

단백질 추출용 역미셀 실관막장치에 관한 연구

윤현희·박상준·유인상

경원대학교 공과대학 화학공학과

Reversed Micellar Protein Extraction in a Hollow Fiber Membrane Extractor

Hyon Hee Yoon, Sang Joon Park and In Sang Yoo

Department of Chemical Engineering, Kyungwon University, Seongnam 461-701, Korea

ABSTRACT

Solubilization phenomena of a protein in a reversed micellar solution were investigated and a hollow fiber membrane extractor was tested for reversed micellar protein extraction equipment. Alkaline protease was used as a model protein compound and the reversed micellar solution was consisted of AOT and isooctane. It was found that protein solubilization was strongly influenced by ionic strength and pH. The distribution coefficient of the protease between the aqueous solution and the AOT/isooctane solution was also observed to be as high as 4.0 within the scope of this experiment. A hollow fiber membrane extractor was constructed and tested for the protein extraction. The overall mass transfer coefficient at a typical experimental condition of this study was observed to be $6.7 \times 10^{-5} \text{cm/s}$. It was also found that the mass transfer resistance on reversed micellar solution was the dominant resistance for the protein transfer.

서론

생물공학제품의 정제 및 분리는 침전, 전기영동, 크로마토그래피 등을 이용한 회분식 혹은 소규모 공정으로 주로 이루어지고 있으며, 이러한 공정들은 효과적인 대규모 생산공정화에 어려움을 겪고 있다. 따라서, 대규모 화학공정에서 흔히 쓰이고 있는 용매추출공정은 적절한 용매를 사용할 경우 생물공학제품의 분리 및 정제에도 효과적으로 응용될 수 있을 것이다. 특히, 최근에 연구가 진행되고 있는 유화액막 혹은 역미셀(Reversed micelle)계를 이용한 분리공정은 단순한 용매추출공정에 의한 분리에서

문제가 되는 용매에 의한 단백질의 비활성화를 방지할 수 있기 때문에 더욱 효과적인 공정으로 여겨진다. 역미셀계를 이용한 단백질의 분리에 관한 연구는 비교적 최근에 이루어지고 있으며, 이러한 분리공정의 활용가능성에 대한 연구결과가 주로 MIT의 연구진에 의하여 발표되고 있다(1-3).

역미셀은 계면활성제의 polar head group이 내부(water pool or polar core)를 형성하고 hydrophobic hydrocarbon moieties는 외부의 유기용매와 접촉하고 있는 것으로(4), 역미셀을 형성하고 있는 유기용매(역미셀 용액)는 단백질과 같은 생물공학제품을 용해시킬 수 있는 바, 역미셀용액과

단백질을 함유한 수용액을 접촉시키면 수용액 내의 단백질이 역미셀 내의 water pool로 이동하게 된다. 이 때 수용액과 역미셀용액 사이의 단백질 분배계수는 수용액 내의 단백질과 역미셀용액에 분산되어 있는 역미셀 내부의 계면활성제 head group과의 상호작용이 주요 인자가 된다.

본 연구에서는 수용액의 이온세기와 pH가 분배계수에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 model system으로 alkaline protease를 AOT/isooctane 용액으로 용해시켜 추출실험을 수행하였다.

역미셀용액을 이용한 단백질 분리공정은 첫째 계면활성제와 유기용매로 구성된 역미셀용액과 발효액을 접촉시켜 단백질을 역미셀용액상으로 추출시킨 후 이 혼합용액을 두 개의 상으로 분리한 후 상분리된 역미셀용액을 순수한 수용액과 다시 접촉시켜 역미셀용액 내의 단백질을 수용액상으로 역추출하는 과정으로 이루어진다. 이러한 역미셀계를 이용한 단백질 추출공정의 연속화 및 상업화를 위한 추출장치로서 일반적인 추출공정에서 전통적으로 사용되고 있는 mixer-settler와 비교적 최근에 연구되고 있는 membrane extractor 등을 이용한 단백질 추출실험 결과가 발표되었다(5-7). 이밖에 liquid membrane을 이용한 추출장치도 연구되고 있다(3).

다공성 막을 이용한 액-액 추출공정은 수용액상과 유기용매상의 혼합을 방지하면서 두 상을 접촉시키게 된다. 즉 소수성 막을 사용할 경우 막의 pore 내에 유기용액이 침투하여 채워지며 이 때 수용액상의 압력을 유기용액상의 압력보다 크게 조절함으로써 유기용매가 수용액상으로 넘어오는 것을 막을 수 있고, 따라서 물질전달계면(두 상의 접촉계면)은 막의 pore내에서 유지된다. 이 경우 막 내에서의 용질의 확산은 주로 유기용액상에서 이루어지는 것이다. 이와 같은 막을 이용한 투과추출은 1976년 solvent swollen membrane extraction 기술이 Lee(7)에 의하여 처음 도입된 이래 금속이온의 선택적 추출(8)과 기체의 분리(9) 등의 분야에 응용되고 있으며, 최근에는 Cussler(6)가 투과추출기술을 단백질 분리에 응용한 바 있다.

막을 이용한 액-액 추출공정의 단점은 막의 저항으로 인하여 추출속도가 느리다는 점인 바 이는 충분한 크기의 다공성 고분자 막(film)을 사용하고 실관막 장치(hollow fiber membrane system)와 같은 넓은 접촉면적을 가진 추출장치를 사용함으로써 보완될 수 있다. 이와 같은 실관막 모듈을 액-액 추출장치로 사용할 때 용질의 물질전달 면적이 수

천 m^2/m^3 까지 될 수 있어 기존의 충전탑의 수 백 m^2/m^3 보다 높은 장점을 갖고 있다. 또한 실관막 모듈에서는 각 상의 흐름이 독립적이기 때문에 각 상의 유속과 물리적 성질을 임의로 독립적으로 조절하여 효율적인 추출조업이 용이하다. 반면에 기존의 mixer-settler에서는 두 개의 상이 직접 접촉하므로 밀도차와 혼합조건 등에 제한이 있고, 충전탑에서는 효율적인 공정을 위한 적절한 유속조절이 요구된다. 즉 실관막 장치는 mixer-settler나 충전탑에 비하여 조업상의 제한요소가 적고 추출속도 문제에서도 막에 의한 물질전달저항이 있으나 넓은 접촉면적으로 보상되어 효율적인 액-액 추출장치로 사용될 수 있다.

본 연구에서는 이러한 실관막 추출장치를 이용한 단백질 분리실험을 통하여 단백질 추출장치로서의 사용가능성과 효율성을 검토하고자 하였다. 즉 단백질을 추출하는 공정의 조업상태를 실험적으로 관찰하고 또한 물질전달계수를 관찰하여 장치의 효율성을 검토하였다. 이러한 연구결과는 실관막 단백질 추출장치의 개발에 기초자료로 이용될 것이다.

재료 및 방법

분배계수 측정 실험

실관막을 이용한 단백질 추출실험에 앞서 역미셀 용액의 단백질 용해특성 및 분배계수를 측정하였다. 이미 정제된 상업용 alkaline protease 수용액(Novo product ALCALASE 2.5ℓ TYPE DX)를 단백질농도가 Lowry 방법으로 측정하여 1.0mg/ml가 되게 희석하여 model system으로 사용하였다. 이때 수행한 추출실험 방법은 다음과 같다.

역미셀용액은 유기용매인 isooctane에 계면활성제 sodium di-2-ethylhexyl sulfo-succinate(AOT)를 용해시켜 제조하였다. 일정량의 역미셀용액과 수용액(feed)을 비이커에서 혼합하여 자석교반기로 5분간 교반한다. 이때 protease가 수용액상으로부터 역미셀용액상으로 이동하게 된다. 혼합액을 원심분리하여 역미셀용액(유기용매상)과 수용액상으로 분리한다. 상분리된 역미셀용액으로부터 protease를 역추출하기 위하여 순수한 수용액과 혼합하여 자석교반기로 15분간 교반한 후 원심분리한다. 이러한 실험에서 pH는 0.5N HCl 또는 0.5N NaOH를 가하여 조절하였고 이온세기는 KCl의 농도로서 조절하였다. 단백질농도(total protein)는 280nm 파장에서 UV 흡광도로서 protease의 농도를 측정하였다.

이 때 사용한 분광도계는 Milton Roy Spectronic 21D 이었다.

실험장치 및 방법

본 연구에 사용된 실관막은 미국 Celanese사에서 제조된 상업용 실관막(Celgard X10-400)으로서 산·알칼리 및 용매 등에 내성이 뛰어난 polypropylene 재질의 소수성 막(membrane)이다. Table 1에 본 실관막의 일반적인 사양을 표시하였다.

실관막 모듈의 외층용기(shell)은 내경 6mm, 외경 10mm, 길이 15cm의 유리관을 사용하였다. 모듈의 제작은 먼저 실관막이 유리관 벽에서 떨어져 중심 부분에 위치하도록 유리관 양끝에 teflon spacer ring을 부착시키고 주어진 개수의 실관막을 spacer 안쪽으로 밀어 넣은 다음 에폭시수지계열의 potting 화합물(Ciba-Geigy AY103)로 고정시켰다. Table 2에 제작된 모듈의 사양을 표시하였다.

추출실험장치는 Fig. 1에 표시된 바와 같이 실관막 모듈 수용액상이 흐르는 배관, 그리고 유기용매상이 흐르는 배관으로 구성되어 있다. 각 용액은 저장조에서 모듈로 펌프에 의하여 이송되고 다시 본래의 저장조로 각각 순환된다. 용질인 alkaline prote-

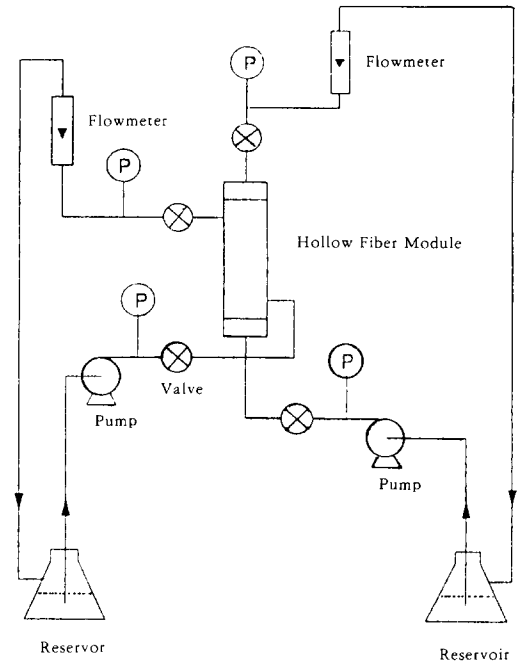


Fig. 1. Experimental set-up for a hollow fiber membrane extractor.

Table 1. Characteristics of celgard X10-400 microporous hollow fiber.

Characteristics	Specification	Test method
Material	Polypropylene	
Property	Hydrophobic	
Porosity	30%	ASTM D-2873
Effective pore size	0.05 μ m	S.E.M.
Internal diameter	400 μ m	HCSPD Method
Wall thickness	30 μ m	HCSPD Method
Outer diameter	460 μ m	HCSPD Method

Table 2. Geometric characteristics of the hollow fiber membrane module.

Dimensions of the module	Specifications
Length	12cm
Internal diameter of the shell	6mm
Internal diameter of the fiber	400 μ m
Number of fibers	30
Cross flow area inside the bundle of fibers	0.038cm ²
Cross flow area outside the bundle of fibers	0.311cm ²
Surface area/volume	15.3cm ² /cm ³

아제를 함유한 수용액상은 모듈의 shell 측으로 역미셀용액인 유기용매상은 실관막 안쪽으로 각각 흐르게 하였다. 유기용매와 수용액의 유량과 압력은 펌프(Micro Pump Co., U.S.A.)의 속도와 모듈 양측의 밸브로 조절하였다. 모듈의 출구와 도입구에 각각 압력계를 설치하여 모듈 내의 실관막 안쪽과 바깥쪽의 압력을 측정하였다. 또한 모듈 내로의 용액의 주입량은 로타미터로 측정하였다.

실험장치의 조작은 먼저 모듈의 실관막 바깥쪽 도입구를 통하여 수용액상을 보낸 후 압력이 0.2kg/cm²을 유지하게 되면 유기용매를 흐르게 하였다. 이 때 양쪽상의 압력차를 0.1kg/cm² 정도가 되도록 조절한다. 적절한 시간 간격으로 저장조로부터 용액을 채취하여 용질의 농도를 분석하였다. 본 실험에서 사용한 alkaline protease의 농도는 280nm 파장에서 UV 흡광도로서 측정하였다.

결과 및 고찰

역미셀용액의 단백질 용해 특성

역미셀용액의 단백질 용해특성 실험 결과 수용액

으로부터 역미셀용액으로 단백질을 추출하는 공정에서 수용액의 pH와 이온세기 등이 중요한 공정변수임이 관찰되었다. 일반적으로 계면활성제(AOT)의 농도가 CMC 이상에서 50mM까지 증가할수록 protease의 용해도가 증가하나 그 이상에서는 증가율이 둔화됨을 관찰하였다. 따라서 본 실험에서 사용한 계면활성제(AOT)의 농도는 50mM이었다.

Fig. 2는 추출및 역추출에 미치는 pH의 영향을 나타낸 것이다. 각 수용액의 pH 값에 따라 단백질이 역미셀용액 내로 추출된 양(% Extracted)과 단백질이 함유된 역미셀용액으로부터 수용액으로 역추출된 양(% Stripped)을 표시한 것이다. 추출시 수용액의 이온세기는 0.1M KCl, 역미셀용액의 AOT 농도는 50mM이었고, 역추출하는데 사용된 수용액의 이온세기는 1.0M KCl이었다. 역추출실험에서 사용된 단백질 함유 역미셀용액은 pH 3.0, 이온세기 0.1 M KCl, AOT 농도 50mM의 조건에서 추출하여 얻었다. 이러한 실험의 범위에서 수용액의 pH가 낮을수록 보다 많은 단백질이 역미셀용액 내로 이동하고 있다. 이러한 현상은 단백질과 계면활성제 사이의 전기적 인력에 기인한다. 즉 수용액의 pH가 낮을수록 단백질이 양전하를 띠게 되어 음전하를 띠고 있는 음이온 계면활성제와의 전기적 인력이 증가하게 된다. 따라서 단백질의 활성도가 감소되지 않는 범위에서 추출은 낮은 pH에서 역추출은 높은 pH에서 최적조건을 찾을 수 있겠다. 일반적으로 protease는 pH=5 이하에서 활성도가 낮아진다. 그러나 본 실험에서는 단백질의 일반적인 추출특성을 파악하고자 하였던 바 본 실험의 범위에서 단백질의 분배계수가

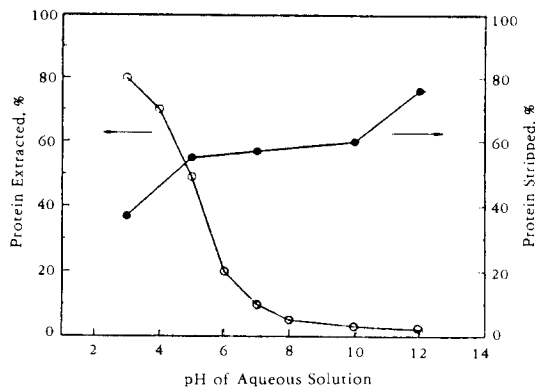


Fig. 2. Effect of pH on protease transfer:
 [AOT/isooctane]=50mM
 Ionic strength=0.01 M KCl (Extraction)
 1.0 M KCl (Stripping)

가장 크게 나타난 pH=3에서 추출실험을 수행하였다.

전기적 인력은 수용액의 이온세기에 의하여도 커다란 영향을 받는다. 수용액의 이온세기가 클수록 전하표면의 electrical double layer의 두께가 감소하고 따라서 Debye ionic atmosphere의 범위가 축소되므로 전기적 상호작용이 감소한다(11). 또한 이온세기가 커지면 역미셀의 크기가 감소하여 역미셀의 단백질 용해능력이 감소한다. Fig. 3은 이러한 이온세기의 영향을 보여주는 것으로 수용액의 이온세기가 클수록 역미셀용액쪽으로의 단백질 이동이 감소함을 나타내고 있다. 따라서 이온세기의 영향은 염(salt)의 종류에 따라 다르겠지만 일반적으로 추출은 낮은 이온세기에서 역추출은 높은 이온세기에서 이루어져야 할 것이다. Fig. 3의 실험에서 추출시 수용액의 pH는 3.0이었고 역추출수용액의 pH는 11.0이었다. 추출실험시 KCl의 농도가 0일 때는 수용액상에 안정된 emulsion이 형성되어 상분리가 이루어지지 않았다.

이러한 실험결과를 요약하면 수용액의 pH와 이온세기는 역미셀용액의 단백질 추출능력에 중요한 인자로서 비교적 낮은 pH와 낮은 이온세기에서 효율적인 추출이 이루어진다. 일반적으로 단백질 또는 아미노산이 수용액으로부터 유기용매상의 역미셀 내부로 이동하는 현상은 단백질 또는 아미노산의 표면 전하와 계면활성제에 의하여 형성되는 역미셀 내부 표면의 전하와의 전기적 상호작용이 주된 원인으로 여겨지고 있다. 따라서 수용액에서 단백질의 표면전하에 영향을 미치는 pH와 전기적 상호작용의 강도에 영향을 미치는 이온세기, 그리고 역미셀 내부표면의 전기적 성질을 결정하는 계면활성제의 종류 등

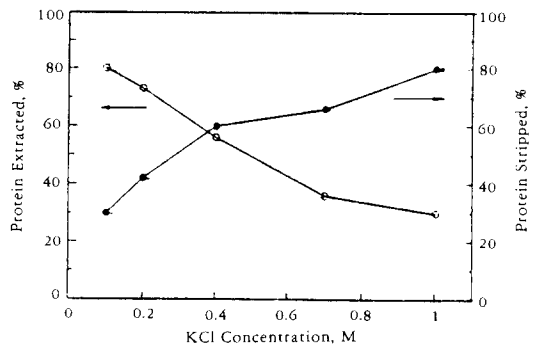


Fig. 3. Effect of ionic strength on protease transfer: [AOT/isooctane]=50mM
 pH=3.0 (Extraction), 11.0 (Stripping).

이 단백질의 역미셀 추출공정에 중요한 공정변수가 된다.

위의 실험결과로부터 alkaline protease의 분배계수를 수용액과 유기용매의 조건에 따라 계산하면 수용액의 pH가 3.0 그리고 이온세기가 0.1M KCl일 때 분배계수가 4.0으로 가장 크게 나타났다. 따라서 실관막 장치를 이용한 추출실험시 이와 같은 조건에서 실험을 수행하였다.

실관막 장치에서의 단백질 추출

역미셀용액의 단백질 용해 특성에 관한 기초실험 결과 본 실험에서 수행한 실험범위에서 수용액의 이온세기는 0.1M KCl, pH는 3.0에서 가장 효과적인 추출이 이루어졌다. 따라서 본 연구의 주요 목적인 실관막 장치에서의 단백질 추출 실험에서 수용액의 단백질농도는 1.0mg/l, 이온세기는 0.1M KCl, pH는 3.0으로 각각 조절하고, 유기용매상은 isooctane에 AOT를 50mM을 가하여 사용하였다. 이 때 사용한 단백질은 위의 실험에서 사용한 단백질과 같은 상용용으로 정제된 alkaline protease를 사용하였다.

실관막장치에서 총괄물질전달계수를 측정하기 위하여 Cussler 등(6)은 저장조용액의 부피가 모듈 내의 용액의 부피보다 훨씬 크므로 모듈 내에서의 물질전달이 정상상태에서 이루어진다고 가정하고 총괄물질전달계수를 실험적으로 구할수 있는 다음과 같은 식을 유도하였다.

$$\ln \frac{\Delta C}{\Delta C_0} = -\frac{t}{\tau} \cdot \frac{1 + \frac{V_0}{HV_i}}{1 + \frac{Q_0}{HQ_i}} [1 - \exp(-\frac{NdLK_0}{Q_0}(1 + \frac{Q_0}{HQ_i}))]$$

(1)

이 식에서

$$\frac{\Delta C}{\Delta C_0} = \frac{(1 + \frac{V_0}{HV_i}C_0 - \frac{V_0}{HV_i}C_0^0 - \frac{C_i^0}{H})}{C_0^0 - \frac{C_i^0}{H}}$$

(2)

$$\tau_0 = \frac{V_0}{Q_0}$$

(3)

를 각각 나타낸다. 식 (1)~(3)에서 하첨자 i와 o는 실관막의 내부상(유기용매상)과 외부상(수용액상)을 각각 나타내며, C는 농도, H는 용질의 분배계수, V는 저장액의 부피, Q는 유속, N은 모듈 내

실관막의 개수, d는 실관막의 직경, L은 실관막의 길이, 그리고 t는 시간을 표시한다. 식 (2)에서 상첨자 O는 초기농도를 표시한다. 즉 저장조의 농도를 시간에 따라 측정하여, $\ln \Delta C / \Delta C_0$ 를 시간에 대하여 도표로 표시하면 직선을 얻게 되며 이 직선의 기울기로부터 총괄물질전달계수 K_0 를 계산하여 얻게된다. Fig. 4는 이와 같은 방법으로 추출실험결과를 표시한 것으로 직선의 기울기로부터 총괄물질전달계수 K_0 를 계산한 결과 $6.7 \times 10^{-5} \text{cm/s}$ 로 나타났다.

실관막 추출장치에서 총괄물질전달저항은 수용액상에서의 물질전달저항, 막에서의 물질전달저항, 그리고 유기용매상에서의 물질전달저항의 합으로 표현할 수 있으며, 각 개별물질전달저항은 각 상의 유속에 따라 변화하게 된다. 따라서 각 개별물질전달저항이 총괄물질전달계수에 미치는 영향 정도를 파악하기 위하여 전체물질전달속도에 대한 유기용매상 및 수용액상의 유속의 영향을 관찰하였다.

Fig. 5와 6은 유기용매상 및 수용액상 유속의 변화에 따른 총괄물질전달계수의 변화를 나타낸 것이다. 유기용매상의 유속을 1.0~20.0cm/s로 변화시켰을 때 총괄물질전달계수가 증가한 반면 수용액상의 유속을 1.0~10.0cm/s로 변화시킨 경우에는 총괄물질전달계수의 변화가 작게 나타났다. 유기용매상 및 수용액상의 유속의 증가는 각 개별물질전달저항을 감소시켜 전체물질전달계수가 증가하게 되며 특히 본실험에서 사용한 추출계(water-AOT/isooctane)에서는 유기용매상의 유속변화에 대하여 더 큰 변화를 보였다. 따라서 본 실험에서와 같이 alkaline

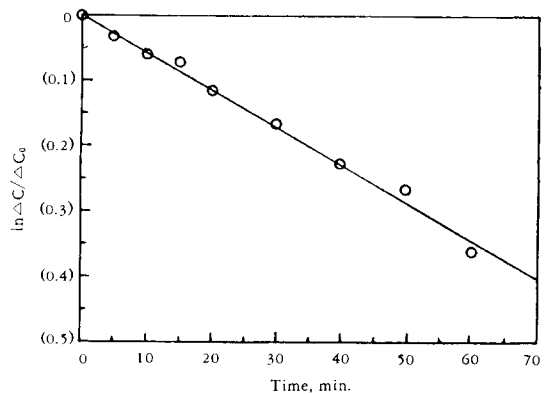


Fig. 4. Fractional concentration difference of solute outside fiber as a function of time. ($v_i=14.7\text{cm/s}$, $v_o=8.0\text{cm/s}$, $v_i=100\text{cm}^3$, $v_o=75\text{cm}^3$)

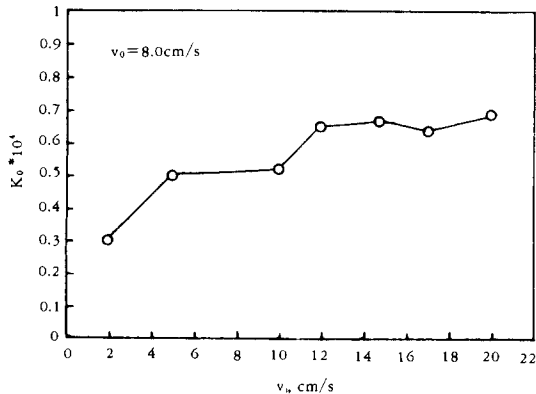


Fig. 5. Effect of the velocity of liquid(organic phase) flowing inside the fiber v_o on the overall mass transfer coefficient K_o .

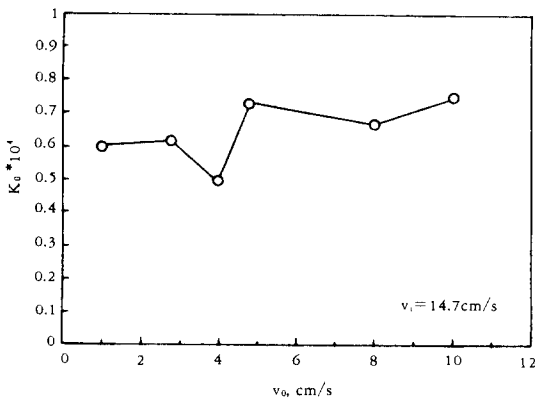


Fig. 6. Effect of the velocity of liquid(aqueous phase) flowing outside the fiber, v_o , on the overall mass transfer coefficient, K_o .

protease를 수용액으로부터 AOT/isooctane 용액으로 polypropylene 막을 통하여 추출할 경우 유기용매상의 물질전달저항이 지배적으로 나타났다.

본 연구에서와 같이 추출용매로서 역미셀용액을 사용할 경우 역미셀용액에 들어 있는 계면활성제로 인하여 실관막 표면과 용액 사이의 표면장력이 감소되어 막의 pore의 삼투압이 감소하게 된다. 일반적으로 두 상 사이의 압력차가 pore의 삼투압보다 크면 pore를 통한 용액의 흐름이 생긴다. 따라서 두 상 사이의 압력차가 조금만 높으면 막을 사이에 둔 두 용액이 쉽게 혼합되어 emulsion이 형성됨을 관찰하였다. 본 실험의 범위에서는 두 상 사이의 압력차를 $0.1\text{kg}/\text{cm}^2$ 이하로 유지하면 emulsion 형성을 방

지할 수 있었다.

요 약

역미셀용액으로 단백질을 추출하는 공정에서 수용액의 이온세기와 pH가 중요한 공정변수가 된다. 본 실험에서 사용한 역미셀용액은 AOT를 isooctane에 50mM의 농도로 용해시켜 사용하였고 단백질로서 alkaline protease를 model compound로 사용하여 추출실험을 수행한 결과 본 실험의 범위에서 pH가 낮을수록, 이온세기가 낮을수록 효율적인 추출이 이루어졌으며, pH가 3.0 그리고 이온세기가 0.1M KCl 일때 분배계수가 4.0으로 가장 크게 나타났다.

단백질의 용매추출 장치로서 실관막 모듈을 제작하여 alkaline protease를 역미셀을 이용하여 용매추출을 수행하였는 바, 단백질 분리공정에 효과적인 장치로 사용될 수 있음을 보여주었다. 본 실험의 조건에서 총괄물질전달계수 K_o 가 $6.7 \times 10^{-5}\text{cm}/\text{s}$ 이었으며 유기용매상의 개별물질전달저항이 수용액상의 물질전달저항보다 중요하게 나타났다. 실관막 추출 장치의 조업시 실관막 양쪽 상의 압력차를 $0.1\text{kg}/\text{cm}^2$ 이하로 조절하여 emulsion의 형성을 방지할 수 있었다.

감 사

본 연구는 1992년 일반목적기초연구과제(KOSEF 921-1000-020-1)의 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. K. E. Golken and T. A. Hatton(1987), *Sep. Sci. Tech.*, **22**, 2 & 3.
2. R. S. Rahaman, J. Y. Chee, J. M. S. Carbal and T. A. Hatton(1988), *Biotech. Progr.*, **4**.
3. T. A. Hatton(1989), In *Surfactant-Based Separation Processes*, Marcel Dekker, Inc., New York.
4. J. H. Fendler and E. J. Fendler(1975), *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, 315, Academic Press.
5. M. Dekker et al.(1986), *Proc. Biocatalysis in Organic Media*, Netherlands.
6. M. Dekker, et al.(1987), *Proc. Int. Congr. on*

- Membranes, Tokyo, 793.
7. L. Dahuron and E. L. Cussler, *AIChE J.*, **34**, 1, 130(1988).
 8. C. T. C. Lee, W. S. Ho and K. J. Liu(1976), U. S. Patent No. 3,956,112.
 9. B. M. Kim(1984), *J. of Memb. Sci.*, **21**, 5.
 10. M. C. Yang and E. L. Cussler(1980), *AIChE J.*, **32**, 1910.
 11. P. C. Hiemenz(1986), *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, 2nd ed., Marcel Dekker, NY.