

## 천잠 견단백질 가수분해 분말의 특성 분석

권해용\* · 이광길 · 여주홍 · 우순옥 · 한상미 · 손봉희 · 이희삼 · 신봉섭<sup>1</sup>  
농업과학기술원 농업생물부, <sup>1</sup>상주대학교 섬유공학과

### Characterization of Hydrolyzed *Antheraea yamamai* Silk Fibroin Powder

HaeYong Kweon\*, Kwang-Gill Lee, Joo-Hong Yeo, SoonOk Woo, SangMi Han,  
Bong Hee Sohn, Heui Sam Lee and Bong Seop Shin<sup>1</sup>

Department of Agricultural Biology, NIAST, RDA, Suwon 441-853, Korea

<sup>1</sup>Department of Textile Engineering, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea

#### ABSTRACT

*Antheraea yamamai* silk fibroin powder was prepared by treatment with HCl. The prepared *A. yamamai* fibroin hydrolysate was characterized by gel filtration chromatography, amino acid analysis, X-ray diffractometry, circular dichroism analysis, differential thermal analysis, and thermogravimetry. The average molecular weight of *A. yamamai* powder was about 430 and the major amino acids composed of the powder were Ala and Ser. According to XRD analysis, *A. yamamai* silk powder showed sharp diffraction peaks at  $2\theta = 20.34^\circ$  and  $31.5^\circ$ . CD spectrum showed a peak around 220 nm and a should 215 nm, assigned to  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet structure, respectively. DSC and TGA showed that the maximum degradation temperature of powder was around 250~270°C. Moreover, no harmful heavy metal was contained in the *A. yamamai* silk fibroin hydrolysate.

**Key words :** *Antheraea yamamai*, Silk fibroin hydrolysate, X-ray diffraction, Thermal Degradation, Heavy metal content

#### 서 론

최근에 들어 실크 단백질을 이용한 비의류용 소재 개발에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(박 1998). 누에가 만드는 순수한 단백질인 실크 단백질은 글라이신, 알라닌, 세린 등의 함량이 매우 높은 특이한 단백질로서 현재까지 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 예로서 인지기능 향상효과(Lee *et al.*, 2004, Yeo *et al.*, 2004), 혈당 억제 효과(Lee *et al.*, 2001), 알콜분해 증진 및 콜레스테롤 상승억제 효과(특허 1999, Lee *et al.*, 2003), tyrosinase 활성 억제 효과(Kato *et al.*, 1998), 뇌 또는 간에서의 활성산소 억제효과(Choi *et al.*, 2000, Choi *et al.*, 1999), 항비만효과(Hong *et al.*, 2002) 등이 보고되어 있다.

실크 단백질의 비의류용 소재개발은 주로 가잠 견단 단백질을 중심으로 이루어져 왔으며 야잠 견단 단백질의 생리활성에 대한 연구보고는 거의 없는 실정이다. 천잠, 작잠 등 *Saturniidae*에 속하는 야잠이 생산하는 견사 단백질은 아

미노산 조성, 밀도, 약품저항성, 인장강도 등 여러 가지 측면에서 가잠 견사단백질과는 큰 차이를 나타내고 있기 때문이다(Kweon & Park 1994). 대표적인 야잠 견단 단백질인 작잠견사의 경우에 산에 대한 가수분해 저항성이 가잠 견사보다 월등히 높은 것으로 보고되고 있다(Kweon *et al.*, 1998). 최근에 들어 야잠 견피브로인인 작잠 견단 단백질을 이용한 소재개발을 위하여 작잠의 산가수분해 활성화 에너지(Kweon *et al.*, 1998), 작잠 견피브로인 분말 제조(Kweon *et al.*, 1999), 염산처리 작잠견사의 유리아미노산 조성(Lu *et al.*, 1996) 등 기초연구가 진행되고 있다. 그러나 비슷한 아미노산 조성을 가지면서 작잠과 같은 속(屬)으로 분류되는 천잠(*Antheraea yamamai* Guerin-Meneville)이 생산하는 천잠 견단 단백질에 대한 연구는 찾아보기 힘든 상태이다. 천잠은 산누에나방과에 속하는 들누에로 한국, 일본 등에 분포하며 상수리나무, 떡갈나무, 밤나무잎 등을 먹으며 연 1회 발생한다. 보통 알 상태로 월동하고 고치색은 녹색으로 실의 품질이 뛰어난 것으로 알려져 있

\*Corresponding author. E-mail: hykweon@rda.go.kr

다(한국잠사학회 1992).

따라서 천잠 견단백질을 이용한 비의류용 소재 개발을 위한 기초연구의 일환으로 천잠고치를 이용하여 제조한 천잠 견단백질 가수분해 분말을 제조하고, 제조된 천잠 견단백질 분말의 분자량, 아미노산 조성, X-선 회절 분석, 원이색성 분석 및 열 특성 분석을 행하였으며, 천잠 분말의 식의약품 분야의 활용성을 살펴보기 위하여 중금속 함량을 분석한 후 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

단백질 분해효소(Alcalase 2.5L Novo Industri Co.)를 사용하여 효소정련법에 의하여 정련하여 천잠고치를 실험재료로 사용하였다.

정련한 천잠고치는 6N 염산을 6시간 처리하여 가수분해한 후 여과된 시료의 무게를 측정하여 가수분해율을 계산하였다. 천잠 가수분해 분말은 탁상용 전기투석장치(Electro-dialysis system, Micro Acilyzer S3, Asahi Chemical Co.)를 이용하여 탈염한 후 동결건조하여 제조하였다. 가수분해 처리 욕비는 1:200으로 행하였다. 염산 처리에 따른 가수분해율을 계산하기 위하여 무처리 천잠 고치의 건조무게와 처리후 천잠 피브로인의 건조 무게를 측정하였다. 처리후 천잠견피브로인의 무게는 염산처리후 3G3 유리여과기에 여과된 불용물의 건조무게로 하였다. 가수분해율은 다음 식 (1)에 의하여 계산하였다.

$$\text{가수분해율(wt \%)} = \frac{\text{처리전후 작잠사의 건조 무게 변화}}{\text{처리전 작잠사의 건조 무게}} \times 100 \quad (1)$$

### 2. 특성 분석

제조된 천잠 견단백질 분말은 아미노산 조성을 살펴보기 위하여 시료를 6N 염산에 녹인후 membrane filter (0.25 μm)로 여과하여 아미노산 분석용 시료로 사용하였다. 아미노산 조성 분석은 Amersham Pharmacia Biotech Co.의 Biochrom 20 plus Amino Acid Analyzer(Sweden)을 사용하여 분석하였다. 천잠분말의 결정구조를 파악하기 위하여 소각과 광각 X-선 산란 분석기(Small-Angle X-ray scattering with general area detector diffraction system, Bruker, Germany)를 이용하여 X-선 회절 특성을 살펴보았으며, 천잠 가수분해 분말의 수용액 상태에서의 구조 특성을 살펴보기 위하여 원이색성분산계(circular dichroism detector, Jasco J-715, Japan)를 이용하여 0.1% 농도로 제조한 천잠수용액의 원이색성을 측정하였다. 시차열특성은 미국 TA Instrument 사의 DSC TA 2910을 이용하여 질소

기류하에서 10°C/min의 승온속도로 50~450°C의 온도범위 내에서 분석하였으며, 열분해 거동은 열중량분석기(Thermogravimetric Analyzer, Q-500, TA Instruments, USA)를 이용하여 20°C/min의 승온속도로 분석하였다. 천잠 견 피브로인 가수분해 분말의 중금속 함량은 유도결합 플라즈마 발광광도기(Inductively Coupled Plasma(ICP) Emission Spectrometer, ICPS-10001V, Shimadzu, Japan)로 측정하였다. 중금속 분석용 표준용액은 각 중금속의 원자흡광분석용 표준원액(Wako Pure Chemical Industry Ltd., Japan)을 사용하였으며 질산 용액으로 희석하여 ICP 분광광도기로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 천잠 견단백질 분말 제조

일반적으로 단백질은 염산 등과 같은 강산에 노출되면 단백질 주쇄가 절단되면서 가수분해된다. 단백질의 가수분해 정도는 처리하는 산의 농도, 온도, 시간 등에 의하여 영향을 받는 것으로 알려져 있으나(Kweon *et al.*, 1998) 천잠에 대한 연구 보고는 없는 실정이다. 따라서, 6N 염산 처리시간에 따른 천잠고치의 가수분해율을 그림 1에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 천잠고치는 12시간 처리이후에는 90% 이상의 산가수분해 거동을 보였으며, 산 처리 6시간 후 천잠 가수분해 분말의 수율은 28.1%이었다.

천잠고치 산가수분해물을 중화한 후 전기탈염하여 얻은 천잠 가수분해 분말은 그림 2와 같은 형태로 나타났으며 부드러운 감촉을 보였다. 또한 제조한 천잠 가수분해 분말의 분자량을 측정하기 위하여 GPC를 운영하여 얻은 겔 여과 크로마토그램을 그림 3에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 평균분자량이 430 Da이었다. 천잠 가수분해

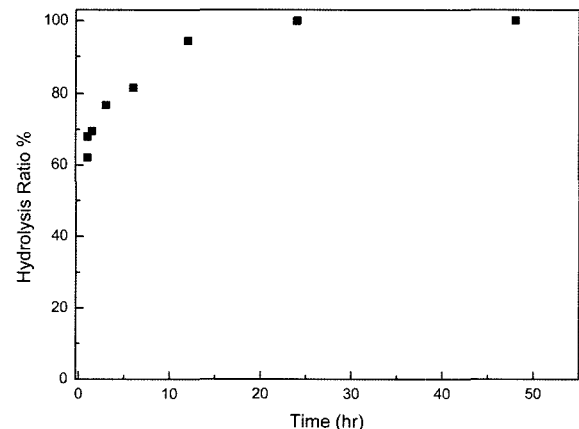


Fig. 1. Hydrolysis curve of *Antheraea yamamai* cocoon treated with 6N HCl at 120°C.

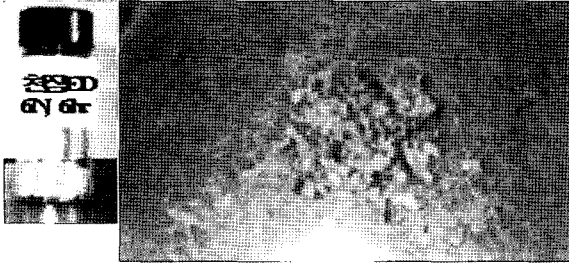


Fig. 2. Photograph of *Antheraea yamamai* silk fibroin powder.

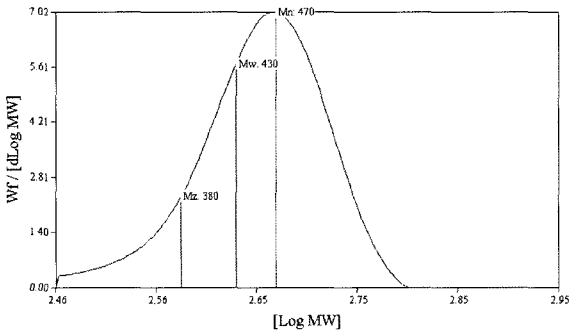


Fig. 3. GPC chromatogram of *Antheraea yamamai* silk fibroin powder.

분말의 아미노산 조성을 분석한 결과(표 1) 알라닌, 글라이신, 등의 함량이 많은 것으로 나타나 일반적인 천잠 견단백질의 아미노산 조성을 나타내었다(Kweon & Park 1994)

2. 천잠 분말의 구조 특성

천잠 견피브로인의 결정성 부분은 주로 알라닌 잔기의

연쇄로 구성되어 있으며 poly(L-alanine)의  $\beta$ -sheet 구조와 거의 일치하는 것으로 보고되어 있다(Arnotte *et al.*, 1967). 일반적으로 천잠 전사는  $2\theta = 16.7^\circ$  부근과  $2\theta = 20.5^\circ$  부근에서 double peak으로 나타난다.  $2\theta = 20.5^\circ$  부근의 회절 피크는 실크의 특징적인 구조인  $\beta$ -sheet를 나타내며 hkl(201) 면의 간격 약 4.3Å에 해당한다. 이 거리간격(d spacing) 값은  $\beta$ -sheet의 분자쇄간에 작용하는 수소결합에 기인된 결정격자의 규칙적인 거리를 나타낸다고 할 수 있다.  $2\theta = 16.7^\circ$  부근의 피크는 hkl 면(002)와 관련된 5.3Å 거리간격의 피크가 관찰된 것이다(Kweon & Park 1994). 천잠 분말은 그림 4에서 보는 바와 같이 강한 회절을 나타내는 회절환을 보여주고 있으며, 이는 일반적인 형태의 천잠 분말의 회절곡선과는 많은 차이를 보여주고 있다. 천잠 가수분해 분말은  $2\theta = 20.34^\circ$  부근에서 4.36Å에서  $\beta$ -sheet를 나타내는(201) 면의 거리간격을 보였으며, 2.84Å의 면간격을 나타내는 회절 피크를  $2\theta = 31.5^\circ$  부근에서 나타내었다. poly(L-alanine)을 고온으로 열처리하면  $\beta$ -sheet 구조를 반영하는 면간격 4.33Å의 회절피크가 강해진다는 보고(Tsukada *et al.*, 1987)도 있으며, 천잠 견단백질과 결정성부분이 같은 것으로 알려진 재생작잠견필름을 열처리 하면 열처리 시간이 증가함에 따라 X선 회절 피크가 날카로워지는 X선 회절곡선이 보고된 바 있다(Kweon *et al.*, 2001). 특히 2.84Å의 면간격을 나타내는 강한 회절 피크는 견단백질의 X선 회절 곡선에서는 관찰하기 힘든 것으로 천잠 분말의 구조 특성에 대한 보다 엄밀한 연구가 필요한 것으로 생각된다.

그림 5는 천잠분말의 원이색성 분석 곡선이다. 정련한

Table 1. Amino acid composition of *Antheraea yamamai* silk fibroin powder

(unit: %)

| Amino acid | asp  | glu  | ser  | gly   | ala   | val  | ile  | leu  | tyr  | phe  | his  | lys  | arg  |
|------------|------|------|------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Content    | 0.33 | 5.90 | 0.55 | 54.84 | 27.65 | 1.26 | 0.43 | 0.31 | 0.77 | 0.60 | 0.23 | 0.42 | 0.76 |

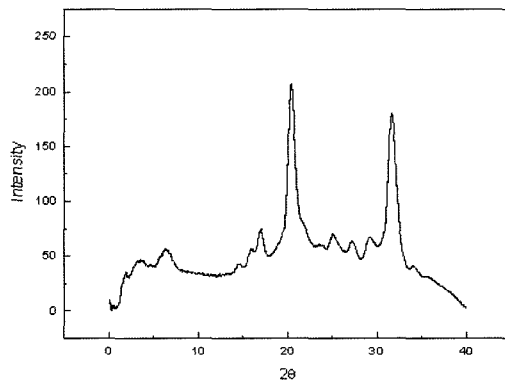
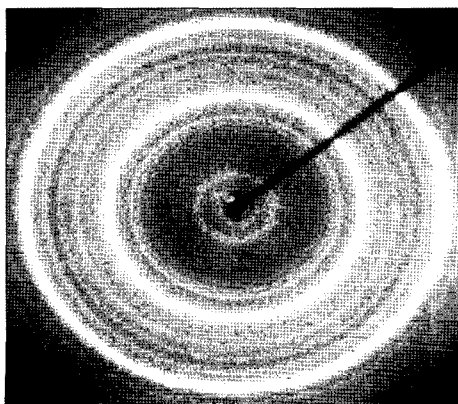


Fig. 4. X-ray diffraction pattern (left) and curve (right) of *Antheraea yamamai* silk fibroin powder.

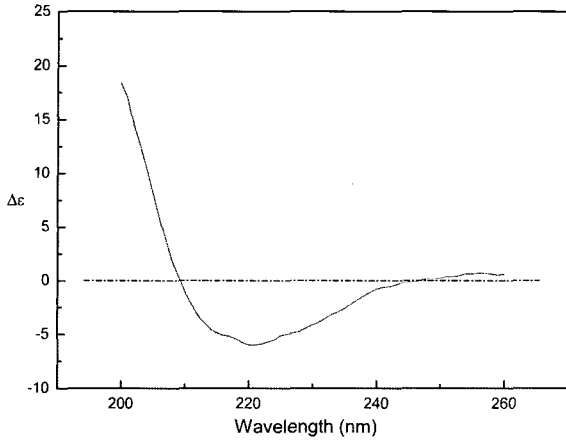


Fig. 5. Circular dichroism spectrum of *Antheraea yamamai* silk fibroin aqueous solution.

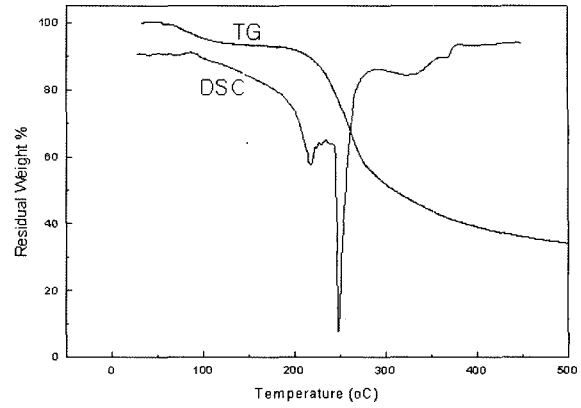


Fig. 6. Thermogravimetry (TG) and differential scanning calorimetry (DSC) curves of *Antheraea yamamai* silk fibroin powder.

Table 2. Heavy metal content of hydrolyzed *Antheraea yamamai* silk fibroin powder

(unit: ppm)

| Sample ID  | Cr    | Cd    | Pb    | Cu    | Zn    | As    | Hg    |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 6h powder  | 0.300 | 0.000 | 0.000 | 0.155 | 0.625 | 0.000 | 0.000 |
| 24h powder | 0.000 | 0.030 | 0.500 | 0.180 | 0.530 | 0.000 | 0.000 |

천잠고치를 LiSCN · H<sub>2</sub>O에 녹여 투석한 후 원이색성을 측정된 Tsukada(1979)의 보고에 의하면, 천잠 견단백질 수용액은 전형적인 α-helix 구조를 반영하는 206 및 220 nm 부근에서 음의 이색성 피크를 보였다고 한다. 천잠 가수분해 분말은 215 nm에서 shoulder를 보였으며 220 nm에서 음(-)의 피크를 보여 Tsukada(1979)의 결과와는 약간은 차이를 보였다. 원이색성 곡선에서 215 nm의 피크는 β-sheet 구조를, 220 nm의 피크는 α-helix 구조를 반영하는 것으로 알려져 있어 천잠 분말의 X-선 회절 곡선의 결과를 잘 반영하고 있다. 그러나, 천잠 가수분해 분말은 천잠 견단백질을 중성염으로 용해하여 제조한 재생 천잠 견단백질과는 구조적으로 차이가 있다는 것을 알 수 있었다.

### 3. 천잠 분말의 열 특성

천잠분말의 열특성을 관찰하여 그림 6에 나타내었다. 천잠, 작잠, 가잠 정련 견사는 각각 383°C, 378°C, 348°C의 온도에서 열분해에 기인하는 시차열분석 곡선상의 흡열피크를 나타내며(Kweon & Park 1994) 천잠 견단백질의 결정성 부분의 주성분인 alanine 연쇄로 이루어진 poly(L-alanine)의 최대 열분해 온도는 380°C 부근으로 보고되어 있다(Tsukada *et al.*, 1987). 재생 견단백질의 경우에는 280°C 부근에서 열분해가 나타나는 것으로 알려져 있으나 천잠 가수분해 견단백질 분말의 경우에는 250°C 부근에서 강한 흡열피크를 나타내었다. 그림 6에서 보듯이 천잠분말

의 열중량곡선은 100°C 부근에서 수증기의 증발에 따른 중량감소를 보인 이후에 225°C 부근부터 열분해에 의한 중량감소가 시작된 후 270°C 부근에서 단위 온도당 최대 중량감소를 나타내고 있다. 이러한 천잠 견단백질 분말의 중량감소 경향은 시차 열분석 곡선상 250°C 부근에서 나타나는 흡열피크가 열분해에 기인하는 것임을 보여준다. 천잠 가수분해 분말의 열거동이 천잠 견사에 비하여 현저하게 약하게 나타난 것은 천잠 분말 제조과정상의 화학적 처리에 의한 분자량 감소, 배향구조의 흐트러짐 등에 기인한 것으로 사료된다.

### 4. 천잠 분말의 중금속 함량 분석

전기탈염으로 제조한 천잠 가수분해 분말을 건강 기능성 식품, 의약품, 또는 화장품 소재 등 인체에 적용하는 재료로 개발하기 위해서는 인체에 치명적인 중금속이 검출되지 않아야 한다. 따라서 제조한 천잠 견단백질 분말의 중금속 함량을 분석하여 표 2에 나타내었다. 표 2에서 보는 바와 같이 수은(Hg), 비소(As) 등 인체에 강한 독성을 나타내는 중금속은 관찰되지 않았다. 또한 Cd는 식품공전(KFDA, 2002) 상의 기준치인 0.50 ppm 미만으로 검출되었으며 납(Pb)의 경우에도 세계 각국의 수산식품 허용수준인 0.5~10 ppm 수준의 범위에 속하였다(Codex 1989). 이상의 결과로 볼 때 천잠 견단백질 가수분해 분말의 중금속 함량은 안전한 수준이며, 천잠 견단백질을 이용한

기능성 식품이나 화장품 등의 소재로 개발하는데 문제가 없음을 확인할 수 있었다.

## 적 요

천잠 견단백질을 이용한 비의류용 소재개발을 위한 기초 연구의 일환으로 천잠 가수분해 견단백질 분말을 제조하여 그 구조 및 열 특성을 살펴보고 중금속 함량을 분석하였다.

1. 천잠 고치를 가수분해하여 제조한 분말의 평균분자량은 430 정도였으며 아미노산 조성 분석 결과 일반적인 천잠 견피브로인의 조성과 유사하였다.

2. 천잠 분말의 X-선 회절 분석 결과  $2\theta = 20.34^\circ$  부근과  $31.5^\circ$  부근에서 강한 회절 피크를 보였으며 원이색분석 결과 220 nm의 피크와 215 nm의 shoulder를 나타내어  $\alpha$ -helix와  $\beta$ -sheet 구조임을 알 수 있었다.

3. 시차열분석 및 열중량분석 결과 천잠 가수분해 분말은  $250^\circ\text{C}$  부근에서 열분해 흡열피크를 보였으며  $270^\circ\text{C}$  부근에서 열분해에 의한 최대 중량감소가 나타났다.

4. 천잠 분말에서는 수은, 비소 등 인체 독성이 강한 중금속을 관찰할 수 없었으므로 기능성 소재 개발을 위한 재료로 천잠 가수분해 분말을 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 인용문헌

박영환 (1998) 견피브로인을 이용한 최근 소재개발 동향. 한잠학지 40(2): 203~212.

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

한국잠사학회 (1992) 잠상견학술용어사전, pp. 124, 수원.

Arnott, S., S. D. Dover, and A. Elliott (1967) *J. Mol. Biol.* 30: 201~208.

Choi, J., D. Kim, S. Park, D. Kim, J. Lee, and Y. Lee (1999) Effects of silk fibroin powder on oxygen radicals and their scavenger enzymes in serum of rats. *Korean J. Seric. Sci.* 41(3): 216~221.

Choi, J., D. Kim, S. Park, J. Kim, J. Lee, K. Lee, J. Yeo, and Y. Lee (2000) Effects of silk fibroin on oxidative stress and membrane fluidity in brain of SD rats. *Korean J. Life Science* 10(5): 511~518.

Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Joint FAO/WHO Food Standards Programme (1989)

Hong, S., K. Park, B. Suh, M. Do, and C. Hyun (2002) Effect of silk fibroin hydrolysate on adipocyte metabolism in db/db mice. *Kor. J. Pharmacogn.* 33(4): 312~318.

Kato, K., 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: 145~147.

KFDA (2002) Food Code, Munyoungsa, Seoul, Korea. pp. 480~482.

Kweon, H., K. Lee, and Y. Lee (1999) Characterization of Tussah (*Antheraea pernyi*) silk fibroin powder prepared by HCl and NaOH. *Korean J. Seric. Sci.* 41(1): 54~60.

Kweon, H., K. Lee, Y. Lee, J. Yeo, and I. Um (1998) Hydrolysis behavior of *Antheraea pernyi* silk fiber treated with HCl. *Korean J. Seric. Sci.*, 40: 163~168.

Kweon, H. and Y. H. Park (1994) Structural characteristics and physical properties of wild silk fibers: *Antheraea pernyi* and *Antheraea yamamai*. *Korean J. Seric. Sci.* 36(2): 138~146.

Kweon, H., S. O. Woo, and Y. H. Park (2001) Effect of heat treatment on the structural and conformational changes of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin film. *J. Appl. Polym. Sci.* 81: 2271~2276.

Lee, K., J. Yeo, Y. Lee, H. Kweon, and J. Kim (2001) Bioactive and skin-compatible properties of silk sericin. *Korean J. Seric. Sci.* 43(2): 109~115.

Lee, M., D. Kim, B. Cho, S. Koo, S. Jew, D. Jin, and S. Lee (2003) Study on consequent body fat and serum lipid metabolism after cocoon hydrolysate, green tea leaves and dietary fiber supplementation. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 46(2): 123~129.

Lee, S., Y. Kim, Y. Kang, O. Kwon, Y. Shin, J. Song, M. Lee, K. Lee, J. Yeo, W. Lee, T. Lee, and S. Kim (2004) The improvement of learning and memory ability of normal persons by BF-7. *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, 8: 307~312.

Lu, A., M. Arai, and K. Hirabayashi (1996) Production of tussah silk powder by hydrochloric acid hydrolysis. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 65: 392~394.

Tsukada, M. (1979) Conformational distribution of the fibroin of *Antheraea yamamai*. *J. Seric. Sci., Jpn* 48: 347~348.

Tsukada, M., M. Nagura, and H. Ishikawa (1987) Structural changes in poly(L-alanine) induced by heat treatment. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* 25: 1325~1329.

Yeo, J., K. Lee, H.Y. Kweon, S. Woo, S. Han, Y. Lee, J. Kim, S. Kim, M. Demura (2004) Cognitive ability enhancement effects in rats by *B. mori* fibroin enzymatic hydrolysate. *Korean J. Seric. Sci.* 46: 23~27.