

알코올의 농도에 따른 실크 비드의 적외선 분광 특성

김성국 · 조유영 · 이광길 · 김기영 · 김현복 · 권해용*
농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과

Effect of ethanol concentration on the infrared spectroscopic characteristics of silk beads

Sung-Kuk Kim, You-Young Jo, Kwang-Gill Lee, Kee-Young Kim, Hyun-bok Kim and HaeYong Kweon*
Sericultural & Apicultural Materials Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 565-851, Korea

(Received September 17, 2015, Revised October 21, 2015, Accepted October 26, 2015)

ABSTRACT

The structural transition of silk protein has been induced by various method including alcohol treatment. To know the effect of alcohol concentration on silk beads conformation, silk beads were prepared in different alcohol concentration (100%, 70%, and 50%) and then examined the infrared spectra of silk beads. Silk beads prepared in 100% alcohol showed at 1265 cm^{-1} attributed β -sheet conformation and did not showed a characteristic absorption peak from model drug. However, silk beads in 70% and 50% alcohol showed some peaks originated from model drug including 2933 cm^{-1} , 1069 cm^{-1} , and 973 cm^{-1} . These results means that the micro-environment of silk beads was affected by alcohol concentration.

Key words : Conformation, Absorption spectra, Domestic silkworm

서 론

누에고치로 만든 수술용 실크 봉합사는 생체적합성이 우수한 천연 재료로 현재까지 의료 현장에서 사용되고 있다. 최근에 들어 세포 및 조직에 대한 실크단백질의 생체적합성이 검증되고 있어 이를 활용한 실크단백질을 이용한 의료용 소재 개발 연구에 관한 관심이 증가하고 있다 (Vepari and Kaplan 2007, Meinel et al. 2005, Minoura et al. 1995). 고막재생용 실크 패치(Kim et al. 2010), 치과용 실크 차폐막(Seok et al. 2013, Kweon et al. 2010a), 조직공학용 실크 지지체(Cho et al. 2013, Zhao et al. 2011), 약물전달용 매트릭스(Kim et al. 2014) 등 다양한 생체재료로서 실크 단백질을 활용하기 위한 연구 개발이 추진되고 있다(Kweon et al. 2014).

실크단백질을 이용한 소재 개발을 위해서는 중성염 등과 같은 물질을 이용하여 재생 견단백질을 제조하고, 필요한 형태의 모양을 만드는 과정이 일반적으로 행하여 진

다. 이 과정에서 얻어지는 실크단백질 제형은 비결정 구조를 가지는 것으로 물성이 약하고 물에 녹기 쉬운 특성을 가지는 것으로 알려져 있다. 따라서, 재생 실크단백질 제형의 안정화를 위하여 화학적인 가교 반응, 열처리, 인장 처리 등 화학적 물리적 자극을 줘서 형태를 안정화 시킨다(Silva et al. 2008, Hu et al. 2006, Kweon and Park 1999, Tsukada 1986). 실크단백질 제형의 안정화에 가장 널리 사용되고 있는 것 중의 하나인 알코올 처리는 가장 실크단백질의 구조 전이에 흔히 사용되는 방법이다. 그러나 알코올의 농도에 따른 구조 전이 효과에 대한 고찰은 쉽게 발견되지 않는다.

실크단백질, 알부민 등과 같은 천연물 유래 고분자 비드는 독성이 없으면서 생분해되는 특성을 가지고 있어 고분자약물 연구 모델로 많이 활용되고 있다(Chavidi et al. 2012, Kim et al. 2014). 특히 실크는 소수성의 특성이 강한 피브로인과 친수성을 띠는 세리신으로 구성되어 있어 입자상 소재화 연구가 활발하게 진행되었다. 실크 피브로

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

인의 친수성을 대표적인 생체재료인 PEG로 보완하여 나노입자화한 연구(Kweon et al. 2010b), 피브로인과 세리신의 알코올성 물질에 대한 용해성을 이용한 비드화 연구 등이 보고되고 있다(Lee et al. 2003, Nam and Park 2001).

본 연구에서는 알코올 농도에 따른 가잠 실크단백질의 구조 전이 특성을 고찰하기 위하여 알코올의 농도에 따라 제조된 실크 비드의 적외선 분광분석 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

시험재료로는 경북 울진 소재의 의료용 누에고치 생산 시범농가에서 생산한 백옥잠 누에고치를 사용하였다. 누에고치는 건전과정을 거쳐 습도가 낮은 견창고에 보관하였다.

2. 비드 제조

백옥잠 누에고치는 마르세이유 비누 0.5% (o.w.f), sodium carbonate 0.3% (o.w.f) 수용액으로 용비 1 : 50의 조건하에서 95°C에서 1시간 동안 2회에 걸쳐 정련하였으며, 정련한 누에고치 70g을 5시간동안 CaCl₂ : H₂O : EtOH = (1 : 8 : 2) mol 비의 혼합용매에 용해, 투석하여 제조한 피브로

인 용액을 비드 제조용 실크단백질 용액으로 사용하였다. 실크단백질 비드는 알코올 용액에 떨어뜨려 제조하였다.

3. 적외선 분광분석

실크단백질 비드를 동결건조하여 고체 상태의 구조를 확인하기 위하여 적외선분광분석기(FT-IR spectrometer spectrum 100, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 KBr법에 의하여 적외선 분광분석을 하였다.

결과 및 고찰

1. 실크 비드 제조

천연적으로 생산되는 실크단백질은 소수성 아미노산인 글리신, 알라닌 등이 많이 분포하는 소수성 물질이다. 화학적으로 실크단백질을 결정화하기 위하여 사용되는 방법으로 알코올 처리법이 활용되고 있다. 본 연구에서는 실크 용액을 특정 약물이 포함되어 있는 알코올 용액에 떨어뜨려 실크 비드를 성공적으로 제조하였다.

2. 실크피브로인의 적외선 분광 특성

적외선 분광 분석은 실크단백질의 2차 구조를 잘 반영하는 특성이 있어 구조 분석에 널리 활용되고 있다. 알코

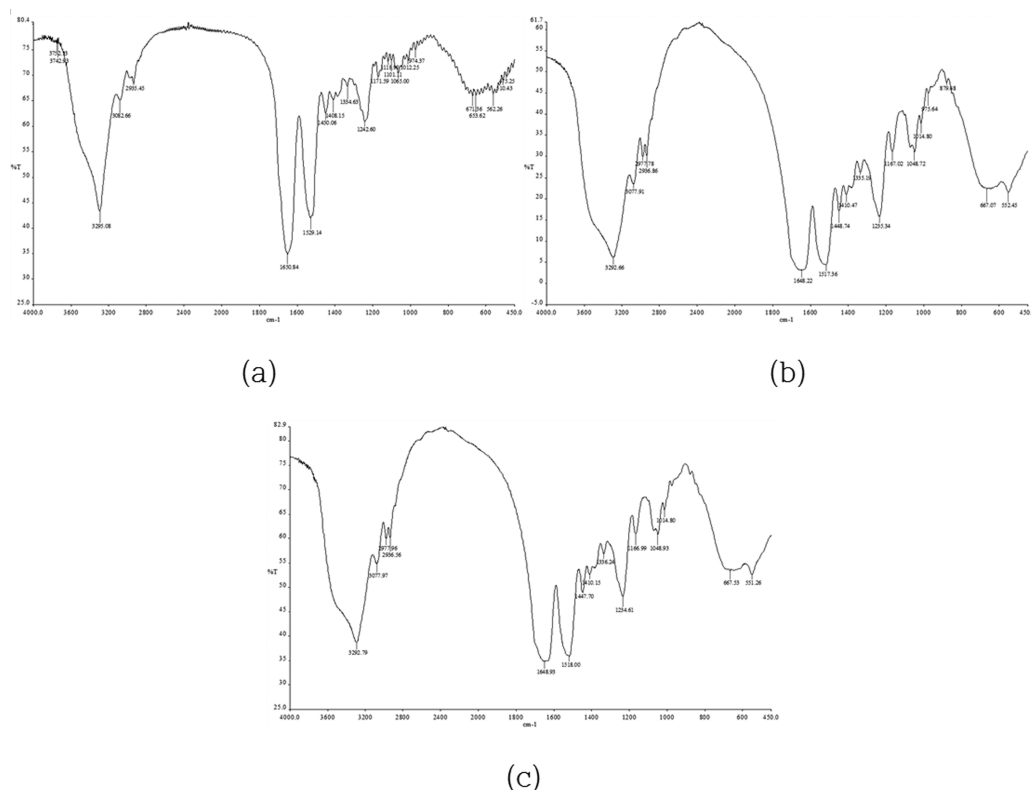


Fig. 1. IR spectra of silk beads prepared from 100% ethanol (a), 70% aqueous ethanol (b), and 50% aqueous ethanol (c).

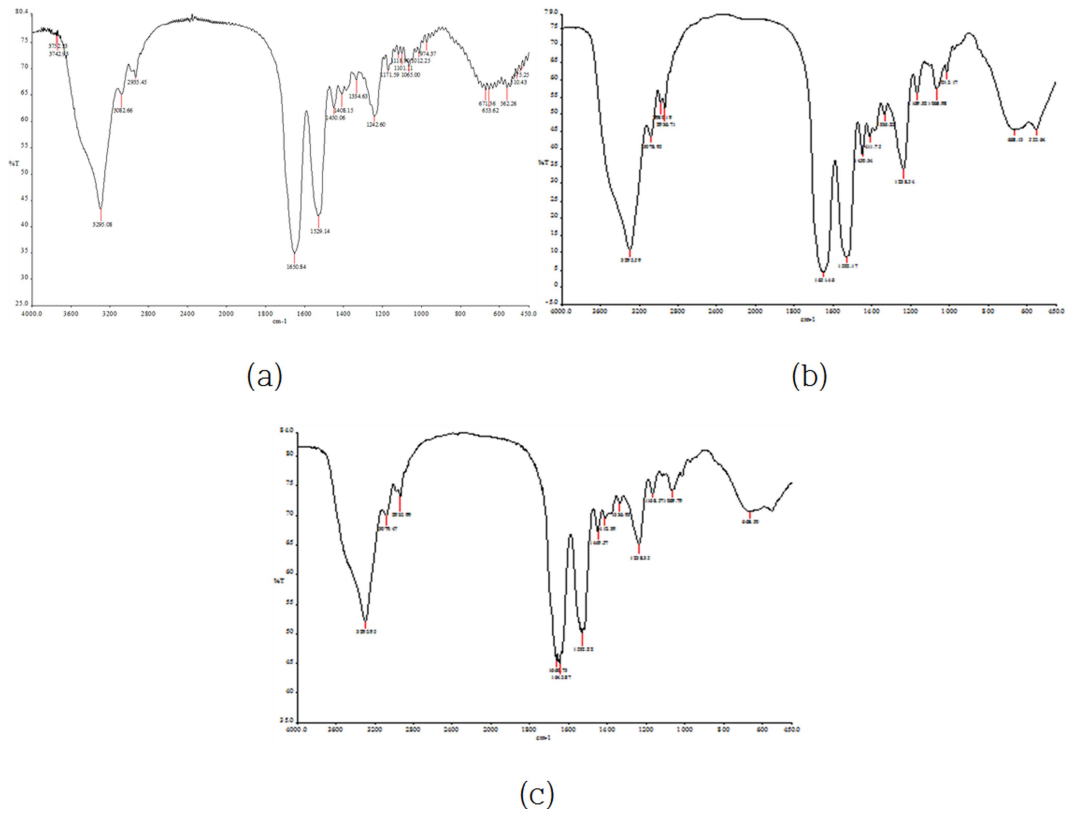


Fig. 2. IR spectra of silk beads prepared from 100% ethanol with 0% 4HR (a), with 0.1% 4HR (b), and with 1% 4HR (c).

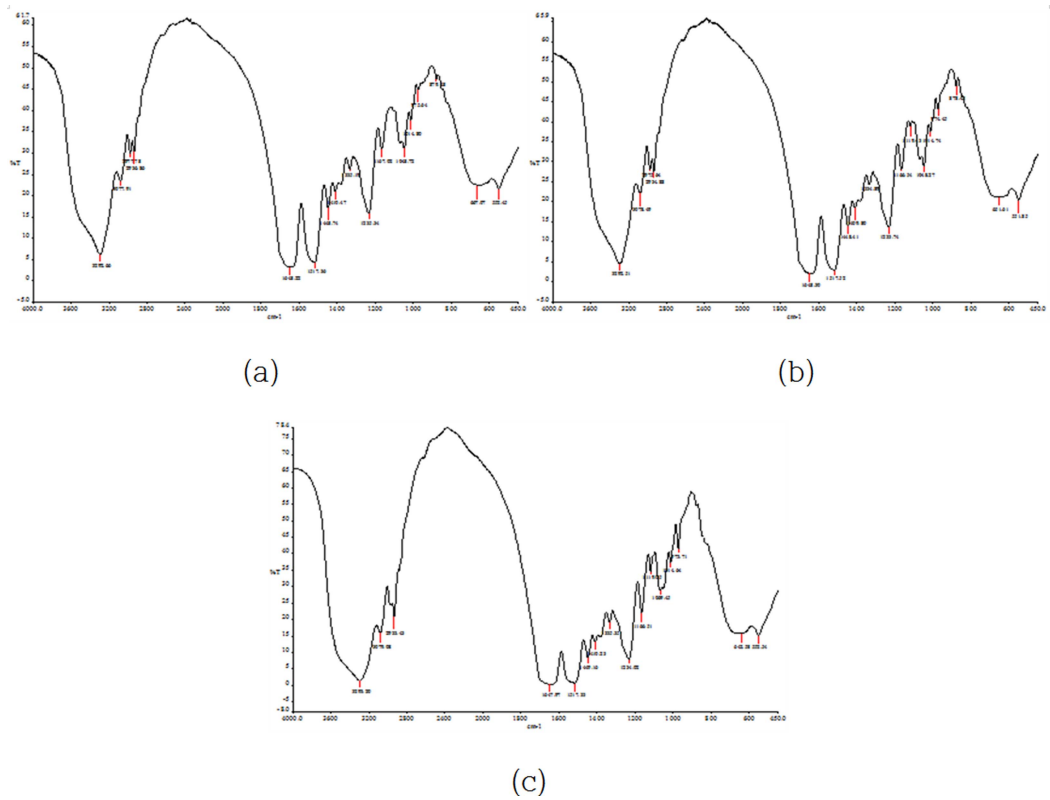


Fig. 3. IR spectra of silk beads prepared from 70% ethanol with 0% 4HR (a), with 0.1% 4HR (b), and with 1% 4HR (c).

알코올의 농도에 따른 실크 비드의 적외선 분광 특성

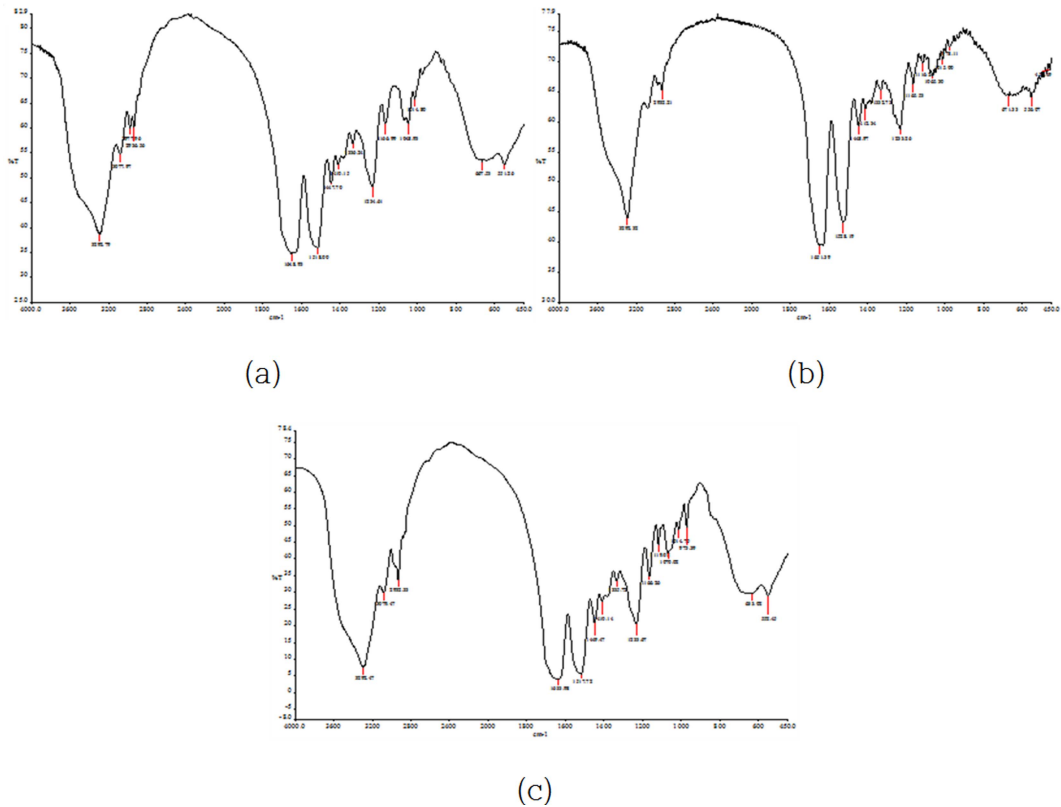


Fig. 4. IR spectra of silk beads prepared from 50% ethanol with 0% 4HR (a), with 0.1% 4HR (b), and with 1% 4HR (c).

올의 농도에 따른 적외선 분광분석 곡선을 그림 1에 나타내었다.

그림 1에서 보는 바와 같이 실크 단백질은 1265 cm^{-1} 부근에서 β -sheet 구조에 기인한 흡수대를 보여주고 있어 결정화되었음을 알 수 있다. 이러한 결과는 여러 연구자들에 의하여 보고되고 있는 결과와 일치하는 데이터로서, 종명과 속명이 다른 작잠 실크단백질의 알코올에 의한 구조전이에 대하여 보고한 Woo et al.(2000)에 의하면, 100% 에탄올은 구조 전이를 유발시키지 못하였으며 80% 에탄올에 의하여도 거의 구조전이가 발생하지 않는 것으로 보고하고 있다. 저농도(50 ~70%) 알코올 처리에 의하여 작잠 실크 단백질이 β -sheet 구조와 α -helix 구조의 특성을 나타낸 반면 고농도 에탄올 처리군에서는 β -sheet, α -helix 및 random coil 구조가 공존하는 것으로 나타난 이번 결과는 문헌에서 고찰한 결과와 일치하는 것으로 나타났다. 알코올의 농도에 따른 구조전이의 차이는 가잠 실크단백질과 야잠 실크단백질간의 차이를 보여준다.

4-hydroxyresocinol (4HR)의 함량 변화에 따른 100% 알코올 처리 실크단백질의 적외선 분광곡선을 그림 2에 나타내었다.

그림 2에서 보는 바와 같이 1% 4HR이 포함된 100% 에탄올 처리에 의하여 amide I 흡수대가 분지되는 효과 이외에는 특별한 변화가 관찰되지 않았다.

그림 3은 4-hydroxyresocinol (4HR)의 함량 변화에 따른 70% 알코올 처리 실크단백질의 적외선 분광곡선을 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 1% 4HR이 포함된 70% 에탄올 처리에 의하여 2933 cm^{-1} 부근의 지방족 alkane의 흡수대가 강하게 발현되고 1069 cm^{-1} 부근, 그리고 973 cm^{-1} 부근의 흡수대가 강하게 발현되는 것으로 나타났다.

4-hydroxyresocinol (4HR)의 함량 변화에 따른 50% 알코올 처리 실크단백질의 적외선 분광곡선을 그림 4에 나타내었다. 50% 알코올을 사용하였을 경우에도 1% 4HR이 포함된 에탄올 처리에 의하여 2933 cm^{-1} 부근의 지방족 alkane의 흡수대가 강하게 발현되고 1069 cm^{-1} 부근, 그리고 973 cm^{-1} 부근의 흡수대가 강하게 발현되는 것으로 나타났다. 이는 70% 알코올을 사용하여 제조한 실크 비드의 적외선 분광곡선 (그림 3)과 비슷한 결과를 보여주고 있다.

실크 비드 적외선 분광곡선에서 약물의 영향을 고찰하기 위하여 4HR의 적외선 분광 특성을 측정하여 그림 5에 나타내었다. 그림 5에서 보는 바와 같이 약물은 매우

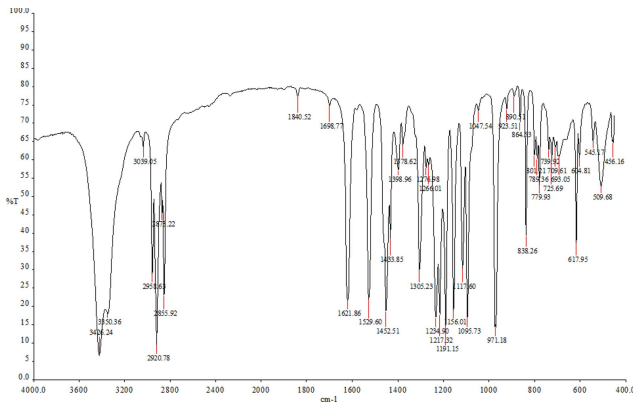


Fig. 5. IR spectrum of 4-hydroxyresocinol.

날카로운 흡수대를 가지고 있는 물질로 나타났다. 특히 그림 3과 4에서 발견되는 실크 비드의 특이 피크는 약물에서 관찰되는 적외선 분광흡수대와 일치하는 것으로 확인되었다.

에탄올의 농도(70%, 50%)에 따라 약물의 흡수대와 관련이 있는 2933 cm⁻¹ 부근, 1069 cm⁻¹ 부근, 그리고 973 cm⁻¹ 부근의 흡수대가 강하게 발현되기도 하고 100% 에탄올로 처리한 경우에는 이들 약물의 흡수대가 거의 발현되지 않은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 가잠 실크단백질의 알코올에 의하여 결정화 거동 등 미세 구조가 알코올의 농도에 따라 차이가 다른 미세 환경을 조성한다는 것을 의미한다. 따라서, 실크단백질의 소재 특성을 정밀 제어하기 위해서는 보다 상세한 구조 변이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

적 요

알코올의 농도 변화에 따른 실크단백질의 구조전이 효과에 대하여 살펴보기 위하여 백옥잠 누에고치를 이용하여 실크단백질 용액을 제조하였다. 알코올의 농도를 100%, 70%, 50%로 조절하여 제조한 실크 비드의 적외선 분광 분석을 하였다. 고농도(100%) 알코올로 처리한 실크단백질은 전형적인 β-sheet 구조를 반영하는 1265 cm⁻¹ 부근에서 흡수대를 보였으며 모델 약물로 사용한 4HR의 특성 피크는 관찰되지 않았다. 알코올의 농도를 70%, 50%로 조절하여 처리한 경우에는 모델 약물의 흡수대인 2933 cm⁻¹ 부근, 1069 cm⁻¹ 부근, 그리고 973 cm⁻¹ 부근의 흡수대가 발현되었다. 이러한 결과는 알코올의 농도에 따라 조성되는 실크단백질의 미세 구조에 차이가 있음을 나타내며, 보다 정밀한 실크단백질 구조 제어를 위한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업 연구사업(과제번호: PJ011214032015)의 지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

References

- Chavidi VP, Bala YS, Chanda LNR, Kokkarachedu VP, Posa S, Subha MCS (2012) Formulation and characterization of sodium alginate g-hydroxy ethylacrylate bio-degradable polymeric beads: in vitro release studies. *J Polym Environ* **20**, 344~350.
- Cho HY, Baik YA, Jeon SY, Kwak YH, Kweon HY, Jo YY, Lee KG, Park YH, Kang DC (2013) Growth and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells on silk scaffolds. *Int J Indust Entomol* **27**, 303~311.
- Hu X, Kaplan D, Cebe P (2006) Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. *Macromol* **39**(18), 6161~6170.
- 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 paper patch. *Wound Rep Regen* **18**, 132~138.
- Kim SK, Jo YY, Lee KG, Lee HS, Yeo JH, Kweon HY (2014) Preparation and characterization of silk beads for protein delivery system. *Int J Indust Entomol* **28**, 66~70.
- Kweon HY, Jo YY, Lee KG, Kim HB, Yeo JH (2014) Silk polymer for medical applications. *J Seric Entomol Sci* **52**, 89~95.
- Kweon HY, Kim SG, An JH, Shim HW, Yang BE, Kim JY, Jo YY, Yeo JH, Lee KG (2010a) Silk fibroin membrane as guided bone regeneration in rat calvarial defects. *Int J Indust Entomol* **21**, 175~179.
- Kweon HY, Yeo JH, Woo SO, Han SM, Jo YY, Lee KG (2010b) Preparation and characterization of silk fibroin nanoparticles. *Int J Indust Entomol* **20**, 25~28.
- Kweon HY, Park YH (1999) Structural and conformational changes of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin films treated with methanol solution. *J Appl Polym Sci* **73**, 2887~2894.
- Lee K, Kweon H, Yeo J, Woo SO, Lee YW, Cho CS, Kim KH, Park YH (2003) Effect of methyl alcohol on the morphology and conformational characteristics of silk sericin. *Int J Biol Macromol* **33**, 75~80.
- Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Kirker-Head C, McCool J, Gronowicz G, Zichner L, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL (2005) The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials* **26**(2), 147~155.
- Minoura N, Aiba SI, Higuchi M, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y (1995) Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin. *Biochem Biophys Res Commun* **208**(2), 511~516.
- Nam J, Park YH (2001) Morphology of regenerated silk fibroin: Effects of freezing temperature, alcohol addition, and molecular weight. *J Appl Polym Sci* **81**, 3008~3021.
- Seok H, Lee SW, Kim SG, Seo DH, Kim HS, Kweon HY, Jo YY, Kang TY, Lee MJ, Chae WS (2013) The effect of silk mem-

- brane plus 3% 4-hexylresorcinol on guided bone generation in a rabbit calvarial defect model. *Int J Indust Entomol* **27**, 209~217.
- Silva SS, Motta A, Rodrigues MT, Pinheiro AFM, Gomes ME, Mano JF, Reis RL, Migliaresi C (2008) Novel Genipin-Cross-Linked Chitosan/Silk Fibroin Sponges for Cartilage Engineering Strategies. *Biomacromol* **9**(10), 2764~2774.
- Tsukada M (1986) Structural changes induced in tussah silk (*Antheraea pernyi*) fibroin films by immersion in methanol. *J Polym Sci Pt B-Polym Phys* **24**, 1227~1232.
- Vepari C, Kaplan DL (2007) Silk as biomaterial. *Prog Polym Sci* **32**, 991~1007.
- Woo SO, Kweon HY, Um IC, Park YH (2000) Structural characteristics of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin treated with ethanol. *Korean J Seric Sci* **42**(2), 114~119.
- Zhao CX, Wu XF, Zhang QA, Yang SQ, Li MZ (2011) Enzymatic degradation of *Antheraea pernyi* silk fibroin 3D scaffolds and fibers. *Int J Biol Macromol* **48**(2), 249~255.