

CTAB/Hexanol/Isooctane 역미셀계를 이용한 단백질 분리

김영숙 · 신해현 · 홍석인 · 권운중¹ · 변유량*

연세대학교 식품공학과, ¹경기대학교 식품가공학과

Protein Separation with CTAB/Hexanol/Isooctane Reverse Micellar System

Kim, Young-Sug, Hae-Hun Shin, Seok-In Hong,
Yun-Joong Kwon¹ and Yu-Ryang Pyun*

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

¹Department of Food Science and Technology, Kyonggi University, Su won 440-760, Korea

The solubilization and desolubilization of proteins in CTAB/hexanol/isooctane reverse micellar system were investigated for the selective separation of proteins. Several proteins were used, including bovine serum albumin (BSA), pepsin, trypsin and ribonuclease-a. Most proteins could be solubilized into reverse micelles in the pH range above the isoelectric point of each protein, where the net charge of protein was opposite to that of surfactant. However BSA was solubilized above pH 10, which is several pH units above the pI 4.9. The kinds of anions in aqueous phase influenced on protein solubilization while no significant trend was observed with different cations. Protein solubilization decreased with increase of the ion size in the order of F⁻, Cl⁻, Br⁻ and I⁻. The size of CTAB micelles did not change significantly with increasing ionic strength, but the solubilization decreased. Protein desolubilization showed opposite behaviors to the solubilization. Several model mixtures such as pepsin/trypsin, pepsin/ribonuclease-a and BSA/ribonuclease-a were successfully separated from each other without changing enzymatic activities.

최근 유전자 재조합기술에 의한 균주개발, 세포배양 등을 통하여 유용한 유전자 산물의 생산이 가능하게 됨에 따라 이들 유전자 산물의 대량생산을 위해서 새로운 단백질의 분리, 정제기술이 요구된다. 현재 활발히 연구되고 있는 생물분리방법 중에서 역미셀(reverse micelle)을 이용한 단백질 분리법은 일반 화학공업에서 사용하고 있는 액-액 추출법과 유사하여 일반 추출용매 대신 역미셀용액을 사용함으로써 발효배양액으로부터 목적단백질을 대규모로 분리할 수 있는 유망한 방법이다.

역미셀에 대한 연구로는 역미셀내에 존재하는 물의 구조 및 특성, 계면활성제의 구조, 역미셀 크기, 역미셀들 사이에서의 물질전달(1, 2), 역미셀에서의 효소반응(3-5) 등이 이루어졌으며 최근에는 단백질 분리의 가능

성(6, 7)이 보고되었다.

역미셀을 이용한 단백질 분리는 단백질이 포함된 수용액(I)과 역미셀용액을 혼합하여 단백질을 수용액상에서 역미셀내로 용해(solubilization)시키는 과정(forward transfer)과 단백질이 용해된 역미셀용액을 제2의 수용액(II)과 다시 혼합하여 역미셀로부터 수용액상으로 desolubilization시키는 과정(backward transfer)으로 이루어진다. 여기서 단백질의 이동은 분자량, 등전점 등의 단백질 특성 뿐만 아니라 계면활성제의 종류 및 농도, 수용액에서 이온의 종류 및 강도, pH 등과 같은 system parameter에 의해 크게 영향을 받으므로 이를 적절히 조절해줌으로써 여러 단백질들의 선택적인 분리가 가능하다.

음이온 계면활성제인 sodium di-2-ethylsulfosuccinate(AOT)를 이용하여 역미셀내로의 단백질 이동 메

Key words: CTAB, reverse micelle, protein separation

*Corresponding author

카니즘에 관해서는 Goklen(8)과 Rho(9) 등에 의하여 연구되었다. 그러나 양이온 계면활성제에 대한 연구는 미약하므로 본 연구에서는 양이온 계면활성제 역미셀인 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)/hexanol/isooctane 계를 이용하여 단백질의 구조, 수용액의 pH, 이온종류 및 강도 등과 같은 system parameter에 따른 단백질의 solubilization/desolubilization을 연구하므로서 단백질 분리의 기초자료를 구하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 양이온 계면활성제 CTAB는 Fluka 제품, 비극성용매인 2,2,4-trimethyl pentane(isooctane), hexanol은 Junsei 제품으로 모두 GR 등급을 사용하였으며, 증류수는 이온교환수지를 통과한 3차 증류수를 사용하였다. 염의 영향을 조사한 실험에서는 GR 등급의 KCl(Shinyo Pure Chem.), KF(Aldrich), KBr(Junsei Chem.), KI(Wako Chem.), NaCl(Shinyo Pure Chem.), CaCl₂(Yakuri Pure Chem.), MgCl₂(Merck) 등을 사용하였다. Karl-Fischer 방법에 의한 수분정량에서는 Merck 제품인 Karl-Fischer 시약과 HPLC용 methanol을 사용하였다. 실험에 사용된 모든 단백질은 Sigma 제품을 이용하였다.

단백질의 용해

Hexanol과 isooctane 1:1 혼합물에 CTAB가 50 mM이 되도록 용해시켜 미셀용액을 조제하고, 조제된 역미셀용액 5 ml와 일정한 pH와 이온강도(이온강도의 영향에 대한 실험을 제외하고는 50 mM로 고정시켰음)를 갖도록 조절된 단백질 수용액 5 ml(단백질농도 0.5 mg/ml)를 100 ml 삼각플라스크에 넣고 실온에서 5분간 교반한 다음 2,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 단백질을 역미셀내로 용해시켰다.

단백질의 회수

단백질의 추출 및 회수는 Luisi 등(10)이 제안한 double transfer 방법을 다소 수정하여 행하였다. 즉, forward transfer에서는 일정하게 pH와 이온강도를 조절된 단백질 수용액(0.5 mg/ml) 5 ml와, CTAB/hexanol/isooctane 계 미셀용액 5 ml를 100 ml 삼각플라스크에 넣고 실온에서 5분간 교반하여 역미셀내로 단백질을 용해시킨 다음 2,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 단백질이 용해된 역미셀을 분리하였다. Backward

transfer에서는 단백질이 용해된 역미셀용액 5 ml와 pH 및 이온강도가 조절된 새로운 수용액 5 ml를 100 ml 삼각플라스크에 넣고 실온에서 15분간 교반하여 단백질을 수용액상으로 이동시키고 2,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 단백질을 수용액상으로부터 회수하였다.

단백질농도 측정

단백질농도는 280 nm의 흡광도로부터 측정하였으며, 탁도가 나타나는 경우에는 탁도의 측정파장인 330 nm에서의 흡광도 값만큼 빼준다음 미리 구한 검량곡선으로부터 구하였다.

pH 측정

pH는 염이나 단백질 첨가에 따른 pH 변화를 줄이기 위해 각 pH에 해당하는 완충용액으로 조절했다. 즉, pH 3 이하에서는 citric acid-NaOH buffer, pH 3-5.7까지는 sodium citrate buffer, pH 5.8-8까지는 phosphate buffer, pH 8.1-9.5는 glycine-NaOH buffer, pH 9.6-11은 phosphate-NaOH buffer, pH 11 이상은 KCl-NaOH buffer를 각각 사용하였다. 역미셀의 water pool의 pH는 근사적인 방법으로 교반 후 역미셀용액과 평형을 이룬 수용액층의 pH로 나타내었다.

W₀ 측정

역미셀용액내의 수분함량은 Karl-Fischer 정량법으로 측정하였다(11). 즉, methanol 20 ml가 들어있는 용기에 수분을 함유하고 있는 역미셀용액 1 ml를 첨가한 후, Automatic Karl Fischer Titrator를 사용하여 Karl-Fischer 시약으로 역미셀내의 수분을 적정하였다. 역미셀용액의 W₀값은 측정된 수분의 몰농도와 알고 있는 계면활성제의 농도로부터 다음 식에 의해 구하였다.

$$W_0 = [H_2O] / [\text{surfactant}]$$

SDS-polyacrylamide gel 전기영동

단백질 혼합물로부터 각 단백질이 선택적으로 분리되었는가를 확인하기 위해, Laemmli(12)의 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 행하였다. 실온에서 20 mA로 4시간 동안 전기영동을 실시한 후, gel을 coomassie brilliant R-250으로 염색하고 Fairbank 등(13)의 방법에 따라 탈색하였다.

결과 및 고찰

단백질의 용해

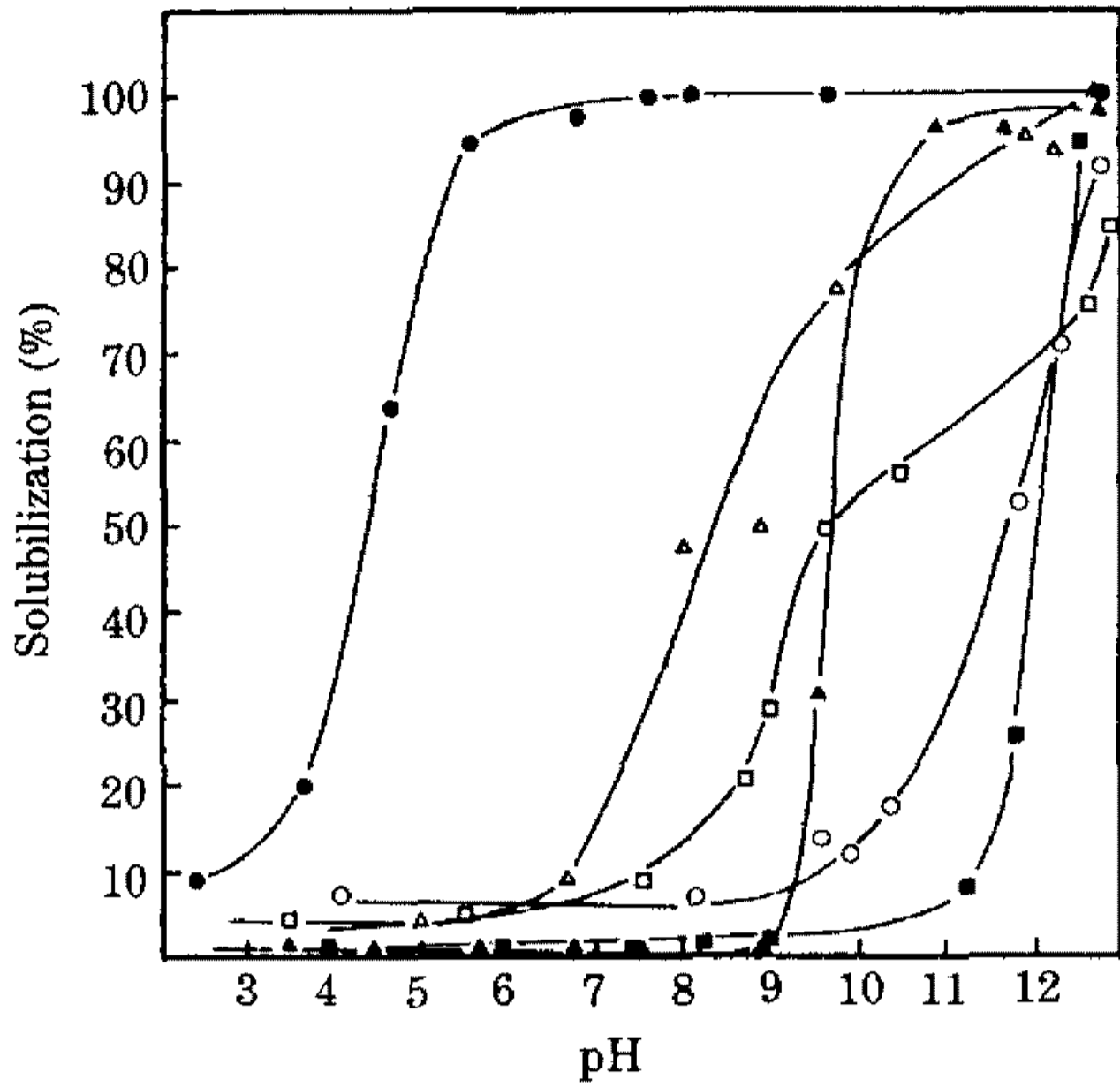


Fig. 1. Effect of pH on protein solubilization in CTAB/hexanol/isooctane system for various proteins
 ▲; BSA □; α-chymotrypsin ■; lysozyme ●; pepsin △; trypsin ○; ribonuclease-a

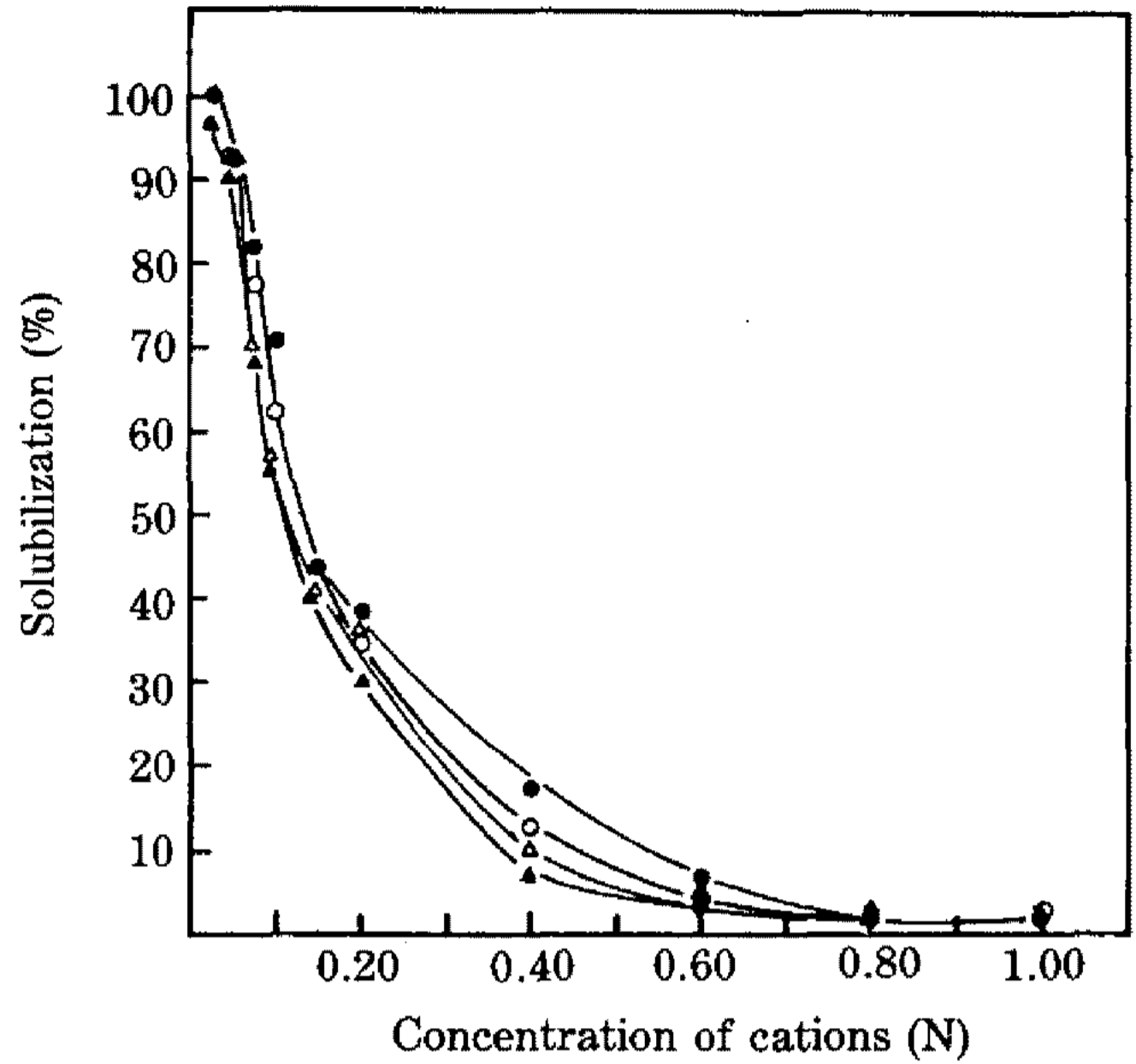


Fig. 2. Effect of cations on protein solubilization in CTAB/hexanol/isooctane at pH 7.0
 ●; KCl ○; NaCl ▲; CaCl₂ △; MgCl₂

pH 영향: 일정한 조건에서 pH를 변화시켰을 때 단백질의 역미셀내로의 용해에 미치는 pH의 영향을 조사하였다.

Fig.1은 분자량이 비교적 큰 BSA(분자량 65,000)와 pepsin(35,000), 중간 정도의 α-chymotrypsin(25,000)과 trypsin(23,300), 그리고 분자량이 비교적 작은 lysozyme(14,300)과 ribonuclease-a(13,700)의 pH에 따른 50 mM KCl/50 mM CTAB 역미셀내로 용해 정도를 나타낸 것이다. 등전점이 낮은 pepsin(pI<3.0)은 pH5 이상의 넓은 pH 영역에서 용해되었으며, trypsin과 α-chymotrypsin은 등전점 부근인 pH8-10에서, 등전점이 비교적 높은 lysozyme(pI=11.0)은 pH12 이상에서 비로소 용해되어 대부분 등전점 이상의 pH 영역에서 용해가 가능하였다. 일반적으로 단백질은 등전점 이하의 pH 영역에서는 (+)전하를 띠므로 CTAB의 (+)전하를 띤 친수성 부분과 정전기적 반발력이 작용하는 반면 등전점 이상의 pH 영역에서는 단백질들이 (-)전하를 띠므로 정전기적 인력이 작용한다. 결국 단백질이 역미셀내로 용해되기 위해서는 일차적으로 역미셀의 계면과 단백질 사이의 정전기적 인력이 작용해야 한다는 것을 의미한다. 이러한 현상은 AOT계에서 cytochrome-c, α-chymotrypsin 및 lysozyme에 대하여 연구한 Goklen(7)의 결과나 TOMAC계의 아미노산과 peptide에 관한 Luisi 등(10)의 보고에서도 확인할 수 있었다. 그러나 trypsin의 경우에는 등전점이 10.5 정도

인데 반해 그보다 낮은 pH7-10의 영역에서도 용해되었다. 단백질의 net charge를 조사한 Townsend 등(14)은 pH7에서 trypsin의 net charge가 이론적으로 +7이지만 실제로 측정된 값은 -11로 다른 단백질과 상이한 현상을 보였다고 보고하였다. 따라서 pH7-10 영역에서 trypsin의 용해는, Townsend 등의 경우처럼 trypsin 표면의 실질적인 전하가 (-)를 띠므로써 나타난 결과라고 생각한다. 한편, BSA는 등전점(pI=4.9)이 낮음에도 불구하고 pH가 10 이상이 되어야만 용해되었다. 이는 BSA의 분자량이 65,000 정도로 다른 단백질에 비해 비교적 큰 편이기 때문에 가용화시키기 위해서는 속이 빈 역미셀을 더 많이 소모하여야 하므로 size exclusion 영향을 받아 추출이 불리해지기 때문인 것으로 생각된다(7).

이온의 종류 및 강도에 따른 영향: 단백질의 역미셀내로 용해에 미치는 이온의 종류와 영향을 검토하였다. Fig.2는 KCl, NaCl, CaCl₂, MgCl₂ 등의 염들을 사용하여 pH7에서 pepsin의 용해에 미치는 양이온의 영향을 조사한 것이고, Fig.3은 KF, KCl, KBr, KI 등을 사용하여 음이온의 영향을 살펴본 결과이다. 그림에서 알 수 있는 것처럼 양이온 계면활성제의 역미셀계에서는 음이온의 종류와 농도가 일정하면 단백질의 용해 정도는 양이온의 종류에 영향을 받지 않으나 계면활성제와 반대 전하의 음이온들에 의하여 영향을 받는 것을 의미한다. 즉, Fig.3에서 음이온 종류에 따른 용해 정도를 비교해

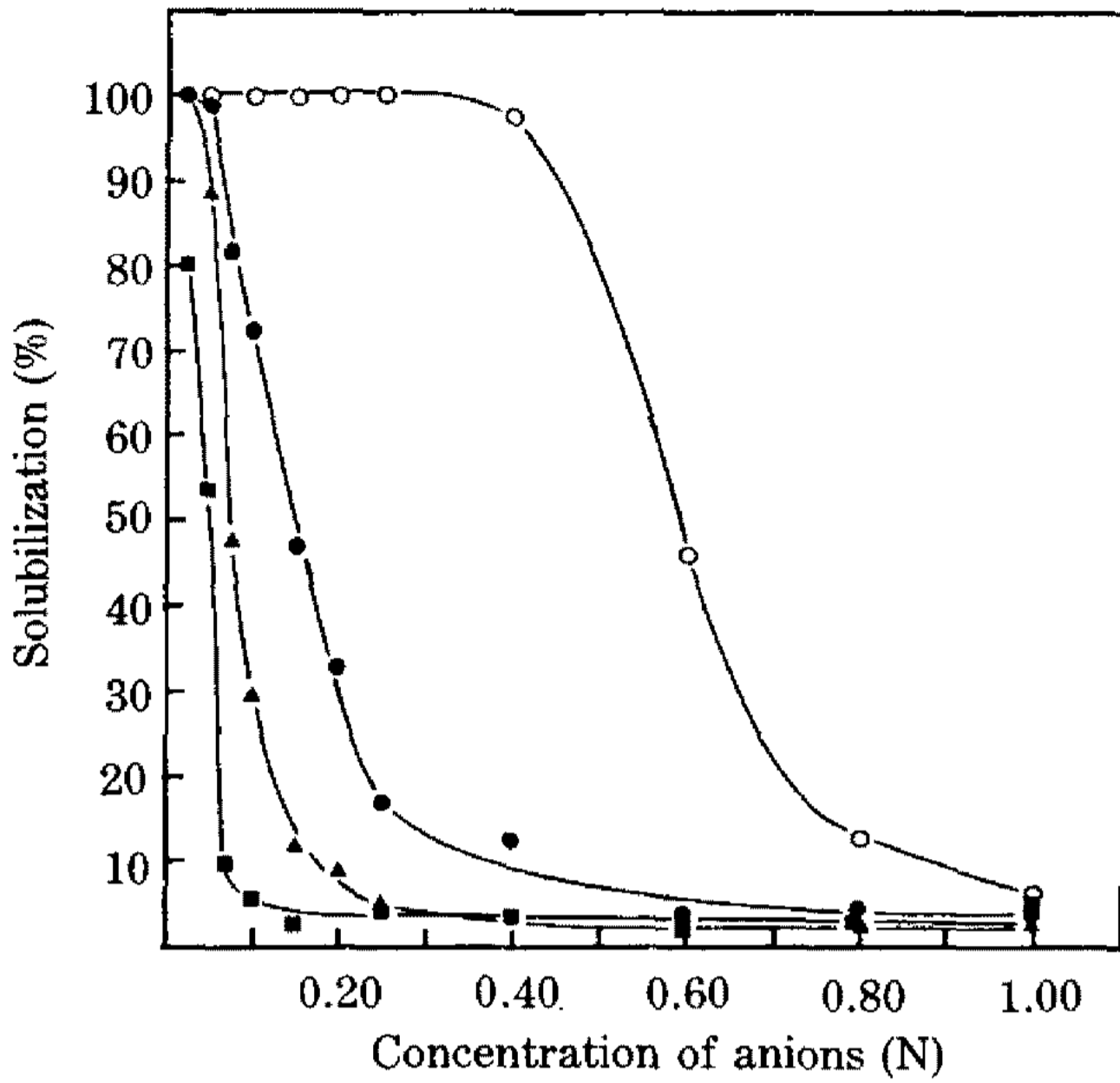


Fig. 3. Effect of anions on protein solubilization in CTAB/hexanol/isooctane at pH 7.0
 ○; KF ●; KCl ▲; KBr ■; KI

보면 이온반경이 작은 $F^- < Cl^- < Br^- < I^-$ 순으로 단백질의 용해에 유리한 것을 알 수 있다.

일반적으로 이온의 전하량이 일정한 조건에서는 이온 반경이 작을수록 수용액내에서 그 주변에 두꺼운 hydration shell을 형성하면서 이온의 극성이 감소되는 것으로 알려져 있다(15, 16). 따라서 이온이 작을수록 극성이 낮기 때문에 계면에서의 정전기적 상호작용에 screening 효과가 감소하여 용해가 유리해지는 것으로 생각된다. 이러한 현상은 음이온 계면활성제인 AOT를 사용한 Rho(9)의 경우에서도 확인되었는데, 양이온이 작을수록 보다 용해가 잘 되었다.

Fig. 4는 pH13에서의 pepsin, trypsin, lysozyme, ribonuclease-a의 용해에 미치는 이온강도의 영향을 살펴본 것이다. 전반적으로 이온강도가 증가할수록 단백질의 용해 정도는 감소하는 경향을 보였다. 이러한 현상은 단백질과 계면 사이의 정전기적 상호작용에 대한 screening 효과가 증대되어 인력이 감소하기 때문인 것으로 생각된다. Pepsin의 경우 KCl 농도 100mM까지는 100% 용해되었으나 그 이상의 농도에서는 서서히 감소하다가 600mM 이상부터 급격히 감소하였다. Trypsin과 lysozyme은 각각 KCl 농도 100mM, 75mM까지 90% 이상 용해되었으나 ribonuclease-a는 50mM의 낮은 KCl 농도에서도 80% 정도밖에 용해되지 않았다. 등전점이 낮은 단백질일수록 pH13에서 (-)전하량이 많으므로 계면활성제와의 정전기적 인력에 유리

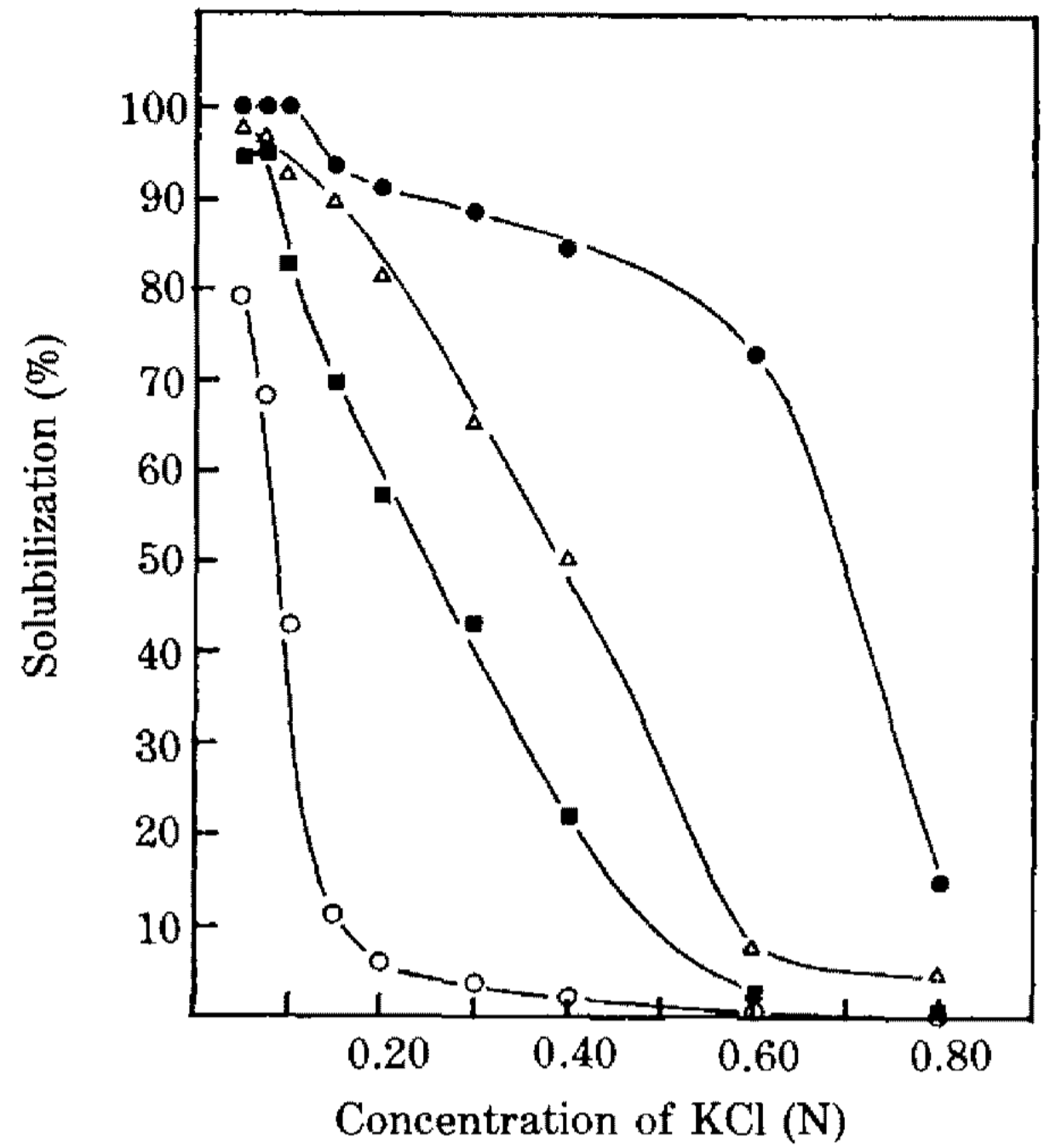


Fig. 4. Effect of KCl concentration on protein solubilization in CTAB/hexanol/isooctane at pH 13.0
 ●; pepsin ■; lysozyme
 △; trypsin ○; ribonuclease-a

한 점을 고려하면, pepsin, trypsin, lysozyme 순으로는 타당성이 있으나 ribonuclease-a의 경우에는 등전점이 낮음에도 불구하고 trypsin이나 lysozyme보다 용해 정도가 낮은 원인에 대해서는 앞으로 더욱 연구가 필요하다고 생각된다.

한편, 각기 다른 이온강도에서 단백질의 용해에 미치는 pH의 영향을 실험한 결과, pepsin의 경우 Fig. 5에 나타난 것과 같이 이온강도가 클수록 100% 용해되는 pH 영역이 알카리쪽으로 이동되었고 trypsin의 경우도 pepsin과 비슷한 경향을 보였다(17). 이는 동일 pH에서 이온강도가 증가하면 이온들의 screening 작용에 의해 단백질과 계면 사이의 정전기적 인력이 감소되기 때문에 단백질의 용해에 역효과를 받게 되며 이 때, pH를 높여 단백질의 (-)전하량을 증가시켜주면 감소된 계면과의 정전기적 인력이 보충되면서 용해가 회복되기 때문인 것으로 추정된다. 결과적으로 단백질이 용해되는 영역은 pH와 이온강도를 변화시키면서 적절히 조절할 수 있으며, 이는 각 단백질을 선택적으로 용해시킬 수 있음을 의미한다.

역미셀의 크기: 역미셀계의 W_o 값은 역미셀계의 특성을 대표할 수 있는 지표인 동시에 역미셀의 크기를 간접적으로 제시해 줄 수 있는 값으로, 일반적으로 W_o 가 클수록 미셀의 크기도 커진다. Fig. 6은 여러 종류의 음이

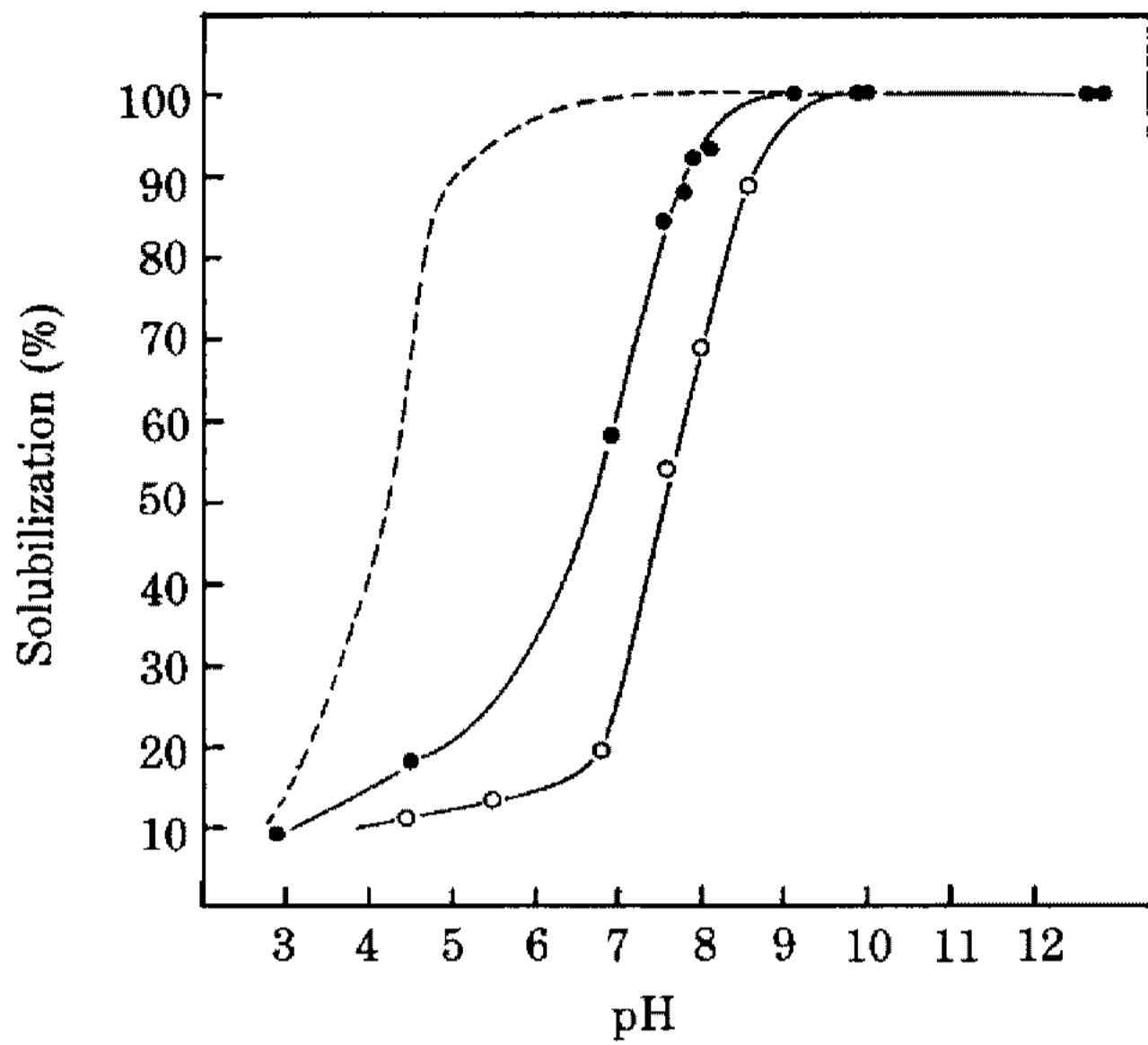


Fig. 5. Effect of pH and KCl concentration on pepsin solubilization in CTAB/hexanol/isooctane system
 ---; 50 mM KCl ●; 100 mM KCl ○; 150 mM KCl

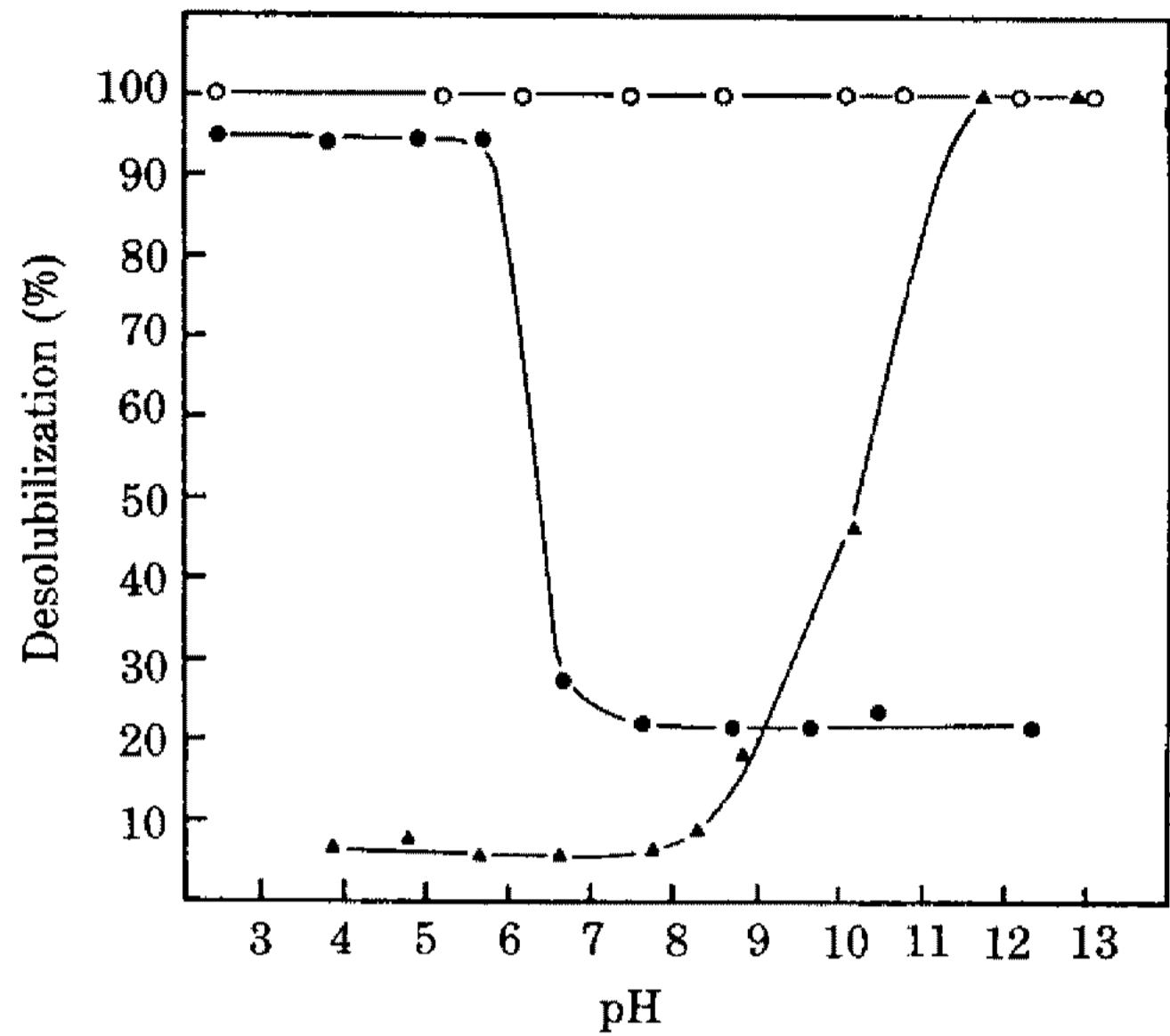


Fig. 7. Effect of pH on protein desolubilization from CTAB/hexanol/isooctane reverse micelles into 1.0 M KCl aqueous solution
 ▲; BSA ●; pepsin ○; ribonuclease-a

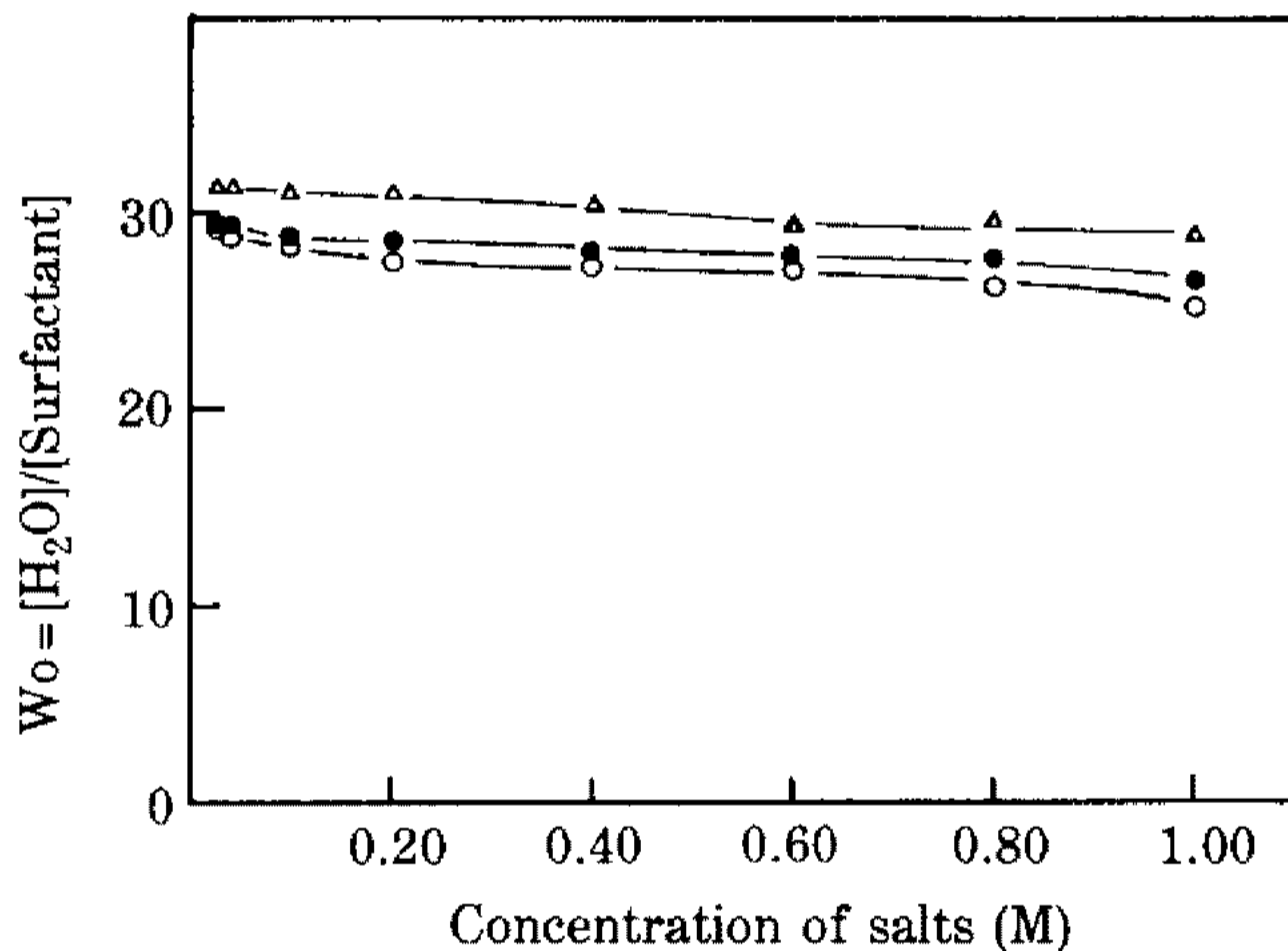


Fig. 6. Changes of W_o depending on salt concentration in CTAB/hexanol/isooctane system
 △; KF ●; KCl ○; KBr

온도에 대해 이온강도에 따른 역미셀의 W_o 값을 나타낸 것으로, 이온의 종류에 관계없이 이온강도가 증가함에 따라 W_o 에는 큰 변화가 없었다. 이는 이온강도가 증가하여도 역미셀의 크기는 거의 일정하다는 것을 의미하므로, 결국 이온의 증가에 따른 계면활성제의 친수성 부분들간의 반발력 감소는 역미셀 크기에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있다. 한편, 이온의 종류에 따라서는 F^- 의 경우 W_o 가 29-32 정도로 가장 높은 값을 보였고 그 다음 Cl^- , Br^- 순으로 이온반경이 작을수록 큰 역미셀을 형성하였다. 앞에서 기술한 것 같이 이온반경이 작을수록 이온 주변에 두꺼운 hydration shell을 형성한다. 따라서 이들은 계면활성제의 친수성 부분과의 결합이 적어지

고 결과적으로 친수성 부분들간의 반발력을 screening 하는 효과가 약해짐으로써 큰 역미셀을 형성하는 것으로 생각된다. 이러한 현상은 물의 역미셀내로의 용해기작을 밝히기 위해 음이온 및 양이온 계면활성제를 사용한 Kitahara 등(18, 19)의 연구에서도 같은 경향을 보였다.

단백질의 desolubilization

역미셀을 이용한 단백질 분리가 실제로 활용되기 위해서는 역미셀내로 목적 단백질을 용해시킨 다음 이를 다시 수용액상으로 회수할 수 있어야 하는데, 용해된 단백질을 새로운 수용액상으로 회수하는 desolubilization 과정은 용해와 반대과정으로 생각할 수 있다. CTAB/hexanol/isooctane 계 역미셀에서 단백질의 회수에 미치는 pH, 염 및 이온강도의 영향을 조사하였다. 먼저 50 mM CTAB를 사용하여 pepsin은 pH5에서, BSA와 ribonuclease-a는 pH12에서 용해시킨 역미셀을 pH와 KCl의 이온강도가 각기 다른 수용액과 접촉시켰을 때 회수되는 정도를 Fig.7 및 8에 나타내었다.

1.0M KCl 조건에서 pH의 영향을 Fig.7에서 살펴보면 pepsin의 경우 pH6 이하의 영역에서는 거의 완전히 회수되나 pH6 이상의 영역에서는 20%의 수준밖에 회수되지 않았으며, ribonuclease-a의 경우에는 모든 pH 영역에서 100% 회수되었다. 한편, BSA의 경우 pH11 이하에서도 역미셀로부터 단백질이 desolubilization되지만 역미셀용액층과 수용액층 사이의 경계면에 흰 gel층

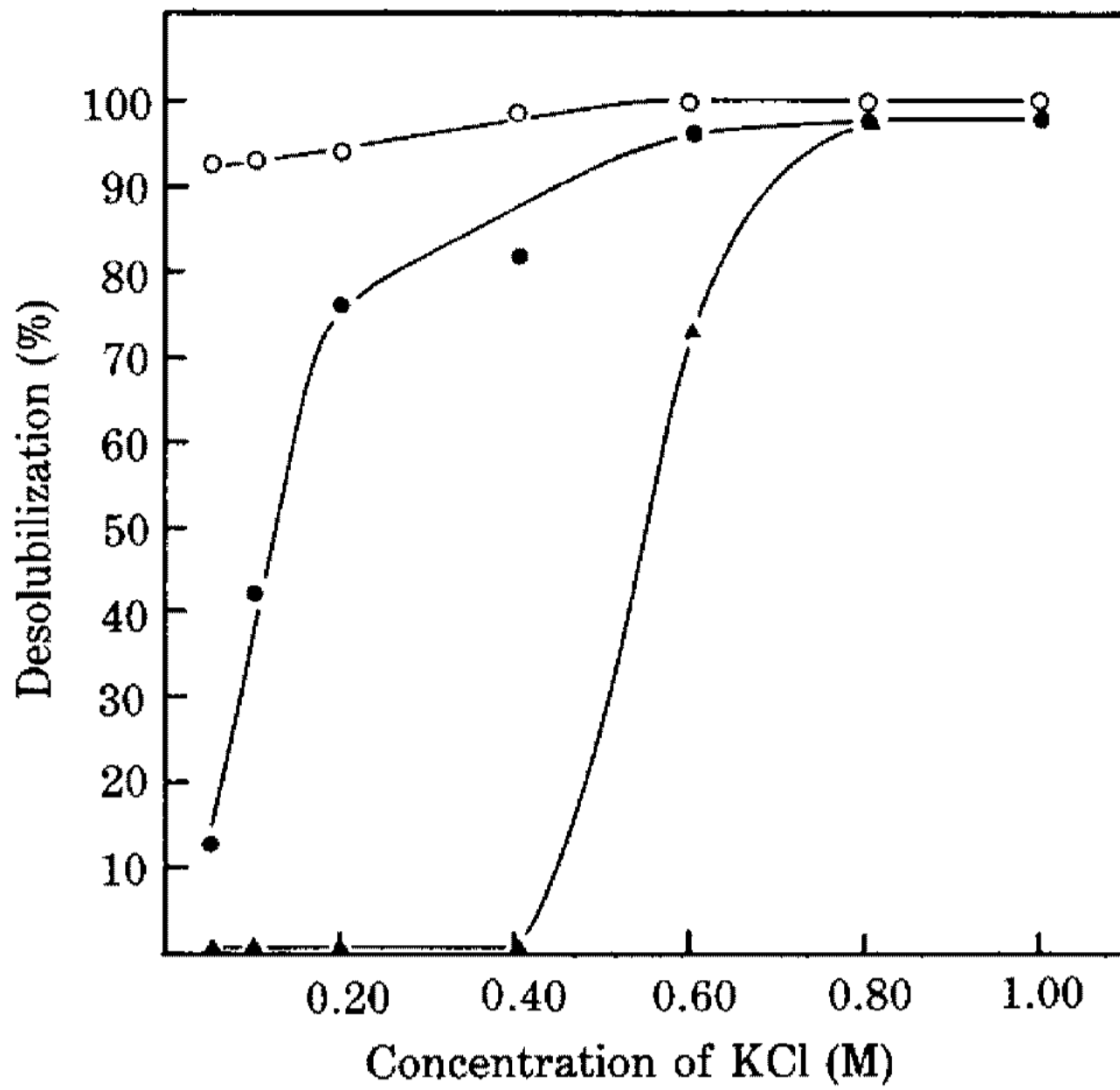


Fig. 8. Effect of KCl concentration on protein desolubilization
▲; BSA ●; pepsin ○; ribonuclease-a

을 형성하여 수용액상으로 회수할 수 없었고, pH11 이상에서야 수용액상으로의 100% 회수가 가능하였다. 이러한 중간층의 손실은 Goklen(8)의 α -chymotrypsin 이나 α -chymotrypsinogen 의 연구에서도 보고되고 있으며 회수과정에서 단백질의 변성에 의한 것으로 추측된다.

한편 Fig.8에서 단백질의 회수에 미치는 이온강도의 영향을 살펴보면 전반적으로 이온강도가 증가함에 따라 회수율이 증가하여 용해와는 반대경향을 보였다. 단백질의 종류에 따라서는 분자량이 작은 ribonuclease-a 의 경우 낮은 이온강도에서도 쉽게 desolubilization 되었고 그 다음이 pepsin, BSA 순으로 단백질의 분자량이 클수록 회수되기 어려웠다. 단백질의 (-)전하와 계면활성제의 (+)전하의 정전기적 인력에 의해 단백질이 역미셀에 결합되어 있는 상태에서 (-)이온들이 계면의 (+)전하에 대해 단백질의 (-)전하와 경쟁적으로 작용하여 desolubilization 이 일어나므로 분자량이 큰 단백질일수록 회수과정에서는 그만큼 더 많은 이온들을 필요로 할 것이다.

Fig. 9, 10은 KI 농도와 pH가 역미셀로부터 단백질의 회수에 미치는 영향을 나타낸 것이다. KCl의 경우와 비교할 때 용해과정에서 분리했던 KI가 회수과정에서는 보다 더 유리한 결과를 나타내었다. 즉, Fig.9에서 pH 영향을 살펴보면, KCl의 경우 pH6 이상에서 20%의 회수에 그쳤던 pepsin이 KI에서는 50% 정도를 유지했

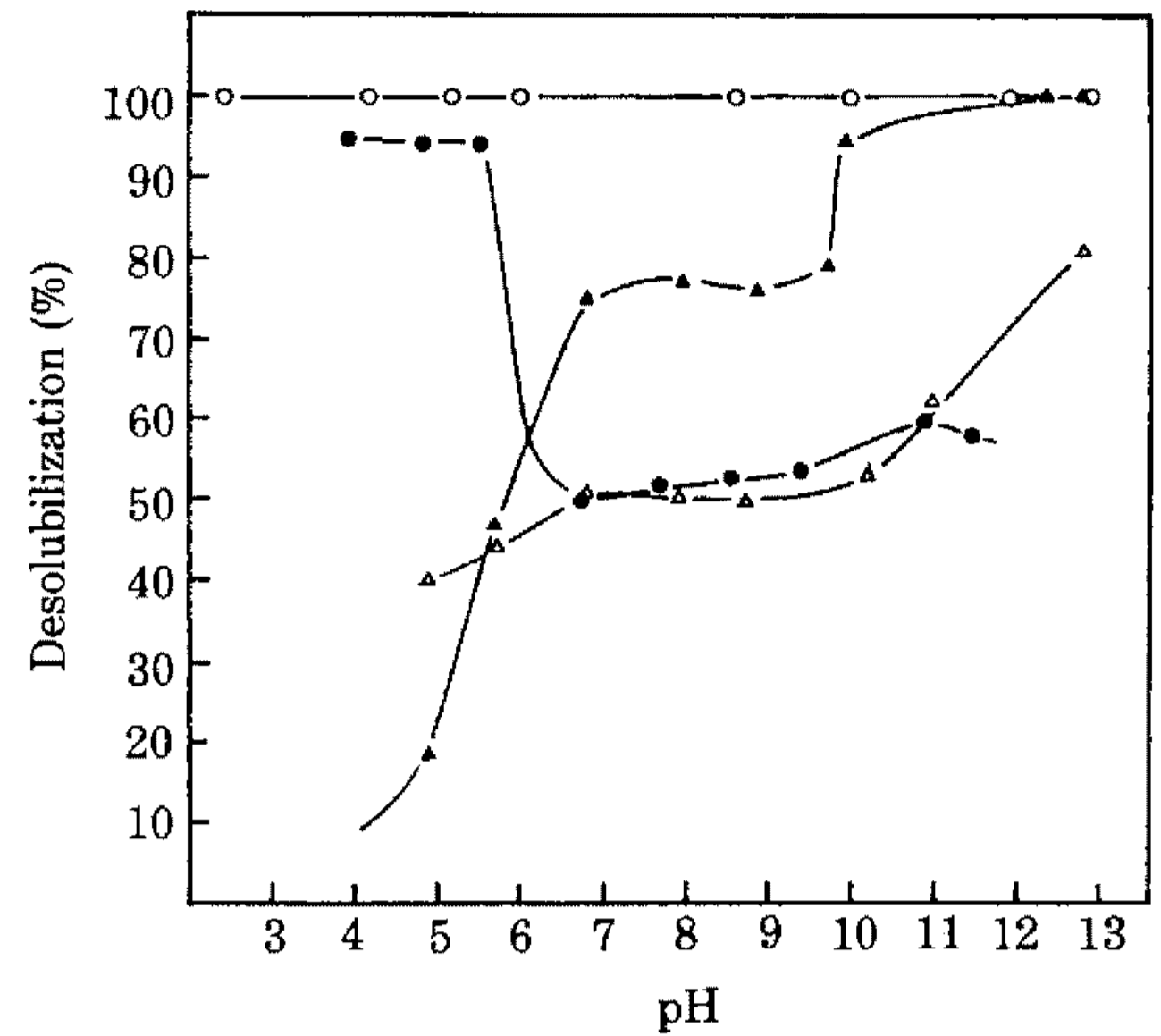


Fig. 9. Effect of pH on protein desolubilization from CTAB/hxanol/isooctance reverse micelles into 1.0 M KI aqueous solution
▲; BSA △; trypsin ●; pepsin ○; ribonuclease-a

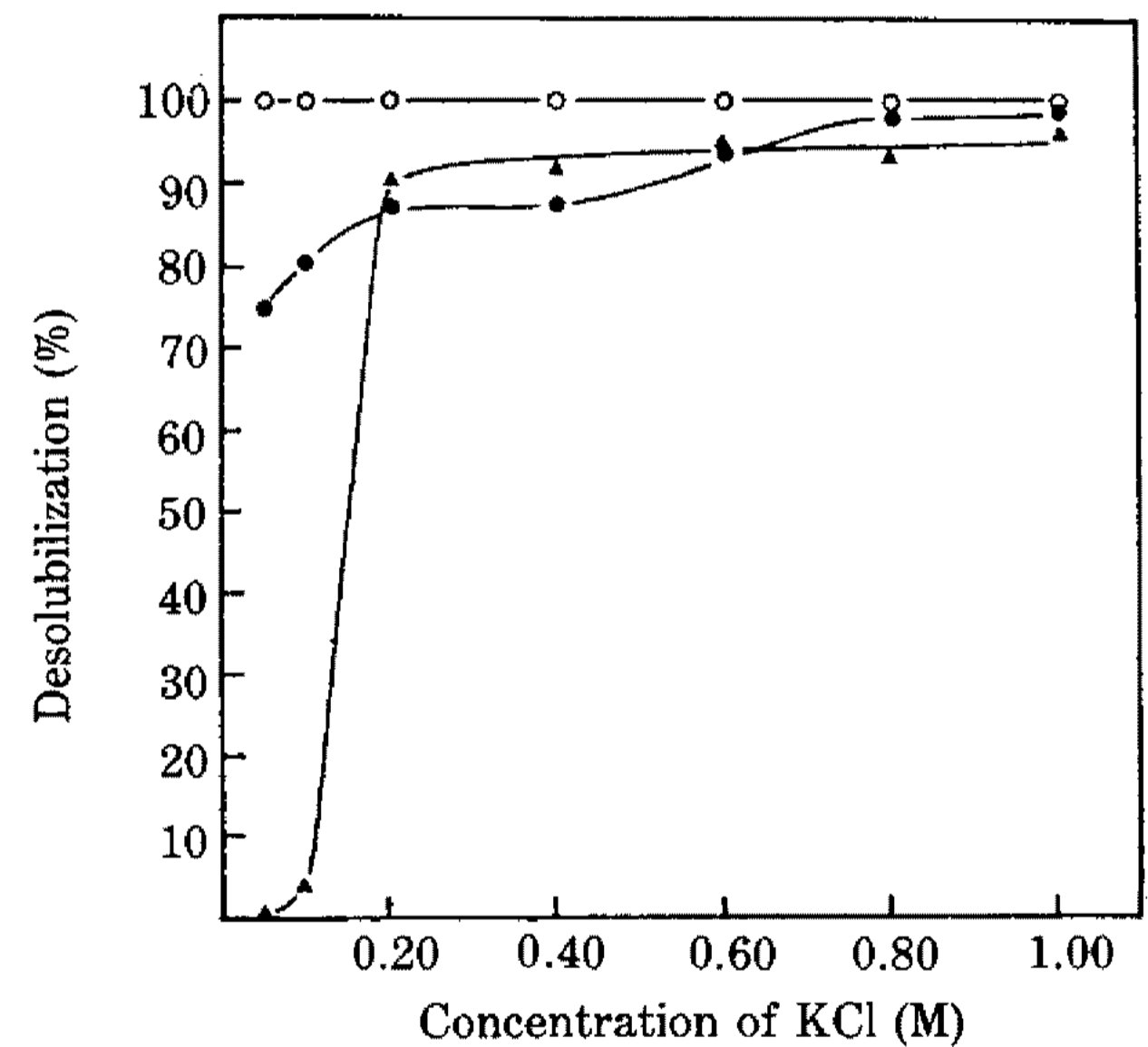


Fig. 10. Effect of KI concentration on protein desolubilization
▲; BSA ●; pepsin ○; ribonuclease-a

으며 BSA의 경우 낮은 pH에서는 여전히 중간층의 손실이 생겼으나 pH7 이상에서 회수가 가능해지면서 pH10 이상에서는 90% 이상의 회수율을 보였다. 또한, KCl에서는 중간층의 손실로 회수가 전혀 불가능하였던 trypsin이 KI의 경우 알칼리쪽으로 가면서 회수가 가능하였다. 한편, Fig.10에서 이온강도의 영향을 보면 이온강도에 따른 증감의 경향은 KCl의 경우와 비슷하지만

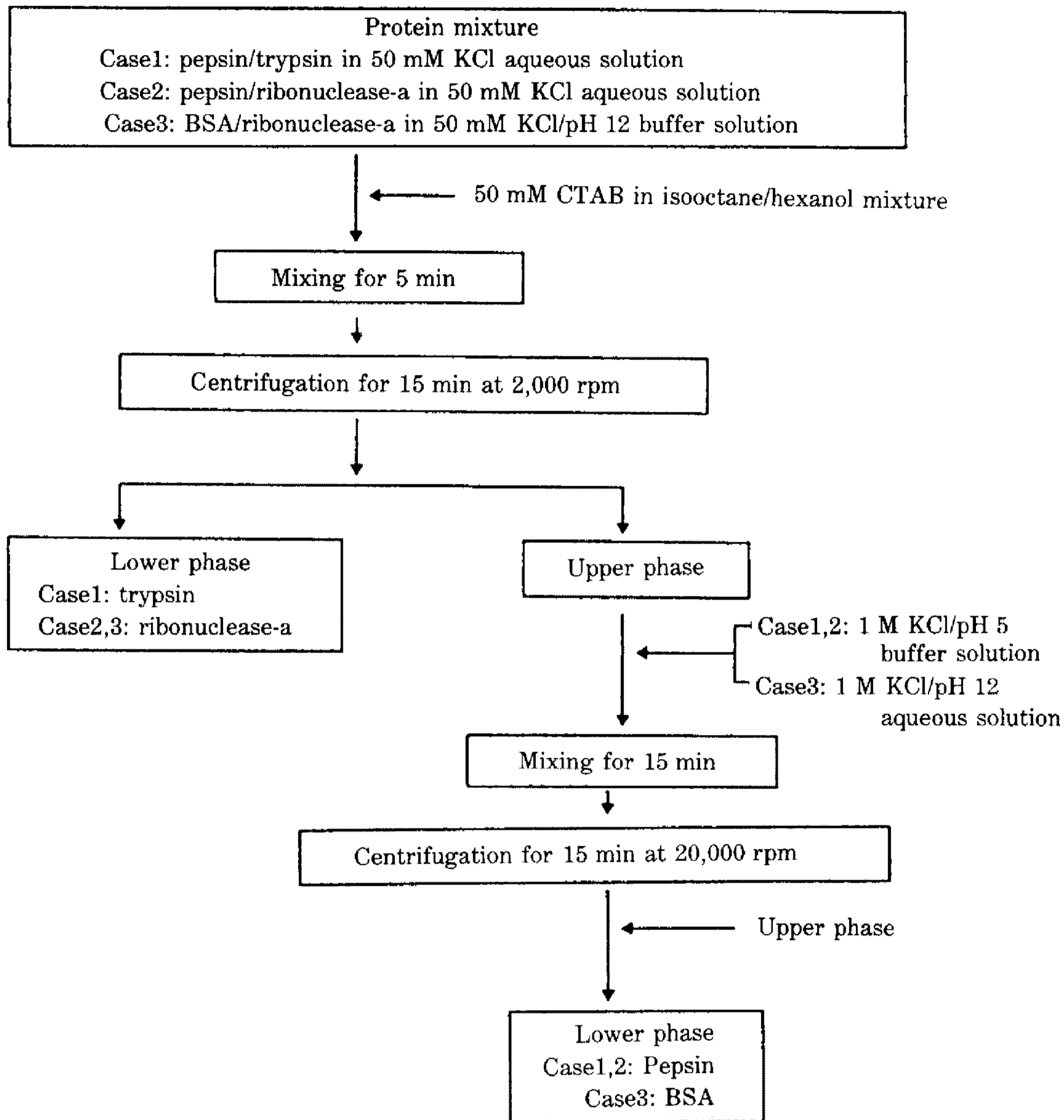


Fig. 11. Procedure for separation of protein mixture

그 회수율은 KCl보다 전반적으로 높았다. 결국, 반경이 큰 I⁻는 Cl⁻에 비해 얇은 hydration shell을 형성하여 계면과의 결합량이 많아지므로 단백질과 계면의 정전기적 결합을 해야 하는 용해과정에서는 분리하였지만 반대로 계면과 결합된 단백질이 분리되는 desolubilization 과정에서는 유리한 영향을 주게 되는 것으로 생각된다.

단백질 혼합물의 분리

이상에서 연구한 solubilization/desolubilization의 system 조건을 적당히 조절하여 단백질 혼합물로부터 각각을 선택적으로 분리할 수 있는 가능성을 검토하였다.

Pepsin/ribonuclease-a, BSA/ribonuclease-a 및

pepsin/trypsin 세 가지 모델 혼합물을 이용하여 선택적 분리를 실시하였으며 그 선정조건과 분리과정은 Fig.11에 나타내었다. 2종류의 단백질이 용해되어있는 단백질 수용액을 forward transfer 과정에서 pH와 이온강도를 적절히 조절함으로써 한 종류는 수용액상에 그대로 남겨두고 다른 한 종류만 역미셀내로 용해시킨 다음, backward transfer에서 역미셀내의 단백질을 제2의 수용액상으로 회수하였다. 분리결과는 Fig.12와 같이 전기영동으로 확인하였다. Fig.12에 표시한 lane 1, 2, 3은 각각 분리전 수용액상의 단백질 혼합물, forward transfer 한 후 수용액층에 잔존하고 있는 단백질, backward transfer 후 제2의 수용액층으로 회수된 단백질을 나타낸 것으로 각각이 선택적으로 완전히 분리되었

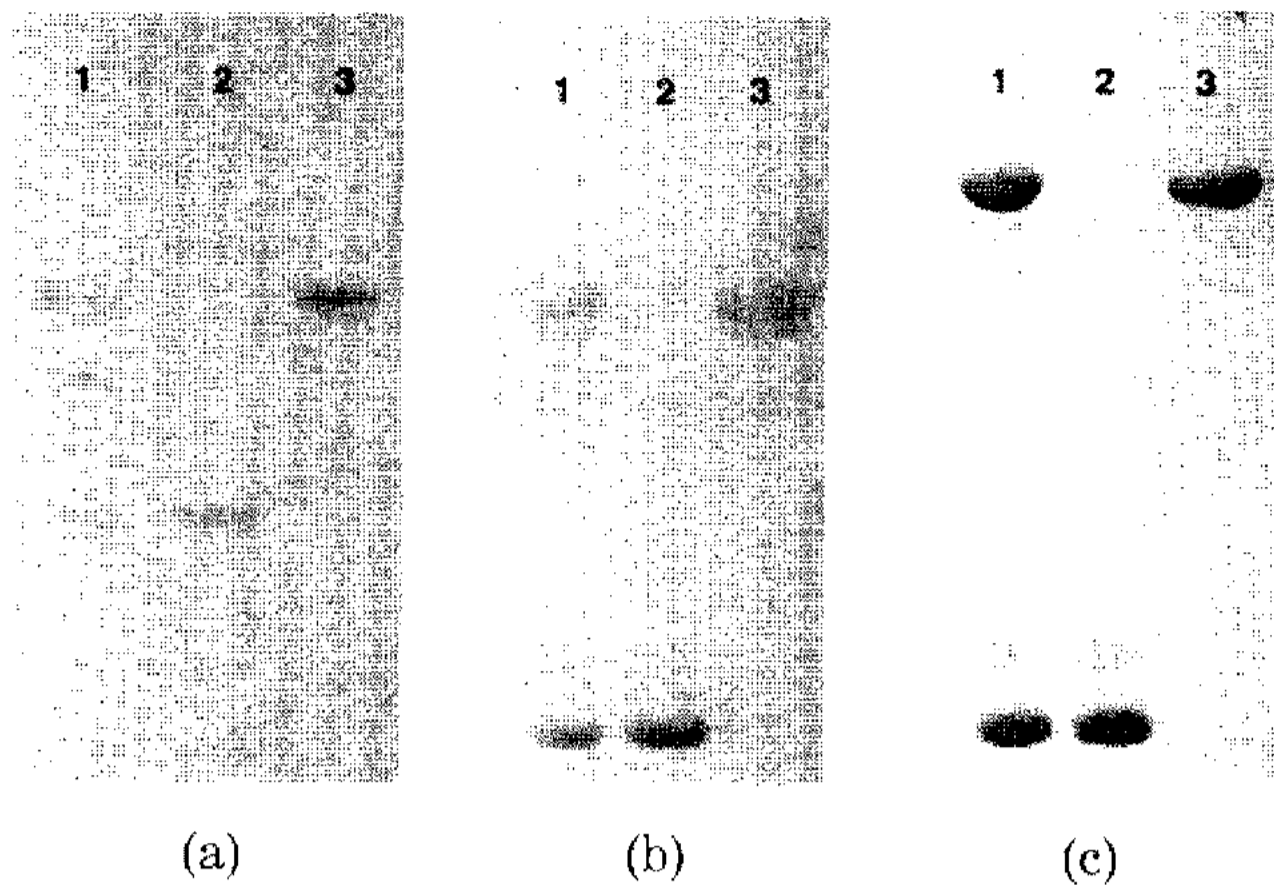


Fig. 12. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins

- (a) Pepsin/trypsin (b) Pepsin/ribonuclease-a
 (c) BSA/ribonuclease-a
 1. Protein mixture
 2. Aqueous solution after forward transfer
 3. Aqueous solution after backward transfer

음을 확인할 수 있었다.

요 약

CTAB/hexanol/isooctane 역미셀을 이용하여 단백질을 선택적으로 분리할 수 있는 분리조건을 밝히기 위해서 먼저 분자량과 등전점이 다른 여러 단백질의 용해와 회수에 미치는 pH, 이온종류 및 이온강도, 계면활성제의 종류 등 system parameters에 대해 연구 검토하였다. pH에 따른 단백질의 용해는 등전점이 낮은 pepsin이 pH5-7 이상, 등전점이 높은 lysozyme이나 ribonuclease-a는 pH11-12 이상으로 단백질이 계면활성제의 (+)전하와 반대전하인 (-)를 띠는 등전점 이상의 pH 영역에서 용해가 가능하였다. 양이온 계면활성제의 역미셀계를 이용한 단백질의 용해는 양이온에 의해서 영향받지 않았으나 계면활성제와 반대전하인 음이온에 따라 영향을 받으며, $F^- > Cr^- > Br^- > I^-$ 의 순으로 이온반경이 클수록 용해 정도가 감소하였다. KCl을 이용하여 이온강도를 증가시킨 결과 역미셀의 크기(W_0)는 거의 일정한 반면 이온에 의한 screening 효과가 증가하여 용해 정도는 전반적으로 감소하였다. 역미셀로부터 단백질의 회수는 용해에 가장 불리하였던 I^- 가 Cl^- 보다 유리하고 이온강도가 증가함에 따라 회수율이 증가하면서 800 mM 이상의 농도에서 대부분의 단백질이 100% 회수되므로 전반적으로 용해와 반대 경향을 나타내었다. 추출 및 회

수의 결과로부터 적절한 조건을 설정함으로써 BSA/ribonuclease-a, pepsin/ribonuclease-a 및 pepsin/trypsin의 혼합물들에서 이들 각각을 분리할 수 있었으며 회수된 효소의 활성은 거의 변화가 없었다.

감사의 말

본 연구는 1989년도 연세대학교 학술연구비 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참고문헌

1. Eicke, H.F., J.C.W. Shepherd and A. Stenemann: *J. Colloid Interface Sci.*, **56**, 168 (1976).
2. Atik, S.S. and J.K. Thomas: *Chem. Phys. Lett.* **79**, 351 (1981).
3. Fletcher, P.D.I., R.B. Freedman, J. Mead, C. Oldfield, B.H. Robinson: *Colloids and Surfaces* **10**, 193 (1984).
4. Misiosrowski, R.L. and M.A. Wells: *Biochemistry*, **13**, 4921 (1974).
5. Grandi, C., R. Smith and P.L. Luisi: *J. Biol. Chem.*, **256**, 837 (1981).
6. Leser, M.E., P.L. Luisi and M. Maestro: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **101**, 6731 (1986).
7. Goklen, K.E: *Doctral Thesis*. Massachusetts institute of Technology (1986).
8. Goklen, K.E. and T.A. Hatton: *Separation. Sci. Technol.* **22**, 831 (1987).
9. Rho, Y.T.: *Korean J. Food Sci. Technol.* **21**, 542 (1989).
10. Luisi, P.L., F.J. Bonner, A. Pellegrini, P. Wegat and R. Wolf: *Helv. Chim. Acta.* **62**, 740 (1979).
11. Stock, J.T.: *Amperometric Titration*, Intersci. N.Y. p.627 (1965).
12. Laemmli, U.K.: *Nature* **227**, 680 (1970).
13. Fairbranks, G., T.L. Steck and D.F.H. Wallach: *Biochemistry* **10**, 2606 (1971).
14. Townsend, A. and S. Nakai: *J. Food Sci.* **48**, 588 (1983).
15. Shaw, D.J.: *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*, Butterworths, N.Y., p.148, 3rd ed. (1980).
16. Eigenberg, D. and D. Crother: *Physical Chemistry with Application to the Life Science*, Benjamin/Communing Publishing p.377 (1979).
17. Kim, Y.S.: *Doctral Thesis*, Yonsei Univ. (1988).
18. Kitahara, A., K. Watanabe: *J. Colloid Interface Sci.* **29**, 48 (1969).
19. Kitahara, A., K. Watanabe: *J. Colloid Interface Sci.* **29**, 418 (1969).

(Received July 20, 1990)