

Dipalmitoyl Phosphatidyl Choline Bilayer Membrane 촉매에 의한 para-Nitrophenyl Palmitate의 가수분해 반응

김기준[†] · 이후설

대진대학교 공과대학 화학공학과
(2007년 12월 24일 접수 ; 2008년 3월 12일 채택)

Catalytic Hydrolysis of p-Nitrophenyl Palmitate in Aqueous Dipalmitoyl Phosphatidyl Choline Bilayer Membrane

Ki-Jun Kim[†] · Hoo-Seol Lee

Dept. of Chemical Engineering, Dae-Jin University, Pochun 487-711, Korea
(Received November 24, 2007 ; Accepted March 12, 2008)

Abstract : Dipalmitoyl phosphatidyl choline and p-nitrophenyl palmitate were directly sonicated in acidic water for 6 minutes to give clear stock solutions. The catalytic hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate was studied at 30-50°C in the presence of unilamellar vesicle and mixture of unilamellar and multilamellar aggregates. The difference of reaction rate between unilamellar and multilamellar was observed. The rate of unilamellar reaction compared to the rate of mixture reaction showed more catalytic effect. The phase transition temperature of vesicle was measured at 37-44°C.

Keywords : dipalmitoyl phosphatidyl choline, p-nitrophenyl palmitate, catalytic hydrolysis, vesicle, unilamellar, multilamellar, phase transition

1. 서 론

인지질은 생체막의 중요한 구성 성분으로서 그 생물학적인 특성이 많이 보고되어 있으며 [1~4], 이들 여러 특성 중에 두개의 긴 알킬사슬의 길이와 불포화도에 따른 물리적인 현상을 많이 연구해 왔다[5~6]. 또한 천연지질과 유사한 합성지질의 이중층막에 대한 연구도 활발하였으며, 3중 알킬사슬을 함유한 암모늄염들도 이중층막이 형성됨이 보고되었다[7~9].

본 연구에서는 인지질로서 dipalmitoyl phosphatidyl choline(DPPC)를 사용하고 사슬 길이가 같은 p-nitrophenyl palmitate(PNPP)로 이루어진 이중층막 지질(vesicle)을 초음파 처리법으로 제조하였고, sepharose-4B로 충전된 컬럼을 사용하여 multilamellar로부터 single unilamellar vesicle을 분리하였다[9]. 이때 염기 촉매에 의한 PNPP의 가수분해 반응을 DPPC의 상전이 효과와, vesicle의 uni-lamellar와 multi-lamellar의 영향을 비교 검토하였다.

[†] 주저자 (e-mail : kjkim@daejin.ac.kr)

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

PNPP와 DPPC는 Sigma사 GR급 제품을 정제 없이 사용했으며, HCl과 sodium borax는 Wako 사의 GR급을, Sepharose-4B는 Sigma사 제품을 사용했다. 모든 수용액은 이차증류수를 사용하여 제조하였다. 흡광도의 측정은 Pye-Unicam사(SP8-400)의 uv-visible spectrophotometer를 사용하였고, pH meter는 Orion사(Orion 230A)의 제품을 사용하였다. 초음파 처리는 제작 의뢰한 태금초음파사의 20 kHz ultrasonicator를 사용하였다.

2.2. Vesicle의 합성 및 반응속도 측정

pH=2.32의 sodium borax-HCl 완충용액에 2×10^{-2} M DPPC와 2×10^{-3} M PNPP용액 5 ml을 vial에 채취해 5°C의 항온상태에서 5분간 초음파 처리하여 vesicle을 제조하였다. 이 투명한 용액 2 ml을 직경 1.5 cm, 길이 25 cm인 Sepharose-4B로 채운 컬럼에 분당 0.6 ml의 속도로 용출시켰다. 이때 275 nm 파장에서 각 분액의 혼탁도(turbidity)로부터 단일층(unilamellar)과 다중층(multilamellar)의 vesicle들을 분리했다[11]. 분리한 보관용액을 완충용액으로 희석시킨 다음, 희석된 시료 2 ml을 quartz cell(pathway=1cm)에 취해 항온으로 유지시킨 후 진한 1~2M NaOH용액을 micro-syringe로 규정된 양만큼(수 μ l)씩 주입하여 가수분해물인 phenolate ion을 400 nm에서 흡광도의 증가량으로 반응속도를 측정하였다. Pseudo-first order rate constant(k_0)는 시간(t)에 대한 $\ln(A_\infty - A_t)$ 를 도시해 기울기로서 구했다.

3. 결과 및 고찰

컬럼 용출시의 turbidity[10]는 Fig. 1과 같다. 초창기에 용출되는 vesicle들은 크기가 큰 다중층 vesicle이 나타났으며 뒤이어 비교적 크기가 균일한 단일층 vesicle들이 용출됨을 알았다. 염기축매하의 PNPP의 가수분해 반응은 다음과 같으며[11]다. 30°C에서 pH=10.07, DPPC 이중층막 안에서 PNPP의 가수분해 과정의 스펙트럼 변화는 Fig. 2와 같으며, 가수분해에 대한 실험 결과치가 Burnett 등이 보고된

실험 결과치에 잘 일치하는 경향을 나타내고 있다[3].

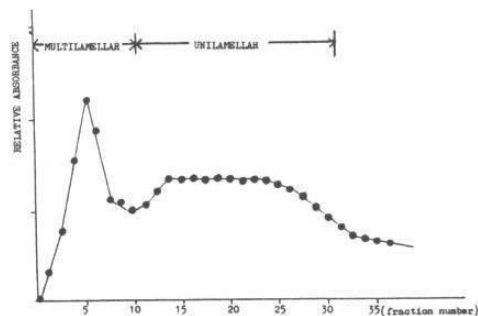
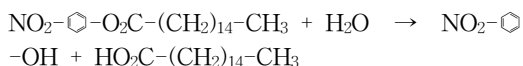


Fig. 1. Turbidity of the each fraction at 275 nm wave length.

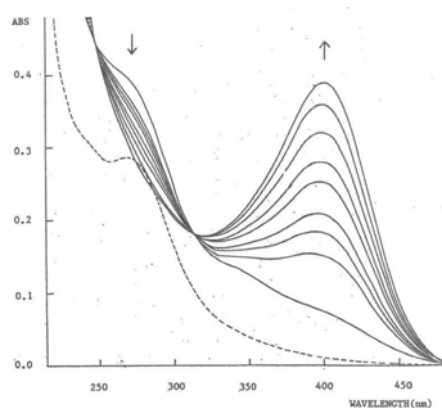


Fig. 2. Time dependence absorption spectra during the DPPC-vesicular catalyzed hydrolysis of PNPP at pH 10.07, at 30°C (dashed line in acidic medium(before hydrolysis), solid lines in alkaline medium).

PNPP 가수분해 반응시 반응물의 최대흡수 파장은 267 nm이었고, 생성물의 최대흡수 파장은 400 nm로 나타났다. Table 1에 33°C에서 시간에 따른 PNPP-DPPC의 스펙트럼의 변화를 나타냈다.

Table 2와 Table 3에 관한 측정은 컬럼을 통과시키지 않은 경우와 컬럼을 통과시킨 경우에 대한 각각의 가수분해 속도상수를 측정하여 나타낸 값들이다.

Table 1. The observed absorbance for the DPPC-vesicular catalyzed hydrolysis of PNPP at 33°C, pH 10.07, $A_{\infty}=0.960$

Time(min.)	A_t	$-\ln(A_{\infty}-A_t)$
2	0.195	0.268
5	0.280	0.368
7	0.322	0.449
10	0.386	0.555
12	0.426	0.627
15	0.478	0.730
17	0.509	0.796
20	0.550	0.892
23	0.587	0.986
25	0.612	1.056
27	0.636	1.127
30	0.660	1.204
33	0.682	1.280
36	0.710	1.386

Fig. 3에서 컬럼을 통과시킨 경우가 컬럼을 통과시키지 않은 경우보다 더 큰 속도상수 값을 얻었는데, 이것은 unilamellar 구조인 vesicle이 더욱 큰 소수성을 나타내기 때문에[11], multilamellar 구조의 경우보다 큰 촉매 효과를

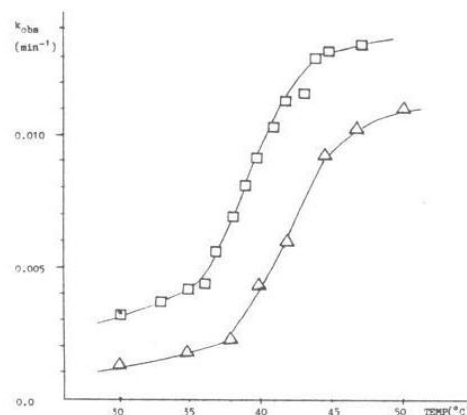


Fig. 3. Temperature dependence on the DPPC-vesicular catalyzed hydrolysis of PNPP ; Δ :not column eluted, \square : column eluted.

나타내는 것으로 알려져 있다[12]. 본 연구에서 측정된 결과에서도 잘 일치하고 있음을 알 수 있다. Gregoriadis는 DPPC의 상전이 온도를 42°C로 고정하여 연구 보고하였다[13]. 본 연구의 경우는 비교적 넓은 온도 범위 하에서 상전이가 발생한 것으로 나타났으나, 이것은 vesicle에 포함된 impurity의 영향과 unilamellar와 multilamellar의 완전한 분리가 발생하지 않아 일어난 영향으로 생각이 되며, Gregoriadis가 발표한 vesicle 구조에 대한 일반적인 경향성과

Table 2. The observed pseudo first order rate constants on the DPPC vesicular catalyzed hydrolysis of PNPP at various temperatures ; not column eluted, pH=10.07, 0.01M borax buffer

TEMP(°C)	30	35	38	40	42	45	47	50
$k_{obs}(min^{-1})$	0.00126	0.00185	0.00224	0.00424	0.00601	0.00916	0.0105	0.0111

Table 3. The observed pseudo first order rate constants on the DPPC vesicular catalyzed hydrolysis of PNPP at various temperature ; column eluted, pH=10.07, 0.01M borax buffer

TEMP(°C)	30	33	35	36	37	38	39
$k_{obs}(min^{-1})$	0.00312	0.00365	0.00418	0.00435	0.00553	0.00689	0.00803
TEMP(°C)	40	41	42	43	44	45	47
$k_{obs}(min^{-1})$	0.00913	0.0102	0.0102	0.0116	0.0129	0.0132	0.0134

같음을 알 수 있었다. 또한 vesicle 존재하에서 친수성 촉매효과는 PNPP의 긴 알킬사슬에 기인한 것으로 Houslay 등은 발표하였다[14]. 이는 본 연구의 경우에서도 unilamellar 구조가 multilamellar 구조의 경우 보다 hydrophobic 효과가 크기 때문에, hydrophilic site에서 일어나는 에스터의 염기 촉매 가수분해 반응속도가 증가되어 unilamellar 구조에서 촉매효과가 큰 것으로 사료된다.

4. 결 론

DPPC와 PNPP의 혼합물(몰비; 10:1)로 이루어진 이중층 vesicle에서 PNPP의 가수분해 반응은 지질의 상전이에 크게 영향을 받는 것으로 나타났다. DPPC의 고체상에서 액정상(liquid crystal phase)으로의 상전이 온도(T_c)는 37~44°C로 나타났으나 순수한 DPPC만의 vesicle에서의 상전이 온도와 비교할 때 전이 온도가 조금 높고 넓게 분포됨이 관측되었으며, 이것은 impurity 효과에 기인한 것으로 사료되며, vesicle의 촉매효과는 unilamellar vesicle의 경우가 uni-와 multilamellar 혼합물인 경우 보다 크게 나타났다. 이것은 unilamellar 구조의 경우가 hydrophobic effect가 크기 때문에 hydrophilic site에서 일어나는 가수분해 반응이 증가된 것으로 생각된다.

참고문헌

1. I. F. Uchegbu, "Synthetic Surfactant Vesicles", CRC Press Inc., p. 95, N. Y. (2000).
2. P. T. T. Wong and H. H. Mantsch, Pressure Effects on the Infrared Spectrum of 1,2-dipalmitoyl Phosphatidylcholine Bilayers in Water, *J. Chem. Phys.*, **83**(7), 3268 (1985).
3. B. K. Burnett and R. J. Robson, Synthesis of Phospholipids Containing Photoactivatable Carbene Precursors in the Headgroups and Their Crosslinking with Membrane Proteins, *Biochimica et Biophysica Acta*, **815**, 57 (1985).
4. P. Vanderwerf and E. F. Ullman, Monitoring of Phospholipid Vesicles Fusion by Fluorescence Energy Transfer between Membrane-Bound Dye Labels, *Biochimica et Biophysica Acta*, **596**, 302 (1980).
5. K. Zana and P. Raoul, "Dynamics of Surfactant Self-Assemblies", Marcel Dekker Inc., pp. 21~31 (2005).
6. T. Sano, J. Tanka, and Y. Toyoshima, Studies on the Phase Transition in Single Lamellar Liposomes, *J. Phy. Chem.*, **86**, 3013(1982).
7. K. Kanto and A. Romero, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**(15), 4030 (1979).
8. Y. Okahata, R. Ando, and T. Kunitake, Phase Transition of the Bilayer Membrane of Synthetic Dialkyl Amphiphiles as Studied by Differential Scanning Calorimetry, *Ber. Bunsenges. Phy. Chem.*, **85**, 789 (1981).
9. T. Kunitake, N. Kunitake, and N. Nakashima, Bilayer Membranes of Triple-Chain Ammonium Amphiphiles, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 1978 (1984).
10. Terrance G. Cooper, "The Tools of Biochemistry", John Wiley & Sons Inc., p. 117, N. Y. (1975).
11. H. Xu and C. H. Huang, Scanning Calorimetric Study of Fully Hydrated Asymmetric Phosphatidylcholines with One Acyl Chain Twice as Long as the Other, *Biochemistry*, **26**, 1036 (1987).
12. Y. Okahata and T. Kunitake, Formation of Stable Bilayer Assemblies in Dilute Aqueous Solution from Ammonium Amphiphiles with the Diphenylazomethine Segment, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**(2), 549 (1980).
13. G. Gregoriadis, "Liposome Technology", CRC Press Inc., p. 58, N. Y. (1984).
14. M. D. Houslay and K. K. Stanley, "Dynamics of Biological Membrane", John Wiley & Sons Inc., p. 51, N. Y. (1982).