

## Calcium chloride 피브로인 용해물의 Gel Filtration Chromatography에 의한 순수분리 및 효소 가수분해 효과

여주홍 · 이광길 · 이용우  
농업과학기술원 잠사곤충부

### Pure-Separation of Calcium chloride-treated Silk Fibroin Hydrolysate by Gel Filtration Chromatography and Effect of It's Enzymatic Hydrolysis

Joo Hong Yeo, Kwang Gill Lee and Yong Woo Lee  
Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agriculture Science and Technology, Suwon 441-100, Korea

#### ABSTRACT

The pure-separation of calcium chloride-treated fibroin hydrolysates could be carried out using gel filtration chromatography. Also, the effect of its enzymatic hydrolysis was investigated in order to find out the enhancement of their functionality. The average molecular weight(Mw), solubility and free amino acid compositions of three hydrolysates samples (calcium chloride, calcium chloride-flavourzyme and calcium chloride-thermoase) were measured to compare their characteristics. The molecular weight of calcium chloride hydrolysate was about Mw 46,800 and it can be reduced to Mw 12,500 and 1,070 upon the enzymatic hydrolysis by flavourzyme and thermoase, respectively. A solubility of calcium chloride-treated samples shows about 60% while calcium chloride/enzyme-treated samples are perfectly soluble (100% solubility). The total amino acid composition of calcium chloride enzymatic hydrolysates are much higher than that of calcium chloride hydrolysate.

Key words : Gel filtration chromatography, Fibroin hydrolysate

#### 서 론

견 피브로인 단백질 가수분해물의 식품첨가물(Chen *et al.*, 1991) 및 건강 기능성 응용 분야(Chen *et al.*, 1993)로의 사용 확대 등과 관련하여 중화 과정에서 생기는 염 및 용액 속에 존재하는 단백질 이외 물질의 순수 분리 문제가 문제시 될 수 있다. 예를 들어서 견 피브로인을 가수분해시켜 순수 견 피브로인만을 회수하고자 할 때, 실험실 수준에서 가장 보편적으로 쓰고 있는 것이 일정 분자량 크기의 셀룰로오스 투석튜브가 주로 사용되어진다(Lu *et al.*, 1994). 그러나 투석튜브를 사용함으로써 얻어지는 견 단백질 회수 문제는 우선 제외하더라도 다음과 같은 문제점 때문에 실용적 이면서 순수한 분리는 결코 될 수가 없다. 즉, 일정 분자량 크기의 투석튜브를 사용하였을 경우 염이 완전히 제거될 때까지 매번 물을 치환해야 한다는 시간상 문제, 고가임에도 불구하고 거

의 1~2회용으로 그 사용이 그치고 만다는 경제상의 문제 및 사용한 분자량 크기 이하의 유효 성분은 모두 빠져나간다고 하는 결정적인 단점을 대표적으로 들 수가 있어 비효율적이라고 할 수 밖에 없다. 때문에 혼합 용액 내의 단백질과 단백질 이외 물질과의 순수 분리를 감안할 경우, 일정 분자량 크기에 의한 막(Membrane) 및 튜브와 같은 물리적 분리 방법 이외의 다른 순수 분리 방법을 고려할 수 있다. 이것은 순도가 높은 고부가가치 제품의 생산 여부를 결정하는 대단히 중요한 사항으로 작용될 수가 있기 때문이다. 견 피브로인의 경우, 필수 아미노산을 포함한 18종의 아미노산이 골고루 함유되어 있는 천연단백질 자원으로서, 최근의 연구 성과(Griffiths *et al.*, 1995, Yeo *et al.*, 1999)로 보아 유효기능성을 충분히 가지는 자원으로서 활용이 가능할 것으로 생각되어진다.

견 피브로인을 가수분해시키고자 할 경우, 산(HCl) 및 중성염(CaCl<sub>2</sub>)을 많이 사용하고 있으나 그중, 염

산을 사용하는 산 가수분해 법이 거의 주종을 이루고 있다(Chen *et al.*, 1991). 중성염 계통인  $\text{CaCl}_2$  용해액의 경우는 용액상에 존재하는  $\text{Ca}^{2+}$  및  $\text{Cl}^-$ 의 제거 문제 보다도, 최종적으로 얻어지는 분말이 수용성이 아니라는 점 때문에 분말 회수이용 측면은 거의 고려되지 않았다. 산 가수분해법의 경우 대부분이 공업용 막으로부터 건 단백질의 분리를 하고 있으며, 그로부터 얻어진 분말은 완전히 저분자화가 되어지고, 100% 수용성 분말이 얻어진다는 점을 특징으로 들 수 있다. 그러나 너무 저분자일 경우, 섭취하였을 때 소화 혹은 장내 흡수가 너무 잘 일어나서 유효한 기능성의 작용을 기대할 수 없다는 사실을 상기시킬 필요가 있다. 환원하면 일정 분자량대의 아미노산이 기능성을 기대할 수 있다는 말과도 같은 의미인데, 아마도 수천 단위의 Oligo-peptide 정도가 유효 기능성에 효과가 있다는 것을 의미한다. 이것은 식품 영양학적인 보고(손동화, 1997)와도 일치하는 사실로 생각되어지며, 분자량과 유효 기능성 및 약효의 메커니즘을 밝히는데 중요한 단서로 작용을 할 수가 있다.

따라서 본 연구에서는 산 가수분해가 아닌 중성염 피브로인 용해물의 순수 분리를 Gel Filtration Chromatography(GFC)를 이용한 결과와 아울러 그 용액을 단백질 분해 효소를 처리하였을 때의 효과 등에 대해 알아보하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 연구에 사용한 건 단백질은 가잠(*Bombyx mori*)을 전령 상염으로 사육하여 얻은 누에고치를 정련하여 사용하였다. 세리신을 제거하기 위한 정련은 먼저 고치내에 남아있는 번데기를 제거한 후, 고치를 적당한 크기로 잘라 육비 50 : 1에서 5 wt%의 마르셀 비누 및 3 wt%의  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  혼합 용액에 넣어 90°C에서 40분간 2회 처리한 후, 증류수로 3번 정도 같은 작업을 반복하여 충분히 수세하였다. 수세 후 자연 건조시켜 정련한 피브로인 단백질을 얻었다.

### 2. 중성염 용해

중성염 가수분해 용액으로는  $\text{CaCl}_2$ -EtOH의 혼합용액을 제조한 후, 실크 단백질을 용해시켰다(Ajisawa, 1998), 즉 피브로인 단백질 35 g을 기준으로 염화칼슘( $\text{CaCl}_2$ , 藥理化學工業(株), 1급,  $\text{Mw}=110.99$ )· $\text{H}_2\text{O}$ ·

Ethanol의 몰 함량비가 1 : 8 : 2가 되도록 조절하여 90°C에서 5시간 반응시켜 중성염 가수분해액을 얻었다. 이 용액을 거즈 및 부직포로 완전히 이물질 등을 깨끗이 여과한 후 반으로 희석시켜 실크 피브로인 중성염 가수분해 원액으로 하였다.

### 3. GFC에 의한 순수 분리

겔 여과 장치의 컬럼은 직경 10 cm, 길이 1 m의 GradiFrac system(Pharmacia Biotech, Sephadex G-25 media, HiLoad P-50 Pump and UV-1 Monitor, Sweden)을 사용하여 중성염과 실크 피브로인의 순수 분리를 행하였다. flow rate는 25 ml, fraction은 30 ml, chart speed는 5 mm/min의 조건으로 건 피브로인을 순수 분리하였다(Sample 1).

### 4. 효소가수분해 및 용해도

위에서 순수 분리한 Sample 1 용액의 양에 대하여 1%의 단백질 가수분해효소, Flavourzyme(NOVA, USA) 및 Thermoase(Daiwa Kasei, Japan)를 55°C에서 5시간 가수분해를 행하였다. 그 후 100°C에서 5~10분 열처리를 하여 효소의 활성을 없앤 다음 효소 가수분해 용액을 얻었다(Flavourzyme처리 : Sample 2, Thermoase처리 : Sample 3). 용해도의 측정은 동결건조로부터 얻어진 분말 각 1 g을 25°C에서 1시간 동안 용해시킨 후 잔류물의 처음 무게에 대한 비로서 측정하였다.

### 5. 분자량 측정 및 유리 아미노산 분석

분자량의 측정은 Gel Permeation Chromatography(GPC)법에 의한 절대 분자량을 측정하였다. 0.2N  $\text{NaNO}_3$ 를 완충용액으로 하여, 0.5% 내외의 농도로 조절된 수용액 상태의 시료를 refractive index(RI), light scattering(LS), diffractive pressure(DP) 및 ultraviolet(UV)의 값으로부터 절대 분자량의 분포가 자동으로 계산되어지는 GPC system(Viscotek, USA) 장치를 사용하였다. 표준시료는 polyethyleneoxide(PEO,  $\text{Mw}=110,000$ )를 사용하여 재현성 여부 및 기기의 안정상태를 파악하였다. 또한 각 유리아미노산 분석은 각 시료의 수용액으로부터 원심분리(HITACHI Model 18PR-3, 15,000 rpm, 4°C, 30분)로 침전물을 제거한 다음, 건조 후 구연산(pH 2.2)을 첨가하여 자동아미노산 분석장치(SHIMADZU Model LC-5A)를 사용하였다. 아울러 비교를 위하여 건 피브로인의 전 아미노산 조성은 정련한 시료를 사용하

여 6N-HCl로 진공 상태에서 48시간 가수분해하여 분석을 하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. GFC에 의한 건 피브로인 단백질의 순수 분리

Fig.1에 GradiFrac 장치를 이용한 건 피브로인 중성염 가수분해물의 protein 및 염의 분리 그림을 표시하였다. Fig.1-(A)는 small column(Sephadex G-25, XK-26×40사용)을 사용한 경우의 분리 그림을 나타내고 있고 Fig.1-(B)는 본 연구에서 사용한 GradiFrac system의 분리 그림을 나타내고 있다. 즉 (A)의 경우가 실험실 수준의 데이터라고 한다면 (B)의 경우는 보다 산업화에 가까운 실제에 가깝다고 할 수 있을 것이다. Fig.1-(A)와 같이 small column을 사용한 목적은 여러 가지 분리 조건을 잡기 위한 것이고, 이 분리조건을 기준으로 대용량의 scale-up에

해당하는 것이 Fig.-(B)의 분리그림이다. Fig.1-(A) 및 (B)에서 나타나 있는 것과 같이 elution volume이 빠른 쪽(왼쪽 피크)과 그것보다 느린 쪽(오른쪽 피크)의 피크가 분리되고 있어서 protein과 염이 완벽하게 분리되고 있음을 나타내고 있다. Desalting을 목적으로 하는 Sephadex media의 특성은 media 표면 사이사이로 먼저 분자량이 작은 물질이 채워지게 되고, 그 후 분자량이 상대적으로 큰물질(아미노산 혹은 단백질)등이 빠져나오게 되므로 graph상은 염보다 분자량이 큰 단백질 혹은 아미노산 그룹이 먼저 빠져나오게 된다. Fig.1은 이러한 이론(Porath *et al.*, 1959)을 완벽하게 뒷받침하는 형태의 그림을 나타내고 있고, 본 실험의 순수분리가 가능함을 나타내고 있다. 때문에 본 방법으로 얻어지는 용액 혹은 분말의 경우 고 품질의 중성염에 의한 가수분해가 된 분말을 얻을 수 있음을 나타낸다고 할 수 있다. 특히, Fig. (B)의 경우도 마찬가지로 완벽한 분리능을 나타내고 있으며, 실험실 수준에서 행한 결과를 그대로 산업화에 응용할 수 있음을 나타내는 scale-up의 좋은 model이라고 할 수 있다. 또한 Fig.1의 경우는 단순한 Desalting용 media를 사용함으로 인한 분포만을 나타내고 있으나, 이 protein 성분 안에는 다른 분자량 분포를 가진 성분이 존재할 수 있고, 다른 성질의 media, 예를 들어서 charge를 띤 media 혹은 fine-media를 선택적으로 사용할 경우, 다른 성분을 분리시킬 수 있음을 의미한다고 할 수 있다.

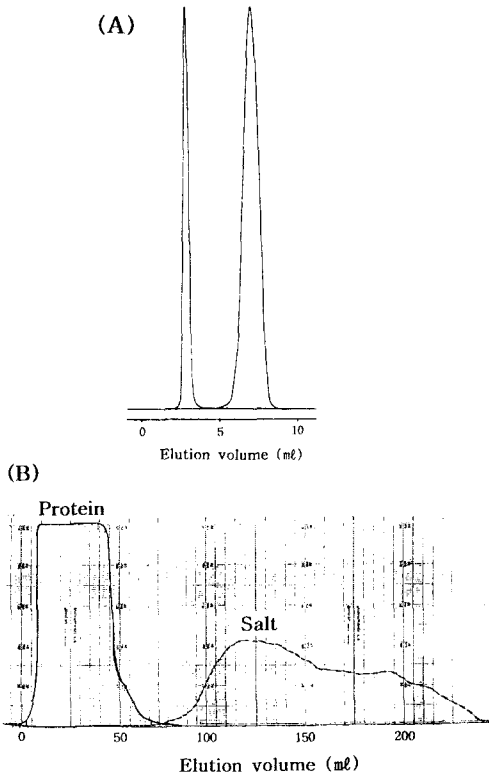


Fig.1. Gel filtration chromatography patterns of fibroin hydrolysates treated with  $\text{CaCl}_2$  at different GFC column. (A); XK-26×40 column, (B); GradiFrac system column.

#### 2. 회수분말의 분자량 및 용해도

본 연구에서는 절대 분자량의 측정을 GPC법에 의하여 측정하였다. 0.2N  $\text{NaNO}_3$ 를 flow buffer로 하여 0.5% 내외의 농도로 조절한 수용액 상태의 시료를 RI, LS, DP, UV이 값으로 환산되어지는 program을 이용하였으며, 농도의 측정은 Yeo등(1999)의 방법에 따라 행하였다. Table 1에 본 연구에서 얻은 중성염, 중성염-효소 가수분해물의 GPC에 의한 절대 분자량 측정 결과 및 용해도를 나타내고 있다. Ca

Table 1. Weight molecular weight (Mw) distribution and solubility of calcium chloride and calcium chloride enzyme hydrolysis samples

Sample	Mw	Solubility(%)
1 ( $\text{CaCl}_2$ )	46,800	60
2 ( $\text{CaCl}_2$ -flavourzyme)	12,500	100
3 ( $\text{CaCl}_2$ -thermoase)	1,070	100

Cl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>-Flavourzyme 및 CaCl<sub>2</sub>-Thermoase 처리 시료의 경우 각각 46,800, 12,500 및 1,070부근에서 분자량의 분포를 나타내고 있었다. 물론 효소 가수분해의 경우, 효소의 양을 늘려서 가수분해를 시키면 분자량이 좀더 낮아질 수는 있으나, 단백질의 양에 적용될 수 있는 적정효소의 양을 찾는 것이 경제적이고, 또한 순수 단백질 분리 및 정제를 목표로할 때 가능하면 효소를 적게 사용하여 목표로 하는 적정 분자량을 찾는 것은 중요한 일이라 생각되어진다. 본 연구에서는 위에서 언급한 것과 같이 용액 양을 기준으로 1%정도가 적정 농도임으로 판단하였다. 또한 가수분해 조건에 따른 분자량의 차이는 분자량의 분포에 해당하는 아미노산 및 특수 작용기의 분포를 가정할 수 있으며, 따라서 이러한 아미노산 및 특수 작용기의 분포가 나타내는 기능성임을 기대할 수 있다. 이것은 특정 아미노산 그룹 및 Oligo-peptide가 특정 기능성에 유효할 수 있다는 보고(손동화, 1997)에서도 잘 알 수 있다. 때문에 이러한 건 단백질의 가수분해 조건에 따른 분자량의 분포는 건강 기능성을 필두로 현대 사회에서 꼭 필요한 기능성 물질의 소재개발에 기본적인 정보를 제공하여 줄 것이다. 또한 용해도의 경우는 효소 가수분해의 유무에 대하여 많은 차이가 보이고 있다. 육안 및 filtering으로 확인한 결과, 중성염(CaCl<sub>2</sub>)으로 가수분해한 시료의 경우는 약 60% 정도가 용해 혹은 입자가 분산된 형태를 나타내었다. 반면, Flavourzyme 및 Thermoase로 가수분해한 샘플의 경우, 깨끗이 100% 용해되었다. 특히 Thermoase로 가수분해한 시료의 경우, 그 용해정도는 아주 좋았다. 이것은 체내에 들어갔을 경우, 흡수의 정도가 용이함을 의미하며 언급한 분자량을 작용기로하는 기능성을 기대할 수 있을 것이다.

### 3. 유리아미노산 분석

식품 및 영양학적인 면에서 펩타이드와 아미노산의 함량은 영양, 맛 그리고 건강기능성에 영향을 미침으로써 식품에 있어서 매우 중요한 역할을 한다(손동화, 1997). 또한 식품단백질 유래의 생리활성 펩타이드에 관한 최근의 연구 동향은 펩타이드를 함유하는 전구체를 섭취하였을 때 과연 어떤 형태로 흡수되어 최종적으로 어떤 생리활성을 나타내는가 하는 점이다. 또한 영양학적인 관점에서 이 같은 펩타이드의 영향은 체내 단백질 합성에는 영향을 미치지 않는다. 아미노산 장애자, 수술 후 환자의 회복에 매우 유리한 것으로 생각된다. 건 피브로인 산 가수분해물

의 경우, Glycine, Alanine등이 반 이상을 차지하고 있으므로 그로 인해 맛은 설탕의 몇 배 이상의 단맛을 나타내고 있다. 그러나 산 가수분해가 아닌 경우는, 분자쇄의 절단 정도가 산 가수분해보다는 크지 않기 때문에 본 연구에서와 같은 분자량 수천 정도의 Oligo-peptide로서는 맛의 차이를 기대하기는 어렵다. 그러나 이것이 체내에 들어갔을 경우, 체내효소에 의한 가수분해를 다시 생각할 수 있기 때문에 어느 정도 분자량을 갖는 것이 좋을 것이라는 생각을 하게 된다.

Table 2에 CaCl<sub>2</sub> 및 CaCl<sub>2</sub>-효소 가수분해물의 유리아미노산 함량의 결과를 표시하였다. 중성염으로 용해한 시료의 유리아미노산 함량은 마일드한 조건 때문에 37.2%의 유리아미노산 함량을 나타내고 있다. 또한 효소 처리한 시료의 경우 총 유리아미노산은 효소 미처리 시료에 비하여 약 2배 정도의 총 유리아미노산 함량차이가 있음을 알 수 있다. 참고로 표시한 건피브로인의 완전 가수분해한 결과(Table 2-Fibroin참조)를 총 유리아미노산이라고 할 때 중성염 처리 시료의 유리아미노산 총량은 약 38%수준을 나타내고 있고, 효소를 처리함으로써 인한 유리아미노산의 함량은 70% 내외를 나타내고 있다. 이것은 분자량의 크기와는 무관하지는 않은데, 효소를 처리함으로써 효소의 작용에 의한 -OH기의 절단과 아올러(Serine 및 Tyrosine의 함량 증가), 건 피브로인의  $\beta$ -sheet구조 골격을 형성하는 Glycine 및 Alanine의 사슬이 절단되어 분자량이 저하된 것으로 생각되어진다. 실크 피브로인의 결정구조가 주로 -(Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser)<sub>n</sub>-의 반복단위로 생각

**Table 2.** Free amino acid compositions in the calcium chloride, calcium chloride-enzyme hydrolysed fibroin solution and the amino acid composition of fibroin

Amino acid	Composition(mol%)			
	CaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub> *	CaCl <sub>2</sub> **	Fibroin
Glycine	13.1	25.5	28.9	42.9
Alanine	13.6	20.6	23.7	30.4
Serine	4.3	10.9	11.0	12.2
Tyrosine	3.2	4.0	4.1	4.8
Valine	1.1	1.4	1.2	2.5
Aspartic acid	0.5	0.7	0.5	1.9
Glutamic acid	0.8	1.1	1.3	1.4
Threonine	0.6	1.0	0.5	0.9
Total	37.2	65.5	71.2	97.0

\* CaCl<sub>2</sub>-flavourzyme

\*\* CaCl<sub>2</sub>-thermoase

할 때(Asakura *et al.*, 1998), -Gly-Ala- 혹은 -Gly-Ala-Gly- ...등의 그룹이 혼재할 수 있음을 짐작케 한다. 물론 결정과 결정 사이에 존재한다고 하는 Tyr, Glu, Val등의 잔기도 혼재할 것이다. 이러한 분자량의 크기를 나타내는 아미노산 Sequence와 기능성과의 관계는 지금부터 밝혀야 할 중요한 연구과제 중의 하나라고 생각한다. 결론적으로 Table 2에도 있는 것과 같이 처리조건에 의한 유리아미노산의 차이가 인정되고 있는 것은 유효한 작용기 혹은 유효 아미노산에 의한 기능성을 기대할 수 있으리라 생각되어지고, 실크 피브로인과 같은 순수 천연단백질 원에서 추출한 물질의 기초의약품 소재 및 기능성 식품 첨가물로서의 사용을 기대할 수 있을 것이다.

## 적 요

Calcium chloride 피브로인 용해물의 Gel Filtration Chromatography에 의한 순수분리 및 효소가수분해 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 중성염을 사용한 실크 단백질의 순수 분리가 GFC에 의해 될 수 있음을 알았다.
2. GFC에 의한 순수분리 건 단백질의 GPC에 의한 절대 분자량(Mw) 측정 결과는 CaCl<sub>2</sub> 처리 분말이 46,800, CaCl<sub>2</sub>-Flavourzyme처리 분말이 12,500, CaCl<sub>2</sub>-Thermoase처리 분말이 1,070의 분자량 분포를 각각 나타내었고, 이 용액을 이용한 효소 가수분해 분말의 경우 100% 수용성을 나타내었다.
3. 유리아미노산 함량의 결과는 CaCl<sub>2</sub>처리 분말이 37.2%, CaCl<sub>2</sub>-Flavourzyme분말이 65.2% 및 CaCl<sub>2</sub>-Thermoase처리분말이 71%의 총 유리아미노산 함량을 나타내어, 효소를 처리함으로써 그 함량 차이가 인정되었다.

## 인용문헌

- Ajisawa A. (1998) Dissolution of silk fibroin with calciumchloride/ethanol aqueous solution *J. Scri. Sci. Jpn.*, **67**(2) : 91-94
- Asakura T., Yamazaki Y., Koo W-S., M. Demura (1998) Determination of the mutual orientation of the <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C NMR chemical shift tensors of <sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N double labeled model peptides for silk fibroin from the dipolar-coupled powder patterns. *J. Mole. Stru.*, **446** : 179-190
- Chen K., R. Takano and K. Hirabayashi (1991) Production of soluble fibroin powder by hydrolysis with hydrochloric acid and physical properties. *J. Scri. Sci. Jpn.*, **60**(5) : 358-362
- Chen K., K. Iura R. Aizawa and K. Hirabayashi (1991) The digestion of silk fibroin by rat. *J. Scri. Sci. Jpn.*, **60**(5) : 402-403
- Chen K., K. Iura R. Takano and K. Hirabayashi (1993) Effect of fibroin administration on the blood cholesterol level of rats loaded with cholesterol. *J. Scri. Sci. Jpn.*, **62**(1) : 56-60
- Griffiths J. M., T. T. Asbburn, M. Auger, P. R. Costa, R. G. Griffin and P. T. Lansbury (1995) Rotational resonance solid-state NMR elucidates a structural model of pancreatic amyloid. *J. An. Chem. Soc.*, **117**(12) : 3539-3546
- Lu X., D. Akiyama and K. Hirabayashi (1994) Production of silk powder and properties. *J. Scri. Sci. Jpn.*, **63**(1) : 21-27
- Porath J., P. Flodin (1959) Gel filtration : A Method for desalting and group separation. *Nature* **183** : 1657-1659
- 손동화 (1997) 건강기능성 식품펩타이드 및 응용. 식품과학과 산업 **30**(1) : 22-29
- Yeo J.-H., K.-G. Lee, Y.-W. Lee, J. Nam and S.-Y. Kim (1999) Changes of silk protein compositions by solubility conditions. *Analytical Science & Technology* **12**(4) : 306-311