

파파인을 이용한 피브로인 펩타이드의 글리세릴 에스터화 반응

정재호 · 이신영¹ · 허 원^{1*}

연세대학교 나노메디칼 협동과정, ¹강원대학교 공과대학 생물공학과

Glyceryl Esterification of Fibroin Peptide by Papain

Jaeho Jeong, Shin-Young Lee¹, and Won Hur^{1*}

Nanomedical Graduate Program, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

¹Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

Abstract Papain hydrolysate of fibroin was found to be mainly composed of several even-numbered peptides that can be produced at a large scale and can be used as a precursor for biological fine-chemicals such as peptide detergents. Thus, the hydrolysate was further modified to synthesize a peptide mixture of glyceryl esters using the identical enzyme for the production of such chemicals. Formation of glyceryl ester of each peptide was confirmed by identifying peaks of the nominal mass shift of +74 Da in mass spectrometry. Analysis of the mass spectra indicated that glyceryl esters of di- and tetra-peptides were the major constituents of the mixture and that alanylglycine was most preferentially esterified. It also suggests that papain prefers dipeptide to tetrapeptide and alanine to serine or tyrosine at P₂ position as substrate for glyceryl esterification. The glyceryl esters were recovered using ion exchange resin and the yield of glyceryl esterification recorded was 17.8% by weight.

Keywords: fibroin peptide, glyceryl ester, papain, peptidyl glyceride

서 론

양잠누에 (*Bombyx mori*)의 고치에서 생산되는 섬유 단백질인 피브로인은 대부분의 단백질과 달리 크기가 작은 아미노산인 글리신 (glycine) 알라닌 (alanine) 세린 (serine)의 조성비가 각각 48, 32 및 11%로 전체의 91%를 차지하며 [1], 글리신과 알라닌, 세린 및 타이로신 (tyrosine)이 교대로 치환된 Gly-X (X: Ala 65%, Ser 23%, Tyr 9%)가 반복되는 아미노산 서열 구조를 가지고 있다 [2]. Jeong 등 [3]은 이와 같이 아미노산 서열이 반복되는 특성을 이용하여 피브로인을 파파인으로 가수분해하여 [Gly - X]_n - (n = 2, 4, 6 및 8)인 짝수의 올리고 펩타이드가 대부분인 가수분해물을 얻을 수 있다고 보고하였다. 다른 단백질의 가수분해물의 펩타이드

조성은 매우 다양한 반면, 피브로인 가수분해물은 매우 제한적인 종류의 짝수 펩타이드로 주로 구성되어 있고 산업적인 수준으로 대량 얻을 수 있어 다양한 정밀화학제품의 원료로 활용할 수 있을 것으로 예상된다. 예를 들어 펩타이드와 글리세리드 (glyceride)가 결합한 1-peptidyl-2-arachidonoyl-3-stearoyl-*sn*-glyceride는 양의 혈청에서 발견되는 면역활성 물질이다 [4]. 이와 같이 지방산의 종류나 펩타이드의 종류를 달리하여 다양한 펩타이드 글리세리드를 합성할 수 있고, 이들 중에는 특별한 생리활성을 가지는 펩타이드 글리세리드가 있을 수 있으나, 아직까지 이와 같은 다양한 펩타이드 글리세리드를 합성한 보고는 없다. 현재까지는 펩타이드 대신 아미노산 글리세리드가 새로운 바이오 계면활성제로서 개발할 목적으로 효소적인 방법으로 합성된 바 있다 [5]. 펩타이드 혼합물을 효소적으로 가공하여 기능을 개선시키는 방법은 알려져 있으나, 이 과정에서 각각의 펩타이드의 조성의 변화를 질량분석기를 이용하여 추적한 결과는 보고된 바 없다. 그리고 혼합물의 특성상 여러 종류의 기질이 단일 효소와

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6276, Fax: +82-33-243-6350

e-mail: wonhur@kangwon.ac.kr

반응하는 경우, 효소 반응의 특성, 기질특이성에 따른 펩타이드 혼합물의 조성의 변화 및 이 과정에서 효소의 기질 특이성을 역추적할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 피브로인 펩타이드를 효소적으로 수식하여 펩타이드 글리세리드를 합성하는 중간단계로 파파인을 이용하여 글리세롤 에스터화 반응을 통하여 피브로인 펩타이드의 글리세릴 에스터를 합성하는 반응을 수행하였다. 특히 파파인은 펩타이드 가수분해 활성뿐만 아니라 에스터 분해효소 (esterase)의 활성을 동시에 가지고 있으므로 [6], 효소적으로 에스터를 합성하는데 사용되어 왔다. 그동안 파파인은 유기용매가 첨가된 조건하에서 주로 아미노산인 알라닌을 알코올류를 에스터 결합시키거나 [7], 펩타이드에 에탄올을 에스터 결합시키거나 [8] 혹은 D, L 아미노산의 분할하는데 [9] 사용되었다. 이후 Mintin 등 [10]은 파파인으로 N 말단이 보호된 여러 종류의 아미노산에 글리세롤을 에스터 결합시키는 반응을 성공하였다. 효소적 에스터화 반응의 촉매로 빈번하게 사용되는 트립신과 달리 파파인은 넓은 기질 특이성 [11]을 가지고 있으므로 다양한 기질에 글리세릴 에스터를 형성할 수 있을 것으로 예상된다.

따라서 본 연구에서는, 파파인으로 가수분해된 피브로인 펩타이드에 추가적으로 글리세롤을 공급하고 반응조건을 변화시켜 피브로인 펩타이드에 글리세릴 에스터 결합을 형성시키는 역반응을 시도하였다. 에스터 결합을 형성하기 위해서는 카복실기가 해리되지 않은 상태에서 -COOH의 OH기가 효소의 활성부위의 아미노산의 잔기와 수소결합을 형성한 후 분리되어야 하므로, 에스터화 반응은 펩타이드의 카복실기의 pKa 값보다 충분히 낮은 pH 3에서 과량의 글리세롤을 첨가하여 반응시키고 각각의 펩타이드의 글리세릴 에스터의 생성 여부는 전기분무 이온화형 질량분석기 (ESI-MS)를 이용하여 분석하였다. 아울러 생성된 글리세릴 에스터는 카복시 말단이 에스터화되어 중성용액에서 양전하를 띠는 점을 활용하여 이온교환수지 칼럼을 이용하여 회수하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 피브로인 펩타이드는 고농도의 염용액으로 가용화시킨 재생피브로인을 파파인으로 가수분해하여 제조하였다 [3]. 파파인 (crude papain, 1 U/mg), dithiothreitol, formic acid, trifluoroacetic acid (TFA) 및 acetonitrile은 Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA)에서 구매하였다.

글리세릴 에스터화 반응

피브로인 펩타이드를 최종농도가 10% (w/v) 되도록 글리

세롤 50% (w/v)를 포함한 반응용액 50 mL에 녹이고 1 N HCl 용액으로 pH를 3.0으로 조정하였다. 일반적으로 pH 3의 반응 조건에서 시트르산 완충용액이 사용되지만 피브로인 펩타이드 10% 용액 자체도 매우 높은 완충작용을 하므로 별도로 완충용액을 사용하지는 않았다. 여기에 파파인 1% (w/v) 및 dithiothreitol 0.5% (w/v)를 첨가한 후 반응액을 pH 3.0으로 다시 조정하고 40°C에서 6시간 동안 자력교반기로 교반하면서 반응시킨다.

피브로인 펩타이드의 글리세릴 에스터화 반응 분석

실리카 겔 TLC판 (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Berlin, Germany)의 전개 시작점에 시료를 수 마이크로리터 주입하고 건조시킨 후 전개용매로 n-butanol : acetic acid : water (12 : 3 : 5)를 사용하여 밀폐용기에서 전개시킨 후 꺼내어 상온에서 건조시켰다. 건조된 TLC판에 아세톤에 용해된 ninhydrin 용액 0.25% (w/v)를 분무하고 110°C에서 5분간 가열한 후 전개된 스팟을 관찰하였다. 반응액 혹은 용출액을 건조시킨 후 KBr 분말과 혼합하여 시료를 준비하고 FT-IR (FT/IR-3000, Bio-Rad, Cambridge, UK)을 이용하여 적외선영역에서의 스펙트럼을 관찰하여 반응여부를 확인한다.

펩타이드 에스터 반응물의 질량분석

반응물의 펩타이드의 조성을 확인하기 위하여 액체크로마토그래프와 전기분무 이온화 질량분석기 (LC-ESI-MS) (LCMS-2010, Shimidzu, Japan)를 사용하였다. 액체 크로마토그래피 칼럼은 C18 역상칼럼 (Alltima™ HP C18, 150 × 2.1 mm, Alltech, USA)을 사용하고, 시료는 acetic acid (1%, w/v)에 녹인 후 5 L 주입하고 이동상 용액은 acetic acid (0.1%, w/v)와 acetonitrile를 섞어 탈기 후 0.2 mL/min의 유속으로 흘러주며 칼럼의 온도는 항온 챔버에서 40°C로 유지하였다. 질량분석기는 양이온 모드에서 50에서 2000 m/z까지 스캔하여 질량스펙트럼을 얻었다. 펩타이드의 이론 분자량 및 질량은 펩타이드 질량 계산소프트웨어 (peptide mass calculator V3.2)를 사용하여 계산하였다 [12].

이온 교환수지 칼럼을 이용한 반응물의 회수

합성된 글리세릴 펩타이드를 회수하기 위하여 약산성 이온교환수지인 CM-Sepharose CL-6B 100 (Sigma, USA)을 인산완충용액 (KH₂PO₄ 10 mM, pH 7)에서 수화시킨 후 일회용 칼럼 (polypropylene, 20 x 150 mm)에 40 mL을 충전하고 동일한 완충용액을 주입하여 평형상태를 만들었다. 여기에 pH 7로 조절된 시료를 칼럼의 상단에 투입하고 스며들게 한 후 200 mL의 인산완충용액을 주입하여 흘러주면서 5 mL씩 시료를 취하고 이후 용출용액 (KH₂PO₄

200 mM, pH 9)을 주입하고 칼럼에서 배출되는 용액을 분획하여 회수하였다.

결과 및 고찰

피브로인 펩타이드의 글리세릴 에스터화 반응

과파인으로 가수분해된 피브로인 펩타이드를 농도가 각각 50, 60, 70, 80 및 90%의 글리세롤 용액에 최종농도 10% (w/v)이 되도록 녹이고 반응시킨 후 TLC를 이용하여 글리세릴 에스터 반응을 모니터 하였다. 글리세롤이 첨가되지 않은 대조시료에서 관찰되지 않는 새로운 스팟 ($R_f = 0.54$)이 글리세롤이 포함된 반응액 시료에서 모두 관찰되었으며, 스팟의 크기는 글리세롤의 농도가 증가하여도 변하지 않았다. 가수분해된 피브로인의 평균 분자량을 400 Da로 가정하였을 때 50%와 90%의 글리세롤은 몰비로 약 22.4배와 39배에 해당되어 역반응인 글리세릴 에스터 결합을 촉진시킬 수 있을 것으로 추정하였다. 그러나 생성물의 TLC 스팟의 크기에는 큰 변화가 없는 반면 반응액의 점도를 증가시키므로, 이후 실험에서는 글리세롤의 농도를 50%로 고정하여 에스터화 반응을 진행하였다.

에스터화 반응을 통하여 글리세릴 펩타이드가 제조되었는지 확인하기 위하여 LC-ESI-MS를 사용하여 반응 전 후의 시료를 분석하였다. C18 reverse phase 칼럼을 사용하여 반응물과 생성물의 시료의 크로마토그램을 얻었으나, 펩타이드 혼합물이 각각의 펩타이드의 피크로 완전하게 분리되는 조건을 찾을 수 없었다. 따라서 acetonitrile의 조성을 변화시켜 혼합물이 분리되지 않는 조건에서 얻어진 각각의 시료의 단일 피크의 정점에서 조성물의 질량 스펙트럼을 분석하였다 (Fig. 1). 피브로인 펩타이드의 질량 스펙트럼에는 피브로인에서 빈번하게 출현하는 디펩타이드 (di-peptide)인 AG, VG 및 YG의 $[M+H]^+$ 에 해당하는 피크가 147.10, 175.12 및 239.12 m/z에서 관찰되었으며 테트라펩타이드 (tetrapeptide)인 AGAG, AGYG, AGVG 및 AGSG와 헥사펩타이드 (hexapeptide)인 AGAGAG, AGAGSG, AGAGYG와 옥타펩타이드 (octapeptide)인 AGAGAGSG에 해당하는 큰 피크들이 관찰되었다. 이 결과는 과파인으로 가수분해된 피브로인 펩타이드의 조성이 짝수의 아미노산으로 구성되어 있다는 Jeong 등 [3]의 보고와 일치하였다. 이외에도 m/z 값이 188.15, 216.15 및 280.20에서 큰 피크가 관찰되는데 이들은 AG, VG 및 YG의 $[M+H]^+$ 에 해당하는 m/z 이론값 보다 각각 41.074, 41.042 및 41.097만큼 크다. 질량 증가분이 41에 해당하는 물질은 HPLC-ESI-MS에서 reverse phase C18 칼럼의 용매로 사용된 acetonitrile (41.052 Da)로 AG, VG 및 YG에 결합되어 검출된 것으로 보인다. ESI-MS로 펩타이드를 분석할 때 acetonitrile을 사용하면 +41 Da의 질량증가가 나타나는 경우가 이전의 연구에서도 보고되고 있다 [13].

반응후 시료의 질량스펙트럼에는 m/z 값이 221.20, 249.20, 313.22, 349.30인 새로운 피크가 추가로 관찰되었다 (Fig. 1(b)). 이 값들은 펩타이드 AG, VG, YG 및 AGAG의 $[M+H]^+$ 에 해당하는 m/z 값에 약 74 Da의 질량에 증가된 것이다. 글리세롤의 평균질량은 92.094 Da이고 ^{12}C 및 ^{14}N 으로 구성된 isotopic mass는 92.047 Da이다. 여기에 물분자 축합반응으로 수소 2원자와 산소 1원자의 질량 (18.01 Da)을 제하면 글리세릴 에스터화 반응에 의하여 증가되는 isotopic 질량 증가는 74.037 Da이다. 따라서 반응시료의 질량분석 스펙트럼은 글리세롤이 50% (w/v) 존재하는 pH 3의 반응조건에서 가수분해된 피브로인 펩타이드가 과파인에 의하여 글리세릴 에스터를 형성하였음을 나타내고 있다. 반응후 시료의 질량스펙트럼에서 질량이 74 Da 증가된 펩타이드의 질량에 해당하는 피크를 찾아 Table 1에 정리하였다. 반응전 시료에서 관찰되었던 헥사펩타이드와 옥타펩타이드에 해당하는 m/z 값에 +74 Da의 질량 이동에 해당하는 값을 가진 피크는 주로 스펙트럼의 백그라운드 수준의 이온화 정도의 값을 나타내거나 관찰되지 않았다. 반면 디펩타이드와 테트라펩타이드의 글리세릴 에스터에 해당하는 $[M+H]^+$ 의 m/z 값을 가지는 피크들이 주로 확인되었다.

Table 1. Major peaks in ESI-MS spectrum of papain hydrolysate of fibroin and their corresponding peptides with mass shift by glyceryl adduct were compared to the peaks found in the reaction mixture of glyceryl esterification

Peak (m/z)	Corresponding peptide ¹		mass shift by glyceryl adduct (+74.037) ²	Peaks at the reaction mixture of glyceryl esterification	
	Peptide	Theoretical $[M+H]^+$		m/z	Delta mass
147.10	AG	147.076	221.076	221.20	74.10
175.12	VG	175.108	249.108	249.20	74.08
239.12	YG	239.103	313.103	313.22	74.10
275.15	AGAG	275.135	349.135	349.30	74.15
291.15	AGSG	291.130	365.13	365.40	74.25
303.18	AGVG	303.166	377.166	377.30	74.12
367.18	AGYG	367.161	441.161	441.30	74.12
403.20	AGAGAG	403.194	477.194	477.25	74.05
419.21	AGAGSG	419.189	493.189	493.50	74.29
431.25	AGAGVG	431.225	505.225	N.F. ³	-
495.24	AGAGYG	495.220	569.220	N.F. ³	-
547.29	AGAGAGSG	547.247	621.247	621.85	74.56

¹ Calculated by Peptide Mass Calculator V3.2.

² Theoretical mass shift of glyceryl adduct.

³ Not found.

반응 후 시료의 질량스펙트럼에서는 104.15 및 134.15 m/z 값에서 새로운 피크가 관찰되는데, 이 값들은 글리신보다 28 및 58 Da의 질량 증가를 나타내며 formyl기 및 2-hydroxyethyl기가 첨가된 N-formylglycine과 N-(2-hydroxyethyl)glycine에 해당된다. 따라서 반응 시료에서 조성비가 가장 높은 펩타이드 AG가 분해되어 이와 같은 물질이 생성되었을

가능성이 높다. 그러나 파파인에 의하여 분해되었는지 혹은 낮은 pH 조건에서 화학적으로 분해되었는지는 더 이상 확인하지 않았다.

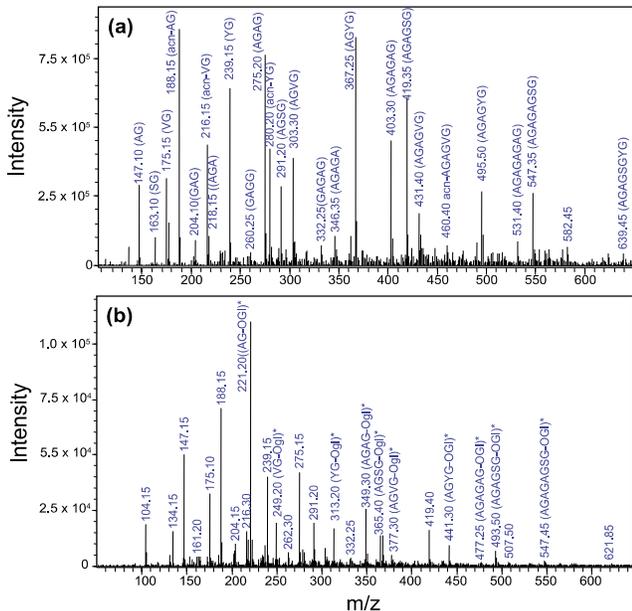


Fig. 1. ESI-MS spectra of papain hydrolysate of fibroin (a) and of the reaction mixture of glyceryl esterification of the hydrolysate (b) (* denotes peaks corresponding to glyceryl ester).

글리세릴 에스터 펩타이드의 조성 분석

반응 전후의 시료의 질량스펙트럼에서 주요 펩타이드에 해당하는 피크의 크기를 비교하여 펩타이드의 조성의 변화 및 반응 후 생성물의 조성을 분석하였다. 펩타이드는 질량 분석기에서 이온화되는 효율이 서로 달라 정량적인 비교가 어렵다. 예를 들어 당화 헤모글로빈 펩타이드의 당화도를 질량분석기를 이용하여 분석할 때 당화 펩타이드의 이온화 효율이 달라져 정량적인 비교를 위하여 이온화 효율의 보정이 필요하였다 [14]. 따라서 펩타이드의 글리세릴 에스터 역시 이온화 효율이 달라질 것으로 예상되므로 생성물의 조성 또한 정량적인 비교는 정확하지 않으므로 기존의 펩타이드의 조성 스펙트럼의 개별 피크들의 증감을 비교하여 반응전과 반응후의 조성물의 변화를 관찰하였다.

반응후 시료의 질량스펙트럼에서 가장 크기가 큰 피크는 221.20 m/z로 alanylglycine glycerol ester (AG-OGI)에 해당하지만 반응전 시료에서 크기가 큰 피크를 나타내었던 펩타이드 AGAG와 AGYG의 글리세릴 에스터의 $[M+H]^+$ 에 해당하는 349.30 및 441.30 m/z에서의 피크의 크기는 상대적으로 작게 나타났고 4개 이상의 아미노산으로 구성된 펩타이드에 해당하는 피크의 크기 역시 전체적으로 감소하였다. 이 결과는 글리세롤이 50% 포함된 낮은 pH의 반응 조건하에서도 피브로인 펩타이드가 더욱 가수분해 되었거나

글리세롤 에스터화 반응이 펩타이드 가수분해와 동시에 일어날 수 있음을 의미한다. 따라서 반응전 시료의 주요 펩타이드에 해당하는 피크의 크기 및 반응후에 남아있는 미반응 펩타이드 및 글리세릴 에스터 펩타이드에 해당하는 피크의 크기를 비교하였다 (Fig. 2). 반응전의 시료의 질량스펙트럼에서는 AG, AGAG, AGAGAG 및 AGAGAGAG에 해당하는 피크의 크기가 점차적으로 감소하였다. 반면 반응후에는 AGAGAG 및 AGAGAGAG에 해당하는 피크의 크기는 백그라운드 수준으로 감소하였고 AGAG에 해당하는 피크의 크기는 AG의 절반 이하로 감소하여 조성의 변화가 있음을 나타내었으며 글리세릴 에스터 반응은 펩타이드 AG와 AGAG에서 주로 관찰 되었다. 따라서, Fig. 2에서 미반응 펩타이드와 이에 상응하는 글리세릴 에스터의 피크의 강도를 비교하면 파파인의 에스터 반응의 기질 친화도는 AG > AGSG > SG > AGAG 순서로 확인된다.

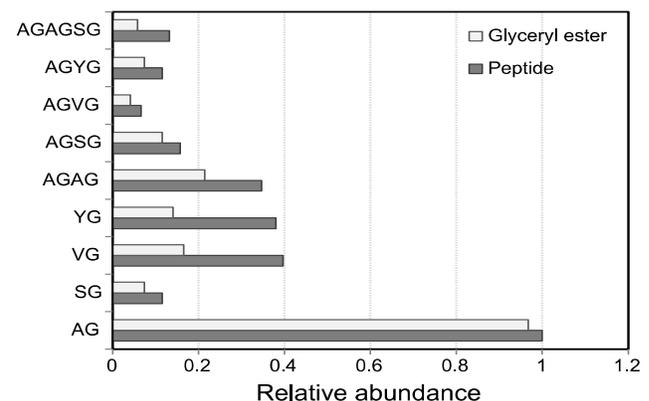


Fig. 2. Relative abundance of major peptides and their corresponding glyceryl esters determined by the peak intensities of ESI-MS spectra.

파파인의 기질특이성은 펩타이드 서열상의 7개의 아미노산 잔기 (P₁-P₄ 및 P₁-P₃)의 위치에 해당하는 7개의 활성부위 (S₁-S₄ and S₁-S₃)에 의하여 결정된다 [6]. 파파인의 가수분해 반응의 기질 특이성은 활성부위 S₂에 대응하는 펩타이드의 P₂ 위치에 공수성이나 방향족 잔기가 위치한 아미노산을 선호한다 [15]. Mintin 등 [10]은 N말단이 보호된 아미노산에 몰비로 50배의 글리세롤을 첨가하여 50-70%의 수율의 글리세릴 에스터를 얻었으나 발린, 이소류신 및 아스파틱산의 경우에는 수율이 10-15%로 감소하였고 그 이유는 기질특이성을 결정하는 P₁ 위치에 아미노산이 측쇄의 입체적 장애 (steric hindrance)에 기인한다고 설명하였다. 본 실험에서는 파파인의 에스터 형성반응에서 P₂ 위치에 세린이나 타이로신 보다 알라닌이 위치한 디펩타이드 기질을 선호하고, 테트라펩타이드의 경우 P₂ 위치에 알라닌이 있어도 기질 친화도가 디펩타이드 보다 떨어진다는 것을 알 수 있다.

글리세롤이 동시에 2개 이상의 펩타이드에 에스터화 반응이 되는 경우를 예상할 수 있다. 글리세릴 펩타이드 중에서 AG-O-glycerol의 빈도가 가장 높으므로 펩타이드 AG가 추가로

에스터화 반응된 *O,O*-Bis(alanylglycyl)glycerol이 생성되었을 수 있다. 이에 해당하는 $[M+H]^+$ 의 이론질량은 349.189 Da이며 2개의 alanylglycine의 N말단의 아민그룹에 양성자가 추가된 $[M+2H]^{2+}$ 의 이론질량은 350.189 Da이며 이에 해당하는 m/z 값은 175.094이나 기존의 강도가 높은 피크와 모두 중첩되어 *O,O*-Bis(alanylglycyl)glycerol의 생성 여부를 확인할 수 없었다. 두번째로 빈도가 높은 glyceryl-YG의 경우에 펩타이드 AG가 추가된 에스터화 반응을 통하여 결합된 *O*-(tyrosyl-glycyl)-*O*-(alanyl-glycyl)glycerol의 $[M+H]^+$ 의 이론질량은 441.257 Da이며 따라서 $[M+2H]^{2+}$ 의 이론질량은 442.257 Da이며 이에 해당하는 m/z 값은 221.130으로 계산되지만 역시 다른 주요 피크의 m/z 값과 중첩되어 글리세롤에 펩타이드 2 분자와 결합한 반응물의 존재 유무는 확인할 수 없었다.

반응물의 글리세릴 펩타이드의 회수

반응 후 시료의 질량 스펙트럼은 글리세릴 펩타이드와 미반응 펩타이드가 섞여 있음을 보여주고 있다. 따라서 글리세릴 펩타이드가 C말단에 글리세릴 에스터를 형성하여 중성 pH에서 양전하를 가지는 특성을 활용하여, 양이온교환수지 칼럼을 사용하여 미반응된 펩타이드와 글리세릴 펩타이드를 분획하였다 (Fig. 3). 시료를 주입한 후 중성 인산완충용액으로 200 mL을 흘려주며 5 mL 단위로 분획물을 얻었고 이중 20에서 70 mL까지의 분획시료에서 214 nm에서 높은 흡광도를 가지는 피크가 관찰되었다. 이후 pH 9인 용출용액으로 교환하여 220에서 250 mL 사이에서 다시 피크를 관찰할 수 있었다. 첫번째 피크는 미반응 펩타이드로 추정되며 중성에서 순전하가 0으로 양이온수지에 흡착되지 않고 바로 용출된 것으로 판단된다. 두번째 피크는 글리세릴 펩타이드로 추정되며 흡광도로 추정한 글리세릴 에스터화 반응의 수율은 17.8%로 나타났다. 고농도의 pH 9인 인산완충용액으로 용출된 분획이 글리세릴 펩타이드인지 확인하기 위하여 건조시킨 후 시료를 FT-IR을 사용하여 분석하였다 (Fig. 4). 피브로인 펩타이드 시료의 FT-IR 스펙트럼에서 amide I과 II는 1643 및 1522 cm^{-1} 에서 관찰되었고 카복실기는 1390 cm^{-1} 가 현저하게 사라지고 1200 cm^{-1} 이하에서 흡광도가 증가에서 관찰되었다. 반면 회수된 시료에서는 1390 cm^{-1} 의 피크하였다. 펩타이드 결합의 C=O 결합의 신축 진동을 나타내는 amide I 영역의 흡광은 1720-1600 cm^{-1} 의 영역에서 관찰되고 C-N 결합의 신축진동 및 C-N-H 결합의 변형 진동을 나타내는 amide II 영역은 1600-1480 cm^{-1} 의 영역에서 관찰되며 펩타이드의 C말단의 COO⁻ 결합의 진동은 1430-1360 cm^{-1} 의 영역에서 관찰되고, 글리세롤의 C-O 결합의 신축 진동은 1300-900 cm^{-1} 에서 주로 관찰되는 것으로 알려져 있다 [16]. 따라서 용출용액으로 사용된 인산염의 IR 영역에서의 흡광도도 혼합되어 있는 점과 COO⁻ 결합에 해당하는 흡광도 줄어드는 점을 함께 고려하면 용출된 시료는 글리세릴 펩타이드로 확인할 수 있었다.

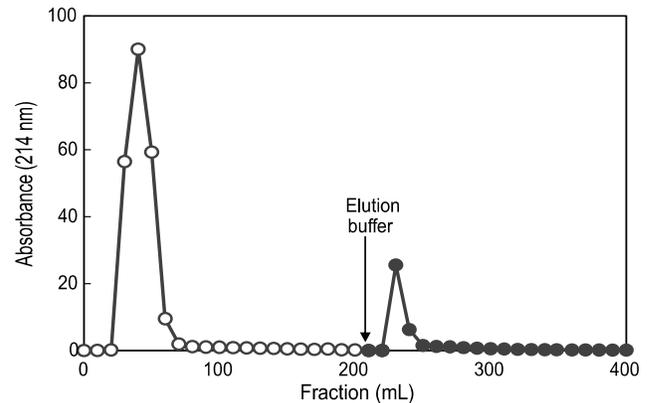


Fig. 3. Fractionation of the reaction mixture of glyceryl esterification of fibroin hydrolysate using ion-exchange chromatography.

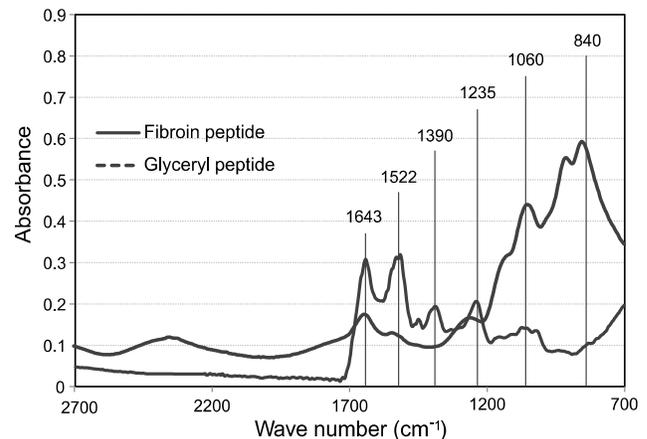


Fig. 4. FT-IR spectra of fibroin peptide and the fraction of glyceryl peptide from ion-exchange chromatography.

요약

본 연구에서는 파파인으로 가수분해된 피브로인 펩타이드에 글리세롤을 추가하고 동일한 효소인 파파인을 이용하여 글리세릴 에스터 결합을 형성시키는 반응을 수행하였다. 피브로인 펩타이드 10%와 글리세롤 50% 포함된 반응용액을 pH 3, 40°C의 반응 조건에서 글리세릴 에스터가 생성됨을 ESI 질량 분석을 통하여 확인하였다. 아울러 반응 전 시료의 펩타이드의 조성 and 생성된 글리세릴 펩타이드 에스터의 조성으로부터 헥사 및 옥타펩타이드의 비율은 감소하였고 디펩타이드와 테트라펩타이드의 글리세릴 에스터가 반응 생성물을 주로 구성되어 있으며 특히 AG-OGI의 조성이 증가하였음을 확인하였다. 글리세릴 펩타이드를 양이온교환수지 칼럼을 사용하여 미반응된 펩타이드와 분리하여 17.8%의 수율로 수득하였고, 이 시료를 FT-IR로 분석하여 펩타이드의 C말단의 COO⁻의 감소를 확인하여 글리세릴 펩타이드임을 재확인하였다.

접수 : 2010년 6월 4일, 게재승인 : 2010년 8월 23일

REFERENCES

1. Shimura, K., A. Kikuchi, K. Ohtomo, Y. Katagata, and A. Hyodo (1976) Studies on silk fibroin of *Bombyx mori*. I. Fractionation of fibroin prepared from the posterior silk gland. *J. Biochem. (Tokyo)* 80: 693-702.
2. Zhou, C., F. Confalonieri, M. Jacquet, R. Perasso, Z. G. Li, and J. Janin (2001) Silk fibroin: Structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 44: 119-122.
3. Jeong, J. and W. Hur (2010) Even-numbered peptides from a papain hydrolysate of silk fibroin. *J. Chromatogr. B* 878: 836-840.
4. Thacker, J. D., M. A. Brown, R. F. Rest, M. Purohit, S. Sassi-Gaha, and C. M. Artlett (2009) 1-Peptidyl-2-arachidonoyl-3-stearoyl-sn-glyceride: an immunologically active lipopeptide from goat serum (*Capra hircus*) is an endogenous damage-associated molecular pattern. *J. Nat. Prod.* 72: 1993-1999.
5. Moran, C., M. R. Infante, and P. Clapes (2002) Synthesis of glycerol amino acid-based surfactants. Part 2. Lipase-catalysed synthesis of 1-*O*-lauroyl-*rac*-glycero-3-*O*-(*N*_a-acetyl-L-amino acid) and 1,2-di-*O*-lauroyl-*rac*-glycero-3-*O*-(*N*_a-acetyl-L-amino acid) derivatives. *Org. Biomol. Chem.* 2002: 1124-1134.
6. Schechter, I. and A. Berger (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 27: 157-162.
7. Cantacuzene, D. and C. Guerreiro (1987) Papain catalyzed esterification of alanine by alcohols and diols. *Tetrahedron Lett.* 28: 5153-5156.
8. Kawashiro, K., H. Ishizaki, S. Sugiyama, and H. Hayashi (1993) Esterification of *N*-benzyloxycarbonyldipeptides in ethanol-water with immobilized papain. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 309-314.
9. Moriniere, J. L., B. Danree, J. Lemoine, and A. Guy (1988) Papain-assisted resolution of natural and xenobiotic α-amino acid. *Synth. Commun.* 18: 441-444.
10. Mitin, Y. V., K. Braun, and P. Kuhl (1997) Papain catalyzed synthesis of glyceryl esters of *N*-protected amino acids and peptides for the use in trypsin catalyzed peptide synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 54: 287-290.
11. Lowbridge, J. and J. S. Fruton (1974) Studies on the extended active site of papain. *J. Biol. Chem.* 249: 6754-6761.
12. Peptide mass calculator v3.2. <http://rna.rega.kuleuven.ac.be/masspec/pepcalc.htm>.(2010).
13. D'agostino, P. A., J. R. Hancock, and L. R. Provost (1999) Packed capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry analysis of organophosphorus chemical warfare agents. *J. Chromatogr. A* 840: 289-294.
14. Nakanishi, T. and A. Shimizu (2000) Determination of ionization efficiency of glycosylated and non-glycosylated peptides from the N-terminal of hemoglobin-chain by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 746: 83-89.
15. Kimmel, J. R. and E. L. Smith (1957) The properties of papain. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 19: 267-334.
16. Déléris, G. and C. Petibois (2003) Applications of FT-IR spectrometry to plasma contents analysis and monitoring. *Vib. Spectrosc.* 32: 129-136.