

연구노트

효소처리에 의한 *Bombyx mori* fibroin 가수분해물의 분자량 및 구조 변화

여주홍[†] · 박경호[†] · 이광길 · 우순옥 · 권혜용 · 한상미 · 이희삼 · 이진아¹ · 이인석¹ · 조윤희^{1,*}

농촌진흥청 잠사양봉소재과, ¹경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과

Molecular Weight and Structural Changes of Enzymatic Hydrolysate from *Bombyx mori* Fibroin

Joo-Hong Yeo[†], Kyung-Ho Park[†], Kwang-Gill Lee, Soon-Ok Woo, HaeYong Kweon, Sang-Mi Han, Heui-Sam Lee, Jinah Lee¹, In Seok Lee¹, and Yunhi Cho^{1,*}

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science and Technology

¹Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

Abstract This study examined the enzymatic digestion, average molecular weight distribution and structural changes of *Bombyx mori* silk gland fibroin using gel permeation chromatography and nuclear magnetic resonance methods. The pure-separation of calcium chloride-treated fibroin hydrolysates was carried out by gel filtration chromatography. Also, the effects of fibroin's enzymatic hydrolysis were investigated using an edible enzyme. The average molecular weight of three hydrolysate samples (silk gland fibroin (SF), SF-calcium chloride (SFC), and SFC-enzyme) were measured to compare their characteristics. The molecular weights of SF, SFC, and SFC-enzyme were approximately 108,000, 65,000, and 1,000 Da, respectively. Finally, we determined the structural characteristic changes of the different enzymatically digested samples by ¹³C nuclear magnetic resonance methods. For the enzymatically digested fibroin, the glycine ¹³C^α resonance indicated that the amino acid was dramatically changed and/or separated out; however, this was not shown for the normal *Bombyx mori* silk gland fibroin.

Keywords: *Bombyx mori* silk gland fibroin, molecular weight distribution, nuclear magnetic resonance

서 론

현대는 지속적인 경제적 발전에 따라 식생활 패턴이 서구화되고, 환경오염 등의 외부적 요인과 스트레스 등의 내부적 요인에 의해 당뇨병, 고지혈증 및 고혈압 등의 만성 성인병 유병률이 높아지고 있는 추세이다. 또한 평균 수명 연장으로 인해 노령화 사회가 됨에 따라 건강증진에 대한 소비자들의 관심 및 욕구가 크게 높아지고 있다(1). 이러한 인식을 바탕으로 의약품 뿐만 아니라 식품에 대한 관심이 높은 상황에서 건강기능식품이 질병예방 및 건강 증진에 도움을 줄 수 있다는 많은 연구가 진행되고 있다(1).

건강기능성식품의 개발에는 다양한 천연물 소재가 사용되는데, 그 기능성을 규명하여 체내 생리조절에 관여할 수 있도록 하고자 하는 궁극적인 목적이 있다. 이를 위해서는 여러 고려할 사항이 있지만, 우선 목적에 적합한 천연물 소재 및 활성물질 선택과 그 구조 및 생리활성 등 물질 본연의 특성파악이 무엇보다 중요하다(2). 천연물 소재를 비롯한 식품에서의 펩타이드는 영양뿐 아니라 건강기능성에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다(2). 이는 체내에서 생리활성을 지닌 다양한 유리 펩타이드와

는 달리 효소 등의 여러 처리에 의해 생성되는 펩타이드이다. 이처럼 생성된 펩타이드는 다양한 구조와 각각의 다른 생리활성을 지니게 된다. 이와 더불어 다양한 구조적 특성에 기인하여 소화 및 흡수에도 영향을 미치게 될 것 알려져 있다(1,2). 또한, 산업화가 가능한 천연물 자원을 활용한 건강기능식품 소재의 특성연구는 급격한 현대 산업화 과정 중에 축소되고 있는 일차산업인 농업 발전의 또 다른 대안이 될 수 있다는 점에서도 그 의미가 있을 것으로 생각되어진다.

최근 양잠소재, 특히 누에고치에서 만들어지는 실크 펩타이드 중 하나인 가잠(*Bombyx mori*) 피브로인의 경우 여러 생리활성 연구가 진행되고 있다. 상처치유(3), 유허활성 산소억제효과(4) 및 최근에는 특정 효소처리에 의해 그 구조적 변화가 야기된 피브로인의 경우 인지 및 기억력을 향상에도 도움이 된다고 보고되어 있다(5). 이런 *B. mori* 피브로인의 다양한 기능성은 구조적 변화를 비롯한 물리적, 화학적 성질변화에 의한 것으로 여겨진다(6,7).

이에 본 연구는 누에고치의 주성분인 *B. mori* 피브로인 성분의 여러 건강기능성 생리활성을 부여하기 위한 연구의 일환으로, 누에 실 샘플로부터 얻은 *B. mori* 피브로인의 효소가수분해 시 그 분자량 및 구조적 특성을 파악하고자 한다.

재료 및 방법

Bombyx mori 피브로인의 용해 및 순수 분리

Bombyx mori 피브로인을 얻기 위하여 누에고치가 아닌 누에 실 샘플로부터 직접 피브로인을 채취하여 사용하였다. 이 피브로인은 상업으로 사육한 누에생체 5령 6일째 누에를 4°C 얼음물

[†]Joo-Hong Yeo and Kyung-Ho Park contributed equally to this study.
*Corresponding author: Yunhi Cho, Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi-do 446-701, Korea
Tel: 82-31-201-3819, Fax: 82-31-201-3819
E-mail: choyunhi@khu.ac.kr
Received June 3, 2008; revised July 4, 2008;
accepted July 8, 2008

속에서 중부 실 샘플을 절개한 후 회수하였다. 용해는 회수하여 건조한 피브로인 35 g을 기준으로 하였으며, 용매는 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} : \text{ethanol}$ 의 몰 함량비가 1:8:2가 되도록 조절하여 환류장치가 부착된 기기에서 90°C, 5시간 가열한 후 필터링(Whatman No. 2 filter paper, Whatman, Maidstone, Kent, UK)하여 잔유물을 제거하였다. 이후 Madyarov 등(8)의 방법에 따라 제조하였다. 이 용액을 sephadex G-25 gel filtration chromatography(GFC)(pharmacia, GradiFrac, UV-1 detection, Uppsala, Sweden)를 이용하여 피브로인과 염을 완전히 분리하였으며, column은 Sephadex G-25-fine media가 충전된 XK-50 column(Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 사용하였다. 이렇게 분리된 피브로인 용액에 특정 단백질 분해효소(Novo Nordisk, Bagsvrd, Denmark)를 첨가하여 질소가스 충전 조건 및 55°C에서 24시간 가수분해하고, 100°C에서 5분간 효소의 불활성 처리를 한 후, 여과(0.45 µm, Sartorius, Goettingen, Germany)하여 잔유물을 제거한 후 효소 가수분해 용액을 얻었다.

분자량 측정

분자량은 Piotr 등(8)의 방법에 따라 gel permeation chromatography(GPC: Viscotec, Houston, TX, USA)를 이용하였으며, column은 ultrahydrogel 120과 500(Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였다. 0.5% 내외의 농도로 조절할 수 용액 상태의 시료를 0.2 N NaNO_3 를 완충용액으로 사용하여 분석한 후 refractive index(RI)로 환산하였다(9,10). 표준 시료는 pullulan(shodex standard P-82, Showa Denko, Tokyo Japan)을 별다른 정제없이 그대로 사용하였다.

¹³C-NMR 분석

핵자기 공명장치(nuclear magnetic resonance, NMR)는 물질 변화의 구조 정보를 제공하는데 주요한 분석 수단의 하나이며, 특히 *B. mori* 피브로인처럼 주기적인 반복 단위를 가지는 구조 해석 이용 시 더욱 확실하게 구조적 변화를 확인할 수 있다. ¹³C-NMR 분석방법은 Copper 등(11)의 방법에 따라 수행하였으며, 0.1%의 누에 체내 피브로인을 9 M LiBr 용액에 녹인 후 10%(v/v) H_2O 를 첨가하여 pH 7.0을 유지하였다. ¹³C-NMR 측정 장치는 JEOL® α400 spectrometer(400 MHz)(JEOL®, Tokyo, Japan) 장치를 사용하였으며, 측정조건은 20,000 pulses, 8.70 µs pulse angle, 표준물질로는 $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ 을 사용하였다(7,8).

결과 및 고찰

***Bombyx mori* 피브로인의 용해 및 순수 분리**

본 연구는 *B. mori* 피브로인의 다양한 생리활성을 밝히기 위한 기초연구로서 특정 효소를 이용한 가수분해 시 그 구조적 변화 특성을 알아보았다. 기존의 연구(12)는 누에고치로부터의 피브로인을 분리하여 그 특성 및 생리활성을 조사하였으나, 본 연구는 기존 연구와 달리 직접 누에 생체에서 피브로인을 분리하여 사용하였다. 효소가수분해는 그 과정 중에 염화칼슘에 의한 용해 과정을 거치기 때문에 이 과정 중에 생성되는 염을 제거해야만 한다. 일반적인 *B. mori* 피브로인을 산 가수분해 혹은 효소가수분해 시 생성되는 염의 분리를 막(membrane) 혹은 튜브가 주로 사용되고 있다(13-16). 그러나 이러한 방법은 회수율이 20-30%에 지나지 않을 뿐 아니라, 시간적, 경제적으로도 많은 손실을 불러 일으킨다. 이에 본 연구에서는 gel filtration chromatography(GFC)에 의해 *B. mori* 피브로인을 순수 분리하여 그 결과를 Fig. 1에 제시하였다. 제시한 Fig. 1에서 앞부분의 피크는 분자량이 큰 *B. mori* 피브로인을 나타내고, 뒷부분 피크는 분자량이 작은 염

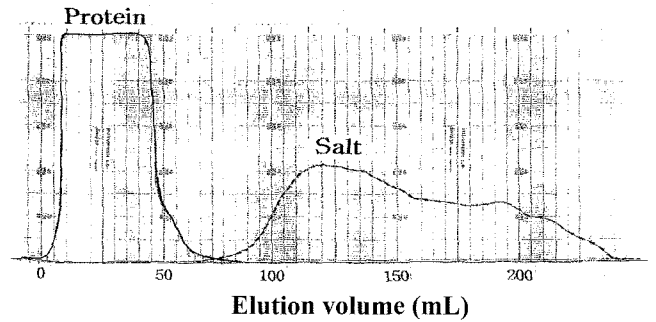


Fig. 1. Gel filtration chromatography chart of *B. mori* fibroin hydrolysates treated with calcium chloride at GradiFrac (Sephadex G 25 fine gel) system.

화합물 및 기타 성분을 의미한다. 본 연구의 *B. mori* 피브로인의 회수율은 약 70% 이상으로 기존의 방법에 비해 약 40% 이상 높았다. 이는 gel filtration chromatography(GFC)법이 기존의 막과 튜브를 이용한 방법에 비해 효소가수분해 시 발생하는 염을 더 효율적으로 제거하여, 고 순수·고 수율의 *B. mori* 피브로인을 얻을 수 있는 방법임을 확인할 수 있었다(17).

분자량

천연물 소재를 비롯한 식품에서의 펩타이드는 그 조성 및 구조에 의해 소화, 흡수 및 특정한 생리활성을 지닐 수 있고, 물질의 구조적 차이는 분자량에 기인하여 분자량의 조절은 건강기능 식품 개발에 있어 중요한 문제 중 하나이다(18). 이에 본 연구에서는 특정 효소에 의한 용해 후 순수 분리된 *B. mori* 피브로인의 분자량을 gel permeation chromatography(GPC)법으로 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 여러 사전연구에서 *B. mori* 피브로인의 분자량 분포는 많이 보고되어져 있는데(19,20), 주로 누에고치로부터 분리한 피브로인을 전기영동을 이용한 대략적인 분자량 분포를 나타내고 있고 그 분포는 10-30 Da으로 알려져 있다(19). 본 연구에서는 누에 체내의 피브로인 분자량을 직접 측정함으로써 누에 본연의 피브로인 분자량을 측정하였다는데 그 의미가 있으며, 측정된 분자량은 108,000 Da 내외였다(Fig. 2). 또한 이 피브로인을 염화칼슘으로 가수분해 시 분자량이 65,000 Da 내외로 약 43,000 Da이 감소하였다. 여기에 염화칼슘-효소를 처리할 경우, 분자량이 1,050 Da 정도로 현저히 감소하여 어떤 생리활성을 나타낼지는 확인할 수 없으나 체내 소화 및 흡수에 유리하게 작용할 수 있을 것으로 여겨진다(21). 펩타이드의 소화 및 흡수는 다양한 carrier 및 그 구조와 작용 기구에 의해서 영향을 미치는 것으로 보고되어져 있어(22), 분자량에 따른 소화 및 흡수 그리고 생리활성은 추후 연구를 통해 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다. 이러한 점을 감안하여도, 본 연구에서 사용한 피브로인의 구조 중 50% 이상이 glycine과 alanine 등의 반복적 구조(-GAGAGS-)로 이루어져 있는데, 이 구조가 중성염 가수분해 및 효소를 처리에 의해 영향을 받을 수 있음을 제시하고, 이는 사전 연구를 통해 밝혀진 피브로인의 생리활성과는 다른 새로운 생리활성 및 기능성을 나타낼 수 있을 것으로 생각되어진다.

NMR 분석

B. mori 피브로인의 효소 가수분해 시 구조적 변화를 ¹³C 핵자기공명(NMR)으로 분석하여 Fig. 3에 나타내었다. NMR은 극소적인 구조변화를 연구하는데 있어 매우 유용한 분석 수단이다(20,23). *B. mori* 피브로인의 경우 그 구조가 매우 규칙적으로 배

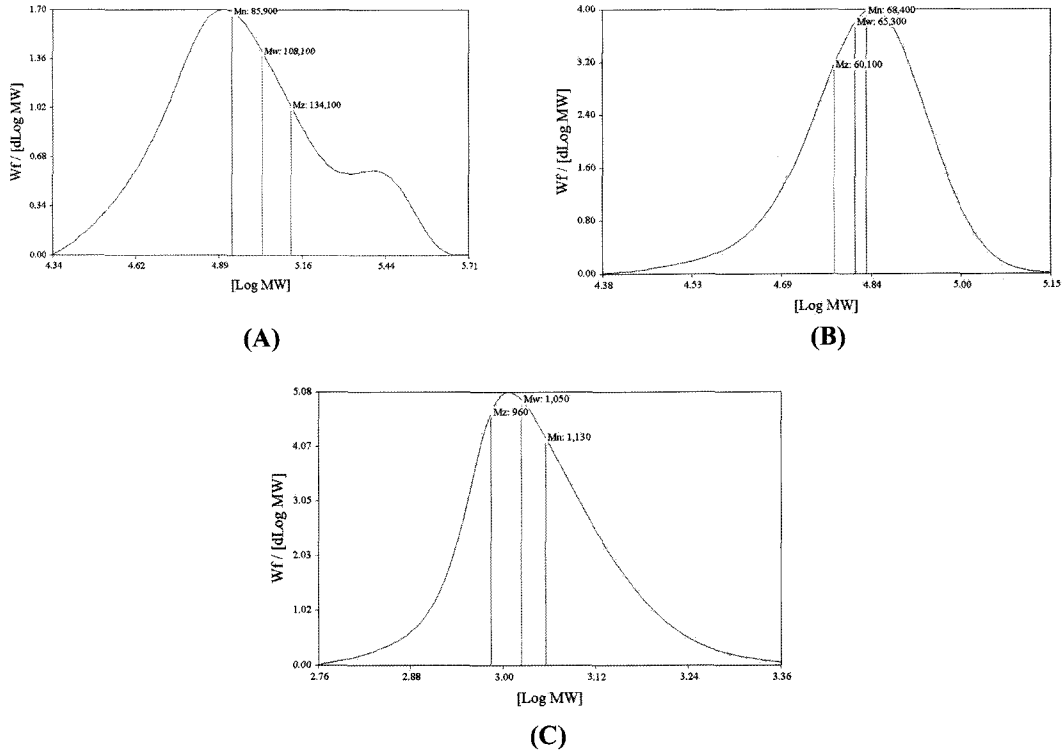


Fig. 2. Weight molecular weight distribution of silk gland fibroin (A), calcium chloride treated fibroin (B), and calcium chloride-enzymatic digestion fibroin (C) by GPC method.

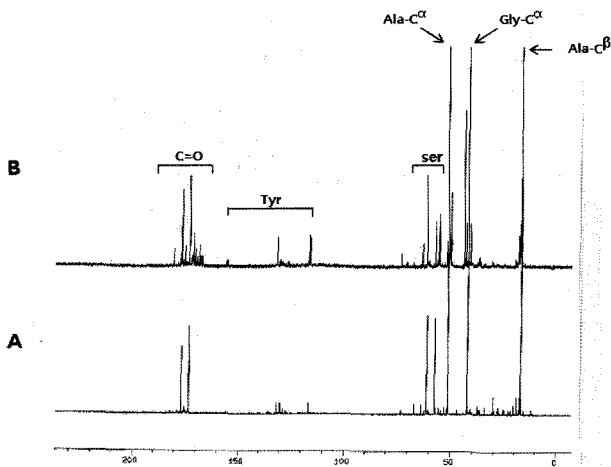


Fig. 3. ¹³C-NMR of *Bombyx mori* silk gland fibroin (A) and calcium chloride-enzymatic digestion fibroin (B). *Bombyx mori* silk gland fibroin peaks (A) attribute to amino acid residues are simply shown.

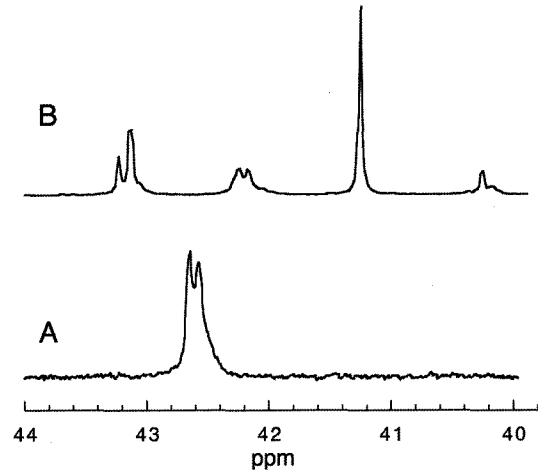


Fig. 4. Expanded ¹³C-NMR spectra of *B. mori* silk fibroin treated with (B) and without (A) enzymatic digestion. Only ¹³C^α peaks attributed to glycine residues are shown.

열이 되어져 있고, 특히 β-sheet를 기본구조로 하고 있어 NMR 분석의 적합한 모델로 알려져 있다(23). Fig. 3A는 누에 채내로부터 얻은 피브로인의 ¹³C-NMR 스펙트럼을 나타낸 것으로 피브로인의 골격에 해당하는 탄소의 피크 위치가 동정이 되어져 있으며, 주로 glycin, alanine, serine 및 tyrosine의 메인 피크의 탄소 공격 부위가 동정이 되어져 있다. 이 결과는 Asakura 등(20)이 보고한 피브로인 NMR 피크와 일치하였다. Fig. 3B는 효소 가수분해한 피브로인의 ¹³C-NMR 스펙트럼을 나타낸 것으로 피브로인의 주쇄의 피크가 영향을 받아 많은 부분의 피크가 분열되었음을 알

수 있었다. ¹³C-NMR 분석 결과 중 40-44 ppm 피크는 glycine의 ¹³C^α 피크로서, 이 부분을 확대하여 Fig. 4에 제시하였다. *B. mori* 피브로인의 구조는 -G-A-G-A- 반복구조가 50% 이상을 차지한다. 특히, glycine를 의미하는 40-44 ppm 부근의 높은 피크는 효소 가수분해에 의해 -G-A-G-A-반복 구조가 분해되었음을 생각할 수 있고, 이로 인해 분자량이 현저히 저하된 것으로 생각되어진다. 이는 Zhou 등(24)과 Yeo 등(4)의 연구와 유사한 결과로서 42.6 ppm 부분의 ¹³C^α 피크가 효소 가수분해 과정을 거치면서 40.3, 41.3, 42.1-42.2 ppm 그리고 43.1-43.2 ppm의 총 4부분으로

분해되어 분자량이 낮아졌을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 누에 실 샘플로부터 얻은 *Bombyx mori* 피브로인의 효소 가수분해 시 그 분자량 및 구조적 특성을 파악하고자 하였다. Gel filtration chromatography(GFC)에 의해 *B. mori* 피브로인을 순수 분리한 결과 회수율이 약 70% 이상으로 기존의 방법(막과 튜브 분리법)에 비해 약 40% 이상 높았다. 이는 GFC법이 고순수·고 수율의 *B. mori* 피브로인을 얻을 수 있는 방법임이 확인되었다. Gel permeation chromatography에 의한 분자량 측정 결과 누에 체내 피브로인, 염화칼슘 용해 물 및 효소 가수분해물이 각각 평균분자량 108,000 Da 내외, 65,000 Da 내외 및 1,000 Da 내외임을 알 수 있었다. 또한 효소 가수분해에 의한 구조적 변화를 ¹³C-NMR로 알아본 결과, *B. mori* 피브로인의 메인 골격에 해당되는 glycine, alanine 및 serine 등의 골격 피크가 관찰되었으며, 특히 효소가수분해 시 glycine를 의미하는 40-44 ppm 부근의 피크가 높게 나타난 것으로 보아 -G-A-G-A-반복 구조가 분해되었고, 이로 인해 분자량이 현저히 저하되었을 것으로 생각되어진다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업의 지원(과제번호: 20080401034034)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Katz F. Research priorities move toward healthy and safe. Food Technol.-Chicago 54: 42-46 (2000)
2. Rutherford KJ, Gill HS. Peptides affecting coagulation. Brit. J. Nutr. 84: 99-102 (2000)
3. Yeo JH, Lee KG, Kim HC, Oh YL, Kim AJ, Kim SY. The effect of PVA/chitosan/fibroin(PCF)-blended sponge sheets on wound healing in rats. Biol. Pharm. Bull. 23: 1220-1223 (2000)
4. Yeo JH, Lee KG, Kweon HY, Woo SO, Han SM, Kim SS, Demura M. Fractionation of a silk fibroin hydrolysate and its protective function of hydrogen peroxide toxicity. J. Appl. Polym. Sci. 102: 772-776 (2006)
5. Kim DK, Kang YK, Lee MY, Lee KG, Yeo JH, Lee WB, Kim YS, Kim SS. Neuroprotection and enhancement of learning and memory by BF-7. J. Health Sci. 51: 317-324 (2005)
6. Lee KG, Yeo JH, Lee YW, Kweon HY, Woo SO, Han SM, Kim JH. Studies on industrial utilization of silk protein. Korean J. Food Sci. Ind. 36: 25-37 (2003)
7. Yeo JH, Lee KG and Lee YW. Pure-separation of calcium chloride-

treated silk fibroin hydrolysate by gel filtration chromatography and effect of its enzymatic hydrolysis. Korean J. Seric. Sci. 41: 211-215 (1999)

8. Piotr K, Barbara PP. Urethane oligomers as raw materials and intermediates for polyurethane elastomers. Methods for synthesis, structural studies, and analysis of chemical composition. Polymer 44: 5075-5101 (1998)
9. Madyarov S, Lee KG, Yeo JH, Nam J, Lee YW. Improved method for the preparation of silk fibroin hydrolysates. Korean J. Seric. Sci. 41: 102-110 (2000)
10. Kim MH, Moon HR. Effects of sample pretreatment in amino acid analysis. Korean J. Clin. Pathol. 21: 34-39 (2001)
11. Cooper WT, Heiman, AS, Yates RR. Early diagenesis of organic carbon in sediments from the peruvian upwelling zone. J. Am. Chem. Soc. 305: 158-172 (1986)
12. Kim HA, Park KH, Yeo JH, Lee KG, Jeong DH, Kim SH, Cho YH. Dietary effect of silk protein sericin or fibroin on plasma and epidermal amino acid concentration of NC/Nga mice. Korean J. Nutr. 39: 520-528 (2006)
13. Chen K, Takano R, Hirabayashi K. Production of soluble fibroin powder by hydrolysis with hydrochloric acid and physical properties. J. Scri. Sci. Jpn. 60: 358-362 (1991)
14. Chen K, Iura K, Aizawa R, Hirabayashi K. The digestion of silk fibroin by rat. J. Scri. Sci. Jpn. 60: 402-403 (1991)
15. Chen K, Iura K, Takano R, Hirabayashi K. Effect of fibroin administration on the blood cholesterol level of rats loaded with cholesterol. J. Scri. Sci. Jpn. 62: 56-60 (1993)
16. Lu X, Akiyama D, Hirabayashi K, Production of silk powder and properties. J. Scri. Sci. Jpn. 63: 21-27 (1994)
17. Porath J, Flodin P. Gel filtration : A method for desalting and group separation. Nature 183: 1657-1659 (1959)
18. Ganapathy V, Leibach FH. Peptide transporters. Curr. Opin. Nephrol. Hy. 5: 395-400. (1996)
19. Shimura K, Katagata Y. Chemical Structure of Fibroin. Shinshu University, Ueda, Japan. pp. 335-352 (1980)
20. Asakura T, Yamazaki Y, Koo WS, Demura M. Determination of the mutual orientation of the ¹⁵N- and ¹³C-NMR chemical shift tensors of ¹³C-¹⁵N double labeled model peptides for silk fibroin from the dipolar-coupled powder patterns. J. Mol. Struct. 446: 179-190 (1998)
21. Hopfer U, Nelson K, Perrotto J, Isselbacher KJ. Glucose transport in isolated brush border membrane from rat small intestine. J. Biol. Chem. 248: 25-32 (1973)
22. Groff JL, Gropper SS. Advanced Nutrition and Human Metabolism. 3rd ed. Wadsworth and Thomson Learning, Belmont, CA, USA. pp. 178-204 (2000)
23. Asakura T, Sakakuchi R, Demura M, Manabe T, Uyama A. *In vitro* production of *Bombyx mori* silk fibroin by organ culture of the posterior silk glands; Isotope labeling and fluorination of the silk fibroin. Biotechnol. Bioeng. 4: 245-252 (1993)
24. Zhou CZ, Confalonieri F, Medina N, Zivanovic Y, Esnault C, Yang T, Jacquet M, Janin J, Duguet M, Perasso R, Li ZG. Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. Nucleic Acids Res. 28: 2413-2419 (2000)