

동물 경조직 단백질 성분의 조성과 생리기능에 관한 연구

우각 수우각 서각에서 분리한 경 단백질의 조성에 대하여

이 승 기 · 김 영 은

서울대학교 약학대학 생물화학교실

(1974년 2월 11일 접수)

요약: 동물 경조직 단백질에 관한 연구의 일환으로 3종의 동물의각질(우각, 수우각, 서각)을 각각 채취하여 Gillespie 등의 방법에 의하여 0.1 M-thioglycolate 로 40°C 에서 keratin 을 추출한 후 S-carboxymethyl (SCMK) 유도체를 합성하였고 1/10 N-HCl 로 등전점 (pI 4.7~5.05)의 범위에서 침전된 단백을 각각 분리하였다.

추출된 경단백의 수득량은 건조 중량으로 16~30%이었다. 추출된 keratin 의 아미노산 조성은 3종 공히 18종이었으며, 그 조성비의 차이는 별로 없었으나 단 우각에서 추출된 단백질의 Lysine 함량은 2.67%로 수우각 5.57%, 서각 4.99%에 비하여 현저한 차이가 있었으며, 우각의 S-carboxymethyl cysteine 의 함량은 9.41%로 수우각 6.06%, 서각 5.96%에 비해 크므로 우각 keratin 의 disulfide bridge 에 의한 cross-linking 정도가 수우각, 서각에 비해 크다는 것을 나타내고 있다.

추출 단백질의 monosaccharide, sialic acid, hexosamine, 및 uronic acid 의 조성을 분석한 결과 이들 총 함량을 표시하면 추출 단백질의 건조중량에 대하여 우각은 1.38%, 수우각 0.47%, 서각 1.04%이었다.

Sialic acid 의 함량은 추출 단백질의 건조중량에 대하여 gm 당 우각 1.26 μ mol, 수우각 0.29 μ mol, 서각 0.96 μ mol 로 나타났다.

Hexosamine 분석에서 3종 공히 galactosamine 은 검출 되지 않고 glucosamine 만 이 검출되었으며 또한 uronic acid 분석결과 glucuronic acid 는 3종 공히 검출되지 않았고 galacturonic acid 만 이 검출되었다.

또한 중성당의 조성은 우각 및 수우각에는 glucose, galactose, xylose, fucose 가 서각에는 glucose, mannose, ribose 가 각각 검출되었다.

당 교실에서는 동물 경조직 추출물이 마약중독자의 금단증상을 완화하는 효과가 있음을 보고한 바 있다.

본실험에서는 동물 경조직인 우각, 수우각, 서각에서 Gillespie(1957)등의 low-sulfur containing keratin 추출방법에 의하여 단백을 각각 추출, 분리, 정제하여 이들 경단백 상호간의 구성 성분상의 차이 등을 비교검토할 목적으로 구성 아미노산 분석과 이들 단백질에 conjugation 된 monosaccharide, hexosamine, sialic acid 및 uronic acid 등

의 정성분석에 의한 존재의 확인과 정량분석에 의한 조성함량을 밝히므로써 각각의 성분 조성상의 특징을 비교 검토하였기에 보고하는 바이다.

실험 재료 및 방법

A. 실험 재료

본 실험에서 사용한 우각은 시내 마장동 도살장에서, 수우각은 타일랜드에서 직접 구입하였으며 서각은 시중 한약국에서 구입하였음.

B. 유효성분의 추출분리

Gillespie 등의 방법에 의하여 low-sulfur containing protein인 SCMKA (S-carboxymethyl keratin의 유도체중 low-sulfur containing keratin)을 추출하는 방법을 사용하였으며 단 추출 온도를 50°C에서 40°C로 또 zinc acetate에 의한 최종단백 침전 방법을 0.1N HCl을 이용 등전점을 각각 찾아 단백을 분리하므로 약간의 수정을 하였다.

즉 우각, 수우각, 서각에 각각 붙어 있는 불순물을 수도물로 수회 세척하여 제거하고 증류수로 다시 3~4회 세척한후 그늘에서 자연 건조시킨 것을 각각 분말로 만든후 percolator 장치를 사용하여 acetone으로 탈지후 완전히 건조한 분말을 각 40g을 취하여 추출에 사용하였다. 추출은 각각 sample 40g을 Erlenmeyer flask에 넣고 0.1 M-thioglycolate (pH 10.5) 900 ml를 넣고 기내의 공기는 질소 gas로 완전히 치환시켜 공기에 의한 단백질의 산화를 막고 40°C 항온조에서 1시간 동안 계속 흔들며 추출한 후 원심분리하고 상등액은 high-sulfur 함유단백 및 low-sulfur 함유단백의 혼합물이므로 제거하고 잔사를 동일한 방법으로 3회 더 추출하고 남은 잔사를 사용하여 0.1 M-thioglycolate (pH 12.3) 900 ml로 40°C에서 질소 gas 치환하에 1시간 흔들며 주면서 추출한다. 추출후 원심분리하여 取한 상등액을 동양여지(No. 2B)로 여과한 여액을 원액으로 한다. 잔사는 다시 동일 용량의 0.1M-thioglycolate (pH 12.3) 900 ml로 동일 조건하에서 추출하여 원액과 합한다. 추출액을 20°C로 냉각하고 차광하에 추출액 1l에 대하여 iodoacetate 40g을 150ml의 증류수에 용해시켜 pH 7로 조정된 용액을 적가하면 pH는 9까지 된다. nitroprusside 시험을 하여 음성이 되도록 방치한 후 다시 0.1 M-thioglycolate를 가해 nitroprusside 시험이 양성인 되도록 한 후 cellophane 지로 유수중에서 일야간 투석시킨다. pH가 6근처가 된 투석액에 포화 zinc acetate 용액을 가해 최종농도가 0.02 M이 되게 하면 다량의 침전이 석출한다. 3000r. p. m.에서 10분간 원심분리하여 침전을 취하고 0.1 M-sodium acetate 용액에 용해시켜 불용물은 원심분리하여 제거하고 상등액을 투석하고 pH 6근처일때 상기와 같이 zinc acetate 침전을 시키는 조작을 2회 반복한 후 투석액이 pH 6근처가 된 추출액에 0.1 N-HCl 용액을 적가하면서 등전점을 찾아 단백을 분리 정제하고 70% acetone으로 3회 세척하고 acetone과 ethyl ether로 각각 3회 세척하여 건조시킨 단백을 sample로 하였다. 추출조작을 도시하면 Figure 1과 같다.

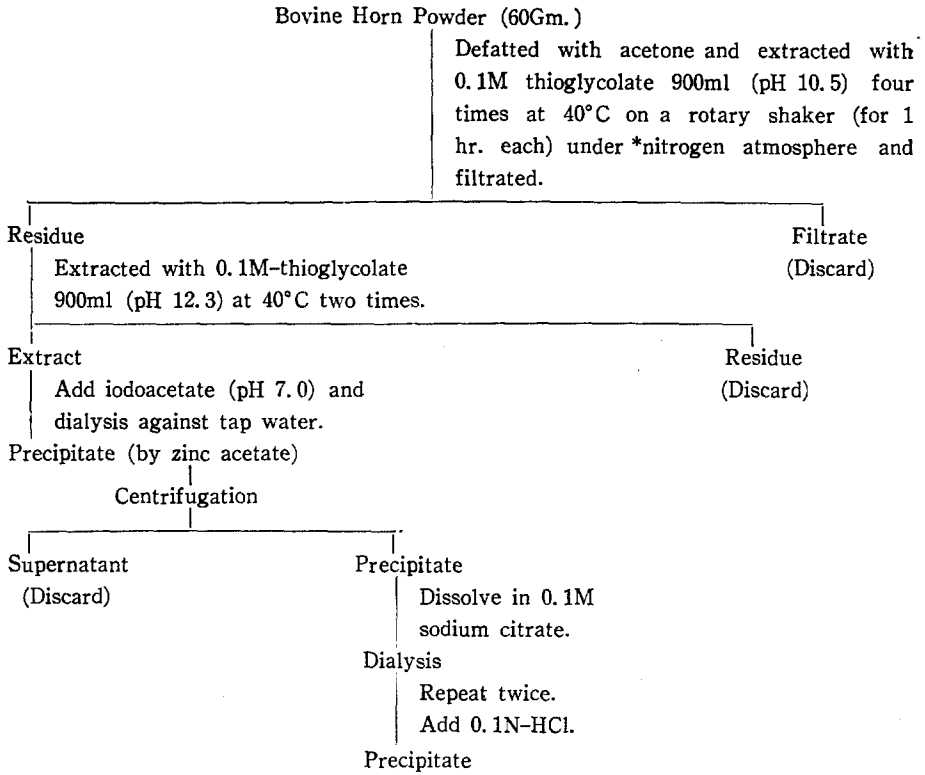


FIGURE 1: The Procedure of Extraction

우각, 수우각, 서각의 추출된 단백질의 yield와 각각의 등전점을 표시해 보면 Table I과 같다.

TABLE I : Isoelectric Points and Protein Yields of Various Horns

	Bovine Horn	Water Buffalo Horn	Rhinoceros Horn
pI	4.7-4.8	4.7-4.8	4.9-5.05
Yield(%)	29.5	16.3	17.6

C. 확인 및 정량시험

1) Amino acid 조성

* pyrogallol 5g을 증류수 50ml에 녹이고 따로 NaOH 6g을 증류수 25ml에 용해하여 두 액을 합하고 일단 N₂ gas를 pyrogallol-NaOH 용액을 통과시킨후 증류수를 다시 통과시킨 N₂ gas로 기내의 공기를 치환시켰다.

a) Sample의 분해

Sample을 각각 3mg을 정평하여 초자관(0.6×7cm)에 넣고 6N-HCl, 1ml씩을 가한 후 봉관하여 HCl-H₂O 공비혼합물(b. p. 108°C)에 넣고 reflux하며 24시간 분해시킨다.

b) Sample의 처리

분해후 개관하여 NaOH pellets을 넣은 P₂O₅-desiccator에서 건조하여 염산을 완전히 제거한 후 pH 2.2, citrate buffer 1ml를 가하여 용해시킨 후 이 중 0.1ml를 취하여 아미노산 자동분석기(Hitachi KLA-3B)로 산성, 중성 아미노산을 pH 3.25, citrate buffer로 elution한 후 pH 4.25, citrate buffer로 elution시켰고 염기성 아미노산은 pH 5.28, citrate buffer로 elution시켰다. Standard는 각아미노산 0.05μ mole을 사용하였다. 그 결과는 Table II와 같다.

* Tryptophane은 alkali로 분해하여 비색하는 Block and Bolling's Modification of the Millon-Lugg Method(Block, 1951)에 준하여 시험하였다.

a) Sample의 분해

Sample 각각 25mg을 초자관(0.6×7cm)에 넣고 5N-NaOH 용액 1ml를 가하여 봉관후 100°C 수욕상에서 18시간 분해시켰다.

b) 정 량

분해후 7N-H₂SO₄ 용액으로 중화, 원심분리하여 상등액을 취하여 20ml 눈금매긴 원심관에 넣고 증류수로 전액을 10ml로 한다. 여기에 Lugg's HgSO₄-HgCl₂-Na₂SO₄ 침전시약* 3ml를 가하여 100°C에서 10분간 방치한 후 유수중에 냉각하고 7N-H₂SO₄ 용액 2ml를 가한 후 증류수로 전액을 20ml로 하였다. 원심분리하여 상등액을 버리고 침전을 Lugg's Washing 시약*으로 2회 세척한 후 침전을 Lugg's color 시약*(HgSO₄-HgCl₂) 5ml에 현탁하여 50~55°C에서 15분간 방치한 후 원심분리한다. 상등액을 취하고 다시 Lugg's Color 시약 5ml로 침전을 세척한 후 전액과 합하고 증류수 2ml를 더 추가하여 3.45% NaNO₂ 1ml를 가하여 정확히 30초 후에 420mμ에서 Spectronic 20을 사용하여 1cm cell로 optical densities를 읽는다. Standard(H₂O에 용해)는 7N-H₂SO₄ 용액으로 중화하는 것을 제외하고 전부 동일하게 조작하여 발색, 비교하여 sample의 tryptophane량을 구하였다.

2) 당류시험

Glegg (Glegg *et al.*, 1953)의 방법에 준하였다.

A) PPC와 TLC에 의한 확인

* Lugg's 침전시약 : 75 g HgSO₄, 55 g HgCl₂, 70 g Na₂SO₄을 H₂SO₄ 125 g과 H₂O 850ml를 혼합한 것에 용해한 후 전량을 1l로 한다.

* Lugg's 세척시약 : 침전시약을 동일 volumn의 N-H₂SO₄로 희석한다.

* Lugg's 정색시약 : HgSO₄ 12 g과 HgCl₂ 9 g을 H₂O 600ml+H₂SO₄ 100g, 용액에 용해하고 500 g의 H₂SO₄를 추가한다. 냉각하여 1l로 한다.

TABLE II : Amino Acid Composition of Animal Hard Tissue Proteins.
(g. of amino acid / 100g. protein)

Amino Acids	0.1M-Thioglycolate Protein Extract (at pH 12.3)		
	Bovine Horn	Water Buffalo Horn	Rhinoceros Horn
Tryptophane	0.65	0.75	0.65
Lysine	2.67	5.57	4.99
Histidine	0.86	1.12	1.21
Arginine	11.02	10.61	11.61
Aspartic acid	10.09	10.73	9.89
Threonine	3.98	3.97	3.90
Serine	4.50	5.16	4.48
Glutamic acid	18.62	19.36	18.24
Proline	3.74	2.87	3.16
Glycine	3.79	4.86	3.90
Alanine	4.50	4.44	5.27
Cystine	0.55	—	0.72
Valine	5.56	5.73	5.95
Methionine	0.68	1.26	0.90
Isoleucine	4.12	4.64	4.50
Leucine	10.23	10.96	11.23
Tyrosine	5.42	4.86	5.43
Phenylalanine	2.92	3.29	3.60
Carboxymethyl Cysteine	9.41	6.06	5.96
Total	103.41	106.27	105.09

a) Sample 의 분해

Sample 각각 50mg 과 dried activated resin* (Dowex 50W (H⁺)) 600mg, 증류수 1.3ml 를 초자관에 (0.6×7cm) 넣고 봉관후 100° C 수욕상에서 48 시간 분해시킨다.

b) Sample 의 처리

분해후 개관하여 test tube 에 옮기고 증류수 1ml 로 초자관을 세척하여 전액과 합한 후 원심분리하여 (3000r. p. m. 30 분) 상등액을 다른 test tube 에 옮기고 45° C 이하에서 vacuum rotary evaporator 내에서 건조시킨후 잔사에 0.1ml 증류수를 가하여 용해시키고 whatmann No. 1 paper 와 TLC 상에 각각 직경 5mm 이내로 10~20 회 spotting 한다.

* Dried activated resin: Dowex 50W 10g 을 4.4N-HCl 1l 로 처리한 후 산성이 없어질 때까지 증류수로 세척하고 suction 으로 완전히 수분을 제거한 후 공기 중에서 건조시켜 사용하였다.

c) 전개방법

전개용매 (Chargaff *et al.*, 1948) (n-butanol: pyridine: H₂O)로 ascending 방법으로 3회 전개 (Jeanes *et al.*, 1951)시킨다. TLC도 동일 용매로 27cm 전개시켰다.

d) 발색방법

전개후 완전히 건조된 paper와 TLC 상에 발색시약 (1968) (diphenylamine + aniline + acetone + H₃PO₄)을 spray 하여 가열해서 다음과 같은 결과를 얻었다.

standard는 각각 1% 수용액을 spotting 하여 sample의 spots와 비교 동정하였다.

TABLE III: Composition of Carbohydrates Detected from Hard Tissue Proteins.

Samples	Hexose			Pentose		
	Glucose	Galactose	Mannose	Xylose	Fucose	Ribose
Bovine Horn	+	+	+	+	+	-
Water Buffalo Horn	+	+	-	+	+	-
Rhinoceros Horn	+	-	+	-	-	+

B) Total Hexose의 정량

W. E. Trevelyan and Harrison (1952) 방법에 준하였다.

a) Sample의 가수분해

시료 30mg을 정평하여 glass tube에 (0.6×7cm) 넣고 봉관후 boiling water-bath에서 4시간 가수분해후 개관 후 원심분리 (3000 r. p. m. 10분)하여 처음 상등액과 합하여 5ml로 만든 후 이중 1ml를 정량분석에 사용한다.

b) 정량

Bakelite 전 pyrex tube에 anthrone 시약 5ml를 정확히 취하고 ice water로 냉각한 후 sample 시액 1ml를 위에 증적시킨 후 냉수욕상에서 꺼내어 처음에는 서서히 그 다음에는 강하게 진탕 혼화 후 비등수욕상에서 정확히 10분간 가열 후 tube를 즉시 유수중에서 2분간 냉각후 Beckmann DU type spectrophotometer로 1 cm cell을 사용하여 620m μ 에서 optical densities를 측정했다.

TABLE IV: Total Hexose Amounts for Each Extracted Keratins.

Samples	Per cent of total hexose in protein extracts
Bovine Horn	0.079 %
Water Buffalo Horn	0.161 %
Rhinoceros Horn	0.033 %

한편 standard는 glucose 40.0mg을 정평하여 500ml의 포화 benzoic acid 용액에 용해하여 1ml 당 80 μ g 함유 stock solution을 만들고 희석하여 사용한다. 정량분석 결과는 Table IV와 같다.

또한 glucose를 standard로 한 calibration curve는 Figure 2와 같다.

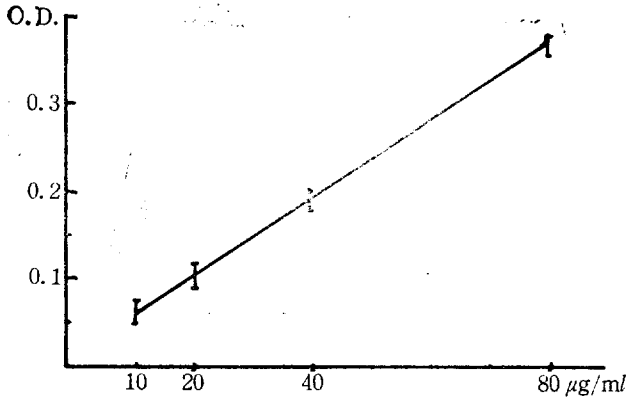


FIGURE 2: Total Hexose Standard Calibration Curve.

3) Sialic acid의 시험

(가) ppc에 의한 확인

(a) Sample의 가수분해

Sample 각각 500mg씩을 bakelite stoppered test tube에 넣고 0.1 N-H₂SO₄ 용액 8ml를 가하여 80°C에서 60분간 분해시켰다.

(b) Sample의 처리

분해후 원심분리하여 (3000r. p. m. 10분) 상등액을 취하고 0.1 N-sulfuric acid 용액 2ml를 추가하여 세척, 원심분리하여 전액과 합한 후 포화 barium hydroxide 용액을 1적씩 가하여 중화시킨 후 원심분리하여 생성한 barium sulfate 침전을 제거하고 상등액만 취하여 과량의 양 ion을 제거하기 위해 column [activated resin; Dowex 50W (H⁺)]*을 통과시킨다. 통과액 10ml를 취하여 vacuum-evaporator 내에서 45°C 이하에서 감압건조시킨 후 증류수 0.1ml를 가하여 용해시키고 whatmann No. 1 paper에 전액을 spotting 한다.

(c) 전개 및 발색

전개용매 (Dewitt *et al.*, 1959) (ethylacetate: pyridine: H₂O: HAc=5:5:3:1)로 포화된 chamber 내에서 ascending 방법으로 전개시킨다. 전개후 완전히 건조하여 발색시약 (Svennerholm *et al.*, 1959) (dimethylaminobenzaldehyde+50% H₂O-ethanol+n-butanol)을 spray하여 건조후 약 80°C로 가열하니 10~15분 경과후에 발색하였다. 또한 standard는 N-acetylneuraminic acid (편산화학주식회사제품, 일본)를 증류수에 녹인 것과 0.1N-H₂SO₄ 용액에 용해한 액 4ml (240µg of N-acetylneuraminic acid)를 sample과 동일하게 처리하여 비교동정하였다.

결과: 우각, 수우각, 서각의 세 경우에 있어서 모두 spot를 detect하지 못했다.

* Activated resin 과 column 의 제조 : Dowex 50W (H⁺) 10g 을 2N-NaOH 100ml 에 현탁하여 처리한 후 증류수로 alkali 성이 없어질 때까지 세척하고 여분의 수분을 suction 으로 제거한 후 사용하였다. column 충전은 2.5g 의 dried activated resin 을 배량의 증류수에 현탁시켜 하였다.

(나) Sialic acid 의 정량

(a) Sample 의 가수분해

Sample 각각 25mg 에 0.1N-H₂SO₄ 용액 1ml 씩을 가하여 glass stoppered test tube 에 넣고 80°C 에서 60 분간 분해시킨 후 원심분리하고 상등액에서 0.2ml 를 정확히 취하여 Leonard-Warren 방법 (1959)에 준하여 정량하였다.

(b) 정 량

상등액 0.2ml 씩을 glass stoppered test tube 에 취하고 sodium metaperiodate 시약 0.1ml 씩을 가하여 진탕 혼화후 실온에서 20 분간 방치하고 arsenite 시약 1ml 씩을 가하여 황록색이 없어질 때까지 진탕한 후 thiobarbituric acid 시약* 3ml 를 가하여 100°C 에서 15 분간 반응시킨 후 냉수로 냉각하고 cyclohexanone 4.3ml 를 가하여 강하게 진탕하여 원심분리 (3000r. p. m. 15분)하고 cyclohexanone 층을 532m μ 과 549m μ 에서 Beckmann DU type spectrophotometer 로 1 cm cell 에서 optical densities 를 측정한다. 계산은 다음식에 의하여 한다.

$$\mu \text{ mol of N-acetylneuraminic acid} = 0.090 \times O. D_{549} - 0.033 \times O. D_{532}$$

결과는 Table V 와 같다.

TABLE V: Sialic Acid Contents of Hard Tissue Proteins.

Samples	μ mol of N-acetylneuraminic acid / gm.
Bovine Horn	1.26
Water Buffalo Horn	0.29
Rhinoceros Horn	0.96

4) Uronic Acid 시험

(가) PPC 에 의한 Uronic Acid 의 확인

(a) Sample 의 가수분해 (Dziewiatkowski, 1962)

Sample 각각 20mg 을 glass ampule (1.4×8cm) 에 취하고 activated resin [amberlite-CG 120×8~10 (200~400mesh)]* 250mg 을 각각 충전시킨 후 0.05 N-HCl 5ml 를 넣고 봉관하여 H₂O-HCl 공비혼합물 (108°C) 중에서 24 시간 가수분해시킨다.

* 2-Thiobarbituric acid 는 E. Merck 제품이며 hot water 로 재결정하여 무수인산 감압 desiccator 에서 건조하여 사용직전에 시약을 조제하여 온시 사용하였다. 즉 7.1g 의 Na₂SO₄ 를 증류수 약 80ml 에 용해 (mass flask 내) 하여 가열한 후 재결정한 2-thiobarbituric acid 600mg 을 가하여 증류수로 100ml 로 하고 약 5 분간 가열하여 완전히 용해시킨 후 정량여지 (동양여지 No. 5B) 로 여과하여 온시 사용하였다.

(b) 가수분해물의 처리

개관후 2ml의 탈 ion 화한 증류수로 4회 세척한 액과 여과하여 얻은 여액을 합하여 40°C 이하에서 vacuum rotary evaporator 로 감압건조시키고 (C-H₂SO₄와 NaOH pellets 을 evaporator 내에 넣어둔다) 그 건조잔사를 0.1ml 증류수에 용해시키고 이를 Whatmann No. 1 paper 상에 diameter 5mm 이내로 spotting 한다.

(c) 전개 및 발색

전개용매(Hoffman *et al.*, 1956) (ethylacetate: acetic acid: H₂O=3:1:3v/v)로 포화된 chamber 에서 ascending 방법으로 전개시킨다. 전개후 완전히 건조하여 AgNO₃ 시약* 중에 속히 통과시키고 다시 건조시킨 후 이어서 0.5N-NaOH(in alcohol)시약* 을 spray 하고 10분간 공기중에 방치한 후 2N-NH₄OH 용액 중에 약 5분간 담그었다가 유수중에서 1시간 세척후 100°C oven 내에서 가열시키면 선명한 갈색 spot 를 볼 수가 있다. 그 결과를 보면 Table V 과 같다.

TABLE V: Uronic Acids Detected from Hard Tissue Proteins.

Samples	Glucuronic Acid	Galacturonic Acid
Bovine Horn	-	+
Water Buffalo Horn	-	+
Rhinoceros Horn	-	+

(나) Total uronic acid 의 정량분석

Bitter and H. M. Muir(1962)의 방법에 준하였다.

(a) Sample 의 가수분해

전향의 uronic acid 정성분석시 가수분해조건과 동일하였다.

(b) 가수분해물의 처리

개관후 2ml의 탈 ion 화한 증류수로 4회 세척한 액과 여과한 여액을 합하여 40°C 이하에서 vacuum rotary evaporator 로 감압 건조시키고 (C-H₂SO₄와 NaOH pellet 를 evaporator 내에 넣어둔다) 건조잔사를 2ml의 0.14N-NaOH 에 용해시키고 10분간 60°C 수욕상에서 가열해준후 실온까지 냉각해 준다. 다시 2ml의 0.2M-NaAc buffer(pH 5.9)를 가하고 이중 1ml를 취하여 정량한다.

(c) 정 량

Bakelite 전 시험관에 5ml의 sulfuric acid 시약*을 가하여 0°C까지 빙수욕중에서 냉각하고 sample 1ml (4~40µg의 uronic acid 포함)를 위에 층적시키고 처음에는 서서히, 이어서 강하게 진탕하고 boiling water bath 내에서 10분간 가열한다. 유수중에서 2분간 냉각한 후 carbazole 시약* 0.21ml를 가하고 다시 boiling water bath에서 15분간 가열하고 이의 optical densities 를 Hitachi recording spectropho-

* AgNO₃ 시약 : AgNO₃ 포화용액 (in H₂O) : acetone=0.1 : 20 (v/v)

* NaOH 시약 : 0.5% in ethanol(40% NaOH 용액 1ml를 80ml ethanol 에 용해시킨다)

tometer (model EPS-3T)를 사용하여 $530m\mu$ 에서 측정하고 standard calibration curve의 optical densities와 비교하여 산출한다.

한편 standard calibration curve는 glucuronic acid (Sigma Chemical Company 제품)를 $5\mu\text{g/ml} \sim 40\mu\text{g/ml}$ 조제하여 상기와 동일한 방법으로 $530m\mu$ 에서 optical densities를 측정하여 다음 Figure 3과 같은 calibration curve를 구했다.

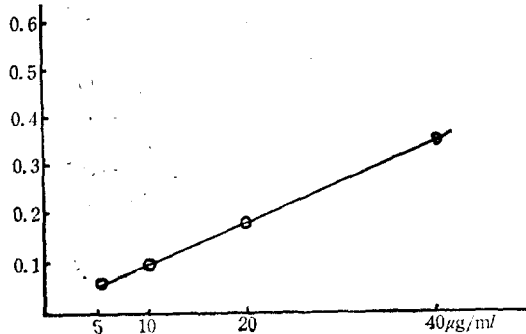


FIGURE 3: Total Uronic Acid Standard Calibration Curve.

각 sample의 total uronic acid의 양을 보면 Table VII과 같다.

TABLE VII: Amounts of Total Uronic Acid in Extracted Proteins.

Samples	Per cent of total uronic acid / extracted protein amounts
Bovine Horn	0.018 %
Water Buffalo Horn	—
Rhinoceros Horn	0.031 %

(다) Glucuronic acid 정량

Z. Dische (1947)의 방법에 준하였다.

a) Sample의 가수분해와 분해후처리

Total uronic acid의 가수분해 조건과, 분해물의 전처리방법과 동일하게 하였다.

b) 정량

Sample 0.8ml ($20 \sim 40\mu\text{g}$ 의 glucuronic acid 함유)에 0.2% mannose 용액 0.2ml를 가하여 빙냉하고 혼합후 dil- H_2SO_4 (6:1 v/v) 4.5ml를 가한다. 빙수로부터 꺼내어 실온으로 2분간 가온후 다시 boiling water bath에서 2분간 가열후 실온으로 냉각하여 2.5% (v/v) thioglycolic acid 용액 0.1ml를 가하고 잘 혼합한 다음 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 로 50시간 방치하면 강한 적색을 정한다. Hitachi recording spectrophotometer (model

* 0.025M sodium tetraborate (analytical grade) in sulfuric acid (Sp. Gr. 1.84)

* 0.125% carbazole in absolute ethanol (analytical grade): Stable for 12 weeks at 4°C in the dark.

EPS-3T)를 사용 530m μ 과 480m μ 에서 opical densities 를 구하여 (O. D_{530m μ} -O. D_{480m μ})를 구하고 standard calibration curve 의 O. D. 와 비교하므로 다른 uronic acids 존재 하에서 glucuronic acid 를 정량하였다.

한편 standard calibration curve 는 glucuronic acid(Sigma Chemical Company 제품)를 20 μ g/ml~40 μ g/ml 조제하여 상기와 동일한 방법으로 optical densities 를 측정하였고 Figure 4 와 같다.

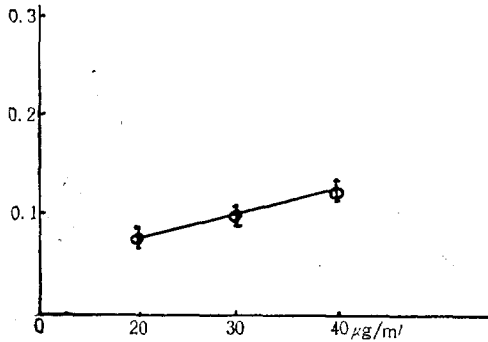


FIGURE 4 : Glucuronic Acid Standard Calibration Curve.

또한 calibration curve 와 비교하여 계산한 각 sample 의 glucuronic acid 의 양을 보면 Table VIII과 같다.

TABLE VIII : Amounts of Glucuronic Acid in Extracted Proteins.

Samples	(O. D _{530nm} -O. D _{480nm})	Amounts
Bovine Horn	-0.09	none
Water Buffalo Horn	-0.173	none
Rhinoceros Horn	-0.13	none

5) Hexosamine 의 시험

(가) PPC 와 TLC(Gal, 1968)에 의한 확인

(a) Sample 의 가수분해

Sample 각각 50mg 을 정평하여 glass tube(0.6 \times 7cm)에 넣고 4N-HCl 1ml를 넣어 봉관한 후 boiling water bath 내에서 15 분간 가수분해시킨다.

(b) Sample 의 처리

가수분해 후 증류수로 10 배 희석하고 원심분리한다. 상등액중 5ml를 취하여 activated resin[Dowex 50W (H⁺)]*을 통과시키고 증류수로 산성이 없어질 때까지 resin

* Activated Dowex 50W (H⁺) form; Dowex 50W 10 g 을 beaker 에 취하고, 2 N-NaOH 용액 50ml 를 넣어 처리한 후 증류수로 alkali 가 없어질 때까지 씻은 후 2N-HCl 용액 50ml 를 가하여 처리하고 증류수로 산성이 안 나타날 때까지 세척한 후 suction 으로 여분의 수분을 제거하여 column(0.6 \times 8cm)에 충전한다. 충전은 resin 2.5g 을 배량의 증류수에 현탁하여 충전하여 사용한다.

을 세척한 후 2N-HCl 용액으로 elution 하여 정확히 5ml를 취한 용액중 1ml을 따르
취하여 40°C 이하에서 vacuum rotary evaporator로 건조하고 건조잔사에 0.1ml 증
류수를 가하여 용해시킨 후 spotting 한다.

(c) 전개 및 발색

TLC를 할 때는 전개용매 (pyridine: H₂O=7:1.5v/v)과 또 (butanol: ethanol:
water=4:1:1v/v)를 각각 사용하여 ninhydrin(0.2% in acetone) 용액을 spray 하
였으며, PPC를 할 때는 전개용매는 TLC 때와 같은 두 system을 사용하였으며 발색
시약은 ninhydrin(0.2% in acetone)과 ammoniacal AgNO₃(전기기술) 용액을 각각
spray 하여 standard의 spot와 동정하였다. 그 결과를 보면 table K와 같다.

TABLE K: Hexosamines Detected from Extracted Proteins.

Samples	Glucosamine	Galactosamine
Bovine Horn	+	-
Water Buffalo Horn	+	-
Rhinoceros Horn	+	-

(나) 정 량

Norman F. Boas 방법 (1953)에 준하였다.

(a) Sample의 가수분해

전량의 가수분해조건과 동일하게 처리하였다.

(b) 가수분해물의 처리

분해시킨 후 개관하여 증류수로 10 배 희석한 후 원심분리한다. 상등액 중 5ml를 취
하여 Activated resin [Dowex 50W (H⁺)]를 통과시키고 증류수로 산성이 없어질 때
까지 resin을 세척한 후 2N-HCl 용액으로 elution 하여 정확히 5ml를 취한다.

(c) 정 량

이 5ml를 공전시험관에 넣고 0.5% phenolphthalein(in ethanol) 1적을 가한 후
4N-NaOH 용액으로 색이 발현할 때까지 가하고 0.5N-HCl 용액으로 색이 다시 없어
질 때까지 가한 후 이에 해당하는 NaCl 양을 4N-NaCl 용액으로 Blank*와 standard*
에 가하여 염의 양을 동일하게 한 후 Acetylacetone 시약* 1ml를 가하고 89~92°C
에서 45분간 반응시킨 후 유수중에서 냉각하고 Ethanol 2.5ml를 가하여 혼합한 후
Ehrlich 시약* 1ml씩을 가하여 조심스럽게 진탕(CO₂ gas 발생때문)한 후 ethanol로

- * Blank test는 sample 대신 증류수 3ml를 사용하여 염의 양을 보정하여 ample과 동일하게
처리하였다.
- * standard는 glucosamine, HCl을 사용하였으며 3ml(5μg/ml~40μg/ml)를 각각 취하여 sample
과 동일하게 조작하여 optical densities를 측정하였다.
- * Acetylacetone 시약(제일화학약품) : 재증류하여 사용 직전에 조제한다. 즉 1N-Na₂CO₃ 용액에
acetylacetone 시약 2ml를 가하여 전량을 100ml로 하여 사용한다.
- * Ehrlich 시약 : 2.67g의 재 제정된 p-dimethyl-aminobenzaldehyde를 ethanol-HCl (1:1)용
액에 용해시킨다.

전량을 10ml로 하여 2 시간동안 실온에서 방치한 후 Beckmann DU type spectrophotometer 를 사용하여 1cm cell로 optical densities 를 구한다. 한편 standard 는 3ml (5 μ g/ml~40 μ g/ml in H₂O)를 취하여 염을 보정한 뒤 sample 과 동일하게 조작하여 530 m μ 에서 optical densities 를 구한다.

standard calibration curve 를 표시하면 Figure 5 과 같다.

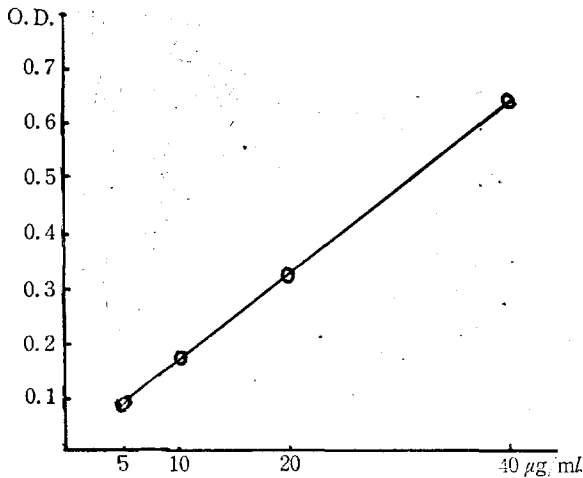


FIGURE 5 : Total Hexosamine Standard Calibration Curve.

또한 각 sample 의 total hexosamine 의 함량을 표시하면 Table X와 같다.

TABLE X : Hexosamine Contents in Extracted Hard Tissue Proteins.

Samples	Amounts of total Hexosamine g./100g
Bovine Horn	0.019
Water Buffalo Horn	0.017
Rhinoceros Horn	0.014

6) 원소분석

C, H, N 의 원소분석은 Coleman model 29-N-Analyzer, model 33-C-H Analyzer를 각각 사용하였으며 S의 원소 분석은 개량연소 flask 를 사용하는 Thorin 방법 (木下盛雄, 1965)에 의하여 분석하였다.

그 결과를 표시하면 Table XI과 같다.

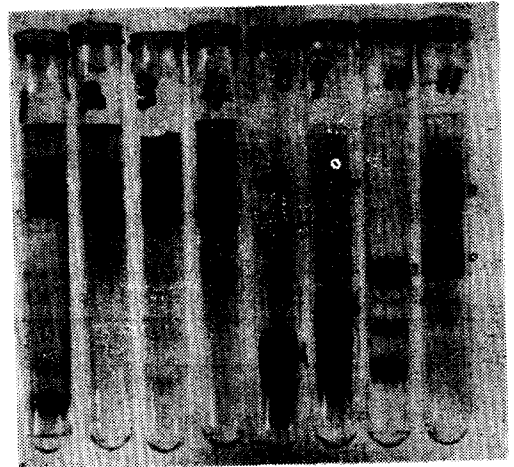
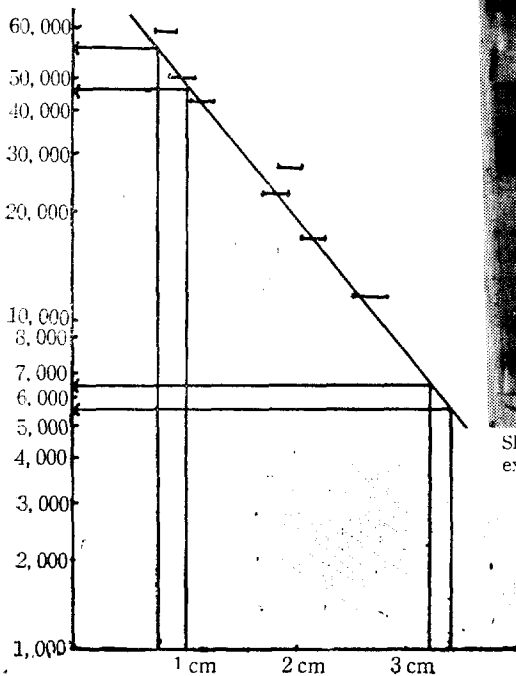
TABLE XI : Elemental Analysis

Samples	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)*
Bovine Horn	47.62	6.71	14.47	4.97
Water Buffalo Horn	47.84	6.99	14.07	4.07
Rhinoceros Horn	47.42	6.60	14.24	6.19

결론 및 고찰

우각, 수우각, 서각에서 0.1M-thioglycolate 로 추출한 후 iodoacetate 로 S-carboxymethyl 化한 3 종의 keratin 의 수득량은 16~30%였으며 우각, 수우각, 서각의 keratin 단백질의 등전점은 공히 4.7~5.07 이었다.

SDS acrylamide gel disk electrophoresis 에 의한 분자량 측정치의 결과는 3 종 공히 수종의 단백질로 구성되어 있는 것으로 밝혀졌으며 그중 분자량 67,000~72,000; 60,000; 47,000 의 3 개의 Band 는 3 종의 keratin 에서 major components 로 공히 존재하는 것이며 minor components 에 있어서는 분자량 23,500 의 Band 를 우각은 함유하며, 수우각은 27,500 의 Band 를, 서각은 23,500; 16,000; 8,500 의 3 Band 를 갖는 것으로 나타났다.



SDS gel disc electrophoresis patterns of keratin extracts of four species of animals, as the following.

- 1) Shell of Manis Pentadactyla
- 2) Bovine Horn
- 3) Rhinoceros Horn
- 4) Water Buffalo Horn
- 8) Cytochrome C M.W. 11,700
- Ovalbumine M.W. 17,200
- 9) Myoglobuline M.W. 17,200
- Bovine Albumine M.W. 67,500
- 10) Chymotrypsinogen M.W. 27,500
- 11) γ -Globuline M.W. 50,000 M.W. 23,500

FIGURE 6 : Determination of Molecular Weight by Acryl Amide Gel Electrophoresis.

상기에 표시된 전기 영동의 pattern 과 mobility 및 분자량을 표시한 검량선에 이를 표시해 보면 Figure 6 과 같다.

또한 이들 추출 단백질 (SCMK)의 구성 아미노산은 공히 18 종이었고 구성아미노산 중, arginine, aspartic acid, glutamic acid, leucine, cystine 의 5 종의 아미노산 함량은 전체 아미노산의 57~59%를 차지하고 있는 것으로 나타났다.

또한 우각, 수우각, 서각의 구성 아미노산 간의 차이는 별로 없었으나 lysine 함량에 있어서 우각은 2.67%로 수우각 5.57%, 서각 4.99%에 비하여 $\frac{1}{2}$ -량에 불과하였다.

우각과 서각의 아미노산 분석표 중에 cystine 이 미량이지만 검출된 것은 iodoacetate 에 의한 S-carboxy methyl 화가 완결되지 못하였음을 시사하는 것으로 사료되며 carboxymethyl cysteine 의 함량에 있어 우각이 수우각 및 서각보다 약 2배 많은 것으로 봐서 우각이 기타의 2종에 비하여 cystine 에 의한 disulfide 결합이 많은 것으로 추정할 수 있다.

한편 이들 추출 단백질에 결합되어 있는 monosaccharide, hexosamine, uronic acid, sialic acid 등 당의 함량에 있어 우각은 1.38%, 수우각은 0.47%, 서각은 1.04%로 나타났다.

이들 성분 중 특기할 것은 hexosamine 은 우각, 수우각, 서각 공히 glucosamine 만을 함유하고 있으며, uronic acid 는 3종 공히 galacturonic acid 만을 함유하고 있음이 밝혀졌다.

또한 중성당으로서 우각과 수우각에 있어서는 glucose, galactose, mannose, xylose, fucose 를 공히 함유하는데 반하여 서각에서는 glucose, mannose, ribose 를 함유하고 있는 것으로 나타났다.

한편 acrylamide gel disk electrophoresis 결과 밝혀진 Band 중 저분자 단백질은 고 glycine, 고 tyrosine 을 함유하는 단백질로서 이것의 생화학적 활성에 대하여 각국에서 추궁하고 있음이 알려져 있다.

References

- Bitter, T. and Muir, H. M., (1962), *Anal. Biochem.* **4**, 330.
 Block, R. J. (1951), *Amino Acid Composition of Protein and Foods, Analytical Methods and Results, 2nd Ed.*, pp. 131.
 Boas, N. F. (1953), *J. Biol. Chem.* **204**, 553.
 Chargaff, E., Levine, G., and Green, C. (1948), *J. Biol. Chem.* **75**, 67.
 Dewitt, C. W. and Rowe, J. A. (1959), *Nature* **184**, 381.
 Dische, Z. (1947), *J. Biol. Chem.* **171**, 725.
 Dziewiatkowski, D. (1962), *Biochim. Biophys. Acta.* **56**, 167.
 Gal, A. E. (1968), *Anal. Biol.* **24**, 452.
 Gillespie, J. M. and Springell (1957), *Austr. J. Chem.* **10**, 344.

- Glegg, R. E., Eidinger, D. and Leblend, C. P. (1953), *Science* **118**, 614.
Hoffman, P., Linker and Meyer, K. (1956), *Science* **124**, 1252.
Janes, A. C., and Dimler, R. (1951), *J. Anal. Chem.* **23**, 415.
Svennerholm, E. E. and Svennerholm, L. (1959), *Nature* **181**, 1154.
Trevelyan, W. E. and Harrison, J. S. (1952), *Biochem. J.* **50**, 298.
Warren, L. (1959), *J. Biol. Chem.* **234**,
木下盛雄 (1965), *Japan Analyst.* **14**, 352.

[Abstract]

Studies on the Compositions of Hard Tissue Proteins Extracted from Bovine Horn, Water Buffalo Horn and Rhinoceros Horn

Seung Ki Lee and Young Eun Kim

*Department of Biochemistry, College of Pharmacy
Seoul National University, Seoul, Korea*

We have previously reported that the abstinence syndrom of narcotic addicts was relieved by the protein extracts of animal hard tissue (from *Manis pentadactyla*). The protein extracts of the hard tissue were found to be a sort of keratin.

Keratins were extracted from three species of animal horns (bovine horn, water buffalo horn and rhinoceros horn) with 0.1 M-Thioglycolate at 40°C and S-carboxymethyl derivatives (SCMK) of the keratin were synthesized by the method of Gillespie and his co-workers. The yields of the keratin derivatives were in the range of 16% to 30% of the dryweight of the horns.

In an attempt to elucidate and compare the compositions of the keratin derivatives, the analysis for amino acids, monosaccharides, hexosamines, uronic acids, sialic acids among bovine horn, water buffalo horn, and rhinoceros horn, were performed. Eighteen kinds of amino acids were found in the three keratin derivatives and there were no differences in the composition among them, with the exception of lysine contents of bovine horn protein extracts (2.67%), which was distinctively lower than those of water buffalo horn protein extracts (5.57%) and those of rhinoceros horn protein extracts (4.99%).

The amounts of carboxymethyl cysteine of bovine horn are twice of those of water buffalo horn and those of rhinoceros horn. In view of these results, it is presumed that the crosslinking rate of bovine horn keratin by cystine disulfide bridge is higher than those of water buffalo horn and Rhinoceros horn.

The conjugated components of the keratin derivatives, such as monosaccharides, sialic acids, hexosamines, and uronic acids were totally contained 1.38% in bovine horn keratin, 0.47% in water buffalo horn keratin and 1.04% in rhinoceros horn keratin. There are some similarities among the keratin derivatives of the three species, such as these keratins do not contain galactosamine but glucosamine,

and also the existence of glucuronic acid in these keratins is not detected but galacturonic acid.

The sugar moieties of these proteins consisted of glucose, galactose, xylose, fucose in bovine horn protein extracts; glucose, galactose, xylose, fucose in water buffalo horn protein extracts; glucose, mannose, ribose in rhinoceros horn protein extracts.