

단보(Note)

역미셀을 이용한 Alkaline Protease의 추출분리

윤 현 희

경원대학교 화학공학과

Extractive Separation of an Alkaline Protease Using Reversed Micelles

Hyon Hee Yoon

Department of Chemical Engineering, Kyungwon University

ABSTRACT

The extraction behavior of an alkaline protease using reversed micelles was investigated. The reversed micellar solution consisted of AOT in isooctane. It was found that distribution of alkaline protease into the organic phase increased at lower pH, lower ionic strength, and higher AOT concentration. When the real fermentation broth was extracted of alkaline protease, an activity yield of 20% and a purification factor of 2.0 were obtained.

서 론

최근 유전공학의 발달로 세포배양에 의한 생물발효제품의 생산이 크게 진보하고 있으나, 이러한 발효제품의 분리와 정제 기술은 상대적으로 발전되지 못하고 있다(1). 현재, 생물공학제품의 분리와 정제는 침전, 전기영동, 크로마토그래피등을 이용한 회분식 그리고 소규모 공정으로 주로 이루어지고 있으며, 이러한 공정들은 효과적인 대규모 연속생산공정화에 어려움이 있다. 이러한 관점에서, 대규모 화학공정에서 흔히 쓰이고 있는 용매추출공정은 적절한 용매를 선택하여 생물공학제품의 효율적인 분리공정으로 사용될 수 있겠다. 특히, 최근에 연구가 진행되고 있는 유화액막 혹은 역미셀(Reversed Micelle)용액을 이용한 추출공정은 단순한 용매추출공정에서 분체가 되는 용매에 의한 단백질의 비활성화를 방지할 수 있기 때문에 더욱 효과적인 공정으로 여기진다(2-9).

역미셀은 계면활성제에 의하여 미세한 수용액상의 입자가 유기용매상에 안정되게 분산(용해)되어 있는 것이다(10). 이러한 역미셀을 형성한 유기용매상을 단백질을 함유하고 있는 수용액(발효액)과 접촉시키면 수용

액중의 단백질이 유기용매상의 역미셀내부로 이동하게 된다. 역미셀내부는 수용액상이므로 추출된 단백질이 유기용매에 의하여 비활성화되지 않는다.

일반적으로 단백질 또는 아미노산이 수용액으로부터 유기용매상의 역미셀 내부로 이동되는 현상은 단백질 또는 아미노산의 표면전하와 계면활성제에 의하여 형성된 역미셀 내부표면의 전하와의 전기적 상호작용이 주된 원인으로 여겨지고 있다(2). 따라서 수용액에서 단백질의 표면전하에 영향을 미치는 pH와 전기적 상호작용의 강도에 영향을 미치는 이온세기, 그리고 역미셀 내부표면의 전기적 성질을 결정하는 계면활성제의 종류 등이 단백질의 선택적 분리에 중요한 공정변수가 된다.

이러한 공정변수들의 영향은 단백질의 종류에 따라 그 영향력의 정도가 각각 다르며, 특히 다양한 성분을 함유하고 있는 발효액으로부터 특정 단백질을 추출할 경우 불순물에 의한 영향이 예상된다. 그러나 현재까지 제한된 몇가지 단백질의 분리에 관한 실험결과가 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서는 역미셀을 이용한 추출공정을 *Bacillus licheniformis*의 발효액으로부터 alkaline protease를 분리하는데 사용하여 그 효율성 및 공정특성을

관찰 검토하고자 한다.

재료 및 방법

균주배양 및 효소생산

Alkaline serine producing strain인 *Bacillus licheniformis* ATCC 21424를 KCCTC로 부터 분양받아 사용하였다. 보존배지의 조성은 beef extract 0.3%, peptone 0.5%, agar 1.5%이었다. 접종을 위한 성장배지의 조성은 glucose 3%, bean meal 1%, CaCl_2 0.04%, MgCl_2 0.2%이며, protease생산을 위한 발효배지는 glucose 6%, soy bean meal 2%, CaCl_2 0.04%, MgCl_2 0.02%이었다. 성장배지와 발효배지에서 0.1 M phosphate 완충용액을 사용하였다(11).

Agar slant에 보관한 균주를 성장배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 접종균으로 사용하였다. 접종균 5%를 발효배지에 접종하여 37°C에서 48시간동안 발효시켰다. 이와 같은 방법으로 생산된 발효액으로부터, 본 실험의 목적인, protease의 추출분리실험을 수행하였다.

추출분리 실험

역미셀용액은 유기용매인 isooctane에 계면활성제 sodium-di-2-ethylhexyl sulfosuccinate(AOT)를 용해시켜 제조하였다. 일정량의 역미셀용액과 발효액을 beaker에서 혼합하여 자석교반기로 5분간 교반한다. 이때 protease가 발효액으로부터 역미셀용액으로 이동하게 된다. 혼합액을 원심분리하여 역미셀용액(유기용매상)과 수용액상으로 분리한다. 분리된 역미셀 용액으로부터 protease를 역추출하기 위하여 순수한 수용액과 혼합하여 자석교반기로 15분간 교반한 후 원심분리한다. 이러한 분리실험에서 수용액상의 pH와 이온세기가 중요한 공정변수가 되는데, pH는 0.5N HCl 또는 0.5N NaOH를 가하여 조절하였고 이온세기는 KCl의 농도로서 조절하였다.

실제 발효액으로부터 protease를 분리하는 실험에 앞서 기초실험으로서 이미 정제되어 상업용으로 제품화된 alkaline protease 용액(NOVO product ALCALASE 2.5 L TYPE DX)를 이용하여 역미셀용액에서의 protease 용해실험을 수행하므로써 최적의 추출조건을 관찰하였다.

분석

Protease activity는 0.05M Na_2CO_3 - NaHCO_3 완충용액에 녹아있는 azocasein(Sigma Chemicals)을 기질로 사용하여

비교분석하였다(8). 단백질의 농도(total protein)는 Lowry method(12)로 측정하였다. 기초실험에서는 280nm의 파장에서 UV 흡수도로서 protease의 농도를 측정하였다. 이때 사용한 분광도계는 Milton Roy Spectronic 21D이었다.

결과 및 고찰

역미셀용액의 단백질 용해특성

역미셀용액의 단백질 용해특성을 고찰하기 위하여 이미 정제된 상업용 alkaline protease 수용액을 단백질농도가 Lowry method로 측정하여 1.0mg/ml가 되게 희석하여 model system으로 사용하였다. 이러한 기초실험 결과(Fig. 1,2,3) 수용액으로부터 역미셀용액으로 단백질을 추출하는 공정과 단백질이 함유된 역미셀용액으로부터 순수한 수용액으로 역추출하는 공정에서 수용액의 pH, 이온세기, 그리고 AOT의 사용농도 등이 중요한 공정변수임이 관찰되었다.

pH의 영향

Fig. 1은 추출 및 역추출에 미치는 pH의 영향을 나타낸 것이다. 각 수용액의 pH 값에 따라 단백질이 역미셀용액내로 추출된 양(% Extracted)과 단백질이 함유된 역미셀용액으로부터 수용액으로 역추출된 양(% Stripped)을 표시한 것이다. 추출시 수용액의 이온세기는 0.1 M KCl 역미셀용액의 AOT농도는 100mM이었고, 역추출하는데 사용된 수용액의 이온세기는 1.0M KCl이었다. 역추출실험에서 사용된 단백질함유 역미셀용액은 pH

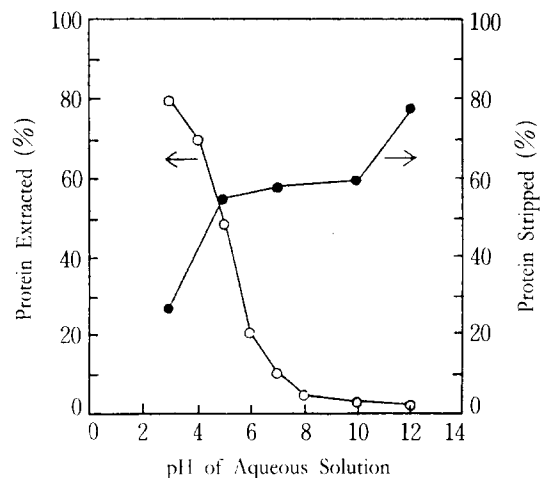


Fig. 1. Effect of pH on protease transfer.

3.0, 이온세기 0.1 M KCl, AOT 농도 100mM 조건에서 추출하여 얻었다. 각 상에서의 단백질(Protease)농도는 280nm의 파장에서 UV 흡수도로서 측정하였다.

Fig. 1의 실험범위에서 수용액의 pH가 낮을수록 보다 많은 단백질이 역미셀 용액내로 이동하고 있다. 이러한 현상은 단백질과 계면활성제 사이의 전기적 인력에 기인한다(2). 수용액의 pH가 낮을수록 단백질이 양전하를 띠게되어 음전하를 띠고 있는 음이온 계면활성제와의 전기적 인력일 증가하게된다. 따라서 추출은 낮은 pH에서 역추출은 상대적으로 높은 pH에서 최적조건을 찾을 수 있겠다.

이온세기의 영향

전기적 인력은 수용액의 이온세기에 의하여 커다란 영향을 받는다. 수용액의 이온세기가 클수록 전하표면의 electrical double layer의 두께가 감소하고 따라서 Debye ionic atmosphere의 범위가 축소되므로서 전기적 상호작용이 감소된다(10). 또한 이온세기가 커지면 역미셀의 크기가 감소하여 역미셀의 단백질 용해능력이 감소한다. Fig. 2는 이러한 이온세기의 영향을 보여주는 것이다. 수용액의 이온세기가 클수록 역미셀용액쪽으로의 단백질분포가 감소함을 나타내고 있다. 따라서 이온세기의 영향은 salt의 종류에 따라 다르지만(9) 일반적으로 추출은 낮은 이온세기에서 역추출은 높은 이온세기에서 이루어져야 할 것이다. 이 실험에서 추출조건은 수용액의 pH는 11.0이었다. 추출실험시 KCl의 농도가 영일때는 수요액상에 안정된 emulsion이 형성되어 상분리가 이루어지지 않았다.

AOT농도의 영향

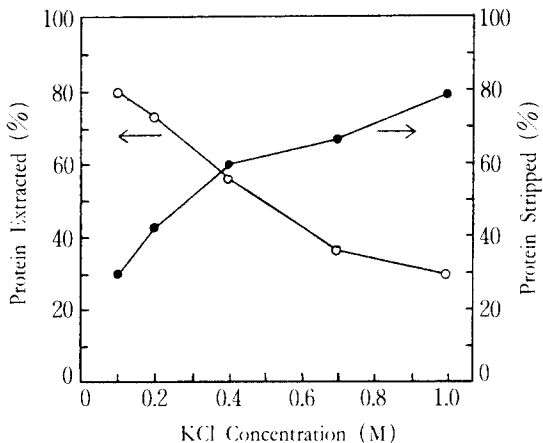


Fig. 2. Effect of ionic strength on protease transfer.

역미셀을 이용한 단백질 추출시 AOT 사용농도의 영향을 관찰하기 위하여 몇가지 서로다른 농도의 AOT를 함유한 역미셀용액을 조제하여 protease 추출실험을 수행하였다. 이 때 수용액의 pH는 3.0 이온세기는 0.1 M KCl이었다. Fig. 3는 실험결과로서, 세가지 서로다른 농도의 protease를 함유한 수용액으로부터 역미셀용액으로 protease가 추출된 양을 AOT 사용농도의 함수로 수용액으로부터 역미셀용액으로 protease가 추출된 양을 AOT 사용농도의 함수로 나타낸 것이다. Fig. 3에 표시된 각 수용액의 단백질농도는 Lowry 방법으로 측정된 것이다. 일반적으로 예측된 바와같이 AOT 사용농도가 증가할수록 단백질 추출량이 증가하고 있다.

Fig. 3의 자료를 재정리하면, AOT의 사용농도를 1:2.5:5의 비율로 증가시켰을 때 AOT 1mol당 추출된 단백질의 절대량은 약 1:1/2:1/4의 비율로 감소하였다. 또한 수용액의 단백질농도가 1:3:8의 비율로 변함에 따라 추출된 단백질의 절대량은 약 1:2.7:6의 비율로 증가하였다. 이러한 실험결과는 역미셀용액내의 단백질농도와 수요액상의 단백질농도 사이에 평형관계가 존재하며, 이때 평형상수 혹은 분배계수는 AOT의 농도등에 따라 변하는 원리에 기인된다. 그러나 이와같은 현상을 입증하기 위해서는 보다 많은 실험이 요구된다.

결론적으로, 역미셀을 이용하여 단백질을 추출할 경우 pH와 이온세기 그리고 수용액의 단백질농도에 따른 AOT 사용농도의 적절한 선택이 필요하며, 추출하고자 하는 단백질의 종류에 따라 효율적인 계면활성제와

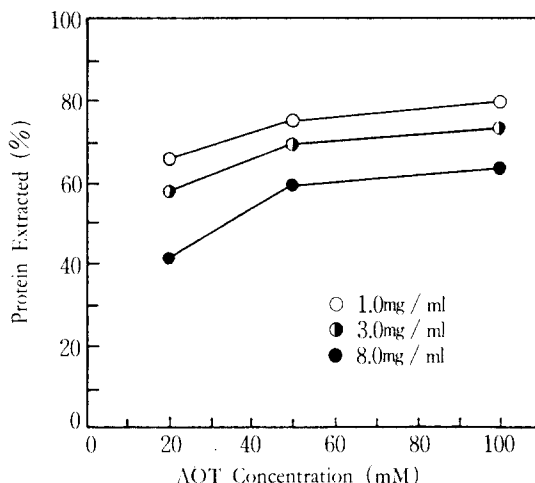


Fig. 3. Effect of AOT concentration on protease extraction. Protein concentration in feed=1.0, 3.0, and 8.0mg / ml.

유기용매의 사용이 요구된다.

발효액으로부터 단백질 분리

기초실험 결과로부터 얻은 적절한 추출 및 역추출 조건을 이용하여 실제 발효액으로부터 protease의 분리 실험을 수행하였다. 즉, 추출실험에서 발효액의 pH를 3.0 이온세기를 0.1 M KCl, 역추출실험에서 수용액의 pH를 11.0 이온세기를 1.0 M KCl로 조절하였다. Fig. 4은 실험결과로서, 발효액으로부터 alkaline protease를 추출한 후 수용액으로 역추출하여 얻은 최종 생산물의 정제율과 수율을 AOT 사용농도의 함수로 나타낸 것으로 activity는 20% 정도가 회수되었고 specific activity는 약 2배로 증가하였다. Fig. 4에 표시된 정제율(purification factor)은 생산물의 specific activity를 발효액의 specific activity로 나눈 값이고 수율(yield)은 생산물의 total protein mass를 발효액의 total protein mass에 대한 백분율로 나타낸 것이다.

AOT 사용농도의 영향은 Fig. 4의 결과에서 나타나 있듯이 AOT 사용농도가 증가할수록 추출된 단백질의 양(yield)은 증가하지만 정제율 즉 specific activity는 감소하였다. 따라서 AOT의 농도가 높으면 역미셀용액의 선택적 단백질 분리효율이 감소하게 된다.

요 약

역미셀용액을 이용하여 alkaline protease를 추출분리하

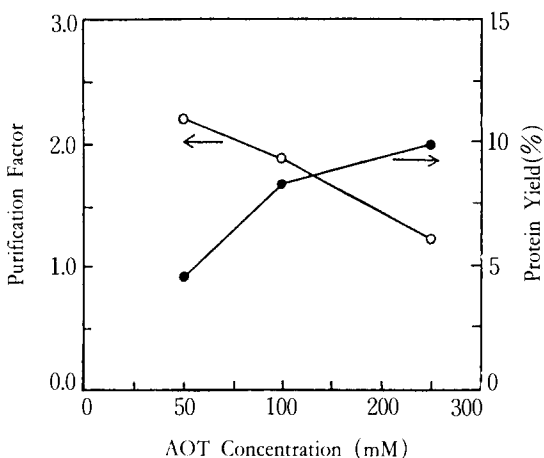


Fig. 4. Alkaline protease extraction from fermentation broth using reversed micelles as a function of AOT concentration.

는 공정의 특성을 관찰하였다. 실험에 사용한 유기용매와 계면활성제는 isoctane과 AOT이었다. 실험결과 수용액의 pH, 이온세기, 그리고 계면활성제의 농도 등이 역미셀용액의 단백질 추출능력에 중요한 인자로서 비교적 낮은 pH(3.0)와 낮은 이온세기(0.1 M KCl)에서 효율적인 추출이 이루어졌다. 계면활성제(AOT)의 사용농도를 20-100mM의 범위에서 증가시키면 수율은 증가하나 선택적분리 효율은 감소하였다. 실제발효액으로부터 alkaline protease를 추출한 결과 약 20%의 activity가 회수되었고, specific activity는 약 2배 증가하였다.

감 사

본 연구는 1989년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 선진교수 학술연구조성비로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 장호남(1989), 화학공업과 기술, 7(2), 7.
2. T. A. Hatton(1989), in *Surfactant-Based Separation Processes*, (J. F. Scamehorn and J. H. Harwell eds.), 55, Marcel Dekker.
3. L. Dahurn and E. L. Cussler (1988), *AIChE J.*, 34, 130.
4. P. L. Luisi, M. Giomini, M. P. Pileni, and B. H. Robinson (1988), *Biochimica Biophysica Acta*, 949, 209.
5. R. Kuboi, Y. Mori, and I. Komasaawa(1989), *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, 15, 669.
6. M. R. Dekker, R. Hilhorst, and C. Laane(1989), *Anal. Biochem.*, 178, 217.
7. D. W. Armstrong and W. Li(1988), *Anal. Chem.*, 60, 86.
8. R. S. Rahaman, J. Y. Chee, J. M. S. Cabral, and T. A. Hatton(1988), *Biotech. Prog.*, 4(4), 218.
9. 조상우, 최춘순, 이준식(1989), 한국생물공학회지, 4(3), 123.
10. P. C. Hiemenz(1986), *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, 2nd ed., Marcel Dekker.
11. J. P. Viccaro(1973), US Patent 3,748,233.
12. T. G. Cooper(1977), *The Tools of Biochemistry*, 53, Wiley.

(Received; November 4, 1990, Accepted; December 30, 1990)