

효소반응에 의한 견피브로인의 전이

김동건 · 최진협 · 小西 孝*

동아대학교 천연섬유학과 · 京都工藝纖維大學 高分子學科*

Transition of Silk Fibroin by Enzymatic Reaction

Dong Keon Kim, Jin Hub Choi and Takashi Konishi*

Department of Natural Fiber Science, Dong-A University Pusan 604-1 714, Korea

*Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Japan

ABSTRACT

The crystalline fraction of silk fibroin (Fcp) was obtained from the aqueous solution of silk fibroin hydrolyzed by α -chymotrypsin. The molecular weight of Fcp was found approximately 7000 by using high speed GPC. On the other hand, a high molecular weight of PIFcp product could be obtained by the reverse reaction of enzymatic proteolysis of Fcp precipitates. Some parts of this PIFcp have the molecular weights of approximately 17000 and 24000. As a result of x-ray diffraction analysis, the crystal structure of Fcp and PIFcp was turned out silk-II type and silk-I type, respectively. Upon the reverse reaction of enzymatic proteolysis, the structural transition occurred from silk-II type to silk-I type crystal for the most of Fcp precipitates. It was confirmed that PIFcp might be somewhat stable crystal structure of silk-I type according to the thermal analysis as well as x-ray diffraction method.

Key word : Silk fibroin, Enzymatic proteolysis, Molecular weight, Crystal structure, Silk-II, Silk-I

緒 論

絹피브로인에는 2가지 結晶形態가 있으며, Silk II型的 構造는 antiparallel chain pleated sheets가 基本이 되어 있는 것이 Marsh등(1955)에 의해 밝혀졌고 Silk I型的 構造는 平林등(1968)과 小西등(1968)에 의해 crank shift型을 이루고 있는 것을 알게 되었다. 그러나, Silk I型은 再現性이 좋은 試料를 작성하기 힘들고 Silk I型的 配向試料를 얻으려고 하여도 곧 안정한 Silk II型으로 轉移하기 때문에 얻을 수 있는 知識에는 限界가 있다. 小西등(1967,1970)에 의해 絹피브로인의 chymotrypsin에 의한 酵素加水分解에 의해 얻어진 結晶部分에 있어서 2가지의 結晶形態의 存在가 確認되어 結晶構造의 解析에 利用되어지고 있다.

食品蛋白質改質分野에서 酵素分解逆反應을 이용한 蛋白質의 再合成에 관하여 많은 研究가 報告되어지고 있는데 藤卷 등(1975), 藤卷(1975), Feany &

Wedeca(1979)에 의하면 蛋白質分解酵素를 이용해서 그의 逆反應을 일으키는 것이다. 즉, 必須아미노산을 導入하는 것에 의해 低營養·未利用 蛋白質原의 營養價를 改良하는 것이 可能하고, 親水性아미노산을 導入하는 것에 의하여 蛋白質의 溶解性을 改質하는 것이 可能하나, 이때 酵素分解逆反應은 基質이 低分子펩티드일 것, 基質濃도가 극단적으로 높을 것, 反應系가 弱酸性일 것의 3가지 條件이 필요하다고 報告하였다. 絹피브로인의 結晶部分에 대하여 이 3條件을 檢討하여 보면 基質의 分子量은 低分子펩티드보다 조금 높다고 할 수 있으며 基質의 濃도를 조금 높게 하면 溶液이 겔화하고 反應系의 pH에 의해 生成物이 影響을 받을 수 있다. 그러나, 이 酵素分解逆反應이 絹피브로인에도 應用이 可能하다면 絹피브로인의 親水性아미노산 導入에 의한 溶解性的 改良과 分子量의 制御 그리고 안정한 Silk I型的 結晶을 얻을 수 있을 可能性이 있다.

本 論文에서는 絹피브로인 結晶部分이 酵素分解逆

反應에 의해 高分子量化되는 酵素分解逆反應物의 分子량을 고속겔여과크로마토그래피로 測定함과 동시에 X線回折 및 熱의性質을 測定하였다.

材料 및 方法

1. 絹피브로인의 精練

日本京都工藝纖維大學 纖維學部の 部屬農場에서 생산된 家蠶絹을 마르세유비누를 사용하여 精練하였다.

2. 絹피브로인 結晶部分(silk fibroin crystalline part)의 調製

精練한 絹피브로인 10 g을 10M LiBr水溶液 200 ml에 40°C에서 약3時間 溶解한 후, 이 용액을 蒸溜水 200 ml로 稀釋하여 透析用 cellulose tube에 넣고 sodium carbonate로써 pH8에 調整한 蒸溜水를 透析外液으로 사용하여 5°C중에서 3일간 透析을 실시하였다. 透析後, 이 水溶液을 遠心分離(30분, 3000 rpm)하여 絹피브로인水溶液으로 하였다. 이 水溶液 400 ml에 0.2 M Na_2HPO_4 水溶液 183 ml와 0.2 M NaH_2PO_4 水溶液 17 ml 蒸溜水 200 ml를 혼합하여 제작한 同量의 pH 7.8phosphoric acid buffer(農藝化學實驗書, 1964)를 혼합하여 酵素 α -chymotrypsin 100 mg을 사용하여 40°C 恒溫槽中에서 24時間 酵素加水分解를 행하였다. 生成된 白色沈澱物을 遠心分離하여 沈澱物에 0.1 N HCl 200ml를 가하여 酵素反應을 정지시켰다. 蒸溜水를 넣어 다시 遠心分離한 後, 5°C중에서 透析外液에 蒸溜水를 사용하여 2일간 透析을 행하였다. 透析 後, 遠心分離한 白色沈澱物을 凍結乾燥하여 粉末試料(이하 Fcp라고 함)를 얻었다.

3. 酵素分解逆反應物(Fcp-Plastein)의 調製

Fcp의 4 M尿素水溶液을 溶媒置換法에 의해 調製하였다. 즉 Fcp를 소량씩 10 M LiBr水溶液 20 ml에 溶解하여 Fcp 3.6 g을 完全溶解시킨 후, 8 M의 濃도가 되도록 고체의 尿素를 가해 透析用 cellulose tube에 넣고 透析外液으로서 8 M 尿素水溶液 400 ml에 sodium acetate 6.4 g을 녹여 acetate acid로 pH 5.5에 調整한 緩衝液을 사용하여 透析을 행하였다. 다음으로 6 M(pH 5.5), 4 M(pH 5.5)을 사용하여 透析外液의 尿素水溶液濃도를 24시간 간격으로 낮추어 Fcp의 수용액을 4 M 尿素水溶液으로 調製하였다. 이 溶液을 10%로 濃縮(志村 등, 1979)하여 4 M 尿素水溶液에 溶解한 pH 5.5의 용액을 얻었다. 이 용액에 α -chymotrypsin(酵素-基質比 0.02)을 가해 40°C 恒

溫槽에서 12, 24, 48時間으로 나누어 反應시켰다. 反應이 끝난 후 生成된 塊狀의 白色沈澱物을 遠心分離(60분, 1000 rpm)하고 0.1 N HCl로 酵素反應을 정지시켜 透析用 cellulose tube에 넣고 透析하여 凍結乾燥에 의해 粉末의 酵素分解逆反應物(이하 PFcp라고 함)를 얻었다.

4. 고속겔여과크로마토그래피

志村 등(1979)이 제시한 고속겔여과크로마토그래피방법에 의해 試料의 分子량測定을 행하였다. 裝置는 633A 日立高速液體濾過크로마토그래피를 사용하였고 칼럼은 YMC-Pack Diol-120 (칼럼크기, 내경 8 mm × 길이 300 mm)을 사용하였다. 溶出緩衝液 (8 M 尿素, tris-10 mM, EDTA-1 mM, pH 7.5)을 日立波長可變流動光度計을 사용하여 280 nm으로 測定하였고 溶出의 流速은 0.4 ml/min로 測定하였다. 칼럼계의 檢量線을 작성하기 위하여 標準蛋白質試料로서 albumin (MW : 45000), myoglobin (MW : 18000), glucagon (MW : 3500)을 사용하였다.

5. X線回折

X線回折裝置는 理學電氣製 X線回折裝置를 사용하여 Ni filter로 濾過한 Cu-K α 線(λ : 1.542 Å)을 사용하였다. 試料는 凍結乾燥에 의해 얻어진 粉末試料를 사용하여 직경 약 1 mm의 구멍을 뚫은 두께 약 0.5 mm의 鉛板에 試料를 넣어 X線을 照射하였다. X線回折寫眞은 Laue 平板카메라를 사용하여 카메라거리 30 mm, 직경 0.5 mm의 Pinball Slit를 사용하여 出力은 40 kV, 15 mA, 露出時間은 3時間으로 하였다.

1) 示差熱分析(DTA)

島津製의 示差熱分析裝置(DT-20B)를 사용하여 試料 2 mg을 減壓下, 20°C/min의 昇溫速度로 室溫에서 400°C까지 測定하였다.

結果 및 考察

1. Fcp의 調製

絹피브로인은 直接水에 溶解하지 않기 때문에 먼저 LiBr水溶液에 溶解한 후, 同量의 蒸溜水에 稀釋한 것을 透析用 cellulose tube에 넣고 透析外液에 蒸溜水를 이용하여 透析하였다. 透析은 3일간에 걸쳐 실시하였으나 그 期間中에 겔화하는 것이 觀察되었다. 그 中에는 同條件으로 모든 과정이 행해지고 있음에도 불구하고 透析中의 cellulose tube 가운데 한개만이 겔화하는 現象이 나타났다. 이것은 透析用 cellulose tube에 넣을때의 실험조작에 의한 溶液의 濃度變化等

을 생각할 수 있으나 여기에는 겔화하지 않는 것을 피브로인수용액으로 하였다. 피브로인수용액을 phosphoric acid buffer(pH 7.8)중에 酵素 α -chymotrypsin으로 酵素加水分解를 행하였다. 이 처리의 反應時間을 24時間으로 하였으나 이것은 白色沈澱物의 生成이 이 時間을 境界로 停止되는 것이 觀察되었다. HCl에 의해 酵素加水分解를 停止시킨 다음 蒸溜水에 2일간 透析을 행한 후, 白色沈澱物을 減壓과 液體窒素로 冷却하는 것에 의해 凍結乾燥하여 粉末試料(Fcp)을 얻었다.

2. PIFcp의 調製

絹피브로인 結晶部分(Fcp)은 疎水性 아미노산殘基가 많기 때문에 直接水와 緩衝液에서는 溶解되지 않는다. 따라서 本 實驗에서는 前述의 Fcp의 調製와 같이 LiBr水溶液에 우선 溶解한 것을 透析法에 의해 水溶液과 置換하였다. 또 α -chymotrypsin은 4 M이하의 尿素水溶液中에서도 活性이 일어나는 것이 報告(今堀 등, 1977)되어 있으므로 緩衝液으로서 蛋白質의 解離劑인 尿素水溶液을 이용하였다.

Fcp를 LiBr水溶液에 溶解한 것을 透析外液으로 4 M 尿素水溶液을 사용하여 透析한 결과 沈澱이 생겼다. 한편, 8 M 尿素水溶液을 外液으로 사용한 경우에는 沈澱이 發生하지 않았다. 따라서, Fcp를 LiBr水溶液에 溶解한 것에 固體의 尿素를 8M이 되도록 첨가하고 透析外液으로는 각각의 8 M, 6 M, 4 M 尿素水溶液 400ml에 sodium acetate 6.4 g을 가하고 acetic acid로 pH 5.5로 調整한 緩衝液을 사용하여 하루걸러 順次的

으로 濃度를 低下시켜 本 結果, Fcp가 安定하게 4 M 尿素水溶液에 溶解되어 있는 것이 확인되었다. 또, pH 5.5로 調製한 것은 3條件중 한가지로서 Fig. 1에 나타낸 것과 같이 酵素 α -chymotrypsin의 경우에는 약pH 5.5부근에서 分解反應의 逆反應에 의해 acyl 酵素中間體가 형성되고 이것이 한번 형성되면 acyl 基를 親核基로 轉移시켜서 펩티드結合을 合成하는 것이 可能하다.

일반적으로 食品蛋白質에 있어서 酵素分解逆反應에서는 30~50%의 高濃度를 필요로 하나 Fcp試料에서는 10%의 濃度를 넘으면 겔화하든지, 酵素分解逆反應 中 沈澱이 析出해 버리기 때문에 이 실험에서는 Fcp를 10%로 농축시켜 실험하였다.

여기에 α -chymotrypsin을 가해 40°C 恒溫槽에서 酵素分解逆反應을 행하였다. 이 때의 反應시간을 12, 24, 48時間으로 한 것을 각각 PIFcp(12h), PIFcp(24h), PIFcp(48h)로 나타내었다. Fcp의 경우와 같이 HCl로서 酵素反應을 停止시킨 다음 蒸溜水로서 2日間の 透析後에 凍結乾燥하여 얻어진 粉末試料를 酵素分解逆反應物(PIFcp)로 하였다.

3. 고속겔여과크로마토그래피에 의한 分子量測定

PIFcp의 分子量을 구하기 위해 칼럼계의 檢量線을 作成하여 Fig. 2에 나타내었다. 檢量線을 얻기 위해 여러 종류의 分子量의 標準蛋白質試料를 이용하여 겔여과에 따른 각 標準蛋白質試料의 容出實驗結果으로부터 縱軸에 分子量의 對數, 橫軸에 溶出量으로 하여 檢量線을 作成하였다.

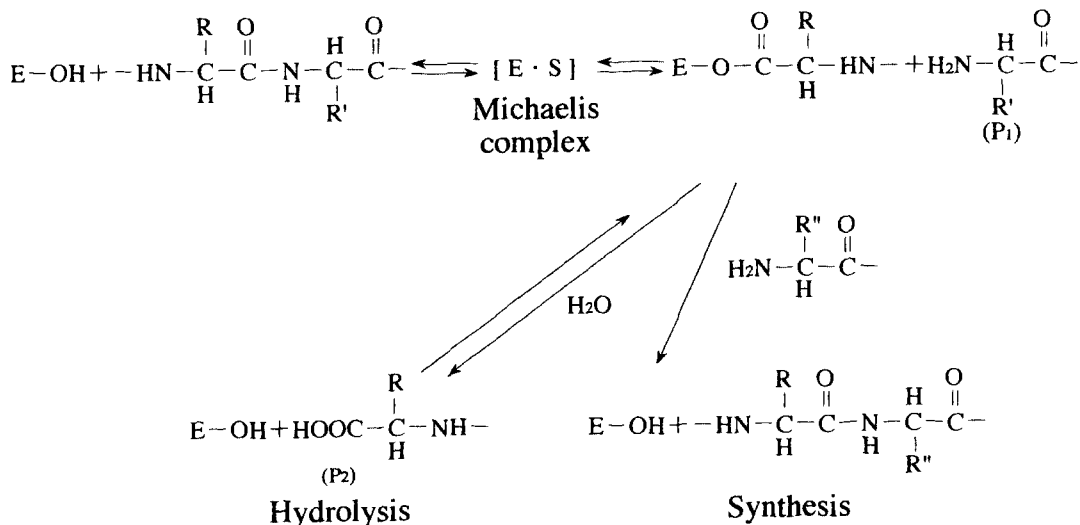


Fig. 1. The reverse reaction of enzymatic proteolysis.

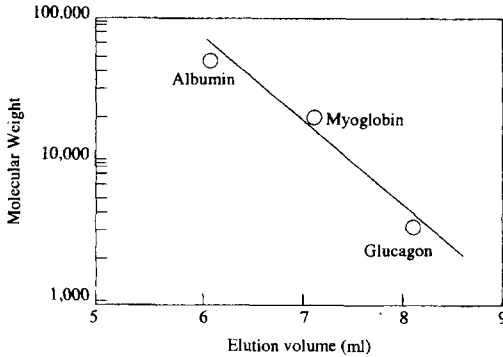


Fig. 2. Determination of molecular weight by gel filtration.

本實驗에서의 Fcp와 PIFcp의 고속겔여과크로마토 그래피에 의한 겔濾過曲線을 Fig. 3에 나타내었다. Fcp에서는 分子量 약7,000에 해당하는 peak 하나가 나타났으나 酵素分解逆反應後에는 이 peak이외에도 分子量 약17,000과 약24,000에 대한 peak도 나타났었다. 즉, 分子量 7000의 Fcp가 酵素分解逆反應하는 것에 의해 그 중 일부 分子量이 약2.5배~약3.5배까지 上昇하는 것이 確認되었다. 또 反應時間을 12, 24, 48時間으로 變化시킨 結果를 Fig. 4에 나타내었다. 反應時間이 增加하는 것에 의해 高分子量化되어진 PIFcp의 量이 增加하나 반대로 分子量 약7000의 peak가 조금減少하는 것이 觀察되었다. 또 低分子量側의 조금 완만한 peak가 觀察되었다.

以上으로부터, 酵素分解反應은 全部의 Fcp가 反應하지 않고 그 중 일부만이 反應하는 것과 反應은 1대

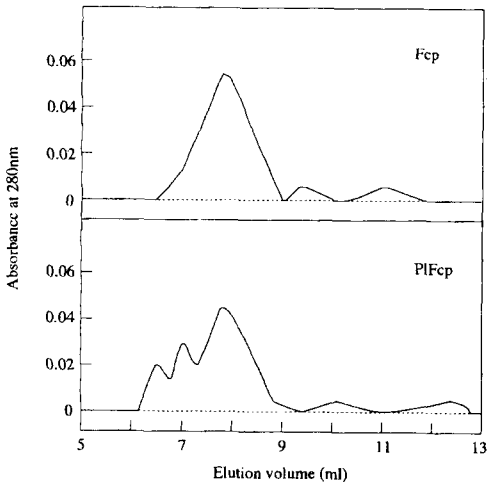


Fig. 3. Gel filtration chromatograms for Fcp and PIFcp.

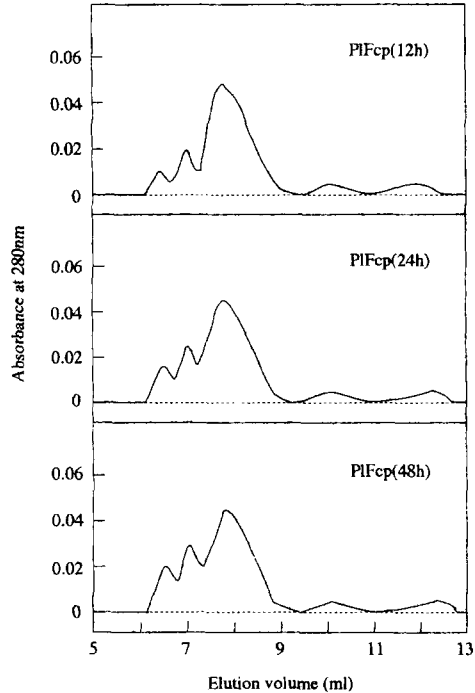
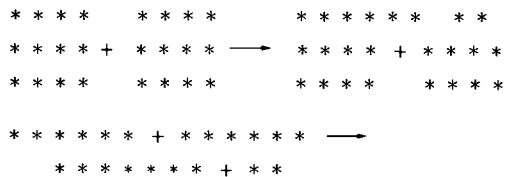


Fig. 4. Gel filtration chromatograms for PIFcp(12h), PIFcp(24h), PIFcp(48h)

1로서만 行하여지는 것이 아니라 한 번 高分子量化되어진 PIFcp가 재차 다른 分子와 結合하여 더욱더 큰 高分子가 되는 것과 低分子量의 分子(oligomer와 free amino acid)가 생기는 것이 推測되며 이것을 다음과 같이 나타낼 수 있다.

<Hypothesis diagrams of molecular weight changed of Fcp and PIFcp by reverse reaction of enzymatic proteolysis>



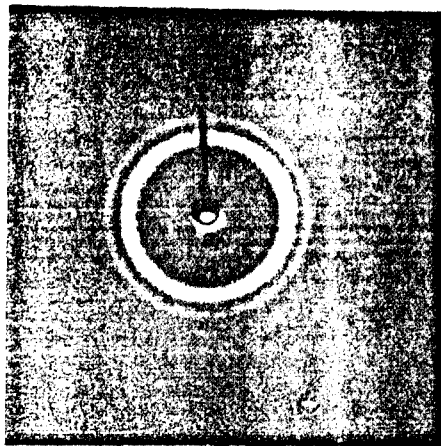
- 여기서, * * * * : Fcp
- * * * * * : PIFcp
- * * : Oligo peptide etc.
- * * * * * * * * : Molecular weight increased of PIFcp

이번에 사용한 Fcp의 分子量은 약7000이며, 前

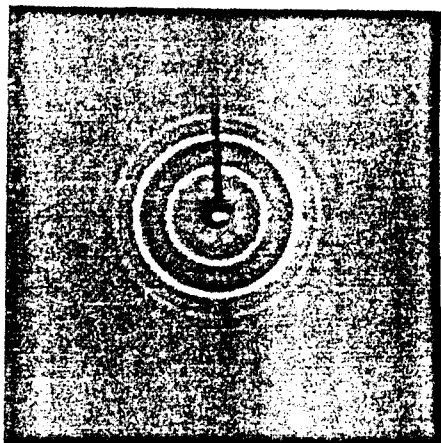
述의 3條件중 한가지인 最適基質分子量은 약1000~1500정도이기 때문에 Fcp의 分子量이 높아 일부만이 高分子量化되지 않았던 原因이 여기 있지 않는 가라고 생각되어 酵素加水分解에 의해 Fcp의 低分子量화를 試驗하여 보았으나 結果는 생각대로 되지 않았다.

4. X線回折

Fcp와 PIFcp의 結晶形態를 X線回折法에 의해 조사한 回折圖를 Fig. 5에 나타내었다. Fcp의 X線回折寫眞에서는 面間隔 0.468 nm, 0.425 nm, 0.369



Fcp



PIFcp

Fig. 5. X-ray diffraction patterns of Fcp and PIFcp powder.

nm의 강한 Debye-Scherrer ring이 나타나 있다. 이 回折寫眞은 Silk II型的 特征적인 것이며 絹피브로인水溶液을 α -chymotrypsin으로 分解沈澱시킨 Fcp가 Silk II型的 結晶構造를 가지고 있는 것이 確認되었다. 또, PIFcp의 X線回折寫眞으로부터는 面間隔 0.718 nm, 0.448 nm의 강한 Debye-Scherrer ring이 나타나 있다. 이 Debye-Scherrer ring은 Silk I型的 特征적인 것이며 本實驗에서 얻어진 PIFcp가 Silk I型結晶의 構造를 가지고 있는 것이 確認되었다.

5. 示差熱分析(DTA)

Fcp와 PIFcp에 대하여 示差熱分析에 의한 熱分解點을 測定한 結果를 Fig. 6에 나타내었다. 安定한 結晶이라 할 수 있는 Silk II型的 熱分解peak點의 位置는 약320°C전후이며 不安定한 結晶이라고 할 수 있는 Silk I型的 熱分解peak點은 약290°C전후에 存在하고 있는 것으로 알려져 있는데 (石川 등, 1972), 本實驗에서 調製한 Fcp는 약327°C, PIFcp는 약310°C에서 나타내고 있다. PIFcp가 Silk I型結晶이라는 것은 앞의 X線回折에 의해 確認되고 있으므로 이 PIFcp는 어느 정도 安定된 結晶이라고 말할 수 있다. 이것은 主鎖結合力の 增大效果과와 함께 結晶構造로부터 오는 水素結合力の 增大效果가 더해졌기 때문이라고 생각할 수 있다.

絹피브로인의 結晶部分만을 사용하여 高分子量化한 PIFcp는 어느정도 安定하여 Silk I型結晶의 構造解析研究에 有用할 수 있다고 생각되며, 또 分子量을 增加시키는 것과 동시에 低分子量部分을 除去하는 것에 의하여 보다 安定한 Silk I型結晶이 얻어질 수 있다고 생각되어 진다.

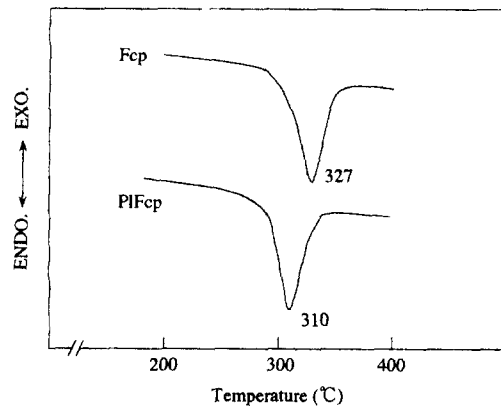


Fig. 6. DTA thermograms of Fcp and PIFcp.

摘 要

分子量 약 7000 의 Fcp는 酵素分解逆反應을 이용하는 것에 의해 分子量 약 17000 과 약 24000 까지 高分子量化된 PIFcp가 얻어졌다. 또, 酵素分解의 逆反應에 의해 高分子量化되는 것은 一部の Fcp이며 Silk II型結晶으로부터 Silk I型結晶으로 轉移하는 것은 대부분의 Fcp에서 나타났다. 이 PIFcp는 X線回折과 示差熱分析(DTA)의 結果로부터 어느정도 安定한 Silk I型的 結晶構造를 가지는 것이 確認되었다.

參考文獻

味澤昭義 (1970) 絹フィブロンの溶解に関する研究 (VI) 中性鹽類溶液の滲透性と絹フィブロインの溶解. 日蠶雜. **39**(3): 139~142.
 今堀和友·小昌陽之助·中野準三 (1977) 生體機能高分子. 講談社. **29**.
 藤卷 正生 (1975) タンパク質の再合成. 高分子. **24**(5): 302~308.
 藤卷正生·荒井綜一·山下道子 (1975) 蛋白食糧とフ

ラステイン反應. 蛋白質核酸酵素. **20**(10): 927~935.
 平林 潔·石川 博·角戶正夫·吳祐吉 (1968) 絹フィブロインの分子形態. 纖維學會誌(4). **24**: 397~400.
 平林 潔·渡邊 誠·鈴木 誠 (1989) 絹のゲル化とその應用. 纖維學會誌. **45**(6): 263~267.
 石川 博·塚田益裕·土井詰功·近田 淳雄·平林 潔 (1972) 絹フィブロインのDSC曲線. 纖維學會誌. **28**(4·5): 91~98.
 小西 孝·近藤宗夫·黒川昌孝 (1967) 酵素分解したフィブロインの構造について. 纖維學會誌. **23**(2): 64~69.
 小西 孝·黒川昌孝 (1968) 家蠶フィブロイン- α の結晶構造. 纖維學會誌. **24**(12): 550~554.
 小西 孝·黒川昌孝 (1970) フィブロイン α 型ならびに β 型の結晶ブレンド. 纖維學會誌. **28**(4·5): 83~90.
 農藝化學實驗書 (1964) 京大農藝化學教室.
 R.E.Feany, J.R.Wedaca編, 藤卷 正生, 荒井 綜一 翻譯 (1979) 食品蛋白質. 學術出版センター. 152~178.
 R. E. Marsh, R. B. Coray and L. Pauling (1955) Investigation of the structure of silk fibroin, *Biochem. Biophys. Acta.* **16**: 1~34.
 志村憲助·江尿慎一郎·吉田充輝·石原弘章 (1979) ゲル濾過法. 學術出版センター.