

혼합 실크 피브로인막의 투명도

조유영* · 권해용 · 여주홍 · 이광길
농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과

Transparency of various silk fibroin membranes

You-Young Jo*, HaeYong Kweon, Joo-Hong Yeo, and Kwang-Gill Lee

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

(Received September 28, 2013, Accepted October 29, 2013)

ABSTRACT

Silk fibroin is a natural biomaterial that has the biocompatibility and other many advantages. But as a silk fibroin membrane thickness increases, the transparency becomes more opaque. Because the transparency of membranes tissue such as the cornea and dura mater are necessary, transparent membrane is required to replace these transparent membranes. In this study, we fabricated blending silk fibroin membranes that made by mixing the various inorganic salts or polymer in an aqueous solution of silk fibroin. The transparency of the membranes were analyzed. the transparency of these membranes is very different, depending on the mixed materials. Inorganic salts mixed silk membrane was more transparent than the polymer mixed one. Especially, the silk fibroin membrane with calcium chloride was very transparent. We showed the possibility of blending silk fibroin membrane, which can be used in perfect transparent membrane such as the cornea. In the future, we expect that the transparent blending silk fibroin membrane can be used in various medical applications.

Key words : Silk fibroin, Salt, Polymer, Transparency

서 론

인류사회가 고도로 발달함에 따라 의료용품 뿐 만 아니라 생활용품 등 다양한 분야에서 좀 더 친환경적이고, 생체친화적인 천연물을 이용한 제품개발에 대한 요구가 증폭되고 있다.

실크는 과거 의류소재로서 각광을 받아 왔으나, 합성 섬유의 등장과 높은 인건비의 벽에 부딪쳐 의류소재 (명주실)로서의 사용이 급격하게 줄어들었다. 하지만 다양한 개발을 통해 생활용품(비누, 치약, 염모제, 화장품), 식료품(뇌기능개선제, 실크함유 장류(된장, 고추장, 간장 등)), 의료용소재로서 재탄생을 거듭하고 있다. 그 중 의료용 소재로서 실크연구는 2000년 이후로 급격히 증가하였으며, 세포 성장과 증식(Kim et al. 2009), 뼈(Meinel et al. 2005), 고막(Kim et al. 2010), 방광(Gomez et al. 2011), 반월판 (Mandal et al. 2011), 심

장(Patra et al. 2012), 신경도관 (Huang et al. 2012)의 재생 등 다양한 기관의 재생을 위한 생체재료로 연구되고 있다.

이전 연구에서 실크 용해 시간 및 실크함량 등 실크의 용해방법에 따라 제작된 실크 생체막의 투명도와 두께, 유연성 등의 물리적 특징이 현저히 차이를 확인하였다 (Jo et al. 2012). 그러나 실크막의 두께가 증가할수록 실크막은 투명도를 잃고 매우 불투명한 막으로 바뀌게 된다. 인체에 필요한 생체막 중 각막이나 뇌경막 같이 투명도가 반드시 필요한 막의 경우에는 실크만을 이용하여 투명한 생체막을 제작하기 어렵고 특히 뇌경막과 같은 두꺼운 생체막은 더욱 그러하다.

본 연구에서는 실크막의 투명도를 증가시켜 의료용 생체막 뿐 만 아니라 산업용 투명막으로 사용하고자 다양한 무기염과 고분자 물질 등을 실크수용액과 다양한 농도로 혼합하여 혼합 실크막을 제작하고 그 투명도를 평가하였다.

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

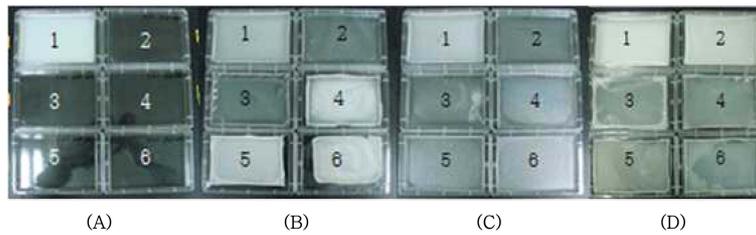


Fig. 1. Transparency of blended silk membranes A) Calcium chloride, B) Sodium acetate, C) Potassium chloride, D) Glycerol 1) Control (silk only), 2) 0.05 g, 3) 0.1 g, 4) 0.2 g, 5) 0.3 g, 6) 0.4 g mixture.

재료 및 방법

1. 실크 피브로인 수용액 제조

누에고치로부터 세리신을 제거하기 위하여 마르세이유 비누를 넣고 고온 고압에서 정련하여 정련수를 만들었다. 정련수 70 g을 염화칼슘 : 물 : 에탄올 = 1 : 8 : 2 (몰비율)의 용액으로 80°C에서 60분 동안 용해시켰다. 이 용액을 부직포와 탈지면으로 거른 뒤 3일 동안 투석하여 염을 제거하여 실크 피브로인 수용액을 만들었다. 제조된 실크 피브로인 수용액의 농도는 수분분석기(MA100C, Sartorius, Germany)를 이용하여 105°C에서 측정하였다. 이 수용액의 농도를 높이기 위하여 투석막에 실크 피브로인 수용액을 넣고 PEG 20,000을 투석막 위에 뿌려 24시간 동안 농축하였다. 농축된 수용액의 농도는 수분분석기를 이용하여 측정하였다.

2. 혼합 실크 피브로인 막 제작

혼합 실크막을 만들기 위해, 위에서 만들어진 실크 피브로인 수용액의 농도를 계산하여 정확하게 1 g의 실크 피브로인이 함유되도록 실크 피브로인 수용액을 비이커에 넣고 혼합물을 각각 0~0.4 g까지 가하여 200 rpm의 속도로 30분간 교반하였다. 충분히 혼합된 수용액을 투명한 트레이 플레이트(77 × 111 mm)에 넣어 25°C, 습도 50%의 항온습실실에서 일주일 동안 건조하여 혼합 실크 피브로인 막을 제작하였다. 혼합 실크 피브로인 막을 제작하기 위해 사용된 혼합물은 무기염 종류로 염화칼슘, 염화칼륨, 염화나트륨, 아세트산나트륨을 사용하였으며, 고분자 물질로는 젤라틴, 아가로스, 글리세롤, PEO 등을 사용하였다.

3. 혼합 실크 피브로인 막의 투명도 분석

실크 피브로인 막의 투명도를 측정하기 위하여 장비를 제작하였다. 제작된 막의 투명도를 평가하는 방법을 간략히 설명하면, 15포인트의 글씨가 씌어진 판을 바닥에 장착하고 바닥으로부터 실크막의 거리를 멀리하여 글씨가 선명히 보이는 정도로 투명도를 평가하였다. 바닥에 생체막을 대고 글씨가 전혀 보이지 않을 경우-(opaque), 바닥에

대고 글씨가 보일 경우, 1 cm 거리를 두고 글씨가 보일 경우 *로 표시하였다. 투명도 측정점수는 매 1 cm 증가 될 때마다 *표시를 하나씩 추가하였으며, 최장 5 cm까지 측정하였다. 5 cm 거리에서도 실크막 아래의 글씨가 선명히 보이면 ***** (very transparent)로 표시하였다.

4. 통계학적 분석

각 실험은 최소 8회 이상 반복 실험을 수행하였다. 통계분석 (STASTICA)은 mean ± SD로 표시하였고, ANOVA (one-way analysis of variance) 분석을 통하여 신뢰도 99% ($p < 0.05$)로 분석하였다.

결과 및 고찰

실크는 조직공학과 재생의학의 발전과 더불어 각광받는 생체재료로 많은 연구자에 의해 막, 스펀지, 하이드로젤 등 다양한 형태와 용도로 연구되고 있다(Sofia et al. 2001, Lv et al. 2004, Kim et al. 2005, Kim et al. 2010, Mandal et al. 2011, Masahiro et al. 2011, Diab et al. 2012). 실크막에 대한 연구 또한 뼈재생을 위한 나노섬유막 (Kim et al. 2005), 고막(Kim et al. 2010), 피부(Wendt et al. 2011) 등 다양하게 이루어지고 있다. 하지만 실크는 다른 물질을 혼합하지 않고 막을 만들 경우 약 100 μm 이하의 얇은 두께에서는 매우 투명한 막을 제작할 수 있지만 두께가 두꺼워질수록 그 투명도는 현저히 저하되며 뇌경막과 같은 두께(1 mm)의 막을 제작할 경우 매우 불투명해진다. 뇌경막의 경우 현재 소로부터 추출한 콜라겐막을 이용하여 불투명한 막이 시판되고 있다. 하지만 이 콜라겐막은 뇌수술시 출혈부위의 확인이 어려워 막을 자주 들추어 보아야 하는 불편을 야기하므로 투명한 뇌경막 개발 요구가 계속해서 제기되고 있는 실정이다. 또한 각막과 같은 막조직은 아주 투명하고 깨끗한 생체막만이 이를 대체할 수 있다.

본 연구에서는 두께가 증가하여도 투명도를 유지하는 실크 막을 제작하기 위하여, 실크 피브로인을 이용하여 실크 피브로인 수용액을 제작한 후 여기에 무기염류 또는 고분자 물질을 혼합하여 혼합 실크 피브로인 막을 제

Table 1. Transparency of the potassium chloride blended silk membranes

Mixture concentration (g)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
Transparency	-	*****	*****	**	**	*

*****very transparent;-opaque.

Table 2. Transparency of the sodium chloride blended silk membranes

Mixture concentration (g)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
Transparency	-	*****	*****	****	**	**

*****very transparent;-opaque.

Table 3. Transparency of the calcium chloride blended silk membranes

Mixture concentration (g)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
Transparency	-	*****	*****	*****	*****	*****

*****very transparent;-opaque.

Table 4. Transparency of the sodium acetate blended silk membranes

Mixture concentration (g)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
Transparency	-	*****	*****	-	-	-

*****very transparent;-opaque.

작하였다. 만들어진 실크 피브로인 수용액의 농도는 약 3% 내외였으며, 생체막 제작을 위해 PEG 20,000을 이용하여 7%까지 농축을 하였다. 농축된 실크 피브로인 수용액 1 g에 대하여 혼합하고자 하는 무기염류나 고분자물질의 양을 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 g씩 각각 혼합하여 충분히 교반 후 혼합 실크 피브로인 막을 제작하였다 (Fig. 1). 혼합 실크 피브로인 막은 혼합물의 양에 따라 0.15 ~ 0.5 mm 두께의 막이 제작되었다. 자세히 살펴보면, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 g의 혼합물이 첨가되었을 때, 각각 0.12, 0.16, 0.24, 0.30, 0.37, 0.52 mm의 평균 두께를 갖는 실크막이 제작되었다. 혼합 실크 피브로인 막의 투명도를 살펴보면 0.05 g의 혼합물이 첨가되었을 때, 모든 무기염류 혼합 실크 피브로인 막에서 5 cm의 높이에서도 아래 글씨가 보일 정도의 투명한 막을 제작할 수 있었다. 염화칼륨을 혼합한 막의 경우(Table 1), 0.05와 0.1 g이 혼합되었을 때 투명도를 유지하였지만 혼합한 염화칼륨의 양이 늘어날수록 투명도가 떨어졌다. 염화나트륨을 혼합한 막의 경우(Table 2), 염화칼륨을 혼합한 막과 비슷한 양상을 보였으며, 염화칼륨보다는 더 투명한 막이 제작되었다. 염화칼슘을 혼합한 막의 경우(Table 3), 혼합된 염의 양과 관계 없이 모든 범위에서 아주 투명하고 깨끗한 막이 만들어

Table 5. Transparency of the glycerol blended silk membranes

Mixture concentration (g)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
Transparency	-	-	**	***	***	***

*****very transparent;-opaque.

Table 6. Transparency of the gelatin blended silk membranes

Mixture concentration (g)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
Transparency	-	-	*	*	-	-

*****very transparent;-opaque.

졌다. 그림 1에서 보는 것과 같이 그 투명도는 매우 우수하였다. 아세트산나트륨을 혼합한 막의 경우(Table 4), 0.05와 0.1 g이 첨가 되었을 때는 염화칼륨과 비슷한 양상을 보였지만 0.2 g 이상의 양이 첨가되면 실크만 이용하여 만들어진 대조군보다 더 불투명한 막이 제작됨을 알 수 있었다. 대부분의 무기염류 혼합막은 혼합물의 양이 증가할수록 막의 투명도도 함께 상실하는 특징을 보여주었다. 고분자를 혼합한 막의 경우, 염을 혼합한 막에 비해 대체로 불투명한 막이 제작되었으나 글리세롤을 혼합할 경우 혼합된 양이 증가될수록 오히려 투명도가 증가됨을 확인할 수 있었다. 또한 젤라틴을 혼합할 경우에는 막의 생성이 제대로 되지 않고 공극이 생기는 막으로 제작되었다. PEO와 아가로스를 혼합한 생체막 역시 투명도가 증가되지 않았다(data not shown). 이상의 결과에서 염화칼슘이 함유된 생체막의 경우는 매우 기대되는 투명도를 보여주었지만, 고분자물질과 무기염류의 대부분은 예상과 달리 실크막의 투명도를 증가시키지 못하였다. 혼합 실크막은 실크 단백질과 염과 반응하여 실크 사슬에 각 이온들이 끼어들어가면서 미세환경이 변화되고 실크단백질의 2차구조에 영향을 주어, 실크막의 구조가 랜덤에서 β-sheet구조로 안정화 되면서 투명도를 증가시켰을 것으로 예상되며, 1가 이온과 2가 이온 등 염의 특성과 관련이 있을 것으로 생각된다. 향후, 실크막의 구조적 변화를 관찰하기 위한 DSC, IR, X-선 회절분석과 같은 기기분석을 통해 실크구조의 변화 및 투명도에 영향을 미치는 원인을 밝히고자 한다. 본 연구에서 보여준 염화칼슘이 혼합된 실크막은 인체조직 중 투명한 막이 필요한 곳에 사용될 수 있을 뿐 아니라, 다양한 분야에서 투명한 막이 필요한 산업용도로도 이용가치가 있다고 보여진다.

적 요

실크는 천연고분자 단백질로 생체친화적이며, 최근 조

직공학 연구가 활성화 되면서 각광받는 생체재료이다. 하지만 실크 단독으로 실크막을 제작하였을 때, 얇은 막은 투명도가 있지만 두께가 두꺼워지게 되면 실크막은 매우 불투명한 막으로 바뀌게 된다. 인체조직에서 사용되는 막 중 각막이나 뇌경막 등 투명도가 반드시 필요한 생체막에 실크막을 이용하기 위해서는 실크막의 투명도가 반드시 요구된다. 따라서, 본 연구에서는 실크 피브로인 수용액에 다양한 무기염류와 고분자물질을 혼합하여 혼합 실크막을 제작하고 그 투명도를 분석하였다.

제작된 혼합 실크막은 혼합된 물질에 따라 투명도가 매우 달랐다. 무기 염류가 혼합된 실크막의 경우 고분자물질과 혼합된 실크막에 비해 더 투명도가 높았으며, 특히 염화칼슘이 혼합된 실크막의 투명도는 매우 투명하였다. 따라서, 각막 등 완벽한 투명도를 요구하는 생체막으로 실크막을 사용할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다. 향후 혼합 실크막의 물리적 특성 규명을 통해 좀 더 물성이 개선된다면, 투명한 실크막이 다양한 용도로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ906973)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.

Gomez P, Gil ES, Lovett ML, Rockwood DN, Vizio DD, Kaplan DL, Adam RM, Estrada CR, Mauney JR (2011) The effect of manipulation of silk scaffold fabrication parameters on matrix performance in a murine model of bladder augmentation. *Biomaterials* **32**, 7562~7570.

Huang W, Begum R, Barber T, Ibba V, Tee NCH, Hussain M, Arastoo M, Yang Q, Robson LG, Lesage S, Cheysens T, Skaer NJV, Knight DP, Priestley JV (2012) Regenerative potential of silk conduits in repair of peripheral nerve injury

in adult rats. *Biomaterials* **33**, 59~71.

Jo YY, Kweon HY, Lee KG, Lee HS (2012) A study of changes 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 KH, Jeong L, Park HN, Shin SY, Park WH, Lee SC, Kim TI, Park YJ, Seol YJ, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC, Han SB, Chung CP (2005) Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *Journal of Biotechnology* **120**, 327~339.

Kim KH, Kim MH, Lim YH, Park SR, Choi BY, Park HC, Yoon SH, Min BH, Park HS (2009) A comparative biocompatibility study of chondrocyte-driven ECM and silk fibroin scaffolds in vitro and in rat acute traumatic brain injury. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **6**, 1420~1428.

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.

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, Park SH, Gil ES, Kaplan DL (2011) Multilayered silk scaffold for meniscus tissue engineering. *Biomaterials* **32**, 639~651.

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.

Meinel L, Fajardo R, Hofmann S, Langer R, Chen J, Snyder B, Novakovic GV, Kaplan D (2005) Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone* **37**, 688~698.

Patra C, Talukdar S, Novoyatleva T, Velagala SR, Muhlfeld C, Kundu B, Kundu SC, Engel FB (2012) Silk protein fibroin from *Antheraea mylitta* for cardiac tissue engineering. *Biomaterials* **33**, 2673~2680.

Sofia S, McCarthy MB, Gronowicz G, Kaplan DL (2001) Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* **54**, 139~148.

Wendt H, Hillmer A, Reimers K, Kuhbier JW, Schafer F, Allmeling C, Kasper C, Vogt PM (2011) Artificial skin-culturing of different skin cell lines for generating an artificial skin substitute on cross-weaved spider silk fibres. *PLOS ONE* **6**, 1~10.