

누에 실샘 가수분해물의 제조 및 특성 규명

황정욱¹ · 이희삼² · 김호진¹ · 김규오¹ · 최용수^{1*}

¹차의과학대학교 바이오산업융합학과, ²농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과

Manufacture and Characterization of Silkworm Gland Hydrolysate

Jung Wook Hwang¹, Heui Sam Lee², Hojin Kim¹, Kyu-Oh Kim¹, Yong-Soo Choi^{1*}

¹Department of Applied Bioscience, CHA University, Seongnam 463-836, Republic of Korea

²Sericultural & Apicultural Materials Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Republic of Korea

(Received August 22, 2012, Accepted October 9, 2012)

Abstract

Silk protein has been explored to be used for biomedical applications for several decades. However, it has not been used in this field cause to their irreversible crystallization after dissolving in water. The existing methods of silk protein hydrolysis using silkworm cocoon were used with harmful solvents and through a very complicated process. Therefore, we have developed novel methods for the production of water-soluble hydrolysate using silkworm gland. We manufactured two types of silkworm gland-derived hydrolysate (water-soluble SGH, SSGH; total SGH, TSGH) and compared the characteristics with commercial cocoon-derived sericin hydrolysate (CSH). The molecular weight of SGH ranged from 7 to 50 kDa (SSGH) and 5 to 15 kDa (TSGH) within glycine, alanine, and aspartic acid as a main amino acid composition. In contrast, CSH ranged from 15 to 50 kDa within serine and aspartic acid. The results of FTIR implied that SGH was more soluble form than CSH, as shown by the decrease in the β -sheet structure at 1630 cm^{-1} on amide I peak. In comparison with 10% fetal bovine serum, 0.1% (1 mg/ml) SSGH had equivalent effect on the proliferation of human dermal fibroblasts and mesenchymal stem cells. All results of the SSGH made by novel manufacturing process indicate the SSGH is more preferable as a culture medium supplement than cocoon-derived sericin.

Key words : Cell culture, Medium supplement, Sericin, Silkworm gland hydrolysate

서 론

누에는 나비목 누에나방과에 속하는 누에나방의 유충으로서 뽕나무 잎을 먹고 그 뽕잎의 단백질과 탄수화물을 이용하여 실크 단백질을 합성하여 무정형의 젤(amorphous gel) 상태로 실샘에 분비한다(Gamo et al. 1977). 약 1,000여개의 세포로 구성된 한 쌍의 실샘은 생리학적 역할에 따라 앞실샘, 중간실샘 및 뒷실샘으로 구분되는데, 누에 체적의 약 30%를 차지하고 있다. 실샘에 저장된 실크 단백질은 피브로인과 세리신으로 구분하며, 피브로인은 후부실샘에서 분비되고 세리신은 중부실샘에서 분비된다(Sasaki et al. 1980, Grzelak 1995, Takasu et al. 2002, Tokutake 1980).

오래 전부터 연구자들은 누에 유래 실크 단백질을 의료 및 연구용 생체소재로 개발하기 위한 연구를 수행해왔다.

Terada 등(2002)은 소혈청이 포함되지 않은 배지에 누에 고치에서 분리한 0.1%(v/v) 세리신을 첨가하였을 때 세포의 증식이 촉진되었다고 보고하였다. Gstraunthaler 등(2003)은 누에 유래 단백질을 이용하여 소혈청(fetal bovine serum)에서 발생하는 전염성 질병과 높은 단가문제를 해결하기 위한 연구를 수행하였다. 뿐만 아니라 누에 유래 실크 단백질의 혈당 감소, 보습, 주름 방지, 항산화 및 암세포 증식억제에 대한 효과도 보고되었다(Daithankar et al. 2005, Mondal et al. 2007, Dash et al. 2008). 최근 Morikawa 등(2009)과 Ohnishi 등(2012)은 누에고치 유래 펩타이드 형태의 0.1%(v/v) 세리신 가수분해물이 체장세포의 생존율과 증식률을 상승시킨다고 발표하였다.

세리신은 250, 120, 90, 70, 40 kDa의 분자량으로 구성된 고분자 단백질로서 누에고치로부터 세리신을 분리하는 즉시 수소결합과 비가역적인 결정화가 진행되어 시간이

*Corresponding author. E-mail: yschoi@cha.ac.kr

지남에 따라 상온에서 젤 형태로 변한다(Kweon et al. 2009). 따라서 일반적으로 분리된 세리신을 산이나 중성염 또는 효소 등을 이용하여 다시 가수분해함으로써 수용성 분자로 제조하여 사용하였다. 현재까지 세리신 분리를 위한 많은 방법들이 개발되었으나, 누에고치를 원료로 하는 세리신 가수분해물 제조 방법은 인체에 유해한 용매가 사용되며 고온과 고압 반응 등 제조 방법이 매우 복잡하다. 또한 제조 단계에서 폐수가 발생되고 대량 생산이 어려울 뿐만 아니라 가공 후 분자의 결정화로 인해 물에 완전히 녹지 않는 성분이 존재하기 때문에 다른 용도로의 사용이 제한되었다(Jo et al. 2011).

최근 누에 유래 실크 단백질은 의료용 생체소재로 활용 가능성이 점차 커지고 있으나 다양한 분야에 적용을 위한 원료 가공에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 누에 고치 대신 동결 건조한 실샘으로부터 고온, 고압 또는 유기용매 등을 사용하지 않고 상온에서 수용성 가수분해물을 제조하는 새로운 제조방법을 개발하였다. 그리고 제조된 누에 실샘 가수분해물의 특성과 세포 증식에 대한 효과를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 누에 실샘 가수분해물의 제조

5령 7일 익은 누에(백옥잠)를 동결건조하여 실샘만 분

리한 후, 원심식 초미세분말 제조기를 이용하여 실샘 분말을 제조하였다(Fig. 1a). 수용성 누에 실샘 가수분해물(soluble silkworm gland hydrolysate, 이하 “SSGH”라 약칭)의 제조는 실샘 분말 24 g을 증류수 800 ml에 혼합하여 상온에서 30분 동안 교반 후 4°C에서 13,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상등액만 회수하였다. 회수한 상등액에 1 M NaOH를 가하여 상온에서 30분간 가수분해 하였다(Fig. 1b). 전체 실샘 가수분해물(total silkworm gland hydrolysate, 이하 “TSGH”라 약칭)의 제조는 실샘 분말 24 g을 1 M NaOH 800 ml에 혼합하여 80~90°C에서 1시간 동안 가수분해 하였다(Fig. 1c). 가수분해된 SSGH와 TSGH의 상등액에 인산을 첨가하여 중화시킨 뒤 셀룰로오스 투석막(MWCO = 3,000, Spectrum, USA)을 이용하여 3일 동안 증류수로 투석하였다. 투석 과정 중 발생한 침전물을 제거하기 위하여 4°C에서 13,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 누에 실샘 가수분해 용액을 제조하였다. 이렇게 제조된 누에 실샘 가수분해 용액을 영하 20°C에서 냉동시킨 후 동결건조하여 분말 상태로 제조하였다. 또한 대조군으로 누에고치 유래 세리신 가수분해물(cocoon-derived sericin hydrolysate, CSH)(Sigma-Aldrich, USA)를 이용하였다.

2. SDS-PAGE를 이용한 분자량 분석

누에 실샘 가수분해물의 정량은 Bradford 분석법을 이용하였다. 정량한 누에 실샘 가수분해물을 14% SDS

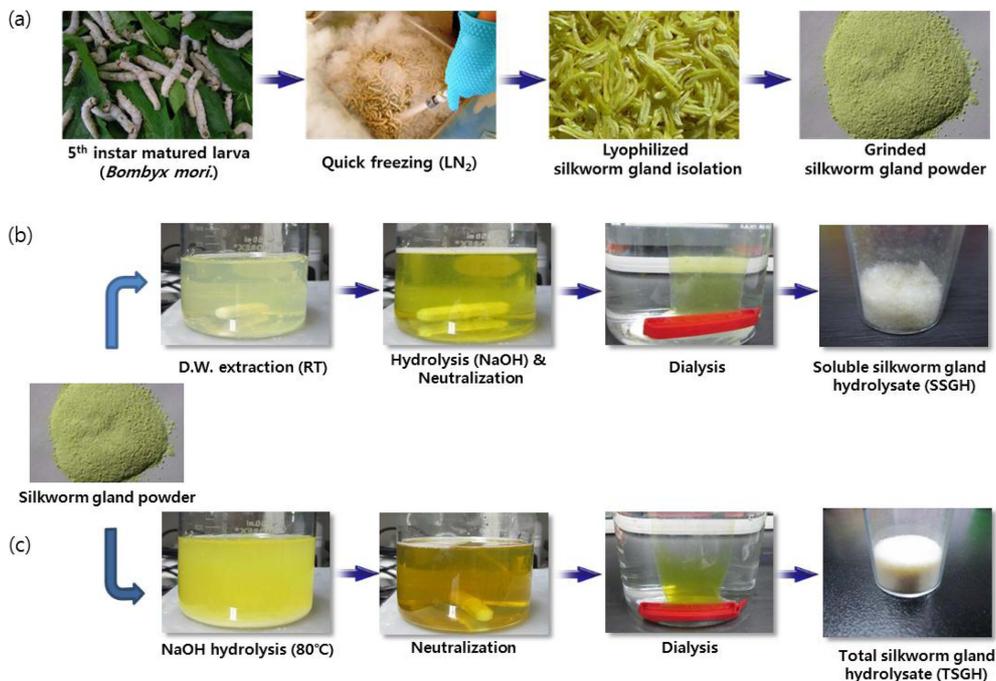


Fig. 1. The manufacturing process of silkworm gland hydrolysate. Silkworm gland powder (a), water-soluble silkworm gland hydrolysate (b), and total silkworm gland hydrolysate (c).

polyacrylamide gel에 넣고 Dual Mini Slab Kit(Bio-rad, Mini-PROTEAN 3 Cell)을 이용하여 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel은 Coomassie brilliant R 250으로 염색하였고, 표준 분자량 표지 단백질(ELPIS, Korea)을 이용하여 분자량을 분석하였다.

3. FT-IR 분석

적외선 스펙트럼 파장 4000 ~ 300 cm⁻¹에서 존재하는 쌍극자 모멘트가 변화하는 분자 골격의 진동과 회전 에너지를 흡수 반응 작용기를 확인하기 위하여 FT-IR spectrometer (Bruker, USA)를 이용하여 분석하였다 (Sarovart et al. 2003, Prasong et al. 2009).

4. 아미노산 분석

누에 실샘 가수분해물 3 mg을 6 N HCl 2 ml에 넣고 질소 가스를 이용하여 1분간 탈기한 후, 100 ~ 120°C에서 24시간 동안 가수분해 후 80 ~ 90°C에서 건조시켰다. 이렇게 건조된 잔여물을 0.2 N HCl 3 ml로 용해시킨 후 닌하이드린법을 이용하여 아미노산을 정량 한 다음 양이온 교환 컬럼이 장착되어 있는 아미노산 자동분석기(Hitachi model 835, Japan)로 분석하였다.

5. 세포 배양

인간 피부 섬유아세포 배양을 위해 10% FBS(fetal bovine serum; Hyclone, USA)와 100 U streptomycin, 100 µg/ml penicillin이 함유된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Hyclone, USA) 배지를 사용하였고, 태줄 유래 중간엽줄기세포는 10% FBS, 100 U streptomycin, 100 µg/ml penicillin이 함유된 α-MEM (alpha minimum essential medium; Hyclone, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

6. 세포 독성

96-well plate에 인간 피부 섬유아세포와 중간엽줄기세포를 각 well 당 3 × 10³ cells로 분주한 다음 24시간 동안 배양한 후 누에 실샘 및 고치 유래 가수분해물이 농도별 (0.2, 0.5, 1, 2, 5 mg/ml)로 첨가된 배지를 200 µl씩 첨가 후 24시간 동안 배양하였다. 각 well에 WST-1 용액을 (WST-1 kit, ELIPS, Korea) 20 µl씩 첨가한 후 3시간 동안 배양한 다음 ELISA reader(Epoch, Korea)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 분석하였다.

7. 세포 증식 효과 분석

인간 피부 섬유아세포와 중간엽줄기세포를 48-well plate에 각 well 당 1 × 10⁴ cells로 분주한 후 24시간 배양한 다

음 FBS가 포함되지 않은 배양 배지에 1 mg/ml 누에 실샘 및 고치 유래 가수분해물을 처리한 후 96시간 동안 배양하였다. 배양 동안에 24시간 간격으로 10% WST-1이 첨가된 배지를 처리하여 3시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 주요 아미노산 구성 성분

누에 실샘 가수분해물의 단백질 특성을 확인하기 위하여 SSGH, TSGH, CSH의 아미노산 조성을 분석하였다. SSGH에서는 글리신(29.5%), 알라닌(15.3%), 아스파르트산 또는 아스파라긴(12.4%), 세린(9.9%)이 주로 함유되어 있었다. TSGH에는 아스파르트산이나 아스파라긴(25.9%), 글리신(18.7%), 알라닌(14.2%), 세린(8.3%)이 주로 함유되어 있었다. 대조군인 CSH의 경우에는 아스파르트산 또는 아스파라긴(33.6%), 세린(25%)이 주된 구성 성분이었다(Table 1).

SSGH는 글리신이 CSH보다 3.6배 높게, 알라닌은 5.4배 높게 나타났다. TSGH는 글리신이 CSH보다 2.2배 높게, 알라닌은 5배 높게 나타났다. 세린의 경우 CSH는 SSGH와 TSGH보다 2.7배 높게 나타났다. 누에 실샘에 존재하는 순수한 세린의 주요 아미노산 성분은 아스파르트산 또는 아스파라긴(14.77%), 글리신(16.05%), 세린(33.46%)으로 구성되며 피브로인은 아스파르트산 또는 아스파라긴

Table 1. The main amino acid (in mole %) composition of silkworm gland hydrolysate and cocoon-derived sericin hydrolysate

Amino acid	SSGH	TSGH	CSH
Asx	12.4	25.9	33.6
Glx	5.4	7.0	4.8
Ser	9.9	8.3	25.0
Gly	29.5	18.7	8.6
His	1.7	1.1	1.8
Arg	2.2	2.6	3.9
Thr	2.4	1.8	7.3
Ala	15.3	14.2	2.8
Pro	1.9	1.9	0.4
Tyr	7.2	6.3	4.4
Val	4.3	4.1	3.5
Met	0.3	0.3	0.2
Cys2	0.6	0.2	0.2
Ile	1.8	1.7	0.7
Leu	1.8	1.6	0.9
Phe	2.1	1.5	0.4
Lys	1.3	3.0	1.6

SSGH: soluble silkworm gland hydrolysate, TSGH: total silkworm gland hydrolysate, CSH: cocoon sericin hydrolysate

(2.39%), 글리신(43.53%), 세린(12.32%)으로 구성된다 (Minoura et al. 1995). 따라서 SSGH는 세리신과 피브로인에 해당하는 주요 아미노산 성분이 모두 존재하는 것을 확인하였다.

2. 분자량 분포

가수분해 조건이 서로 다른 SSGH, TSGH, 그리고 CSH의 분자량을 측정하기 위하여 SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다. 일반적으로 누에고치를 이용하여 제조한 가수분해물(CSH)의 경우 15~50 kDa으로 분포하며 중저분자 상태로 존재하였다. SSGH는 7~50 kDa으로 분포하며 고분자에서 저분자까지 다양한 범위로 존재하였고, TSGH의 경우 5~15 kDa으로 저분자 상태로 존재하였다(Fig. 2). 가수분해 방법을 통하여 제조되는 물질들은 제조공정 온도, 시간, 투석 방법에 따라 최종 산물의 분자량, 물성 그리고 생리적 활성이 다르게 나타난다 (Cho et al. 2006). 따라서 SSGH, TSGH 그리고 CSH의 가수분해 제조 공정을 비교할 때 고온에서 가수분해한 TSGH와 CSH가 상온에서 가수분해된 SSGH보다 저분자 형태로 존재하였으며 이에 따른 각 원료의 물성의 차이는 제조시 처리 온도에 기인함을 알 수 있었다.

3. FT-IR 분석

누에 실샘 가수분해물의 2차 구조를 확인하기 위하여 FT-IR 분석을 수행하였다. SSGH, TSGH, CSH의 IR-

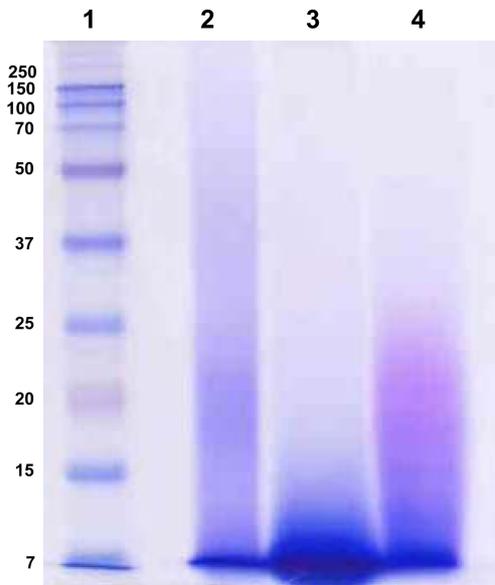


Fig. 2. Comparison of molecular weight of silkworm gland hydrolysate and cocoon-derived sericin hydrolysate. Lane 1, marker; lane 2, soluble silkworm gland hydrolysate (SSGH); lane 3, total silkworm gland hydrolysate (TSGH); lane 4, cocoon-derived sericin hydrolysate (CSH).

spectrum의 패턴은 1625~1655 cm^{-1} 와 3420~3440 cm^{-1} 에서 각각 피크를 나타내었다(Fig. 3). 일반적으로 누에 유래 실크 단백질인 세리신과 피브로인의 IR-spectrum 패턴은 1625~1655 cm^{-1} 와 3420~3440 cm^{-1} 부근에서 특이적인 강한 흡열 피크를 나타낸다(Prasong et al. 2009, Sarovart et al. 2003). 이러한 피크 패턴은 각각 random coil과 β -sheet에 해당하며 소수성 결합과 결정성 구조를 나타내는 작용기로 물에 용해되지 않는 특성과 밀접한 연관이 있다. 본 연구에서 제조한 SSGH, TSGH 그리고 대조군 CSH 모두 세리신에서 나타나는 특이적인 피크와 동일한 패턴을 확인하였으며 실샘을 원료로 제조한 SSGH와 TSGH는 누에고치를 원료로 제조한 CSH보다 random coil과 β -sheet에 해당하는 작용기가 1~3배 낮게 확인되었다. 따라서 실샘 가수분해물과 고치 유래 세리신 가수분해물의 물성 차이는 제조시 가해지는 온도의 차이와 이로 인해 형성되는 각 가수분해물 2차구조의 변화에 기인함을 확인하였다.

4. 세포 독성

누에 유래 실크 단백질은 우수한 생체적합성을 가지고 있으며, 면역반응을 일으키지 않는 것으로 알려져 있다 (Hwang et al. 2009). 이러한 생체 적합성을 확인하기 위하여 인간 중간엽줄기세포와 피부 섬유아세포를 이용하여 SSGH, TSGH, CSH에 대한 세포독성 분석을 수행하였다. 그 결과 SSGH, TSGH, CSH원료 모두 세포 생존율에 영향을 주지 않았다(Fig. 4).

5. 세포 증식 촉진 효과

FBS가 첨가되지 않은 배지에 1 mg/ml SSGH를 첨가하여 인간 중간엽줄기세포와 피부섬유아세포를 배양한 결과

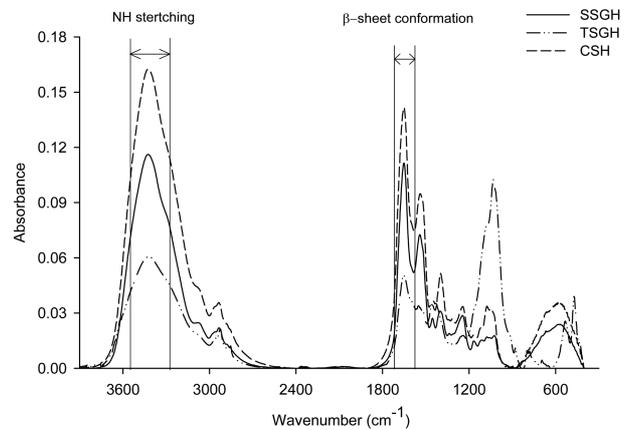


Fig. 3. FT-IR spectra of silkworm gland hydrolysate and cocoon-derived sericin hydrolysate.

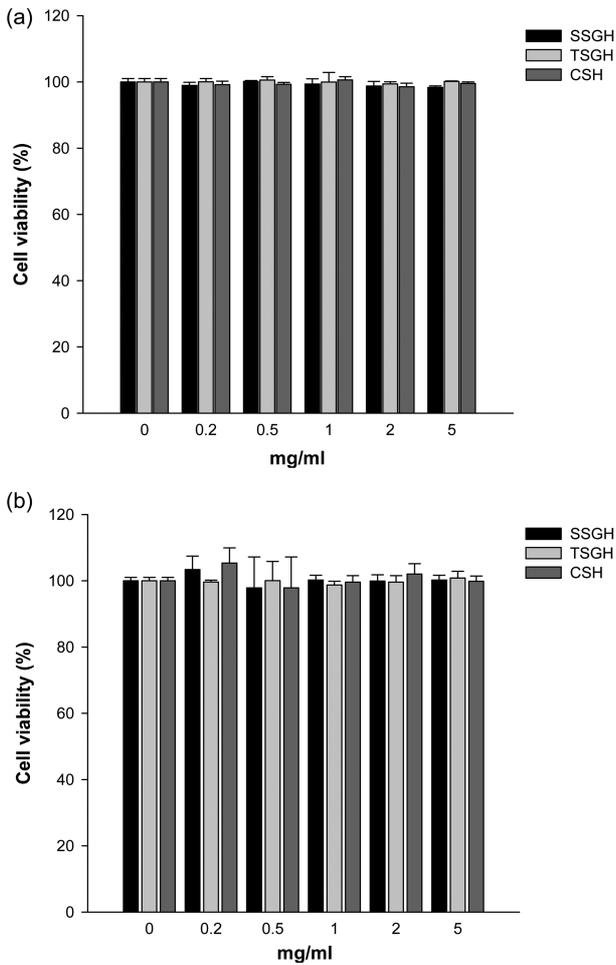


Fig. 4. Cell cytotoxicity assay of mesenchymal stem cells (a) and fibroblasts (b) after 24 h of cell culture with silkworm gland hydrolysate and cocoon-derived sericin hydrolysate.

10% FBS를 첨가한 대조군과 동등한 세포 증식 촉진효과를 나타내었다. 반면 TSGH와 CSH의 증식효과는 대조군 대비 70%를 나타내었다(Fig. 5). 세포 배양액에 우혈청이 없는 경우 누에고치 유래 세리신 가수분해물은 세포사멸 신호를 억제함으로써 세포 생존율을 증가시키고 세포 증식을 촉진한다(Takahashi et al. 2003). 일반적으로 세포는 증식하기 위해 알부노이드 단백질인 BSA 등을 주요 에너지원으로 이용한다. 세리신에 존재하는 세린은 알부노이드 단백질로서 세포의 생존 및 증식에 관여한다(Terada et al. 2002). 세리신의 경우 세린이 30%이상, 피브로인의 경우 세린으로 변환될 수 있는 글리신이 44%이상 함유되어 있다(Kim et al. 2012). 따라서 SSGH는 세리신과 피브로인의 아미노산 특성을 모두 나타내고 있어 TSGH와 CSH에 비해 세포증식과 관련된 에너지원을 보다 많이 함유하고 있다. 이러한 이유로 SSGH는 무혈청 배지에서 세포증식 촉진과 세포사멸 억제에 보다 효과적인 영향을 주

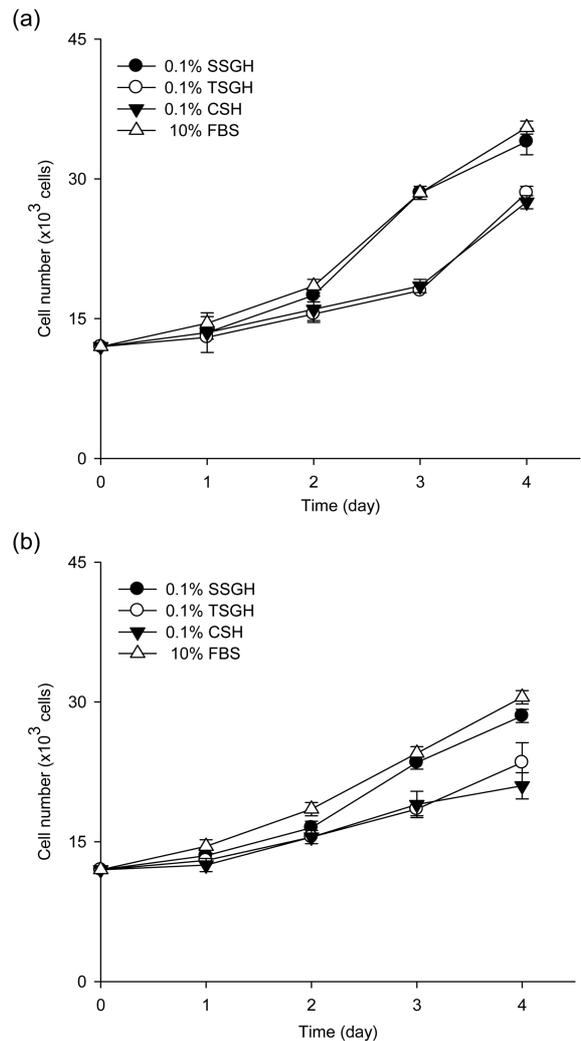


Fig. 5. Effect of silkworm gland hydrolysate and cocoon-derived sericin hydrolysate on the proliferation of mesenchymal stem cells (a) and fibroblasts (b).

는 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서 제조한 SSGH는 세포배양을 위한 배지 첨가제 및 소혈청 대체재로 이용할 수 있음을 확인하였다.

적 요

본 연구에서는 인체에 유해한 용매를 사용하지 않고 누에 실샘으로부터 가수분해물을 제조하는 새로운 공정을 개발하였다. 제조된 누에 실샘 가수분해물의 특성 분석을 통해 누에고치 유래 세리신 가수분해물(CSH)과 구성 성분 및 물성이 상이함을 확인하였다. 또한 1 mg/ml 수용성 누에 실샘 가수분해물(SSGH)을 첨가한 경우 10% FBS를 첨가한 대조군과 동등한 세포 증식효과가 있음을 증명하였다. 결론적으로 누에 실샘 가수분해물은 혈청을 대체할

수 있는 우수한 소재임을 확인하였다. 본 연구에서 개발한 제조방법을 통해 생산된 누에 실샘 가수분해물은 향후 화장품 및 의료용 소재로 그 응용범위를 확대할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 농업공동연구사업(No. PJ007354)의 지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사 드립니다.

인용문헌

- Cho SW, Kim JD, Lee KW, Choi DG, Han SK, Lee YJ, Cho HK (2006) Stimulation of insulin secretion and immune system in silk peptide and chitosan oligosaccharides. *Kor J Gerontol* **16**, 88~93.
- Daithankar AV, Padamwar MN, Pisal SS, Paradkar AR, Mahadik KR (2005) Moisturizing efficiency of silk protein hydrolysate: Silk fibroin. *Indian J Biotech* **4**, 115~121.
- Dash R, Mandal M, Ghosh SK, Kundu SC (2008) Silk sericin protein of tropical tasar silkworm inhibits UVB-induced apoptosis in human skin keratinocytes. *Mol Cell Biochem* **311**, 111~119.
- Gamo T, Inokuchi T, Laufer H (1977) Polypeptides of fibroin and sericin secreted from the different section of the silk gland in *Bombyx mori*. *Insect Biochem* **7**, 285~295.
- Gstraunthaler G (2003) Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX* **20**, 275~281.
- Grzelak K (1995) Control of expression of silk protein genes. *Biochem Mol Biol* **110**, 671~681.
- Hwang WJ, Jeong SN, Kim YS, Pi SH, You HK, Chung CP, Shin HS (2009) Clinical study of guided bone regeneration of extracted socket with PLA/PGA membrane and silk fibroin membrane. *J Korean Acad Periodontol* **39**, 129~138.
- Jo YY, Kweon HY, Lee KG, Nam SH, Lee HS, Yeo JH (2011) The promotion of cell attachment and proliferation on silk fibroin. *J Appl Biol Chem* **54**, 166~170.
- Kweon HY, Yeo JH, Kim KY, Kim YS, Song HS, Kim SJ, Woo SO, Han SM, Lee KG (2009) Characteristics of silk sericin extracted from sericinjam. *Int J Indust Entomol* **18**, 121~124.
- Kim YA, Song EH, Shin KO, Lee YM, Cho YH (2012) Dietary effect of silk protein on epidermal levels of free sphingoid bases and phosphate metabolites in NC/Nga mice. *Korean J Nutr* **45**, 113~120.
- Mondal M, Trivedy K, Kumar SN (2007) The silk protein, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., - a review. *Caspian J Env Sci* **5**, 63~76.
- Morikawa M, Kimura T, Murakami M, Katayama K, Terada S, Yamaguchi A (2009) Rat islet culture in serum-free medium containing silk protein sericin. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **16**, 223~228.
- Minoura N, Aiba SI, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y (1995) Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrices. *J Biomed Mater Res* **29**, 1215-1221.
- Ohnishi K, Murakami M, Morikawa M, Yamauchi A (2012) Effect of the silk protein sericin on cryopreserved rat islets. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* **19**, 354~360.
- Prasong S, Yaowalak S, Wilaiwan S (2009) Characteristics of silk fiber with and without sericin component: A comparison between *Bombyx mori* and *philosamia ricini* silks. *Pakistan J Biol Sci* **12**, 872~876.
- Sarovart S, Sudatis B, Meesilpa P, Brian P, Magaraphan R (2003) The use of sericin as an antioxidant and antimicrobial for polluted air treatment. *Rev Adv Mater Sci* **5**, 193~198.
- Sasaki S, Nakagaki I (1980) Secretory mechanism of fibroin, a silk protein, in the posterior silk gland cells of *Bombyx mori*. *Membr Biochem* **3**, 37~47.
- Takahashi M, Tsujimoto K, Yamada H, Takagi H, Nakamori S (2003) The silk protein, sericin, protects against cell death caused by acute serum deprivation in insect cell culture. *Bio-technol Lett* **25**, 1805~1809.
- Takasu Y, Yamada H, Tsubouchi K (2002) Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 2715~2718.
- Terada S, Nishimura T, Sasaki M, Yamada H, Miki M (2002) Sericin, a protein derived from silkworms, accelerates the proliferation of several mammalian cell lines including a hydridoma. *Cytotechnology* **40**, 3~12.
- Tokutake S (1980) Isolation of the smallest component of silk protein. *Biochem J* **187**, 413~417.