

## 단백질 알부민 수용액의 광대역 초음파 스펙트로스코피

## — Wide-Band Ultrasonic Spectroscopy in Albumin Aqueous Solution —

한서대학교 방사선학과·대구대학교 물리학과\*

김정구·배종림\*

## — 국문초록 —

알부민 수용액(pH 7)에 대한 초음파 흡수 메커니즘을 규명하기 위해 주파수 0.2~1,000 MHz에 걸쳐 흡수특성측정을 하였다. 관측된 단백질 알부민 수용액의 흡수스펙트럼은 David-Cole함수의 거울상으로 가정한 완화시간의 분포함수와 일치하였다. 이 분포함수는 BSA분자의 수화평형에 의한 것이고 수화평형에 의해 넓은 주파수영역에 걸쳐 완화현상이 일어난다.

**중심 단어:** 단백질 알부민, 초음파 흡수, 수화평형, 완화현상

## I. 서 론

진단과 치료 등에 초음파가 광범위하게 이용되고 있어, 초음파와 생체조직과의 상호작용에 대한 초음파 흡수메카니즘을 규명하기 위해 많은 연구가 행해지고 있다. 특히 소 혈청 알부민(Bovine Serum Albumin: BSA)은 대표적인 단백질의 하나이다. 따라서 단백질 용액의 초음파 흡수메카니즘을 규명하기 위하여 알부민에 대한 연구가 많이 행하여지고 있다<sup>1-5)</sup>. Kessler와 Dunn<sup>2)</sup>은 펄스법을 사용하여 20°C, pH 2.3~11.8에 대해 주파수 1~50 MHz의 BSA 수용액의 초음파 흡수측정을 행하여 pH 4.3과 pH 10에서 최대 흡수치를 관측하였다. pH 4.3의 피크는 helix-coil 전이에 의한 것으로 해석하였지만 pH 10에 대해서는 만족할 정도의 해석은 없었다. Zana와 Lang<sup>6)</sup>은 25°C, 2.8 MHz에서 펄스법으로 BSA와 여러 가지의 단백질에 대해 pH 변화에 따른 초음파 흡수측정을 행하

여 흡수의 최대가 되는 pH(pHM)은 모든 단백질에 대하여 거의 같았고 pHM에서 초음파 흡수의 원인을 프로톤전이에 의한 것으로 해석하였다. 또 Barnes et al<sup>4,5)</sup>은 구형 공명법을 이용하여 20°C, 0.2~1 MHz의 BSA 흡수측정을 행하여 pH 3.2에서 0.4 MHz, pH 11.6에서 3 MHz 부근에 프로톤 전이에 의한 초음파 완화현상을 관측하였다. 이와 같이 산성 측과 알카리 측에 대한 초음파 완화현상의 연구는 많이 행하여지고 있지만 pH 7에 대한 초음파 완화에 대한 해석은 거의 없는 실정이다. 그 이유의 하나로 흡수스펙트럼이 단순한 단일완화로 표현되지 않고 굉장히 넓은 주파수영역에 걸쳐 변화하기 때문에 하나의 측정법으로 넓은 주파수영역의 흡수측정이 어렵기 때문이다. Kessler와 Dunn<sup>2)</sup>은 완화시간의 분포로부터 pH 7의 초음파 흡수의 원인으로 용매와 용질의 상호작용에 의한 것이라고 제안했다. 또 O'Brien과 Dunn<sup>7)</sup>, Schneider et al<sup>8)</sup>들은 헤모그로빈용액에 대한 측정에서 넓은 주파수 영역에 걸쳐 완화시간이 분포하고 있음을 역시 관측하였다. 이들도 초음파 완화 메커니즘을 용매와 용질의 상호작용에 의한 것이라고 제시했다. 반면에 Cho et al<sup>9)</sup>은 단백질 분자들의 체적변화에 의한 것이라고 암시했다. pH 7의 단백질 용액의 초음파 측정에서 가장 큰 어려움은 완화시간분포가 넓은 주파수영역에 걸쳐 분포하고 있다는

\* 이 논문은 2007년 4월 4일 접수되어 2007년 6월 8일 채택 됨.  
책임저자: 김정구, (702-722) 충남 서산시 해미면 대곡리 360  
한서대학교 방사선학과  
TEL: 041-660-1055, FAX: 041-660-1058  
E-mail: jkkim@hanseo.ac.kr

것이다. 이전의 초음파 측정은 실험상의 어려움 때문에 1~100 MHz가 가장 넓은 주파수 영역이었다. 따라서 보다 넓은 주파수 영역에 대한 정밀한 초음파 흡수측정이 요구되고 있다.

본 연구는 0.2~1,000 MHz의 주파수 영역에서 BSA 용액의 pH 7에서 초음파 흡수측정을 행하여 그 흡수 메카니즘을 규명하는 것이다. 관측된 pH 7의 흡수스펙트럼은 David-Cole 함수의 거울상으로 가정한 완화시간의 분포 함수와 일치하였다. 이 분포함수는 BSA분자의 수화평형에 의한 것이고 수화평형에 의해 완화현상이 일어난다. 수화평형은 단일 완화시간으로 나타나지 않고 연속적인 완화시간으로 분포하고 있어 넓은 주파수영역에 걸쳐 완화현상을 가진다.

## II. 실험방법

실험에 사용한 BSA는 결정화되고, 동결 건조한 순도 99% 이상이며(Sigma Chemical Co. A7638), BSA 수용액의 농도는 50 mg/ml이다. 시료는 실험 하루 전에 만들어 4℃의 냉장고에 보존하였으며, 용해 시 pH는 7이었고 실험할 때 진공펌프로 기포를 제거하였다. 측정온도는 20℃이고 측정방법은 광회절 초음파 공명법(0.2~10 MHz), Bragg반사법(12~100 MHz), 고분해능 Bragg반사법(120~1,000 MHz), 펄스법(3 MHz의 음속)이다. 실험에서 가장 중요한 실험장치는 데이터가 빈약한 저주파수 영역 특히 1 MHz 이하에서 흡수측정이 가능한 광회절 초음파 공명법이다. 광 회절 공명법은 이미 기술되어 졌다<sup>10)</sup>. 공명기는 수정진동자와 오목반사판으로 구성되어 있으며, 수정진동자에 연속파를 보내면서 공명기 내에 정상파를 만든다. 이 정상파의 파면에 평행하게 광을 입사시키면 Raman-Nath 회절이 일어나고 회절광은 광 헤테로다인법을 사용하여 음파신호를 검출한다. 광원은 He-Ne 레이저(15 mW)를 사용했다. 공명 스펙트럼을 얻기 위해서 0.01 Hz까지 분해 가능한 함수발생기의 주파수를 변화시킴과 동시에 수신기로부터 나온 신호를 오실로스코프에 저장한다.

## III. 결과 및 논의

### 1. 흡수스펙트럼의 해석

그림 1은 pH 7의 흡수측정의 결과를 나타내고 있다. 아

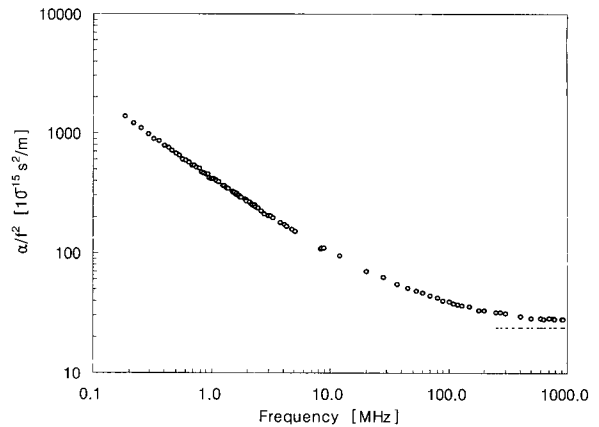
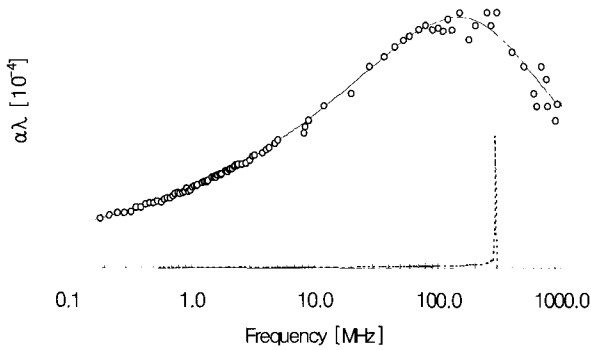


Fig. 1. Ultrasonic absorption  $\alpha/f^2$  versus frequency in the bovine serum albumin solution with the concentration of 50 g/l at pH 7 and 20°C. The dashed line represents the absorption in water  $\alpha/f^2 = 24.0 \times 10^{-15} \text{ s}^2/\text{m}$

주 넓은 주파수영역에 걸쳐  $\alpha/f^2$ 는 변화하고 있고 100 kHz 이하에서도 완화현상은 계속되고 있지만 1,000 MHz 부근에서는 거의 포화치( $(\alpha/f^2)_\infty = 27 \times 10^{-15} \text{ s}^2/\text{m}$ )에 도달하고 있다. 점선은 물의 흡수치( $25 \times 10^{-15} \text{ s}^2/\text{m}$ )를 나타내고 1,000 MHz 부근의 포화치는 물의 흡수치와 거의 같고 완화과정이 없음을 알 수 있다. 넓은 주파수영역에 걸친  $\alpha/f^2$ 의 변화는 완화시간의 분포를 나타낸다. 완화과정만을 논의하기 위해서는 실험치에서 극한값( $(\alpha/f^2)_\infty$ )을 빼어 하고 극한값( $(\alpha/f^2)_\infty$ )을 빼어  $\alpha\lambda$ 로 나타낸 것이 그림 2이다. 수백MHz 이상에서 데이터의 흠어짐은 차를 취했기 때문에 오차가 확대해 보이는 것이다. 그림 2의 특징은 약 100 MHz에 피크가 있고 저주파수영역으로 길게 뻗어 있는 것이다. 이 스펙트럼을 단일완화로 해석하는 것이 불가능하기 때문에 다중완화 혹은 완화시간분포로 생각하여야 한다. 그러나 다중완화로 해석하기에는 적어도 3중 이상의 완화로 가정할 필요가 있지만 파라메타가 너무 많아 그다지 의미가 없다. 그래서 완화시간의 분포를 생각한다. Davidson-Cole형 분포는 어떤 특성완화시간  $\tau_0$  보다도 빠른 주파수영역 즉, 고주파수 쪽으로 분포함수를 갖는다. 그러나 그림 2는 오히려 특성완화시간  $\tau_0$  보다도 느린 저주파수영역 즉, 저주파수 쪽으로 분포함수를 갖는다. 그래서 다음과 같은 복소 체적탄성률에 대한 분포함수를 생각한다<sup>11)</sup>.

$$K^*(i\omega\tau_0) = K_0 + (K_\infty - K_0) \int_0^\infty \frac{g(\tau/\tau_0)i\omega\tau}{1 + i\omega\tau} d\left(\frac{\tau}{\tau_0}\right) \dots\dots\dots (1)$$



**Fig. 2.** Relaxational absorption per wavelength( $\alpha\lambda$ ) versus frequency in the bovine serum albumin solution at pH 7. The absorption at the high-frequency limit was subtracted from the raw data. The solid line represents the fitted curve of Eq.(3) with  $\tau_0=5.5\times 10^{-10}$  s,  $\beta=0.29$ , and  $K_\infty-K_0=5.03\times 10^6$  N/m<sup>2</sup>. The dashed curve indicates the distribution function  $g$  of relaxation frequencies with the vertical scale being arbitrary

여기서

$$g\left(\frac{\tau}{\tau_0}\right)d\left(\frac{\tau}{\tau_0}\right) = -\frac{\sin\beta\pi}{\pi}\left(\frac{1}{(\tau/\tau_0)-1}\right)^\beta d\ln\left(\frac{\tau}{\tau_0}\right),$$

for  $1 < \tau/\tau_0 < \infty = 0$ , for  $0 < \tau/\tau_0 < 1$  ..... (2)

여기서  $K^*$ 는 복소 체적 탄성률,  $K_0$ ,  $K$ 는 각각 저주파수, 고주파수 극한치이다. 그림 3의 (a)는 통상의 Davidson-Cole형 분포함수를 나타내고, 그림 3의 (b)는 식 (2)의  $g(\tau/\tau_0)$ 를 나타내고 있다. 그림 3의 (a)와 (b)는  $\tau/\tau_0=1$ 에 대해 서로 거울상의 관계로 되어 있다. 식 (1)의 적분을 해석적으로 풀어 충밀리기 탄성률의 기여를 무시하면

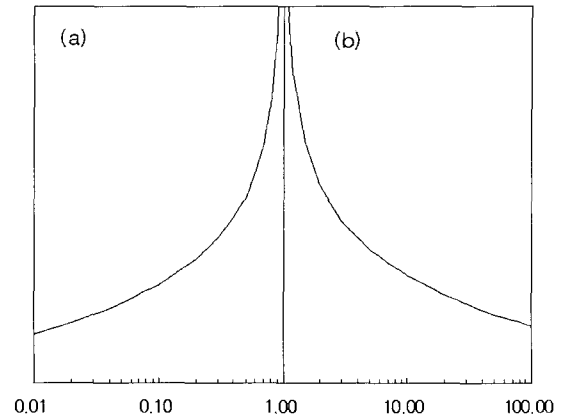
$$\alpha\lambda = \frac{\pi}{K_0}(K_\infty - K_0)(1 + \omega^2\tau_0^2)^{\beta/2}(\omega\tau_0)^\beta \sin\beta\theta$$

..... (3)

$$K' = K_0 + (K_\infty - K_0)(1 + \omega^2\tau_0^2)^{-\beta/2}(\omega\tau_0)^\beta \cos\beta\theta$$

$$\theta = \arctan(1/\omega\tau_0) \text{ ..... (4)}$$

가 된다. 여기서  $K'$ 는 체적탄성률의 실수부분이다.  $\tau_0$ 와  $K_\infty-K_0$ 은 각각  $\alpha\lambda$ 피크의 위치와 높이를,  $\beta$ 는 저주파수영역의 기울기를 나타낸다. 그림 2의 실선은 식 (3)에서  $\tau_0=5.5\times 10^{-10}$  s,  $\beta=0.29$ 일 때의 피팅으로 실험치와 잘 일치하고 있다. 또  $\alpha\lambda$ 의 절대치에서  $K_\infty-K_0=5.03\times 10^6$  N/m<sup>2</sup>



**Fig. 3.** Distribution function of relaxation time by Davidson-Cole(a), and that by the present authors(b). Distribution functions of (a) and (b) are  $\frac{\sin\beta\pi}{\pi}\left(\frac{x}{1-x}\right)^\beta$  and  $\frac{\sin\beta\pi}{\pi}\left(\frac{1}{x-1}\right)^\beta$ , respectively. Here  $\beta=0.29$

가 얻어졌다. 그림 2의 점선은 완화주파수의 분포함수  $g$ 를 나타내고 수직축은 임의이다. 그림 4는 그림 2의 fitting에서 결정된 파라메타를 사용하여 식 (4)로부터 계산한 체적탄성률의 실수부분을 규격화한 분산곡선이다. 음속 분산량( $V_\infty-V_0$ )은 흡수치에서 1.7 m/s로 평가되어 졌다. 이것은 3 MHz와 1,000 MHz의 음속 차 2 m/s와 대체로 일치하고 있다.

## 2. 완화현상의 메카니즘

Schneider et al<sup>8)</sup>는 헤모그로빈 용액의 초음파 측정에서 그림 2와 아주 유사한 흡수 스펙트럼을 얻었다. 그리고 그들은 4단계의 완화과정으로 스펙트럼을 설명하기에 충분하다고 제시하였다. 그러나 완화 메카니즘은 각각의 단계마다 다른 메카니즘으로 설명하였다. pH 7에서 예상할 수 있는 완화 메카니즘은 히스티딘 잔기의 이미다졸 그룹의 프로톤 전이(예상되는 pK = 6.5-7.0), 단백질분자들의 구조적 변동, 수화작용(용질과 용매의 상호작용) 등이다. 이미다졸 그룹의 프로톤 전이에 의한 완화는 헤모글로빈 용액에서 pH 7 부근에 작은 피크가 관측되었다<sup>7)</sup>. 그러나 BSA 용액에서는 이러한 피크가 관측되지 않았다<sup>6)</sup>. 그리고 BSA용액의 히스티딘 잔기 함유량은 헤모그로빈의 5분의 1 정도이다<sup>12)</sup>. 고분자의 내부운동과 같은 구조적 변동에 의한 완화는 넓은 주파수영역에 걸쳐 흡수스펙트럼이 나타내지 않고 단일 혹은 이중완화현상을 보인다<sup>13)</sup>. 이리하여 완화시간이 넓게 분포하는 것은 가장 유력한 완

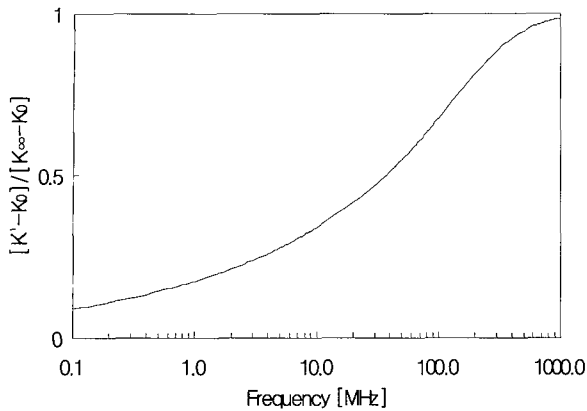


Fig. 4. The dispersion curve of the real part of bulk modulus calculated from Eq. (4) with  $\tau_0 = 5.5 \times 10^{-10}$  s and  $\beta = 0.29$ . The limiting velocity difference,  $V_\infty - V_0$ , evaluated is 1.7 m/s for the present solution

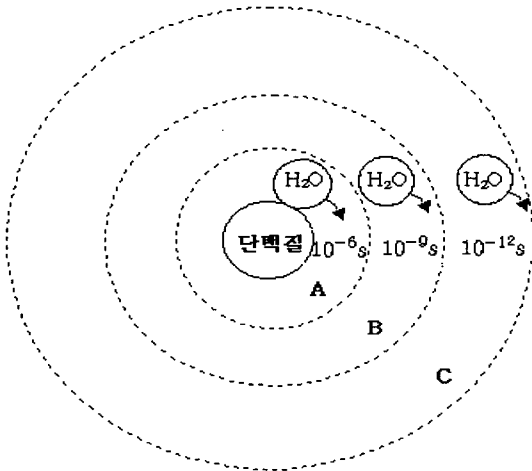


Fig. 5. The degrees of hydration of bovine serum albumin molecules

화 메카니즘이 음파에 의해 수화평형의 혼란을 야기하는 것을 암시한다. 단백질의 경우 수화량(결합수)은 0.2~0.5 g/protein이다<sup>14)</sup>. BSA의 경우는 1개의 분자에 2,000~3,000의 결합수가 존재한다. 그림 5에 나타난 것과 같이 단백질의 수화수에는 단백질과 직접 강하게 결합되어 있는 A층과 약간 자유로운 B층, 그리고 자유로운 물분자 C층이 존재함을 NMR 연구로부터 알려져 있다<sup>15)</sup>. 실제로는 A층과 B층의 중간적인 수화층도 존재할 것이므로 물분자 층들은 그림 5와 같이 구분되어 있지 않고 연속적으로 분포하고 있다. 그리고 물 분자들은 그들의 위치를 다른 층으로 서로서로 교환한다. 이러한 수화평형에 의해 완화현

상이 일어난다. A층에 있는 물분자의 체재시간은  $\sim 10^{-6}$  초이고 순수한 물분자(C층)의  $10^{-12}$ 초이므로 체재시간은  $10^{-6} \sim 10^{-9}$ 로 분포하고 있다<sup>16,17)</sup>. 이것은 그림 3(b)의 시간 분포와 거의 일치하고 있다. A층보다도 B층의 분자수가 훨씬 많이 분포되어 있기 때문에 고주파수 일수록 완화강도가 커지는 것은 당연하다. 이와 같이 단백질과 물분자와의 수화가 완화의 원인이라고 생각하면 정성적이지만 실험결과를 잘 설명할 수 있다.

#### IV. 결 론

넓은 주파수영역에 걸쳐 초음파 흡수측정을 행하는 것은 고분자용액에서 일어나는 완화현상을 이해하기 위해서는 필수적이다. 그리하여 우리는 0.2~1,000 MHz의 넓은 주파수 영역에 걸쳐 pH 7의 BSA수용액에 대한 초음파 흡수측정을 행하였다. 그 결과 BSA 수용액(pH 7)의 흡수 스펙트럼은 저주파수영역으로 분포함수를 갖고, 완화 메카니즘을 단백질과 물분자와의 수화평형에 의한 것으로 해석하였다.

#### 참 고 문 헌

1. S. Nishikawa, T. Ohno, and H. Huang : Ultrasonic absorption in aqueous solutions of amino acids at neutral pH, J. Acoust. Soc. Am., 113, 2884-2888, 2003
2. L. W. Kessler and F. Dunn : Ultrasonic investigation of the conformational changes of bovine serum albumin in aqueous solution, J. Phys. Chem., 73, 4256-4263, 1969
3. J. Lang, C. Tondre, and R. Zana : Effect of urea and other organic substances on the ultrasonic absorption of protein solutions, J. Phys. Chem., 75, 374-379, 1971
4. C. Barnes, J. A. Evans, and T. J. Lewis : Ultrasonic absorption of bovine serum albumin solutions in the frequency range 200 kHz-1 MHz, J. Acoust. Soc. Am., 78, 6-11, 1985
5. C. Barnes, J. A. Evans, and T. J. Lewis : Ultrasonic absorption of bovine serum albumin

- solutions in the frequency range 60 kHz–160 kHz, *J. Acoust. Soc. Am.*, 80, 1291–1296, 1986
6. R. Zana and J. Lang: Effect of pH on the ultrasonic absorption of aqueous solutions of proteins, *J. Phys. Chem.*, 74, 2734–2736, 1970
  7. W. D. O'Brien, Jr. and F. Dunn: Ultrasonic absorption mechanism in aqueous solutions of bovine hemoglobin, *Phys. Chem.*, 76, 528–533, 1969
  8. F. Schneider, F. Muller–Landau, and A. Mayer: Acoustical properties of aqueous solutions of oxygenated and deoxygenated hemoglobin, *Biopolymers*, 8, 537–544, 1969
  9. K. C. Cho, W. P. Leung, H. Y. Mok, and C. L. Choy: Ultrasonic absorption in myoglobin and other globular proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, 830, 36–44, 1985
  10. Jong–Rim Bae and Myung–Ha Lee: High-Q ultrasonic resonator using optical diffraction for liquids *J. Kor. Phys. Soc.*, 29, 40–43, 1996
  11. R. Piccirelli and T. A. Litovitz: ultrasonic shear and compressional relaxation in liquid glycerol, *J. Acoust. Soc. Am.*, 29, 1009–1020, 1957
  12. F. W. Kremkau: Biomolecular absorption of ultrasound. III. Solvent interactions, *J. Acoust. Soc. Am.*, 83, 2410–2415, 1988
  13. S. Kato, N. Yamauchi, H. Nomura, and Y. Miyahara: Ultrasonic relaxation study of aqueous solutions of poly(acrylic acid), *Macromolecules*, 18, 1496–1504, 1985
  14. I. D. Kuntz and W. Kauzmann: Hydration of proteins and polypeptides, *Adv. Protein Chem.*, 28, 239–345, 1974
  15. T. S. Lioutas, I. C. Baianu, and M. P. Steinberg: Oxygen-17 and deuterium nuclear magnetic resonance studies of lysozyme hydration, *Arch. Biochem. Biophys.*, 247, 68–75, 1986
  16. G. Held, F. Noack, V. Pollack, and B. Melton: Protonenspinrelaxation und Wasserbeweglichkeit in Muskelgewebe, *Z. Naturforsch.*, 28c, 59–62, 1973
  17. S. H. Koenig and W. E. Schillinger: Nuclear magnetic relaxation dispersion in protein solutions, *J. Biol. Chem.*, 244, 3283–3289, 1969

• Abstract

## Wide-Band Ultrasonic Spectroscopy in Albumin Aqueous Solution

Jeong-Koo Kim · <sup>1)</sup>Jong-Rim Bae

*Dept. of Radiological Science, Hanseo University*

<sup>1)</sup>*Dept. of Physics, Daegu University*

Ultrasonic absorption spectrum in bovine serum albumin aqueous solutions have been measured at 20°C over the broad frequency range 0.2~1,000 MHz at pH 7. The absorption spectrum observed at neutral pH was successfully analyzed with the distribution of relaxation time assuming a mirror-image curve of the Davidson–Cole function. This distribution function suggests that hydration of BSA molecules is responsible for the absorption.

**Key Words:** BSA, Ultrasonic absorption, Relaxation time, Hydration