한국생물공학회지 제6권 제4호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 6. No. 4. 337-344(1991)

역미셀을 이용한 리파아제의 분리

최 평 호 · 류 희 욱 · 이 태 호 · 장 용 근
한국과학기술원 화학공학과

Separation of Lipases Using Reversed Micelles

Pyeong Ho Choi, Hee Wook Ryu, Tae Ho Lee and Yong Keun Chang
Dept. of Chem. Eng., Korea Advanced Institute of Science and Technology

ABSTRACT

The liquid-liquid extraction of lipase A from *Candida cylindracea* and lipase B from porcine pancrease was carried out using reversed micellar organic solvents. Effects of various factors such as ionic strength, pH, and species and concentration of surfactant, on lipase solubilization were studied. A cationic surfactant cetyl-trimethyl ammonium bromide(CTAB) in isooctane/n-hexanol(1:1) was found to be an effective solvent and its optimum concentration was 50 mM. KCl among various salts tested was the most effective and the efficiency of solubilization of lipase increased with decreasing the ionic strength of salts. The maxium activity and solubiliz ation of protein were obtained at pH 8. The stripping efficiency has a maximum value at pH 4 and increases with KCl concentration in the range of 0.2~1.0 M. After the solubilization and stripping, the overall recovery efficiency of mass and specific activity of lipases were 62% and 66%, respectively.

서 론

유전자 공학의 급속한 발전으로 인하여 유전자 조작을 통한 생화합물의 대량 생산 기술이 개발되고 있다. 그러나, 이에 비해 대량 생산된 생화합물을 배양액으로부터 효율적으로 분리하는 기술의 발달이 병행되지 못하고 있다.

생화합물의 분리 방법은 전통적으로 chromatography나 전기영동 등에 의한 회분식 공정을 이용하는데, 대형화에 따른 분리공정의 효율이 감소하는 어려움이 있다. 따라서, 연속공정으로서 대형화가 쉽고 효율적인 생물분리 공정의 개발이 요구되고 있다.

생화합물을 분리하기 위한 새로운 방법으로 액-액 추출법이 사용되고 있다. 액-액 추출법은 화학 또는 석유화학 산업에서 오래전부터 널리 사용해온 방법으로서 회분식 또는 연속식 공정에 대한 설계나 대형화가 비교적 쉬운 장점이 있다. 그러나, 액-액 추출법을 생화합물의 분리에 이용하게 될 때의 문제점 중의 하나가 추출을 위한 적절한 용매가 없다는 점이다. 현재 이용되고 있는 액체용매는 수성이상계로서 이는 두수용성 고분자가 어떤 농도 조건에서 서로 섞이지 않는 두 수용액상을 형성하고 이때 각 상은 주로 하나의 고분자를 포함하며 생화합물은 각 상에 서로 다른 비율로 존재한다는 점에 기초를 두고 있다. 이 계는 Albertson이 처음 연구하였고(1), Kula(2) 등은 상업적으로 중요한 여러 종류의 단백질들의 분배(partitioning)에 대한 연구를 하였으며, 실제 공정에의 적용을 위한 공학적 기초를 발전시켰다.

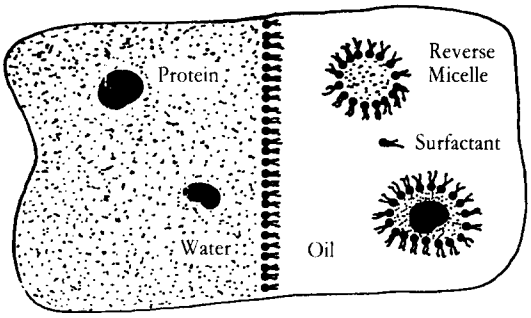

Fig. 1. Schematic of reversed micellar extraction of proteins.

또 하나의 방법으로서, 역미셀을 이용하면 단백질이 수용액상에서 유기용액상으로 이동될 수 있음이 Luisi 등에 의해 제시되어 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(3, 4). 역미셀은 유기용매 내에서 형성되는 작은 계면활성제의 집합체로서 보통 수용액상의 미셀과는 달리 계면활성제의 친수성 부분이 내부로 향하여 물을 유기용매로부터 유리할 수 있는 극성 코어를 형성하며, 꼬리 부분은 유기용매상에 노출되어 있다. 분리의 관점에서는 두개의 상이 존재하는 영역이 중요한데, 이 영역 내의 조성하에서 수용액 상과 유기용매 상의 상분리와 단백질 분배가 이루어져 궁극적으로 단백질의 분리가 가능하다. Fig. 1은 역미셀 추출의 원리도이다. 역미셀은 비극성 환경하에서 계면활성제에 의해 안정화된 nm 크기의 수용액 방울을 말한다. 대부분의 단백질은 비극성 용매에 거의 녹지 않으며, 이들 용매에 단백질을 전달시킬 경우 비가역적인 변성(denaturation)을 일으켜 효소기능을 상실하게 된다. 그러나, Luisi 등은 아미노산, 단백질, 핵산 등을 포함한 생화합물들이 변성되지 않고 역미셀 용액에 추출될 수 있으며, 역으로 역미셀로부터 수용액상으로 전달될 수 있음을 발표하였다(3−11). 역미셀을 포함하는 유기상을 이용한 단백질과 기타 다른 생화합물들의 선택적 추출은 향후 연속 생물 분리공정에 이용될 수 있는 중요한 기술 중의 하나이다(11−13).

본 연구는 역미셀을 포함한 유기 용매로의 리파아제의 추출에 있어서의 주요변수인 pH, 이온강도, 계면활성제의 종류와 농도, 염의 종류 등의 영향을 실험을 통하여 설명하고, 최적 분리조건을 제공하는데 있다.

실험재료 및 방법

효소용액 제조

본 연구에서 사용된 효소인 리파아제는 SIGMA 제품을 사용하였고, 사용된 두 종류의 리파아제의 특성을 Table 1에 제시하였다. 효소용액은 증류수에 원하는 농도에 따라 필요한 양을 제조하였다. 모든 실험에 lipase B를 주로 사용하였고 lipase A는 size effect를 알아볼 때만 사용하였다.

추출용매와 역추출용액의 제조

효소 용액으로부터 단백질 효소를 분리하기 위한 추출용매는 isooctane, dodecane, tetradecane과 같은 유기용매에 계면 활성제를 첨가하여 준비하였다. 계면활성제는 음이온 계면 활성제인 sodium-di-2-ethylhexylsulfosuccinate (AOT)를, 양이온 계면활성제인 cetyltrimetyl ammonium bromide(CTAB)를 사용하였다. 추출용매 제조시 AOT는 isooctane에 첨가하여 제조하였고, CTAB는 n-isooctane / hexanol (1:1)에 첨가하여 사용하였다. 사용된 모든 시약은 SIGMA 제품을 사용하였다. 역추출용액은 3차 증류수에 0.1 N NaOH와 1 N HCl을 이용하여 pH를 조절한 후 염을 첨가하여 이온강도를 조절하였다.

실험 과정

역미셀에 의한 단백질의 공정은 Fig. 2에 보인 한 예와 같이 두 공정으로 구성되어 있다. 수용액상의 단백질이 역미셀상으로 전달되는 공정으로 구성되어 있다. 수용액상의 단백질이 역미셀상으로 전달되는 추출공정과 유기상에 전달된 단백질이 다시 새로운 수용액상으로 전달되는 역추출공정의 두 단계로 수행된다. 효소용액으로부터 단백질을 추출하기 위하여 상온에서 효소용액과 추출용매를 1:1 부피로 혼합하여 100 ml의 비이커에서 60

Table 1. Properties of lipases A and B

	lipase A	lipase B
source	*Candida cylindracea*	porcine pancrease
molecular weight	120,000	52,000
isoelectric point	4.2	5.2
specific activity [Unit / mg]	43.22	4.08

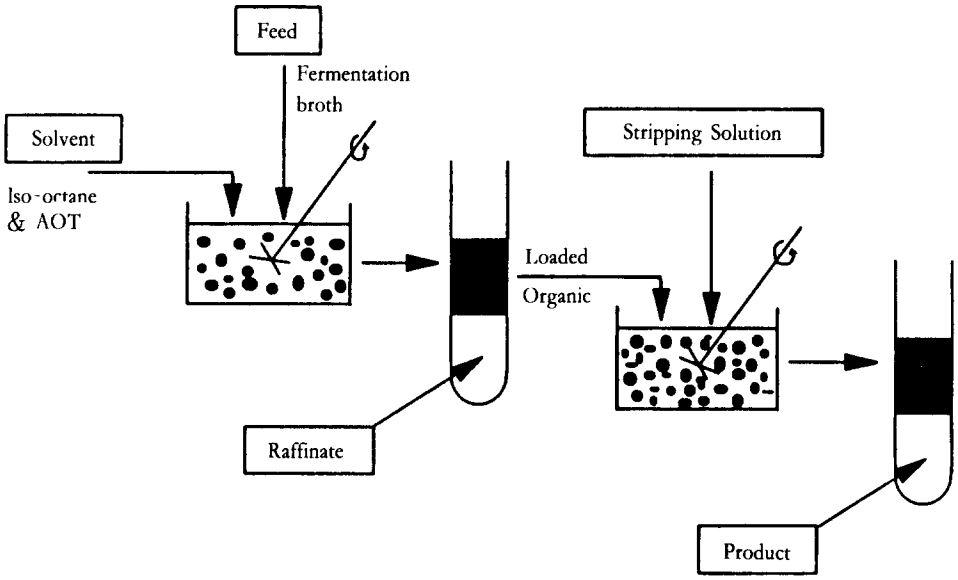

Fig. 2. Proposed process for protein recovery using reversed micelles.

0 rpm으로 5분간 교반시킨 후 10분간 3,000 rpm에서 원심분리 시킨다. 단백질이 추출된 유기상에 역추출 용액을 1:1 첨가하여 600 rpm으로 20분 동안 교반한 후 20분 동안 3,000 rpm으로 원심분리하여 분리된 수용액을 분석한다.

단백질의 농도와 활성도 분석

리파아제 농도는 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry 등(14)의 방법으로 정량화하였다. 리파아제는 지방을 분해하여 지방산과 글리세롤을 만드는 효소로서 생성된 지방산의 양을 측정함으로써 활성도를 결정한다. 본 연구에서는 기질로서 olive oil을 사용하는 Kwon and Rhee가 제안한 "copper soap colorimetry" 방법을 사용하였다(15). Copper reagent는 Lowry and Tinsley (16)에 의해 제안된 방법에 의해 준비하였고, 이 방법을 이용하기 위해서 먼저 지방산 농도에 따른 흡광도 변화에 대한 표준 곡선(standard curve)을 구해야 한다. 표준곡선은 2~50μmol의 oleic acid를 5ml의 isooctane 속에 완전히 녹인 후 1ml의 cupric-acetate-pyridine (pH 6.1) 시약을 넣고 90초 동안 격렬하게 혼합하여 발색 반응을 시킨다. 혼합 후 10~20초 동안 침전시킨다음 715 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 구하였다. 활성도의 결정은 1ml 리파아제 용액에 5ml olive oil emulsion과 pH 4의 phosphate buffer 용액 4ml를 넣고 37℃서 30분간 반응시킨 후, 6N HCl 5ml를 첨가하여 반응을 중단시키고, 30초 동안 격렬하게 혼합한 다음, 5ml의 isooctane를 첨가하여 5분간 이 혼합물을 끓인다. 지방산이 용해된 isooctane 상등액 5ml를 시험관에서 분리한후, spectrophotometer 를 사용하여 흡광도를 측정하여, 측정결과를 표준곡선과 비교하여 지방산을 정량화하였으며 이로부터 활성을 결정하였다. 리파아제의 활성도는 unit로 나타내고 위의 반응 조건하에서 1분간 생성된 1μmol의 지방산을 의미한다.

역미셀의 수분함량의 조사

유기용매 속의 수분함량은 단백질이 추출된 후 역미셀 용액의 상태를 평가하기 위해서 조사했다. 미셀의 크기는 수분의 함량에 비례하며 그 관계식은 다음과 같다(10).

$$R_S = (3V_w / f_s)W_o + 3V_s / f_s \quad (1)$$

여기에서 R_s는 미셀의 직경이고, V_s는 shell 내에서 고려되는 계면 활성제의 몰 부피비, V_w는 물의 몰 부피, W_o는 물과 계면 활성제의 몰농도 비, f_s는 surfactant head coverage 이다. 수분함량은 Karl-Fisher Titrator(Metrohm model; 665 Dodimat, 678 EP/KF processor)을 이용하여 측정하였다. 이 장치에서는 수분을 포함하고 있는 시료에 무수 메탄올이 가한 후 iodine, sulfur dioxide, nitrogeneous base의 성분들로 이루어진 용액으로 적정하며 기본반응은 다음의 두 부분으로 이루어진다.

$CH_3OH+SO_2+RN \rightarrow (RNH)SO_3CH_3$

$H_2O+I_2+(RNH)SO_3CH_3+2\ RN \rightarrow (RNH)SO_4CH_3+2\ (RNH)I$

이때 모든 물이 반응하고 나면 적정은 끝나게 된다. I_2는 I^-보다 높은 전도도를 가지며 종말점 도달 이후부터 축적되기 시작하므로 전도도에서의 급격한 변화가 나타나는데 이로서 종말점을 구할 수 있고 따라서 수분함량이 계산된다.

결과 및 고찰

단백질 추출

계면활성제의 영향

본 연구에 사용된 리파아제는 등전점(isoelectric point, pI)이 각각 4.2, 5.2의 산성 조건으로서 음이온 계면활성제 AOT와 양이온 계면활성제 CTAB를 사용했을때 pH 변화에 따른 리파아제 B의 용해도를 Fig. 3에 보였다. Fig. 3에서 보는바와 같이 음이온 계면활성제 AOT를 사용했을 때 수용액의 pH가 4이하에서 80%보다 높은 용해도를 얻을 수 있지만, pH 4 이상에서는 용해도가 급격하게 감소하였다. 양이온 계면활성제의 경우 수용액의 pH가 5이상에서 높은 용해도를 보이고, pH 8에서 약 80% 정도의 가장 높은 용해도를 얻을 수 있었다. 본 연구에서 사용된 리파아제는 낮은 pH에서는 활성도가 급격히 감소하는 특성이 있고, 양이온 계면 활성제 CTAB를 사용할 경우, 높은 pH에서의 용해도가 높기 때문에 활성도의 감소없이 효율적인 효소의 분리가 가능하다.

임계 미셀 농도(critical micelle concentration; CMC)는 미셀 형성을 위해 필요한 계면활성제의 최소농도로 미셀과 평형상태에 있는 비집합성 계면활성제(unaggregated surfactant)의 농도를 의미한다. CMC 값은 계면활성제에 대한 용매의 물리적 성질(surface tension, turbidity, osmotic pressure)의 영향을 받으며 양이온 계면활성제 CTAB의 CMC 값은 0.00099M의 매우 작은 값으로 이 농도 이상에서 미셀이 형성된다. Fig. 4는 계면활성제의 농도 증가에 따른 용해도의 변화를 나타낸 것이다. 계면활성제의 농도가 50mM일때 가장 높은 용해도를 얻을 수 있으며, 그 이상에서는 약간 감소하는 경향을 보이는데, 이는 50mM 이상에서는 미셀이 서로 뒤엉켜(overlap) 복잡한 구조를 가지며 이것으로 인해 리파아제의 용해가 방해받는 것으로 생각된다.

단백질 구조와 수용액 pH의 영향

두 리파아제를 양이온 계면활성제 CTAB를 사용하여 추출했을때의 용해도에 대한 pH의 영향을 Fig. 5에 보였다. 리파아제의 pI보다 약간 높은 수용액의 pH에서 높은

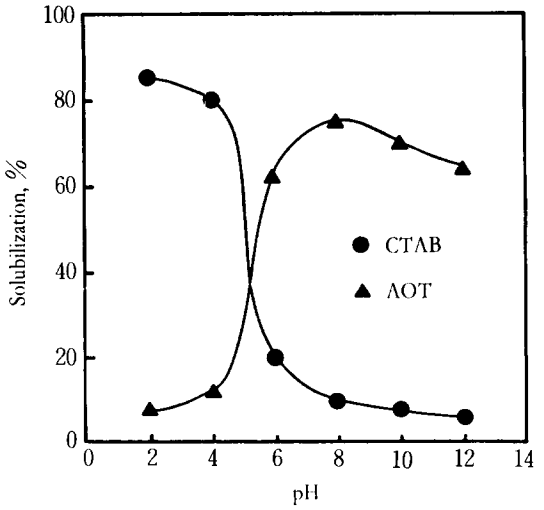

Fig. 3. Effect of pH on lipase solubilization for different surfactants. (lipase B, 50mM CTAB, 50mM AOT, 0.1M KCl)

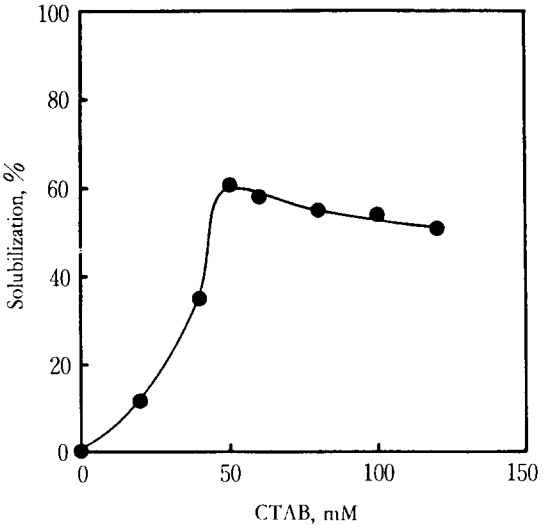

Fig. 4. Effect of concentration of CTAB on lipase solubilization. (lipase B, pH 8, 0.1M KCl)

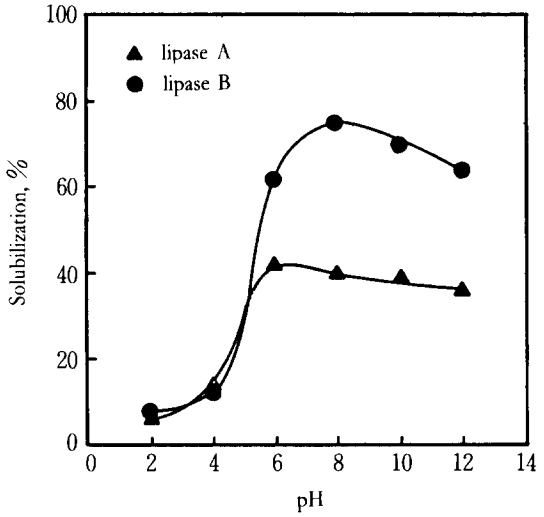

Fig. 5. Effect of pH on solubilization for different lipases.
(50mM CTAB, 0.1M KCl)

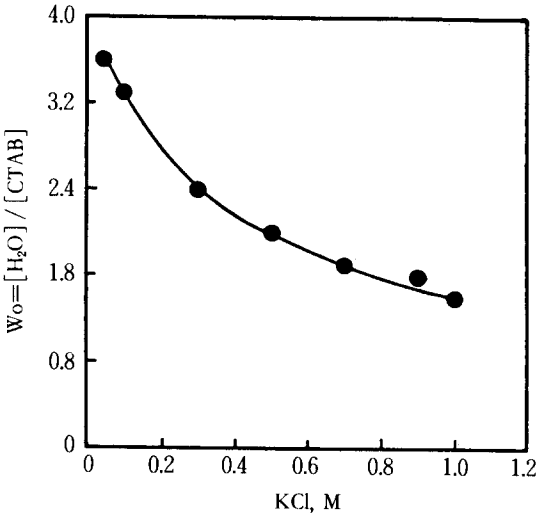

Fig. 6. Effect of ionic strength on equilibrium micelle size for 50mM CTAB in n-hexanol / isooctane (1:1).
(lipase B, pH 8, 50mM CTAB)

용해도를 보인다. 즉 리파아제 A의 경우는 pH 6~7 영역에서 가장 높은 용해도를 얻을 수 있으며, 리파아제 B는 pH 8 근처에서 높은 용해도를 나타낸다. 최대 용해도를 얻을 수 있는 수용액의 pH가 중성이기 때문에 효소의 변성도 작을 것으로 예상된다.

Fig. 5에 의하면 분자량이 상대적으로 큰 리파아제 A(분자량: 120,000)의 용해도가 분자량이 작은 리파아제 B(분자량: 52,000)보다 전체적으로 낮은 값을 보인다. 이러한 결과는 단백질의 분자량이 커짐에 따라 일정한 크기의 미셀 내부에 안정한 상태로 존재하기가 어려운 "size exclusion effect" 때문에 용해도가 감소한다고 생각되며 Hatton등의 연구 결과와 잘 일치한다(3).

이온강도와 염의 영향

정전기적 상호작용은 이온강도에 의해 조절될 수 있기 때문에 단백질 수용액의 염 농도를 변화시킴으로써 이온강도의 단백질 용해에 대한 영향을 조사하였다. 먼저 미셀의 크기에 대한 이온강도의 영향을 조사하였다. 수용액과 평형상태에 있는 역미셀 용액에서 미셀의 크기는 수용액의 이온강도가 증가함에 따라 감소하는데, 이는 전기장 속에서 이온의 포텐셜 감소와 관련되기 때문이다 (7, 17).

Fig. 6은 KCl의 농도변화에 따른 미셀의 수분함량의 변화를 나타내고 있다. 수분함량은 Karl-Fisher Titrater를 사용하였고, 수분함량과 미셀의 크기는 비례관계가 있다(10). 이온들의 종류에 따라 전하를 띤 표면위에 흡착되는 경향이 다른 것으로 알려져 있다. 즉, 크기가 작은 이온들은 극성이 작고 따라서 반대의 전하를 띤 어떤 표면위에 흡착되는 경향도 작다. 큰 이온일수록 흡착경향이 강하다. 반대로 대전된 표면위에 용액으로부터 이온들이 흡착하여 Stern layer를 형성하며 반대로 대전된 표면으로부터 멀어져감에 따라 정전기적 포텐셜은 급속히 감소한다. 이때, 이온이 흡착시 흡착효율은 원자가가 1가에서 2가, 3가로 증가함에 따라 보통 10배, 100배로 증가하는데, 이것은 높이 대전된 이온이 Stern layer로의 강한 흡착력 때문으로 이온의 원자가가 증가할수록 layer의 두께는 감소한다(18, 19). 이 원자가의 효과를 Schuze-Hardy rule이라하며 동일 원자가에 대해서 다른 흡착 경향은 Hofmeister series에 따라 이온반경에 비례한다. 이것을 본 실험의 관점에서 보면 원자가가 높은 이온의 염일수록, 이온반경이 큰 이온을 가진 염일수록 미셀 주위의 흡착이 강하고 layer를 압축하여 작은 미셀을 형성한다.

단백질의 용해에 대한 염의 영향을 조사하기 위하여, isooctane 0.1M－AOT계와 isooctane / hexanol 0.05M－CTAB 계에 대해 NaCl, $CaCl_2$, KCl의 3가지 염을 사용하였고, 그 결과를 Table 2에 제시하였다. 동일 원자가인 Na^+, K^+의 경우 이온반경이 각각 0.095nm, 0.133nm로서 K^+ 이온이 크기 때문에 Hofmeister series에 의하면 KCl

Table 2. Karl-Fisher titration of water content

salt	NaCl	$CaCl_2$	KCl
Wo in 0.05M CTAB in isooctane / hexanol	3.067	3.213	3.607
Wo in 0.1M AOT in isooctane	24.2	10.5	9.3

을 사용했을 때의 미셀의 크기가 작아야 한다. 일반적으로 양이온 계면활성제를 사용한 미셀의 크기 (Wo<3)는 음이온 계면 활성제를 사용한 미셀의 크기(Wo=20~150)보다 훨씬 작다. Table 2에서 보는바와 같이 음이온 계면활성제에 KCl을 사용하는 경우, 미셀의 크기가 가장 작다. 따라서, 이론적인 결과와 잘 일치한다. 2가 이온인 Ca^{2+}의 경우는 "Schuze-Hardy rule"에 따라 미셀의 크기가 가장 작을 것으로 기대되었지만, 오히려 K^+보다 다소 큰 입자의 미셀을 형성하였다.

리파아제 B의 용해도에 대한 여러 종류의 염들의 이온강도의 영향을 Fig. 7에 나타내었다. 각 염들의 농도를 0.05M에서부터 1.2M까지 증가시켰을 때의 결과를 나타낸 것으로서, KCl의 경우에는 0.05M 일때 최대의 용해도 77%를 얻었으며, 0.25M 이하의 범위에서 70 이상의 높은 값을 얻을 수 있었고, 0.4M 이후부터는 급격하게 감소하였다. 이것은 앞에서 살펴 보았듯이 이온강도의 증가로 정전기적 포텐셜이 거리에 따라 감소함으로써 단백질이 용해되기 위한 driving force인 정전기적 인력이 감소되고 이에 대응하여 용해도가 감소하기 때문이다. NaCl와 $CaCl_2$의 경우 KCl에 비하여 용해도가 35%와 52%로 매우 낮았으나, 최대 용해도는 KCl을 사용한 경우와 마찬가지로 약 0.2M 이하의 낮은 이온강도에서 얻을 수 있었다. 결과적으로 이온강도에 따른 단백질의 분리 효율면에서 볼때는 대부분의 염의 경우 최적농도가 약 0.2M의 이하이고, 염의 종류면에서 볼 때는 KCl을 사용하는 경우가 리파아제의 분리에 보다 효과적이다.

Goklen and Hatton(3)에 의하면 수용액상에서 유기상으로 단백질의 전달은 낮은 이온강도에서 잘 일어나며, 유기상에서 역추출 수용액상으로의 역추출은 높은 이온강도에서 잘 일어난다. 이러한 경향은 본 연구 결과와 잘 일치한다.

단백질의 역추출

단백질의 역추출(stripping)은 추출의 반대공정으로서 기본 원리는 추출공정과 같다. 여기서 사용된 역미셀 용액은 앞의 단백질 용해 실험에서 얻은 최적 조건으로 조절되었고, 단백질 탈거에 대한 pH와 이온강도의 영향을 조사하였다.

Fig. 8은 두 리파아제에 대한 수용액 pH의 영향을 나타낸 것으로 비교적 낮은 pH에서 가장 높은 회수율을

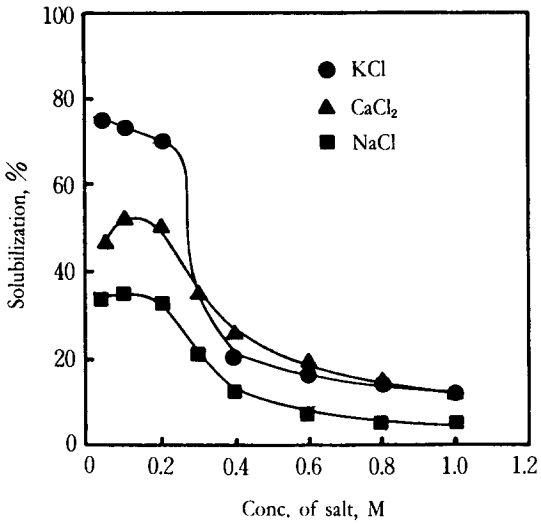

Fig. 7. Effect of ionic stregth and salts on lipase solubilization.
(lipase B, pH 8, 50mM CTAB)

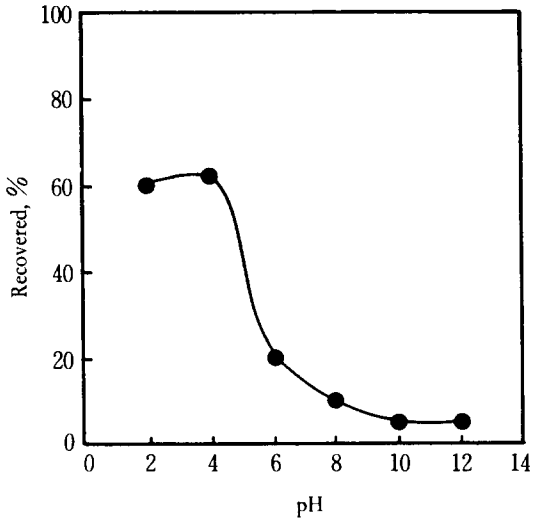

Fig. 8. Effect of pH on lipase stripping.
(lipase B, 1.0M KCl)

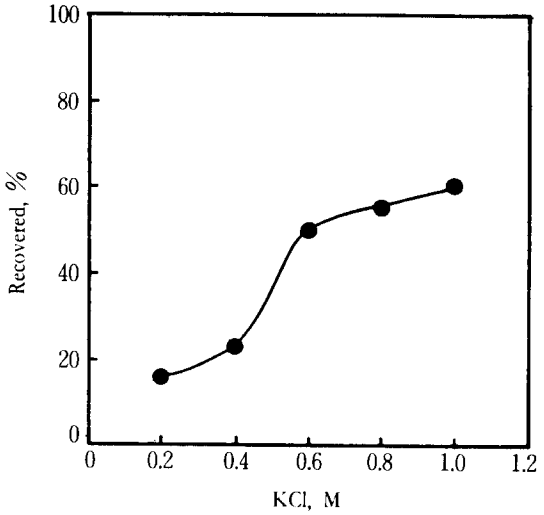

Fig. 9. Effect of ionic strength on lipase stripping(lipase B, pH 4).

보이는데, 이것은 낮은 pH에서 단백질의 전하가 양으로 대전되어 미셀과 반발력이 작용하고, 따라서 단백질은 다시 수용액상으로 이동하기 때문이다. Fig. 9는 이온강도에 의한 영향을 보여주고 있다. 이온강도가 커짐에 따라 단백질이 수용액상으로 이동하려는 경향을 보이는데 이는 이온강도가 증가함에 따라 단백질의 정전기적 포텐셜이 감소하기 때문이다. KCl의 경우에 단백질의 추출과정에서는 KCl의 경우 0.3M 이하의 낮은 농도에서 최적 조건을 보이는 반면, 단백질의 탈거 과정에서는 0.6M 이상에서 높은 탈거 능력을 보인다. Fig. 8과 Fig. 9에 보여진 실험 결과, pH 4, KCl 농도 1.0M 에서의 회수율(overall recovery)은 62% 였다. 이는 추출 과정으로부터 얻어진 용액을 사용한 결과이므로 solubilization efficiency 77%를 감안한다면 stripping에서의 효율은 85%이다. 또한 비활성도는 추출 탈거 전에 비해 66%로 감소된 것으로 나타났다.

요 약

수용액으로 부터 역미셀을 이용한 리파아제 분리공정에 있어서의 주요인자인 이온강도, pH, 계면 활성제의 농도 등의 영향에 대하여 실험을 통하여 연구하였다. 본 연구에 사용된 두 리파아제의 등전점 값이 낮기 때문에 음이온 계면활성제 AOT 보다는 양이온 계면 활성제인 CTAB가 추출시 효소의 비활성화 방지면에서 유리했다. CTAB를 사용할 때 수용액 pH가 8일때 가장 많은 양의 효소(77%)가 추출되었으며, 발효액의 이온 강도를 높여 줄수록 추출되는 효소의 양은 감소하였다. 여러종류의 염들 가운데 KCl을 사용하였을 때, 가장 높은 추출 효율을 얻을 수 있었으며, 최적의 염의 농도는 0.05M 이었다. 유기상 내의 CTAB 농도의 경우, 그 값이 50mM 이상에서 높은 추출 효율을 얻을 수 있었다. 단백질의 역추출 과정에서는 역추출 수용액의 pH가 4일때 가장 많은 양의 효소가 회수되었다. 또한 수용액의 이온 강도를 높여 줄수록 역추출되는 효소의 양은 증가하였다. 추출, 역추출시 회수된 리파아제는 양적으로는 62%까지 가능하였고, 비활성도면에서는 66%까지 가능하였다.

참 고 문 헌

1. P. A. Albertson (1971), in *Partition of cells and macromolecules, 2nd ed.*, Wiley Interscience, New York.
2. H. Hustedt, K. H. Kroner, U. Mennge, and M. R. Kula (1985), *Trends Biotechnol.*, **3**, 139.
3. K. E. Goklen T. A. Hatton (1985), *Biotech. Prog.*, **1**, 69.
4. K. Vant' Riet and M. Dekker (1984), *Proc. 3rd European congress on Biotechnology, Munchen*, 10−14 September.
5. P. L. Luisi and R. Wolf (1982), *in Solution Behavoir of surfactants, Theoretical and Applied Aspects*, p887, K. L. Mittal, and E. J. endler, Eds., Plenum publishing, New York, NY.
6. P. L. Luisi, C. Grandi, R. E. Smith (1981), *J. Biolo. Chem.*, **256**(2), 837.
7. P. L. Luisi, F. J. Bonner, A. Pellegrini, P. Wignet, R. Wolf (1976), *Helv. Chem. Acta*, **62**, 740.
8. Kiran. L. Kadam (1986), *Enzyme Microb. Technol*, **8**, 266.
9. M. A. Wells, R. L. Misiorowski (1974), *Biochem.*, **13**, 4921.
10. K. E. Goklen (1986), *Liquid-Liquid Extraction of Biopolymer: Selective Solubilization of Proteins in Reverse Micelles, Doctorial Thesis*, Massachusetts Institute of Technology.
11. M. Declker, K. Van't Riet, S. R. Weijer (1986), *J. Chem. Eng*, **33**, B27.
12. S. Giovence, F. Verheggen (1987), *Enzyme Microb. Technol*, **9**, 470.
13. D. W. Amstrong, W. Li (1988), *Anal. Chem*, **60**, 86.

14. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951), *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
15. D. Y. Kwon and J. S. Rhee (1986), *JAOCS*, **63**, 89.
16. R. R. Lowry and L. J. Tinsley (1976), *JAOCS*, **5 3**, 470.
17. Luisi, P. L., M. E. Leser, G. Wei, M. Maestro (1986), *Biochem. Biophys. res. commun.*, **135**(2), 629.
18. Luisi, P. L., C. Grandi, R. E. Smith (1981), *J. Biolo. Chem.*, **256**(2), 837.
19. Luisi, P. L., F. J. Bonner, A. Pellegrini, P. Wignet, R. Wolf (1976), *Helv. Chim. Acta*, **62**, 740.

(Received; October 8, 1991, Revised; October 20, 1991, Accepted; October 31, 1991)