생물공정은 주로 미생물의 발효반응기, 세포 분쇄과정, 분리/정제 공정으로 구성된다. 폴리펩타이드 (Mw<10 kDa) 나 단백질 (Mw>10 kDa) 과 같은 열에 약한 거대생물분자를 다루는 생물공정의 분리에는 전기영동법 (1D or 2D electrophoresis), 크로마토그래피법 (chromatography), 분리막법 (membrane in ultra-filtrations for size exclusion) 그리고/또는 결정화법 (crystallization) 등과 같은 정밀하고 섬세한 장치가 사용된다. 분리공정의 주요 목적은 단백질이나 펩타이드 생성반응 후 나오는 혼합용액에서 물/숙주단백질/단백질분해효소 등을 제거하는 것이다.

전기영동법은 pI (isoelectric point) 와 mass 차이를 이용하는 PAGE (Polyacrylamide (Agarose) Gel Electrophoresis) 이 주로 사용된다. 이러한 전기영동법은 주로 작은 양의 정량적 분석법으로 사용하지만, 대용량 분리공정에도 이용될 수 있다.

분리막법 (e.g., UF and MF, see Fig. 6-1) 은 주로 생물 반응후 우선적으로 거치는 분리공정으로 입자크기에 따라서 분리한다. 크로마토그래픽 공정은 대용량 단백질의 분리와 정제에서 많이 사용하며, 고순도의 최종 제품을 위해서는 생물반응에 관련된 여러 불순물 (비정상 단백질, 덩어리 단백질, 불완전 단백질, 비활성 단백질 등) 의 정제과정이 필요하기 때문에, 여러 단계의 크로마토그래픽 분리공정 (e.g., ion exchange (IEC), reversed phase (RPC), affinity (AFC), hydrophobic interaction (HIC) and size exclusion (SEC)) 을 포함할 수 있다. 하지만, 크로마토그래픽 공정개발에 있어서 생물분자의 복잡한 흡착메카니즘으로 인하여 아직까지 실험적 공정개발에 치중하고 있다 (Iyer et al., 1999). 결정화 공정은 주로 제품생산 최종단계에서 많이 사용되지만, 분리공정 전반에서 두루 사용될 수 있다.

분리/정제 공정의 한 예로서, 그림 6-1 은 노보노르디스크 (Novo Nordisk A/S, Denmark) 회사에서 재조합된 *E. coli* 박테리아로부터 생산하는 인간성장호르몬 (hGH, 191 amino acids, 22.125kDa, pI=4.9) 의 발효, 분리, 정제과정을 보여준다.

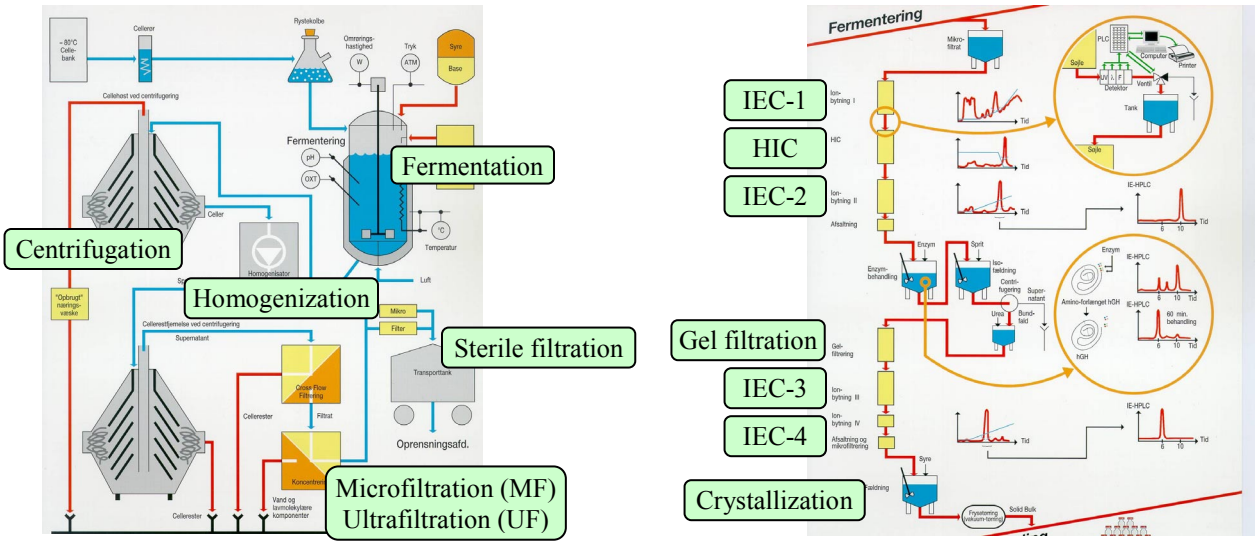

Fig. 6-1. Production, recovery and purification of a human growth hormone (hGH) through *E. coli* in NovoNordisk A/S (Novo Nordisk, internal report, Denmark, 2003).

hGH 의 분리/정제공정은 membrane (i.e., MF and UF) 을 이용한 1 차적 분리후, 여러 단계의 크로마토그래픽 공정 (i.e., IEC and HIC) 을 통하여 정제하고, 결정화를 통하여 마무리 짓고 있다 (Novo Nordisk, internal report, Denmark, 2003).
본장에서는 생물 분리공정에서 많이 사용하고 있는 분리막, 크로마토그래피 그리고 연속적 크로마토그래피 (SMB) 공정에 대하여 간략하게 살펴보고, 이들의 특성을 알아본다.

Keywords: bioseparation process, membrane, chromatography, SMB (simulated moving bed) chromatography.

6.1 분리막 (membrane)

분리막 공정은 높은 분리성능과 높은 살균력을 유지하면서 연속적으로 운전할 수 있으므로, 주로 발효반응후 나온 생성물의 1 차적 분리공정으로 많이 사용한다. 최근엔 membrane bioreacor (MBR) 과 같이 발효반응기와 분리막 공정을 결합하여, 발효반응에서의 생성될 수도 있는 반응저해물질 (inhibitor) 의 연속적 제거를 위해 MBR 기법이 개발되었다. MBR 의 한 예로서, 락틱산 생산공정에서 락테이트 이온은 음이온 교환막을 통하여 수산기 (OH^-) 와의 교환으로 연속적으로 제거될 수있다 (Garde et al., 2002).
분리막 공정 (e.g., microfiltration and ultrafiltration) 의 가장 큰 문제점중에 하나는 단백질이나 다른 거대분자에 의한 막표면의 막힘현상 (fouling of the membrane surface) 이다. 이러한 막힘현상을 줄이기 위한 한가지 방법은, 음이온교환막 (anion exchange membrane) 의 경우, 전류의 방향을 주기적으로 바꾸어서 막표면에 붙어있는 단백질등을 일시적으로 탈착시키는 것이다.
분리막 성능에 관한 연구는 주로, pH, 이온강도 (ion strength), 막표면 전하량, 막기공 크기에 따른 영향을 살펴보는 것이며, 이들 변수는 분리하고자 하는 목적 단백질과 불순물의 농도와 성분에 따라서 최적화되어야 한다.

6.2 크로마토그래피 (chromatography)

크로마토그래픽 분리는 컬럼내 고상의 충전입자와 액상의 여러 성분들간의 다른 친화력을 이용하여 분리하는 것이고, 친화력이 큰 액상분자는 느린속도로, 친화력이 작은 분자는 빠른 속도로 이동하기 때문에 각 성분은 다른 체류시간을 갖는다.
단백질등의 생물분자 대량생산을 위한 분리공정으로서 크로마토그래피 공정 (Baciocchi et al., 2002; Juza et al., 2000; Iyer et al., 2002) 이 다른 공정에 비해 아직까지는 유력해 보인다. 고순도의 최종제품을 위하여 생물반응에 관련된 여러 불순물 (비정상 단백질, 덩어리 단백질, 불완전 단백질 등) 제거를 위한 정제과정은 여러 단계의 크로마토그래픽 분리공정을 포함할 수 있다. 표 6-1 은 여러 가지 크로마토그래픽 분리공정의 특성을 보여준다.
크로마토그래픽 분리공정에서 쓰이는 크로마토그래픽 합성수지 또는 폴리머 (i.e., packing material, resin, polymer matrix) 는 분리공정의 성능을 좌우하는 매우 중요한 요소이다. 이들 합성수지의 성능은 단백질 결합용량과 결합력으로 크게 구분되는데, 분리하고자 하는 단백질의 종류에 따라 적절히 선택되어져야 한다.
좀더 가시적 단백질 분리공정에 대한 소개를 위해 그림 6-2 에서는, 피크의 분별도 (resolution) 가 분리성능을 크게 영향을 준다고 볼 때, 각 분리공정마다 특별한 분리대가 존재함을 볼수 있다. 즉 RPC (reverse phase chromatography) 는 주로 분자량이 비교적 작은 단백질, 분자량이 10^4 근처에서는 electrophoresis 에 의한 방법들과 SEC 가 큰 분별력을 보여준다. IEC (ion exchange chromatography) 와 CE (capillary electrophoresis) 는 전반적인 분자량범위에서 다른 피크를 보여주는 것이 다른 방법들과 구별된다. 그림 6-2 는 매우 간단하고 대략적인 분별능력을 보여준 것이고, 분리하고자 하는 단백질과 분리목적에 따라 분리방법은 선택되어져야 할 것이다

표 6-1. 단백질 크로마토그래픽 분리공정 분류

공정 분류	분리 원리	공정 특성
이온교환 공정 (IEC): Ion-exchange chromatography	정전기적 상호작용	단백질과 펩타이드의 최종정제를 위한 가장 일반적 공정, 목적분자와 다른 전하량을 갖는 불순물 제거, 까다롭지 않은 공정조건에서 사용
상 반전 공정 (RPC): Reversed phase chromatography	소수성 상호작용	펩타이드 분리를 위해 주로 사용되는 매우 강력한 분리공정, 유기용매 사용, 목적분자와 매우 비슷한 불순물제거, 최종정제와 단백질 포착단계에서 사용가능
소수성 상호작용 공정 (HIC): Hydrophobic interaction chromatography	소수성 상호작용	상반전공정보다는 분리력이 약한 공정, 수용성 용매 사용, 주로 큰 단백질 정제에 사용, 최종정제와 단백질 포착단계에서 사용가능
친화 공정 (AFC): Affinity chromatography	단백질과 리간드간의 친화성	배양매체와 숙주단백질제거를 위해서는 가장 강력한 분리공정, 리간드의 선택에서 분리성능에 큰 영향을 줌
단백질 크기 분리공정 (SEC): Size exclusion chromatography	크기	주로 최종정제단계에서 사용, 대상분자와 크기가 다른 단백질 제거

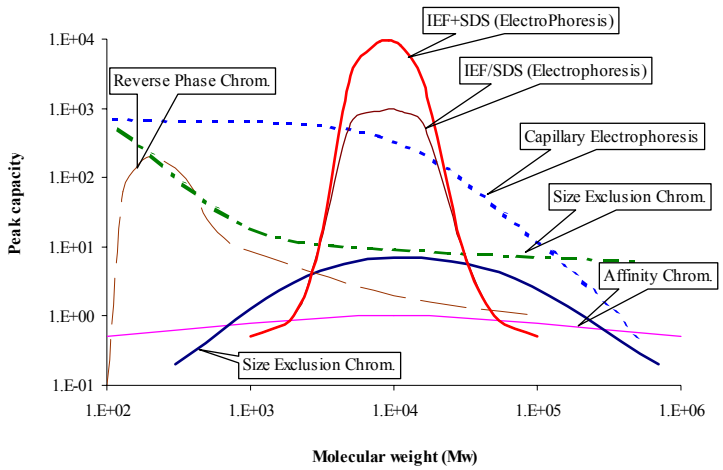

Fig. 6-2 Peak capacity distribution with respect to molecular weight according to separation methods (Conference on ISPPP 2002, Germany).

6.3 연속적 크로마토그래피 (SMBC, simulated moving bed chromatography)

연속적 크로마토그래픽 공정으로 생물분자의 대량생산에 적합한 SMB (simulated moving bed) protein chromatography 는 최근 각광을 받고 있는 분리 기술이다 (Juza et al., 2000; Xie et al., 2003). 여러 크로마토그래피 컬럼이 직렬로 연결되어 있는 SMB chromatography 는 분리하고자 하는 액상 성분과 고상흡착제와의 counter-current 접촉을 통하여 높은 driving force 를 유지할 수 있으며, 따라서 용매 사용량의 절감, 장치투자비를 감소시킬 수 있다. 하지만, 이러한 장점을 모두 취하기 위해서는 여러 운전변수 (e.g., flowrates, switching time and column configuration) 들이 적절히 조절되어져야 한다. 그림 6-3 은 일반적인 4-zone (desorbent-extract-feed-raffinate) SMB 공정을 보여준다.

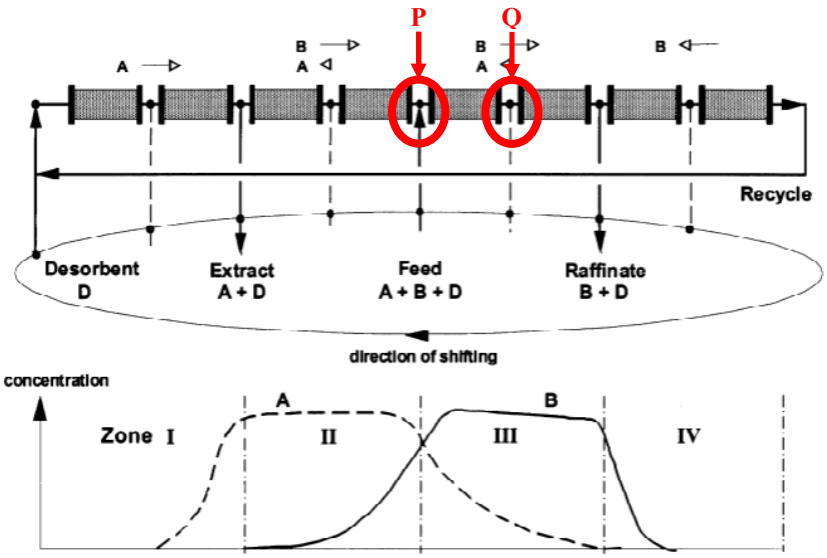

Fig. 6-3 4-zone (desorbent-extract-feed-raffinate) SMB process for separation of component A (high affinity) and B (low affinity).

직렬로 연결된 8 개의 크로마토그래피는 고정되어 있고, 4 개의 액상 흐름 (desorbent, extract, feed and raffinate) 을 정해진 switching time 에 따라 변경함으로 모사된 이동층 (simulated moving bed) 을 이루어 낸다. 즉, 그림 6-3 에서 보듯이, 어느 한 cycle 에서 용매 (D) 와 두성분의 혼합물인 feed (A+B+D) 를 P 점을 통하여 주입하다가, switching time 이 되면, 액상의 흐름 방향과 동일한 방향으로 한컬럼 앞당겨 Q 점에 feed 를 주입한다. 물론 다른 액상 흐름들 (desorbent, extract, and raffinate) 도 한컬럼 앞당겨서 주입되거나 추출된다 (Ma and Wang, 1997; Pais et al., 1998).
여기에서 모사된 고상속도 (solid particle velocity, $v_s = L_c / \tau$, where L_c is the single column length and τ the switching time) 는 친화력이 큰 A 성분의 이동속도 (=최저 고상속도) 와 친화력이 작은 B 성분의 이동속도 (=최대 고상속도) 의 사이에 존재하도록 운전되며, 두성분은 feed 점을 중심으로 분리된다. SMB 공정은 주로 두성분의 분리에 사용되므로, chiral separation 에서 많이 사용된다. 최근에 chiralpack 충전입자의 개발로 인하여, 대부분 생물분자에 존재하는 광학이성질체 (enantiomers) 의 분리에 매우 큰 잠재력을 갖고 있다 (Juza et al., 2000).
실험을 통한 이들 운전변수의 최적화는 일반적으로 시간이 많이 소요되고, 고비용이므로, model-based simulation and optimization 은 효과적으로 이들 운전변수를 최적화하는데 도움이 될 것이다. 이 공정의 모델링과 모사/최적화 결과는 다음장 (7 장) 에서 좀더 자세하게 설명한다.

6.4 결론

발효반응후 생성된 생물분자는 membrane 으로 장착된 filtration 과정을 거쳐서 1 차적으로 분리되고, 여러단계의 크로마토그래픽을 통하여 주로 정제된다. 이러한 생물공정의 하류공정 (downstream process) 은 상류공정 (upstream process) 의 생성물/불순물 농도등에 영향을 받기 때문에 생물반응기의 동적거동에 따라 분리/정제공정의 운전조건이 최적화되어야 한다 (Staby et al., 1998).
본 6 장에서는 생물분자 생산에 있어서 주로 사용하는 분리/정제 공정의 특성에 관하여 설명하였고, 다음 장에서는 분리/정제공정의 모델링과 모사에 관하여 다룬다.

Reference

Baciocchi et al. (2002), Separation of binaphthol enantiomers through achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 944, p225.

Garde, A.; J-U. Rype; G. Jonsson (2002), A method and apparatus for isolation of ionic species from a liquid, WO 02/48044 A2, p1-50.

Iyer H, Tapper S, Lester P, Wolk B, Van Reis R. (1999). Use of the steric mass action model in ion-exchange chromatographic process development. J Chromatogr A 832: 1-9.

Juza et al. (2000), Simulated moving bed chromatography and its application to chirotechnology, Trends in Biotech., 18, p108.

Ma, Z; Wang, N.-H. L. (1997), Standing wave analysis of SMB chromatography: Linear systems, AIChE J., 40(10), 2488-2508.

Pais, L. S.; Loureiro, J. M.; Rodrigues, A. E. (1998), Modeling strategies for enantiomers separation by SMB chromatography, AIChE J., 44(3), 561-569.

Staby et al. (1998), Comparison of loading capacities of various proteins and peptides in culture medium and in pure state, J. Chromatogra. A, 827, 311–318.

Xie, Y., S.-Y. Mun and N.-H. L. Wang (2003), Startup and Shutdown Strategies of Simulated Moving Bed for Insulin Purification, Industrial and Engineering Chemistry Research, 42(7), 1414-1425.