

Aggregation of Fibroin Molecular in Aqueous Solution

Hyo-Jin Son, Won Hur, Jae-Ho Jeong, Ji-Young Kim

Kangwon National University, School of Biotechnology and Bioengineering

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

Abstract

For the investigation of the properties of aqueous fibroin solution, the variation of molecular weight by aggregation of silk, morphology and difference of molecular weight at pI value was investigated. The distribution of molecular weight investigated using gel filtration chromatography and formation of aggregates were confirmed by using Field emission scanning electron microscope. The precipitation of fibroin solution at its pI value was compared by molecular weight distribution and the formation of fibroin aggregated were investigated. The aggregation kinetics were investigated at various condition.

서론

Silk protein은 *Bombyx mori*로부터 생성되며 silk fibroin(SF)과 silk sericin(SS)으로 구성된 천연고분자물질이다[1]. SF는 친수성과 소수성이 block-like 형태로 구성되어 있다. SF는 장력, 탄력, 부드러움, 흡수성 등의 이점으로 인해 오래 전부터 값비싼 직물로 사용되어왔으며 생체와도 친화성이 있어 외과의 봉합선 같은 생물 의학 용도로도 이용되어지고 있다[2]. SF뿐만 아니라 그동안 폐기물로 여겨졌던 SS도 PEGylation 등의 방법을 통해 활용하는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 또한 Silk protein의 self-assembly는 coating이나 micro 또는 nanoparticle로의 적용에 이용되고 있다[3].

fibroin을 활용한 소재의 개발에 필요한 사전 연구로서 본 연구에서는 SF의 수용액상에서의 응집현상을 살펴보기 위하여 분자량 분포를 조사하고 피브로인의 응집을 전자현미경등으로 관찰하였다. 그리고 다양한 조건에서 피브로인의 응집 현상 및 응집 속도를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

사용된 SF은 동결 건조된 것을 사용하였으며 (주)화인코에서 제공받았다.

2. 분자량 분포 측정

분자량 분포의 변화를 관찰하기 위하여 gel filtration chromatography(waters, model 930)을 사용하였다. Colume은 TSK G4000sw(Fraction range 20 ~ 10,000 x 10³)을 사용하였으며 흡광도는 280nm에서 측정되어 졌다. Mobile phase는 20mM Tris buffer(pH 7.5), flow rate는 0.5ml/min이다.

3. Field Emission Scanning Electron Microscope(FESEM) 관찰

수용액 상태의 SF은 FESEM(HITACHI, S-4300)으로 관찰하였고 mica(고려과학)는 sputter를 사용하여 gold coating 처리 후 사용하였다. silk solution에 mica를 침지하여 SF를 흡착시키고 N₂ gas로 여분의 액체를 제거하여 건조하였다. 다시 한번 sputter로 gold coating을 한 후에 관찰하였다. Accelerating voltage는 15kV, 배율은 10,000배이다.

4. 입도분석

SF의 입도는 Particle Size Analyzer(Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd)를 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 수용액 상태에서 SF의 분자량 분포 변화

SF을 증류수에 용해시킨 후 0hr, 1hr, 3hr에서 분자량의 분포 변화를 측정하였다(Fig. 1). 초기 그래프와 비교하여 RT(retention time)-20분 이전에 분획되는 SF의 농도가 시간에 따라 높아지는 것을 확인하였으며 3시간째에 RT-10분, 즉 분획 범위를 초과하는 10,000KD이상의 분자량을 갖는 SF의 pick가 생성되는 것으로 보아서 aggregation이 일어남을 추정할 수 있었다.

2. SF 수용액의 전자현미경 관찰

SF을 1%(w/v)의 농도로 증류수에 용해하고 mica를 침지하여 SF를 부착시킨 후에 관찰하였다(Fig. 2). 미세한 입자들이 mica 전체에 깔려져있고, 약 50-100nm 정도의 크기를 보이는 입자들이 함께 관찰되었다. 이는 SF의 뭉쳐짐으로 인해서 형

성이 된 것으로 추정된다.

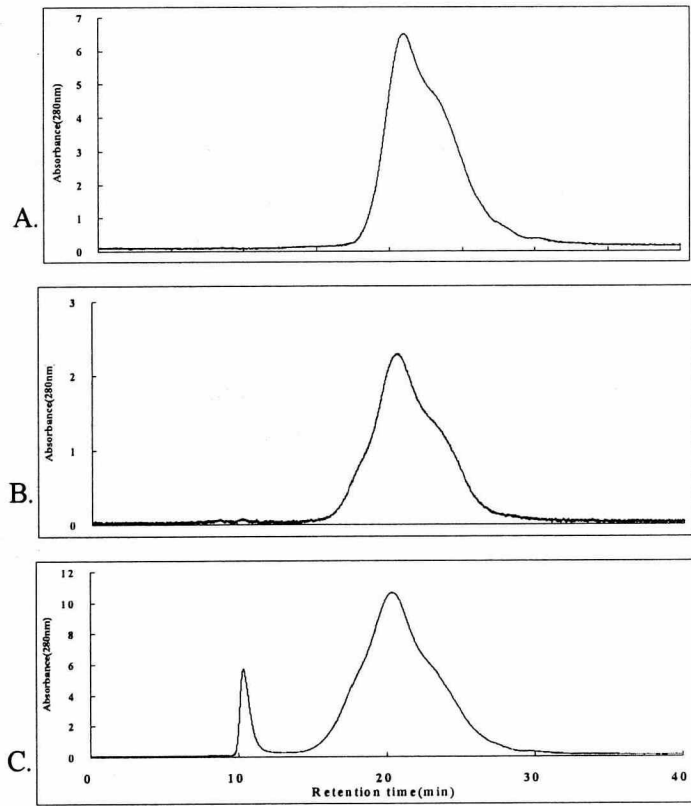


Fig. 1. Gel filtration chromatography of SF with time. 0hr(A), 1hr(B), 3hr(C).

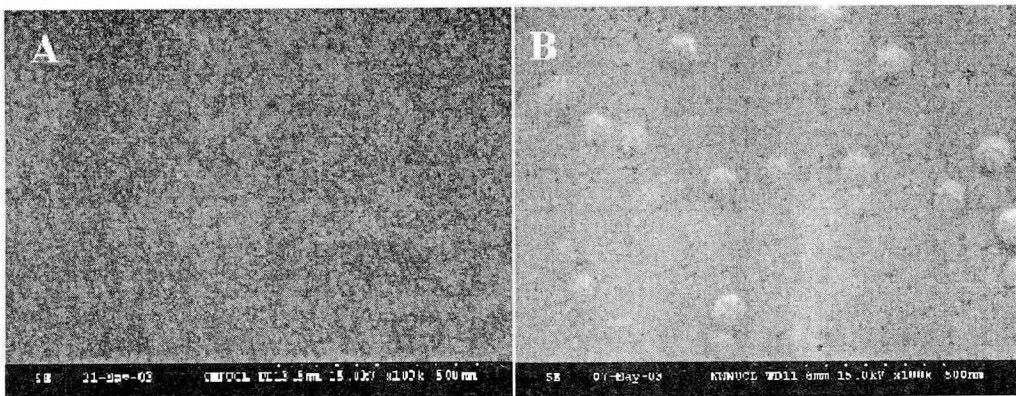


Fig. 2. FESEM images of silk fibroin with time. Control(A), 3hr(B).

3. 등전점에서의 침전과 상등액의 분자량 분포

1%(w/v) silk(SF) solution을 제조한 후 autoclave에서 121°C에서 15분간 처리한다. sonication이후에 0.1M HCl로 pH 4.2로 적정하여 침전액과 상등액으로 분리시켰다. 각각 gel filtration chromatography을 통해 분자량 분포를 살펴보았다.

등전점의 침전물은 SF solution의 RT-20분대 pick에 대한 RT-10분대 pick의 비가 높아졌음을 볼 수 있었는데(Fig. 3.) 등전점에서 10,000KD이상의 분자량을 갖는 SF, 즉 응집된 silk가 침전된 것으로 사려된다.

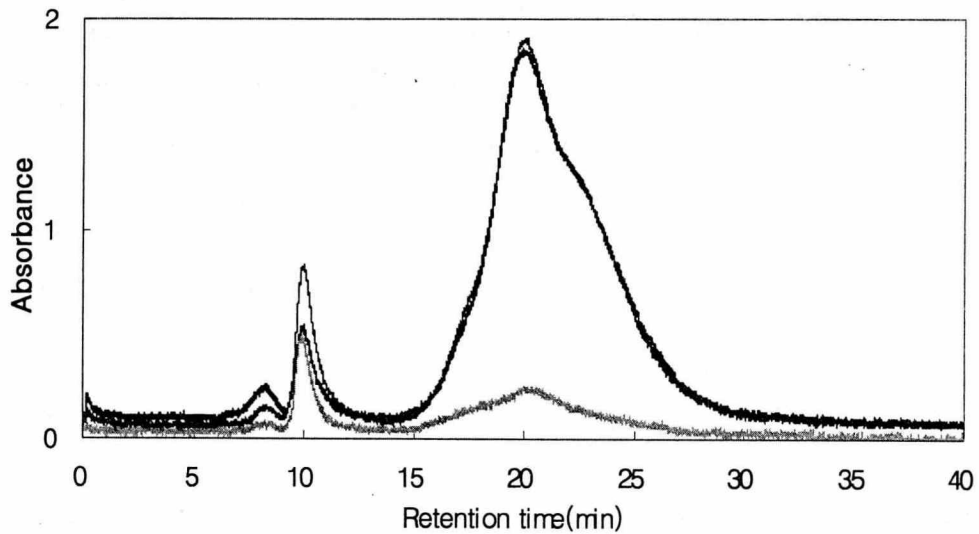


Fig. 3. Gel filtration chromatography of SF at pI value. precipitate(A), suspension(B), silk solution before pI titration(C).

4. 침전물의 입도

1%(w/v) Silk solution을 사용하여 등전점에서의 침전액의 입도분포를 살펴보았다(Fig. 4). 입자의 크기는 아래 그림과 같이 일정한 크기가 아닌 다양한 것으로 나타났는데 약 75%는 1-100 μ m, 10%는 1 μ m이하, 15%는 100 μ m이상의 크기를 갖는 것으로 나왔다.

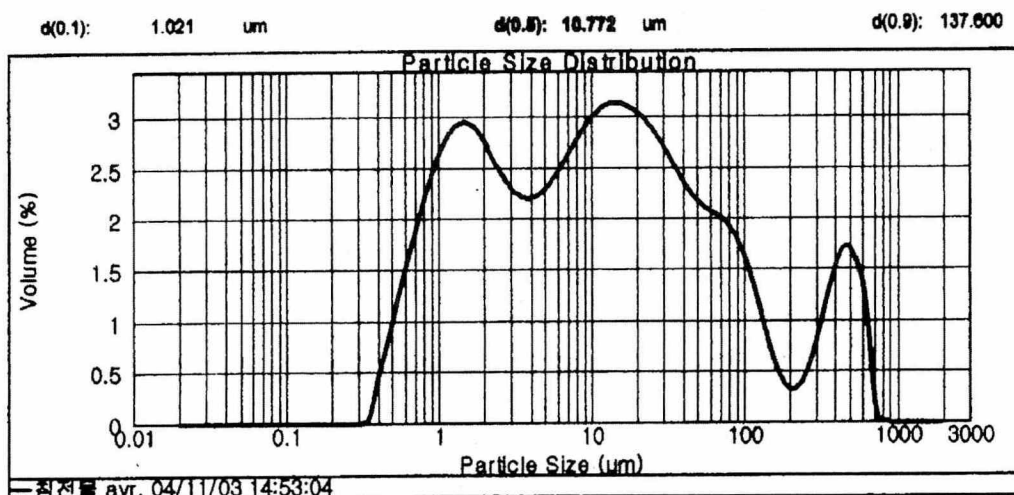


Fig. 4. particle size measurements of precipitate after pI titration.

References

1. Kweon H. Y. and, C. S. Cho (2001), Biomedical application of silk protein, *Int. J. Indust. Entomol.* **3**(1), 1~6.
2. T. Furuzono, K. Ishihara, N. Nakabayashi, Y. Tamada (2000), Chemical modification of silk fibroin with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, *Biomaterials* **21**, 327~333.
3. Cho K. Y. and J. Y. Moon, Y. W. Lee, K. G. Lee, J. H. Yeo, H. Y. Kweon, K. H. Kim, C. S. Cho (2003), preparation of self-assembled silk sericin nanoparticles, *International Journal of Biological Macromolecules* **32**, 36~42.