

상 접촉법을 이용한 BSA의 AOT 역미셀으로 가용화: pH와 염의 영향

노 선 군 · †강 춘 형
전남대학교 공과대학 화학공학부, 고분자기술연구소
(접수 : 2000. 12. 4., 게재승인 : 2001. 2. 17.)

Solubilization of BSA into AOT Reverse Micelles Using the Phase-Transfer Method: Effects of pH and Salts

Seon-Gyun Rho and Choon-Hyoung Kang†
Department of Chemical Engineering, Polymer Science and Technology Research Center, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
(Received : 2000. 12. 4., Accepted : 2001. 2. 17.)

Bovine serum albumin(BSA) was solubilized into the reverse micellar phase consisting of sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT) and isooctane using the phase transfer method. Of particular interest in this study were the effects of pH and the added salt type and concentration on the solubilization efficiency. When univalent or divalent salts such as KCl, NaCl, MgCl₂, or CaCl₂ were added to the aqueous phase at a concentration of 0.1 M, maximum solubilization efficiency was attained at a pH ranging from 5 to 7, depending on the added salt type. Increased salt concentration up to 1 M resulted in an increased solubilization efficiency for CaCl₂ and NaCl, while the addition of MgCl₂ beyond 0.1 M showed an anomalous trend. Further, it was noteworthy that to a large extent the protein precipitated in the interface between the organic and aqueous phases at lower pHs and lower salt concentrations. The size of the reverse micelle water pool was estimated by measuring the molar ratio of the surfactant to the water, W₀. Irrespective of pH in the aqueous phase, the resulting value of W₀ was almost constant, eg., 20 for MgCl₂. However, the value of W₀ decreased with increased salt concentration in the cases of KCl and CaCl₂.

Key Words : solubilization, reverse micelle, AOT, BSA, salt, pH

서 론

의약품이나 식품공학 등에 널리 이용되는 생물학적인 물질들은 자연상태에서 혼합물인 상태로 존재하므로 특정 성분을 얻기 위한 분리정제 공정이 필요하다. 특히 생물학적 물질들은 열, 빛, 혹은 pH 등의 작은 외부 환경의 변화에도 파괴되거나 변성되므로 활성을 유지할 수 있는 특별한 공정이 요구된다. 일반적으로 세균이나 발효에 대한 연구는 활발히 연구되고 발전되어 온 반면에 단백질과 핵산 같은 물질들의 분리정제 기술은 최근에 비로서 관심을 갖게 되었다. 기존의 단백질 분리정제 방법들인 전기영동법, 침전법, column liquid chromatography법 등(1,2)은 대량생산의 한계 때문에 비용이 비싸다는 단점을 가지고 있다. 이런 이유로 최근에는 계면활성제를 이용한 분리 정제 방법의 연구가 활발히 진행되고 있

다(3-5). 특히 역미셀을 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(3-8).

역미셀을 이용한 추출공정의 연구에서는 계면활성제가 포함된 유기상과 단백질이 포함된 수용액상 간의 접촉에 의한 상 접촉법, 계면활성제가 포함된 유기상에 단백질 농축 수용액을 직접 가용화시켜 특정성분만을 추출하는 주입법, 그리고 유기상과 단백질 분말을 직접 접촉시키는 고체-액체 추출법 등이 주로 쓰인다. 주입법은 주로 단백질 분자량이 커서 수용액상에 존재하는 단백질을 유기상으로 가용화시키기 어려운 물질에 사용되며 매우 작은 양만을 추출할 수 있다는 단점을 가지고 있다. 고체-액체 추출법은 유기상과 단백질 분말이 직접 접촉하기 때문에 단백질의 활성을 잃을 수 있는 단점을 가지고 있으므로 불용성 단백질에 한정하여 사용되고 있다. 상 접촉법은 많은 양의 단백질을 추출할 수 있다는 장점이 있지만 비교적 큰 단백질의 경우에는 가용화 효율이 매우 낮은 단점을 가지고 있다.

가용화 공정에 널리 사용되는 음이온 계면활성제인 AOT는 음이온을 띤 친수성의 머리부분과 양이온을 띤 2개의 소

†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

수성 꼬리부분으로 구성되어 있다. 이러한 계면활성제의 구조적 성질로 인하여 친수성인 머리부분이 수용액과의 인력에 의해 역미셀을 형성하게 된다. 적절한 조건에서 역미셀이 형성되면 소수성 부분의 꼬리들이 수용액과의 반발력에 의해 유기상으로 이동하게 된다. 이런 원리를 이용하여 수용액상에 녹아있는 단백질을 유기상으로 추출할 수 있게 된다.

생물학적 물질로 대표되는 수용성 단백질은 고유의 등전점을 가지고 있다. 이런 이유로 역미셀을 이용한 가용화 과정에는 수용액 상의 pH, 염의 종류와 그 농도, 계면활성제의 구조와 농도 등이 가장 큰 영향을 미친다고 알려져 왔다(9-11). 그러나 비교적 작은 단백질과는 달리 분자량이 매우 큰 단백질의 경우에는 역미셀을 이용한 추출의 효율이 매우 낮기 때문에 폭넓게 사용하지 못한 실정이다. 실제로 분자량이 큰 단백질의 경우에는 역미셀 water pool의 평균 크기보다 더 큰 실험결과도 보고되고 있기도 하다[12]. 따라서 분자량이 큰 단백질의 경우에는 추출 기구가 아직까지 잘 알려져 있지 않고 있다.

본 연구에서는 분자량이 큰 BSA를 모델 단백질로 선택하였다. BSA는 분자량이 매우 클 뿐만 아니라 나선형의 구조를 가지고 있다. 이런 이유로 역미셀을 이용한 이전의 BSA의 추출에 대한 연구는 광범위하게 진행되지 못하고 있다. 특히, 대부분의 BSA에 대한 연구에서는 일반적으로 유기상에 직접 단백질을 가용화시키는 주입법을 사용하고 있다(3,4,13).

본 연구에서는 비교적 작은 단백질에 한정하여 사용되어온 상 접촉법을 이용하여 비교적 큰 단백질인 BSA를 유기상으로 가용화시킬 때 추출 변수인 pH, 염의 종류 그리고 농도에 따른 가용화 효율을 관찰하였다. 더욱이 일반적으로 수용액상의 농도만을 분석하여 유기상의 농도를 추정하는 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) 될 수도 있기 때문이다. 이는 효과적인 추출공정의 운전조건을 결정하는데 있어서 간과해서는 안 될 매우 중요한 변수를 제시하는 것을 의미한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에서는 분자량은 65,000이고 등전점이 4.9인 수용성 단백질인 BSA(from Bovine serum, Sigma Type A-7906)를 모델 단백질로 사용하였다. 역미셀을 형성하는 양 친매성 분자인 음이온 계면활성제 AOT는 Sigma사로부터 구입하였으며, 유기용매인 isooctane(99.0% 이상)은 YAKURI 사로부터 구입하였다. 수용액상의 염의 종류와 농도에 따른 영향을 파악하기 위해 사용된 염은 1:1 염인 KCl과 NaCl 그리고 1:2 염인 MgCl₂와 CaCl₂를 사용하였다. KCl과 NaCl은 각각 Sigma사와 Junsei사로부터 구입하였으며, 1:2 염은 YAKURI 사로부터 구입하였다. 위의 시약들은 모두 정제과정 없이 사용하였다. 수용액상에 사용된 완충용액은 10 mM Acetate 완충용액과 Glycine-NaOH 완충용액을 제조하여 사용하였다.

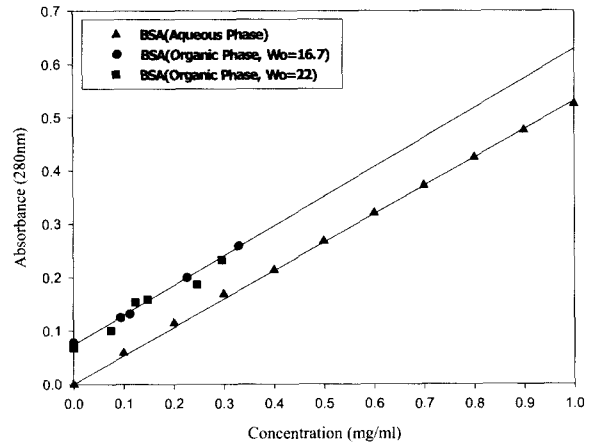


Figure 1. A₂₈₀ Calibration curve for BSA.

실험

BSA 가용화에 사용된 수용액상은 10 mM 완충용액에 적당한 염의 농도와 1 mg/ml의 단백질로 이루어져 있다. 완충용액은 pH의 안전성에 한계를 가지고 있으므로 pH=6까지는 acetate 완충용액을, pH=6~8까지는 acetate 완충용액에 NaOH를 첨가하여 사용하였으며 pH=8~9까지는 glycine-NaOH 완충용액을 사용하였다. 유기상은 200 mM AOT/isooctane으로 이루어져 있다.

실험은 직경 20 mm의 glass vial에서 수용액상과 유기상을 각각 5 ml씩 자석식 교반기를 이용하여 약 2시간 정도 혼합한 다음 20°C로 유지되는 항온조에서 약 3일 이상 방치하였다.

분석

완전히 상 분리가 이루어진 후 수용액상과 유기상으로부터 각각의 시료를 채취하여 280 nm에서 분광광도계(Bausch & Lomb사의 Spectronic21)을 이용하여 잔류 단백질의 농도를 분석하였다. BSA의 경우 분광광도계의 흡광도 값은 파장이 280 nm에서 농도에 대해 선형성을 띄게 되므로 흡광도값을 측정함으로써 단백질 농도를 구할 수 있다. (Figure 1. 참조)

가용화 효율은 초기 수용액상의 단백질 농도에 대한 유기상의 단백질 농도의 비로 결정하였다. 일반적으로 수용액상만을 분석할 경우 수용액상과 유기상 사이의 계면에 단백질이 침전되므로 정확한 가용화 효율을 얻지 못할 수도 있다. 단백질의 분자량이 작은 경우는 비교적 작은 오차를 보이지만 BSA와 같이 분자량이 큰 단백질의 경우에는 심각한 오차를 포함할 수도 있기 때문에 유기상을 직접 분석하여 가용화 효율을 결정하여야 한다. 이런 이유로 본 연구에서는 수용액상 뿐만 아니라 유기상의 농도도 측정하였다. 또한 유기상의 역미셀 안에 포함된 단백질 뿐만 아니라 소량의 물도 흡광도값에 영향을 미치게 된다. Figure 1은 유기상에서 수분 함량에 대한 BSA의 흡광도 값을 도시한 그림이다. BSA의 경우 유기상에 존재하는 수분함량인 $W_0 = [H_2O] / [AOT]$ 값이 16.7 이하인 조건에서는 흡광도 값이 단백질 농도와 선형임을 알 수 있다. 만약 16.7 이상의 W_0 값에서는 농도와 흡광도 값과의 관계는 선형관계에서 벗어나게 되므로 농도결정이 매우 복잡하게 된다. 그러므로 본 연구에서는 유기상의 BSA 농도를 결정하기 위하여 유기상을 희석하여 W_0 값을 16.7이하인

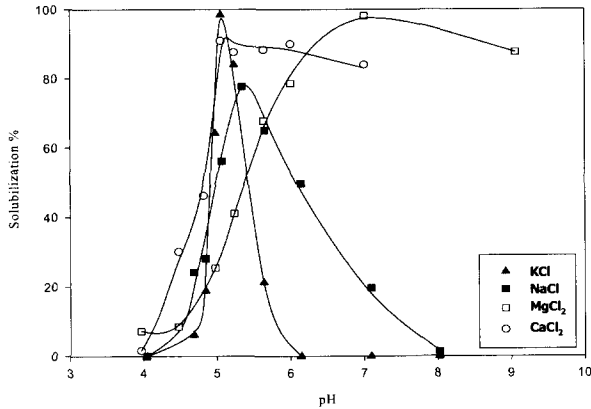


Figure 2. Effects of pH and salt type on solubilization of BSA(0.1 M salt).

조건을 유지하여 분석하였다. 한편, 유기상의 수분함량은 Denver Instrument사의 model 150 titration controller가 부착된 Coulometric Karl-Fisher titrator를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 기존에 작은 단백질만을 유기상으로 분리하는 대신 비교적 큰 단백질인 BSA를 유기상으로 분리하였다. 가용화 실험의 가장 큰 변수들인 pH와 염의 종류 및 농도에 대한 영향을 알아보기 위하여 10 mM 완충용액, 염 그리고 단백질로 이루어진 수용액상과 200 mM AOT/isooctane으로 이루어진 유기상을 등 부피로 접촉시켜 실험을 수행하였다. 두 상이 분리된 후 수용액상과 유기상 사이의 계면에 침전된 단백질의 양을 직접 결정하였다. 이때 유기상에 존재하는 수분함량을 측정하여 역미셀의 물리적 성질인 역미셀의 크기를 결정하였다.

pH에 대한 영향

Figure 2은 수용액상의 염의 종류와 pH변화에 따른 단백질 가용화의 영향을 나타내었다. 이때 수용액의 염 농도는 0.1 M로 고정하였다. 모든 염들은 각각 특정 pH에서 최대의 가용화 효율을 나타내었다. 특히 비교적 크기가 작은 단백질들을 다룬 기존의 실험들에서 음이온 계면활성제의 경우 등전점 이하의 pH에서 매우 좋은 가용화 효율을 보이는 것과는 달리, 분자량이 매우 크고 나선형의 구조를 가지는 BSA의 경우에는 등전점 이하의 pH에서 상호작용하는 힘보다 등전점 이상에서 작용하는 힘이 더 크게 작용함을 알 수 있다.

Figure 3에서 보는 바와 같이 일반적으로 단백질은 등전점 이하에서 침전되는 경향을 보이므로 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. KCl의 경우에는 NaCl의 경우보다 더 좁은 pH영역에서 가용화가 이루어 지지만 가용화 효율은 더욱 효과적임을 보여주고 있다. 1:2 염의 경우 등전점 이하에서는 pH가 감소함에 따라 가용화 효율은 매우 급격히 감소하는 경향을 보였다. MgCl₂의 경우

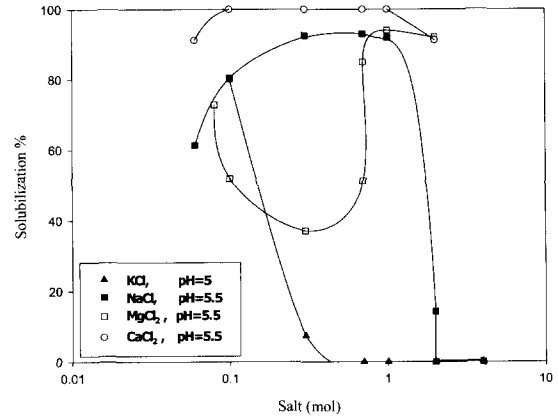


Figure 3. Effects of salt type and concentration on solubilization of BSA.

pH=7 근처에서 최고 가용화 효율을 보였으며 pH=7 이상에서는 가용화 효율은 약간 감소하였다. CaCl₂의 경우에는 pH=5 근처에서 최고의 가용화 효율을 보였으며 그 이상의 pH에서는 약간 감소하는 경향을 보였다. 또한 최고점 이하의 pH에서 CaCl₂가 MgCl₂보다 더 높은 가용화 효율을 보이며 pH의 변화에 급격한 가용화 효율의 증가를 보인 반면, 최대점 이상의 pH에서는 MgCl₂가 더 높은 가용화 효율을 보이지만 증가의 정도는 완만함을 보여주고 있다. 이는 최고점 이하의 pH에서 CaCl₂가 MgCl₂보다 단백질과 계면활성제 사이의 상호 작용하는 인력이 더 크기 때문으로 생각된다. 또한 일반적으로 등전점 이상의 pH에서 1:2 염이 1:1 염보다 더 높은 효율을 보임을 알 수 있다. 이러한 염 종류에 따른 가용화 실험의 결과는 계면에서의 계면장력이 염의 종류에 따라 서로 다르기 때문에 염의 분배계수 영향으로부터 기인하는 것으로 추정할 수 있다.

염의 종류와 농도에 대한 영향

계면활성제인 AOT는 양친매성 물질이므로 AOT는 수용액상과 유기상에 존재할 수 있다. 특히 염 농도가 매우 낮으면 AOT는 수용액상에 존재하나, 이온강도가 높아지면 AOT는 유기액상으로 이동하게 된다. 이는 이온강도가 증가함에 따라 AOT 친화력은 유기액상에 호의적으로 변하기 때문이다. 실제로 본 연구의 실험에서도 염의 농도가 낮은 경우 수용액상이 혼탁해 지는 현상이 관찰되었으며 이로 인하여 더 이상 액-액 상분리 실험을 수행할 수 없었다.

Figure 3에는 일정한 pH에서 염의 종류와 농도에 따른 변화를 나타내었다. 1:1 전해질의 경우 최고의 가용화 효율을 나타내는 pH에서 염 농도의 변화에 따른 영향을 관찰하였다. KCl의 경우 염 농도가 증가함에 따라 가용화 효율은 급격히 감소하였으며 0.7 M 이상에서는 더 이상의 가용화는 일어나지 않았다. NaCl의 경우 약 1 M 까지는 염 농도가 증가함에 따라 가용화 효율은 증가하지만 약 1 M 이상에서는 급격히 감소하여 더 이상 가용화되는 단백질은 검출되지 않았다. 1:2 전해질인 MgCl₂의 경우 약 0.3 M에서 최저점의 가용화 효율을 보였으며 약 1 M 이상에서는 거의 일정한 값을 보였다. 더욱이 CaCl₂의 경우 매우 낮은 염 농도와 높은 염 농도에서 가용화 효율이 약간 감소하는 경향을 보였다. 특히 1:1 염의 경우 염의 농도가 매우 높아지면 가용화 효율이 급격히 감소

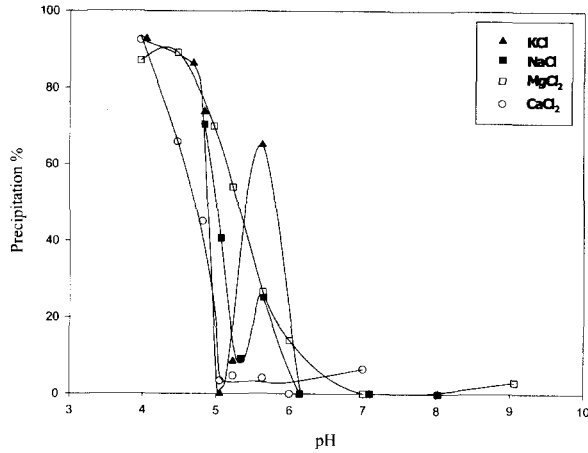


Figure 4. Effects of pH and salt type on precipitation of BSA(0.1M salt).

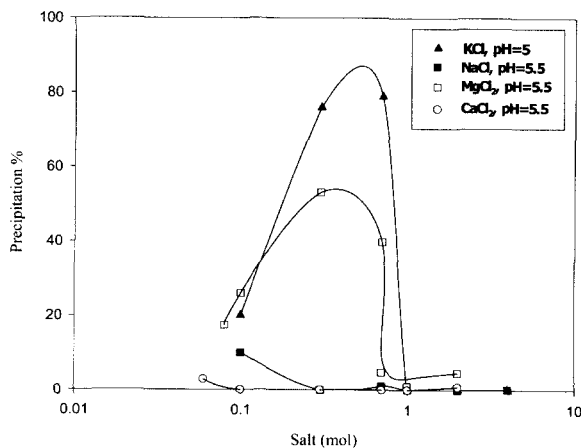


Figure 5. Effects of salt type and concentration on precipitation of BSA.

하는 경향을 보였다. 이는 매우 높은 염 농도에서 수용액상의 전하 밀도가 증가하여 단백질과 계면활성제 사이의 상호작용하는 인력이 급격히 감소하기 때문이다. 그러나 1:2 염의 경우에는 염의 농도가 높아지면 약간의 가용화 효율의 감소를 보였으며 이는 염 농도의 증가에 따른 수용액상의 전하밀도는 증가하지만 1:1 염의 경우와는 달리 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 가 단백질과 계면활성제 머리 사이에 다리 역할을 하게 되므로 강한 인력이 작용하게 되어 높은 염 농도에서도 가용화가 가능해지기 때문으로 사료된다.

계면에서의 침전

본 연구의 실험 결과인 Figure 4와 5는 수용액상과 유기상 사이의 계면에서 단백질이 침전되는 정도를 보여주고 있다. 침전의 정도는 초기 수용액상에 존재하는 단백질 농도에 대해 유기상과 수용액상을 접촉한 후 두 상의 농도를 직접 분석하여 그 차이의 비로 나타내었다. 수용액의 pH가 낮은 경우에 상 접촉 후의 수용액상과 유기상의 단백질 농도는 초기 농도에 비해 현저하게 낮아 대부분의 초기 단백질이 계면에 침전되어 있을 것으로 추정할 수 있었다. 또한 염이 첨가되지 않은 조건에서도 수용액상의 혼탁현상과 계면에서의 침전 현상이 나타났다.

Figure 4는 pH변화에 따른 계면에서의 단백질 침전의 정도를 보여주고 있다. 등전점 이하의 낮은 pH영역에서는 pH가 감소함에 따라 염의 종류에 관계없이 침전의 양은 급격히 증가하였으나 등전점 이상의 pH에서는 각 염에 따라 침전의 정도는 큰 차이를 나타내었다. 특히 1:1 전해질의 경우 등전점 이상에서 침전율이 최대가 되는 pH가 존재함을 보여주고 있다. KCl의 경우가 NaCl의 경우보다 침전의 정도는 훨씬 심하였으며 이로 인하여 Figure 2에서와 같이 등전점 이상의 pH에서 NaCl의 가용화 효율이 훨씬 증가함을 추론할 수 있게 되는 것이다. 1:2 전해질의 경우에는 $CaCl_2$ 가 $MgCl_2$ 보다 더 광범위한 pH 범위에서 침전이 일어남을 알 수 있다. 더욱이 $CaCl_2$ 의 경우가 $MgCl_2$ 에 비교하여 등전점 근처에서 급격한 침전량의 감소를 보였다.

Figure 5는 염 농도에 대한 단백질의 침전량을 나타내었다. 최대의 가용화 효율을 보여주는 염 농도에서는 염 종류에 상관없이 모두 최소의 침전량을 나타내었다. KCl과 $MgCl_2$ 의 최대의 침전량을 보이는 염의 농도가 존재하였으나 NaCl과 $CaCl_2$ 의 경우에는 염 농도가 증가함에 따라 더 이상의 침전은 관찰되지 않았다. 이처럼 계면에서의 단백질 침전은 가용화 효율에 매우 큰 영향을 미치는 인자임을 알 수 있었다.

역미셀의 크기

역미셀의 물리적 성질을 나타내는 크기는 일반적으로 역미셀의 water pool로 표현할 수 있다. 유기상에 존재하는 역미셀의 크기를 측정하는 방법들은 직접적인 방법인 광산란법과 간접적인 방법인 유기상의 수분함량으로부터 측정하는 방법이 있다. 대부분의 역미셀 크기는 이전의 실험들에서 보고된 바와 같이 간접적인 방법을 이용하여 크기를 측정된 결과와 광산란법을 이용하여 직접 측정된 크기와 비교할 때 상당히 근접한 결과를 보이고 있다[14-17]. 이런 이유로 본 연구에서는 간편한 Karl-Fisher 적정기를 이용하여 유기상의 수분함량을 측정하여 역미셀의 크기를 계산하였다. 역미셀의 크기인 water pool의 반경(R_{wp})은 다음으로 표현할 수 있다.

$$R_{wp}[nm] = (3V_w / \Sigma) W_0 \tag{1}$$

여기서 V_w 는 단일 물분자의 부피이고, Σ 는 계면에서 계면활성제 한 분자가 차지하는 면적을 나타낸다. V_w 와 Σ 는 거의 일정하기 때문에 W_0 값이 이에 독립적이라고 가정하면 역미셀 크기를 쉽게 구할 수 있다.

Figure 6에는 일정한 염의 농도(0.1 M)에서 pH변화에 대한 W_0 값을 도시하였다. 1:1 전해질인 KCl의 경우 10 이하의 매우 작은 값을 보이지만 등전점 이상의 pH에서 최고점을 나타내는 pH를 보여 주었다. 그러나 1:2 전해질인 $MgCl_2$ 의 경우에는 약 20의 거의 일정한 W_0 값을 보였다. Figure 7은 일정한 pH에서 염 농도에 대한 W_0 값의 변화를 나타내었다. 모든 염에 대하여 농도가 증가함에 따라 유기상에 수분함량인 W_0 값은 차츰 작아짐을 알 수 있었다. 이는 염의 농도가 증가할수록 하전된 단백질 분자와 계면활성제 극성부분 사이의 인력은 감소하게 되어 크기가 작은 역미셀을 형성하기 때문이다. 그러나 $CaCl_2$ 의 경우에는 작은 수분함량을 보임에도

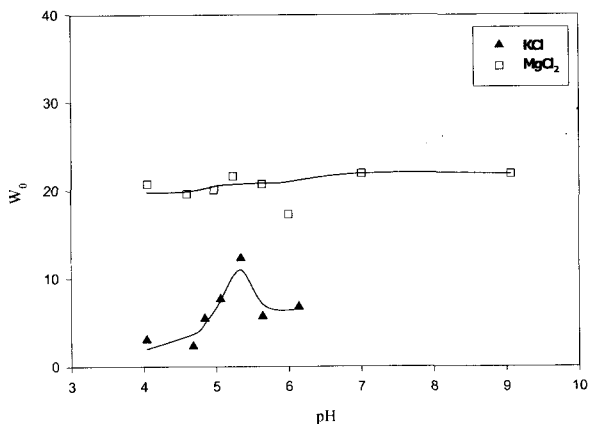


Figure 6. Effects of pH on the molar ratio of water to AOT, W_0 (0.1 M salt).

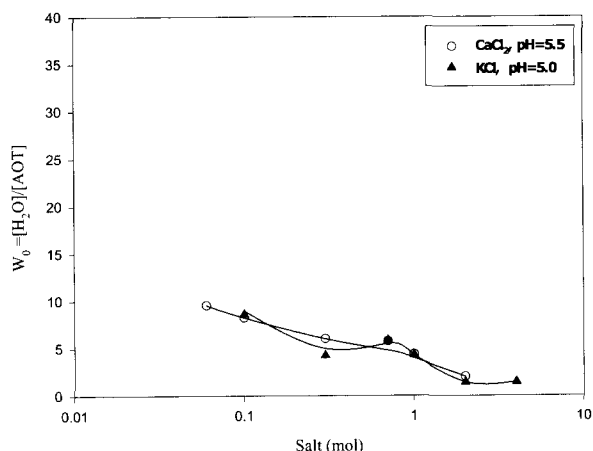


Figure 7. Effects of salt type and concentration on the molar ratio of water to AOT, W_0 .

불구하고 높은 염의 농도에서 가용화 효율은 우수하며 이는 Ca^{2+} 이 단백질과 계면활성제 사이의 인력을 증가시켜 상대적으로 수분함량이 적은 역미셀을 형성하기 때문인 것으로 추론할 수 있다. 그러므로 BSA와 같이 비교적 분자량이 큰 단백질의 경우에는 기존의 간접적인 방법으로 역미셀의 크기를 추산하는 것은 많은 오차를 포함할 수 있으며 특히 높은 염 농도에서는 직접적인 방법으로 역미셀의 크기를 측정하여야 더 타당한 결론을 내릴 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

상 접촉법을 이용하여 BSA를 음이온 계면활성제인 AOT와 isooctane으로 구성된 역미셀상으로 가용화하였다. 본 연구에서는 pH와 염의 종류 및 농도가 가용화 효율에 미치는 영향에 주목하였다. 0.1 M의 KCl, NaCl, $MgCl_2$ 그리고 $CaCl_2$ 와 같은 1:1 염 혹은 1:2 염을 수용액에 첨가하면 첨가한 염의 종류에 따라 pH=5~7사이에서 최대의 가용화 효율을 보였다. $CaCl_2$ 와 NaCl의 경우, 1 M까지는 첨가한 염의 농도가 증가함에 따라 효율도 증가하였으나 $MgCl_2$ 의 경우에는 특이한 경향을 보였다. 염의 농도가 낮거나 pH가 낮은 경

우에는 단백질이 광범위하게 수용액상과 유기상의 계면에 침전되는 것은 주목할 부분이다. 역미셀의 water-pool 크기는 물에 대한 계면활성제의 몰비인 W_0 를 측정하여 추산하였다. $MgCl_2$ 의 경우에는 pH변화에 관계없이 $W_0=20$ 의 거의 일정한 값을 보인 반면 $CaCl_2$ 와 KCl의 경우 염 농도가 증가함에 따라 W_0 는 감소하였다.

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 Affection 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.
- Dekker M. and M. E. Leser (1994), highly Selective Separations in Biotechnology, 86-120, Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall.
- 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.
- Kadam K. L. (1986), Reverse micelles as a bioseparation tool, *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 266-273.
- Shiomori K., N. Ebuchi, Y. Kawano, R. Kuboi, and I. Komasaawa (1998), Extraction Characteristic of Bovine Serum Albumin Using Sodium Bis(2-ethyl-hexyl) Sulfosuccinate Reverse Micelles, *J. Ferment. Bioeng.*, **86**(6), 581- 587.
- Ichikawa S., M. Imai, and M. Shimizu (1992), Solubilizing Water Involved in Protein Extraction Using Reversed Micelles, *Biotech. Bioeng.*, **39**, 20-26.
- Lye G. J., J. A. Asenjo, and D. L. Pyle (1995), Extraction of Lysozyme and Ribonucleasea Using Reverse Micelles: Limits to Protein Solubilization, *Biotech. Bioeng.*, **47**, 509-519.
- 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
- Shiomori, K., Kawano Y., Kuboi, R., and Komasaawa, I. (1995), Effective purification method of large molecular weight proteins using conventional AOT reverse micelles, *J. Chem.. Eng. Japan.*, **28**, 803-809
- 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.
- Rahaman. R. S. and T. A. Hatton (1991), Structural

- Characterization of α - Chymotrypsin Containing AOT Reversed Micelles, *J. Phys. Chem.*, **95**, 1799-1811.
16. Wolbert, R. B. G., R. Hilhorst, G. Voskuilen, H. Nachtegaal, M. Dekker, K. Vanriet, 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.
17. M. Caselli, M., P. L. Luisi, M. Maestro, and R. Roselli (1988), Thermodynamic of the Uptake of Proteins by Reverse Micelles: Approximation Model, *J. Phys. Chem.*, **92**, 3899-3905.