

AOT 역미셀 용액으로부터 BSA의 역추출에 영향을 미치는 인자들에 관한 연구

노 선 군 · *강 춘 형
전남대학교 공과대학 화학공학과, 전남대학교 고분자기술연구소
(접수 : 2000. 11. 14., 게재승인 : 2000. 12. 20.)

A Study of the Factors Affecting the Backward Transfer of BSA from AOT Reverse Micellar Solutions

Seon-Gyun Rho and Choon-Hyoung Kang†
Department of Chem. Eng., Polymer Science and Technology Research Center, Chonnam National University,
Kwangju 500-757, Korea
(Received : 2000. 11. 14., Accepted : 2000. 12. 20.)

The factors affecting the back-extraction efficiency of Bovine Serum Albumin (BSA, Mw. 65kDa, pl 4.9) solubilized in an AOT reverse micellar solution, prepared by the injection method, to an excess aqueous phase were investigated. In particular, the effects of pH, the types of salts, alcohols added as cosurfactants, and their concentrations in the aqueous phase were examined. Furthermore, by comparing the CD spectra of the back-extracted BSA and the feed BSA, the structural changes of BSA during the extraction process were determined. The addition of 1:1 salt such as KCl or NaCl to the aqueous phase resulted in almost a 100% extraction to the aqueous phase at a pH higher than its isoelectric point pl. This high efficiency of back-extraction might be due to the change in the interactions between the protein and micellar aggregates driven by the added salt. For 1:2 salts like CaCl₂ and MgCl₂, BSA was back-extracted with lower than 20% extraction efficiency. Maximum extraction efficiencies were attained at about pH=7 and pH=8 for monovalent and divalent salts, respectively. The addition of alcohols as cosurfactants led to an improvement in back-extraction efficiency. From the CD spectra of BSA extracted to the aqueous phase, it was observed that denaturation of BSA was not significant. In certain back-extraction conditions, the extracted BSA showed even higher activity than the feed BSA.

Key Words : reverse micelle, AOT, BSA, back-extraction, solubilization, injection method

서 론

단백질과 핵산 등의 생물학적 물질들은 일상 생활에서 널리 이용되는 물질들로서 일반적으로 혼합물로 존재하게 된다. 특정 성분의 물질이 혼합물 형태로 존재할 때보다는 단일 성분으로 존재할 때 매우 큰 경제성을 갖게 되므로 혼합물을 분리 정제하는 과정이 필요하며 높은 순도와 수율 그리고 대량적이고 경제적인 방법으로 분리하는 기술개발이 요구된다. 그러나 생물학적 물질들의 혼합물로부터 원하는 특정 물질만을 분리하는 분리기술들은 많은 연구에도 불구하고 아직까지 완성되지 못하고 있다.

기존에 널리 사용되고 있는 공정들은(1,2) 대량생산이 어려워 매우 값비싼 생산물을 얻지 못하면 경제성이 보장되지 못할 뿐 아니라 물질에 따라 생물학적 활성에 영향을 미칠 수 있는 단점을 가지고 있다. 이러한 이유로 다른 접근방법이 필요하며 최근에는 역미셀을 이용한 단백질 추출방법에 대한 연구가 집중적으로 이루어지고 있다. 특히, 역미셀은 생물학적 물질들의 활성을 유지시키면서 빠른 시간 내에 많은 양의 단백질을 추출할 수 있다는 장점을 가지고 있으므로 최근에는 많은 연구가 진행되고 있다(3-8).

미시적인 가용화된 수용액상을 내부에 포함하고 있는 계면활성제 물집들이 비극성 유기용매 안에 분산되어 등방성 용액을 형성하는 Winsor II 형태가 역미셀 상이며 때로는 water-in-oil(W/O) microemulsion으로 불리기도 한다. 이러한 역미셀 상을 이용하여 수용액상에 존재하는 아미노산이나 단백질 같은 생물학적 물질들을 추출할 수 있다. 역미셀상으로 추출된 생물학적 물질들은 다른 과잉 수용액과 접촉시켜 수용액상으로 역추출하게 된다. 추출 공정의 온도나 압력들의 운전조건

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering and Polymer Science and Technology Research Center, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1818, Fax : +82-62-530-1819
E-mail : chkang@chonnam.ac.kr

이 온화하여 외부요인에 의하여 쉽게 변성되어 활성을 잃기 쉬운 생물학적 물질들의 분리와 정제에 적합한 방법으로 생각되어 왔다. 생물학적 물질로 대표되는 수용성 단백질의 경우에는 고유의 등전점을 가지고 있으므로 과잉 수용액상의 pH, 염의 종류와 농도 등이 역추출 효율에 주된 영향을 미치는 인자들로 알려져 있다(9). 또한 알콜류 같은 제 3의 물질들을 첨가함으로써 알콜의 종류가 역추출 속도에 미치는 영향(10)과 계면활성제의 종류와 농도 등이 추출 효율에 미치는 영향에 대한 연구결과도 보고되고 있다(11,12).

역미셀을 이용한 추출에 관한 연구의 방법으로는 가용화 공정과 역추출이 하나의 추출공정을 형성하는 액-액 추출(phase-transfer method), 고체물질을 유기상과 접촉 후 역추출하는 방법인 고체-액체 추출법 그리고 직접 유기상에 생물학적 물질을 가용화 한 후 역추출하는 방법인 주입법(injection method) 등이 주로 사용되고 있다. 그러나 액-액 추출방법의 경우 많은 양의 물질을 빠른 시간 내에 추출할 수 있는 장점을 가진데 반하여 생물학적 물질이 분자량이 커지면 한정된 범위의 pH나 염의 농도에서만 가용화를 시킬 수 있다는 단점을 가지고 있다. 또한 고체-액체 추출법의 경우 물질이 유기상과 직접 접촉함으로써 생물학적 활성을 쉽게 잃을 수 있는 단점을 가지고 있기 때문에 불용성 물질의 추출에 한정하여 사용되고 있다. 주입법은 가용화 효율을 100%로 유지할 수 있고 유기상의 역미셀의 크기와 조건을 인위적으로 조절할 수 있기 때문에 분자량이 크고 액-액 추출에서 가용화 효율이 매우 낮은 경우에 유리한 실험법이다. 액-액 추출 실험에서와는 달리 주입법에서는 forward transfer 과정이 필요하지 않으므로 기존의 forward transfer 과정의 정보로부터 최대 가용화 조건을 설정하여 쉽게 역추출할 수 있을 뿐만 아니라 단백질 추출에 미치는 여러 인자들의 영향을 체계적으로 연구하는데 있어서 매우 효과적인 방법이라 할 수 있다. 주입법은 유기용매/계면활성제로 구성된 유기상에 농축된 단백질 수용액을 주입하여 역미셀을 형성시키므로 유기상의 수분함량을 임의로 조절할 수 있을 뿐만 아니라 단백질의 활성도 효과적으로 유지할 수 있다.

계면활성제는 추출에 결정적인 영향을 미친다. 일반적으로 합성된 이온성 계면활성제의 대부분은 하나의 소수성 사슬을 가지고 있기 때문에 실온의 유기용매에서는 역미셀을 형성하기가 매우 힘들다. 이런 경우 역미셀을 형성하기 위하여 다른 표면활성시약(cosurfactant)을 첨가하기도 한다. 일반적으로 사용되는 표면활성시약들은 짧은 사슬을 가진 알코올류나 아민류들이다. 그러나 표면활성시약의 도움 없이도 역미셀을 형성할 수 있는 계면활성제는 탄화수소 사슬이 2~3개의 사슬을 가지는 경우이다. 하나의 탄화수소 사슬을 가지는 계면활성제에 비해 두 개의 사슬을 가지는 경우는 균형적인 친수성-소수성의 성질들을 띄게 된다. 사슬에 가지가 있는 경우는 더욱 소수성의 성질을 증가시키므로 23개의 탄화수소 사슬에 비해 하나의 사슬을 가지는 경우는 유기용매보다 물에 더 호의적인 성질을 가지게 된다. 만약 사슬이 한 개이거나 친수성 성질이 강한 계면활성제를 사용하는 경우에는 유기용매의 용해도를 증가시키고 역미셀의 형성을 도와주기 위한 소수성 표면활성시약이 필요하게 된다. 수용액상의 pH가 등전점보다 높은 경우에 단백질은 표면 순전하가 음이온을 띠게 되므로

음이온 계면활성제와의 반발력에 의해 단백질이 수용액상으로 추출되게 된다. 이런 조건을 고려하여 본 연구에서는 표면활성시약의 도움없이 역미셀을 형성할 수 있는 계면활성제를 선택하였다. 계면활성제의 머리 부분이 음이온이고 꼬리 부분이 2개의 사슬을 가지고 있는 조건을 만족하는 계면활성제가 sodium bis(2-thylhexy) sulfosuccinate(AOT)이다.

최근에는 역미셀의 크기와 크기분포를 광산란법을 이용하여 직접 측정하여 계면활성제, 염의 종류와 농도에 따른 크기의 구조적인 영향에 대한 연구가 보고되기도 하였으며(13,15,18) 특히 분자량이 큰 단백질의 경우 유기상의 단백질보다 작은 역미셀의 크기가 보고됨으로써 기존의 역미셀 형성에 대한 새로운 기구의 필요성을 제기하였다(16). 이와 같이 역미셀을 이용한 단백질의 추출연구가 광범위하게 진행되어 왔으나, 추출 공정에 미치는 모든 변수들의 영향들을 정확하게 파악하기는 매우 어려운 일이다. 더구나 상대적으로 분자량이 큰 monomeric, oligomeric 단백질들의 액-액 추출에 미치는 변수들의 영향은 더욱 복잡한 형태로 나타난다. 또한 이런 단백질들은 구조적 상호작용에 의해 배제되기 쉬울 뿐만 아니라 추출공정 중에 변성되기 쉽다. 특히 혈청 알부민으로 수술 후 외상치료를 널리 쓰이는 단백질인 BSA의 경우에는 그 구조가 나선형이고 분자량 또한 크기 때문에 기존의 액-액추출법을 이용하여 BSA를 유기상으로 가용화시키는 것이 어렵다. 이는 분자량이 큰 경우 단백질 크기가 water pool의 크기보다 더 크게 존재할 수도 있기 때문이다. 역미셀의 내부는 단백질 분자와 water pool로 구성되어 있으므로 유기상의 수분함량으로부터 역미셀의 크기를 유추할 수 있으며(1,17) 역미셀의 크기는 분리 안정성과 열역학적 성질 규명, 분리에 있어서 기하학적 모델에 적용하기 위하여 결정하게 된다. 유기상의 수분함량은 몰과 계면활성제 몰 비인 $W_o = [H_2O]/[AOT]$ 로 표현되며 역미셀의 크기는 water pool의 반경(머리부분을 포함한 미셀의 water core의 평균반경)인 R_{wp} 로 나타낸다. R_{wp} 는 측정된 W_o 를 이용하여 식(1)에 의하여 계산할 수 있다. 여기서 꼬리부분의 길이는 제외되며 AOT의 꼬리의 길이는 약 1nm의 크기를 가진다.

$$R_{wp}[nm] = (3/\Sigma) W_o \quad (1)$$

ν_w 는 단일 물분자의 부피($0.03nm^3$)이고, Σ 는 계면에서 계면활성제 한 분자가 차지하는 면적($0.5nm^2$)을 나타낸다. ν_w 와 Σ 는 거의 일정하므로 W_o 값이 이에 독립적이라고 가정하면 역미셀의 크기를 유추할 수 있다.

역미셀의 크기는 pH, 계면활성제 종류와 농도 그리고 염의 종류와 농도에 따라 결정되며 계면활성제의 머리 부분과 수용액과의 인력에 큰 영향을 미치게 된다. 단백질의 크기에 비해 역미셀의 크기가 작은 경우에는 가용화된 단백질의 성질을 잃게 될 수도 있다. 따라서 적절한 역미셀의 크기가 요구된다. 그러나 단백질의 크기가 역미셀의 크기보다 큰 경우에도 가용화가 가능한 것으로 알려졌다. 실제로 이전의 연구결과(16)와 모델 단백질인 BSA의 평균크기를 비교해 보면 단백질 크기보다 더 작은 역미셀도 존재할 수 있음을 알 수 있다. 이는 분자량이 작은 단백질의 가용화 기구와는 달리 분자량이 큰 단백질에 대한 가용화 기구는 이온의 영향을 포

Table 1. Experimental conditions of aqueous phase

	For pH Effects	For Salt Conc. Effects
Buffer Conc.(mM)	10	10
Aqueous phase pH	4.0, 4.5, 4.9, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0	7.0(KCl), 8.0(NaCl, CaCl ₂ , MgCl ₂)
Salt Conc.(M)	0.1	0.08, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 3.0

함하여 여러 가지 요인에 복잡한 형태로 의존하고 있다는 증거이다. 이런 이유로 역미셀을 이용한 BSA의 추출에 대한 연구는 광범위하게 진행되지 못하였을 뿐만 아니라 정확한 추출 기구 또한 아직까지 잘 알려져 있지 않는 실정이다. 한편, 주입법을 이용하여 친수성이면서 크기가 큰 단백질인 BSA를 유기상에 주입하면 쉽게 역미셀 안으로 가용화시킬 수 있으며 그 안에서는 대부분의 활성과 구조가 유지된다. 따라서, 액-액 추출법을 이용하여 유기상으로 가용화하기 어려운 단백질 등의 추출공정에 대한 연구에서는 유기상에 직접 단백질을 주입함으로써 가용화 공정을 대신하여 수행하는 것이 일반적이다. 실제로 가용화가 어려운 BSA에 대한 대부분의 연구에서는 일반적으로 주입법을 사용하고 있다(3).

본 실험에서는 음이온 계면활성제인 AOT와 iso-octane으로 이루어진 역미셀 용액에 적절한 수분함량(W₀)을 가진 BSA 용액을 주입하여 가용화시킨 다음에 새로운 수용액과 접촉시켜 역추출하였으며 이때 접촉시킨 과잉 수용액상의 pH, 염의 종류와 농도 그리고 알코올의 종류에 따른 BSA 역추출 효율의 변화를 관찰하였다. 또한 유기상의 수분함량을 측정하여 유기상에 존재하는 역미셀의 크기를 결정하였으며, CD spectropolarimeter를 이용하여 역추출된 단백질의 mean residue ellipticity(θ)를 측정하여 활성을 확인하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에서는 혈청 단백질인 BSA(Type A-7906)를 모델 단백질로 사용하였다. BSA는 분자량이 65000이며 등전점이 4.9이다. 또한 구조가 나선형을 띠고 있으며 일반적인 크기는 2-7 nm이다. 역미셀을 형성하는 양 친매성 분자는 음이온 계면활성제인 AOT를 사용하였다. 위의 시약들은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 유기용매인 iso-octane (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 CaCl₂와 MgCl₂를 사용하였다. KCl과 NaCl은 각각 Sigma사와 Junsei사로부터 구입하였으며 CaCl₂와 MgCl₂은 YAKURI사로부터 구입하여 사용하였다. 알코올의 사슬 크기에 따른 영향을 관찰하기 위하여 사용된 시약은 99.9%의 methanol, ethanol 그리고 propanol이다. 위의 시약들은 더 이상의 정제 과정 없이 사용하였다. 수용액상에 사용된 완충용액은 Acetate buffer(pH 4-6)와 Tris-HCl buffer(pH 7-8)로 2차 증류수를 사용하여 제조하였다.

실험방법

유기상에 주입된 단백질 농축 수용액의 농도는 4 mg/ml이고 이때의 pH는 5.0로 고정하여 사용하였다. 이전 연구에서

200 mM AOT/iso-octane과 pH=5.0인 조건들은 forward transfer에서 최대가용화 효율의 조건임을 밝힌 바 있다(9,16). 본 실험에서도 단백질 농축수용액의 pH와 AOT 농도를 각각 5.0과 200 mM으로 설정하였다. 단백질 농축 수용액 0.24 ml를 3.76 ml의 AOT/iso-octane 용액에 주입하였으며 이 용액이 투명하게 변할 때까지 자석식 교반기를 이용하여 혼합하였다. 준비된 역미셀 용액의 초기 W₀는 16.7로 유지하였다. 단백질과 AOT 사이의 non-specific hydrophobic interaction을 방지하고 큰 W₀를 유지하기 위해 유기상에 주입된 단백질 농축 수용액에는 염을 첨가하지 않았으며 수용액에 염을 첨가하더라도 가용화의 역미셀 크기나 역미셀 내의 염의 농도에는 별다른 변화가 없을 것으로 간주하였다(13). 단백질이 포함된 역미셀 용액에서는 적어도 2-3시간 동안에는 영김이나 혼탁함은 관찰되지 않았다.

단백질이 가용화되어 있는 역미셀 용액 4 ml를 적절한 염이 포함되어 있고 완충용액으로 pH가 조절된 4 ml의 과잉 수용액과 접촉시켜 역추출을 시행하였다. 접촉시킨 용액을 30분간 원심분리기(3600 rpm)를 이용하여 상분리 한 후 이틀 동안 20°C로 유지되는 항온조에 방치하였다. 수용액상과 유기상으로 분리된 각각의 상은 syringe를 이용하여 조심스럽게 시료를 채취하여 각 상의 농도를 UV spectrophotometer를 이용하여 분석하였다. AOT/iso-octane 용액에 주입된 단백질 농축액의 pH를 일정하게 유지하고 수용액상의 pH, 염 종류와 농도를 변화시켜 단백질 추출실험을 행하였다. 이때 사용된 수용액상의 조건들을 Table 1에 나타내었다. 또한 알코올의 종류에 따른 영향을 파악하기 위하여 수용액상에 첨가된 알코올의 농도는 4%V/V로 유지하였으며 이때 염은 0.1M KCl 농도를 유지하였다.

분 석

상분리가 완전히 이루어진 후 수용액상과 유기상으로부터 각각의 시료를 채취하여 UV-spectrophotometer(Bausch & Lomb사의 spectronic 21)를 이용하여 280 nm에서 각 상의 단백질 농도를 분석하였다.

추출효율은 초기 유기상에 존재하는 단백질 농도에 대하여 상대적인 수용액상의 단백질 농도로 결정하였다. 특히 유기상의 농도 결정은 Figure 1에서 보는 바와 같이 W₀값이 약 20 이하에서 UV의 흡광도 값이 단백질의 농도에 대하여 선형임을 알 수 있다. W₀값이 증가하게 되면 UV의 흡광도 값이 농도와의 선형관계에서 벗어나게 되어 흡광도를 이용한 단백질 농도의 결정이 매우 복잡하게 된다. 그러므로 W₀값이 선형인 범위를 벗어나는 경우에는 유기상을 희석하여 선형성이 유지되는 낮은 W₀값의 조건을 유지하여 분석하였다.

또한 유기상의 역미셀 크기는 유기상의 수분함량으로부터 식 (1)을 사용하여 추산하였다.

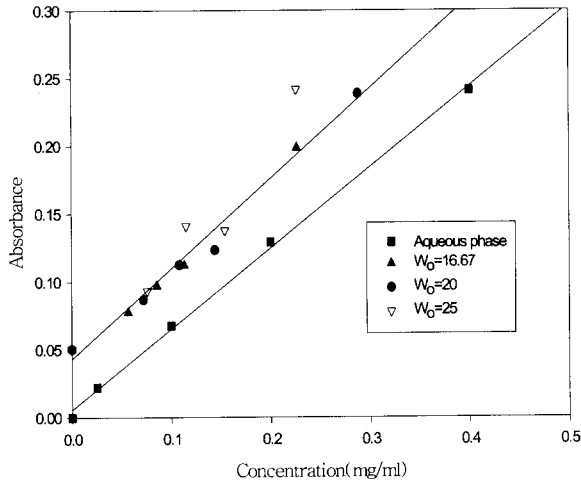


Figure 1. A₂₈₀ Calibration curves for BSA.

유기상의 수분함량을 측정하기 위하여 Denver Instrument사의 model 150 titration controller가 부착된 Coulometric Karl-Fisher titrator를 이용하였다. 수용액상으로 역추출된 단백질의 활성을 확인하기 위하여 JASCO사의 model J-715 spectropolarimeter를 이용하였다. 일관성 있는 활성측정을 위해서 BSA의 시료는 0.2 mg/ml의 농도로 유지하였으며 20°C에서 행하였다. 측정결과는 ellipticity (θ)로 표현하였다. 수용액상으로의 단백질 추출효율 E_b 는 주입법에 의해 가용화된 단백질에 대한 유기상으로부터 추출된 수용액상의 단백질 농도의 비로 결정하였다. 실제의 실험에서는 추출 후의 유기상과 수용액상의 단백질 양이 초기에 주입한 단백질 양과 차이를 보이는 경우가 있으며, 그 차이는 계면에 침전된 단백질의 양으로 정의되며 침전된 단백질의 양 P 는 초기 유기상의 단백질 양에 대한 침전된 단백질 양의 비로 계산하였다. 회수되지 않고 유기상에 잔류하는 양 R 은 초기 유기상 속의 단백질 양에 대한 유기상 속에 잔존하는 단백질 양의 비로 표현하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 비교적 분자량이 큰 수용성 단백질인 BSA를 사용하여 주입법에 의해 유기상에 가용화시킨 후 수용액상으로 단백질을 회수하는 실험을 행하였다. 더욱이 수용액상과 유기상의 농도를 직접 분석함으로써 단백질이 수용액상으로 추출되지 못하고 계면에 영커있는 양을 계산하였다. 특히 수용성 단백질인 BSA는 고유의 등전점을 가지고 있기 때문에 수용액상으로 단백질을 회수할 때 가장 큰 영향을 미치는 인자인 수용액상의 pH, 염의 종류 그리고 염의 농도 등에 대한 영향을 관찰하였으며 알코올의 종류에 대한 영향을 파악하였다.

pH에 대한 영향

일반적으로 수용성 단백질은 고유의 등전점 pI 를 갖는다. 만약 수용액상의 pH가 pI 보다 높으면 단백질의 표면 순전하는 음전하를 띠게 되며 pH가 pI 보다 낮으면 양전하를 띠게 된다. 본 연구에 사용된 BSA($pI=4.9$)의 표면은 양전하와 음

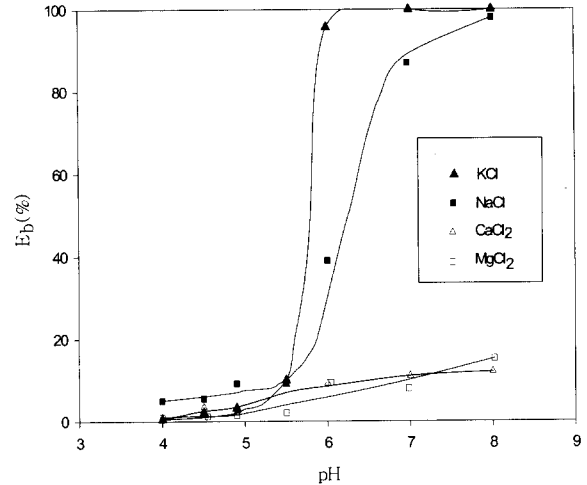


Figure 2. Effects of pH on extraction of BSA.

전하를 띤 작용기로 구성되어 있으며 전체 표면의 순전하는 양전하를 띠고 있다. 그러므로 유기상에서 역미셀을 형성할 수 있는 음이온 계면활성제를 사용하여 단백질을 가용화시킬 수 있다. 또한 등전점보다 큰 pH를 갖는 수용액과 접촉시키면 역미셀 속의 단백질의 순전하가 음전하를 띠게 되며 음이온 계면활성제의 머리와의 반발력에 의해 단백질이 수용액상으로 추출된다. 만약 수용액상의 pH가 단백질의 pI 보다 낮으면 단백질과 계면활성제 머리부분과의 정전기적 인력이 강하게 작용하여 이미 형성된 역미셀의 재분배가 일어나지 않아 유기상의 단백질을 수용액상으로 이동시키기 어렵다.

단백질 농축 수용액(pH=5)이 주입된 유기상은 단백질이 포함된 역미셀이 형성되고 수용액상은 0.1 M의 염과 10 mM 완충용액으로 구성되어 있다. 두 상이 접촉하면 수용액상의 조건에 따라 유기상의 단백질은 재분배가 이루어진다. Figure 2는 수용액상의 pH에 따른 단백질의 추출효율을 나타낸 그림이다. 1:1 전해질인 KCl과 NaCl의 경우 등전점 이상의 pH에서 단백질이 추출됨을 알 수 있다. 특히 낮은 pH에서는 단백질이 거의 추출되지 않지만 등전점 이상의 pH인 약 5.5에서 매우 급격히 추출효율이 증가함을 볼 수 있다. 더욱이 낮은 pH에서는 NaCl이 KCl보다 약간 높은 추출효율을 보이지만 전체적으로 그 차이는 매우 작다. 그러나 pH=5.5 이상에서는 KCl이 NaCl보다 추출효율이 더 급격히 증가함을 알 수 있다. 1:2 전해질인 CaCl₂와 MgCl₂의 경우에는 pH에 상관없이 매우 낮은 추출효율을 보였으며 작은 양이지만 pH가 증가함에 따라 추출효율은 약간 증가하였다. 이처럼 염의 종류에 따른 단백질의 추출효율은 매우 큰 차이를 보여주고 있다. 1:1 전해질의 경우에는 pH가 증가함에 따라 수용액상에 단백질표면의 순전하는 음이온을 띠게 된다. 단백질이 음이온을 띠게 되면, 계면활성제의 머리부분의 음이온과 반발력이 작용하여 유기상의 역미셀에 있는 단백질이 쉽게 수용액상으로 추출될 수 있는 조건을 형성하기 때문이다. 그러나 1:2 전해질의 경우에는 Ca²⁺과 Mg²⁺ 이온이 단백질과 계면활성제 사이에서 다리 역할을 하게 되어 단백질의 표면 순전하가 음이온을 띠게 되더라도 역미셀 내부의 단백질이 쉽게 수용액상으로 추출되지 못하기 때문이다. Figure 3은 BSA가 수

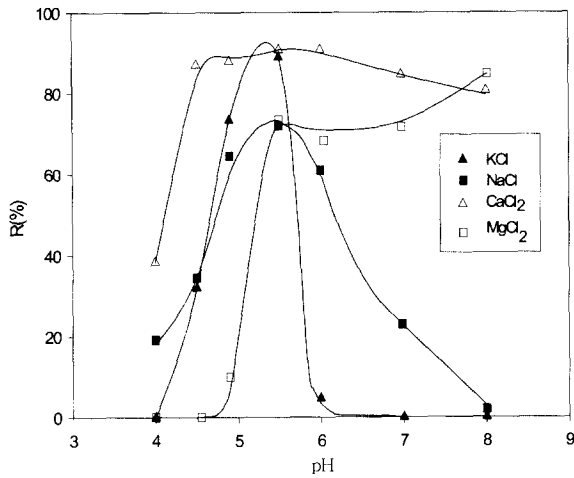


Figure 3. Effects of pH on residue of BSA.

용액상으로 추출된 후 유기상에 잔존하는 단백질의 농도를 측정된 결과로 1:1 전해질의 경우에는 등전점 보다 약간 높은 pH에서 잔존하는 단백질이 최대값을 보임을 알 수 있다. 그러나 1:2 전해질의 경우에는 등전점 근처에서 잔존하는 단백질이 급격히 증가하였으며 pH가 증가하더라도 유기상의 단백질의 양은 수용액상으로 추출되지 못하고 유기상에 남아 있음을 알 수 있다.

위의 결과들을 이용하여 최적 forward transfer의 가용화 조건을 유추할 수 있다. 즉, BSA의 가용화 공정의 최대 효율은 1:1 전해질의 경우에 pH=5.0 이상에서 이루어지고 1:2 전해질인 MgCl₂는 pH=5.0 이상에서 그리고 CaCl₂는 pH=4.5 이상에서 최대 가용화가 이루어짐을 예측할 수 있으며 이는 문헌상 내용[19]과 일치한다.

알코올의 영향

일반적으로 표면활성시약들은 계면활성제 혼자서 쉽게 역미셀을 형성하지 못하는 경우에 사용된다. 표면활성시약들은 알킬기 사슬들로 인해 소수성 성질을 더욱 증진시키는 효과가 있으므로 쉽게 역미셀을 형성할 수 있게 된다. 널리 사용되는 표면활성시약인 알코올은 용매의 유전상수를 감소시켜 계면활성제는 더욱 안정되고 단단한 구조를 갖게 한다.

Figure 4는 알코올의 종류에 따른 단백질의 역추출 효율을 나타낸 그림이다. Figure 3과 비교하면 알코올을 접촉하는 수용액상에 첨가함으로써 추출효율이 개선됨을 알 수 있었다. 특히 알코올 사슬의 길이가 증가함으로써 역추출이 가능한 수용액상의 pH범위가 넓어짐을 보였다. 이런 현상은 단백질의 등전점보다 높은 pH의 수용액에서는 단백질 표면의 순전하는 음이온을 띄게 되고 이때 표면활성시약의 영향으로 인해 단백질의 표면의 음전하와 계면활성제의 머리의 음전하 사이의 반발력은 증대되며 꼬리 부분의 소수성기의 힘은 더욱 증가하기 때문인 것으로 사료된다. 더구나 알코올의 알킬기 사슬길이가 증가하면 소수성의 힘이 더욱 증가하게 되어 이런 현상은 더욱 두드러지게 된다.

염의 종류와 농도에 대한 영향

일반적으로 염을 첨가하면 역미셀 내부에서 하전된 계면과

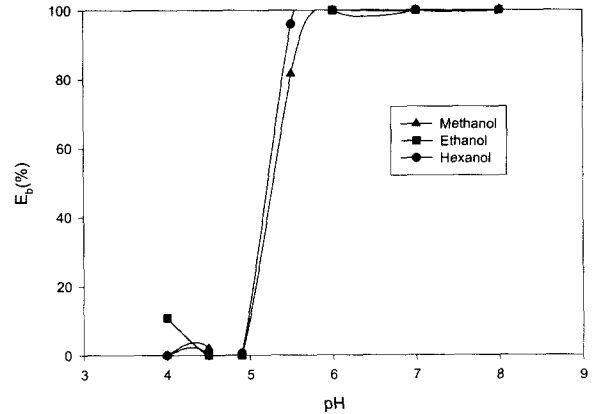


Figure 4. Effects of alcohol on extraction of BSA (0.1 M KCl, 4% vol)

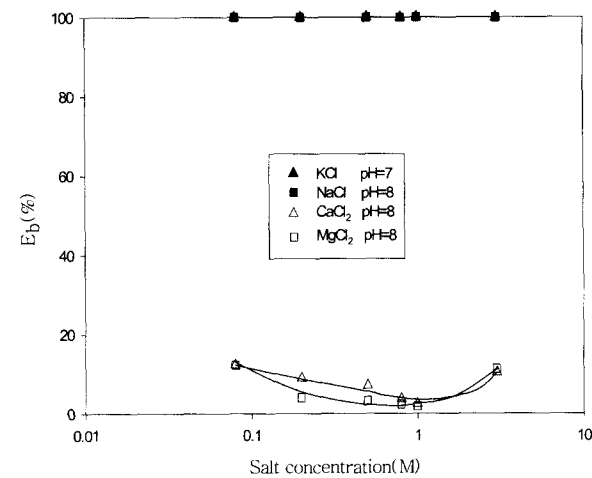


Figure 5. Effects of salt concentration on extraction of BSA.

하전된 단백질 분자사이의 정전기적 상호작용을 감소시키고 계면활성제 머리부분 간의 정전기적 반발력에 영향을 미치며 높은 이온세기에서 역미셀의 크기가 감소한다. 첨가된 염의 종류에 따른 영향에 대해서는 염의 이온 크기가 클수록 큰 정전기적 차폐효과(electrostatic screening)를 가져와서 역미셀의 형성을 더욱 방해하기 때문이다. 따라서 이 차폐효과가 역미셀로부터 수용액상으로의 단백질 추출에 영향을 미치게 된다. 이 정전기적 차폐효과는 염이온이 단백질 분자와 계면활성제 분자 사이에서 정전기적으로 역미셀 형성을 방해하는 효과이며 일반적으로 이온크기는 이온화 경향(ionization tendency)에 따른다. 또한 이온화 경향이 클수록 이온 크기가 커진다. 그러므로 이온화 경향이 큰 염을 사용하였을 경우에는 이온화 경향이 작은 염을 사용하였을 때보다 낮은 이온세기에서도 역추출이 이루어질 수 있다.

염의 농도에 대한 영향을 알아보기 위해 본 연구에서 설정한 수용액상의 pH는 Figure 2에서 최대 추출효율을 얻을 수 있는 값으로 고정하였으며 염의 농도에 따른 추출효율의 결과를 Figure 5에 도시하였다. 1:1 전해질인 KCl과 NaCl의 경우 염농도에 관계없이 거의 100%를 추출할 수 있었으며 이는 수용액상의 염의 농도가 증가함에 따라 단백질 표면의 전하 밀도는 증가하게 되고 계면활성제와 단백질 사이의 반발

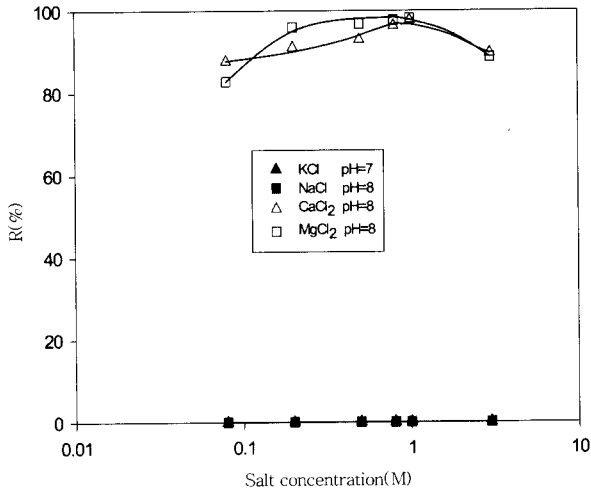


Figure 6. Effects of salt concentration on residue of BSA.

력은 증가하게 되기 때문이다. 1:2 전해질의 경우에는 수용액 상의 전해질의 농도가 증가함에 따라 전하밀도는 증가하지만, Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이온이 단백질과 계면활성제 사이의 다리 역할을 하게 되어 강한 인력이 작용하고 있기 때문에 쉽게 수용액상으로 추출되지 못한다. 1:2 전해질의 경우에는 매우 작은 양의 단백질만이 추출되며 낮은 농도의 염의 경우에는 수용액상이 혼탁하거나 계면에 영킴 현상이 일어나 더 이상 실험을 수행할 수 없었다. 이는 낮은 염의 농도에서는 유기상에 존재하는 계면활성제인 AOT가 수용액상으로 녹아 들어갈 수 있기 때문으로 사료된다. Figure 6에는 염의 농도에 대한 유기상에 잔존하는 단백질의 양을 도시하였다. 1:1 전해질의 경우에는 염의 농도에 상관없이 유기상에 잔존하는 단백질은 검출되지 않았으나 1:2 전해질의 경우에는 거의 모든 양이 유기상에 남아 있음을 알 수 있다.

계면에서의 침전

계면에 침전되는 BSA의 양은 유기상과 수용액을 접촉한 후 두 상의 농도를 각각 직접 분석하여 초기 유기상에 주입한 단백질 농도에 대해 수용액상과 유기상의 농도에 대한 차이의 비로 나타내었다.

Figure 7은 일정한 염의 농도(0.1 M)에서 pH변화에 따른 계면의 침전 정도를 보여 주고 있다. 등전점 이하의 pH에서는 pH가 감소함에 따라 침전량이 급격히 증가하는 경향을 보였다. 특히 1:1 전해질의 경우 pH=6이상에서는 더 이상 계면에서 침전 현상이 확인되지 않았으며 $CaCl_2$ 의 경우에도 pH=6 근처에서는 확인되지 않았지만 pH가 증가하면서 작은 양이지만 침전량이 다시 증가하였다. 매우 낮은 pH에서 더 이상 실험을 수행할 수 없었는데 이는 계면에서의 영킴 현상이 증가함에 따라 수용액상이 microemulsion을 형성하지 못하고 macroemulsion을 형성하여 수용액상이 혼탁하게 보이기 때문이다. Figure 8은 최고 추출효율의 pH에서 염의 농도에 따른 침전 양을 나타낸 것으로 단지 0.08M $MgCl_2$ 에서 작은 양만이 확인될 뿐 더 이상 계면에서의 침전이 확인되지 않았다. 따라서 최고 추출효율의 pH에 따른 염의 농도의 영향은 무시할 만하며 수용액상의 pH는 등전점보다 높아야 된다는

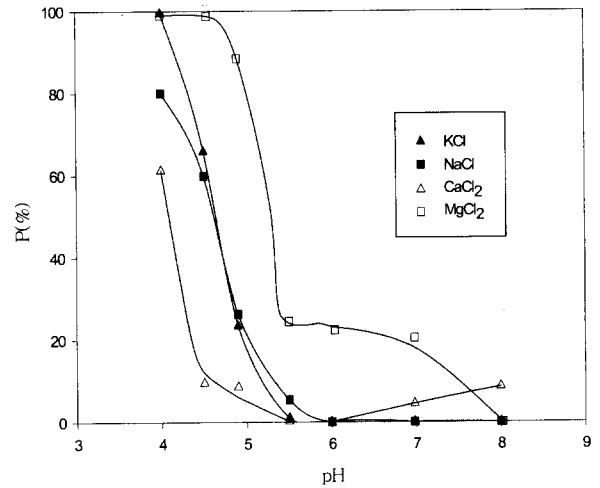


Figure 7. Effects of pH on precipitation for BSA.

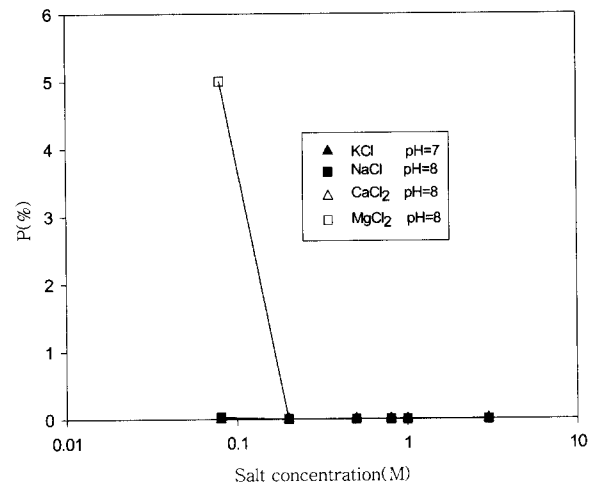


Figure 8. Effects of salt concentration on precipitation for BSA.

것을 확인하였다.

역미셀의 크기

주입법의 장점 중 하나는 유기상에 가용화시킬 때 원하는 수분의 함량을 인위적으로 조절할 수 있다는 것이다. 본 연구에서는 수분함량 $W_0(=[H_2O]/[AOT])$ 는 Figure 1로부터 W_0 값이 단백질의 농도와 선형적인 관계가 성립하는 범위를 유지하기 위하여 16.7로 고정하여 사용하였다.

Figure 9은 0.1 M 염의 농도에 대하여 pH변화에 따른 유기상의 수분함량을 도시한 그림이다. $NaCl$ 과 $MgCl_2$ 의 경우 W_0 값은 약 33과 30의 거의 일정한 값을 보이지만 $NaCl$ 의 경우 등전점 이상의 pH에서 약간 증가하는 경향을 보인다. 이에 반해 KCl 과 $CaCl_2$ 의 경우 W_0 값은 등전점까지는 감소하는 경향을 보이지만, 등전점 이상의 pH에서는 약간 증가하는 경향을 보인다. 더욱이 $CaCl_2$ 의 경우에는 등전점 이하의 pH에서 유기상의 수분함량이 KCl 보다 더 큰 값을 보이지만 등전점 이상의 pH에서는 KCl 경우의 수분함량이 더 큰 값을 보인다. 또한 등전점 이상의 pH에서는 KCl 의 경우에 pH가 증가함에 따라 수분함량은 약간 증가하는 경향을 보이나 대

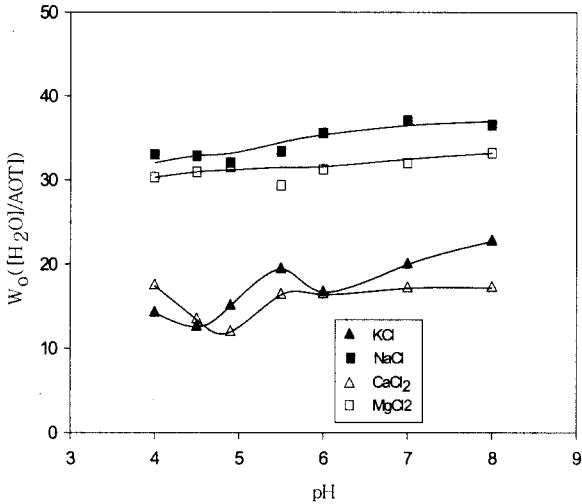


Figure 9. Effects of pH on W_0 for BSA.

체적으로 약 $W_0=15$ 의 값을 나타낸다. 결과적으로 pH에 따른 유기상의 수분함량은 1:1전해질의 경우에는 pH가 증가함에 따라 등전점 이상의 pH에서 작은 양이지만 약간 증가하는 경향을 보인 반면 1:2전해질의 경우에는 거의 일정한 값을 보임을 알 수 있었다. 또한 NaCl의 경우에 KCl의 경우보다 훨씬 큰 수분함량을 나타내었다.

한편 염의 농도에 따른 유기상의 수분함량인 W_0 값은 Figure 10에 도시하였다. 염의 농도가 증가함에 따라 염의 종류에 관계없이 수분함량은 모두 감소하는 경향을 보였다. 이는 염의 농도가 증가함에 따라 전하밀도가 증가하게 되고 이로 인하여 역미셀의 크기는 더욱 감소하기 때문이다. 그러나 염의 농도가 매우 높은 경우에는 W_0 의 평균값이 0.78로써 식(1)로 부터 water pool의 반경을 추산하면 0.14 nm임을 알 수 있다. 약 3.3 nm의 반경을 갖는 BSA의 크기와 비교하면, water pool에 완전히 내포되어 가용화가 이루어지는 기존의 작은 단백질에 대한 가용화 기구로는 분자량이 비교적 큰 BSA의 가용화 과정을 설명할 수 없게 된다. 실제로, 분자량이 큰 경우에는 water pool에 내포되지 않고 단백질 주변에서 물분자의 수화(hydration)에 의하여 가용화된다는 가설도 제기된 바 있다(20). 단백질의 크기가 비교적 작은 경우에 광산란법을 이용하여 역미셀의 반경을 측정된 결과와 간접적인 방법인 Karl-Fisher Titrator를 이용하여 측정된 결과는 서로 비슷하다는 결과를 보인 바 있다(14). 그러나 최근 연구들에서는 유기상의 역미셀은 크기 분포를 가지는 결과들이 보고 되고 있다. 본 연구의 결과인 Figure 10에서도 역미셀의 크기가 단백질의 평균 크기보다 더 작은 결과를 보이고 있다. 만약 역미셀의 크기가 단백질의 크기보다 작으면 추출된 단백질은 활성은 잃게 되었을 것이다. 그러나, 아래의 결과에서 보게 될 것과 같이, 역추출된 단백질의 활성은 거의 완전하게 유지되고 있음을 알 수 있다. 이런 결과는 유기상에 가용화된 단백질은 유기용매에 직접 노출되어 있지 않으며 최소한 수용액 환경 하에 존재하고 있다는 것을 알 수 있다. 이는 단백질이 포함된 water pool의 수분함량이 단백질이 포함되지 않는 water pool의 수분함량 보다 훨씬 작거나 단백질을 포함할 수 있는 크기의 역미셀의 수가 비어 있는 역미셀의

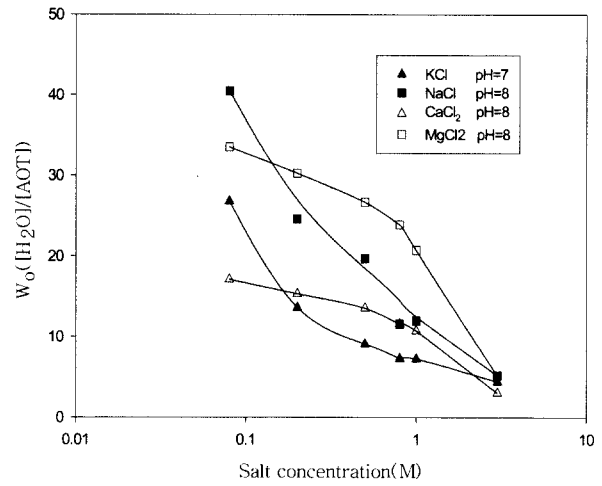


Figure 10. Effects of salt concentration on W_0 for BSA.

수보다 훨씬 많아서 역미셀이 크기분포를 가져야 가능한 것이다.

BSA 활성

일반적으로 역미셀 내부의 water pool의 외부 층은 계면활성제 머리그룹의 친수성기 영향을 강하게 받는다. 이 부분의 수용액 성질은 water pool의 가운데 수용액 성질과는 다르기 때문에 water pool 속의 비이상적인 물의 성질이 단백질의 다양한 변형을 초래한다고 알려져 있다(2,21). 또한 단백질의 모든 표면이 계면활성제의 친수성 그룹과 접촉하여 결합하는 과정에서 단백질의 수축이 일어난다. 결과적으로 helicity의 변화는 역미셀 내부의 water pool 성질 뿐만 아니라 단백질과 역미셀의 하전된 내부 이중층 사이의 강한 상호작용에 의하여도 일어나게 된다. BSA의 경우에는 상호작용이 water pool의 크기에 무관할지라도 단백질의 2차 구조변화에 단백질과 계면활성제 사이의 정전기적 상호작용이 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 CD spectropolarimeter를 이용하여 BSA의 활성을 확인하였다. 일반적으로 단백질이나 핵산 등의 생체 고분자는 아마이드 구조, 푸린 그리고 피리딘 염기와 같은 발색단을 가지고 있으며 이들은 일정한 구조 또는 불규칙한 배열을 이루고 있다. 이로 인하여 서로 다른 광회전성을 나타낸다. 서로 다른 광회전성을 이용한 CD spectropolarimeter는 polypeptide와 단백질의 2차 구조에 매우 민감하여 생체 고분자의 입체구조 연구의 중요한 수단으로 사용된다. CD spectropolarimeter의 측정값은 mean residue ellipticity()로 표현하며 다음과 같이 정의된다.

$$\theta = 100_{obs}/(LC) \tag{2}$$

여기서 obs 는 관찰된 ellipticity(θ), C 는 residue의 농도 (mol/l) 그리고 L 은 빛투과길이(cm)이다. 본 연구에서 사용한 BSA는 나선(helix)구조를 가진 단백질로서 W형 경향을 보여 주고 있다. Ellipticity()가 작고 뚜렷한 W자형 형성 여부를 확인함으로써 BSA의 활성 정도를 판단할 수 있다.

BSA의 활성은 초기 유기상에 공급된 단백질의 활성에 대해 역추출된 단백질의 활성을 비교함으로써 확인할 수 있다.

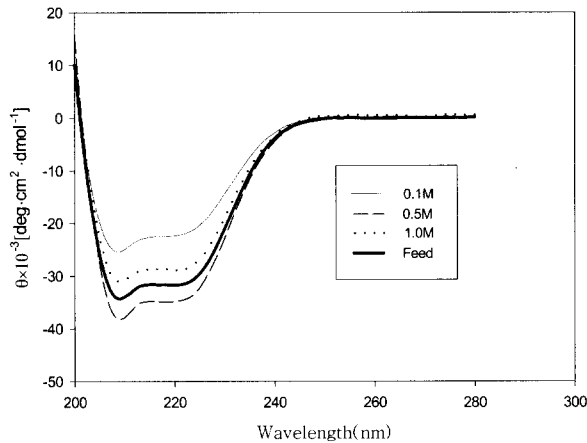


Figure 11. Comparison of CD spectra of feed BSA($\text{pH}_{\text{inj}}=5$) with those extracted from organic phase at various salt concentration of aqueous phase ($\text{pH}=7$, KCl).

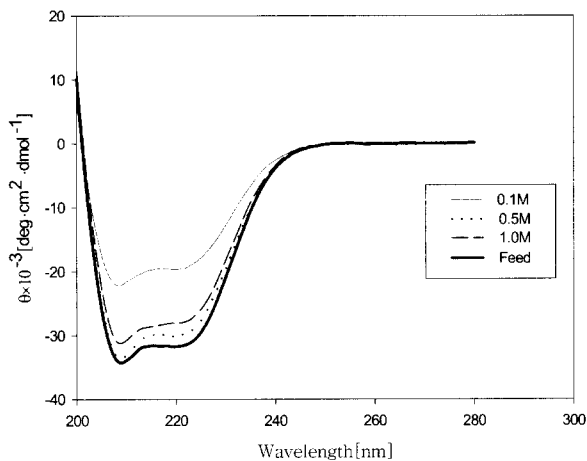


Figure 12. Comparison of CD spectra of feed BSA ($\text{pH}_{\text{inj}}=5$) with those extracted from organic phase at various salt concentration of aqueous phase ($\text{pH}=8$, NaCl).

본 연구에서 사용한 BSA의 활성은 CD spectrum이 208 nm와 222 nm에서 최소값을 가지면서 W자형의 형성여부로 판단하였으며 모든 시료의 농도를 0.2mg/ml로 고정하여 20°C에서 행하였다.

유기상과의 접촉에 따른 영향을 배제한 상태에서 완충용액의 pH에 따른 순수 BSA의 활성을 알아보기 위해 단백질이 포함된 수용액의 pH에 따른 단백질의 활성을 확인하였다. 본 보에서는 보이지 않았으나, pH=8인 경우 가장 높은 활성을 나타내며 pH=6에서 활성은 급격히 감소함을 알 수 있었다. 또한, 유기상에 주입된 수용액의 단백질 농축액의 pH가 5일 때 수용액상으로 역추출된 BSA의 활성은 수용액의 pH가 감소함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 특히 수용액의 pH가 6일 때 추출된 단백질의 활성이 가장 낮음을 알 수 있었다.

Figure 11은 BSA 농축 수용액을 pH=5로 고정된 경우 수용액에 가한 KCl 농도에 따른 활성을 측정된 결과이다. 이때 접촉 수용액의 pH는 7로 고정하였다. 유기상에 주입된 단백질(pH=5)의 활성에 비해 추출이 종료된 후 활성이 같거나 더

줄어드는 일반적인 경향이지만 접촉 수용액의 염의 농도가 0.5 M인 경우에는 추출된 BSA의 활성이 유기상에 주입된 BSA보다 나은 활성을 보였다. 이런 결과는 단백질의 활성이 pH뿐만 아니라 염의 종류와 농도에 따라 복잡하게 영향을 받으며 수용액상의 조건을 적절히 조절함으로써 활성을 증가시킬 수도 있다는 것을 의미한다. Figure 12은 단백질 농축수용액의 pH를 5로 고정된 경우 NaCl 농도에 따른 BSA 활성의 영향을 측정된 결과이다. 이때 수용액의 pH는 8로 고정하였다. 염의 농도가 0.5 M에서 최대 활성을 보이지만 유기상에 주입된 단백질보다는 낮은 활성을 보여 주었다. 위의 결과를 종합하면 활성에 관한 최적조건의 염농도는 0.5 M임을 알 수 있으며 특히 KCl의 경우 0.5 M에서 pH=5에서의 활성보다 추출 후 활성이 더 좋은 효율을 보였다.

요 약

주입법을 이용하여 AOT 역미셀 용액에 가용화된 BSA를 과잉 수용액으로 역추출할 때 효율에 영향을 미치는 요인들에 대하여 조사하였다. 특히 수용액의 pH, 수용액에 가한 염의 종류와 농도, 알코올의 종류에 따른 영향을 검토하였다. 더하여, 역추출된 BSA의 CD 스펙트럼을 원래의 BSA의 CD 스펙트럼과 비교하여 추출과정 중에 발생하는 구조적 변화를 결정하였다. KCl이나 NaCl과 같은 1:1염을 수용액에 첨가하면 BSA의 등전점 이상의 pH에서는 거의 100% 역추출 효율을 보였다. 이것은 첨가된 염에 의하여 유발되는 역미셀과 단백질 간의 전기적 상호작용의 변화에 기인한 것으로 추측된다. CaCl₂와 MgCl₂와 같은 1:2염의 경우에는 20% 이하의 역추출 효율을 보였다. 1가 염과 2가 염의 경우 각각 pH=7과 pH=8에서 최고의 효율을 보였다. 표면활성시약으로써 알코올을 첨가하는 경우에는 역추출 효율이 향상됨을 보였다. 과잉 수용액으로 추출된 BSA의 CD 스펙트럼으로부터 추출 공정 중에는 특이할 만한 구조적 변성은 관찰되지 않았으며, 특정된 추출조건에서는 원래의 단백질 보다 높은 활성을 보이기도 하였다.

REFERENCES

- O'Farrell P. H. (1985), Separation techniques based on the opposition of two counteracting forces to produce a dynamic equilibrium, *Science*, **227**, 1586-1589
- Ivory C. F. and W. A. Gobie (1990), Continuous counteracting chromatographic electrophoresis, *Biotechnol. Prog.*, **6**(1), 21-32.
- Dekker M., K. V. Piet, B. H. Bijsterbosch, P. Fijneman, and R. Hilhorst (1990), Mass Transfer Rate of Protein Extraction with Reversed Micelles, *Chem. Eng. Sci.*, **45**(9), 2949-2957.
- Marcozz G., N. Correa, P. L. Luisi, and M. Casell (1991), Protein Extraction by Reverse Micelles: A Study of the Factors Affecting the Forward and Backward Transfer of alpha-Chymotrypsin and Its Activity, *Biotech. Bioeng.*, **38**, 1239-1246.
- Abbott N. L. and T. A. Hatton (1988), Liquid-Liquid Extraction for Protein Separations, *Chem. Eng. Prog.*, August 31-41.

6. Dekker M. and M. E. Leser (1994), highly Selective Separations in Biotechnology, 86-120, Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall.
7. Andrews B. A., D. L. Pyle, and J. A. Asenjo (1994), The Effect of pH and Ionic Strength on the Partitioning of Four Proteins in Reverse Micelles Systems, *Biotech. Bioeng.*, **43**, 1052-1058.
8. Kadam K. L. (1986), Reverse micelles as a bioseparation tool, *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 266-273.
9. Shiomori K., N. Ebuchi, Y. Kawano, R. Kuboi, and I. Komazawa (1998), Extraction Characteristic of Bovine Serum Albumin Using Sodium Bis(2-ethyl-hexyl) Sulfosuccinate Reverse Micelles, *J. Ferment. Bioeng.*, **86**(6), 581- 587.
10. LEE Sung-Sik, Eun-Ju LEE, Sung-Eun PARK, Jong-Hwa KIM, Jong-Gyu YANG (1999), Effect of addition alcohol on liquid-liquid extraction of BSA using reversed micelles, The 5th International Symp., 881-884.
11. Ichikawa S., M. Imai, and M. Shimizu (1992), Solubilizing Water Involved in Protein Extraction Using Reversed Micelles, *Biotech. Bioeng.*, **39**, 20-26.
12. Lye G. J., J. A. Asenjo, and D. L. Pyle (1995), Extraction of Lysozyme and Ribonuclease Using Reverse Micelles: Limits to Protein Solubilization, *Biotech. Bioeng.*, **47**, 509-519.
13. Wolbert R. B. G., R. Hilhorst, G. Voskuilen, H. Nachtegaal, M. Dekker, K. Vantriet, and B. H. Bijsterbosch (1989), Protein transfer from an aqueous phase into reversed micelles: The effect of protein size and charge distribution, *Eur. J. Biochem.*, **184**, 627-633.
14. Caselli M., P. L. Luisi, M. Maestro, and R. Roselli (1988), Thermodynamics of the Uptake of Proteins by Reverse Micelles: A First Approximation Model, *J. Phys. Chem.*, **92**, 3899-3905.
15. Rahaman R. S. and T.A. Hatton (1991), Structural Characterization of Chymotrypsin Containing AOT Reversed Micelles, *J. Phys. Chem.*, **95**, 1799-1811.
16. Rho S. G., C. H. Kang and D. H Park (2000), Effect of pH and salt type for BSA Solubilization Using Reverse Micelles., In *kor. J. Biotechnol. Bioeng. Spring Symposium*, 157-160
17. Rabie H. R. and J. H. Vera (1996), Generalized water uptake modeling of water in-oil microemulsion. New experimental results for Aersol-ot-water-salts systems, *Fluid Phase Equilibria*, **122**, 169-186.
18. Zampieri G. G., H. Jackle, and P. L. Luisi (1986), Determination of the Structural Parameters of Reverse Micelles after Uptake of Proteins, *J. Phys. Chem.*, **90**, 1849-1853.
19. Hilhorst R., M. Sergeerva, D. Heering, P. Rietveld, P. Fijneman, R. B. G. Wolbert, M. Dekker, and B. H. Bijsterbosch (1995), protein Extraction from an Aqueous Phase into a Reversed Micellar Phase: Effect of Water Content and Reversed Micellar Composition, *Biotech. Bioeng.*, **46**, 375-387.
20. Aveyard R., B. P. Binks, S. Clack, and J. Mead (1986a), Interfacial Tension Minima in Oil-Water-Surfactant Systems, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, **82**, 125-142.
21. Nagahama K., H. Noritomi and A. Koyama (1996), Enzyme recovery from reversed micellar solution through formation of gas hydrates, *Fluid Phase Equilibria*, **116**, 126-132.