

AOT-Isooctane 역마이셀계를 이용한 단백질 분리에 관한 연구

노영태·김영숙·조형용·변유량
연세대학교 식품공학과

A Study on Protein Separation with AOT-Isooctane Reverse Micellar System

Young-Tae Rho, Young-Sug Kim, Hyung-Yong Cho, and Yu-Ryang Pyun
Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul

Abstract

For the selective separation of proteins, the solubilization and desolubilization of proteins in sodium-di-2-ethylhexyl sulfosuccinate (AOT)-isooctane reverse micellar system were investigated. Protein solubilization increased with increasing the concentration of AOT to 200 mM and then decreased above that concentration. Protein was solubilized into reverse micelles in the pH range below the isoelectric point of each protein, pH 4-10 for lysozyme and pH 5-6 for trypsin and α -chymotrypsin. Lysozyme, trypsin and α -chymotrypsin were efficiently extracted in the presence of KCl and NaCl while larger molecular weight proteins such as pepsin and BSA had high solubilization with CaCl_2 . At higher ionic strength, all proteins exhibited much less tendency to solubilize and the increase of ionic strength resulted in the decrease of micelle size. Lysozyme was successfully back transferred at pH 12.2 and 1.0M KCl; trypsin at pH 12.6 and 0.5M KCl; and α -chymotrypsin at pH 6.7 and 0.5M KCl. In a test group of separation experiments, complete separation of lysozyme from BSA could be obtained.

Key words: reverse micelle, protein separation

서 론

역마이셀(reverse micelle)은 비극성 용매내에서 계면활성제의 소수성 부분이 외부로 향하고 친수성 부분이 내부로 향하도록 배열되어 안정화된 nanometer-scale의 수용성 입자로, 아미노산이나 단백질, 핵산과 같은 친수성 물질을 함유한 수용액과 역마이셀을 함유한 비극성 용매를 혼합하여 주면 친수성 물질들은 역마이셀의 수용액 입자 내부로 쉽게 solubilization 되면서 변성이 일어나지 않은 상태로 존재한다.

역마이셀에 대해서는 역마이셀내에 존재하는 물의 구조 및 성질⁽¹⁻³⁾, 계면활성제의 구조, 역마이셀의 크기 등을 중심으로 한 역마이셀의 구조, 역마이셀과 역마이셀 사이에서의 물질전달^(4,5), 그리고 α -chymotrypsin, phospholipase A₂, lysozyme, ribonuclease 등을 이용한 역마이셀 내에서의 효소반응⁽⁶⁻⁹⁾에 관하여 많은 연구가 이루어졌다. 역마이셀 내에서의 효소반응은

steroid와 같은 소수성 물질의 bioconversion⁽¹⁰⁾과 아미노산으로부터 펩타이드 형성⁽¹¹⁾에 활용될 수 있으며 최근에는 역마이셀을 이용한 drug encapsulation⁽¹²⁾과 단백질 분리⁽¹³⁻¹⁵⁾의 가능성도 보고되고 있다. 특히, 역마이셀을 이용한 단백질 분리계는 일반화학 공업에서 사용하고 있는 액-액 추출계와 유사하므로 일반 추출 용매 대신 역마이셀 용액을 사용함으로써 발효 배양액으로부터 원하는 단백질의 연속적이면서 대규모의 분리가 가능하며, 기존의 column chromatography나 침전법과 같은 소규모의 회분식 방법에 비하여 효율적인 방법이 될 수 있다.

본 연구에서는 음이온 계면활성제인 sodium-di-2-ethylhexyl sulfosuccinate(AOT)와 비극성 용매인 isooctane의 역마이셀계를 이용하여, 수용액상의 단백질을 역마이셀 내로 추출하는 과정(forward transfer)과 역마이셀 내로 추출된 단백질을 수용액상으로 회수하는 과정(backward transfer)의 2단계에서 단백질의 추출 및 회수에 영향을 미치는 AOT 농도, pH, 염의 종류 및 이온강도 등의 효과에 대해 조사하

Corresponding author: Yu-Ryang Pyun, Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul, 120-749

고, 각 단백질의 전달조건을 단백질 혼합물에 적용하여 각각에 대한 선택적 분리의 가능성을 검토함으로써 역마이셀을 이용한 단백질 분리의 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 계면활성제는 음이온 계면활성제인 sodium-di-2-ethylhexyl sulfosuccinate(AOT)로 Sigma 제품을 사용하였으며, 비극성 용매로는 Junsei 제품인 GR 등급의 2,2,4-trimethylpentane(isooctane)을 사용하였고, 증류수는 이온교환수지를 통과한 3차 증류수를 사용하였다. 염의 영향을 조사한 실험에서는 GR 등급의 KCl(Shinyo pure chem.), NaCl(Shinyo pure chem.), CaCl₂(Yakuri pure chem.), MgCl₂(Merk) 등을 사용하였다. 실험에 사용된 모든 단백질은 Sigma 제품을 사용하였다.

단백질의 추출(forward transfer) 및 회수(backward transfer)

단백질의 추출 및 회수는 Luisi 등⁽¹³⁾이 제안한 double transfer 방법을 다소 수정하여 행하였다. 즉, forward transfer에서는 일정한 pH와 이온강도로 조절된 단백질 수용액(0.5 mg/ml) 5 ml와 AOT-isooctane으로 조제된 역마이셀 용액 5 ml를 100 ml 삼각 플라스크에 넣고 실온에서 5분간 교반하여 역마이셀내로 단백질을 solubilization 시킨 다음 2000×g에서 15분간 원심분리하여 단백질이 추출된 역마이셀을 분리하였다. Backward transfer에서는 단백질이 추출된 역마이셀 용액 5 ml와 pH 및 이온강도가 조절된 새로운 수용액 5 ml를 100 ml 삼각 플라스크에 넣고 실온에서 15분간 교반하여 단백질을 수용액상으로 desolubilization 시키고 2000×g에서 15분간 원심분리하여 단백질을 수용액상으로 회수하였다.

단백질 농도 측정

단백질 농도는 280 nm의 흡광도에서 측정하였고, 탁도가 나타나는 경우에는 탁도의 측정과장인 330 nm에서의 흡광도를 측정하여 280 nm에서의 탁도값(탁도는 파장의 4승에 반비례)으로 보정하여 빼주었다.

pH 측정

pH는 염이나 단백질 첨가에 따른 변화를 줄이기 위해 각 pH에 해당하는 완충용액으로 조절하였다. 즉, pH 3 이하에서는 citric acid-NaOH buffer, pH 3-5.7까지는 sodium citrate buffer, pH 5.8-8까지는 phosphate buffer, pH 8.1-9.5까지는 glycine-NaOH buffer, pH 9.6-11까지는 phosphate-NaOH buffer, pH 11 이상은 KCl-NaOH buffer를 각각 사용하였다. 역마이셀 용액의 pH는 교반 후 역마이셀 용액과 평형을 이룬 수용액층의 pH로 나타내었다.

Wo 측정

역마이셀 용액내의 수분함량은 Karl-Fisher 정량법⁽¹⁶⁾으로 측정하였다. 즉, methanol 20 ml가 들어있는 용기에 수분을 함유하고 있는 역마이셀 용액 1 ml를 첨가한 후, Automatic Karl Fisher Titrator를 사용하여 Karl Fisher 시약으로 역마이셀내의 수분을 적정함으로써 그 함량을 측정하였다.

역마이셀 용액의 Wo 값은 측정된 수분함량의 물농도와 알고 있는 AOT의 물농도로부터 다음 식에 의해 구하였다.

$$W_o = [H_2O]/[AOT]$$

SDS-polyacrylamide gel 전기영동

전기영동 분석은 Laemmli⁽¹⁷⁾와 Fairbanks 등⁽¹⁸⁾의 방법에 따라 행하였다.

결과 및 고찰

단백질 추출

AOT 농도의 영향

분자량 및 등전점이 다른 단백질들에 대해 계면활성제의 농도와 수용액내의 pH, 이온종류 및 이온강도에

Table 1. Effect of AOT concentration on protein solubilization (unit: %)

Concentration of AOT (mM)	Protein		
	Lysozyme	α -Chymotrypsin	BSA
25	95	97	0
50	100	98	3
100	98	100	17
200	92	46	
400	87	85	16
500	85	79	25

따른 역마이셀내로의 추출정도를 조사하였다.

Table 1은 계면활성제 AOT의 농도에 따른 단백질의 추출정도를 나타낸 것으로, 분자량이 비교적 작은 lysozyme (14, 300)과 α -chymotrypsin (25, 000)은 낮은 AOT 농도에서도 90% 이상의 추출을 보인 반면 분자량이 큰 BSA (65, 000)의 경우 25mM AOT까지는 전혀 추출되지 않다가 AOT 농도가 증가함에 따라 그 추출율이 증가하면서 200mM에서는 46%의 추출율을 보였다. Kitahara 등⁽¹⁹⁾의 보고에 의하면 역마이셀은 AOT 농도의 증가와 함께 그 크기가 증가하여 어느 일정농도 이상에서는 거의 같은 크기를 유지한다고 하였는데, 이러한 사실을 고려할 때 BSA와 같이 분자량이 큰 단백질의 경우 역마이셀내로 추출되기 위해서는 더 큰 마이셀이 필요하므로 낮은 AOT 농도에서는 size exclusion 효과로 거의 추출되지 않다가 AOT 농도가 증가함에 따라 마이셀 크기가 증가하여 단백질 추출율이 높아지는 것으로 생각된다. 한편, 높은 AOT 농도에서는 전반적으로 그 추출율이 감소하였는데, 이는 단백질이 비극성 용매층의 AOT와 complex를 형성하면서 겔화되었기 때문으로 생각된다.

pH의 영향

50mM AOT/0.1M KCl에서 단백질 추출에 대한 pH 영향을 살펴본 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Lysozyme, α -chymotrypsin 및 trypsin은 등전점 이상의 pH 영역에서 모두 추출율이 매우 낮았다. 등전점 이하의 pH 영역에서는 lysozyme의 경우 pH 4-10

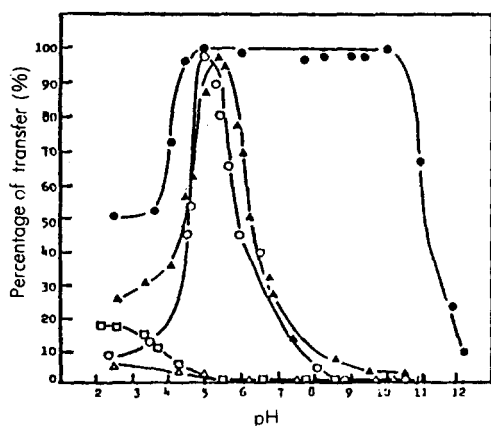


Fig. 1. Effect of pH on protein solubilization: Lysozyme (●, 11.0), Trypsin (▲, 10.5), α -Chymotrypsin (○ 8.6), BSA (△, 4.9), Pepsin (□, < 1): The values in the parentheses are the isoelectric points from Goklen¹⁵⁾

의 넓은 영역에서 95% 이상의 높은 추출율을 보인 반면 α -chymotrypsin과 trypsin은 등전점보다 훨씬 낮은 영역인 pH 5와 pH 5.4 부근에서 최고의 추출율을 보이다가 pH가 낮은 산성영역에서는 추출율이 다소 감소하는 경향을 보였다. 등전점 이상의 pH 영역에서 모든 단백질의 추출율이 낮은 것은 단백질의 net charge가 (-) 전하를 띠어 AOT의 친수성기의 (-) 전하와 정전기적 반발력이 작용하기 때문이다. 등전점 이하의 pH 영역에서는 단백질이 (+) 전하를 띠므로 단백질과 AOT 사이의 정전기적 인력이 작용하게 되는데, 이러한 사실을 Fig. 1의 결과로 미루어 볼 때 결국 단백질이 역마이셀내로 solubilization되기 위해서는 단백질과 계면활성제 사이에 정전기적 인력이 우선적으로 작용해야 한다는 것을 알 수 있다. 등전점 이하의 pH 영역에서도 단백질의 분자량에 따라 추출율이 높은 pH 영역이 각각 다른데, 분자량이 작은 lysozyme의 경우 등전점 부근의 영역을 포함하여 넓은 pH 영역에서 추출되는 것으로 보아 이는 size exclusion 영향은 거의 받지 않는 것으로 생각된다. 반면, 분자량이 보다 큰 α -chymotrypsin과 trypsin의 경우 등전점에 인접한 pH 영역에서는 size exclusion에 의해 낮은 추출율을 보이다가 등전점에서 먼 낮은 pH에서는 단백질의 (+) 전하가 많아짐으로써 단백질과 AOT 간에 충분한 정전기적 인력이 작용하여 추출율이 증가하는 것으로 생각된다. 그러나 pH가 더욱 낮아진 산성영역에서는 단백질이 변성되어 AOT와 불용성 화합물을 형성하면서 단백질의 추출율이 감소하는 것으로 보이며, 이와 같은 결과는 Scope의 연구⁽²⁰⁾에서도 보고되고 있다. 한편, pepsin과 BSA는 모든 pH 영역에서 낮은 추출율을 나타내었는데, pepsin의 경우 등전점이 pH 1.0 이하로 매우 낮기 때문이며 BSA의 경우 낮은 등전점과 큰 분자량에 의한 size exclusion의 결과로 생각된다.

염의 종류의 영향

여러 종류의 염을 사용하여 이온의 강도를 변화시켰을 때 단백질의 추출정도는 Fig. 2와 같다. 즉, lysozyme은 NaCl, CaCl₂의 경우 높은 이온강도에서도 95% 이상의 높은 추출율을 보였고 KCl의 경우는 0.4M 이상에서 추출율이 급격히 감소하였으며 MgCl₂의 경우는 전농도 범위에서 대체로 추출율이 낮았다. Trypsin과 α -chymotrypsin은 염의 종류에 관계없이 대체로 염농도 0.1M 이상부터 추출율이 급격히 감

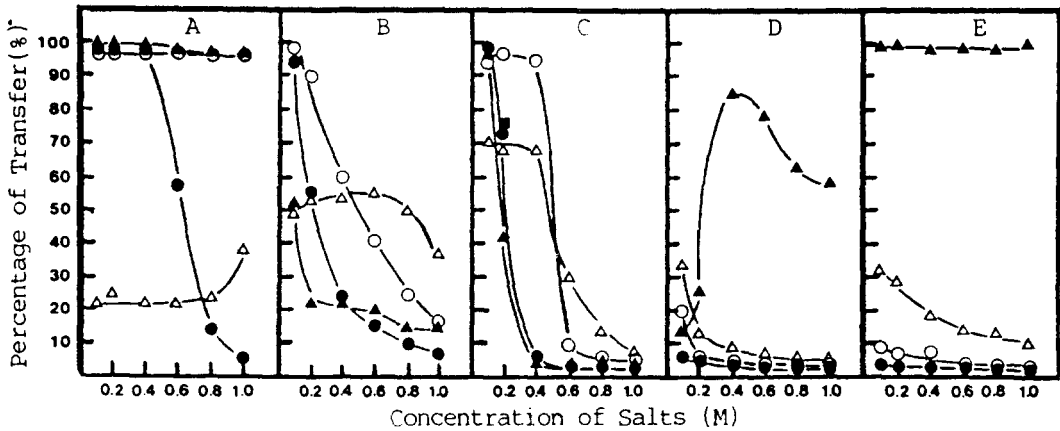


Fig. 2. Effect of ionic strength on Protein (A; lysozyme, B; trypsin, C; α-chymotrypsin, D; pepsin, E; BSA) solubilization KCl (●), NaCl (○), CaCl₂ (▲), MgCl₂ (△).

소하는 경향을 보였다. 한편, 분자량이 큰 pepsin이나 BSA는 CaCl₂를 제외한 다른 염농도에서는 농도에 관계없이 다른 단백질들에 비해 추출율이 낮았는데, pepsin의 경우 CaCl₂를 사용하였을 때 0.4 M 까지 추출율이 증가하였다가 그 이상의 농도에서는 약간 감소하는 경향을 보였으며 BSA는 CaCl₂ 1.0 M 까지 거의 100%에 가까운 추출율을 보였다. 모든 단백질에서 대체로 이온강도의 증가에 따라 추출율이 낮아지는 경향을 나타내고 있는데, 이러한 현상은 이온의 강도가 증가하면 AOT와 반대전하의 이온들간의 정전기적 결합량이 증가하면서 단백질이 역마이셀로 추출되기 위한 필수조건인 단백질과 AOT 사이의 정전기적 반응에 screening 작용이 증대되기 때문이다. 또한 Goklen⁽¹⁵⁾이 보고한 것과 같이 이온강도가 증가하면 양이온이 AOT의 친수성 부분과 결합하여 친수성 부분들간의 정전기적 반발력에 대한 차단효과가 커져서 역마이셀의 크기가 작아지기 때문에 단백질 추출도 불리해지는 것으로 생각된다. 일반적으로 W₀가 커짐에 따라 역마이셀의 크기도 커진다고 보고되고 있으므로⁽¹⁾, 여러 종류의 염들에 대해서 50 mM AOT-0.1 M KCl 조건으로 W₀를 측정 한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 전반적으로 이온강도가 증가하면 W₀가 감소하면서 이온강도의 증가에 따라 역마이셀의 크기가 작아짐을 알 수 있다. 그러나 1가 이온의 경우 K⁺에 비해 Na⁺의 W₀값이 컸으며 Fig. 2에 의하면 W₀값이 큰 Na⁺의 경우 전반적으로 단백질 추출율이 높았다. 2가 이온들은 1가 이온에 비하여 W₀가 높음에도 불구하고 단백질에 따라 그 추출양상이 달라지면서 마이셀의 크기와 단백질 추출간의 정확한 상관관계를 밝히기

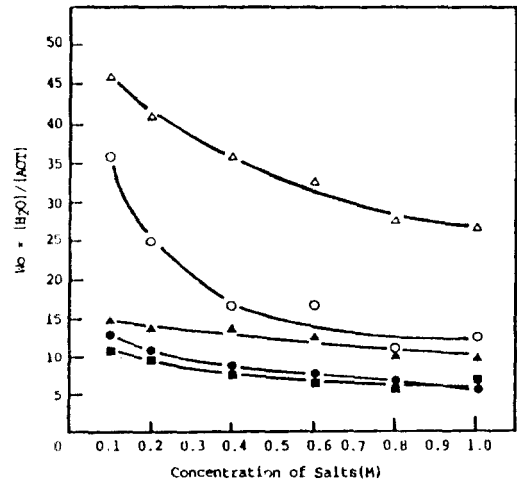


Fig. 3. Effect of ionic strength on W₀ with various salts: KCl (●; protein⁻, ■; protein⁺), NaCl (○), CaCl₂ (▲), MgCl₂ (△)

가 어려웠다. 그러나 분자량이 큰 pepsin이나 BSA의 경우 역마이셀의 크기가 작은 Na⁺, K⁺의 조건보다는 큰 마이셀을 형성하는 Ca²⁺와 Mg²⁺에서 더 높은 추출율을 보임으로써 분자량이 큰 단백질들의 경우 작은 마이셀에 의해 size exclusion을 받게 되며 따라서 역마이셀이 클수록 유리함을 알 수 있다.

단백질의 회수

앞에서는 단백질의 역마이셀내로의 solubilization 조건을 연구하였는데 역마이셀에 의한 단백질의 추출이 분리공정에서 실제로 활용되려면 역마이셀내로 추출된

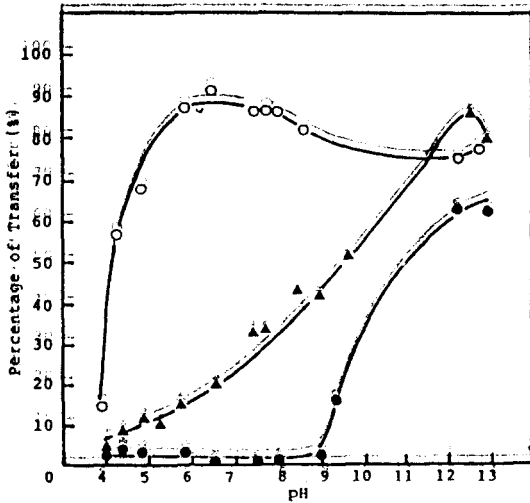


Fig. 4. Effect of pH on protein desolubilization: Lysozyme (●), Trypsin(▲), α-Chymotrypsin(○).

목적 단백질의 수용액상으로부터의 회수가 가능해야 한다.

Lysozyme 과 α-chymotrypsin 은 0.1 M KCl-pH 5.2, trypsin 은 0.1 M KCl-pH 5.5에서 역마이셀내로 추출시킨 다음 이를 0.5 M KCl 수용액으로 다시 회수시켰을 때 pH에 따른 단백질의 회수율을 Fig. 4에 나타내었다. Lysozyme 의 경우 pH 9까지는 거의 회수되지 않다가 그 이상의 pH 영역에서 점차 회수되는 경향을 보였고, α-chymotrypsin 은 pH 6 이상의 영역에서 높은 회수율을 보였으며, trypsin 은 pH가 증가함에 따라 회수율이 증가하면서 pH 12.5에서 최고의 회수율을 보였다. 즉, 대부분의 단백질은 forward transfer 와 반대로 등전점 이상의 pH 영역에서는 높은 회수율을 보였으며, 단백질마다 회수하는 수용액의 pH에 따라 그 회수 정도가 다르게 나타나 선택적으로 단백질을 분리할 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 또한 α-chymotrypsin 의 경우 pH 6 이상에서 85% 이상의 높은 회수율을 보이다가 pH 11 이상에서 회수율이 다소 감소하였는데 이는 단백질의 변성으로 AOT 와 불용성의 중간 계면을 형성하기 때문인 것으로 생각된다. 역마이셀로부터 단백질의 회수는 α-chymotrypsin 을 이용한 Goklen 의 경우⁽¹⁵⁾에도 본 연구에서 보다 다소 낮은 값인 약 60%의 회수가 가능하다고 보고한 바 있다.

Fig. 5에서는 pH 영향에서와 같은 조건으로 forward transfer 를 행한 뒤 lysozyme 은 pH 12.2, α-chymotrypsin 은 pH 6.7, trypsin 은 pH 12.6으로

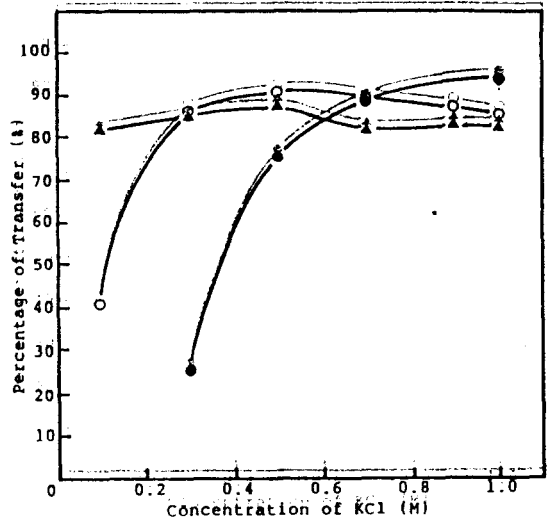


Fig. 5. Effect of ionic strength on protein desolubilization: lysozyme(●), trypsin(▲), α-chymotrypsin(○).

회수가 가능한 조건에서 각 단백질의 회수에 대한 이온 강도의 영향을 살펴보았다. 모든 단백질은 forward transfer 와는 반대로 이온강도가 증가함에 따라 회수율이 점차 증가하였고 아주 높은 pH 영역에서는 추출에서와 마찬가지로 회수율이 다소 감소하는 경향을 보였다.

이상으로부터 단백질의 회수율을 높이기 위해서는 적절한 pH와 이온강도의 선택이 중요하다는 것을 알 수 있으며, 본 실험에서는 lysozyme 의 경우 1.0 M KCl-pH 12.2, α-chymotrypsin 은 0.5 M KCl-pH 6.7, trypsin 은 0.5 M KCl-pH 12.6에서 85% 이상의 높은 회수율을 보이는 조건을 얻었다.

단백질 혼합물의 분리

앞에서 살펴보았듯이 각 단백질이 분자량 및 등전점의 차이에 따라 forward/backward transfer 과정의 최적조건이 서로 다른 경향을 보임으로써 단백질 혼합물로부터 각각을 선택적으로 분리할 수 있다는 가능성을 얻었다.

본 연구에서는 BSA 와 lysozyme 의 혼합물로부터 각각의 분리를 시도하였다. 0.1 M KCl-pH 6.8의 BSA/lysozyme 수용액을 50mM AOT 의 역마이셀 용액과 교반하여 분자량이 크고 등전점이 낮은 BSA 는 수용액에 그대로 남겨두고 분자량이 작고 등전점이 높은 lysozyme 은 역마이셀내로 추출한 다음, 역마이셀내로 추출된 lysozyme 은 다시 1.0 M KCl-pH 12.5



Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins.

1. bovine serum albumin-lysozyme
2. bovine serum albumin
3. lysozyme

수용액과 교반하여 수용액상으로 다시 회수하였다. 이렇게 분리된 단백질을 전기영동으로 확인한 결과 Fig. 6과 같이 나타났다. 여기서 lane 1은 수용액상의 BSA와 lysozyme band, lane 2는 forward transfer 후 수용액층의 band, lane 3은 backward transfer 후 수용액층의 band를 나타낸 것으로 BSA와 lysozyme이 선택적으로 분리되었음을 알 수 있다.

이상의 결과들로부터 AOT의 농도, 이온의 강도, pH 등의 요인들을 적절히 변화시킴으로써 분자량과 등전점이 다른 단백질 혼합물로부터 목적 단백질을 선택적으로 분리할 수 있다고 판단된다.

요 약

AOT-Isooctane 역마이셀계를 이용한 단백질 추출 및 회수에 영향을 미치는 여러가지 요인과 단백질 혼합물로부터의 선택적인 분리에 대해 연구 검토하였다. Lysozyme, α -chymotrypsin은 AOT 100mM까지 높은 추출율을 보이다가 100mM 이상에서는 점차 감소하였고, BSA는 200mM까지 추출율이 증가하다가 그 이상에서는 감소하였다. pH에 따른 단백질의 역마

이셀내로의 추출은 등전점이 높은 lysozyme이 pH 4-10; α -chymotrypsin과 trypsin은 각각 pH 5, 5.4에서 95% 이상의 높은 추출율을 보였으며 등전점이 낮은 pepsin과 BSA는 어떤 pH 영역에서도 거의 추출되지 않았다. 이온강도를 증가시켰을 때 단백질의 추출이 감소하였고, W₀가 감소하면서 역마이셀의 크기도 감소하였으며 이온에 따라 $Mg^{2+} > Na^{+} > Ca^{2+} > K^{+}$ 의 순으로 나타났다. 단백질 회수시에는 전반적으로 추출과는 반대경향을 보였으며, lysozyme의 경우 회수하는 수용액이 1.0 M KCl-pH 12.2일 때, α -chymotrypsin은 0.5 M KCl-pH 6.7, trypsin은 0.5 M KCl-pH 12.6일 때 85% 이상의 높은 회수율을 얻었다. BSA/lysozyme 혼합물로부터 각각의 분리를 시도하였는데, BSA는 forward transfer 후 역마이셀내로 추출되지 않은 채 수용액상에 남게하고 lysozyme은 역마이셀내로 추출시킨 후 backward transfer 과정을 거쳐 새로운 수용액상으로 회수하여 전기영동으로 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단의 1988년 자유공모과제 학술연구조성비 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드린다.

문 헌

1. Zulauf, M. and Eicke, H. F.: Inverted Micelles and Microemulsions in the Ternary System $H_2O/Aersol\ OT/Isooctane$ as Studied by Photon Correlation Spectroscopy. *J. Phys. Chem.*, **83**, 430 (1979)
2. Maitra, A.N. and Eicke, H.-F.: Effect of Rotational Isomerism on the Water-Solubilizing Properties of Aersol OT as Studied by H NMR Spectroscopy. *J. Phys. Chem.*, **85**, 2687 (1981)
3. Wong, M., Thomas, J.K. and Gratzel, M.: Fluorescence Probing of Inverted Micelles. The State of Solubilized Water Clusters in Alkane/Diisooctyl Sulfosuccinate (Aersol OT) Solution. *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 2391 (1976)
4. Eicke, H. F., Shepherd, J.C.W. and Stenemann, A.: Exchange of Solubilized Water and Aqueous Electrolyte Solutions between Micelles in Apolar Media. *J. Colloid Interface Sci.*, **56**, 168 (1976)

5. Atik, S.S. and Thomas, J.K.: Transport of Ions Between Water Pools in Alkanes. *Chem. Phys. Lett.*, **79**, 351 (1981)
6. Fletcher, P.D.I., Freedman, R.B., Mead, J., Oldfield, C. and Robinson, B.H.: Reactivity of α -Chymotrypsin in Water-in Oil Micromulsions. *Colloids and Surfaces*, **10**, 193 (1984)
7. Misiosrowski, R.L. and Wells, M.A.: The Activity of Phospholipase A₂ in Reversed Micelles of Phosphatidylcholine in Diethyl Ether: Effect of Water and Cations. *Biochemistry*, **13**, 4921 (1974)
8. Grandi, C., Smith, R.E. and Luisi, P.L.: Micellar Solubilization of Biopolymers in Organic Solvents: Activity and Conformation of lysozyme in Isooctane Reverse Micelles. *J. Biol. Chem.*, **256**, 837 (1981)
9. Wolf, R. and Luisi, P.L.: Micellar Solubilization of Enzymes in Hydrocarbon Solvents. Enzymatic Activity and Spectroscopic Properties of Ribonuclease in n-Octane. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **89**, 209 (1979)
10. Hilhorst, R., Laane, C., and Veeger, C.: Enzymatic Conversion of Apolar Compounds in Organic Media Using an NADH-Regenerating System and Dihydrogen as Reductant. *FEBS Lett.*, **159**, 225 (1983)
11. Luthi, P. and Luisi, P.L.: Enzymatic Synthesis of Hydrocarbon Soluble Peptides with Reverse Micelles. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7825 (1984)
12. Luisi, P.L., Imre, V.E., Jaeckle, H. and Pande, A.: Microemulsions: Proteins and Nucleic Acids as Guest Molecules. *Topics Pharm. Sci.*, **1983**, 243 (1983)
13. Luisi, P.L., Bonner, F.J., Pellegrini, A., Weget, P. and Wolf, R.: Micellar Solubilization of Proteins in Aprotic Solvents and their Spectroscopic Characterization. *Helv. Chim. Acta*, **62**, 740 (1979)
14. Leser, M.E., Luisi, P.L. and Maestro, M.: Application of Reversed Micelles for the Extraction of Proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **101**, 6731 (1986)
15. Goklen, K.E.: *Liquid-Liquid Extraction of Biopolymers; Selective Solubilization of Proteins in Reversed Micelles*. Doctoral Thesis, Massachusetts Institute of Technology (1986)
16. Stock, J.T.: Determination of Water by the Karl Fischer Technique and Related Methods. in *Amperometric Titrations*, Intersci., NY, p.627 (1965)
17. Laemmli, U.K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head Bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 689 (1970)
18. Fairbranks, G., Steck, T.L. and Wallach, D.F.H.: Electrophoresis Analysis of the Major Polypeptides of the Human Erythrocyte Membrane. *Biochemistry*, **10**, 2606 (1971)
19. Kon-No, K., Asano, H. and Kitahara, A.: Study on the Size of Reversed Micelles of Anionic and Cationic Surfactants. *Prog. Colloid & Polymer Sci.*, **66**, 20 (1983)
20. Scope, R.K.: *Protein Purification: Principles and Practice*, p.194, Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin (1982)

(1989년 5월 29일 접수)