

공학석사 학위논문

아임계 및 초임계 이산화탄소와

역미셀을 이용한

Hen Egg White Lysozyme의 물질전달

2006년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

정 선 미

공학석사 학위논문

아임계 및 초임계 이산화탄소와

역미셀을 이용한

Hen Egg White Lysozyme의 물질전달

지도교수 전 병 수

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2006년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

정 선 미

정선미의 공학석사 학위논문을 인준함

2006년 2월

主 審 工學博士 이 근 태 (인)

委 員 農學博士 안 동 현 (인)

委 員 工學博士 전 병 수 (인)

목 차

목 차	i
List of Figures	iii
List of Tables	iv
Abstract	viii
I. 서 론	1
1. 역미셀 계(Reverse Micelles System)	5
(1) 역미셀 형성 계면활성제	5
(2) 역미셀 형성과 단백질 추출 mechanism	8
(3) 역미셀의 크기	14
2. 역미셀을 이용한 단백질의 액-액 추출방법	18
3. 역미셀의 단백질 추출에 영향을 미치는 인자	20
(1) pH의 영향	20
(2) 이온강도의 영향	24
(3) 계면활성제 농도의 영향	26
(4) 유기용매 <i>i</i> -octane 부피의 영향	26
(5) 초임계 이산화탄소의 영향	26
4. 물질전달 이론(Mass Transfer Theory)	27
5. 초임계 유체 기술	31

III. 재료 및 방법	34
1. 재료 및 시약	34
(1) Lysozyme 수용액 제조	36
(2) 유기용액 제조	36
2. 실험방법	36
3. 실험 장치와 운전조건	37
IV. 결과 및 고찰	41
1. Lysozyme 농도 결정	41
2. Lysozyme의 추출효율	41
(1) pH의 영향	41
(2) 이온강도의 영향	45
(3) 계면활성제 농도의 영향	45
(4) 유기용매 <i>i</i> -octane 부피의 영향	52
(5) 초임계 이산화탄소의 영향	52
3. 실험 Data의 상관관계	60
V. 결 론	66
References	68
Nomenclature	78

List of Tables

Table 1. Protein properties data	22
Table 2. Properties of hen egg white lysozyme	35
Table 3. Experimental conditions for reverse micelle process with supercritical carbon dioxide	39
Table 4. Previous correlations for mass transfer coefficient	62
Table 5. Constant C of Table 4	62
Table 6. Mass transfer coefficient of the all conditions	64

List of Figures

Fig. 1. Structure of triethylmethyl ammonium chloride (TOMAC)	7
Fig. 2. Structure of sodium di(2-ethylhexyl) sulfosuccinat (AOT)	7
Fig. 3. Schematic ternary phase diagram of an oil-water-surfactant microemulsion system	10
Fig. 4. Schematic representation of protein solubilization in reversed micelle	11
Fig. 5. Electrostatic interaction in organic phase	12
Fig. 6. Collision model for protein solubilization in reverse micelle-containing organic solutions	13
Fig. 7. Reverse micelle size and surfactant property	16
Fig. 8. Schematic illustration of the relation between surfactant and water concentration in the system	17
Fig. 9. Liquid-liquid extraction method reverse micelle	19
Fig. 10. Electrostatic criteria for protein extraction	23
Fig. 11. Ion distribution in reverse micelle (N, M : Chloride salts)	25

Fig. 12. Concentration profile for an extracted solute on the liquid-liquid system	30
Fig. 13. Schematic diagram of reverse micelle process	39
Fig. 14. Schematic of lysozyme transfer using reverse micelle in the interface of vessel	40
Fig. 15. Calibration curve of lysozyme	42
Fig. 16. Effect of pH in the aqueous phase on the mass transfer rate of lysozyme into reversed micelles with 50:50 volume ratios of organic phase (lysozyme 0.2 g/L, KCl 0.1 M, AOT 20 mM, 200 bar and 45°C)	43
Fig. 17. Effect of pH in the aqueous phase on the mass transfer coefficient K value (lysozyme 0.2 g/L, KCl 0.1 M, AOT 20 mM, 200 bar and 45°C)	44
Fig. 18. Effect of ionic strength in the aqueous phase on the mass transfer rate of lysozyme into reversed micelles with 50:50 volume ratios of organic phase (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, AOT 20 mM, 200 bar and 45°C)	46
Fig. 19. Effect of ionic strength in the aqueous phase on the mass transfer coefficient K value (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, AOT 20 mM, 200 bar and 45°C)	47

Fig. 20. Effect of volume of the aqueous phase on the mass transfer rate of lysozyme into reversed micelles with AOT concentration in organic phase (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, AOT 20 mM and 45°C); (a) 100, (b) 150 and (c) 200 bar	48
Fig. 21. The amount of lysozyme transferred into the organic phase according to AOT concentrations (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M, AOT 20 mM and 45°C); (a) 100, (b) 150 and (c) 200 bar	50
Fig. 22. Effect of AOT on the mass transfer coefficient K value (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1M, and 45°C)	51
Fig. 23. Effect of volume of the aqueous phase on the mass transfer rate of lysozyme into reversed micelles with various volume ratios of <i>i</i> -octane in organic phase (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M, AOT 20 mM, 200 bar); (a) 25, (b) 35 and (c) 45°C	53
Fig. 24. The amount of lysozyme transferred into the organic phase according to <i>i</i> -octane volume ratio (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M, AOT 20 mM and 45°C); (a)100, (b) 150 and (c) 200bar	55
Fig. 25. Effect of various volume ratio of <i>i</i> -octane on the mass transfer coefficient K value (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M, AOT 20 mM and 45°C)	56

Fig. 26. Effect of SCO_2 on the mass transfer rate of lysozyme into reverse micelles with 50:50 volume ratio of organic phase (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M and AOT 20 mM); (a) 25, (b) 35 and (c) 45°C	57
Fig. 27. Effect of SCO_2 and temperature on the mass transfer coefficient K value (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M KCl and AOT 20 mM)	59
Fig. 28. Comparison of Mass transfer coefficient K_{exp} and K_{cal} value	63

Mass Transfer of Hen Egg White Lysozyme Using Sub/Supercritical Carbon Dioxide With Reverse Micelles

Sun-Mi Jung

*Department of Food Science and Technology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

The transport phenomena process of lysozyme between aqueous solutions and AOT(Sodium di(2-ethylhexyl) sulfosuccinate)-*i*-octane(2,2,4-trimethylpentane)solutions dissolved with pressurized Supercritical Carbon Dioxide (SCO₂) were studied using reversed micelles at a plate system. The mass transfer rates were examined for various conditions, ionic strengths, pHs, AOT concentrations, *i*-octane volumes, SCO₂ pressures and temperatures. In this study, it was developed a model for estimating mass transfer of lysozyme on the basis of data measured from a flat vessel at pressurized two phases system, an aqueous phase containing protein and an organic phase reversed micelles mixed with SCO₂.

The results were similar to the conventional method of reversed micelles process without SCO₂ at the various

experimental conditions. However under the pressurized SCO_2 , it occurred constantly the mass transfer of lysozyme from aqueous phase to organic phase for the initial 8~12 minutes and which are approaching then it maintained an even mass transfer rate.

Mass transfer rates for the extraction of lysozyme were measured in a stirred cylindrical vessel. The vessel consist of an inner diameter of 60 mm and a height of 140 mm, containing 4 equi-spaced longitudinal baffles. The interfacial area was $2.827 \times 10^{-3} \text{m}^2$. Two co-axially mounted impellers were used, which were driven independently by magnetic drive. In all experiments, the impellers rotated in the same direction. A water jacket was used to control temperature in the range of 25~45°C. The CO_2 pressure in the vessel was regulated by high pressure pump.

In the lysozyme extraction utilizing the reversed micelles process, dissolving SCO_2 in the organic phase improved dramatically the mass transfer rate of lysozyme in the aqueous phase. Mass transfer coefficient, K was shown the highest value at the experimental conditions as follow: Ionic strength 0.1 M of KCl, pH 9.3 of the aqueous phase, 100 mM of AOT concentration in the organic phase, 200 bar of SCO_2 pressure, 45°C of temperature in the vessel.

Resulting of diminishing the interfacial tension between aqueous and organic phase by pressurized SCO_2 , the lysozyme of the aqueous phase was able to be transferred to the organic phase easily. As the results of adapting the empirical equations for the mass transfer coefficients, this study was similar to the

empirical model of Dekker(1990). Mean deviation (%) about the experimental and theoretical values of the mass transfer coefficient K was shown 25% by Dekker's equation.

I. 서 론

단백질과 핵산 등의 생물학적 물질들은 일상생활에서 널리 이용되는 물질들로서 일반적으로 혼합물로 존재하게 된다. 특정 성분의 물질이 혼합물 형태로 존재할 때보다는 단일 성분으로 존재할 때 매우 큰 경제성을 갖게 되므로 혼합물을 분리과정이 필요하며 높은 순도와 수율 그리고 대량적이고 경제적인 방법으로 분리하는 기술개발이 요구된다. 생물분리정제 기술은 단백질과 핵산 등과 같은 유용한 생물학적 물질들을 혼합물로부터 분리해내거나 농축하는 기술을 의미한다. 일반적으로 단백질과 같은 생물학적 활성을 지닌 물질들은 대량생산의 한계 때문에 매우 값비싼 생산물을 얻지 못하면 경제성이 보장되지 못하므로 높은 순도와 고수율, 대량생산 및 경제적인 방법으로 분리하여야 한다.

기존에 널리 사용되고 있는 생물학적인 물질들의 분리방법들로는 column liquid chromatography, 전기영동법, 염이나 용매를 이용한 침전법 등의 공정들이 사용되어져 오고 있다(O' Farrell, 1985; Ivory, 1990; Lensen, 1984; Gehrke, 1998). 그러나 column liquid chromatography나 전기영동법 등은 대량생산이 어려워 매우 값비싼 생산물을 얻지 못하면 경제성이 보장되지 못한다. 또한 염을 이용한 침전법은 물질에 따라 생물학적 활성에 영향을 미칠 수 있는 단점을 가지고 있다. 이런 이유로 최근에는 단백질이나 핵산과 같은 생체분자들의 분리를 위한 분석기술의 개발에 많은 노력을 기울여 왔지만 대부분의 경우 분석적인 응용에 제한되어 있고 산업적 규모로의 이용은 미비한 실정이다. 따라서 높은 순도와 수율 그리고 대량생산과 경제적인 방법으로 분리하는 새로운 분리기술의 개발이 요구되고 있는 실정이다(Zamarro *et al.*, 1996; Kommareddi *et al.*, 1994).

이러한 이유로 대량생산이 가능하고, 다단계 역류조작이 가능하다는

장점을 가진 액-액 추출 공정이 제안되었다(Schmidt *et al.*, 1996; Forciniti *et al.*, 1991). 제안된 액-액 추출공정에 사용된, 유기용매를 이용한 공정의 연구는 획기적인 방법이라 할 수 있다. 그러나 추출된 생물학적 물질들에 대한 용매의 용해도 용량과 낮은 선택도의 한계를 보였으며 추출된 물질들의 변성과 활성에 대한 문제가 제기되었다. 이런 단점을 피하기 위하여 유기용매에 계면활성제를 첨가하여 역미셀을 이용한 추출공정이 고안되었다. 이 추출공정은 단백질이나 생물학적 물질들의 활성을 유지시키면서 빠른 시간 내에 많은 양의 생물학적 물질, 특히 단백질을 추출할 수 있다는 장점을 가지고 있기 때문에 많은 연구가 진행되고 있다(Dekker *et al.*, 1990a; Marcozz *et al.*, 1991; Andrews *et al.*, 1994; Kadam, 1986).

역미셀을 이용하여 수용액상에 녹아있는 단백질을 유기상으로 가용화(solubilization) 시킬 때 영향을 미치는 인자들은 수용액상의 pH, 염의 종류와 그 농도, 계면활성제의 구조와 농도 등이 가장 크다고 알려져 있다(Leodidis *et al.*, 1989; Hilhors *et al.*, 1995; Hong *et al.*, 2000). 이런 인자들이 추출에 가장 큰 영향을 미치는 이유는 단백질이 고유의 등전점을 가지고 있기 때문이다. 이 외에 완충용액의 농도, 계면활성제의 농도와 종류, 수용액상과 계면활성제의 부피 비, 유기상의 종류와 농도, 알코올 같은 제 3의 물질 첨가 등에 대한 연구결과도 보고되고 있으며(Lye *et al.*, 1995). 미셀 크기에 의한 구조적 영향에 대한 연구결과도 진행되고 있다(Zampieri *et al.*, 1986). 역미셀을 이용하여 단백질을 분리할 때 유기상의 역미셀들은 단백질과 소량의 물을 포함하고 있다. 유기상 역미셀들의 이온함량을 원자흡수법으로 측정한 Marcozz *et al.*(1991)의 연구결과에 의하면 유기상의 이온농도는 무시할 만함이 밝혀진 바, 추출되는 수용액에 가한 염이 거의 존재하지 않게 된다.

Zampieri *et al.*(1986)은 실온에서 여러 $W_o(=[H_2O]/[AOT])$ 값에 대하여 비교적 작은 단백질이 포함된 역미셀들의 구조적인 매개변수들을 결정하였다. Caselli *et al.*(1988)은 역미셀들에 의해 단백질이 분리될 때 구조적인 매개변수인 역미셀의 크기를 열역학적인 접근 방법을 이용하여 계산하였다. 최근에는 역미셀의 크기와 크기분포를 광산란법으로 직접 측정하여 계면활성제, 염의 종류와 농도에 따른 구조적인 영향의 연구가 보고되기도 하였다(Dekker *et al.*, 1989).

역미셀을 이용한 추출 공정은 단순한 용매추출공정에서 문제가 되는 용매에 의한 생화학제품의 비활성화를 방지할 수 있기 때문에 더욱 효과적인 공정이라고 생각된다(Zamarro *et al.*, 1996; Kommareddi *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1996). 역미셀은 계면활성제에 의하여 미세한 수용액상의 입자가 유기상에 안정되게 분산되어 있는 것(Andrews *et al.*, 1994)으로, 역미셀을 형성한 유기상을 단백질을 함유하고 있는 수용액상과 접촉시키면 수용액 중의 단백질이 유기상의 역미셀 내부로 이동하게 된다. 역미셀 내부는 수용액상으로 추출된 단백질은 유기용매에 의하여 비활성화 되지 않는다.

일반적으로 단백질 혹은 아미노산이 수용액상으로부터 유기상의 역미셀 내부로 이동되는 현상은 단백질 또는 아미노산의 표면전하 계면활성제에 의하여 형성된 역미셀 내부 표면의 전하와의 전기적 상호작용(electrostatic interaction)이 주된 원인으로 여겨지고 있다(Zamarro *et al.*, 1996). 따라서 수용액상에 단백질의 표면전하에 영향을 미치는 pH, 이온강도, 그리고 역미셀 내부 표면의 전기적 성질을 결정하는 계면활성제의 종류 등이 단백질의 선택적 분리에 중요한 공정변수가 된다고 볼 수 있다. 즉, 이러한 역미셀을 포함하는 유기상을 이용한 단백질과 다른 생화학물의 선택적인 추출은 향후 연속 생물 분리공정에 이용될 수 있는 중요한 기술 중의 하나이다(Marcozz *et al.*, 1991; Kadam,

1986; Dekker *et al.*, 1990b).

역미셀 용액을 이용한 단백질 추출공정에서 물질전달 mechanism은 water-in-oil microemulsion 내부로 단백질이 용해되는 현상을 명확히 규명할 수 있다. 이에 관해서 Luisi *et al.*(1984)는 단백질 전달 거동에 대한 실험적 측정을 보고하였고, 열역학적 모델을 이용하여 현상을 규명한 실험적인 결과가 발표되었다(Kinugasa *et al.*, 1991; Goto *et al.*, 1998; Plucinski *et al.*, 1994). 그러나, 단백질이 역미셀상으로의 전달 및 다시 수용액상으로 전달되는 계면에서의 거동에 대한 규명이 현저히 미약하여 두 상의 접촉 시 microemulsion system이 평형으로 근접할 때 물질전달속도에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 그러나, 최근에 Göklen *et al.*(1990) 등에 의해서 역추출(back extraction) 시 중요한 계면저항을 주목하였고, Luisi *et al.*(1984) 등은 단백질의 전달 속도가 역추출 보다는 정추출(forward extraction)이 훨씬 빠르다는 것을 보고 하였다. 그리고 Nilschi *et al.*(1999)에 의해서 lysozyme의 정추출 시 계면저항은 대류 전달과 연관 지었을 때 무시된다고 보고하였다.

역미셀을 이용한 단백질 추출은 단백질의 생물학적 활성을 유지시키면서 저비용으로 연속적인 대량 생산을 할 수 있지만, 계면활성제를 유기용매에 용해시켜 사용하는 단점이 있다. 이러한 사실을 고려하여 본 연구에서는 역미셀을 포함한 유기용매로의 lysozyme의 추출에서 초임계 이산화탄소의 가압으로 *i*-octane의 사용량 및 잔존율을 줄이며, 이밖에 주요변수인 pH, 이온강도, 계면활성제의 농도 등의 변화에 의한 추출속도에 대한 영향을 고찰하고, 최적 분리조건을 제시하며 대형화 및 연속식 공정을 개발하는데 있어 공학적 기초를 제공하는데 있다. 그리고, 액-액 간의 물질전달 기구를 해석하기 위해서 stirred flat vessel을 이용하여 역미셀상으로 전달되는 계면전달속도의 계면 거동

변수들을 측정하여 총괄반응속도 및 반응속도정수를 구하는 방법과 반응형태를 고찰하며, microemulsion system을 이해하는데 목적을 두고 있다.

1. 역미셀 계(Reverse Micelles system)

(1) 역미셀 형성 계면활성제

합성된 이온성 계면활성제의 대부분은 친수성의 머리 부분과 소수성의 꼬리 부분으로 이루어져 있다. 이때 계면활성제 머리 부분은 일반적으로 양이온, 음이온 그리고 중성이온을 띄며 1~3개의 소수성 꼬리부분을 가지고 있다. 만약 계면활성제가 하나의 꼬리를 가지고 있는 경우 소수성의 성질이 약하여 실온이 유기용매에서는 역미셀을 형성하기가 매우 힘들다. 이런 이유로 다른 보조표면계면활성제(cosurfactant)를 첨가하기도 한다(Shinoda *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1999). 일반적으로 사용된 보조표면계면활성제들은 짧은 사슬의 알코올들이나 아민류이다. 그러나 보조표면계면활성제들의 도움 없이도 역미셀을 형성할 수 있는 계면활성제는 탄화수소 사슬이 2~3개의 사슬을 가지는 사슬이다(Hou *et al.*, 1987). 하나의 탄화수소 사슬을 가지는 계면활성제에 비해 두개의 사슬을 가지는 경우는 균형적인 친수성-소수성의 성질들을 띄게 된다. 특히 사슬에 가지가 있는 경우에는 더욱 소수성의 성질을 증가시킨다. 2~3개의 탄화수소 사슬에 비해 하나의 사슬을 가지는 경우는 유기용매보다 물에 더 호의적인 성질을 가지는 것은 당연한 현상이다. 만약 사슬이 한개 이거나 친수성 성질이 강한 계면활성제를 사용하는 경우에는 유기용매의 용해도를 증가시키고 역미셀 형성을 도와주기 위한 소수성 보조표면활성제가 필요하다. 더욱이 단백질과 같은 등전점을 가지는 경우, 등전점 이하의 pH에서는 단백질 표면 순전하는 음이온을 띄게 된다. 이런 조건에서는 양이온 계면활성제를 사용하여 역미셀을 형성하

는 것이 효과적이며 대표적으로 사용되고 있는 양이온 계면활성제는 Fig. 1에 나타낸 triethylmethyl ammonium chloride(TOMAC)이다 (Jarudilokkul *et al.*, 1999). 등전점 이하의 pH에서는 단백질 표전 순전하는 양이온을 띄게 된다. 이런 조건을 고려하여 본 연구에서는 보조 표면활성제의 도움 없이도 역미셀을 형성할 수 있는 계면활성제를 선택하였다. 이런 조건의 성질들은 음이온이며 2개의 사슬 그리고 사슬에 가지가 있는 계면활성제의 경우이며 이 조건을 만족하는 계면활성제가 AOT로 Fig. 2에 AOT의 구조를 나타내었다. 음이온 계면활성제인 AOT는 분자구조상 머리 부분의 면적이 꼬리 부분의 면적보다 작은 특징을 갖는다.

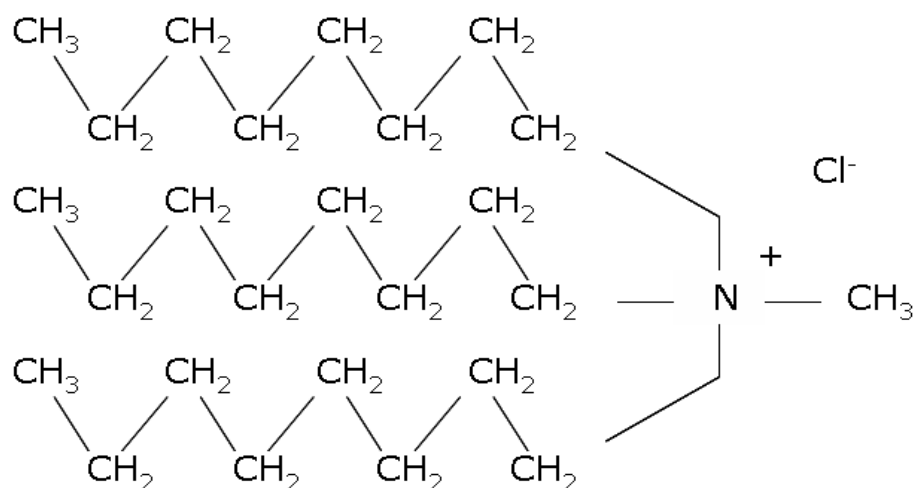


Fig. 1. Structure of triethylmethyl ammonium chloride (TOMAC).

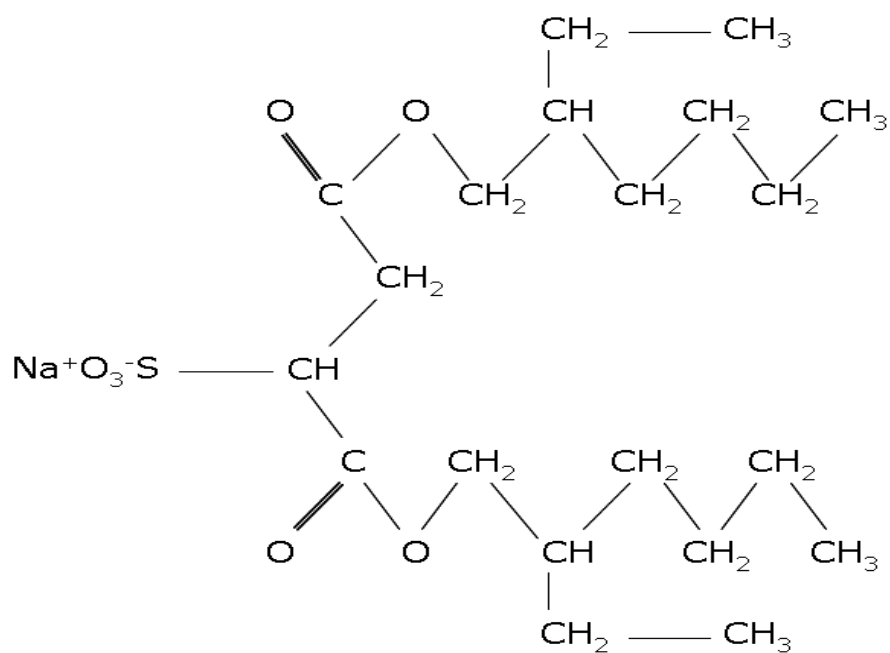


Fig. 2. Structure of sodium di(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT).

(2) 역미셀 형성과 단백질 추출 mechanism

역미셀의 형성은 수용액상과 음이온 계면활성제가 포함된 유기상이 접촉하여 형성된다. 음이온 계면활성제인 AOT는 음이온을 띤 친수성의 머리 부분과 소수성의 꼬리부분으로 이루어져 있다. 이런 성질들에 의하여 역미셀의 형성은 계면에서 형성되어 유기상으로 이동하게 된다. 친수성 머리 부분과 수용액 간의 친화력이 작용하여 수용액을 포함하는 극성 내부핵을 형성하게 된다. 이를 water in oil microemulsion이라 부르며 이 집합체들을 역미셀이라 부른다(Eicke *et al.*, 1976; Yoon *et al.*, 1996). 이렇게 형성된 역미셀은 Fig. 3에서 보인 바와 같이 수용액과 같이 수용액과 유기용매 그리고 계면활성제의 3성분계이며 유기용매가 전체 부피의 80~90%, 물이 10% 그리고 계면활성제가 10% 미만의 부피로 구성된다.

일반적으로 역미셀 용액은 몇 가지 특징을 가지고 있다. 첫 번째는 역미셀 형성 후 시간에 따른 상 분리가 없으므로 열역학적으로 안정적인 계이다. 두 번째는 수용액상과 유기상 사이의 계면장력이 비교적 작다는 것이다. 세 번째는 역미셀은 nm 단위의 아주 작은 droplet이라는 점이다. 이런 작은 크기 때문에 일반적인 emulsion이 혼탁한 현상을 보이는데 반하여 역미셀들은 microemulsion 용액에서 투명하게 보이는 것이다. 네 번째는 작은 크기의 droplet 집합체이면서도 물과 유기용매 영역 사이의 내부 표면이 매우 넓다는 장점이 있다. 다섯 번째는 용액의 점도는 순수 유기용매의 점도와 비슷하다는 특징을 가지고 있다. 이런 특성 때문에 역미셀들의 활용도는 매우 높다고 할 수 있다(Langevin, 1992).

Fig. 4에 보인 바와 같이 역미셀들은 내부핵에 물 등의 수용액을 포함하며 이를 water pool이라 하고, 이 water pool에 수용성 단백질이 모이게 되므로 유기용매 속에서도 생체 물질의 활성을 유지할 수 있게

된다. 이렇게 형성된 역미셀은 소수성 부분인 계면활성제 꼬리들이 수용액과의 반발력이 작용하게 되고 이 힘에 의하여 유기상으로 이동하게 된다. 이런 원리를 이용하여 수용액상에 녹아있는 생체 단백질들을 추출하게 된다(Barbaric *et al.*, 1976; Aveyard *et al.*, 1986a; Krei *et al.*, 1992). 한편 수용성 단백질들을 효과적으로 추출하기 위해서는 단백질들의 특성을 파악해야만 한다. 수용성 단백질은 고유의 등전점을 가지고 있다. 이런 이유로 역미셀을 이용한 단백질 가용화 실험에는 수용액상의 조건을 등전점보다 작은 pH를 유지하는 것이 일반적이다. Fig. 5은 수용액상의 pH 조건에 대해 단백질과 계면활성제 사이의 상호작용을 보여준 그림이다. Fig. 5의 (a)에서는 수용액상에 단백질이 존재하지 않은 경우, 역미셀과 water pool을 형성할 수 있음을 보여주고 있으며, (b-1), (b-2)는 수용액상의 단백질의 순전하가 각각 양이온과 음이온에서의 상호작용을 설명한 그림이다. 만약 등전점 이상의 pH를 유지할 경우 계면활성제 머리 부분인 음이온의 영향으로 단백질과 계면활성제 간의 정전기적 인력이 급격히 감소하게 되어 수용액상에 녹아있는 단백질을 분리하는 것이 어렵다. 또한 수용액에 녹아있는 단백질들이 활성을 잃을 수도 있다.

Fig. 6은 역미셀을 이용하여 수용액상에 녹아있는 단백질을 유기상으로 추출하는 과정을 나타내었다. 이 과정은 그림에서 보는 바와 같이 단백질이 포함된 수용액상이 유기상과 접촉을 한 뒤 계면에서 분리되는 것이다. 이는 계면활성제의 친수성기인 머리 부분이 계면을 향해 형성되고 수용액상의 단백질이 계면활성제의 머리와 강항 인력이 작용하여 단백질을 포함한 역미셀을 형성하게 되는 것이다. 이렇게 형성된 역미셀은 계면활성제 꼬리 부분이 수용액상과 강한 반발력을 형성하여 유기상으로 이동하는 과정을 거치게 된다.

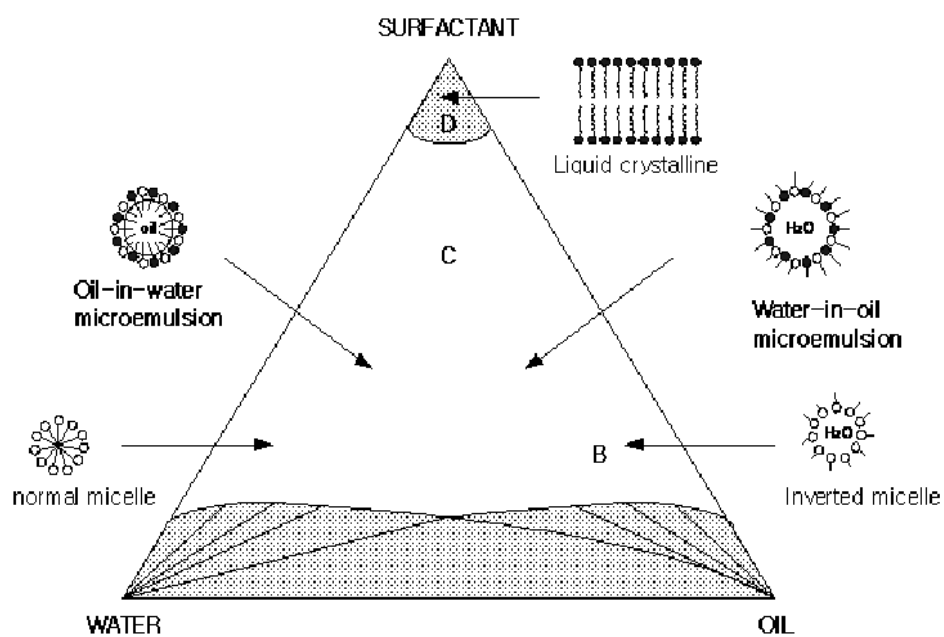


Fig. 3. Schematic ternary phase diagram of an oil-water-surfactant microemulsion system.

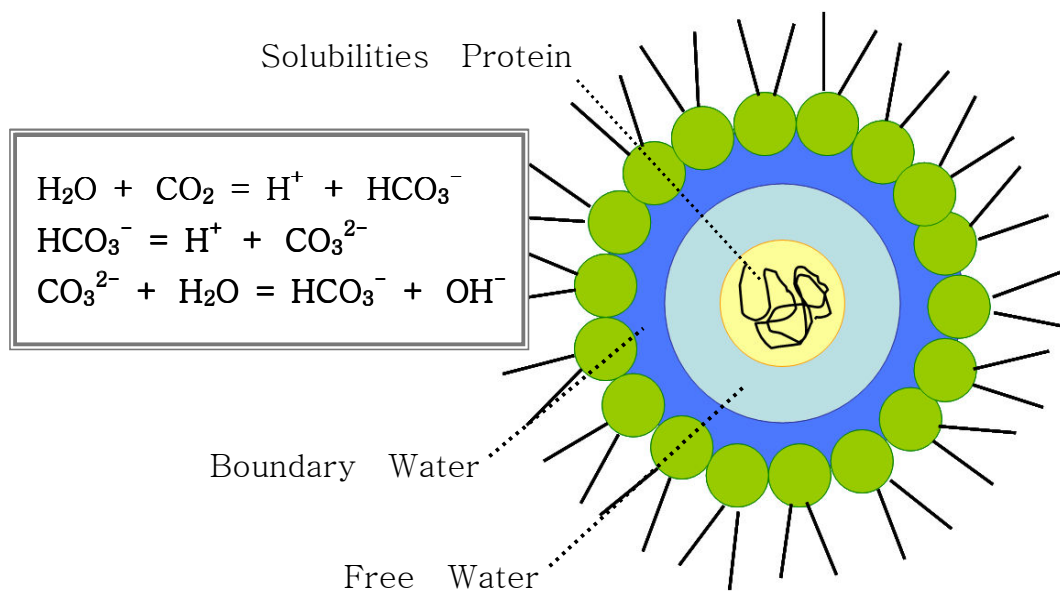


Fig. 4. Schematic representation of protein solubilization in reversed micelle.

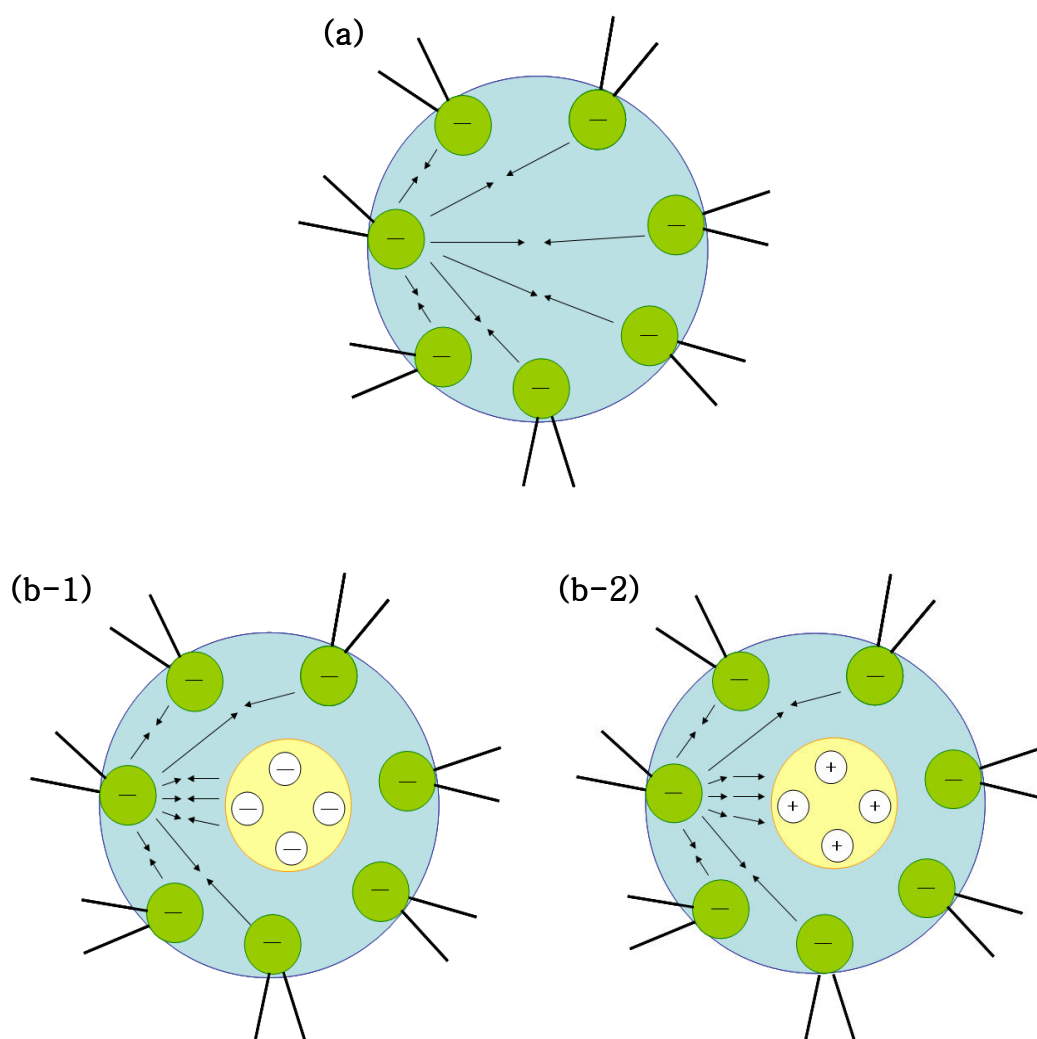


Fig. 5. Electrostatic interaction in organic phase.

(a) Surfactant head group repulsion.

(b) Surfactant head group/protein interaction.

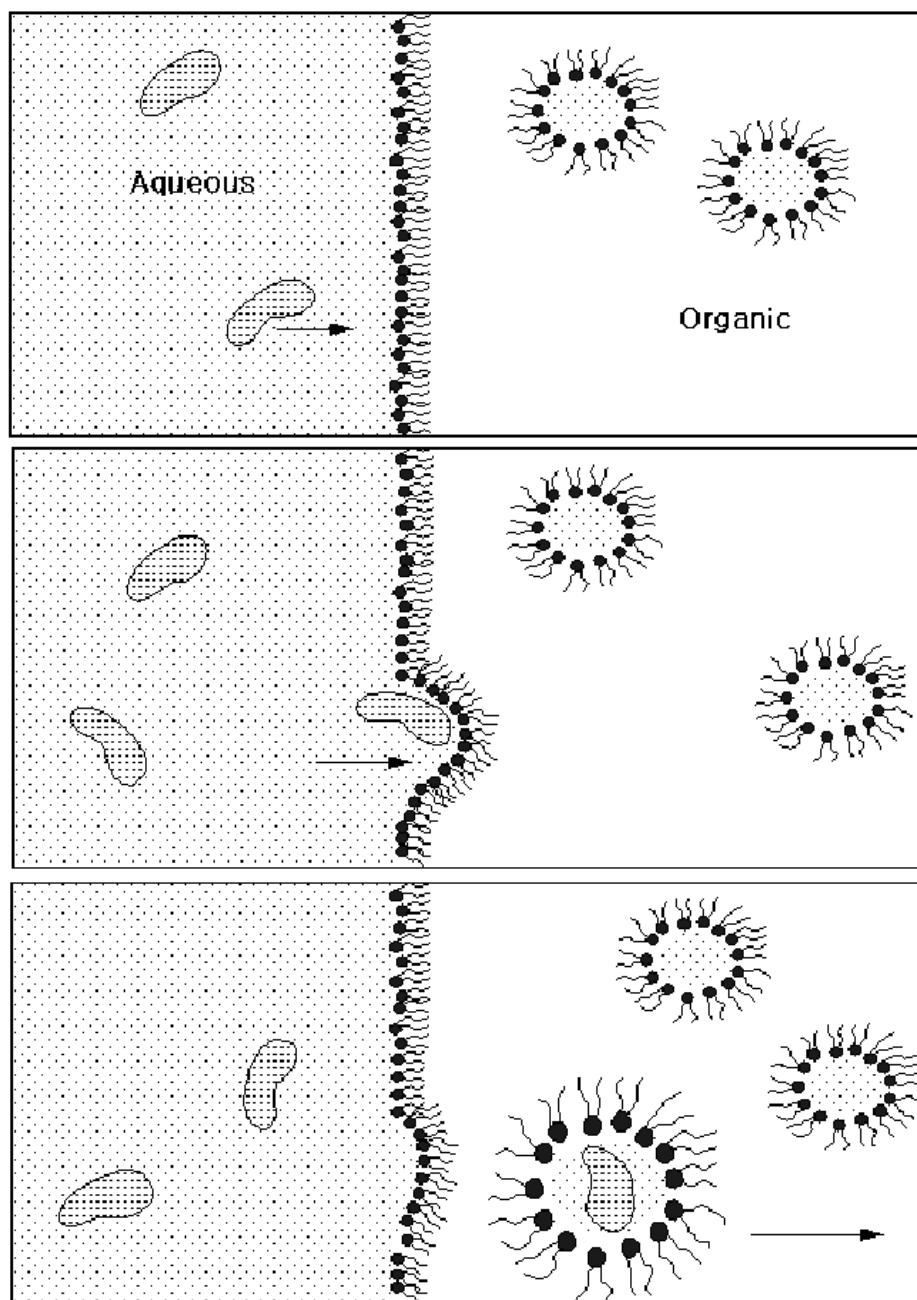


Fig. 6. Collision model for protein solubilization in reverse micelle-containing organic solutions.

(3) 역미셀의 크기

역미셀의 물리적 성질인 역미셀의 크기는 여러 인자들에 의해 결정된다. 일반적으로 역미셀의 크기에는 계면활성제의 종류와 농도가 가장 큰 영향을 미친다. 또한 상접촉 시 수용액상의 염의 종류와 농도에 따라서도 결정될 수 있다. 실제로 AOT의 머리 부분이 친수성의 성질을 띠므로 수용액과의 인력이 작용하기 때문에 수용액상의 조건에 따라 크기가 결정될 수 있다.

분리에 있어서 역미셀의 크기는 원하는 물질의 분리에 결정적인 역할을 한다. 만약 추출하고자 하는 단백질이 역미셀보다 큰 경우에는 분리가 불가능하게 될 것이다. 따라서 역미셀의 크기는 추출의 중요한 인자임을 알 수 있다. 더욱이 역미셀의 크기는 분리공정의 안정성과 열역학적 성질 규명, 분리에 있어서 가하학적 모델에 적용하기 위해서 측정하여야 한다.

역미셀 내부는 단백질 분자와 water pool로 형성되기 때문에 유기상의 수분함량을 측정함으로써 유추할 수 있다(Hilhors *et al.*, 1995; Rabie *et al.*, 1996). 유기상의 수분함량은 물과 계면활성제의 몰비율 $W_o = [H_2O]/[AOT]$ 로 표현된다. 역미셀의 크기는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 water pool의 반경(머리 부분을 포함한 미셀들의 water core의 평균반경)인 R_{wp} 로 표현된다. 여기서 꼬리부분의 길이(1 nm)는 제외된다.

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

V_w 는 단일 물분자의 부피(0.03 nm^3)이고, Σ 는 계면에서 AOT 계면활성제 한 분자가 차지하는 면적($\Sigma AOT = 0.055 \text{ nm}^2$)을 나타낸다. V_w 와 Σ 는 거의 일정하기 때문에 W_o 값이 이에 독립적이라고 가정하면 역

미셀의 크기를 쉽게 구할 수 있다. 역미셀의 크기는 여러 변수들에 의하여 영향을 받는다. 특히, Fig. 8에서 보인 바와 같이 유기상의 계면활성제 농도와 물의 양에 따라 결정된다. 물의 양이 증가하면 유기상의 수분함량인 W_o 값이 감소하게 되어 역미셀의 크기는 작아짐을 알 수 있다. 한편 일정한 W_o 값에서 역미셀의 크기는 일정해짐을 알 수 있다. 즉 계면활성제와 물의 양이 증가해도 역미셀의 크기는 일정하게 유지된다. 따라서 적절한 역미셀의 크기는 단백질 분리효율에 영향을 미치므로 단백질 크기에 따른 적절한 역미셀의 크기를 형성할 수 있도록 여러 변수의 영향을 파악하는 것이 좋다.

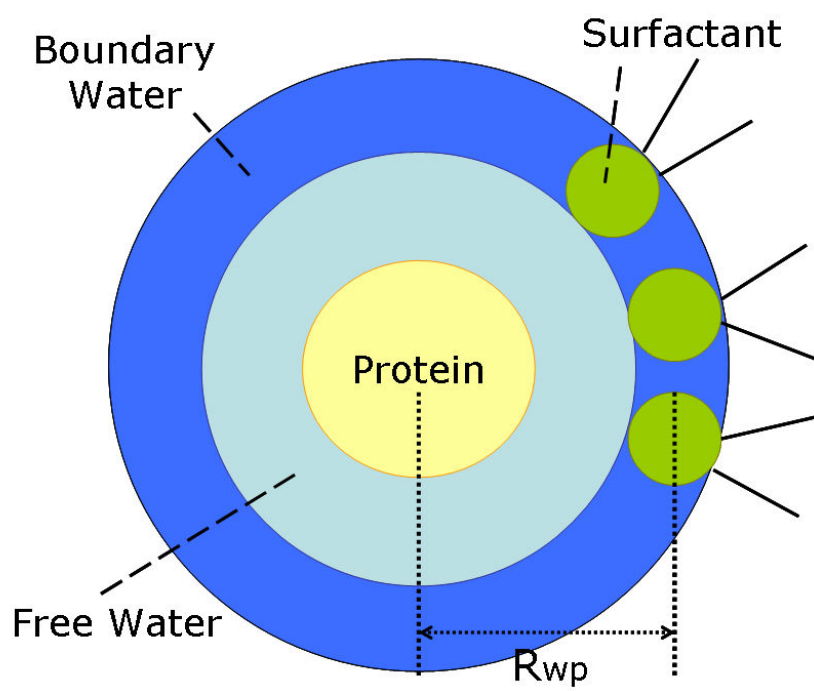


Fig. 7. Reverse micelle size and surfactant property.

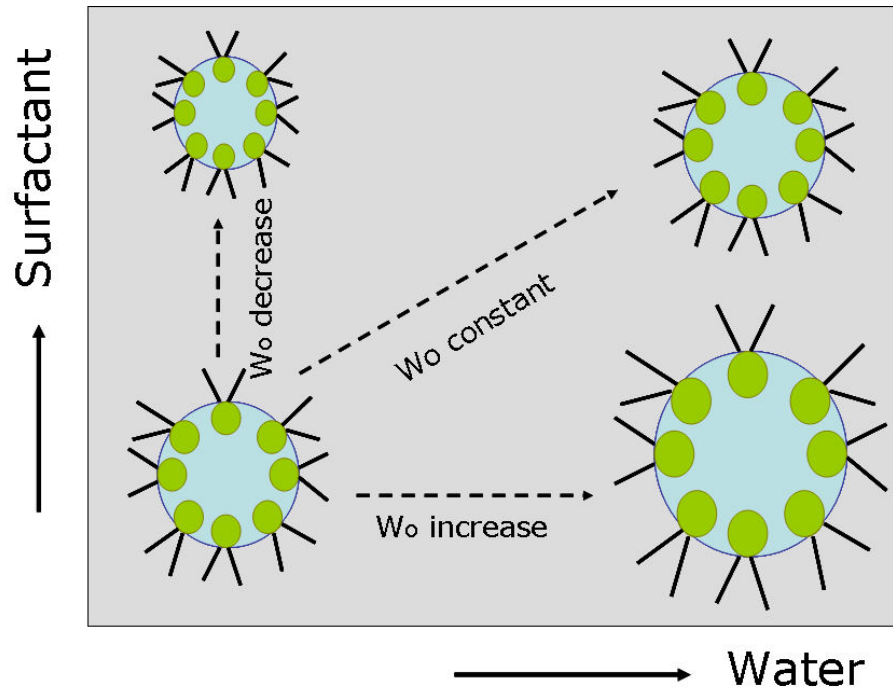


Fig. 8. Schematic illustration of the relation between surfactant and water concentration in the system.

3. 역미셀을 이용한 단백질의 액-액 추출 방법

일반적으로 역미셀을 사용하는 단백질 분리는 두 액상(수용액상과 유기상)을 이용하여 행하여지므로 일종의 액-액 추출방법이라고 할 수 있다. 그러나 불용성 단백질의 경우에는 고체-액체 추출 방법이 사용된다. 고체-액체 추출방법은 먼저 주입법을 이용하여 단백질이 포함되지 않은 역미셀 상의 유기상에 만든다. 이렇게 형성된 역미셀을 이용하여 단백질 고체 분말과 직접 접촉시킨다. 접촉에 의해 고체 단백질은 유기상으로 가용화할 수 있게 된다. 그러나 이 방법은 추출과정추출에 영향을 주는 변수에 대하여 잘 알려지지 않을 뿐 아니라 액-액 추출법이나 주입법보다 선택적인 면에서 효율이 매우 낮다. 더욱이 단백질 가용화의 시간과 양, 그리고 활성에서 효율이 액-액 추출방법에 비해 매우 낮다. 그러나 단지 불용성 단백질의 분리에 대한 방법의 가능성을 보여주고 있으나 거의 사용되지는 않는 실정이다. 이에 비해 액-액 추출방법은 단백질이 녹아있는 수용액상과 계면활성제가 녹아있는 유기상을 접촉시켜 평형에 도달하게 하는 방법이다. 이러한 액-액 추출방법은 Fig. 9에서 보여준 정추출이다. 이 추출은 단백질이 녹아있는 수용액상과 계면활성제가 있는 유기상을 접촉시킬 때 수용액상의 단백질 계면에서 유기상의 계면활성제인 AOT와 접촉하여 역미셀을 형성하여 유기상으로 이동해가는 단계를 말한다. 수용성 단백질이 유기상으로 전달되기 때문에 이를 가용화라고 부른다. 이때 가용화 효율 향상을 위해 수용액상의 pH와 염의 농도 그리고 유기상의 AOT 농도 등의 조건을 조절한다. 접촉 계면의 한계를 극복하고 원활한 두 상간의 접촉을 위해 혼합과 원심분리를 하고 두 상간의 평형을 위해 안정화 하는 것으로 설명되어진다. 이러한 액-액 추출방법은 짧은 시간 동안 많은 양의 단백질을 분리할 수 있고 단백질 활성을 유지시킬 수 있다는 장점이 있기 때문에 가장 많이 이용되고 있다.

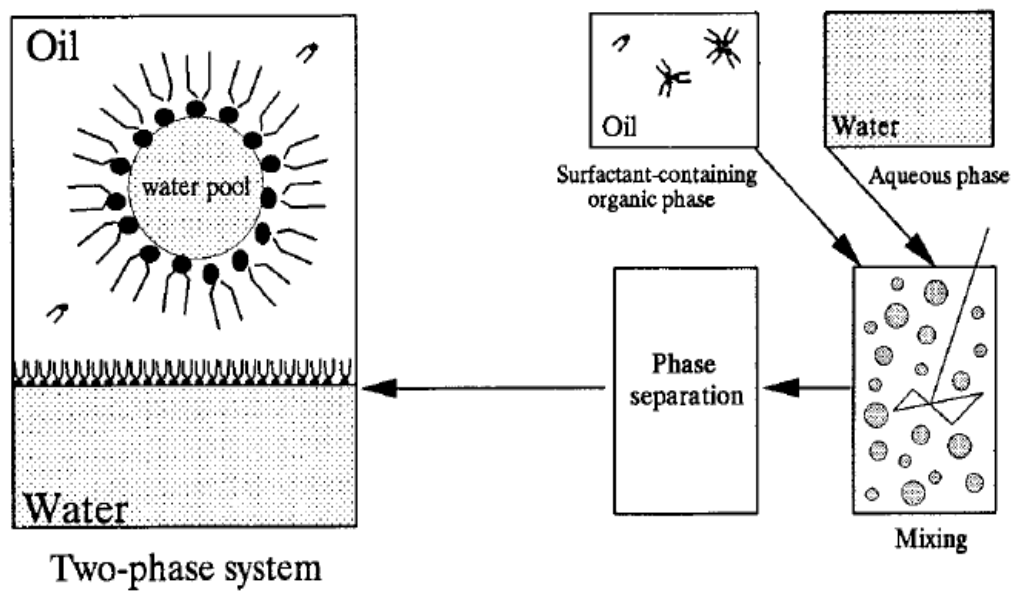


Fig. 9. Liquid-liquid extraction method reverse micelle.

4. 역미셀의 단백질 추출에 영향을 미치는 인자

역미셀을 이용한 분리는 수용액상과 유기상의 두 액상을 이용하는 추출방법의 하나이며, 이 추출에 영향을 미치는 여러 변수들이 있다. 그 중에서도 단백질 분자량, 계면활성제의 농도, 염의 농도에 따른 이온세기의 영향, 수용액상의 pH 등이 대표적인 변수들이다.

(1) pH의 영향

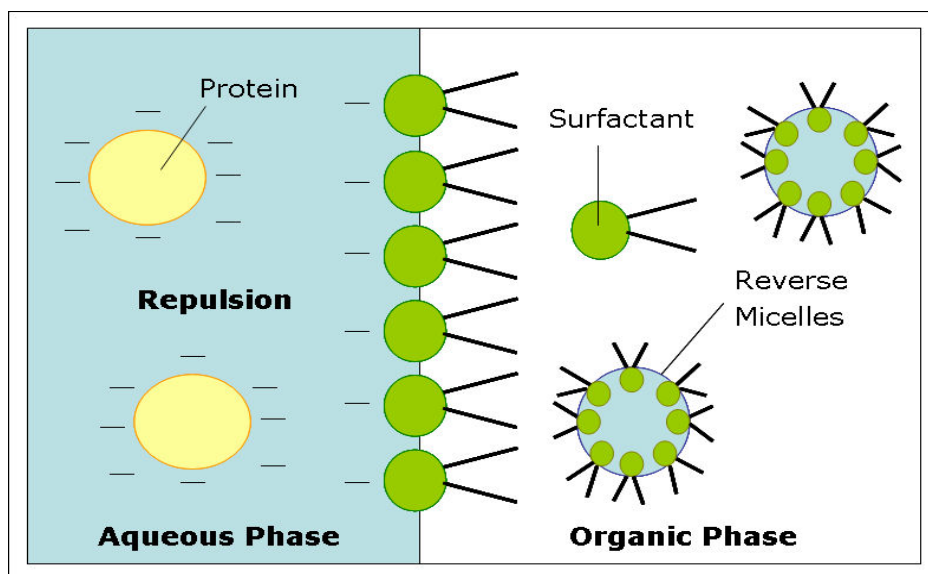
각 수용성 단백질은 등전점(pI)을 갖는다. 대표적인 단백질의 분자량과 등전점은 Table 1에 나타내었다. 수용액상의 단백질을 유기상으로 가용화하기 위해서는 수용액상의 pH를 조절하여야 한다. 만약 등전점보다 큰 pH를 갖는 수용액에서는 단백질의 순전하가 음전하를 띄게 되며 이 경우는 양이온 계면활성제를 사용한다. 그러나, pH가 등전점보다 낮은 경우는 단백질의 순전하가 양전하를 띄게 되므로 이때는 음이온 계면활성제를 사용하는 것이 효과적이다.

수용액상의 pH에 따른 단백질 추출과정을 Fig. 10에 나타내었다. Fig. 10(a)는 수용액상의 pH가 등전점보다 큰 경우를 보인 그림이다. 이 경우 수용액상에 녹아있는 단백질의 표면전하는 음전하를 띄게 되므로 유기상의 음이온 계면활성제의 머리 부분과 반발력이 작용하여 단백질은 유기상으로 추출할 수 없게 되고 단지 수용액만 포함된 역미셀이 형성됨을 보여주고 있다. 그러나, Fig. 10(b)는 등전점보다 낮은 pH 조건에서는 단백질 순전하가 양전하를 띄게 되어 계면활성제 머리부분의 음이온과 정전기적 인력이 작용하여 단백질이 포함된 역미셀이 형성되므로 분리 효율이 향상된다. 이처럼 수용액상의 pH에 따라 단백질이 분리되는 매우 큰 영향을 미치게 된다. 만약 등전점 이상의 높은 pH인 경우는 단백질의 고유한 생물학적 활성을 잃게 되므로 단백질 추출은 등전점보다 낮은 pH에서 실행하여 단백질 순전하는 양전하를 띄도록

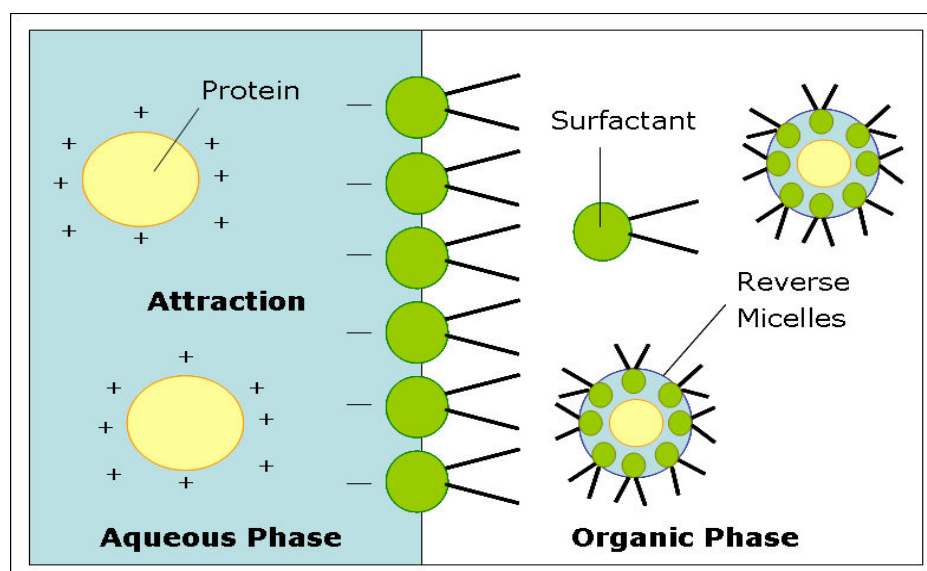
하고 음이온 계면활성제를 사용하여야 효과적임을 알 수 있다. 이런 원리를 이용하면 유기상에 가용화되어 있는 단백질을 쉽게 수용액상으로 회수할 수 있다. 수용액상으로 단백질을 회수하기 위해서는 등전점보다 큰 pH를 새로운 수용액과 접촉시키면 역미셀 속의 단백질의 순전하가 음전하를 띄게 되며 음이온 계면활성제 머리와 반발력에 의해 단백질이 수용액상으로 추출된다. 만약 수용액상의 pH가 단백질의 등전점보다 낮으면 유기상에 가용화된 단백질이 수용액상으로 추출되지 않는다. 즉, 단백질과 계면활성제 머리 부분과의 정전기적 인력이 강하게 작용하여 이미 형성된 역미셀의 재분배가 일어나지 않아 유기상의 단백질의 수용액상으로 이동시키기 어렵다. 그러나, 모든 경우에 효율이 pH만의 영향을 받는 것은 아니며 더러는 다른 변수에 따라 전혀 다른 효과를 나타낼 수도 있다.

Table 1. Protein properties data

Protein	Source	Mw	pI
Cytochrome c	Horse heart	12,300	10.4
Ribonuclease a	Bovine pancreas	13,700	7.8
Lysozyme	Chicken egg white	14,300	11.2
α -chymotrypsin	Bovine pancreas	25,300	8.3
α -chymotrypsinogen	Bovine pancreas	25,800	9.5
Trypsin	Bovine pancreas	23,300	10.5
Trypsinogen	Bovine pancreas	24,500	9.3
Elastase	Bovine pancreas	~25,000	8.9
α -Amylase	Bacillus sp.	24,000	5.9
Renin	Calf stomach	44,000	~4.9
Pepsin	Porcine stomach mucosa	32,700	< 1
Bovine Serum Albumin		65,000	4.9



(a) $\text{pH} > \text{pI}$ + Anionic Surfactant = Non Extraction



(b) $\text{pH} < \text{pI}$ + Anionic Surfactant = Extraction

Fig. 10. Electrostatic criteria for protein extraction.

(2) 이온강도의 영향

역미셀을 이용한 단백질 분리에서 염의 농도 또한 중요한 변수이다. 역미셀을 이용한 추출에 있어서 염의 첨가는 두 가지의 중요한 영향을 나타낸다. 염은 역미셀들과 하전된 계면 단백질 사이의 정전기적 상호작용을 감소시키며 다른 한편으로는 Fig. 11와 같이 계면활성제 머리 부분 간의 정전기적 반발력을 감소시켜 높은 이온세기에서는 역미셀들의 크기 감소를 초래한다. 염의 농도가 높아질수록 친수성 단백질 분자와 계면활성제의 극성 그룹 사이의 인력은 감소한다. 이와 같은 이유로 계면활성제 머리 부분 상의 반발력도 감소한다. 그 결과, 작은 역미셀이 형성되고 $W_o(=[H_2O]/[AOT])$ 값도 작아지므로 가용화되어 분리 추출되는 단백질 양은 감소하게 된다. 염이 첨가되지 않은 경우, 즉 이온 세기가 충분치 못한 경우엔 수용액상과 유기상 사이에 응집현상 (aggregation)이 생기는 것을 관찰 할 수 있다. 이는 염을 첨가하면 계면과 하전된 단백질 사이의 정전기적 상호작용은 감소되나 염이 없는 경우에는 정전기적 상호작용이 강하여 역미셀 형성을 방해하게 되기 때문이다. 그리고, 첨가되는 염의 이온이 작을수록 작은 정전기적 차폐 효과(electrostatic screening)를 가져와서 역미셀 형성을 촉진한다. 정전기적 차폐효과로 인해 이온이 단백질과 계면활성제 사이에서 정전기적으로 역미셀 형성을 방해하는 효과이며 일반적으로 이온 크기는 이온화 경향(ionization tendency)에 따른다. 이온화 경향이 클수록 이온의 크기가 커지면 이온화 경향이 작은 염을 사용하였을 경우에는 이온화 경향이 큰 염을 사용하였을 때보다 높은 염 농도에서도 가용화가 일어날 수도 있다.

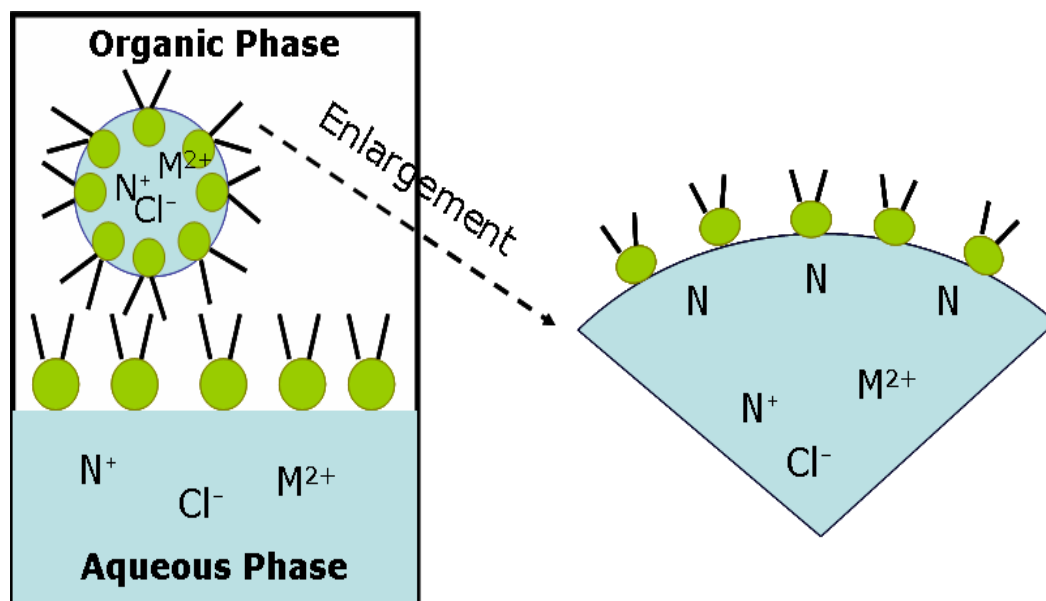


Fig. 11. Ion distribution in reverse micelle (N, M : Chloride salts).

(3) 계면활성제 농도의 영향

계면활성제의 농도가 증가 할수록 유기상에서 단백질의 추출이 많아지며 결과적으로 pH 곡선과 일치한다(Gölken, 1986). 그 반면, 높은 계면활성제 농도는 역추출에서 수용액상으로 단백질이 회수되기 어렵다(Hentsch *et al.*, 1992; Carneiro-da-Cunha *et al.*, 1994). 그러므로, 두 상간의 물질전달에서 최적 계면활성제 농도는 유기상으로의 단백질의 최대 추출을 이루기 위한 최소한의 농도이며, 이는 단백질의 추출을 위한 역미셀상의 선택성이 유기상에서 계면활성제의 농도에 의한 것임을 나타낸다(Wei *et al.*, 2002). 또한, 임계 미셀 농도(Critical Micelle Concentration : CMC)는 미셀 형성을 위해 필요한 계면활성제의 최소 농도로 미셀과 평형상태에 있는 비집합성 계면활성제의 농도를 의미한다. CMC값은 계면활성제에 대한 용매의 물리적 성질(surface tension, turbidity, osmotic pressure)의 영향을 받는다.

(4) 유기용매 *i*-octane 부피의 영향

단백질의 효율적이고 대량생산을 위한 방법으로 고안된 액-액 추출 방법 중의 하나인 역미셀 추출은 water pool을 이용한 추출물질의 무변성으로 각광을 받았으나, 역미셀 형성을 위해 사용된 유기용매의 잔존 가능성과 이로 인한 추출물질의 변성 등으로 연구가 더디게 진행되고 있다. 그래서, 계면활성제의 용매로서 일련의 새로운 용매가 나오지 않는 한 역미셀을 이용한 단백질 추출은 상용화되기 어려운 실정이다. AOT의 CMC에 맞추어 유기용매의 부피를 점차 줄이고 초임계 이산화탄소에 의한 유기상과 수용액상의 계면장력의 약화시킨다.

(5) 초임계 이산화탄소의 영향

최근 초임계 유체를 이용한 연구가 많이 이용되고 있으며 그 적용 가

능성에 따라서 다양한 물질들이 초임계 유체로 사용되고 있다 그 중에서 이산화탄소는 값이 저렴하고 독성과 가연성이 없으며 초임계 상태에 비교적 쉽게 도달할 수 있기 때문에 초임계 유체로서의 효과적인 성질과 이산화탄소 고유의 유용한 성질을 동시에 가지고 있다는 장점에도 불구하고 안타깝게도 분자 자체의 극성이 없기 때문에 대부분의 극성용매에 대한 용해력이 매우 낮다는 결정적인 단점을 가지고 있다. 초임계 이산화탄소와 극성물질 간의 용해력을 향상시키기 위해서 이산화탄소의 고유성질을 변화시킨다는 것은 불가능하기 때문에 초임계 이산화탄소에 계면활성제와 같이 극성물질이 이산화탄소와 쉽게 결합할 수 있도록 해주는 물질을 첨가하여 microemulsion이나 macroemulsion을 형성토록 하였다.

5. 물질전달 이론(Mass Transfer Theory)

액-액 추출 시 물질전달속도는 일반적으로 3가지 저항에 의해서 결정되어진다(Dekker *et al.* 1990). 즉, 역미셀을 이용한 단백질 추출에서 단백질 분자는 수용액 내 bulk상으로부터 계면으로 확산되고, 계면에서 단백질은 계면활성제 분자층에서 캡슐화 되며, 단백질을 포집한 역미셀은 bulk 유기상으로 확산되는 과정으로 이루어진다. 대부분의 추출시스템에서 전달되는 물질의 계면농도는 평형하다고 가정하면 이러한 시스템에서 물질전달속도는 단지 수용액상과 유기상 중 한쪽의 확산 과정에 의해서 결정된다. Fig. 12에서 나타낸 바와 나타낸 바와 같이 수용상 내에 존재하는 단백질이 유기상으로 전달되는 액-액의 물질전달을 R 은 다음 식으로 표현되어질 수 있다.

$$R = Ka(C_{aq} - C_{aqi}) \quad (2)$$

R : mass transfer rate of protein from
aqueous phase to organic phase

K : overall mass transfer coefficient

a : interfacial area for the mass transfer

C_{aq} : concentration of protein in aqueous phase

i : interface zone

H가 수용액상과 유기상 사이의 단백질의 분배계수이면, 상간의 평형 관계식을 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$C_{orgi} = HC_{aqi} \quad (3)$$

H : distribution coefficient

C_{org} : concentration of protein in organic phase

식 (1), (2) 그리고 수용액에 용해된 단백질이 역미셀 상으로 시간에 따라 추출되는 molar flux를 나타내는 식은 다음과 같다(Nishiki *et al.*, 1998&1999).

$$J = R/a = V/a \cdot (dC_{aq}/dt) = K\{C_{aq} - (1/H)C_{orgi}\} \quad (4)$$

H는 분배계수로서 $H = C_{orgi}/C_{aqi}$ 이며, forward extraction에선 계면에서의 용질의 농도가 매우 작으므로 $C_{orgi}/H \ll C_{aqi}$ 에서 C_{orgi}/H 항은 무시할 수 있으므로 식 (4)의 두 항을 변수 분리하여 적분한 다음

일반해를 구하면 식 (5)로 나타낼 수 있다(Chun *et al.*, 1999).

$$\ln(1-C_{org}/C_o) = -(a/v)Kt \quad (5)$$

C_o : initial concentration of lysozyme
in aqueous phase

V : volume of aqueous phase

따라서, 전달 과정을 위한 물질전달계수인 K value는 $-\ln(1-C_{org}/C_o)$ 의 slope로 부터 시간 t 에 대한 curve를 구할 수 있다. 시간에 따른 단백질의 추출된 양을 도시하여 기울기와 추출 접촉계면 면적 및 수용액의 부피로부터 물질전달계수 K value를 실험으로부터 구할 수 있다.

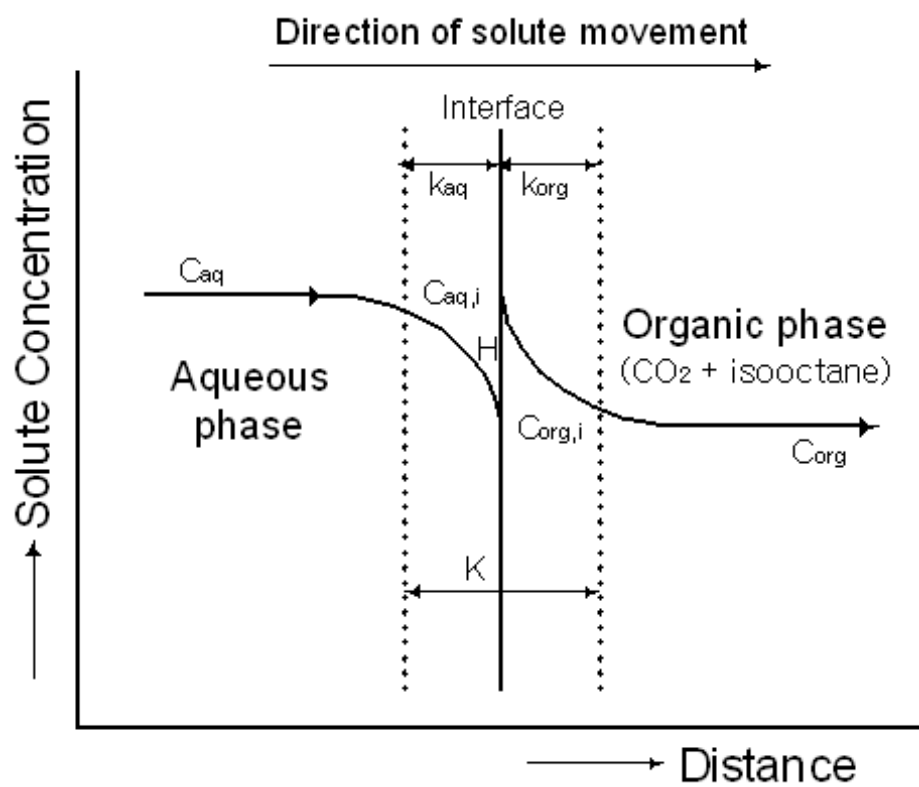


Fig. 12. Concentration profile for an extracted solute on the liquid-liquid system.

6. 초임계 유체 기술

기체 상태에서는 원자 또는 분자가 불규칙하게 운동하고 있는데 온도가 내려가게 되면 원자 또는 분자가 밀집한 상태가 되어 액체나 고체상태가 된다. 이것은 원자 또는 분자 사이에 인력이 보다 크게 작용하기 때문이다. 온도가 높을 때는 원자, 분자의 운동 에너지가 커지므로 이들 사이에 작용하는 인력을 극복하고 불규칙한 운동을 하게 되며, 온도가 낮아지면 운동 에너지가 작아지므로 인력이 이 운동 에너지를 이겨내어 서로 끌어당기게 된다. 이 원자 또는 분자 사이에 작용하는 인력은 이들이 응집하도록 하는 힘이므로 응집력이라 하며, 온도를 점차 내리면 기체는 응집이 가능하게 되어 액화되기 시작한다. 그러나 온도가 증가함에 따라 원자 또는 분자의 운동 에너지가 활발해져서 응집이 불가능해지기 시작하는데, 유체의 운동 에너지와 응집력이 같아지는 온도를 그 유체의 “임계온도”라고 하고 이때의 증기압을 “임계압력”이라고 한다. 이 임계점에서는 액체와 기체의 두 상태를 서로 분간할 수 없게 되며, 일반적으로 기체는 임계온도 이하로 온도를 내리지 않는 한 아무리 압력을 가하여도 액화되지 않는다. 따라서 초임계 유체란 “임계온도와 임계압력 이상에 있는 유체”로 정의되며, 임계점 이하의 조건에서는 나타나지 않는 특징을 가지고 있다. 즉, 임계점 이하에 있는 유체의 물성은 온도와 압력에 따라 크게 변화하지 않는데 이와는 달리 초임계 유체는 밀도변화와 용매분자의 집단화로 인해 독특한 성질을 가지게 된다. 밀도를 이상기체에 가까운 희박상태에서부터 액체 밀도에 가까운 고밀도 상태까지 연속적으로 변화시킬 수 있기 때문에 유체의 용해도, entrainer 효과 등의 평형물성과 점도, 확산계수, 열전도도 등의 전달물성, 그 뿐만 아니라 용매화 및 분자 clustering 상태를 조절할 수 있다. 초임계 유체의 용해력은 용매의 밀도와 밀접한 관계를 가지고 있기 때문에 액체용매와 마찬가지로 액체나 고체를 용해하는 능력을 갖게 된

다. 따라서 압력과 온도를 변화시켜서 원하는 밀도에 이르게 하여 용해력을 조절할 수 있게 된다. 또한, 초임계 유체를 용매로 사용할 경우, 용체용매를 사용할 때 발생하는 표면장력에 의해서 일어나는 wetting 문제 같은 것도 일어나지 않게 된다. 이러한 물성 조절의 용이성을 반응과 분리 등의 공정에 이용하면 단일용매로 여러 종류의 액체용매에 상응하는 용매 특성을 얻을 수 있다. 또한 상온에서 기체 상태인 물질을 초임계 유체로 선정하는 경우에는 잔존용매의 문제를 해결할 수 있으며, 이산화탄소와 같이 인체에 무해하고 환경오염에 미치는 영향이 적은 용매를 사용하게 되면 무독성이고 친환경적인 공정개발이 가능하다. 그 외 초임계 유체 추출 분리법의 장점은 다음과 같다.

- 1) 유체의 뛰어난 침투성에 의해 고체나 점도가 높은 액체 등 원재료로부터 추출을 빨리 할 수 있다.
- 2) 분리공정의 전후 처리과정을 한 공정 내에서 수행할 수 있어 장치비와 에너지소모를 절감하는 등 경제성을 갖고 있다.
- 3) 사용되는 추출용매는 일반적으로 저장이 용이하고 값싸게 구입할 수 있다.
- 4) 온도와 압력의 제어에 의하여 추출물로부터의 탈 용매가 쉽게 이루어진다.
- 5) 초임계 유체 추출 및 분리공정이 수행된 후에 용질의 분리조작이 간단하며 이 때 이용한 유체는 회수가 용이하며 쉽게 recycle 된다.
- 6) 대기압과 상온에서 기체 상태인 용매를 사용함으로써 추출 후에 추출 잔유물과 추출물을 손실 없이 회수 할 수 있다.
- 7) 초임계 유체 추출법은 온도와 압력의 변화 뿐 만 아니라 보조용매를 첨가함으로써의 용매의 특성을 변화시킬 수 있고, 단계적인 밀도의 변화로 다단계 추출은 물론 다단계 회수공정을 사용할 수 있다.

다.

- 8) 액체용매보다 비교적 적은 용매능력 때문에 적당한 추출조건 및 용매의 선정에 의하여 선택적으로 저 휘발도를 갖는 물질의 분리가 가능하여 고가제품의 회수 등에 이용된다.

초임계 유체 추출법은 수증기 증류법에 비하여 분리에 소요되는 에너지량이 적고 열에 변하기 쉬운 성분의 변질을 막을 수 있으며, 용매 추출법에 비해서는 용매의 회수가 용이하고 무독성 및 비활성이기 때문에 순도와 독성 문제가 까다로운 식품 및 의약품 등의 추출에 유리하다 (Brunner, 1994). 사용되는 초임계 유체의 이산화탄소는 다른 유체에 비해 쉽게 초임계 상태를 만들 수 있고 무색, 불연성, 무독성 및 용질과의 비반응성의 장점이 있어 식품의 추출용매로 가장 널리 사용되고 있다. 또한 이산화탄소의 용질의 용해도나 선택도를 높이기 위해서 용질과 친화력이 좋은 보조용매를 소량 첨가한 초임계 혼합유체를 용매로 사용하여 용질의 추출량을 증가시키는 연구가 많이 진행되고 있다.

응용범위는 식품공업, 의약품공업, 화학공업 등 매우 광범위하며 식품공업에서의 응용에는 커피나 차로부터 카페인의 추출, 맥주원료인 호프로부터 쓴맛 성분과 향의 추출, 담배로부터 니코틴의 추출, 향료로부터 정유성분의 추출, 향료의 추출, 어류로부터 DHA, EPA의 추출, 지방산의 추출 또는 분획, 유지방, 난황, 돼지고기 기름으로부터 콜레스테롤의 추출, 어류 유지성분의 분석, 해조류 중의 생리활성 물질추출, 어유 중의 독성물질 추출, 해양 미생물로부터 제 2차 대사산물의 추출 등을 들 수 있다.

III. 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

Lysozyme(E.C. 3.2.1.17 from mucopeptide N-acetyl hydrolase, 14.3 kDa, pI 11.2,)은 hen egg white에서 추출된 것으로 Sigma-Aldrich Inc. (No. L-6876, USA)에서 구입하여 사용하였으며 lysozyme의 특성은 Table 2에 나타내었다. 계면활성제 AOT는 purity 99.9%로 Sigma-Aldrich Inc. (No. D-4422, Mw=444.55, USA), 유기 용매 *i*-octane은 Junsei Chemical Reagent (No. 5G2212, Mw=114.23, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

0.1 M HCl/NaOH는 AR grade로 (Sigma-Aldrich Inc., USA)각각의 농도에 맞도록 측량하여 3차 증류수로 직접 제조하여 사용하였다. 그 외 KCl은 AR grade, UV cuvette 세척용 methanol은 HPLC grade로 Sigma-Aldrich Inc.에서 구입하였다. 또한, 실험에 필요한 수용액은 3차 증류수를 사용하여 수용액상의 pH에 영향을 주지 않도록 하였다. 그리고, 99.999%의 purity의 이산화탄소를 사용하여 초임계 이산화탄소 상태로 유기상에 가압하였다. Lysozyme의 농도분석을 위해 사용한 시약으로는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Yakuri Pure Chem. Co., Japan), $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Folin-Coicalteu's phenol reagent, 2N, Sigma-Aldrich Inc., USA)이 있으며, 수용액의 pH는 Mettler Delta 350(Mettler Toledo, U.K.)를 사용하여 측정하였다.

Table 2. Properties of hen egg white lysozyme

Properties	Lysozyme
Molecular weight	14,300
Size (Å)	45,000
Radius (Å)	19
Isoelectric point	11.2
Specific activity (unit/mg)	50,000
available	Cell lytic enzyme

(1) Lysozyme 수용액 제조

Lysozyme을 3차 증류수에 원하는 농도에 따라 200 mL를 제조하였으며, parameter인 수용액의 pH는 0.1 M HCl/NaOH로 첨가량이 최대 0.5 mL로 수용액상의 부피에 영향을 주지 않도록 하였다. 이온강도는 KCl로 원하는 Mol에 맞도록 측량하여 첨가하였다.

(2) 유기용액 제조

유기용매 *i*-octane 100 mL에 원하는 농도에 따라 AOT를 첨가하여 제조하였다.

2. 실험방법

Lysozyme 수용액의 pH와 이온강도, 유기용액상의 계면활성제의 농도, 유기용매의 *i*-octane 부피 및 초임계 이산화탄소의 가압 정도를 parameter로 하였으며, 이들의 조건들은 Table 3에 나타내었다. Lysozyme이 용해되어 있는 수용액상의 pH는 3.8~11.3, 이온강도는 KCl 0.1~0.4 M 범위로 하였으며, lysozyme을 추출하기 위한 유기용액상의 AOT 계면활성제는 20~100 mM, 유기용매 *i*-octane은 초임계 이산화탄소와의 부피비율로 20~80%(v/v)로 변화를 주었다. 마지막으로 초임계 이산화탄소는 100~200 bar의 압력으로 가압하였다.

반응기에 수용액상 200 mL를 주입한 뒤, 깔때기를 이용하여 유기상 100 mL를 천천히 주입시켜 상간의 섞임이 없도록 한다. 그리고 나서, 초임계 이산화탄소 100mL를 주입시켜 원하는 압력에 도달하면 두 상간의 섞임이 없는 최적의 rpm인 170 rpm에서 16분간 교반한다. 수용액상의 sample은 2분마다 0.5 mL씩 취하여 유기상과 반응하는 수용액의 부피에 영향을 주지 않도록 하였으며, 유기상의 W_o 값은 $t=0$ 일 때부터 시작하여 2분마다 0.5 mL씩 sampling하여 측정하였다. 반응이

끝난 후, 수용액상의 lysozyme 농도 측정을 위하여 Lowry Assay를 사용하여 UV spectrophotometer (KONTRON, UVIKON 933, USA)로 측정하였다.

3. 실험장치 및 운전조건

초임계 유체 line은 1/4"의 stainless steel pipe (316ss)을 사용하였고, 포화압력 상태인 이산화탄소가 cylinder로부터 냉각기(-20°C)를 통과하여 CO₂ 내에 존재하는 기포가 제거된 후 high pressure pump (P-50, Thar, USA)에 의해 초임계 이산화탄소의 유량을 정량적으로 pumping 하였고 이는 반응기 내의 설정 압력이 유지됨을 뜻한다. 반응기 내의 온도는 thermocouple에 의해 감지되어 조절하게 되며 반응기 외부에 heating jacket을 설치하여 반응기 내부의 온도를 일정하게 유지시켰다. System 내의 압력은 check valve를 사용하여 순간 압력변화로 인한 반응기 내의 추출 조건 변화를 방지하였으며 safety valve를 부착하여 system 내의 excess pressure를 제거하였다. 반응이 끝난 후, 반응기에서 바로 초임계 이산화탄소를 공기 중으로 방출하였다. 그리고, 1/8" stainless steel pipe (316ss)을 유기상과 수용액상의 높이로 맞추어 반응기 내부에 설치한 후 1/8" metering valve를 사용하여 샘플을 채취하였다.

Table 3. Experimental conditions for reverse micelle process
with supercritical carbon dioxide

Conditions	Ranges
pH	3.8 ~ 11.3
KCl concentration (M)	0.1 ~ 0.4
AOT concentration (mM)	20 ~ 100
SCO ₂ Pressure (bar)	100 ~ 200
Temperature (°C)	25 ~ 45

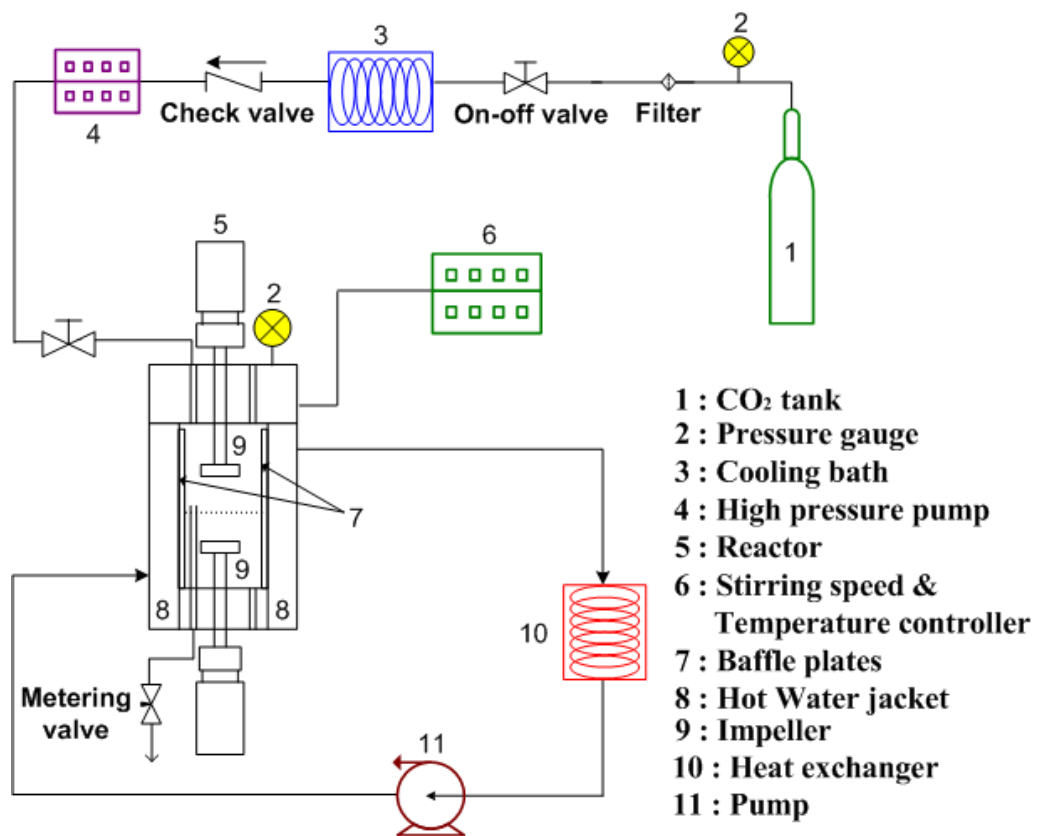


Fig. 13. Schematic diagram of reverse micelle process.

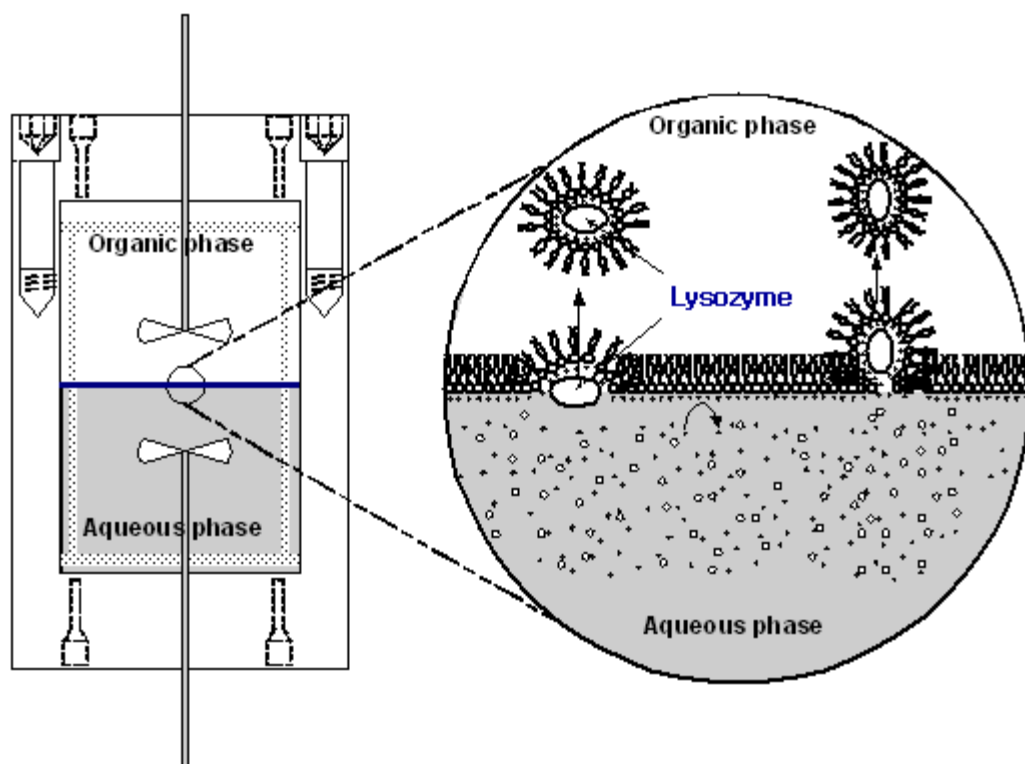


Fig. 14. Schematic of lysozyme transfer using reverse micelle in the interface of vessel.

IV. 결과 및 고찰

1. Lysozyme의 농도 결정

Lowry Assay를 사용하여 lysozyme의 검량곡선을 작성한 뒤, sampling 되는 수용액상의 lysozyme 농도를 결정하였다. Fig. 15는 lysozyme의 검량곡선이다.

2. Lysozyme의 추출효율

(1) pH의 영향

Fig. 16은 수용액상에서 pH의 변화에 따른 lysozyme의 물질전달율을 나타낸 그림이다(Zamarro *et al.*, 1996). Lysozyme의 pH보다 낮은 pH 6.8~9.3 근처에서 높은 용해도를 나타낸다. 이러한 현상은 단백질과 계면활성제 사이의 전기적 인력에 기인하다. 수용액과 pH가 낮을수록 단백질이 양전하를 띄게 되어 음전하를 띄고 있는 음이온 계면활성제와 정전기적 인력이 증가하게 된다. 따라서, 최대 용해도를 얻을 수 있는 수용액의 pH가 중성 근처이기 때문에 효소의 변성도 면에서 안정하다고 생각된다(Göklen *et al.*, 1987). 또한, Fig. 17과 같이 lysozyme의 등전점과 가장 근접한 pH 9.3에서 0.757×10^{-2} m/sec의 가장 큰 물질전달계수 K value를 가진다.

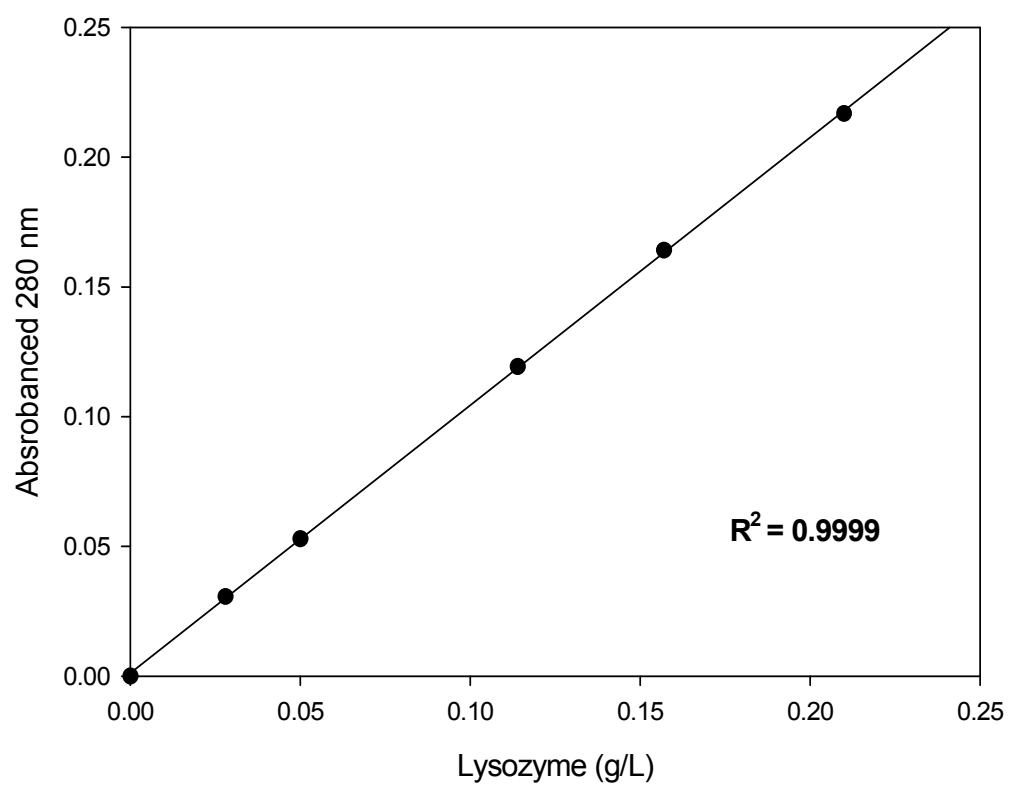


Fig. 15. Calibration curve of lysozyme.

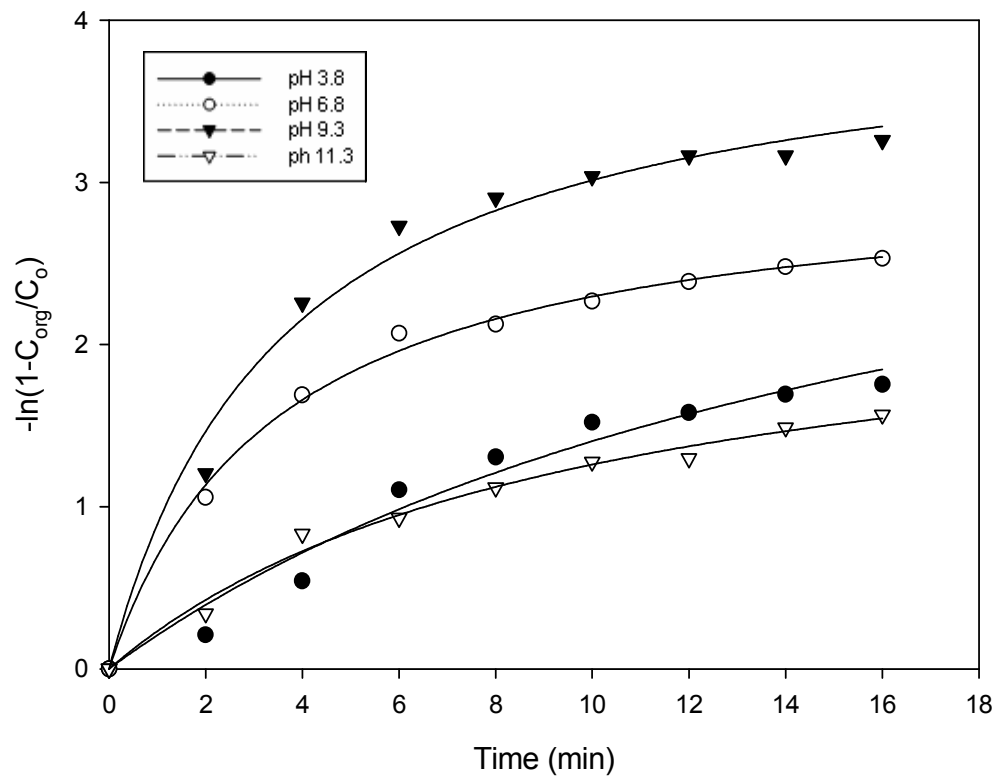


Fig. 16. Effect of pH in the aqueous phase on the mass transfer rate of lysozyme into reversed micelles with 50:50 volume ratios of organic phase (lysozyme 0.2 g/L, KCl 0.1 M, AOT 20 mM, 200 bar and 45°C)

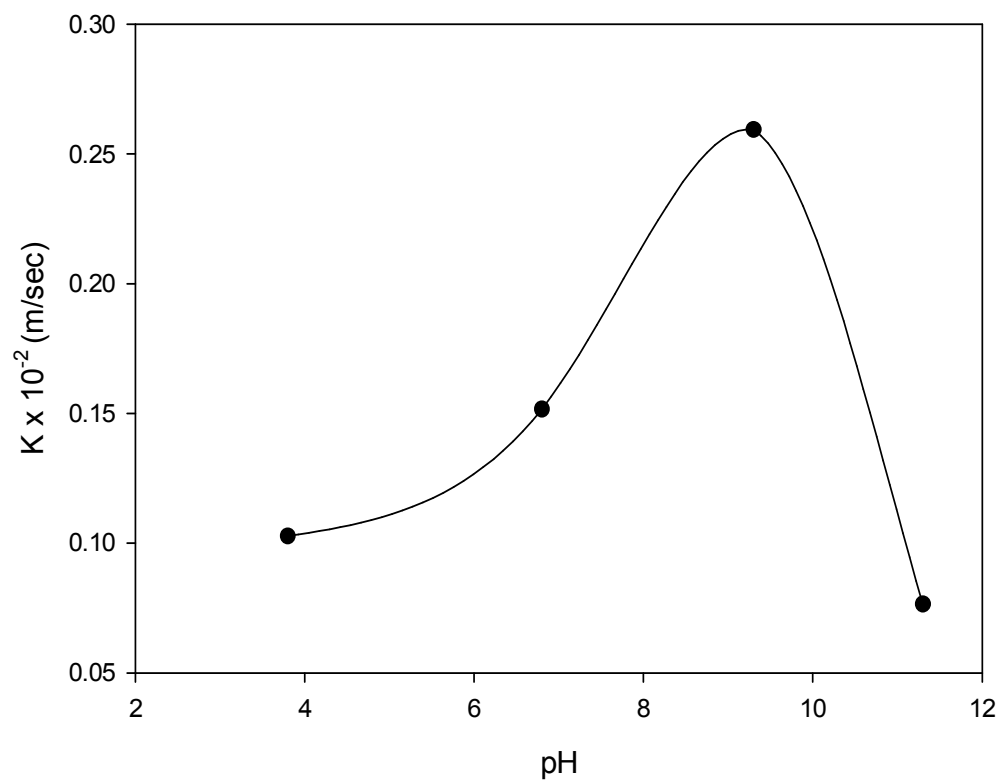


Fig. 17. Effect of pH in the aqueous phase on the mass transfer coefficient K value (lysozyme 0.2 g/L, KCl 0.1 M, AOT 20 mM, 200 bar and 45°C)

(2) 이온강도의 영향

정전기적 상호작용은 수용액의 이온강도에 의하여 커다란 영향을 받는다. 수용액의 이온강도가 클수록 Debye screening effect의 결과로서 전기적 인력이 감소하며, 따라서 높은 이온강도에서는 친수성 생분자(hydrophilic biomolecule)들과 계면활성제의 머리 부분들 간의 인력이 감소하므로 작은 미셀을 형성하게 된다. 따라서 이러한 수용액의 이온강도의 증가로 인한 영향으로 역미셀의 단백질 용해력이 감소한다. Fig. 18은 이러한 이온강도의 영향을 보여주고 있으며 이온강도가 클수록 역미셀 용액 쪽으로 단백질 분포가 감소함을 나타내고 있다. 또한, Fig. 19는 0.1 M KCl에서 0.553×10^{-2} 으로 가장 큰 K value를 나타내고 있다.

(3) 계면활성제 농도의 영향

AOT의 CMC 값은 약 0.001 M의 매우 작은 값으로 이 농도의 이상에서 미셀이 형성된다. Fig. 20은 음이온 계면활성제의 여러 농도에 따라 역미셀 안으로 lysozyme의 추출을 나타낸 그림이다. 그리고 Fig. 21, 21에 나타난 바와 같이 유기용액상에서 계면활성제의 농도가 증가할수록 lysozyme의 물질전달율도 증가한다. AOT의 농도가 100 mM일 때, 물질전달계수 K value는 0.185×10^{-2} m/sec을 나타낸 그림은 Fig. 22이다. 계면활성제의 농도가 80~100 mM에서는 거의 85% 이상의 높은 추출율을 나타냈으며 그 이상의 농도에서는 감소하는 경향을 보이는데 이는 미셀이 서로 뒤엉켜 거대 고분자 형태를 이루어 역미셀 안으로의 lysozyme 추출을 방해하기 때문이다. 따라서, 본 연구에서의 AOT CMC는 100 mM임을 알 수 있었다.

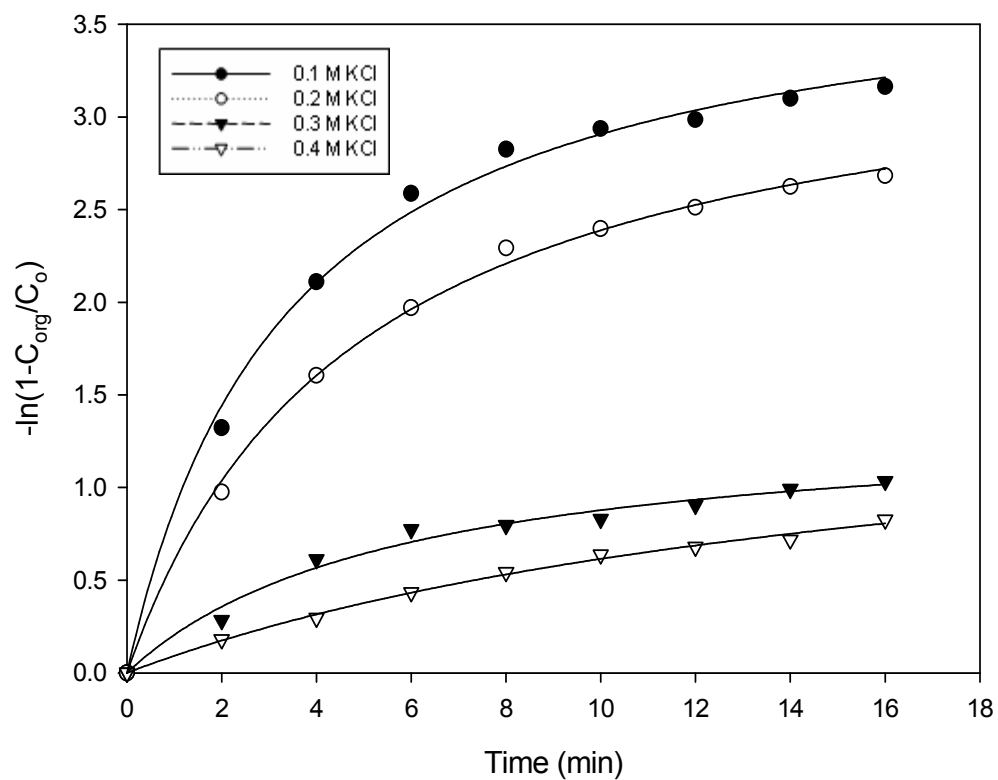


Fig. 18. Effect of ionic strength in the aqueous phase on the mass transfer rate of lysozyme into reversed micelles with 50:50 volume ratios of organic phase (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, AOT 20 mM, 200 bar and 45°C)

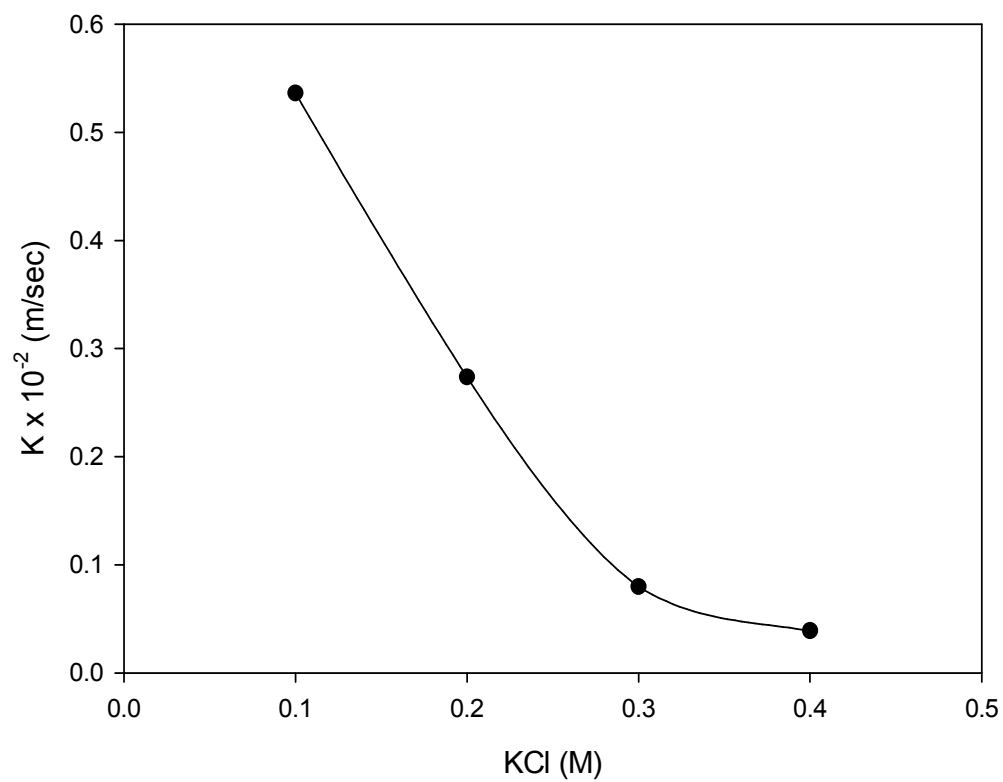
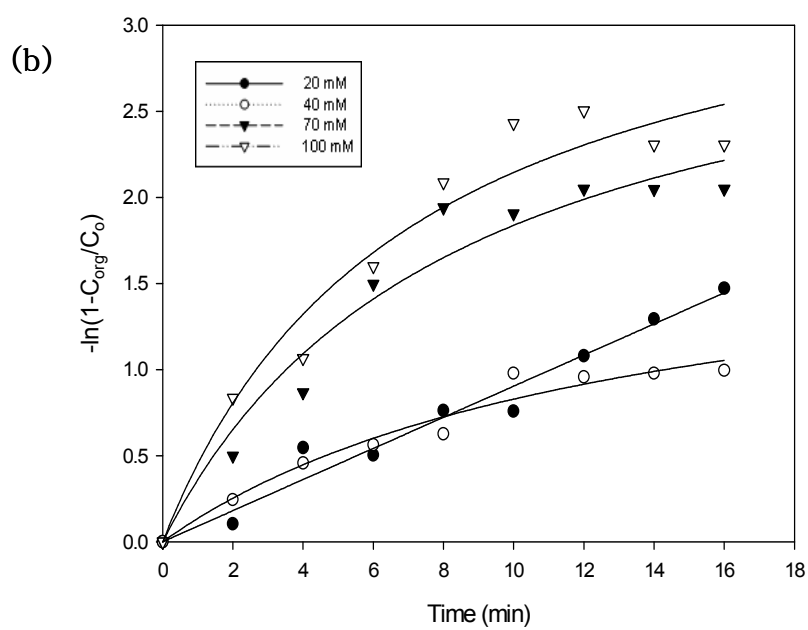
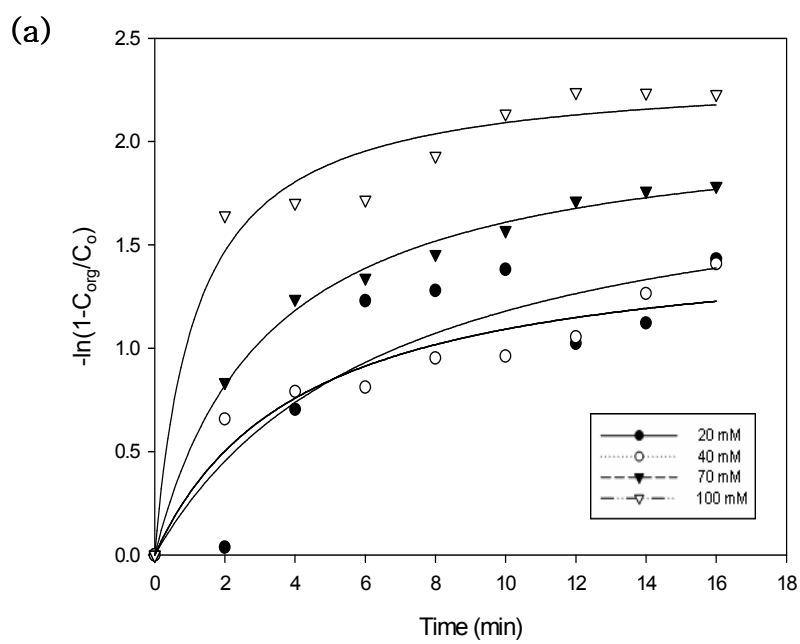


Fig. 19. Effect of ionic strength in the aqueous phase on the mass transfer coefficient K value (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, AOT 20 mM, 200 bar and 45°C)



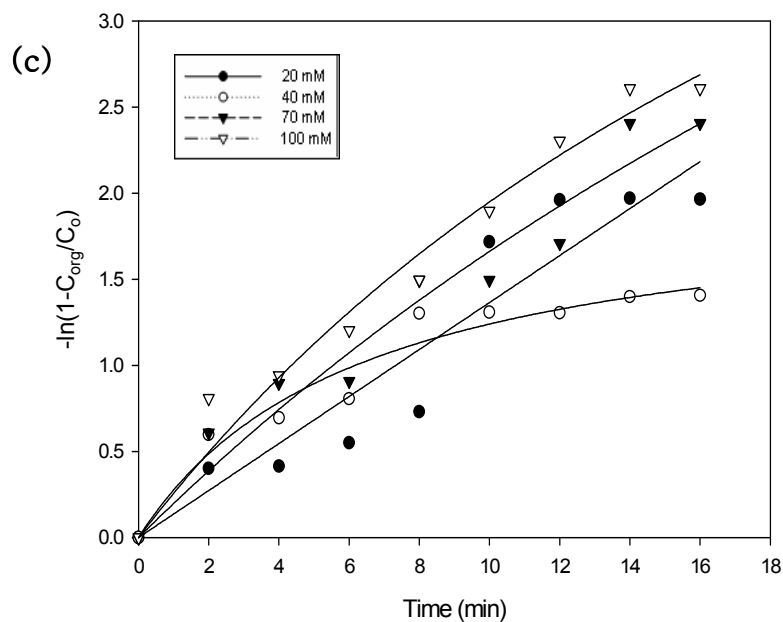


Fig. 20. Effect of volume of the aqueous phase on the mass transfer rate of lysozyme into reversed micelles with AOT concentration in organic phase (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M and 45°C) ; (a) 100, (b) 150 and (c) 200 bar.

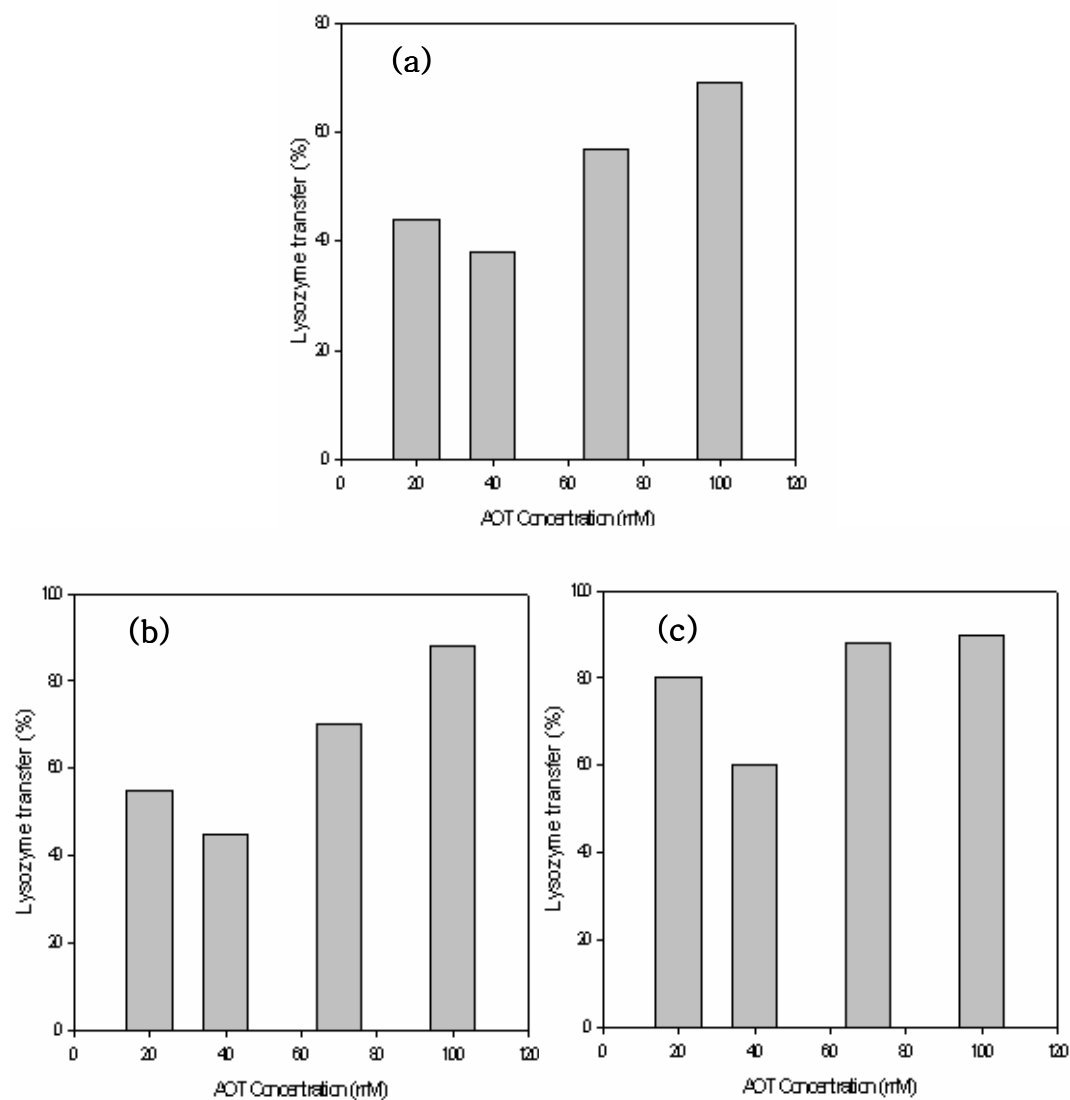


Fig. 21. The amount of lysozyme transferred into the organic phase according to AOT concentrations (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M and 45°C); (a) 100, (b) 150 and (c) 200 bar.

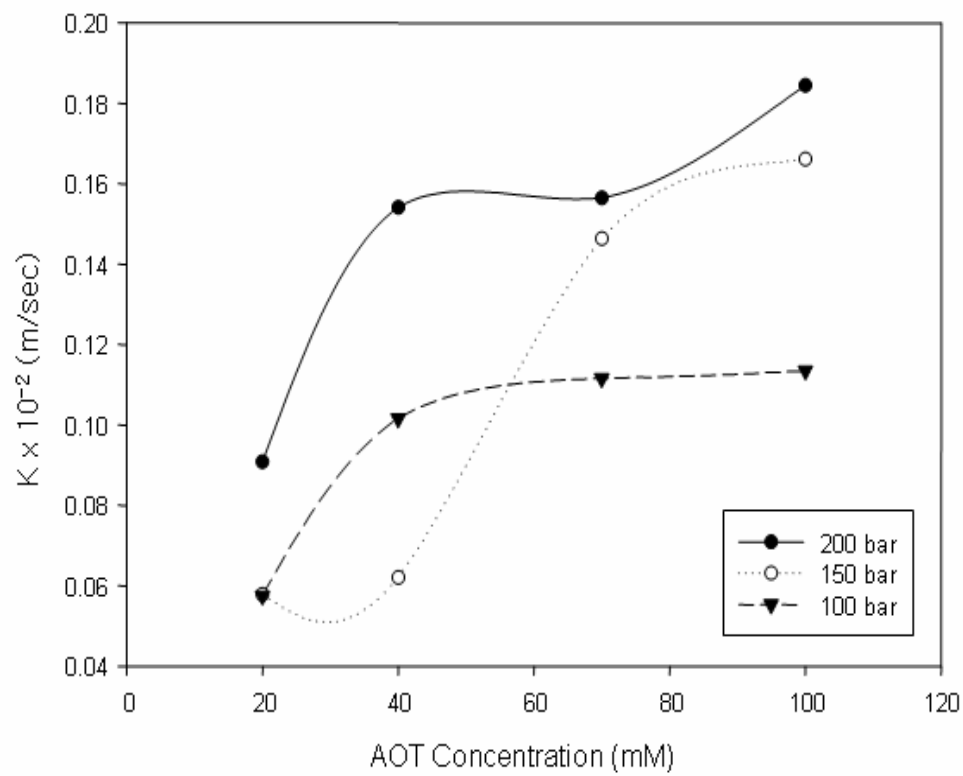


Fig. 22. Effect of AOT on the mass transfer coefficient K value (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M and 45°C).

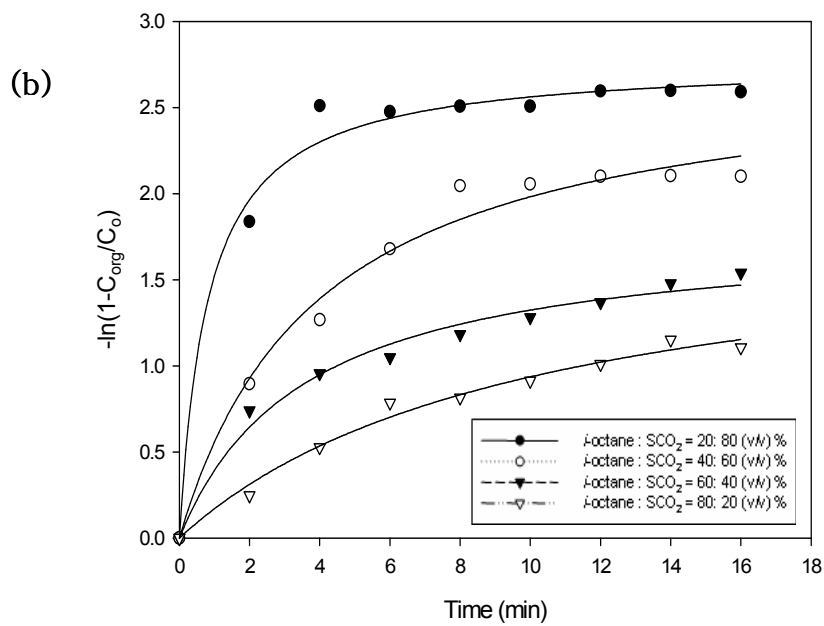
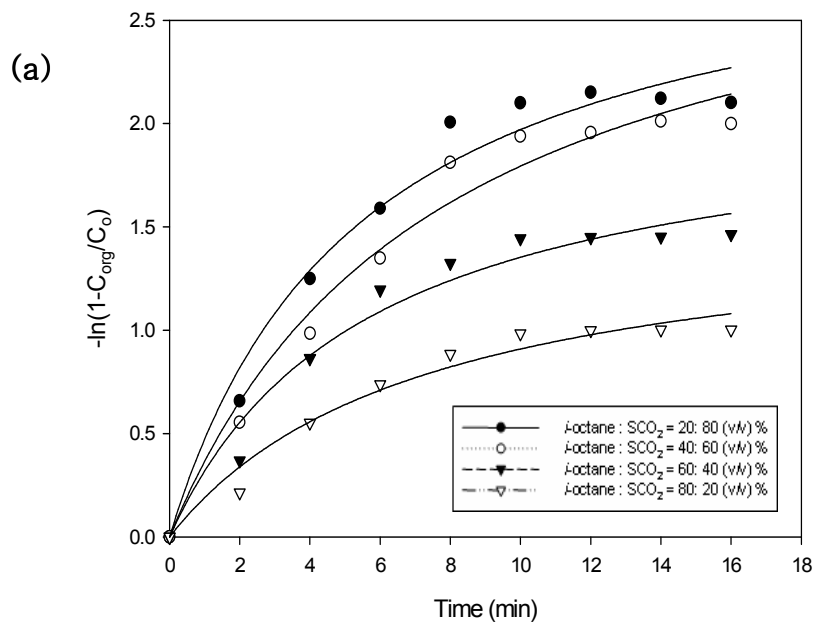
(4) 유기용매 *i*-octane 부피의 영향

Fig. 23-25은 유기용매 *i*-octane의 부피에 따른 lysozyme 추출을 나타낸 그림이다. *i*-octane의 양은 20~100 mL로 유기상의 부피비율에 따랐으며, 계면활성제 AOT의 양은 *i*-octane의 부피에 비례하여 20 mM로 일정하게 하였다. *i*-octane의 부피가 20 mL일 때 lysozyme의 추출이 가장 잘 되었는데, 이는 초임계 이산화탄소의 양이 증가할수록 lysozyme의 추출이 잘 된다는 것으로도 말 할 수 있다. 역미셀 반응기 내부로 주입된 초임계 이산화탄소가 많을수록 유기상과 수용액상의 계면장력이 점차 약해짐으로써 역미셀로의 lysozyme 추출을 빨리 이루어지게 한다는 것으로 판단된다.

(5) 초임계 이산화탄소의 영향

Fig. 26, 27은 유기용매 상에 초임계 이산화탄소를 주입하였을 때 역미셀로의 lysozyme 물질 전달을 나타낸 그림이다. 그림에서 보듯이, 8-12분 사이에 모든 전달이 끝나는 것을 알 수 있다. 반응이 끝난 후, lysozyme의 물질 전달율은 그대로 유지되었다. 반면에, 앞서 연구된 초임계 이산화탄소의 주입이 없는 일반적인 액-액 추출에서는 30분보다 더 많은 시간이 소요되었다(Dekker *et al.*, 1989; Chun *et al.*, 1999). 그러므로, lysozyme의 물질 전달을 측정은 여러 parameter들을 고려하여 총 반응시간을 16분으로 하여 반응에 상관없을 정도의 0.5 mL를 2분 간격으로 채취하여 UV로 측정하였다.

초임계 이산화탄소의 주입으로 인해 온도와 압력이 높을수록 추출율이 빨랐다. 이는 가압된 초임계 이산화탄소에 의해 수용액상과 유기용액상의 계면장력이 약해져 lysozyme의 추출이 용이하였기 때문이다.



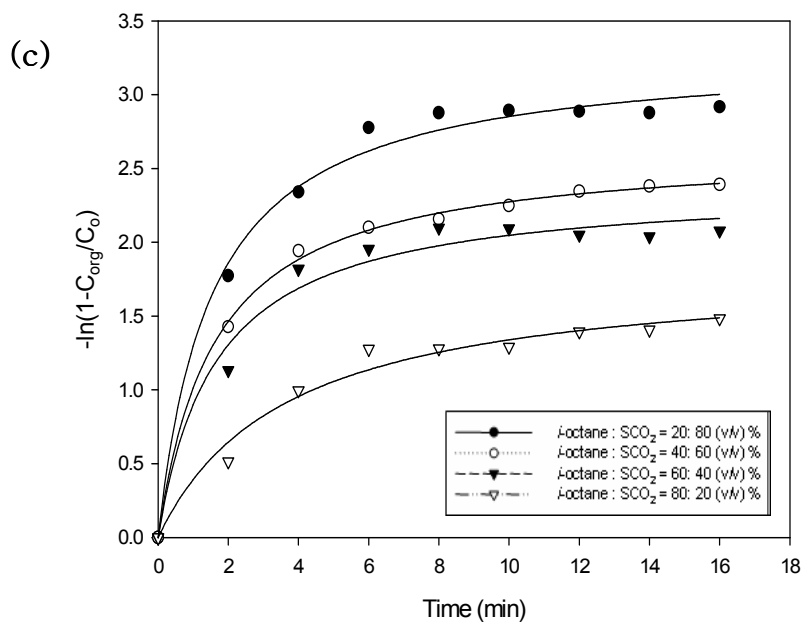


Fig. 23. Effect of volume of the aqueous phase on the mass transfer rate of lysozyme into reversed micelles with various volume ratios of *i*-octane in organic phase (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M, AOT 20 mM, 200 bar); (a) 25, (b) 35 and (c) 45°C.

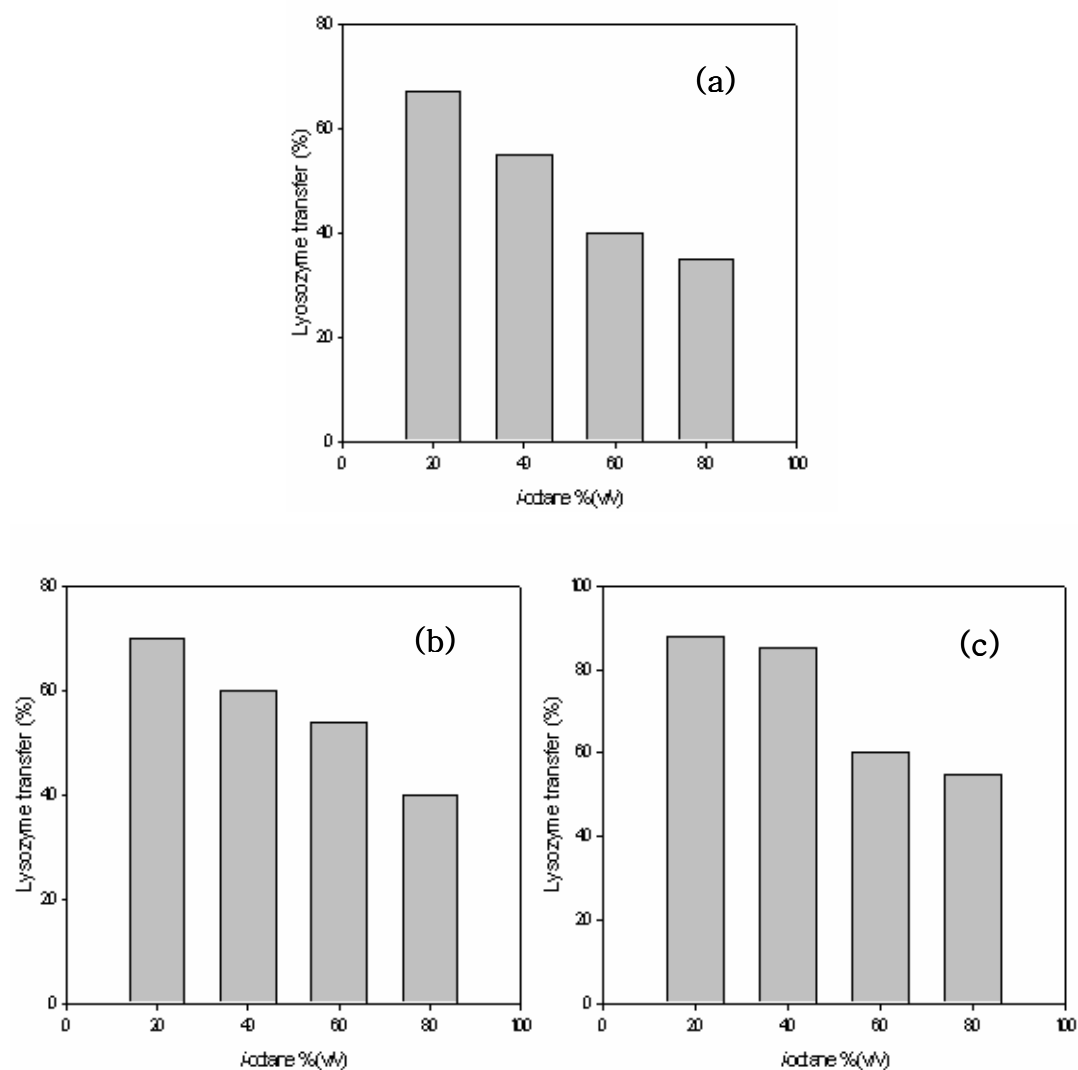


Fig. 24. The amount of lysozyme transferred into the organic phase according to *i*-octane volume ratio (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M, AOT 20 mM and 45°C); (a) 100, (b) 150 and (c) 200 bar.

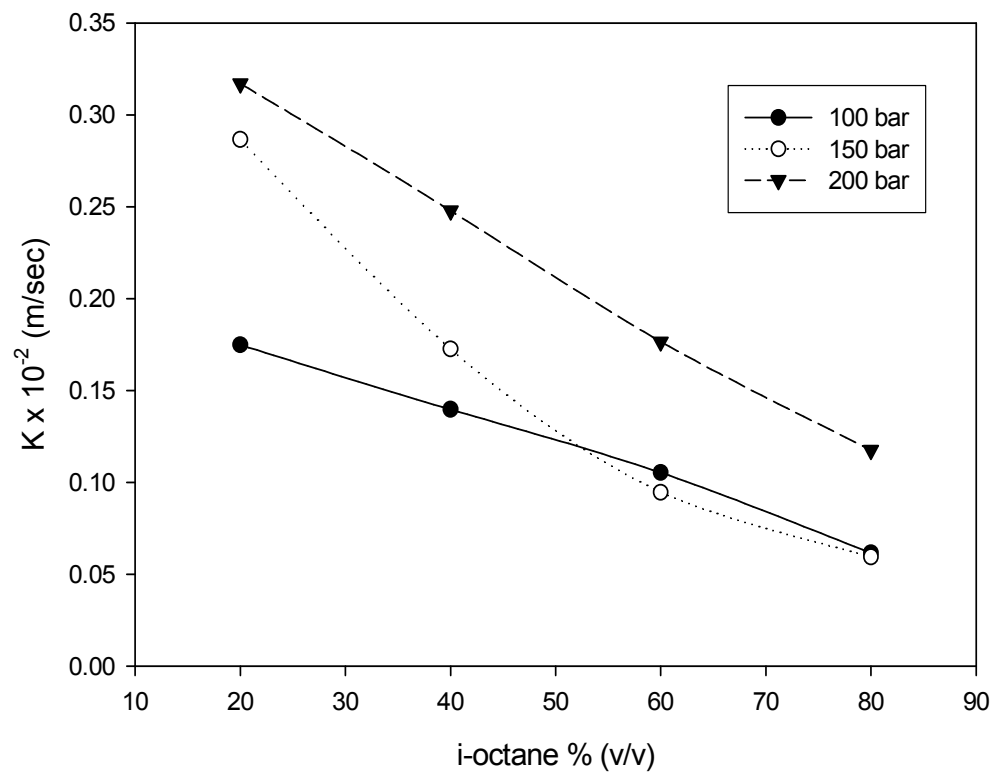
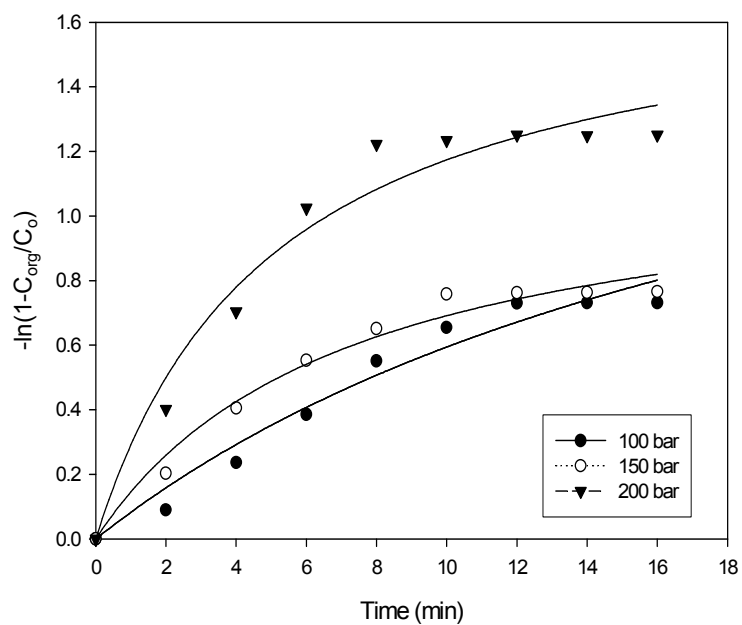
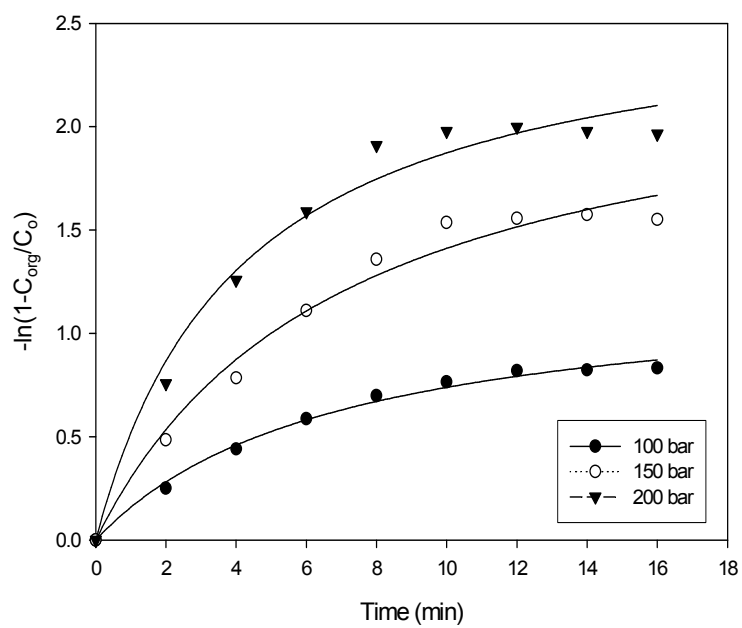


Fig. 25. Effect of various volume ratio of *i*-octane on the mass transfer coefficient K value (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M, AOT 20 mM and 45°C).

(a)



(b)



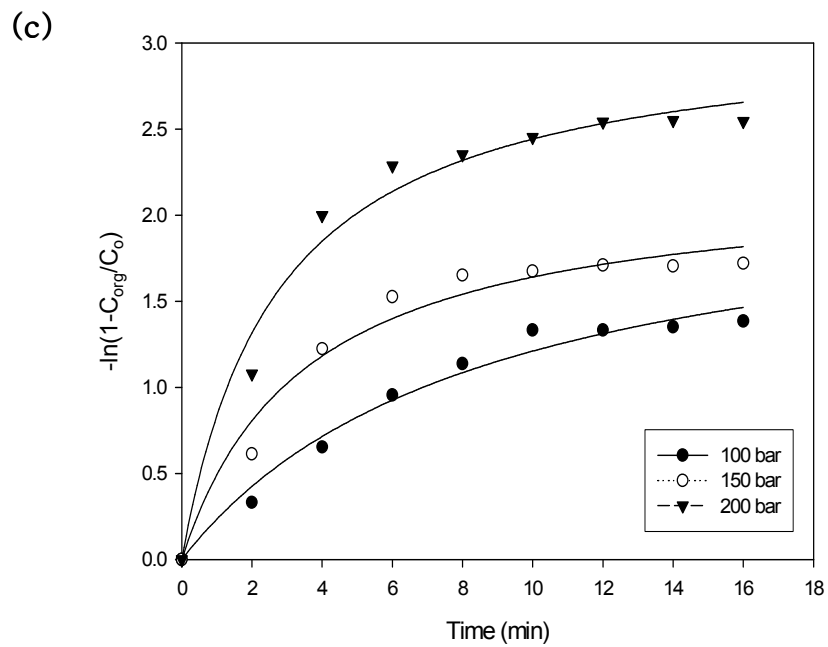


Fig. 26. Effect of SCO_2 on the mass transfer rate of lysozyme into reverse micelles with 50:50 volume ratio of organic phase (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M, AOT 20 mM); (a) 25, (b) 35 and (c) 45°C.

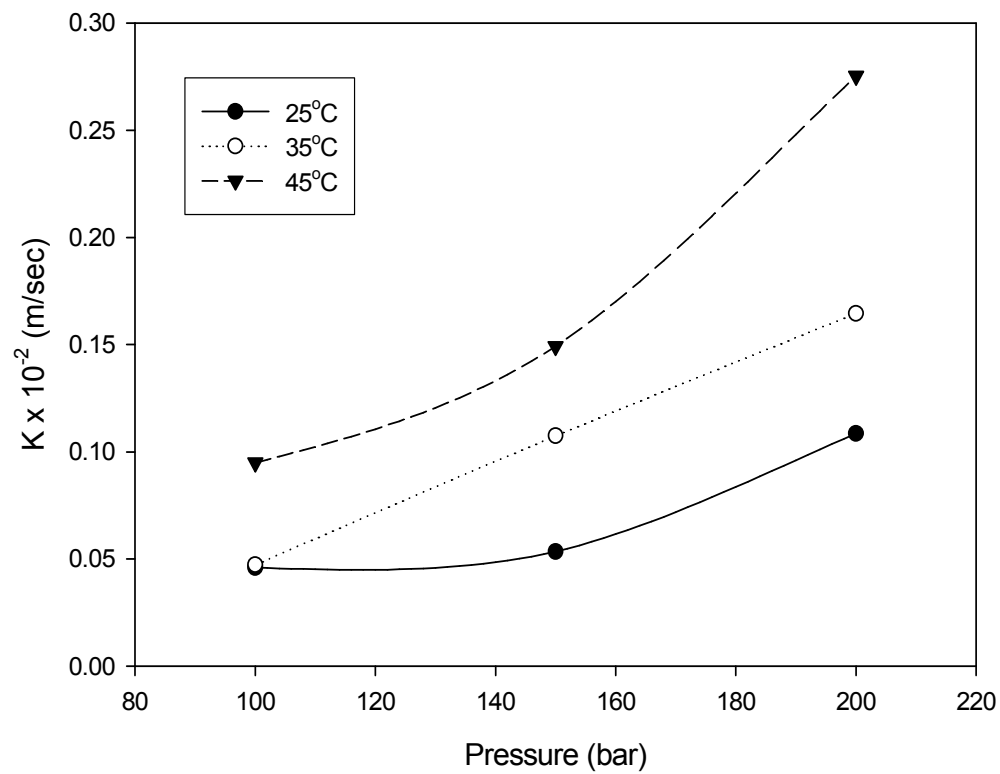


Fig. 27. Effect of SCO_2 and temperature on the mass transfer coefficient K value (lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M, AOT 20 mM).

3. 실험 Data의 상관관계

액-액 계면에서는 수력학적 조건들이 복잡하고 물질전달에 대한 이론적 해석이 불가능하므로 물질전달계수와 관련되는 실험변수들과의 상관관계를 일반적으로 차원해석으로 구하였다.

수용액상의 Sherwood number에 대한 Re_1 만이 독립적으로 작용한다고 가정하고 밀도, 점도 및 계면장력의 변화가 거의 없으므로 물질전달계수를 측정할 수 있는 상관관계식을 다음과 같은 무차원 그룹으로 나타내었다.

$$Sh_1 = \alpha Re_1^\beta Sc_1^\gamma \quad (3)$$

여기서, α , β , γ 는 실험정수이며, 식 (3)의 무차원군들은 다음과 같은 식 (4)로 나타내었다.

$$\begin{aligned} Re \text{ (Reynolds number)} &= d^2 N_1 \rho^1 / \mu_1 \\ Sc \text{ (Schmidt number)} &= \nu_1 / D\rho \\ Sh \text{ (Sherwood number)} &= K_f L / D\rho \end{aligned} \quad (4)$$

식 (3), (4)로부터 다음과 같은 상관관계식을 얻었다.

$$Sh_1 = 0.558 Re_1^{0.554} Sc_1^{0.205} \quad (5)$$

따라서, 실험으로부터 얻은 Sh_1 값들과 식 (4)에서 계산된 Sh_1 의 값을 Fig. 28에 plot한 결과, 일정한 교반속도에서 수용액상의 pH 6.8~11.3, KCl 1.0 M에서 계산값과 실험값이 비교적 근사하였으며, AOT 농도는 본 실험에 사용된 농도범위에서 일치하였다. 그리고, 본 연구의 실험 장치와 유사한 Lewis(1954), Mcmanamey(1961),

Mayer(1961), Asai(1983), Dekker(1990)의 역미셀을 이용한 물질전달속도 연구보고에서도 같은 현상을 보여주었다. 또한, 그들의 효율들은 Table 4의 $\alpha_1, \alpha_2, \dots$ 에서 보여 지며 이것은 vessel과 impeller의 치수와 기하학적 구성에 의해 결정되어 진다. 상수 α 와 표준편차 (%)는 Table 5에 나타내었다.

그러므로, 물질전달계수 K value는 본 실험조건과 유사한 연구인 Dekker(1990)에 의해 계산하여 Fig. 28에 나타내었으며 본 연구를 통해 얻은 모든 K value는 Table 6에 조건에 맞추어 나타내었다. 차원해석을 통한 무차원 군으로 구성된 상관관계식에 적용한 결과 K value의 실험값과 이론값의 오차 범위는 25% 범위에 있었다.

Table 4. Previous correlations for mass transfer coefficient

Correlations	
Lewis (1954)	$Sh = 0.66 Re^{0.5} Sc^{0.33}$
Mcmanamey (1961)	$Sh = 0.66 Re^{0.5} Sc^{0.33} \left(\frac{\mu}{\mu_s} \right)^{0.14} \left(\frac{\mu_s}{\mu} \right)^{0.14}$
Mayers (1961)	$Sh = 0.66 Re^{0.5} Sc^{0.33} \left(\frac{\mu}{\mu_s} \right)^{0.14} \left(\frac{\mu_s}{\mu} \right)^{0.14} \left(\frac{\mu_s}{\mu} \right)^{0.14}$
Asai (1983)	$Sh = 0.66 Re^{0.5} Sc^{0.33} \left(\frac{\mu}{\mu_s} \right)^{0.14} \left(\frac{\mu_s}{\mu} \right)^{0.14} \left(\frac{\mu_s}{\mu} \right)^{0.14} \left(\frac{\mu_s}{\mu} \right)^{0.14}$
Dekker (1990)	$Sh = 0.66 Re^{0.5} Sc^{0.33} \left(\frac{\mu}{\mu_s} \right)^{0.14} \left(\frac{\mu_s}{\mu} \right)^{0.14} \left(\frac{\mu_s}{\mu} \right)^{0.14} \left(\frac{\mu_s}{\mu} \right)^{0.14} \left(\frac{\mu_s}{\mu} \right)^{0.14}$

Table 5. Constant C of Table 4

Correlation Equations	C (Constants Geometry)	Mean Deviation (%)
Lewis (1954)	4.8769×10^{-5}	38.65
Mcmanamey (1961)	1.2951×10^{-6}	37.20
Mayers (1961)	8.0035×10^0	37.56
Asai (1983)	1.6788×10^6	26.71
Dekker (1990)	3.0304×10^3	37.87

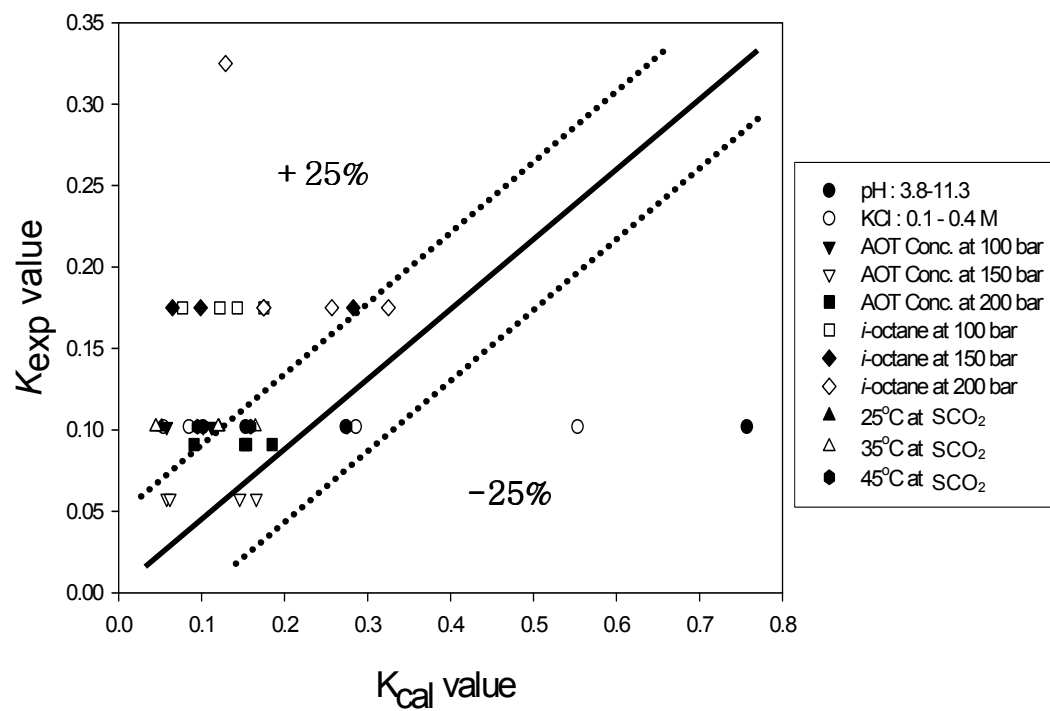


Fig. 28. Comparison of Mass transfer coefficient K_{exp} and K_{cal} value.

Table 6. Mass transfer coefficient of the all conditions

($\times 10^{-2}$ m/sec)

pH	K value	Conditions
3.8	0.102	
6.8	0.273	lysozyme 0.2 g/L, KCl 0.1 M, AOT 20 mM, 200 bar and 45°C
9.3	0.757	
11.3	0.153	
KCl (M)	K value	Conditions
0.1	0.553	
0.2	0.286	lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, AOT 20 mM, 200 bar and 45°C
0.3	0.085	
0.4	0.054	

Table 6. Continue

AOT Conc. (mM)	Pres. (bar)			Conditions
	100	150	200	
20	0.058	0.058	0.091	lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M, and 45°C
40	0.102	0.062	0.154	
70	0.112	0.146	0.157	
100	0.113	0.166	0.185	
<i>i</i> -octane (mL)	Pres. (bar)			Conditions
	100	150	200	
20	0.175	0.283	0.325	lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M, AOT 20 mM and 45°C
40	0.143	0.175	0.257	
60	0.122	0.099	0.175	
80	0.077	0.065	0.129	
Temp. (°C)	Pres. (bar)			Conditions
	100	150	200	
25	0.045	0.045	0.095	lysozyme 0.2 g/L, pH 6.8, KCl 0.1 M, and AOT 20 mM
35	0.052	0.120	0.159	
45	0.121	0.165	0.275	

V. 결 론

역미셀과 초임계 이산화탄소를 이용하여 수용액에 존재하는 난백 lysozyme이 역미셀에 의하여 계면을 통과하여 초임계 이산화탄소와 isooctane의 혼합 용매가 존재하는 유기상으로 이동하는 물질전달 속도가 측정되었다.

역미셀은 유기용매에서 자발적으로 형성되는 열역학적으로 안정화된 작은 계면활성제의 집합체로서 계면활성제의 소수기는 유기용매를 향하고, 친수기는 효소와 기질 쪽으로 향하여 물을 내포한 집합체(water pool)을 형성하게 된다. 즉 역미셀은 비극성 용매 내에서 계면활성제의 소수성 부분은 외부로 향하고, 친수성 부분은 내부로 향하도록 배열되어 안정화된 여러 nm 크기의 입자를 형성하며, 여기에 물을 첨가하면 계면활성제 내부에 물분자들이 포집된 형태를 이루는 것이다.

본 연구에서는 음이온 계면활성제인 AOT를 이용하여 유기용매인 *i*-octane에 용해시켜 역미셀을 형성하였다. 또한 역미셀에 의한 분리 및 정제에 연구되어 온 여러 효소 중에서 세균 세포벽의 구성 성분인 다당류의 가수분해를 촉매 하는 효소인 lysozyme을 이용하여 수용액상에 존재하는 lysozyme을 이산화탄소로 가압한 반응기 내에서 역미셀이 형성되어 있는 유기용매로의 물질 전달 속도를 측정하였다.

물질 전달 속도에 영향을 주는 주요 변수로는 수용액의 pH와 이온강도, 유기용액의 계면활성제의 농도뿐만 아니라 반응기 내부의 초임계 이산화탄소의 압력과 온도 등이 있다. 기존의 역미셀을 이용한 lysozyme의 물질전달 연구에서와 마찬가지로 수용액의 pH와 이온강도, 유기용액의 계면활성제의 농도는 이산화탄소로 가압한 상태에서도 수용액상에서 유기용액상으로의 lysozyme의 물질전달 속도에서 거의 같은 경향을 나타내었다. 즉 수용액의 pH가 lysozyme의 등전점인 pH

11.3까지는 물질 전달 속도가 계속해서 증가하다가 pH 11.3 이상에서는 단백질의 전하와 음이온 계면활성제인 AOT, 즉 역미셀의 전하가 모두 음이온을 띠게 되어 반발 작용으로 물질전달 속도가 현저하게 감소하였다. 또한 수용액의 이온강도를 조절하는 KCl의 농도가 0.1 M이었을 때 가장 높은 물질 전달 속도를 나타내었으며, 유기용액의 AOT의 농도는 농도가 증가할수록 물질전달속도가 증가하였다. 또한 반응기 내부의 이산화탄소의 압력을 100~200 bar로 조절하여 실험을 행하였는데, 200 bar에서 가장 높은 물질 전달 속도를 나타내었다. 이것은 반응기 내부의 압력이 높을수록 초임계 이산화탄소의 압력으로 인해 lysozyme을 포함한 물분자가 역미셀 내부로 빨리 포집되는 것으로 해석 할 수 있다. 또한 반응기 내부의 온도가 상승 할수록 lysozyme의 물질 전달 속도는 빨라졌다.

기존의 초임계 이산화탄소를 사용하지 않고 역미셀을 이용하여 lysozyme의 물질전달 속도를 규명한 여러 연구와 비교하였을 때, 초임계 이산화탄소로 가압하여 실험을 행한 결과 lysozyme의 수용액상에서 유기상으로의 물질 전달 속도가 수십 배 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며 이것은 반응기 내부에 가압된 초임계 이산화탄소로 인하여 수용상과 유기상의 계면장력이 약해지면서 훨씬 더 단백질의 물질 전달이 효과적으로 일어날 수 있었던 것으로 판단된다.

따라서 이러한 결과를 바탕으로 물질 전달 속도인 K value을 구할 수 있고, 이것을 차원해석을 통한 무차원 군으로 구성된 Dekker (1990)의 상관관계식에 적용한 결과, 본 실험 조건과 유사한 연구에서 도출한 물질 전달 계수 K value의 실험값과 이론값의 오차 범위는 25% 범위에 있었다.

References

- Abbott N. L. and T. A. Hatton. 1988. Liquid-liquid extraction from protein separations. *Chem. Eng. Prog.*, August, 31-41.
- 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.
- Andrews B. A. and K. Haywood. 1994. Effect of pH, ion type and ionic strength on partitioning of proteins in reverse micelle systems. *J. Chromatography A.*, 668, 55-60.
- Asai S., J. Hatanaka and Y. Uekawa. 1983. Liquid-liquid mass transfer in an agitated vessel with a flat interface. *J. Chem. Eng. Japan.*, 16, 463-469.
- Aveyard R., B. P. Binks, S. Clack and J. Mead. 1986a. Interfacial tension minima in oil-water-surfactant systems. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I.*, 82, 125-142.
- Barbaric S. and P. L. Luisi. 1981. Micellar solubilization of biopolymers in organic solvents - 5. Activity and conformation of α -chymotrypsin in isooctane-AOT reverse micelles. *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 4239-4244.
- Brunner G. 1994. Gas extraction. Steinkopff Darmstadt Springer, New York.
- 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.

- Chou S. H. and B. H. Chiang. 1998. Reversed micellarextraction of Hen egg lysozyme. *J. Food Sci.*, 63, 399-402.
- Chun B. S., S. K. Kim and G. T. Wilkinson. 1999. Mass transfer during enzyme extraction with reverse micelles, *ISEC'99*.
- Bollag D. M., M. D. Rozycki and S. J. Edelstein. 2004. Protein Methods second edition. A Jhon Wiley & Sons. Inc., 62-71.
- Dekker M. and M. E. Leser. 1994. Highly selective separations in biotechnology. Blackie Academic & Professional, Imprint of Chapman & Hall, 86-120.
- Dekker M., K. Van't Riet, B.H. Bijsterbosch, P. Fijneman and R. Hilhorst. 1990. Mass transfer rate of protein extraction with reversed micelles. *Chem. Eng. Sci.*, 45, 2949-2957.
- Dekker M., R. Hilhorst and C. Laane. 1989. Isolating enzymes by reversed micelles. *Analyt. Biochem.*, 178, 217-226.
- Eicke H. F. and J. Rehak. 1976. On the fromation of water-oil-microemulsions. *Helvetica Chimica Acta*, 59, 2883-2891.
- Faeder J and B. M. Ladanyl. 1999. Molecular dynamics simulations of the interior of aqueous reverse micelles. *J. Phys. Chem. B.*, in process.
- Forciniti D., C. K. Hall and M. R. Kula. 1991. Protein partitioning at the isoeletric point: Influence of polymer molecular weight and concentration and protein size. *Biotech. Bioeng.*, 38, 986-994.
- Gehrke S. H., N. R. Vaid and J. F. Mcbride. 1998. Protein sorption and recovery by hydrogels using principles of

- aqueous two-phase extraction. *Biotech. Bioeng.*, 58, 416-427.
- Göklen K. E. and T. A. Hatton. 1986. Proceedings. *ISEC86* Munich, 3, 587-595.
- Göklen K. E. and T. A. Hatton. 1987. Liquid liquid extraction of low molecular proteins by selective solubilisation in reversed micelles. *Sep. Sci. Technol.*, 22, 831-841.
- Goto M., Y. Ishikawa, T. Ono, F. Nakashio and T. A. Hatton. 1998. Extraaction and activity of chymotrypsin using AOT-DOLPA mixed micellar systems. *Biotechnol. Prog.*, 14, 729-734.
- Hatton T. A. 1989. Reverse micellar extraction of proteins. In surfactant based separation process (Scamehorn J. F. and J. H. Harwell, eds), Marcel Dekker. New York. Basel. 55-90.
- Hayes D. G., 1997. Mechanism of protein extraction from the solid state by water-in-oil microemulsions. *Biotech. Bioeng.*, 53. 583-593.
- Hentsch M., P. Menoud, L. Steiner, E. Flaschel and A. Renken. 1992. Optimazation of the surfactant (AOT) concentration in a reverse micellar extraction process. *Biotechnology Techniques*, 6, 359-364.
- Hilhors R., M. Sergeerva, D. Heering, P. Rietveld, P. Fijneman, R. B. G. Wolbert, M. Dekker and B. H. Bijsterbosch. 1995. Protein extraction from and aqueous phase into a reversed micellar phase: Effect of water content and reversed micellar composition. *Biotech. Bioeng.*, 46, 375-387.

- Hong D. P., S. K. Lee and R. Kuoi. 2000. Conformational transition and mass transfer in extraction of proteins by AOT-alcohol-isooctane reverse micellar system. *J. Chromatography B*, 743, 203.
- Hou M. J. and D. O. Shah. 1987. Effects of molecular structure of the interface and continuous phase on solubilization of water in water-in-oil microemulsions, *Langmuir*, 3, 1086-1096.
- Ivory C. F. and W. A. Gobie, 1990. Continuous counteracting chromatographic electrophoresis. *Biotechnol. Prog.*, 6, 21-32.
- Jarudilokkul S., L. H. Poppenborg and D. Stuckey. 1999. Backward extraction of reverse micellar encapsulated proteins using a counterionic surfactant. *Biotech. Bioeng.*, 62, 593-601.
- Kadam K. L. 1986. Reverse micelles as bioseparation tool. *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 266-273.
- Kazuhisa O., Y. Nishii, S. Nii, T. Kinugasa and K. Takahashi. 2001. Interfacial properties between aqueous and organic phases in AOT reversed micellar system for lysozyme extraction. *J. Chem. Eng. Japan.*, 34, 501-505.
- Keri G. A. and H. Hustedt. 1992. Extraction of enzyme by reverse micelles. *Chem. Eng. Sci.*, 47, 99-111.
- Kinugasa T. S. and I. Tanahashi and H. Takeuchi. 1991. Extraction of lysozyme using reversed micellar solution: Distribution equilibrium and extraction rates. *Ind. Eng. Che.*

- Res.*, 30, 2470-2476.
- Kim Y. S., Y. T. Rho, H. H. Shin, S. I. Hong and Y. R. Pyun. 1990. Protein solubilization in reverse micelles of carionic surfactant. *Korean J. Biotech. Bioceng.*, 5, 215-221.
- Kinugasa T., K. Watanabe and H. Takeuchi. 1992. Activity and conformation of lysozyme in reversed micellar extraction. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 31, 1827-1829.
- Kommareddi N. S., K. C. O' Connor and V. T. John. 1994. EPR characterization of α -chymotrypsin activity site dynamics in reversed micelles at enhanced gas pressures and after subjection to clathrate formation conditions. *Biotech. Bioeng.*, 43, 215-224.
- Krei G. A. and H. Hustedt. 1992. Extraction of enzymes by reverse micelles. *Chem. eng. Sci.*, 47, 99-111.
- Langevin D., 1992. Micelles and microemulsions. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 43, 341-369.
- Lee S. S., E. J. Lee, S. E. Park, J. H. Kim and J. G. Yang. 1999. Effect of addition alcohol on liquid-liquid extraction of BSA using reversed micelles. *The 5th International Symp.*, 881-884.
- Lensen H. G. W., D. Bargeman, P. Bergveld, C. A. Smolders and J. Feijen. 1984. High-performance liquid chromatography as a technique to measure the competitive adsorption of plasma onto latices. *J. Colloid Interface Sci.*, 99, 1-8.
- Leolidis E. B. and T. A. Hatton. 1989. Specific ion effects in electrical double layers: Selective metals in Winsor II

- microemulsion systems. *Separation and Sci. Technol.*, 26, 291-299.
- Lewis J. B. 1954. The mechanism of mass transfer of solutes across liquid-liquid interfaces - Part I: the determination of individual transfer coefficients for binary systems. *Chem. Eng. Sci.*, 3, 248-259.
- Lie H. L., W. C. Hsieh and H. S. Liu. 2004. Molecular dynamics simulations to determine the effect of supercritical carbon dioxide on the structure integrity of hen egg white lysozyme. *Biotech. Bioeng.*, 20, 930-938.
- Lowry O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Luisi P. L. and B. E. Straub. 1984. Reverse micelles: Biological and technological relevance of Amphiphilic structures in apolar media. Plenum Press, New York.
- Lye G. J., A. Asenjo and D. L. Pyle. 1995. Extraction of lysozyme and ribonuclease-a using reverse micelles: Limits to protein solubilization. *Biotech. Bioeng.*, 47, 509-519.
- Lye G. J., J. A. Asenjo and D. L. Pyle. 1994. Protein extraction using reverse micelles: kinetics of protein partitioning. *Chem. Eng. Sci.*, 49, 3195-3204.
- Lye, G. J., J. A. Asenjo and D. L. Pyle. 1996. Reverse micellar mass-transfer processes: spray column extraction of lysozyme. *AIChE J.*, 42, 713-726.
- Marcozzi G., N. Correa, P. L. Luisi and M. Casell. 1991. Protein

- extraction by reverse micelles: A study of the factors affecting the forward and backward transfer of α -chymotrypsin and its activity. *Biotech. Bioeng.*, 38, 1239-1246.
- Martinek K. and N. L. Levashov. 1978. Catalysis by water-soluble enzymes in organic solvent. Solubilization of enzymes against denaturation (inactivation) through their inclusion in reverse micelles of surfactant. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR (Engl. edn)*, 236, 951-953.
- Mayer G. R. A. 1961. The correlation of individual film coefficients of mass transfer in a stirred cell. *Chem. Eng. Sci.*, 16, 69-75.
- McManamey W. J. 1961. Molecular diffusion and liquid-liquid mass transfer in stirred transfer cells. *Chem. Eng. Sci.*, 16, 251-254.
- Nishii Y., S. Nii, K. Takahashi and H. Takeuchi. 1999. Extraction of proteins by reversed micellar solution in packed column. *J. Chem. Eng. Japan.*, 32, 211-216.
- Nishii Y., T. Kinugasa, S. Nii and K. Takahashi. 2002. Transport behavior of protein in bulk liquid membrane using reversed micelles. *J. Memb. Sci.*, 195, 11-21.
- Nishiki T., I. Sato, A. Muto and T. Kataoka. 1998. Mass transfer characterization in forward and back extraction of lysozyme by AOT-isooctane reverse micelles across a flat liquid-liquid interface. *Biochem. Eng. J.*, 1, 91-97.
- Noh K. H. and J. Y. Imm. One-step separation of lysozyme by

- reverse micelles formed by the cationic surfactant, cetyldimethylammonium bromide. 2005. *Food Chem.*, 93, 95-101.
- O' Farrell P. H., 1985. Separation techniques based on the opposition of two counteracting forces to produce a dynamic equilibrium. *Science*, 227, 1586-1589.
- Park J. Y. and J. S. Lim. 2004. A study on the supercritical Carbon dioxide emulsion and its application. *Korean Chem. Eng. Res.*, 42, 494-509.
- Pires M. J., D. M. F. Prazeres and J. M. S. Cabral. 1993. Protein assay in reversed micelle solutions. *Biotechnology Techniques*, 7, 293-294.
- Pires M. J., M. R. Aires-Barros and J. M. S. Cabral. 1996. Liquid-liquid extraction of proteins with reversed micelles. *Biotechnol. Prog.*, 12, 290-301.
- Plucinski P. and W. Nitsch. 1994. Mechanism of mass transfer between aqueous phase and water-in-oil microemulsion. *Langmuir*, 10, 371-376.
- Rabie H. R. and J. H. Vera. 1996. Generalized water uptake modeling of water in oil microemulsion. New experimental results for Aerosol-OT-water-salts systems. *Fluid Phase Equilibria*, 122, 169-186.
- Schmidt A. S., B. A. Andrews and J. A. Asenjo. 1996. Correlations for the partition behavior of proteins in aqueous two phase system: Effect of overall protein concentration. *Biotech. Bioeng.*, 50, 617-626.

- Shin Y. O. and J. H. Vera. 2002. Solubilization limit of lysozyme into DODAMC reverse micelles. *Biotech. Bioeng.*, 80, 537-543.
- Shin Y. O., M. E. Weber and J. H. Vera. 2003. Comparison of two methods to recover lysozyme from reverse micellar phase. *Separation Science and Technology*, 38, 1733-1748.
- Shin Y. O., M. E. Weber and J. H. Vera. 2003. Effect of salt and volume ratio on the reverse micellar extraction of lysozyme using DODMAC. *Fluid Phase Equilibria*, 207, 155-165.
- Shin Y. O., M. E. Weber and J. H. Vera. 2003. Reverse micellar extraction and precipitation of lysozyme using sodium di(2-ethylhexyl) sulfosuccinate. *Biotech. Prog.*, 19, 928-935.
- Shiomori K., Y. Kawano, R. Kuboi and I. Komasaawa. 2000. Effect of electrostatic interaction on reverse micellar extraction of large molecular weight proteins. *J. Chem. Eng. Japan*, 33, 800-804.
- Shnoda K. and B. Lindman. 1987. Organized surfactant systems: Microemulsions. *Langmuir*, 3, 135-149.
- Somnuk J., E. Paulsen, and D. C. Stuckey. 1999. The effect of demulsifiers on lysozyme extraction from hen egg white using reverse micelles. *Bioseparation*, 9, 81-91.
- Takumi K., S. I. Tanahashi and H. Takeuchi. 1991. Extraction of lysozyme using reversed micellar solution: Distribution equilibrium and extraction rates. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 30, 2470-2476.
- Wei Z., H. Liu and J. Chen. 2002. Forward and backward

- extraction of BSA using mixed reverse micellar system of CTAB and alkyl halides. *Biotech. Bioeng.*, 12, 15.
- Wolbert R. B. G., R. Hilhorst, G. Voskuilen, H. Nachtegaal, M. Dekker, K. Van't Riet and B. H. Bijterbosch. 1989. Protein transfer from an aqueous phase into reversed micelles: the effect of protein size and charge distribution, *Eur. J. Biochem.*, 184, 627-633.
- Yoon J. Y., H. Y. Park, J. H. Kim and W. S. Kim. 1996. Adsorption of BSA on highly carboxylated microspheres-quantitative effects of surface functional groups and interaction forces. *J. Colloid Interface Sci.*, 177, 613-620.
- Zamarro M. T., M. J. Domingo, F. Ortega and P. Estrada. 1996. Recovery of cellulolytic enzymes from wheat-straw hydrolysis broth with dioctyl sulphosuccinate/isooctane reverse micelles. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 23, 14-125.
- 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.

Nomenclature

- a : the interfacial area for the mass transfer, m^2
- C : the concentration of protein, $kgmol/m^3$
- C_o : the initial concentration of protein in the aqueous solution, $kgmol/m^3$
- Ca : Capillary number, gd^2
- C_{aq} : the protein concentration of the aqueous phase solution, $kgmol/m^3$
- C_{org} : the protein concentration of the organic phase solution, $kgmol/m^3$
- C_{iaq} : the protein concentration of the aqueous interface, $kgmol/m^3$
- C_{iorg} : the protein concentration of the organic interface, $kgmol/m^3$
- D_{AB} : diffusion coefficient of solute A in the solution B, m^2/s
- f_s : head coverage of the surfactant
- H : distribution coefficient
- J : molar flux
- K : the overall mass transfer coefficient, m/s
- k : the regional mass transfer coefficient, m/s
- k_B : Boltzmann's constant
- L : diameter of vessel, m
- M : mole volume
- N : agitation speed, $1/s$
- R : the mass transfer rate of lysozyme from the aqueous phase to the organic phase
- Re : Reynolds number, $d^2N_1\rho_1/\mu_1$

Re_2' : modified organic phase Reynolds number, d^2N_2/v_1

R_s : the diameter of reversed micelle

r_A : radius of a molecule of A

Sc : Schmidt number, v_1/D_{AB}

Sh : Sherwood number, KL/D_{AB}

T : absolute temperature, K

V : the volume of the solution, m^3

V_s : the mole volume of the surfactant in the shell

V_w : the mole volume of water content in the shell

W_o : the molar ratio of H_2O/AOT , $[H_2O]/[AOT]$

Greek letter

α : coefficient

μ : viscosity, $Pa \cdot s$

ν : kinetic viscosity, μ/ρ

ρ : density, kg/m^3

σ : interfacial tension, N/m

ϕ : correction factor, 1 ($\mu_2/\mu_1 \leq 7$)

Sub/superscripts

0 : initial concentration

1 : the aqueous phase

2 : the organic phase

A : solute A

B : solution B

aq : the aqueous phase

org : the organic phase,

i : the interface zone

감사의 글

살아감에 있어 긍정적인 사고와 인자함을 가르쳐 주시는 부모님께 깊은 감사를 드립니다. 아버지, 어머니께선 언제나 제게 안락한 모처가 되어 주시며 힘이 되어주십니다. 항상 건강하세요.

제가 논문을 낼 수 있게 지도해 주신 전병수 교수님께 깊이 고개 숙여 인사드립니다. 저는 언제쯤 교수님의 자랑스러운 제자가 될지요! 교수님의 인덕과 자애로움을 배우도록 노력하며, 항상 열심히 하는 모습을 보여드리겠습니다.

바쁘신 와중에도 부족한 제 논문을 세심히 살펴주신 romantist 이근태 교수님과 웃음이 멋있으신 안동현 교수님께도 감사드립니다. 학부와 대학원 생활에 있어 지식과 지혜를 가르쳐 주신 소년적 감성의 시인 김선봉 교수님, 항상 일보전진 하시는 조영제 교수님, 인자하신 양지영 교수님, 말씀만 들어도 웃음이 나는 이양봉 교수님께도 감사드립니다.

식품공학 실험실에 들어와 인연이 된 나의 지식창고 강길윤 박사님, 정신적 지주 이승진 선배님, 만능 해결사 김성진 선배님이 없었다면 지금의 저는 생각할 수도 없겠지요!! 후배의 본분을 인식하고 자주 연락할게요. 미숙한 저를 무한한 인내심으로 가르쳐주시고, 무슨 일이든 척척 해내는 슈퍼우먼 윤성옥 선배님, 무한한 토론의 장으로 나를 깨어있게 만들어 주신 홍언련 박사과정 선생님, 헤어날 수 없는 블랙홀에 빠져 있을 때 지속적인 관심으로 저를 나오게 만들어 준, 지금은 볼 수 없는 김재호 선배님께도 감사의 말을 전합니다. 또한 만담의 달인 현석, 양과같이 보고 또 봐도 도통 알 수 없는 귀여운 지연, 잘 생겼음에도 불구하고 힘까지 좋은 상규, 예쁘고 참한 민경, 인터넷 쇼핑의 여왕 선애, 한 남자 언미, 예쁘고 아름답고 깜찍하고 귀여운 아름, 말 안 해도 아는

무지무지 착한 병욱이, 잘 생긴 우리 까리병관이에게도 고맙다는 말을 전합니다.

대학원 생활의 비타민, 그대들이 없었다면 2년 동안의 대학원 생활이 정말 건조하고 무의미 해졌을 거야. 우람해서 믿음직스러운 혁쓰, 뭔가 말이 통하는 남자, 옥이, 재치꾼 재희, 잊지 못할 중국어 성희언니, 언제나 따뜻한 윤주언니, 귀여운 동생 선희. 고마워요, 대학원 동기들.

언니의 그늘에서 나는 늘 생각하고, 배우며 살아가고 있어. 항상 겸손하고 지혜로운 언니의 행동이 나를 얼마나 자극하는지!!

수다쟁이 고장맨 우리 막둥이, 재진. 너의 유머와 재치가 나를 얼마나 즐겁게 하는지! 지금처럼만 우리의 공생관계를 유지해 가자구~!

지독한 12년 우정, 감자영희, 만두현정 그리고 짱치는 강렬. 너희들이 있기에 내가 있어. 너희들이 주는 사랑에 나는 아무 답도 못했지만 그 자리, 그 모습 그대로 있어줘서 얼마나 고마운지. 사랑한다, 친구야!!

항상 열심히 하는 모습만을 보여주는 범생이. 너의 애마와 함께 여행갈 날만을 기대하고 있어. 힘내라, my girl, 갱!

아, 이제 드디어 조카를 보겠군!! 지은언니 & 송박사님, 항상 행복하고 즐거운 가정이 되길 바랍니다.

아무것도 몰라 무섭기만 했던 97학번 동명생활에 버팀목이 되어줬던 INC 멤버들. 서연, 너의 사랑에 박수를! 예쁘게 살아서 꼭 샘나게 해주세요, 승오 & 선화, 현진선배 커플 그리고 기타 등등.

마지막으로, 대학원에 진학할 수 있게 용기를 주고 대학원 생활을 아무 탈 없이 잘 지낼 수 있게 물심양면으로 도와준 것도 고마운데, 나까지도 사랑해주는 나의 거울. Hey, Jun! 내가 너를 사랑할 수 있게 해줘서 고마워. 살아온 날보다 훨씬 더 많이 살아가며 서로 사랑하자.