

역미셀을 이용한 Lysozyme 추출에 대한 물질전달

†전 병수 · 김석규 · 윤성옥 · 송승구
부경대학교 식품공학과, ¹부산대학교 화학공학과
(접수 : 2001. 3. 12., 게재승인 : 2001. 5. 18.)

Mass Transfer of Lysozyme Extraction Using Reversed Micelles

Byung-Soo Chunt, Suk-Kyoo Kim¹, Sung-Ok Yoon, and Seung-Koo Song¹
Department of Food Science & Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea
¹Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
(Received : 2001. 3. 12., Accepted : 2001. 5. 18.)

Mass transfer rates have been measured for the extraction of enzyme from aqueous solution into a reverse-micelle phase at 25°C. The 420 mL vessel was carefully designed to maintain a planar interface between the aqueous and solvent phases, so allowing precise measurement of interfacial area, has been investigated. Sodium di-2-ethylhexyl sulfosuccinate(AOT) was the surfactant used. Factors varied included: agitator speed, pH, ionic strength and surfactant concentration. Samples were taken from the solvent phase at 15min intervals, and the amount of enzyme extracted was measured by UV absorption at 280 nm. The observed Sherwood numbers for the aqueous phase Sh_1 were correlated in terms of the aqueous phase Reynolds number Re_1 , and modified Schmidt number Sc_1 .

$$Sh_1 = 0.664Re_1^{0.5} Sc_1^{0.33}$$

Key Words : lysozyme, mass transfer, reversed micelles, AOT, surfactant

서론

최근 생물기술의 발전에 따라 다양한 생물제품의 합성 방법과 산업적 규모의 생산이 이루어지고 있다. 그러나 이에 비해 대량 생산된 생물제품의 발효액으로부터 생물제품이 효율적으로 분리하는 기술의 발달이 병행되지 못하고 있다. 전통적인 생물제품의 분리 방법인 chromatography나 전기영동은 의약품 및 식품·음료품에서 요구하는 순도까지 정제하는데 이용되고 있으나, 값이 고가이면서 산업적으로 대량생산하는데 어려움이 있다.

일반적으로 용매 추출은 유기산이나 아미노산 분리에 대한 대형화 공정으로 적용할 수 있는 반면, 단백질에의 적용은 유기용매 환경 하에서 단백질의 비가역적인 변성으로 인하여 적합하지 않다. 따라서 역미셀을 이용한 새로운 추출 기술이 Luisi 등(1)에 의해 제시되어 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 역미셀은 내부에 물 분자를 포함하고 있는 계면활성제 분자의 집합체로서, 친수성 부분은 집합체의 내부로 향해 있는 반면 친유성 부분은 유기용매상으로 향해 있다. 역

미셀 내부의 극성 코어는 계면활성제 분자들로 둘러싸여 있어서 유기용매로부터 보호되기 때문에 생물제품의 비가역적인 변성 없이 극성 코어 안으로 추출할 수 있다(2,3).

Goklen과 Hatton(4)은 혼합 교반조를 이용하여 3종류의 단백질 혼합물을 분리하였으며, Dekker(5) 등은 α -amylase의 연속적 추출과 추출에 대한 수학적 모델을 제시하였다. 더욱이 역미셀 액막을 이용한 추출은 Luisi(1,2), Amstrong과 Li(6) 그리고 Kuboi 등(7)에 의하여 증명되었다. 그러나 역미셀을 이용한 단백질 추출 메커니즘은 계면활성제 환경에서 단백질과 물의 용해 특성의 복잡화로 인하여 여전히 불투명하다.

따라서 본 연구에서는 역미셀 내부로 전달되는 단백질의 분포 거동을 lysozyme에 대하여 등전점(pI) 아래의 pH에서 음이온 계면활성제를 이용하여 실험하였으며, 역미셀 추출에서 lysozyme 거동변수의 추출(forward extraction)을 토대로 하여 검토하였다. 그리고 액-액 간의 물질 전달기구를 해석하기 위하여 stirred flat vessel을 이용하여 역미셀 상으로 전달되는 물질 전달속도의 계면 거동변수들을 측정하여 총괄전달 속도 및 전달속도정수를 구하는 방법과 반응형태를 고찰하였으며, 마이크로에멀전 시스템을 이해하는 데 목적을 두고 있다.

†Corresponding Author : Department of Food Science & Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea
Tel : +82-51-620-6428, Fax : +82-51-622-9248
E-mail : bschun@pknu.ac.kr

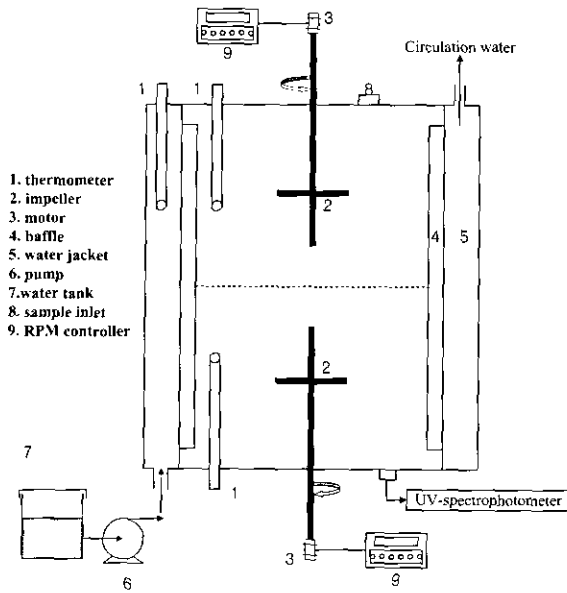


Figure 1. Schematic diagram of lysozyme extraction with reversed micelles.

재료 및 방법

실험재료

음이온 계면활성제인 sodium-di-2-ethylhexyl sulfosuccinate (AOT)는 Aldrich Co. LTD.(USA)로부터 구입하였으며, 유기 용매는 분석용 특급시약의 iso-octane(2,2,4-trimethylpentane)에 AOT를 용해하여 사용하였다. 단백질 수용액은 3차 증류수에 KCl을 용해하여 이온강도를 조절한 후 lysozyme을 원하는 농도로 용해하여 제조하였으며, 이 수용액의 pH는 0.1 N HCl, 0.1 N NaOH를 직접 첨가하여 조절하였다. 본 연구에서 사용된 효소인 lysozym(E.C.3.2.1.17 mucopeptide N-acetyl-muramyl hydrolase, $M_w=14,300$, $pI=11.2$)은 SIGMA Co. Ltd.(USA)에서 구입하였다. 그 외의 모든 시약은 분석용 특급 시약을 사용하였다.

실험장치 및 실험방법

본 실험에 사용된 stirred flat vessel(Figure 1)은 내경 64 mm, 높이 130 mm, 두께 3 mm의 pyrex로 제작되었고, vessel 내에 두개의 impeller와 vessel의 내부벽에 4개의 방해판을 부착시켜 종전의 lewis cell을 개량시킨 장치이다. 각 impeller는 vessel 내경의 1/10(8 mm) 직경과 3/10(32 mm) 높이로 평판 날개를 가진 것으로 날개가 각 상의 중간에 위치하도록 고정시켰다.

vessel의 내부 벽에는 두 용액을 혼합하기 위하여 방해판을 부착시켰으며, 이 방해판은 두께 2 mm, 폭 8 mm로 크기가 동일하며, 외부 glass cylinder는 외경 120 mm, 두께 5 mm의 pyrex로 제작한 것으로 vessel 양끝에 stainless steel로 부착시켜 내부와 외부 glass cylinder 사이의 둥근 공간을 항온수조를 순환시킬 수 있도록 water jacket을 사용하였다.

실험을 실행하기 전 vessel unit를 증류수로 세척하였으며, 각 상의 impeller 회전수는 motor가 부착되어 각각 독립적으로 조절할 수 있으며, impeller 회전 방향이 같은 방향이 되

Table 1. Experimental conditions and physical properties of system used at 25°C Temp. = 25°C, lysozyme = 0.2g/L, KCl = 0.1M

system	ρ w(kg/m ³)	μ w(kg/m · s ²)	DW × 10 ¹¹ (m ² /s)
water	1002.3	0.0009	19
0.2 M sucrose	1366.7	0.0015	7.9
0.4 M sucrose	1379.2	0.0017	6.9
0.8 M sucrose	1620.8	0.0030	3.9
0.04 g starch	998.2	0.0018	6.5
0.16 g starch	998.3	0.0038	3.0
0.3 g starch	998.5	0.0059	1.9

도록 고정시켜 각 상의 회전수를 시료를 넣기 전에 tacometer로 측정해 두었다. 액-액 평판 교반조내 두 액상의 접촉 계면 면적은 $2.827 \times 10^3 \text{ m}^2$ 이고, vessel 내부에 주입되는 두 용액은 단백질 수용액을 먼저 vessel 중간까지 주입한 다음 역미셀 용액을 깔때기를 이용하여 vessel 벽을 따라 흘러내리게 천천히 주입시켜 cell내 차지하는 두 용액의 부피를 각각 200 mL로 일정하게 하였다.

Motor의 스위치를 작동시킨 후 주사기로 유기상의 용액을 채취하여 t=0에서의 농도를 결정한 후 15분 간격으로 유기상의 용액을 전체량에 영향을 주지 않는 약 1 mL 정도를 채취하여 시간에 따른 농도 변화를 UV-spectrophotometer (UVcon 933, Kontron, Italy)로 측정하였다.

본 실험에 사용된 물성값 및 실험조건들을 Table 1에 수록하였다.

아래쪽상을 수용상, 위쪽상을 유기상으로 하여 실험이 진행되는 동안 회전수에 의한 계면의 부서짐이 있는지를 관찰하였고, 교반조 내의 온도와 회전수의 일정함을 확인하였으며, 실험은 회분식 조작에 의한 25°C에서 실행하였다.

물질전달 이론

액-액 추출시 물질전달속도는 일반적으로 3가지 저항에 의해서 결정되어진다. 즉 역미셀을 이용한 단백질 추출(Forward extraction)에서 단백질 분자는 수용상내의 벌크상으로부터 계면으로 확산되고, 계면에서 단백질은 계면활성제 분자층에서 캡슐화되어 단백질을 포집한 역미셀은 벌크 유기상으로 확산되는 과정으로 이루어진다. 대부분의 추출 시스템에서 전달되는 물질의 계면농도는 평형하다고 가정하면 이런 시스템에서 물질전달속도는 단지 1상 계면과 2상 계면 중 한쪽의 확산과정에 의해서 결정된다.

수용상내에 존재하는 용질이 역미셀상으로 전달되는 액-액 계의 물질전달 메카니즘은 다음식으로 표현될 수 있다.

$$J_1 = K_1 S(C_{aq} - C_{iaq}) \tag{1}$$

$$J_2 = K_2 S(C_{iorg} - C_{org}) \tag{2}$$

여기서 K_1 와 K_2 은 역미셀상으로 추출 및 수용액상으로 역추출될 때 물질전달 계수를 나타내며, S는 물질전달 접촉면적, C_{aq} 와 C_{org} 는 수용액상의 유기상의 용질의 농도를 나타낸다.

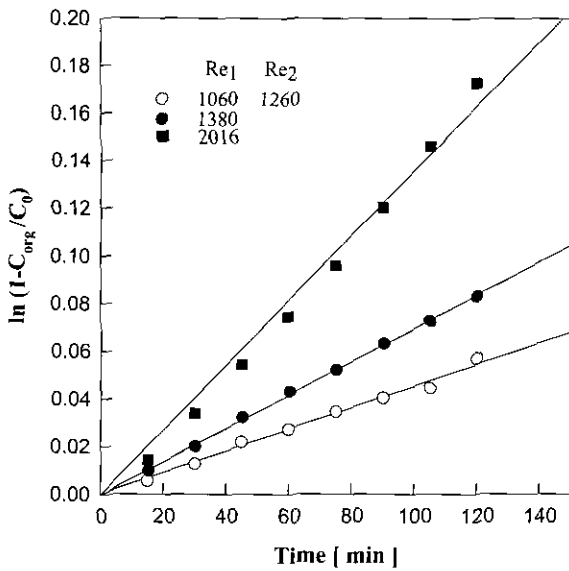


Figure 2. $\ln(1-C_{org}/C_0)$ vs. time at 25°C (0.2 g/L lysozyme, 20 mM AOT, pH 6.3, 0.1 MKCl.)

물질전달계수의 실험적 측정

수용상내에 존재하는 용질이 역미셀상으로 전달되는 액-액 계의 물질전달 메카니즘은 다음식으로 표현되어진다.

$$J = \frac{V_{aq}}{S} \frac{dC_{meas.}}{dt} = K_1 (C_{aq} - \frac{1}{H} C_{iorg}) \quad (3)$$

H는 분배계수로서, $H = C_{iorg}/C_{iaq}$ 이며 forward extraction에서 계면에서의 용질의 농도는 매우 작으므로, $C_{iorg}/H \ll C_{aq}$ 따라서 C_{iorg}/H 항은 무시되고 식 (3)의 두 항은 변수분리하여 적분한 다음 일반해를 구하면 식 (4)로 된다.

$$\ln(1 - \frac{C_{org}}{C_{po}}) = -\frac{S}{V_{aq}} K_1 t \quad (4)$$

여기서 C_{org} 는 수용상에 존재하는 단백질의 초기농도를 나타내며, S는 계면적, V는 수용상의 부피를 나타낸다. 따라서 시간에 따른 단백질의 추출된 양을 도시하여 기울기와 추출 접촉계면 면적 및 수용액의 부피로부터 물질전달계수 K_1 을 실험으로부터 구할 수 있다.

결과 및 고찰

Lysozyme의 물질전달속도 측정

Stirred flat vessel에서 lysozyme 추출의 물질전달속도는 교반속도의 함수로서 측정되어졌으며, 추출하기 전·후 두 상의 단백질 농도 측정으로 인하여 총괄물질전달계수 K_1 는 교반속도 $[N (s^{-1})]$ 의 함수로서 계산하였다. 초기 lysozyme 0.2 g/L, pH 6.3, 0.1 N KCl, 20 mM AOT 농도로 조제하여 상·하 교반속도(1.666-3.166sec⁻¹)에 대한 영향을 시간의 함수로서 역미셀상에 용해된 단백질 농도를 측정하여 $\ln(1-C_{aq}/C_0)$ 대를 도시한 결과 Figure 2를 잘 만족하였으며, 일정한 교반속도에서

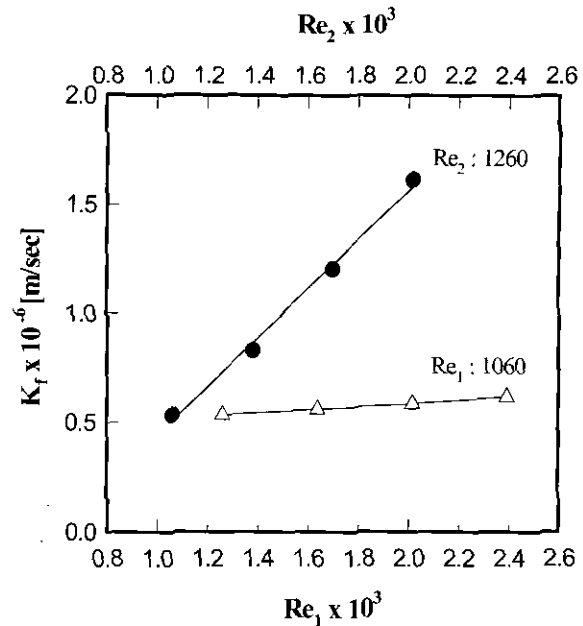


Figure 3. Effect of reynold numbers Re_1 , Re_2 on mass transfer coefficients K_1 (0.2 g/L lysozyme, 20 mM AOT, pH 6.3, 0.1 MKCl.)

이온강도, pH, AOT 농도에 따른 영향 또한 시간의 함수로서 직선의 기울기로부터 실험적 물질전달계수 K_1 을 추산하였다.

교반 속도의 영향

Stirred flat vessel에서 단백질 수용상의 Reynolds number, Re_1 과 역미셀상의 Reynolds number, Re_2 가 물질전달계수, K_1 에 미치는 영향을 고찰하기 위해서 물-단백질-역미셀상에서 일정한 이온강도와 pH, 그리고 AOT농도에서 Re_1 , Re_2 를 변화시킴에 따른 시간의 함수로서 lysozyme의 추출에 대한 K_1 값을 Figure 3에 나타내었다. Figure 3에 나타남과 같이 유기상의 impeller를 일정하게 하였을 때, 즉 $N_2=1.6S^{-1}$ 인 경우 K_1 값이 일정하게 증가하고 있음을 알 수 있으며 또한 K_1 는 Re_1 에만 의존하고, Re_2 는 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. 이것은 기존의 연구(Mayers(8); Komasaawa(9); Asai et al.(10), Imai and Furusaki(11))인 평판 교반조에서의 결과와 대부분 일치함을 나타내었다.

계면활성제의 영향

계면활성제(AOT)농도에 따른 lysozyme의 추출속도는 Figure 4에서의 같이 농도가 증가할수록 단백질 전달속도가 증가하였으며, 80 mM 이상의 농도에서는 감소하는 경향을 보이는데 이것은 AOT 농도 증가로 인한 유기상 내의 역미셀이 거대 고분자 형태를 이루어 역미셀 안으로 단백질 전달이 어렵게 된다는 것을 나타내며, 또한 물질전달계수에 의존적인 AOT 농도는 교반속도와는 무관하다고 가정하였다.

pH와 이온강도의 영향

단백질 추출시 수용상의 pH와 이온강도는 Figure 5와 6처럼 일정한 교반속도에서 전달속도에 강한 영향을 주고 있음을 알 수 있으며, 이들 특성들은 용액 내에서의 물질전달에는 중요한 영향을 주지 않는다고 보고 있다. 따라서 이러한

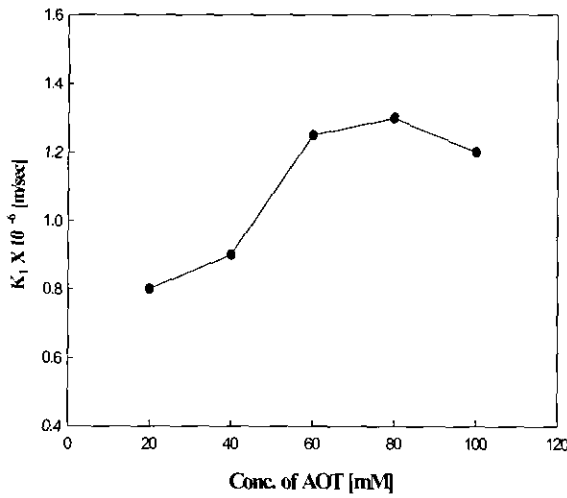


Figure 4. Effect of AOT concentration in the organic phase on mass transfer coefficient K_1 . (0.2 g/L lysozyme, pH 6.3, 0.1 MKCl)

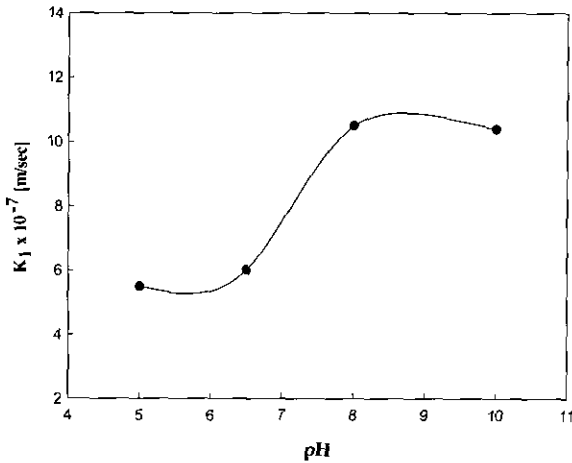


Figure 5. Effect of aqueous pH on mass transfer coefficients K_1 (0.1 MKCl, 20 mM AOT).

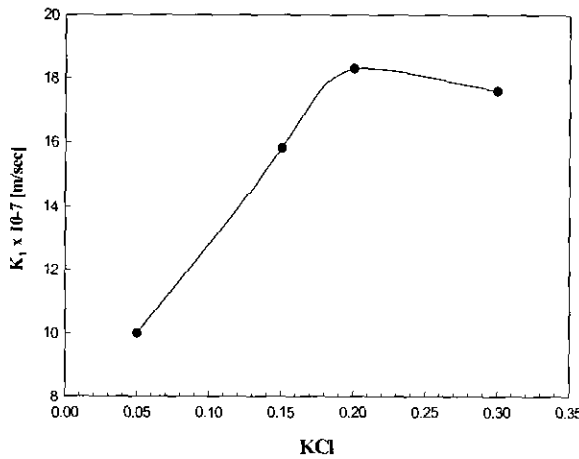


Figure 6. Effect of aqueous KCl on mass transfers K_1 . (0.1 MKCl, 20 mM AOT).

추출속도의 큰 변화는 수용상의 조건에 의해서 강하게 영향을 받는 계면에서의 물질전달 과정임을 보여주고 있다. 즉,

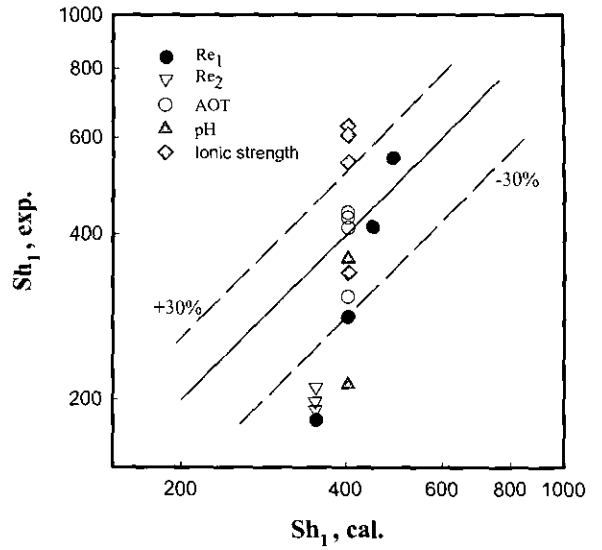


Figure 7. Mass transfer coefficient parity plot.

높은 pH와 이온강도에서는 교반속도(N)에 의존하지 않으며, 이 조건에서 계면에서의 물질전달이 전체 전달속도에 지배적임을 알 수 있다.

Lysozyme의 계면물질전달계수 값이 최저 $K_6 \cdot 10^6$ m/s, 최고 10^7 m/s 정도이므로 이 결과는 Nitsch 와 Plucinski(12)의 수용상의 미립자가 유기상으로 전달될 때의 속도보다 일반적으로 빠른 것으로 나타났으며, Dungan 등(13)에 의해 측정된 결과와 비교하면 조금 느린 것으로 나타났다.

실험 data의 상관관계

액-액 계면에서는 수력학적 조건들이 복잡하고 물질전달에 대한 이론적 해석이 불가능하므로 물질전달계수와 관련된 실험변수들과의 상관관계를 일반적으로 차원해석으로 구하였다.

Figure 7에 나타난 바와 수용상의 Shewood number에 대해 Re_1 만이 독립적으로 작용한다고 가정하며, 밀도 및 점도 그리고 계면장력의 변화가 거의 없기 때문에 물질전달계수를 측정할 수 있는 상관관계식을 다음과 같은 무차원 그룹으로 나타내었다.

$$Sh_1 = \alpha Re_1^\beta Sc_1^\gamma \tag{5}$$

여기서 α, β, γ 은 실험정수이며, 식 (5)의 무차원군들은 다음과 같은 식 (6)으로 나타내었다.

$$\begin{aligned} Sh(\text{Sherwood number}) &= K_1 L / D_p \\ Re(\text{Reynolds number}) &= d^2 N_{1 \rho_1} / \mu_1 \\ Sc(\text{Schmidt number}) &= \nu_1 / D_p \end{aligned} \tag{6}$$

식(5)과 식(6)로부터 다음과 같은 상관관계식을 얻었다.

$$Sh_1 = 0.664 Re_1^{0.5} Sc_1^{0.03} \tag{7}$$

따라서 실험으로부터 얻은 Sh_1 값들과 식 (7)에서 계산된

Sh₁의 값을 Figure 7에 plot한 결과, 일정한 교반속도에서 수용상의 pH 6.0-10, KCl 0.05-1.0 M에서 계산값과 실험값이 거의 일치하였으며, AOT 농도는 본 실험에 사용된 농도범위에서 일치하였다. 그리고 본 연구의 실험장치와 유사한 Dekker(14), Kinugasa 등(15)의 역미셀을 이용한 물질전달속도 연구보고에서도 같은 현상을 보여주었다.

결론

수용상에 존재하는 단백질(lysozyme)을 유기상(isooctane)에 용해된 음이온 계면활성제(AOT)를 이용하여 액-액 접촉 평면 계면을 통한 추출에서 Re₁의 영향이 지배적임을 알 수 있으며, Re₂는 물질전달속도에는 거의 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. pH와 이온강도는 계면에서 전달현상이 다른 변수들보다 많은 영향을 가지며, 이들 전체 변수들을 무차원 그룹으로 하여 식(7)과 같은 관계식을 도출하였으나 실험값과 측정값의 범위가 30% 내에 존재하는 조건들은 제한적임을 나타내었다.

사용기호

aq	aqueous (-)
C	concentration of protein (mol/m ³)
C _{meas.}	measuring of concentration (mol/m ³)
D	diffusion coefficient (m ² /s)
d	impeller diameter (m)
H	distribution coefficient (-)
i	interface (-)
J	molar flux of protein (mol/m ² · s)
K ₁	mass transfer coefficient (m/s)
L	length parameter (m)
N	impeller (rpm)
o	initial (-)
org	organic (-)
po	protein (-)
R	rate of mass transfer (m/s)
Re	Reynolds number, d ₂ N/ν
S	interfacial area (m ²)
Sc	Schmidt number, ν/D
Sh	Sherwood number, K ₁ L/D
t	time (s)
v	aqueous phase volume (m ³)
μ	dynamic viscosity (N · s/m ²)
ρ	density (kg/m ³)
ν	kinematic viscosity (m ² /s)
1	forward extraction (-)
2	back extraction (-)

REFERENCES

- Luisi, P., F. Henninger, M. Joppish, A. Dossean, and G. Casnati (1977), Solubilization and Spectroscopic Properties of α-chymotrypsin in cyclohexane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 1384-1389.
- Luisi, P. L., M. P. Pileni, and B. H. Robinson (1998), Reverse Micelles as Hosts for Protein and Small Molecules, *Biochimica Biophysica Acta*, 947, 209-246.
- Dekker, M., K. Vant' Reit, J. W. A. Baltussen, B. H. Bijsterbosch, R. Hilhorst, and C. Lanne (1987), Reversed Micellar Extraction of Enzymes; Investigations on the Distribution Behaviour and Extraction Efficiency of α-amylase, *Proc. 4rd Eur. cong. Biotechnol.* 2, 507-510.
- Goklen, K. E. and T. A. Hatton (1985), Protein Extraction Using Reverse Micelles, *Biotech. Prog.* 1, 69-74.
- 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.
- Armstrong, D. W. and W. Li (1988), Highly Selective Protein Separation with Reversed Micellar Liquid Membranes, *Anal. Chem.*, 60, 86-88.
- Kuboi, R. Y. Mori, and I. Komazawa (1990), Solubilization and Separation of Powder Protein by Reverse Micelles Extraction. *Kagaku Koagaku Ronbunshu*, 15, 669-673.
- Mayers, G. R. A. (1979), The Correlation of Individual Film Coefficient of Mass Transfer in a stirred Cell. *Chem. Eng. Sci.* 16, 69-75
- Komasawa, I. T. Octaka, and A. Yamada (1980), Diffusional Resistance in Extraction Rate of Copper with Hydroxyoxime Extractant. *J. Chem. Eng. Jpn.* 13, 209-213.
- Asai, S., J. Hatanaka, and Y. Uekawa (1983), Liquid-Liquid Mass Transfer in an Agitated Vessel with a Flat Interface. *J. Chem. Eng. Jpn.* 16, 463-469.
- Imai, M. and S. Furusaki (1987), Extraction Rate of Lanthanum by D2EHPA. *Kagaku Koagaku Ronbunshu*, 13, 355-362.
- Nitsch, W. and P. Plucinski (1989), Two-phase Kinetics of the Solubilization in Reverse Micelles. *Ber. Bunsen. Phys. Chem.* 93, 994-997.
- Dungan, S. R., T. Bausch, T. A. Hatton, P. Plucinski, and W. Nitsch (1991), Interfacial Transport Processes in the Reversed Micellar Extraction of Protein. *J. Colloid and Interface Sci.* 145, 33-50.
- Dekker, M., K. Vant' Reit, 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.
- Kinugasa, T., Tanahashi, and H. Takeuchi (1991), Extraction of Lysozyme Using Reversed Micellar Solution: Distribution Equilibrium and Extraction Rate, *Ind. Eng. Chem. Res.* 30, 2470-2476.