

Silk I 형 결정을 얻기 위한 투석의 pH조건

김동건 · 小西 孝*

동아대학교 천연섬유학과 · 京都工藝纖維大學 高分子學科*

Dialytic pH Condition for Obtaining Silk I Type Structure

Dong Keon Kim and Takashi Konishi*

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

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

ABSTRACT

As a condition for obtaining the silk I type crystal that has stability and high reproducibility, after dissolving silk fibroin crystalline part (Fcp), the changes of recrystallized crystal structure according to dialytic pH were examined by x-ray diffraction and differential thermal analysis. The Fcp was obtained from the aqueous solution of silk fibroin enzymatic proteolyzed by chymotrypsin. The crystal structure of Fcp showed silk II type. When the Fcp was dissolved by 10M LiBr aqueous solution, the Fcp1 showed the silk II type at pH9. However, besides the silk II type, the silk I type structure begins to appear at pH8 and only the silk I type structure was found below pH6. On the other hand, the Fcp2 that calcium chloride was used in the dissolution found only the silk I type crystal structure below pH8.

Key words : Silk fibroin, Dialysis, Silk II type, Silk I type, Proteolysis

緒 論

家蠶絹fibroin에는 安定한 Silk II 형과 準安定한 Silk I 형의 두가지 結晶構造가 存在하고 있다. Silk II 형은 antiparallel chain pleated sheet構造가 基本이 되어져 있다(Marsh *et. al.*, 1955). 이 構造는 絹fibroin 分子가 相互逆方向으로 平行하게 나열되어져 NH基와 CO基 사이에서 分子間 水素結合으로 이루어진 sheet 상의 構造를 形成하고 있으며 sheet는 amion酸 1殘基마다 굽어 접혀진 層狀으로 되어져 있다. 한편, Silk I 型構造에 있어서는 그 格子定數도 여러 研究者들에 의해 서로 다른 數値가 報告되어져 있어 아직 完結되지 않고 있다(小西·黑川, 1968; 平林 등, 1968). 이 Silk I 型構造의 研究가 상세히 이루어지지 않고 있는 하나의 原因은 Silk I 型構造는 熱處理(石川 등, 1972) 라든지 延伸(塚田 등, 1987; 金 등, 1996)에 의해 쉽게 Silk II 형으로 轉移하기 때문에 配向試料로부터 良質의 X線回折像이 얻어질 수 있기 때문이다.

小西 등(1968)은 Silk I 型的 結晶은 단순히 絹絲線의 乾燥뿐 만 아니라 α -chymotrypsin으로 絹fibroin의 分解沈澱物을 溶解한 후 透析再結晶化하는 것에 의해 얻어질 수 있다고 報告하였다. 또한 絹fibroin의 結晶性部分의 model로 되어져 있는 合成polypeptide인 poly L-(-Ala-Gly)의 透析에 의해 얻어진 化合物에 대하여 報告되어져 있다(塚田, 1983; 奥山 등, 1988).

本 實驗에서는 이들 여러 가지의 調製에 의한 試料 가운데 가장 結晶성이 좋은 絹fibroin의 酵素加水分解에 의해 얻어진 絹fibroin結晶部分을 사용하여 이 試料를 中性鹽溶液에서 溶解하여 再現성이 높은 Silk I 型結晶을 얻기 위한 調製條件을 檢討하였다.

實驗方法

1. 絹fibroin의 精練

日本京都工藝纖維大學의 附屬農場에서 生産된 家蠶繭을 切斷한 後, 마르세유 비누를 사용, 2회反復精

練하여 sericin을 除去하였다. 이 때의 精練率은 23%였다.

2. 絹fibroin結晶部分(Fibroin Crystalline Part)試料의 調製

精練하여 얻은 絹fibroin纖維 10 g을 10 M LiBr水溶液 200 ml에 40°C에서 完全溶解한 後, 同量의 蒸溜水에 稀釋시켰다. 이 水溶液을 cellulose tube에 넣고 pH8로 調整한 蒸溜水로서 72시간 透析하여 遠心分離로서 불순물을 제거하였다. 이 얻어진 fibroin水溶液을 pH7.8로 調整한 0.2 M phosphoric acid buffer中에서 α -chymotrypsin 100 mg을 사용하여 40°C에서 24時間 酵素加水分解를 실시하였다. 이를 遠心分離하여 얻어진 沈澱物에 0.1 N Hcl 200 ml를 가하여 酵素反應을 停止시킨 다음, 蒸溜水로서 48時間 透析하였다. 透析後 遠心分離하여 白色沈澱物을 凍結乾燥에 의해 粉末試料(이하 Fcp라고 함)를 調製하였다.

3. 透析에 있어 結晶化條件이 다른 試料의 調製

Fcp試料 100 mg을 10 M LiBr水溶液 10 ml에 完全溶解시킨 다음 cellulose tube에 넣어 透析外液의 pH를 酢酸과 암모니아수를 使用하여 9~4의 범위로 調整한 蒸溜水에 대하여 4日間 透析하였다. 再結晶된 白色沈澱物을 遠心分離한 후, 凍結乾燥에 의해 粉末試料(이하 Fcp1이라 함)를 調製하였다. 또한, Fcp試料를 $\text{CaCl}_2 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : \text{H}_2\text{O} = 1 : 2 : 8$ (mol比)의 混合溶液(味澤, 1970) 4 ml에 70°C에서 1시간 完全溶解시킨 다음, 위와 같은 方法으로하여 얻어진 粉末試料(이하 Fcp2라고 함)을 調製하였다.

4. X線回折

X線回折裝置는 理學電氣製 X線回折 發生裝置를 사용하여 Ni filter로서 濾過한 Cu-K α 線 ($\lambda=1.5421\text{\AA}$)을 使用하였다. 回折寫眞은 Laue平板카메라를 使用하였으며 直徑 0.5 mm의 pinhole을 使用하여 出力 40kV, 15mA로 5時間露出하여 撮影하였다.

5. 示差熱分析(DTA)

鳥津製의 示差熱分析裝置 DT-28B를 使用하여 測定하였다. 測定試料는 2 mg으로 하였으며 昇溫速度 20°C/min, 測定範圍 30-400°C로 하고 測定雰圍氣는 減壓下에서 實施하였다.

結果 및 考察

1. Fcp1에 있어 透析外液 pH와 結晶構造의 關係

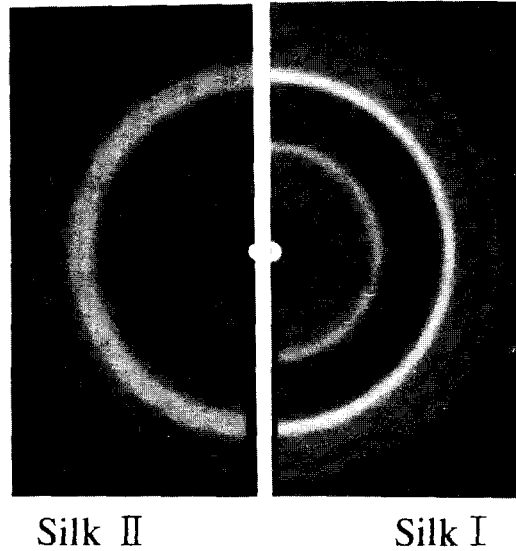


Fig. 1. X-ray diffraction patterns of Silk II and Silk I type crystal.

먼저, 代表的인 Silk I 과 Silk II 型結晶의 X線回折寫眞을 Fig. 1에 나타내었다. Silk II 型結晶에는 面間隔 4.6Å 및 4.3Å의 강한 反射가 나타나는 것이 特徵이었으며 本 實驗에서 使用된 Fcp試料의 回折寫眞에도 이들 2개의 反射가 나타나는 것으로부터 Silk II 型結晶인 것이 確認되었다. 또한, Silk I 型結晶에는 面間隔 7.2Å 및 4.5Å의 강한 反射가 나타나는 것이 特徵이었다.

透析外液의 pH를 달리하여 調製한 試料Fcp1의 X線回折寫眞을 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다. 透析外液의 pH를 9로 調整한 試料에서는 面間隔 4.6Å와 4.3Å의 강한 反射가 나타나 Fcp의 試料과 같이 Silk II 型의 結晶構造를 나타내었다. 그러나, pH8로 調整한 試料에서는 Silk II 型結晶의 特徵인 4.6Å의 反射는 강하게 나타내고 있으나 4.3Å의 反射는 약하게 나타내고 있으며 새로운 Silk I 型의 反射에 相應하는 7.2Å의 약한 反射를 나타내었다. pH7.5에서 調製된 試料에서도 pH8과 같은 傾向을 나타내었으나 透析外液이 pH7에서는 Silk II 型의 反射는 완전히 없어져 Silk I 型의 特征적인 7.2Å와 4.5Å의 강한 反射만이 觀察되었다. 또한, pH6以下에 있어서도 Silk I 型의 反射가 선명히 觀察되는 것으로부터 Silk I 型의 結晶構造를 나타내는 試料를 調製하기 위해서는 透析外液을 pH7以下로 할 必要가 있는 것을 알 수 있었다.

結晶構造는 熱의特性에도 현저히 反映하고 있으므로 以上の 試料에 대하여 示差熱分析을 행하여 그 結果를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 2에서 Silk II 型의 結

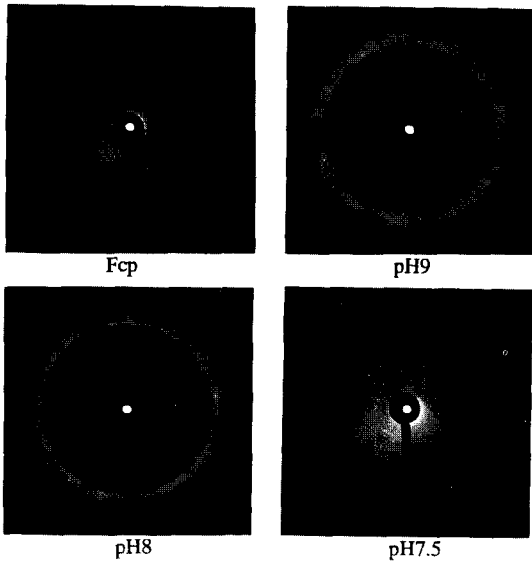


Fig. 2. X-ray diffraction patterns of Fcp1 dialyzed at various pH values after being dissolved with 10M LiBr aqueous solution for 1h, in comparison with Fcp.

晶構造를 나타낸 pH9의 試料은 Fcp의 試料과 같이 330°C부근에서 熱分解點을 나타내었다. 또, pH8과 7.5試料에서는 Silk II 型의 分解peak와 더불어 Silk I 型結晶의 分解點인 305°C부근에서도 分解peak가 나

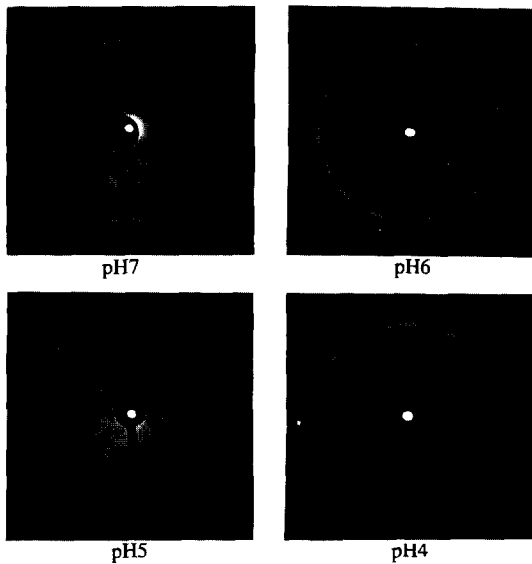


Fig. 3. X-ray diffraction patterns of Fcp1 dialyzed at various pH values after being dissolved with 10 M LiBr aqueous solution for 1h.

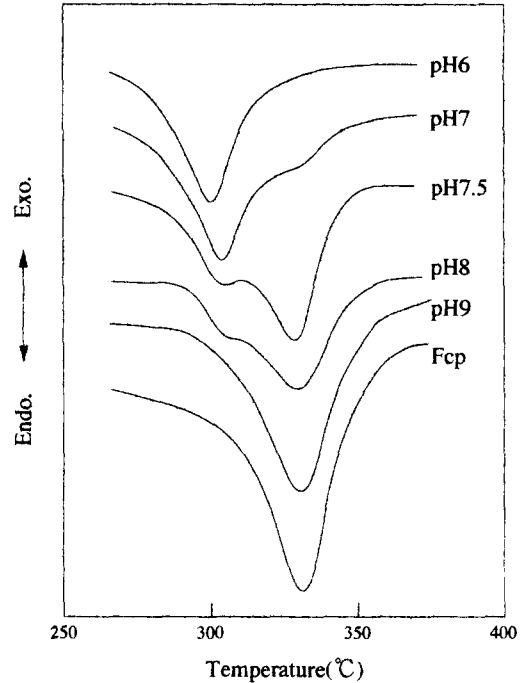


Fig. 4. DTA thermograms of Fcp1 dialyzed at various pH values after being dissolved with 10M LiBr aqueous solution for 1h, in comparison with Fcp.

타났다. 이것으로 이들 試料에는 Silk I 型과 Silk II 型의 두가지 結晶이 混在하고 있는 것을 示唆하고 있으며 Silk I 型보다 Silk II 型의 分解點이 높은 것으로 보다 安定한 것을 알 수 있고 分解peak의 크기로부터 pH8과 pH7.5의 試料 모두가 Silk I 型보다도 Silk II 型이 많이 存在하고 있는 것을 알 수 있다. pH7의 試料에서는 X線回折의 結果와 一致하는 Silk I 型의 分解peak를 나타내었으나 X線回折에서는 나타나지 않았던 Silk II 型의 分解peak가 아주 적게 存在하고 있는 것을 알 수 있었다. 그러나, pH6 以下의 試料에서는 Silk I 型의 分解peak만이 나타났다. 이와 같은 結果로부터 絹fibroin을 LiBr水溶液에 完全溶解한 후, 透析再結晶化에 의한 再現性이 좋은 Silk I 型結晶을 調製할 경우에는 透析外液의 pH를 6以下로 하는 것이 가장 좋은 것으로 判斷할 수 있다.

Table 1에는 X線回折과 示差熱分析의 結果로부터 透析外液의 pH와 結晶構造의 關係를 나타내었다. Fcp試料로부터 透析再結晶化하여 얻어진 Fcp1試料의 結晶構造에 變化가 나타나 結晶構造는 透析外液의 pH가 크게 作用하고 있는 것을 알 수 있다. 즉, 크게 分類하여 酸性側에서는 Silk I 型, 알칼리側에서는 Silk II 型의 結晶構造를 나타내었다. 絹fibroin의 結晶

Table 1. Changes in crystal structure of Fcpl dialyzed at various pH values after being dissolved with 10M LiBr aqueous solution for 1h.

pH	Crystal structure
4	silk I
6	silk I
7	silk I + silk II
7.5	silk I + silk II
8	silk I + silk II

成長을 위해서는 우선, 分子運動에 의한 分子間的 NH基와 CO基間的 接觸頻度の 增大에 의한 sheet形成이 必要하며 sheet形成 후, 再醃列이 일어나기 어려운 경우에는 Silk I型, 일어나기 쉬운 경우에는 Silk II型이 된다고 報告되어지고 있다(石川·奈倉, 1983). 一般的으로 蛋白質은 酸性쪽에서는 收縮, 알카리쪽에서는 伸張이 일어난다. 그러므로 收縮하는 것에 의해 sheet醃列이 일어나기 어렵게 되어 酸性側에서는 Silk I型을 形成하였고 伸張하는 것에 의해 sheet醃列이 쉽게 일어나 알카리側에서는 Silk II型的 結晶構造를 나타낸다고 생각할 수 있다.

2. Fcp2에 있어 透析外液 pH와 結晶構造의 關係

Fcp2 試料의 X線回折寫眞을 Fig. 5에 나타내었다. 透析外液의 pH를 10으로 調製한 試料에서는 面間隔 4.6Å와 4.3Å의 강한 反射를 나타내어 Fcp 試料와 같이 Silk II型的 結晶構造를 나타내었다. 그러나, pH

9.5에서 調製한 試料에서는 Silk II型的 特征적인 反射는 약하게 나타나며 Silk I型的 反射에 相應하는 4.5Å와 7.2Å의 反射가 나타나 Silk II型和 Silk I型的 두가지 特徵이 觀察되었다. pH9의 試料에서는 Silk I型的 特征적인 反射만이 觀察되었으며 pH8以下에 있어서는 Silk I型的 反射만이 선명히 觀察되었다.

이들 試料에 대한 示差熱分析의 結果를 Fig. 6에 나타내었다. pH10의 試料의 分解點은 330°C부근에 位置하여 Silk II型的 結晶構造를 나타내었다. pH9.5試料에서는 Silk II型的 分解peak와 함께 Silk I型的 分解點에 歸屬하는 305°C부근에서도 分解peak가 觀察되었다. pH9以下の 試料에서는 각각 Silk I型的 分解peak만이 나타나 Fig. 5의 X線回折 結果와 一致하였다.

X線回折 및 示差熱分析의 結果에 의한 透析外液의 pH와 結晶構造의 關係를 Table 2에 나타내었다. Table 1과 比較하여 보면 Fcp1의 경우에는 pH7.5부근을 境界로하여 그 以下에서는 Silk I型, 그 以上에서는 Silk II型을 나타내고 있으나, Fcp2의 경우에는 pH9.5를 境界로 하고 있다. 다른 溶解劑의 사용에 따른 結晶轉移의 pH境界가 달라지는 原因은 염화칼슘을 溶解劑로 사용한 경우, 常溫에서는 Fcp試料의 溶解가 곤란하여 70°C에서 1시간에 걸쳐 溶解시킨 것을 들 수 있다. 高溫에서 長時間 溶解하면 fibroin의 分子鎖가 보다 짧게 절단되므로 쉽게 Silk I型으로 된다고 생각되어지며 그 때문에 Fcp2의 pH境界가 9.5의 알카리측으로 移動되어졌다고 생각할 수 있다.

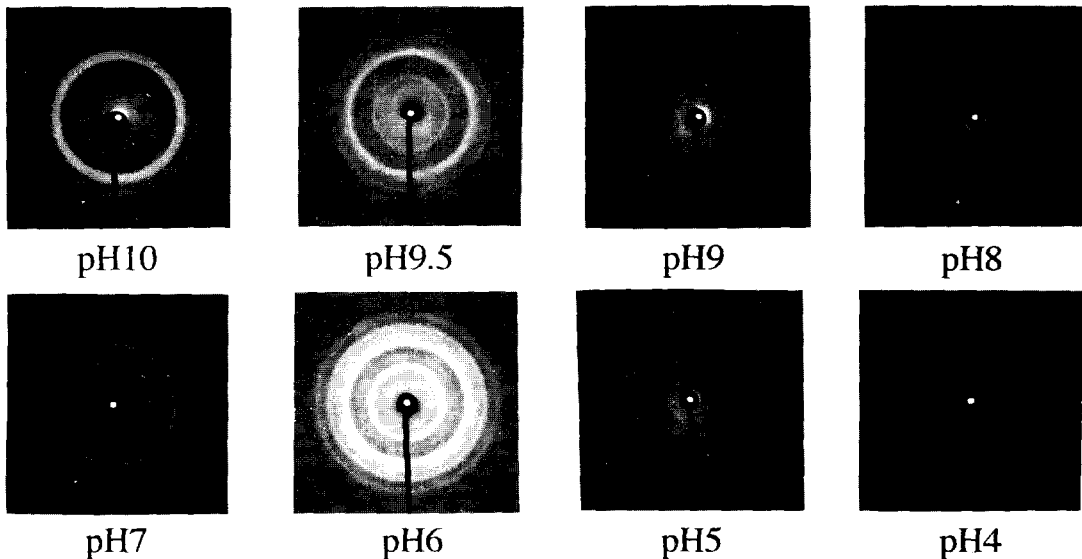


Fig. 5. X-ray diffraction patterns of Fcp2 dialyzed at various pH values after being dissolved with CaCl₂ at 70°C for 1h.

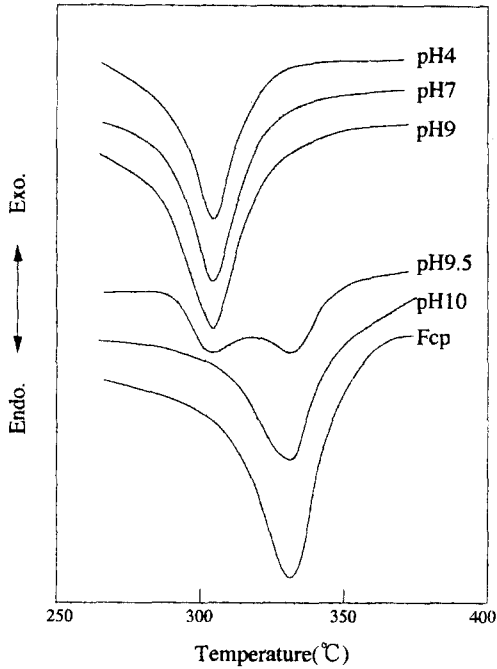


Fig. 6. DTA thermograms of Fcp2 dialyzed at various pH values after being dissolved with CaCl₂ at 70°C for 1h, in comparison with Fcp.

따라서, 염화칼슘을 溶解劑로서 1時間 溶解하였던 것을 26時間으로 延長하여 透析外液의 pH를 10으로 調整한 試料를 製造하였다. 溶解 1時間의 pH10 試料는 上記의 X線回折과 示差熱分析에 의해 Silk II 型の 結晶만이 存在하고 있는 것이 確認되어졌으나 Fig. 7에 나타낸 溶解 26時間의 Fcp2-pH10 試料에서의 X線回折寫眞에서는 Silk II 型の 反射가 弱하게 나타남과 동시에 Silk I 型の 反射에 歸屬하는 7.2Å와 4.5Å의 回折環이 觀察된다. 또한, Fig. 8에 나타낸 示差熱分析에 있어서도 Silk II 型 및 Silk I 型の 分解peak를

Table 2. Changes in crystal structure of Fcp2 dialyzed at various pH values after being dissolved with CaCl₂ at 70°C for 1h.

pH	Crystal structure
4	silk I
5	silk I
6	silk I
7	silk I
8	silk I
9	silk I
9.5	silk I + silk II
10	silk II

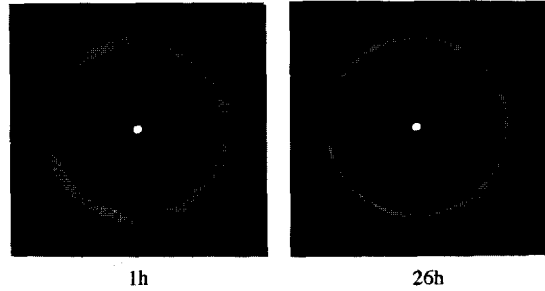


Fig. 7. X-ray diffraction patterns of Fcp2 dialyzed at pH10 after being dissolved with CaCl₂ at 70°C for 1h and 26h.

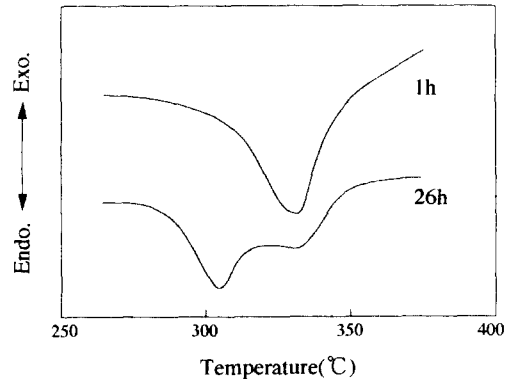


Fig. 8. DTA thermograms of Fcp2 dialyzed at pH10 after being dissolved with CaCl₂ at 70°C for 1h and 26h.

함께 나타내고 있으며 分解peak의 크기로부터 溶解時間이 1時間의 경우에는 存在하지 않았던 Silk I 型이 26時間의 경우에는 Silk II 型보다도 많이 存在하고 있는 것을 알 수 있었다.

摘 要

安定하고 再現성이 높은 Silk I 型結晶을 얻기 위한 調製條件으로써 酵素分解에 의한 絹fibroin의 沈澱物을 中性鹽類 分解하여 透析再結晶化時의 透析外液 pH에 따른 結晶構造의 變化를 檢討하였다.

絹fibroin을 透析에 의한 再結晶化時의 溶解劑로서 LiBr水溶液을 사용한 경우에는 透析外液이 pH9에는 Silk II 型の 結晶構造를 나타내었으나 pH8에서는 Silk II 型和 더불어 Silk I 型이 나타나기 시작하여 pH6以下에서는 再現성이 좋은 Silk I 型的 結晶만이 存在하였다.

또한, 溶解劑로서 鹽化칼슘의 混合液을 사용한 경우에는 pH8以下에서 再現성이 좋은 Silk I 型的 結晶

이 존재하게 되는 것을 알 수 있었다.

引用文獻

- 味澤昭義 (1970) 絹 フィブ론의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.
- 平林 潔 · 石川 博 · 角戶正夫 · 吳祐吉 (1968) 絹フィブロイン의分子形態. 纖維學會誌. **24**: 397~400.
- 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의DSC曲線. 織學誌. **28**: 91~98.
- 石川 博 · 奈倉正宣 (1983) 絹フィブロイン의構造と物性. 織學誌. **39**: 353~363.
- 金東建 · 崔震浹 · 小西 孝 (1996) Lithium Bromide水溶液中에서 延伸된 絹의 構造와 物性. 韓蠶誌. **38**: 33~38.
- 小西 孝 · 黒川昌孝 (1968) 家蠶フィブロイン-a의結晶構造. 纖維學會誌. **24**: 550~554.
- 奥山健二 · 高梨克弘 · 中島 靖 · 長谷川圭子 · 平林 潔 · 西 則雄 (1988) X線回折, 電子線回折SilkI型構造と解析. 日蠶雜. **57**: 23~30.
- R. E. Marsh, R. B. Coray and L. Pauling (1955) Investigation of the structure of silk fibroin. *Biochem. Biophys. Acta.* **16**: 1~34.
- 塚田益裕 (1983) 絹フィブロインモデル化合物의分子構造. 日蠶雜. **52**: 160~165.
- 塚田益裕 · 笠井鴨民 (1987) 延伸處理に伴う家蠶絹フィブロイン의構造變化. 織學誌. **43**: 451~455.