역미셀과 가압 이산화탄소를 이용한 lysozyme의 물질전달

박선영, 전병수
부경대학교 식품공학과

Mass Transfer of Hen Egg Lysozyme into Reversed Micelles Using Dissolved CO_2

Sun-Young Park, Byung-Soo Chun
Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyng National University

서론

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 (1984) 등에 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 (1992) 등은 역미셀이 물분자를 둘러싸고 있는 유기용매상의 계면활성제의 집합체라고 표현하였다. 수용상에 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.

역미셀을 이용한 단백질 추출 원리를 산업적으로 이용하기 위해서는 물질전달의 특징과 물질전달 속도에 관한 연구가 필요하다. 따라서 이전의 여러 연구에서 이러한 물질전달의 특징과 속도가 규명되어 있으나, 일반적인 상온 · 상압 하에서는 물질전달 속도가 아주 낮은 값을 가진다. 또한 유기용매를 사용함으로 해서 반응 후의 유기용매의 잔존 가능성이 우려되므로 이러한 단점을 보완하기 위해, 사용되는 유기용매의 양을 줄이는 대신 일정한 압력을 가해 액상의 CO_2를 유기상에 용해시키는 방법을 적용시켰다.

본 실험에서는, 세균 세포벽의 구성 성분인 다당류의 가수분해를 촉매하는 효소인 lysozyme을 음이온 계면활성제인 AOT를 유기용매인 isooctane에 용해시켜 역미셀 내부로 포집하는 과정에서 일정한 압력의 CO_2를 유기용액에 용해시켜 실험을 행하였다. 일정한 압력으로 CO_2를 용해시켰을 때, lysozyme이 역미셀 내부로 포집되는 과정에서 물질전달 특징의 알아내고, 이 때의 물질전달 속도를 측정하여 이전의 다른 연구와 비교 · 분석하고자 한다.

이론

Lysozyme의 물질전달 과정에 있어서, 물질전달 속도는 일반적으로 3가지 저항에 의해서 결정된다. 즉 수용상에 존재하는 단백질 분자는 벌크상으로부터 계면으로 확산되고, 계면에서 단백질은 계면활성제의 음이온들과 결합하여 역미셀이 형성되어 그 내부로 물분자와 함께 포집되고, 이것은 다시 벌크 유기상으로 확산되는 과정으로 이루어진다. 물

질전달 과정에 있어서 전달되는 물질의 계면농도가 평형하다고 가정하면 물질전달 속도는 수용상과 유기상의 계면 중 어느 한쪽의 계면에서 일어나는 확산과정에 의해서 결정된다.

수용상에서 일어나는 물질전달 메커니즘을 다음과 같이 표현 할 수 있다.

$$R = ka(C_{aq}-C_{aq,i}) \quad (1)$$

여기서 k 는 단백질이 역미셀 내부로 포집될 때의 물질전달 계수를 나타내며, a 는 계면의 면적, C_{aq} 는 수용상의 단백질의 농도를 나타낸다.

$$C_{org,i} = HC_{aq,i} \quad (2)$$

$$J = R/a = (V/a)(-dC_{aq}/dt) = k\{C_{aq}-(1/H)C_{org,i}\} \quad (3)$$

H는 분배계수로서, $H = C_{iorg}/C_{iaq}$이며 lysozyme이 역미셀 내부로 포집될 때 계면에서의 용질의 농도는 매우 작으므로 따라서 C_{iorg}/H 항은 무시되고 식(3)의 두 항은 변수 분리하여 적분한 다음 일반해를 구하면 식(4)로 된다.

$$\ln(1-C_{org}/C_0) = -(a/v)kt \quad (4)$$

여기서 C_0는 수용액상에 존재하는 단백질의 초기농도를 나타내며, v는 수용액상의 부피를 나타낸다. 따라서 시간에 따른 단백질의 추출된 양을 도시하여 기울기와 추출 접촉계면 면적 및 수용액의 부피로부터 물질전달계수 k값을 실험으로부터 구할 수 있다.

실험

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 pH는 0.1N 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.

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), 그리고 반응기 내부의 온도 변화(25 ~ 35℃) 등 5가지의 실험 조건 변화로 lysozyme의 물질전달 특성을 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 물질전달 속도를 측정하였다. Lysozyme의 농도는 UV spectrophotometer (KONTRON, UVIKON 933)를 사용하여 Lowry 법으로 측정하였다.

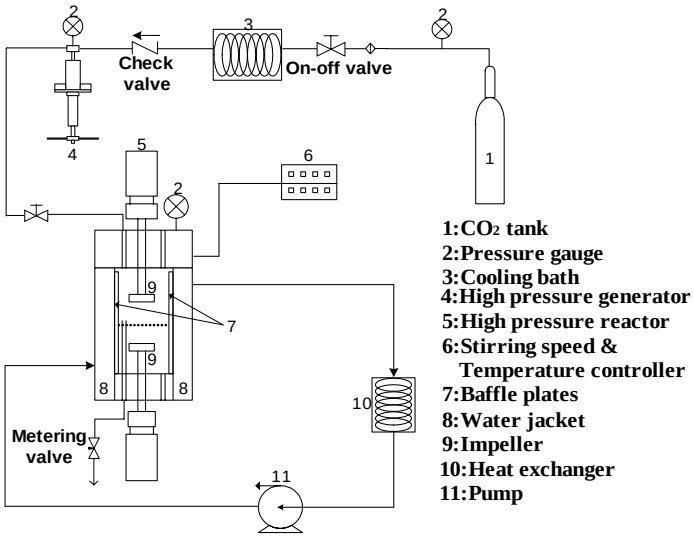

Fig. 1. Schematic diagram of high pressure reversed micellar system.

결과 및 토론

각각의 실험 조건에 따른 실험 결과를 Figs. 2 ~ 4에 나타내었다. 유기용액상에 CO_2를 용해시켜 lysozyme이 역미셀 내부로 포집되는 특징을 관찰하였을 때, 이전의 연구 결과와 비교하여 특이한 점은 그림에 나타난 바와 같이 반응 초기에 lysozyme의 급속한 물질 전달이 일어나고, 반응 30 ~ 40분 이후에는 아주 적은 양의 lysozyme이 유기상으로 전달되는 것이 관찰되었다. Fig. 2에서는 수용액의 이온강도를 결정하는 KCl 농도의 영향을 나타낸 것으로, CO_2를 용해시키지 않았을 때와 마찬가지로 0.1 M KCl 농도에서 가장 lysozyme의 물질전달이 잘 일어나는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 3에서는 수용액의 pH 변화에 따른 lysozyme의 물질전달을 나타낸 그림이다. 수용액의 pH가 Lysozyme의 등전점 이하인 pH 9까지는 점점 증가하고 있으나 pH 12에서는 다시 현저하게 감소하는 현상을 볼 수 있는데

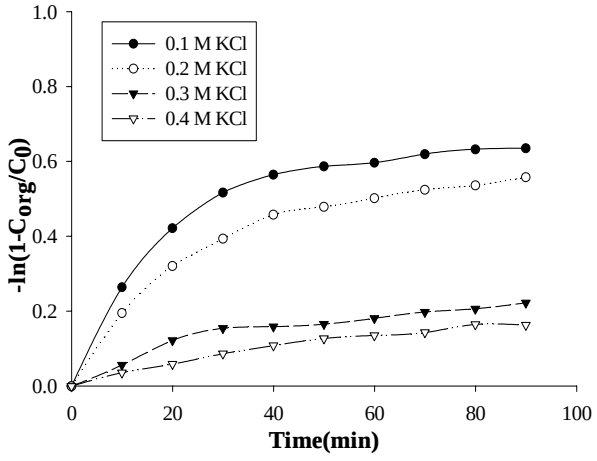

Fig. 2. The effect of ion strength on mass transfer rate of lysozyme into reversed micelles with 50:50 volume ratio of organic phase (pH 7, AOT 20 mM, pressure 34 bar, temperature 25℃).

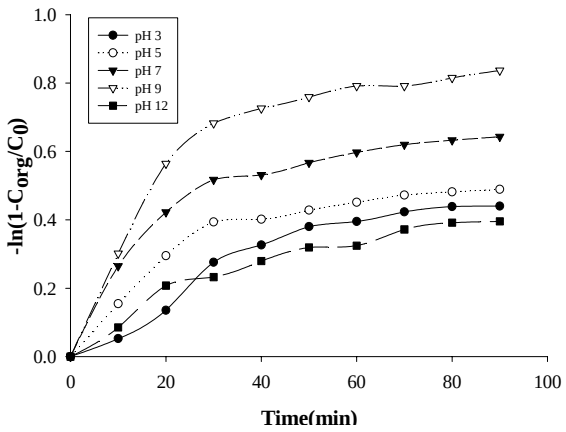

Fig. 3. The effect of pH on mass transfer rate of lysozyme into reversed micelles with 50:50 volume ratio of organic phase (KCl 0.1 M, AOT 20 mM, pressure 34 bar, temperature 25℃).

이것은 수용액의 pH가 lysozyme의 등전점 이상이 되면 lysozyme은 양전하를 띄게 되고 따라서 역미셀을 형성하는 계면활성제인 AOT와의 반발작용으로 lysozyme의 역미셀 내부로의 전이가 일어나지 못하게 되어 이러한 결과가 나타난 것으로 설명할 수 있다.

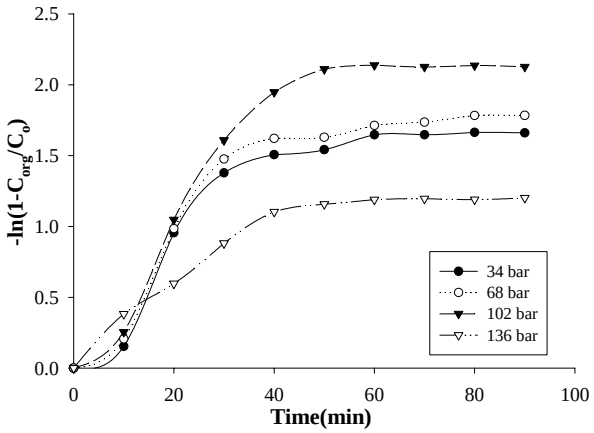

Fig. 4. The effect of CO_2 pressure on mass transfer rate of lysozyme into reversed micelles with 50:50 volume ratio of organic phase (KCl 0.1 M, AOT 20 mM, pH 7, temperature 25℃).

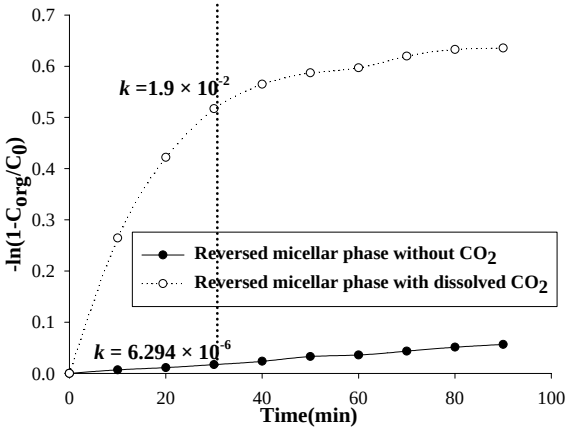

Fig. 5. Comparison between the dissolved CO_2 (34bar) reversed micellar phase and the conventional reversed micellar phase (0.2 g/L of lysozyme, 0.1 M KCl, pH 7, 20 mM AOT, 25℃).

Fig. 4는 CO_2를 용해시키는 압력의 변화에 따른 lysozyme의 물질전달을 나타내었다. 압력이 102 bar일 때까지는 lysozyme의 물질전달율이 증가하다가 136 bar 이상에서는 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 결과적으로 Fig. 5에 나타난 바와 같이 역미셀을 이용하여 lysozyme을 추출하는 데 있어서, 유기용액에 일정한 압력을 가하여 CO_2를 용해시켰을 때와 CO_2 없이 이전의 일반적인 역미셀 실험을 비교한 결과, 계면에서의 물질전달 계수인 k값은 CO_2를 용해시켰을 때 훨씬 더 큰 값을 얻을 수 있었다. 이것은 CO_2를 유기용액에 용해시켜 역미셀 실험을 행하였을 때, 용해된 CO_2로 인하여 수용액과 유기용액 사이의 계면장력이 약해지고, 따라서 계면에서의 lysozyme의 물질전달이 보다 쉽게 이루어지기 때문인 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Yasuhiro, N., Takumi, K., Susumu, N. and Katsuroku, T.: *J. Membr. Sci.*, 195, 11(2002).

2. Nishiki, T., Sato, I., Muto, A. and Kataka, T.: *Biochem. Eng. J.*, 1, 91(1998).

3. Nishii, Y., Nii, S., Takahashi, K. and Takeuchi, H.: *J. Chem. Eng. Jpn.*, 32, 211(1999).

4. Chun, B.S., Kim, S.K. and Wilkinson G.T.: *ISEC'99*(1999).

5. Lye, G.Y., Asenjo, J.A. and Pyle, D.L.: *AIChE J.*, 42, 713(1996).

6. Dekker, M., Van't Riet, K., Bijsterbosch, B.H., Fijneman, P. and Hilhorst, R.: *Chem. Eng. Sci.* 45, 2949(1990).

7. Dungan, S.R., Bausch, T., Hatton, T.A., Plucinski, P. and Nitsch, W.: *J. Colloid Interf. Sci.* 145, 33(1991).

8. Luisi, P.L. and Straub, B.E. : Plenum Press, New York (1984).

9. Kinugasa, T., Watanabe, K. and Takeuchi, H.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 31, 1827(1992).