한국생물공학회지 제18권 제3호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 18, No. 3, 202-206(2003)

가압 이산화탄소와 역미셀을 이용한 난백 lysozyme의 추출에 대한 수분함량의 영향

박 선 영 · †전 병 수
부경대학교 식품생명공학부
(접수 : 2003. 5. 13., 게재승인 : 2003. 6. 27.)

The Effect of Water Content on Hen Egg Lysozyme Extraction using Reversed Micelles and Pressurized Carbon Dioxide

Sun-Young Park and Byung-Soo Chun†
Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
(Received : 2003. 5. 13., Accepted : 2003. 6. 27.)

A study of hen egg lysozyme extraction using reversed micelles and pressurized CO_2 phase was conducted. The relationship between the lysozyme extraction and water content (W_0) under the pressurized CO_2 conditions was investigated. The water content of the micellar organic phase was a significant parameter affecting the mass transfer of protein and enzymatic activity in reversed micellar process. It was found that the reversed micelles in the organic phase with pressurized CO_2 were larger than the organic phase without CO_2. Therefore, the extractionrate of lysozyme in the interface of the aqueous phase and the organic phase was increased. W_0 value was increased at the high surfactant concentration and the extraction rate of lysozyme was enhanced.

Key Words : Hen egg lysozyme, reversed micelle, pressurized CO_2, water content (W_0), surfactant

서 론

최근 생물공학의 발전으로 효과적인 단백질의 분리 및 정제 방법이 산업적으로 많이 응용되고 있다. 그 중에서 역미셀을 이용한 단백질의 추출 공정은 이러한 흐름에 맞추어 단백질의 연속적이고 대량적인 생산이 가능하다. 이는 Luisi(1)에 의해 제시되어 연구되고 있는 생화합물의 분리 및 정제의 중요한 방법으로서, 유기용매에서 계면활성제를 이용하여 단백질, 효소, 아미노산 등과 같은 생화학 제품의 변성을 유발하지 않고 추출할 수 있다고 보고하였다.

Kinugasa(2)는 역미셀이 물분자를 둘러싸고 있는 유기용매상의 계면활성제의 집합체라고 표현하였다. 수용 상에 존재하는 물분자는 역미셀 내부에 water pool을 형성하여 역미셀 내부에 포집될 수 있다. 이러한 원리를 이용하여 수용액에 녹아 있는 단백질을 계면활성제가 포함되어 있는 유기용액과 반응시키면 단백질 분자는 물분자들과 함께 역미셀 내부로 포집된다.

기존의 역미셀을 이용한 많은 연구(3-7)에서 역미셀을 형성하기 위하여 계면활성제를 유기용매에 용해시켜 사용하였다. 따라서 역미셀 내부로 포집되는 단백질의 양에 영향을 주는 주요 변수로는 수용액의 pH, 이온강도, 유기용액의 계면활성제의 농도 등이었다. 그러나 본 실험에서는 유기용액에 이산화탄소를 가압하여 용해시킴으로써 추출되는 단백질의 양이 증가되는지 관찰하였고, 이 때 역미셀 내부에 형성되는 water pool의 크기, 즉 수분함량 (W_0)를 측정하였다. 또한 일정한 압력을 가하여 이산화탄소를 유기용액에 용해시킴으로써 역미셀을 이용한 단백질 추출실험에서 사용되는 유기용매의 양을 줄임으로 해서 유기용매의 잔존 가능성을 줄이고자 하였다.

역미셀 내부로 포집되는 단백질의 양은 유기상에 형성되는 역미셀의 크기에 의해 결정된다. 즉 유기상에 형성되는 역미셀의 크기가 클수록, 즉 역미셀 내부에 형성되는 water pool이 클수록 역미셀 내부의 수분함량 (W_0)이 증가하게 되므로 수용액상에 존재하는 단백질의 포집양이 증가하게 된다 (8).

따라서 본 실험에서는, 세균 세포벽의 구성 성분인 다당류

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

의 가수분해를 촉매하는 효소인 lysozyme을 음이온 계면활성제인 AOT를 유기용매인 isooctane에 용해시켜 역미셀 내부로 포집하는 과정에서 일정한 압력의 이산화탄소를 유기용액에 용해시켜 실험을 행하였다. 일정한 압력으로 이산화탄소를 용해시켰을 때, lysozyme이 역미셀 내부로 포집되는 과정에서 lysozyme의 추출양을 측정하고 또한 이때 역미셀 내부의 수분함량 (W_0)이 단백질의 추출양에 어떠한 영향을 주는지 분석하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 재료

음이온 계면활성제인 sodium-di-2-ethyhexyl sulfosuccinate (AOT)는 Aldrich Co. Ltd.로부터 구입하였으며, 유기용매는 분석용 특급시약의 isooctane (2,2,4-trimethylpentane)에 AOT를 용해하여 사용하였다. 단백질 수용액은 3차 증류수에 KCl을 용해하여 이온강도를 조절한 후 lysozyme을 원하는 농도로 용해하여 제조하였으며, 이 수용액의 pH는0.1N HCl, 0.1N NaOH를 직접 첨가하여 조절하였다. 본 연구에서 사용된 효소인 lysozyme (E.C.3.2.1.17 Mucopeptide N-acetylmuramyl hydrolase, MW = 14,300, pI = 11.2)은 Sigma Co., Ltd.에서 구입하였다. 그 외의 모든 시약은 분석용 특급 시약을 사용하였다. 또한 실험에 사용한 이산화탄소는 순도 99%를 사용하였다. 또한 수용액의 lysozyme의 농도는 0.2 g/L로 하여 실험에 사용하였다.

실험방법

본 실험에서는 실험 변수로서 KCl을 이용한 수용액의 이온강도 변화 (0.1 ~ 0.4 M), 수용액의 pH 변화 (pH 3 ~ 12), 유기용액의 AOT의 농도변화 (20 ~ 100 mM), 반응기 내부의 CO_2의 압력변화 (34 ~ 136 bar) 등 5가지의 실험 조건 변화로 lysozyme의 추출양을 관찰하였다.

Fig. 1은 본 실험에서 사용된 장치의 모식도이다. 실험이 진행되는 반응기 내부에 미리 실험 조건에 맞게 조제한 수용액과 유기용액을 2:1 비율로 주입한 다음, 가압하여 CO_2를 유기용액에 용해시키고 실험 조건에 해당하는 온도로 반응기 내부의 온도를 조절하였다. 반응기 내부의 교반기는 수용상과 유기상의 계면이 깨어지지 않는 170 rpm으로 교반하여 실험이 진행되는 10분마다 수용액의 단백질 농도를 측정하여 단백질의 추출양을 측정하였다.

분석

Lysozyme의 농도는 UV spectrophotometer (UVIKON 933, Kontron)를 사용하여 Lowry 법으로 측정하였다. 추출된 단백질 양은 다음과 같이 계산하였다:

$$\text{Transfer rate (\%)} = \frac{C_{org} V_{org}}{C_{aq} V_{aq}} \times 100$$

또한 본 실험에서 역미셀 내부의 수분함량 (W_0)의 값은 Mettler Toledo DL-31 titrator (USA)을 이용한 Karl-Fischer titration에 의하여 측정되었으며, 이 때 사용된 시약은 Hydranal Composite 5와 Hydranal Methanol Dry (Riedel-de-Han, Seelze, Germany)이다.

역미셀 내부의 수분함량 (W_0)은 Göklen (9)에 의해 정의된 식에 의해 계산하였다:

$$Rs = (3Vw / fs)W_0 + 3Vs / fs$$

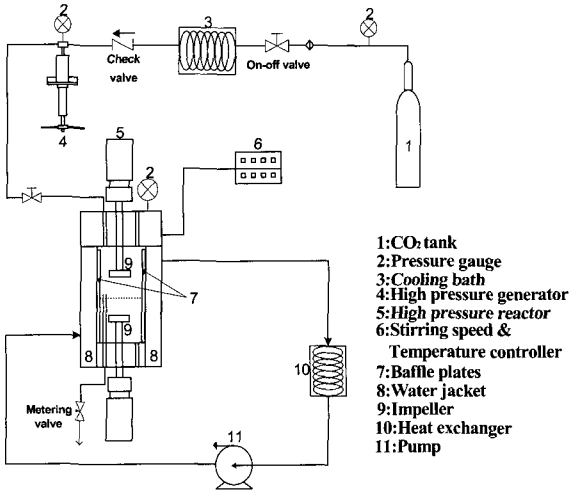

Figure 1. Schematic diagram of reversed micellar process.

결과 및 고찰

수용액의 이온강도와 pH의 영향

Fig. 2와 Fig. 3은 수용액의 이온강도를 변화시켰을 때 수용액에 존재하는 lysozyme이 역미셀 내부로 포집되는 정도와 그 때의 역미셀 내부의 수분함량을 나타낸 것이다. 수용액의 이온강도, 즉 KCl의 농도가 0.1 M 일 때 가장 높은 추출율을 나타냈으며, 이것은 이온강도가 커질수록 유기용액에 존재하는 음이온 계면활성제인 AOT와의 정전기적 상호작용이 증가하면서 더 작은 역미셀을 형성하는 것으로 판단된다. 따라서 Fig. 3에 나타난 바와 같이 이온강도가 증가함에 따라 역미셀 내부의 수분함량이 감소했고, 이것은 이온강도를 증가시켰을 때 역미셀의 크기가 작게 형성된다 할 수 있다.

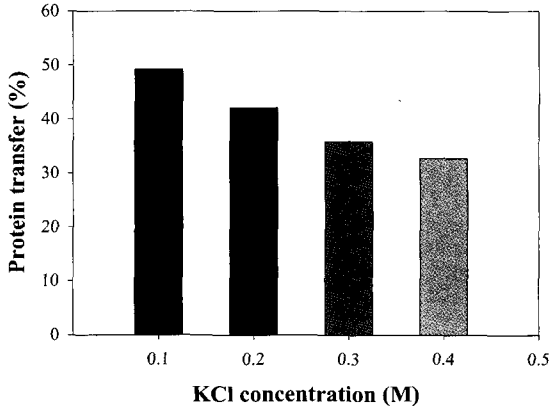

Figure 1. Amount of lysozyme transferred into the organic phase according to ionic strength of aqueous phase (lysozyme concentration 0.2 g/L, pH 7, AOT 20 mM, CO_2 pressure 34 bar, 25℃).

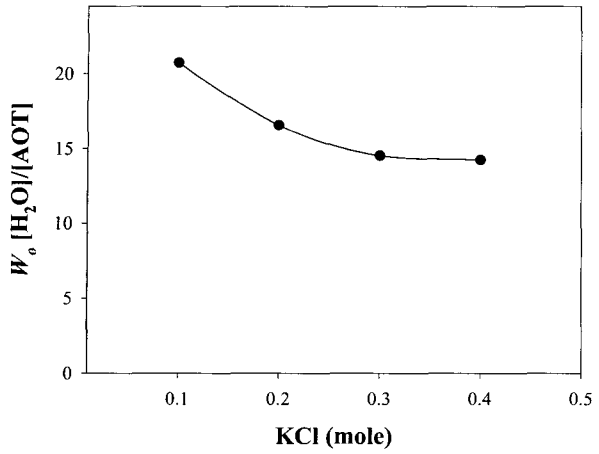

Figure 2. Effect of ionic strength of aqueous phase on *Wo* (lysozyme concentration 0.2 g/L, pH 7, AOT 20 mM, CO_2 pressure 34 bar, 30℃).

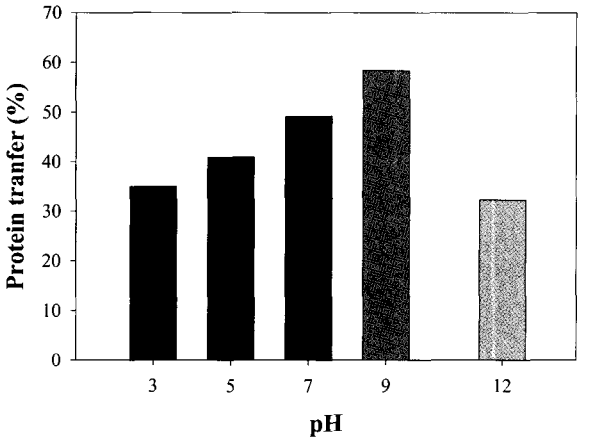

Figure 3. Amount of lysozyme transferred into the organic phase according to pH of aqueous phase (lysozyme concentration 0.2 g/L, KCl 0.1 M, AOT 20 mM, CO_2 pressure 34 bar, 25℃)

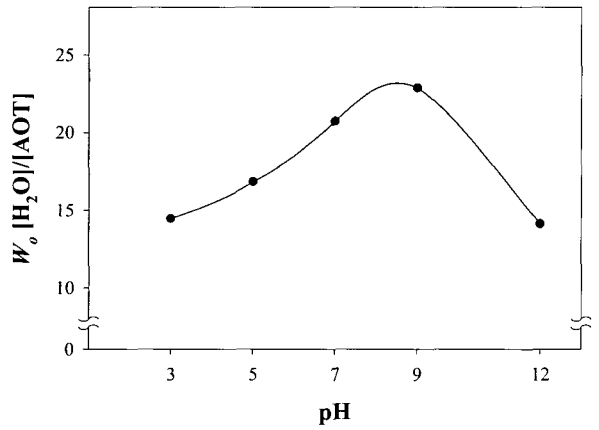

Figure 4. Effect of pH of aqueous phase on *Wo* (lysozyme concentration 0.2 g/L, KCl 0.1 M, AOT 20 mM, CO_2 pressure 34 bar, 30℃).

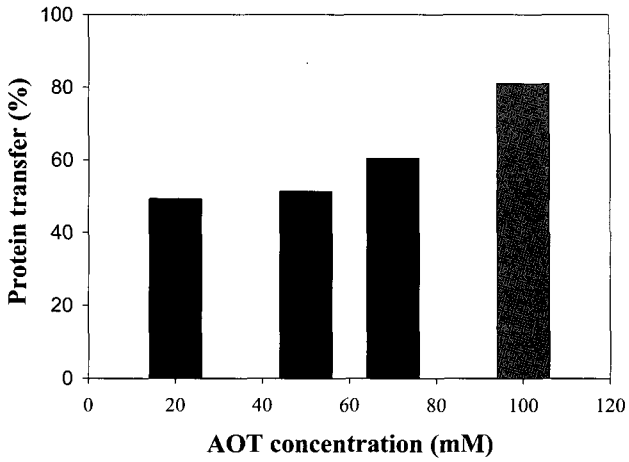

Figure 5. Amount of lysozyme transferred into the organic phase according to anionic surfactant concentration (lysozyme concentration 0.2 g/L, KCl 0.1 M, pH 7, CO_2 pressure 34 bar, 25℃).

또한 수용액의 pH가 lysozyme의 추출율에 미치는 영향을 살펴 보았을 때(Fig. 4), 수용액의 pH가 lysozyme의 등전점 (pI)인 11에 가까워질수록 추출량이 증가하다가, 등전점 이상이 되었을 때 급격이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 단백질이 등전점 이하에서는 양전하를 띄게 되고, 이것은 유기용액의 음이온 계면활성제와 반응하게 되어 역미셀 내부로 단백질의 포집이 이루어지지만, 등전점 이상에서는 같은 음전하를 띄게 되므로 전기적 반발작용에 의해 상대적으로 단백질의 추출율이 낮아지게 된다. 또한 단백질이 가지는 전하 또한 역미셀을 형성하는데 영향을 주게 되어 pH 12 이상에서 역미셀 내부의 수분함량이 다시 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

이러한 결과는 이전의 역미셀을 이용한 단백질 추출 연구(10)에서와 같은 결과를 나타내었으며, 수용액의 이온강도, pH의 영향은 이산화탄소로 가압된 반응기 내부에서도 같은 영향력을 나타내었다.

계면활성제 농도의 영향

유기용액의 계면활성제의 농도를 변화시켰을 때 단백질의 추출율을 관찰하였다(Fig. 6). 계면활성제의 농도가 증가함에 따라 추출되는 단백질의 양도 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 이때 유기상에 형성되는 역미셀 내부의 수분함량도 함께 증가함을 확인할 수 있었다. 그러나 계면활성제의 농도가 100 mM 이상이 되었을 때는 유기상에서 계면활성제간의 엉김 현상으로 인하여 더 이상 계면활성제의 농도 증가는 불가능 하였고, 따라서 본 실험에서 임계미셀농도 (critical micelle concentration; CMC)는 100 mM로 확인되었다.

가압 이산화탄소의 영향

본 실험에서는 기존의 역미셀 실험과 달리 이산화탄소로 가압한 상태에서 실험을 행하였다. 따라서 반응기 내부의 이산화탄소 압력을 달리 하였을 때 lysozyme의 추출율과 이 때의 역미셀 내부의 수분함량을 관찰하였다(Fig. 7 and 8). 반응기 내부의 압력을 증가시켰을 때 102 bar까지는 lysozyme의 추출율이 증가하다가 그 이상에서는 다시 감소하는 현상이 나타났

다. 같은 조건에서 이산화탄소의 압력을 102 bar까지 증가시켰을 때 단백질의 추출율이 증가되었으며 이것은 가압된 이산화탄소로 인하여 수용상과 유기상의 계면장력이 약해진 결과로 판단된다.

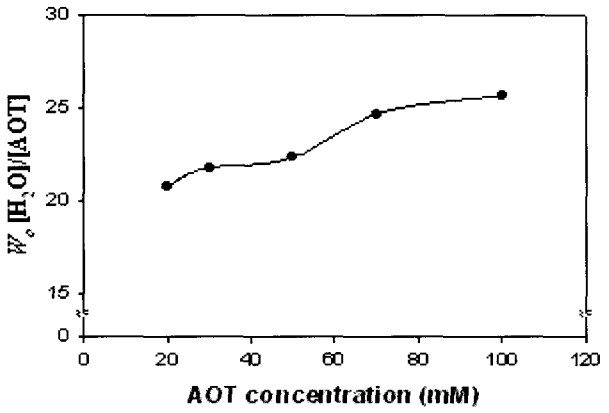

Figure 6. Effect of surfactant concentration on *Wo* (lysozyme concentration 0.2 g/L, KCl 0.1 M, pH 7, CO_2 pressure 34 bar, 25℃).

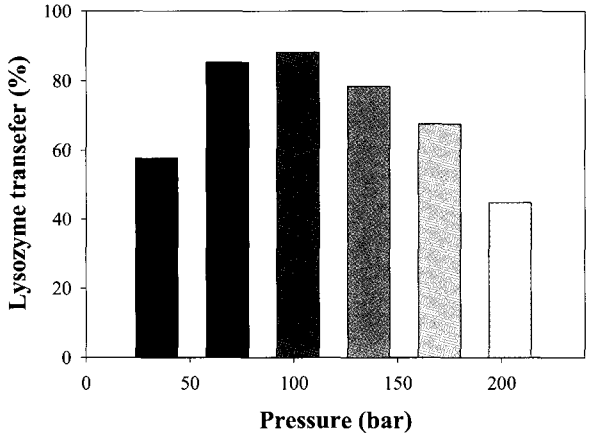

Figure 7. Amount of lysozyme transferred into the organic phase according to CO_2 pressure (lysozyme concentration 0.2 g/L, KCl 0.1 M, pH 7, AOT 20 mM, 30℃).

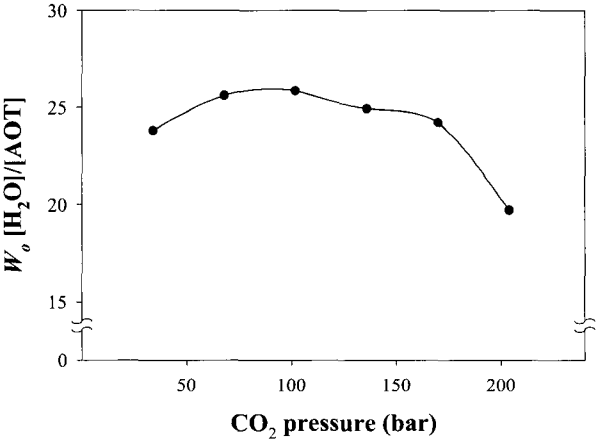

Figure 8. Effect of pressurized CO_2 on *Wo* (lysozyme concentration 0.2 g/L, KCl 0.1 M, pH 7, AOT 20 mM, 30℃).

수분함량의 변화

Fig. 9는 역미셀 실험에서 이산화탄소로 가압했을 때와 가압하지 않았을 때의 역미셀 내부의 수분함량을 비교하여 나타내었다. 같은 조건에서 반응기 내부에 34 bar의 이산화탄소를 가압하였을 때 역미셀 내부의 수분함량이 두 배 정도 증가함을 확인할 수 있었다.

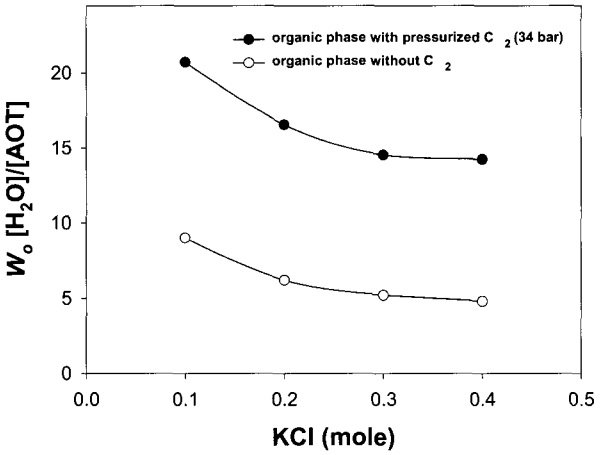

Figure 9. Comparison of *Wo* value in the organic phase with and without pressurized CO_2 (lysozyme concentration 0.2 g/L, KCl 0.1 M, pH 7, AOT 20 mM, CO_2 pressure 34 bar, 25℃).

요 약

역미셀과 가압이산화탄소를 이용한 난백 lysozyme의 추출 실험에서 일정한 압력의 이산화탄소를 유기용액에 가하였을 때 lysozyme의 추출율과 그 때 형성되는 역미셀의 크기, 즉 역미셀 내부의 수분함량 (W_0)를 알아보았다.

이산화탄소로 가압된 상태에서도 수용액에서 유기용액으로의 lysozyme의 추출 경향은 실험조건인 수용액의 이온강도, pH, 유기용액의 계면활성제의 농도를 달리 하였을 때 기존의 다른 연구와 유사한 경향을 나타내었으며, 이산화탄소의 압력을 102 bar 까지 증가시켰을 때 가장 높은 추출율을 나타내었다. 또한 이때 역미셀 내부의 수분함량 (*W0*)을 측정한 결과, lysozyme의 추출율과 역미셀 내부의 수분함량은 비례함을 확인할 수 있었다.

감 사

이 논문은 2002년도 부경대학교 연구년 교수지원 및 BB21 Project 연구비 지원에 의해서 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Luisi, P. L. and B. E. Straub (1984), Reverse micelles: Biological and technological relevance of amphiphilic structures in apolar media, Plenum Press, New York.
2. Kinugasa, T., K. Watanabe, and H. Takeuchi (1992), Activity and conformation of lysozyme in reversed micellar extraction. *Ind. Eng. Chem. Res.* **31**, 1827-1829.
3. Lye, G. J., J. A. Asenjo, and D. L. Pyle (1994), Protein extraction using

reverse micelles: kinetics of protein partitioning. *Chem. Eng. Sci.* **49**, 3195-3204.

4. Kazuhisa, O., Y. Nishii, S. Nii, T. Kinugasa, and K. Takahashi (2001), Interfacial properties between aqueous and organic phases in AOT reversed micellar system for lysozyme extraction. *J. Chem. Eng. Jpn.* **34**, 501-505.
5. Haifei, Z., J. Lu, and B. Han (2001), Precipitation of lysozyme solubilized in reverse micelles by dissolved CO_2. *J. Supercritical Fluid* **20**, 65-71.
6. Chou, S. H. and B. H. Chiang (1998), Reversed micellar extraction of hen egg lysozyme. *J. Food Sci.* **63**, 399-402.
7. Douglas, G. H (1996), Mechanism of protein extraction from the solid state by water-in-oil microemulsions. *Biotech. Bioeng.* **53**, 583-593.
8. Pileni, M. P., T. Zemb, and C. Petit (1985), Solubilization by reverse micelles: solute localization and structure perturbation, *Chem. Phys. Lett.* **118**, 414-420.
9. Gōklen, K. E. and T. A. Hatton (1987), Liquid-liquid extraction of low molecular proteins by selective solubilixation in reversed micelles, *Sep. Sci. Technol.* **22**, 831-841.
10. Pires, M. J., M. R. Aires-Barros, and J. M. S. Cabral (1996), Liquid-liquid extraction of proteins with reversed micelles, *Biotechnol. Prog.* **12**, 290-301.