

AOT 역미셀을 이용한 α -chymotrypsin의 가용화에 대한 연구; pH와 염의 영향

노 선 군 · †강 춘 형
전남대학교 공과대학 화학공학과, 고분자기술연구소
(접수 : 2000. 11. 20., 게재승인 : 2000. 12. 20.)

A Study on the Solubilization of α -Chymotrypsin Using AOT Reverse Micelles; Effects of pH and salts

Seon-Gyun Rho and Choon-Hyoung Kang†
Department of Chemical Engineering, Polymer Science and Technology Research Center, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
(Received : 2000. 11. 20., Accepted : 2000. 12. 20.)

Micellar aggregates are known to be useful for the selective isolation of biologically active materials such as amino acids, proteins, and enzymes from crude mixtures sparsely dispersed in water. In this study, the effects of pH, salt type and its concentration on the solubilization of α -chymotrypsin into the organic micellar phase, which consisted of AOT (sodium di(2-ethylhexyl)sulfosuccinate) and iso-octane, were comprehensively examined. It was found that maximum extraction efficiency was attained at a pH below the isoelectric point of α -chymotrypsin; at pH=5.0 for NaCl and KCl, and at pH=7.0 for CaCl₂ and MgCl₂. In order to avoid complications stemming from the precipitation of protein at low pH interfaces, the protein concentrations in the organic and aqueous phases were directly measured. The size of the micelle water pool was estimated by measuring the molar ratio of the surfactant to the water, W_0 . The resulting values of W_0 were nearly constant at 30 and 19 for NaCl and KCl, respectively, and were independent of pH. The addition of 1:2 salts like MgCl₂ and CaCl₂ led to much lower, but a constant value of, W_0 than the 1:1 salts.

Key Words : solubilization, reverse micelle, AOT, α -chymotrypsin

서 론

생물분리정제의 기술은 단백질과 핵산 등과 같은 유용한 생물학적 물질들을 혼합물로부터 분리해 내거나 농축하는 기술을 의미한다. 일반적으로 단백질과 같은 생물학적 활성을 지닌 물질들은 대량생산의 한계 때문에 매우 값비싼 생산물을 얻지 못하면 경제성이 보장되지 못한다. 따라서 높은 순도와 수율, 그리고 대량생산과 경제적인 방법으로 분리하는 새로운 분리기술의 개발이 요구되고 있다.

이러한 이유로 대량생산이 가능하고, 다단계 역류조작이 가능하다는 장점을 가진 역미셀을 이용한 액-액 추출공정이 제안되었다. 특히 역미셀을 이용한 추출공정은 생물학적 물

질들의 활성을 유지시키면서 빠른 시간 내에 많은 양의 생물학적 물질, 특히 단백질을 추출할 수 있다는 장점을 가지고 있기 때문에 많은 연구가 진행되고 있다(1~6).

역미셀을 이용한 단백질 분리는 유기상으로의 가용화 과정과 다시 과잉 수용액상으로의 역추출 과정의 두 단계로 이루어진다. 가용화 과정에서는 여러 변수에 의해 선택적 분리가 이루어질 수 있는데, 수용액상의 pH, 염의 종류와 농도, 계면활성제의 구조와 농도 등이 큰 영향을 미친다고 알려져 왔다. 더욱이 단백질의 가용화에서는 고유의 등전점으로 인하여 수용액상의 pH, 염의 종류와 농도 등이 큰 영향을 미치게 된다. 이외에 완충용액의 농도, 계면활성제의 종류와 농도, 수용액상과 유기상의 부피 비, 유기상의 종류와 농도 등의 영향에 대한 연구 결과도 보고되고 있으며(7,8), 미셀 크기에 의한 구조적 영향에 대한 연구도 진행되고 있다(8,9).

역미셀 상은 단백질을 포함한 수용액상과 계면활성제를 포함한 유기상이 접촉하여 형성된다. 특히 음이온 계면활성제인 AOT의 경우에는 음이온의 친수성 머리부분과 양이온을 띤 소수성 꼬리부분으로 구성되는데 친수성 머리부분의 유기

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering and Polymer Science and Technology Research Center, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1818, Fax : +82-62-530-1819
E-mail : chkang@chonnam.ac.kr

용매와의 상호작용과 소수성 꼬리부분의 물과의 반발력으로 인하여 polar inner core를 형성하게 된다. 이러한 water-in-oil microemulsion의 집합체를 역미셀이라고 하며 역미셀들의 inner core에 내포된 약간의 물로 구성된 water pool에 수용성 생체물질(단백질)이 위치하게 되므로 유기용매 속에서도 생체물질의 활성을 유지하게 한다. 적당한 조건 하에서 역미셀이 형성되면 소수성 부분의 꼬리들이 수용액과의 반발력에 의해 유기상으로 이동하게 되며, 이런 원리를 이용하여 수용액상에 녹아있는 단백질을 유기상으로 추출할 수 있게 되는 것이다.

형성된 역미셀의 크기는 계면활성제 종류와 농도, 염의 종류와 농도 등에 따라 결정된다. 역미셀의 내부 core는 단백질 분자와 water pool로 형성되어 있으므로 유기상의 수분함량을 측정함으로써 추산할 수도 있다(6,11,15). 유기상의 수분함량은 물과 계면활성제 몰 비인 $W_0(=[H_2O]/[AOT])$ 로 나타내며 역미셀의 크기인 water pool의 반경은 머리부분을 포함한 역미셀의 water core의 평균반경인 R_{wp} 로 표현된다.

$$R_{wp}[nm] = (3V_w / \Sigma) W_0 \quad (1)$$

여기서 V_w 는 단일 물분자의 부피($\approx 0.03 \text{ nm}^3$)이고, Σ 는 계면에서 계면활성제 한 분자가 차지하는 면적을 나타낸다. V_w 와 Σ 는 거의 일정하기 때문에 W_0 값이 이에 독립적이라고 가정하면 역미셀 크기를 쉽게 구할 수 있다. 기존의 연구들에서는 여러 W_0 값에 대하여 비교적 작은 단백질이 포함된 역미셀의 구조적인 매개변수들을 결정하였다(9,10,12,14).

이와 같이 역미셀을 이용한 단백질의 액-액 추출에 대한 연구가 광범위하게 진행되어 왔으나, 추출공정에 미치는 모든 변수들의 영향들을 정확하게 파악하기는 매우 어려운 일이다. 그러므로 본 연구에서는 단백질 가용화 공정에 미치는 영향들을 파악하고자 수용액상에 녹아있는 수용성 단백질인 α -chymotrypsin을 음이온 계면활성제인 AOT와 iso-octane으로 이루어진 water-in-oil(w/o) 역미셀의 유기상으로 분리하고 이때 영향을 미치는 여러 가지 요인들의 영향을 연구하였다. 특히 수용액상에 존재하는 수용성 단백질을 유기상으로 가용화시킬 때 추출 변수인 pH, 염의 종류와 농도에 따른 가용화 효율을 관찰하였으며 그때의 역미셀 크기를 결정하였다. 더욱이 수용액상의 조건에 따라 단백질이 가용화되지 못하고 유기상과 수용액상 간의 계면에 영키게되는 경우도 있으므로 (13) 본 연구에서는 수용액상과 유기상의 농도를 직접 분석하여 가용화 효율을 결정하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에는 Sigma사로부터 구입한 분자량이 25,000이고 등전점이 8.3인 수용성 단백질 α -chymotrypsin(from bovine pancreas, c-4129)을 모델 단백질로 사용하였다. 역미셀을 형성하는 양친매성 음이온 계면활성제 AOT는 Sigma 사로부터 구입하였으며 유기용매인 iso-octane(99.0% 이상)은 YAKURI 사로부터 구입하였다. KCl과 NaCl은 각각 Sigma사와 JUNSEI 사로부터 구입하였으며, 1:2염은 YAKURI사로부터 구입하였다. 위의 시약들은 모두 더 이상의 정제과정 없이 사용하였다.

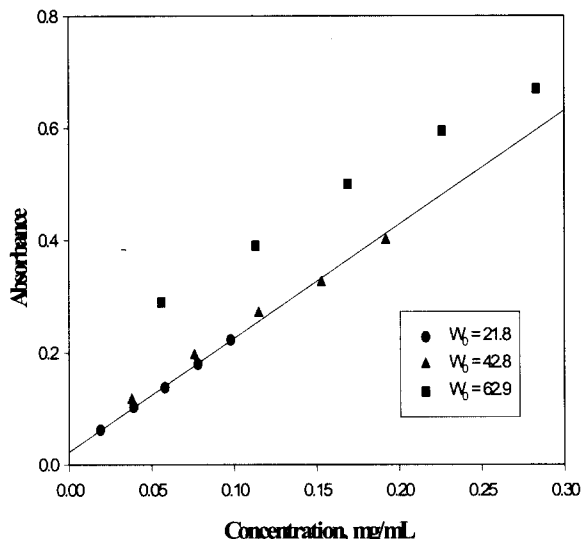


Figure 1. A_{280} Calibration curve for α -chymotrypsin in organic phase.

수용액상에 사용된 완충용액은 초순수 제조기를 이용하여 제조한 18 M Ω 이상의 물을 사용하여 acetate 완충용액, phosphate 완충용액, 그리고 glycine-NaOH 완충용액을 제조하여 사용하였다.

실험

단백질 추출에 사용된 수용액상은 완충용액과 적당한 염의 농도, 그리고 1 mg/mL의 단백질로 이루어져 있다. 완충용액은 약 pH=5.6까지는 acetate 완충용액을 사용하였고, pH=6~9까지는 phosphate 완충용액, pH=9~11까지는 glycine-NaOH 완충용액을 사용하였다. 완충용액의 농도는 20 mM로 유지하였으며 유기상은 50 mM AOT/iso-octane으로 이루어져 있다.

실험은 수용액상과 유기상을 각각 5 mL씩 접촉시킨 후 자석식 교반기를 사용하여 700 rpm에서 2시간 정도 혼합하고 원심분리기(3000 rpm)를 이용하여 15분 정도 상분리 시킨 뒤 20°C로 유지되는 항온조에 2~3일 정도 방치하였다.

분석

상분리가 완전히 이루어진 후, 수용액상과 유기상으로부터 각각의 시료를 채취하여 280 nm에서 UV-분광광도계(Bausch & Lomb사의 Spectronic21)를 이용하여 잔류 단백질의 농도를 분석하였다.

가용화 효율을 결정하기 위하여 수용액상의 잔류 농도와 유기상의 농도를 직접 측정하였다. 특히, 유기상에는 유기용매와 계면활성제 뿐만 아니라 역미셀 안에 존재하는 물을 포함하기 때문에 UV-분광광도계를 이용하여 유기상의 단백질 농도를 결정하기 위해서는 물이 UV흡광도에 미치는 영향을 고려해야 한다. Figure 1에서 보는 바와 같이 W_0 값이 약 21.8 이하에서 UV(280 nm)의 흡광도 값이 단백질 농도에 대하여 선형관계를 나타내지만 W_0 값이 증가하게 되면 UV의 흡광도 값이 농도와 선형관계에서 벗어나게 되어 분석이 매우 복잡해지므로 W_0 값이 선형인 범위를 벗어나는 경우에는 유기상을 희석하여 W_0 값이 21이하인 조건을 유지하여 분석하였다.

또한 유기상의 수분함량은 Denver Instrument사의 model

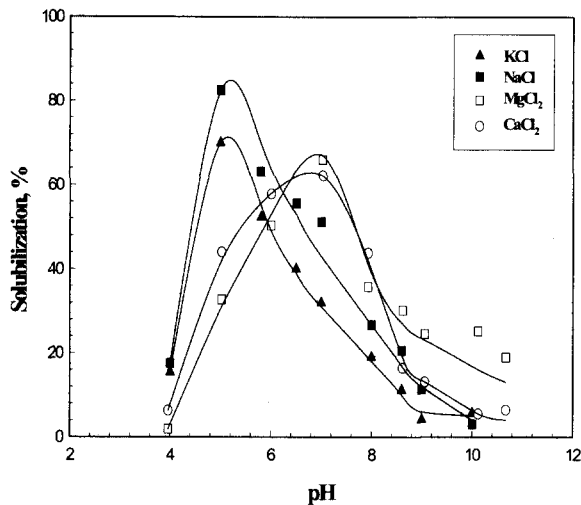


Figure 2. Effects of pH and salt types on solubilization of 1 mg/mL α -chymotrypsin.(0.1 M salt)

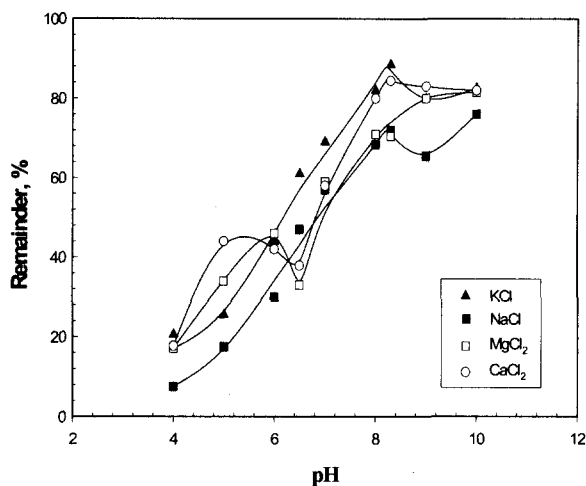


Figure 3. α -chymotrypsin remained in the aqueous phase after solubilization.(0.1 M Salt)

150 titration controller가 부착된 Coulometric Karl-Fisher titrator를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

pH에 대한 영향

Figure 2는 수용액상의 염의 종류와 pH변화에 따른 단백질 가용화 효율의 변화를 보여주고 있다. 모든 염은 최고의 가용화 효율을 나타내는 점을 보였다. 가용화 효율은 유기상의 농도를 수용액상에 남아있는 단백질 농도와 비교하면 가용화되어 유기상에 존재하거나, 수용액상에 가용화되지 않고 잔류하는 양이 초기 농도와 같지 않은 경우가 있으며 이는 계면에 영킴으로 존재하거나 침전된 양이 있음을 알 수 있다. 1:1염인 KCl과 NaCl의 경우에는 pH=5 근처에서 최고의 가용화 효율을 보였다. 특히 최고점 이하의 pH에서 가용화가 급격하게 증가하였으며 pH=5 이상에서는 점진적인 가용화 효율의 감소를 보였다. 또한, 일정한 pH 조건에서는 NaCl의

경우가 KCl 경우보다 더 높은 가용화 효율을 나타내었다. 그러나 Figure 3에 나타낸 바와 같이, 가용화 후 수용액상에 잔류하는 단백질 농도는 KCl인 경우에 NaCl 경우보다 더 높으므로 KCl 가용화 효율은 더 낮게 된다.

한편 1:2염인 MgCl₂와 CaCl₂의 경우에는 pH=7 근처에서 최고 가용화 효율을 보였으며 pH=7 이하에서는 pH가 증가함에 따라 가용화 효율은 차츰 증가하였으나 등전점에 가까워질수록 가용화 효율은 감소함을 알 수 있었다. 특히 단백질의 순전하는 등전점 이상의 pH에서는 음이온을 띄게 되어 단백질의 생물학적 활성을 잃게 되기 쉽기 때문에 등전점 이상의 pH에 대한 결과의 실제적인 활용에는 상당한 주의가 필요할 것이다. 1:2염의 경우 수용액상에 존재하는 양은 1:1염과 같이 뚜렷한 상관관계를 나타내지 않는다. 수용액상에 존재하는 단백질 양은 pH가 증가할수록 증가하지만, 유기상의 가용화 효율은 최고점이 존재하는 다른 관계를 나타내고 있다. 이런 현상은 계면에서 침전에 의한 영향으로 유추할 수 있다.

실험 결과로부터 NaCl이 KCl보다 훨씬 효과적임을 알 수 있었으나, 단백질의 활성을 유지하기 위해서는 NaCl보다 KCl을 사용하는 것이 더욱 효과적이라고 알려져 있다(1, 13, 15). 그러므로 최대한의 활성을 유지하면서 가용화 효율을 높일 수 있는 최적 조건 변수 중에서 염의 종류가 매우 중요한 요인임을 알 수 있다.

한편, 최고점 이하의 pH에서 CaCl₂가 MgCl₂보다 더 높은 가용화 효율을 보인 반면, 최고점 이상의 pH에서는 MgCl₂가 더 높은 가용화 효율을 보였다. 이는 최고점 이하의 pH에서 CaCl₂의 경우가 MgCl₂ 경우보다 단백질과 계면활성제 사이의 상호 작용하는 인력이 더 크기 때문이다. 또한 pH=6 이하의 비교적 낮은 범위에서는 1:1염이 1:2염보다 더 높은 가용화 효율을 보이는데 반해 pH=6 이상에서는 1:2염이 더 높은 효율을 보임을 알 수 있었다. 이러한 염 종류에 따른 가용화의 결과는 계면에서의 계면장력이 염의 종류에 따라 서로 다르기 때문에 염의 분배계수에 대한 영향으로부터 기인하는 것으로 추정할 수 있다.

염 농도에 대한 영향

염의 농도가 매우 낮은 경우에는 작은 양이나 AOT가 수용액상에 존재할 수 있으며, 이온강도가 강해지면 모든 AOT는 유기상에 존재하게 된다. Heptane을 사용한 이전의 실험(16)에서 NaCl이 0.02 M 이하에서는 AOT가 완전히 수용액상에 존재하고 0.07 M 이상에서는 모든 AOT는 유기상에 존재한다고 알려져 있다. 이는 이온강도가 증가함에 따라 AOT 친화력은 유기상에 호의적으로 변하기 때문이다. 본 실험에서도 매우 낮은 염 농도에서 AOT가 수용액에 용해되어 수용액상이 혼탁해지는 현상이 관찰되었으며 이 경우에는 더 이상 액-액 상분리 실험을 수행할 수 없었다.

Figure 4는 pH=5로 일정하게 유지하고 염의 종류와 농도에 따른 가용화 효율의 변화를 관찰한 결과이다. 염의 종류에 관계없이 모두 최고점을 나타내었으며 낮은 염의 농도에서는 가용화 정도는 약간 감소하지만 약 0.1 M 근처에서 모든 염의 경우에 최고의 가용화 효율을 나타내었다. 또한, 최고점 이상의 염 농도에서는 농도가 증가함에 따라 가용화 효

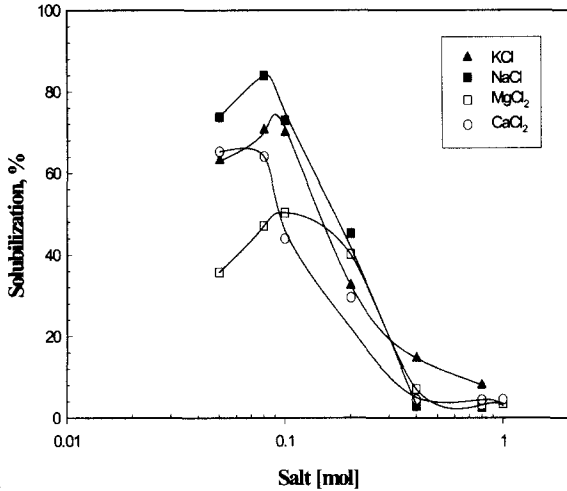


Figure 4. Effects of salt type and its concentration on solubilization of 1 mg/mL α -chymotrypsin.(pH=5)

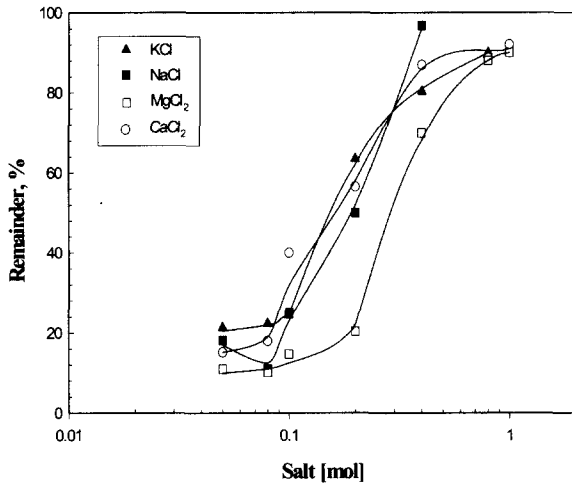


Figure 5. α -chymotrypsin remained in the aqueous phase after solubilization.(pH=5)

율은 점차 감소하는 경향을 보였다. 염의 농도에 따른 수용액에 남아 있는 단백질의 농도 또한 가용화 효율과 비슷한 양상을 보여주고 있으며 염의 농도가 증가할수록 최고점 0.1 M 이상에서 가용화 효율이 감소하였다.

Figure 5는 가용화 후 수용액에 잔류하는 염의 농도를 나타낸 것이다. 이 그림으로부터 수용액상에 남아있는 단백질 농도 또한 0.1 M에서 최소점을 나타내고 그 이상의 농도에서는 농도에 따라 남아있는 단백질 양도 증가함을 알 수 있다. 그러나 매우 낮은 염 농도에서는 용액이 혼탁하게 되어 분석이 불가능하여 더 이상의 실험 진행이 어려웠다. 이는 위에서 설명한 바와 같이, 계면활성제인 AOT가 유기상과의 친화력이 점차 감소하여 수용액상에 잔류하기 때문이다.

1:1염의 경우에는 일반적으로 KCl보다 NaCl이 높은 가용화 효율을 보여 주었다. KCl의 경우에는 약 0.4 M 이상의 농도에서는 다른 염들에 비해 가용화 효율이 약간 높았으나, 높은 염 농도에서는 염의 종류에 관계없이 모두 약 5% 정도의 매우 낮은 가용화 효율을 보였다. 이는 매우 높은 염 농

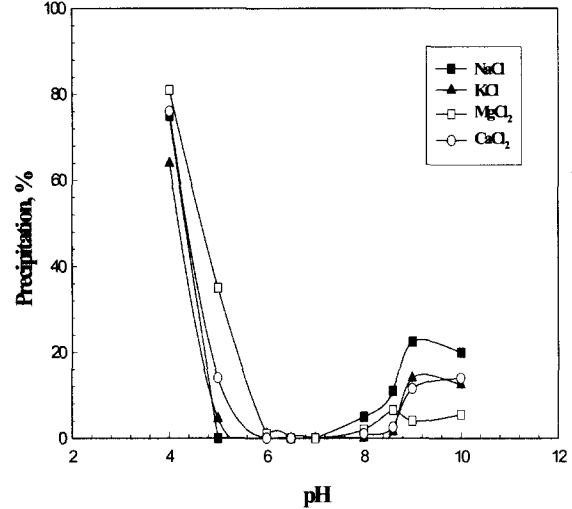


Figure 6. Effects of pH and salt type on precipitation of 1 mg/mL α -chymotrypsin.(0.1M salt)

도에서 수용액상의 전하밀도가 증가하여 단백질과 계면활성제 사이의 상호작용하는 인력이 급격히 감소함을 보여주는 결과이다. 특히 1:2염의 경우 CaCl₂가 MgCl₂보다 약 0.1 M 이하에서 더 높은 가용화 효율을 보이지만 0.1 M 이상의 농도에서는 MgCl₂가 더 높은 가용화 효율을 보였다. 또한 최대 가용화효율을 보이는 염의 농도 이상에서는 CaCl₂ 경우보다 MgCl₂ 경우보다 더욱 급격한 감소를 보였다.

계면에서의 침전

본 연구의 결과인 Figure 6은 수용액상과 유기상 사이의 계면에서 단백질이 침전되어 있는 정도를 보여주고 있다. 침전의 정도는 초기 수용액상에 존재하는 단백질 농도에 대해 유기상과 수용액상을 접촉한 후 두 상의 농도를 분석하여 초기 단백질 농도와와의 차이로 나타내었다. 두 상의 단백질 농도를 직접 분석함으로써 수용액상의 농도만을 분석하고 침전이나 영킴을 무시하여 가용화 효율을 결정한 종전의 연구방법들에 필연적으로 포함되어 있는 오차를 배제할 수 있었다. 낮은 pH에서 수용액상과 유기상 모두에서 매우 작은 양의 단백질만이 검출되어 초기 단백질농도와 비교하면 대부분의 단백질이 계면에 침전되어 있음을 알 수 있었다. 특히, 계면에 많은 양의 단백질이 존재함으로써 수용액상은 혼탁함을 보일 가능성이 매우 높아지게 된다. 본 연구에서도 낮은 pH에서의 단백질 가용화 실험은 수용액상의 혼탁으로 인하여 더 이상 수행할 수 없었다. 이는 역미셀들이 아주 작은 water droplet을 가지는 microemulsion을 형성하지 못하게 되어 대부분의 단백질이 계면에 침전되어 emulsion 용액을 형성하므로 용액이 혼탁하게 보이기 때문이다.

Figure 7은 각 염의 농도에 따른 계면에서의 침전 정도를 나타낸 그림이다. 이 그림으로부터 염의 농도에 따른 침전의 정도는 1:1염인 KCl과 NaCl의 경우 염 농도에 관계없이 침전의 양이 거의 일정함을 알 수 있다. 그러나 1:2염인 MgCl₂ 경우에는 염의 농도가 증가할수록 침전 및 계면에 영킴으로 존재하는 양이 감소함을 알 수 있다. 침전 양이 감소한다는 것이 곧바로 가용화 효율이 높다는 것을 의미하지는 않는다.

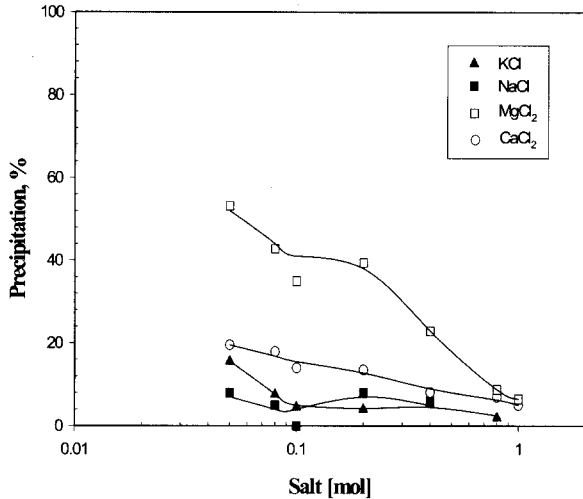


Figure 7. Effects of salt type and its concentration on precipitation of 1 mg/mL α -chymotrypsin.(pH=5)

이는 가용화가 거의 일어나지 않아서 역미셀 형성이 없는 경우를 나타낼 수도 있기 때문이다. 낮은 염의 농도에서 침전 및 계면에 존재하는 양이 많은 것과 또한 염이 첨가되지 않은 조건에서도 수용액상의 혼탁현상과 계면에서의 엉킴 현상이 나타나는 것은 염이 가용화 과정에서 계면과 대전된 단백질 분자 사이의 전기적 상호작용을 감소시켜 계면에서의 침전현상이 해소되기 때문이다.

이런 이유로 본 연구에서는 pH의 조절과 염을 첨가하여 염 농도에 대한 실험을 행하였다. Figure 6과 같이 pH=5 이하의 낮은 pH에서는 단백질의 침전이 많이 생성됨을 알 수 있었다. 또한 pH가 증가함에 따라 침전의 정도는 급격히 감소하였으며 pH=6 근처에서부터 더 이상의 침전은 확인되지 않았다. 그러나 등전점 이상의 높은 pH에서는 작은 양이지만 침전현상이 다시 나타나기 시작했으며 약간 증가하는 형태를 보였다. 이 결과를 Figure 2와 비교하면 계면에서의 침전은 가용화 효율에 큰 영향을 미치고 있음을 알 수 있었으며 종합적으로 낮은 pH와 등전점 이상의 높은 pH에서는 가용화 효율이 매우 낮음을 알 수 있다.

역미셀의 크기

물리적 성질인 역미셀의 크기는 water pool의 반경 향으로 표현 할 수 있으며 alkyl 사슬의 꼬리부분을 제외한 머리부분과 water core를 포함하고 있는 부분의 평균 반경으로 나타낼 수 있다. 본 연구에서는 Coulometric Karl-Fisher titrator를 이용하여 물과 계면활성제의 물 비인 $W_0 = [H_2O]/[AOT]$ 값을 구함으로써 식 (1)로부터 쉽게 역미셀의 크기를 구할 수 있다.

Figure 8과 같이 1:1염인 NaCl의 경우 W_0 값은 약 30의 거의 일정한 값을 나타내지만 KCl의 경우는 pH가 증가함에 따라 약 10에서 5로 점차 감소하는 경향을 보여 주었다. 이로부터 유기상의 미셀 크기는 NaCl의 경우가 KCl의 경우보다 훨씬 크다는 것을 알 수 있으며 큰 단백질을 분리에는 NaCl이 KCl보다 효과적으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 또한 1:2염인 MgCl₂와 CaCl₂의 경우 W_0 값은 모두 10 이하의 매우 작은 값을 나타내었으며 MgCl₂의 경우가 CaCl₂ 보다

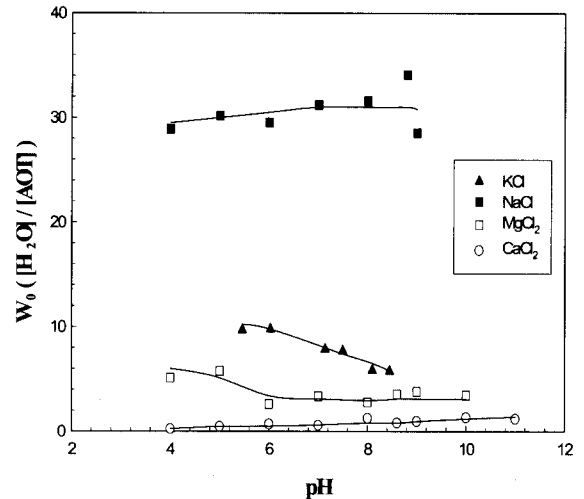


Figure 8. Effects of pH and salt type on W_0 of 1 mg/mL α -chymotrypsin.(0.1 M salt)

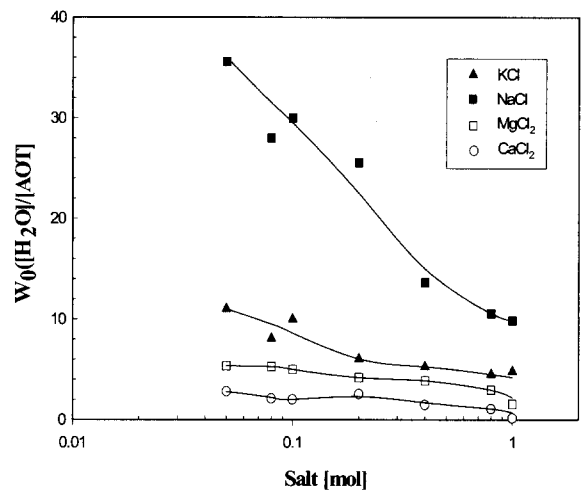


Figure 9. Effects of salt type and its concentration on W_0 of 1 mg/mL α -chymotrypsin.(pH=5)

약간 큰 W_0 값을 나타내었다.

Figure 9의 염의 농도에 따른 W_0 값의 결과로부터 염의 농도에 관계없이 1:1염인 KCl과 1:2염인 MgCl₂와 CaCl₂의 경우는 W_0 값이 거의 일정하지만 농도가 증가할수록 약간 감소함을 알 수 있었다. 그러나 NaCl의 경우에는 농도에 따라 큰 폭의 감소를 나타내고 있음을 알 수 있다. 이것은 염의 농도가 커질수록, 다시 말해서, 이온세가 증가할수록 하전된 단백질 분자와 계면활성제 극성부분 사이의 인력은 감소하고 따라서 크기가 작은 역미셀을 형성하게 된다는 것을 의미한다.

그러나 본 연구에서 사용된 비교적 분자량이 작은 단백질인 α -chymotrypsin의 경우에는 가용화 효율을 W_0 값과 비교할 때 미셀 크기가 가용화에 미치는 결정적인 변수는 아님을 알 수 있다.

요 약

미셀 집합체들이 수용액에 존재하는 혼합물로부터 아미노

산, 단백질, 그리고 효소와 같은 생물학적 물질의 선택적인 추출에 유용하게 사용될 수 있음은 널리 알려져 있다. 본 연구에서는 가용화 과정에 영향을 미치는 변수들을 확인하기 위하여 AOT와 iso-octane의 유기상에서의 α -chymotrypsin 가용화에 대하여 pH의 영향, 염의 종류와 염의 농도의 영향을 연구하였다. NaCl과 KCl에 대하여서는 pH=5.0에서 최대 효율을 나타내며, MgCl₂와 CaCl₂에 대해서는 pH=7.0에서 최대 효율을 나타내었는데 이와 같은 조건은 모두 α -chymotrypsin의 등전점 이하 영역이다. 낮은 pH에서는 계면에 단백질이 광범위하게 침전되거나 영킴현상이 나타나기 때문에 유기상에서의 단백질 농도를 직접 측정하여 실험오차를 줄였다. 미셀의 water pool 크기는 물에 대한 계면활성제의 몰 비(W₀)를 측정하여 추산하였다. 1:1염인 NaCl과 KCl에 대하여 W₀ 값은 각각 30과 19로 거의 일정하고 MgCl₂와 CaCl₂의 1:2염에 대하여서는 1:1염의 W₀값보다 훨씬 작은 5 이하의 값을 나타내었다.

REFERENCES

1. Marcozz. G., N. Correa, P. L. Luisi, and M. Casell (1991), Protein Extraction by Reverse Micelles: A Study of the Factors Affection the Forward and Backward Transfer of α -Chymotrypsin and Its Activity, *Biotech. Bioeng.*, **38**, 1239-1246.
2. Dekker. M., K. V. Piet, B. H. Bijsterbosch, P. Fijneman, and R. Hilhorst (1990), Mass Transfer Rate of Protein Extraction with Reversed Micelles, *Chem. Eng. Sci.*, **45(9)**, 2949-2957.
3. Abbott. N. L. and T. A. Hatton (1988), Liquid-Liquid Extraction for Protein Separations, *Chem. Eng. Prog.*, August 31-41.
4. Andrews. B. A., D. L. Pyle, and J. A. Asenjo (1994), The Effect of pH and Ionic Strength on the Partitioning of Four Proteins in Reverse Micelles Systems, *Biotech. Bioeng.*, **43**, 1052-1058.
5. Kadam. K. L. (1986), Reverse micelles as a bioseparation tool, *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 266-273.
6. Dekker. M., and M. E. Leser (1994), Highly Selective Separation in Biotechnology (Street, G.Ed.), pp. 86-120, Blackie Academic & Professional an imprint of Chapman & Hall.
7. Ichikawa. S., M. Imai, and M. Shimizu (1992), Solubilizing Water Involved in Protein Extraction Using Reversed Micelles, *Biotech. Bioeng.*, **39**, 20-26.
8. Lye. G. J., J. A. Asenjo, and D. L. Pyle (1995), Extraction of Lysozyme and Ribonuclease Using Reverse Micelles: Limits to Protein Solubilization, *Biotech. Bioeng.*, **47**, 509-519.
9. Zampieri. G. G., H. Jackle, and P. L. Luisi (1986), Determination of the Structural Parameters of Reverse Micelles after Uptake of Proteins, *J. Phys. Chem.*, **90**, 1849-1853.
10. Rahaman. R. S. and T. A. Hatton (1991), Structural Characterization of α -Chymotrypsin Containing AOT Reversed Micelles, *J. Phys. Chem.*, **95**, 1799-1811.
11. Rabie. H. R. and J. H. Vera (1996), Generalized water uptake modeling of water- in-oil microemulsion. New experimental result for Aersol-ot-iso-octane-water-salts system, *Fluid Phase Equilibria*, **122**, 169-186.
12. Wolbert. R. B. G., R. Hilhorst, G. Voskuilen, H. Nachttegaal, M. Dekker, K. Vantriet, and B. H. Bijsterbosch (1989), Protein transfer from an aqueous phase into reversed micelles : The effect of protein size and charge distribution, *Eur. J. Biochem.*, **184**, 627-633.
13. Shiomori. K., N. Ebuchi, Y. Kawano, R. Kuboi, and I. Komasa (1998), Extraction Characteristic of Bovine Serum Albumin Using Sodium Bis(2-Ethylhexyl) Sulfosuccinate Reverse Micelles, *J. Ferment. Bioeng.*, **86(6)**, 581-587.
14. M. Caselli. M., P. L. Luisi, M. Maestro, and R. Roselli (1988), Thermodynamic of the Uptake of Proteins by Reverse Micelles: Approximation Model, *J. Phys. Chem.*, **92**, 3899-3905.
15. Hilhorst. R., M. Sergeerva, D. Heering, P. Rietveld, P. Fijneman, R. B. G. Wolbert, M. Dekker, and B. H. Bijsterbosch (1995), Protein Extraction from an Aqueous Phase into a Reversed Micellar Phase: Effect of Water Content and Reversed Micellar Composition, *Biotech. Bioeng.*, **46**, 375-387.
16. Aveyard. R., B. P. Binks, S. Clack, and J. Mead (1986), Interfacial Tension Minima in Oil-Water-Surfactant Systems, *J. Chem Soc., Faraday Trans. I*, **82**, 125-142.
17. Langevin, D. (1992), Micelles and microemulsions, *Ann. Rev. Phys. chem*, **43**, 341- 369.
18. Eicke, H.F (1980), Surfactant in nonpolar solvents: Aggregation and micellization *Top. curr. chem*, **87**, 85-145.