

## 효소에 의한 실크 세리신의 가수분해와 항산화 효과

김 무 곤 · 오 한 진 · 이 지 영 · 이 정 용\* · 이 기 훈<sup>†</sup>

서울대학교 바이오시스템 · 소재학부, \*월드웨이(주) 생명공학연구소  
(2009년 2월 27일 접수, 2009년 5월 25일 수정, 2009년 5월 30일 채택)

### Enzymatic Hydrolysis of Silk Sericin and Its Anti-oxidative Effect

Moo Kon Kim, Hanjin Oh, Ji Young Lee, Jeong Yong Lee\*, and Ki Hoon Lee<sup>†</sup>

Department of Biosystems & Biomaterials Science and Engineering, Seoul National University, 599 Gwanak-ro,  
Gwanak-gu, Seoul 151-921, Korea

\*WORLDWAY Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Jeonui Industrial Complex  
(Received February 27, 2009; Revised May 25, 2009; Accepted May 30, 2009)

**요약:** 본 연구는 열수추출법에 의하여 추출한 세리신을 이용하여 단독 또는 2종의 효소를 이용하여 가수분해하고 그 가수분해물의 항산화 및 미백효과를 살펴본 것이다. 여러 산업용효소 중 세리신에 대한 분해효과가 우수한 alcalase, flavourzyme 및 protamex를 이용하여 분해한 결과 세리신의 분자량은 20 ~ 30 kDa의 범위로 감소하였으며 사용한 효소별로 특이적 가수분해물이 나타났다. 세리신 가수분해물의 항산화능을 살펴본 결과 원래 세리신에 비하여 DPPH 소거율이 높게 나타났으며 flavourzyme과 protamex를 같이 사용한 경우 약 85 %의 소거율을 나타냈다. 티로시나아제의 활성억제 효과를 살펴본 경우에는 세리신 가수분해물이 오히려 더 낮은 억제효과를 나타내었으나 세리신 가수분해물의 분획을 실시하고 활성억제 효과를 살펴본 결과 F2와 P3의 분획이 상대적으로 우수한 억제 효과를 나타내었다.

**Abstract:** In this study, we hydrolyzed hot-water extracted sericin with single or two enzymes and investigated anti-oxidative effect on DPPH free radical and inhibitory effect on tyrosinase activity of the sericin hydrolysates. Alcalase, flavourzyme, and protamex were effective in hydrolyzing sericin. Sericin was degraded into the range of 20 ~ 30 kDa. The sericin hydrolysate was shown to have stronger antioxidant properties than the original sericin. In the case of flavourzyme and protamex combination, the scavenging effect of sericin hydrolysate on DPPH radical was increased up to about 85 %. However, the inhibitory effect on tyrosinase activity of enzymatic hydrolysates was lower than that of the original sericin. After fractionation of sericin hydrolysates, we found that F2 and P3 fraction has higher inhibitory effect on tyrosinase activity compared to other fractions.

**Keywords:** silk sericin, antioxidative effect, tyrosinase activity, enzymatic hydrolysis, flavourzyme

## 1. 서 론

실크는 피브로인과 세리신이라는 두 단백질로 이루어져 있으며, 이 중 피브로인은 우리가 실크라고 부르는 섬유를 구성하고 세리신은 두 가닥의 피브로인을 감싸고 있는 단백질이다. 세리신은 통상 정련 공정을 통하여 제

거가 되며 이렇게 세리신이 제거가 된 후에야 실크 고유의 광택과 촉감이 나타난다. 세리신은 전체 실크 단백질의 약 25 %를 차지하지만 위와 같은 정련공정을 통하여 대부분 폐기되는 실정이다. 그러나 이렇게 폐기되는 세리신을 재활용하고자 하는 시도가 꾸준히 진행되고 있으며 그 중 가장 성공적으로 적용된 분야가 세리신의 보습성을 이용한 화장품 분야이다.

세리신은 하나의 단백질이라기보다는 여러 단백질이 혼재해 있으므로 피브로인을 감싸고 있는 단백질의 총칭

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: prolee@snu.ac.kr)

이라고 볼 수 있다. 따라서 세리신의 분자량도 다양한데 연구자에 따라 약간의 차이가 있지만 통상 70 ~ 300 kDa의 범위에 있다고 여겨진다[1-3]. 현재 가장 널리 이용되는 세리신 추출방법은 증류수만을 이용하여 80 ~ 120 °C의 고온에서 처리하는 열수추출법이다. 이 경우 순수하게 물만을 이용함으로써 추가적인 공정이 필요하지 않다는 장점이 있다. 비록 분자량이 저하된다는 단점이 있지만 식품 및 화장품 분야로 이용하는데 있어서는 큰 문제가 되지 않는다.

일반적으로 세리신은 친수성 단백질로 알려져 있지만 열수추출법에 의하여 제조된 세리신은 여전히 고분자 물질이어서 동결건조 후 물에 대한 용해도가 떨어진다. 현재 이러한 용해도 문제를 해결하기 위하여 산 또는 염기 조건에서 추가적으로 가수분해된 세리신이 시판되고 있다. 그러나 이러한 가수분해 방법은 중화 탈염의 추가적인 공정이 필요할 뿐만 아니라 세리신을 무차별적으로 가수분해하여 제품 성능의 재현성에 문제점이 있다고 판단된다. 따라서 최근에는 효소를 이용한 저분자화 방법들이 시도되고 있다. 효소를 이용하는 경우 특이적 반응이 일어나 일정한 분자량을 갖는 세리신 분자를 재현성 있게 생산할 수 있으며 염산 또는 수산화나트륨과 같은 위해물질을 사용하지 않으므로 보다 안전한 공정이다.

세리신의 아미노산 조성상 특징을 보면 세린이 약 30%를 차지하고 친수성 아미노산의 함량이 높은 특징을 갖고 있다. 특히 세리신의 아미노산 조성은 인체의 천연 보습인자(natural moisturizing factor, NMF)와 유사하여 피부보습효과가 우수한 소재로 알려져 있어 화장품에서 보습성분으로 이용이 되어 왔다. 보습효과 이외에도 Kato 등[4]은 세리신이 지질과산화와 티로시나아제의 활성 억제에 효과가 있음을 발표한 바 있으며, 이를 바탕으로 현재는 세리신의 미백효과, 피부암 억제 등의 생리활성을 검증하는 연구 등이 발표되고 있다[5-9].

그러나 아직까지 정확한 기작에 대한 연구는 드문 실정인데 이는 세리신을 구성하는 단백질의 종류가 다양하고 추출시 추가적인 가수분해로 인하여 새로운 단백질이 형성되므로 실제 생리활성에 관여하는 세리신 단백질을 분리하는 것이 어렵기 때문이다. 그러나 최근 세리신의 추출 및 후처리 조건을 달리하여 세리신을 제조하고 보다 높은 생리활성 단백질을 찾기 위한 연구가 시도되고 있다. 김 등은 세리신을 3회 분획한 것과 수용성 세리신 분말을 3가지 효소로 처리하여 항산화능을 검토한 결과 고분자 세리신의 항산화능이 가장 우수한 것으로 보고하였다[10]. Wang 등은 세리신을 protease P로 가수분해

하여 티로시나아제의 활성억제를 실험한 결과 분자량 250 ~ 4000 Da의 세리신 단백질이 10 mg/mL의 농도에서 약 50%의 억제효과가 있음을 보고하였다[11]. 그러나 아직까지 초기 연구 단계이며 보다 상세한 연구가 요구된다.

본 연구는 열수추출법에 의하여 추출한 세리신을 1종의 효소 또는 2종의 효소를 복합적으로 사용하여 가수분해하고 그 가수분해물의 항산화능을 검토하고자 한다. 또한 분자량 대역별 분획을 통하여 항산화능이 보다 우수한 세리신을 동정하고자 한다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 재료

누에고치는 월드웨이(주)(Korea)에서 제공받았으며 사용된 효소는 모두 Novozyme (Denmark)에서 구입하였다. 3,4-Dihydroxy-L-phenyl-alanine (DPPH), ninhydrin solution, tyrosinase, arbutin, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DOPA) 및 그 외 시약들은 모두 Sigma Aldrich (USA)에서 구매하였다.

### 2.2. 실험방법

#### 2.2.1. 세리신 효소 가수분해와 분자량 분포 분석 및 분획

누에고치 2 g과 증류수만 이용하여 욕비 1 : 20으로 고온고압(120 °C, 98 kPa)상태에서 1 h 동안 처리하여 세리신 수용액을 얻었으며, 세리신 수용액의 농도가 최종 1%가 되도록 증류수를 첨가하였다. 초기 효소의 선별과정에서는 효소를 세리신 대비 1%의 양을 첨가하여 가수분해를 시행하였다. Alcalase, flavourzyme 및 protamex를 이용한 실험에서는 azocasein 분해 시 15 min 동안 흡광도를 1 증가시키는데 필요한 효소의 양을 기준으로 하여 효소의 첨가량을 조절하였다. 그 결과 세리신 1 g당 alcalase는 10  $\mu$ L, flavourzyme은 80 mg, 그리고 protamax는 10 mg를 첨가하였다. 상기 3종의 효소를 단독 또는 2종을 혼합하여 세리신 수용액에 첨가하여 37 °C에서 6 h 동안 가수분해시켰다. 2종의 효소를 사용하는 경우에는 위의 각 효소 첨가량에 1/2를 사용하여 두 효소를 혼합하였다. 효소의 불활성화는 반응이 종료된 후 100 °C에서 1 h 동안 시행하였다. 이 후 각각 분해된 세리신 수용액을 바로 실험에 이용하였다.

세리신 및 그 가수분해물의 분자량은 각각의 세리신 수용액을 8 M urea 수용액과 1 : 1로 혼합하여 최종

4 M urea 수용액을 이동상으로 하여 겔여과 측정법으로 측정하였다. 컬럼은 Superdex 75 (GE Healthcare, USA)를 이용하였으며 유속은 0.5 mL/min, 시료 loading 양은 0.1 mL으로 하였다. 세리신을 분획하는 경우에 있어서는 같은 방법으로 시행하되 시료 loading 양은 0.5 mL으로 하였다.

### 2.2.2. 세리신 가수분해물의 N말단 정량

세리신이 가수분해된 정도를 알아보기 위하여 10배 희석시킨 200  $\mu$ L의 세리신 수용액과 200  $\mu$ L의 ninhydrin reagent를 혼합하고 15 min 동안 100  $^{\circ}$ C에서 반응시킨 후, 15 min 동안 ice water에서 냉각시켰다. 이 후 50 % 에탄올을 1 mL 넣고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다 [12]. 만일, 흡광도가 1.5를 초과하는 경우에는 5배 희석하여 측정하였다.

### 2.2.3. 항산화 테스트

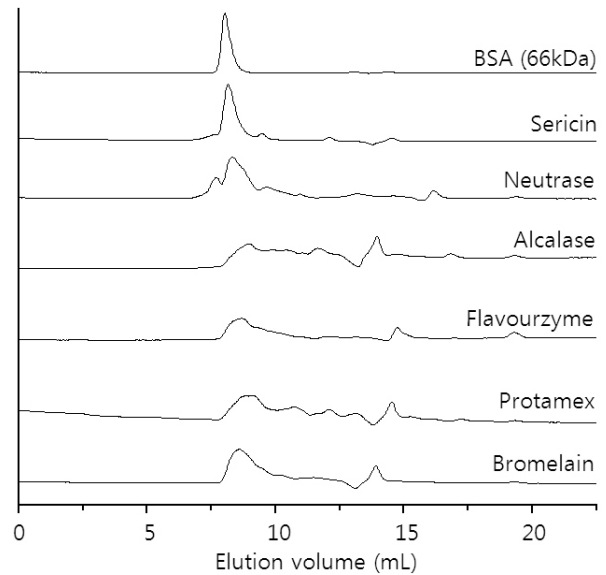
세리신의 항산화능은 DPPH 라디칼의 소거능으로 판단하였다. DPPH를 에탄올에 녹여 농도가 0.6 mM이 되도록 하고 가수분해 한 세리신 수용액은 phosphate 완충액으로 pH 5.8로 맞추었다. 각 세리신 수용액과 DPPH 시약을 2 : 1로 섞고 25  $^{\circ}$ C에서 30 min 동안 반응시킨 후 원심분리시켜 상등액을 취하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 다음의 식으로 라디칼의 소거율을 계산하였다.

$$\text{Scavenging effect (\%)} = \left\{ 1 - \left( \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \right\} \times 100$$

$A_{\text{sample}}$ 은 세리신을 첨가하였을 때의 흡광도이며,  $A_{\text{control}}$ 은 세리신이 첨가되지 않았을 때의 흡광도이다. 한편 세리신 수용액 자체의 흡광도를 고려하여 517 nm에서의 세리신 수용액 흡광도를 측정하여 각각의 시료별로 그 값을 보정해주었다. 기존 항산화제와 비교를 위하여 알부틴(arbutin) 10 mg/mL을 이용하였다.

### 2.2.4. 티로시나아제 활성 억제 실험

pH 7.0의 sodium phosphate 완충액 10 mL에 티로시나아제와 DOPA를 각각 3.4 mg과 17.5 mg 용해하여 시험용액을 제조하였다. 세리신 수용액(10 mg/mL)은 먼저 pH를 7.0으로 조절하고 세리신 수용액과 티로시나아제 수용액을 각각 850  $\mu$ L와 50  $\mu$ L씩 넣고 37  $^{\circ}$ C에서 6 min 동안 교반하였다. 이 후 DOPA 수용액을 50  $\mu$ L 넣고 37  $^{\circ}$ C에서 1 min 동안 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하여 다음의 식을 이용하여 활성억제 효과를 나타내었다.



**Figure 1.** Molecular weight distribution of sericin hydrolyzed with various enzymes.

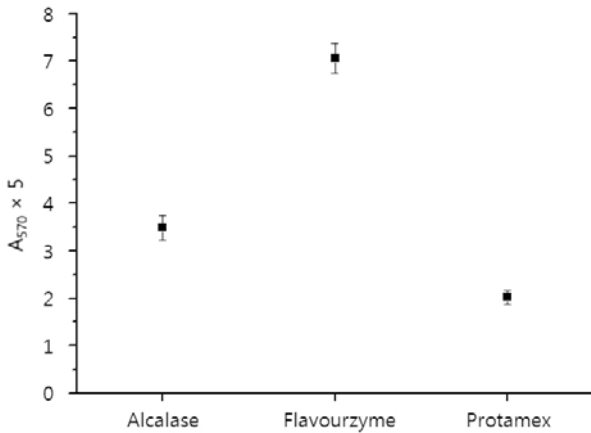
$$\text{Inhibition effect (\%)} = \left\{ 1 - \left( \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \right\} \times 100$$

$A_{\text{sample}}$ 은 세리신을 첨가하였을 때의 흡광도이며,  $A_{\text{control}}$ 은 세리신이 첨가되지 않았을 때의 흡광도이다. 항산화 테스트와 마찬가지로 세리신 수용액 자체의 흡광도는 보정해주었다. 기존 항산화제와 비교를 위하여 알부틴 10 mg/mL을 이용하였다.

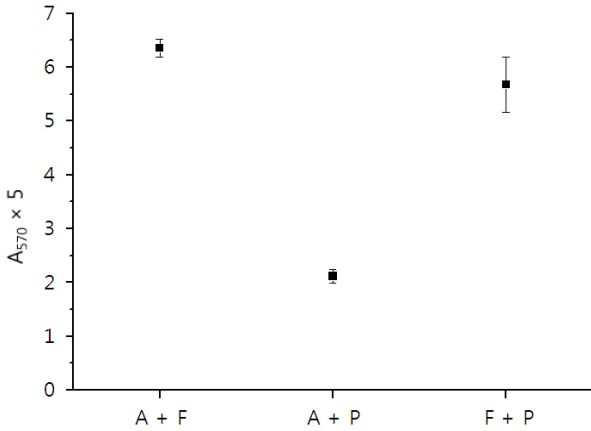
## 3. 결과 및 고찰

세리신의 가수분해에 적합한 효소를 선별하기 위하여 총 5종의 효소에 대하여 가수분해를 실시하고 분자량을 측정하였다. Figure 1에서 보는 바와 같이 열수추출 세리신(HS)는 약 66 kDa 정도의 분자량을 갖는데 반하여 효소로 가수분해한 세리신의 경우 상당히 저분자화 되었음을 알 수 있다. 사용한 효소 중에는 alcalase, flavourzyme 그리고 protamex가 neutrase나 bromelain에 비하여 가수분해 정도가 더 많이 일어났음을 알 수 있었으며, 향후 실험에서는 alcalase, flavourzyme, 그리고 protamex의 3종의 효소만을 이용하였다.

세 효소의 세리신에 대한 가수분해능력을 평가하기 위하여 효소의 첨가량을 azocazein을 분해하는 능력을 기준으로 통일하였다. Figure 2에서 보듯이 flavourzyme이 가수분해능력이 가장 우수하고 protamex가 가장 떨어졌



**Figure 2.** Increase of N-terminal residue of sericin after hydrolysis with single enzyme for 6 h. The absorbance was multiplied by 5 because of the dilution before measurement.

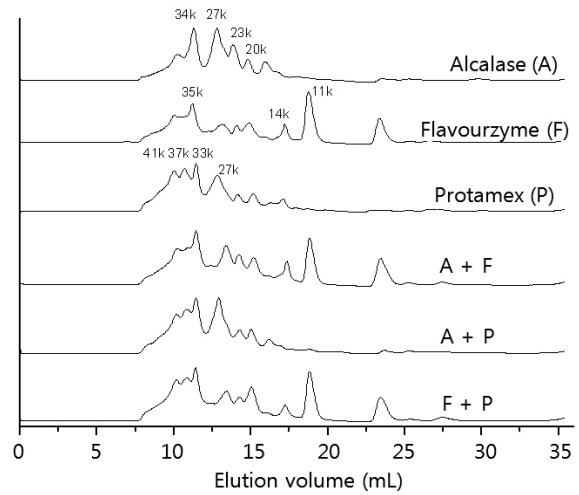


**Figure 3.** Increase of N-terminal residue of sericin after hydrolysis with combination of two enzymes for 6 h. The absorbency was multiplied by 5 because of the dilution before measurement. A+F: alcalase and flavourzyme, A+P: alcalase and protamex, and F+P: flavourzyme and protamex.

다. 일반적으로 protamex와 alcalase는 endopeptidase로 소수성 아미노산에 대한 특이성을 나타내며[13], flavourzyme은 endo와 exopeptidase의 혼합물이다. 따라서 flavourzyme에 의한 N말단의 증가는 세리신 단백질의 C말단에서 분해된 유리 아미노산에 기인한 것으로 판단된다.

Figure 3은 2종의 효소를 혼합하여 세리신을 분해하였을 때 증가하는 N말단을 정량한 것이다. 단독의 경우와 유사하게 flavourzyme이 포함된 처리군에서 보다 많은 N말단이 형성되었음을 확인할 수 있다.

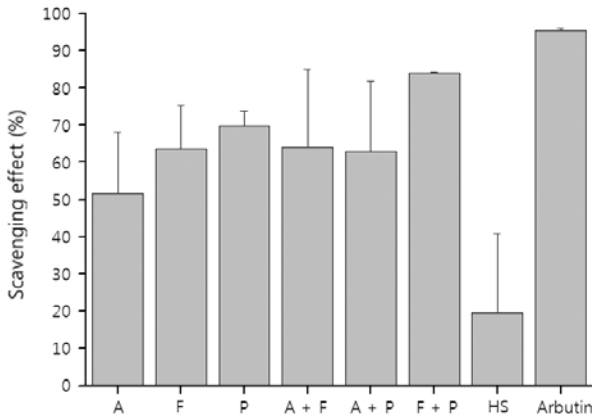
Figure 4는 단독 또는 2종의 효소를 사용하여 세리신



**Figure 4.** Molecular weight distribution after hydrolysis with single enzyme and combination of two enzymes. A+F: alcalase and flavourzyme, A+P: alcalase and protamex, F+P: flavourzyme and protamex, and WS: commercial sericin.

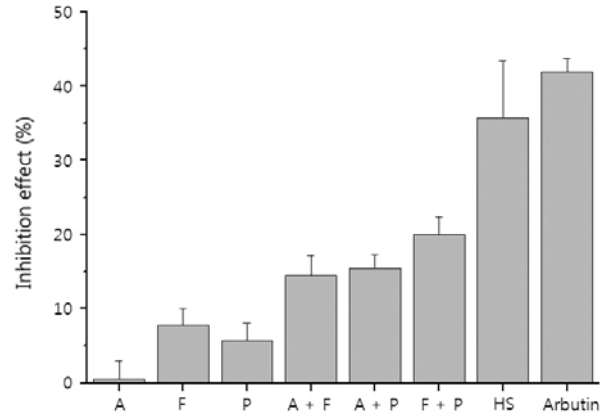
을 가수분해한 후의 분자량 분포이다. 단독의 경우 alcalase는 약 14 ~ 66 kDa의 범위에서 대부분의 세리신 가수분해물이 나타났으며 특히 34 kDa와 27 kDa의 피크가 강하게 나타나는 것이 특징이다. Flavourzyme의 경우 다른 효소와 달리 상당히 넓은 분자량 분포를 나타내었으며 11 kDa에서의 피크가 높은 것이 특징이다. 또한 앞서 언급한 것처럼 flavourzyme내에 포함된 exopeptidase에 의하여 분해된 유리 아미노산으로 추정되는 물질의 피크가 컬럼의 분해능을 초과하는 약 23 mL에서 나타났다. Protamex에 의한 가수분해의 경우에는 분자량이 13 ~ 66 kDa이지만 41, 37 그리고 33 kDa의 세리신 분자가 강하게 나타나는 것으로 보아 저하 효과가 크지 않은 것으로 판단되는데 이는 앞선 N말단 분석 결과와 일치한다. 2종의 효소를 이용하여 분해하는 경우에는 각 효소의 특징이 복합적으로 나타났다. Flavourzyme이 포함되는 경우에는 약 11 kDa에 해당하는 피크가 관찰되었으며 protamex가 포함된 경우에는 33 ~ 41 kDa에 해당하는 특이적 피크가 나타났다. Alcalase가 포함된 경우에는 20 ~ 27 kDa에 해당하는 alcalase에 의해 가수분해된 세리신의 특징이 나타났다.

단독 또는 2종의 효소를 이용하여 가수분해한 세리신의 항산화능을 DPPH 라디칼에 대한 소거능으로 평가하였다. Figure 5에서 보듯이 단독의 경우 protamex로 분해된 세리신의 항산화능이 더 우수한 것으로 나타났다.



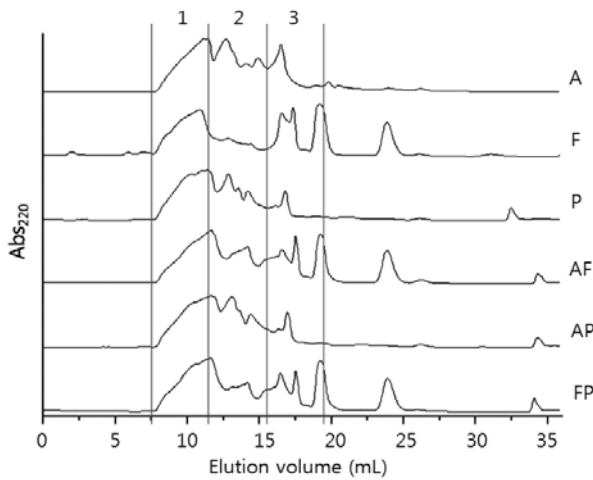
**Figure 5.** Scavenging effect of sericin and its enzymatic hydrolysates on DPPH free radical. A: alcalase, F: flavourzyme, P: protamex, A+F: alcalase and flavourzyme, A+P: alcalase and protamex, F+P: flavourzyme and protamex, and HS: intact sericin.

2종의 효소로 가수분해한 경우에는 flavourzyme-protamex로 가수분해한 세리신의 항산화능이 더 우수하였다. 가수분해된 세리신이 항산화능이 보다 높게 나타난 이유는 단백질의 입체구조와 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다. 단백질은 매우 복잡한 3차원 구조를 갖는데 일반적으로 소수성 아미노산은 내부에 친수성 아미노산은 표면에 많이 존재하는 것으로 알려져 있다. 효소 가수분해를 통하여 단백질의 분자량을 저하시키면 그만큼 단백질의 크기도 작아지고 그에 따라 표면적이 증가하게 되므로 보다 많은 친수성 아미노산이 표면에 위치할 가능성이 생긴다. 또한 일부 소수성 아미노산의 경우 원래 단백질의 내부에 존재하였더라도 저분자화에 의해 변성이 일어나 표면으로 노출될 가능성도 있다. 아미노산 중 항산화능이 우수한 아미노산은 시스틴, 히스티딘, 리신, 트립토판, 메티오닌, 티로신 등인데 세리신에는 이들 아미노산이 약 7.3 mol% 정도 존재한다[14,15]. 이들 중 리신과 히스티딘은 친수성 아미노산으로 단백질의 표면에 존재할 가능성이 높으며 트립토판과 티로신은 소수성 아미노산이지만 변성에 의해 표면으로 노출되었을 것으로 생각된다. 실제 효소 가수분해시 일부 침전이 발생하는 것으로 보아 이러한 소수성 아미노산이 표면으로 노출되어 소수성 상호작용에 의해 침전이 발생하는 것으로 보인다. 특히 protamex는 소수성인 트립토판과 티로신을 더 특이적으로 분해하기 때문에 보다 더 많은 트립토판과 티로신이 노출되고 결과적으로 더 우수한 항산화능을 보이게 된 것으로 생각된다.



**Figure 6.** Inhibitory effect of sericin and its enzymatic hydrolysates on tyrosinase activity. A: alcalase, F: flavourzyme, P: protamex, A+F: alcalase and flavourzyme, A+P: alcalase and protamex, F+P: flavourzyme and protamex, and HS: intact sericin.

DPPH 라디칼에 대한 소거능력이 일반적인 항산화 특성을 보여주는 것에 반하여 티로시나아제의 활성억제는 피부의 미백효과와 밀접한 연관성을 갖는다. 따라서 효소에 의하여 가수분해된 세리신이 실제 이와 같은 미백효과를 나타내는지 확인하기 위하여 티로시나아제의 활성 억제 효과를 살펴보았다(Figure 6). 당초 저분자 세리신에서 보다 우수한 티로시나아제 활성 억제효과를 기대하였으나 실제로는 원래 세리신(HS)의 활성 억제 효과가 더 우수하게 나타났다. 효소 가수분해한 세리신 중에서는 단독의 경우 flavourzyme이 상대적으로 좋은 억제효과를 나타내었으며 2종의 효소를 처리한 경우에는 flavourzyme과 protamex로 분해한 세리신이 보다 좋은 효과를 나타내었다. 최근 Kang 등과 Anghileri 등은 티로시나아제가 피브로인과 세리신에 존재하는 티로신 잔기를 산화시킬 수 있음을 보고하였다[15,16]. 이들은 산화된 티로신이 퀴논구조로 바뀌게 되고 단백질 내의 아미노 작용기와 반응하여 단백질간의 가교결합이 생성되는 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 티로시나아제의 활성을 측정하는 과정에서 DOPA를 첨가하기 전 티로시나아제와 세리신 단백질만을 교반하는 과정이 있는데 이때 티로신 잔기의 산화가 일어나고 산화된 티로신 잔기가 가교반응을 하는 것으로 보인다. 실제 반응과정에서 약간의 침전물이 발생하는데 이는 이러한 가교반응의 결과라 생각된다. 따라서 저분자 세리신의 경우 티로신이 노출되어 있을 가능성이 있으므로 반응이 빨리 일어나고 가교도 많이 발생하여 세리신에 존재하는 티로신이 상당



**Figure 7.** Fractionation of sericin proteins prepared from enzymatic hydrolysis. A: alcalase, F: flavourzyme, P: protamex, AF: alcalase and flavourzyme, AP: alcalase and protamex, and FP: flavourzyme and protamex.

히 소모되었을 것으로 판단된다. 반면에 고분자 세리신(HS)의 경우 티로신이 단백질의 내부에 존재하고 그로 인하여 티로시나아제의 접근성이 떨어져 상당량의 티로신이 미반응 상태로 남아 있을 것으로 생각된다. 실제로 Anghileri 등은 저분자 피브로인과 고분자 피브로인을 비교한 결과 저분자 피브로인이 티로시나아제와 보다 빨리 반응함을 보고하였다[15].

비록 세리신 가수분해물의 티로시나아제에 대한 활성 효과가 낮게 나타났지만, 세리신 가수분해물에 존재하는 다양한 단백질 중 보다 효과적인 단백질을 찾기 위하여 각 가수분해물의 분획을 Figure 7과 같이 실시하였다. 단백질이 검출되는 시점부터 4 mL씩 각각 3분획하여 항산화능을 살펴보았다. 각 분획의 분자량은 분획 1이 33 ~ 59 kDa, 분획 2는 18 ~ 33 kDa, 그리고 분획 3은 10 ~ 18 kDa이었다.

분획된 세리신의 티로시나아제 활성 억제 효과를 Table 1에 나타내었다. 단일 효소를 이용한 경우에 있어서는 분획전과 유사하게 protamex와 flavourzyme으로 분해한 세리신이 보다 나은 억제효과를 가졌으며 alcalase로 분해한 경우가 가장 좋지 않았다. Flavourzyme으로 분해한 세리신의 분획 중에서는 상대적으로 고분자량인 F1이 가장 우수한 억제효과를 보였으며, alcalase와 protamex의 경우에 있어서는 저분자량이 우수한 억제효과를 보였다. 그러나 각 분획별 존재하는 단백질의 양이 상이하므로 단백질 함량에 따른 억제효과를 살펴본 결과 F2와 P3이 다른 분획에 비하여 우수한 억제효과를 나타내었다.

**Table 1.** Inhibitory Effect of Sericin Fractions Hydrolyzed by Single and Two Enzymes on Tyrosinase Activity

Fractions <sup>a</sup>	Protein content ( $\mu\text{g}$ )	Inhibition rate (%)	Inhibition rate/Protein content (%/ $\mu\text{g}$ )
Single enzyme			
A1	2.17	19.6 $\pm$ 7.3	9.03 $\pm$ 3.35
A2	3.01	16.1 $\pm$ 9.5	5.36 $\pm$ 3.15
A3	1.95	21.7 $\pm$ 6.2	11.18 $\pm$ 3.19
F1	2.48	28.7 $\pm$ 3.9	11.56 $\pm$ 1.58
F2	0.12	21.8 $\pm$ 4.2	182.35 $\pm$ 35.02
F3	2.54	22.3 $\pm$ 4.3	8.79 $\pm$ 1.70
P1	3.09	21.4 $\pm$ 3.8	6.93 $\pm$ 1.24
P2	2.61	21.6 $\pm$ 1.6	7.95 $\pm$ 0.29
P3	0.57	26.0 $\pm$ 0.7	45.53 $\pm$ 1.23
Two enzymes			
AF1	2.58	22.6 $\pm$ 4.5	8.77 $\pm$ 1.73
AF2	0.75	23.1 $\pm$ 4.1	30.86 $\pm$ 5.47
AF3	1.81	26.0 $\pm$ 2.4	14.40 $\pm$ 1.32
AP1	2.51	25.6 $\pm$ 2.8	11.21 $\pm$ 1.06
AP2	2.96	25.7 $\pm$ 0.7	9.82 $\pm$ 0.65
AP3	0.75	27.0 $\pm$ 2.6	40.74 $\pm$ 1.35
FP1	2.93	28.2 $\pm$ 2.7	8.75 $\pm$ 0.97
FP2	0.65	28.7 $\pm$ 1.9	39.79 $\pm$ 1.02
FP3	1.85	30.7 $\pm$ 1.0	14.63 $\pm$ 1.43

Ax: sericin fraction hydrolyzed by alcalase, Fx: sericin fraction hydrolyzed by flavourzyme, Px: sericin fraction hydrolyzed by protamex, AFx: sericin fraction hydrolyzed by alcalase and flavourzyme, APx: sericin fraction hydrolyzed by alcalase and protamex, and FPx: sericin fraction hydrolyzed by flavourzyme and protamex. Numbers designate the fractions from Figure 7.

특히 F2의 경우에 있어서는 월등히 좋은 억제효과가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 한편 2종의 효소를 이용하여 분해한 세리신의 경우 분획간 유의성 있는 차이점이 나타나지는 않았으나 대체로 저분자량인 AF3, AP3 그리고 FP3의 억제효과가 좋게 나타났다. 단백질 함량을 고려한 경우에는 AF2, AP3, FP2가 우수한 억제효과를 보였는데 이는 단독 효소의 경우에서 우수한 효과를 나타낸 F2와 P3의 분획이 함유되어 있기 때문인 것으로 판단된다.

## 4. 결 론

효소를 이용한 세리신의 가수분해를 시도한 결과 사용한 5가지 효소 중에 alcalase, flavourzyme, 그리고 protamex가 우수한 분해능력을 나타내었다. 이들 효소를 이용하여 단독 또는 2종의 효소를 같이 사용하여 세리신을 분해한 결과 분자량이 약 20 ~ 30 kDa으로 감소함을 확인하였다. 가수분해된 세리신의 DPPH 라디칼 소거능은 가수분해 전 세리신에 비하여 향상되었으며 이는 항산화능이 우수한 아미노산이 단백질의 표면으로 도출된 결과라고 생각된다. 한편 티로시나아제의 활성 억제 평가에서는 오히려 가수분해된 세리신이 낮은 억제효과를 나타내었는데 이는 단백질의 표면으로 도출된 티로신이 산화되어 더 이상 DOPA와의 경쟁관계를 유지하지 못하여 나타난 결과라고 판단된다. 그러나 세리신 가수분해물을 분획하여 실험한 결과 F2와 P3 분획이 상대적으로 우수한 억제효과를 나타내어 이들 분획에 대한 추가적인 연구가 진행된다면 미백효과가 우수한 단백질을 찾아낼 수 있을 것이라고 판단된다.

## 참 고 문 헌

1. K. Sprague, The *Bombyx mori* silk proteins: characterization of large polypeptides, *Biochemistry*, **14**(5), 925 (1975).
2. T. Gamo, T. Inokuchi, and H. Laufer, Polypeptides of fibroin and sericin secreted from the different sections of the silk gland in *Bombyx mori*, *Insect Biochem.*, **7**(3), 285 (1977).
3. Y. Takasu, H. Yamada, and K. Tsubouchi, Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **66**(12), 2715 (2002).
4. K. Kato, S. Sato, A. Yamanaka, H. Yamada, N. Fuwa, and M. Nomura, Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**(1), 145 (1998).
5. S. Zhaorigetu, N. Yanaka, M. Sasaki, H. Watanabe, and N. Kato, Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **71**(1 ~ 3), 11 (2003).
6. M. Sasaki, H. Yamada, and N. Kato, Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium and calcium in rats, *Nutr. Res.*, **20**(9), 1505 (2000).
7. S. Zhaorigetu, M. Sasaki, H. Watanabe, and N. Kato, Supplemental silk protein, sericin, suppresses colon tumorigenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**(10), 2181 (2001).
8. K. Tsujimoto, H. Takagi, M. Takahashi, H. Yamada, and S. Nakamori, Cryoprotective effect of the serine-rich repetitive sequence in silk protein sericin, *J. Biochem.*, **129**(6), 979 (2001).
9. M. Takahashi, K. Tsujimoto, H. Yamada, H. Takagi, and S. Nakamori, The silk protein, sericin, protects against cell death caused by acute serum deprivation in insect cell culture, *Biotechnol. Lett.*, **25**(21), 1805 (2003).
10. J. H. Kim and D. G. Bae, Hydrolysis characteristics and application of silk sericin: II. Characteristics of soluble sericin and its application on human skin, *Korean J. Seric. Sci.*, **45**(1), 58 (2003).
11. J. H. Wu, Z. Wang, and S. Y. Xu, Enzymatic production of bioactive peptides from sericin recovered from silk industry wastewater, *Process Biochemistry*, **43**(5), 480 (2008).
12. R. J. Beynon, Proteolytic enzymes : a practical approach, eds. J. S. Bond, 38, Oxford University Press, England (1989).
13. S. Sindayikengera and W. Xia, Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from protamex, *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, **7**(2), 90 (2006).
14. R. Marcuss, Antioxidative effect of amino acids, *Nature*, **186**, 886 (1960).
15. A. Anghileri, R. Lantto, K. Kruus, C. Arosio, and G. Freddi, Tyrosinase-catalyzed grafting of sericin peptides onto chitosan and production of protein-polysaccharide bioconjugates, *J. Biotechnol.*, **127**(3), 508 (2007).
16. G. D. Kang, K. H. Lee, C. S. Ki, and Y. H. Park, Crosslinking reaction of phenolic side chains in silk fibroin by tyrosinase, *Fiber. Polym.*, **5**(3), 234 (2004).