

Purple Membrane으로 재구성된 L- α -lecithin Vesicle에서 Photochemical Reaction Differential Scanning Calorimetry에 의한 Methylene Blue의 에너지 전달

김기준 · 성기천 · 이 후 설

대전대학교 공과대학 화학공학과

Energy Transfer of Methylene Blue on the Purple Membrane Incorporated into L- α -lecithin Vesicle by Photochemical Reaction Differential Scanning Calorimetry

Kim, Ki-Jun · Sung, Ki-Chun · Lee, Hoo-Seol

*Dept. of Chemical Engineering, Dae-Jin University

(Received Oct., 15, 1996)

ABSTRACT

Thermograms of methylene blue(MB) in L- α -lecithin vesicle and incorporated purple membrane vesicle(InPM) systems have been studied by photochemical reaction differential scanning calorimetry at 25~55°C. Phase transition temperatures of lecithin vesicle, purple membrane(PM), and InPM were found to be independent of illumination of light(436nm) at 39~40°C, but endothermic phase transition was found in InPM vesicle. In MB-InPM system, endothermic phase transition was found on unillumination of light at 40~42°C, but exothermic phase transition was found on steady illumination of light at 48~52°C. It was estimated that the light energy absorbed from MB on vesicular surface was transferred to PM, and the transferred energy was redistributed to hydrophobic site of membrane. Therefore, the exothermic phase transition was measured at high temperature because of the increased hydrophobicity of acyl chain.

I. 서 론

유기색소분자들의 metachromasy 현상을 연구하는데 methylene blue(MB)가 자주 사용된다. 수용액 중의 일정 농도범위에서 MB분자들은 안정한 회합체를 자체 형성할 뿐만 아니라, 지지전해질이나 음이온성 고분자들이 첨가되면 안정한 회합체를 매우 잘 형

성한다.^{1~3)} 친수성표면을 가지는 인지질 vesicle 수용액 중에서도 MB는 안정한 회합체를 형성하며,⁴⁾ bacteriorhodopsin(BR) 수용액이나 purple membrane(PM)을 재구성시킨 인지질 vesicle (InBR 혹은 InPM)수용액에서도 매우 잘 회합체를 형성한다 (Fig. 1).⁵⁾ 이 때에 인지질만으로 만든 vesicle과 비교할 때 PM을 재구성시킨 vesicle의 경우에는 이중층막의 상전이 온도 부근에서 단분자와 이합체간의 흡광

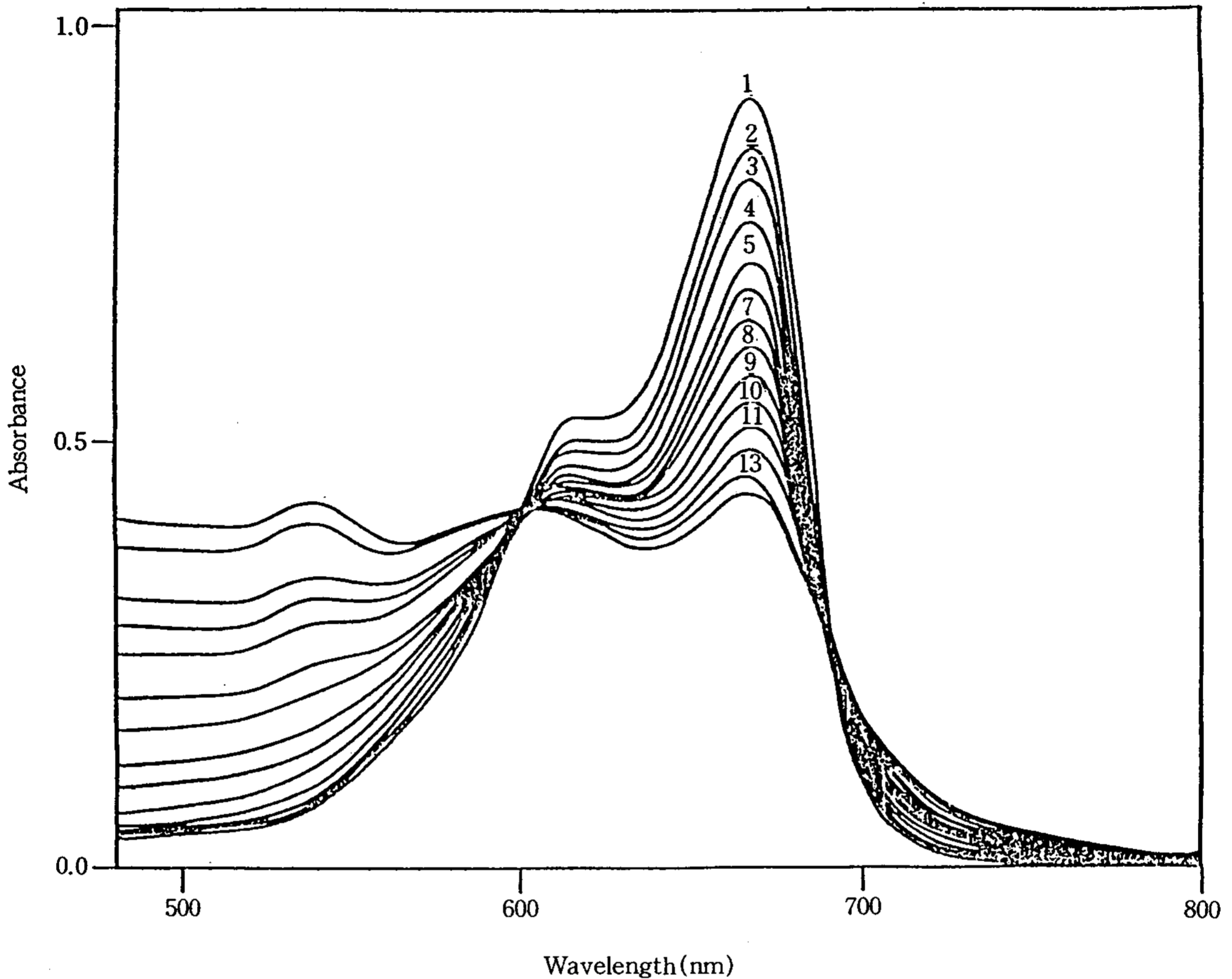


Fig. 1. Absorption spectra of $1.29 \times 10^{-5} \text{M}$ -MB in the presence of incorporated PM-lecithin in vesicle at 20°C : 1 : $X_{\text{InPM}}=0.369$, 2 : $X_{\text{InPM}}=0.506$, 3 : $X_{\text{InPM}}=0.635$, 4 : $X_{\text{InPM}}=0.744$, 5 : $X_{\text{InPM}}=0.839$, 6 : $X_{\text{InPM}}=0.883$, 7 : $X_{\text{InPM}}=0.933$, 8 : $X_{\text{InPM}}=0.968$, 9 : $X_{\text{InPM}}=0.977$, 10 : $X_{\text{InPM}}=0.982$, 11 : $X_{\text{InPM}}=0.985$, 12 : $X_{\text{InPM}}=0.987$, 13 : $X_{\text{InPM}}=0.990$, 14 : $X_{\text{InPM}}=0.991$, $X_{\text{InPM}} = [\text{InPM}] / ([\text{InPM}] + [\text{MB}])$, $\text{pH}=7.4$.

도비(α/β)가 상당량 증가하는 것으로 나타났다. 이것은 vesicle이 고체상태인 상전이온도 이하의 온도구간에서는 지질의 사슬들과 PM의 소수성 부분 사이의 큰 hydrophobic effect에 의해 vesicle에 재구성된 PM은 구조적으로 안정화된다. 결과적으로 고체상의 InPM수용액에 존재하는 MB분자들은 PM의 친수성 부분과 안정한 회합체를 이루게 된다. 그러나 지질막이 상전이 온도에 도달되면 인지질막의 fluidity가 증가하여 hydrophobic effect가 감소하게 된다. 이 때에 인지질 이중층막 중의 PM의 친수성 부분에 회합되었던 MB분자들은 이중층막의 전체표면으로 재분배되는 것으로 설명한다.⁵⁾ Retinal을 포함한 PM은

시각세포의 중요한 단백질이며, 외부로부터 빛이 조사되면 광순환회로를 돈다. 광순환회로 과정 중에 lysine 216 잔기와 retinal이 결합하여 생긴 protonated Schiff base에 의해 proton을 pumping한다.⁶⁾ PM의 여러 성분 중에서 retinal이 all trans형태인 light adapted PM은 빛을 받으면 J, K, L, M_{412} 등의 중간체를 거치며 광순환회로를 돈다.¹²⁾ 인지질로 재구성된 PM vesicle(InPM)도 빛을 쬐여주면 proton을 pumping한다.

본 연구에서는 Halobacterium halobium으로부터 분리한 PM을 L- α -lecithin vesicle에 재구성시켰다. 이 재구성 vesicle(InPM) 존재하에서 MB의 metac-

hromasy특성을 광의 조사 유·무에 따른 vesicle의 상전이 현상과, 이로 인한 색소분자와 purple membrane사이의 광에너지 전달 특성을 고찰하고자 한다.

II. 실험

1. 기구 및 시약

Methylene blue, L- α -lecithin(soybean), bacto-peptone, tris(hydroxymethyl)methylamine, D-Nase 등은 Sigma Co. 제품을 사용했고, MgSO₄, CaCl₂, FeCl₂, NaCl, 그리고 CuSO₄ 등은 Junsei사의 GR급을 사용했다. UV/VIS spectrophotometer는 Pye-Unicam사의 model SP8-400을 사용했고, photo-D.S.C는 Seico Instruments Inc.의 model SSC5200H를 사용했다. 초음파 발생기는 태금사의 20kHz ultrasonicator를, 배양기는 Fisher사의 model 129 shaking water bath($\pm 1^\circ\text{C}$)를 사용했다. 초원심분리기는 Shimadzu사의 제품을 사용했다.

2. BR의 제조 및 분리

3L 삼각 flask에 배지용액 1L(NaCl 250g, MgSO₄ 20g, CaCl₂ 0.2g, KCl 2g, bacto-peptone 10g, MnSO₄ 3mg, FeCl₂ 23mg, ZnSO₄ 4.4mg, CuSO₄ 50mg)을 넣고, 여기에 Halobacterium halobium R1을 접종하여 150rpm, 40°C 온도에서 100W 백열전구 4개를 쪼이면서 4일간 배양했다. 배양액을 2,200rpm에서 원심분리한 후에 D-Nase 5mg을 넣고 0.1M NaCl 용액에서 24시간 투석시켰다. 이 적색용균물을 6,000rpm에서 40분 동안 원심분리하여 박테리아 단백질층을 얻었다. 이 단백질을 sucrose density gradient하에서 원심분리하여 red membrane과 purple membrane을 분리했다.

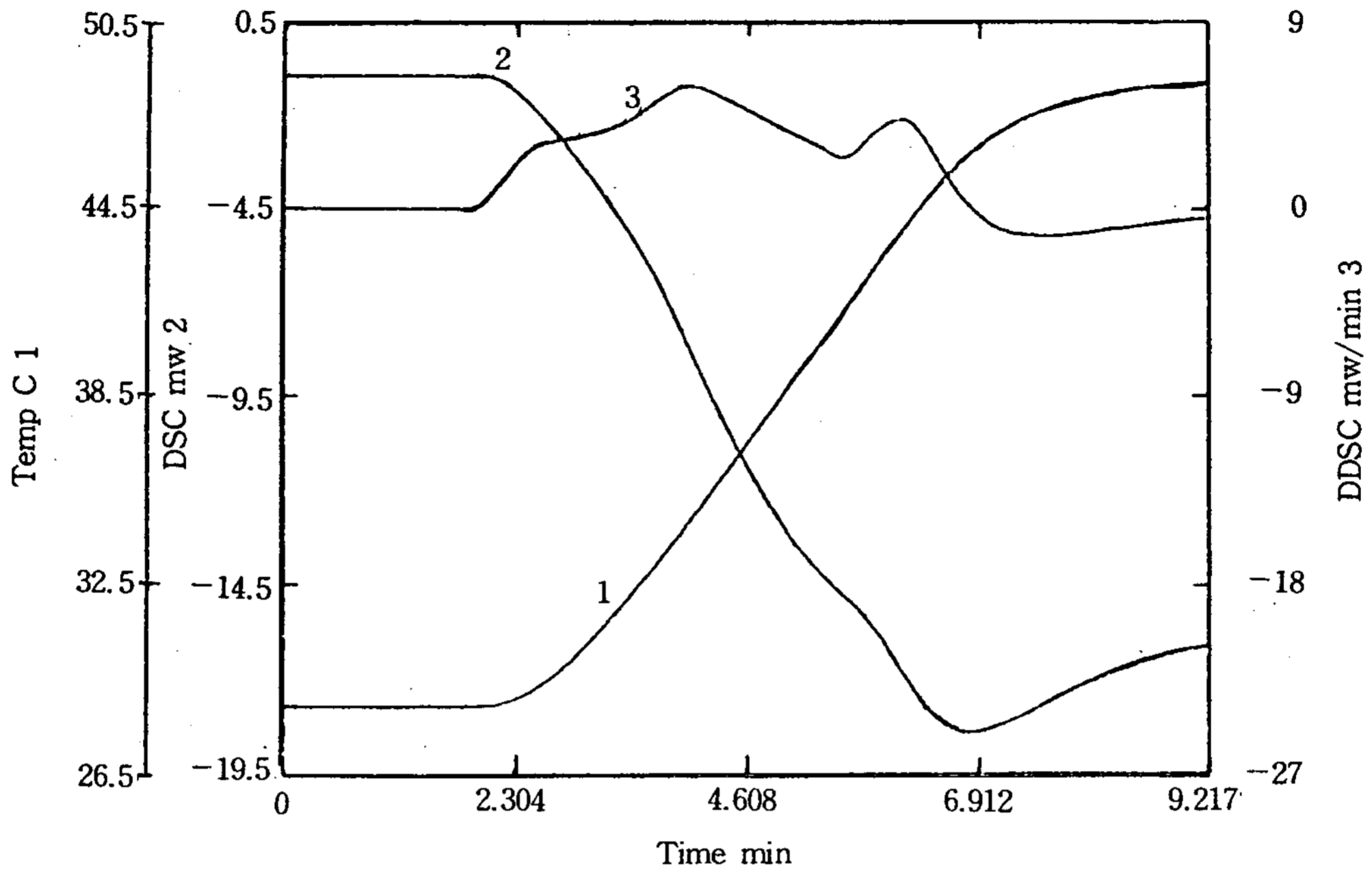
3. PM의 재구성 및 photo-D.S.C thermogram 측정

0.1M tris(hydroxymethyl)methylamine 완충용액에 10mmol L- α -lecithin을 vortex mixer로 혼합 교반한 후 3분간 초음파 처리하여 vesicle을 만들고, 이 vesicle에 진한 PM용액을 가한 후 얼음중탕에서 초음파 재처리하여 InPM을 만들었다. MB의 stock solution은 1mM 수용액으로 제조하여 차광하에서 냉

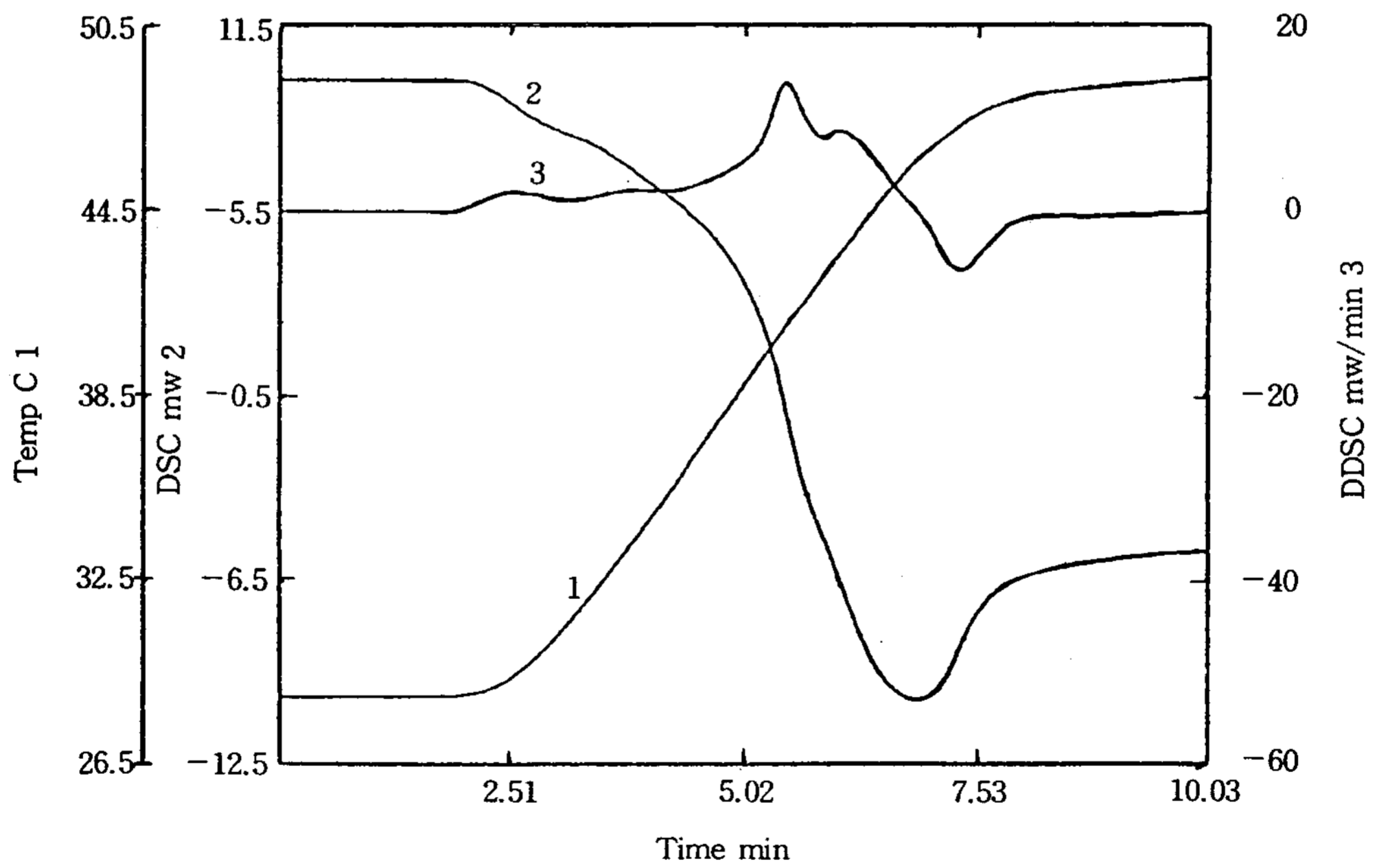
장 보관했다. Photo-D.S.C thermogram의 측정은 무광인 조건에서는 광섭유를 따라 나오는 중심파장이 436nm인 Xe lamp의 빛(10mW/cm²)을 1시간 이상 차광시킨 후에 thermogram을 측정했고, 유광인 조건의 실험은 시료 cell에 30분 동안 빛을 조사시킨 다음, 계속하여 빛을 조사시키면서 thermogram을 관측하였다. 그리고 D.S.C thermogram을 측정할 때에, PM이 재구성된 InPM의 경우에는 sample cell에 InPM 수용액을 넣고 reference cell에 InPM과 같은 양의 vesicle 수용액을 취하여 측정하였으며, InPM이 포함되지 않은 경우에는 reference cell에 알루미늄 pan만을 사용했다. 모든 D.S.C. thermogram 중의 기호1(TEMP C)은 sample chamber의 섭씨온도 변화를 나타내며, 기호2(DSC mw)는 differential scanning calorimeter(D.S.C)의 thermogram을 나타낸다. 기호3(DDSC mw/min)은 시간에 따른 D.S.C의 변화율을 나타낸 것이다.

III. 결과 및 고찰

인지질에 재구성시킨 PM vesicle(InPM)을 $1.29 \times 10^{-5}\text{M}$ MB 수용액에 첨가할 때의 spectrum변화를 Fig. 1에 나타냈다. 이것은 MB분자의 회합체 형성에 InPM이 적당한 쌓임자리를 제공하여 주기 때문이다. Xe-lamp로부터 중심파장이 436nm인 interference filter를 거쳐 광섭유를 통해 나온 강도가 10mW/cm²인 빛의 조사 유·무에 따라 인지질 vesicle의 photochemical reaction differential scanning calorimeter(photo-D.S.C)의 thermogram을 Fig. 2에 나타냈다. 이때 빛의 조사 유·무에 상관없이 인지질의 주성분인 dipalmitoyl phosphatidyl choline의 상전이 온도 구간인 37~41°C로 나타났다. Fig. 3은 PM만의 D.S.C. thermogram이다. PM내에 존재하는 proteolipid에 의해서 인지질 vesicle의 경우보다 조금 낮은 온도 구간에서(36~40°C) 상전이가 나타난 것으로 생각된다. 인지질로 재구성된 PM vesicle(InPM)의 D.S.C. thermogram은 시료셀에 InPM을 그리고 기준셀에 인지질만의 vesicle을 넣고 측정했다(Fig. 4). 이 때에는 비교적 높은 온도 구간에서 상전이가 나타났으며, 빛의 조사 유·무에 무관하게 흡열적인 상전이가 나타났다. 또한 빛을 조사하

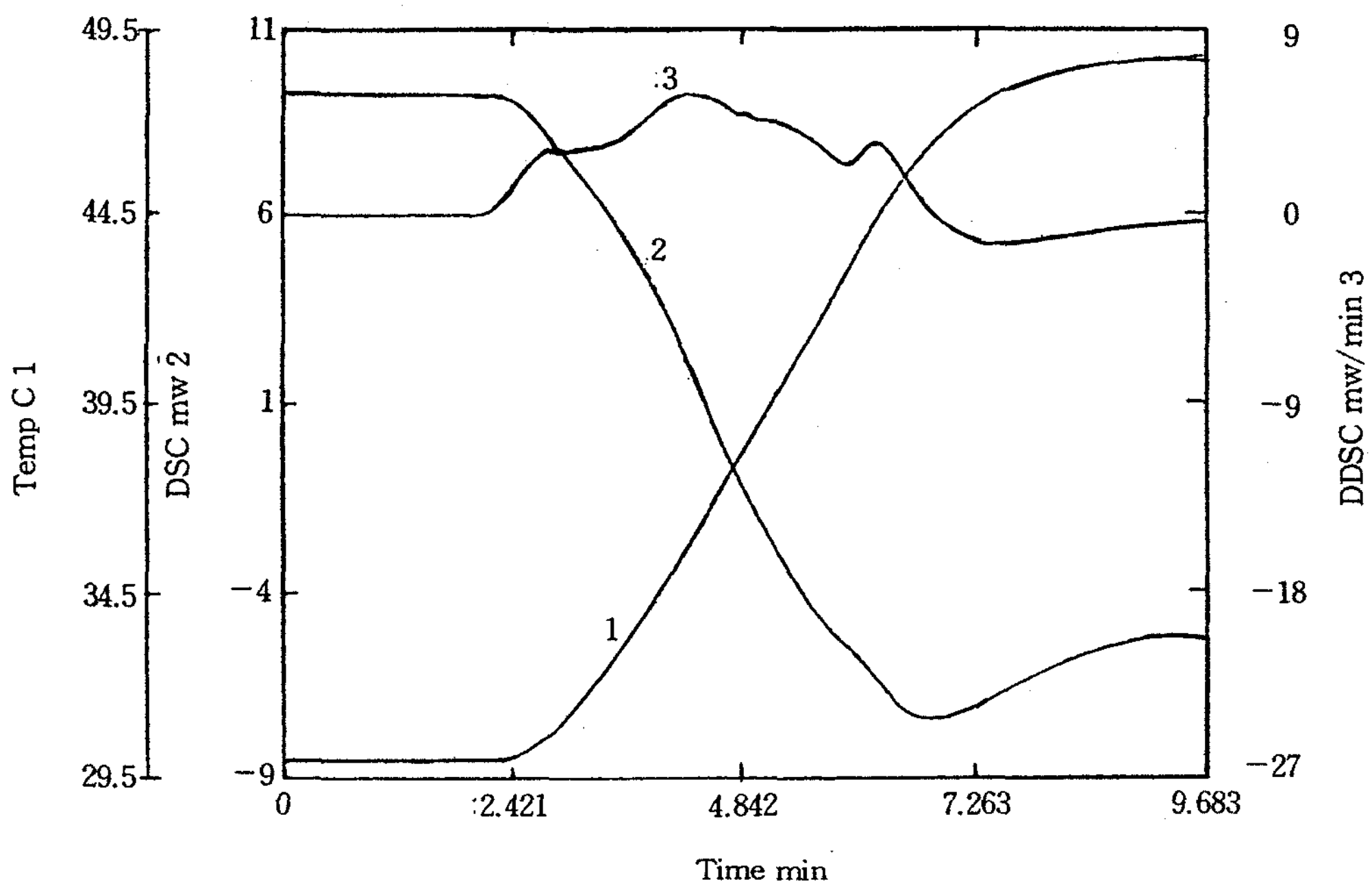


a)

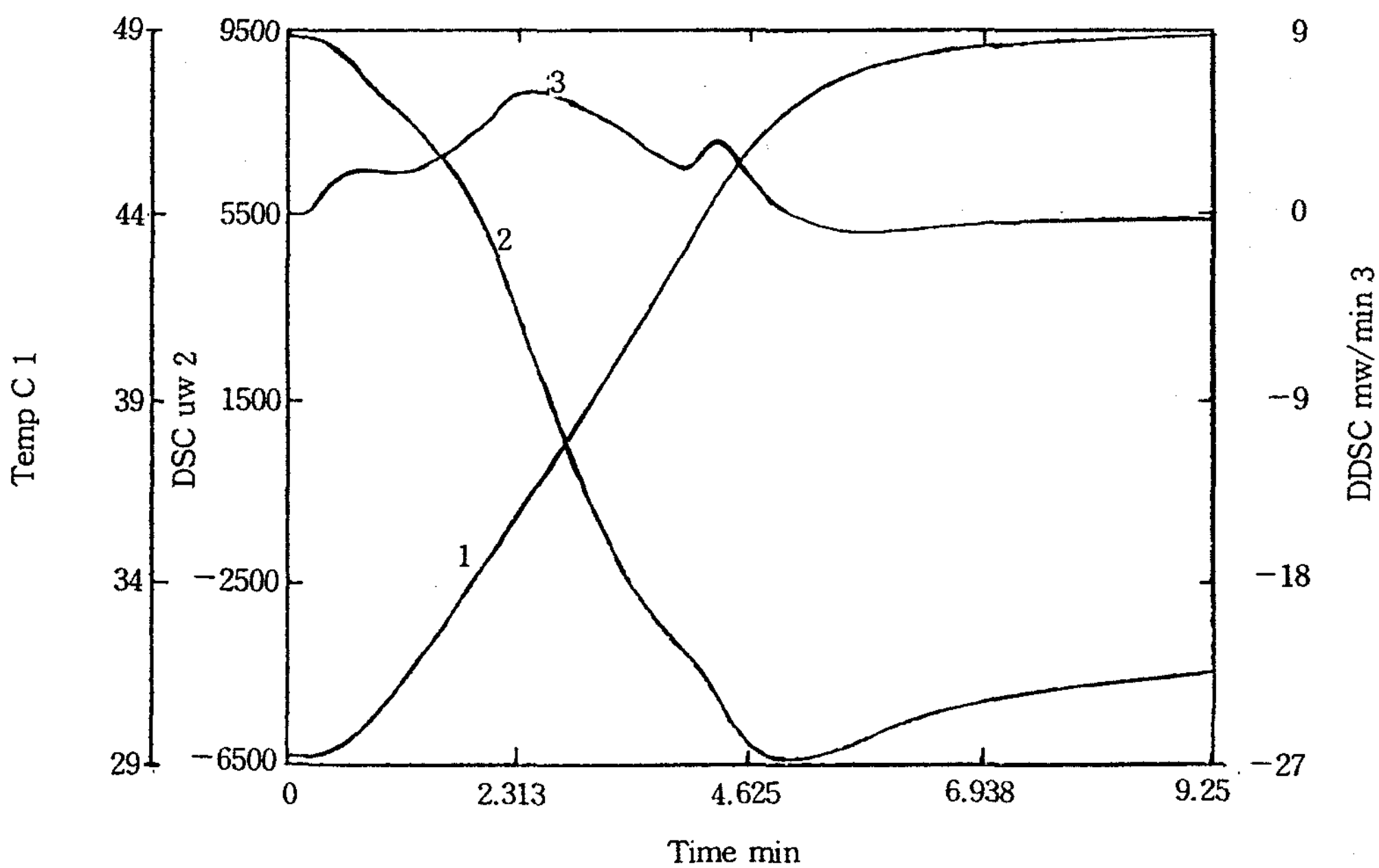


b)

Fig. 2. D.S.C. thermograms of L- α -lecithin vesicle : a) : unillumination of light, b) : steady illumination of light(436nm), [lipid]= 6.27×10^{-4} M : vesicle=32.5mg, reference=A1 pan.

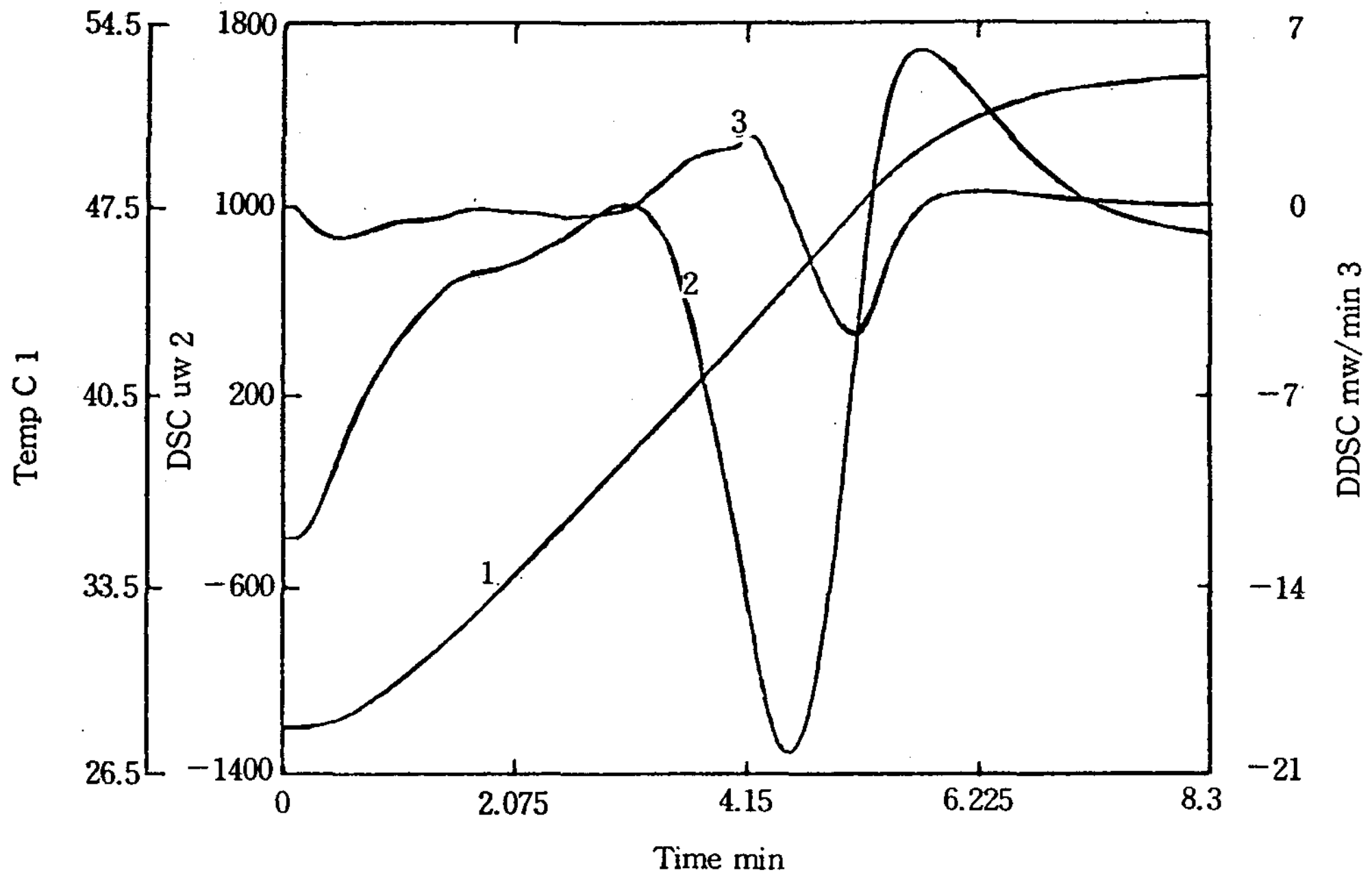


a)

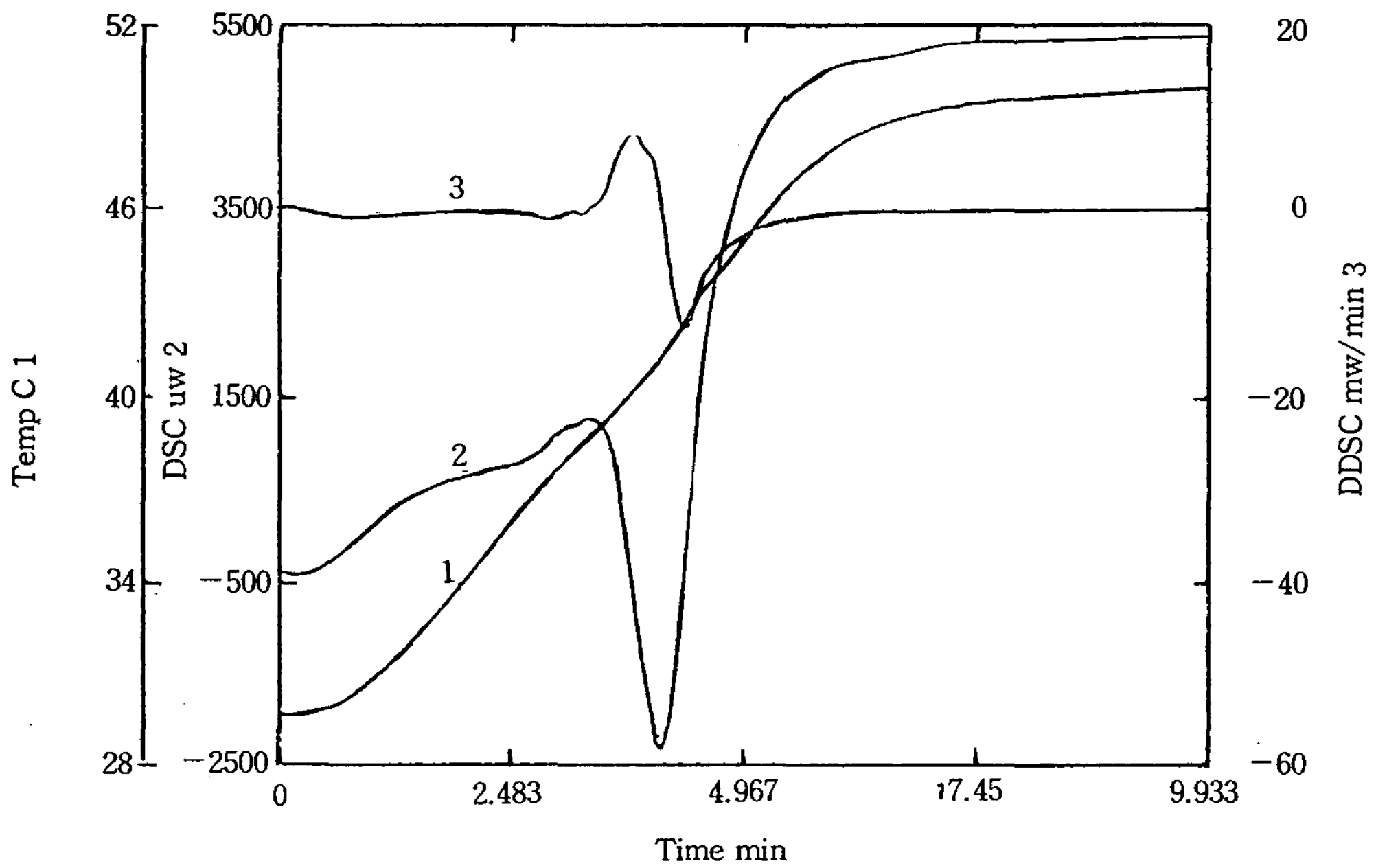


b)

Fig. 3. D.S.C. thermogram of PM : a) : unillumination of light(436 nm), [PM]= 1×10^{-5} M : PM=24. 1mg, reference=Al pan.

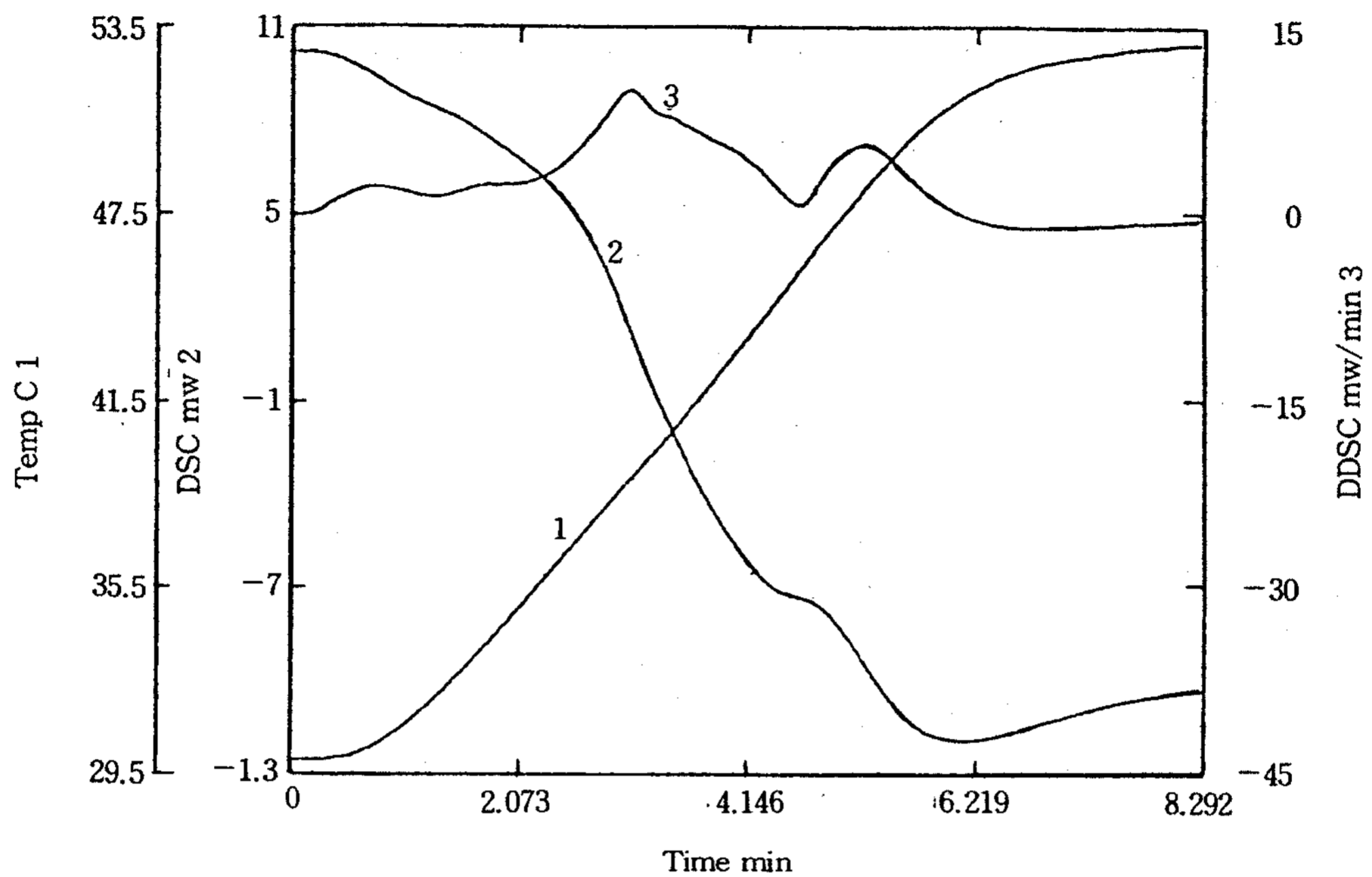


a)

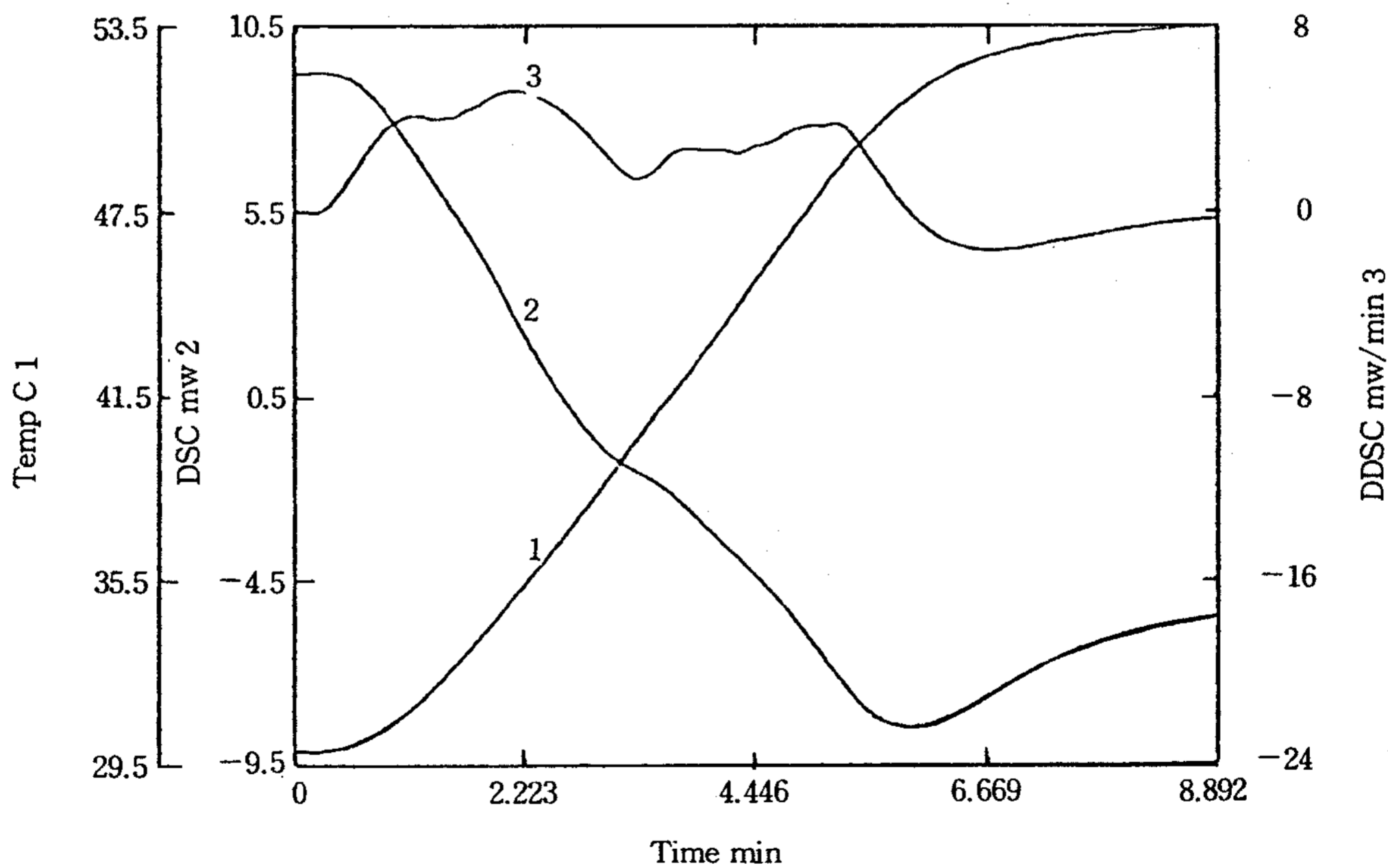


b)

Fig. 4. D.S.C. thermogram of InPM vesicle : a) : unillumination of light, b) : steady illumination of light(436 nm), $[InPM] = 6.27 \times 10^{-4} M$: PM=24.7mg, reference=vesicle 24.0mg.

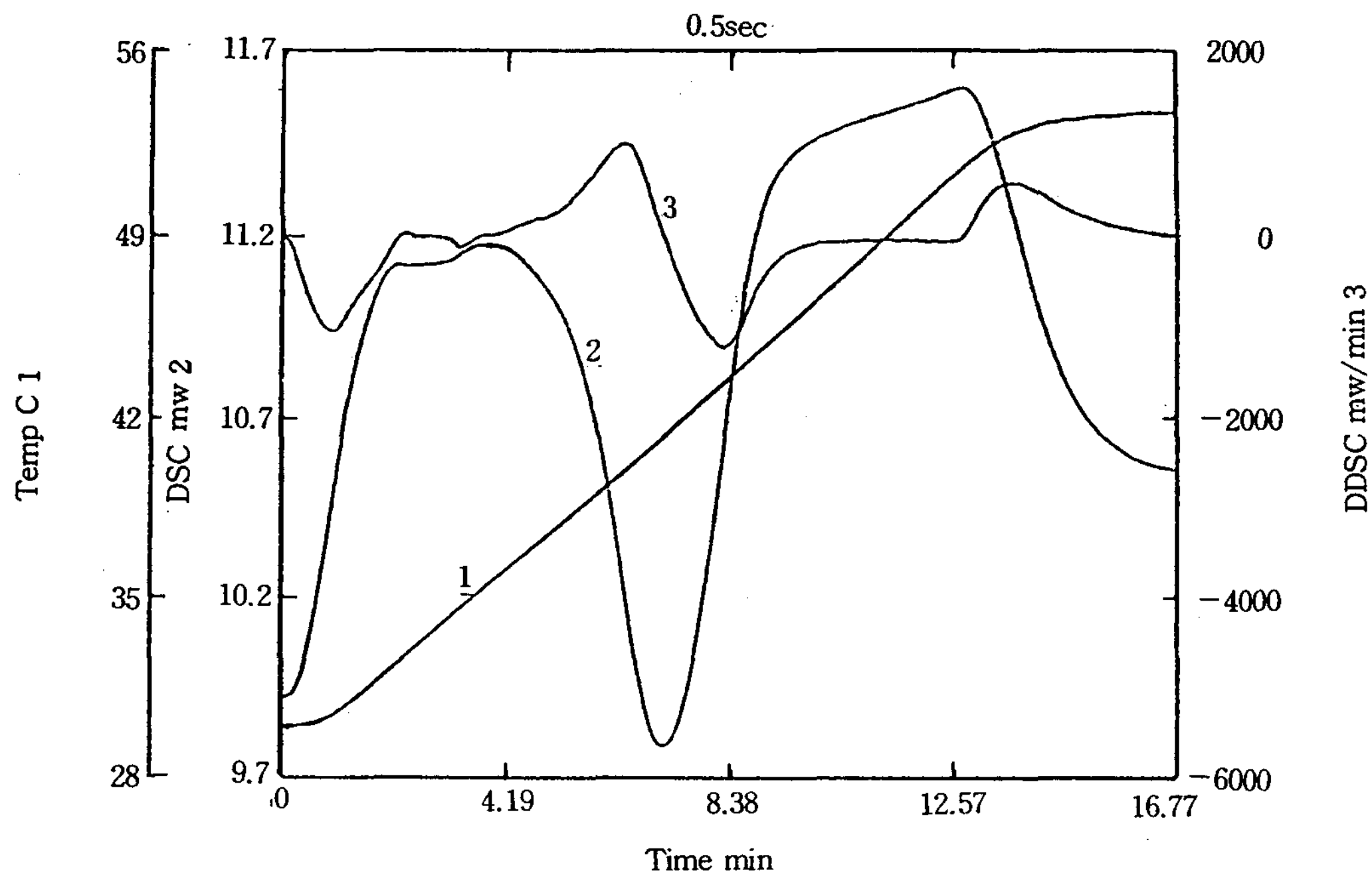


a)

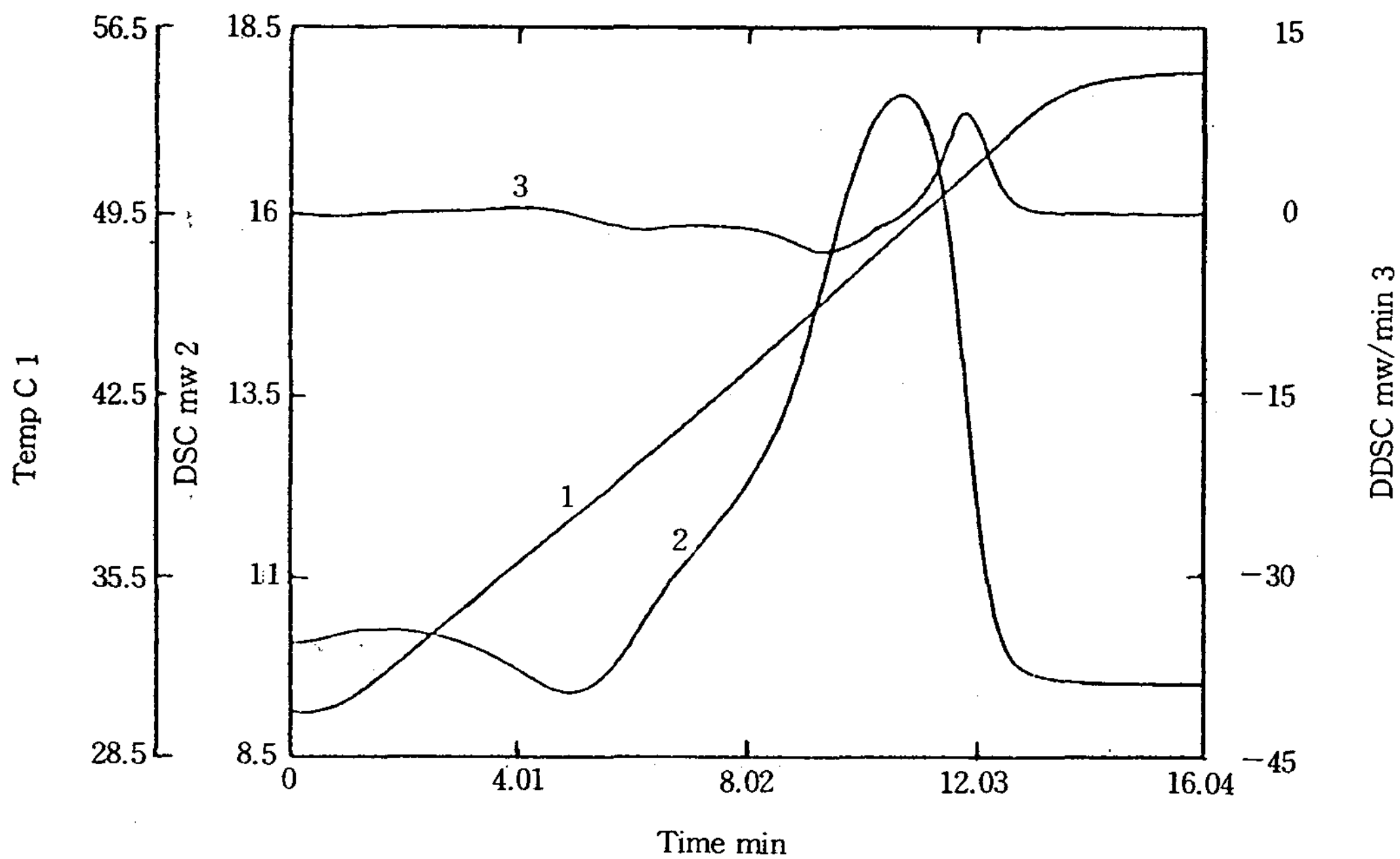


b)

Fig. 5. D.S.C. thermogram of L- α -lecithin vesicle with MB : a) : unillumination of light, b) : steady illumination of light(436nm), [lipid]= 6.72×10^{-4} M, [MB]= 3.79×10^{-4} M : (MB+lipid)=33.6mg, reference=Al pan.



a)



b)

Fig. 6. D. S. C. thermogram of MB-InPM vesicle : a) : unillumination of light, b) : steady illumination of light(436nm), $[MB]=3.79 \times 10^{-5}M$, $[lipid]=6.27 \times 10^{-4}M$, $[PM]=1.81 \times 10^{-6}M$; (MB+InPM)=32.4mg, reference=vesicle 33.0mg.

지 않았을 때와(Fig. 4(a)) 빛을 조사할 때(Fig. 4(b))를 비교하면, 빛을 조사하는 경우에 조금 낮은 40°C 근처에서 상전이가 관측되었다. 이것은 PM이 최대흡수파장(500nm)보다 짧은 파장인 436nm 빛을 흡수하여 광순환회로를 돌 때에,⁸⁾ 이중층막에 재구성된 PM내의 protonated schiff base에서 proton이 이탈되고, 이로 인해 PM분자내의 amino acid와 retinal의 결합 형태가 바뀌게 되어, InPM vesicle 중의 PM과 인지질사슬과의 hydrophobic interaction도 조금 감소되는 것으로 생각된다. MB와 lecithin vesicle의 혼합물의 D.S.C. thermogram에서는(Fig. 5) 빛의 조사 유·무에 상관없이 38~40°C 근처에서 상전이가 관측되었다. 이것은 lecithin만의 vesicle에서와 같이, vesicle표면에 있는 MB가 흡수한 빛에너지는 vesicle의 구조에 큰 영향을 끼치지 못하는 것으로 생각된다. Fig. 6은 L- α -lecithin으로 재구성된 InPM vesicle수용액에 MB가 첨가되었을 때의 D.S.C. thermogram이다. 50분 이상 빛을 차광시켰을 때에는 Fig. 4(a)의 InPM만의 thermogram과 같이 41~42°C 구간에서 강한 흡열적 상전이가 관측되었으나, 연속적으로 빛을 조사시켰을 때에는 높은 온도구간인 46~48°C 부근에서 강한 발열적인 상전이 현상이 관측되었다. 이것은 InBR vesicle의 경우와 매우 다른 현상이다. MB는 감광제로 자주 사용되나,⁹⁾ 형광성은 없는 색소이다. Cyanine dye나¹⁰⁾ hemithioindigo 유도체들은¹¹⁾ 합성 이중층막에서 형광을 나타낸다. 이 경우에 이중층막이 액정상에 도달되면 형광강도가 급격히 감소하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 유기색소분자들은 이중층막의 표면에서 회합하는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 만약 색소가 소수성사슬을 가진 경우에는 색소의 사슬부분이 이중층막의 소수성 부분에 파고 들며, 또한 상전이 전·후에 있어서 이중층막의 fluidity와 색소분자의 형광 편극도에 민감한 영향을 준다. 그러나 본 실험의 결과 무광인 조건에서 InPM vesicle에서 MB가 감광제 기능을 가지거나, hemithioindigo유도체와 같이¹¹⁾ 이중층막이 액정상일 때 열적인 탈색화 기능과 열적인 cis-trans 광이성질화 기능을 가진다고 규정할 수 없다. 그렇지만 InPM 계에 MB가 존재할 때, 연속적인 빛의 조사에 의해 비교적 높은 온도에서 발열적 상전이가 발생된 것은 vesicle 표면에서의 hydrophilic effect와 막내부의

hydrophobic force가 증가된 것으로 생각된다. 즉 MB-InPM vesicle 시스템에서 MB가 외부의 빛을 흡수하여 PM에 에너지를 전달한다. 이때 PM에 전달된 빛에너지는 lipid 이중층막의 소수성 상호작용을 증가시켜 이중층막의 상전이 온도를 높여주며, 전달되어 축적된 에너지는 발열적 상전이를 유발시키는 것으로 본다. 보다 세부적인 광학적인 메커니즘을 위해 더 많은 연구가 요구된다.

III. 결 론

L- α -lecithin과 인지질로 재구성된 purple membrane vesicle(InPM)의 각각의 수용액에 methylene blue(MB)의 photochemical reaction differential scanning calorimetry를 25°C에서 55°C까지 측정했다. 인지질 vesicle, purple membrane(PM), 그리고 MB-인지질 vesicle에서는 빛의 유무에 무관하게 39~43°C 범위에서 상전이가 나타났으나, InPM의 경우에는 흡열적 상전이가 나타났다. MB-InPM vesicle에서는, 무광인 조건 아래서는 흡열적 상전이가 40~42°C 범위에서 나타났고, 유광인 조건에서는 발열적 상전이가 48~52°C 범위에서 나타났다. 이것은 MB가 흡수한 빛에너지가 PM으로 전달되어 인지질 acyl기의 소수성을 증가시키고, 재분배에 의해 축적된 에너지 때문에 높은 온도 범위에서 발열적 상전이가 나타나는 것으로 사료된다.

문 헌

1. I. L. Arbeloa and K. K. Rohatgi Mukerjee, *Spectrochimica Acta*, 44A, 423(1981).
2. R. E. Ballard and C. H. Park, *J. Chem. Soc.*, (A), 1340(1970).
3. V. Vitagliano and L. Constantino, *Boll. Soc. Natur. Napoli*, 78, 169(1969).
4. H. Lee and H. S. Lee, *J. Kor. Chem. Soc.*, 35(6), 612(1991).
5. H. Lee, H. O. Pae, C. O. Lim and H. S. Lee, *J. Kor. Chem. Soc.*, 36(4), 504(1992).
6. B. K. K. Fung and L. Stryer, *Pro. Natl. Acad. Sci., USA* 77(5), 2500(1980).

7. M. Seigneuret and J. L. Rigaud, *FEBS Lett.*, **188**(1), 102(1985).
8. N. R. S. Reddy, R. Picorel and G. J. Small, *J. Phys. Chem.*, **96**, 6458(1992).
9. T. H. paik and Y. G. Lee, *J. Kor. Oil Chem. Soc.*, **4**(2), 25(1987).
10. N. Nakashima and T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4261(1982).
11. T. Seki, T. Tamaki, T. Yamaguchi and K. Ichimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**, 657 (1992).
12. A. V. Sharov, A. V. Pakulev, S. A. Chekalin and Y. A. Matveetz, *B. B. A.*, **808**, 13~23 (1985).