

## Spray Column에서 역미셀을 이용한 Lipase의 분리

한 동 훈 · 홍 원 희  
한국과학기술원 화학공학과

### Separation of Lipase Using Reverse Micelles in Spray Column

Dong Hoon Han and Won Hi Hong

Department of Chemical Engineering, KAIST

#### ABSTRACT

Lipase was separated using reverse micelles in a spray column. The 50mM AOT-Isocetane solution was used as reverse micellar solution for the extraction of lipase(crude containing 25% Protein). Ionic strength was controlled by KCl(0.1M KCl for extraction, 0.5M KCl for back extraction). Acetate buffer and phosphate buffer were used for control of pH. The efficiencies of extraction and stripping were 30% and 50%. An increase of circulation did not change the efficiency of extraction in forward extraction. The optimum flow rate was around 0.101ml/sec.

#### 서 론

최근에 생물공학의 비약적인 발전을 통해 많은 생체물질들이 생산된다. 하지만 생체물질의 특성상 대량생산이 어렵고 분리에 사용되는 비용이 고가여서 그 사용이 많이 제한되고 있다. 그래서 최근에는 upstream쪽의 개발 못지 않게 downstream의 개발도 중요한 역할을 갖게 되었다. 이러한 요구에 부응하여 80년대부터 액액추출법의 한 종류인 역미셀을 이용한 단백질의 추출이 많이 연구되고 있다. 이 방법은 Luisi(1), Hatton(2), Dekker(3) 등에 의해 연구되었으며 역미셀에 의한 추출에 영향을 미치는 인자들에 관한 효과들이 연구되었다. 또한 역미셀내로의 용해에 대한 수학적인 설명을 위해서 많은 모델도 제안되었다(4). 그리고 연속조업의 가능성도 혼합기-침강조방식으로 그 타당성 등이 연구되었다(5). 그러나 연속공정을 실험할 때 Tween 85와 AOT, SDS 등과 같은 계면활성제는 추출시나 역추출시에 두 상의 분리에 있어서 오랜 시간 정체시에도 상이 잘 분리되지 않는 문제점이 발생된다. 즉 두

상으로 분리가 되는 것처럼 보이지만 수용상에 아직도 많은 양의 유기상이 남아 뿌옇게 보인다. 하지만 Span 80과 CTAB는 추출과 역추출시의 분리에 전혀 문제가 발생하지 않고 깨끗하게 분리되었다. 그 이유는 각각의 계면활성제의 특성값(HLB; Hydrophile-lipophile balance)에 기인한 것으로 생각된다. 문헌(6)에 의하면 상분리가 잘되는 계면활성제의 종류는 보통 이 HLB값이 작은 것(HLB: 1-8)으로 W/O형 유탁액 제조에 적합한 계면활성제이다. 즉 역미셀 자체가 W/O 상태이므로 물보다는 계면활성제가 유기상에 잘 녹아서 수용상에서 용해되지 않기 때문이다. 그러나 HLB값이 큰(10 이상) 계면활성제는 보통 친수성으로 O/W 유탁액을 만들기 때문에 수용상에 용해되어 수용액이 탁하게 된다. 그러므로 HLB값을 잘 고려하여 우리가 선정한 계에 맞는 계면활성제를 선택하여야 한다. 하지만 단백질의 안정화 구역이 HLB값이 큰 계면활성제를 사용하여야만 할 경우에는 그 분리의 용이성을 위하여 spray column을 사용하는 것이 기존의 방법에 비해서 훨씬 조작성이 용이하다. Spray column은 기

존의 혼합기 방식과는 달리 격렬한 혼합이 없으므로 상분리가 용이하고 동력비와 장치비 등이 적게 든다.

본 연구에서는 기존의 혼합에 의한 역미셀내로의 단백질의 추출방법의 단점인 상분리의 어려움을 해소하고 적은 동력을 사용할 수 있는 spray column에서의 추출을 연구하였다. 그리고 이러한 spray column의 조작시에 추출량에 영향을 미치는 여러 인자들의 효과를 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

본 실험에서는 유기용매로 Aldrich사의 2, 2, 4-trimethylpentane(isooctane)을 사용하였고, 계면활성제로는 Fluka사의 AOT(sodium di-2-ethylhexyl sulfosuccinate)를 사용하였다. 실험 효소는 lipase로서 Sigma사 제품을 사용하였다. 이 제품은 25%의 단백질을 함유하고 있다. 그리고 단백질 농도 분석용 시약은 Sigma사의 제품을 사용하였다. 그 외의 제품은 모두 GR grade였다.

### 효소용액의 제조

효소용액의 제조시에 lipase를 1mg/ml의 농도로 만들어서 사용했다. 각각의 용액은 200ml씩 제조되었다. 또 각 용액의 pH는 완충용액으로 조절되었다. 완충용액은 모두 3차 증류수로 조제되었다. pH 3.6-pH 5.6까지는 acetate 완충용액을 사용하였고 pH 7-pH 9.0까지는 phosphate 완충용액을 사용하였다. 추출시에는 0.1M KCl, 역추출시에는 0.5M MCl로 용액의 이온강도를 조절하였다. 여기서 추출시 염의 첨가는 계면활성제의 손실을 방지하기 위한 것이다.

### 역미셀 용액의 제조

본 실험에서 사용한 역미셀 용액은 유기용매로서 2, 2, 4-trimethylpentane(isooctane)을 사용하였고, 계면활성제로는 음이온 계면활성제이며 HLB값이 10이상인 AOT(sodium di-2-ethylhexyl sulfosuccinate)를 사용하였다. 이 용액은 AOT 50mM의 농도로 제조되었다.

### 실험장치

Fig. 1에 나와 있는 spray column을 사용하여 실험하였다. Pump는 peristaltic pump를 사용하였다. 이 column은 distributor에 6개의 구멍을 가지고 있으며 column의 지름은 1inch이다. Column의 끝 부

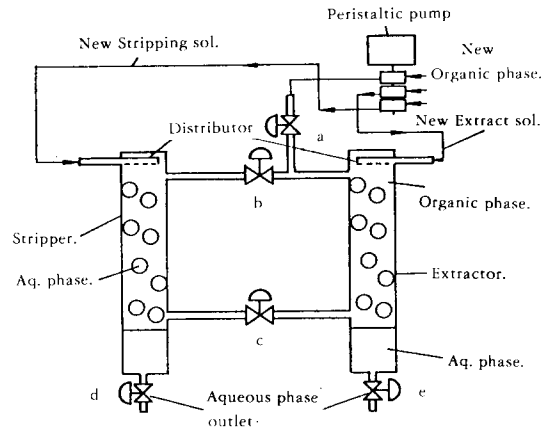


Fig. 1. The schematic diagram of apparatus

분에는 각 유기상과 수용상의 입, 출구가 있고 각각 밸브가 설치되어 있으며 유연튜브로 연결되어 있다. 그 용량은 100ml이다. Column은 distributor를 가진 부분과 가지지 않은 부분의 두 부분으로 구성되어 있다. 실험시 두 부분이 연결되어 사용된다.

### 실험방법

추출시에는 extractor에 유기상을 75ml를 넣고 pH와 이온세기가 조정된 lipase를 함유한 수용액 200ml를 peristaltic pump를 이용하여 적당한 유속으로 distributor로 보내준다. Distributor는 수용상과 유기상의 접촉면적을 증가시키기 위하여 수용상을 작은 방울로 흘려 보낸다. 이때 수용상과 유기상이 접촉함에 의하여 역미셀이 형성되고 그 안으로 lipase가 가용화된다. 추출잔액은 유기상과의 비중차이로 쉽게 상분리가 일어나며 아래의 출구 e로 나온다. 역추출시에도 stripper에 추출시에 사용되었던 유기상 70ml를 extractor와 연결되어진 c 밸브를 통하여 넣은 후 pH와 염의 농도가 조절된 수용액 200ml를 distributor를 통해 넣어준다.

### 단백질 농도 분석과 활성도 분석

Lipase의 농도는 bovine serum albumin으로 정량곡선을 만들어 BCA micro assay법(7)을 사용하여 정량하였다. Lipase의 활성도는 lipase가 기름을 분해하여 지방산과 글리세롤을 생성한다는 사실에 근거한 Kwon and Rhee(8)의 "Copper soap colorimetry" 방법을 사용하였다.

**역미셀 안의 수분함량 분석**

역미셀 안의 수분의 함량은 역미셀 크기의 상대적인 비교에 중요한 변수이다. 이 값은 역미셀 안으로의 단백질의 가용화 정도에 영향을 미치는 인자이다. 그러므로 이 값의 측정은 추출을 위한 기본적인 변수로 중요하다. 역미셀 안의 수분 함량은 Karl Fisher Titrimeter(Coulometric K-F Titrimeter, Model 447)를 사용하여 분석하였다. 이 때 이 양을 나타내는 변수로  $W_0$  값을 사용한다. 이 값은 측정된 물과 계면활성제간의 몰비로 나타낸다.

$$W_0 = \frac{[\text{water}]}{[\text{Surfactant}]}$$

[Water] : 유기상에 대한 물의 몰농도  
 [Surfactant] : 계면활성제의 몰농도

**결과 및 고찰**

**수용상의 pH 영향**

pH는 역미셀을 이용한 추출에 미치는 중요한자로 단백질을 적당하게 하전시켜 역미셀내로 용해시키는 작용을 한다. 그러므로 단백질의 추출시에 그 추출량 및 활성도를 최적으로 유지시키기 위하여 적절한 pH범위를 선정하는 것이 매우 중요하다. 이 실험에서는 추출물을 함유한 수용액상의 pH를 조절하면서 추출에 미치는 pH의 영향을 조사하였다. 완충용액으로는 acetate 완충용액과 phosphate 완충용액을 사용했다. pH는 추출시에는 3.6부터 5.6까지 역추출시에는 7.0에서 9.5까지의 범위로 변화시키면서 실험하였다. 추출과 역추출시에 유속은 0.135ml/sec으로 일정하였다. 사용한 lipase의 등전점 (pI; isoelectric point)은 5.2였다. Spray column에서 추출시 Fig. 2에서 보는 것과 같이 pI보다 낮은 pH에서 추출량이 많고 등전점에 가까워질수록 그 추출량이 현저하게 감소함을 볼 수 있다. 여기서 solubilization(%)은 추출된 단백질의 양을 추출전 단백질의 양으로 나누어 100을 곱한 값이다. 이 값과 기존의 혼합 방법에 의한 값(9)이 Fig. 2에 비교되어 있다. 이 값들을 보면 기존의 혼합에 의한 방법이 spray column에 의한 방법보다 10~50% 정도 추출효율이 좋은 것을 볼 수 있다. 이것은 접촉시간과 혼합정도의 차이에 의한 결과로 유속의 변화 등을 통해 spray column에서의 값을 증가시키기에 의해 어느 정도 차이를 줄일 수 있을 것이다. 또한 Fig. 3에서 역추출시 pH가 증가함에 따라 역추출되는 양

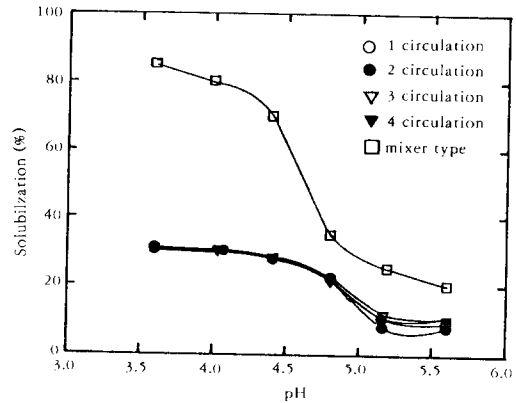


Fig. 2. The effect of pH on solubilization

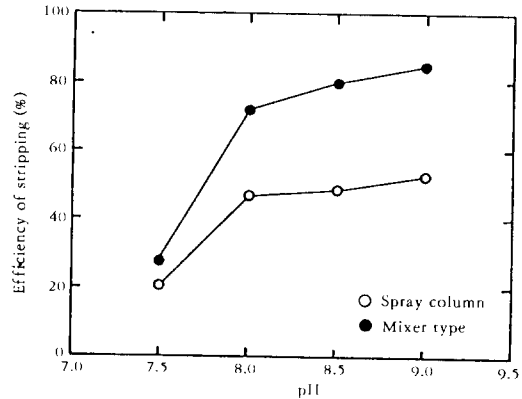


Fig. 3. The effect of pH on stripping

이 현저하게 증가하는 경향을 볼 수 있다. 여기서 stripping efficiency는 유기상속의 단백질에서 역추출 후의 수용상에서의 단백질의 양을 뺀 값을 유기상속의 단백질의 양으로 나누어 100을 곱한 값이다. Fig. 3에서 역추출값이 큰 pH범위는 8.0에서 9.0으로 문헌(9)에 보고된 lipase의 안정화 구역과 잘 일치하며, 이것은 기존의 혼합에 의한 방법으로 실험한 결과(10)와도 잘 일치하고 있다.

**수용상의 접촉횟수의 영향**

추출시에 수용상과 유기상의 접촉횟수(circulation)가 추출량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 spray column을 통과해 나온 추출잔류액을 모았다가 1회 접촉이 끝난 후에 다시 peristaltic pump로 distributor를 통해 흘려 보내줌으로써 접촉횟수를 변화시켰다. 이때 유속 역시 0.135ml/sec으로 일정

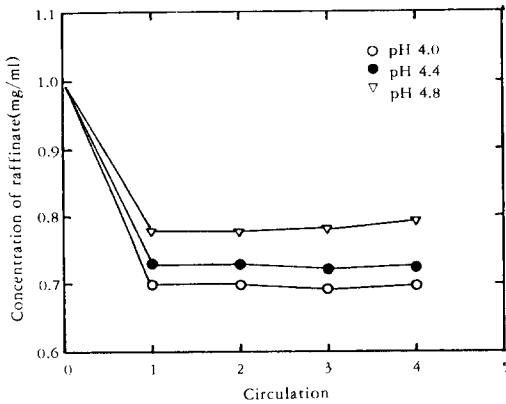


Fig. 4. The effect of circulation on solubilization

하게 유지시켰다. 결과는 Fig. 4에 나타나 있는데 유기상과 수용상과의 접촉횟수가 추출효율의 증가에 어떤 영향도 끼치지 않음을 볼 수 있다. 이 결과는 본래의 예상과 다른 결과를 나타내었는데 그 이유는 추출상에 있는 불순물들과 계면활성제와의 결합체 형성에 의한 계면활성제의 손실과 물질전달의 방해에 따른 결과라고 생각된다. 그 증거중의 첫번째는 추출횟수가 증가함에 따라 수용상의 방울의 크기가 같은 유속에서 훨씬 커지는 현상이다. 이는 유기상의 계면활성제의 손실에 따른 계면장력의 증가가 발생하기 때문이다. 그래서 이 계는 그 에너지를 낮추기 위해 방울 자체의 크기를 증가시킴으로 접촉면적을 작게하여 역미셀계의 에너지를 감소시키게 된다. 실험시에 두 상의 경계면에 나타난 흰색의 물질들이 이러한 물질들로 생각된다. 두번째는 역추출과 추출의 비교이다. 즉 역추출에서 수용상의 접촉횟수에 대한 효과를 추출과 비교하는 것이다. 이 결과는 Fig. 5에 나타나 있다. 이 결과를 보면 예상과 같이 접촉횟수의 증가에 따라 역추출량이 증가함을 볼 수 있다. 이는 역추출시에 유기상으로 흘러보내진 역추출용액이 염으로 이온강도가 조절되어진 깨끗한 수용액이므로 계면활성제의 손실이 없었고, 또한 염의 농도의 증가로 계면활성제의 head group 사이의 반발력이 감소되어 계면활성제 사이의 인력이 증가하기 때문이다. 이에 따라 경계면에서의 흰색물질도 없었으며 예상과 같이 추출량도 증가하였다. 세번째는 유기상속의 물의 함량을 측정된 Fig. 6이다. Fig. 6를 보면 접촉횟수에 대한 유기상내의 물의 함량을 나타내었는데 접촉횟수에 대해 큰 변화가 없었다. 원래 기존의 혼합방식에서는 두 상의 혼합시간이

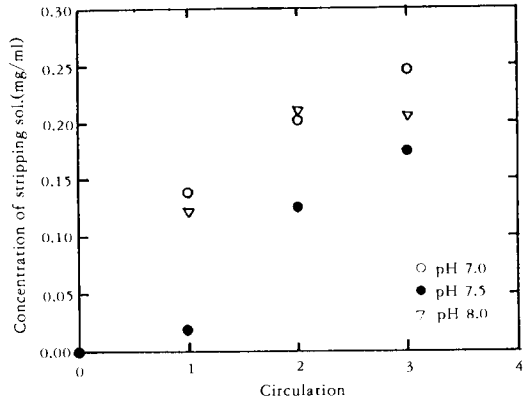


Fig. 5. The effect of circulation on stripping

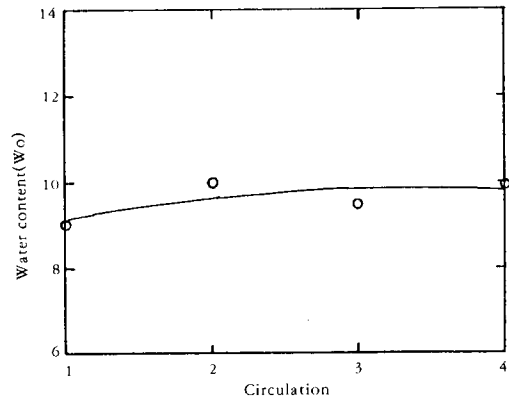


Fig. 6. The effect of circulation on water content in organic phase

증가함에 따라 역미셀속의 물의 함량이 증가하다가 사용된 계면활성제와 이온의 농도에 대해 정해진 값에 이르면 그 양이 일정해지는 것이 보통이다. 그러나 이것은 주어진 농도에서 역미셀의 크기가 증가한다는 의미가 아니고 혼합으로 계면활성물질이 생성한 역미셀의 갯수가 늘어난다는 의미이다(2). 그러므로 본 실험결과에서 유기상내의 물의 함량이 초기부터 일정하다는 것은 더 이상 역미셀을 형성할 계면활성제가 유기상속에 없다는 뜻으로 본 실험에서 사용한 spray column이 기존의 혼합방식보다 물질 전달속도가 느리다는 것을 고려하면 이것은 유기상속의 계면활성제가 불순물에 의해 손실된 증거로 생각할 수 있다. 그러므로 이 column에서의 연속조업을 위해서는 계면활성제를 포함한 유기상의 계속적인 공급이 필요하며 계면활성제의 손실을 방지하기

위해 이온세기를 조절하는 것이 필요하다.

**유속의 효과**

역추출시 유속이 추출량에 미치는 효과를 알아보기 위해서 watson peristaltic pump를 사용하여 유속을 변화시켜 가면서 추출효과를 비교하였다. 이때 유속은 방울의 형태가 구분될 수 있을 정도의 유속 범위내에서 실험하였다(0.001ml/sec-0.135ml/sec). 그 결과는 Fig. 7에 나타나 있다. 이 결과를 보면 유속에 따른 추출량의 최적점이 존재한다는 것을 알 수 있다. 즉 유속이 낮을수록 공급되는 수용상의 방울의 크기가 작아지고 방울을 뚜렷하게 형성하므로 유기상과 수용상의 접촉면적이 증가하고 탑내의 체류시간도 증가하므로 단백질의 추출효과는 증가한다. 하지만 흐름이 매우 약해서 혼합효과는 반대로

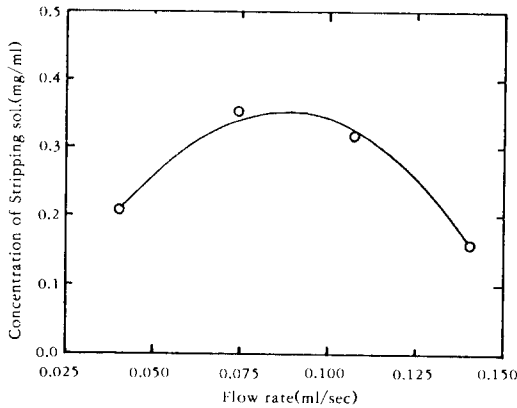


Fig. 7. The effect of flow rate on stripping

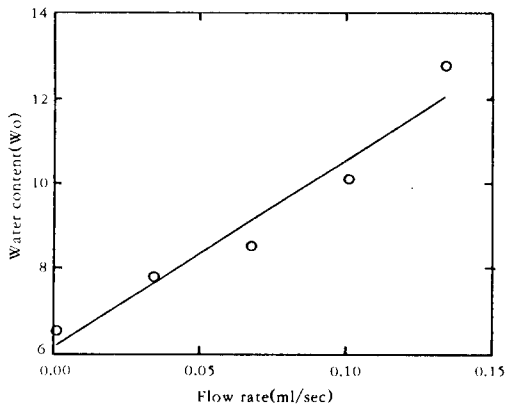


Fig. 8. The effect of flow rate on water content in organic phase

적어지기 때문에 역미셀 속의 물의 함량이 적어 추출에 역효과를 주게 된다. 그리고 유속이 높아지면 수용상의 방울이 명확하게 형성되고 얇고 column의 하단부에서 방울을 형성하기 때문에 접촉면적과 체류시간은 감소하지만 흐름이 유기상과 잘 섞여 역미셀 속의 물의 함량이 증가하는 낮은 유속과 반대의 효과가 나타난다. 그러므로 이러한 영향들의 상호작용으로 중간유속에서 최적점이 형성된다. 유속에 대한 물의 함량을 나타낸 결과는 Fig. 8에 나타나 있다.

**수용상의 부피의 효과**

수용상의 부피에 따른 추출량의 변화를 보기 위해서 수용상과 유기상의 비를 각각 0.7 : 1(50ml : 75ml), 1 : 1(75ml : 75ml), 1.7 : 1(125ml : 75ml), 2.3 : 1(175ml : 75ml), 2.7 : 1(200ml : 75ml)로 하여 추출실험을 하였다. 이때 유속은 0.135ml/sec이었다. 결과는 Fig. 9에 나온 것같이 수용상이 많아질수록 추출량이 급격히 증가하고 있다. 이는 새로운 수용상의 계속적인 공급이 같은 수용상으로 접촉횟수를 늘리는 것보다 더 큰 효과를 나타낸다는 것을 보여준다.

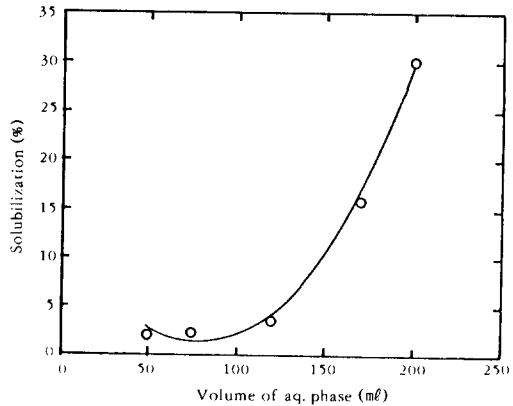


Fig. 9. The effect of volume of aqueous phase on extraction

**요 약**

연속추출시 그 상의 분리가 용이한 spray column에서 역미셀을 이용한 추출에 영향을 미치는 pH, 접촉횟수, 유속, 수용상과 유기상의 비 등 추출에 영향을 미치는 여러 인자들을 조사해 보았다. 그 결과 lipase는 등전점보다 낮은 3.6-4.5 사이에서 추출이 잘되었으며 역추출시에는 그와 반대로 등전점보다

높은 pH인 8.0-9.0에서 잘 추출되었다. 수용상과 유기상 사이의 접촉횟수가 증가함에 따라 추출량이 증가되었으며 추출시 계면활성제의 손실 때문에 유기상의 지속적인 공급이 필요하다. 유속의 효과는 접촉면적과 유기상 사이의 물의 함량의 반대효과로 0.068ml/sec과 0.101ml/sec사이에서 최적의 값을 갖는다. 수용상과 유기상간의 비에 따른 추출량은 예측했던대로 수용상의 양이 많을수록 그 추출량이 급격히 증가하는 경향을 보였다. 각각에서 활성도는 추출전에 비해 70%의 회수율을 보였다.

### 감 사

본 연구는 한국과학재단이 선정한 생물공정 연구센터의 연구비와 과학기술원 자체 연구비에 의하여 수행되었으며 연구비의 지원에 깊은 감사 드립니다.

### 참 고 문 헌

1. G. Marcozzi, N. Correa and P. L. Luisi(1991), *Biotech Bioeng.*, **38**, 1239.
2. T. A. Hatton(1989), "Surfactant-based Separation Process", Marcel Dekker Inc.
3. M. Dekker, R. Hihorst and C. Laane(1989), *Anal. Chem.*, **178**, 217.
4. D. Bratko, A. Lusar, S. H. Chen(1988), *J. Chem. Phys.* **89**, 545.
5. M. Dekker, K. Van'T Riet and S. R. Weijers, (1986), *Chem. Eng. J.*, **13**, B27.
6. D. Meyers(1991), "Surfaces, Interfaces, and Colloids", 238, VCH Publishers, Inc.
7. P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson and D. C. Klenk(1985), *Anal. Chem.*, **150**, 76.
8. D. Y. Kwon and J. S. Rhee(1986), *JAACS*, **63**, 89.
9. 최평호, 류희옥, 이태호, 장용근(1991), 한국생물공학회지, **6**, 337.
10. M. R. A. Barros and J. M. S. Cabral(1991), *Biotech Bioeng.*, **38**, 1302.
11. C. Jolival, M. Himmer and H. Renon(1990), *J. Colloid Interface Sci.*, **47**, 99.
12. G. A. Krei, H. Hustedt(1992), *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 99.
13. S. Ichikawa, M. Imai and M. Shimizu(1992), *Biotech Bioeng.* **39**, 20.
14. S. F. Matzke, A. L. Creagh, C. A. Haynes, J. M. Prausnitz and H. W. Blanch(1992), *Biotech Bioeng.*, **40**, 91.
15. M. J. M. Castro, and J. M. Cabral(1989), *Enzyme Micro. Technol.*, **11**, 6.
16. Kiran L. Kadam(1986), *Enzyme Micro. Technol.*, **8**, 266.
17. E. Ruckenstein and P. Karpe(1990), *Biotech Lett*, **12**, 241.