

역미셀을 이용한 Lysozyme 추출 최적조건

†전 병수 · 1김 석규 · 윤 성옥 · 1송 승구
부경대학교 식품공학과, 1부산대학교 화학공학과
(접수 : 1999. 11. 23., 게재승인 : 1999. 12. 18.)

Optimum Conditions of Lysozyme Extraction Using Reversed Micelles

Byung-Soo Chun†, Suk-Kyoo Kim¹, Sung-Ok Yoon, and Seung-Koo Song¹

The Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

¹Division of Chemical Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

(Received : 1999. 11. 23., Accepted : 1999. 12. 18.)

Proteins were extracted from an aqueous phase with reversed micelles. The effect of pH, and salt concentration on the solubilization of lysozyme in AOT/isooctane solution was studied to explore the potential for employing this solvent system in the large-scale recovery and concentration of proteins using liquid extraction. For pH values below the isoelectric point, pI of the protein, solubilization was high, probably owing to strong electrostatic interactions between the positively charged proteins and the anionic surfactant heads forming the inner micelle wall. At low ionic strength complete solubilization of the protein was observed. A pH higher than the pI of lysozyme and a salt concentration lower than that of the water pool were required for the recovery aqueous phase to ensure the back extraction of lysozyme from the AOT reversed micelles.

Key Words : lysozyme, reversed micelles, AOT, forward extraction, backward extraction

서 론

생화학 기술의 발달로 인하여 생화학제품의 산업적 생산이 이루어지면서 이를 대형화 및 연속식으로 분리 및 정제하는 기술이 절실히 요구되고 있다. 일반적으로 생화학제품의 분리는 기존의 chromatography, 침전법, 전기영동 등의 방법이 있으나, 이런 방법들은 회분식으로 정량적 해석은 용이하나 대량생산에 의한 상업화의 어려움을 가지고 있다. 따라서 연속 및 대형화가 가능한 분리기술인 역미셀 추출은 Luisi(1,2) 등에 의해 제시되어 생화학물의 분리 및 정제의 중요한 방법으로서 과거 10여년 전부터 오늘날까지 이에 대한 많은 연구가 진행되어 오고 있다. Figure 1은 역미셀에 의한 단백질이 추출되는 원리를 간단한 도식으로 나타낸 것으로 역미셀은 유기용매에 자발적으로 형성되는 열역학적으로 안정화된 계면활성제의 집합체로서 계면활성제의 친수성기가 유기용매에 용해되어 작은 수용액 방울 안으로 향해 있으며, 탄화수소 꼬리는 유기용매상에 노출되어 있다. 계면활성제의 집합체의 직경은 1-10nm로 단백질 크기와 유사하며, Goklen(2,3) 등은 계면활성제에 의해 안정화된 극성 코어 안으로 친수성 부분을 가지는 단백질, 효소, 아미노산 등과 같은 생화학

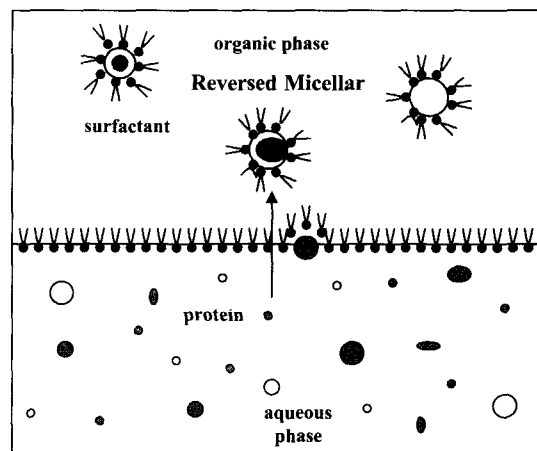


Figure 1. Schematic diagram of reversed micellar extraction.

제품의 변성을 유발하지 않고 추출할 수 있다고 보고하고 있다. 역미셀에 의한 분리 및 정제에 연구되어 온 여러 효소 중에서 lysozyme은 식품과 임상분야의 광범위한 가능성 때문에 매우 중요한 효소 기질로 이용하고 있으며, 효소용액의 pH, 이온강도, 염의 종류, 유기용매의 계면활성제 농도 그리고 추출 시간은 lysozyme의 분리효율에 영향을 미치는 변수들이다(4-10). 따라서 본 연구에서는 수용액상에 존재하는 lysozyme을 역미셀을 사용

†Corresponding Author : The Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea
Tel : 051-620-6428, Fax: 051-622-9248
E-mail : Bschun@dolphin.pknu.ac.kr.

하여 유기상으로 추출하는 과정에서 추출효율에 영향을 주는 주요 변수들을 실험을 통하여 고찰하고, 추출 후 lysozyme의 회수율을 검토하여 최적 추출조건을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

시약

본 연구에서 사용된 효소 lysozyme(E.C.3.2.1.17. Mucopolysaccharide N-acetylmuramyl hydrolase)은 SIGMA에서 구입하였으며, bis-(2-ethylhexyl) sulfosuccinate sodium salt(AOT 98%)은 Aldrich로부터 구입하였다. Potassium chloride은 SIGMA를 사용하였으며, 그 외의 모든 시약은 분석용 특급 시약을 사용하였다.

추출용액과 역추출 용액의 제조

효소용액은 3차 증류수로 0.2 g/L의 농도로 제조하여 pH와 이온강도를 조절하였고, 효소용액으로부터 lysozyme을 분리하기 위한 추출용액은 isooctane에 음이온 계면활성제인 AOT를 용해시켜 제조하였다. 역추출 용액은 3차 증류수에 0.1N HCl, 0.1 N NaOH를 이용하여 pH를 조절한 뒤 KCl, NaCl을 첨가하여 이온강도를 조절하여 제조하였다.

방법

역미셀 추출공정은 추출공정과 역추출공정의 두 단계로 구성되어 있다. 효소용액으로부터 효소를 추출하기 위하여 상온에서 효소용액과 추출용액을 동등한 부피(각 100 mL)로 혼합하여 50 mL 비이커에서 2-10분간 교반한 후 10분간 3000 rpm에서 원심분리 하였다. 효소가 추출된 상등액을 역추출용액과 동등한 부피로 혼합하여 2-15분간 교반한 후 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 분리된 수용액내의 성분을 분석하였다.

단백질 분석

단백질 농도는 bovin serum albumin을 표준용액으로 하여 BCA 방법(11)으로 정량화하였으며, 기초실험에서는 280 nm의 파장에서 UV 흡수도로써 lysozyme의 농도를 분석하였다.

Lysozyme 회수율은 다음과 같은 식에 의해 측정되었다.

Lysozyme 회수율(%) =

$$\frac{(\text{추출 후 수용액상의 lysozyme 전체 농도})}{(\text{추출 전 수용액상의 lysozyme 전체 농도})} \times 100$$

역미셀의 수분함량 측정

유기상내의 역미셀에 함유된 수분은 KCl 농도에 따른 단백질 추출 후 역미셀 크기 상태를 평가하기 위해서 조사하였다. 수분함량은 Karl-Fisher Titrator(Kyoto electronic MKS-IS)를 이용하여 측정하였으며, W_0 [H₂O/AOT]로 나타내었다.

결과 및 토론

역미셀 추출공정은 크게 Forward extraction과 Backward extraction으로 나누어진다. Forward extraction은 단백질이 용해되어있는 수용상으로부터 계면활성제가 녹아있는 역미셀상으로 추출하는 공정이고, Backward extraction은 역미셀상으로 추출

된 단백질을 새로운 역추출 수용상으로 추출하는 공정이다.

Lysozyme 추출(Forward extraction)

pH의 영향

수용액상의 pH는 역미셀상으로 단백질 추출시 가장 큰 영향을 주는 변수이다. Figure 2는 pH변화에 따른 lysozyme 추출효율에 따른 영향을 나타낸 결과로, pH 값이 증가할수록 lysozyme 추출이 증가하는 경향을 보이나, 등전점인 11.2에 근접한 pH 10 이상에서는 추출이 감소하였다. 이것은 pH 10 이하에서는 단백질 표면이 양이온을 띄고 있어 음이온 계면활성제의 음이온기와 전기적 상호작용으로 인하여 lysozyme이 수용액상에서 역미셀상으로 전달되기 때문이다(3-5). 또한 수용액상의 pH가 lysozyme의 등전점에 도달하면 중성에 가까워지면서 단백질과 계면활성제간의 전기적 상호작용이 감소하여 역미셀의 극성 코어안으로 lysozyme 용해가 감소한다. Lysozyme 추출에 대한 최적 pH 범위는 6-9이었으며, pH 6.8에서 실험을 한 이유는 중성 영역에서 효소의 변성을 억제시킬 수 있을 것으로 예상된다.

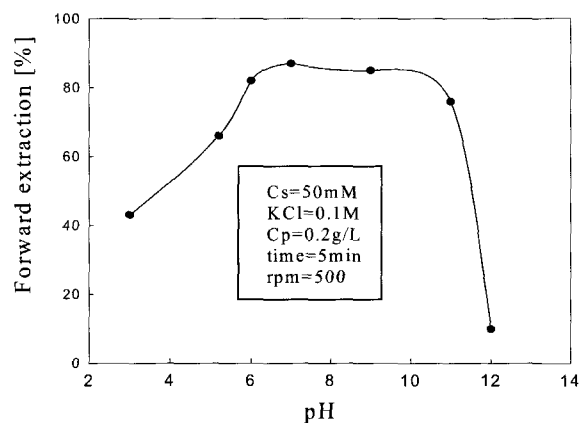


Figure 2. Effect of aqueous pH on the forward extraction of lysozyme.

이온강도의 영향

전기적 상호작용은 이온강도에 의해서 조절이 가능하기 때문에 염의 농도를 변화시켜 이온강도의 lysozyme 용해에 대한 영향을 조사하였다. 먼저 이온강도가 증가할수록 lysozyme 전달이 감소하는 결과를 나타내고 있으며, 이것은 단백질과 계면활성제간의 전기적 상호작용을 감소시키는 "electrostatic screen effect", "size exclusion effect"로 인하여 작은 미셀을 형성하기 때문이다(12). Figure 3은 KCl, NaCl 염에 대한 추출 정도를 조사한 것으로 0.1M에서 최대의 용해도를 얻었으며, 0.4 M 이하의 범위에서는 급격하게 감소하였다. Figure 4는 KCl농도변화에 따른 수분함량의 변화를 나타내고 있으며, 염 농도의 증가로 인한 수분함량의 감소와 미셀크기의 감소를 나타내고 있는데 이것은 미셀의 크기와 수분함량과는 비례관계가 있음을 나타내고 있다(13). 결과적으로 Dekker(7) 등의 연구에 의하면 수용액상에서 역미셀 상으로 단백질 전달은 낮은 이온강도에서 역추출은 높은 이온강도에서 잘 일어난다. 이러한 현상은 본 연구 결과 매우 잘 일치하였다.

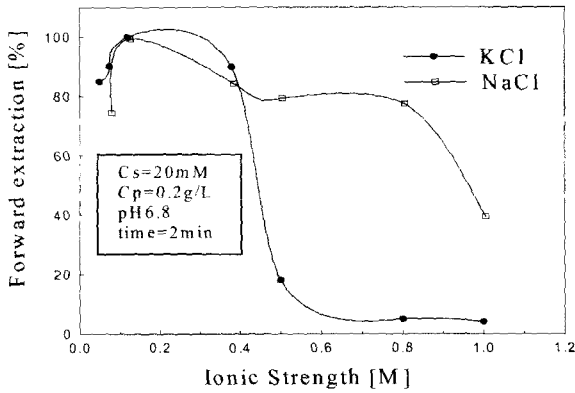


Figure 3. Effect of ionic strength in the aqueous phase on the forward extraction of lysozyme.

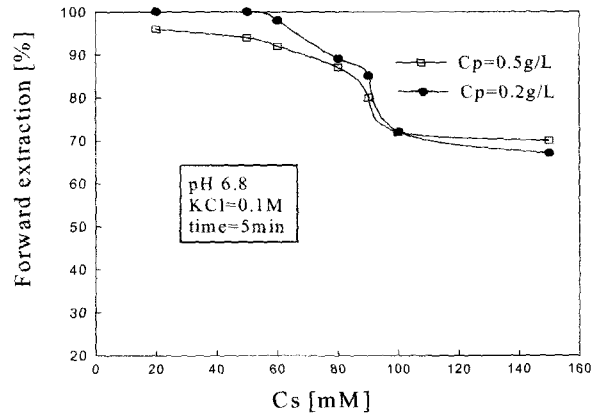


Figure 5. Effect of surfactant concentration in isoctane and initial lysozyme concentration in the aqueous phase on the forward extraction of lysozyme.

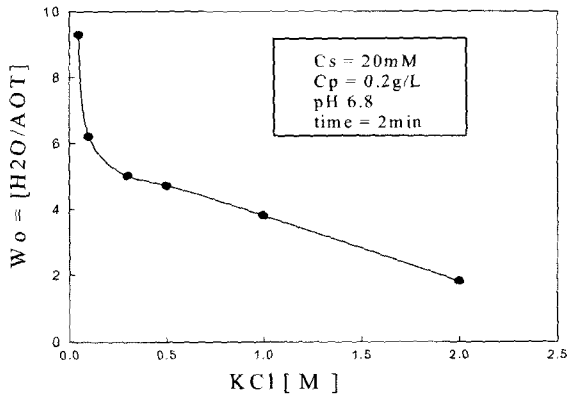


Figure 4. Effect of ionic strength on equilibrium micell size for 20 mM AOT in isoctane.

AOT농도의 영향

Figure 5는 계면활성제의 농도변화에 따른 lysozyme의 추출 정도를 나타내는 것으로 50 mM이하의 농도에서 95% 이상의 높은 추출효율을 얻었으며, 그 이상의 농도에서는 현저히 감소하는 경향을 보였다. 이는 계면활성제 분자들이 미셀에 응집되어 지게 구조를 형성하여 계면에서의 유체 저항을 증가시켜 미셀의 복잡한 구조로 인해 lysozyme의 추출에 방해를 주는 것으로 생각된다.

추출시간의 영향

Lysozyme 추출시 시간에 따른 변화를 Figure 6에 나타내었다. AOT 사용농도는 10 mM과 20 mM 이며, 초기에는 20초 간격으로 2분후에는 2분 간격으로 일정하게 나누어서 16분간 실험하였다. 연구결과 2분일 때가 최대 용해도를 나타내었으며, 그 이상에서는 일정하였다. 따라서 추출을 2분간 수행한 후 역추출을 하였다.

Lysozyme의 역추출(Backward extraction)

Lysozyme의 역추출은 역미셀상에 용해된 단백질을 새로운 수용상으로 재회수하는 공정으로 기본원리는 추출공정과 같다. 여기서 사용된 역미셀 용액은 앞의 추출공정에서 얻은 최적조건으로 조절하였고, lysozyme 역추출에 있어 새로운 수용상의 pH 이온강도 그리고 역추출 시간의 영향을 조사하였다. Figure 7은 단

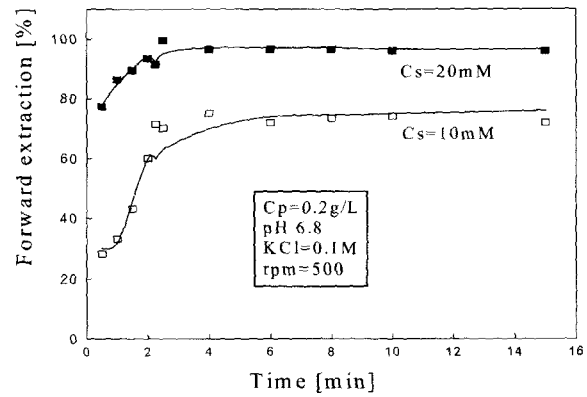


Figure 6. Time scale of forward transfer for lysozyme into reversed micelles.

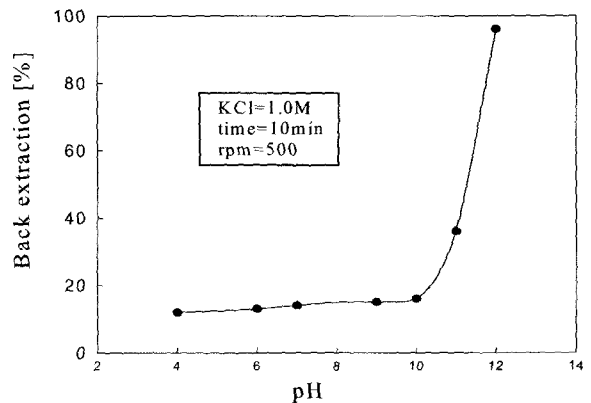


Figure 7. Effect of aqueous pH in the recovery phase on the back-transfer of lysozyme. Forward transfer was performed in advances under the appropriate conditions : 20 mM AOT, pH 6.8, 100 mM KCl, 0.2 g/L lysozyme.

백질 수용액의 pH의 영향을 나타낸 것으로 lysozyme의 pI(11.2)보다 높은 pH 12에서 최대 회수율을 보였는데, 이는 추출공정과 반대로 높은 pH에서 단백질의 전하가 음으로 대전되어 계면활성제 친수성기들과 반발작용이 발생하여 단백질은 다시 새로운 수용액상으로 전달된다(12,13). Figure 8은 이온강도의 영향을 나

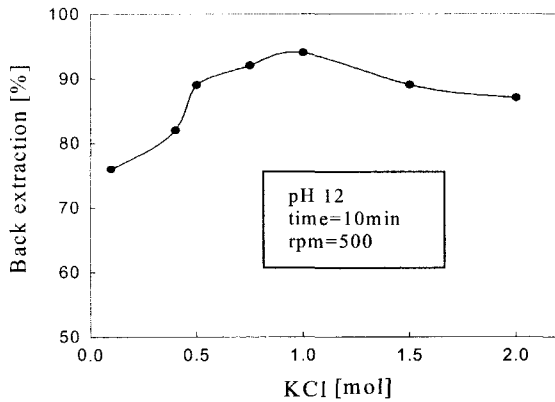


Figure 8. Effect of ionic strength in the recovery phase on the back-transfer of lysozyme. Forward transfer was performed in advances under the appropriate conditions : 20 mM AOT, pH 6.8, 100mM KCl, 0.2 g/L lysozyme.

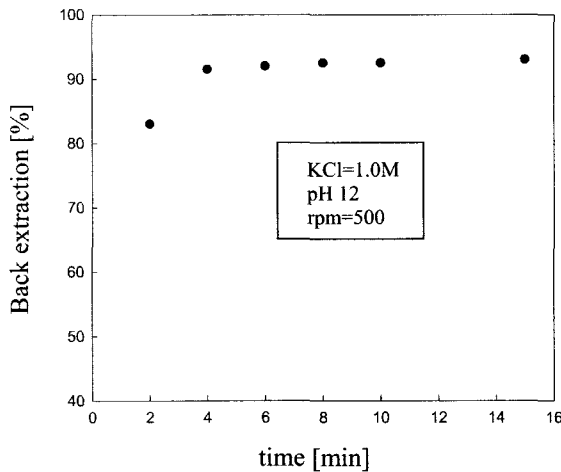


Figure 9. Time scale in the recovery phase on the back-transfer of lysozyme. Forward transfer was performed in advance under the appropriate conditions : 20 mM AOT, pH 6.8, 100 mM KCl, 2.0 g/L lysozyme.

타낸 것으로 이온강도가 커짐에 따라 단백질이 새로운 수용액상으로 전달하려는 경향을 보이는데, 이는 이온강도가 증가함에 따라 전기적 상호작용이 감소하기 때문이다. Figure 9는 시간에 따른 lysozyme의 역추출 정도를 나타낸 것으로 추출되는 시간과 는 달리 약 2-3배 정도 느린 약 8 min대에서 추출되었으며, 이는 역미셀상으로 전달될때의 저항보다 역미셀상에서 다시 수용액상으로 전달될 때의 저항이 훨씬 크다는 것을 알 수 있었다. 또한 이런 현상은 Dekker(14) 등의 역미셀을 이용한 단백질의 물질전달속도 연구에서도 같은 결과를 나타내었다.

요 약

Lysozyme 수용액으로부터 역미셀을 이용한 Lysozyme 추출공정에서 주요변수인 pH, 이온강도, AOT 농도, 추출시간 등을 실험을 통하여 연구하였으며, 미셀내의 수분함량과 lysozyme 농도는 비례관계임을 KCl 농도변화에 따른 결과로서 알 수 있었다. 본 연구에 사용된 lysozyme의 등전점이 약 11.2로 음이온 계면

활성제를 사용할 경우 추출공정에 유리함을 알 수 있었고, 추출 공정(forward extraction)에서의 최적조건은 pH 6-9일 때, 그리고 0.1 M 염농도와 50 mM이하의 AOT 농도에서 가장 높은 lysozyme 추출 효율을 얻을 수 있었다. 그리고 역추출(back extraction)에서는 pH 12이상, 1 M 염농도에서 Lysozyme의 가장 높은 추출 효율을 나타내었다.

감 사

본 연구는 (주) 고려식료와 97년도 청정생산기술사업의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Luisi, P. L., M. Giomini, M. P. Pileni and B. H. Robinson (1998), Reverse Micelles as Hosts for Protein and Small Molecules, *Biochimica Biophysica Acta*, 947, 209-246.
- Goklen, K. E. and T. A. Hatton (1985), Protein Extraction using Reverse Micelles, *Biotech. Prog.* 1, 69-74.
- Hatton, T. A. (1989), Reversed Micellar Extraction of Proteins in Surfactant-Based Separation Processes, Vol. 33, J. F. Scamehorn, and J. H. Harwell, p55, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel.
- Goklen, K. E. and T. A. Hatton (1987), Liquid Liquid Extraction of Low Molecular Proteins by Selective Solubilization in Reversed Micelles, *Sep. Sci. Technol.* 22, 831-841.
- Dekker, M. R., R. Hihorst, and C. Laane (1989), Isolating Enzyme by Reversed Micelles, *Anal. Biochem.* 178, 217-226.
- Kelley, B. D., D. I. C. Wang, and T. A. Hatton (1993), Affinity-Based Reversed Micellar Protein Extraction.: I. Effect of Cosurfactant Tail Length. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 1199-1208.
- Dekker, M., K. Vant' Reit, and S. R. Weijer (1986), Enzyme Recovery by Liquid-Liquid Extraction using Reversed Micelles, *J. Chem. Eng.* 33, B27-B33.
- Rahaman, R. S., J. Y. Chee, J. M. S. Cabral, and T. A. Hatton (1988), Recovery of An Extracellular Alkaline Protease from Whole Fermentation Broth using Reverse Micelles, *Biotech. Prog.* 4, 217-224.
- Armstrong, D. W. and W. Li (1988), Highly Selective Protein Separation with Reversed Micellar Liquid Membranes, *Anal. Chem.* 60, 86-88.
- Aires-Barros, M. R. and J. M. S. Cabral (1991), Selective Separation and Purification of Two Lipases from *Chromobacterium Viscosum* using AOT Reversed Micelles, *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 1302-1307.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951), Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Kinugasa, T., S. Tanahashi, and H. Takeuchi (1991), Extraction of Lysozyme Using Reversed Micellar Solution: Distribution Equilibrium and Extraction Rates, *Ind. Eng. Chem. Res.* 30, 2470-2476.
- Goklen, K. E. (1986), Liquid-Liquid Extraction of Biopolymer : Selective Solubilization of Proteins in Reversed Micelles, Ph.D. Massachusetts Institute of Technology, MA.
- Dekker, M., K. Vant' Reit, B. H. Bijsterbosch, P. Fijneman, and R. Hihorst (1990), Mass Transfer Rate of Protein extraction with Reversed Micelles, *Chem. Eng. Sci.* 45, 2949-2957.