

저온감압 자건법에 의한 재조합 형광누에고치의 조사

박종화¹ · 김성완² · 정영훈¹ · 이종길¹ · 고영미¹ · 이상찬¹ · 최광호² · 김성렬² · 구태원^{2*}
¹충청북도농업기술원 잠사시험장, ²농촌진흥청 국립농업과학원

Reeling of recombinant fluorescence cocoons through low temperature decompressed cooking

Jong-hwa Park¹, Sung-wan Kim², Young-hun Jeong¹, Jong-kil Lee¹, Young-mi Go¹, Sang-chan Lee¹, Kwang-Ho Choi², Seong-Ryul Kim² and Tae-Won Goo^{2*}

¹Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services, Chengwon-gun, 363-931, Republic of Korea

²National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon, 441-100, Republic of Korea

(Received September 05, 2013, Accepted October 05, 2013)

ABSTRACT

The fluorescent proteins are generally denatured by heat treatment and thus lose their color. The normal reeling method includes processing by drying and cooking the cocoons near 100°C before reeling. Therefore, the usual processing method cannot be used for making colored fluorescent silks. To develop a method that is applicable to producing transgenic silk without color loss, we develop reeling methods adequate for a recombinant fluorescence cocoons. It was found that the fluorescence cocoons keep their native color when dried at temperatures lower than 60°C for 15 h. Also, a new cooking method to soften the fluorescent cocoons was developed: the cocoons were soaked in a solution of 0.2% sodium carbonate (Na₂CO₃)/0.1% nonionic surfactant (Triton X100) at 60°C and then placed under vacuum. The repeated vacuum treatments enabled complete penetration of the solution into the cocoons, and the cocoons were thus homogeneously softened and ready for reeling. In this state, the cooked cocoons can be reeled by an automated reeling machine. Our results suggest that drying and cooking of the cocoons at low temperature enables the subsequent reeling of the colored fluorescent silks by an automatic reeling machine without color loss and can produce silks that can be used for making higher value-added silk materials.

Key words : Fluorescence cocoon, Reeling, Silkworm, Transgenesis

서 론

누에는 수 천년동안 양잠산업에 있어서 실크를 생산하는 대표적인 견사곤충으로 인류에 지대한 공헌을 해왔다. 최근에는 일본의 Tamura et al.(2000)에 의해서 형질전환 누에 제작이 성공함으로써, 누에가 전통적인 실크를 생산하는 곤충에서 강력한 생물학적 모델 곤충 또는 인·축 적용 단백질의약품과 새로운 인공의 실크소재를 생산하는 생체공장화의 대상 곤충으로써 새로운 이용 가능성이 대두되고 있다(Prudhomme and Couble 2002, Wurm 2003). 실제로 현재까지 사이토카인 등 다양한 유용 재조합단백질을 형질전환누에가 개발 되었거나 추진 중에 있다. 이

중에서도 특히 2003년에 누에의 피브로인 경쇄 내 인간의 typeIII procollagen 단백질이 포함된 재조합 누에고치를 생산하는 형질전환누에가 보고된 이후 (Tomita et al. 2003), 누에의 피브로인 경쇄 이외에도, 피브로인 중쇄, 세리신 1B 및 fibrohexamerin 유전자를 이용하여 후부 및 중부견사선 내에서 재조합단백질을 생산할 수 있는 발현 시스템이 각각 개발되었다(Royer et al. 2005, Kojima et al. 2007, Tomita et al. 2007). 그리고 지금까지 이들 발현 시스템을 사용하여 EGFP를 포함한 다양한 형광단백질, basic fibroblast growth factor (bFGF), human serum albumin (HSA), feline interferon (FeIFN), insulin like growth factor-I (hIGF-I) 등이 성공적으로 발현되었다(Hino

*Corresponding author. E-mail: gootw@korea.kr

et al. 2006, Kurihara et al. 2007, Ogawa et al. 2007, Tomita et al. 2003, Zhao et al. 2009). 또한, 최근 국내 농촌진흥청 국립농업과학원 연구팀에도 농가 보급품종인 백옥잠(잠123 × 잠124)을 이용하여 피브로인 중쇄 유전자 내에 EGFP, mKate2 및 EYFP 형광유전자를 각각 도입하여 녹색, 적색 및 황색형광 누에고치를 생산하는 형질전환누에 개발에 성공한 바 있다(Kim et al. 2011). 이들 형광누에고치는 특정 파장의 빛을 비추면 어둠 속에서 영롱한 녹색, 적색 및 황색형광을 나타내며, 형광유전자가 후부견사선에 강하게 재조합단백질로 발현됨으로써 자연광에서도 녹색, 적색 및 황색을 띄는 특징을 가지고 있다. 그리고 실크 생산을 위한 세리신을 제거하는 정련과정에서 색깔이 없어지는 칼라고치나 골든실크누에의 황금고치와는 달리 견사의 주성분인 피브로인 중쇄 유전자에 삽입된 형광유전자의 발현으로 정련을 해도 형광단백질의 고유한 색깔이 그대로 유지되며, 자연광 하에서도 도입 형광유전자 고유의 형광색을 나타내어 별도의 염색 처리가 필요 없다. 따라서, 친환경적이면서도 경제적인 장점을 동시에 보유하고 있다. 그러나 이들 형광누에고치는 기존의 100°C 내외의 고온에서 고치를 삶는 자건(煮繭)과 제사(製絲) 방법을 이용하면 형광단백질이 심각한 변성이 초래되고 이로 인해 형광색깔을 잃게 되는 단점 또한 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 이들 형광누에고치를 이용하여 별도의 염색처리 없이 패션의류, 벽지, 조명등갓, 액세서리, 인테리어용품 등의 고부가가치 실크소재로 적용하기 위하여 형광누에고치에 적합한 제사방법을 개발하였다.

재료 및 방법

1. 누에품종 및 사육

본 연구에 사용된 누에(*Bombyx mori*)는 백옥잠(잠123 × 잠124)의 피브로인 중쇄(fibroin heavy chain) 내 북미산해파리(*Aequorea victoria*) 유래의 녹색형광유전자(Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) 도입에 의해 녹색형광 누에고치를 생산하는 제 6세대 형질전환누에를 사용하였다. 형질전환누에는 일반누에와 동일하게 농촌진흥청 농업생물부의 표준 사육 기준 (온도, 24°C~27°C; 상대습도, 70%~90%)에 준하여 사육하였고, 필요한 시기에 따라 시료를 채취하였다.

2. 녹색형광 누에고치 건조 조건

형광단백질은 일반적으로 고온 열처리에 의해서 변성이 되므로 고온 처리 시 고유의 형광색깔을 잃게 된다. 따라서 본 연구에 사용된 녹색형광 누에고치는 일반 누에고

치를 건조할 때 행해지는 100°C 이상의 고온 건조가 아닌 저온에서 고치를 열풍건조기를 이용하여 15시간 건조하였다.

3. 녹색형광 누에고치의 세리신 팽윤제 조제

일반적으로 정상 누에고치의 자건(고치삶기)은 100°C 이상의 고온처리 과정이 요구된다. 녹색형광 누에고치를 정상 누에고치의 자건 조건으로 자건 시 고온에 의해서 외래단백질인 녹색형광단백질이 심각한 변성이 초래된다. 따라서 저온(55~60°C)에서 녹색형광 누에고치의 세리신을 화학적으로 팽윤시키기 위하여 알칼리제로는 탄산나트륨(Na_2CO_3)을, 계면활성제로는 비이온계 계면활성제인 Triton X100을 사용하였다. 녹색형광 누에고치의 세리신 팽윤을 위하여 침지액 조제는 탄산나트륨의 농도를 0.1, 0.2, 0.3, 0.4%로 설정하고, Triton X100의 농도는 0, 0.1, 0.2, 0.3%로 설정한 다음, 고치 내강 내 침지액의 최적 침투를 위하여 탄산나트륨과 Triton X100를 조합 처리하고 침투율을 측정하였다. 침투율은 침지액을 처리한 전체 누에고치 중에서 누에고치 내강 내 침지액의 침투에 의해 침지용기의 바닥 면에 완전히 가라앉은 누에고치의 숫자로 측정하였다.

4. 감압 처리에 의한 누에고치 내강 내 침지액 진공 침투

누에고치 내강 내 침지액을 침투하기 위하여, 침지액의 순환이 용이한 구멍 뚫린 스텐레스 망에 누에고치를 넣은 후 누에고치가 침지액 위로 떠는 것을 방지하기 위하여 가중기로 눌러준 다음, 적정농도의 탄산나트륨과 Triton X100 용액 중에서 적어도 1개를 포함한 용액 중에 누에고치를 60°C, 20분간 침지하였다. 20분간 침지 후 충청북도 농업기술원 잠사시험장에서 자체 개발한 감압기에 옮겨 -600~-680 mmHg까지 감압을 실시한 후 이 상태로 1~5분간 유지한 다음 5~10분에 걸쳐 서서히 상압으로 복압을 실시하여 누에고치 내강 내로 침지액을 진공 침투시켰고, 필요에 따라 감압 횟수와 감압도를 달리하여 처리하였다.

5. 녹색형광 누에고치의 조사

감압 처리에 의한 침지액이 침투된 녹색형광 누에고치는 감압기에서 꺼낸 후 침지액의 제거를 위하여 수돗물에 10~20분 수세한 다음, 충청북도 농업기술원 잠사시험장에서 자체 개발한 세미조사기를 이용하여 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 녹색형광 누에고치에 적합한 건조 조건

생고치 내의 번데기를 그대로 방치하면 누에나방으로

변태하여 고치 밖으로 나오게 된다. 그러면 그 누에고치는 조사(실켜기)가 불가능하기 때문에 나방이 고치 밖으로 나오기 전에 번데기를 도살하기 위하여 고치를 건조할 필요가 있다. 일반적으로 누에고치를 건조하는 경우에는 초기 온도를 113°C로 하고, 이후 서서히 온도를 낮추고 5~6시간 동안 62°C까지 낮추는 방법으로 건조를 한다. 이렇게 누에고치를 건조했을 때 42%의 건조비율을 얻을 수 있다(표 1). 그러나 형질전환누에가 생산한 녹색형광 누에고치는 북미산해파리 유래의 녹색형광유전자(EGFP)가 재조합단백질로 발현되어 녹색형광색을 띄기 때문에, 고온으로 열처리를 할 경우 재조합단백질이 변성되어 고유의 녹색형광 색깔을 잃게 된다. 따라서 녹색형광 누에고치를 55~60°C 저온에서 15시간 열풍 건조했을 때 고유의 녹색형광색이 유지되는 것을 확인할 수 있었고, 이때 건조비율은 38% 내외로 곰팡이 피해 없이 장기간 저장이 가능할 것으로 판단되었다(표 1).

2. 감압 처리에 의한 누에고치 내강 내 침지액 진공 침투 조건

일반적으로 정상 누에고치의 자견(고치삶기)은 진행식 자견기를 사용하여 수행된다. 자견은 40°C 정도의 온도에서 고치를 침지하는 것을 시작하여, 100°C 이상의 온도에서 고온 처리하고 다시 75°C 정도의 저온부에서 저온 처리 후 다시 고온 처리하여 비등 온도에서 서서히 60°C 정도까지 온도를 낮추는 과정으로 진행된다. 이러한 자견 과정을 통하여 고치층의 세리신이 팽창하게 되어 고치 내강으로 증기나 온수의 출입이 용이하게 된다. 그러나 녹색형광 누에고치를 정상 누에고치의 자견 조건으로 자견시 고온에 의해서 외래단백질인 녹색형광단백질이 심각한 변성이 초래하게 되고, 결과적으로 누에고치는 녹색형광색을 잃게 된다. 따라서 본 연구에서는 고온 처리가 아닌 저온 감압처리에 의해 누에고치 내강 내로 침지액을 침투시키고자 하였다. 저온에서 녹색형광 누에고치의 세리신을 화학적으로 팽윤시켜 고치 내강 내로 침지액을 침투를 용이하게 하기 위하여 알칼리제로는 탄산나트륨(Na_2CO_3)을, 계면활성제로는 비이온계 계면활성제인 Triton X100을 사용하였다. 그리고 침지액의 고치 내강 내로의

Table 1. Weight ratio of dried cocoon after heat treatment of ordinary and fluorescence cocoons, respectively.

Experiment	Ordinary cocoon	Fluorescence cocoon
Temperature (°C)	113 ~ 62	55 ~ 60
Times (h)	6	15
Ratio of dried cocoon (%)	42%	38%

최적 침투를 위하여 탄산나트륨과 Triton X100 적정 조합 처리 농도를 결정하고자 하였다.

세리신의 팽윤 및 연화 작용을 하는 탄산나트륨의 농도에 따른 고치 내강 내 침지액의 침투 효율을 분석하기 위하여 0.1% 농도의 Triton X100을 0.1, 0.2, 0.3, 0.4% 농도의 탄산나트륨(Na_2CO_3)과 각각 조합 처리한 침지액을 제조하였다. 탄산나트륨의 농도를 달리한 각각의 침지액을 60°C까지 가온한 후 누에고치를 20분간 침지하고, 충청북도 농업기술원 잠사시험장에서 자체 개발한 감압기에 옮겨 -620 mmHg까지 감압을 실시한 후 이 상태로 1~5분간 유지한 다음 5~10분에 걸쳐 서서히 상압으로 복압을 실시하였다. 감압과 복압은 3회 반복 실시한 후 각각의 Triton X100과 탄산나트륨 조합 처리 침지액에 대하여 누에고치 내강 내 침지액의 침투율을 조사하였다. 그 결과, 0.1% 농도의 Triton X100과 0.2% 농도의 탄산나트륨을 조합 처리했을 때 고치 내강 내 침지액의 침투율이 100%로 가장 높게 나타났다(표 2).

누에고치층의 교착하여 침지액의 침투작용을 용이하게 하는 비이온계 계면활성제인 Triton X100의 농도에 따른 고치 내강 내 침지액의 침투 효율을 분석하기 위하여 상기 결과에 가장 우수한 결과를 나타낸 0.2% 농도의 탄산나트륨을 0, 0.1, 0.2, 0.3% 농도의 Triton X100과 각각 조합 처리한 침지액을 제조하고, 상기와 동일한 방법으로 감압 처리한 다음 누에고치 내강 내 침지액의 침투율을 조사하였다. 그 결과, Triton X100 무처리 및 0.1% 농도의 Triton X100 처리구에서 고치 내강 내 침지액의 침투율이 100%로 가장 높게 나타났다(표 3). 그러나 Triton X100 무처리의 경우에는 비록 100%의 침투율을 나타내었지만 0.1% Triton X100 처리구에 비하여 실폴립율이 저조한 것으로 나타났다. 따라서, 녹색형광 누에고치 내강 내 침지액의 침투율이 가장 우수한 침지액 제조 조건은 0.1% 농도의 Triton X100과 0.2% 농도의 탄산나트륨의 조합 처리로 판단되었다.

Table 2. Effect of sodium carbonate concentration (Na_2CO_3) on the penetration ratio of solution into the fluorescence silk cocoons

Na_2CO_3 (%) Triton(%)	0.1	0.2	0.3	0.4
0.1	71.4%	100%	71.4%	78.6%

Table 3. Effect of nonionic surfactant (Triton X100) on the penetration ratio of solution into the fluorescence silk cocoons

Triton(%) Na_2CO_3 (%)	0.1	0.2	0.3	0.4
0.1	100%	100%	85.7%	85.7%

Table 4. Effect of numbers of vacuum on the penetration ratio of solution into the fluorescence silk cocoons

Numbers of vacuum	1	2	3	4
Penetration ratio (%)	70%	80%	100%	100%

Table 5. Effect of intensity of pressure on the penetration ratio of solution into the fluorescence silk cocoons

Pressure (mmHg)	-600	-620	-640	-680
Penetration ratio (%)	90%	100%	100%	100%

다음으로는 진공감압 횟수와 감압도에 따른 녹색형광 누에고치 내강 내 침지액의 침투율을 조사하였다. 이때 침지액은 상기에서 가장 우수한 결과를 나타낸 0.1% 농도의 Triton X100과 0.2% 농도의 탄산나트륨을 조합하여 사용하였다. 진공감압 횟수를 1, 2, 3, 4회로 달리하여 처리했을 때 3회 및 4회 처리구에서 침투율이 100%로 가장 높게 나타났다. 그러나 4회 진공감압 처리 시 3회 처리구에 비하여 생사 내 마디수가 증가해 생사량이 감소하는 결과를 초래했다. 따라서 녹색형광 누에고치 내강 내 침지액의 진공 침투는 감압과 복압을 3회 반복처리 시 가장 우수한 것으로 판단되었다(표 4). 또한, 감압도를 -600, -620, -640, -680 mmHg로 달리하여 침투율을 조사한 결과, -600 mmHg를 제외한 모든 진공감압 처리구에서 침투율이 100%로 나타났지만 -640 mmHg 이하의 진공감압시 침지액이 역류하여 기계고장의 결과를 초래하였다. 따라서 녹색형광 누에고치 내강 내 침지액의 진공 침투에 가장 적합한 감압도는 -620 mmHg인 것으로 판단되었다(표 5).

3. 녹색형광 누에고치의 조사

상기에 의해 감압 처리에 의한 침지액이 침투된 녹색형광 누에고치는 감압기에서 꺼낸 후 침지액의 제거를 위하여 수돗물에 10~20분 수세하고, 충청북도 농업기술원 잠사시험장에서 자체 개발한 세미조사기를 이용하여 조사하였다. 이때 조사는 실켜는 속도 160 m/min, 목적 섬도 21 denier, 실켜기 시작 시 고치 갯수 7~10개, 실끝 찾기 탕온도 68~70°C, 실켜기 탕온도는 38~40°C로 설정하여 실시하였다. 그 결과, 녹색형광 누에고치로부터 고유의 녹색형광색의 변성 없이 자연광 하에서도 천연의 녹색형광색을 띄는 생사를 생산할 수 있었고, 생산된 생사를 어둡속에서 특정 파장의 빛을 조사했을 때 뚜렷한 녹색형광을 확인 할 수 있었다(그림 1).

이상의 결과로써, 우리는 재조합 녹색형광단백질(EGFP)

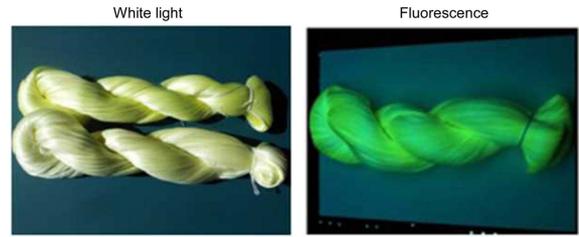


Fig. 1. Green fluorescent silks produced by a cooking method adequate for a recombinant fluorescence cocoons. The picture is take through a yellow filter under a blue LED.

을 포함한 누에고치로부터 녹색형광 단백질의 변성을 초래하지 않는 누에고치의 저온건조 방법, 저온 진공감압 처리에 의해 고치 내강 내 침지액 침투방법 및 조사방법을 개발하였다. 그 결과, 녹색형광 누에고치로부터 천연의 녹색형광색을 띄는 생사를 생산할 수 있었다. 그리고 생산된 녹색형광 생사는 별도의 염색처리 없이 패션의류, 벽지, 조명등갓, 액세서리, 인테리어용품 등의 고부가가치 실크소재로 적용이 기대된다.

적 요

최근 국내 농촌진흥청 국립농업과학원 연구팀에서 농가 보급품종인 백옥잠(잠123×잠124)을 이용하여 피브로인 중쇄 유전자 내에 녹색형광유전자(EGFP)를 도입하여 녹색형광 누에고치를 생산하는 형질전환누에 개발에 성공한 바 있다. 그리고 녹색형광 누에고치는 견사의 주성분인 fibroin heavy chain 유전자에 삽입된 형광유전자의 발현으로 정련을 해도 형광단백질의 고유한 색깔이 그대로 유지되며, 자연광 하에서도 도입 형광유전자 고유의 형광색을 나타낸다. 그러나 형광누에고치는 기존의 100°C 내외의 고온 처리에 의한 건조, 자건 및 조사 방법을 이용하면 형광단백질에 심각한 변성이 초래되고 이로 인해 형광색깔을 잃게 되는 단점을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 녹색형광 누에고치로부터 녹색형광단백질의 변성을 초래하지 않는 누에고치의 저온건조 방법, 저온 진공감압 처리에 의해 고치 내강 내 침지액 침투방법 및 조사방법을 개발하여, 녹색형광 누에고치로부터 천연의 녹색형광색을 띄는 생사를 생산하였다. 그리고 이들 생산된 녹색형광 생사는 별도의 염색처리 없이 패션의류, 벽지, 조명등갓, 액세서리, 인테리어용품 등의 고부가가치 실크소재로 적용이 기대된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번

호: PJ009044032013) 및 농림축산식품부 생명산업기술 개발사업(과제번호: 311059-4)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

- Hino R, Tomita M, Yoshizato K (2006) The generation of germline transgenic silkworms for the production of biologically active recombinant fusion proteins of fibroin and human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* **27**, 5715~5724.
- Kim SW, Yun EY, Kim SR, Park SW, Kang SW, Kwon OY, Goo TW (2011) Construction of transgenic silkworms expressing human stem cell factor (hSCF). *J Life Sci* **21**, 12~17.
- Kojima K, Kuwana Y, Sezutsu H, Kobayashi I, Uchino K, Tamura T, Tamada Y (2007) A new method for the modification of fibroin heavy chain protein in the transgenic silkworm. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 2943~2951.
- Kurihara H, Sezutsu H, Tamura T, Yamada K (2007) Production of an active feline interferon in the cocoon of transgenic silkworms using the fibroin H-chain expression system. *Biochem Biophys Res Commun* **355**, 976~980.
- Ogawa S, Tomita M, Shimizu K, Yoshizato K (2007) Generation of a transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon: production of recombinant human serum albumin. *J Biotechnol* **128**, 531~544.
- Prudhomme JC and Coble P (2002) Perspectives in silkworm (*Bombyx mori*) transgenesis. *Curr Sci* **83**, 432~438.
- Royer C, Jalabert A, Da Rocha M, Grenier AM, Mauchamp B, Couble P, Chavancy G (2005) Biosynthesis and cocoon-export of a recombinant globular protein in transgenic silkworms. *Transgenic Res* **14**, 463~472.
- Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P (2000) Germline transformation of the silkworm using a piggyback transposon-derived vector. *Nat Biotechnol* **18**, 81~84.
- Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, Shimizu K, Nakamura N, Tamura T, Yoshizato K (2003) Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat Biotechnol* **21**, 52~56.
- Tomita M, Hino R, Ogawa S, Iizuka M, Adachi T, Shimizu K, Sotoshiro H, Yoshizato K (2007) A germline transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon. *Transgenic Res* **16**, 449~465.
- Wurm FM (2003) Human therapeutic proteins from silkworms. *Nat Biotechnol* **21**, 34~35.
- Zhao Y, Li X, Cao G, Xue R, Gong C (2009) Expression of hIGFI in the silk glands of transgenic silkworms and in transformed silkworm cells. *Sci China C Life Sci* **52**, 1131~1139.