

Systems biology and engineering (SBE)

임영일

CAPEC, Department of Chemical Engineering,
Technical University of Denmark, DK-2800 Lyngby, Denmark
Phone: +45 4525 2804, Fax: +45 4593 2906, Email: lim@kt.dtu.dk

7. 크로마토그래픽 공정의 모델링과 모사

단백질 크로마토그래피 (e.g., chiral HPLC, IEC, RPC, HIC etc.) 는 생물분자의 대용량 정제를 위한 상용화 공정에서 많이 사용된다 (6 장의 그림 6-1 참조). 일반적으로 이들 생물분자는 매우 고가의 소량이므로, 공정 설계 변수 (e.g., bed voidage, column length and resin capacity) 와 운전변수 (e.g., feed concentrations, salt concentrations, flowrates, pH, temperature and ionic strength) 는 공정의 성능과 효율성을 극대화하도록 조절되어야 한다 (Jennings et al., 1995).

이러한 설계변수와 운전변수의 model-based optimization 을 위하여 다음과 같은 연구가 요구된다.

- 흡착메카니즘의 규명과 이에따른 흡착 평형농도식 (adsorption isotherms) 의 수학적 모델링
- 충전입자내 기공에서의 물질전달계수의 예측과 흡착반응식 (adsorption kinetics) 모델링
- 단백질의 구조 (structure) 또는 형상 (conformation) 변화에 관련된 흡착메카니즘 변화와 열역학적 특성치 변화에 대한 연구
- 실험결과와 비교를 통한 모델링 인자 예측, 공정의 최적화, 그리고 공정제어.

특히, 어떤 단백질 크로마토그래피 공정이 주어졌을 때, pH 와 salt 농도에 따른 분리 성능의 실험 또는 예측은 필수적인 단계이다. salt 농도는 운전중에 일정하게 유지하기 (i.e., isocratic mode) 보다는 특정시간동안 일정한 농도 기울기로 주입하는 gradient mode 로 운전된다. 그림 7-1 은 순수한 인간성장호르몬 단백질 (hGH, 191 amino acids, 22.125kDa, pI=4.9) 의 pH 와 salt 농도에 따른 실험으로 얻은 크로마토그램을 보여준다.

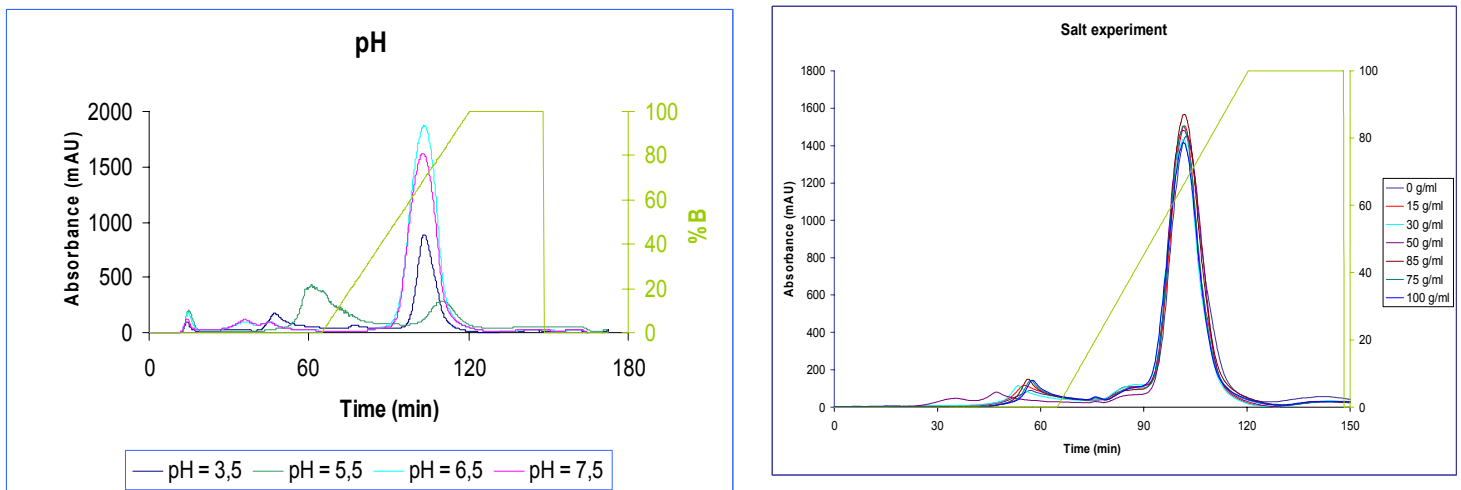


Fig. 7-1. Chromatograms for pure human growth hormone (hGH): comparison of separation performance in pH and salt concentration variations (Novo Nordisk, internal report, Denmark, 2003)

이 실험은 XAD 7 이라는 충전입자를 이용한 RPC 에서 얻은 결과로서, 최적 pH=6.5 그리고, salt conc.=85 g/ml gradient mode 에서 가장 좋은 분리성능을 보여주고 있다.

본 7 장에서는 먼저 pH 와 salt 농도가 분리능에 미치는 영향에 관하여 이론적으로 접근하고, 크로마토그래픽 공정의 모델링과 모사, 그리고 연속적 크로마토그래픽 공정이라고 볼 수 있는 SMB 공정의 모사/최적화에 관하여 설명한다. 특히 본장에서는 여러 크로마토그래픽 공정중에서 이온교환크로마토그래피 (IEC) 에 중점을 둔다.

Keywords: adsorption isotherms; adsorption kinetics; gradient elution mode; chromatography; SMB chromatography

7.1 흡착 평형농도식 (adsorption isotherms)

흡착 평형농도식은 컬럼의 충전입자와 액상의 단백질 성분간의 흡착 친화력을 측정할 수 있는 한가지 방법으로, 친화력이 큰 분자가 충전입자에 더 많이 흡착을 한다. 일반적으로 액상의 농도 변화에 따른 고상내 (i.e., 충전입자내) 흡착된 단백질의 질량으로 흡착평형농도식은 표현된다. 그림 7-2 (a) 는 인간성장호르몬 단백질의 RPC 에서 보여주는 평형농도이고, 그림 7-2 (b) 는 bovine serum albumin (BSA, 68 kDa, pI=4.7) 단백질의 IEC 에서 보여주는 평형농도이다.

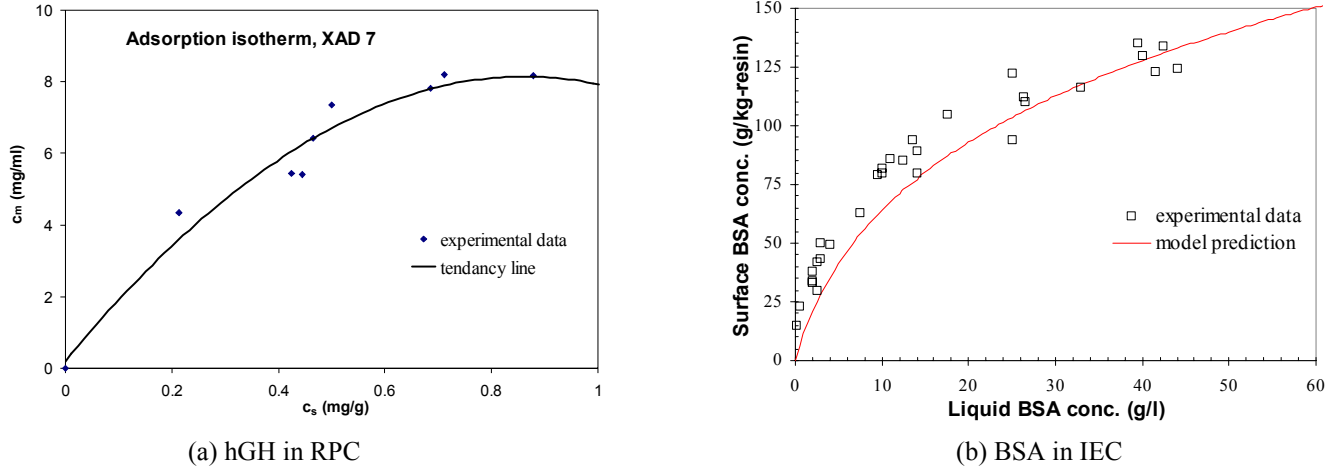


Fig. 7-2 Adsorption isotherms by experiments and model predictions.

단백질과 같은 거대분자 평형농도식의 모델링은 전통적으로 사용하는 단순한 식으로 설명이 안되는 경우가 많다. 전통적인 평형농도식으로 linear, Langmuir, bi-Langmuir or competitive bi-Langmuir 등이 있다 (James et al., 1999). 선형과 Langmuir 평형농도식은 다음과 같이 표현된다.

$$q_i^* = k_i C_i \tag{7-1}$$

$$q_i = \frac{k_i C_i}{1 + \sum_j k_j C_j} \tag{7-2}$$

특히 Langmuir-type 평형농도식은 mono-layer adsorption 가정하에서 유도된 식이므로, 단백질과 같은 multi-layer adsorption 특성을 보여주는 경우 좀더 정밀한 평형농도식의 사용이 요구된다. 열역학적 평형모델은 복잡한 단백질 흡착을 좀더 구체적으로 설명할 수 있다 (Reje & Pinto, 1997). 이모델은 특히 pH 와 salt 농도에 따른 흡착농도 변화를 설명할 수 있는 장점을 갖는다. 한 예로서 이온교환크로마토그래피 (IEC) 에서의 이온교환에 관하여 설명을 해보도록 한다. 어떤 salt 이온과 단백질 이온의 흡착에 대하여, 고상 충전입자의 평형농도 (q_i^*) 와 액상농도 (C_i), 그리고 salt 이온가 (z_s) 와 단백질 이온가 (z_j) 라고 하면, 이들간의 평형 반응식은 다음과 같이 표현할 수 있다.



여기에서, K_{sj} 은, salt 이온으로 포화된 충전입자에서 j-protein 이 흡착할 때 갖는 평형상수를 뜻한다. 따라서 이 평형상수는 각 농도의 활동도로써 표현할 수 있다.

$$K_{sj} = \frac{\bar{a}_j \left(\frac{a_s}{\bar{a}_s} \right)^{z_j/z_s}}{a_j} \tag{7-4}$$

여기에서 a_i 와 \bar{a}_i 는 각각 액상과 고상의 활동도이다. 따라서, 평형상태에서 고상의 단백질농도는

$$\bar{a}_j = \bar{\gamma}_j q_j^* = K_{sj} a_j \left(\frac{\bar{a}_s}{a_s} \right)^{z_j/z_s} \quad (7-5)$$

로서 표현된다. 이모델은 따라서 각 성분에 대한 액상/고상 활동도 계수 (activity coefficient) 와 이온가 (effective ion valence) 그리고 평형상수값, 즉, 한 개 성분에 대하여 4 개의 모델인자를 포함한다. NaCl 과 같은 단순한 염에 대한 전해질의 활동도 계수 예측모델 (Bromley, 1973; Meils et al., 1996) 은 비교적 잘 알려져 있지만, 단백질과 같은 복잡한 물질의 고상 활동도 계수 예측 모델 (Talu & Zwiebel, 1986; Raje & Pinto, 1997) 은 일반적으로 잘 알려져 있지 않기 때문에 실험을 통한 예측이 요구된다.

7.2 pH 와 salt 농도에 따른 흡착농도식의 영향

대부분의 이온교환 (IEC) 단백질 흡착에 있어서, 특정값 이상의 염농도 증가에 따라서 단백질의 흡착량은 감소한다 (Zhang & Sun, 2002). 왜냐면, 충전입자와 단백질간의 정전기적 상호작용이 염농도의 증가로 인하여 감소하고, 단백질 분자의 소수성 성향이 좀더 강화되기 때문이다. 염농도는 일반적으로 이온강도 (ionic strength) 로 표시되는데, 용액내 주된 전해질은 염이므로, 이온강도와 염농도는 거의 일치한다고 볼 수 있다. 일반적으로 이온강도 (I) 는 몰라농도 (molarity, mol/kg-solvent) 로 표시되는데, 염의 이온강도는 대부분 액상농도 (mol/l) 와 비슷한 값을 갖는다. 예를 들어 소금에 대한 이온강도는 다음과 같다.

$$I = \frac{1}{2} \sum_{j=Na^+,Cl^-} m_j z_j^2 = m_{NaCl} \approx C_{NaCl} \quad (7-6)$$

염농도는 식 (7-5) 에서도 보듯이 평형농도식에서 직접적인 연관관계를 갖고 있다. pH 는 주로 단백질의 이온가 (z_j) 에 큰 영향을 준다. 하지만 단백질의 이온가는 또한 염농도에도 변할 수 있다 (Menon & Zydney, 1999). 단백질과 같은 거대분자는 3 차원의 복잡한 구조로 인하여, 실질 이온가 (net charge, z_j^{net}) 와 흡착반응에 참여하는 효과적 이온가 (effective charge, z_j in Eq. (7-5)) 가 같은 값을 갖지 않는다. 일반적으로 실질 이온가 보다 매우 작은 양의 이온들만이 이온교환 흡착에 참여한다.

한 예로서 BSA 단백질의 pH 에 따른 실질 이온가 (z_{BSA}^{net}) 는 다음과 같이 표현될 수 있다 (Hu et al., 1992).

$$z_{BSA}^{net} = 96 - \sum_i \frac{(N_{H^+})_i}{1 + 10^{(pK_{diss})_i - pH}} \quad (7-7)$$

여기에서 $(N_{H^+})_i$ 는 BSA 몰당 해리 가능한 각각의 아미노산내 수소이온수이고, pK_{diss} 는 해리 가능한 아미노산의 해리상수이다. Hu et al. (1992) 는 이식을 이용하여 $pH=7.0$ 에서 $z_{BSA}^{net}=13.0$ 으로 예측하였는데, 이값은 실험값과 매우 잘 일치한다 (Menon & Zydney, 1999). 이 실질 이온가는 주어진 pH 에서 어떤 단백질 분자가 갖을 수 있는 최대 전하량을 의미한다.

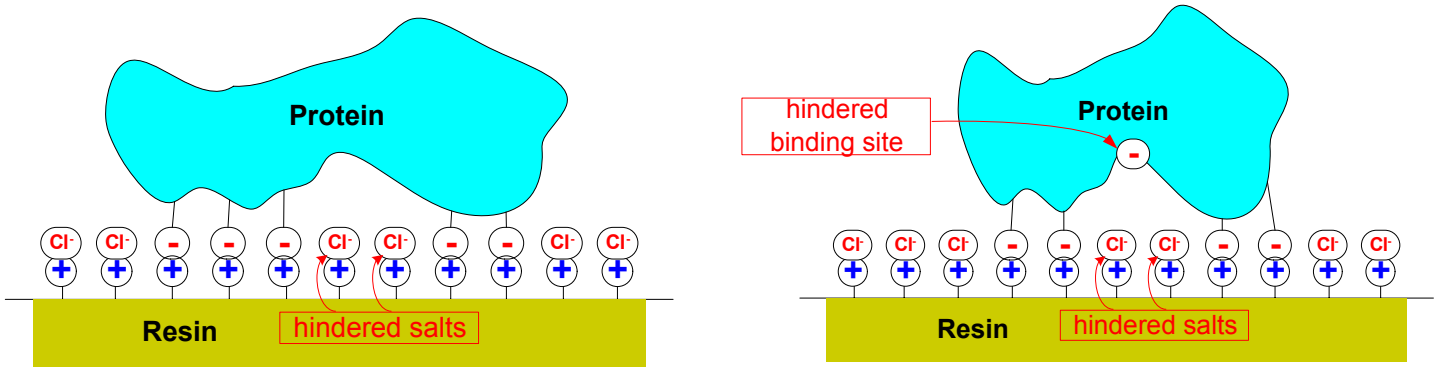
pI 보다 큰 pH 를 유지할 때, 단백질은 음전하를 띠게 되는데, pH 가 높아질수록 분자내 반발력이 커져 단백질분자의 반경은 약간 증가할 수 있다. 즉, pI 보다 너무 높거나 낮은 pH 에서 단백질 분자의 평균 크기는 약간 증가할 수 있으며, 높은 전하량으로 분자당 binding site 가 증가하게 되고, 따라서 흡착되는 단백질 수는 감소한다.

흡착반응에 참여할 효과적 이온가 (z_j) 는 흡착반응에 참여하지 않을 모든 숨겨진 이온가 ($z_j^{hindered}$) 를 고려하면서 정의할 수 있다 (Lim and Kim, 2004).

$$z_j = z_j^{net} - z_j^{hindered} \quad (7-8)$$

여기에서 숨겨진 이온가 ($z_j^{hindered}$) 는 액상 단백질 분자의 용액환경에 따른 단백질 형상변화를 고려하는 함수로서, 염농도, buffer solution, 또는 다른 성분들의 농도등을 고려해야 할 것이다. 특히 염농도의 증가는 단백질의 평균 분자크기를 약간 감소시키는데 (Menon & Zydney, 1999), 이로인해 일부의 이온들이 입체적으로 숨겨질 수가 있어, 결국 효과적 이온가를 감소시킬 수 있다 (Lim and Kim, 2004). 이에 대한 추정모델은 그림 7-3 에서 보여주고 있다.

이온교환크로마토그래피 내에서 BSA 의 숨겨진 이온가 ($z_j^{hindered}$) 는 약 $z_j^{hindered} \approx 8.1$ 정도로 예상된다 (Reje & Pinto, 1997).



(a) protein-resin binding at $C_{NaCl} = 300mM$

(b) protein-resin binding at $C_{NaCl} = 500mM$

Fig. 7-3 Putative model for the salt dependent effective charge of proteins

7.3 크로마토그래픽 공정 모델과 모사

크로마토그래픽 공정은 주로 회분식으로 운전 (batch mode) 이 되고, 농도분포가 시간에 따른 공간상의 변화로서 표시되므로, 시공간에 대한 편미방으로 모델링된다. 충전입자의 크기가 커서 물질전달 영향을 무시할 수 없을 때 (e.g., preparative chromatography), 비평형흡착 모델이 사용된다. 각각의 성분 에 대한 고/액상 질량수지식은 액상농도 (C), 고상농도 (n) 그리고 평형농도 (n^*) 에 대한 3 개의 식으로 구성된다.

$$\frac{\partial C}{\partial t} + v_L \frac{\partial C}{\partial z} = \frac{\partial}{\partial z} \left(D_{ax} \frac{\partial C}{\partial z} \right) - \frac{1 - \epsilon_b}{\epsilon_b} \frac{dn}{dt} \quad (7-9a)$$

$$\frac{dn}{dt} = k(n^* - n) \quad (7-9b)$$

$$0 = g(C, n^*) \quad (7-9c)$$

식 (7-9a) 는 컬럼의 길이 (z) 방향으로의 질량 이동항 (convection term), 확산항 (dispersion term) 그리고 흡착속도식 (reaction term) 을 포함하고 있고, 식 (7-9b) 은 linear driving force 흡착속도식을 나타내며, 식 (7-9c) 앞서 설명한 adsorption isotherms (see Eq. (7-5)) 의 일반화된 함수를 보여준다. 컬럼의 voidage (ϵ_b) 와 비흡착 물질의 순수 이동속도 (v_L) 는 공정설계 또는 운전변수로서 결정이 되고, 컬럼 축방향 확산계수 (D_{ax}) 그리고 물질전달계수 (k) 는 실험에 기초한 empirical equation 으로 유추될 수 있으며, 유체의 열역학적 특성치로서 간주된다. 앞서 설명한 바와 같이 흡착 평형농도식 (7-9c) 은 이 비평형모델식에서 분리성능을 좌우하는 가장 중요한 부분이다.

음이온 교환 크로마토그래피 공정의 한 예로, 염농도에 따른 BSA 단백질의 elution curve 는 그림 7-4 에서 보여준다. elution curve 는 컬럼의 끝에서 유출되어 나오는 용액의 농도를 시간에 따라 표현한 것으로, 크로마토그램을 농도단위로 환산한 것이다. 염농도 증가에 따라 효과적 이온가를 감소시키면서 식 (7-5) 의 흡착평형농도식을 이용하였을 때, 실험값에 매우 근사한 모사결과를 보여준다 (Lim and Kim, 2004).

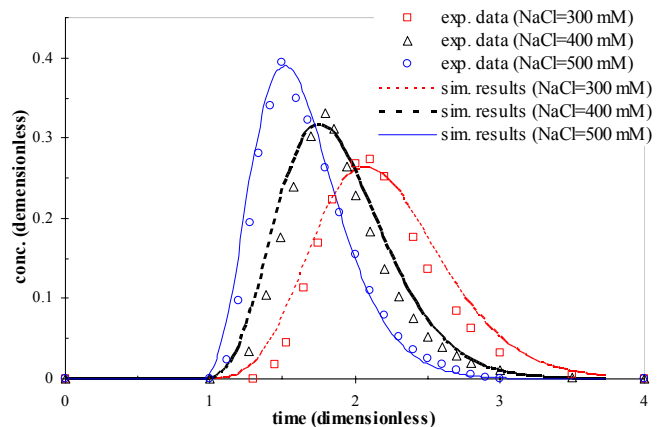


Fig. 7-4 Elution curves according to salt concentrations ($z_{BSA} = 5.20$ for $C_{NaCl} = 300mM$, $z_{BSA} = 5.02$ for $C_{NaCl} = 400mM$, and $z_{BSA} = 4.91$ for $C_{NaCl} = 500mM$).

7.4 SMBC (simulated moving bed chromatography)

제 6 장에서 설명을 하였듯이, SMB 공정은 flowrates, switching time and column configuration 등의 운전변수를 최적으로 조절되어야 SMB 공정의 고유한 장점들을 모두 살릴 수 있다. SMB 공정의 모델링에 있어서, true moving bed (TMB) model (Pais et al., 1998), 선형 흡착 평형 농도식에서의 continuous moving bed (CMB) model (Ma and Wang, 1997) 그리고 simulated moving bed (SMB) model (Pais et al., 1998) 등이 사용된다. TMB 혹은 CMB 모델은 정상상태에서의 개략적 평균농도를 비교적 간단하게 얻을 수 있지만, SMB 공정의 주기적 농도변화를 예측하기 위해서는 SMB 모델을 이용하여야 한다. 특히 흡착 평형 농도식 (adsorption isotherms) 의 비선형성이 증가할수록, TMB 모델의 정확성은 감소한다.

SMB 모델은 식 (7-9) 의 컬럼모델에 주기적인 port switching 을 모델링하는 식을 추가하여 얻을 수 있다.

$$\begin{cases} Q_{in}^i = Q_{out}^{i-1} + \lambda_1 Q_{feed} + \lambda_2 Q_{des} - \lambda_3 Q_{ext} - \lambda_4 Q_{raf} \\ C_{in}^i \cdot Q_{in}^i = C_{out}^{i-1} \cdot Q_{out}^{i-1} + \lambda_1 C_{feed} \cdot Q_{feed} + \lambda_2 C_{des} \cdot Q_{des} - \lambda_3 C_{out}^{i-1} \cdot Q_{ext} - \lambda_4 C_{out}^{i-1} \cdot Q_{raf} \end{cases} \quad (7-10)$$

여기에서 i 는 컬럼번호이고, i -column 으로 유입되는 유량은 $(i-1)$ -column 에서 유출되는 유량에 0 과 1 로서 구성된 논리변수 $(\lambda_1 - \lambda_4)$ 에 따라 주어지는 특정 유량과의 합 또는 차로써 계산되어진다. 논리변수 $(\lambda_1 - \lambda_4)$ 는 switching time 에 따라 변하며, 가상 이동층을 구현한다.

SMB 모델은 각 성분과 각 컬럼에 대한 편미방식을 계산해야 하므로, 빠르고 정확한 계산기법이 요구된다. 특히 최적화의 경우 수백번에 이르는 모사를 연속해서 수행함으로 계산시간이 많이 걸리게 되며, SMB 공정은 비교적 변화량이 큰 농도분포를 보이므로, 공간방향에 대한 계산오차가 클 수 있다. 빠른 계산과 적은 수치 오차를 위하여 CE/SE method 는 좋은 대안으로 여겨진다 (Lim et al., 2004).

그림 7-5 는 어떤 광학이성질체의 SMB 분리공정 (Pais et al., 1998) 의 최적화 결과를 보여준다. Pais et al. (1998) 이 제시한 운전변수를 초기값으로 시작하여, productivity 을 최대화하는 최적화를 통하여 얻은 이 결과는 43 번의 port switching 이후에 cyclic steady-state 의 처음, 중간 그리고 나중 상태를 보여준다. 본 최적화 과정은 Lim (2004) 에서 자세하게 설명된다.

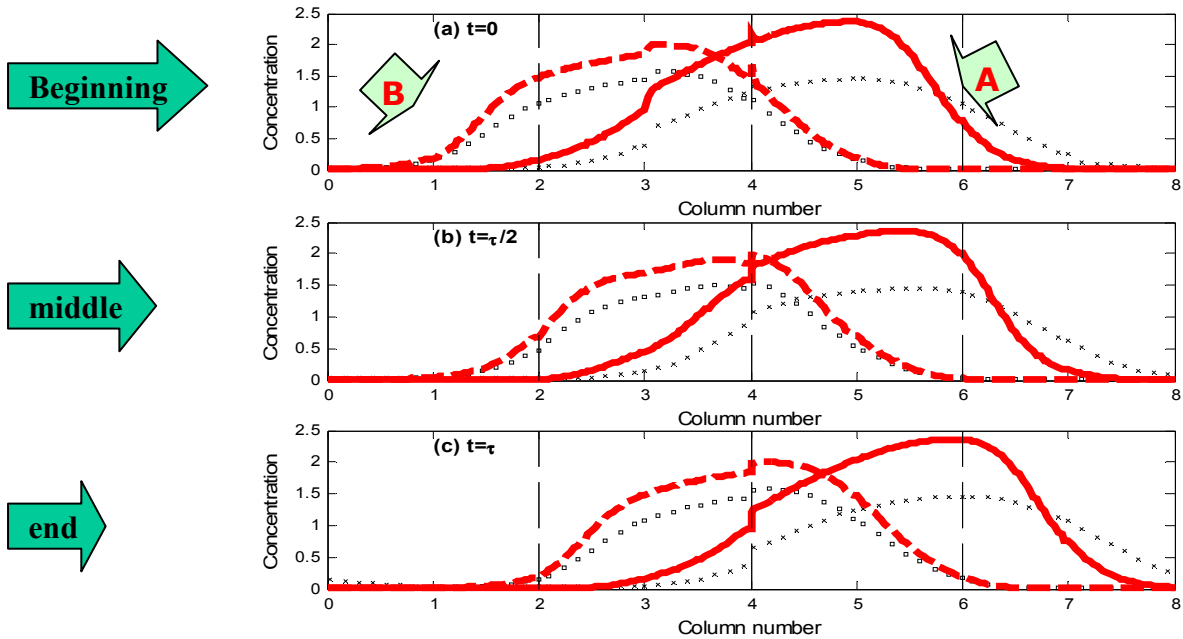


Fig. 7-5 Comparison of SMB simulation results for optimized operating conditions (bold lines) and initial operating conditions (points) at three different moments of the cycle time ($N_{shift} = 43$).

7.5 결론

생물분자의 분리 및 정제는 고순도를 요구하고 있기 때문에, 생물분자 생산공정은 매우 복잡하고 고비용의 downstream 공정을 포함하고 있다. 또한 연속공정이라기 보다는 회분식으로 운전이 되고 있기 때문에, 동적 공정모사와 동적 최적화가 요구된다.

생물분자의 복잡성과 다양성으로 인하여 흡착메카니즘의 규명과 흡착 평형식 모델은 아직 많은 연구가 진행중에 있으며, 단백질의 3 차원 구조에 따른 흡착특성에 관한 분자모델링 부분은 앞으로 흥미있는 연구분야가 될 것으로 생각한다. 또한 생물 분리공정에서 여러 단위공정의 scheduling and planning 을 통한 최적화는 좀더 경제적으로 생물분자를 생산해 낼 수 있을 것이다.

References

- Bromley, L. A. (1973), Thermodynamic properties of strong electrolytes in aqueous solutions, *AIChE J.*, 19(2), 313-320.
- Hu, X., D. D. Do & Q. Yu (1992), Effects of supporting and buffer electrolytes (NaCl, CH₃COOH and NH₄OH) on the diffusion of BSA in porous media, *Chem. Eng. Sci.*, 47(1), 151-164.
- James et al. (1999), Determination of binary competitive equilibrium isotherms from the individual chromatographic band profiles, *Chemical Engineering Science*, 54(11), 1677-1696.
- Jennings, L. S., K. L. Teo, F. Y. Wang & Q. Yu (1995), Optimal protein separation, *Computers Chem. Eng.*, 19(5), 567-573.
- Lim, Y. I. & I. H. Kim (2004), Modeling and simulation of protein ion-exchange chromatography, *Biotech. Bioeng.*, submitted.
- Lim, Y. I. (2004), An optimization strategy for nonlinear simulated moving bed chromatography: multi-level optimization procedure (MLOP), *Kor. J. Chem. Eng.*, accepted.
- Lim, Y. I., S. C. Chang & S. B. Jørgensen (2004), A novel PDAE solver: iterative CE/SE method, *Comp. Chem. Eng.*, *in press*.
- Ma, Z.; Wang, N.-H. L. (1997), Standing wave analysis of SMB chromatography: Linear systems, *AIChE J.*, 40(10), 2488-2508.
- Melis, S., J. Markos, G. Cao & M. Morbidelli (1996), Separation between amino acids and inorganic ions through ion exchange: Development of a lumped model, *Ind. Eng. Chem. Res.* 35, 3629-3636.
- Menon, M. K. & A. L. Zydney (1999), Effect of ion binding on protein transport through ultrafiltration membranes, *Biotech. & Bioeng.*, 63(3), 298-307.
- Pais, L. S.; Loureiro, J. M.; Rodrigues, A. E. (1998), Modeling strategies for enantiomers separation by SMB chromatography, *AIChE J.*, 44(3), 561-569.
- Raje, P. & N. G. Pinto (1997) Combination of the steric mass action and non-ideal surface solution models for overload protein ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A*, 760, 89-103.
- Talu, O. & I. Zwiebel (1986), Multicomponent adsorption equilibria of nonideal mixture, *AIChE J.*, 32(8), 1263-1276.
- Zhang, S. & Y. Sun (2002), Steric mass-action model for dye-ligand affinity adsorption of protein, *J. Chromatogr. A*, 957, 89-97.