

상분리 온도 근처에서 섞임체 단백질-물의 비선형 광학적 특성*

조창호 · 김태균 · 서영석

배재대학교 물리학과

(1997년 5월 30일 받음)

자기유도 타원편광축 회전에 의한 제3차 비선형 광학감수율을 상분리 온도 근처에서 측정하였다. 불순물인 소금의 양의 증가는 상전이 온도를 높이고 글리세롤 양이 증가함으로써 상전이 온도가 감소함을 관측하였다.

I. 서 론

액체-액체 혼합물에서 일어나는 임계현상은 매우 다양하게 연구되어 실험과 이론에서 많은 발전이 있었다.^[1] 특히 상분리 물질이 유전체일 때, 상분리가 일어나는 온도 근처에서 유전체의 광학적 현상에 관해서 많은 연구가 진행되었는데, 이는 유전율 측정^[2] 정전기장 유도 Kerr효과^[3], 빛산란실험^[4] 등을 이용하여 수행되었다. 강력한 전기장이나 자기장이 유전체에 가해지면, 장 유도 비선형 광학 특성은 임계온도 근처에서 비정상적인 변화를 보인다. 이론적으로 액체-액체 혼합물에서 일어나는 상분리 현상은 방울 모델(droplet model)에 의하여 잘 설명될 수 있다.^[5] 비선형 유전체 효과는 가해진 정전기장에 의해서 몇 개의 추가적인 분자 내부 또는 정전기장과 분자들과의 상호작용의 영향 때문인 경우가 많으며 특히 쌍극성 유전체(dipolar dielectrics)에서는 분자들의 재배치에 의한 유전율의 변화가 비선형 유전체 효과의 주된 요인이다.^[2] 분자들의 재배치에 의한 비선형 광학 감수율을 측정하기 위하여 펄스폭이 짧은 정전기장이나 레이저 펄스를 사용하여 유전체에 복굴절을 유도한다. 이러한 유도 복굴절로부터 3차 비선형 광학 감수율을 얻을 수 있다.

단백질-물로 이루어진 두 종류 액체 섞임체의 상분리 연구는 생체 조직에서 일어나는 현상과 매우 유사하여 생체의 역학 구조를 이해하는데 결정적인 단서를 제공하고 있다.^[6] 상분리가 중요한 역할을 하는 경우로 적혈구가 기형으로 형성되어 가는 과정인 겸상 적혈구 병(sickle-cell disease)이 있으며, 또한 포유류 동물 백내장의 진행과정에서 눈의 수정체 세포질이 혼탁하게 되는 현상도 액체-액체 상분리가 일어나는 과정으로 설명할 수 있다.^[7] 수정체는 무게의 65%가 물이고, 35%가 단백질이며 그리고 소량의 소금으로 되어 있다. 투명한 수정체의 단백질은 90%가 결정체라 부르는 수용성 구조를 형성하고 있고, 물리학적으로 아직 알려지지 않는 알부민 노이드라 부르는 수용성이 아닌 단백질이 수 % 들어 있다.^[7] 단일한 수정체 세포속의 혼합물은 유사한 두 종류의 혼합물로 생각할 수 있으며 주성분은 단백질과 물이다. 실험실에서

는 온도를 내리면서 유도되는 'cold' 백내장 실험을 수행하는데, 이 실험을 통해서 포유류 동물의 백내장의 진행 과정과 단백질-물 혼합물에서 혼탁(turbidity)이 나타나는 두 종류 섞임체의 상분리 현상이 서로 같음이 밝혀졌다.^[6] 병리학적인 백내장에서 수정체가 혼탁해짐으로서 눈으로 들어오는 빛을 흡수하거나 산란시킨다. 수정체가 계속적으로 투과된 빛의 세기를 흡수하여 결국 수정체의 색깔을 변화시키고, 빛의 산란으로 수정체를 통과한 빛의 파두를 왜곡시켜서 망막위의 상이 흐려지게 한다. 현재 백내장의 연구로 빛을 산란시키는 요소는 수정체 내의 생리-화학적으로 작용하는 미소 원소들이라 알려졌다. 빛을 산란시키는 이러한 원소들의 형성을 방해하거나, 원상으로 되돌리는 시약을 발견하는 연구가 계속 진행 중이다. 본 연구는 현재 Lysozyme의 공급원으로 되고 있는 가금류 중 우리나라 재래종 오골계의 난백에서 추출한 것을 사용하여 실험하였다.

이 논문은 극성인 단백질과 극성인 소금물의 두 종류 섞임체를 시료로 사용하였으며, 자기 유도 타원 편광축 회전 방법을 사용하여 3차 비선형 광학감수율을 온도의 함수로 하여 측정하였다. 단백질-물 섞임체의 3차 비선형 광학감수율이 상분리 온도 근처에서 비선형적으로 변하여 발산되었고, 불순물을 첨가하여 상분리 온도의 변화를 관측하였다. 불순물인 소금 농도의 증가는 상분리 온도를 높게 되고, 글리세롤의 농도가 증가함에 따라서 상분리 온도가 낮아짐을 관측하였다.

II. 자기유도 타원편광축 회전 (self-induced ellipse rotation : SIER)

강력한 레이저 광을 구형 단백질 Lysozyme에 입사시키면 광학장 유도 비등방성이 유도된다. 이러한 비등방성체의 대칭 강체 대분자는 다음과 같은 Smoluchowski 방정식을 만족한다.^[9]

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \frac{D}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left[\sin \theta \left(\frac{\partial \rho}{\partial \theta} + \frac{1}{k_B T} \frac{\partial V}{\partial \theta} \rho \right) \right] \quad (1)$$

여기에서 $\rho = \rho(\theta, t)$ 는 각분포 함수, t 는 시간, D 는 회전 퍼짐 상수, k_B 는 볼츠만 상수, θ 는 대칭축과 전기장의 방향과 이루는 각이고 V 는 가해진 레이저광에 의한 분자의 퍼텐셜 에너지

*본 논문은 96년도 기초과학연구소 학술연구조성비(BSRI-96-2450)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

지이다. 레이저 광을 입사시킬 때, 맥스웰-볼츠만 평형분포를 가정하여 전기장($E(r, t)$)의 제곱값까지만 근사한 각분포 함수로부터 유도되는 비등방성 분자의 회전에 의한 유도 복굴절 Δn 은 다음의 관계식으로 주어진다.^[10,11]

$$\tau \frac{\partial(\Delta n)}{\partial t} + \Delta n = n_2 |E(r, t)|^2 \quad (2)$$

여기에서, n_2 는 비선형 굴절율이고, τ 는 회전분자의 이완시간으로 $\frac{1}{D}$ 로 주어진다.

이 방정식의 해는

$$\Delta n(r, t) = \frac{n_2}{\tau} \int_{-\infty}^t |E(r, t')|^2 \exp\left(\frac{-(t-t')}{\tau}\right) dt' \quad (3)$$

이다. 광학적으로 등방성 매질에 타원 편광된 강력한 레이저 광이 입사되었을 때 타원 복굴절이 형성된다. $\hat{E} = \hat{e}_+ E_+ + \hat{e}_- E_-$ 와 $\hat{e}_\pm = (\hat{x} \pm i\hat{y})/\sqrt{2}$ 을 사용하여 일반적인 타원 복굴절과 관련된 식을 만들기 위하여 식 (3)을 원형 좌표계로 변환시키면, 원형 복굴절 $\delta n_c(t)$ 은 다음과 같다.^[12]

$$\delta n_c(t) = \frac{2\pi}{n} 6\chi_{1221}^{(3)}(-\omega, \omega, \omega, -\omega) \frac{1}{\tau} P \int_{-\infty}^t |E(t')|^2 |e^{-(t-t')/\tau}| dt' \quad (4)$$

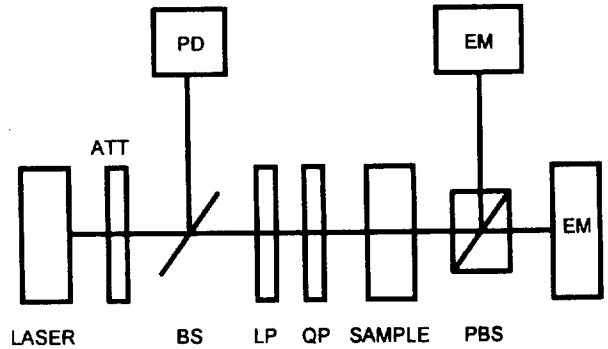
여기에서 n 은 굴절률, $\chi_{1221}^{(3)}(-\omega, \omega, \omega, -\omega)$ 는 3차 비선형 광학 감수율이고 P 는 편광 인자로 $(|E_-|^2 - |E_+|^2)/|E|^2$ 이다. 레이저광이 매질로 통과하면 유도 원형 복굴절은 다음과 같이 편광 타원의 장축의 각을 회전시킨다:

$$\theta = \omega \delta n_c l / 2c \quad (5)$$

여기에서 c 는 광속이고 l 은 매질의 길이이다.

III. 실험방법 및 결과

비선형 광학 효과를 관측하기 위한 SIER 실험장치는 그림 1과 같다. 선형 편광기(LP)를 통과한 광은 선형 편광된다. 선형 편광된 광의 편광 방향과 $\lambda/4$ 파장판(QP)의 광축과 이루는 각이 $\pi/4$ 일 경우 광은 원형 편광된 광이 나온다. 그러나 임의의 각 β 일 경우는 타원 편광 된다. 타원 편광된 광은 시료를 통과 하면서 SIER 효과 때문에 타원 편광의 장축이 회전된다. 편광 빔분리기(PBS)로 회전에 의한 변화량을 측정한다. 레이저 광을 초점거리 30 cm로 약간 집속시켜서 시료에 입사시켰다. 시료에서 나오는 광을 편광 빔분리기를 사용하여 S, P 편광 성분으로 분리한 후 광 세기의 비를 측정하였다. 광원으로는 Nd:YAG 레이저(Spectron Laser Sys. SL400)을 사용하였으며, 펄스폭은 18 ns 이고, 출력에너지는 펄스당 200 mJ 로서 에너지를 줄여서 실험하였다. 선형 편광기의 방향과 $\lambda/4$ 파장판의 광축과의 각을 30도로 고정하여 사용하였다. 시료를 담은 용기는 광 경로가 1 cm 이고, 유리관의 벽에 무반사 코팅을 하여 사용하였다. 펄스의 반복율은 초당 1개로 하였으며, 레이저 광의 반복율에 의하여 온도가 변하지는 않았다. 한 실험치는



ATT : 감쇄기 BS : 광속분리기
 PBS : 편광 광속분리기 LP : 선형 편광자
 QP : $\lambda/4$ 파장판 EM : 에너지 미터
 PD : 광 검출기

그림 1. 자기유도 타원편광축 회전에 의한 3차 비선형 광학 감수율 측정 장치도

10번 반복하여 평균치를 기록하였다. 신호광의 측정은 에너지 미터(Coherence Co. Model Labmaster P10 I)을 사용하여 S와 P 편광에서 나오는 레이저 에너지를 측정하였다. 시료를 넣기 전 유리 광학부품의 온도에 대한 비틀림 복굴절을 측정하고 결과 본 실험의 온도 범위 내에서는 거의 검출되지 않았다.

만일 사용한 레이저광이 가우스형인 $I = I_0 \exp(-b^2 r^2)$ 이라면, SIER 각은 식 (5)으로부터 얻을 수 있다.^[12]

$$\theta(t) = (48 \pi^2 \omega P I_0 / n^2 c^2) \chi_{1221}^{(3)}(-\omega, \omega, \omega, -\omega) (\sqrt{\pi/2b} \tau) [1 + \text{erf}(bt - 1/2b\tau)] \exp(-t/\tau + 1/4 b^2 \tau^2) \quad (6)$$

여기에서 I_0 는 시료 안의 레이저광 세기의 봉우리이고, erf 는 오차함수이다. 그림 1에서 선형 편광자(LP)를 통과한 레이저

광의 편광 상태는 Jones 벡터로 표시하면 $P = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix} E(t)$ 다. 선

형 편광축과 $\lambda/4$ 판 QP의 광축이 이루는 각을 β 라하면, QP를 통과한 레이저광은 $M(-\beta)RM(\beta)$ 로 표시할 수 있다. 여기에서

$$R = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & i \end{bmatrix} \text{와 } M(\beta) = \begin{bmatrix} \cos \beta & \sin \beta \\ -\sin \beta & \cos \beta \end{bmatrix} \text{이다. 타원 편광된 레이}$$

저광이 SIER에 의하여 변화된 편광축 회전은

$$M(\theta(t)) = \begin{bmatrix} \cos \theta(t) & \sin \theta(t) \\ -\sin \theta(t) & \cos \theta(t) \end{bmatrix} \text{이다. 식 (5)의 편광인자는}$$

$2 \sin \beta \cos \beta$ 이다. 편광 광속 분리기(PBS)에서 P 편광과 S 편광의 투과 계수는

$$\begin{bmatrix} T_p \\ T_s \end{bmatrix} = M(\theta(t)) M(-\beta) R M(\beta) P \text{이다.}$$

PBS를 통과하여 나오는 레이저광의 에너지 비율은

$$\eta = \frac{\int |T_s|^2 I(t) dt}{\int |T_p|^2 I(t) dt}$$

$$= \frac{\int_{-\infty}^{\infty} [\cos^2 \beta \sin^2(\beta - \theta(t)) + \sin^2 \beta \cos^2(\beta - \theta(t))] I(t) dt}{\int_{-\infty}^{\infty} [\cos^2 \beta \sin^2(\beta - \theta(t)) + \sin^2 \beta \cos^2(\beta - \theta(t))] I(t) dt} \quad (7)$$

이다.^[13] 여기에서 실험한 초기 조건은 $\beta = \pi/6$ 이었다. 실험에 사용한 레이저의 펄스폭은 18 ns 이므로 b 는 결정되며, 계산에 사용한 회전이완 시간 τ 는 참고문헌(14)와 같이 측정된 결과 변화의 폭이 비선형 광학감수율의 측정 오차의 한계 내 있어서 50 ns로 일정하게 대입하여 식 (7)의 적분방정식을 풀었다. 분자 회전 이완시간이 레이저 펄스폭보다 짧은 경우는 윗식을 적분하지 않고 사용한다. 그러나 펄스폭이 회전 이완시간보다 짧은 경우, 비선형 굴절률은 사용한 레이저 펄스폭에 따라서 크기가 변한다. 비선형 굴절률로부터 계산된 물리적 상수인 비선형 광학 감수율은 펄스폭에 따라서 변하게 된다. 이러한 모순을 제거하기 위하여 레이저 펄스의 영향이 있는 동안 분자를 회전시키는 시간을 적분하여 비선형 광학감수율을 계산하였다.

시료는 참고문헌(15)과 같은 방법으로 오골계 난백으로부터 추출한 Lysozyme을 소금물과 섞어서 실험의 시료로 사용하였다. 광의 흡수 관계를 측정하기 위하여 사용한 시료중 NaCl 0.7몰 pH 5.4 20% 농도의 흡광도(OD)는 분광 광도계(Beckman Co. DU-65)로 측정하였다. 상분리 온도에서 멀리 떨어진 온도에서 측정된 결과 0.99 이었다. 그러므로 흡수 관계는 무시하고 실험하였다. 불순물인 글리세롤의 첨가는 Lysozyme과 소금물의 혼합물에 첨가하여 실험하였다. Lysozyme을 소금물에 녹일 때 처음은 거품을 내며 서서히 녹으며

로 시간을 두어 실온에서 녹였다. 실험은 37.5°C 조금 아래서부터 0.1도 간격으로 상분리 온도까지 실험하였다. 비선형 굴절률의 비정상적인 변화는 상분리 온도 약 5°C 위에서부터 약간의 요동이 시작되며, 약 3°C 위에서부터 변하기 시작하여 상분리 온도에서는 발산됨이 관측되었다. 그림 2는 Lysozyme-물 섞임체에 대한 공존곡선이다. 소금의 농도는 0.5몰이고, pH는 5.4 에서 측정된 결과이다. 임계 농도와 임계 온도는 각각 (25.0 0.5)%와 (10.9 0.5)°C 이었다. 공존 곡선은 위로 볼록한 그림이었다. 공존 곡선 임계지수 β 와 농도, 환산 온도 관계는 $\varphi - \varphi^* \sim [\frac{T - T^*}{T^*}]^\beta$ 로 주어지는데^[16], 그림 2의 실험값을 최소 자승법으로 그린 결과가 실선이다. 임계지수 β 는 (4.5 ± 0.5) 이었다. 공존곡선의 온도의 결정은 3차 비선형 광학 감수율을 측정하고, 광산란 실험으로 확인한 결과이다. 유전율 상수로 측정된 결과와 실험 오차의 한계내에서 거의 일치하였다. 한 상으로 되어 있는 온도 37.5°C 에서부터 온도를 서서히 내리면서 유전율을 측정하였는데 유전율의 변화가 급격하게 증가하다가 감소하는 온도를 상분리 온도로 잡았다. 그림 3은 NaCl 0.7몰 pH 5.4 Lysozyme 의 물에 대한 농도가 20%인 경우 온도를 변화시키면서 P편광과 S편광에서 나오는 신호광의 에너지를 측정된 결과 그 비율이다. 상분리 온도에서 발산함을 보이고 있다. 이 실험값을 식 (7)에 넣어서 3차 비선형 광학 감수율을 계산하여 얻은 결과가 그림 4이다. 상분리 온도에서 약 3°C 위부터 요동은 있었지만 거의 변화는 보이지 않고 약 1°C 부터 급격하게 S, P 편광에서 나오는 레이저 광의 세기가 급격하게 변하였다. 3°C 위의 각각의 온도에서는 편광의 세기

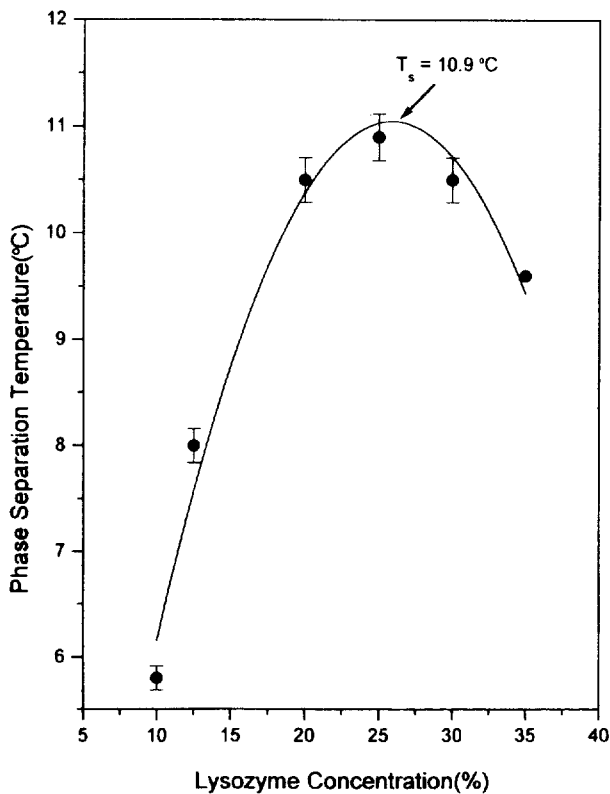


그림 2. 두 종류 섞임체 단백질-물의 공존곡선

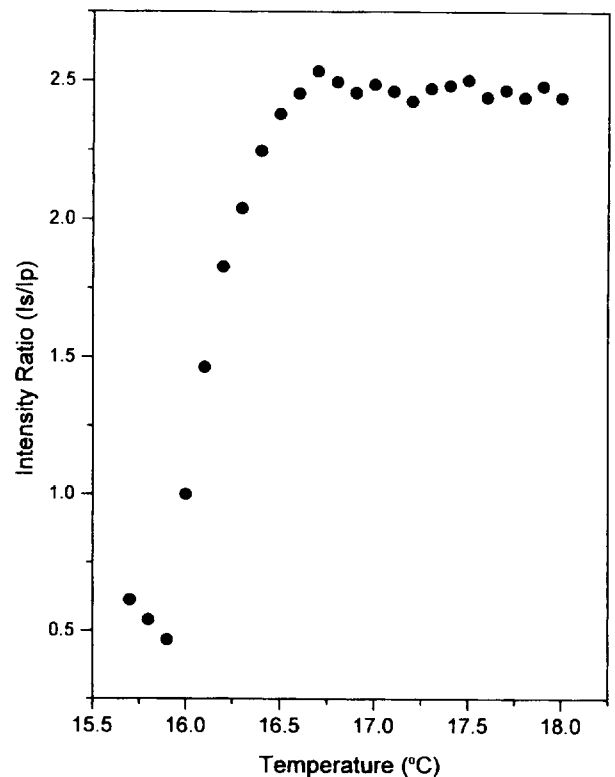


그림 3. 온도변화에 따른 레이저광 세기의 비율

가 일정하게 관측되었다. 상분리 온도를 지난 후에는 편광에서 나오는 빛의 세기의 비율이 요동이 있으며, 급격하게 감소하고 투명도가 거의 0 이었다. 방울 모델에 의하면 3차 비선형 광학 감수율과 임계지수 그리고 환산온도 관계는 $\chi \sim [\frac{(T-T^*)}{T^*}]^{-\phi}$

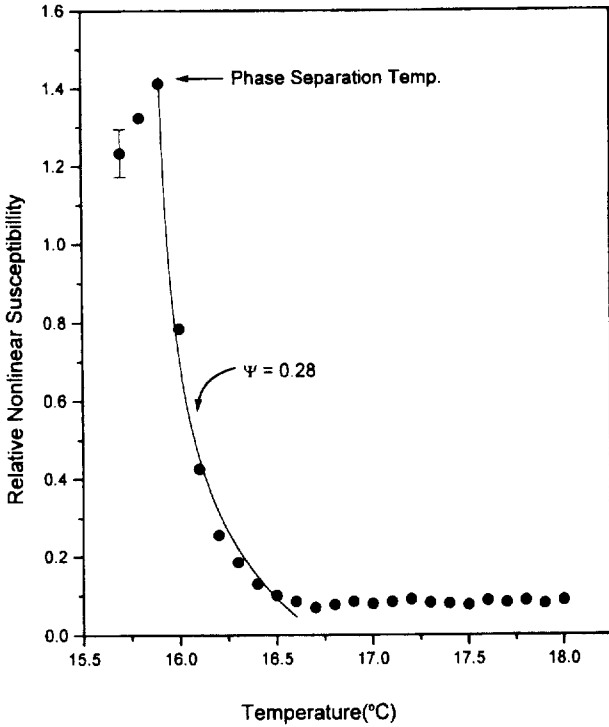


그림 4. 온도변화에 따른 3차 비선형 광학감수율

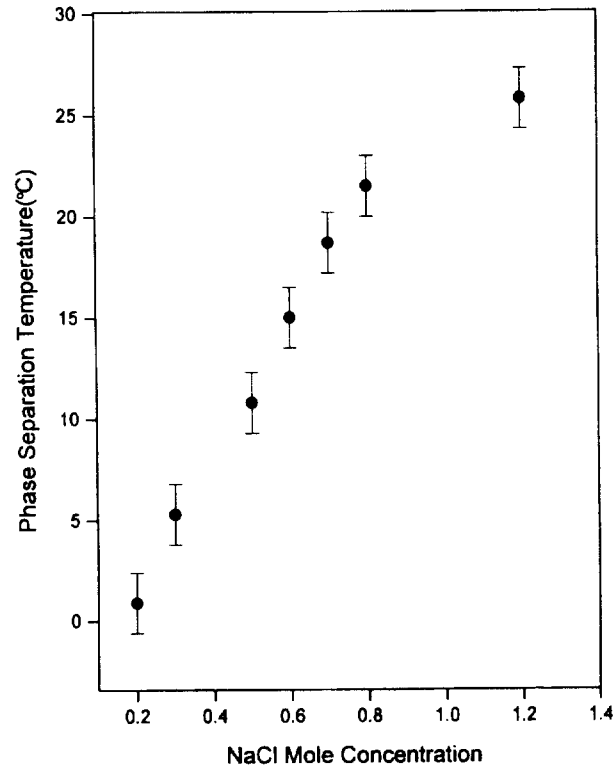


그림 5. NaCl의 농도에 따른 상분리 온도 변화

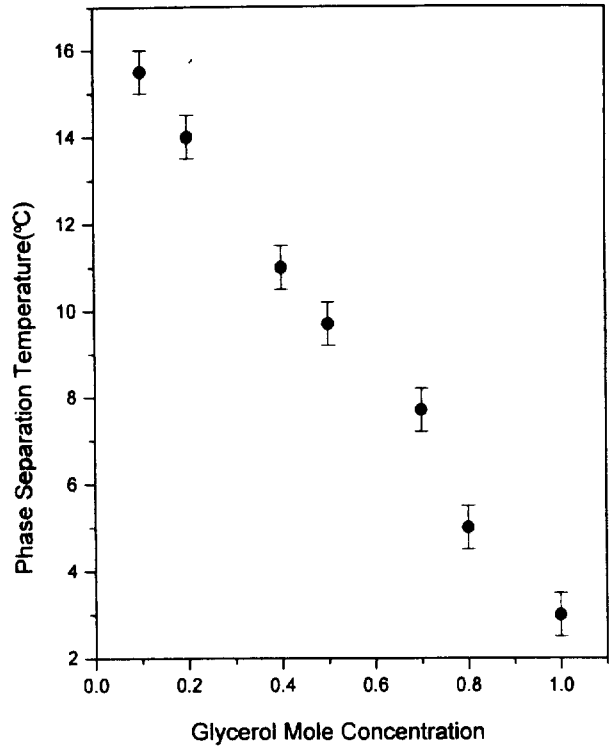


그림 6. 글리세롤 농도에 따른 상분리 온도 변화

로 주어진다.¹¹⁾ 상분리 온도 근처의 실험값을 최소 자승법에 의하여 그린 결과가 실선이다. 임계지수 ψ 가 (0.28 ± 0.01) 이었다. 그림 5는 소금의 농도에 따른 상분리 온도의 변화를 나타내고 있다. 각각의 소금 농도에 대하여 그림 4와 같은 실험을 반복하여 얻은 결과이다. 물에 대한 Lysozyme 의 농도는 20% 이었고, pH는 5.4 이었다. 농도가 증가함에 따라서 상분리 온도가 증가함을 보이고 있다. 그림 6은 불순물로서 글리세롤을 첨가하였을 때 상분리 온도의 변화를 나타내고 있다. 각각의 농도에 대하여 그림 4와 같은 실험을 반복하여 얻은 것이다. 이 때 사용한 시료는 NaCl 의 농도는 0.7몰 pH는 5.4 이고, 물에 대한 Lysozyme의 농도는 20%를 사용하였다. 글리세롤의 양이 증가함에 따라서 상분리 온도가 감소함을 보이고 있다. 불순물을 첨가하였을 경우 3차 비선형 광학감수율 기울기 변화율의 일반성(universality)을 조사하였으나 본 실험의 오차의 한계 내에서 불순물 첨가 이전과 변화가 없었다.

IV. 논 의

생체를 구성하고 있는 단백질-물 혼합물에 대한 상분리 온도 근처에서 3차 비선형 광학감수율의 비정상성에 대하여 조사하였다. 상분리 온도 근처에서 3차 비선형 광학감수율 기울기의 임계지수는 $\psi = \gamma - 2\beta$ 의 관계에서 삼투 압축율(osmotic compressibility) 임계지수 γ 는 1.18이었다. 광산란 실험으로부터 얻은 결과와 오차의 한계 내에서 일치함을 보였다.¹⁷⁾ 불순물인 글리세롤을 첨가하여 3차 비선형 광학감수율을 측정하여 기울기를 조사한 결과도 마찬가지로 일치함을 보여주었다. 불순물의 종류에 따라서 소금의 양의 증가는 상분리 온도

를 증가시키고, 글리세롤 양의 증가는 상분리 온도를 감소시킴이 관측되었다. 소금과 글리세롤은 단백질 용액과 서로 상호작용 하여 안정화되는 용매이다.^[18] 소금은 표면장력을 증가시키고 약한 결합을 주며, 글리세롤은 극성 영역의 친화력을 높이게 되는 역할을 하는데 이러한 화학적 성질이 상분리에 미치는 영향을 조사 연구 중이다.

참고문헌

- [1] L. Mistura, J. Chem. Phys. **59**, 4563 (1973); J.S. Hoyer and G. Stell, J. Chem. Phys. **75**, 3559 (1981).
- [2] J. Ziolo, Chem. Phys. Lett. **53**, 345 (1978).
- [3] J.S. Hoyer and G. Stell, J. Chem. Phys. **81**, 3200 (1984).
- [4] B. Fechner, Acta Phys. Pol. **36**, 297 (1969).
- [5] M. Given, I. Pelah and U. Efron, Phys. Lett. **A48**, 1 (1974); W. Pysuk and K. Zbonisky, Chem. Phys. Lett. **52**, 577 (1977);
- [6] G. B. Benedek, J. I. Clark, E. N. Serrallach, C. Y. Young, L. Mengel, T. Sauke, A. Bagg and K. Benedek, Phil. Trans. R. Soc. Lond. **A293**, 329 (1979).
- [7] J. A. Thomson, P. Schurtenberger, G. M. Thurston and G. B. Benedek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 7079 (1987).
- [8] M. L. Broide, C. R. Berland, J. Pande, O. O. Ogun and G. B. Benedek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 5660 (1991).
- [9] A. Morita and H. Watanabe, J. Chem. Phys. **70**(10) 4708 (1979).
- [10] H. Watanabe and A. Morita, J. Chem. Phys. **73**(11) 5884 (1980).
- [11] K. Sala and M.C. Richardson, Phys. Rev. A **12**, 1036 (1975).
- [12] 조창호, 박사학위 논문 "자기유도 광 Kerr 효과에 의한 비선형 광학감수율에 관한 연구" (서울대, 1988); A. Ouyang, IEEE J. Quantum Electron. **QE-9**, 1064 (1973).
- [13] Chang-Ho Cho, Jai-Hyung Lee and Joon-Sung Chang, JKPS **24**(1) 15 (1991).
- [14] George K. L. Wong and Y. R. Shen, Phys. Rev. **A10**, 1277 (1974).
- [15] 조창호, 서영석, 이종수, 김세창, 새물리 **36**, 119 (1996).
- [16] J. Gouldn, J. Greffe and D.W. Oxtoby, J. Chem. Phys. **70**(10), 4742 (1979).
- [17] P. Schurtenberger, R. A. Chamberlin, G. M. Thurston, J. A. Thomson and G. B. Benedek, Phys. Rev. Lett. **63**, 2064 (1989).
- [18] T. E. Creighton, *PROTEIN STRUCTURE*, p.333, IRL Press at Oxford Univ. (1989).

Nonlinear optical behavior of binary mixture protein and water near the phase separation temperature

Chang-Ho Cho, Tai-Gyun Kim and Young-Seok Seo
Dept. of Physics, Paichai University, Taejon 302-735, Korea

(Received : May 30, 1997)

The 3rd order nonlinear optical susceptibility was measured through the self-induced ellipse rotation. The phase separation temperature increases with the increase of salt and it decreases with the increase of glycerol.