

## Molecular Weight Distribution of Regenerated Silk Fibroin in Aqueous Solution

Jae-Ho Jeong, Won Hur

Kangwon National University, School of Biotechnology and Bioengineering

TEL: +82-33-250-6276, FAX: +82-33-243-6350

### Abstract

In order to investigate the properties of aqueous fibroin solution, the molecular weight distribution of silk fibroin was determined by gel filtration chromatography. The molecular weights spreaded from 200 kDa to less than 20 kDa. The distribution of molecular weight was significantly affected when the pH of solubilization solution is less than 1. Distributions of fibroin solution stored at various condition were also investigated.

### 서 론

실크는 피브로인(Fibroin)과 이를 둘러싸고 있는 세리신(Sericin)으로 구성되어 있다. 실크 섬유의 약 72.6 %를 차지하는 피브로인을 구성하는 아미노산은 주로 글라이신(35 %), 알라닌(27 %), 세린(13 %), 타이로신(10 %)으로 구성되어 있으며 이 4종의 아미노산이 전체의 약 75 %를 차지한다. 실크 피브로인은 인체에 독성과 자극이 없는 천연 단백질로서 다른 단백질에 비하여 입자 크기가 작고, 원료가 풍부하며 가공 공정이 간단하여 편리한 다기능 생물 소재로 개발되고 있다(1-4).

피브로인을 이용하여 유용한 기능성 생물소재를 개발하기 위해서 수용액 상태에서의 피브로인의 특성의 파악이 필수적이다. 따라서 본 연구에서는 염용액으로 수용화된 실크 피브로인의 액상 거동을 살펴보고자 gel filtration chromatography를 통하여 분자량 분포를 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실크 피브로인 수용액 제조

천연 실크를 탄산나트륨( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 수용액(0.3 %)에서 100 °C로 30분간 끓여 세리

신을 제거한 후 염화칼슘(CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) 수용액(37.5 %)으로 수분간 100 °C에서 끓여 실크 피브로인을 용해시켰다. 11~12 %(w/v)의 실크 피브로인 수용액을 얻었고 이것을 MWCO(molecular cut off)가 6000~8000 Dalton인 셀룰로오스 투석막 (Cell-Sep. USA)으로 투석하였다. 약 2~3일간을 투석액을 교환하여 전도도계(Corning CD-55 Sensor, USA)를 사용하여 conductivity를 측정하여 투석액의 conductivity가 변화하지 않을 때까지 실행하였다.

## 2. 분자량 분포 측정

Gel filtration chromatography(waters, model 930)로 실크 피브로인의 분자량 분포를 측정하였다. 분획용 컬럼은 TSK G4000sw(Fraction range 20~10,000x10<sup>3</sup>)를 사용하였고 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. Mobile phase로 20 mM tris buffer(pH 7.5)를 사용하였으며 flow rate는 0.5 ml/min으로 유지했다. 분자량을 알기 위한 표준 물질로는 Blue dextran (M.W.=2,000 kDa), Thyroglobulin (M.W.=669 kDa), Appoferritin (M.W.=443 kDa), β-Amylase (M.W.=200 kDa), Alcohol dehydrogenase (M.W.=150 kDa), Albumin (M.W.=66 kDa), Carbonic anhydrase(M.W.=29 kDa), Cytochrome c(M.W.=12.4 kDa)을 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

## 2.4 평균 분자량 계산

Gel filtration chromatography의 데이터의 retention time으로부터 분자량(M<sub>i</sub>)를 추정하고 피크의 intensity(H<sub>i</sub>)로부터 일정 분자량의 상대적 분자수(N<sub>i</sub>=H<sub>i</sub>/M<sub>i</sub>)를 계산하여 식(1), (2)로부터 수평균 분자량(Number-averaged molecular weight, M<sub>n</sub>)과 중량 평균 분자량(Weight-averaged molecular weight, M<sub>w</sub>)를 구하였고 식(3)으로 분산 계수(polydispersity index, PDI)를 구하였다.(5)

$$\bar{M}_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \quad (1) \quad \bar{M}_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i} \quad (2) \quad PDI = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n} \quad (3)$$

## 결과 및 고찰

### 1. 액상의 피브로인의 분자량 분포

염용액으로 가용화시킨 피브로인을 투석시켜 염을 제거한 상태에서 동결건조 보관되었던 피브로인을 수용액에 1 %(w/v)의 농도로 녹인 후 분자량 분포를 측정

하였다. 재생된 실크 피브로인의 분자량은 200 kDalton에서 증가하여 40 kDalton에서 가장 높은 농도를 보이고 있고 분획한계인 20 kDalton이하 까지 넓게 분포되어 있었다(Fig. 1). 수평균 분자량과 중량평균 분자량은 각각 8.8 kDalton과 68.5 kDalton으로 계산되었으며 분포를 나타내는 PDI는 7.7로 계산되었다. 분획 한도인 1000 kDalton 이상인 10.6분에서 피크가 관찰되었다.

클론된 *Bombix mori*의 피브로인의 유전자로부터 피브로인의 분자량은 309 kDalton으로 알려져있다(6). 따라서 염용액으로 가용화된 피브로인은 고온의 가용화시키는 과정에서 피브로인이 부분 분해되어 분자량이 감소된 것을 보여주고 있다. 동시에 투석과정에서 분자량이 작은 펩타이드는 제거되어 Fig. 1에서 볼 수 있는 분자량분포를 나타내고 있다.

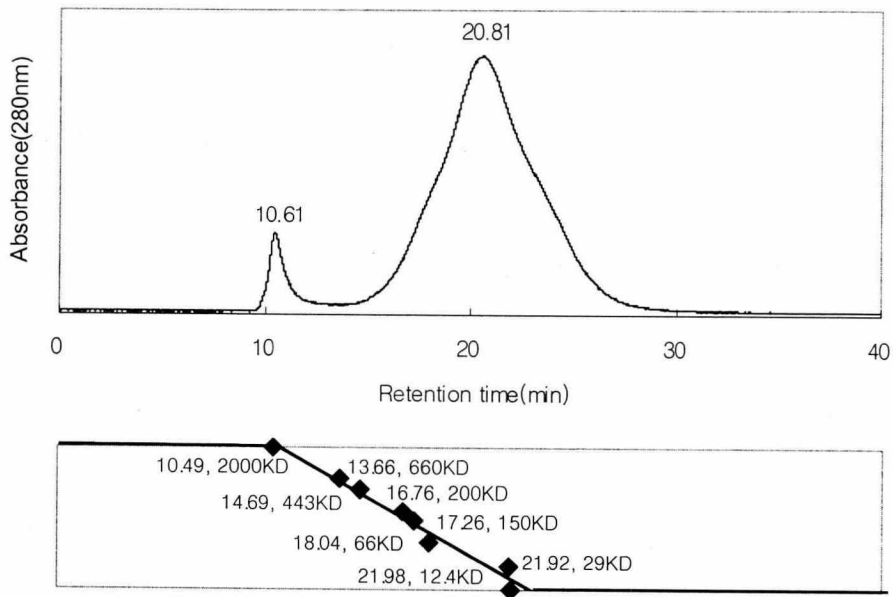


Figure 1. Molecular weight distribution of regenerated silk fibroin in aqueous solution.

## 2. Heat treatment와 pH control

피브로인을 가용화시키는 과정에서 염화칼슘 수용액의 pH를 6, 4, 2, 그리고 1로 조절하여 각각의 용액에 실크를 용해시켰다. 각각의 용해된 피브로인 수용액의 분자량 분포를 측정하였다. 피브로인의 분자량 분포는 pH 4와 6에서는 뚜렷한 차이를 확인 할 수 없었으나 pH 2와 pH 1에서는 분자량의 감소를 확인 할 수

있었다.

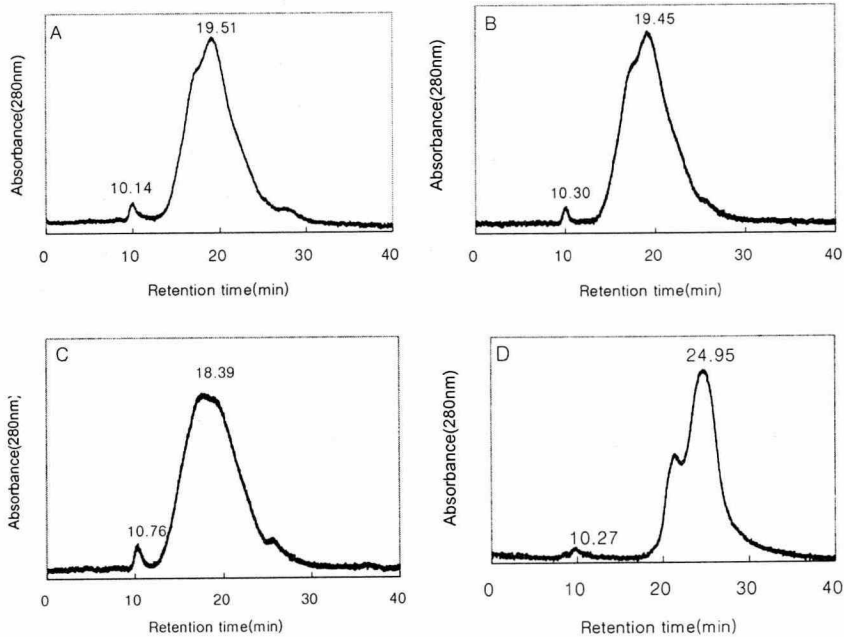


Figure 2 Molecular weight distribution of fibroin solubilized at (A)pH 6, (B)pH 4, (C)pH 2 and (D)pH 1.

### 3. 온도의 변화에 따른 피브로인의 분자량 분포

피브로인 수용액을 상온에서 방치하거나 저온에서 저장할 경우의 분자량 분포를 측정하였다. 피브로인 수용액을 상온에서 방치하거나 저온에서 보관하면 분획한도 보다 큰 분자량에 해당하는 10분대의 피크의 크기가 증가하는 것이 일반적으로 관찰되었다. 반면에 피브로인 수용액을 95℃로 평형화된 반응조에서 수초간 가열 후 급속히 냉각시킨 후 분자량 분포를 측정하였다. 열처리된 피브로인 수용액의 분자량의 분포는 분자량의 큰 부분에서는 많은 변화를 보이지 않았으나 분획한도에 해당하는 20 kDalton 이하의 영역에서 새로운 피크가 관찰되었다.

### References

1. D. K. Kim, Y. H Kim, Y. G. Chin (2001), The change of molecular weight and structure in the preparation process of silk fibroin powder, *J. kor. Fiber Soc.* **38**,

105-110.

2. Gotoh, Y., M. Tsukada, N. Minoura (1996), Chemical modification of the arginyl residue in silk fibroin. 2. Reaction 1,2-cyclohexanedione in aqueous alkaline medium, *Int. J. Biol. Macromolecules* **19**, 41-44.
3. S. J. He, R. Valluzzi, S. P. Gido (1999), Silk I structure in *Bombix mori* silk foams, *Int. J. Biol. Macromolecules* **24**, 187-195.
4. P. Monti, G. Freddi, A. Bertoruzza, N. Kasai, M. Tsukada (1998), Raman spectroscopic studies of silk fibroin from *Bombix mori*, *J. Raman spectroscopy* **29**, 297-304.
5. Hee Jeong Chae, Man-Jin In, Eui Yong Kim (1998), Effect of solubilization condition on molecular weight distribution of enzymatically hydrolyzed silk peptides, *Korean J. Biotechnol. Bioen.* **13**, 114-118.
6. Cong-Zhao Zhou, Fabrice Confalonieri, Nadine Medina (2000), Fine structure of *Bombyx mory* fibroin heavy chain gene, *Nucleic Acids Research* **28**, 2413-2419.