韓蠶學誌 45(1), 46~57(2003)
Korean J. Seric. Sci.
<論 文>

실크 세리신의 가수분해 특성과 응용 I. 세리신의 분자량 제어

김정호* · 배도규
경북대학교 천연섬유학과

Hydrolysis characteristics and applications of silk sericin I. Control of molecular weight of sericin

Jeong Ho Kim and Do Gyu Bae
Natural Fiber science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the characteristics of the soluble sericins after degumming and after hydrolysis of insoluble sericin with various enzymes. Especially, the hydrolysis characteristics were examined in terms of molecular weight of the soluble sericin. Amino acid composition and molecular weight characteristics of the soluble sericins were also studied. When the insoluble sericin was hydrolyzed with kojizyme and flavourzyme, the solubility was highest at pH 7 and 50°C. On the other hand, in the cases of protamex and alcalase, the highest solubility was obtained at 60°C. In these cases, solubility increased with pH. In enzymatic hydrolysis, the solubility was increased with concentration of enzymes until 4 hours. After then, a slight difference was found along with treatment times. In enzymatic hydrolysis, the absorbance of the soluble sericin was increased with concentration of enzymes and treatment times. Average degree of polymerization was decreased with treatment time and concentration. The amino acid compositions were similar in low(low molecular weight by degumming) and high (high molecular weight by degumming). Those of PK (soluble sericin hydrolyzed with kojizyme), PP (soluble sericin hydrolyzed with protamex), and PA(soluble sericin hydrolyzed with alcalase) were similar to each other. Serine and tyrosine compositions were higher in low and high than those of PK, PP, and PA. However proline was absent in low and high. Molecular weights of the various sericins became higher as KP>high>PP>low>PA and those of KP and PA were 9,800 and 905 respectively.

Key words : Sericin, Hydrolysis, Molecular Weight, Degree of polymerization

서 론

실크는 약 25%와 75%의 다른 물질로 이루어져 있으며 이를 각각 세리신과 피브로인으로 규정하고 있다. 세리신은 용해성이 높아 일반적으로 정련 공정에서 제거되어 피브로인만 남게 되는데 이를 일반적으로 멍주라 하며 주로 의류용으로 사용한다. 그렇기 때문에 세리신은 정련과정 이후에는 폐수로 버려지게된다.

정련 후 폐수로 버려지는 세리신을 수거하여 적절히 처리하게되면 가공품으로 사용하거나 응용 가공소재로 사용할 수 있다. 가공용으로 사용하기 위해서는 용해성이 중요한 요소가 되며 이러한 용해성은 분자량과 아미노산 조성에 크게 영향을 받으며 이들의 변화에 따라 다른 여러 특성들도 달라지게 된다. 어떤 물질을 가공하는 이유는 그 물질이 가지지 않거나 모자란 특성을 채워주거나 개선시키기 위함이다. 이러한 특성들이 될 수 있는 세리신의 특징은 지금까지 많은 연구가 되어있는 피브로인의 연구와 더불어 최근에 활발히 진행 중에 있다.

아미노산 조성면에서 살펴보면, 피브로인에는 글리신, 알라닌, 세린의 순으로 함량이 높으며, 이들이 전체 피브로인의 80% 이상을 차지하여 특정아미노산이 편중된 반면(Gulrajani, 1993), 세리신의 경우에는 함량순으로 세린, 글리신, 아스파라긴산, 트레오닌, 알라닌 등의 주요성분뿐만 아니라 타이로신을 비롯하여 거의 17종의 아미노산을 골고루 함유하고있다.

체내에서 합성할 수 없어 반드시 음식물로 공급받아야 하는 것을 필수 아미노산이라 하며, 필수 아미노산 중 1가지가 부족해도 단백질 부족현상을 나타내게되는데, 필

*Corresponding author. E-mail: muchay@hanmail.net

수 아미노산은 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린이 있는데 이 중 트립토판을 제외한 모든 필수 아미노산이 세리신에 함유되어있다.

그러므로 세리신을 식품으로 사용할 경우 상당히 유용한 건강식품이 될 수 있으며, 이미 상당부분 다양한 용도로 개발되어있다. 산화방지제나 티로시나제 저해제로서의 세리신의 이용에 관한 기술(특허, 1998-042150; Kato *et al.*, 1998)과, 피부 탄력을 유지시키는 엘라스틴 및 콜라겐의 분해를 근본적으로 저해시키는 저해제로서 세리신을 사용하고(특허, 2000-0056836), 화장원료로 사용하며(특허, 昭61-118307; 특허, 1996-016870), 화장품, 치료학 및 농업분야에 사용하기 위해 세리신을 아실화한 아미노산을 함유하는 각종 조성물에 대한 보고(특허, 5,504,228)도 있고, 견피브로인 및 세리신을 주성분으로 하여 창상피복재로 사용하거나(특허, 2000-0068154) 색전제로서 우수한 혈전 형성능을 가지고 있다고 한다(특허, 1999-0048843). 또한 알코올 분해 증진효과 및 콜레스테롤 상승억제 효과가 있고(특허, 1999-0058644), 혈당강화에도 효과(이 등, 2001)가 있다고 보고되어 있다.

이러한 점들을 종합해 볼 때, 세리신은 피부 및 생체 활성에 많은 기여를 할 수 있으며, 세리신을 인체에 이용하기 위해서는 어떤 식으로든 피부나 생체에 흡수 및 접촉되어야 한다.

흡수되기 위해서는 분말상으로나 액상으로 만들어 경피흡수 하거나 먹음으로써 가능하나, 세리신의 분자량을 제어하여 수용화하여야 효과가 높다. 수용화하는 가수분해 방법으로는 고온고압법(특허, 1999-021158; 특허, 昭49-117712), 산 가수분해법(Lu *et al.*, 1996; 김 · 배, 1999; 특허, 2000-0006718), 알칼리 가수분해법(김 · 배, 2000a), 효소 가수분해법(Chen *et al.*, 1995; Jung & Bae., 2000; 김 · 배, 2000b)이 있다.

현재 가장 많이 사용되고 있는 방법은 산을 이용하여 가수분해하여 중화한 후 탈염하여 건조하는 방식이 주류를 이루며, 알칼리 가수분해의 경우 인체에 유해한 lysinoalanine의 생성(Groot *et al.*, 1969) 및 일부 아미노산의 파괴로 인하여 그 유해성에 대한 검정의 실험이 되고 있는 상태(이, 2001)이며, 고온고압법은 특별한 약제가 필요 없고 장치만 있으면 가능하므로 효율적이나 난용성 세리신의 경우 용해하기가 어렵다. 그러나 이러한 가수분해법의 가장 큰 특징은 세리신에 대해 무작위로 가수분해가 일어나기 때문에 분자량을 제어하기가 힘들다는 것이다.

그래서 최근 많이 연구되고 있는, 인체 무해용 효소를 이용하여 수용화하는 효소 가수분해법이 분자량 제어에는 효과가 큰 것으로 보고(특허, 1998-081941; 특허, 1999-0074787; 특허, 1999-0086233)되고 있다. 효소의 일반적인 특징은 기질의 특정 부분만을 절단하므로 특정 말단을 갖거나, 조건을 잘 조절하게되면 일정한 분자량을 가진 수용해물을 얻을 수 있다.

지금까지 세리신의 각종 특성들과 응용에 대한 보고가 많아 효과에 대해서는 어느 정도 인지되어 있으나, 정확한 메카니즘이나 분자량 차이에 따른 특성들에 대해서는 상세히 알려진 바가 없다. 따라서 세리신의 분자량을 제어하면서 수용화 할 수 있는 방법과 분자량에 따른 특성들 및 이들의 응용에 대해 알아보기 위하여 우선, 본 실험에서는 세리신의 분자량 제어를 위해 절각견을 고온고압 정련하여 수용성 세리신을 얻고, 남은 난용성 세리신을 추출하여 효소 가수분해하였다. 효소 가수분해 조건에 따른 세리신의 용해도와 분자량 변화를 여러 방법으로 살펴보고 세리신의 분자량을 어느 정도 제어할 수 있는지에 대해 알아보고 그 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

절각견을 130°C에서, 1시간동안 고온 고압 정련하였다. 정련 액을 한외여과막 장치(U/F & N/F system, Actra)에서 투과 분자량 크기 20,000인 여과막을 사용하여, 1/2을 농축하여 투과된 용액과, 농축액에 처음 양과 같게 증류수를 첨가하여 1/2로 농축하는 것을 2회 반복하여 투과된 용액을 합하여 수용성 저분자 수용액을 얻었다. 투과 분자량 크기 200,000인 여과막을 사용하여 남은 농축액에 처음 양과 같게 증류수를 첨가하여 1/2로 농축하는 것을 3회 반복하여 투과된 수용성 고분자 수용액을 얻었다. 이후 남은 농축액은 filter paper(Whatman, 5C)로 여과하였다. 여과 후 잔류물은 증류수를 첨가하여 재 여과하고, 같은 방법으로 5반복 여과 후 수용성 세리신을 제거하였다.

잔류물인 난용성 세리신을 수거하여 건조시킨 후 가수분해시의 시료로 사용하였다. 정련 후 얻은 수용성 세리신 용액 2종류와 가수분해 후 얻어진 수용액은 동결건조하여, 이를 데시케이트(desiccator)에 보관 후 필요시에 사용하였다.

가수분해에 사용한 효소의 종류는 다음과 같다.

Alcalase 0.6L (Novo Nordisk, batch no:PMN 00092, Denmark)

Flavourzyme 500 MG (Novo Nordisk, batch no:HP2 02013, Denmark)

Kojizyme 50C MG (Novo Nordisk, batch no:HP2 02011, Denmark)

Protamex (Novo Nordisk, batch no:PW2 A0010, Denmark)

2. 효소 가수분해

난용성 세리신의 효소분해 시 용해특성을 알아보기 위

해, 난용성 세리신을 여러 가지 조건에서 아래와 같이 효소 가수분해 후 85°C에서 5분간 처리하여 효소의 활성을 없앤 다음 원심분리기(Beckman, J2-21)로 10,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 20배 희석한 후 분광광도계(UV,VIS-spectrophotometer, Beckman, DU 650)로 세리신의 최대흡수파장인 271 nm에서 측정한 흡광도 값을 용해도의 척도로 하였다.

1) pH 변화에 따른 용해도

pH는 1 mol 아세트산과 1 mol 암모니아수를 이용하여 buffer를 만들어 실험 중 pH 변화를 최소화하였다. 0.5 g의 난용성 세리신 분말을 욕비 1:50, 효소의 양은 세리신 분말의 10%, 온도는 50°C, pH(4,5,6,7,8,9)별로 12시간 가수분해하여 pH 변화에 따른 흡광도를 측정하였다.

2) 처리 온도에 따른 용해도

0.5 g의 난용성 세리신 분말을 욕비 1:50, 효소의 양은 세리신 분말의 10%, kojizyme과 flavourzyme의 pH는 6, 온도는 30, 40, 50, 60°C에서, protamex와 alcalase의 pH는 7, 온도는 30, 40, 50, 60, 70°C에서 각각 12시간 가수분해하여 온도 변화에 따른 흡광도를 측정하였다.

3) 처리 시간에 따른 용해도

0.5 g의 난용성 세리신 분말을 욕비 1:50, 효소의 양은 세리신 분말의 10%, kojizyme과 flavourzyme의 pH는 6, 온도는 50°C에서, protamex와 alcalase의 pH는 7, 온도는 60°C에서 각각 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24시간 가수분해하여 처리 시간에 따른 흡광도를 측정하였다.

4) 효소 농도에 따른 용해도

0.5 g의 난용성 세리신 분말을 욕비 1:50, 효소의 양은 세리신 분말의 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30%로 하고, kojizyme과 flavourzyme의 pH는 6, 온도는 50°C에서, protamex와 alcalase의 pH는 7, 온도는 60°C에서 각각 4시간 가수분해하여 효소 농도 변화에 따른 흡광도를 측정하였다.

5) 용해도 및 평균중합도 측정을 위한 효소 가수분해

이상과 같이 효소 가수분해 시 최적의 용해도를 고려하여 처리시간과 농도 변화에 따른 용해도와 흡광도 및 평균중합도를 측정하기 위해서 아래와 같은 조건으로 가수분해하였다.

세리신 분말 : 0.5 g

pH : kojizyme과 flavourzyme은 6, protamex와 alcalase는 7

온도 : kojizyme과 flavourzyme은 50°C, protamex와 alcalase는 60°C

욕비 = 1:50

효소농도 : 0.5, 2, 5% on the weight of sericin (o.w.s.)

처리시간 : 1, 2, 4, 8, 12, 24시간

가수분해한 수용액을 실활 시키기 위해 85°C에서 5분간 처리하였다. 처리액을 원심분리(10,000 rpm, 20 min)한 후 상등액을 취하여, 271 nm에서 흡광도를 측정하고, 닌히드린 반응의 시료로 사용하였다. 침전물은 filter paper를 이용하여 수세 후 건조하여 식 (1)과 같은 방법으로 용해도를 구하였다.

$$\text{용해도}(\%) = \frac{\text{가수분해 전 무게} - \text{가수분해 후 불용해물의 무게}}{\text{가수분해 전 무게}} \times 100(\%) \quad (1)$$

6) 각종 분석을 위한 효소 가수분해

이상과 같이 효소 가수분해 시 최적의 용해도와 평균분자량을 고려하여 가수분해한 것과, 수용성 세리신 2종 및 난용성 세리신을 각종 분석과 실험에 이용하였다. 효소 가수분해는 다음과 같은 조건으로 가수분해하여 3종의 세리신을 얻었다.

난용성 세리신 30 g을 욕비 1:50으로 하고, kojizyme의 경우는 효소농도 0.5% o.w.s., pH 6, 온도 50°C에서 4시간 처리하였고, protamex의 경우는 효소농도 0.5% o.w.s., pH 7, 온도 60°C에서 8시간 처리하였고, alcalase는 효소농도 5% o.w.s., pH 7, 온도 60°C에서 8시간 처리하였다. 각 시간 처리 후 85°C에서 5분간 처리하여 효소의 활성을 없앤 후 식혀서, filter paper를 이용하여 1차 여과한 후 glass filter (G4)를 이용하여 2차 여과하여 얻은 용액을 동결건조 하였다. 이상과 같은 일련의 과정을 그림 1에 나타내었다.

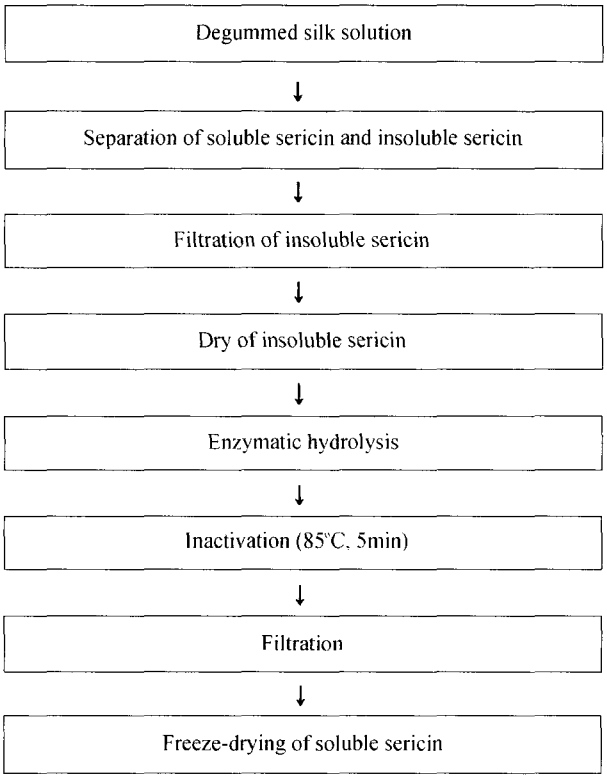

Fig. 1. Flow chart for sericin powder preparation.

3. 말단기 정량에 의한 평균 중합도 측정

난용성 세리신을 효소 가수분해한 후 닌히드린반응(김 등, 1991)을 시켜 분광광도계로 392 nm에서 흡광도를 측정하였다. 난용성 세리신 1 g을 6N HCl로 가수분해한 후 감압건조, 수세, 건조 후 증류수를 첨가하여 10 ml로 정용하여 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 닌히드린반응 시켜 흡광도를 측정하여 완전 가수분해된 세리신의 mol 흡광도를 기준으로 하였다. 닌히드린반응 시 완전 가수분해 액은 증류수를 첨가하여 0.1% 농도로 하여 0.5 ml, 효소 가수분해한 용액은 가수분해한 용액을 1% 농도로 하여 0.5 ml을 vial에 넣고, 1% 닌히드린 용액 0.5 ml를 첨가한 후 증류수를 첨가하여 10 ml로 정용 한 후 밀폐하여 100°C에서 20분간 처리하였다. 평균중합도는 식 (2)와 같은 방법으로 구하였다.

$$\text{평균 중합도} = \frac{\text{완전 가수분해한 용액의 mol량 흡광도}}{\text{가수분해한 용액의 mol량 흡광도}} \quad (2)$$

4. 아미노산 분석

수용성 세리신과 효소 가수분해로 얻은 분말과 난용성 세리신 분말의 각 1 g에 6N HCl을 첨가하여 10 ml로 만들어 ampule에 담아 질소가스를 7분간 충전 후 밀봉하여 110°C에서 24시간 가수분해하여 냉각하고 염산을 감압하여 제거하고 증류수로 2회 세척한 다음 건조시켰다. 건조시킨 시료를 구연산 완충액(pH 2.2)으로 용해 후 10 ml로 정용하여 0.45 μm membrane filter로 여과한 뒤 자동 아미노산 분석기(Pharmacia Biotech Co, Biochrom20)로 분석 정량 하였다.

5. GPC(Gel Permeation Chromatography)에 의한 분자량 측정

수용성 세리신 분말 2종과 효소 가수분해로 얻은 분말 3종의 분자량 분포를 알아보기 위해 GPC-MALS(wyatt, DAWN EOS(S/N:245-E))를 이용하여 측정하였다.

Table 1. Sample I.D. of powders and fabrics treated at various conditions

Sample I.D.	Treatment conditions
IN	Insoluble sericin powder
low	Soluble sericin powder of low molecular weight obtained by degumming
high	Soluble sericin powder of high molecular weight obtained by degumming
PK	Soluble sericin powder hydrolyzed with kojizyme
PP	Soluble sericin powder hydrolyzed with protamex
PA	Soluble sericin powder hydrolyzed with alcalase

각 sample I.D.는 표 1과 같다

결과 및 고찰

1. 효소 가수분해

1) 효소가수분해의 적정조건

효소는 일반적으로 특정 기질의 특정 반응만을 촉진하는 기질특이성을 가지고 있으며, 효소의 작용에 영향을 미치는 인자는 크게 온도와 pH로 나눌 수 있다. 효소의 작용은 다른 화학반응과 같이 온도의 상승과 더불어 반응속도가 증대되나, 효소는 그 소재가 단백질이기 때문에 변성이 시작되는 온도를 경과하면 반응 속도는 급격히 저하하며 마침내는 응고하여 활성을 잃게 된다. 이 때 최대 반응속도를 가질 때의 온도를 최적온도라고 한다. 그리고 효소는 단백질이므로 그의 성질은 pH에 따라 영향을 받는다. 극단적인 산성 또는 알칼리성이 되면 변성하여 그 활성을 완전히 상실한다. 대부분의 효소는 일정한 pH에서만 활성을 가지며, 효소활성이 가장 좋은 때의 pH를 최적 pH라 한다(정, 1996).

본 실험에서는 FAO의 식품 첨가물용 효소규격에 적합한 제품을 사용하여 난용성 세리신의 효소 가수분해 시 최적의 가수분해 조건을 알아보기 위한 실험을 하여 그림 2~5에 나타내었으며 가수분해 정도를 흡광도로 나타내었다.

그림 2는 세리신의 가수분해 시 처리 pH 변화에 따른 가수분해물의 흡광도를 나타낸 그림으로, kojizyme과 flavourzyme의 경우 pH 변화에 따라 흡광도가 비슷한 경향으로 나타났으며, 최적 pH는 6 부근인 것으로 나타났다.

protamex와 alcalase의 경우도 pH 변화에 따른 흡광도가 서로 비슷한 경향으로 나타났으며, 처리 pH가 높을수록 흡광도도 높게 나타났다. pH 5~6부근을 경계로 낮은

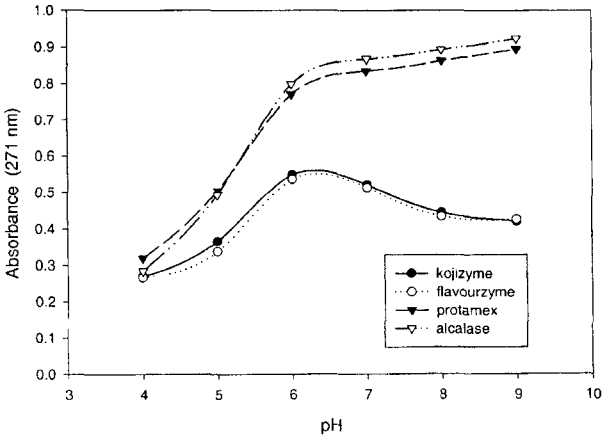

Fig. 2. Effect of treatment pH on the solubility in hydrolyzing insoluble sericin with various enzymes.

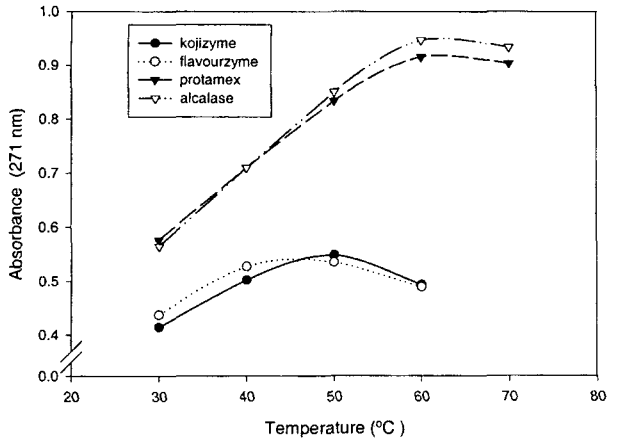

Fig. 3. Effect of treatment temperature on the solubility in hydrolyzing insoluble sericin with various enzymes.

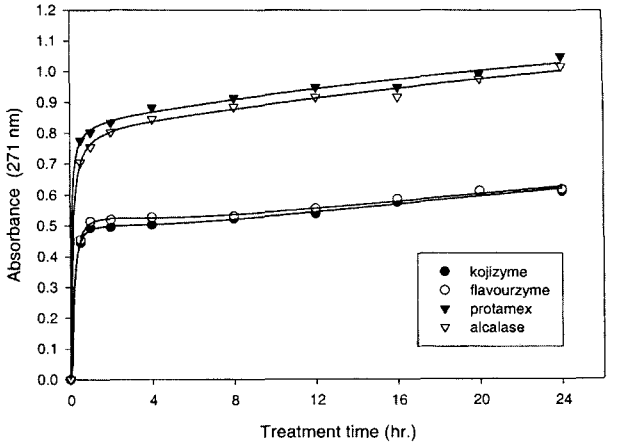

Fig. 4. Effect of treatment time on the solubility in hydrolyzing insoluble sericin with various enzymes.

pH에서는 protamex가, 높은 pH에서는 alcalase의 흡광도가 높게 나타났으나 큰 차이는 나타나지 않았다. 특이한 것은 kojizyme과 flavourzyme의 경우와 같이, 일반적인 효소의 특징이 일정 pH까지 pH의 증가에 의해 활성이 증가하다가 그 이후에는 활성이 점차 감소하는 경향을 보이는데, protamex와 alcalase의 경우 실험한 범위 내에서는 pH증가에 의해 효소의 활성이 계속 증가한다는 것이다. 이들의 최적 pH는 위에서 언급했듯이 극단적인 산성이나 알칼리를 제외하고 최대한 높은 pH가 최적일 것이나, 이들을 사용하여 각종 식품이나 기타 재료로 사용하기 위해서는 활성이 크게 차이나지 않으면서 중성인 pH가 적정 pH라고 사료되어 이후의 실험에서는 적정 pH를 7로 고정하여 실험하였다.

그림 3은 세리신의 가수분해 시 적정 pH에서의 온도변화에 따른 가수분해물의 흡광도를 나타낸 그림이다. pH의 영향에서와 같이 protamex와 alcalase의 처리가 kojizyme과 flavourzyme의 경우보다 용해도가 크고, 최적온도는 60°C로 나타났다. kojizyme과 flavourzyme의 경우는 최적온도가 50°C 부근으로 나타났다.

그림 4는 세리신의 효소 가수분해 시 적정 pH와 온도에서, 처리시간에 따른 가수분해물의 흡광도를 나타낸 그림이다. 모든 처리에서 초기 2시간까지는 흡광도 변화가 급격히 증가하며, 그 이상의 처리시간 경과에 의해서는 흡광도 증가가 완만하게 나타난 것으로 보아, 가수분해가 2시간 이전에 상당부분 나타나는 것으로 보여지며, 2시간 이후에도 어떤 식으로든 효소가 작용을 계속하여 미미하게나마 흡광도가 증가된 것으로 보인다.

그림 5는 세리신의 가수분해 시 효소처리 농도가 가수분해물의 흡광도에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 전체적으로 효소농도 3%까지는 흡광도가 급격히 증가하였지만,

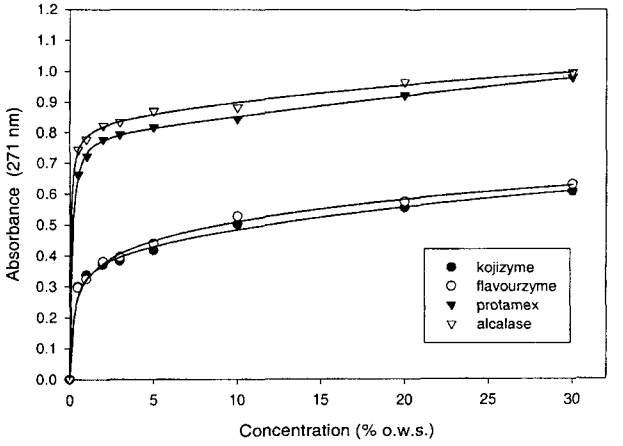

Fig. 5. Effect of treatment enzyme concentration on the solubility in hydrolyzing insoluble sericin with various enzymes.

그 이상의 농도에서는 흡광도 증가가 완만하게 나타났다. 효소는 최적조건에서 그 활성을 소실하는데 장시간을 요한다. 따라서 최적조건에서의 처리효소 농도가 적당량이고 가수분해 시간이 충분하다면, 효소의 농도가 적정농도 이상인 것에 비해 분해 정도의 차이는 크지 않기 때문에 나타난 현상이라 사료된다.

2) 용해도 측정

일반적으로 효소는 단백질 기질을 분해할 때, 말단기 부분만을 절단하는 exo activity enzyme과 내부를 절단할 수 있는 endo activity enzyme으로 구분할 수 있다(정, 1996). 이 중 endo activity enzyme은 효소분해 시간이 증가함에 따라 가수분해 정도가 증가하지만, 일정 시간 이후에는 그 증가량이 미미하다. 이러한 이유는 특정기와 반응할 수 있는 상태라면 내 · 외부를 막론하고 무작위로 특정기를 분해하기 때문에 많은 분해가 분해시간 초기에 일어나게 된다. 그 이후는 처리시간이 증가하더라도 기질의

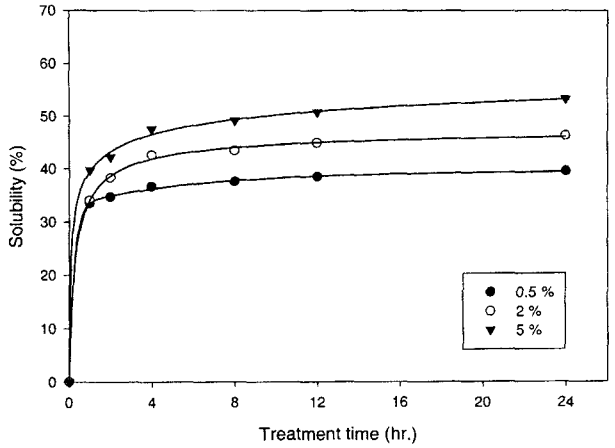

Fig. 6. Effects of treatment time and concentration on the solubility in hydrolyzing insoluble sericin with kojizyme.

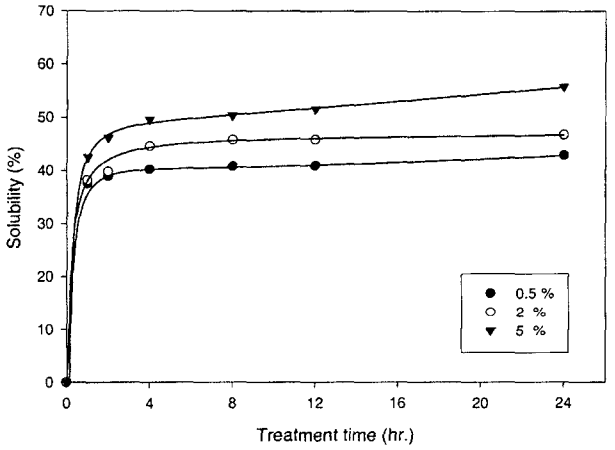

Fig. 7. Effects of treatment time and concentration on the solubility in hydrolyzing insoluble sericin with flavourzyme.

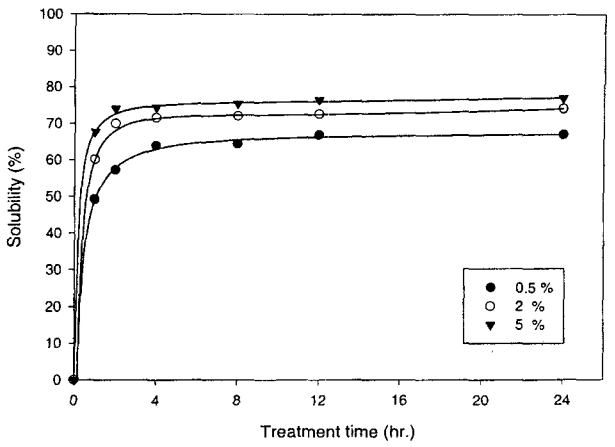

Fig. 8. Effects of treatment time and concentration on the solubility in hydrolyzing insoluble sericin with protamex.

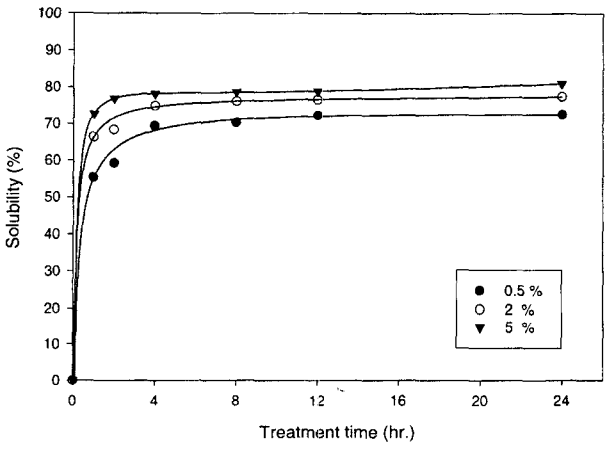

Fig. 9. Effects of treatment time and concentration on the solubility in hydrolyzing insoluble sericin with alcalase.

특성상 효소가 내부로 이동할 수 없다면 특정말단기만을 분해하기 때문이다. 지금까지 난용성 세리신의 각 효소 가수분해 시 최적 pH와 온도를 측정하고, 시간과 농도의 변화에 따른 가수분해 경향을 알아보았는데, 최적 pH와 온도로 고정하고 효소의 농도와 처리시간을 조절하게되면 용해도가 달라질 것이며, 이들에 대한 정보를 얻기 위해 실험한 결과를 그림 6~9에 나타내었다.

그림 6은 kojizyme의 세리신 가수분해 시 처리시간과 농도변화에 따른 용해도를 나타낸 그림이다. 처리농도가 높을수록, 처리시간이 경과할수록 용해도가 높은 것을 알 수 있었다. 4시간 이상 처리했을 때에는 처리시간의 증가에 따라 용해도의 증가폭이 완만한 것으로 나타나 24시간 처리시 효소농도가 0.5%의 경우는 39.5%, 5%의 경우는 53.26%로 13%이상의 용해도 차를 보였다. 효소농도 5%, 4시간 처리의 경우는 47.57%로 5%, 24시간의 경우가 5.69% 만 더 높게 나타나, kojizyme의 경우 세리신의 용해도를 높이기 위해서는 처리시간의 지속보다는 효소의 농도를 조절하는 것이 더 적당할 것으로 사료된다.

그림 7은 flavourzyme의 세리신 가수분해 시 처리시간과 농도변화에 따른 용해도를 나타낸 그림으로, kojizyme의 경우와 비슷한 용해도 경향을 나타내었으나 효소농도 5%, 24시간 처리 시 55.7%의 용해도로 kojizyme 보다는 용해도가 약간 높았다.

그림 8은 protamex의 세리신 가수분해 시 처리시간과 농도에 따른 용해도를 나타낸 그림으로, 처리시간 4시간까지는 용해도가 급격히 증가하다가 그 이후의 처리에서는 시간의 경과에 따라 증가 정도가 완만하였다. 효소농도 5%의 경우 4시간 처리 시 용해도는 74.39%이고 24시간 처리 시는 76.98%로 4시간 처리 이후에는 처리시간 경과에 따른 가수분해 효과가 적은 것으로 사료된다.

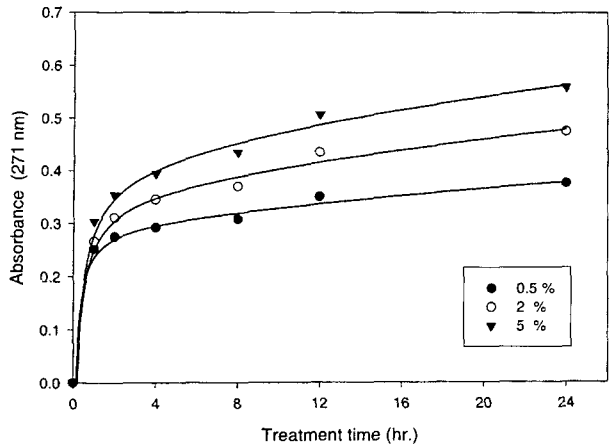

Fig. 10. Effects of treatment time and concentration on the absorbance of the soluble sericin in hydrolysis with kojizyme.

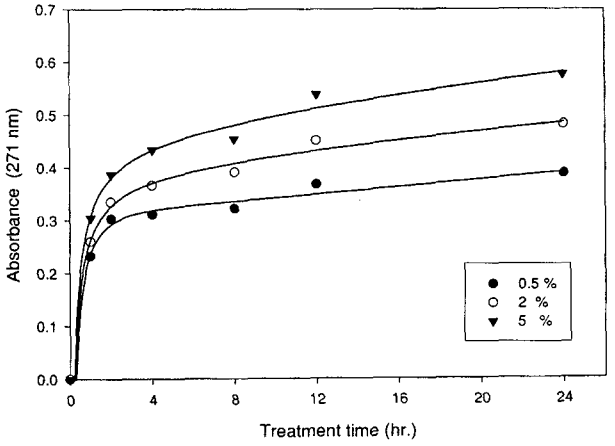

Fig. 11. Effects of treatment time and concentration on the absorbance of the soluble sericin in hydrolysis with flavourzyme.

그림 9는 alcalase의 세리신 가수분해 시 처리시간과 농도변화에 따른 용해도를 나타낸 그림으로, 그림 8의 protamex와 비슷한 용해도 경향을 나타내며, 효소농도 5%, 24시간 처리의 경우 용해도가 80.97%로 protamex보다 높게 나타났다.

3) 흡광도를 이용한 용해도

앞에서 효소농도와 처리시간에 따른 용해도를 알아보았는데, 이들에 대한 흡광도를 측정하여 용해도와 흡광도의 상관관계를 알아보았다.

그림 10은 kojizyme의 효소농도와 처리시간에 따른 가수분해 정도를 흡광도로 나타낸 그림으로, 처리시간이 증가하고 처리농도가 높을수록 흡광도는 높게 나타났다. 그림 6에서 살펴본 용해도에서 4시간 이상 처리에서는 처리시간의 증가에 따라 용해도 증가가 미미하였으나, 그림 10의 흡광도에서는 계속해서 증가하는 경향이 나타났다. 일반적으로 동일한 성분의 두 가수분해물이 용해 농도가 같다면 용해액의 흡광도도 같은 값으로 나타나야 할 것이나 다르게 나타났다는 것은, 흡광도가 곧 용해도의 척도라고 하는 것은 잘못된 것임을 시사한다. 분자량에 차이가 있는 동일한 성분의 두 물질이 같은 무게의 양일 때 분자량이 작은 것이 전체 표면적이 크므로 흡광도가 높게 나타나게된다. 이러한 원리로 비추어볼 때, kojizyme 처리의 경우 처리시간의 증가에 의해 용해도는 거의 일정하나 흡광도가 증가했다는 것은 용해된 세리신이 효소에 의해 계속해서 분해가 진행되어 전체 표면적이 증가했음을 의미하며 분자량도 점점 작아졌을 것이라 사료된다.

그림 11의 flavourzyme과 그림 12의 protamex, 그림 13의 alcalase 처리의 경우도 흡광도 정도만 차이가 날뿐 용해도와 비교해 처리시간의 경과에 의해 흡광도가 증가하는 경향은 kojizyme과 같은 현상이라 보여진다.

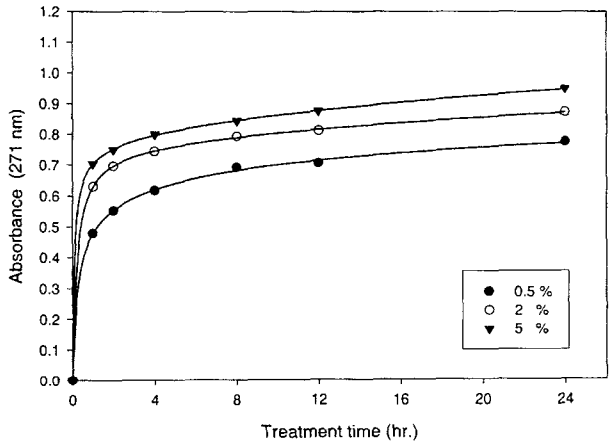

Fig. 12. Effects of treatment time and concentration on the absorbance of the soluble sericin in hydrolysis with protamex.

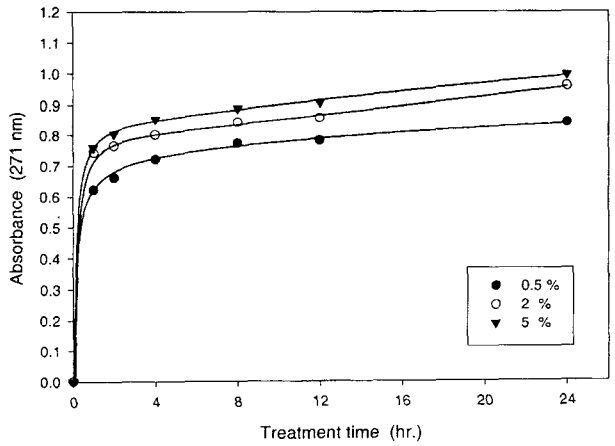

Fig. 13. Effects of treatment time and concentration on the absorbance of the soluble sericin in hydrolysis with alcalase.

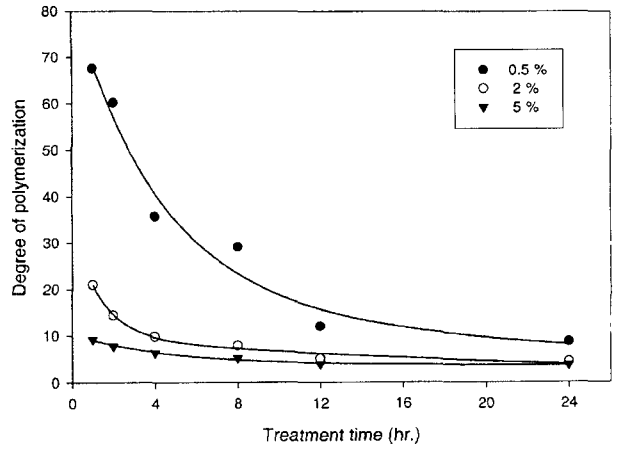

Fig. 14. Effects of treatment time and concentration on the average degree of polymerization of the soluble sericin in hydrolysis with kojizyme.

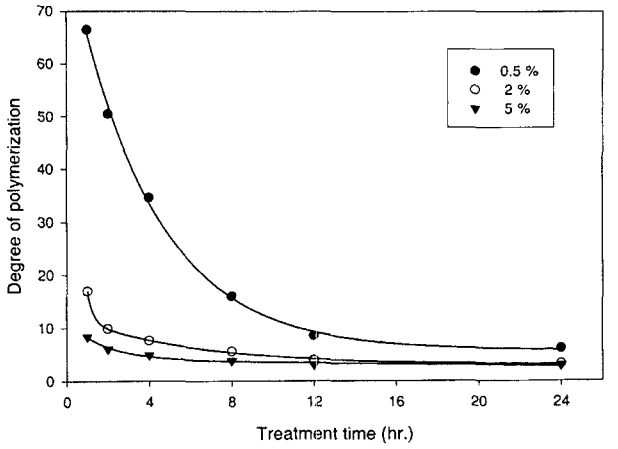

Fig. 15. Effects of treatment time and concentration on the average degree of polymerization of the soluble sericin in hydrolysis with flavourzyme.

4) 말단기 정량에 의한 평균중합도

단백질 분자량을 측정하는 방법에는 일반적으로 SDS-전기영동이나, 분자량 측정기인 GPC를 사용하거나, 각종 말단기를 정량하여 평균 중합도를 측정하는 방법들이 주류를 이룬다. 본 실험에서는 간단하게 알아볼 수 있는 말단기 정량법을 이용하여, 최적 pH와 온도에서 각 효소의 처리시간과 농도 변화에 따라 수용성화 된 세리신의 평균중합도를 측정하였다.

그림 14는 kojizyme의 효소농도와 처리시간에 따른 평균중합도를 나타낸 것이다. 효소농도가 높을수록 처리시간이 경과할수록 평균중합도는 낮게 나타났다. 이러한 결과는 그림 6의 용해도와 그림 10의 흡광도에서 고찰한 것과 같이, 4시간 처리 이후의 경우 용해도 증가는 미미하나 흡광도는 계속 증가하여 효소에 의해 수용성화 된 세리신에 대해서 4시간 처리 이후에도 계속 가수분해가 이루어져 평균중합도가 작아진 것으로 사료된다.

효소농도가 낮을수록 처리시간에 따른 평균중합도 폭이 크게 차이나는 것을 볼 수 있으며, 분자량이 큰 것을 원할 경우에는 효소농도를 0.5%로 사용하는 것이 적절할 것으로 사료된다.

그림 15는 flavourzyme의 효소농도와 처리시간에 따른 평균중합도를 나타낸 것이다. kojizyme 처리와 비슷한 경향으로 효소농도가 높을수록 처리시간이 경과할수록 평균중합도는 낮게 나타났다. kojizyme과 flavourzyme의 0.5% 농도 4시간 처리 이전의 평균중합도는 30이상으로 나타났으며, 2%농도 이상의 경우는 1시간 처리이상에서 거의 20 이하의 평균중합도를 나타내고, 5% 농도에서는 평균중합도가 10이하로 낮게 나타났다. 이는 일정 효소 농도 이상이면 불용해물의 가용화뿐만 아니라 용해된 세리신에도 계속 작용하여 전체 분자량이 작아지는 것으로 사료되며, 24시간 처리 시 kojizyme 처리의 평균중합도는 3.69, flavourzyme은 2.91로 3개 전후의 아미노산을 가진 저분자 펩타이드로 가수분해 할 수 있을 것으로 기대된다.

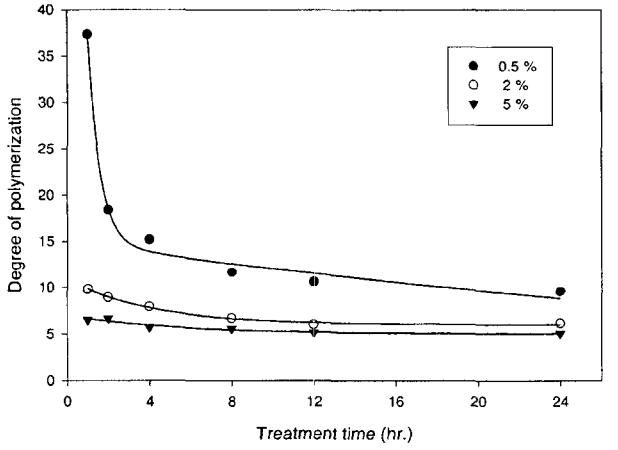

Fig. 16. Effects of treatment time and concentration on the average degree of polymerization of the soluble sericin in hydrolysis with protamex.

그림 16은 protamex의 효소농도와 처리시간에 따른 평균중합도를 나타낸 것으로 처리시간이 경과하고 효소농도가 높을수록 평균중합도는 낮게 나타났다. 특이한 것은 효소농도 5%로 처리한 경우 그림 8에서 보면, 1시간 처리시의 용해도가 67.7%이고, 2시간 처리시의 용해도가 73.99%로서 그 차이가 6.29%밖에 나지 않는데, 그림 16에서의 평균중합도는 각각 37.37과 18.41로 두배의 차이가 나고 있다. 이는 이 효소가 endo형이라는 것을 시사하며, 1시간 처리 시에 용해된 세리신에는 난용성 세리신의 내부를 절단하여 분자량이 큰 수용성도 상당부분 있어서

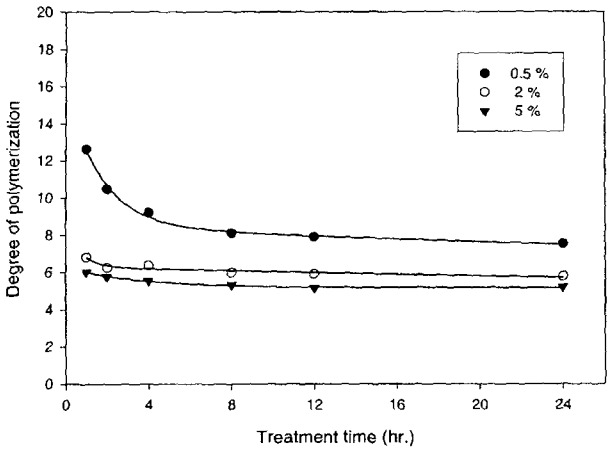

Fig. 17. Effects of treatment time and concentration on the average degree of polymerization of the soluble sericin in hydrolysis with alcalase.

용해도도 높고 중합도도 크나, 계속 처리하여 2시간이 경과하였을 때는 용해된 분자량이 큰 세리신도 더욱 가수분해되고, 난용성 세리신도 일부 용해되어 용해도는 더욱 커지고 중합도는 월등히 작아져 거의 1/2수준에 이르는 것으로 사료된다.

그림 17은 alcalase의 효소농도와 처리시간에 따른 평균중합도를 나타낸 것이다. protamex 처리의 경우와 비슷한 평균중합도 경향을 보이나, 전체적으로 용해도도 높고, 0.5% 농도의 경우 protamex 처리보다 상당히 낮은 평균중합도를 나타내고, 다른 농도에서도 약간 더 낮거나 비슷한 평균중합도를 나타내는 것으로 보아, 사용한 효소 중 난용성 세리신에 대한 가수분해 활성이 가장 높은 것으로 사료된다.

protamex와 alcalase의 효소농도 5%, 4시간 처리시의 평균중합도는 각각 5.74, 5.54이었고, 24시간 처리시의 평균중합도는 5.09와 5.19로서, 4시간 처리 이후 계속 처리하여도 비슷한 경향을 나타내는 것은, 일정한 크기로 분해한 후 더 이상 세리신에 영향을 미치지 않는 것으로 사료되며, 이러한 특징은 특정 말단기와 일정한 분자량을 가진 펩타이드로 가수분해하기에 적당한 효소라고 생각된다.

2. 아미노산 분석

표 2는 세리신 분말의 아미노산 분석을 한 표이다. 전체적으로 17종 아미노산 대부분을 함유하고 있으며, 수용성 세리신인 low와 high의 경우 효소 가수분해된 것들보다 세린과 타이로신의 함량이 높고, 글리신의 양은 적었으며, 프롤린의 경우는 검출되지 않았다.

생사의 외층에서 내층으로 용해되기 어려운 순서인 세리신의 I, II, III, IV에서 고온고압 정련 시 얻은 low와 high는 I이나 II 부분에 해당되고, IN은 III이나 IV 부분에 해당된다고 할 수 있다. 그리고 IN을 효소 가수분해 한 PK, PP, PA도 수용성이긴 하나 III, IV 부분에서 얻은 것이라 할 수 있다.

Table 2. Amino acid compositions of the various samples (unit : mol%)

Amino acid	low	high	PK	PP	PA	IN
Asp.	16.94	16.54	17.54	16.57	16.02	16.21
Thr.	9.45	9.13	9.12	9.65	9.53	9.38
Ser.	35.21	34.52	31.69	31.36	31.62	30.61
Glu.	4.10	4.07	4.79	4.37	4.10	4.27
Pro.	0	0	0.73	1.10	1.34	1.79
Gly.	13.84	13.72	15.34	15.58	15.01	15.62
Ala.	3.57	3.70	3.66	3.70	3.84	4.89
Cys.	0.78	0.70	0.90	0.74	0.93	0.79
Val.	3.51	3.59	3.64	3.83	3.62	3.51
Met.	0.46	0.55	0.38	0.42	0.52	0.59
Ile.	0.75	0.79	0.96	1.05	0.99	1.20
Leu.	1.14	1.09	1.19	1.55	1.44	1.78
Tyr.	3.00	2.80	2.60	2.21	2.69	1.93
Phe.	0.48	0.47	0.46	0.50	0.55	0.74
His	0.98	1.14	1.05	1.32	1.25	1.37
Lys.	2.78	2.92	2.84	3.10	2.82	2.78
Arg.	3.00	4.28	3.10	2.95	3.74	2.54
total	100	100	100	100	100	100

그러므로 low와 high에 함량이 높은 세린과 타이로신은 외층인 I, II에 더 많이 포함되어 있고, 글리신은 내층인 III이나 IV에 더 많이 포함되어 있으며, 프롤린은 내층에만 존재한다는 것을 의미한다.

글리신의 경우 피브로인에 약 40%이상 존재하며 이는 분자량이 작아 결정성을 이루기 쉬운데, 세리신의 경우 내층에 이러한 아미노산이 많이 함유되어 있어 외층보다 단단한 결합을 이루기 쉬워 친수성이 많은 외층보다 용해되기 어렵다고 사료된다.

세린만을 볼 때 수용성 세리신의 경우 IN에 비해 함유량이 평균 13.9%나 더 높았고, IN을 효소 가수분해 한 것에서도 평균 3.1% 높았다. 항산화 작용과 노인성 치매에 효과가 있다는 타이로신의 경우, IN보다 수용성 세리신에서 함량이 높았으며, IN의 효소 가수분해물에서도 수용성보다는 낮았지만 함량이 높은 것을 확인할 수 있었다.

이러한 특성은 세린과 타이로신이 외층에 많이 포함되어 있으므로 low나 high가 IN보다 이들의 함량이 높은 것은 당연하나, IN을 가수분해하여 얻은 세리신에서도 세린과 타이로신의 함량이 IN보다 높다는 것은 IN 자체 내에서도 위치에 따라 아미노산 함량이 다르다는 것이며, 중심부로 갈수록 세린과 타이로신의 함량은 낮고 글리신의 함량은 높다는 것이다. 그러므로 효소 가수분해하여도 가

수분해되지 않고 남아있는 IN의 중심부에는 결정성이 존재할 가능성도 있다고 예측할 수 있다.

이러한 여러 정황으로 미루어볼 때 생사나 고치의 세리신은 외층에서 내층으로 갈수록 용해성이 높은 친수성 아미노산인 세린과 타이로신의 함량이 낮아지고 분자량이 작은 글리신의 함량은 높고 밀도는 커져서 용해도는 떨어지고 난용성은 증가하는 것으로 사료된다.

3. GPC에 의한 분자량 측정

그림 18~22는 수용성 세리신과 효소 가수분해된 세리신의 분자량 분포를 나타낸 그림이다. 이들의 GPC측정에 의해 얻은 M*n*(수평균분자량)과 M*w*(중량평균분자량)와 말단기 정량에 의해 구한 D*P*(평균중합도)와 식 (3)과 식 (4)에 의해 구한 M*p*(중합도평균분자량)를 표 3에 나타내었다.

$$\text{평균 아미노산분자량} = \frac{\sum(\text{아미노산분자량} \times \text{mol})}{\sum \text{mol}} \quad (3)$$

$$\text{중합도 평균분자량} = \text{평균중합도} \times \text{평균 아미노산분자량} \quad (4)$$

그림 18은 low의 분자량 분포를 나타낸 그림이다. 전체적으로 저분자로부터 6,000 사이에 분포되어 있고 3,000 이하의 것들이 주류를 이루며, M*n*은 2,056, M*w*는 2,396, M*p*는 1,387로 나타났다. 일반적으로 계산방식에 의해 M*n*보다 M*w*가 약간씩 크게 나타나는데 본 실험에서 측정한 말단기 정량법에 따른 평균분자량인 M*p*는 이들 보다도 낮은 값을 갖는 것을 알게되었다.

그림 19는 high의 분자량 분포도로서, 1,500부근과 3,500부근에 많이 분포되어 있으며, 전체적으로 1,000~6,000 사이에 거의 분포되어 있다. M*n*은 2,276, M*w*는 2,886, M*p*는 1,832로 low보다 약간 큰 분자량 구성을 이루고 있으며 D*P*의 경우는 low를 기준으로 high가 33.6%가 더 크게 나타났다.

처음 분류당시 low는 20,000 이하, high는 200,000 이하의 투과 분자량 크기의 여과막을 사용하여 분류를 하였으나, 분자량 측정결과 둘 다 6,000 이하의 분자량 분포를 이루었다. low의 경우 3,000 이하, high의 경우 3,500 이하에서 상당부분 분포하는 것으로 보아, 고온고압 정련된 수용성 세리신은 6,000 이하의 저분자를 가지며, M*n*이나 M*w*가 2,000~3,000 사이인 것으로 보여진다. 특히

Table 3. Molecular weights of the various samples

	low	high	PK	PP	PA
M*n*	2,056	2,276	4,903	1,879	734
M*w*	2,396	2,886	9,800	2,447	905
D*P*	12.50	16.70	35.68	11.64	5.32
M*p*	1,387	1,832	3,950	1,287	585

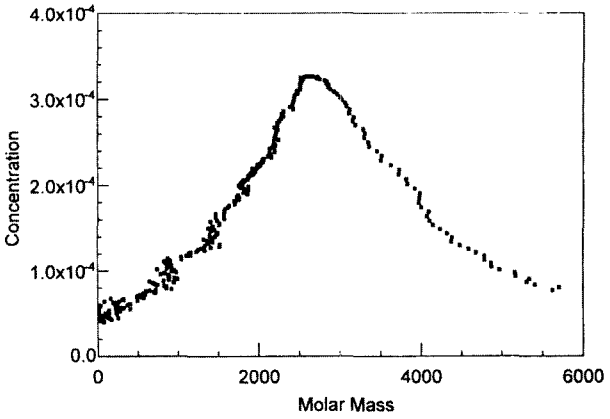

Fig. 18. Molecular weight distribution of the soluble sericin of low molecular weight obtained by degumming.

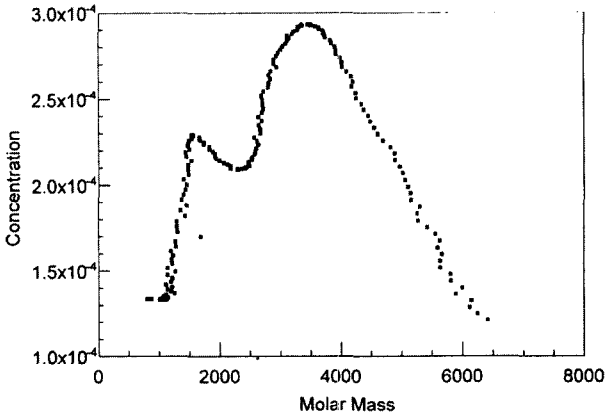

Fig. 19. Molecular weight distribution of the soluble sericin of high molecular weight obtained by degumming.

low의 경우 분자량 500 이하인 아미노산 단위에서도 측정 된 것으로 보아, 유리 아미노산도 상당수 포함된 것으로 사료된다.

그림 20은 PK의 분자량 분포로, 저분자로부터 약 60,000까지 넓은 범위에 분포되어 있다. 분자량 10,000 전후에 많이 분포하는 것으로 관찰되며, M*n*은 4,903, M*w*는 9,800으로 나타났다. M*p*는 3,950으로 M*n*보다 약간 낮았으나, 세가지 측정 방법 모두에서 3,950 이상의 분자량으로 low와 high보다는 상당히 크다는 것을 확인할 수 있었다.

그림 21은 PP의 분자량 분포도인데, M*n*은 1,879, M*w*는 2,447로 나타났다. low나 high보다는 넓은 범위에서, PK보다는 짧은 범위인, 저분자에서 약 15,000까지의 분포를 보인다. low나 high보다 분자량 분포는 넓으나 M*n*은 오히려 작은 것을 볼 수 있는데, 이는 난용성 세리신을 가수분해하였기 때문에 다양한 분자량 분포를 보이며, protamex에 의해 아주 저분자까지 분해된 세리신이 많다는 것을 의미한다.

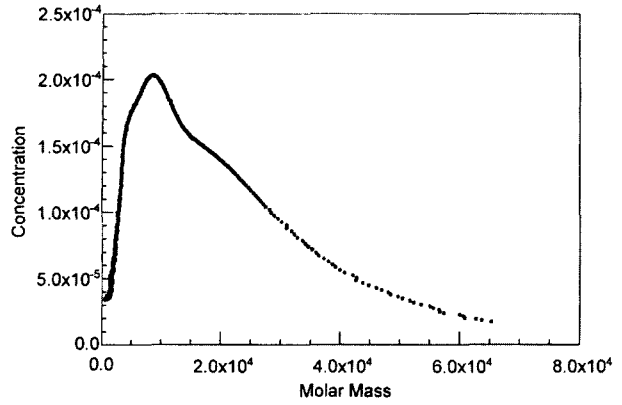

Fig. 20. Molecular weight distribution of the soluble sericin hydrolyzed with kojizyme.

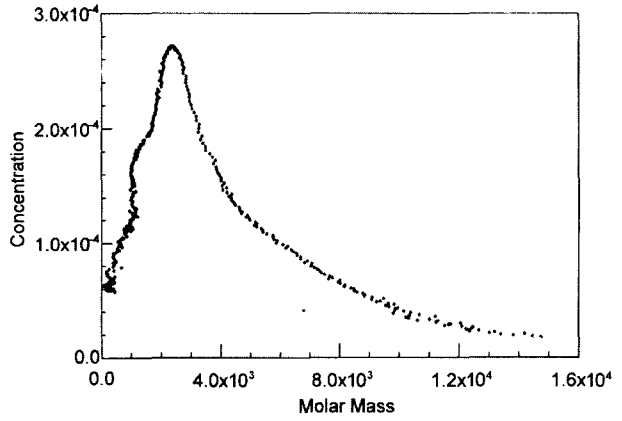

Fig. 21. Molecular weight distribution of the soluble sericin hydrolyzed with protamex.

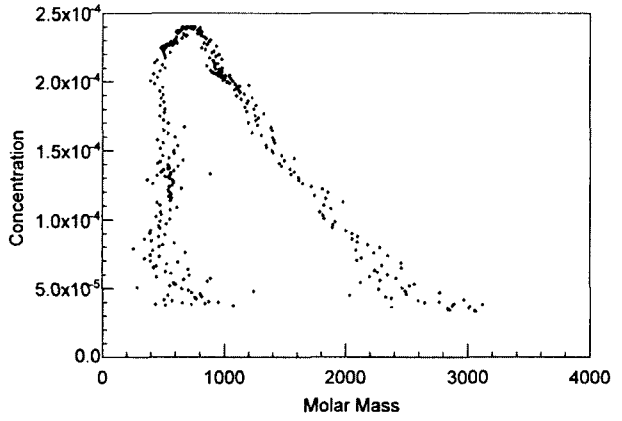

Fig. 22. Molecular weight distribution of the soluble sericin hydrolyzed with alcalase.

그림 22는 PA의 분자량 분포도로서, M*n*은 734, M*w*는 905로 나타났다. 다른 종류의 세리신 보다 훨씬 낮은 분자량 분포를 보이며 1,000 이하에 상당부분 분포하는 것을 볼 수 있다. 특히 400 이하의 분자량 분포는 거의 없으며, 400~700 사이에 분포율이 높은 것으로 보아, 3~6개 정도의 펩타이드가 많을 것으로 기대된다. 평균 중합도인 DP도 5.32로 측정되어 GPC로 측정한 것과 비슷한 중합도로 보인다. 이것을 종합해볼 때 다른 처리와는 달리 일정한 크기의 펩타이드로 가수분해되었다는 것을 시사하며, 이는 alcalase가 세리신의 일정 아미노산 결합부분만을 분해하며, 이 아미노산 결합부분이 세리신의 내부에 존재하지 않으면 더 이상 분해하지 않아 크기가 일정하고 특정 말단기를 가지는 펩타이드를 만들게되므로, 동일한 말단기에 의한 특정한 성질을 가지는 기능성 펩타이드로서의 효과도 기대해 볼만하다고 사료된다.

전체적으로 볼 때 6,000 이상의 고분자 세리신을 얻기 위해서는, 난용성 세리신의 효소 가수분해 중 kojizyme을 사용하고, 분포가 일정한 저분자 세리신을 얻고자 할 때는 alcalase 5% 농도로 처리하는 것이 적당하다고 사료된다. 이렇듯 용도에 따라 세리신의 분자량을 제어하기 위해서는 난용성 세리신을 이용하여 효소가수분해 하는 것이 적절하리라 사료되며, 수용성 세리신의 경우는 분자량이 6,000 이하인 것을 확인할 수 있었다.

세리신의 여러 특성 중 분자량의 차이에 의한 특성을 응용하기 위해서는 분자량을 제어 할 수 있는 방법이 필요하다. 이상의 실험 결과를 보면 난용성 세리신을 추출하여 효소의 종류와 효소의 농도, 처리 시간 등을 적당히 조합하게되면 다양한 분자량의 세리신을 얻을 수 있으며 이렇게 얻어진 세리신을 각각 필요한 용도에 사용하게 되면 더욱 큰 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

정련 액에서 수용성 세리신을 얻고, 남은 난용성 세리신을 여러가지 효소로 가수분해하여, 효소 가수분해 특성을 알아보고, 아미노산 조성과 분자량을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 효소 가수분해 시 kojizyme과 flavourzyme의 최적조건은 pH 7, 온도 50°C이었고, protamex와 alcalase는 처리 pH의 증가에 따라 활성이 높았고 최적온도는 60°C이었다.

2. 효소 가수분해 시 용해도 측정에서는 효소 처리농도 증가에 따라 용해도도 높았으며, 4시간 이상의 처리에서는 아주 소폭으로 용해도가 증가하였다.

3. 효소 가수분해 시 흡광도를 이용한 용해도 측정에서는 효소 처리농도 증가에 따라 흡광도도 높았으며, 4시간 이상의 처리에서도 계속하여 흡광도가 증가하였다.

4. 효소 가수분해 시 말단기 정량에 의한 평균중합도 측정에서는 처리시간과 농도의 증가에 따라 중합도가 감소

하였다.

5. 아미노산 분석 결과 정련 후 채취한 low와 high의 아미노산 조성이 비슷하고, PK와 PP 및 PA의 아미노산 조성이 비슷하였으며, low와 high는 PK, PP, PA보다 세린과 타이로신의 함량이 많았고, 프롤린은 검출되지 않았다.

6. GPC에 의한 분자량 측정결과 중량평균분자량(Mw) 크기는 PK>high>PP>low>PA 순서이었으며, PK와 PA의 Mw는 각각 9,800, 905이었다.

참고문헌

Chen K., Y. Umeda, and K. Hirabayashi (1995) Enzymatic hydrolysis of silk fibroin, *J. Seric. Sci. Jpn.*, **65**(2): 131~133.

GROOT A. P. DE, P. Slump (1969) Effects of severe alkali treatment of proteins on amino acid composition and nutritive value, *J. nutrition*, **98** : 45~56.

정동효 (1996) 효소학 개론, 대광서림, pp. 159~161.

Jung H. Y. and D. K. Bae (2000) Enzymatic hydrolysis of insoluble silk sericin by alcalase, *Korean. J. Seric. Sci.*, **42**(1) : 48~57.

Kato N., S. Sato, A. Yamanaka, H. Yamada, N. Fuwa, and M. Nomura (1998) Silk Protein, Sericin, Inhibits Lipid Peroxidation and Tyrosinase Activity, Biosci. Biotechnol. Biochem., **62**(1) : 145~147.

김동주, 권동주, 양희천, 윤형식(1991) 食品化學, 영지문화사, pp. 168~169.

김정호, 배도규(1999) 불용성 세리신의 산 가수분해, 韓蠶學誌., **41**(1) : 48~53.

김정호, 배도규(2000a) 불용성 세리신의 알칼리 가수분해, 韓蠶學誌., **42**(1) : 31~35.

김정호, 배도규(2000b) 불용성 세리신의 효소 가수분해, 韓蠶學誌., **42**(2) : 104~108.

이지은(2001) Calcium hydroxide에 의한 silk fibroin의 가수분해, 경북대학교 대학원.

이광길, 여주홍, 이용우, 권해용, 김종호(2001) 세리신 단백질의 생리활성과 피부친화성 탐색, 韓蠶學誌., **43**(2) : 109~115.

Lu Ailin, M. Arai, and K. Hirabayashi (1996) Production of tussah silk powder by hydrochloric acid hydrolysis, *J. Seric. Sci. Jpn.*, **65**(5) : 393~394.

특허 : 生絲精練時におけるセリシンの生成方法, 昭49-117712, 1974.

특허 : 脂溶性セリシンペプチド含有化粧料, 昭61-118307, 1986.

특허 : New acylamino acids(USA), Patent number 5,504,228, 1996.

특허 : 화장료용 복합안료, 이의 제조방법 및 이를 함유하는 메이컵 화장료 조성물, 공개번호 특1996-016870.

특허 : 산화방지제 또는 티로시나제 저해제로서의 세리신의 이용, 공개번호 특1998-042150.

특허 : 누에고치 등을 이용한 기능성 실크아미노산, 펩티드 소재의 제조방법 중 효소 분해법에 의한 제조방법, 공개번호 특1998-081941.

특허 : 견사단백질을 이용한 색전제 및 색전방법, 공개번호 특1999-0048843.

특허 : 알코올 분해 증진효과 및 콜레스테롤 상승억제효과를 지닌 세리신펩타이드 물질 및 이를 이용한 혼합음료 및 건강 식품, 공개번호 특1999-0058644.

특허 : 효소분해에 의한 실크분말 펩타이드의 제조방법, 공개번호 특1999-0074787.

특허 : 효소에 의한 바이오 실크 세리신펩타이드 용액 및 분말제조 방법, 공개번호 특1999-0086233.

특허 : 견사의 치즈정련 및 염색방법, 공개번호 특1999-021158.

특허 : 코쿤 등을 이용한 아미노산·펩티드 조미료 제조 방법 및 이를 이용한 기능성 조미료 소재의 제조 방법, 공개번호 특2000-0006718.

특허 : 세리신의 추출방법 및 그 용도, 공개번호 특2000-0056836.

특허 : 견 피브로인 및 견 세리신을 주성분으로 하는 창상피복재 및 그의 제조 방법, 공개번호 특2000-0068154.