

Bacillus licheniformis 蛋白質 分解 酵素에 의한 精練 絹絲의 特性
III. 絹 피브로인 水溶液의 舉動

金榮大 · 南重熙*

農村振興廳 蠶業試驗場, *서울대학교 農業生命科學大學

Physicochemical Characteristics of Silk Fibroin Degummed by
Protease in *Bacillus licheniformis*

III. Behavior in Aqueous Solution of Silk Fibroin

Yung Dae Kim and Joong Hee Nahm*

Sericultural Experiment Station, RDA, Suwon, Korea

*College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

It has been known that the silk degumming treated by hot alkali solution is easy to handle but is liable to yield poor-quality silk due to the degree of degumming loss, incomplete-degumming or over-degumming. Therefore, many studies have been carried out on the silk degumming by enzyme in order to improve the quality of silk. However, no attention has been paid to the physicochemical analysis of enzymatic degummed silk.

In this paper, two different degumming methods, soap and enzymatic, are compared in aqueous solution state of silk fibroin.

The results can be summarized as follows:

There was no significant difference between two solutions on the bases of polarizing microscopy, TEM observation and SDS-PAGE. Spherulite of silk fibroin was not observed in polarizing microscopy, however the leaf-shape fibril structure was developed upon solidification. The size of spherulites of silk fibroin in TEM observation were 30~120 nm with a wide range of size distribution. The intrinsic viscosity of enzymatic degummed fibroin solution was lower than that of soap degummed solution. This can be explained that the silk fibroin was more degraded by enzymatic degumming method compared with the soap degumming method. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed that the fibroin molecule was composed of large component of molecule weight above 50 kd and small component of molecule weight about 20 kd. There was no difference in crystallinity between two degumming methods on the bases of results of DSC thermograms and IR spectra.

Key words : Silk fibroin, fibroin aqueous solution, silk degumming, degradation, crystallinity

序 論

生絲의 精練 과정에서 精練 처리의 양부는 絹의 성질을 변화시키고 絹織物의 품질에 크게 영향을 미친다. 絹絲의 精練 방법으로는 알카리성 약품 및 熱을

이용하는 방법과 蛋白質 分解 酵素를 이용하는 방법으로 크게 나눌 수 있으며, 비누 精練과 酵素 精練이 絹絲의 물성에 미치는 영향을 精練 機構에서 볼 때 두 가지 점에서 차이가 있다고 생각할 수 있는데, 첫째는 비누와 酵素의 絹絲에 대한 직접적인 영향으로

비누 精練은 세리신의 解膠作用에 의하여 주로 精練 되는데 비하여 酵素 精練은 polypeptide의 절단에 의하여 精練이 행하여 진다는 점이며, 둘째는 비누 精練과 酵素 精練의 간접적인 영향으로 비누 精練은 고온(98°C 내외)에서 처리하는데 비하여 酵素 精練은 비교적 온화한 온도(55°C)에서 처리하는데 따른 처리 온도가 絹絲에 미치는 영향이 차이가 있을 것으로 생각하고 실험한 결과를 前報(金·南 1992)에 보고 하였다. 이번에는 위와같은 精練 機構의 차이를 絹 피브로인 수용액 상태에서 분석하고자 하였다.

絹 피브로인의 構造를 연구하기 위하여는 먼저 피브로인을 可溶化시키지 않으면 안되는데 이때 피브로인이 될 수 있는대로 損傷을 받지 않은 방법이 요구되며 絹 피브로인 水溶液은 繭絲 혹은 絹絲를 될 수 있는 한 polypeptide chain을 끊지 않으면서 분자간 수소 결합을 풀어 수용성으로 한 것이다(小西 1980).

絹 피브로인 水溶液에 관한 보고로 奥山·德武(1984)는 피브로인의 溶解 방법을 정리하여 보고하였는데 絹 피브로인 용해 약제로는 濃磷酸, 濃鹽酸, 濃黃酸, lithium bromide, lithium thiocyanate, lithium iodide, calcium nitrate, zinc chloride, stannic chloride, barium hydroxide, calcium hydroxide, calcium bromide, dichloroacetic acid, trifluoroacetic acid, ethylenediamine-cupric hydroxide와 calcium chloride-water-alcohol 混合液 등이 있다고 하였다. 이 가운데서 본 실험에서 사용한 絹 fibroin 溶解 藥劑에 대한 연구 보고를 보면 小西 等(1967, 1970a)은 8% ethylenediamine 용액에 6%가 되도록 cupric hydroxide를 加해 混合한 후 不溶物을 원심 분리하여 제거하고 이 용액 20~25 ml에 絹 fibroin 2g를 용해하고 용해 직후에 10% acetic acid로 pH 6.8로 中和하여 銅 이온이 없어 질때까지 透析하여 絹 fibroin 水溶液을 얻었다. 또 味澤(1969)은 $CaCl_2 \cdot H_2O \cdot ROH$ 의 3成分系 溶液에 의한 絹 fibron 용해는 $CaCl_2 \cdot H_2O \cdot ROH = 1 : 8 : 2$ (몰비)이었을 때 최대 용해량을 나타낸다고 하였고 絹 fibroin은 $CaCl_2 \cdot H_2O$ 溶液에는 용해하지만 $CaCl_2 \cdot ROH$ 溶液에서는 거의 溶解하지 않으며 $CaCl_2 \cdot H_2O$ 溶液에 ROH를 첨가하면 絹 fibroin 溶解는 감소할 것이라고 생각하지만 오히려 증대되는데 이와같은 원인은 纖維狀 fibroin이 복잡한 微細 構造를 가지고 있고 그 溶解 反應에는 용액의 滲透, 膨潤의 難易가 因子로서 작용하기 때문에 滲透性이 큰 ROH의 첨가는 $CaCl_2 \cdot H_2O$ 용액의 滲透性을 높혀 溶解性을 증대시키기 때문이라 추측했다. 그러나 ROH의 첨가가 적당량을 넘으면 단백질에 대한 凝固 作用의 편이 우선해서 용해 작용은 저하되는 것이라고

추정했다.

溶解 條件에 따른 분자량의 변화를 보면 胡 等(1990)은 精練絹을 50% calcium chloride 溶液에서 용해할 때 粘度에 의하여 分子量을 구한 결과 煮沸 溶解 時間이 10分일 때는 分子量이 35万이지만 시간이 경과하면 급속히 감소하여 2시간이 지나면 16.6万, 4시간이 지나면 3.5万이 된다고 하였는데, 塚田 等(1990)은 lithium bromide 水溶液으로 後藤 等(1990)은 lithium thiocyanate 水溶液으로 絹絲를 溶解해서 얻은 再生絹 피브로인의 溶解 特性에 관한 試驗 結果 溶解할 때의 온도와 시간이 달라도 分子量은 2万 내지 3万~20万인 것이 SDS-電氣泳動 結果 밝혀졌고 再生絹 피브로인의 分子 形態와 아미노산 조성도 큰 차이가 없는 것을 확인하였다.

絹 피브로인 水溶液의 分子 構造를 보면 塚田·平林(1983)은 絹絲腺에서 摘出した 未變性 피브로인과 絹絲를 飽和 lithium bromide에 溶解해서 얻은 再生絹 피브로인의 分子 形態는 再生絹 피브로인의 分子 形態가 random coil인데 반하여 未變性 피브로인은 α -helix의 형태를 취하는 것이 포함되어 있는데 그 含有率은 5齡의 經過 日數에 따라서 증가한다고 하였다.

絹 피브로인 水溶液을 casting하여 얻은 絹 피브로인의 구조는 水溶液으로부터 film을 만들 때의 온도가 40°C 이하에서는 silk I型이 얻어지지만 40°C 이상에서는 silk II型이 얻어지면(清水 1941), 馬越 等(1973a)은 結晶化가 생기는 濃度는 65% 내외이고 건조 온도 0~40°C에서는 α 型(silk I型), 50°C 이상과 0°C 이하에서는 β 型(silk II型)이 된다고 하였고, Magoshi *et al.*(1979)은 絹絲腺 피브로인은 60°C 이하에서 浸漬하면 random coil 구조는 α 型, 70°C 이상에서는 α 型和 β 型이 混合되어 나타나며 浸漬 溫度가 높아질수록 random coil의 전이 비율이 높아진다고 하였다.

絹 피브로인 水溶液의 結晶 構造에 관한 연구로 Lucas *et al.*(1957, 1962)은 絹 피브로인 水溶液을 chymotrypsin으로 처리하면 約 60%의 沈澱物인 結晶部分(Fcp)과 나머지 約 40%의 溶解性인 非結晶部分으로 분리되는데 이들에 대한 amino acid sequences를 보고하였고, 小西 等(1967, 1970b)에 의하면 Fcp은 피브로인 β 型的 X선 回折像을 나타내나 Fcp을 다시 용해하고 透析 沈澱시킨 沈澱物(Fcp 1x)은 피브로인 α 型的 X선 回折像을 나타낸다고 하였다. 또 Fcp의 結晶 形態는 棒像 粒子가 보이지만 酵素 加水分解 시간을 단축하면 sheaf-like한 結晶이 얻어진다고 하였다.

絹絲에 관한 연구중 絹을 非衣料 素材로서 활용하려고 하는 연구로는 絹을 일단 水溶液으로 만든 다음 여러 종류의 용도를 모색하려고 하고 있다(平林·朝倉, 1989; 平林, 1989; 中山, 1989). 再生絹 水溶液을 원료로 溶液·粉末·膜·多孔質體 등 다른 形成物의 조제가 용이하게 되고 용도에 맞추어서 成形이 가능하게 되기 때문이다(塚田 등, 1990).

이상과 같은 연구 배경아래 前報(金·南, 1992, 1993)에서는 製絲 과정에서 變性を 받는 시료인 생사를 이용하였으나 본 실험에서는 繭層을 자연 건조함으로써 變性を 받지 않은 試料를 精練法을 달리한 絹 피브로인에 대하여 絹 피브로인 水溶液 상태에서 분자 구조상의 차이가 있는지를 구명하고자 널리 사용되고 있으며 溶解할 때 비교적 피브로인에 대한 degradation이 적은 두가지 溶解法으로 만든 絹 피브로인 水溶液에 대하여 水溶液 상태에서의 차이를 밝히고자 絹 피브로인 水溶液의 이화학적 특성을 분석 비교 검토하였다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

供試 繭層은 표준 온습도로 飼育하고 上族한 “陽秋” 品種의 고치를 自然 溫度에서 건조한 뒤 약 7 mm×7 mm의 크기로 자르고 酵素 精練은 繭層을 4~6層으로 다시 나누어 前報(金·南, 1992)와 같이 精練한 다음 精製하여 試料로 하였다.

2. 피브로인 水溶液의 調製

Cupric Hydroxide와 Ethylenediamine의 混合 溶液에 의한 法(以下 Cu-Ed法이라 한다)은 蒸溜水 25 ml에 ethylenediamine 2.6 ml와 cupric hydroxide 2.0 g의 混合 溶液을 15시간 攪拌하여 10분간 3000 rpm에서 遠心 分離하여 未溶解 成分을 제거한 뒤 fibroin 1.5g을 실온에서 용해하고 冷水 中에서 50% acetic acid 3.2 ml를 가해 中和한 뒤 증류수에서 透析하였다. 透析은 透析 外液에 ferrous ammonium sulfate를 가할 때 주황색이 나타나지 않을 때까지 하였다.

Calcium Chloride와 Ethanol에 의한 法(이하 Ca-Ed法이라 한다)은 味澤(1969)의 방법에 따라 CaCl₂·H₂O·C₂H₅OH의 mol비를 1:8:2하고 混合 溶液 40 ml에 fibroin 1.2g를 沸騰點에서 20分間 處理한 뒤 蒸溜水에 4일간 透析하였다.

透析이 끝난 絹 피브로인 水溶液은 0°C에서 24時間 定置하여 沈澱된 未溶解 殘渣를 제거하고 0°C에 보관하여 사용하였다.

3. 分析 方法

絹 피브로인 水溶液의 농도로 吸光度 276 nm에서 E276^{1%} = 11.5(Pandit *et al.*, 1972)로 농도를 조정하였고 偏光 顯微鏡 觀察은 絹 피브로인 濃度 1%의 水溶液을 slide glass 위에 몇 방울 떨어뜨린 뒤 약 3時間 後에 偏光 顯微鏡의 直交 coil하에서 관찰하였다.

TEM 觀察은 絹 피브로인 水溶液을 1%로 조정한 뒤 2%의 PTA 染色液으로 染色하여 電子 顯微鏡(Hu-11)으로 관찰하였다.

粘度의 측정은 Cannon-fensks 粘度計로 25.0°C의 精密 恒溫 水槽에서 絹 피브로인 水溶液의 濃度別로 0.2 M NaCl을 첨가하여 시료를 粘度計에 넣고 25分 뒤 측정하였다. 여러가지 絹 피브로인 수용액의 濃度(c)에서 specific viscosity와 reduced viscosity를 계산하고 C=0에서 외삽하여 intrinsic viscosity를 구하였다.

電氣 泳動은 Laemml(1970) 방법에 따라서 준비된 각 시료에 sample buffer(0.0625 M tris-HCl(pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue)을 첨가하고 20°C에서 1시간 방치한 후 시료로 사용하였다. 농축 gel은 acrylamide 2.5%, 분리 gel은 acrylamide 11%로 만들어 well당 40 μl의 시료를 넣어 농축 gel 중에서는 20 mA, 분리 gel에서는 30 mA로 전류를 공급하면서 실온에서 전기 영동하였다. 영동이 끝난 gel은 염색액(acetic acid : methanol : 증류수 = 10 : 40 : 50; 0.1% coomassie brilliant blue)에서 2시간 이상 염색한 다음 脫色液(acetic acid : methanol : 증류수 = 10 : 40 : 50)으로 gel 배경이 깨끗해질 때까지 탈색하였다.

DSC 分析은 絹 피브로인 水溶液을 冷凍 乾燥시켜 만든 분말을 前報(金·南, 1992)와 같은 방법으로 測定하였고, IR 分析은 비누와 酵素 精練絹을 Cu-Ed法으로 용해한 絹 피브로인 水溶液을 실온에서 送風 乾燥하여 만든 시료를 赤外線 分光光度計(Hitachi, 270~50型)로 분석하였다.

結果 및 考察

1. 偏光 顯微鏡 觀察

絹 피브로인 水溶液의 凝固 형태를 알기 위하여 偏光 顯微鏡으로 관찰한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 絹 피브로인 水溶液의 응고 형태는 葉脈像으로 보이며 비누 精練과 酵素 精練 사이에는 차이가 없었고 용해 방법에 따른 차이도 없었다. 祖父江·石川(1961)은 液狀絹 피브로인과 세리신에 대하여 偏光

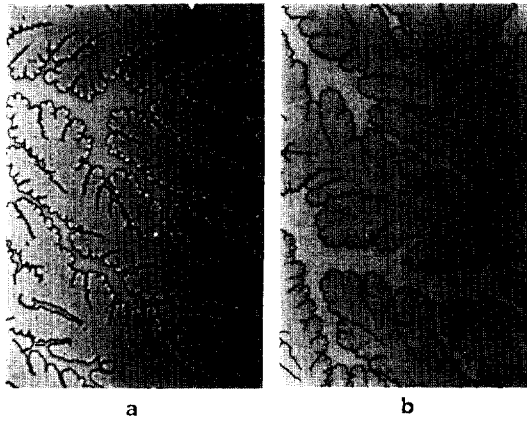


Fig. 1. Polarizing microscopic features of aggregated silk fibroin aqueous solution degummed by soap(a) and enzyme(b), dissolved in ethylenediamine-cupric hydroxide.

顯微鏡의 直交 코일 下에서 관찰하면 피브로인의 球晶은 최대 크기가 直徑 0.01 mm 内外이고 세리신은 0.06 mm의 球晶이 관찰된다고 하였다. 平林 等(1968)도 偏光 顯微鏡으로 絹絲腺 피브로인에서 온도 변화에 따른 球晶의 발생을 관찰한 결과 球晶의 발생은 온도 50°C 以下에서 나타나고 pH 변화에 따라서는 pH 5 부근에서만 나타나지 않는데 이것은 絹絲腺의 pH는 5附近이므로 絹 피브로인이 結晶化되기 어렵기 때문이라 생각하였다. 또 絹 피브로인의 球晶은 α型 結晶 形態를 나타내고 표면구조는 다른 線狀 高分子와 同一이며 鉤狀 高分子는 β型 結晶 形態를 취한다고 하였고, 塚田(1985)도 絹絲線을 偏光 顯微鏡으로 관찰하면 球晶을 관찰할 수 있는데 球晶 析出물을 얻을 수 있는 온도의 범위는 5~40°C 라고 하였다. 皆川 (1980)도 蛋白質의 합성이 급속히 진행해서 肥大해진 熟蠶의 後部 液狀絹을 질소 기류중에서 風乾하여 電子 顯微鏡으로 直徑 100~150Å의 球狀의 피브로인 粒子가 分散되어 있는 상태가 관찰된다고 하였다. 본 실험에서 偏光 顯微鏡 觀察 결과 球晶은 관찰되지 않았으나 나무잎 모양의 피브릴 구조가 잘 발달되어 있는 것으로 나타났다.

2. 電子 顯微鏡 觀察

絹 피브로인 水溶液을 2% PTA로 染色하여 透過 電子 顯微鏡으로 관찰한 결과는 Fig. 2와 같은데 絹絲는 작은 球型이 모여서 포도상 내지 염주상을 하고 있으며 絹絲의 精練 條件이나 絹 피브로인의 溶解 方法에 따른 차이는 발견할 수 없었다. 또 球晶의

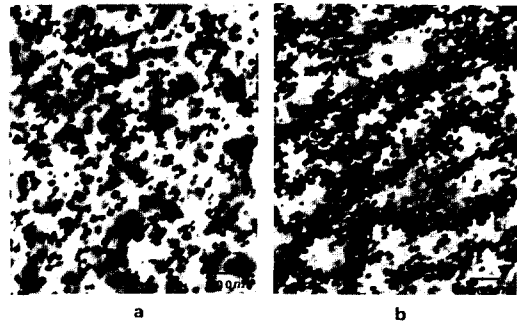


Fig. 2. TEM micrographs of silk fibroin aqueous solution degummed by soap(a) and enzyme(b), dissolved in ethylenediamine-cupric hydroxide.

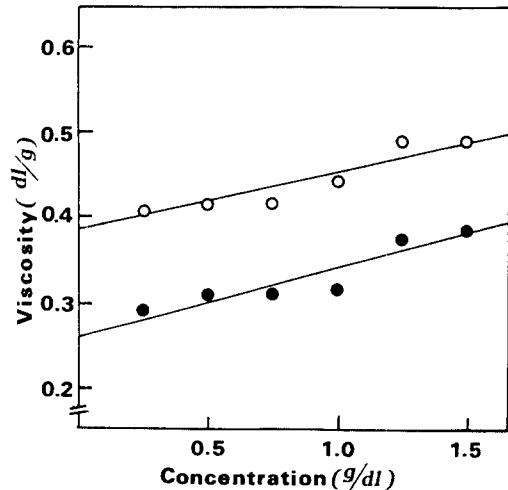


Fig. 3. The reduced viscosities of silk fibroin aqueous solution dissolved in ethylenediamine-cupric hydroxide ○: soap degumming, ●: enzymatic degumming.

크기도 30~120 nm로서 變異가 커서 단적으로 말할 수 없으나 精練 條件에 따른 차이는 크지 않았다.

3. 絹 피브로인 水溶液의 粘度

Cu-Ed法과 Ca-Et法에 의한 비누 및 酵素 精練 絹 피브로인 水溶液의 intrinsic viscosity는 각각 Fig. 3과 Fig. 4와 같다. 비누 精練 絹 피브로인 水溶液의 intrinsic viscosity를 溶解 方法別로 보면 Cu-Ed法은 0.38 dl/g이었고 Ca-Et法은 0.42 dl/g이었으며, 酵素 精練 絹 피브로인 水溶液의 intrinsic viscosity를 溶解 方法別로 보면 Cu-Ed法은 0.27 dl/g이었고 Ca-Et法은 0.30 dl/g으로서 비누 精練 絹 피브로인 水溶液보다 酵素

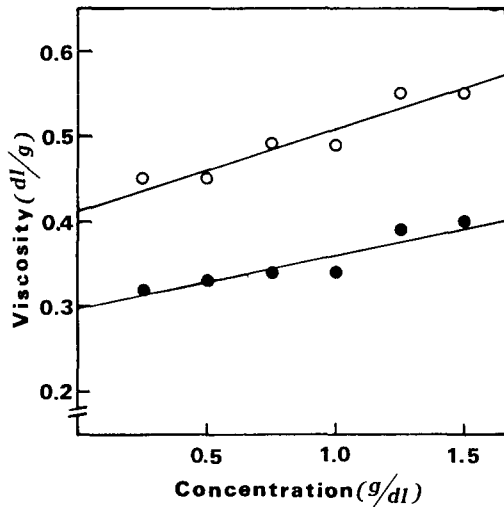


Fig. 4. The reduced viscosities of silk fibroin aqueous solution dissolved in calcium chloride-ethanol-water ○; soap degumming, ●; enzymatic degumming.

精練 絹 피브로인 水溶液의 intrinsic viscosity가 낮았고 같은 방법으로 精練한 絹 피브로인 水溶液의 intrinsic viscosity를 비교하면 Cu-Ed法으로 溶解하였을 때 약간 낮은 경향을 나타냈다.

Iizuka and Yang(1968)은 피브로인 水溶液은 쉽게 fibril을 형성하기 때문에 粘度 測定이 어려우므로 0.2 M NaCl을 첨가하여 측정한 결과 intrinsic viscosity (η)은 0.33 dl/g이었고, Pandit *et al.*(1972)은 絹 피브로인의 점도(η)에 관한 보고에서 native globular protein은 분자량에 관계없이 η 의 값이 3~4 cc/g인데 絹 피브로인은 이보다 훨씬 높은 값을 가지므로 絹 피브로인의 분자 형태는 球晶이 아니라고 하였다. 또 globular protein은 denaturation에 의하여 η 의 값이 증가하는데 denaturing solvent의 존재하에서 η 를 측정하는 것이 흥미있는 일이라고 하였으며 0.1 M NKO_3 을 첨가한 絹 피브로인 水溶液에서 11.5 cc/g을 얻었다.

Sagar *et al.*(1978)은 lithium thocyanate로 溶解한 silk protein의 0.1 M KCl 水溶液에서 intrinsic viscosity는 60 ml/g이었고, 4 M urea를 첨가하면 80 ml/g으로 증가하는데 urea의 첨가는 hydrodynamic volume의 증가로 분자 구조가 느슨 해지기 때문이라 하였으며, sodium carbonate로 精練해서 얻은 絹 피브로인은 10 ml/g 정도라고 하였다.

본 실험 결과 비누 精練 絹 피브로인 水溶液보다 酵素 精練 絹 피브로인 水溶液의 intrinsic viscosity는 감소하였는데 위의 보고와 관련하여 보면 酵素

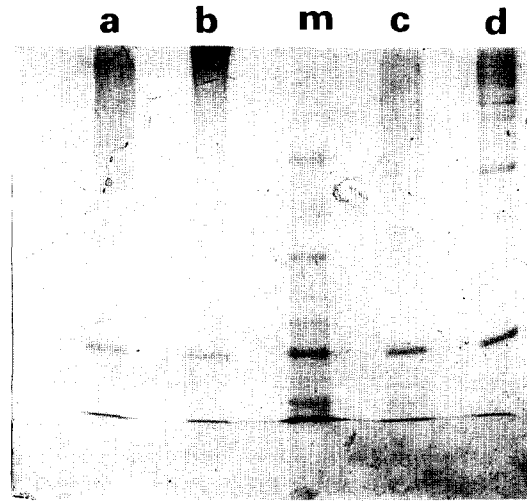


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electropherograms of silk fibroin solution a; soap degummed and dissolved in ethylenediamine-cupric hydroxide, b; enzymatic degummed and dissolved in ethylenediamine-cupric hydroxide, c; soap degummed and dissolved in calcium chloride-ethanol-water, d; enzymatic degummed and dissolved in calcium chloride-ethanol-water Standard protein markers (m) were bovine albumin (66 kd), egg albumin (45 kd), G-3-P dehydrogenase (36 kd), carbonic anhydrase (29 kd), trypsinogen (24 kd), trypsin inhibitor(20.1 kd) and α -lactalbumin (14 kd). 11% SDS-gels were used and the proteins were stained with coomassie brilliant blue R.

精練 絹絲는 精練 과정에서 비누 精練 絹絲보다 많이 變性을 받은 것으로 생각되며 이것은 前報(金·南, 1992)에서 酵素 精練의 경우가 粘度 값이 낮다는 결과와 일치한다.

4. 絹 피브로인 水溶液의 電氣 泳動像

비누 精練과 酵素 精練 絹絲에 대하여 絹 피브로인의 용해 방법에 따른 絹 피브로인 水溶液의 分子量 分布를 구명하기 위하여 電氣 泳動 실험 결과는 Fig. 5와 같은데 精練 방법에는 관계없이 약 20 kd에서 small subunit, 약 50 kd 이상에서 large subunit에 해당하는 폭넓은 band가 나타났다.

絹 피브로인의 分子量과 subunit 구조에 대하여 Tashiro and Otsuki(1970a, b, 1972)는 中部 絹絲腺으로부터 抽出한 液狀絹 피브로인의 超遠心法에 의한 分子量은 $32\sim 42 \times 10^4$ 이고 major homogeneous component와 minor heterogenous low molecular weight component가 disulfide bond로 결합되어 있

다고 한 이래, Sasaki and Noda(1973)도 SDS 電氣泳動, 沈降 平衡法과 粘度 測定 등으로 絹絲腺 피브로인 分子는 分子量 2.6×10^4 의 3개의 small component와 分子量 2.8×10^5 의 1개의 large component가 disulfide bond로 결합되어 있다고 하였다. Shimura *et al.*(1982)은 絹絲線 피브로인을 mercaptoethanol과 같은 還元劑로 處理하면 電氣泳動 移動도에 따라 2개의 band가 나타나는데 큰 편의 subunit의 分子量은 3.5×10^5 이고 작은편은 2.5×10^4 이었고 染色 濃度の 測定에서 兩 subunit의 mol 比는 1:1로 추정하였다. Sprague(1975)은 中部 絹絲腺에서 抽出한 피브로인을 SDS-polyacrylamide 電氣泳動한 결과 移動도가 약간 다른 2개의 band가 있는데 이들의 분자량은 약 350,000이었고 이들 두 polypeptide의 아미노산 분석 결과 차이가 없다고 하였으며 건층은 2% Na_2CO_3 , 100°C 처리로 얻은 피브로인을 電氣泳動한 결과 30분 처리에서도 심하게 degradation이 일어난다고 하였다. Gamo *et al.*(1977)은 熟蠶 絹絲腺에서 얻은 피브로인을 PAGE로부터 분자량 2.5×10^4 의 light polypeptide와 2.6×10^5 의 heavy polypeptide로 되어있고 disulfide bond로 가교되어 있다고 하였다.

한편 森 等(1989)은 凝固 絹絲腺 피브로인을 Li-SCN으로 용해하여 정제한 피브로인에 protease를 반응시킨 뒤 電氣泳動한 결과 fibroin subunit의 H鎖와 L鎖의 band가 消失되고 새로운 低分子의 band가 나타나는 것을 확인하고 酵素에 의하여 피브로인도 어느 정도 分解가 일어난다고 추측하였으나, 森 等(1990)의 絹織物에 대한 酵素 精練에서는 fibroin subunit의 영동 pattern의 변화는 없었으나 sodium carbonate로 전처리한 뒤 酵素 精練하면 fibroin subunit의 H鎖와 L鎖의 分解가 인정된다고 하였다. 塚田 等(1990)은 lithium bromide로 용해한 絹피브로인 水溶液을 7.5%와 12%의 acrylamide gel에 의한 電氣泳動한 결과 용해 조건이 달라도泳動 pattern에는 변화가 보이지 않았으며 어떤 絹 피브로인 시료도 2万 내지 3万에서 20万 以上에 이르는 폭넓은 分布를 이룬다고 하였다. 後藤 等(1990)도 lithium thiocyanate로 용해한 絹 피브로인 水溶液에 대한 전기 영동 실험에서 용해 조건이 달라도 再生絹 피브로인 시료는 2~3万 이상의 폭넓은 분자량 분포를 가지는 泳動像을 나타내며 분자량 2万 以下の 영역에서도 복수의 band가 나타나고 분자량 6万의 분자량에서도 이동도가 다른 2종류의 sharp 한 band가 관찰된다고 하였는데 본 실험 결과에 의하면 精練 방법에 따른 영동 pattern의 변화는 인정할 수 없었으며 다만 Ca-Et법으로 용해한 絹 피브로인 水溶液

에서만 50 kd 이상의 large subunit에서 移動도가 따른 여러 개의 sharp한 band가 관찰되었다.

5. 冷凍 乾燥 粉末의 熱的 舉動

再生絹 피브로인의 熱的 舉動을 알기 위하여 精練絹 피브로인을 溶解한 피브로인 水溶液을 凍結 乾燥하여 얻은 粉末에 대하여 DSC thermogram을 보면 비누 精練 絹絲는 Fig. 6 酵素 精練 絹絲는 Fig. 7과 같으며 熱分解에 따른 吸熱 peak 溫度는 비누 精練絹에서 Cu-Ed法으로 용해한 絹 피브로인 水溶液은 290.6°C

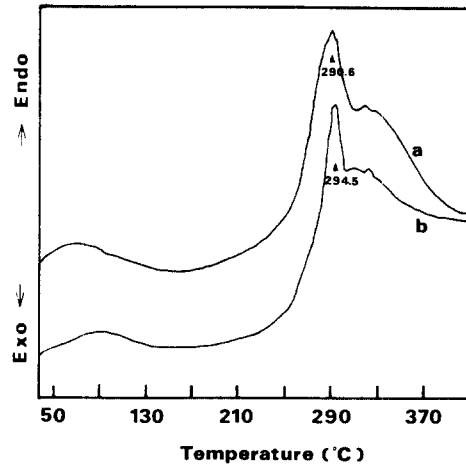


Fig. 6. DSC thermograms of soap degummed silk fibroin powder a: dissolved in ethylenediamine-cupric hydroxide, b: dissolved in calcium chloride-ethanol-water.

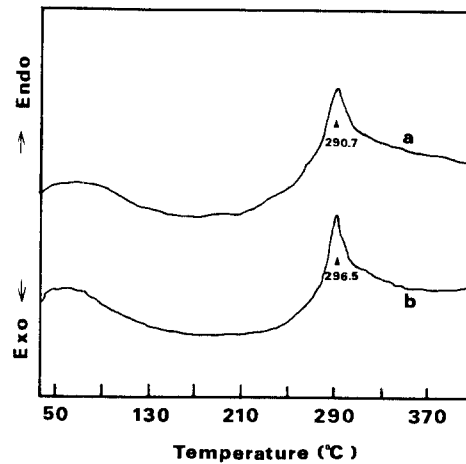


Fig. 7. DSC thermograms of enzymatic degummed silk fibroin powder a: dissolved in ethylenediamine-cupric hydroxide, b: dissolved in calcium chloride-ethanol-water.

이었고, Cu-Et法으로 溶解한 水溶液은 294.5°C 이었으며, 酵素 精練絹을 Cu-Ed法으로 溶解한 絹 피브로인 水溶液은 290.7°C 이었고, Ca-Et法으로 溶解한 水溶液은 296.5°C 이었다. 精練 방법에 따른 吸熱 peak 溫度의 차이는 없었고 용해 방법에 따른 吸熱 peak 온도는 Cu-Ed法으로 용해하였을 때 낮았다.

後藤 等(1990)은 9 M LiSCN으로 용해한 再生絹 피브로인의 DSC thermogram에서 176°C 에서 吸熱 peak와, 180~210°C 에서 폭넓은 吸熱 peak가 나타나며 發熱 peak는 222°C 에서, 銳利한 吸熱 peak은 280°C 에서 나타난다고 하였으며 溶解 온도가 60°C 에서 50~30°C 로 낮아질수록 280°C 부근에서 나타나는 peak은 高溫側으로 移行하는 傾向이라고 하였다.

前報(金 · 南, 1992)에서는 酵素 精練 絹絲의 열 분해에 따른 吸熱 peak은 비누 精練 絹絲에 비하여 약 10°C 내외 높았으나 酵素 精練 絹絲와 비누 精練 絹絲를 용해한 水溶液을 다시 冷凍 乾燥하여 얻은 시료에 대한 吸熱 peak 온도의 차이는 精練 방법에 따른 차이가 없었는데, 이와같은 이유는 시료로 이용한 자연 건조한 繭層은 前報(金 · 南, 1992, 1993)에서 變性을 받은 生絲와는 달리 結晶性和 配向성이 낮은 상태이기 때문에 精練 絹絲도 결정성의 차이가 없는 것으로 추측되며 또 피브로인의 용해 과정과 건조 과정을 거치는 동안 精練 효과가 소실되었기 때문이라 추측된다.

6. IR spectrum에 의한 分析

精練 방법에 따른 再生絹 피브로인의 分子 形態를 알기 위하여 絹 피브로인을 Cu-Ed法으로 溶解한 피브로인 水溶液을 送風 乾燥하여 얻은 시료의 infrared spectrum은 Fig. 8과 같으며 精練 조건에 관계없이 silk II型에 해당하는 1635, 1233, 998, 975 cm^{-1} 의 band와 silk I型에 해당하는 1665, 1535, 1015, 645 cm^{-1} 의 band가 동시에 나타났다. 즉 絹 피브로인 水溶液의 분자 구조는 精練 방법에 따른 차이는 적었다.

絹 피브로인의 結晶 構造는 crank shaft 構造를 가진 不安定型의 silk I型(α 型)과 anti-parallel β -pleated sheet 구조를 가진 silk II型(β 型)이 있다(平林, 1984; 石川 · 奈倉, 1983). 奈倉 等(1984)은 이들의 微細 構造에서 silk I型 結晶과 random coil이 대부분을 점하고 random coil 중에는 약간의 α -helix와 微量의 β 鎖가 散在해 있는데 220°C 에서 熱 處理 후 冷却하면 silk II型으로 變하며 silk II型은 silk II型 結晶과 random coil이 大部分을 占하고 random coil 중에는 α -helix가 散在해 있다고 하였다.

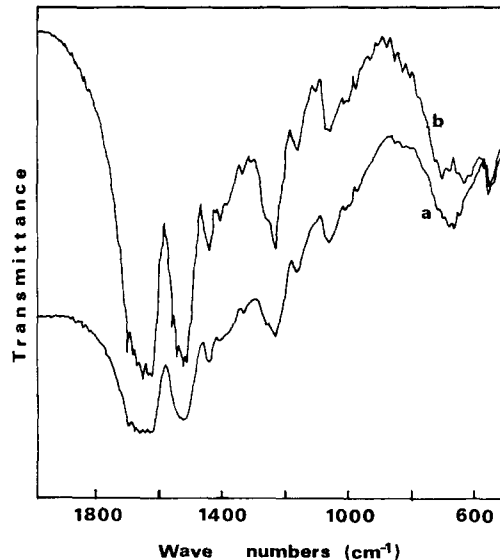


Fig. 8. Infrared spectra of air dried films of silk fibroin solution dissolved in ethylenediamine-cupric hydroxide a: soap degumming, b: enzymatic degumming.

絹 피브로인의 結晶 構造와 赤外線 吸收 領域에 대하여 早川 等(1970)은 silk I型의 amide I, II는 1665 cm^{-1} 와 1535 cm^{-1} 에서, amide III은 1266 cm^{-1} 과 1240 cm^{-1} , amide V의 흡수는 645 cm^{-1} 근방에서 넓게 나타나는데 비하여, silk II형은 amide I, II는 1635 cm^{-1} 와 1530 cm^{-1} 에서, amide III은 1266 cm^{-1} 과 1233 cm^{-1} 근처에서, amide V의 흡수는 700 cm^{-1} 에서 나타나며, 또 絹 피브로인과 같이 -Gly-Ala-의 결합을 가진 것에서는 1015 cm^{-1} 의 흡수는 silk I型에서, 998 cm^{-1} 과 975 cm^{-1} 의 흡수는 silk II型에 기인하는 것이라고 하였다.

Polypeptide 蛋白質의 分子 構造와 赤外線 吸收 領域에 대하여 宮澤(1964)은 amide I 吸收는 α -helix에서는 1650 cm^{-1} , β 型에서는 1630 cm^{-1} 附近에서 강한 吸收帶가 나타나고, amide II 吸收는 α -helix에서는 1550 cm^{-1} 附近의 강한 垂直 成分과 1520 cm^{-1} 附近의 약한 平衡 成分으로 나누어지지만, β 型에서는 1530 cm^{-1} 附近의 강한 平衡 成分과 1550 cm^{-1} 附近의 垂直 成分으로 나누어진다고 하였다. 또 random coil의 polypeptide에서는 폭넓은 amide 吸收帶가 1655 cm^{-1} 에서 나타나는데 이것은 α -helix의 amide I 吸收帶와 判별하기 어렵지만, α -helix의 amide II 吸收帶는 2가닥으로 나누어지는데 반하여 random coil에서는 폭넓은 amide II 吸收帶가 1535 cm^{-1} 附近에 나타난다고 하였다. Magoshi *et al.*(1977)와 Bhat and

Nadiger(1980)은 amide I, II, III, V에 해당하는 吸收帶가 β 構造에서는 1630, 1530, 1265, 700 cm^{-1} 에서 random coil에서는 1660, 1540, 1235, 650 cm^{-1} 에서 나타난다고 하였다. 특히 Bhat and Nadiger(1980)은 Gly-Gly linkage는 1015 cm^{-1} , Ala-Ala linkage는 970 cm^{-1} , Ala-Gly linkage는 988과 975 cm^{-1} 에서 peak이 나타나므로 家蠶 피브로인에서는 1015와 970 cm^{-1} 의 peak는 없고 975와 998 cm^{-1} 의 peak만 있다고 하였다.

絹 피브로인의 구조에 대하여 清水(1941)는 水溶液으로부터 film을 만들 때의 온도가 40°C 以下에서는 silk I型이 얻어지지만 40°C 以上에서는 silk II型이 얻어진다고 하였고, 馬越 等(1973a)은 結晶化가 생기는 농도는 65% 내외이고 건조 온도 0~40°C 에서는 α 型(silk I型), 50°C 이상과 0°C 이하에서는 β 型(silk II型)이 된다고 하였으며, 中島 等(1987)은 casting할 때 水溶液의 pH 7 以上에서는 silk II型, pH 5 以下에서는 silk I型이 얻어진다고 하였다. 塚田(1985)은 絹絲腺 피브로인 水溶液을 乾燥 固化시킬 때 casting 溫度가 높더라도 casting 속도가 느릴수록 β -rich 구조가 되며 casting 속도가 빠를수록 random coil-rich 구조가 되므로 分子 構造는 casting 온도와 속도에 달려 있다고 하였다.

塚田 等(1990)은 再生絹 피브로인의 분자 형태를 알기 위하여 未變性 絹 피브로인을 9 M LiBr 용액에서 조제한 絹 피브로인의 IR spectra에서 용해 조건에 따른 차이는 없다고 하였는데 어떤 시료의 IR spectra에서도 amide I band가 1652 cm^{-1} , amide II band 1535 cm^{-1} , amide III band는 1243 cm^{-1} 에서 관찰되고, amide V band는 660 cm^{-1} 부근에서 폭넓게 나타나서 random coil 특유의 분자 형태를 나타낸다고 하였다. 後藤 等(1990)도 9 M LiSCN 용액으로 온도와 시간을 달리하여 용해한 再生絹 피브로인의 IR spectra는 塚田 等(1990)의 LiBr에 의한 再生絹 피브로인의 경우와 동일한 결과를 얻었다고 하였다.

본 실험 결과 精練 조건에 관계없이 絹 피브로인 水溶液을 送風 乾燥하여 얻은 시료는 silk II型에 silk I型이 가미된 형태로 나타났다. 즉 絹 피브로인 水溶液의 분자 구조는 精練 조건에 따른 차이는 없었는데, 이와 같은 원인은 건조 조건이 精練 처리에 비하여 피브로인의 構造 결정 요인이 높기 때문에 비누 정련과 효소 정련의 차이가 없는 것으로 고찰된다.

摘 要

繭層을 자연 건조하므로써 變性を 받지 않은 試料에 대하여 *Bacillus licheniformis* 蛋白質 分解 酵素 精練과 비누 精練의 특성을 비교하기 위하여 널리 사용되고 있으며 溶解할 때 비교적 피브로인에 대한 degradation이 적은 두가지 溶解法으로 溶解한 絹 피브로인 水溶液에 대하여 분자 구조상의 차이가 있는지를 구명하고자 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 絹 피브로인 水溶液의 偏光 顯微鏡으로 觀察한 결과 球晶은 관찰되지 않았으나 나무잎 모양의 피브릴 구조가 나타났고 電子 顯微鏡으로 관찰한 결과 球晶의 크기는 30~120 nm 정도였으며 精練 방법과 絹 피브로인을 溶解하는 방법에 따른 차이는 없었다.

2. 絹 피브로인 水溶液의 粘度 측정 결과 비누 精練 絹 피브로인 水溶液보다 酵素 精練 絹 피브로인 水溶液의 intrinsic viscosity가 낮았다.

3. 絹 피브로인 水溶液에 대한 電氣 泳動 試驗 결과 약 20 kd에서 small subunit와 50 kd 이상에서 large subunit에 해당하는 폭 넓은 band가 나타났으며 精練 방법에 따른 차이는 없었다.

4. 絹 피브로인 수용액을 冷凍 乾燥한 분말에 대한 熱 分解 온도는 비누 精練 絹絲와 酵素 精練 絹絲간에 차이가 없었고 溶解 방법에 따른 熱 分解 온도는 cupric hydroxide-ethylene diamine法으로 溶解하였을 때 조금 낮았다.

5. 絹 피브로인 水溶液을 送風 乾燥한 시료에 대한 IR spectrum은 silk II형과 silk I형이 복합되어 나타났다으며 精練 방법에 따른 차이는 없었다.

引用 文 獻

- 味澤昭義(1969) 絹フィブロインの溶解に關する研究. (III) $\text{CaCl}_2\text{-H}_2\text{O-R}\cdot\text{OH}$ 3成分系溶液による 絹フィブロインの溶解. 日蠶雜 38(4): 340~346.
- Bhat, N. V. and Nadiger, G. S.(1980) Crystallinity in silk fibers: partial acid hydrolysis and related studies. *J. Appl. Polym. Sci.* 25: 921~932.
- Gamo, T. Inokuchi, T. and Laufer, H.(1977) Polypeptides of fibroin and sericin secreted from the different sections of the silk gland in *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 7: 285~295.
- 後藤洋子・塚田益裕・箕浦憲彦(1990) チオシアン酸リチウムによる絹フィブロインの溶解と分解. 日蠶雜, 59(6): 402~409.
- 早川忠男・近藤慶之・山本靜護・野口順藏(1970) 絹ダンパク質の高分子化學的研究. 第2報 家蠶繭フィブロイン結晶部分模型の合成とその構造. 高分子化學, 27:

- 229~240.
- 平林潔・関常勝・石川博・角戸正夫・呉裕吉(1968) 絹フィブロインの球晶について. 織學誌, **24**(9): 411~414.
- 平林潔(1984) 絹の化学と構造・物性. 繊維と工業, **40**(4・5): 119~124.
- 平林潔(1989) 絹の機能化. 高分子, **38**(12): 1062~1065.
- 平林潔・朝倉哲郎(1989) 絹の化学と構造・物性. 繊維と工業, **45**(11): 463~468.
- 胡國梁・荒井三雄・平林潔(1990) フィブロイン増量絹の性質. 日蠶雜, **59**(1): 26~33.
- Iizuka, E. and Yang, J. T.(1968) The disordered and β conformation of silk fibroin in solution. *Biochemistry* **7**(6): 2218~2228.
- 石川博・奈倉正宣(1983) 絹フィブロインの構造と物性. 繊維と工業, **39**(10): 353~363.
- 金榮大・南重熙(1992) *Bacillus licheniformis* 蛋白質分解酵素에 의한 精練 絹絲의 特性. I. 精練 絹絲의 理化学的 特性. 韓蠶學誌, **34**(2): 41~51.
- 金榮大・南重熙(1993) *Bacillus licheniformis* 蛋白質分解酵素에 의한 精練 絹絲의 特性. II. 精練 絹絲의 熱處理影響. 韓蠶學誌, **35**(1).
- 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. 織學誌, **23**(2): 64~69.
- 小西孝・黒川昌孝(1970a) 絹フィブロイン α 型の結晶構造. 京工織大學報, **6**(1): 24~29.
- 小西孝・黒川昌孝(1970b) 絹フィブロインの単結晶. 織學誌, **26**(9): 443~446.
- 小西孝(1980) 續 絹絲の構造(北條舒正編) p. 259~269, 信州大學纖維學部 上田.
- Laemmli, U. K.(1970) Clearance of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680~685
- Lucas, F. Shaw, J. T. B. and Smith, S. G.(1957) The amino acid sequence in a fraction of the fibroin of *Bombyx mori*. *Biochem. J.* **66**: 468~479.
- Lucas, F. Shaw, J. T. B. and Smith, S. G.(1962) Some amino acid sequences in the amorphous fraction of the fibroin of *Bombyx mori*. *Biochem. J.* **83**: 164~171.
- 馬越淳・笠井頼民・角戸正夫(1973a) 絹の結晶化と α - β 轉移に関する研究. 高分子化学, **30**: 649~653.
- 馬越淳(1973b) 凍結處理による絹フィブロインの結晶化について. 高分子化学, **30**: 580~582.
- Magoshi, J. Magoshi, Y. Nakamura, S. Kasai, N. and Kakudo, M.(1977) Physical properties and structure of silk. V Thermal behavior of silk fibroin in the random-coil conformation. *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* **15**: 1675~1683.
- Magoshi, and J. Magoshi, Y.(1979) Physical properties and structure of silk, VI. Conformational changes in silk fibroin induced by immersion in water at 2 to 130°C. *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* **17**: 515~520.
- 皆川基(1980) 續絹絲の構造(北條舒正編) p. 187~208 信州大學纖維學部 上田.
- 高澤辰雄(1964) ポリペプチドおよびタンパク質の赤外吸收. 蛋白質核酸酵素, **9**(11): 975~980.
- 森肇・角田素行・松原藤好(1989) 絹の酵素精練方法の確立. アパレル科學研究センター-研究報告, **8**: 15~18.
- 森・角田素行・松原藤好(1990) 市販絹精練用酵素(アルカラ-ゼ)による絹の精練とフィブロインサブユニットへの影響. アパレル科學研究センター-研究報告, **9**: 4~7.
- 奈倉正宣・石川博・塚田益裕(1984) 家蠶絹フィブロイン膜中の微細構造. 高分子論文集, **41**(3): 139~143.
- 中島靖・高梨克弘・奥山健二・平林潔(1987) 絹フィブロイン結晶成分割試料よりsilk I型結晶を得るための透析条件. 日蠶雜, **56**(1): 83~84.
- 中山博(1989) 絹フィブロインを利用した賞品開発. 繊維と工業, **45**(6): 258~262.
- 奥山田生・徳武哲(1984) 天然高分子 141~184 共立出版株式会社 東京.
- Pandit, M. W., Sagar, A. J. and Narasinga Rao, M. S.(1972) Studies on silk fibroin. I. Molecular weight, sedimentation coefficient, viscosity and optical rotation of silk fibroin from carbonate-extracted silk fiber. *Archs. Biochem. Biophys.* **149**: 259~268.
- Sagar, A. J., Narasinga Rao, M. S. and Pandit, M. W.(1978) Properties of silk Proteins extracted in saturated lithium thiocyanate solution. *Indian J. Biochem. Biophys.* **15**: 59~61.
- Sasaki, A. and Noda, H.(1973) Studies on silk fibroin of *Bombyx mori* directly extracted from the silk gland. II. Effect of reduction of disulfide bonds and subunit structure. *Biochim. Biophys. Acta*, **310**, 91~103.
- Shimura, K., Kikuchi, A., Katagata, Y. and Ohotomo, K.(1982) The occurrence of small component proteins in the cocoon fibroin of *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.* **51**(1): 20~26.
- 清水正徳(1941) フィブロイン變性の中間形態と其絹絲形成過程に於ける意義に就て. 蠶試報, **10**(7): 475~494.
- 祖父江寛・石川博(1961) 家蠶セリシンおよびフィブロインの球晶. 工化誌, **64**(7): 1320~1321.
- Sprague, K. U.(1975) The *Bombyx mori* silk proteins: characterization of large polypeptides. *Biochemistry*, **14**(5): 925~931.
- Tashiro, Y. and Otsuki, E.(1970a) Dissociation of native fibroin sulphhydryl compounds. *Biochim. Biophys. Acta*, **214**: 265~271.
- Tashiro, Y. and Otsuki, E.(1976b) Studies on the posterior silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. IV. Ultracentrifugal analyses of native silk proteins, especially fibroin extracted from the middle silk gland of the mature silkworm. *J. Cell Biol.* **46**: 1~16.
- Tashiro, Y., Otsuki, E. and Shimadzu, T.(1972) Sedimentation analyses of native silk fibroin in urea and guanidine-HCl. *Biochim. Biophys. Acta*, **257**: 198~209.
- 塚田益裕・平林潔(1983) 家蠶絹フィブロインの分子形態. 織學誌, **39**(6): 265~268.
- 塚田益裕(1985) 異なる乾燥温度で作製した家蠶絹フィブロインの分子形態. 織學誌, **41**(7): 265~270.
- 塚田益裕・後藤洋子・箕浦憲彦(1990) 臭化リチウムによる絹フィブロインの溶解と分解. 日蠶雜, **59**(5): 325~330.