

고분자 소재로서 실크 세리신의 이용

이기훈

1. 서론

세리신은 실크 단백질 중 25%를 차지하는 단백질이다. 세리신은 2가닥의 피브로인을 감싸고 있으며, 고치질이 잘 접착되도록 해준다(그림 1). 비극성 아미노산이 많고 물에 잘 용해되지 않는 피브로인과 달리, 세리신은 극성 아미노산이 많고 물에 잘 용해된다. 특히 세리신은 자연계에 존재하는 단백질 중에서 세린 아미노산의 성분이 30% 이상 포함되어 있는 특이적 단백질로 알려져 있다.

실크 단백질을 고분자 소재로 이용하려는 연구는 꾸준히 진행되어 왔지만 주로 피브로인에 한정되어 있었다. 세리신은 이에 비하여 아직 연구실적이 미비하지만 점차 증가하고 있는 추세이다. 현재 세리신은 하이드로젤, 생분해성 재료, 의료용 생체재료, 효소 고정화 지지체, 섬유 코팅제 등으로 이용되고 있다. 또한 세리신의 여러 가지 약리효과와 바이오 산업에서 유용한 효과들이 보고되면서 앞으로 보다 많은 활용이 기대된다.

최근에 자연에 존재하는 소재나 현상을 모방하려는 생체모방기술이 주목을 받고 있는데, 이는 자연계의 시스템이 진화의 역사를 통하여 선택한 가장 효율적인 시스템이기 때문이다. 생체모방기술의 발전과 확대를 위해서는 자연에 대한 보다 깊은 이해가 요구되며, 지속적으로 새로운 물질에 대한 탐색과 심도 깊은 연구가 수반되어야 한다. 많은 연구자들이 누에 또는 거미가 생산하는 실크와 그 방사과정을 모방하려는 시도도 이러한 배경에서 비롯된 것이다. 그러나 누에가

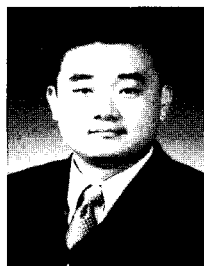
생산하는 또 다른 단백질인 세리신에 대한 연구는 피브로인에 비하여 큰 주목을 받지 못하였지만, 최근 발표되는 세리신에 관한 흥미로운 연구결과들은 그 동안 외면 받아 왔던 이 단백질에 대한 관심을 끌기에 충분하다.

이 글에서는 최근까지 발표된 학술논문을 위주로 세리신의 기본적 특성에 대하여 살펴보고, 분야별 연구 사례를 통하여 새로운 천연 고분자 소재로 세리신의 이용 가능성에 대하여 기술하고자 한다. 세리신의 경우 연구논문 이외에도 특허문헌에서도 유용한 정보를 얻을 수 있으나 이는 이미 Zhang이 정리하여 발표하였으므로,¹ 본 논문에서는 특허문헌은 인용하지 않았다.

2. 세리신의 기본적 성질

2.1 누에 실샘에서 세리신의 분비 및 역할

누에는 2쌍의 실샘을 갖고 있으며 각각의 실샘은 누



이기훈

1998 서울대학교 천연섬유학과(농학사)
 2000 서울대학교 천연섬유학과(농학석사)
 2003 서울대학교 천연섬유학과(농학박사)
 2003~2004 서울대학교 농업생명과학연구원
 객원연구원
 2004~2005 상원대학교 고분자기술연구소
 선임연구원
 2005 서울대학교 바이오시스템·
 소재학부 전임강사

Application of Silk Sericin as a Polymer Material

서울대학교 농업생명과학대학 바이오시스템·소재학부 (Ki Hoon Lee, Department of Biosystems & Biomaterials Science and Engineering, Seoul National University, San 56-1, Sillim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-921, Korea) e-mail: prolee@snu.ac.kr

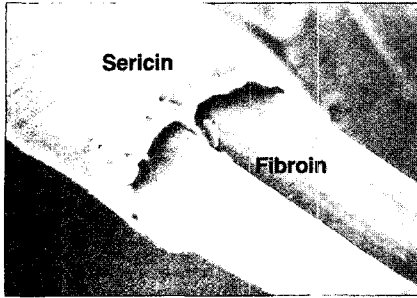


그림 1. 누에 고치실의 전자현미경 사진.

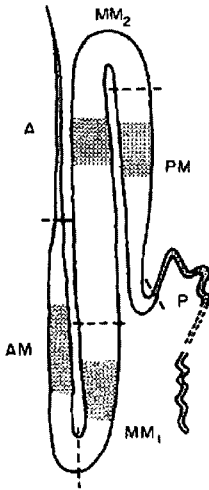


그림 2. 누에 실샘의 구분. A: 전부실샘; AM: 중부실샘의 전부; MM: 중부실샘의 중부; PM: 중부실샘의 후부; P: 후부실샘.⁵

에의 꼬리 쪽부터 후부 (posterior silk gland, PSG), 중부 (middle silk gland, MSG) 그리고 전부 (anterior silk gland, ASG) 실샘으로 구분된다(그림 2). 실크 단백질의 주성분인 피브로인은 후부실샘에서 합성, 분비되어 중부실샘에 저장되었다가 누에가 고치실을 토사하는 시기에 전부실샘으로 이동한다. 이 때 세리신은 중부실샘에서 합성, 분비되며 피브로인을 감싸게 된다.

세리신은 2가닥의 피브로인을 감싸며 고치실을 서로 접착시켜 고치형태를 유지하도록 해준다. 그 동안 피브로인의 방사과정에서 세리신은 단순히 윤활제와 같은 역할을 할 것이라는 추측만 있었을 뿐, 특별히 방사과정에서 어떠한 역할을 하는지에 대한 보고는 없었다. 그러나 최근 세리신이 피브로인 분자의 마이셀 형성을 유도하고 결정화를 지연시키는 효과가 있음이 발견되었다. 세리신은 피브로인보다 친수성 성질이 강

하여 피브로인과 상분리가 일어나며, 이 때 피브로인 분자는 마이셀을 형성하며 안정한 상태를 유지하는 것으로 보고되었다.² 또한 세리신은 피브로인의 결정화를 억제하지만 영구적 억제를 하지 않으므로, 피브로인이 실샘 내에서는 안정한 상태를 유지하고, 토사 순간에는 결정화를 저해하지 않는다고 하였다.³

2.2 세리신의 종류 및 분자량

세리신은 단일 단백질의 명칭이 아니라 피브로인 외부를 감싸고 있는 단백질의 총칭이라고 할 수 있다. 세리신의 분자량은 65~400 kDa로 여러 종류의 단백질로 구성되어 있다. 실샘에서 추출한 세리신은 연구 결과에 따라 최대 8개의 단백질이 존재하는 것으로 보고되었다.⁴ 세리신 단백질의 분류는 Gamo 등이 발표한 연구결과가 많이 인용되고 있다. 이들은 세리신을 분비하는 누에의 중부실샘을 다시 후부, 중부, 전부로 3등분하여(그림 2 참조) 후부에서 s-4 (MW 80 kDa), 중부에서 s-1 (MW 309 kDa), s-3 (MW 145 kDa), 전부에서 s-2 (MW 177 kDa), s-5 (MW 134 kDa)의 5가지 단백질이 존재함을 보고하였다.⁵

이와 같이 세리신이 여러 단백질로 구성되어 있는 것은 유전자 분석을 통해서도 알 수 있다. 세리신을 합성하는 유전자는 현재 *Ser1*, *Ser2*의 2종류가 알려져 있다. 일반적으로 단백질을 합성하기 위해서는 DNA로부터 mRNA가 전사되어야 하는데 세리신 유전자의 경우 하나의 DNA로부터 여러 가지의 mRNA가 전사된다. *Ser1*은 10.5 kb (약 350 kDa), 9.0 kb (약 300 kDa), 4.0 kb (약 133 kDa), 그리고 2.8 kb (약 93 kDa)의 mRNA로 전사되며, *Ser2*는 6.4 (약 213 kDa) 또는 5.0 kb (약 166 kDa)와 3.1 kb (약 103 kDa)의 mRNA로 전사된다. 따라서 이들로부터 만들어지는 단백질은 최소 6개 이상이 존재한다.^{6,7}

누에 실샘에서 분비된 각각의 세리신은 직경이 가는 전부실샘으로 이동하면서 서로 섞이므로 고치실에서 이들 세리신을 분리하는 것은 매우 어렵다. 실제 누에의 실샘 내에서는 세리신 내층과 외층의 분자량 차이가 발생하지만 고치실에서는 내층과 외층 사이에 분자량 차이는 없는 것으로 나타났다.⁸ 그러나 小松計¹은 용해도 차이에 의해 세리신을 용해도가 좋은 외층에 있는 층부터 각각 세리신 I, II, III, IV로 구분하였다(그림 3).⁹ 각각의 층에 대한 아미노산 분석결과 피브로인과 가까운 층일수록 극성 아미노산의 함량이 감소하였으며, 그 결과 용해도는 감소하고, 결정화도는 증가하는 것으로

*3개의 DNA base unit 당 1개의 아미노산이 합성되고 아미노산의 평균 분자량을 100으로 하여 환산한 분자량.

고찰하였다.

2.3 세리신의 아미노산 조성과 서열

이와 같이 세리신은 다양한 단백질로 구성되어 있지만 각 단백질은 여러 아미노산 중 -OH기를 함유하는 아미노산, 특히 세린의 함량이 높다는 공통점을 갖고 있다(표 1). 세린이라는 아미노산 명칭도 바로 세리신에 많이 함유된 아미노산이라는 것에서 유래한다. 피브로인이 비극성 아미노산 함량이 높은 반면 세리신은 극



그림 3. 세리신의 층상구조.

표 1. 세리신의 아미노산 조성(%mol)

Amino acid	Whole Sericin ⁹	Ser1B ¹⁰	Sericin A ²³	Sericin M ²³	Sericin P ²³
Serine (S)	33.43	30.7	39.0	35.4	33.2
Asparagine (N)/Aspartic acid (D) ^a	16.71	12.1	13.3	15.7	11.3
Glycine (G)	13.49	10.8	14.3	16.0	14.1
Threonine (T)	9.74	9.4	3.3	9.7	12.2
Alanine (A)	5.97	7.1	5.5	4.1	8.1
Glutamine (Q)/Glutamic acid (E) ^a	4.42	4.9	12.8	3.1	3.1
Lysine (K)	3.30	4.5	5.4	1.8	1.0
Arginine (R)	3.10	4.9	2.9	3.4	4.0
Valine (V)	2.75	3.7	0.7	3.2	3.9
Tyrosine (Y)	2.61	4.3	0.7	4.0	4.6
Histidine (H)	1.30	1.5	1.0	1.3	n.d. ^b
Leucine (L)	1.14	1.7	0.5	0.9	1.6
Isoleucine (I)	0.72	1.4	0.2	0.5	0.8
Proline (P)	0.68	0.8	n.d. ^b	0.6	1.3
Phenylalanine (F)	0.53	0.7	0.4	0.2	0.7
Tryptophan (W)	0.21	0.8	- ^c	- ^c	- ^c
Cysteine (C)	0.15	0.3	0.1	0.0	n.d. ^b
Methionine (M)	0.04	0.2	n.d. ^b	n.d. ^b	n.d. ^b

^a두 아미노산의 경우 일반적인 아미노산 분석 방법으로는 구별되지 않는다. 그러나 Ser1B의 아미노산 조성은 유전자 정보를 이용하여 산출한 것 이므로 구별이 가능한데 Asparagine/Aspartic acid는 각각 5.0/7.1, Glutamine/Glutamic acid는 각각 2.6/2.3 이다. ^bnot detected. ^cnot determined.

성 아미노산의 함량이 높다는 특징을 갖고 있다. 이와 같은 아미노산 조성의 차이는 물에 대한 용해도 차이를 발생시켜 정련공정과 같은 공정을 가능하게 한다.

세리신을 구성하는 여러 단백질 중 아미노산 서열은 Ser1에서 유래하는 단백질이 밝혀져 있으며 Ser2에서는 일부만 밝혀져 있다. Ser1에서 유래하는 단백질의 경우 38개의 아미노산이 반복되는 서열을 갖고 있으며, 이 서열이 세리신의 β -시트 구조에 해당한다고 보고되었다.¹⁰ 실제 유전자 재조합 기술로 이 아미노산 서열을 생합성한 결과 β -시트 구조가 잘 형성되는 것으로 밝혀졌다.¹¹ 한편 Ser2에서 유래하는 단백질은 약간의 차이는 있지만 15개의 아미노산이 반복적으로 나타난다고 알려졌다(표 2).¹²

2.4 세리신의 2차 구조

세리신의 2차 구조는 대부분 랜덤코일 구조로 이루어져 있으며, 약간의 β -시트 구조를 포함하는 것으로 알려져 있다.¹³ 일반적으로 피브로인에 가까운 세리신 일수록 β -시트 구조의 비율이 증가하는 것으로 보고

표 2. 세리신의 아미노산 서열(각각의 알파벳은 하나의 아미노산에 해당, 표 1 참조)

	Repeated Motifs	Reference
Ser1	SSTSGGTSTY GYSSRHRGGS VSSTGSSSNT DSSTKNAG	10
Ser2	RSPSHKDEKVKPND	11

되었다.⁹ 고치에서 실을 뽑을 때 실이 끊기지 않고 나오는 길이의 비율을 해서율이라 하는데 기존의 세리신의 2차 구조에 대한 연구는 이와 관련하여 이루어졌다. 고온 다습한 조건에서 건조된 고치의 경우 해서율이 떨어지는데 이는 세리신의 2차 구조 중에서 β -시트 구조가 증가하기 때문이다.¹⁴

한편, 고치실에서 추출한 세리신 수용액을 하루 이상 보관하면 젤화현상이 일어나는데 이 역시 β -시트 구조가 형성되면서 일어나는 현상이다. 그러나 열을 가하면 다시 솔 상태로 전이가 일어난다.¹⁵ 이러한 세리신의 솔-젤 전이는 피브로인과 다른 특성이라 할 수 있다.

피브로인은 알코올에 침지하면 β -시트 구조로 전이가 일어나지만, 세리신의 경우 알코올에 의한 β -시트 구조로의 완전한 전이는 일어나지 않는다. 세리신을 에틸알코올, 아세톤 그리고 물에 침지하고 110 °C에서 건조한 후 세리신의 구조전이를 관찰한 결과 세리신의 random coil 구조가 일부 β -sheet 구조로 전이되는 것을 발견하였다. 그러나 유기용매 보다는 물에 의한 영향이 더욱 컸다.¹⁶ 세리신의 2차 구조에 대한 최근의 연구 보고에 의하면 이러한 알코올 처리에 형성되는 세리신의 2차 구조는 β -시트 구조가 아니라 단순히 분자들이 응집되어 있는 상태라고 하였다.¹⁷

피브로인 섬유는 누에가 토사하는 과정에서 연신이가해져 배향구조를 갖지만, Sericin-hope 품종에서 생산되는 세리신 섬유는 배향구조를 갖지 않는다.¹⁸ 그러나 최근에 세리신 필름을 에탄올에 처리하고 연신한 결과 배향구조를 가질 수 있다고 보고되었다(그림 4).¹⁹

이와 같은 세리신의 2차 구조의 특성은 측쇄가 큰 아미노산의 함량이 피브로인에 비하여 많기 때문이다. 피브로인의 경우 측쇄의 작은 아미노산이 많아 분자쇄간 치밀한 구조를 가질 수 있지만, 세리신의 경우에는 β -시트 구조를 형성하더라도 분자간 수소결합이 불안정하게 형성되기 때문에 그러한 구조를 갖기 어렵다.

2.5 세리신의 추출

세리신 연구에 있어서 어려움은 아직까지 그 추출 방법이 체계화되어 있지 못하는 점이다. 앞서 언급하였듯이 세리신은 여러 종류의 단백질이 혼합되어 있는

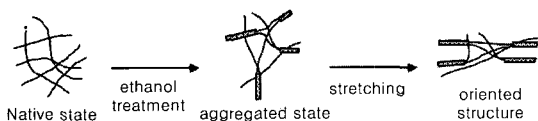


그림 4. 에탄올 처리와 연신에 의한 세리신 분자의 응집과 배향.¹⁹

데, 이들을 누에실샘이 아닌 고치실로부터 각각 분리하기는 매우 어렵다. 따라서 현재는 이들을 별도로 분리하지 않고 이용하고 있다. 일반적인 정련공정에서도 중요하지만 세리신 추출에서도 중요한 것은 피브로인이 손상 받지 않도록, 즉 세리신 용액에 피브로인이 혼합되지 않도록 하는 것이다. 일반적으로 정련공정에서는 세리신이 제거된 비율을 연감율로 나타내는데 세리신이 완전히 제거된 경우 연감율은 25~26%이다.

일반적인 정련공정에서는 비누와 탄산나트륨 등을 이용하여 세리신을 제거한다. 이 경우 실의 품질은 우수하지만 제거된 세리신을 회수하기는 어렵다. 따라서 세리신 추출을 위하여 가장 많이 이용되는 방법은 열수 추출법이다. 일반적으로 100 °C 이상에서 물만을 이용한 추출법인데, 세리신의 분자량이 20~200 kDa으로 저하된다는 단점이 있다. 그러나 물만을 사용하므로 이후에 화학약품 제거하기 위한 투석 등의 공정이 필요하지 않고, 세리신을 거의 완전히 추출할 수 있다는 경제적 이점이 있어 아직 널리 이용되고 있다.

또 다른 방법은 urea 수용액을 이용하는 것이다. 이 방법은 단시간에 분자량의 저하를 최소화하면서 추출할 수 있다는 장점이 있다.²⁰ 그러나 투석을 통하여 urea를 제거하여야 하고 또한 투석 중에 발생하는 젤화나 응집현상을 방지하기 위하여 완충액을 이용하여 투석해야 하는 번거로움이 있다. 하지만 기존 열수추출법에서 얻어진 세리신은 분자량 저하에 의한 여러 단점이 있기 때문에 이를 개선할 수 있는 좋은 추출방법이다.

일반적으로 고치실에서 세리신을 제거하는 경우 대부분 약 알칼리 조건에서 행하여 진다. 그러나 최근 산성조건에서 정련을 수행한 연구결과도 보고되었는데, 이 경우 연감율이 27.8%로 약간의 피브로인도 포함되어 제거된 것으로 보인다.²¹

일본에서는 누에 실샘 중에서 후부실샘(피브로인이 분비되는 실샘)이 결여된 누에 품종(Sericin-hope)이 개발되어 연구에 활용이 되고 있다. 이 누에 품종은 세리신만을 생산하며 이를 고치실과 마찬가지로 토사한다. 이 경우에 있어서는 물에 끓이거나 기존의 피브로인을 용해할 때와 동일한 LiBr 또는 LiSCN 수용액을 이용하기도 한다. 이들 수용액은 분자량의 손실을 최소화 하지만 일반 누에고치의 경우 피브로인도 함께 용해되므로 적용할 수 없다(표 3).

세리신은 여러 종류의 단백질이 혼합되어 있으므로 이를 분리할 필요성은 꾸준히 제기되었다. Mosher는 단백질의 등전점을 이용하여 pH 4.1에서 침전되지 않

표 3. 추출방법에 따른 세리신의 분자량

고치의 종류	추출조건	분자량	Ref.
일반고치	Distilled water 120 °C, 1 hr	50~200 k	52
	8 M urea +2% 2-mercaptoethanol 80 °C, 5 min	150, 250, 400 k	23
Sericin-hope	8 M LiBr 35 °C, 24 h	100, 180 >250 k	19

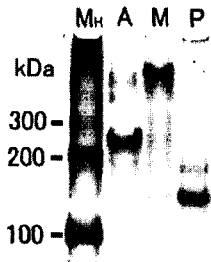


그림 5. 분리된 세리신 단백질의 SDS-PAGE(M_H: 분자량 or M, A : Sericin A, M : Sericin M, P : Sericin P).²³

는 세리신(A)과 그렇지 않은 세리신(B)으로 분리하였다.²² 그러나 이후의 연구 결과 두 단백질 간의 근본적인 차이는 없는 것으로 밝혀졌다. 한편 앞서 언급한 용해도 차이에 의한 세리신의 분리는 끓는 물을 이용해야 하므로 세리신의 분자량 저하를 일으킬 수 있으며, 재현성도 낮아 바람직한 분리법은 아니다.

최근 Takasu 등은 고치실로부터 3 종류의 세리신 구성단백질을 추출하는 방법을 발표하였다.²³ 이들은 urea 수용액을 이용하여 고치실로부터 추출한 세리신 용액에 과량의 에틸알코올을 첨가하여 전체 세리신 분말을 제조하였다. 이 분말을 다시 LiSCN 수용액으로 재용해한 후 에틸알코올 첨가량을 조절하여 각각 Sericin A, M, 그리고 P를 분리하였다. 이들 세리신 단백질은 각각 누에의 중부실샘 중에서 전부, 중부 그리고 후부에 해당하는 단백질로 분자량은 각각 250, 400, 그리고 150 kDa이다(그림 5). 각 단백질의 아미노산 조성과 구조적 특징을 비교, 분석한 결과 Sericin A는 *Ser2*에서 유래하며, Sericin M과 P는 *Ser1*에서 유래한다고 고찰하였다. 특히 Sericin M의 경우 세린이 반복적으로 나타나는 아미노산 서열을 갖고 있다는 추가적인 연구결과를 내놓았다.²⁴ 이 방법은 특정 세리신 단백질을 분리할 수 있다는 장점이 있어, 앞으로의

연구에 많은 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

3. 고분자소재로서의 세리신의 이용

새로운 고분자 소재로서 세리신을 응용하는 연구들이 최근 활발하게 진행 중이다. 이는 세리신이 피브로인에 비하여 용해가 쉽고, 정련과정 중에 발생하는 폐자원을 활용한다는 경제적 이점이 있어 적합한 용도를 찾는다면 그 이용가능성이 매우 높을 것으로 기대되기 때문이다.

세리신은 피브로인에 비하여 미생물에 의하여 쉽게 분해가 되므로 생분해성 소재로 적합할 것으로 판단된다.²⁵ 또한 의료용 소재로도 세리신을 활용하려는 시도도 있는데, 일부에서 세리신으로 인한 면역반응이 나타나 좀더 신중한 접근이 필요하다. 그러나 세리신의 여러 단백질 중에서 어느 단백질이 이러한 면역반응에 원인이 되는지는 아직 밝혀져 있지 않다. 세리신이 고분자 분야에서 가장 성공적으로 적용되고 있는 분야는 섬유분야이다. 세리신을 코팅한 합성섬유는 보습능력이 향상되어 정전기 발생이 감소되고 착용감도 우수한 것으로 알려져 있다. 본 단원에서는 이러한 세리신의 고분자 분야에 적용된 사례를 중심으로 살펴보고자 한다.

3.1 생분해성 소재

천연고분자를 이용한 생분해성 소재의 개발은 오래전부터 시행되어 왔으며, 전분을 활용한 생분해성 폴리우레탄의 개발이 대표적이다. 세리신은 -OH기가 다량으로 존재하므로 전분과 같은 용도로 활용될 수 있다. 일본에서는 세리신을 포함하는 폴리우레탄의 제조방법이 특허로 등록되어 있다.¹

3.2 의료용 소재

실크 단백질은 천연고분자라는 면에서 생체적합성 등의 장점이 있어 피브로인의 경우 이미 많은 연구가 이루어졌다. 그러나 세리신의 경우 일부에 있어 면역반응을 일으키는 것으로 알려져 있다. 생사(세리신이 제거되지 않은 실크 섬유)를 수술용 봉합사로 사용하는 경우에 있어서 임상학적으로 면역반응이 나타난 경우들이 보고되었는데,^{26,27} 이러한 면역반응의 원인이 세리신에 의한 것임이 밝혀졌다.²⁸ 따라서 Altman 등은 과거 실크 봉합사에 관한 연구들을 종합한 결과, 실크를 의료용 소재로 이용하는 경우 세리신의 완벽한 제거가 요구된다고 하였다.²⁹ 구체적으로 세리신 중에서 어떤 성분이 면역반응을 일으키는지 연구가 필요하지만, 현재로서는 혈액과 직접 접촉하지 않는 용도로 세리신

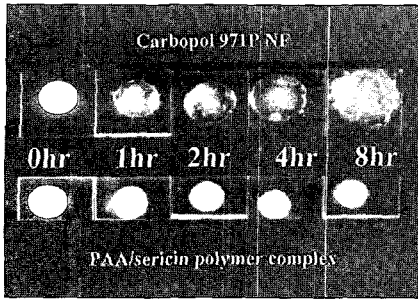


그림 6. PAA/세리신 복합체와 상용 구강점막접착체의 시간에 따른 용해도 비교.³⁰

을 응용할 수 있는 가능성은 있다.

Minoura 등은 피브로인, 세리신 그리고 두 단백질의 혼합물로 필름을 제조하고 섬유아세포(fibroblast)의 부착과 성장을 관찰하였다.³⁰ 그 결과 피브로인과 세리신 단독으로 제조된 필름의 경우 세포의 부착과 성장이 기존의 기질인 콜라겐(collagen)과 유사하였으나 피브로인과 세리신이 혼합된 경우 두 물질간에 상분리가 나타나 안 좋은 결과를 나타내었다. 세포의 성장 모양도 관찰하였는데, 피브로인이 기존의 콜라겐과 유사한 방추형 세포가 형성된 반면, 세리신은 전혀 다른 모양의 세포가 형성되었다. 세포의 표면은 주로 음전하를 띠어 주로 염기성 기질에 부착이 잘 되는데 세리신의 경우 산성아미노산의 함량이 높아 세포와 정전기적 상호작용을 하여 세포의 모양이 변형된 것으로 생각된다. 한편 최근 연구결과에서는 세리신 단백질 중 Sericin M을 이용하여 동일한 실험을 수행한 결과 콜라겐과 유사한 세포부착능을 나타내었다.³¹ 특히 Sericin M 단백질은 세린이 반복적으로 나타나는 아미노산 서열을 갖는데, 이러한 아미노산 서열이 세포부착능을 향상시킨다고 하였다.

Ahn 등은 세리신의 존재 하에서 아크릴산을 템플레이트(template) 중합하여 새로운 점막점착성 고분자를 제조하였다.³² 세리신과 아크릴산은 수소결합으로 안정한 분자구조를 가지며, 그 점착성은 상용 점막점착성 고분자와 유사하였으며, 안정성은 보다 우수하였다(그림 6).

한편, Takeuchi 등은 세리신이 뼈를 구성하는 성분인 아파타이트(apatite)의 형성을 촉진하는 것을 보고하였다.³³ 세리신이 부착되어 있는 생사는 아파타이트가 형성된 반면, 세리신이 제거된 피브로인 섬유에는 형성되지 않았다(그림 7). 세리신에는 -COOH 측쇄를 갖는 산성 아미노산이 20% 정도 함유되어 있는데 이들 아미노산이 아파타이트 형성을 촉진하는 것으로

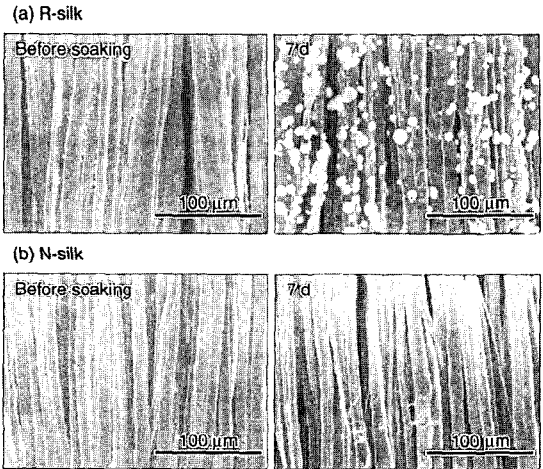


그림 7. 세리신 표면에 형성된 아파타이트. (a) R-silk: 생사; (b) N-silk: 세리신이 제거된 실크.³³

고찰하였다.

세리신 수용액을 동결건조하면 스폰지 형태의 다공성 지지체를 제조할 수 있다. 이러한 다공성 지지체는 세포배양기질, 조직공학용 스캐폴드 등으로 응용할 수 있다. Tao 등은 세리신 수용액의 농도와 동결온도를 조절하여 공극의 크기와 밀도를 제어하였다.³⁴ 이 결과에 의하면 수용액의 농도가 높을수록 그리고 동결온도가 낮을수록 공극의 크기와 공극률은 감소하고 공극의 밀도는 증가하였다. 이와 같은 다공성 세리신 지지체를 실제 응용하기 위해서는 가교를 통한 불용화 처리가 필수적이며 이 연구에서는 PEG-DE를 이용하여 세리신을 가교 처리하였다.

3.3 하이드로젤

하이드로젤(hydrogel)은 높은 수분함량으로 의약과 농업 등에서 활용도가 높은 소재이다. 세리신 수용액은 젤을 형성하는 능력이 있어 주목을 받아왔다. 그러나 세리신 단독의 하이드로젤은 그 강도가 약해 이를 개선하기 위한 연구가 진행되었다.

王 蘇 등은 폴리비닐알코올(PVA)과 세리신을 블렌드하여 의료용 소재로 사용하기 위한 목적으로 하이드로젤(hydrogel)을 제조하고 이의 구조와 물성에 관하여 보고를 하였다.³⁵ 제조된 블렌드 하이드로젤은 세리신 함량이 17 wt%까지는 강도와 탄성이 모두 우수하였다. 이러한 결과는 세리신 분자가 비결정영역의 폴리비닐알코올 분자들과 수소결합하여 나타나는 것으로 고찰하였다. 그러나 17 wt% 이상에서는 폴리비닐알코올과 세리신의 상분리가 발생하였다.

Kweon 등은 세리신의 젤화에 합성고분자인 polo-

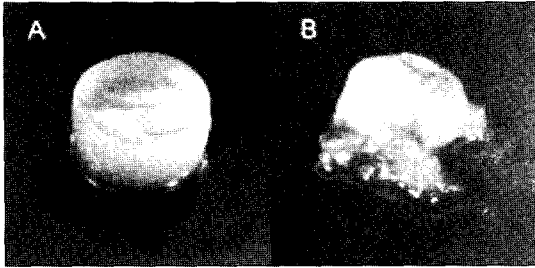


그림 8. 세리신 하이드로젤. A: urea 수용액을 이용하여 추출한 세리신; B: 열수추출한 세리신.³⁸

xamer가 미치는 영향에 대하여 보고하였다.³⁶ 그 결과 poloxamer의 첨가농도와 온도가 증가함에 따라 세리신의 젤화가 촉진되었다. 또한 순수한 세리신은 가역적 젤화거동을 하는 반면 poloxamer를 첨가한 세리신은 비가역적 젤화거동을 하였다. 적외선 분광계와 원색색 분광계를 이용한 분석결과, 세리신 분자가 poloxamer의 첨가에 따라 random coil 구조에서 β -sheet 구조로 빠르게 전이되는 것이 관찰되었다. 또한 X선 회절분석 통하여 poloxamer의 결정구조에 세리신이 영향을 주며, 시차열량주사 분석을 통하여 poloxamer의 녹는점이 낮아지는 것으로 보아 poloxamer와 세리신이 수소결합과 소수성 결합에 의하여 상호작용을 하는 것으로 보고하였다.

Nagura 등은 dimethylolurea(DMU)로 가교결합한 세리신 하이드로젤 막의 구조와 물리적 성질에 대한 연구결과를 발표하였다.³⁷ 가교제의 농도가 낮을 경우 가교결합으로 인하여 보다 치밀한 구조를 가져 수분함유율이 낮아지지만, 일정농도(0.5 mole ratio)가 되면 오히려 세리신의 β -sheet 형성을 저해하여 계속 random coil 구조를 유지하므로 수분함유율이 증가하는 특성을 나타내었다.

한편 Teramoto 등은 블렌드나 가교제 없이 에탄올만으로 순수한 세리신 수용액으로부터 하이드로젤을 제조하였다(그림 8).³⁸ 이들은 Sericin-hope으로부터 얻어지는 세리신 고치를 LiBr 수용액에 용해하여 분자량의 저하가 없는 세리신을 추출하였으며, 열수추출한 세리신과 비교한 결과 세리신의 분자량이 젤의 형태 안정성에 중요한 요소임을 밝혔다.

3.4 세리신을 이용한 섬유 제조 및 개질

세리신으로 제조한 필름이나 섬유는 잘 부스러져 세리신 단독으로 이용은 불가능하다. 이러한 특성으로 인하여 아직까지 전통적인 고분자소재 즉 필름이나 섬유소재로 응용된 예를 찾기는 쉽지 않다. 특히 대부분의 경우 세리신이 주성분이라기 보다는 합성고분자의 성

능을 개선하기 위한 보조성분으로 이용되었다.

세리신은 -OH기가 측쇄에 있는 세린과 트레오닌의 함량이 40% 이상이므로 합성고분자 중 PVA와 유사하며 이에 따라 이들 고분자를 블렌드한 연구가 발표되었다. Miyake 등은 PVA와 세리신을 블렌드하여 사출성형을 시도하였다.³⁹ PVA는 용점과 점도가 높아 사출성형이 어려운 단점이 있는데 이를 해결하기 위하여 세리신을 블렌드한 것이다. 세리신의 함량이 2 wt%에서 응력과 신장이 증가하였고 5 wt%에서는 다시 감소하다가 이후 증가하였다. 세리신 단독의 경우 β -시트 구조를 갖지만, PVA와 블렌드한 경우 세리신 함량이 20 wt% 이하에서는 랜덤 코일 구조를 나타내었다. 세리신 함량이 20 wt% 이상에서는 두 가지의 2차 구조가 모두 나타난다. 세리신의 함량이 10 wt% 이상에서는 PVA와 세리신간의 상분리가 발생하였다.

王蘇 등은 젤방사를 통하여 PVA/세리신 블렌드 섬유를 제조하고 그 구조와 물성을 분석하였다.⁴⁰ PVA 단독으로는 젤방사에 의한 섬유의 제조가 불가능하였으나 세리신을 5 wt%를 포함하는 경우 젤방사가 가능하였다. FT-IR 분광광도계 분석 결과, 두 물질이 수소결합을 이루고 있는 것이 확인되었다. 제조된 섬유의 물성은 비닐론(Vinylon) 섬유보다 강도는 낮았으나 신도는 높게 나타났다. 이러한 현상은 제조된 섬유의 비결정영역의 배합도가 비닐론 섬유에 비하여 작기 때문이다. 그러나 영율(Young's modulus)을 비교한 결과 비닐론 섬유와 비슷하였다.

세리신은 보습효과로 인하여 화장품 등에 주로 이용되어 왔다. 섬유분야에서는 섬유의 표면을 친수성으로 개질하기 위한 방법으로 세리신을 이용하였다. PP,⁴¹ 면 등의^{42,43} 섬유에 세리신을 정착시킨 사례도 있으나, 가장 널리 알려지고 상업화에 성공한 것은 폴리에스테르 섬유이다. 폴리에스테르 섬유에 세리신을 정착시키는 경우 섬유의 보습성이 향상되었으며 정전기의 발생은 억제되었다(그림 9).⁴⁴ 이와 같이 섬유에 세리신을 정착시키는 경우 세탁내구성이 가장 큰 문제였으나, 현재 시판되고 있는 섬유들에서는 가교기술의 발전으로 세탁 내구성이 크게 향상되었다.

3.5 효소고정화 지지체로서의 세리신의 이용

효소는 위치선택성(regioselectivity)과 입체선택성(stereoselectivity) 반응을 하며, 부반응이 적고, 반응조건이 온화한 장점을 갖고 있다. 반면 반응조건이 까다롭고, 안정성에 문제가 있으며, 기질선택성(substrate selectivity)이 있고, 상용화의 측면에서 비용의 문제가 단점이다. 특히 비용 문제와 반응 후 효소를 분리하는

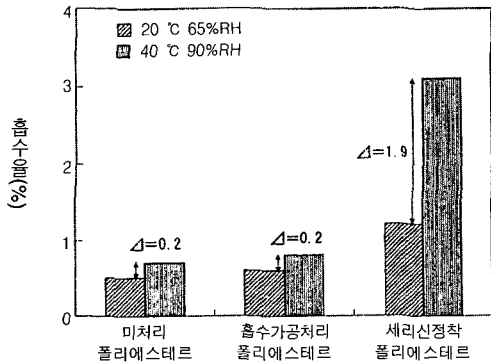


그림 9. 세리신 정착 폴리에스테르 섬유 흡수율.⁴⁴

일은 효소를 이용한 반응에 있어서 가장 큰 걸림돌이다. 이러한 단점을 극복하고자 제안된 방법이 효소를 고정하는 방법이다. 고정화 효소는 반복적 사용이 가능하고, 생성물과 효소의 분리가 용이하여 기존의 단점을 극복할 수 있다.

실크 단백질을 이용한 효소의 고정화도 많은 연구 보고가 있다. 현재까지 효소의 고정화에 이용되는 것은 대부분 피브로인이다. 피브로인은 간단한 처리로 효소의 고정이 가능하며 고정화된 효소는 활성과 안정성이 증가하는 것으로 알려져 있다.⁴⁵⁻⁴⁷ 세리신의 불용화 처리가 어려워 피브로인에 비하여 많은 연구가 안 되었으나 다른 물질과 블렌드하거나 다른 지지체에 코팅되어 이용되었다.

出村誠 등은 실크 부직포에 피브로인과 세리신을 혼합하여 코팅하고 효소의 활성도를 측정하였다.⁴⁸ 그 결과 세리신이 14% 함유되었을 경우 효소의 활성이 최대가 됨을 보였다. 또 다른 연구에서는 세리신과 sPVA를 블렌드하여 막을 제조하고 효소를 막 내부에 가두는 방법으로 고정화하였다. 그러나 이 경우 효소가 막 외부로 유출되는 단점이 있어 블렌드막을 다시 PVA로 코팅하였다.⁴⁹ 실크 단백질을 이용한 이들 초기의 연구는 거의 대부분 효소를 단백질 분자 사이에 물리적으로 가두는 방법을 이용했는데, 이 방법은 효소가 유출될 수 있고 고분자 기질에는 적합하지 않은 단점이 있다.

이와 같은 단점을 극복하고자 피브로인 섬유의 표면에 공유결합으로 고정하는 연구가 시도되었는데, 효소의 활성이 낮은 단점이 있었다. 그러나 피브로인 섬유와 효소 사이에 세리신을 스페이서로 하여 효소를 고정하는 경우 효소의 활성은 물론 반복적인 재사용에도 높은 안정성을 나타내었다(그림 10).⁵⁰ 일반적으로 효소의 고정화 지지체는 표면 특성이 친수성인 것이 바람직한데, 세리신의 경우 피브로인에 비하여 친수성이

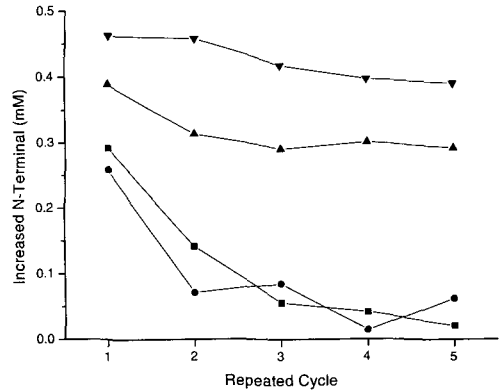


그림 10. 여러 가지 스페이서를 도입한 고정화 효소의 반복사용에 대한 안정성. ●: 직접고정; ■: 에틸렌디아민; ▲: BSA; ▼: 세리신.⁵⁰

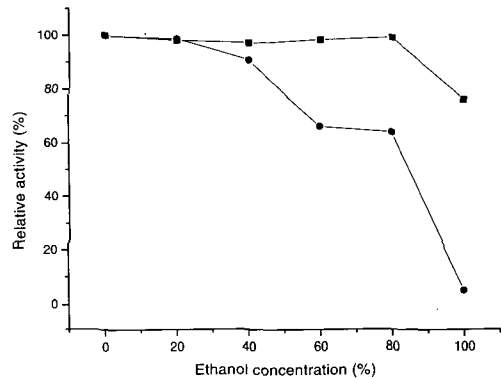


그림 11. 세리신 정착사를 지지체로 하는 고정화 효소의 유기용매하에서의 안정성. ●: 자유효소; ■: 고정화 효소.⁵¹

강하므로, 피브로인에 직접 고정된 경우보다 세리신을 스페이서로 이용한 경우 좋은 결과를 나타낸 것으로 여겨진다.

한편 섬유상 지지체는 비표면적이 크고 물리적 강도가 우수하므로 좋은 효소고정화 지지체이다. 그러나 세리신은 섬유로 가공하기 어려운 단점이 있다. 따라서 생사, 즉 세리신이 제거되지 않은 실크 섬유를 이용하여 고정화 지지체로 이용하였다. 세리신이 유출되지 않도록 글루타알데히드로 가교결합시켜 세리신을 피브로인 섬유에 정착시키고 효소를 고정화하였다. 그 결과 유기용매 하에서도 효소의 활성이 안정적으로 유지되는 결과를 얻을 수 있었다(그림 11).⁵¹

세리신 미세입자를 효소의 지지체로 이용한 연구 결과에서도 효소의 활성이 60% 이상 유지되었으며, 효소의 안정성도 증대되었다.⁵² 특히 이 연구결과에서는

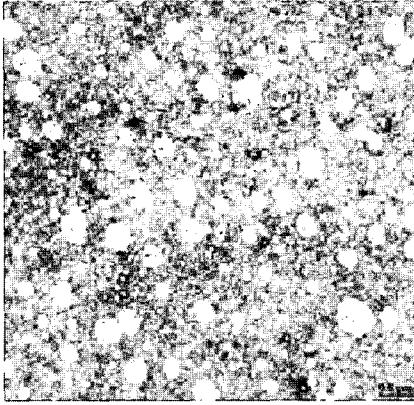


그림 12. 세리신-PEG 나노입자의 투과전자현미경 사진.⁵³

단백질 분해 효소의 존재하에서도 효소의 안정성이 증대되는 결과를 나타내었다. 최근 효소와 같은 단백질을 이용한 약물치료법이 적용되고 있는데, 이 경우 약물로 이용한 단백질이 소화장 또는 혈액 속의 단백질 분해 효소에 의하여 분해되어 제 기능을 발휘하지 못하는 경우가 많다. 그러나 이 결과에서처럼 세리신이 단백질 분해 효소로부터 효소 등의 단백질을 보호하는 기능이 있다면 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 특히 Cho 등은 세리신에 PEG를 공유결합시켜 200 nm 크기의 나노입자를 제조하였는데,⁵³ 위와 같은 세리신의 성질을 활용하면 단백질 약물의 전달체로 활용이 가능할 것이다(그림 12).

4. 세리신의 생리적 기능

세리신은 고분자 소재로서만 아니라 여러 가지 생리 활성 소재로서의 기능도 갖고 있다. 최근 세리신에 관한 연구가 증가하고 있는 것은 바로 이러한 생리활성 기능을 활용한 신소재의 개발이 가능할 것이라는 기대 때문이다. 오래 전부터 세리신은 사람의 피부에 존재하는 천연보습인자(natural moisturizing factor, NMF)와 유사한 아미노산 조성을 갖고 있어 화장품에 널리 이용이 되어 왔다. 두 단백질의 공통점은 세린의 함량이 특이적으로 높다는 점이다.

Kato 등은 세리신이 지질의 과산화와 티로시나제(tyrosinase)의 활성을 억제하는 것을 효과가 있음을 보고하였다.⁵⁴ 지질의 과산화와 티로시나제는 피부의 노화와 관련이 있는 것으로 세리신을 기능성 화장품 원료로 이용할 수 있는 가능성을 제시하였다. 한편 Zh-aorigetu 등은 세리신이 자외선으로 인한 피부의 화상

이나 암의 진행도 억제하는 효과를 나타내었는데 이는 산화적 스트레스(oxidative stress)를 억제하는 세리신의 효과라고 설명하였다.⁵⁵

세리신은 식품으로서의 기능도 있는데, Sasaki 등은 세리신이 아스파탁산과 세린이 많다는 사실에 착안하여 이들이 금속성분과 배위결합을 하여 금속성분의 장내흡수를 도울 수 있을 것으로 기대하였다.⁵⁶ 열수추출한 세리신을 쥐에 투여하여 금속성분의 흡수도를 측정한 결과 아연, 철, 마그네슘 그리고 칼슘의 소화흡수가 각각 41, 41, 21 그리고 17% 향상되었다. 이들에 의하면 이러한 금속성분의 소화흡수를 돕는 단백질은 casein phosphopeptides(CPP)이후 세리신이 처음이라고 보고하였다. 또한 결장암을 유도한 쥐를 이용한 실험에서 세리신을 섭취한 쥐는 결장내의 선종의 수가 62%까지 억제되는 것으로 밝혀졌다.⁵⁷

한편 세포배양을 통한 다양한 실험과 물질의 생산이 증가하면서 이들 세포를 효과적으로 보관하는 문제가 대두되었다. 많은 경우에 있어 냉동보관을 하게 되는데 이 경우 세포의 파괴가 발생할 수 있다. 따라서 이러한 피해를 방지하기 위하여 동결방지제가 이용되는데, 세리신의 경우에도 이러한 효과가 발견되었다.⁵⁸ 특히 세리신에서 발견되는 38개의 아미노산 반복서열을 생합성하여 첨가한 결과, 기존의 동결방지제와 유사한 결과를 얻었다.

세리신은 세포의 보관뿐만 아니라 세포의 배양액의 성분으로도 이용가능성이 제시되었다. 세포를 배양하는 경우 기존에는 세포의 영양분으로 배양액에 혈청을 혼합하였지만 최근에는 무혈청 배양액의 이용이 증가하고 있는 추세이다. 그러나 기존의 배양액을 무혈청 배양액으로 교체하는 경우 급성혈청결핍(acute serum deprivation)에 의한 세포의 과사가 발생할 수 있다. 하지만 무혈청 배양액에 세리신을 첨가하는 경우 곤충 세포에서의 위와 같은 과사를 억제하는 것으로 보고되었다.⁵⁹ 한편, 당뇨병의 연구와 치료에 있어서 췌장 세포의 배양은 매우 중요한 기술인데, Ogawa 등은 배양액에 혈청대신 세리신을 공급한 결과, 쥐의 췌장세포 배양에 효과적임을 발표하였다.⁶⁰

5. 결론

세리신은 지금까지보다는 앞으로의 활용 가능성이 기대되는 소재이다. 1994년 이후 SCI-Expanded에 등재된 학술지에 발표된 세리신에 관한 논문은 총 116

개가 검색되는데, 이 중 53개가 2003년 이후에 발표되었다. 고분자 분야와 관련해서 발표된 건수는 1994년 이후 39개이며 이 중 21개가 2003년 이후 발표되었다. 비록 다른 고분자 소재에 비하여 아직 미약한 수준이나 아직 잘 알려져 있지 않는 소재라는 점에서 앞으로 더욱 많은 연구가 진행될 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Y. Q. Zhang, *Biotechnol. Adv.*, **20**, 91 (2002).
2. H. J. Jin and D. L. Kaplan, *Nature*, **424**, 1057 (2003).
3. K. H. Lee, *Macromol. Rapid Commun.*, **25**, 1792 (2004).
4. 胡衛軍, 嶋田透, 小林正彦, *日蠶雜*, **61**, 236 (1992).
5. T. Gamo, T. Inokuchi, and H. Lauffer, *Insect Biochem.*, **7**, 285 (1977).
6. J. J. Michaille, P. Couble, J. C. Prodhomme, and A. Garel, *Biochimie*, **68**, 1165 (1986).
7. J. J. Michaille, A. Garel, and J. C. Prodhomme, *Sericologia*, **30**, 49 (1990).
8. 朱良均, 荒井三雄, 平林潔, *日蠶雜*, **64**, 209 (1995).
9. 小松計一, *蠶試報*, **26**, 135 (1975).
10. A. Garel, G. Deleage, and J. C. Prudhomme, *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **27**, 469 (1997).
11. J. Huang, R. Valluzzi, E. Bini, B. Vernaglia, and D. L. Kaplan, *J. Biol. Chem.*, **278**, 46117 (2003).
12. J. J. Michaille, A. Garel, and J. C. Prudhomme, *Gene*, **86**, 177 (1990).
13. E. Iizuka, *Biochim. Biophys. Acta.*, **181**, 477 (1969).
14. L. J. Zhu, M. Arai, and K. Hirabayashi, *J. Seric. Sci. Jpn.*, **64**, 420 (1995).
15. 朱良均, 荒井三雄, 平林潔, *日蠶雜*, **65**, 270 (1996).
16. 塚田益裕, *日蠶雜*, **52**, 157 (1983).
17. K. G. Lee, H. Y. Kweon, J. H. Yeo, S. O. Woo, Y. W. Lee, C. S. Cho, K. H. Kim, and Y. H. Park, *Int. J. Biol. Macromol.*, **33**, 75 (2003).
18. H. Teramoto and M. Miyazawa, *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, **72**, 157 (2003).
19. H. Teramoto and M. Miyazawa, *Biomacromolecules*, **6**, 2049 (2005).
20. Y. Takasu, H. Yamada, and K. Tsubouchi, *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, **71**, 151 (2002).
21. A. Kurioka, F. Kurioka, and M. Yamazaki, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 774 (2004).
22. H. H. Mosher, *Am. Dyes. Repr't.*, **21**, 341 (1932).
23. Y. Takasu, H. Yamada, and K. Tsubouchi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 2715 (2002).
24. K. Tsubouchi, Y. Igarashi, Y. Takasu, H. Yamada, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 403 (2005).
25. A. Seves, M. Romano, T. Maifreni, S. Sora, and O. Ciferri, *Int. Biodeter. Biodegr.*, **42**, 203 (1998).
26. D. H. Hollander, *Med. Hypotheses*, **43**, 155 (1994).
27. S. Kurosaki, H. Otsuka, M. Kunitomo, M. Koyama, R. Pawankar, and K. Matumoto, *Nippon Ika Daigaku Zasshi*, **66**, 41 (1999).
28. W. Zaoming, R. Codina, E. Fernandez-Caldas, and R. F. Lockey, *J. Inv. Allergy Clin. Immunol.*, **6**, 237 (1996).
29. G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **24**, 401 (2003).
30. N. Minoura, S. Aiba, Y. Gotoh, M. Tsukada, and Y. Imai, *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 1215 (1995).
31. K. Tsubouchi, Y. Igarashi, Y. Takasu, and H. Yamada, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 403 (2005).
32. J. S. Ahn, H. K. Choi, K. H. Lee, J. H. Nahm, and C. S. Cho, *J. Appl. Polym. Sci.*, **80**, 274 (2001).
33. A. Takeuchi, C. Ohtsuki, T. Miyazaki, H. Tanaka, M. Yamazaki, and M. Tanihara, *J. Biomed. Mater. Res.*, **65**, 283 (2003).
34. W. Tao, M. Li, and R. Xie, *Macromol. Mater. Eng.*, **290**, 188 (2005).
35. 王蘇, 後藤康夫, 大越豊, 奈倉正宣, *日蠶雜*, **67**, 295 (1998).
36. H. Y. Kweon, J. H. Yeo, K. G. Lee, Y. W. Lee, Y. H. Park, J. H. Nahm, and C. S. Cho, *Macromol. Rapid Commun.*, **21**, 1302 (2000).
37. M. Nagura, R. Ohnishi, Y. Gitoh, and Y. Ohkoshi, *J. Insect Biotech. Sericol.*, **70**, 149 (2001).
38. H. Teramoto, K. Nakajima, and C. Takabayashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 845 (2005).
39. H. Miyake, H. Wakisaka, and M. Nagura, *J. Insect Biotech. Sericol.*, **71**, 85 (2002).
40. 王蘇, 後藤康夫, 大越豊, 奈倉正宣, *日蠶雜*, **68**, 1 (1999).
41. L. Fontaine, T. Lemele, J. Brosse, G. Sennyey, J. Senet, and D. Wattiez, *Macromol. Chem. Phys.*, **203**, 1377 (2002).
42. 三宅肇, 山下重和, 脇坂博之, 清水慶昭, 奈倉正宣, *織學誌*, **60**, 271 (2004).
43. A. Kongdee, T. Bechtold, and L. Teufel, *J. Appl. Poly. Sci.*, **96**, 1421 (2005).
44. 野村正和, 山田英幸, *織學誌*, **48**, 305 (1992).
45. K. Kuzuhara, T. Asakura, R. Tomada, and T.

- Matsunaga, *J. Biotech.*, **5**, 199 (1987).
46. Y. Liu, H. Liu, J. Qian, J. Deng, and T. Yu, *Anal. Chim. Acta*, **316**, 65 (1995).
 47. Y. Zhang, W. Shen, R. Gu, J. Zhu, and R. Xue, *Anal. Chim. Acta*, **369**, 123 (1998).
 48. 出村 誠, 竹之下仁子, 朝倉哲郎, 酒井治利, 栗岡聰, 小松計一, 金子正夫, *日蚕雜*, **61**, 66 (1992).
 49. 岩元 淳, 野口隆志, 寺本 彰, 飯塚英策, *日蚕雜*, **64**, 427 (1995).
 50. K. H. Lee, G. D. Kang, B. S. Shin, Y. H. Park, and J. H. Nahm, *Int. J. Indust. Entomol.*, **8**, 195 (2004).
 51. K. H. Lee, G. D. Kang, B. S. Shin, and Y. H. Park, *Fibers and Polym.*, **6**, 1 (2005).
 52. Y. Q. Zhang, M. L. Tao, W. D. Shen, Y. Z. Zhou, Y. Ding, Y. Ma, and W. L. Zhou, *J. Biomaterials*, **25**, 3751 (2004).
 53. K. Y. Cho, J. Y. Moon, Y. W. Lee, K. G. Lee, J. H. Yeo, H. Y. Kweon, K. H. Kim, and C. S. Cho, *Int. J. Biol. Macromol.*, **32**, 36 (2003).
 54. K. Kato, S. Sato, A. Yamanaka, H. Yamada, N. Fuwa, and M. Nomura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 145 (1998).
 55. M. Zhaorigetu, N. Yanaka, M. Sasaki, H. Watanabe, and N. Kato, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **71**, 11 (2003).
 56. M. Sasaki, H. Yamada, and N. Kato, *Nutr. Res.*, **20**, 1505 (2000).
 57. S. Zhaorigetu, M. Sasaki, H. Watanabe, and N. Kato, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2181 (2001).
 58. K. Tsujimoto, H. Takagi, M. Takahashi, H. Yamada, and S. Nakamori, *J. Biochem.*, **129**, 979 (2001).
 59. M. Takahashi, K. Tsujimoto, H. Yamada, H. Takagi, and S. Nakamori, *Biotechnol. Lett.*, **25**, 1805 (2003).
 60. A. Ogawa, S. Terada, T. Kanayama, M. Miki, M. Morikawa, T. Kimura, A. Yamaguchi, M. Sasaki, and H. Yamada, *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 217 (2004).