

## 효소 분해에 의한 가용성 실크 펩타이드의 제조

하재석 · 송재준 · 조형권<sup>1</sup> · 이승구\*

한국생명공학연구원 시스템미생물연구센터, <sup>1</sup>(유)한풍제약

**Preparation of Soluble Silk Peptides by Food-grade Proteinases.** Ha, Jae-Seok, Jae Jun Song, Hyoung-Kwon Cho<sup>1</sup>, and Seung-Goo Lee\*. *Systems Microbiology Research Center, KRIBB, Daejeon 305-333, Korea, <sup>1</sup>Hanpoong Pharm. Co., Jeonju 561-021, Korea* – Enzymatic hydrolysis of silk fibers were investigated for the preparation of soluble silk peptides by ten food-grade proteases from *Bacillus*, *Aspergillus*, and plant sources. Silk fibers were dissolved for 1 hr in a 2:1 cosolvent (50% CaCl<sub>2</sub> : ethanol) by heating at 90°C. The silk solution was filtered to remove impurity particles and desalted for 50 hours by a dialysis process to remove the used cosolvent. When the silk hydrolysis was performed at 45°C for 2 hours, most proteases from *Bacillus* and *Aspergillus* generated large amounts of insoluble aggregates. On the contrary, proteases from plant sources produced much less aggregates during prolonged incubations and also exhibited high hydrolysis activities. In regards of the solubility and broad molecular sizes of produced silk peptides, Bromelain was finally selected and applied for the enzymatic hydrolysis of silk fibers.

**Key words:** Silk fibroin, soluble silk peptide, food-grade protease

### 서 론

실크는 약 25%의 세리신과 75%의 피브로인의 섬유로 구성되어 있으며, 정련단계를 거쳐 세리신 부분을 제거한 피브로인 섬유는 수 천년 동안 의류용 실크로 널리 이용되어 왔다[1]. 실크는 순도가 높으면서도 대량 생산이 손쉬운 천연단백질이며, 최근에는 실크를 가수분해한 기능성 아미노산과 펩타이드를 이용하여 건강 기능성소재[2-4] 또는 식품원료로[5, 6]를 개발하는 연구에 많은 관심이 집중되고 있다.

이와 같은 실크 아미노산 및 가용성 펩타이드의 제조방법으로는 처리비용이 저렴하고 생산공정이 비교적 단순한 산 가수분해가 주로 이용되어 왔다. 그러나, 이 방법은 강산을 이용하는 화학반응으로서 펩티드 분자량을 안정적으로 조절하기 어려우며, 아미노산 및 저분자량 펩타이드가 다량 발생하고 탈염과정에서 회수율이 낮아서, 기능성 펩타이드의 제조에는 적합하지 않은 측면이 있다[7, 8]. 따라서 산 가수분해 방법에 비하여 공정안전성 및 투석과정에서의 회수율이 높을 뿐만 아니라, 다양한 분자량의 실크 펩타이드를 안정적으로 제조할 수 있는 효소분해 공법의 개발에 대한 관심이 높다[9, 10].

본 연구에서는 식물, 세균, 곰팡이로부터 유래하는 식품용 프로티아제를 이용하여 가용성 실크펩타이드를 제조하는 효

소공학기술 및 전처리기술의 최적화를 수행하였고, 효소에 따른 실크펩타이드의 분자량 분포 등을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

본 실험에서 사용한 프로티아제들은 10종으로, Collupulin과 Bromelain, Flavourzyme의 3종은 Gist-brocades(Netherlands)의 제품을, Promod 279P는 Biocatalysts(England), Sumzyme은 신일본화학공업(Japan), Panazyme은 Rhodia(NJ, U.S.A.), 그리고 Maxazyme LP와 Neutrase, Protamex, Alcalase등의 4종은 Novo Nordisk(Denmark)의 제품을 사용하였다.

#### 가용성 실크 용액의 제조

실크 용해액은 1차 증류수 100 ml에 CaCl<sub>2</sub> 100 g, 에탄올 50 ml, 섬유상 실크 15-30 g를 첨가하고, 90에서 1시간 이상 가열하여 용해한 후, 투석(dialysis) 시점까지 60°C에 보관하였다[11]. 투석은 실크 용해에 이용된 염, 에탄올을 제거하기 위하여 가용화된 실크를 투석막(MWCO: 6000-8000, Spectrum, U.S.A.)에 주입하고, 1차 증류수(pH 6.5~6.8)를 사용하여 실시하였다. 투석액은 약 30배 부피의 증류수를 1일 3회씩 총 8회 교체하는 방식으로 실시하였고, 용액의 전기전도도(conductivity)를 측정하여 투석완료 여부를 판단하였다. 투석이 완료된 실크는 부직포로 여과하여 불용성 고형물을 제거한 후 가수분해반응의 기질로 이용하였다. 가용화된 실크를 저온에 장시간 방치하는 경우에는 가수분해가 불가능한 젤리가 형성되므로, 되도록 빠른 시간에 투석을 완료하

\*Corresponding author

Tel: 82-42-860-4373, Fax: 82-42-860-4489

E-mail: sglee@kribb.re.kr

고자 하였고, 제조된 용액은 일주일 이내에 가수분해 반응에 사용하였다. 한편, 투석용액의 전기전도도를 측정하여 투석속도를 조사한 결과 상온 및 60°C에서는 비슷하였으나, 4°C에서는 2배 이상의 시간이 소요되는 것으로 확인되었다. 본 연구에서는 상온에서 투석을 실시하였고, 전기전도도가 수돗물 수준에 도달하는 50시간 후에 투석을 종료하였다. 이와 같이 제조한 가용성 실크의 최종적인 피브로인 함량은 95°C에서 24시간 건조시킨 후 건조중량을 측정하여 계산한 결과, 4.5~5.6%(w/v)로 확인되었다.

#### 가수분해 활성의 측정

효소활성은 Hagihara[12]의 방법을 변형하여 측정하였다. 우선 분말 및 용액상태의 효소들을 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)에 10 mg/ml 농도로 용해시킨 후, 동 완충액을 사용하여 적절한 농도로 희석하여 사용하였다. 먼저 카제인 분해활성의 측정을 위하여 0.6%(w/v) hammarstein 카제인(Merck, Germany) 5 ml에 희석된 효소용액 1 ml를 가한 후 37°C에서 10분간 반응시키고, 5 ml의 10% TCA (trichloroacetic acid)를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 반응액은 실온에서 10분간 방치시킨 다음 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 분해되지 않은 카제인을 제거한 후, 상등액을 BCA(Pierce, U.S.A.)법으로 분석하여, 가수분해된 카제인의 양을 측정하였다[13]. 한편 실크 가수분해활성의 측정에는 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)에 0.5%(w/v) 농도로 희석한 가용성 실크를 이용하였으며, 카제인의 경우와 동일한 방법으로 가수분해된 실크의 양을 측정하였다.

#### 실크 펩타이드의 분자량 측정

상용 실크분말(Mayuko, Japan), 투석직후의 실크용액, 및 bromelain, protamex, alcalase 등에 의한 가수분해 실크 펩타이드들의 분자량 분석을 실시하였다. 분자량 측정에는 Superose 12 HR(1.0 × 30 cm)을 장착한 FPLC(Amersham Pharmacia, Sweden)를 이용하였으며, 표준단백질로는 Gel

filtration calibration kit(Amersham Pharmacia, Sweden)를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

#### 효소적 방법에 의한 생 실크의 가수분해

실크용해를 위한 별도의 전처리 없이 실크를 직접 가수분해하는 방법의 타당성을 조사하였다. 먼저, 50 mM sodium phosphate 완충액 10 ml(pH 7.0)에 생 실크 2 g과 식물, 세균 및 곰팡이로부터 유래하는 10종의 프로티아제를 과량(0.5 g) 가하고, 효소이용 가수분해 반응을 45°C에서 48시간 동안 진행한 후, 잔여물의 건조중량을 조사하였다. 그 결과, 효소가수분해에 의한 중량감소는 단지 5-10%에 그쳐서, 본 연구에서 사용한 10종의 효소는 생 실크 가수분해에 적합하지 않은 것으로 확인되었다. 이것은 실크를 구성하는 피브로인 단백질이 특이적인 섬유상 조직을 갖기 때문인 것으로 판단되었으며, 이하 본 연구는 생 실크를 완전히 용해시켜서 2차 구조의 형성을 최소화 시킨 실크 용액을 먼저 제조한 다음에 효소를 처리하는 방법에 의하여 진행하였다.

#### 가용성 실크의 가수분해에 적합한 프로티아제의 선정

식물, 세균, 곰팡이로부터 유래하는 10종의 프로티아제를 종류에 따라 0.01~1 mg/ml의 농도로 조절하여 0.6%(w/v) 카제인 및 0.5%(w/v) 가용성 실크를 분해하였고, 분해된 기질의 양을 BCA 방법으로 측정하여 카제인 및 실크에 대한 기질특이성을 조사하였다. 그 결과, *Bacillus* 유래의 Protamex와 Alcalase, 그리고 파인애플 유래의 Bromelain은 실크를 가수분해하는 활성이 매우 높을 뿐만 아니라, 기질특이성에 있어서도 실크 가수분해에 가장 적합한 것으로 확인되었다(Table 1).

한편, 5%(w/v) 가용성 실크(6 ml)에 3.5 U에 해당하는 각각의 프로티아제를 가하고 45°C에서 2시간 동안 가수분해

Table 1. Comparison of casein and silk fibroin hydrolysis by different commercial proteases.

Enzyme	Sources	Casein Hydrolysis <sup>1</sup>	Fibroin Hydrolysis <sup>2</sup>	Selectivity (F.H./C.H.) <sup>3</sup>
Collupulin	Carica papaya	0.12	0.15	1.3
Bromelain	Pineapple stem	0.37	3.41	9.2
Promod 279P	Aspergillus	0.10	0.63	6.3
Sumyzyme	Aspergillus oryzae	0.07	0.22	3.1
Panazyme	Aspergillus oryzae	0.01	0.17	17
Flavourzyme	Aspergillus oryzae	0.08	0.74	9.2
Maxazyme LP	Bacillus subtilis	0.02	0.05	2.5
Neutrased	Bacillus amyloliquefaciens	2.0	4.0	2.0
Protamex	<i>Bacillus</i> protease complexes	0.64	6.25	9.8
Alcalase	Bacillus licheniformis	0.14	2.33	16.6

<sup>1</sup> Casein hydrolysis: hydrolyzed casein (mg)/enzyme (mg)/min

<sup>2</sup> Fibroin hydrolysis: hydrolyzed silk fibroin (mg)/enzyme (mg)/min

<sup>3</sup> Selectivity: fibroin hydrolysis (F.H.) / casein hydrolysis (C.H.).

반응이 충분히 진행되도록 한 후, 반응액을 3000 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 불용성 침전물(insoluble aggregates)의 량을 조사하였다(Fig. 1). 그 결과, *Aspergillus* 유래 프로티아제인 Promod 279P, Sumyzyme, Panazyme, Flavourzyme 그리고 *Bacillus* 유래 프로티아제인 Protamex의 경우에는 전체 반응액 부피와 비슷한 5-6 ml 부피의 불용성 침전물이 생성되었다. 그 밖의 *Bacillus* 유래 단백질 분해효소인 Maxazyme LP, Neutrase, Alcalase등은 전체 반응액의 30-50%에 해당하는 2-3 ml 부피의 불용성 침전물이 형성되었다. 이에 비하여 식물유래의 프로티아제인 Bromelain과 Collupulin은 0.5-1 ml의 불용성 침전물만을 형성하였다(Fig. 1).

이러한 결과로부터 프로티아제 활성 및 기질특이성이 우수하고, 불용성 침전물 형성이 적은 파인애플 유래의 Bromelain과 *B. licheniformis* 유래의 Alcalase를 실크 펩타이드 제조에 적합한 프로티아제로 1차선정하였으며, 불용성 침전물을 형성하는 단점이 있으나 실크 분해활성이 우수한 Protamex를 대조군으로 하여 이후의 연구를 수행하였다.

**투석조건의 영향분석 및 최적화**

에탄올과 CaCl<sub>2</sub>의 혼합액에 용해된 가용성 실크는 탈염을 위한 투석과정에서도 다양한 이차구조를 형성할 수 있으며, 프로티아제에 의한 가수분해 활성 및 불용성 침전물의 양도 투석조건에 따른 영향을 받을 것으로 예상하였다. 따라서 본 연구에서는 투석온도 및 pH조건을 변화시켜서, 투석조건의 차이가 가용성 펩타이드의 생산 수율에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 먼저 투석실험에 사용한 완충액은 50 mM acetic acid-trisodium citric acid 완충액(pH 4.0, 6.5)와 trisodium citric acid-sodium hydroxide 완충액(pH 9.0)였으며, 투석온도는 각각 4°C, 25°C, 60°C로 설정하였다. 효소이용 가수분해반응은 투석 후, 즉시 실시하였으며, 실크 농도

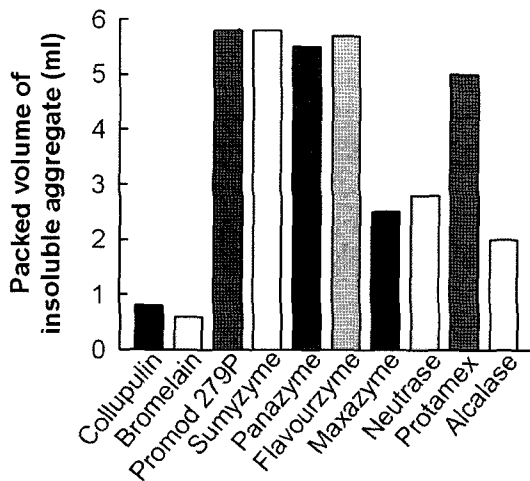


Fig. 1. Packed volumes of insoluble aggregates after the hydrolysis of silk fibroin by different food-grade proteases.

를 1%로 조절하여 반응효율을 조사하였다(Table 2).

그 결과, Bromelain의 경우에는 투석 조건의 변화와 관계없이 대부분 100%에 가까운 가수분해 수율이 관찰되었으나, 다량의 불용성 침전물을 형성하는 Protamex 및 Alcalase는 모든 조건에서 가수분해반응의 수율이 대체로 낮았고, 특히 pH 4인 조건에서 투석을 진행하는 경우, 소량의 불용성 침전물이 형성되면서 생산 수율은 더욱 저하되었다. 이상의 결과를 종합하여 상온 그리고 중성 pH조건에서 투석을 실시함으로써, 실크 가수분해에 미치는 영향을 최소화하고자 하였다.

**가용화 실크의 가수분해 및 기질농도의 영향**

전술한 바와 같이 효소적 방법에 의한 실크 펩타이드의 생산 수율은 반응도중에 형성되는 불용성 침전물의 농도에 따라서 크게 달라진다. 따라서, 기질농도를 1%와 5%로 달리하면서 농도에 따른 실크의 가수분해율을 조사하였다. 효소반응은 37°C에서 4시간 동안 진행하였으며, 이후 20시간 까지 냉장온도에 보관하면서 불용성 침전물의 형성 및 가수분해율을 조사하였다(Fig. 2).

먼저, Bromelain으로 가수분해반응을 수행한 경우에는 1%와 5% 모두 가수분해반응의 수율이 안정적으로 증가되었으며, 불용성 침전물의 형성은 미미하였다(Fig. 2A). 그러나 Protamex의 경우에는 2시간 동안 효소반응을 시켰을 때 최대의 가수분해 반응을 보였으며, 그 이후에는 효소반응이 진행되더라도 오히려 감소하는 현상을 보였고, 이러한 반응효율의 감소는 실크의 농도를 5% (w/v)로 증가시킨 경우에 더욱 심하게 나타났다(Fig. 2B). Alcalase는 대략 1시간 정도 효소반응을 시켰을 때 최대의 가수분해율을 보였으며, 마찬가지로 시간이 경과하면서 발생하는 불용성 침전물로 생산 수율의 감소가 관찰되었다(Fig. 2C). 이와 같은 불용성 침전물로 인한 생산 수율의 감소는 효소의 반응 메커니즘 및 기질특이성의 차이에 기인하는 것으로, 분해산물 중 소수성 펩

Table 2. Effect of desalting conditions on hydrolysis of silk fibroin.

Desalting conditions		Degree of hydrolysis (%)		
Temperature	pH	Bromelain	Protamex	Alcalase
4	4	93.4	81.2	73.4
	6.5	94.7	82.2	74.7
	9	100	86.4	77.6
25	4	99	82.3	68.9
	6.5	100	85	74
	9	100	86.8	77.4
60	4	100	82	66.7
	6.5	100	85.3	73.5
	9	100	90.2	79.4

Hydrolysis condition: 1% silk fibroin, pH 7.0, 37, 4 hr.

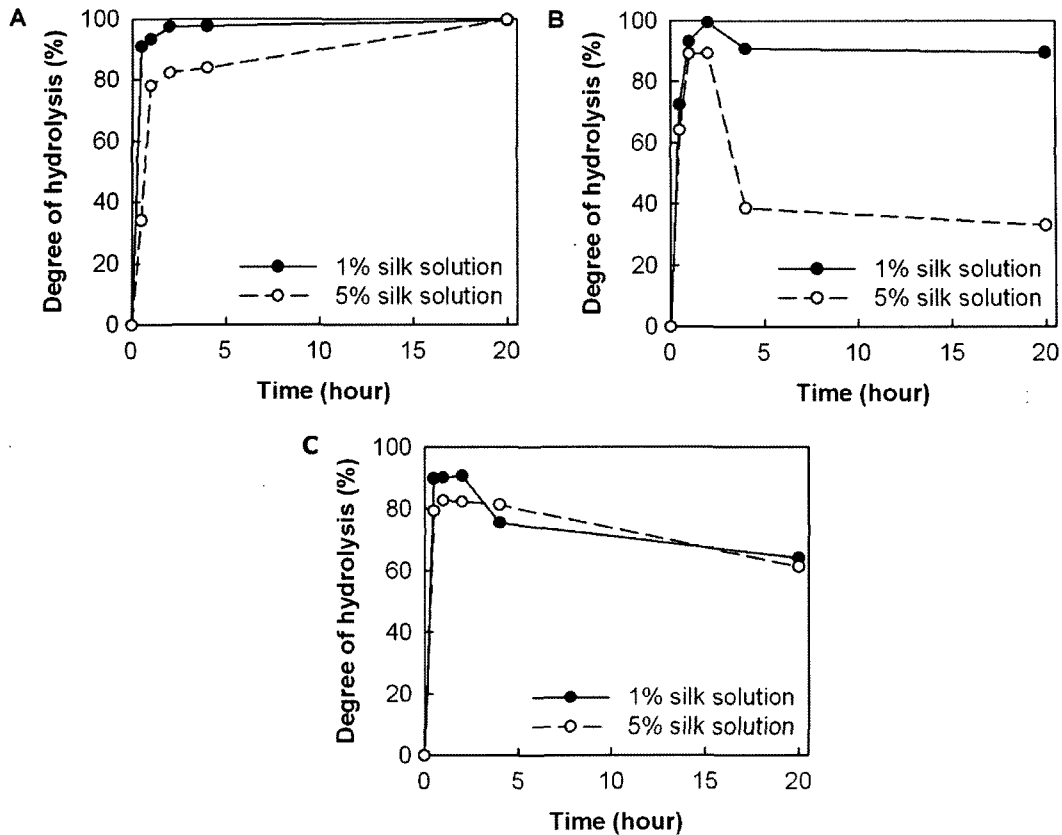


Fig. 2. Enzymatic hydrolysis of silk fibroin by Bromelain (A), Protamex (B), and Alcalase (C).

타이드의 조성이 달라짐에 따라서 소수성 2차 구조의 형성이 촉진되기 때문인 것으로 판단되고 있다.

#### 가수분해 실크 펩타이드의 분자량 특성

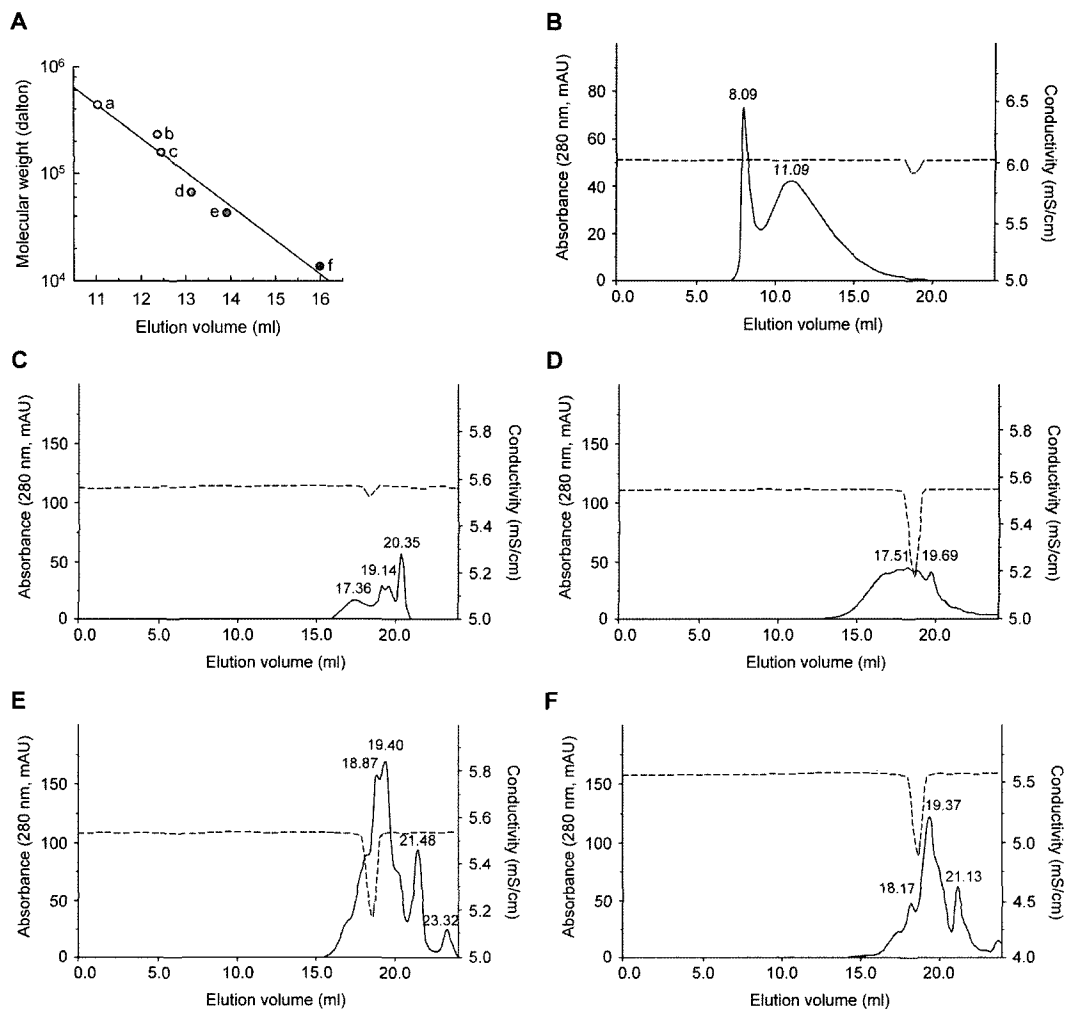
실크 피브로인의 평균 분자량은 대략 350 kDa로 알려져 있는데 [14], 본 실험에서 Gel filtration chromatography로 추정된 결과와도 일치하였다. 가용화된 실크의 분자량을 분석한 Fig. 3B에서 뒤쪽의 피크가 실크 피브로인에 해당하며, 분자량이 440 kDa인 ferritin과 230 kDa인 catalase (Fig. 3A)의 중간에서 검출되었고, 앞의 피크는 피브로인 사이의  $\beta$ -sheet 결합이 잔존하고 있는 거대분자의 검출에 따른 것으로 판단된다. 한편 상용 실크분말(Mayuko, Japan)의 분자량을 분석결과 약 11.5 kDa 이하로 측정되었으며 (Fig. 3C), 가용화된 실크를 Protamex 또는 Alcalase로 가수분해한 경우에서도 이와 비슷한 분자량분포가 확인되었다 (Fig. 3E, 3F). 이에 비하여 Bromelain으로 가수분해한 실크는 가용성이 높으면서도 분자량이 상대적으로 높은 0.1-50 kDa까지 고르게 분포되어 있는 것으로 관찰되었다 (Fig. 3D). 이상의 연구 결과를 종합하면, 가용화한 실크를 상온의 중성 조건에서 투석한 후 파인애플 유래의 프로티아제인 Bromelain을 처리함으로써 가용성이 높고 새로운 분자량 분포특성을 갖는 실크 펩타이드를 효율적으로 제조할 수 있었다.

#### 요 약

천연 단백질인 실크를 가수분해하여, 건강기능성 식품 등에 다양하게 활용될 수 있는 가용성 실크 펩타이드를 생산하는 효소공학적인 연구를 수행하였다. 효소는 *Bacillus*, *Aspergillus*, 파파야, 파인애플 등으로부터 유래하는 10종의 프로티아제를 사용하였으며, 가수분해 효율을 높이기 위하여 생 실크를  $\text{CaCl}_2$ -에탄올 공용액에 녹인 가용화된 실크를 제조하였고, 이를 상온 중성의 조건에서 50시간 동안 투석하여 효소반응을 위한 기질로 사용하였다. 효소반응은 37, pH 7.0에서 수행하였으며, 파인애플 유래 프로티아제인 Bromelain과 *Bacillus* 유래 효소인 Alcalase가 실크의 가수분해에 적합한 것으로 확인되었다. 특히 파인애플 유래의 Bromelain은 가수분해 도중 불용성 침전물의 형성으로 인한 생산 수율의 감소가 가장 적어 가용성 실크 펩타이드의 제조에 적합하였고, 분자량 분포에 있어서도 보다 다양한 것으로 확인되었다.

#### 감사의 글

This research was supported by Hanpoong Pharm. Co. and partly by the 'Biocatalysis Technology Innovation'



**Fig. 3. Gel filtration chromatogram for silk fibroin and several enzymatic silk hydrolysates.** (A) Standard curve for gel filtration chromatography: a, ferritin 440 kDa; b, catalase 232 kDa; c, aldolase 158 kDa; d, bovine serum albumin 67 kDa; e, ovalbumin 43 kDa; f, ribonuclease A 13.7 kDa; (B) CaCl<sub>2</sub>-ethanol treated and desalted silk fibroin; (C) commercial silk peptides (Mayuko, Japan); (D) Hydrolyzed silk peptides by Bromelain; (E) Hydrolyzed silk peptides by Protamex; (F) Hydrolyzed silk peptides by Alcalase.

project of Korea Research Council of Fundamental Science and Technology, Republic of Korea.

## REFERENCES

- Kim, J. H. and D. G. Bae. 2003. Hydrolysis characteristics and applications of silk sericin: Control of molecular weight of sericin. *Kor. J. Seric. Sci.* **45**: 46-57.
- Gill, I., R. Lopez-Fandino, X. Jorba, and E. N. Vulfson. 1996. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enz. Microb. Technol.* **18**: 162-183.
- Park, K. J., S. E. Hong, M. S. Do, and C. K. Hyun. 2002. Stimulation of insulin secretion by silk fibroin hydrolysate in streptozotocin-induced diabetic rats and db/db mice. *Kor. J. Pharmacogen.* **33**: 21-28.
- Ahren, B., S. Mansson, R. L. Gingerich, and P. J. Havel. 1997. Regulation of plasmaleptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting. *Am. J. Physiol.* **273**: 113-120.
- Lee, S. H., H. N. Cho, C. K. Hyun, and S. S. Jew. 2002. Physiological and functional properties of silk peptide. *Food. Sci. Ind.* **35**: 57-62.
- Lee, M. K., D. M. Kim, B. N. Cho, S. J. Koo, S. S. Jew, D. K. Jin, and S. M. Lee. 2003. Study on consequent body fat and serum lipid metabolism after cocoon hydrolysate, green tea leaves and diet fiber supplementation. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**: 123-129.
- Ailin, L., M. Arai, and K. Hirabayashi. 1996. Production of tussah silk powder by hydrochloric acid hydrolysis. *Jpn. J. Seric. Sci.*, **65**: 393-394.
- Takano, R., K. Hirabayashi, and K. Chen. 1991. Preparation of soluble silk fibroin powder by hydrochloric acid hydrolysis. *Sov. Phys. Crystallogr.* **60**: 358-362.
- Chen K., Y. Umeda, K. Hirabayash. 1996. Enzymatic hydrolysis of silk fibroin. *Jpn. J. Sericult. Sci.* **65**: 131-133.

10. Jung, H. Y., and D. K. Bae. 2000. Enzymatic hydrolysis of insoluble silk sericin by alcalase. *Kor. J. Seric. Sci.* **42**: 48-57.
11. Kiyoshi O., and H. Yukio. 1980. Process for producing a fine powder of silk fibroin, *U.S. patent* 4,233,212.
12. Hagihara B., H. Matsubara, M. Nakai, and K. Okunuki. 1958. Crystalline bacterial proteinase: I. Preparation of crystalline proteinase from *Bacillus subtilis*. *J. Biochem. (Tokyo)*. **45**: 185-94.
13. Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallin, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* **150**: 76 - 85.
14. Hyde A. J. and C. Wippler. 1962. Molecular weight of silk fibroin. *J. Polym. Sci.* **58**: 1083-1088

(Received Jan. 28, 2006/Accepted Apr. 7, 2006)