

역마이셀을 이용한 α -Chymotrypsin 추출의 속도론 및 방법론

문창섭 · 노경호 · 정성택*

인하대학교 화학공학과
(1997년 4월 21일 접수, 1997년 6월 28일 채택)

Kinetics and Methodology of α -Chymotrypsin Extraction by Reverse Micelles

Chang Sup Mun, Kyung Ho Row and Sung Taik Chung†

Dept. of Chem. Eng., Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received 21 April 1997; accepted 28 June 1997)

요 약

음이온성 계면활성제 AOT와 iso-octane으로 이루어진 역마이셀상을 이용하여 α -chymotrypsin을 추출하는데 있어 속도론적 및 방법론적 연구를 하였다. 단백질의 이동속도는 이중경막론에 근거한 수학적 모델을 이용하여 정량화하였다. 상간이동법에서 단백질의 순이동 속도는 이동물과 아울러 pH(<pI)와 이온세기가 낮아질수록 증가한 반면, 그 반대 조건에서는 역이동이 우세하였다. 그러나 역이동 속도는 순이동 속도에 비해 약 10-100배 정도 느림을 보였다. 또한, 순이동의 pH 조건은 역이동 속도 및 이동물에 큰 영향을 주었다. α -Chymotrypsin의 역이동을 위하여 분자체를 이용한 탈수법을 도입한 결과 pH나 이온세기의 조작 없이 단백질을 침전으로 얻어내는 것이 가능하였고 역이동에서 순이동시의 pH와 이온세기는 단백질을 침전으로 얻어내는데 영향을 주지 않았다. 그리고 분자체의 투입량이 증가할수록 회수율이 증가하였고 상간이동법에 비해 높은 값을 나타내었다.

Abstract—Kinetics and methodology were investigated for the extraction of α -chymotrypsin using reverse micellar phase composed of AOT and iso-octane. Experimental data on the transfer rates of protein were analyzed quantitatively by a mathematical model based on the two-film theory of mass transfer. In the case of phase transfer method, the rate and percentage of the forward transfer increased with decreasing pH(<pI) and ionic strength, while the opposite conditions favored the back extraction from the reverse micellar phase. The rates of the back extraction, however, were approximately 10 to 100 times smaller than those of the forward extraction. The forward pH condition also had a significant influence on the rate and percentage of backward transfer. In another method that was introduced for the backward transfer, the micelles were dehydrated with molecular sieves in order to precipitate protein without manipulating pH and ionic strength. The forward pH and ionic strength did not act upon the precipitation of protein and the recovery of protein was elevated with molecular sieves input and higher than in the phase transfer method.

Key words: Reverse Micelle, Protein, α -Chymotrypsin, Extraction, Molecular Sieve

1. 서 론

역마이셀은 무극성 용매 속에서 계면활성제 분자들의 나노미터 크기의 집합체로서 열역학적으로 안정하고 광학적으로 투명하다. 생물공학적인 측면에 있어서, 이러한 구조적인 특성을 이용하여 물이나 단백질과 같은 친수성 분자들을 역마이셀의 극성 중심(polar core)에 녹일 수 있다. 이 방법은 극성인 용질을 외부의 무극성 용매로부터 효과적으로 차단할 수 있고, 효소인 경우 생물학적 활성을 유지시킬 수 있다. 따라서 지난 10년 동안 역마이셀을 이용한 단백질 추출법이 많이 연구되었다[1-7].

이러한 추출공정은 먼저, 선택적으로 단백질을 역마이셀상으로 이동시키는 순이동(forward transfer)과 역마이셀 속의 단백질을 다시 수용액상으로 회수해내는 역이동(backward transfer)의 두 단계로 나

눌 수 있다. 이러한 단백질의 이동은 주로 두 상의 접촉에 의한 상간 이동법(phase transfer method)에 의해 이루어진다.

이러한 단백질 이동의 구동력은 단백질과 역마이셀간의 정전기적 인력(electrostatic interaction)과 이온세기(ionic strength)에 의한 Debye screening effect를 들 수 있다. 이들에 영향을 미치는 주요 변수로는 수용액상의 pH, 이온세기와 종류, 단백질의 등전점(pI), 그리고 상의 부피비(V_m/V_w) 등을 들 수 있다.

따라서, 마이셀이 음이온성 계면활성제로 이루어진 경우 pI보다 낮은 pH에서 단백질 표면의 양의 전하 밀도가 높게 되고, 이 밀도가 클수록 역마이셀과의 정전기적 인력이 크게 된다. 또한 수용액상의 이온세기가 적을수록 Debye screening effect가 적게 일어나서 단백질과 역마이셀간의 인력이 간섭받지 않을 수 있게 되어 수용액상에서 역마이셀상으로의 순이동속도가 증가하게 된다. 반대로 pH와 이

온세기가 높을 때 수용액상으로 역이동속도가 증가하게 된다.

상간이동법 이외의 방법으로 역이동 공정에서 상간이동법에서의 pH와 이온세기 조작과 같은 번거로움을 피하기 위하여 실리카겔을 역마이셀상에 투입하여 역마이셀 속의 물, 계면활성제, 그리고 단백질을 실리카겔에 흡착시켜 단백질을 회수해내는 공정이 발표되었다[8].

그러나 다량의 계면활성제가 단백질과 함께 흡착되는 단점 때문에 최근에 Gupta[9]는 단백질의 역이동 과정에서 4Å의 세공 크기를 갖는 Na-A형 분자체를 이용하였다[10]. 순이동 과정으로부터 얻은 유기상에 분자체를 첨가하면 3.5Å의 친수성기와 8.3Å의 소수성기를 가진 AOT와 같은 계면활성제는 극미량만이 분자체의 표면에 흡착되고, 4Å의 세공내부로는 흡착이 불가능한 반면 역마이셀 속의 물만이 세공내로 흡착되어 단백질을 침전으로 얻을 수 있게 된다.

이와 같이 역마이셀을 이용한 단백질 추출에 대한 많은 연구가 있어 왔지만 단백질의 이동에 대한 속도론적인 접근은 거의 없었고 최근 90년대에 들어서야 시작되었다. 현재까지 알려진 속도론적 측면의 연구로는 stirred diffusion cell[11]에서 수용액상과 역마이셀상을 섞지 않고 계면을 일정하게 유지시키면서 α -chymotrypsin이 계면을 통과할 때의 물질이동 계수를 측정하거나, lysozyme과 ribonuclease에 대해 수용액상과 역마이셀상 사이의 2개의 경막으로 이루어진 계면을 통과한다는 이중경막론(two-film theory)을 적용하여 혼합물질이동계수(combined mass transfer coefficient, $K_L A$)를 측정한 것이 있다[12].

본 연구는 음이온성 계면활성제인 AOT[Sodium di(2-ethyl-hexyl)sulfosuccinate]와 iso-octane으로 이루어진 역마이셀상을 이용하여 단백질 분해 효소인 α -chymotrypsin을 추출하는데 있어 첫째, 상간이동법에 의해 수용액상 중의 α -chymotrypsin이 선택적으로 역마이셀상으로 이동하는 순이동과 이동한 역마이셀 속의 α -chymotrypsin이 다시 수용액상으로 이동하는 역이동에 대하여 수용액상의 pH와 이온세기에 따른 혼합물질이동계수($K_L A$)와 분배계수 값의 변화를 측정하여 Mixer-Settler System[13]이나 Spray Column[14] 등과 같은 실제 장치로서 scale-up하는데 필요한 기초 결과를 얻으며, 둘째, 상간이동법과 분자체를 사용한 방법으로 α -chymotrypsin을 역이동시키거나 회수하는 경우, 순이동시의 pH와 이동세기 같은 조건이 이에 미치는 영향을 조사하고 그 두 가지 방법을 비교하여 최적조건과 방법을 찾아내는데 그 목적이 있다.

2. 이 론

2-1. 이중경막(Two-film)을 통한 단백질의 이동 메카니즘과 물질이동계수

α -Chymotrypsin이 일정부피 V_1 인 상 1로부터 일정부피 V_2 인 상 2로 Fig. 1과 같은 계면의 이중경막을 통해 이동할 때, 시간 t 에서의 각각의 농도를 $C_1(t)$, $C_2(t)$ 라 하고 각 상의 부피 변화를 무시하면 물질수지식은 다음과 같다.

$$V_1 C_1(0) = V_1 C_1(t) + V_2 C_2(t) \quad \text{at} \quad t=0 \quad C_1(t) = C_1(0) \quad C_2(t) = 0 \quad (1)$$

두 상이 평형에 다다르면 $C_1' = m C_2'$ 라 할 수 있다. 여기서 m 은 평형 분배계수이고 C_1' , C_2' 는 평형농도이다. $t \rightarrow \infty$ 일 때 평형상태라면 평형분배계수는 다음과 같다.

$$m = \frac{C_1(\infty)}{C_2(\infty)} \quad (2)$$

이중경막론을 가정한다면 물질이동속도 j_L 은 다음과 같다.

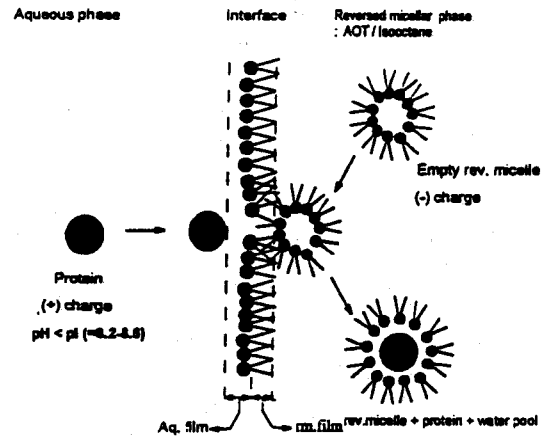


Fig. 1. Mechanism of protein transferring through the two-film into the reverse micelles.

$$j_L = K_L A [C_1(t) - C_1'] \quad (3)$$

K_L 은 총괄물질이동계수(overall mass transfer coefficient)이고 A 는 두 상간의 접촉 면적이다. 그리고 $C_1' = m C_2(t)$ 과 물질수지식을 식 (3)에 대입하여 $C_2(t)$ 를 소거한 후 $C_1(0)$ 에서 $C_1(t)$ 까지 적분하면 다음과 같이 된다.

$$\frac{C_1(t)}{C_1(0)} - \beta = (1 - \beta) \exp[-(\alpha t)] \quad (4)$$

여기서

$$\alpha = \frac{K_L A}{V_1} (1 + m V_2) \quad (5)$$

$$\beta = \frac{m V_2}{(1 + m V_2)} \quad (6)$$

$$V_r = \frac{V_1}{V_2} \quad (7)$$

식 (4)-(7)은 두 상사이에서의 α -chymotrypsin의 이동을 나타낸다. 식 (4)를 다시 표현하면,

$$\ln \left[\frac{C_1(t) - \beta C_1(0)}{(1 - \beta) C_1(0)} \right] = -\alpha t \quad (8)$$

식 (8)의 좌변을 우변의 시간 t 에 대해서 plot하면 그 기울기 $-\alpha$ 값을 구할 수 있다. 따라서 식 (5)-(8)과 실험에 의해 얻은 농도 data로부터 반복 계산을 통해 α 값이 최대오차 10% 범위내에서 가능한 모든 data에 맞을 때까지 반복 계산을 하여 α 값을 구하고, 식 (5)로부터 $K_L A$ 값을 구할 수 있다.

단백질의 이동에 대한 총괄저항 $1/K_L A$ 는 수용액상과 유기상의 계면에 존재하는 두 개의 경막에 대한 저항들의 합으로 나타낼 수 있다. 단백질 이동시 계면에서의 용해 단계에 대한 저항을 무시하면 혼합물질이동계수 $K_L A$ 는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\frac{1}{K_L A} = \frac{1}{k_{aq} A} + \frac{m}{k_{rm} A} \quad (9)$$

비록 두 상간의 접촉면적 A 는 미지수이지만, 위의 식 (9)에서 $1/K_L A$ 와 m 값의 직선관계로부터 절편 $1/k_{aq} A$ 과 기울기 $1/k_{rm} A$ 를 구할 수 있으므로 개별혼합물질이동계수(individual combined mass transfer coefficient) $k_{aq} A$ 및 $k_{rm} A$ 를 구할 수 있다.

3. 실험

3-1. 시약

본 실험에 사용된 단백질인 α -chymotrypsin(from bovine pancreas)과 음이온성 계면활성제인 AOT[Sodium-di(2-ethyl-hexyl)-sulfosuccinate] 그리고 KCl은 Sigma에서 구입하였고, 역마이셀상을 이루는 spectrophotometric grade의 iso-octane(2,2,4-trimethylpentane)은 Aldrich에서 구입한 시약을 사용하였다. Karl-Fisher 적정에 사용된 적정 시약 Hydranal-Coulomat AG-H와 Hydranal-Coulomat CG는 Riedel-de Haen, 그리고 세공크기 4Å의 A형 분자체는 Merck에서 구입한 시약을 사용하였다. 그 외 acetic acid, phosphoric acid, NaCl 등은 모두 1급 시약을 사용하였다. 실험에 사용된 물은 실험실에서 증류 후 이온교환 수지를 거친 18 M Ω 의 deionized water를 사용하였다.

3-2. 상간이동법: 순이동

역마이셀상은 50 mM AOT/iso-octane이고, pH의 영향을 조사하기 위해 수용액은 20 mM acetate pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 buffer와 0.2 M NaCl, 그리고 1 mg/ml α -chymotrypsin으로 이루어져 있다. 이 두 상을 각각 15 ml씩 제조하여 24 °C로 항온된 삼각 플라스크에서 rpm 조절이 가능한 Hot plate stirrer(Thermolyne)를 이용하여 400 rpm으로 magnetic stirring에 의해 두 상을 접촉시키면서 정해진 시간 간격에 따라 1 ml씩 채취하면서 600초간 실험하였다. 채취한 시료는 micro centrifuge(Micro 12, Hanil)를 이용해서 약 5,000 rpm에서 90초간 원심 분리한 후, 양상의 단백질의 농도는 280 nm에서 UV-Vis spectrophotometer(Varian)를 이용하여 측정하였다[15, 16]. 이때 α -chymotrypsin의 extinction coefficient는 50,000 M⁻¹cm⁻¹를 사용하였다[17]. 또한 그때에 역마이셀상에 생성된 water pool의 양은 역마이셀상 중 200 μ l를 syringe(Hamilton)를 이용하여 채취한 후 Karl-Fisher 적정기[18]로 측정하였다.

그리고 이온세기의 영향을 알아보기 위해 수용액상의 조건을 pH 5 acetate의 일정조건에서 NaCl의 농도를 0.2, 0.3, 0.4, 1.0 M로 변화시켜가면서 pH의 영향과 동일한 실험을 진행하였다.

3-3. 상간이동법: 역이동

우선 α -chymotrypsin의 순이동을 pH 5 acetate와 0.2 M NaCl 조건에서 60초간 교반하여 단백질을 이동시킨 후에 30분 정도 상압에서 대부분의 상분리를 일으킨 후, 단백질이 이동한 12 ml의 역마이셀상을 채취하였다. 다시 단백질이 이동할 수용액은 20 mM phosphate pH 6, pH 7.5, pH 9, pH 10.5, pH 12 용액과 1 M KCl로 이루어진 용액 12 ml를 제조하였다. 이 두 상을 약 700 rpm에서 60분간 교반하면서 정해진 시간에 따라 0.7 ml씩 채취한 시료를 상압에서 상분리를 일으킨 후 두 상의 농도를 측정하였다.

단백질의 역이동에서 이온세기의 영향은 pH 영향 실험에서와 같은 일정조건에서 순이동시킨 후, 20 mM, pH 7.5 phosphate의 일정조건에서 KCl의 농도를 0.5, 0.8, 0.9, 1.0 M까지 변화시켜가며 각 조건에 따라 시간에 따른 단백질의 농도 변화를 60분간 관찰하였다.

3-4. 순이동시 pH의 영향

0.2 M NaCl, 1 mg/ml α -chymotrypsin의 조건에서, 순이동의 pH를 20 mM acetate pH 5, pH 6, pH 7 buffer로 변화시켜가며 단백질을 이동시킨 후, 역이동은 20 mM, pH 7.5 phosphate, 1 M KCl의 일정조건에서 일으켜 초기 pH의 역이동에 대한 영향을 60분간 조사하였다.

3-5. 분자체를 이용한 단백질의 회수

순이동을 앞의 pH와 이온세기 조건에서 일으킨 후 30분간 두 상

Table 1. Experimental variables

Variables		Forward transfer	Backward transfer
Phase transfer	pH	20 mM Acetate pH 5, 6, 7, 8	20 mM Phosphate pH 6, 7.5, 9, 10.5, 12
	Ionic strength	NaCl 0.2, 0.3, 0.4, 1.0 M	KCl 0.2, 0.3, 0.4, 1.0 M
	rpm	350, 400	750
Using	Molecular molecular sieves input sieves		After forward transfer 50, 100, 150, 200 mg/ml

Reverse micellar phase : 50 mM AOT/iso-octane, Temperature : 24 °C.

을 분리하였다. 역이동 실험은 15 ml 용량의 vial에서 단백질이 이동된 10 ml의 역마이셀상과 미리 흡착된 수분을 제거하기 위해 300 °C에서 2시간 가량 건조 후 상온의 온도로 유지된 분자체를 50, 100, 150, 200 mg/ml씩 투입하여 약 20분간 잘 혼합한 후, 평형상태에 도달시키기 위해 약 12시간 동안 냉장 보관하여 단백질을 침전으로 회수하였다. 회수된 α -chymotrypsin의 양은 역마이셀상에 남아있는 α -chymotrypsin의 농도를 측정하여 결정하였고, 분자체에 흡착되지 않고 역마이셀상에 남아있는 물의 양은 Karl-Fisher 적정으로 Wo값을 측정하였다.

실험에 사용된 실험 변수들을 Table 1에 나타내었다.

4. 결과 및 고찰

4-1. α -Chymotrypsin의 순이동

4-1-1. pH의 영향

음이온성 계면활성제를 사용할 경우 단백질이 역마이셀상으로 용해되는 경향은 pH가 증가하여 단백질의 등전점인 pI값에 가까워짐에 따라 그 이동속도와 이동률(% transfer)이 낮아지게 된다[12, 19, 20].

Fig. 2는 수용액상의 pH에 따른 수용액상에서의 α -chymotrypsin의 시간에 따른 농도 변화로 대부분의 단백질이 약 60초 정도의 짧은 시간 안에 역마이셀상으로 이동했음을 알 수 있다. α -Chymotryp-

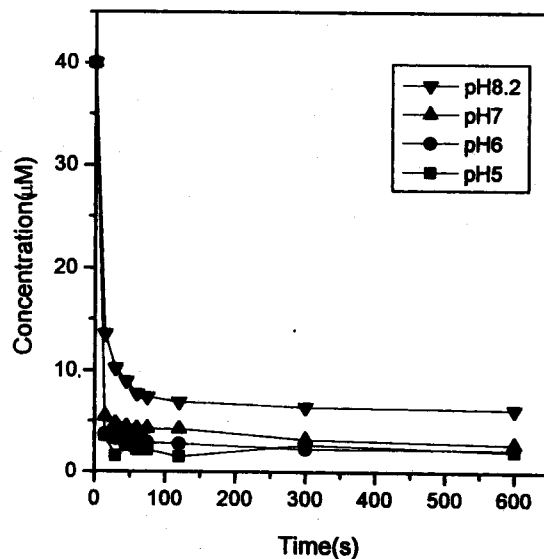


Fig. 2. Changes in concentration at forward transfer of α -chymotrypsin with pH. (0.2 M NaCl, 350 rpm, 24 °C).

sin의 등전점, pI 8.2이하의 pH에서 단백질은 표면의 아미노산 분자들이 양의 전하를 띄게 되고, pH가 낮아질수록 단백질 표면의 양의 전하밀도가 증가하게 되어 역마이셀의 음의 전하를 띄는 친수성기들에 생성된 전기이중층(Electrical Double Layer)[13]과 더욱 강한 정전기적 인력을 갖게 된다[21]. 따라서 pH가 pI 값보다 낮아질수록 단백질의 역마이셀상으로의 이동속도가 높아지게 되고, 단백질이 음이온성 역마이셀의 극성 중심으로의 용해되는 정도가 커지므로 이동률이 높아지게 된다.

이중경막론에 근거한 식 (8)에 의해, pH에 따라서 α -chymotrypsin이 역마이셀상으로 이동하는 이동속도의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. pH가 낮아짐에 따라 속도를 나타내는 기울기의 크기가 점점 증가함을 알 수 있다. Fig. 3의 기울기로부터 계산한 $K_L A$ 값과 분배계수 m 값을 Fig. 4에 나타내었다. $K_L A$ 값은 pH 8인 경우 $2.36 \times 10^{-7} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ 이지만, pH 5에서는 $13.11 \times 10^{-7} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ 로 약 6배 정도의 추출 속도의 증가를 보여준다. 또한 pH가 낮아질수록 분배계수, $m = C_{aq}/C_m$ 값이 낮아지므로 역마이셀상으로 더 많은 단백질이 이동했음을 알 수 있다.

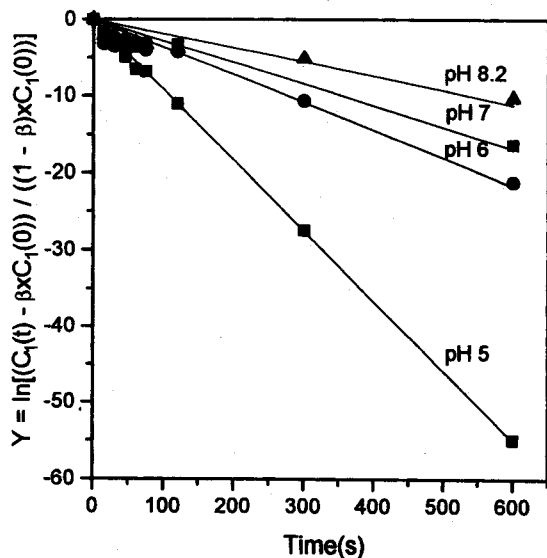


Fig. 3. Forward transfer rates of α -chymotrypsin with pH. (0.2 M NaCl, 350 rpm, 24 °C).

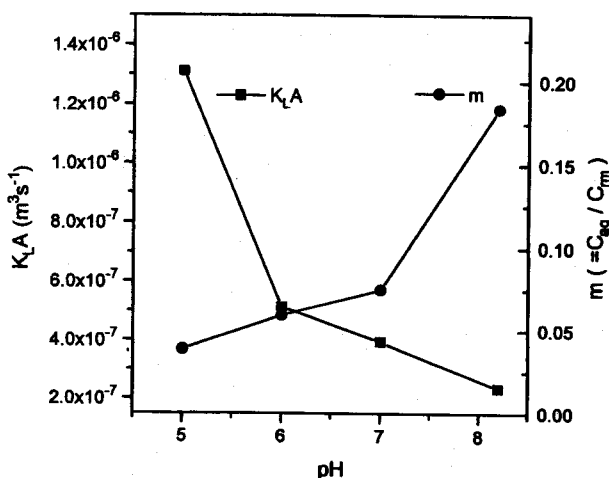


Fig. 4. Effect of pH on $K_L A$ & m at forward transfer of α -chymotrypsin. (0.2 M NaCl, 350 rpm, 24 °C).

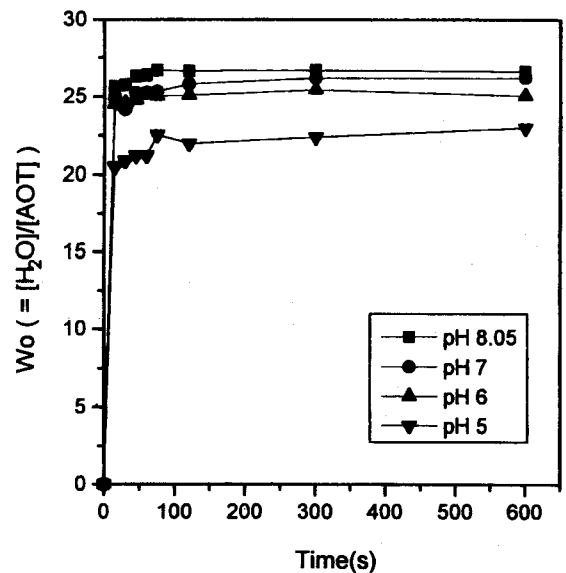


Fig. 5. Changes in W_o at forward transfer of α -chymotrypsin with pH. (0.2 M NaCl, 350 rpm, 24 °C).

결국 일정한 NaCl 농도 0.2 M에서는 pH 5인 조건에서 가장 큰 $K_L A$ 값을 나타내었고 초기 수용액상에서의 단백질 농도의 약 85%가 역마이셀상으로 이동하였다.

단백질과 더불어 역마이셀상으로 이동하여 water pool을 이루는 물의 양, $W_o = [H_2O]/[AOT]$ 의 시간에 따른 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 극성을 띄는 물분자 역시 역마이셀과 정전기적 인력이 작용하기 때문에 α -chymotrypsin의 거동과 같이 약 1분내에 대부분이 이동하는 경향을 나타내었고, 수용액상의 pH가 높아짐에 따라 W_o 값이 점점 더 커짐을 알 수 있다. 그 이유는 pH가 높아짐에 따라 α -chymotrypsin의 이동이 적어지기 때문에 상대적으로 가볍고 극성인 물분자와 역마이셀간의 정전기적 인력이 크게 작용했기 때문인 것으로 생각된다.

4.1-2. 이온세기의 영향

역마이셀을 이용하여 단백질을 선택적으로 추출해내는데 이용되는 주요 변수 중 이온세기 효과에 대한 실험을 행하였다. 일정한 pH에서 수용액상의 이온세기가 증가할수록 전해질 용액으로 전기장의 범위가 줄어드는 Debye screening effect에 의해 단백질과 역마이셀간의 정전기적 인력이 약해진다. 그리고 Sheu 등[22]의 SANS(Small Angle Neutron Scattering)를 통한 연구 결과에 따르면 이온세기가 커짐에 따라 계면활성제의 친수성기간의 인력이 작아지므로 역마이셀의 크기가 작아지게 된다. 따라서 이러한 앞의 두 가지 이유 때문에 이동속도와 이동률이 낮아지게 된다.

Fig. 6에 순이동시 이온세기 변화에 따른 α -chymotrypsin의 이동속도와 분배계수의 변화를 나타내었다. NaCl의 농도가 0.3 M까지 증가할 때에는 큰 차이가 없지만, 0.4, 1.0 M로 증가할수록 단백질의 이동이 큰 영향을 받았다. NaCl의 농도가 증가함에 따라 이동속도는 $13.11 \times 10^{-7} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ 에서 $0.55 \times 10^{-7} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ 까지 약 20배 정도 감소하였고, 분배계수도 증가하므로 단백질의 이동률도 크게 감소하였다. 이러한 결과로부터 α -chymotrypsin이 상간이동법에 의해 순이동할 때 pH에 비해 이온세기가 더욱 큰 영향을 준다는 것을 알 수 있었다.

이온세기에 따른 W_o 값의 변화는 pH의 영향에서와는 반대로 α -chymotrypsin의 거동과 같이 수용액상의 NaCl의 농도가 커짐에 따라 Debye screening effect가 커져서 극성 용질인 물분자 역시 역마이셀상으로 이동하지 못하였다. 하지만 물분자는 단백질에 비해 매우 가벼우므로 그 이동이 매우 빨라서 W_o 값이 약 1분 이내에 평형

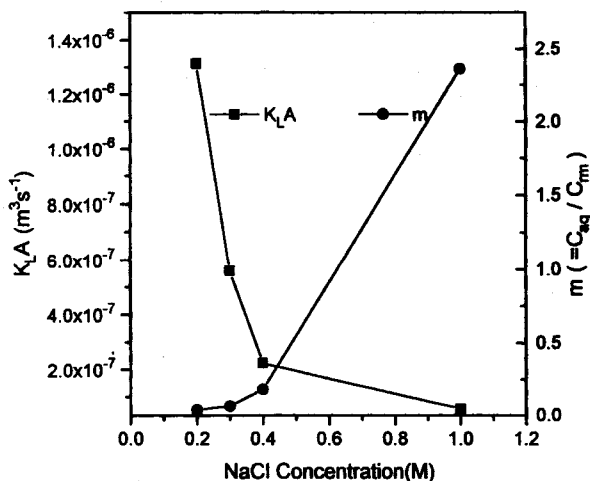


Fig. 6. Effect of ionic strength on K_LA & m at forward transfer of α -chymotrypsin.
(pH 5 acetate, 350 rpm, 24 °C).

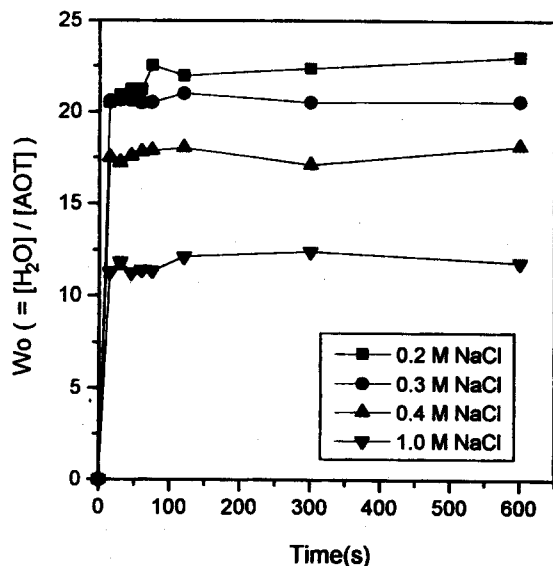


Fig. 7. Changes in W_o at forward transfer of α -chymotrypsin with ionic strength.
(pH 5 acetate, 350 rpm, 24 °C).

상태에 도달함을 보여준다. 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

4-1-3. 최적조건과 수용액상과 역마이셀상의 $k_{aq}A$ 와 k_mA 의 결정
pH와 이온세기에 대한 실험 결과 pH 5 acetate와 0.2 M NaCl의 조건에서 단백질의 이동은 60초 이내에 평형상태에 도달하고, $13.11 \times 10^{-7} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ 의 가장 큰 K_LA 값과 초기 수용액상에서의 단백질 농도의 약 85%가 역마이셀상으로 이동하여 가장 큰 이동률을 나타내었다.

pH 5보다 낮은 pH 4에서는 단백질의 표면 전하 밀도는 pH 5인 경우보다 크지만, 수용액상의 수소이온농도에 의한 Debye screening effect가 커져서 $3.71 \times 10^{-8} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ 의 낮은 K_LA 값과 20.97%의 낮은 이동률을 나타냈다. 또한, 0.2 M NaCl에 비해 낮은 0.1 M NaCl의 조건에서는 Debye screening effect는 줄어들지만, 순이동 후에 수용액상과 역마이셀상이 비교적 안정한 emulsion을 형성하기 때문에 다시 상분리가 되기 어려웠다.

따라서, 단백질이 pH 5와 0.2 M NaCl의 조건에서 큰 표면 전하 밀도와 적은 Debye screening effect 때문에 역마이셀의 극성 중심과

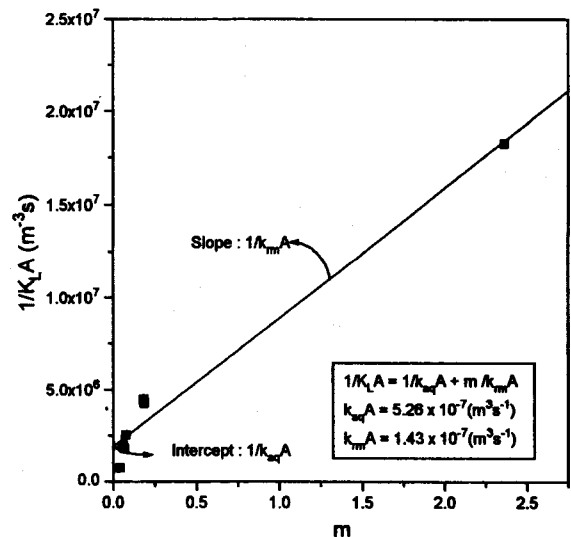


Fig. 8. Determination of aqueous & organic film combined mass transfer coefficients ($k_{aq}A$ & k_mA) for forward transfer of α -chymotrypsin.

의 정전기적 인력이 최대이기 때문에 최대의 α -chymotrypsin의 이동속도와 이동률을 나타내었다.

α -Chymotrypsin의 순이동에 대해 개별혼합물질이동계수를 구하기 위해, 식 (9)에 따라 $1/K_LA$ 값을 분배계수 m 값에 대해 plot한 것을 Fig. 8에 나타내었다. $m < 0.1$ 인 조건에서 정확한 선형관계가 성립되지 않는 이유는 Lye 등[12]에 의해 제시된 바와 같이 단백질 이동에 대한 총괄저항을 더욱 정확히 표현하자면 식 (9)에 단백질이 계면에 용해되는 단계의 속도상수인 계면용해계수(interfacial solubilisation constant)가 포함되어야 하거나 혹은 이중경막론이 적용될 수 있는 한계 때문이라 생각된다.

선형회귀분석을 통해 y절편으로부터 $1/k_{aq}A$, 기울기로부터 $1/k_mA$ 를 각각 구하였다. 그 결과 수용액상쪽의 $k_{aq}A$ 는 $5.26 \times 10^{-7} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, 유기상쪽의 k_mA 는 $1.43 \times 10^{-7} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ 로 나타났다. 여기서 $k_{aq}A$ 가 더 큰 값을 가지는 것은 수용액상쪽의 계면활성제 분자들의 친수성과 α -chymotrypsin 표면 전하사이의 정전기적 인력이 크게 작용하였기 때문인 것으로 생각된다.

4-2. α -Chymotrypsin의 역이동

4-2-1. pH의 영향

순이동에 의해 선택적으로 역마이셀상으로 이동한 단백질을 다시 수용액상으로 이동시켜 원하는 단백질만을 얻기 위해서는 순이동과는 반대의 수용액상 조건을 만든다. 즉, 단백질의 pI값보다 높은 pH의 수용액상과 접촉시켜 역마이셀과 결합해 있는 단백질의 전하를 반대로 바꾸어 반발력을 일으키고, 높은 이온세기에서 Debye screening effect를 크게 일으켜 원하는 단백질을 수용액상으로 회수한다.

단백질의 순이동이 가장 잘 일어나는 조건인 0.2 M NaCl, 20 mM pH 5 acetate, 50 mM AOT/iso-octane의 조건에서 60초간 교반하여 α -chymotrypsin의 순이동을 일으키고 단백질이 이동된 역마이셀상을 분리해낸 후, 다시 단백질이 이동할 높은 이온세기의 1 M KCl과 여러 가지 pH의 20 mM phosphate와 접촉시켰다.

이중경막론에 의한 K_LA 값의 계산 결과와 분배계수의 pH에 따른 변화를 Fig. 9에 나타내었다. 역이동의 경우 분배계수는 pH가 6에서 10까지 증가할 때는 거의 비슷한 경향을 나타내었고 pH 12인 극단적인 조건에 가서야 크게 감소하여 이동률이 증가하는 경향을 나타

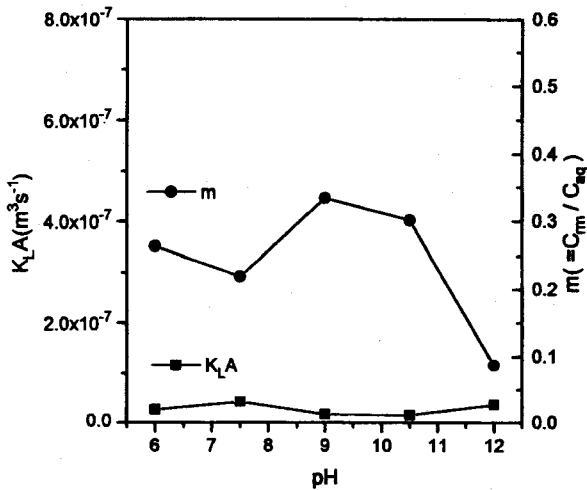


Fig. 9. Effect of pH on K_LA & m at backward transfer of α -chymotrypsin.

Forward condition : pH 5 acetate, 0.2 M NaCl, 400 rpm, 24 °C.

Backward condition : 1.0 M KCl, 700 rpm, 24 °C.

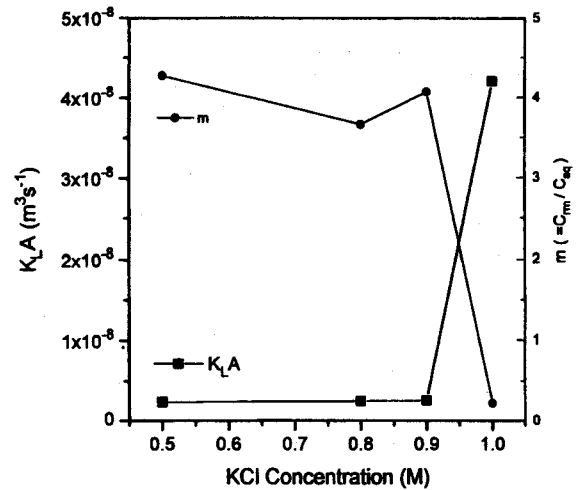


Fig. 10. Effect of ionic strength on K_LA & m at backward transfer of α -chymotrypsin.

Forward condition : pH 5 acetate, 0.2 M NaCl, 400 rpm, 24 °C.

Backward condition : pH 7.5 phosphate, 700 rpm, 24 °C.

내었다. K_LA 값은 $1.5 \times 10^{-8} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ - $3.67 \times 10^{-8} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ 사이의 값으로 거의 비슷한 값을 보였다. Hatton 등[11]이 제시한 단백질의 역이동시 메커니즘에 따르면 역이동시에 단백질을 포함한 역마이셀과 빈 역마이셀과의 접촉에 의해 마이셀 사이에 단백질의 이동이 일어나고, 그로 인해 역이동시 계면에서의 저항이 커지기 때문에 순이동의 경우에 비해 역이동시의 물질이동속도가 10-100배정도 느리다고 설명하고 있다.

4-2-2. 이온세기의 영향

역마이셀상으로 이동한 단백질은 다시 이동할 수용액상의 이온세기가 증가할수록 Debye screening effect가 커져서 이동속도가 증가한다. 또한, 단백질을 포함한 역마이셀이 수용액상과 유기상의 계면에 존재할 때, 역마이셀 내의 water pool의 이온 농도에 비해 새로운 수용액상의 이온의 농도가 크기 때문에 수용액상의 이온 농도가 증가할수록 마이셀 내부에서 수용액상으로 일어나는 삼투압이 더욱 커져서 역마이셀의 형태가 불안정해지고, pool을 이루었던 물분자와 함께 단백질이 수용액상으로 이동하는 것으로 생각된다. 앞의 두가지 이유로 이온세기가 증가할수록 단백질의 이동속도와 이동률이 증가하는 경향을 가진다.

역이동시의 K_LA 값과 분배계수 m 값을 Fig. 10에 나타내었다. KCl의 농도가 0.5 M에서 0.9 M까지 변화할 때에는 K_LA 값은 $2.33 \times 10^{-9} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ - $2.52 \times 10^{-9} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, m 값은 3.668-4.276으로 거의 일정하였다. 하지만, KCl의 농도가 1.0 M이 되면 K_LA 값은 $4.20 \times 10^{-8} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, m 값은 0.2196으로 그 이동속도와 이동률이 급격히 증가하였다.

4-2-3. α -Chymotrypsin의 역이동에서의 순이동 pH 조건의 영향

α -Chymotrypsin의 순이동이 일어날 경우 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 pH 5-7의 변화에 따른 단백질의 이동속도나 이동률에는 큰 차이가 없었다. 본 연구에서는 pH 5, 6, 7에서 순이동을 일으킨 후, 일정한 역이동 조건에서 단백질을 상간이동시켜 순이동시의 pH가 역이동에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 11에서 보인 역이동 조건을 1.0 M KCl, 20 mM pH 7.5 phosphate로 일정하게 유지했을 때, 순이동 pH가 6, 7인 경우에는 시간에 따라 회수되는 단백질의 농도 변화가 크지 않은 반면, pH 5인 경우에는 그 변화가 월등히 증가하여 α -chymotrypsin의 순이동시의 pH가 역이동에 미치는 영향이 놀랄 만큼 큰 것으로 나타났다.

이러한 결과에 대한 원인 규명의 하나로 Hatton 등[11]이 제안한

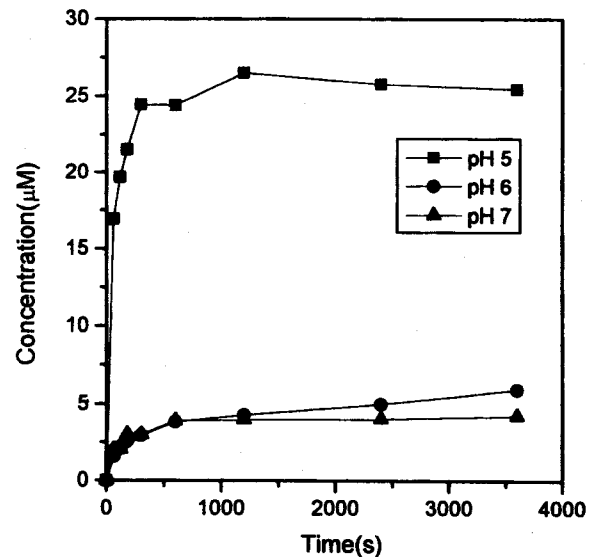


Fig. 11. Changes in concentration at backward transfer of α -chymotrypsin with forward pH.

Forward condition : 0.2 M NaCl, 400 rpm, 24 °C.

Backward condition : pH 7.5 phosphate, 1.0 M KCl, 700 rpm, 24 °C.

메커니즘에 따르면 역이동시 단백질을 포함한 마이셀이 계면에 새로 형성된 빈 마이셀들과의 상호작용 때문에 계면에서의 큰 저항을 가진다는 이론은 역이동의 이동속도가 순이동에 비해 훨씬 느리다는 것을 설명하고는 있으나, 순이동시의 pH가 역이동에 미치는 영향을 설명하기에는 불충분하다. 여기에 따른 정확한 이유는 아직 밝혀지지 않았지만 본 연구에서는 Bausch 등[24]이 제안한 삼투압에 의한 단백질의 역이동과 순이동시 pH에 따라 α -chymotrypsin이 역마이셀내에 존재하는 상황을 고려해 보았다.

일반적으로 SANS[19], Quasi-Elastic Light Scattering, EPR[25, 26] Spectroscopy 등을 이용하여 단백질이 존재하는 역마이셀의 크기와 모양 그리고 단백질의 상태를 조사할 수 있다. 본 연구에 사용된 α -chymotrypsin은 다른 단백질들에 비해 표면에 소수성인 부분이 많이 존재하기 때문에 완전히 water pool에 수화되어 역마이셀의 중심에

존재하기보다는 역마이셀의 소수성기나 심지어 유기용매와도 접하고 있다[3, 9]. 따라서, 순이동시 pH가 5에서 7로 높아질수록 α -chymotrypsin 표면의 전하밀도가 낮아지므로 역마이셀 내부로의 이동 후, 더욱더 소수성기 또는 유기용매와의 분자간 결합이 많아질 것으로 생각된다. 이러한 세 가지 조건에서 순이동을 일으킨 후, 일정 pH와 큰 이온세기(1.0 M)에서 역이동을 일으킬 경우, 단백질을 포함한 역마이셀이 계면에 흡착한 후 삼투압이 작용하여 수용액상으로 이동하겠지만 순이동시의 pH가 높아질수록 마이셀 안에 존재하는 단백질과 소수성 물질들과의 인력 때문에 적은 역이동률(% backward transfer)을 보이는 것으로 생각된다.

4-2-4. 최적 조건과 수용액상과 역마이셀상의 k_{on} A와 k_{off} A의 결정

순이동의 결과와 순이동 pH의 역이동에 대한 영향의 결과로부터 순이동을 pH 5와 0.2 M NaCl에서 일으키고 역이동은 1.0 M KCl에서 일으키는 것이 최적조건이었으며 pH에는 큰 영향을 받지 않았다.

α -Chymotrypsin의 역이동에 대해 개별혼합물질이동계수를 구한 결과 수용액상쪽인 k_{on} A는 $1.03 \times 10^{-8} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, 유기상쪽의 k_{off} A는 $5.03 \times 10^{-8} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ 로 나타났다.

4-3. 분자체를 이용한 단백질의 회수

4-3-1. pH의 영향

0.2 M NaCl의 일정농도에서, pH를 각각 5, 6, 7로 변화시켜가며 α -chymotrypsin을 순이동시킨 후, 분자체의 투입량의 증가에 따른 역마이셀상의 W_o 값의 변화를 Fig. 12에 나타내었다. 순이동 이후의 W_o 값은 Fig. 5에서도 밝혔듯이 pH 조건이 증가함에 따라 거의 같지만 조금씩 증가하였고, 그 이후 분자체의 투입량이 증가함에 따라 세 가지 조건에서 모두 거의 같은 경향으로 W_o 값이 감소하여 200 mg/ml의 분자체가 투입되었을 때에는 W_o 값이 거의 0에 가까워짐을 알 수 있다.

분자체의 투입량 증가에 따른 α -chymotrypsin의 회수율(% recovery)은 Fig. 13에서 보는 바와 같이 순이동시의 pH 5, 6, 7 모두 비슷한 경향으로 증가하는 경향을 보여 200 mg/ml의 분자체가 투입되었을 때에는 87.43 %, 80.27 %, 69.01 %의 역이동률을 나타내었다. 이는 상간이동법과는 달리 분자체를 이용하여 단백질을 회수할 경우 순이동 pH 조건에 영향을 크게 받지 않음은 물론 순이동시 pH를 5까

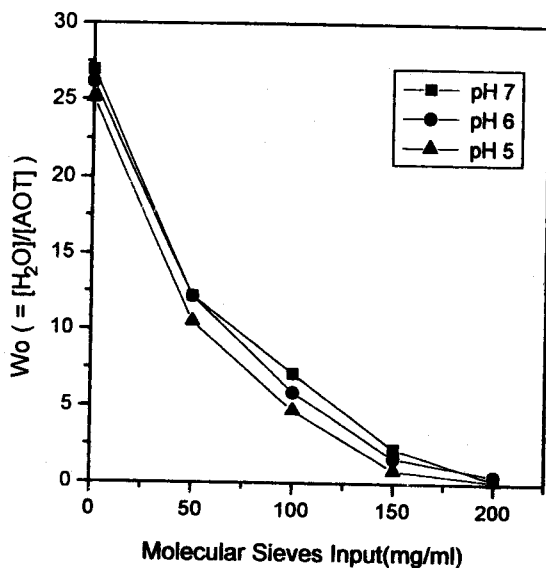


Fig. 12. Effect of molecular sieves input on W_o for backward transfer of α -chymotrypsin with forward pH. (Forward condition : 0.2 M NaCl, 400 rpm, 24 °C).

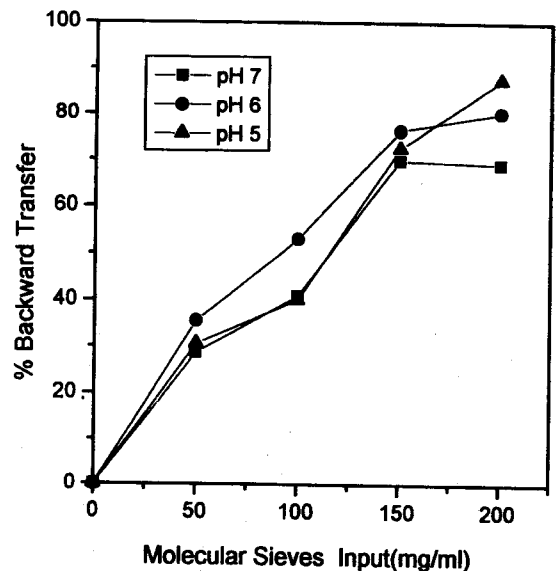


Fig. 13. Effect of molecular sieves input on % backward transfer of α -chymotrypsin with forward pH. (Forward condition : 0.2 M NaCl, 400 rpm, 24 °C).

지 낮추지 않은 조건에서도 α -chymotrypsin을 회수해 낼 수 있음을 나타낸다. Fig. 14에 그 두 가지 방법에 의한 α -chymotrypsin의 역이동률을 비교하였다.

4-3-2. 이온세기의 영향

일정한 pH 5에서 NaCl의 농도를 각각 0.2, 0.4, 1.0 M로 변화시켜가며 α -chymotrypsin을 순이동시킨 후 분자체의 투입량의 증가에 따른 역마이셀상의 W_o 값의 변화를 Fig. 15에 나타내었다. 순이동 이후의 W_o 값은 Fig. 7에서도 밝혔듯이 이온세기가 증가함에 따라 Debye screening effect에 의해 거의 감소하였고, 그 이후 분자체의 투입량이 증가함에 따라 세 가지 조건에서 모두 거의 같은 경향으로 W_o 값이 감소하여 200 mg/ml의 분자체가 투입되었을 때에는 W_o 값이 거의 0에 가까워짐을 알 수 있다.

분자체의 투입량 증가에 따른 α -chymotrypsin의 회수율은 Fig. 16에서와 같이 순이동시 NaCl의 농도 0.2, 0.4, 1.0 M 모두 증가하는

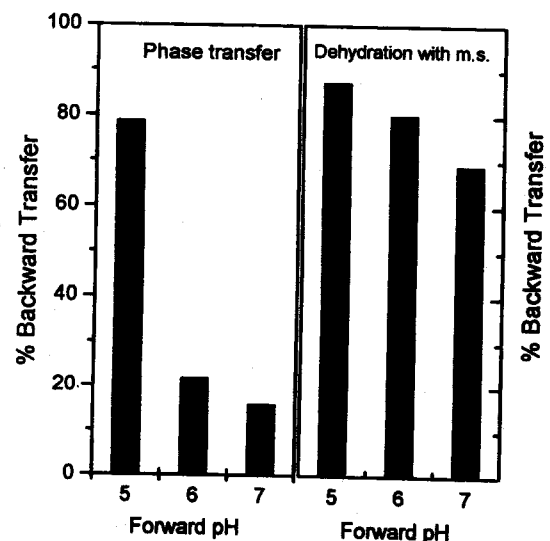


Fig. 14. Comparison of % backward transfer for phase transfer and dehydration with molecular sieves in backward transfer of α -chymotrypsin.

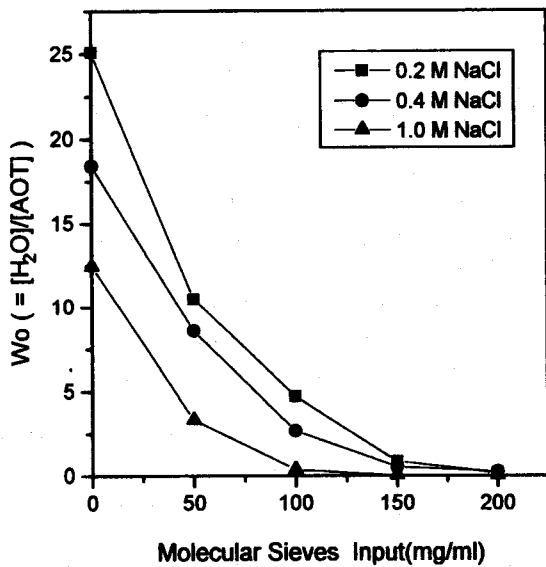


Fig. 15. Effect of molecular sieves input on W_o for backward transfer of α -chymotrypsin with forward ionic strength.
(Forward condition : pH 5 acetate, 400 rpm, 24 °C).

경향을 보여 분자체의 투입량이 200 mg/ml이었을 때에는 87.43 %, 86.70 %, 90.47 %의 높은 역이동률을 나타내었다. 하지만 순이동률 (% forward transfer)은 이온세기가 증가할수록 Debye screening effect에 크게 영향을 받아 낮아지므로 순이동에서 NaCl의 농도는 0.2 M, 역이동에서 분자체의 투입량은 200 mg/ml일 때 α -chymotrypsin을 최대로 분리해 낼 수 있었다.

5. 결 론

수용액 중의 α -chymotrypsin을 음이온성 계면활성제 AOT와 iso-octane으로 이루어진 역마이셀상을 이용하여 추출하는데 있어 상간 이동법에 의한 단백질의 순이동과 역이동의 속도와 이동률을 조사한 결과, 순이동속도는 역이동속도보다 10에서 100배 정도 크며, 순

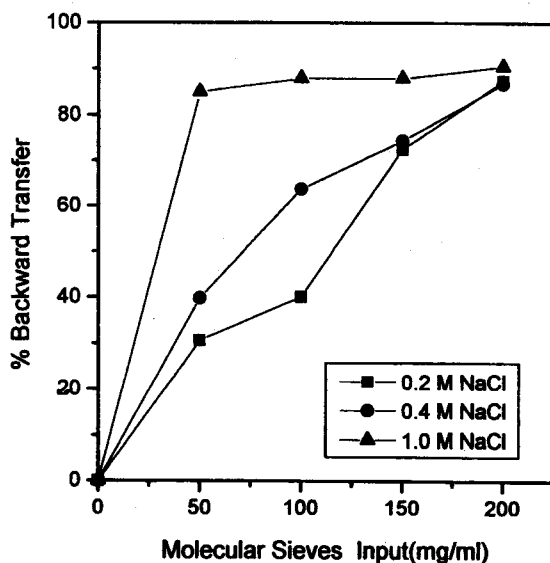


Fig. 16. Effect of molecular sieves input on % backward transfer of α -chymotrypsin with forward ionic strength.
(Forward condition : pH 5 acetate, 400 rpm, 24 °C).

이동의 경우 이온세기가 증가할수록 또한 pH가 pI에 가까워질수록 이동속도와 이동률이 감소하여 pH 5와 0.2 M NaCl의 조건이 최적 조건이었으며, 역이동의 경우에는 pI이후의 pH에서 pH 12의 극단적인 조건을 제외하고는 pH 증가에 대하여 거의 일정한 반면 이온 세기가 증가하면 이동속도와 이동률이 다 같이 증가하는 경향을 나타내고 1.0 M KCl에서 최대값을 나타내었다.

상간이동법과 분자체를 이용한 탈수법에서 역이동률을 비교한 결과 상간이동법에서 역이동률은 순이동의 pH에 의하여 큰 영향을 받으며 순이동의 pH가 5일 때 최대값을 나타내었고, 분자체를 사용한 경우에는 상간이동법의 경우와는 달리 역이동률 혹은 회수율은 순이동시의 pH나 이온세기에 크게 영향을 받지 않고 단지 분자체의 투입량이 늘어남에 따라 증가하며 상간이동법에 비하여 높은 값을 나타내었다.

사용기호

- A : interfacial area [m^2]
- C : concentration of protein [μM]
- j_i : mass transfer rate [$\mu mol/s$]
- $K_L A$: overall combined mass transfer coefficient [m^3/s]
- $k_i A$: individual mass transfer coefficient in i phase [m^3/s]
- m : partition coefficient
- N_{ag} : aggregation number
- P : protein (α -chymotrypsin)
- RM : reverse micelle
- S : surfactant (AOT)
- t : time [s]
- V_i : volume of i phase [m^3]
- V_r : phase volume ratio
- W_o : water content [$[H_2O]/[AOT]$]

그리스 문자

- α : model parameter [s^{-1}]
- β : model parameter

첨자

- aq. : aqueous phase
- org. : organic phase
- rm : reverse micellar phase
- 1 : phase 1
- 2 : phase 2
- i : initial
- f : final

참고문헌

- Abbott, N. L. and Hatton, T. A.: *Chem. Engng. Prog.*, **84**, 31(1988).
- Dekker, M., Hilhorst, R. and Lanne, C.: *Anal. Biochem.*, **178**, 217(1989).
- Martinek, K., Levashov, A. V., Klyachko, N., Khmel'nitsky, Y. L. and Berezin, I. V.: *Eur. J. Biochem.*, **155**, 453(1986).
- Jolival, C., Minier, M. and Renon, H.: *J. Coll. Interf. Sci.*, **135** (1), 85(1990).
- Rahaman, R. S., Chee, J. Y., Cabral, J. M. S. and Hatton, T. A.: *Biotechnol. Prog.*, **4**(4), 218(1988).

6. Woll, J. M., Hatton, T. A. and Yarmush, M. L.: *Biotechnol. Prog.*, **5**(2), 57(1989).
7. Regalado, C., Asenjo, J. A. and Pyle, D. L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 674(1994).
8. Leser, M. E., Mrkoci, K. and Luisi, P. L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 489(1993).
9. Gupta, R. B., Han, C. J. and Johnston, K. P.: *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 830(1994).
10. Mersmann, A.: "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", VCH, Weinheim(1987).
11. Dungan, S. R., Bausch, T., Hatton, T. A., Plucinski, P. and Nitsch, W.: *J. Coll. Interf. Sci.*, **145**(1), 33(1991).
12. Lye, G. J., Asenjo, J. A. and Pyle, D. L.: *Chem. Eng. Sci.*, **49**(19), 3195(1994).
13. Dekker, M., Van't Riet, K. and Weijers, S. R.: *Chem. Eng. J.*, **33**, B27(1986).
14. Lye, G. J., Asenjo, J. A. and Pyle, D. L.: *AIChE J.*, **42**(3), 713(1994).
15. Ballag, D. M. and Edelstein, S. J.: "Protein Method", Wiley Liss, New York, 46(1991).
16. Holme, D. J. and Peck, H.: "Analytical Biochemistry", 40(1994).
17. Marcozzi, G., Correa, N. and Luisi, P. L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 1239(1991).
18. Skoog, D. A., West, D. M. and Holler, F. J.: "Fundamentals of Analytical Chemistry", 6th ed., Holt, Rinehart and Winston, New York, **393**, 762(1992).
19. Brandani, V., Giacomo, G. D. and Spera, L.: *Biotechnol. Prog.*, **28**, 411(1993).
20. Brandani, V., Giacomo, G. D. and Spera, L.: *Biotechnol. Prog.*, **29**, 363(1994).
21. Wolbert, R. B. G., Hilhorst, R., Dekker, M., Van't Reit, K. and Bijsterbosch, B. H.: *Eur. J. Biochem.*, **184**, 627(1989).
22. Sheu, E., Göklen, K. E., Hatton, T. A. and Chen, S. H.: *Biotechnol. Prog.*, **2**(4), 175(1986).
23. Tamamushi, N. and Watanabe, N.: *Colloid. Polym. Sci.*, **258**, 174(1980).
24. Bausch, T. E., Plucinski, P. K. and Nitsch, W.: *J. Coll. Interf. Sci.*, **150**(1), 226(1992).
25. Paradkar, V. M. and Dordick, J. S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 529(1993).
26. Timmins, G. S., Davies, M. J. and Gilbert, B. C.: *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **90**(18), 2643(1994).