

## 인체적용을 위한 실크 스펀지의 제조 및 특성

조유영\* · 권해용 · 이광길 · 여주홍 · 이희삼  
농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과

### Preparation and characterization of medical silk sponge

You-Young Jo\*, HaeYong Kweon, Kwang-Gill Lee, Joo-Hong Yeo, Heui-Sam Lee

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

#### ABSTRACT

Fibroin and sericin are natural proteins obtained from cocoon and one of the spotlight materials for medical device. Medical device made of these proteins also has the advantage that this material is biodegradable in to amino acid. In this study, we prepared silk sponges using fibroin, sericin and additives. The characterizations of the silk sponges such as morphology, stability, and blood absorbency were observed. The structural stability of the silk sponge decreased significantly by increasing sericin contents. The effect on the concentrations of ethanol to induce crystallization was observed to be superior to 70% ethanol. Structural stability of silk sponges containing additives was very lower than those not containing additives. The blood absorbency of the silk sponges was found to be excellent, regardless of the composition of sericin and fibroin. The resilient power of these sponges was also very good, in spite of the repeated soaking and drying. Therefore, we expect that the silk sponges can be used medical supplies such as plastic implants and hemostatic cotton.

**Key words** : Silk protein, Fibroin, Sericin, Sponge, Hemostatic cotton

#### 서 론

의료용 스펀지는 외과적 수술시 출혈을 막거나 상처로부터 혈류의 흐름을 저지하기 위해 사용되는 것과 상처 드레싱 또는 메디폼과 같은 상처 치료제, 스펀지의 공극을 이용하여 세포를 키워 체내에 넣어주기 위해 사용되는 지지체 역할 등 다양한 용도로 사용되고 있다. 하지만 현재 사용되는 대부분의 의료용 스펀지는 합성 고분자 물질 또는 동물성 콜라겐을 이용하여 만들어진 것으로 생체적합성이 떨어지거나, 고가 수입품에 의존한다는 단점이 있다.

누에고치로부터 얻어지는 실크는 친수성인 세리신과 소수성인 피브로인 두 종류의 단백질로 구성된 천연 고분자 물질로서 (Lucas et al. 1957), 생체적합성이 뛰어나 의료용 소재로서 많이 연구되고 있다 (Sofia et al. 2001, Lv et al. 2004, Kim et al. 2005, Kim et al. 2010, Masahiro et al. 2011, Diab et al. 2012, Mandal et al. 2012).

본 연구에서는 누에고치로부터 세리신과 피브로인을 분

리하여 각각을 수용액 상태로 용해시킨 뒤, 이들의 조성비를 달리하거나 첨가물을 혼입하여 다양한 용도로서 활용 가능한 실크 스펀지를 제조하였다. 제작된 실크 스펀지를 각각 70%, 100% 에탄올에 침지하여 안정화 시킨 뒤, 물에 침지하여 형태의 변화를 관찰하고 이를 다시 건조시키고, 물에 침지시키는 과정을 반복하여 형태가 계속 유지되는지에 대한 실크 스펀지의 구조적 안정성을 시험하였으며, 혈액 흡수도를 관찰하였다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 실크 세리신 수용액 제조

누에고치 50 g에 1 L의 증류수를 넣고 115°C에서 5시간 동안 삶은 뒤, 얻어진 상등액을 모아 실크 스펀지 제작을 위한 실크 세리신 수용액으로 사용하였다.

##### 2. 실크 피브로인 수용액 제조

누에고치를 마리세유비누를 이용하여 세리신을 제거한

\*Corresponding author. E-mail: yyjo@korea.kr

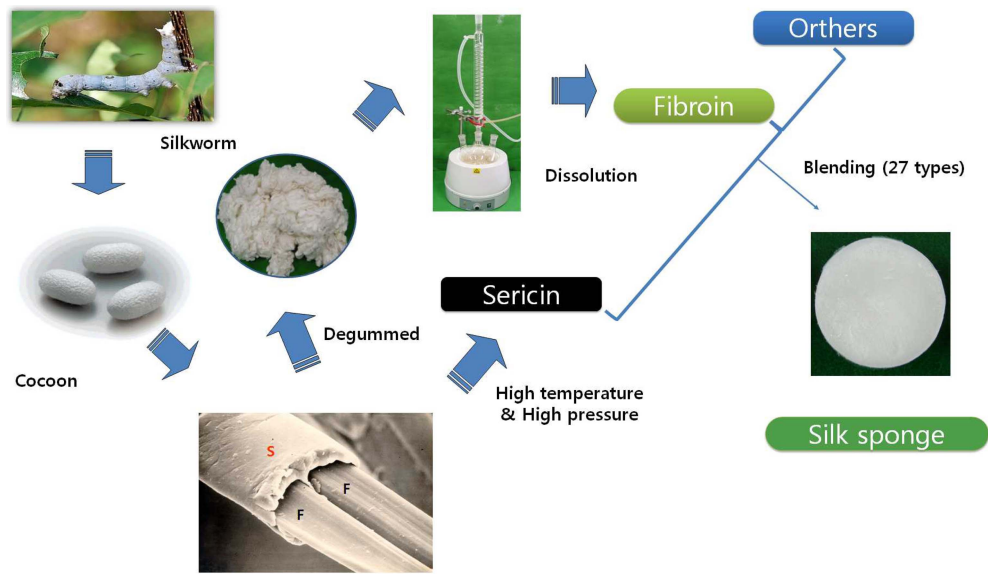


Fig. 1. Manufacturing scheme of silk sponge.

정련솜을 만든 후, 정련솜을 염화칼슘 : 물 : 에탄올 = 1 : 8 : 2 (몰비율)의 용액으로 80°C에서 용해시켰다. 실크정련솜 30 g, 70 g과 용해시간을 1시간, 5시간으로 달리하여 피브로인 용액을 제작하였으며, 이 용액을 부직포와 탈지면으로 거른 뒤 3일 동안 투석하여 염을 제거하여 실크 피브로인 수용액으로 사용하였다.

### 3. 실크 피브로인 수용액의 농도 및 분자량 측정

제조된 실크 수용액의 농도는 수분분석기 (MA100C, Sartorius, Germany)를 이용하여 105°C에서 측정하였다. 제조된 실크 세리신과 피브로인 수용액의 분자량 분포를 관찰하기 위하여 4~12% gradient NuPAGE Bis-Tris Mini gel (novex, USA)을 이용하여 제조사에서 제공한 매뉴얼에 따라 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 완료된 젤은 Coomassie Blue R-250으로 염색하였다.

### 4. 실크 스펀지 제작

상기방법으로 제조된 실크 세리신과 피브로인 수용액을 서로 다른 비율로 혼합하거나 (제품번호 1~21), 여기에 염을 첨가하여 (제품번호 22~27) 만든 총 27가지 조건의 용액을 각각 35Φ 용기에 부어 동결건조하였다 (그림 1). 제작된 실크 스펀지의 두께는 디지털 두께 측정기 (Mutitoyo Digimatic Caliper, Japan)을 이용하여 측정하였다.

### 5. 실크 스펀지의 구조 안정성 및 혈액 흡수도 평가

제작된 실크 스펀지의 구조적 안정성과 흡수력을 평가하기 위하여 우선, 실크 스펀지를 70% 에탄올과 100% 에탄올에 담가 결정화시켰다. 결정화 된 실크 스펀지의 건

조 후 무게를 측정하고, 다시 PBS (pH 7.4)용액에 8시간 동안 담근 다음 건조하여 무게를 측정하는 방식으로 실크 스펀지가 녹지 않고 오랫동안 안정한 구조를 유지하는지 확인하였으며, PBS에 침지했을 때 용액이 흡수되는 양을 측정하여 실크 스펀지의 흡수력을 시험하였다. 대조군으로는 결정화되지 않은 실크 스펀지 (에탄올 무처리군)를 사용하였다. 혈액의 흡수도는 결정화시키지 않은 실크 스펀지 중 제조번호 1~9까지의 스펀지만을 이용하여 혈액을 실크 스펀지에 떨어뜨려 흡수되는 형태와 번지는 정도를 관찰하였다.

### 6. 실크 피브로인 스펀지 제작 및 생분해성 측정

앞에서 제작된 실크 스펀지의 안정성 분석 후 실크 피브로인만으로 구성된 실크 피브로인 스펀지를 제작하였다. 사용된 실크 피브로인 용액은 실크의 양과 용해시간을 달리하여 제작된 2종류의 피브로인 용액을 각각 10, 20, 30, 40, 50 ml씩 75 × 110 mm의 사각틀에 부어 동결건조하여 총 10종류의 실크 피브로인 스펀지를 제작하였다. 실크 스펀지의 두께는 디지털 두께 측정기 (Mutitoyo Digimatic Caliper, Japan)를 이용하여 측정하였다. 스펀지의 생분해성을 측정하기 위하여 스펀지를 70% 에탄올과 100% 에탄올을 이용하여 결정화시켜 구조를 안정화 한 뒤, 매일 PBS용액에서 생분해 정도를 10일 동안 관찰하였다. 대조군으로는 무처리군을 사용하였다.

### 7. 통계학적 분석

각 실험은 최소 4회 이상 반복 실험을 수행하였다. 통계분석은 mean ± SD로 표시하였고, ANOVA (one-way

analysis of variance) 분석을 통하여 신뢰도 95% ( $p < 0.05$ ) 로 분석하였다.

### 결과 및 고찰

실크는 2가닥의 선상단백질인 피브로인을 구상단백질인 세리신이 둘러싸고 있는 구조로, 피브로인과 세리신이 약 75 : 25의 비율로 존재한다 (Putthanarat et al. 1996). 이 두 단백질은 모두 세포부착력이 좋으며, 특히 피브로인은 생체적합성이 뛰어나며 우수한 기계적 강도와 낮은 면역거부반응 및 다양한 형태로의 성형이 가능한 장점을 가지고 있어 많은 연구자에 의해 의료용 소재로서 연구되고 있다 (Moy et al. 1991, Sofia et al. 2001, Lv et al. 2004, Kim et al. 2005). 본 연구에서는 실크로부터 얻어지는 두 단백질을 이용하여 인체적용을 위한 스펀지를 제작하고 이들의 특성을 연구하였다. 세리신은 수용성으로 누에고치를 고온에서 물과 함께 끓일 경우 대부분의 단백질이 물에 용해되어 나오며, 본 연구에서 용해시킨 실크 세리신의 농도는 0.85%였다. 피브로인 수용액은 이전 연구에서 확립된 인체적용소재 제작에 적합한 용해조건으로 피

브로인 수용액을 제조하였다 (Jo et al. 2012). 제조된 피브로인 수용액의 농도는 3.53%였다. 세리신 단백질의 분자량 분포는 주로 6 ~ 30 kD으로 3 ~ 200 kD의 분자량 분포를 보인 피브로인 단백질에 비해 더 낮은 분자량과 좁은 범위의 분포를 보였다 (Data not shown). 그림 2와 같이 세리신 수용액과 피브로인 수용액의 함량을 달리하여 21종류의 스펀지를 제조하였으며, 염을 첨가한 스펀지를 6종류 제조하여 총 27종의 실크 스펀지를 제조하였다. 첨가한 염은 한 종류였으며, 모든 염 첨가 스펀지에서 염의 농도는 동일한 농도로 첨가하였다. 제작된 실크 스펀지의 형태는 그림 3과 같이 피브로인 함량이 높을수록 더 촘촘한 구조를 하고 있었으며, 피브로인과 세리신의 함량이 (피브로인 : 세리신 = 2 : 3 ~ 3 : 2) 비슷할 때 매끈하고 깨끗한 스펀지가 만들어졌다. 이는 사용한 피브로인이 세리신보다 높은 분자량 범위를 갖고 있어, 더 촘촘하고 질긴 구조를 가진 것으로 생각된다. 또한 염을 함유시킨 스펀지의 경우 공극이 크고 더 유연한 특성을 가질 것으로 예상되었으나, 실크만을 이용한 스펀지에 비해 스펀지의 형태가 유지되지 못하는 것을 관찰할 수 있었다. 제작된 실크 스펀지를 각각 70% 에탄올에 침지하여 결정화시킨 뒤

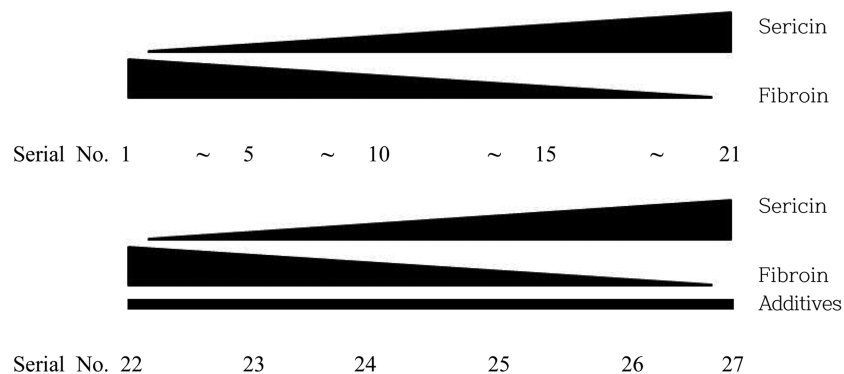


Fig. 2. The component ratio of the manufactured silk sponge.

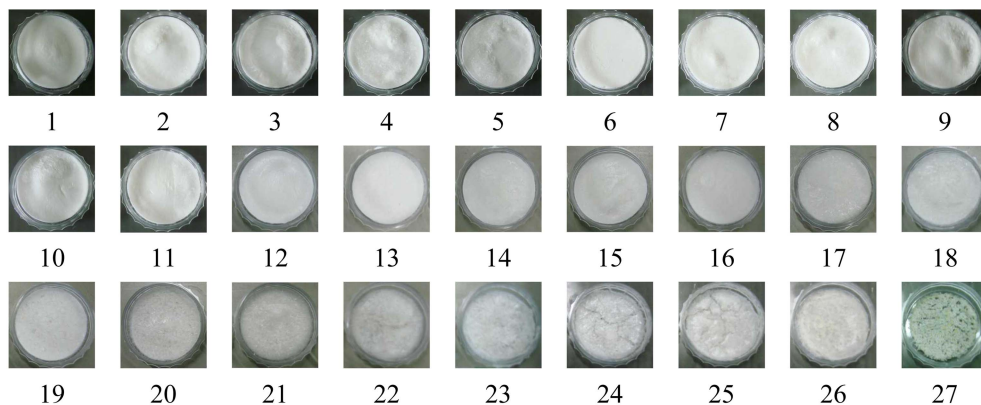


Fig. 3. Morphology of the manufactured silk sponge.

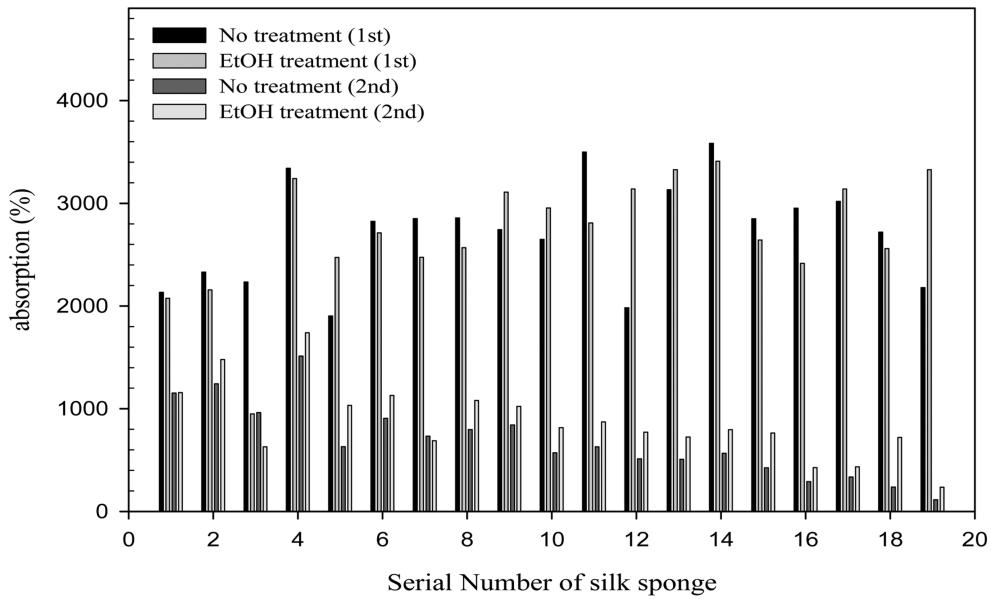


Fig. 4. The structure stability and absorptivity of silk sponge.

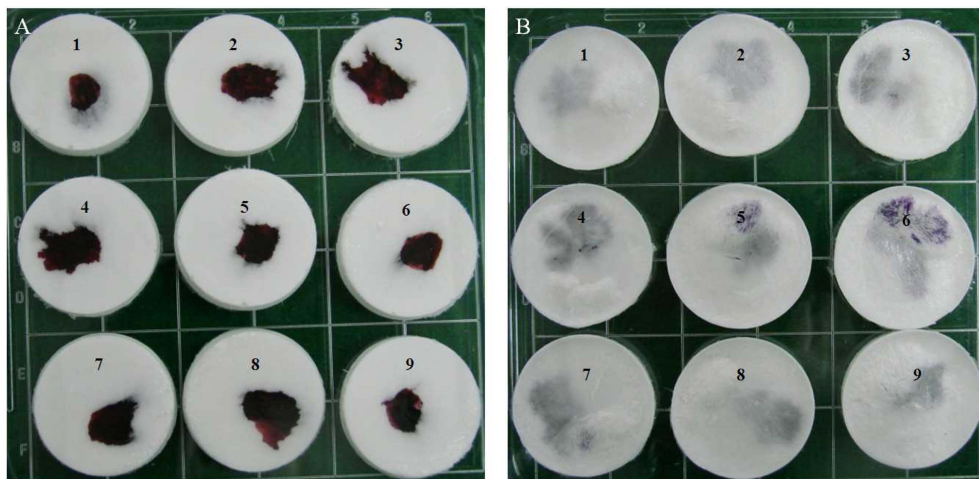


Fig. 5. The blood absorption of silk sponge. (A) Front (B) Rear.

에탄올을 처리하지 않은 실크 스펀지와 수분 흡수력을 비교하였다. 대부분의 스펀지에서 첫 번째 PBS 용액에 침지하였을 때, 무처리 스펀지가 결정화된 스펀지에 비하여 더 많은 용액을 흡수하였으며, 최대 36배까지 용액을 흡수하였다 (그림 4). 두 번째 침지 시에는 결정화된 스펀지가 더 많은 양의 용액을 흡수하였는데 최대 15배까지 용액을 흡수하였다. 스펀지를 침지와 건조를 반복할 경우, 세리신이 많이 함유된 스펀지는 그 형태를 유지하지 못하였으나 피브로인이 많은 스펀지의 경우 여러 차례의 시험에도 불구하고 건조중량이 유지되었으며, 형태에 커다란 변화가 없었다. 이는 수용성인 세리신의 함량이 많을수록 에탄올에 의한 결정화율이 낮아서 형태가 쉽게 무

너지는 것이라 생각된다. 따라서 세리신 함량이 낮은 스펀지만을 이용하여 혈액 흡수정도를 확인하였다 (그림 5). 앞에서 제작된 스펀지 중 세리신 농도는 0~2%이고 피브로인 농도는 5~3%에 해당하는 제조번호 1~9까지의 스펀지를 사용하였다. 이들 스펀지에 혈액을 떨어뜨린 뒤 빠르게 흡수되는지, 그리고 흡수될 때의 모양이 넓게 퍼지는지 좁은 범위에 흡수되는지를 관찰하였다. 시험된 9 종류의 스펀지는 모두 세리신 함량에 의존하지 않고 모두 빠르게 혈액을 흡수하였으며, 넓게 퍼지지 않고 혈액이 떨어진 곳에 집중하여 흡수되는 특성을 갖고 있었다. 이상의 실험결과로 볼 때, 형태를 유지하면서 다양한 용도의 스펀지를 개발하기 위해서는 세리신보다는 피브로인

을 이용하는 것이 적합할 것으로 여겨져 실크 피브로인만을 함유한 스펀지를 제작하였다. 실크 피브로인 수용액을 제조할 때의 실크양과 용해시간을 달리한 두 종류의 실크 피브로인 수용액을 제조하고 피브로인 함유량을 달리하여 서로 다른 두께의 스펀지를 제작하였다. 제작된 스펀지의 두께는 0.6~6.0 mm로 10배까지 차이를 보였다. 또한 제작된 피브로인 스펀지의 생분해성을 분석하기 위하여, 70%와 100% 에탄올에 각각의 피브로인 스펀지를 결정화 시키고 분석한 결과, 70% 에탄올에 결정화시킨 스펀지가 100% 에탄올에 결정화된 스펀지보다 오랫동안 형태를 유지하고 있었다. 피브로인 수용액 제조 시, 용해시간이 길수록, 피브로인 함량이 낮을수록 제작된 피브로인 스펀지가 분해되기 쉬웠다. 본 연구 결과를 통하여 장기간 몸속에서 유지되어야 하는 성형보형물 등에 사용하기 위한 실크 스펀지를 제작할 경우 많은 양의 피브로인만을 짧은 시간동안 용해시킨 실크 피브로인 수용액을 이용하여 스펀지를 제작하는 것이 적합할 것으로 생각되며, 지혈솜 등 다른 용도로 사용할 경우 세리신을 이용하여 제조 단가를 낮추는 것도 좋을 것으로 생각된다.

## 적 요

피브로인과 세리신은 누에고치로부터 얻어지는 천연단백질로 생체적용 의료용 소재 제작을 위해 각광받는 재료 중 하나이다. 이들 단백질로 만들어진 생체재료는 생분해 시 아미노산으로 분해되어 인체에 흡수되므로 인체에 해롭지 않다는 장점을 가지고 있다. 본 연구에서는 누에고치로부터 세리신과 피브로인을 분리하여 수용액을 제작한 뒤, 이들의 조성비를 달리하거나 또는 첨가물을 혼합하여 다양한 용도로 활용 가능한 실크 스펀지를 제작하였다. 제작된 실크 스펀지의 형태와 안정성 및 혈액 흡수력 등의 특성을 관찰하였다. 세리신 함량이 늘어날수록 실크 스펀지의 구조 안정성은 현저히 떨어졌으며, 실크 스펀지를 70%와 100% 에탄올에 각각 결정화를 유도시킨 결정화 구조는 70%에서 결정화된 스펀지의 형태가 더욱 안정된 것을 확인할 수 있었다. 실크 외의 다른 첨가물을 혼합한 스펀지는 실크구조 안정성이 실크단백질 (피브로인, 세리신)만을 이용하여 제작한 스펀지에 비해 매우 떨어졌다. 실크단백질만을 이용하여 만든 스펀지에 대한 혈액 흡수도는 세리신, 피브로인 비율과 상관없이 모두 매우 뛰어난 흡수력을 갖고 있었다. 건조와 침지 반복에 따

른 형태 유지력 또한 실크 스펀지는 매우 우수하였다. 따라서, 실크 단백질을 이용한 스펀지는 성형보형물 또는 지혈솜 등의 다양한 용도로 적용이 가능할 것으로 여겨진다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 차세대 바이오그린 21사업 (과제 번호 : PJ009051)의 지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Diab T, Pritchard EM, Uhrig BA, Boerckel JD, Kaplan DL, Guldberg RE (2012) A silk hydrogel-based delivery system of bone morphogenetic protein for the treatment of large bone defects. *J Mech Behav Biomed Mater* **11**, 123~131.
- Jo YY, Kweon HY, Lee KG, Lee HS (2012) A Study of change on the physical properties of silk fibroin biological membrane according to the dissolving conditions. *J Seric Entomol Sci* **50**, 71~75.
- Kim J, Kim CH, Park CH, Seo JN, Kweon HY, Kang SW, Lee KG (2010) Comparison of methods for the repair of acute tympanic membrane perforations: Silk patch vs. pater patch. *Wound Repair and Regeneration* **18**, 132~138.
- Kim UJ, Park J, Kim HJ, Wada M, and Kaplan DL (2005) Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials* **26**, 2775~2785.
- Lucas F, Shaw JTB, and Smith SG (1957) The amino acid sequence in a fraction of the fibroin of *Bombyx mori*. *Biochem J* **66**, 468~479.
- Lv Q, Cao C, Zhang Y, Man X, Zhu H (2004) The preparation of insoluble fibroin films induced by degummed fibroin or fibroin microspheres. *J Mater Sci Mater Med* **15**, 1193~1197.
- Mandal BB, Grinberg A, Gil ES, Panilaitis B, Kaplan DL (2012) High-strength silk protein scaffolds for bone repair. *Proc Natl Acad Sci* **109**, 7699~7704.
- Masahiro K, Naohide T, Yasuhiro S, Koji Y, Yasushi T, Naoyoshi K, Toru S (2011) Chondrocyte distribution and cartilage regeneration in silk fibroin sponge. *Bio-Medical Materials and Engineering* **21**, 53~61.
- Moy RL, Lee A, Zalka A (1991) Commonly used suture materials in skin surgery. *Am Fam Physician* **44**, 2123~2128.
- Putthanarat S, Eby RK, Adams WW, Liu GF (1996) Aspects of the morphology of the silk of *Bombyx mori*. *J Macromol Sci Pure Appl Chem* **A33**, 899~911.
- Sofia S, McCarthy MB, Gronowicz G, Kaplan DL (2001) Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* **54**, 139~148.