

역미셀을 이용한 단백질의 역추출에 미치는 보조계면활성제의 영향

김봉규, 최진성*, 이성식
 동아대학교 화학공학과, 한국해양연구원*

**Effect of Co-Surfactant Addition on Back-extraction of Proteins
 Using Reverse Micelle Systems**

Bong-Kyu Kim, Jin-Sung Choi*, Sung-Sik Lee
 Dept. of Chem. Eng., Dong-A Univ., 840 Hadan-dong, Pusan
 Kordi. South Sea Institute*

1. 서 론

역미셀에 의한 단백질의 분리는 일반적으로 수상의 pH, 이온 강도 그리고 염의 종류 등과 유기상의 계면활성제의 종류와 농도, 보조 계면활성제의 유무, 용매의 종류 등에 영향을 받는다. 이들 다양한 인자들 중에서, pH와 이온 강도는 역미셀 추출 공정에 있어서 지배적인 인자이다. 이들 파라미터 외에도 단백질과 미셀간의 정전기적, 소수적 그리고 구조적 상호작용 등이 역추출율에 영향을 미친다. 이들 중에서 특히, 정전기적 상호작용은 정추출 과정에서 주된 추진력으로 받아들여지고 있다. 그러나 정추출 보다는 역추출 공정이 상대적으로 어렵다. 그 원인으로서는 단백질 또는 효소가 AOT-역미셀과의 불특정 상호작용으로 인해 비가역적으로 변성하거나 활성을 잃기 때문이다. 그리고 이러한 불특정 상호작용에 의한 효소의 변성 및 단백질의 구조 변화가 역미셀 추출 공정에서 역추출율과 역추출 속도를 현저히 감소시킨다. 그러므로 역미셀을 이용한 단백질의 고순도 분리시, 앞에서 열거한 역추출 공정의 문제점들 중에서 역추출율과 활성 수율에 결정적인 영향을 미치는 미셀-단백질 및 미셀-미셀간 상호작용의 감소를 위한 많은 연구가 필요하다. Dungan 등은 미셀-미셀간 상호작용에 의한 미셀 클러스터(micellar cluster) 형성이 역추출율 감소의 중요한 인자임을 밝혔다. Yamada 등은 미셀-단백질, 미셀-미셀간 상호작용의 제어를 위하여 합성 비이온성 계면활성제(예, Triton, Tween) 또는 생체 계면활성제인 lecithin을 첨가한 혼합 역미셀이 효소와 단백질의 높은 안정성과 선택적인 추출을 나타냄을 발표하였다. 즉 역미셀을 이용한 단백질의 역추출 공정시 역미셀 계면의 특성을 개량하기 위해 간단한 보조 계면활성제(cosurfactant)를 이용한다면 목적 단백질이 고순도, 고활성을 유지할 뿐만 아니라, 선택적인 대량 생산이 가능함을 알 수 있다.

본 연구에서는 AOT-역미셀계를 이용한 단백질 역추출시 문제점 중의 하나인 미셀-미셀간 상호작용의 제어를 위한 보조 계면활성제의 첨가가 단백질의 역추출 거동과 활성 수율에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

2. 실험

2.1 시 료

Waco Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)로부터 95%의 AOT(sodium di[2-ethylhexyl] sulfosuccinate)를 구입하여 정제 없이 그대로 사용하였다. Bovine carbonic anhydrase (CAB (MW=30kDa, pI=5.9)와 보조계면활성제인 PNE(Polyoxyethylene Nonylphenyl Ether)과 Span류는 Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, WI, USA)로부터 구입하였

다. AOT와 PNE의 구조는 각각 Fig.1과 같다. PNE의 C_{EO} [mol]수는 $(CH_2CH_2O)_n$ 의 n수와 일치하고, 각각 3mol, 5mol, 10mol, 20mol을 각각 사용하였다.

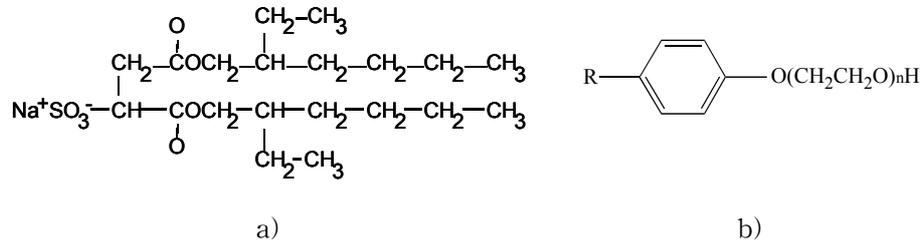


Fig. 1. The structure of a)AOT and b)PNE

2.2 CAB의 역추출

단백질은 주입법으로 AOT/isooctane 용액에 가용화 하였다. 100 μ M의 단백질을 포함하고 있는 완충용액을 함수율 20으로 일정하게 하여 AOT/isooctane 용액에 주입한 다음, 투명한 용액이 될 때까지 강하게 교반한다. 단백질이 가용화 되어 있는 역미셀 용액과 0.1M의 염을 포함하고 있는 완충용액을 추출 평형에 도달하는 4시간까지 접촉시켜 역미셀로부터 단백질을 역추출 시킨다. AOT- 보조계면활성제 혼합 역미셀계에 대해서도 같은 방법으로 실험하였다. 단백질의 농도는 280nm에서 분광법 (UV-1600A, Shimadzu)으로 분석한다.

2.3 역미셀에서의 CAB의 활성 변화의 측정 (수정보완)

CAB의 활성은 반응기질인 p-NPA를 이용하여 에스테르의 가수분해로 결정하였다. CAB를 함유한 샘플을 5mM EDTA와 1mM p-NPA를 함유한 50mM의 Tris/HCL 완충용액 1mL에 가한 후, 강하게 교반하면서 분광광도계로 348nm에서 시간변화에 따른 흡광도의 변화를 측정하여 가수분해 반응의 초기속도를 구하여 이로부터 CAB의 활성을 결정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 CAB의 역추출

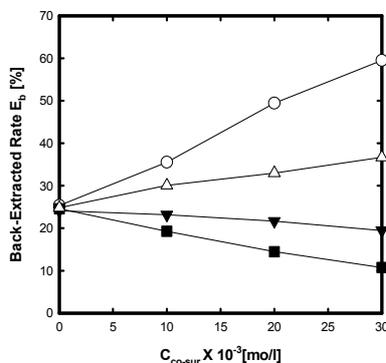


Fig. 1. Effect of PNE and Span85 concentration on the back-extraction behaviors of CAB.

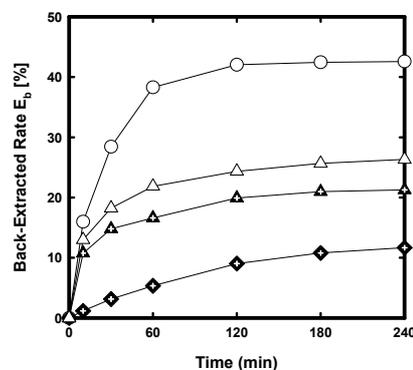


Fig. 2. Time course of the back-extraction fraction of CAB.

Fig 1은 위에서부터 Span85, PNE 3, 5, 10mol의 농도에 따른 역추출율을 나타내고 있으며 Fig 2는 Span85, PNE 3mol, AOT 단독, PNE 10mol의 시간별 역추출율의 변화를 나타내고 있다. 염을 함유하지 않은 수상 (pH_{inj} 8)에 녹인 CAB를 유기상에 가용화 한 후, KCl의 농도가 0.1M인 새로운 수상 (pH_{aq} 8.2)과 접촉시켜 역추출 실험을 하였다. Fig.1은 CAB의 역추출율 변화에 미치는 보조계면활성제의 첨가 효과를 나타내고 있다. Fig.1에서 알 수 있듯이 CAB의 역추출율은 역미셀계에 첨가된 보조 계면활성제의 종류와 농도에 따라 다양한 역추출 거동을 나타내고 있다. Span 85 또는 EOmol수 3mol의 PNE를 첨가하였을 때에는 첨가하는 보조계면 활성제의 농도가 증가할수록 단백질의 역추출율이 증가하였다. 그러나 PNE의 EOmol수가 3.0mol 이상인 경우는 첨가농도가 증가할수록 단백질의 역추출율이 오히려 감소하고 있음을 알 수 있다. Fig.2는 AOT 역추출계를 이용한 단백질 CAB의 역추출 속도 실험 결과이다. Span85 또는 EOmol수 3mol의 PNE가 소량 첨가되었을 때가 CAB의 역추출 속도가 증가함을 알 수 있다.

3.2. 역미셀계의 퍼콜레이션에 미치는 보조계면활성제의 첨가 영향

Figure 3은 AOT 역미셀에 가용화된 수상의 부피분율 Ψ_{aq} 에 대한 전기 전도도 (k)의 변화를 나타낸 것이다. 퍼콜레이션 시발점에 해당하는 부피 분율 Ψ_p 가 첨가된 보조계면활성제의 종류와 농도에 따라 크게 달라짐을 알 수 있다. C_{EO} [mol]수가 3인 PNE를 첨가하였을 때는 퍼콜레이션 시발점 (Ψ_i)이 증가 한 반면, C_{EO} [mol]수가 5 이상일 때는 감소하였다. 이 결과는 C_{EO} [mol]수가 3일때는 역미셀계에 첨가한 PNE의 농도가 증가 할 수록 미셀간의 인력적인 상호작용이 감소함을 의미하고, C_{EO} [mol]수가 5이상 일때는 증가함을 의미한다.

Ψ_i 와 Ψ_p 의 차이 $\Delta\Psi_i$ 는 퍼콜레이션 프로세스에 대한 PNE의 농도 효과를 나타내고 있다. 여기에서 Ψ_i 와 Ψ_p 는 PNE를 첨가 또는 첨가하지 않았을 때 각각의 퍼콜레이션 시발점이다. 상대적인 퍼콜레이션 시발점과 첨가된 PNE의 농도와의 상관 관계를 Figure 4와 같이 PNE 농도에 대해 $\Delta\Psi_i$ 를 플롯팅함으로써 나타내었다. $\Delta\Psi_i$ 와 각 PNE 농도 사이에는 선형적인 상관관계가 있었다.

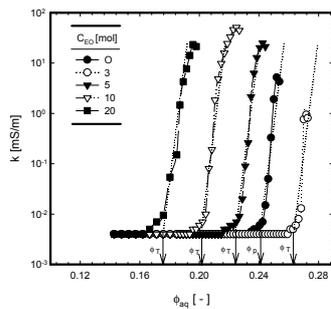


Fig. 3. Effect of PNE addition on the percolation processes of RVMS

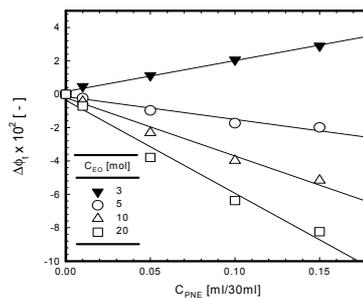


Fig. 4. Analysis of PNE affecting percolation process of RVMS.

여기에서의 기울기를 β_1 로 정의하면, β_1 는 미셀간의 인력적인 상호작용에 대한 각 PNE의 첨가 효과를 나타내게 된다. 플러스 값의 β_1 는 역미셀계에의 PNE의 첨가에 따른 역미셀계의 안정화 또는 미셀-미셀간 상호작용의 감소를 의미한다. 그림을 통해, 실험에 사용된 PNE의 첨가가 역미셀계의 안정화에 주로 감소 효과를 주게 됨을 알 수 있다.

4. 결 론

역미셀을 이용한 단백질 역추출시 문제점 중의 하나인 미셀-미셀간 상호작용의 제어를 위해, 보조 계면활성제의 첨가가 CAB의 역추출 거동에 미치는 영향에 대하여 검토하였다. CAB의 역추출율은 첨가한 계면활성제의 종류와 농도에 크게 영향을 받았다. 비이온 계면활성제를 보조계면활성제로 사용한 이번 연구에서 Span 85 또는 3.0mol의 PNE의 첨가시 첨가 보조계면활성제의 농도가 증가하면 역추출율과 역추출 속도가 증가하였다. 반면, 3.0mol 이상 농도의 PNE를 첨가하면 계면활성제의 농도가 증가할수록 역추출율 및 속도가 오히려 감소하였다.

5. 참고문헌

- 1) Dungan, S. R.; Bausch, T.; Hatton, T. A.; Plucinski, P.; Nitsch, W. *J. Colloid Interface Sci.* 145, 33, (1991)
- 2) Dekker, M.; Vant Riet, K.; Bijsterbosch, B. H.; Wolbert, R. B. G.; Hilhorst, R. *Chem. Eng. Sci.* 45, 2949 (1990)
- 3) Yamada, Y.; Kasai, K.; Kuboi, R.; Komasaawa, I., *Kagaku kogaku Ronbunshu*, 20, 54 (1994a)
- 4) Yamada, Y.; Kuboi, R.; Komasaawa, I., *Solv. Extr. Res. Dev. Japan*, 1, 167 (1994b)
- 5) Hong, D. -P., R. Kuboi and I. Komasaawa, *Korean J. Chem. Eng.*, 14(5), 334-340 (1997)
- 6) Hong, D. -P. and Kuboi, R., *Biochem. Eng. J.* 4, 23-29 (1999)