

Halobacterium Halobium의 Membrane에서 잉여부피 변화에 관한 연구

김기준[†] · 이주엽

대진대학교 공과대학 화학공학과
(2011년 6월 9일 접수 ; 2011년 6월 23일 채택)

A Study on Change of Excess Volume in Membrane of Halobacterium Halobium

Ki-Jun Kim · Joo-Youb Lee

Dept. of Chemical Engineering, Dae-Jin University, Pocheon 487-711, Korea
(Received June 9, 2011 ; Accepted June 23, 2011)

Abstract : The excess volumes of mixing of benzyl alcohol and halothane in vesicle and in suspensions of several lipids have been determined at 25 °C it using a excess volume dilatometer. The potency of general anesthetics has long been known to correlate with lipid solubility. Denaturations of the vesicle, which is a sole membrane protein in the purple membrane of Halobacterium Halobium, were studied by absorption changes at 280 nm and fluorescence changes at 330 nm and excess volume dilatometer. The particle size analysis of viscous polymer solutions by diffusional interchange is the key step by measurement. The excess volume of mixing in chitosan was found to be negative, whereas them of purple membrane, Halobacterium Halobium and red membrane were positive in benzyl alcohol and halothane. This result was confirmed as Miller's supposition.

Keywords : Halobacterium Halobium, purple membrane, red membrane vesicle, excess volume

1. 서론

최근에 살아 있는 세포내에서 마취제의 작용에 대한 관심이 높아지고 있으며, 생물학적 거대 분자가 생리적으로 수용액에서 활성적이고 지질-마취제 상호작용은 살아 있는 세포내에서 마취제 작용에 대한 부피변화를 이해하는데 필요하다 [1,2]. 지질은 중성지질, 낱, 인지질 및 스테롤 등

을 포함하고 있으며 생체안에서 영양분의 저장물질 또는 세포의 구성 성분으로 알려져 있다. 특히 인지질은 생체막의 주요 성분으로 막의 용질 투과성에 있어서 중요한 역할을 한다. 또한 지질은 수용액에서 Zwitterions으로 존재하고, 부피 변화는 전해질의 경우와 같이 지질과 마취제가 구조적 상호작용을 하여 나타난다[3,4].

마취제가 지질막에서 작용하는 부분의 생리적 작용과 특성은 잘 알려져 있지 않지만, Miller 등이 dipalmitoyl phosphatidyl choline(DPC) 등의 지질에서 정량적으로 부피변화를 식 1에 의하여

[†]주저자 (E-mail : kjkim@daejin.ac.kr)

제안하였다.¹⁾ 마취제가 작용하는 순수한 분울 팽창 E 는 다음과 같다.

$$E = \frac{V_2 \cdot X_2 \cdot P_2}{V_m} - \beta(P_1) \dots \dots \dots (1)$$

윗 식에서 V_2 는 마취제가 작용하는 부분에서 마취제의 분몰 부피이고, X_2 는 1기압 하에서 물 분울 용해도($X_2 \ll 1$)를 의미하며, P_2 는 마취제가 작용하는 부분의 부분압력을 나타낸다. 또한 V_m 는 물 부피이고, β 는 등온 압축율이며, P_1 는 전체 압력을 의미한다.

본 연구에서 사용한 Halobacterium Halobium(HH)은 고농도의 염 용액에서 자라는 진핵 세포로서 미생물로부터 배양한 후 purple membrane(PM)과 red membrane(RM)을 분리하였다[5,6]. Purple membrane에 빛을 쬐어주면 광순환 회로를 돌게 되며, proton이 pumping되고, pH가 중성으로 변화된다. HH, PM, RM, Chitosan의 시료들을 교반하여 입자크기를 측정하였고, 이들 vesicle의 경우에 연속적으로 빛을 쬐어주면 proton의 이동방향은 vesicle의 내부에서 외부로 이동한다[7,8]. 마취제에 대한 부피 변화는 excess volume dilatometer로 측정하여 각 성분물질의 소수성 부분과 친수성 부분의 차이에 의해 유발되는 부피변화의 영향을 측정한 결과 마취제에 의한 chitisan의 잉여부피는 감소하였으나, PM, HH과 RM의 잉여부피는 증가하였다.

2. 기기 및 실험 방법

자외선 및 가시광선 분광 광도계는 Varian 회사 제품의 Model Cary-17D를 사용하였으며, 30 ㎐ 초음파기기, ultracentrifuger는 Beckman사 제품을 사용하였다. Beckman 온도계와 스위치가 부착된 항온조는 VWR Scientific사의 제품을 사용하였으며, 입자크기 분석은 Sedigraph 5000(model BI-DCP)을 이용하여 측정하였다. 마취제인 halothane과 benzylalcohol은 Aldrich사에서 구입하였고, Chitosan, tris-base 등은 Sigma chemical사에서 구입했으며, pepton (Bacteriological Technical Bactor Agar)은 Difco Lab. 에서 구입하였다. 실험에서 사용한 dilatometer는 Duncan과 Sheridan⁸⁾의 dilatometer를 이용하였다. Vesicle이 형성된 직

접적인 확인은 300nm의 파장에서 turbidity로 확인하였다. 마취제인 halothane과 벤질알콜은 일정한 농도로 맞추어 vesicle에 섞어 초음파처리하였다.

Vesicles은 일정한 양의 완충용액과 시료를 교반한 후에 초음파 처리한 다음 부피 변화를 측정하였다. 배지는 고온 고압하에서 배지 1 ㎖ 당 150 ml의 점종액으로 점종하였으며, 온도는 39 °C 로 유지하였고 150 rpm 으로 회전시켜 가면서 항온 하에서 인큐베이터에 5일 동안 키운 후에 원심분리 하였다[9].

완숙한 박테리아는 15분간 원심분리한 후 침전물을 기본 염용액에 넣고 0.1M NaCl 3 ㎖ 속에서 24시간 투석시켰다. 최종 침전물은 5 ml 탈이온 증류수에 넣고, 원심분리병 바닥에 60 % 설탕용액 1 ml를 넣은 후, 그 위에 30 ~ 50 % 까지 농도 범위에서 원심분리하였다. 따라서 DNA가 방출된 빨간 자주빛 침전물을 그 위에 붓고 15°C 에서 원심분리 하면 PM은 평형에 도달하게 된다. 자주빛 띠와 바로 위에 빨강 띠가 생기는데 이것은 RM의 밀도가 1.16 g/cm³ 이고, PM의 밀도가 1.18 g/cm³ 으로 분별 원심분리법에 의하여 RM을 PM으로 부터 분리하였다. 500 mg의 키토산을 pH 7.5, 0.01 M 인산 완충용액 혹은 트리스 완충용액 10 ml에 넣고 vortexing한 후에 초음파 처리를 3분 간격으로 4번 반복하였다. 온도는 0 °C를 유지하고 초음파 처리 중에 용액에 질소를 불어 넣어 주었다[10,11].

측정값을 이용하여 다음 식으로 잉여부피를 구하였다.

$$\bar{V}^E = \frac{n_3}{A+1} (-\bar{V}_3^E + \bar{V}_4^E) \dots \dots \dots (2)$$

\bar{V}^E 와 n_3 로 부터 다음 식으로 유도된다.

$$\bar{V}_4^E = \frac{\bar{V}^E(A+1)}{n_3} + \bar{V}_3^E \dots \dots \dots (3)$$

3. 결과 및 고찰

HH에 의해서 재구성된 여러 vesicle은 Sepharose 4B column을 통과시키면, 평균 크기가 250 Å 정도의 작은 unilamella 구조에 가까운 bilayer lipid vesicle에 벤질알콜을 혼합한 시료

의 스펙트럼은 Fig. 1과 같다. 자외선 및 가시광선에서 얻은 PM의 흡수 스펙트럼 Fig. 1에 의해서 농도가 7.4×10^{-5} M 임을 알았다. 25 °C 에서 측정된 각 용매들에서 벤질 알콜의 농도에 따른 부피 변화는 Table I와 같다. Fig. 1에서 벤질 알콜을 지질에 첨가함에 따라 약간 장파장 이동을 볼 수 있는데, 이는 지질에 마취제가 첨가됨에 따라 벤질 알콜의 $\pi \rightarrow \pi^*$ 전자 전이가 비극성 용매 효과에 의해 에너지 준위차가 감소하여 발생하는 현상이다[11]. PM에서 5×10^{-5} mol 벤질 알콜의 잉여부피는 3회 반복 측정된 평균값은 1.05 ml/mol 이었으며, 벤질 알콜의 몰 부피는 103.83 ml/mol이다. 이 값은 Miller 등이 측정하여 얻은 값들과 비교할 때 거의 유사하였다[12]. Fig. 2는 vesicle를 vortexing한 후에 입자 크기를 HH, PM, RM, chitosan에 관해 측정된 결과 HH, PM, RM은 vesicle들로 particle diameters가 비슷하게 나타났으나, 키토산의 입자크기가 다르게 나타난 것은 이들과 비교하여 분자구조가 상이한 것으로 생각이 된다.

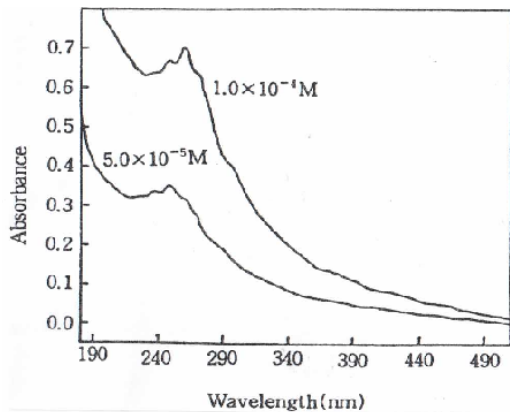


Fig. 1. The spectra of the benzyl alcohol in lipid vesicle.

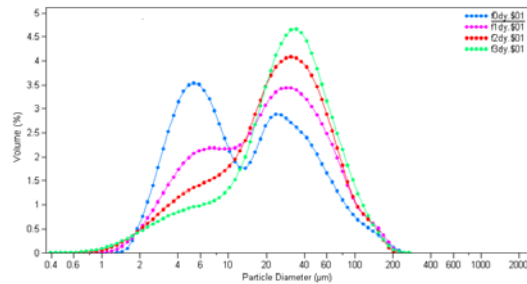


Fig. 2. The particle size analysis in lipid vesicles: (1) halobacterium halobium, (2) purple membrane, (3) red membrane, (4) Chitosan.

국부 마취제로 작용하는 벤질 알콜은 지질의 머리부분 근처에서 작용하는 것으로 알려져 있는데, 할로테인과 vesicle은 지질의 소수성 영역으로 침투하고, 친수성 부분은 지질의 머리 부분인 아실기에 수소 결합을 한다³⁾. 따라서 25 °C에서 측정된 각 용매들에서 각 마취제의 농도에 따른 부피 변화에서 휘발성이 큰 할로테인은 전체적으로 부피변화 폭이 커짐을 알 수 있었다. Fig. 3에서 할로테인은 전신 마취제로 비극성 물질이므로 아실기를 가진 머리 부분에서 반발력이 작용하고, 소수성 영역으로 투과가 잘 되어 부피 변화가 크게 나타난 것으로 생각된다.

Fendler는 벤질알콜의 영향이 막 두께에 변화를 주지 않지만 PM은 RM보다 막 두께를 약간 증가 시키는 효과가 있음을 발표하였고,²⁰⁾ 각 마취제에 대하여 모두 양의 잉여부피를 나타내었다. 이 효과는 용액 부피가 용매와 용질 부피의 합보다 적기 때문에 생기는 electrostriction현상이며¹⁸⁾, 이는 전기장하에서 마취제 자체를 극성인 물 분자가 둘러싸는 현상을 의미한다. 또한 키토산은 여러 종류의 지질을 포함하는 혼합물로서

Table I. Comparison of volume changes for benzyl alcohol in lipids at 25°C.

PM		DPPC		DPPC+PM		DPPC+PM+Red membrane	
\bar{V}^E (ml/mol)	\bar{n}_3 (mol)	\bar{V}^E (ml/mol)	\bar{n}_3 (mol)	\bar{V}^E (ml/mol)	\bar{n}_3 (mol)	\bar{V}^E (ml/mol)	\bar{n}_3 (mol)
7.8×10^{-6}	1.0×10^{-5}	8.3×10^{-6}	1.0×10^{-5}	8.8×10^{-6}	1.0×10^{-5}	9.2×10^{-6}	1.0×10^{-5}
8.2×10^{-6}	1.0×10^{-4}	9.9×10^{-5}	1.0×10^{-4}	1.07×10^{-5}	1.0×10^{-4}	1.5×10^{-5}	1.0×10^{-4}
9.01×10^{-6}	1.0×10^{-3}	1.05×10^{-4}	1.0×10^{-3}	2.02×10^{-4}	1.0×10^{-3}	2.4×10^{-4}	1.0×10^{-3}

2중, 3중 결합의 지질들은 cis - trans 형태로 꼬여 있어 packing이 잘 안되며, 소수성이 작아 부피 변화가 감소한 결과라고 생각한다. 극성물질과 비극성 물질의 원형질 막에 대한 투과는 극성인 물질이 결합을 형성하는 한쪽 음이온에 편재하여 분자가 쌍극자로 작용하며 머리 부분에 배열한 것으로 사료된다. 이는 Miller의 부피 변화를 측정 한 결과와 본 실험과도 잘 일치하고 있으며, 휘발성제에 의한 마취작용은 지질의 소수성 영역에 따른 부피 팽창과 상호관련이 있음을 확인한 것이다.

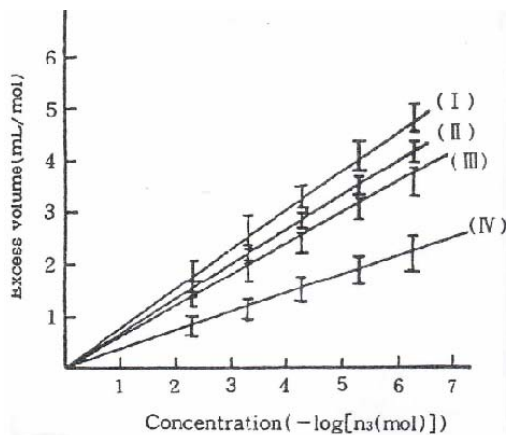


Fig. 3. Results of experiments with halothane in vesicle ; I, purple membrane, ;II, halobacterium halobium, ; III, red membrane ; IV, chitosan.

4. 결론

1. 극성 마취제인 벤질 알콜이 재구성된 양이 많을수록 흡광도가 크을 알 수 있었다.
2. 벤질 알콜이 vesicle에 재구성된 시료에서 PM, HH, RM, chitosan 순으로 잉여부피가 감소하였다.

3. Vesicle에 할로테인이 첨가되어 재구성된 상태에서 잉여부피의 변화가 가장 크게 나타났다.
4. Chitosan은 벤질알콜과 할로테인 마취제에 의한 잉여부피를 나타냈으나 PM, HH과 RM은 양의 잉여부피를 나타냈다.

참고문헌

1. K. J. Kim, K. C. Sung, H. S. Lee .(2000): J. Korean Eng. Chem., 11(1), 24-28.
2. Miller, K. W., Hammond, L. and Porter, E. G.(1977): Chem. Phys. Lipids 20, 229-241.
3. Simon, S. A., McIntosh, T. J., Bennett, P. B. and Shrivastav, B. B. (1979): Mol. Pharmacol. 16, 163-170.
4. Colley, C. M. and Metcalfe, J. C. (1972): FEBS Lett. 24, 241-246.
5. Smith, R. A., Porter, E. G. and Miller, K. W. (1981): Biochim. Biophys. Acta 645, 327-338.
6. Franks, N. P and Leib, W. R. (1967): Nature 274, 339.
7. Battino, R. (1971): Chem. Rev. 71, 5-45.
8. Pflug, H. D. and Benson, G. C. (1968): Can. J. Chem. 46, 287-294.
9. Duncan, W. A., Sheridan, J. P. and Swinto, J. L. (1965): Trans. Faraday Soc., 61,421
10. Steeckenius, W., Rowen, R. (1967): J. Cell Biol. 34 337-357.
11. Mullins, L. J. (1964): Chem. Rev. 54 289-323.
12. Haydon, D. A., Hendry, B. M., Lerinson, S. R. (1977): Biochim Biophys. Acta 470, 17-34.