

펩티드-물 상호작용. 1-페닐-2-아세트아미도 3-부탄온의 용해도에 대한 압력과 온도의 영향

李仁子 · 姜相旭 · 申斗濬 · 金 健†

고려대학교 이과대학 화학과

(1982. 8. 16 접수)

Peptide-Water Interaction. Effects of Pressure and Temperature on the Solubility of 1-Phenyl-2-acetamido-3-butanone

In-Ja Lee, Sang-Wook Kang, Doo-Soon Shin and Keon Kim†

Department of Chemistry, Korea University Seoul 132, Korea

(Received Aug. 16, 1982)

요 약. 수용액 속에서 1-페닐-2-아세트아미도-3-부탄온의 용해도를 20, 30, 40°C에서 또 1kg/cm²에서 4500kg/cm²까지의 압력에서 측정하였다. 압력이 커질수록 용해도는 감소한다. 이러한 용해도 변화는 디케토피페라진과 아주 비슷하다. 디케토피페라진이 펩타이드 결합의 모델 화합물이라는 점과 1-페닐-2-아세트아미도-3-부탄온이 한개의 펩타이드 결합과 상당히 큰 소수성 작용기를 가졌다는 점을 고려할 때 이와 같은 용해도 변화는 예상 밖이다. 부피 변화와 열용량 변화에 대한 값은 이상하다고 할 정도는 아니었다.

ABSTRACT. The solubilities of 1-phenyl-2-actamido-3-butanone were measured in H₂O at 20, 30 and 40°C at pressure from 1 to 4500 kg/cm². Pressure going up to 4500 kg/cm², the solubility in H₂O decreases consistantly as that of diketopiperazine does. As diketopiperazine is a model compound of peptide bond and 1-phenyl-2-actamido-3-butanone has only one peptide bond and a pretty large hydrophobic group, the solubility behaviour is quite surprising. Volume change and heat capacity change data are reasonable.

1. 서 론

소수성 작용과 펩티드 결합의 수소 결합이 단백질의 3차 구조에 가장 크게 영향을 미친다. 이중에서도 소수성 작용이 주로 영향을 미치고 펩티드 결합의 수소 결합은 소수성 작용에 비하면 그 영향이 상당히 작다는데 대부분의 학자들이 그 견해를 같이 하고 있다¹. 따라서 열이나 화학물질에 의한 단백질의 변성은 이 소수성 작용만으로 설명하고 있으며 대부분의 경우 잘 설명되고 있다.

그러나 압력에 의한 단백질의 변성은 이 소수성 작용만으로 설명하는 데는 많은 어려움이 있다. 간단한 지방족 화합물이나² 방향족 화합물³을 소

수성작용의 모델로 하여 얻은 열역학적 자료와 압력에 의한 단백질 변성과는 다음과 같은 두가지 점에서 차이가 있다. 첫째로 압력에 의한 단백질 변성의 경우 부피 변화가 너무나 작다는 점이다. 이것에 대한 설명으로는 단백질 변성때 소수성 작용기의 일부만 물에 드러난다는 주장과 지방족 소수성 작용기에 의한 부피 변화와 방향족 작용기에 의한 부피 변화의 부호가 반대라는 주장이 있다^{4,5}. 특히 후자의 경우 아세트페논을 모델 화합물로 한 연구로 보아서 어느 정도 타당성이 있는 것 같다³. 둘째로 모델 화합물의 자료에 의하면 지방족이나 방향족 모두 다 2000~3000기압에서 물에 대한 최대 용해도를 가진다. 이것은 단백질이 5000기압 이상에서 변

성이 일어난다는 점을 도저히 설명할 수가 없다. 즉 압력에 의한 단백질 변성은 소수성 작용만으로는 설명할 수가 없다.

한편으로 펩티드의 수소 결합이 압력에 의하여 어떻게 영향을 받는가를 알기 위해서 diketo-piperazine(이하 DKP라고 약한다.)을 수소 결합의 모델화합물로 사용하여 그 용해도를 측정하는 연구가 있었다⁶. 그러나 이 수소 결합만으로 압력에 의한 단백질의 변성을 알아내는 데는 미흡할 수 밖에 없었다.

따라서 본 연구자는 펩티드 결합과 소수성 작용기를 동시에 가지고 있는 1-phenyl-2-acetamido-3-butanone(이하 PAB라고 약한다.)를 모델 화합물로 하여 여러 압력에서 그 용해도를 측정함으로써 압력에 의한 단백질 변성의 기초 자료를 제공하고자 한다.

2. 실험

PAB는 Borum⁷의 방법으로 합성하여 Xylene으로 두 번 재결정하였다.

압력장치. 압력 발생 장치는 Harwood Engineering Co. 제품으로 조립하였다. (최대압력: 12,000kg/cm²) 압력 측정은 manganin선의 저항이 압력에 정비례함을 이용하여 측정하였고 압력의 검정은 25°C에서 Benzene의 고체-액체 상변화를 실험한 Osugi Jiro⁸의 실험값을 사용하였다.

광학측정 볼 및 석영 셀. 흡광도가 크기 때문에 자체에서 제작한 1mm 석영 셀을 사용하였고, 측정 볼은 다이얼형으로 자체 제작한 것이다³.

온도조절. 온도 조절은 자체 제작한 수조에 순환 펌프를 달아서 수조의 물이 측정 볼에 띄워진 황동 자켓을 통과하게 함으로써 조절하였다. 온도 조절 후 2시간 정도면 볼 내부의 온도와 수조의 온도에 차이가 없었기 때문에 볼 내부의 온도를 수조의 온도로 대치해서 읽었다. 수조의 온도 조절은 ±0.02°C 정도이다.

용해도 측정. PAB가 280nm에서 카르보닐기의 흡수가 있음을 이용해서 흡광도 측정으로 용해도를 구했다. 증량법으로 구한 것과 큰 차이

가 없다는 것은 이미 밝혀졌다⁹. 280 nm에서 몰 흡광계수는 95.1±0.1M⁻¹cm⁻¹⁹이다. 흡광도 측정은 자체에서 개조한 Beckmann DU-2를 사용하였다.

3. 결 과

흡광도 및 용해도. 280nm에서 측정된 흡광도가 Table 1에 있다.

용액이 압력때문에 수축되는 효과를 고려하여 흡광도로부터 용해도를 구하였다. 용액의 압력에 따른 밀도의 변화를 모르기 때문에 흔히 사용하는 방법대로 용매 즉 물의 밀도로 대신하여 고려하였다. 물의 밀도는 Kell과 Whalley¹⁰의 자료와, Grindley와 Lind¹¹의 자료를 이용하였다². 구한 용해도로부터 열역학적 성질을 계산하기 위해서는 용해도의 자연대수(즉 ln s)를 함수꼴로 나타내는 것이 좋다.

함수꼴은 온도에 대해서는 $a + \frac{b}{T} + c \ln T + dT + eT^2$ 의 꼴로, 압력에 대해서는 $A + BP + CP^2 + DP^3 + EP^4$ 꼴로 표시하는 것이 좋기 때문에² $\ln S = (A_1 + A_2P + A_3P^2 + A_4P^3 + A_5P^4) + (A_6 + A_7P + A_8P^2 + A_9P^3 + A_{10}P^4) \frac{1}{T} + (A_{11} + A_{12}P + A_{13}P^2 + A_{14}P^3 + A_{15}P^4) \ln T + (A_{16} + A_{17}P + A_{18}P^2 + A_{19}P^3 + A_{20}P^4) T + (A_{21} + A_{22}P + A_{23}P^2 + A_{24}P^3 + A_{25}P^4) T^2$ 로 표시하여 최소자승법으로 computer를 사용하여 각 계수를 구하였다.

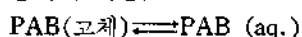
이렇게 구한 계수로부터 계산한 용해도가 Table 2에 있다. 실험값과 계산값의 일치율을 보기 위해서 20°C, 30°C, 40°C에서 압력에 따른 용해도를 그린 것이 Fig. 1~3에 있다. 그림에서 I는 실험값의 범위를 나타내며, 0는 계산값이다. 계산값이 실험값을 대표하고 있는 것을 알 수가 있다. Fig. 4는 20°C, 30°C,에서 계산값에 대한 그림이다.

용액화 과정에서의 열역학적 성질의 계산. 다음과 같은 과정에서의 열역학적 자료를 계산하는 데는 수용액에서의 PAB 용해도가 활동도와 같다는 가정을 전제한다. 이와 같은 가정은 PAB 농도가 작다는 점에서 그다지 나쁜 것은 아니다. 또 하나는 고체상태 PAB의 활동도가 1이라는 가정인데 이것 역시 그다지 문제점이 없다.

Table 1. Absorbance of 1-phenyl-2-acetamido-3-butanone.

Pressure (kg/cm ²)	Temperature (°C)					
	20		30		40	
1	0.557	0.643	0.839	0.741	1.163	
	0.554	0.606	0.840	0.746	1.095	
	0.653		0.704	0.715	1.075	
500	0.490	0.489	0.525	0.628	0.919	
	0.583	0.588	0.526	0.575	0.892	
			0.587			
1000	0.465	0.470	0.461	0.460	0.725	0.684
	0.495	0.484	0.521	0.522	0.672	0.673
					0.695	
1500	0.396	0.377	0.397	0.435	0.537	0.556
	0.390	0.371	0.397	0.429	0.558	0.560
	0.421		0.410	0.408	0.557	
2000	0.329	0.338	0.352	0.390	0.436	0.459
	0.339		0.353	0.379	0.473	0.469
			0.346	0.345	0.458	
2500	0.322	0.286	0.327	0.329	0.372	0.388
	0.324	0.287	0.330	0.311	0.411	0.414
	0.320	0.320	0.337	0.333	0.390	
3000	0.279	0.280	0.306	0.307	0.322	0.367
	0.283	0.277	0.302	0.308	0.366	0.373
	0.312	0.309				
3500	0.278	0.282	0.304	0.305	0.273	0.315
	0.257	0.256	0.290	0.278	0.350	0.349
					0.310	
4000	0.280	0.227	0.297	0.292	0.322	0.325
	0.280	0.237	0.259	0.258	0.290	0.290
	0.267	0.260				
4500	0.273	0.272	0.279	0.243	0.323	0.318
	0.239	0.234	0.245	0.247		

응액화 과정.



평형상수 = PAB(aq.)의 활동도

PAB(고체)의 활동도

= PAB(aq.)의 활동도

= PAB(aq.)의 용해도 = S

따라서 자유에너지 변화 $\Delta G = -RT \ln S$ 이다. 여기에서 용해도는 Kauzmann¹에 의해서 제기된

마대로 물분율로 표시하였다.

부피 변화, $\Delta V = (\partial \Delta G / \partial P)_T$ 에서 ΔV 를 계산할 수 있다. 이렇게 계산한 ΔV 가 Table 3과 Fig. 5에 있다. 이것을 보면 온도가 증가할수록 ΔV 가 커짐을 알 수 있다. 20°C일 때 ΔV 가 1000 kg/cm²에서 최대값을, 4000 kg/cm²에서 최소값을 보이는 것은 실제라기 보다는 용해도를 함수 꼴로 나타냈기 때문에 나타난 것이라고도 볼 수

Table 2. Solubility of 1-phenyl-2-acetamido-3-butanone in H₂O ($\times 10^{-3}$ mole fraction).

Pressure (kg/cm ²)	Temperature(°C)		
	20	30	40
1	1.16	1.37	2.22
500	1.01	1.13	1.66
1000	0.864	0.941	1.29
1500	0.739	0.798	1.04
2000	0.646	0.694	0.874
2500	0.581	0.620	0.756
3000	0.539	0.569	0.674
3500	0.512	0.536	0.621
4000	0.495	0.514	0.591
4500	0.475	0.499	0.585

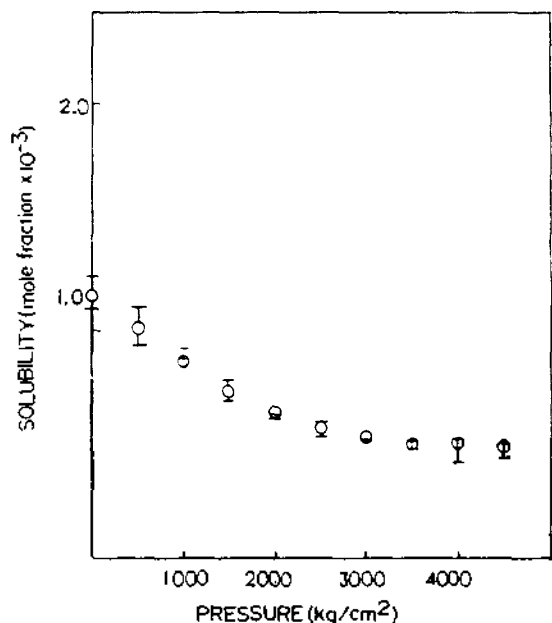


Fig. 1. Solubility of PAB in water (at 20°C).

있으며, 그 자체는 큰 의미는 없는 것 같다.

40°C일때 높은 압력에서 음수가 되는 것은 Suzuki⁶ 등의 결과와도 일치하는 것으로 흥미있는 점이다.

엔탈피 변화 및 엔트로피 변화. 엔탈피 변화 ($=\Delta H$)는 $\Delta H = \partial(\Delta G/T) / \partial \frac{1}{T} = RT^2(\partial \ln S / \partial T)_P$ 로 계산하였다. 계산된 ΔH 를 Table 4와 Fig. 6에 나타내었다.

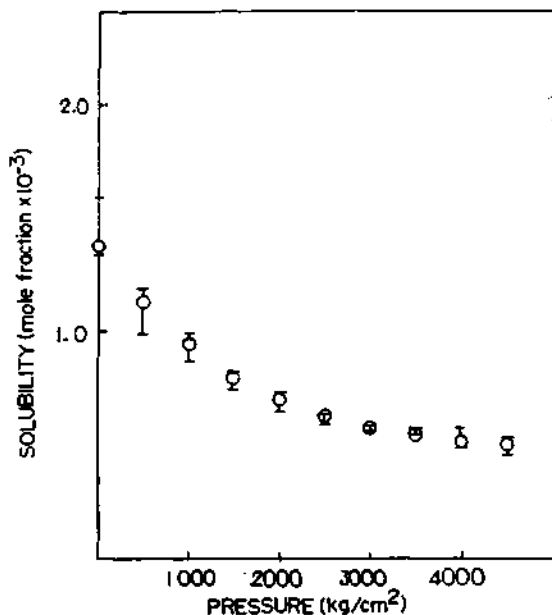


Fig. 2. Solubility of PAB in water (at 30°C).

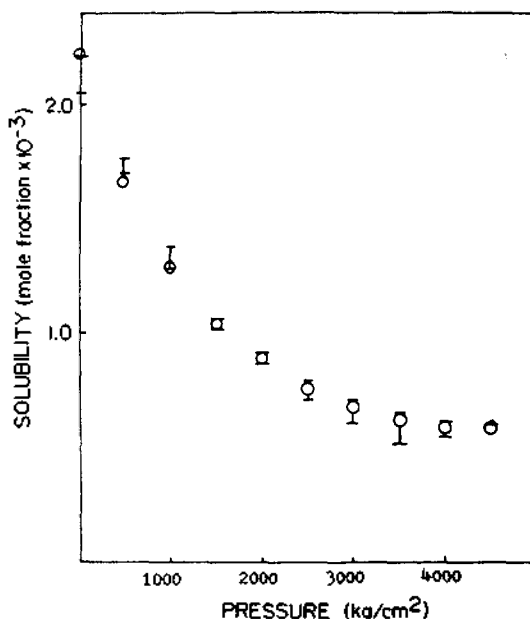


Fig. 3. Solubility of PAB in water (at 40°C).

엔트로피 변화는 $\Delta S = -(\partial \Delta G / \partial T)_P$ 로 계산하였고, Table 5와 Fig. 7에 나타내었다. Fig. 6과 Fig. 7을 비교하면 서로 아주 비슷한 것을 관찰할 수 있다. 즉 엔탈피-엔트로피 상쇄 현상이

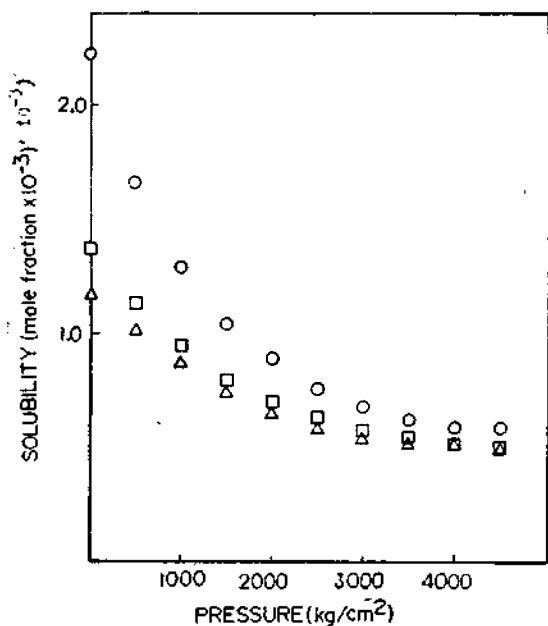


Fig. 4. Solubility of PAB in water. Δ : 20°C, \square : 30°C, \circ : 40°C.

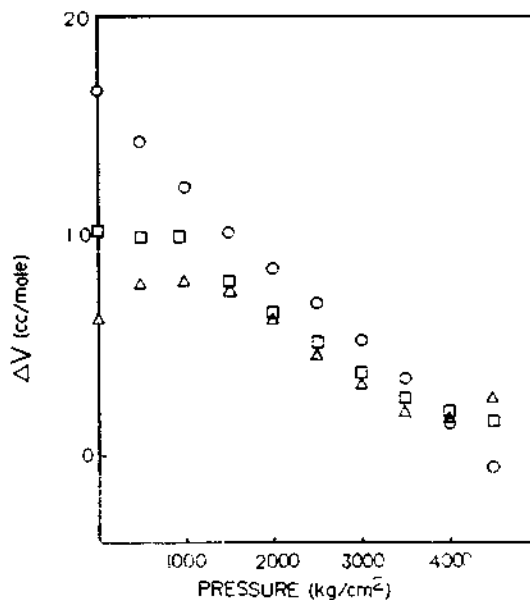


Fig. 5. Volume change in water solution. Δ : 20°C, \square : 30°C, \circ : 40°C.

Table 3. Volume change in water solution(cc/mole).

Pressure (kg/cm ²)	Temperature(C)		
	20	30	40
1	6.11	10.2	16.7
500	7.69	9.89	14.3
1000	7.98	9.04	12.2
1500	7.55	7.85	10.3
2000	6.04	6.48	8.59
2500	4.50	5.05	6.91
3000	3.03	3.69	5.23
3500	1.98	2.55	3.48
4000	1.69	1.75	1.59
4500	2.50	1.44	-0.518

다른 모델 화합물^{2,3}들과 마찬가지로 존재함을 알 수 있다.

열용량 변화. 열용량 변화는 $\Delta C_P = (\partial \Delta H / \partial T)_P$ 로 계산하였다. 구한 ΔC_P 를 Table 6과 Fig. 8에 실었다. 온도에 관계없이 ΔC_P 는 거의 일정하고 또 압력이 증가하면 감소하고 있음을 볼 수 있다.

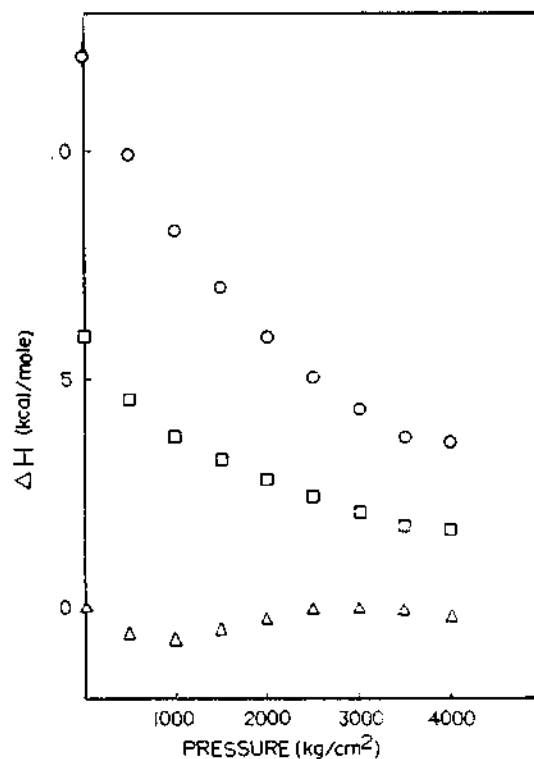


Fig. 6. Enthalpy change in water solution. Δ : 20°C, \square : 30°C, \circ : 40°C.

Table 4. Enthalpy change in water solution (kcal/mole).

Pressure (kg/cm ²)	Temperature(C)		
	20	30	40
1	0.00818	5.97	12.1
500	-0.58	4.58	9.93
1000	-0.65	3.74	8.29
1500	-0.47	3.21	7.02
2000	-0.23	2.81	5.97
2500	-0.0847	2.43	5.06
3000	-0.0584	2.07	4.30
3500	-0.135	1.76	3.78
4000	-0.21	1.64	3.65

Table 5. Entropy change in water solution (cal/mole C).

Pressure (kg/cm ²)	Temperature		
	20	30	40
1	-13.3	6.62	26.6
500	-15.6	1.65	19.0
1000	-16.2	-1.48	13.2
1500	-15.9	-3.57	8.80
2000	-15.4	-5.18	5.08
2500	-15.0	-6.63	1.89
3000	-15.1	-8.00	-0.74
3500	-15.5	-9.13	-2.58
4000	-15.8	-9.61	-3.10

Table 6. Heat capacity change in water solution (kcal/mole C).

Pressure (kg/cm ²)	Temperature		
	20	30	40
1	0.586	0.606	0.626
500	0.508	0.525	0.543
1000	0.432	0.447	0.462
1500	0.362	0.374	0.387
2000	0.299	0.310	0.321
2500	0.247	0.257	0.267
3000	0.207	0.218	0.229
3500	0.184	0.196	0.208
4000	0.179	0.193	0.207
4500	0	0	0

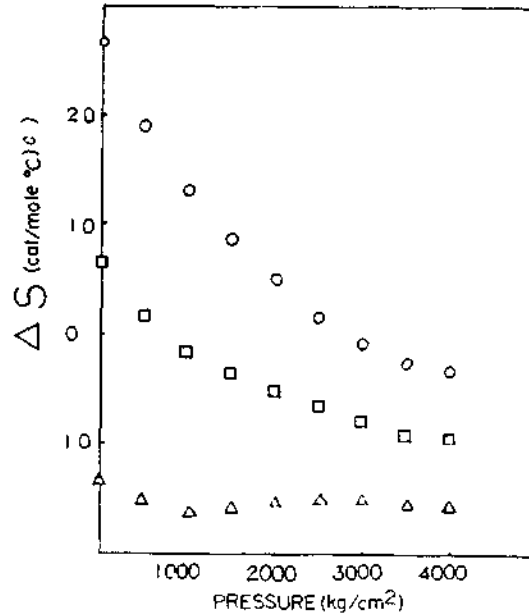


Fig. 7. Entropy change in water solution. Δ : 20°C, \square : 30°C, \circ : 40°C.

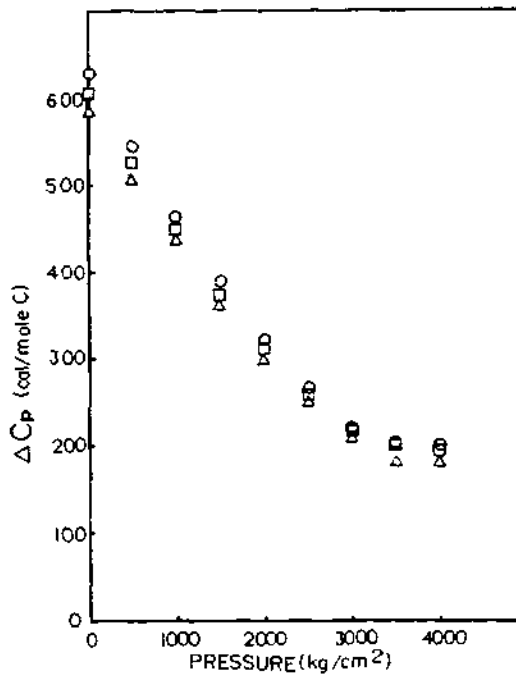


Fig. 8. Heat capacity change in water solution. Δ : 20°C, \square : 30°C, \circ : 40°C.

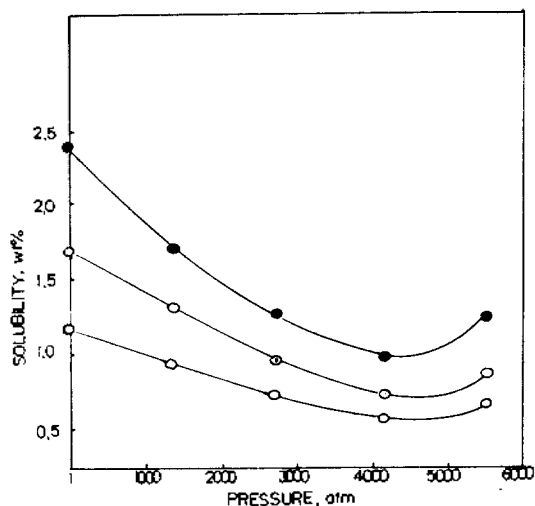


Fig. 9. Solubility of DKP vs. pressure.

4. 논 의

모델 화합물로 사용한 PAB는 한 개의 펩티드 결합과 비교적 큰 소수성 작용기인 벤질기를 가지고 있다. 따라서 이 화합물의 물에서의 행동, 특히 용해도의 압력에 따르는 변화가 소수성 작용을 나타내리라고 예상하였다. 그러나 예상과는 전혀 달리 펩티드 결합에 의한 수소 결합의 모델 화합물인 DKP의 용해도와 아주 비슷한 행동을 보이고 있다. DKP 용해도 그림은 Fig. 9에 실었다⁶. Fig. 4와 Fig. 9를 비교해 보면 서로 아주 흡사하게 압력이 증가함에 따라서 급격히 용해도가 감소하고 또한 용해도에 의한 영향도 비슷하다. 이들과는 달리, 펩티드 결합이 없는 소수성 작용의 모델 화합물인 4-octanone이나 acetophenone의 경우 2000~3000 기압에서 최대 용해도를 가진다.

이처럼 PAB의 물에서의 행동이 특히 압력에 따르는 용해도 변화가 큰 소수성 작용기가 있음에도 불구하고 펩티드 결합에 의하여 좌우된다는 사실은 매우 흥미롭다. 즉 이제까지 소수성 작용만으로 압력에 의한 단백질 변성을 논하려 했던 것에 무리가 있음은 위사실로 보아서 당연한 것 같다.

부피 변화를 보면 DKP의 경우 1 기압에서 약

5cc/mole 정도인데 비해서 PAB의 경우 약 10cc/mole 정도이다. 이것의 차이점은 현재로는 정확하게 설명할 수가 없고(왜냐하면 각 작용기의 ΔV 의 합이 전체 화합물의 ΔV 와 같지 않다는 것은 알려져 있다)². 다만 phenyl기에 의한 ΔV 가 양의 값일지도 모른다는 견해를 좀더 뒷받침하고 있다.

열용량의 변화를 보면 온도에 따라서 그다지 변화가 없고 압력이 커지면 감소하는 현상을 보이고 있다. $\Delta C_p > 0$ 인 것은 화합물 주위에 용매화된 물의 구조가 보통 물의 구조에 비해 좀더 구조화 되어 있기 때문이다. 따라서 압력이 커질 때 ΔC_p 가 감소하고 있는 것은 높은 압력에서 물 자체의 구조가 좀더 구조화되어 있음을 암시하고 있다. 이처럼 높은 압력에서 물이 좀더 구조화된다는 것은 Walrafen¹²에 의한 Raman 스펙트럼 결과와 일치하고 있다.

5. 결 론

높은 압력에서의 단백질의 안전성, 즉 3차 구조를 논함에 있어서 소수성 작용만으로 논할 것이 아니라 펩티드 결합의 영향을 고려해야 할 것이다. 펩티드 결합이 소수성 작용기에 직접 영향을 주는지, 아니면 높은 압력에서 펩티드 결합의 수소 결합이 소수성 작용에 비해서 그 영향이 커지는지는 앞으로 좀더 연구해야 할 문제이다.

인 용 문 헌

1. W. Kauzmann, *Adv. Protein Chemistry*, **14**, 1 (1959).
2. K. Kim, Ph. D. Thesis Princeton University (1979).
3. S. W. Kang, Master Thesis, Korea University (1982).
4. D. D. Kasarda, *Biochim. Biophys. Acta*, **217**, 535 (1970).
5. G. Weber, F. Tanaka, B. Y. Okamoto and H. G. Drickamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 1264 (1974).
6. K. Suzuki, M. Tsuchiya and H. Kadono, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **43**, 3083 (1970).

7. R. H. Wiley and O. H. Borum, *J. Amer. Chem. Soc.*, **244**, 5843 (1969).
8. Osugi Jiro, *Rev. Phys. Chem. Japan*, **38**, 90 (1968).
9. I. J. Lee, T. E. Kim, B. Y. Chung and K. Kim, *고려대학교 이공논집*, **22**, 229 (1981).
10. T. Grindley and J. E. Whalley, *J. Chem. Phys.*, **62**, 3496 (1975).
11. T. Grindley and J. E. Lind, *J. Chem. Phys.*, **54**, 3983 (1971).
12. G. E. Walrafen, "Colloqu. Intl. CNRS No 246 L'eau et les Systemes Biologiques" (A. Alefsen and A. J. Berteaud, eds), P. 223~227, 1976.