

Protein-detergent 결합과 Micelle형성에 미치는 알코올의 영향

權 赫 哲

(太平洋化學(株) 主任技師)

Complex formation of ferrimyoglobin with lauryl pyridinium iodide was followed spectrophotometrically in aqueous-alcoholic systems containing methanol, ethanol, propanol, and butanol. Micelle formation of the detergent in the same media was also detected spectrophotometrically.

It was found that methanol and ethanol destabilize the formation of both micelles and the protein detergent complex, while n-propanol and butanol isomers stabilize both systems. Isopropanol has no effect. The magnitudes of stabilization and destabilization are similar, as judged from the shifts of the critical micelle concentrations and of the midpoints of complex formation curve. Interaction of the protein with the detergent was found to occur both below and above the critical micelle concentration. It is suggested that the association of the detergent with the protein results in the formation of micellar like structures on the protein surface.

I 서 론

이온성 세제들의 micelle 形成은 electrostatic free energy와 hydrophobic free energy의 상호 균형에 의하여 지배된다. 여기에 functional group을 갖는 물질의 첨가는 micelle의 크기와 안정도에 큰 영향을 준다. 고급 아민이나 메칼탄의 첨가는 동급의 산이나 알콜에 비하여 micelle의 안정도를 증가 시키며 CMC를 낮게 한

다. hydrophobicity가 큰 고급알콜은 저급알콜에 비하여 micelle 의 안정도에 효과적임이 밝혀졌다. 세제와 프로테인의 작용도 이들과 유사하게 일어날 것으로 생각된다.¹⁾ 세제-프로테인의 작용과 micelle 形成을 비교하는 것은 세제에 의한 생물학적인 여러 현상을 이해하는데 큰 도움이 된다. 이에대한 연구는 hydrophobic chain length와, 이온의 세기, 반응 과정간의 유사성 등의 측면에서는 이미 밝혀졌다. 본실험에서는 여러 알콜들이 프로테인-세제계에 미치는 영향에 관하여 조사하였다.

II 실험

Materials:

- 1) Ferri-myoglobin: Sperm whale(0.3% Fe). Koch-Light, Colnbrook, England.
- 2) Lauryl Pyridinium Chloride: Henkel Dusseldorf, Germany
- 3) Lauryl Pyridinium Iode(LPI): Lauryl Pyridinium Chloride와 Conc. NaI 용액으로 부터 침전을 얻어 증류수로 2차 재결정하여 사용.
- 4)上記 이외의 시약은 시약 1급을 사용함
- 5) 알콜은 사용하지전 증류하여 사용함.

실험방법 :

모든 측정은 $25^{\circ} \pm 0.5^{\circ}C$ 에서 하였으며 용액들은 0.1mM의 인산 buffer를 사용하였으며, pH는 7.15 ± 0.1 을 유지 시켰다. 본 실험은 Ferrimyoglobin과 Lauryl pyridinium halide가 반응하여 green compbx를 형성하는 점을 이용하였다.²⁾ 이 반응은 흡광도의 변화 측정으

로 쉽게 알 수 있다. 프로테인은 세제와 작용하여 자신의 입체구조에 변화를 일으키고 prosthetic group을放出하며 spectrum의 변화를 가져온다. 이 prosthetic group은 용액 내에서 여분의 세제와 반응하여 흡광도에 변화를 준다. 본 실험에서 여분 세제의 농도는 프로테인이 없을 때 hemin과 결합하여 green complex를 형성하는데 필요한 양의 20배 이상이다. 이러한 조건 하에서 흡광도의 변화는 프로테인-세제의 상호작용의 척도가 된다.

Ferri-myoglobin Lauryl pyridinium Iodide의 相互反應은 469nm(Soret band)에서 흡광도의 변화를 나타낸다. 시료는 제조 후 30~200分 사이에測定하며 이 시간 이내에는 그리 큰 변화가 일어나지 않는다.

Critical Micelle Concentration은 285nm에서 spectrophotometric titration에 의하여測定된다. 이 波長에서 흡광도의增加는 micelle 表面에서 I⁻ 이온과 Pyridinium group간에 charge transfer Complex가 形成됨으로서 일어난다.³⁾

약자사용

LPI; Lauryl Pyridinium Iodide

CMC; Critical Micelle Concentration

III 결 과

Fig I에 알콜성 용액에서 Ferrimyoglobin과 LPI의 spectrophotometric titration의 몇가지 예들이 있다. 여기서 보면 green-complex 形成에 대하여 methanol은 불안정도를增加시키며(transition curve가 세제의 높은 농도쪽으로 이동한다) n-부탄올은 안정도를 증가시켜주고 있다. 물의 transition curve와 同一하게 나타나는 isopropanol(10%)의 경우도 비교하였다. Fig II에서는 프로테인이 있을 때와 없을 때에 동일한

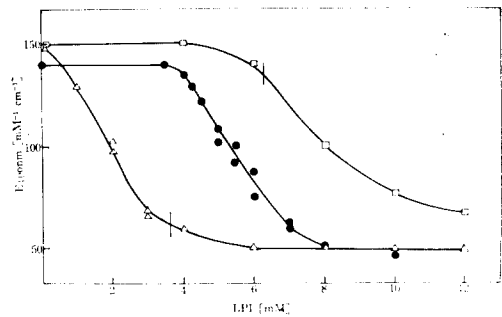


Fig 1. spectrophotometric titrations of ferri-myoglobin (0.1mM) with LPI, at 469nm in Various Solvent Compositions: (○) water; (□) water (10% volume isopropanol); (△) water (10% volume n-butanol); (●) water (10% volume methanol). Vertical bars show the CMC on the complex formation curves.

알콜들이 micelle 形成에 이와 유사한 영향을 주고 있음을 보여준다. 여기서 보면 프로테인 존재시 波長 285nm의 吸收 曲線에서 transition region이 있음을 알 수 있다. 이것은 알콜이 없을 때와 n-부탄올이 있는(6.0%) 두 경우에 CMC 바로 아래에서 부분적으로 green-complex 形成이 일어나고 있음을 말해주는 것이다. 이러한 조건 아래서 charge transfer complex가 나타나는 것은 프로테인 表面에서 micelle 構造가 形成

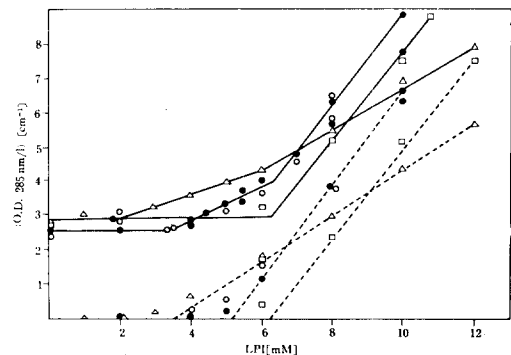


Fig 2. CMC determinations for LPI by spectrophotometric titrations at 285nm in the absence (.....) and presence (—) of myoglobin (0.1mM) in Various Solvent Compositions. Notations as in Fig. 1.

Table I.

Influence of Various Alcohols on LPI Micellization, and on
LPI Interaction with Myoglobin

alcohol	Concen. % volume	LPI(m M) at green complex formation of:		CMC of LPI(m M)		$\epsilon_{285}(\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1})$		v		System No.
		25%	75%	No protein	0.1mM myoglobin added	No protein	0.1mM myoglobin added	form slope of transition curves	form CMC shift	
Methanol	20	8.30	10.90	8.60	9.10	1.19	1.24	16.0	5.0	1
Ethanol	20	6.79	9.40	7.44	7.18	0.93	0.87	12.0	-2.6	2
Methanol	10	6.55	9.05	6.20	6.40			12.0	2.0	3
—	—	4.70	6.50	5.20	5.35	1.36	1.34	16.0	1.5	4
Iso-propanol	10	4.54	6.20	5.00	5.40	1.25	1.08	>20.0	4.0	5
N-Propanol	10	3.40	5.05	4.28	5.00	0.82	0.78	11.0	0.2	6
Ter-Butanol	6	4.06	5.46	4.43	4.60	1.16	1.06	>15.0	1.7	7
N-Butanol	6	1.24	2.94	3.55	3.70	0.68	0.70	4.0	1.5	8
Sec-Butanol	6	3.10	4.82	3.20	4.05	1.19	0.96	9.0	8.5	9
Iso-Butanol	6	2.22	3.50	2.95	3.60	0.88	0.72	5.5	6.5	10

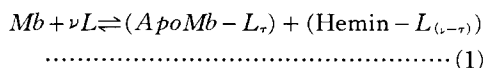
되고 있음을 말하는 것이다. 이에 대한 것은 別途로 추후에 취급하겠다.

Fig II에서 단백질 존재시의 CMC값의 結定은 LPI의 고농도 값들을 LPI의 저농도에서 얻은 흡수선까지 entropolation하여 얻었다 Fig I에서는 단백질과 세제의 결합이 CMC위 뿐만 아니라 아래에서도 가능함을 나타낸다.

25%, 75%의 green complex를 形成하는 LP I의 농도, myoglobin존재시와 부재시의 CMC 값들을 여러가지 알콜 수용액에 대하여 구한 값들을 Table I에 요약하여 놓았다.

각 단백질 분자와 작용하는 세제분자의 수 (ν)는 두가지의 방법으로 구한다.

첫째는, complex形成이 아래와 같은 반응으로 나타낼 수 있음을 가정하고 구한다.



$A - L_x$ 는 A가 x세제 분자와 결합한 것을 나타내며 L은 세제, Mb는 myoglobin, Apo Mb는 Apomyoglobin을 말한다. 이 반응의 단백질 분율을 α 라 하고 Mass action law를 적용하면

$$L_f = \left(\frac{1}{k}\right)^{1/\nu} \left[\frac{(1-\alpha)^2}{\alpha}\right]^{1/\nu} Mb_\tau \dots \dots \dots (2)$$

K는 전리상수이며, L_f 는 자유세제의 농도, Mb_τ 는 전체 단백질의 농도를 나타낸다. L_f 를 전세제의 농도 L_t 로 나타내면

$$L_f = L_t - \nu(1-\alpha)Mb_t \dots \dots \dots (3)$$

식 (3)을 (2)에 대입하고 양면에 대수를 취하고 $\alpha=0.25$ 에서 $\alpha=0.75$ 를 빼면

$$\ln \left[\frac{L_t(\alpha=0.25) - 0.75 \cdot \nu \cdot Mb_t}{L_t(\alpha=0.75) - 0.25 \cdot \nu \cdot Mb_t} \right] = \frac{1}{\nu} \ln \left[\frac{0.75^2/0.25}{0.25^2/0.75} \right] = \frac{3.29}{\nu} \dots (4)$$

식 (4)를 좌표로 풀면 ν 값이 얻어진다. 이 ν 값은 transition curve의 예민도나 식 (1)로 표시되는 反應과 직접 관계가 있다. 두번째는 Fig II의 단백질 존재하에서 얻어진 CMC값의 이동으로부터 계산해 낼 수 있다. 이 방법은 sodium dodecyl sulfate와 serum albumin과의 상호 작용에 사용 되었으며 실제값에 근사한 값을 얻었다. 이 방법은 micelle은 단백질과 작용하지 않는다는 가정하에 성립하며, 세제분자는 용액 중에서 단백질과 결합하여 감소하기 때문에 CMC값이 이동 한다고 가정한다. Table I에서 보는 바와 같이 대부분의 경우에 CMC값의 變化는 너무적기 때문에 ν 값이 클때는 반응식 (1)에

서 구한 값을 설명할 수 없다. 그러므로 본실험에서 약간의 알콜들의 존재하에 micelle이 프로테인과 작용할 수가 있으며, 프로테인은 자신의 표면 위에 micelle의 형성을 촉진 시킨다고 할 수 있다.

이의 가능성은 첫째로 만약 프로테인과 세제의 상호 작용의 CMC 위에서만 일어난다면 어떠한 CMC값의 변화도 일어날 수 없다는 것이다. 본실험에서 이 상호 작용이 일부는 CMC 위에서 일부는 아래에서 일어나고 있으며 CMC의 변화는 결합된 세제의 양에만 관계하기 때문에 낮은 ν 값을 갖는다. 둘째는 프로테인에 의한 micelle의 촉진은 CMC의 감소변화를 일으킬 수 있다는 점이다.

$\epsilon 285$ 에서 charge transfer complex의 흡수는 고농도의 세제속에서는 Tabl I에서 보듯이 프로테인 존재의 영향을 받지 않는다. 그러나 아주 낮은 농도에서는 프로테인 존재시 transition 영역에서 $\epsilon 285$ 의 흡수값이測定된다. (Fig II). 이에 대한 설명은 이 영역안에서 가해지는 세제 분자들이 전부 프로테인과 작용하는 것은 아니며 CMC아래에서 charge transfer complex를 形成하는데도 기여한다는 것이다. 다른 설명은 정상적인 micelle에 비하여 프로테인 위에 형성된 micelle의 構造는 낮은 charge density를 갖고 있다는 것이다.

IV 고 찰

알콜은 잘알려진 프로테인 변성제이다. 이들의 변성 능력은 hydrophobic chain length가 커질수록 증가하며 branch가 있으면 감소한다. (4,5) 여러가지 용액에서 알수 있듯이 변성 능력과 hydrophobicity간에는 일정한 관계가 있다. (6) hydrophobic interaction을 형성하려는 알콜은 변성된 벌려진 구조를 안정화 시키려 하며 이때 프로테인의 hydrophobic group은 medium 쪽을 향한다고 생각할 수 있다. 여러가지 이온성 세제의 micelle 形成도 알콜들에 의하여 영향을 받는다(7,8). micelle의 붕괴가 프로테

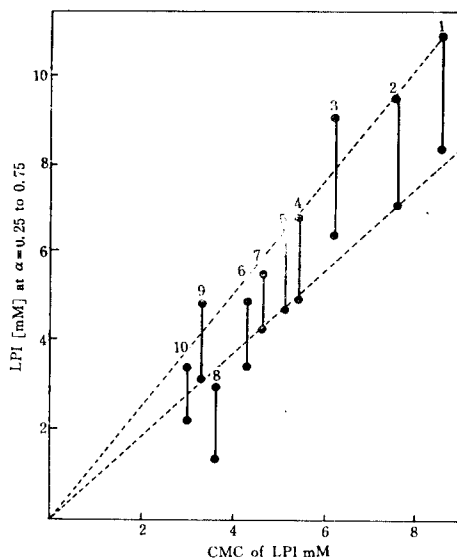


Fig 1 LPI concentrations needed to achieve 25 -75% of protein-detergent complex formation v.s. CMC values of the detergent in the absence of protein at the same Solvent compositions. (Numbers identify the composition, according to Table I.)

인의 변성과 유사하게 일어난다고 생각될지 몰라도 이 경우엔 반대의 결과가 일어난다 hydrophobicity가 큰 알콜들은 프로테인 변성에 큰 영향을 주며 micelle의 안정도를 높여 준다. 이들은 CMC를 낮게한다. hydrophobicity가 작은 알콜들은 프로테인 변성에 미약한 영향을 주며, micelle 파괴에 효과적이고 CMC값을 높여 준다. 이러한 작용은 세제분자와 함께 더 안정된 mixed micelle을 形成하려는 알콜의 성질도 설명할 수 있으며 알콜의 hydrophobicity가 증가할수록 커진다. 저급 알콜일수록 이 작용은 적어지며 메탄올과 때로는 에탄올에서 프로테인 변성에서와 동일한 작용으로 micelle이 불안정하여진다. 이러한 두 작용이 열역학적으로는 타당하다면 25% 에탄올중의 decyl trimethyl ammonium bromide나, 22% 에탄올중의 Na-dodecyl sulfate, 본실험의 10%의 이소프로필아민 중의 LPI(Fig I) 등에서 보는 바와 같이 알콜은 CMC에 어떠한 영향도 주지 않는다. 알콜 프로테인계에서는 이와 유사한 현상은 일어나지 않는다. Fig III은 여러가지 알콜의 존재하에 25%에서 75%의 프로테인을 green complex로 변화

시키는데 필요한 세제의 농도를 같은 조건에서 측정된 CMC값에 대하여 좌표로 그린 것이다. micelle 形成과 세제-프로테인의 결합에 미치는 알콜의 영향이 비교되었다. Fig III 은 이 두 과정 사이의 메탄올, 에탄올에 의한 불안정성 n-부탄올, 부탄올 이성체에 의한 안정성과 이소프로판올에 대한 무영향등의 관계를 볼수 있다. 여기에서 micelle의 形成에 미치는 알콜들의 영향은 프로테인에 미치는 영향과는 반대이며 프로테인-세제 complex 形成에 대하여는 같은 효과를 준다는 결론을 내릴수 있다. 특히 프로테인 세제 complex의 안정화가 mixed micelle을 形成하여 micelle을 안정화시키는 알콜들과 같은 알콜들에 의하여 이루어 진다고 할 수있다. (7) 그러므로 myoglobin-LPI complex는 세제의 구조에 의해 micelle의 성질을 갖고 있다고 추정할 수 있다. CMC 상, 하에서 complex 形成이 나타나며 앞에서 말한 charge-transfer complex가 생기는 것은 이러한 가설을 뒷받침하여 준다. 프로테인 표면에서 생기는 micelle 構造는 free

micelle과 동일하게 알콜의 영향을 받는다.

References

1. Steinhards, J., And Reynolds. J.A., "Multiple Equilibra in Protein Solutions," Academic Press, New York, 1969.
2. Yonath, J., and Blauer, G. Eur. J. Biochem, 41, 163, (1974)
3. Strauss, And Strauss, U.P., J. phys chem 62, 1321. (1958)
4. Schrier, E.E., Ingwall, R.T. And Shergaga H.A., J. phylerm. 69, 298 (1965)
5. Gerlsma, s.r. Eur J. Biochem 14, 150 (1970)
6. Herskovts, T.T, And Kelly, T.H., J. phys chem 77, 381. (1973)
7. Emerson, M.E., And Holtzer, A., J. phys chem 71, 3320 (1967)
8. Shirhama, K., And Kashiwabara, T,
9. Colloid Interface sci 39, 65 (1971)