

전도도와 점도 측정을 이용한 역미셀의 특성 연구

노선균, 강춘형*
 전남대학교 공과대학 화학공학부
 (chkang@chonnam.ac.kr*)

The Study for Property of Reverse Micelles Using Measurement of Conductivity and Viscosity

Seon-Gyun Rho , Choon-Hyoung Kang*
 Department of Chemical Engineering, Chonnam National University
 (chkang@chonnam.ac.kr*)

서론

생물학적 물질들은 일상생활에서 널리 이용되는 물질들로서 일반적으로 혼합물로 존재하게 된다. 특정 성분의 물질이 혼합물 형태로 존재할 때보다는 단일 성분으로 존재할 때 매우 큰 경제성을 갖게 되므로 혼합물을 분리 정제하는 과정이 필요하며 높은 순도와 수율 그리고 대량적이고 경제적인 방법으로 분리하는 기술개발이 요구된다. 이런 이유로 높은 순도와 수율, 그리고 대량생산이 가능하고, 다단계 역류조작이 가능하다는 장점을 가진 액-액 추출 공정이 제안되었으나 추출된 생물학적물질들에 대한 용매의 용해도 용량과 낮은 선택도의 한계를 보였으며 추출된 물질들의 변성과 활성에 대한 문제가 제기되었다. 이런 단점을 피하기 위하여 유기용매에 계면활성제를 첨가하여 역미셀을 이용한 추출 공정이 고안되었다. 이 추출공정은 단백질이나 생물학적 물질들의 활성을 유지시키면서 빠른 시간 내에 많은 양의 생물학적 물질, 특히 단백질을 추출할 수 있다는 장점을 가지고 있기 때문에 많은 연구가 진행되고 있다[1].

특히 BSA의 경우에는 그 구조가 나선형이고 분자량 또한 크기 때문에 기존의 액-액 추출 방법을 이용하여서는 유기상으로 가용화 시키기가 어렵다. 이는 분자량이 큰 경우에 단백질의 크기가 water pool의 크기보다 더 크게 존재할 수도 있기 때문이다. 한편 주입법을 이용하여 친수성이면서 크기가 큰 단백질인 BSA를 유기상에 주입하면 쉽게 역미셀 속으로 가용화되면서 역미셀 속에서 활성을 유지하게 된다. 따라서 액-액 추출 방법으로 유기상으로 가용화되기 어려운 단백질에 대한 연구에서는 유기상에 직접 단백질을 주입하는 방법을 쓴다. 역미셀을 이용하여 수용액상에 녹아 있는 단백질을 유기상으로 가용화시킬 때 영향을 미치는 인자들은 수용액상의 pH, 염의 종류와 그 농도, 계면활성제의 농도 등이 가장 크게 영향을 미친다고 알려졌다.

역미셀을 이용하여 단백질을 분리할 때 유기상의 역미셀들은 단백질과 소량의 물을 포함하고 있다. Zampielli 등은 실온에서 여러 $W_0(=[H_2O]/[AOT])$ 값에 대하여 비교적 작은 단백질이 포함된 역미셀들의 구조적인 매개변수들을 결정하였다. 역미셀들을 이용한 단백질의 액-액 추출에 대한 연구가 광범위하게 진행되어 왔으나, 추출공정에 미치는 모든 변수들의 영향들을 정확하게 파악하기는 매우 어려운 일이다. 더구나 상대적으로 분자량이 큰 단량체나 소중합체 단백질들의 액-액 추출에 미치는 변수들의 영향은 더욱 복잡한 형태로 나타난다. 또한 이런 단백질들은 구조적 상호작용에 의해 배제되기 쉬울 뿐 아니라 시스템에서

변성되기가 쉽다. 특히 혈청 알부민으로 수술 후 외상치료에 널리 쓰이는 단백질인 BSA의 경우에는 기존의 액-액 추출 방법을 이용하여 BSA를 유기상으로 가용화시키는 것이 어렵다. 이는 분자량이 큰 경우 단백질 크기가 water pool의 크기보다 더 크게 존재할 수도 있기 때문이다. 이런 이유로 역미셀을 이용한 BSA의 추출에 대한 연구는 광범위하게 진행되지 못하였을 뿐만 아니라 정확한 추출기구 또한 아직까지 잘 알려져 있지 않는 실정이다. 한편, 주입방법을 이용하여 친수성이면서 크기가 큰 단백질인 BSA를 유기상에 주입하면 쉽게 역미셀 속으로 가용화되며 역미셀속에서 활성과 본래 구조를 유지하게 된다. 따라서 상이동 방법에 의하여 유기상으로 가용화하기 어려운 단백질의 역추출공정에 대한 연구에서는 유기상에 직접 단백질을 주입함으로써 가용화공정을 대신하여 수행하는 것이 일반적이다. 실제로 가용화가 어려운 BSA에 대한 대부분의 연구에서는 일반적으로 유기상에 직접 단백질을 가용화시키는 방법인 주입방법을 사용하고 있다.

이처럼 단백질 추출에서 결정적인 인자인 역미셀의 특성을 정확히 파악하는 것은 매우 중요한 일이다. 본 연구에서는 역미셀의 특성을 파악하기 위하여 전도도와 점도를 측정하여 계면활성제의 농도에 따른 특성과 단백질농도에 따른 특성 등을 파악하였다.

실험

본 실험에 사용된 수용성 단백질은 BSA(Bovine serum albumin, A-7906)이며 Sigma사로부터 구입하였다. BSA의 분자량은 65,000이다. 역미셀을 형성하는 양 친매성 분자는 음이온 계면활성제인 Sodium di(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT)는 Sigma사로부터 구입하였으며 유기 용매인 isooctane (99.0%이상)은 YAKURI사로부터 구입하였다. 위의 시약들은 특급시약이며 더 이상의 정제과정 없이 사용하였다. 점도측정에 사용된 점도계는 ostwald viscometer를 사용하였으며 전도도 측정에 사용된 전도도계는 Denver Instrument사의 model 30이 사용되었다.

유기상은 isooctane에 계면활성제인 AOT를 용해시켜 제조하였다. AOT는 양친매성 물질이므로 유기용매에 잘 녹는다. 유기상의 제조에 사용될 수 있는 유기 용매는 물에 대한 용해도가 작아야 되며, 형성된 역미셀이 안정적으로 분산될 수 있어야 한다. 널리 사용되는 유기용매로는 isooctane외에도 octane, n-heptane, kerosene, cyclohexane, chloroform, silicone oil 등이 있으며 본 연구에서는 가장 보편적인 isooctane을 사용하여 AOT를 용해시켰다. 점도 측정은 21°C로 일정하게 유지된 항온조에서 AOT/isooctane 용액에 수분을 0.25ml~4ml까지 첨가하면서 각각의 점도를 측정하였다.

전도도 측정은 유기상에 소량의 물을 마이크로 피펫으로 첨가하여 교반기를 이용하여 700 rpm으로 약 1시간동안 교반시킨 후 전도도를 측정하였다. AOT 농도에 따른 전도도 측정 실험은 AOT-isooctane 용액에 단백질이 없는 증류수를 첨가하여 전도도를 측정한다. 제조된 유기상 시료 10ml를 반응조에 넣고 증류수를 0.1ml씩 첨가하여 교반시킨 후 전도도를 측정하였다. AOT농도를 150mM, 200mM을 각각 제조한 다음 위 과정을 반복하여 물수에 따른 전도도의 변화를 측정하였다.

BSA 농도 변화에 따른 전도도 측정실험은 제조한 유기상 시료에 제조한 BSA 수용액 (0.5, 1, 2 mg/ml)을 0.1ml씩 첨가하여 교반시킨 후 전도도를 측정하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 AOT 역미셀의 크기를 측정하기 위하여 ostwald viscometer를 이용하여 점도를 측정하였다. 그리고 isooctane의 절대점도 상대점도를 이용하여 AOT/isooctane + water의 점도를 측정하고 계면활성제가 함유하고 있는 물의 양을 이용하여 역미셀의 크

기를 비교하는 실험을 하였다.

그림 1은 AOT-*isooctane* 용액 100mM, 150mM, 200mM에 증류수를 첨가하며 전도도를 측정된 결과이다. AOT의 농도가 높을수록 기울기가 크게 증가하는 점이 늦게 나타났음을 알 수 있었다. 이는 순수한 물을 첨가 시에 AOT계의 물농도가 높을수록 더 많은 용매를 첨가해도 안정하다는 것을 의미한다. 이는 일정량 이하의 물은 유기상에서 역미셀 형성이 안정적으로 이루어짐을 알 수 있다. 또한 유기상의 역미셀이 허용할 수 있는 능력으로 간주 할 수 있다. 그리고 유기상의 AOT 농도가 증가하면 안정적인 역미셀 형성의 능력도 증가함을 알 수 있다. 그림 2는 물에 수용성 단백질인 BSA를 첨가하여 역미셀의 전도도를 측정 하였다. 그림 1과 비교하면 단백질이 첨가된 수용액에서 기울기가 크게 증가하는 점이 빨리 나타났음을 알 수 있었다. 즉, 단백질이 첨가되지 않는 순수한 물로 형성된 역미셀의 경우가 더 많은 용량을 추출 할 수 있음을 알 수 있다. 이는 BSA 같은 단백질의 경우 그 크기와 무게로 인하여 더 적은 부피만을 허용함을 알 수 있다. 그러나 유기상에 계면 활성제의 농도를 증가 시키므로 인해 이런 단점을 피할 수 있음을 알 수 있다. 그림 3과 4는 일정 AOT 농도 조건하에서 단백질 농도를 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml로 변화시켜 전도도를 측정된 결과이다. 단백질 농도가 높을수록 기울기가 크게 증가하는 점이 늦게 나타났음을 알 수 있었다. 이는 수용액상의 단백질의 순전하가 양이온을 띄어 계면활성제 머리부분의 음이온과 인력이 작용함으로 인하여 단백질의 농도가 높을수록 인력이 커져 더 많은 용질을 첨가해도 안정한 역미셀을 형성 할 수 있음을 보여준다. 그림 5는 일정 AOT 농도에서 W_0 값이 증가함에 따른 유기상의 점도를 측정된 결과이다. W_0 값이 증가함에 따라 점도도 증가함을 알 수 있다. 또한 유기상의 AOT 농도가 증가함에 따라 같은 W_0 값에서 점도는 증가함을 알 수 있었다. 이는 유기상에 계면활성제의 농도가 증가함으로 인해 역미셀이 더 안정적으로 존재함을 의미하는 것이다. 그림 6은 아래 점도 관계식을 이용하여 역미셀의 크기를 추산한 그림이다.

$$\eta_{sp} = (\eta - \eta_0)/\eta_0 = 2.5\phi + 14.1\phi^2 \quad (1)$$

$$\phi = (N_A V_{rm} C_s)/n_{ag} \quad (2)$$

$$d_{wp} = [(6V_w C_w n_{ag})/(\pi C_s)]^{1/3} \quad (3)$$

여기서 η 는 AOT/*isooctane*의 점도이고 η_0 은 *isooctane*의 점도이다. 또 V_{rm} 은 역미셀의 부피를 말하며 d_{wp} 는 역미셀의 water pool size를 나타낸다. W_0 값이 증가함에 따라 역미셀의 크기는 증가함을 알 수 있다. 그러나 계면활성제의 농도가 증가 할지라도 일정한 W_0 값에서는 거의 같은 크기의 역미셀을 형성함을 알 수 있었다.

결론

본 실험에서는 전도도와 점도를 이용하여 AOT 역미셀의 특성을 연구하였다. 또한 측정된 점도를 사용하여 역미셀의 크기를 추산하였다.

1. AOT계의 물농도가 높을수록 더 많은 용매를 첨가해도 역미셀은 안정하다는 것을 알 수 있었다.
2. 유기상에 첨가한 수용액의 단백질 농도가 높을수록 더 많은 용량을 첨가해도 안정한 역미셀을 형성 할 수 있음을 알 수 있었다.
3. W_0 값이 증가할수록 역미셀의 크기가 동일한 폭으로 증가함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. A. S. Schmidt, B. A. Andrews and J. A. Asenjo, "Correlations for the partition behavior of proteins in aqueous two phase system: Effect of overall protein concentration", *Biotechnology and Bioengineering*, 50,617-626(1996).

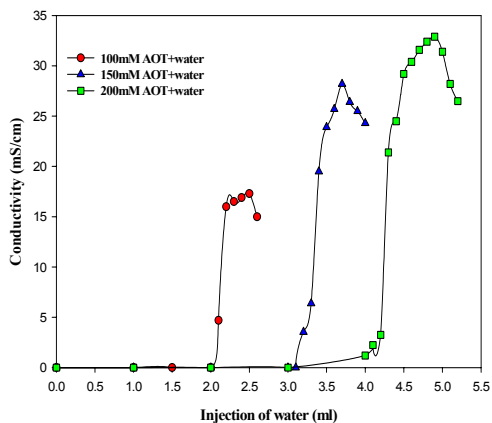


Figure 1. Measurement of Conductivity at AOT+water reverse micelles system.

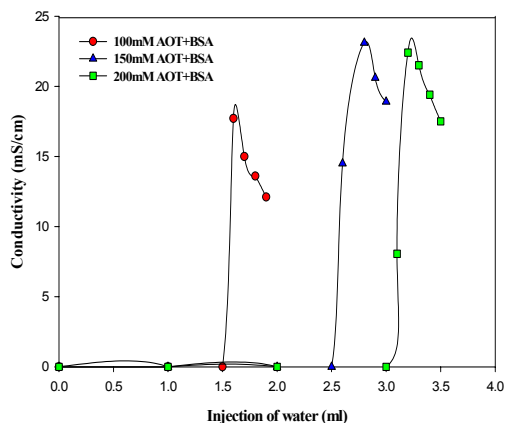


Figure 2. Measurement of Conductivity at AOT+BSA reverse micelles system.

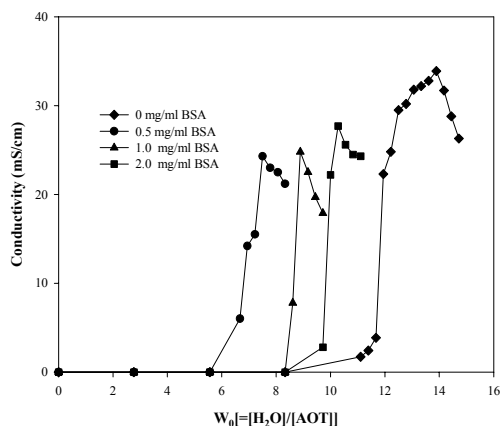


Figure 3. Measurement of Conductivity at 100mM AOT+BSA reverse micelles system.

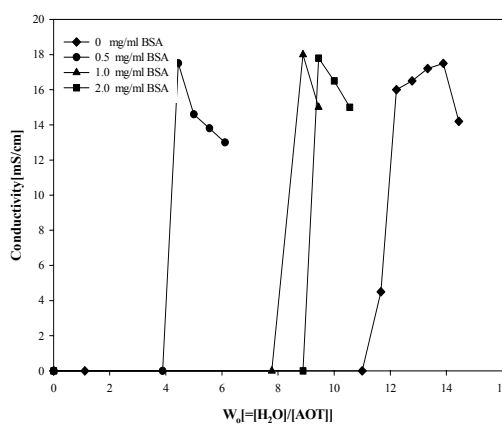


Figure 4. Measurement of Conductivity at 200mM AOT+BSA reverse micelles system.

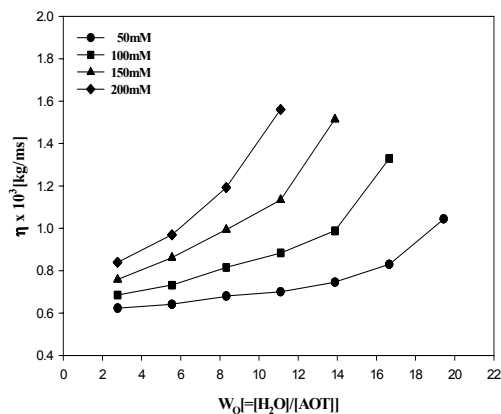


Figure 5. Viscosity of reverse micellar phase at total AOT concentration.

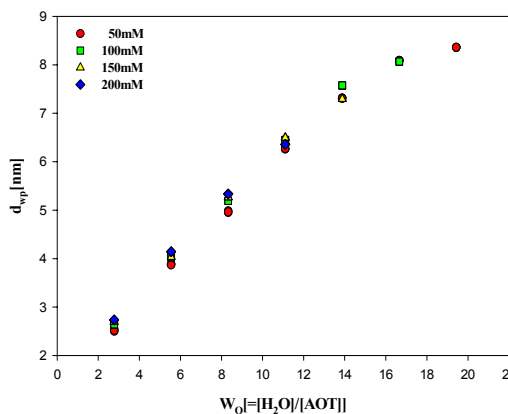


Figure 6. water pool size of AOT reverse micellar.