

Reverse Micelles를 이용한 BSA 가용화에서 pH와 Salt Type의 영향

노선균^{1,2}, 강춘형^{1,2}, 박돈희¹전남대학교 공과대학 화학공학부¹, 전남대학교 고분자기술연구소²

전화 (062) 530-1818, FAX (062) 530-1819(강춘형)

Abstract

Solubilization of bovine serum albumin(BSA) is performed using a reverse micellar system consisting of sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate(AOT). Of particular, effects of pH, salt concentration and its type on the solubilization are investigated by means of the phase-transfer method. One of significant findings in our study is that the protein is to a large extent aggregated in the interface between organic and aqueous phases at lower pH and small salt concentration. In this presentation, the optimal extraction process conditions for BSA, which is bulky, are proposed.

서론

Reverse micelles을 이용한 단백질 추출은 생물학적 물질들의 활성을 유지시키면서 빠른 시간 내에 많은 양의 단백질을 추출할 수 있다는 장점을 가지고 있기 때문에 지난 10여년 이상 광범위하게 연구가 진행되고 있다. Reverse micelle을 이용한 가용화 과정에는 수용액상의 pH, 염의 종류와 그 농도, 계면활성제의 구조와 농도 등이 가장 큰 영향을 미친다고 알려져 왔다[1]. 그러나 비교적 작은 단백질과는 달리 분자량이 매우 큰 단백질의 경우에는 reverse micelle을 이용한 추출의 효율이 매우 낮기 때문에 폭넓게 사용하지 못한 실정이다. 실제로 분자량이 큰 단백질의 경우에는 reverse micellar water pool의 평균 크기보다 더 큰 실험결과도 보고되고 있기도 하다. 따라서 분자량이 큰 단백질의 경우에는 추출 mechanism이 아직까지 잘 알려져 있지 않고 있다.

본 연구에서는 분자량이 큰 대표적인 모델 단백질로서 BSA를 선택하였다. BSA는 분자량이 매우 클 뿐만 아니라 나선형의 구조를 가지고 있다. 이런 이유로 reverse micelle을 이용한 이전의 BSA의 추출에 대한 연구는 광범위하게 진행되지 못하고 있다. 특히, 대부분의 BSA에 대한 연구에서는 일반적으로 유기상에 직접 단백질을 가용화시키는 방법인 injection method를 사용하고 있다[2]. 본 연구에서는 phase-transfer을 이용하여 비교적 큰 단백질인 BSA를 유기상으로 가용화시킬 때 추출 변수인 pH, 염의 종류 그리고 농도에 따른 가용화 효율을 관찰하였다. 더우기 본 연구에서는 일반적으로 수용액상의 농도를 분석하여 유기상의 농도를 결정하는 대신 직접 유기상의 농도를 분석하여 가용화 효율을 결정하였다. 단백질의 가용화에서 유기상의 농도를 직접 분석하는 이유는 수용액상의 조건에 따라 단백질이 가용화되지 못하고 유기상과 수용액상 간의 계면에 침전(혹은 엉킴)이 존재하기 때문이다. 이런 현상은 원하는 물질의 최적 분리조건을 결정하는데 있어서 간과해서는 안 될 매우 중요한 변수를 제시하는 것을 의미한다.

본 연구에서는 유기상이 음이온 계면활성제인 AOT와 isoctane으로 이루어진 reverse

micelles을 이용하여 수용액상에 녹아있는 BSA을 유기상으로 분리하였다. 이는 BSA에 대한 보다 효과적인 추출 공정의 운전조건을 제시하고자 하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

본 실험에서는 분자량은 65,000이고 등전점이 4.9인 수용성 단백질인 BSA(Type A-7906)를 모델 단백질로 사용하였다. Reverse micelles을 형성하는 양 친매성 분자인 음이온 계면활성제 AOT는 sigma사로부터, 유기용매인 isooctane(99.0%이상)은 YAKURI사로부터 구입하였다. 수용액상의 염의 종류와 농도에 따른 영향을 파악하기 위해 사용된 염은 1:1 염인 KCl과 NaCl 그리고 1:2 염인 MgCl₂와 CaCl₂를 사용하였다. 위의 시약들은 모두 정제과정없이 사용하였으며 수용액상에 사용된 buffer는 10mM acetate buffer를 제조하여 사용하였다.

단백질 추출에서 사용된 수용액상은 buffer와 적당한 염의 농도 그리고 1mg/ml의 단백질로 이루어져 있으며 유기상은 200mM AOT/isooctane으로 이루어져 있다. 실험은 직경 20mm의 glass vial에서 수용액상 5ml와 유기상 5ml를 각각 제조하여 자석식 교반기를 이용하여 약 2시간 정도 혼합한 다음 20℃로 유지되는 항온조에서 약 3일 이상 방치 한 후 실행하였다. 상 분리가 완전히 이루어진 후 수용액상과 유기상으로부터 각각의 시료를 채취하여 280nm에서 분광광도계(Bausch & Lomb사의 Spectronic21)을 이용하여 잔류 단백질의 농도를 분석하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 사용한 음이온 계면활성제인 AOT는 음이온을 띤 친수성의 head부분과 양이온을 띤 2개의 소수성 tail부분으로 구성되어 있다. 이런 계면활성제의 구조적 성질로 인하여 친수성인 head부분이 수용액과의 인력에 의해 reverse micelle을 형성하게 된다. 적절한 조건에서 reverse micelle이 형성되면 소수성 부분의 tail들이 수용액과의 반발력에 의해 유기상으로 이동하게 된다. 이런 원리를 이용하여 수용액상에 녹아있는 단백질을 유기상으로 추출할 수 있게 된다.

그림 1은 수용액상의 염의 종류와 pH변화에 따른 단백질 가용화의 영향을 나타내었다. 모든 염들은 최고의 가용화 효율을 나타내는 점을 나타내었다. 특히 비교적 크기가 작은 단백질들을 다룬 기존의 실험들에서 음이온 계면활성제의 경우 등전점 이하의 pH에서 매우 좋은 가용화 효율을 보이는 반면, 분자량이 매우 크고 나선형의 구조를 가지는 BSA의 경우에는 등전점 이하의 pH에서 상호 작용하는 힘보다 등전점 이상에서 작용하는 힘이 더 크게 작용함을 알 수 있다. 또한 일반적으로 단백질은 등전점 이하에서 침전되는 경향을 보이고 있다(그림 3 참조). 그러므로 실제로는 등전점 이상의 pH에서 단백질이 효과적으로 추출됨을 알 수 있다. 본 연구의 결과에서 1:1 염의 경우 매우 좁은 pH영역에서 최고점의 가용화 효율을 보였다. 즉, KCl의 경우 pH=5, NaCl의 경우 pH=5.5 근처에서 최고의 가용화 효율을 보였다. 1:2 염의 경우 등전점 이하에서는 pH가 감소함에 따라 가용화 효율은 매우 급격히 감소하는 경향을 보였다. MgCl₂의 경우 pH=7 근처에서 최고 가용화 효율을 보였으며 pH=7 이상에서는 가용화 효율은 약간 감소하였다. CaCl₂의 경우 pH=5 근처에서 최고의 가용화 효율을 보였으며 그 이상의 pH에서는 약간 감소하는 경향을 보였다.

또한 최고점 이하의 pH에서 CaCl_2 가 MgCl_2 보다 더 높은 가용화 효율을 보인 반면에 최고점 이상의 pH에서는 MgCl_2 가 더 높은 가용화 효율을 보였다. 이는 최고점 이하의 pH에서 CaCl_2 가 MgCl_2 보다 단백질과 계면활성제 사이의 상호 작용하는 인력이 더 크기 때문이다. 그리고 일반적으로 등전점 이상의 pH에서 1:2 염이 1:1 염보다 더 높은 효율을 보임을 알 수 있었다. 이러한 염 종류에 따른 가용화 실험의 결과는 계면에서의 interfacial tension 이 염의 종류에 따라 서로 다르기 때문에 염의 분배계수 영향으로부터 기인하는 것으로 추정할 수 있다.

Reverse micelles을 이용한 단백질 추출에서 가장 지배적인 인자 중의 하나는 염의 종류와 농도이다. 계면활성제인 AOT는 친수성기와 소수성기를 동시에 가지고 있는 양친매성 물질이다. 이런 성질 때문에 AOT는 수용액상과 유기상에 존재할 수 있다. AOT가 두 상 사이에 존재할 수 있는 조건은 매우 낮은 염 농도일때 AOT는 수용액상에 존재하며, 높은 이온강도에서는 모든 AOT는 유기액상에 존재하게 된다. 이는 이온강도가 증가함에 따라 AOT친화력은 유기액상에 호의적으로 변함을 알 수 있다. 본 연구의 실험에서도 이런 이유로 매우 낮은 염 농도에서 수용액상의 혼탁현상을 경험하였으며 더 이상 액-액 상분리 실험을 수행할 수 없었다.

그림 2에는 일정한 pH에서 염의 종류와 농도에 따른 변화를 나타내었다. KCl의 경우 염 농도가 증가함에 따라 가용화 효율은 급격히 감소하였으며 0.7M 이상에서는 더 이상의 가용화는 일어나지 않았다. NaCl의 경우 약 1M까지는 염농도가 증가함에 따라 가용화 효율은 증가하지만 약 1M이상에서는 급격히 감소하여 더 이상 가용화되는 단백질은 검출되지 않았다. 1:2 염인 MgCl_2 의 경우 약 0.3M에서 최저점의 가용화 효율을 보였으며 약1M 이상에서는 거의 일정한 값을 보였다. 더욱이 CaCl_2 의 경우 매우 낮은 염 농도와 높은 염 농도에서 가용화 효율이 약간 감소하는 경향을 보였다. 특히 1:1 염의 경우 매우 높은 염 농도에서는 가용화 효율이 급격히 감소 하였다. 이는 매우 높은 염 농도에서 수용액상의 전하 밀도가 증가하여 단백질과 계면활성제 사이의 상호 작용하는 인력이 급격히 감소함을 보여준다. 그러나 1:2 염의 경우 매우 높은 염 농도에서 가용화는 약간 감소하는 경향을 보였다. 이는 1:2 염의 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 가 단백질과 계면활성제 head 사이에 다리 역할을 하게되어 매우 높은 염 농도에서도 가용화될 수 있기 때문으로 생각된다.

본 연구에서 주목할만한 결과중의 하나는 단백질이 계면에 침전되는 결과이다. 본 연구의 실험 결과인 그림 3과 4는 수용액상과 유기상 사이의 계면에서 단백질이 침전되는 정도를 보여주었다. 침전의 정도는 초기 수용액상에 존재하는 단백질 농도에 대해 유기상과 수용액상 접촉 후 두상의 농도를 직접 분석하여 그 차이의 비로 나타내었다. 매우 낮은 pH에서 수용액상에 존재하는 단백질의 양은 매우 적은 양이 검출되었다. 하지만 유기상에서도 단백질은 매우 적은 양이 검출 때 초기 단백질과 비교할 때 대부분이 계면에 엉켜있음을 알 수 있었다. 또한 염이 첨가되지 않은 조건에서도 수용액상의 혼탁현상과 계면에서의 영킴 현상이 나타났다. 그림 3에서 pH=5 이하의 매우 낮은 pH에서는 단백질의 침전이 매우 많이 생성됨을 알 수 있었다. 또한 pH가 증가함에 따라 침전의 정도는 매우 급격히 감소하였다. 이런 결과로부터 계면에서의 침전은 가용화 효율에 매우 큰 영향을 미치는 인자임을 알 수 있었다.

요약

본 연구에서는 20°C에서 음이온 계면활성제인 AOT와 isooctane으로부터 형성된 reverse micelle을 이용하여 수용액상에 녹아있는 BSA인 모델 단백질을 분리하는 실험을 행하였다. 염의 농도가 0.1M에서 최고 가용화 효율은 KCl, NaCl, MgCl₂ 그리고 CaCl₂의 경우 각각 pH=5, 5.5, 7, 5 근처임을 알 수 있었다. 또한 매우 낮은 염 농도에서는 가용화는 일어나지 못하고 계면이 혼탁한 현상을 보였다. 특히 CaCl₂의 경우에 염 농도에 대하여 최고의 가용화 효율을 보였다.

참고문헌

1. Marcozz, G., Correa, N., Luisi, P. L. and Casell, M., "Protein extraction by reverse micelles: A study of the factors affecting the forward and backward transfer of α -chymotrypsin and its activity"(1991), *Biotech Bioeng.*, 38, 1239-1246
2. Shiomori, K., Kawano Y., Kuboi, R. and Komasaawa, I., "Effective purification method of large molecular weight proteins using conventional AOT reverse micelles"(1995), *J. Chem. Eng. Japan.*, 28, 803-809

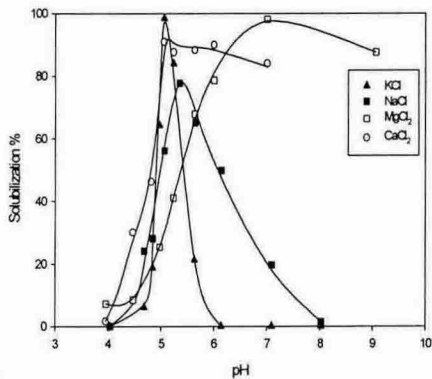


Fig. 1 Solubilization effect of pH and salt type in 1 mg/ml BSA at 0.1M salt

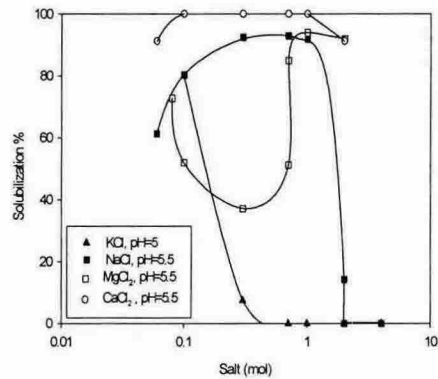


Fig. 2 Solubilization effect of salt concentration and type in 1mg/ml BSA

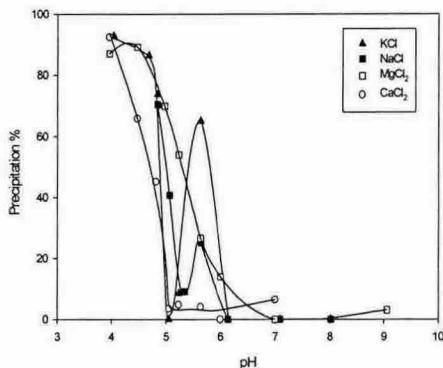


Fig. 3. Precipitation effect of pH and salt type in 1 mg/ml BSA (0.1M salt)

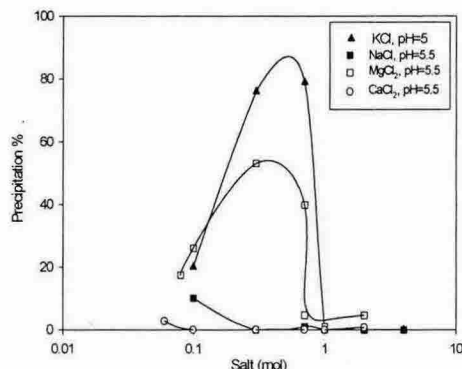


Fig. 4. Precipitation effect of salt concentration and type in 1 mg/ml BSA