

絹糸 Fibroin 中の Hydroxyproline 定量에 對한 報告

崔炳熙, 李春寧, 金漢洙*

(1965年 10月20日 接受)

Hydroxyproline determination in silk fibroin

Byong Hee Choe, Chun Yong Lee, Han Soo Kim

SUMMARY

This was the report of Hydroxyproline detection in silk fibroin and the obtained results were as followings.

1. Hydroxyproline was analyzed 25~75 p.p.m. in specific species silk fibroin.
2. The amino acid was included more in crossed species silk fibroin than in the original species fibroin.
3. The number of amino acids in silk fibroin increased from 18 to 19 kinds.

I. 緒 言

絹糸 fibroin을 對象으로 그 아미노酸組成的 分析에 參與한 사람들은 Tristram (1949)⁽¹⁾, 成田(1955)⁽²⁾, 桐村(1954)⁽³⁾, Block와 Bolling(1945)⁽⁴⁾, Schroeder와 Kay(1955)⁽⁵⁾ 등인데 이 사람들에 依하여 發見된 絹糸 fibroin의 아미노酸은 全部 18種이다.

筆者⁽⁶⁾는 昨年에 蠶品種別 絹糸 fibroin의 아미노酸 分析을 하였던바 上記 18種과 關係없는 새로운 아미노酸의 存在를 一部 品種에서 發見하였고 그 아미노酸이 Hydroxyproline 일 것이라는 推測을 한바 있었는데 本報에서 그 結果를 再次分析하여 報告하는 바이다.

II. 實驗方法과 結果考察

現在 우리나라의 獎勵品種인 雪岳昭陽, 牡丹大同, 妙香清川의 3品種과 그 母體原種繭 6品種으로 모두 9品種을 試料로 한 前番實驗材料를 保管하여 다시 使用하였다.

採取한 生繭層을 Soxhlet 裝置에 依해 acetone으로 脂肪 및 色素等을 除去한 後 다시 ether로 抽出하여 純纖維로 하였다. 이 繭層試料 1g을 100cc 試驗管에 넣고 0.01N—NaOH 20倍量을 加하여 煮沸水浴中에서 1時間 精練하여 水洗하고 다시 反復 精練하였으며 繭層에 吸着된 NaOH를 除去하기 爲하여 溫水로 充分히 水洗한 後 50°C의 乾燥機內에서 乾燥하여 fibroin 試料로 하였다.

이 fibroin 試料를 加水分解하기 爲하여 0.2g씩을 冷却器가 附着된 heart型 flask(50cc)에 넣고 6N—HCl 10cc로 20時間 120°C의 砂浴에서 分解시켜 濾過하였으며 鹽酸을 除去하기 爲하여 35°C의 水浴에서 syrup 狀이 되거 까지 減壓濃縮하였다. 鹽酸을 除去한 同試料에서 鹽類 및 其他 不純物을 除去할 目的으로 80% ethanol을 加하여 溶出시킨다음 acetone과 10N—HCl(100:1) 混液을 加하여 濾過하였으며 다시 減壓下에서 充分히 乾固한 後 10% isopropanol 1cc에 取하였으며 脫色하기 爲하여 再次蒸溜水를 各各 10cc와 活性炭素 0.5g씩을 加하고 煮沸하여 遠心分離시켜 濾過한後 5cc로 稀釋하여 Hydroxyproline 測定用 試料로 하였다.

* 서울大學校 農科大學 (College of Agr. Seoul National University)

Hydroxyproline 分析方法⁽⁷⁾으로서는 27個乾燥試驗管(18×150mm, pyrex)을 準備하여 1標準 Hydroxylproline 溶液과 試料溶液을 다음과 같이 準備하였다.

- tube 1.....1cc의 蒸溜水
- tube 2, 3.....Hydroxyproline, 5γ의 1cc 溶液
- tube 4, 5.....Hydroxyproline, 10γ의 1cc 溶液
- tube 6, 7.....Hydroxyproline, 15γ의 1cc 溶液
- tube 8, 9.....Hydroxyproline, 20γ의 1cc 溶液
- tube 10, 11...묘향×청천, 시료용액 1cc 溶液
- tube 12, 13...묘향, 시료용액 1cc 溶液
- tube 14, 15...청천, 시료용액 1cc 溶液
- tube 16, 17...설악×소양, 시료용액 1cc 溶液
- tube 18, 19...설악, 시료용액 1cc 溶液
- tube 20, 21...소양, 시료용액 1cc 溶液
- tube 22, 23...모란×대동, 시료용액 1cc 溶液
- tube 24, 25...모란, 시료용액 1cc 溶液
- tube 26, 27...대동, 시료용액 1cc 溶液

0.01 M CuSO₄ 溶液, 2.5N—NaOH 및 6% H₂O₂를 各各 1cc씩 繼續하여 各試料液에 加한 後 5分間 때때로 흔들면서 잘 혼합하여 80°C의 水浴上에서 5分間 充分히 흔들면서 飽和酸化물을 除去한 後 氷水로 冷却하고 3N—H₂SO₄ 4cc를 攪拌하면서 加하고 propanol의 5% p-dimethyl amino-benzaldehyde 溶液 2cc를 加하여 充分히 混合한 後 70°C 水浴上에서 16分間 處理한 後 流水로 冷却하여 540mμ 波長의 colorimeter 에 依하여 比色定量하였다.

colorimeter 에 依해 測定된 標準 Hydroxyproline 과 試料의 檢出은 다음과 같으며 標準 Hydroxyproline 의 濃度曲線은 第一圖와 같다.

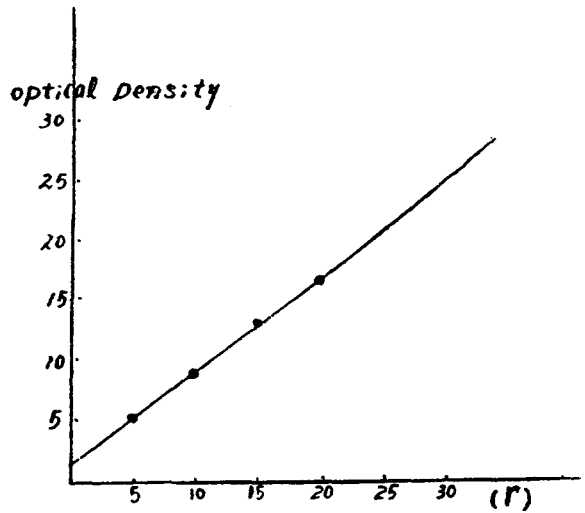
표준 Hydroxyproline, Optical density	
blank,	1.5
5γ sol.	5.2
10γ sol.	9.0
15γ sol.	13.5
20γ sol.	17.0

上記 標準 optical density 에 基準하여 測定된 絹絲 fobroin 의 Hydroxyproline 含有量은 다음과 같다.

第1表

絹絲 fibroin 中の Hydroxyproline 含有量

試料	Optical density	P. P. M. 含有量	% 含有率
妙香清川	2.5	37.5	0.00375
妙香川	2.8	43.8	0.00438
清川	1.5
雪岳昭陽	3.3	52.5	0.00525
雪岳	1.9
昭陽	2.5	37.5	0.00375
牡丹大同	3.7	75.0	0.00750
牡丹	2.3	25.0	0.00250
大同	2.3	25.0	0.00250

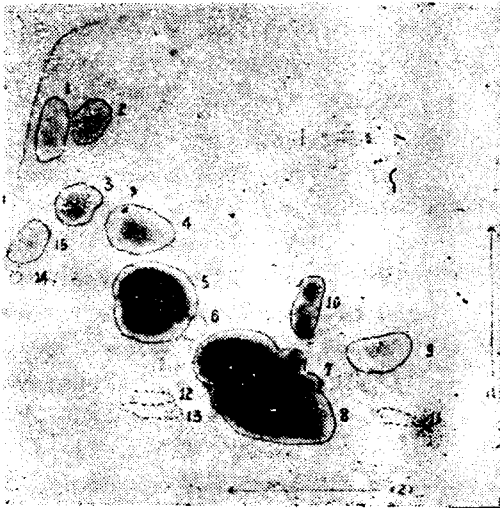


第1圖 Hydroxyproline o.d. curve

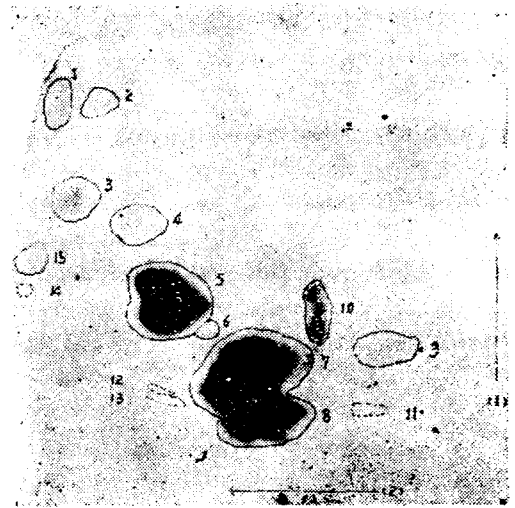
上記에서 보는 바와 같이 Hydroxyproline의 絹絲 fibroin 中の 含有率은 percent 水準에 도달하지 못하여 p.p.m으로 表示하게 되었다. 昨年에 分析한 結果에 依하면 不出現하였던 Hydroxyproline이 今番에는 極少이나마 出現하고 있는 反面 一部 原種菌에서 今番 亦是 不出現되고 있다. 이러한 極微量인 關係로 只今까지의 分析 結果에 나타나지 않은 事實도 無理가 아니다. 그러나 Hydroxyproline이 絹絲 fibroin 中에 없다고 斷定할 수 없다는 것은 本實驗으로 나타난 證이다. 이러한 極微量으로 絹絲 fibroin의 性質을 左右할 수 없는 事實도 또한 明白하나 一般蛋白質에서 보이는 몇가지 아미노酸이 絹絲 fibroin 中에 含有될 수 없다는 根據도 없다. 單只 이러한 아미노酸이 絹絲의 無定形部分에 들어 있으리라는 것은 그 側鎖構造로 能히 想像할 수 있다.

또 昨報에서 paperchromatograph 法으로 分析하였는데도 不拘하고 Hydroxyproline에 類似한 斑點이 第2圖 第3圖와 같이 出現하였던 事實을 보면 이 아미노酸이 大端히 드물게 fibroin 分子에 參與하고 있는 것을 想像할 수 있다.

또 本實驗에서 原種菌에서의 含有量보다 交雜種菌의 含有量이 많이 出現한 事實을 알 수 있으며 本 아미노酸이 蠶兒遺傳과 相當히 關聯性이 있는 것으로 보인다.



第2圖 絹絲 fibroin 中の Hydroxyproline 出現例(15)



第3圖 絹絲 fibroin 中の Hydroxyproline 出現例(15)

Ⅲ. 摘 要

本 報告는 絹絲 fibroin 中の Hydroxyproline 定量結果이며 다음의 結果를 얻었다.

1. 一部品種 絹絲 fibroin 中에 Hydroxyproline이 25~75 p.p.m 含有되고 있었다.
2. 本 아미노酸 含有量은 原種菌보다 交雜種菌에 많이 含有되고 있었다.
3. 本 아미노酸 檢出로 絹絲 fibroin의 아미노酸 種類는 18 種에서 19 種으로 되었다.

參考文獻

1. Tristram, G.R.(1949) Adv. in protein chem. 5, 83
2. 成田耕三(1954) Bull, Chem. Soc. Jap. 75, 1005, 1014
3. 桐村二郎(1954) Bioassay J. 1, 28
4. Block, R.J and Bolling D.(1952), The amino acid composition of Proteins and Foods
5. Schroeder W. A and Kay L.M.(1955) J.Am. Chem. Soc. 77 3908
6. 崔炳熙, 金漢洙(1964) 韓國蠶絲學會誌, 第4號
7. Neuman, R.E and Logan, M.A(1950)J. Biol. Chem. 184, 299