Reversed Micelles를 이용한 단백질 추출 : 속도론적 고찰

문창섭, 이민회, 노경호, 정성택
인하대학교, 화학공학과

Protein Extraction Using Reversed Micelles : Kinetic Study

Chang Sup Mun, Min Hoe Yi, Kyung Ho Row, Sung Taik Chung
Dept. of Chem. Eng., Inha University

서론

Reversed micelles를 이용한 단백질 추출법은 생물학적 활성을 유지시키면서 빠른 시간내에 선택적인 추출을 해낼 수 있는 장점을 가지고 있다. 따라서 지난 10여년동안 여러 단백질의 추출에 대해 주요 변수로서 pH, 이온 세기가 미치는 영향에 대한 많은 연구가 진행 되었다.[1,2,3] 하지만 실제 down stream process로 scale-up하기 위해, 단백질이 aqueous phase와 reversed micellar phase 사이에 분배되는 현상을 속도론적으로 검토한 연구는 아직까지 부족한 실정이다.

현재까지 알려진 속도론적인 연구로는 stirred diffusion cell에서 aqueous phase와 reversed micellar phase를 섞지않고 계면을 일정하게 유지시키면서 α-chymotrypsin이 계면을 통과할 때의 물질전달 계수를 측정하거나, lysozyme과 ribonuclease에 대해 aqueous phase와 reversed micellar phase 사이의 2개의 피막으로 이루어진 계면을 통과한다는 이중피막론(two-film theory)을 적용하여 combined mass transfer coefficient (K_LA)를 측정한 것이있다.[4,5]

본 연구는 음이온성 계면활성제인 AOT (Sodium di(2-ethyl-hexyl) sulfo-succinate)와 isooctane으로 이루어진 reversed micellar phase를 이용하여 단백질 분해 효소인 α-chymotrypsin을 추출하고, 이중피막론을 이용하여 combined mass transfer coefficient (K_LA)를 측정하는 속도론적 고찰에 관한 것으로 aqueous phase 중의 α-chymotrypsin이 선택적으로 reversed micellar phase로 이동하는 forward transfer와 이동한 reversed micelles 속의 α-chymotrypsin이 다시 aqueous phase로 이동하는 backward transfer에 대하여 aqueous phase의 pH와 이온 세기에 따른 combined mass transfer coefficient (K_LA)와 분배계수 값의 변화를 관찰하였다. 이러한 결과로 부터 α-chymotrypsin을 reversed micelles을 이용하여 추출하는 공정에 있어서 빠른 시간안에 효과적으로 분리해낼 수 있는 pH와 이온세기의 조건을 제시하고 이중피막론을 이용하여 본 system에서의 물질 전달 계수를 예측할 수 있음을 보이고자 한다.

이론

Two film model & combined mass transfer coefficient

α-chymotrypsin이 일정부피 V_1인 phase 1로부터 일정부피 V_2인 phase 2로 이동할 때, 시간 t에서의 각각의 농도를 $C_1(t)$, $C_2(t)$라 하고, 각상의 부피 변화를 무시하면, 물질 수지식은 다음과 같다.

$$V_1C_1(0) = V_1C_1(t) + V_2C_2(t) \quad \text{at } t=0 \qquad C_1(t) = C_1(0) \qquad (1)$$
$$C_2(t) = 0$$

두 상이 평형에 다다르면 $C_1^* = mC_2^*$ 라 할 수 있다. 여기서 m은 평형 분배계수라하고 C_1^* , C_2^*는 평형 농도라 한다. t=∞일 때 평형 상태라면 평형 분배계수는 다음과 같다.

$$m = \frac{C_1(\infty)}{C_2(\infty)} \qquad (2)$$

Two film model을 가정한다면 mass transfer rate, j_L는 다음과 같다.

$$j_L = K_L A [C_1(t) - C_1^*] \qquad (3)$$

K_L 은 overall mass transfer coefficient 이고 A는 두 상간의 접촉 면적이다. 그리고 $C_1^* = m C_2(t)$과 물질 수지식을 식(3)에 대입하여 $C_2(t)$를 소거한 후 $C_1(0)$에서 $C_1(t)$ 까지 적분하면 다음과 같이된다.

$$\frac{C_1(t)}{C_1(0)} - \beta = (1-\beta)\exp[-(\alpha t)] \qquad (4)$$

여기서

$$\alpha = \frac{K_L A}{V_1}(1+mV_r) \quad (5), \quad \beta = \frac{mV_r}{(1+mV_r)} \quad (6), \quad V_r = \frac{V_1}{V_2} \quad (7)$$

식 (4)-(7)은 두 상사이에서의 α-chymotrypsin의 이동을 나타낸다. 식 (5)를 다시 표현하면,

$$\ln[\frac{C_1(t) - \beta C_1(0)}{(1-\beta) C_1(0)}] = -\alpha t \qquad (8)$$

식 (8)의 좌변과 우변의 시간 t에 대해서 plot하면 그 기울기 -α값을 구할 수 있다. 따라서 식 (5)-(8)과 실험에 의해 얻은 농도 data로 부터 반복 계산을 통해 α값이 최대오차 10% 범위 내에서 가능한 모든 data에 맞을 때까지 반복계산을 하여 α값을 구하고, 식 (5)로부터 $K_L A$ 값을 구할 수 있다.

실험

본 실험에 사용된 단백질인 α-chymotrypsin (from bovine pancreas)과 음이온성 계면활성제인 AOT(Sodium di(2-ethylhexyl)sulfosuccinate)는 Sigma에서 구입하였고, reversed micellar phase를 이루는 spectrophotometric grade의 isooctane (2,2,4-trimethylpentane)은 Aldrich에서 구입한 시약을 사용하였다.

Aqueous phase 제조에 사용된 물은 실험실에서 제조한 deionized water를 사용하였다. 그 외에 사용된 다른 시약들은 모두 analytical grade이다.

모든 단백질의 transfer 실험은 50ml 용량의 마개가 있는 삼각 플라스크와 water jacket을 이용하여 24℃에서 진행하였다.

Forward transfer의 경우 reversed micellar phase는 50mM AOT/isooctane이고, aqueous phase는 20mM acetate pH5, pH6 buffer와 0.2M NaCl, 그리고 1mg/ml α-chymotrypsin으로 이루어져있다. 이 두 상을 각각 15ml씩 제조하여 삼각 플라스크에서 400rpm으로 magnetic stirring에 의해 두 상을 접촉시키면서 정해진 시간 간격에 따라 1ml씩 채취한 후, 약 5000rpm에서 90초간 원심 분리하였다. 원심분리된 각 상의 단백질의 농도는 282nm에서 UV-Vis spectrophotometer(Varian, Palo Alto, USA)를 이용하여 측정하였다. 이때 α-chymotrypsin의 extinction coefficient는 50,000$M^{-1}cm^{-1}$를 사용하였다.

Backward transfer는 forward transfer후에 2시간 정도 상압에서 상분리를 일으킨 후, 단백질이 이동한 reversed micellar phase 12ml을 채취한다. 다시 단백질이 이동할 aqueous phase는 20mM phosphate pH7.5, pH8.5, pH10.5, pH11.5, pH13 용액과 1M KCl로 이루어진 용액 12ml을 제조한다. 이 두 상을 약 700rpm에서 30분간 교반하면서 같은 방법으로 1ml씩 채취한 시료를 상분리를 일으킨 후, 두 상의 농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Forward transfer의 경우 0.2M NaCl의 일정 농도하에서 acetate buffer의 pH 변화에 따른 aqueous phase에서의 α-chymotrypsin의 농도 변화로서 이중피막론을 이용하여 계산한 결과와 실험치가 일치하고 있음을 Fig. 1.에 나타내었다. Aqueous phase의 pH가 5에서 부터 점점 증가하여 α-chymotrypsin의 pI값인 8.1에 가까워 짐에 따라서 α-chymotrypsin 표면의 전하 밀도가 낮아지기 때문에 reversed micelles과의 정전기적 인력이 약해지게 된다. 따라서 pH가 높아질수록 α-chymotrypsin이 이중피막으로 이루어진 계면을 통과하여 reversed micellar phase로 이동되는 속도가 작아지게되고 reversed micellar phase와 평형을 이루는 aqueous phase에서의 α-chymotrypsin의 평형농도는 점점 증가하게 된다. Forword transfer시의 분배계수(m)을 C_{aq}/C_{rm}이라하면 pH가 증가할수록 분배계수는 커지고, K_LA 값도 감소함을 Fig. 2.에 나타내었다. 이중피막론으로부터 계산한 α-chymotrypsin의 combined mass transfer coefficient, K_LA는 $1.33\times10^{-7}\sim2.09\times10^{-7}(m^3s^{-1})$정도로 D.L.Pyle등[5]이 lysozyme에 대하여 같은 방법으로 계산한 결과와 비교해 볼 때, 비슷한 크기를 가짐을 알 수 있었다.

Backward transfer의 pH에 따른 영향은 forward transfer를 0.2M NaCl, pH6 acetate buffer조건에서 일으킨 후, 다시 α-chymotrypsin이 이동할 aqueous phase의 pH를 7.5에서 10.5까지 변화 시킴에 따라 이동되는 α-chymotrypsin의 양은 거의 같았고, 이동된 단백질의 양도 초기의 16.3%정도 밖에 되지 않았다. K_LA값 또한 $0.11\times10^{-7}\sim0.12\times10^{-7}(m^3s^{-1})$정도로 forward transfer 조건에 비해 매우 느렸다.

Fig. 3.은 backward transfer 실험시 새로운 aqueous phase에서의 조건을 pH 7.5, 1M KCl로 고정시키고 forward transfer시의 pH 조건 변화에 따른 backward transfer시의 α-chymotrypsin의 농도 변화로서 초기의 pH 조건이 큰 영향을 미침을 나타내고, 이중피막론을 이용하여 계산한 결과와 실험치가 일치하고 나타낸다. 또한, 최종적으로 추출되는 α-chymotrypsin의 양은 pH5와 6인 경우 각각 초기의 61.25%와 12.78%로 pH가 5인 경우 최종 추출 효율이 더욱 큰 것으로 나타났다. 그 이유는 backward transfer 과정에서 pH 5인 경우가 더욱 pH 차이가 크기 때문인 것으로 생각된다.

Fig. 4.는 backward transfer시의 forward pH 조건이 5인 경우에 K_LA값은 $0.49\times10^{-7}m^3s^{-1}$이고, pH가 6인 경우는 K_LA값이 $0.12\times10^{-7}m^3s^{-1}$로 추출 속도가 감소함을 나타내고, 또한 Forward transfer의 추출속도에 비해 backward transfer의 경우가 대략 10배 정도 느림을 알 수 있다. 또한 초기 pH가 높아짐에 따라 backward transfer의 분배계수 $m(=C_{rm}/C_{aq})$이 증가함을 나타낸다.

참고 문헌

1. Rahaman, R. S., chee, J. Y., Cabral, M. S., and Hatton, T. A., *Biotech. Prog.*, **4**, 4, 218 (1988)
2. Wolbert, R. B. G., Dekker, M., Van't Riet, K., and Bijsterbosch, B. H., *Eur. J. Biochem.*, **184**, 627 (1989)
3. Maecozzi, G., Correa, N., Luisi, P. L., and Caselli, M., *Biotechnol. Bioengng.*, **38**, 1239 (1991)
4. Dungan, S. R., Bausch, T., Hatton, T. A., Plucinski, P., and Nitsch, W., *J. Colloid Interface Sci.*, **145**, 33 (1991)
5. Lye, G. J., Asenjo, J. A., and Pyle, D. L., *chem. Eng. Sci.*, **49**, 3195 (1994)

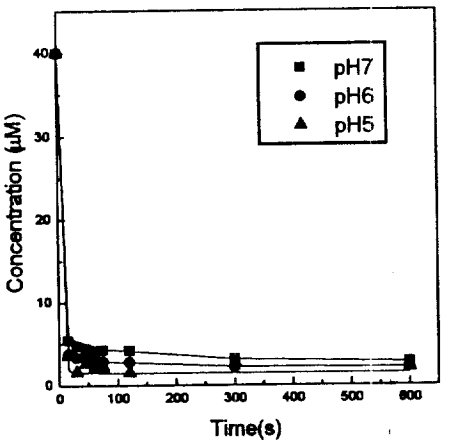

Fig. 1. Forward transfer of α-chymotrypsin. Effect of pH on protein extraction from the aqueous phase. (—) Calculated from the model.
Forward conditions : 0.2M NaCl, 50mM AOT/isooctane, 400rpm, 24℃.

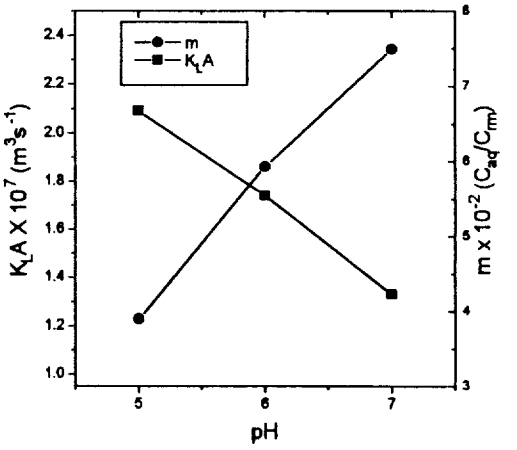

Fig. 2. Effect of pH on the equilibrium partition coefficients and combined mass transfer coefficients for forward transfer of α -chymotrypsin.

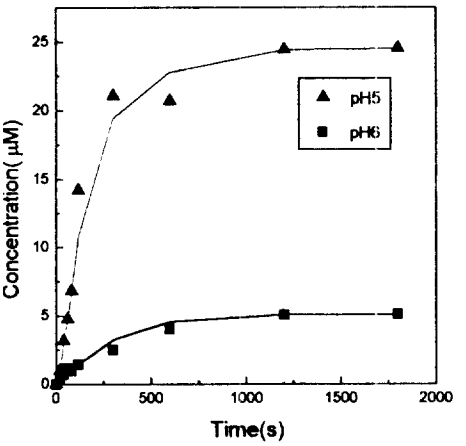

Fig. 3. Backward transfer of α-chymotrypsin. Effect of forward pH condition on protein extraction from the reversed micellar phase. (—) Calculated from the model.
Backward conditions : 1M KCl, pH7.5 phosphate buffer, 700rpm, 24℃.

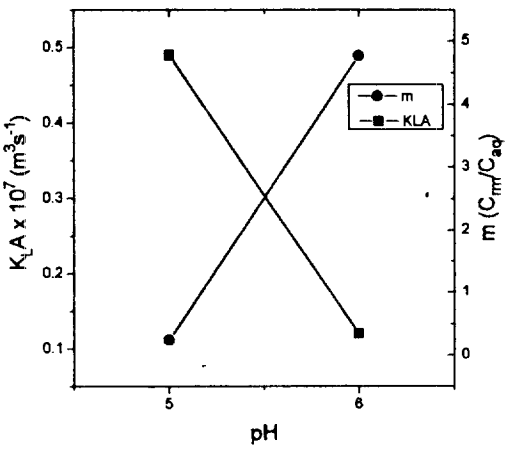

Fig. 4. Effect of pH on the equilibrium partition coefficients and combined mass transfer coefficients for backward transfer of α-chymotrypsin.