

## W/O 에멀전에서 피브로인 분자의 회합 및 응집에 의한 미세구의 형성

이진실 · 김지영 · 허 원\*

강원대학교 생물공학과

(2016년 4월 11일 접수, 2016년 6월 19일 수정, 2016년 6월 27일 채택)

### Formation of Fibroin Microspheres by Molecular Cohesion and Association in Water-in-oil Emulsion

Jin Sil Lee, Ji Young Kim, and Won Hur<sup>†</sup>

Dept. of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Choncheon 24341, Korea

(Received April 11, 2016; Revised June 19, 2016; Accepted June 27, 2016)

**초록:** 실크섬유의 구성단백질인 피브로인은 물에 녹지 않으나 고온의 염용액에 녹는다. 염용액을 투석하면 피브로인 수용액이 얻어지고, 시간이 경과하면 젤이 형성된다. 본 연구에서는 젤 형성 중간단계에 존재하는 피브로인 분자 회합체를 광산란법으로 분석하였고, 시간의 경과에 따라 그 크기가 증가하는 것을 확인하였다. 피브로인 수용액에 데칸과 계면활성제를 섞어 유상수적(W/O)형의 에멀전을 만들고 감압 건조시켜 미세구를 제조하였다. 피브로인 미세구는 매끄러운 표면의 구형을 유지하고 있으며, 수용액이나 식염수에 보관해도 불용성 상태를 유지하였다. 미세구의 불용성과 형태 안정성에 기여하는 피브로인 분자사슬의  $\beta$ -sheet 구조와 결정성 영역을 적외선 분광 스펙트럼과 X선 회절 분석을 이용하여 확인하였다.

**Abstract:** Fibroin is an insoluble protein polymer of silk fiber but undergo solubilization in a hot salt solution. The fibroin-salt solution was dialyzed to obtain an unstable aqueous fibroin, eventually turned to gel. Molecular association of aqueous fibroin and their growth were detected by dynamic light scattering. Fibroin microspheres were prepared by dehydration of W/O emulsion from aqueous fibroin, mixed with decane and detergents. Scanning electron microscopy showed that fibroin microspheres have the smooth surface. The fibroin microspheres remain insoluble in water as well as in saline without any significant swelling. FTIR and XRD were used to detect the presence of  $\beta$ -sheet structure formed by hydrogen bonds between fibroin molecules in an orderly manner.

**Keywords:** fibroin, microsphere,  $\beta$ -sheet structure.

## 서 론

피브로인은 실크섬유를 구성하는 중심 단백질이며 오랫동안 수술용 봉합사로 사용되었고, 생체적합성이 우수하여 다양한 생체소재로 개발되고 있다.<sup>1</sup> 피브로인은 다른 단백질 고분자에 비해 단량체에 해당하는 글리신 세린 알라닌의 구성비가 높으며, 특정한 배열-(glycine-alanine-glycine-alanine-serine-glycine)<sub>n</sub>-이 반복되는 결정성 영역과 비결정성 영역으로 구성되어 있다.<sup>2</sup> 실크섬유는 누에의 실샘에서 방사되는 과정에서 피브로인 분자사슬의 결정성 영역간의 수소결합으로  $\beta$ -sheet 구조를 형성하고 섬유고분자의 특성을 가진다.<sup>3</sup> 섬유상의 불용성 피브로인 단백질은 고농도의 염이나 염-에탄올

용액에 용해시킬 수 있고, 투석 후 염을 제거하면 순수한 피브로인 수용액이 된다. 그러나 피브로인 수용액은 매우 불안정하여 시간이 지나면 결정성 영역 사이에 수소결합으로  $\beta$ -sheet 구조를 형성하고 최종적으로는 불용성 하이드로젤을 형성한다.<sup>4</sup>

피브로인은 결정성이 강한  $\beta$ -sheet 구조 때문에 물에 녹지 않지만, 순수한 단백질이기 때문에 효소에 의하여 분해된다. 따라서 필름, 젤 혹은 미세구로 제조되어 세포지지체, 서방형 약물전달체 및 조직수복용 소재로 연구되었다.<sup>5</sup> 그러나 단백질 고분자의 물리적 특성의 한계로 인하여 다른 첨가제를 사용하여 특성을 개선하거나<sup>6</sup> 전기방사를 통한 나노섬유로 가공하여 기계적인 특성을 개선하여 생체소재로 사용하고 있다.<sup>7</sup> 피브로인 미세구 역시 유상수적(W/O)형 피브로인 에멀전을 감압 건조시켜 밀도와 강도가 높고 구형에 가까운 형태로 제조되어 사용되고 있다.<sup>8</sup> 그러나 수용액상의 피브로인 분

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: wonhurk@gmail.com

©2016 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

자가 모여 불용성 미세구를 형성하는 과정은 잘 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 화학적 수식이나 가교 반응이 없어도 불용성 미세구가 형성하는 과정을 조사하였다.

피브로인 미세구는 생분해되어도 아미노산을 제외한 다른 독성물질을 만들지 않아 약물전달체로서 바람직한 특성을 가질 수 있다. 생체 내에서 분해되는 약물전달용 소재로서는 poly(lactic-co-glycolic) acid(PLGA) 미세구가 주로 사용되어 왔다.<sup>9</sup> 전립선암 치료제로 사용되는 PLGA/goserelin이 미국 식품의약품 안전청의 허가를 받아 1989년 판매되었고, 2009년 황반부종 치료제인 PLGA/dexamethasone까지 13종의 PLGA 서방형 제제가 개발되었다.<sup>10</sup> 그러나 PLGA에 기인한 염증반응이 보고되었고 이를 약화시키기 위한 방법들이 개발되었다.<sup>11</sup> PLGA를 천연고분자와 혼합시켜 염증반응을 약화시켜 조직공학용 소재로서 사용하는 방법도 제시되었다.<sup>12</sup> 반면에, 피브로인은 PLGA처럼 다양하게 가공하기 어려우나 염증 유발 가능성은 낮은 것으로 평가되어 의료용 소재로 사용될 수 있는 여지가 많다.<sup>13</sup> 따라서 피브로인을 생체소재로 사용하기 위하여 전기방사 나노섬유, 다공성 스펀지 및 필름 형태로 제조하고 그 특성을 연구하고 있다.

본 연구에서는 유상수적(W/O)형 피브로인 에멀전을 감압 건조시켜 제조되는 미세구의 형성과정 및 구조 특성을 조사하였다. 피브로인 수용액의 특성을 전자현미경 및 광산란을 이용하여 분석함으로써 미세구의 형성과정을 추적하였다. 동시에 미세구에서 피브로인 분자간의  $\beta$ -sheet 구조와 결정성 영역의 형성을 X선 회절 및 적외선분광법으로 분석하였다. 미세구 내 효소를 고정화시켜 피브로인 단백질 분자사슬 조각의 방출을 억제하였다.

## 실 험

**시약 및 재료.** 실크섬유는 춘천시의 중앙시장 포목점에서 구입하였고, 수 센티미터의 길이로 잘라 탄산나트륨 수용액 0.3%(w/v)에 넣고 끓여 세리신과 불순물을 제거하고 증류수로 세척하였다. 세리신이 제거된 피브로인 섬유를  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  수용액 50%(w/v)에 넣고 105 °C로 가열시켜 녹였다. 피브로인이 용해된 염화칼슘 염용액을 10 kDa인 투석막에 넣고 전기전도도가 10  $\mu\text{S}/\text{cm}$  이하가 될 때까지 증류수를 교환하여  $\text{CaCl}_2$ 를 제거하였다. 투석한 피브로인 수용액을 동결건조시켜 분체로 제조하고 보관하였다. 동결건조된 피브로인 시료의 분자량은 fast protein liquid chromatography(Pharmacia FPLC system, Pharmacia, Kalamazoo, MI, USA)에 분획범위가 20~10000 kDa인 TSKgel 4000sw 칼럼(300×7.8 mm ID Toso Haas, Montgomeryville, PA, USA)을 사용하여 측정하였다. 분자량 표준물질은 blue dextran(2000 kDa), thyroglobulin(669 kDa), apoferritin(443 kDa),  $\beta$ -amylase(200 kDa), alcohol dehydrogenase(150 kDa), albumin(66 kDa), carbonic

anhydrase(29 kDa), cytochrome C(12.4 kDa), 그리고 유동상으로 tris(hydroxymethyl) aminomethane(20 mM, pH 7.0, 1.0 mL/min)을 사용하였다. Thermolysin(P1512)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

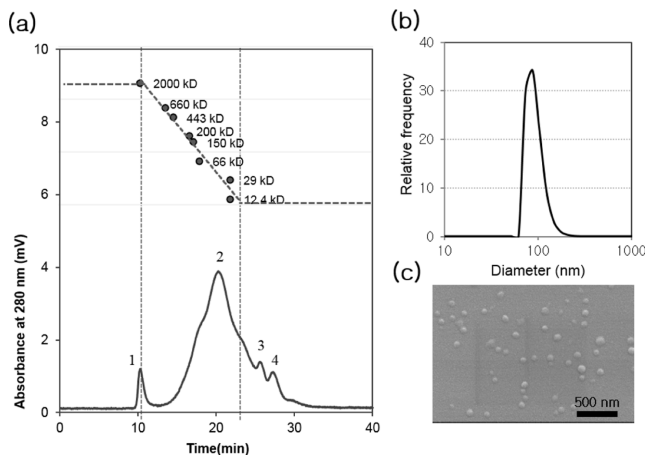
**미립구의 제조.** 피브로인 미립구를 제조하기 위하여 노말 데칸(*n*-decane) 16 mL에 Span 80과 Tween 80을 각각 2 mL씩 첨가하고 40 °C에서 교반하여 유기상 20 mL을 준비한다. 여기에 2%(w/v) 피브로인 수용액 8 mL을 첨가하고 고속균질기(Polytron PT2100; Kinematica, Switzerland)를 사용하여 30000 rpm에서 1분간 균질화시켜 에멀전을 만든다. 유백색 에멀전을 회전감압증발기(JP/N 1000S-W, Eyela, Japan)를 사용하여 40 °C에서 30분 동안 감압하여 수분을 제거한다. 원심분리기를 이용하여 에탄올로 수차례 세척하여 데칸과 계면활성제가 제거된 미세구를 얻었다.

**관찰 및 분석.** 피브로인 미세구 시료를 Sputter(E-1010, Hitachi, Japan)를 이용하여 10 mA에서 70초간 백금으로 코팅시킨 후, 형태와 입자 크기를 전계방사형 주사전자현미경(field emission scanning electron microscope, S-4300, Hitachi, Japan)을 사용하여 15 kV에서 관찰하였다. 피브로인 수용액은 광산란 입자분석기(ELS8000; Otsuka, Japan), 건조된 피브로인 미세구는 FTIR 분광계(Excaliber UMA 500; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 미세구에서 방출되는 단백질은 SDS-PAGE로 분석하였다.

## 결과 및 토론

**수용액 상태의 피브로인 분자.** 실크섬유를 가열한 염화칼슘 용액에 녹인 후 증류수로 투석하여 2%(w/v)의 피브로인 수용액을 제조하였다. 수용액상의 피브로인의 분자량 분포를 젤투과 크로마토그래피(gel permeation chromatography, GPC)를 사용하여 측정하였다(Figure 1(a)). 분자량 분포는 체류시간 10분 위치의 작은 피크 1과 체류시간 20분의 중심값을 가진 넓은 피크 2로 구성된 양봉을 나타내었다. 이외 분자량이 낮은 영역에서 작은 피크 3, 4가 존재한다.

피크 1은 상단 분획한계 분자량인 2000 kDa과 일치하였다. 피크 2의 중간값은 30 kDa에 해당하고 약 600 kDa부터 하단분획한계인 12.4 kDa 이하까지 넓은 분포를 나타내었다. 누에의 실샘에서 얻어지는 피브로인은 분자량 350 kDa의 큰 분자사슬과 25 kDa의 작은 분자사슬로 구성되어 있다.<sup>2</sup> 그러나 피크 2에서 보이는 넓은 분자량 분포는 피브로인이 고온의 염용액에서 가용화시키는 과정에서 절단되어 다양한 길이를 가지는 피브로인 분자사슬의 혼합물에서 기인한 것을 나타낸다. 피크 2에서 피브로인의 분자량인 350 kDa보다 큰 부분도 관찰되는데, 일부 피브로인 분자사슬이 뭉쳐 원래의 피브로인보다 큰 분자를 형성한 것으로 추정된다. 특히 GPC의 분획한계인 2000 kDa에서 관찰되는 피크 1은 피브로인 분자 혹은 분



**Figure 1.** Gel permeation chromatogram of aqueous fibroin (a); hydrodynamic diameter of fibroin aggregates (b); scanning electron micrograph of fibroin aggregates on mica (c).

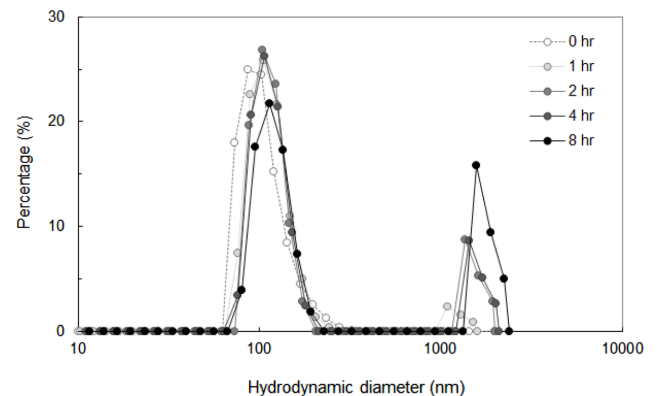
자사슬의 일부가 모여 형성한 회합체로 추정된다.

피크 1의 분획을 회수하고 광산란 입도측정기로 분석하여 약 100 nm의 유체역학적 직경을 가지는 것을 확인하였다 (Figure 1(b)). 이 분획을 마이카 표면에서 건조시킨 후 주사전자현미경으로 관찰하여 100 nm 이하의 크기를 가지는 구형 입자의 존재를 확인하였다(Figure 1(c)).

피브로인 회합체의 존재는 누에의 실샘에서 바로 분리된 피브로인 수용액이나 피브로인을 녹인 염화리튬 용액에서도 관찰된다.<sup>14,15</sup> 광산란법으로 측정된 피브로인 회합체의 크기는 용액에 따라 달랐다. 특히 염용액에서는 피브로인 분자와 회합체의 평형은 피브로인의 농도에 의존하지만, 수용액에서는 회합체가 우세하게 형성된다.<sup>15</sup> 수용액상의 피브로인 회합체의 형성 및 키네틱스는 광산란법으로 연구되었으나, 본 연구에서는 젤 투과 크로마토그래피와 전자현미경을 사용하여 피브로인 회합체의 존재를 실증적으로 증명하였다.

수용액상의 피브로인 분자는 불안정하여 분자사슬간 수소결합을 형성하고 시간이 경과하면 젤을 형성한다. 본 연구에서 제조된 2% 피브로인 수용액도 상온에서 24시간 방치하면 젤 상태가 되었다. 따라서 동적광산란으로 피브로인 수용액이 젤을 형성하는 과정을 추적하였다(Figure 2). Einstein-Stokes 식으로 환산된 수용액의 피브로인 회합체의 유체역학적 직경은 100 nm와 1  $\mu$ m 이상으로 나타났다. 시간이 경과할수록 1  $\mu$ m 이상의 유체역학적 직경을 가지는 불용성 입자의 비율이 증가하였다.

본 연구에서 미세구를 제조하기 위하여 제조한 수용액상태의 피브로인의 분자량 분포는 누에의 실샘에서 방사되는 피브로인의 분자량인 350와 25 kD와는 매우 다르다. 고온의 염용액으로 가용화시키는 과정에서 피브로인의 분자사슬이 절단되고, 탈염 후 수용액상태의 피브로인은 분자간의 회합을



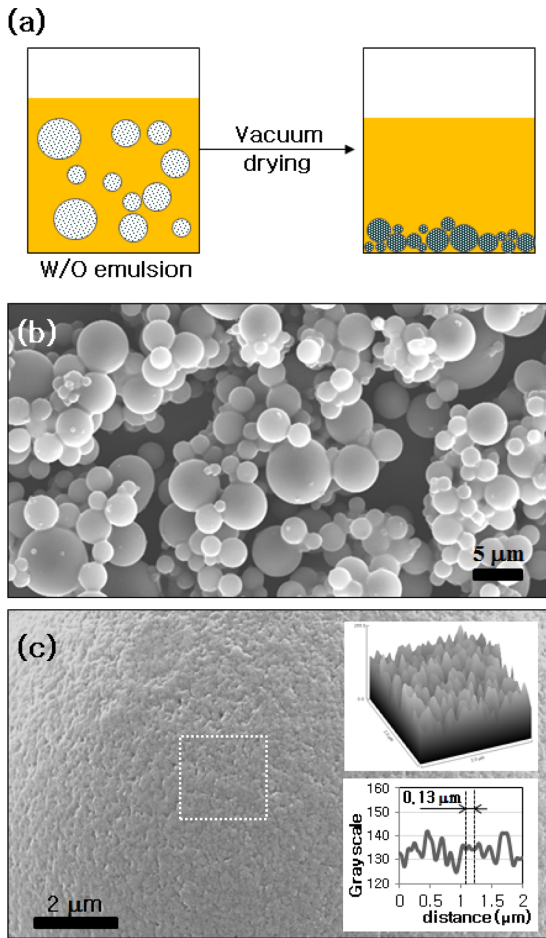
**Figure 2.** Dynamic light scattering of 2% aqueous fibroin at varying times.

통하여 약 100 nm의 유체역학 직경을 가지는 회합체로 일부 존재하고 이들이 뭉쳐 더 큰 입자를 형성하고 최종적으로 젤을 형성하는 것으로 추정된다.

**피브로인 미세구 제조.** 본 연구에서 제조된 2% 피브로인 수용액으로 Kim 등이 보고한 방법에 따라,<sup>8</sup> 불연속상의 W/O 에멀전을 제조하고, 분자의 회합과 응집체를 형성시키고, 감압 건조시켜 피브로인 미세구를 얻었다(Figure 3(a)). 피브로인 180 mg으로부터 131.4 $\pm$ 10.4 mg(n=8)의 미세구가 회수되어 82.2%의 수율을 얻었다. 주사전자현미경으로 미세구의 모양은 완전한 구형에 가깝고 직경은 0.5-6  $\mu$ m임을 확인하였다(Figure 3(b)). 주사전자현미경으로 1만 배로 확대하면 미세구의 표면에서도 굴곡이 관찰되었다(Figure 3(c)). 고배율에서 이미지분석 소프트웨어인 Image J를 사용하여 표면의 굴곡을 3차원으로 재구성하였다. 이미지 분석을 통하여 피브로인 미세구 표면 2  $\mu$ m에 평균 15개의 굴곡이 존재하고 굴곡간 거리는 0.13  $\mu$ m임을 확인하였다.

피브로인 미세구는 분무건조,<sup>16</sup> 염석,<sup>17</sup> 용매증발법,<sup>18</sup> 에탄올 침전법<sup>19</sup> 등으로 제조되어왔다. 그러나 대부분 피브로인 미세구는 구형을 형성하지 못하고 표면이 울퉁불퉁하거나 거친 경우가 대부분이었다. 반면, 본 연구에서 제조된 피브로인 미세구는 완벽한 구형과 매끄러운 표면을 형성하고 있다. 표면을 확대 관찰할 때 보이는 굴곡은 피브로인 회합체가 뭉쳐 형성된 마이크론 크기의 피브로인 하이드로젤 입자가 탈수되면서 생성된 것처럼 보인다. 미세구의 매끄러운 표면은 약물 전달 소재로 유리한 유체역학적 특성을 가진다고 알려져 있다. 그러나 본 연구에서 제조한 피브로인 미세구의 크기는 일정하지 않아, 약물전달소재로 사용하기 위해서는 균일도를 제고해야 한다. 에멀전을 제조하는 유화제의 조성이나 건조방법 및 균일한 크기의 핵입자를 첨가하는 방법 등을 사용하여 제조방법이 최적화되면 더 균일한 크기의 미세구를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

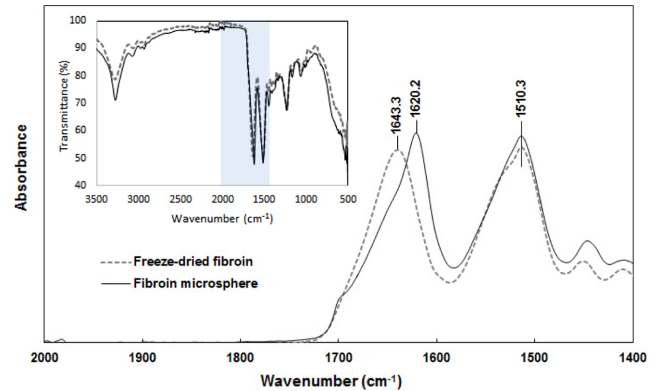
**미세구의  $\beta$ -sheet 형성과 결정성 회복.** 피브로인 미세구



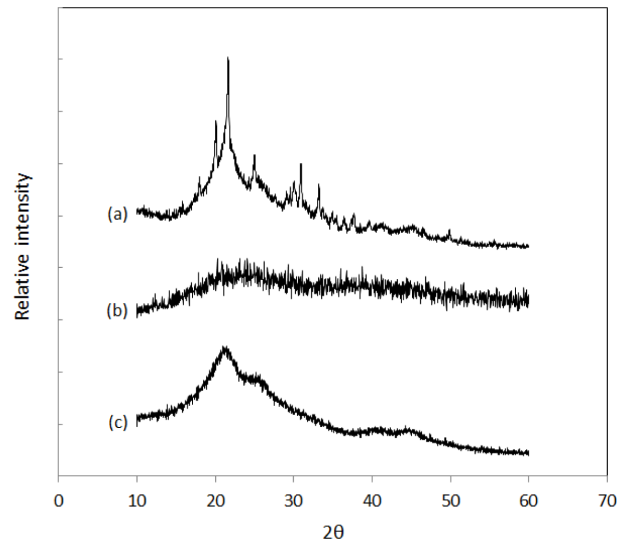
**Figure 3.** A schematic drawing of vacuum dehydration of W/O emulsion and condensation of fibroin microspheres (a). Scanning electron micrograph of fibroin microspheres: (b) 2000x magnification; (c) 10000x magnification. The insets show a three-dimensional surface and roughness width using an image analysis software (Image J).

는 수용액이나 생리식염수에서 1주일 이상 보관하여도 형태의 변화는 관찰되지 않았다. 수용액에서 피브로인 미세구가 용해되지 않고 형태를 유지하는 이유는 피브로인 분자사슬 사이의 수소결합으로 인한 물리적인 가교에 의한 것으로 추정된다. 따라서 적외선 분광분석법으로 미세구의 피브로인 분자의  $\beta$ -sheet의 형성 정도를 조사하였다.

피브로인 미세구의 FTIR 흡광 스펙트럼은 피브로인 고유의 스펙트럼과 대부분 일치하였다(Figure 4). 펩타이드 결합에서 amide II 구조의  $1510\text{ cm}^{-1}$ 의 피크와 amide III 구조를 나타내는  $1236\text{ cm}^{-1}$ 의 피크는 피브로인과 피브로인 미세구의 흡광 스펙트럼에서 변화 없이 같이 관찰되었다. 반면,  $1643\text{ cm}^{-1}$  피크의 중심이  $1620\text{ cm}^{-1}$ 로 이동하였다. 흡광 스펙트럼에서  $1643\text{ cm}^{-1}$ 에서  $1620\text{ cm}^{-1}$ 로 amide I 피크는 이동은 random coil이  $\beta$ -sheet로 바뀌었음을 나타낸다.<sup>20</sup> 따라서 FTIR 흡광



**Figure 4.** FTIR spectra of freeze-dried fibroin and fibroin microspheres with an inset showing the transmittance spectrum and the magnified region ( $2000\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ ).



**Figure 5.** XRD powder patterns of (a) pulverized fibroin; (b) freeze-dried aqueous fibroin; (c) fibroin microspheres.

스펙트럼 분석은 미세구는 피브로인으로 구성되어 있고 피브로인 분자는  $\beta$ -sheet을 형성하고 있음을 확인해준다.

피브로인 미세구에서  $\beta$ -sheet 구조가 형성되어 실크섬유같은 결정성이 회복되었는지 확인하기 위하여, 동결건조된 피브로인 수용액과 피브로인 미세구 그리고 실크 섬유 분말의 X선 회절 분석을 시행하였다(Figure 5). 실크섬유의 XRD에서 관찰되는  $21.12^\circ$  및  $21.70^\circ$ ,  $25.07^\circ$ ,  $30.90^\circ$ 의  $2\theta$  값은 피브로인 미세구의 XRD에서는 모두 사라졌으나  $2\theta$  값이  $21^\circ$ 를 중심으로 넓은 피크의 모양은 유지되었다. 반면, 동결건조된 피브로인 분말의 XRD에서는  $21^\circ$ 의 넓은 피크도 관찰되지 않았다. 따라서 피브로인 분말에서 관찰되지 않던 결정성 영역이 피브로인 미세구에서는 형성되었으나 원래 피브로인 섬유의 결정영역만큼 발달되지 않았음을 확인하였다. 실크섬유는

누에의 실샘에서 방사되면서 피브로인 분자사슬간 반복적인 수소결합을 형성하여 열역학적으로 안정한  $\beta$ -sheet 구조를 형성하여 높은 결정성을 나타낸다. 미세구의 제조과정에서 방사와 같은 전단응력을 제공하는 과정이 존재하지 않아, 실크 섬유 수준의 결정성을 나타내지 않은 것으로 추정된다.

**효소처리를 통한 펩타이드 방출제거.** 본 연구에서 제조된 미세구는 고온의 염용액에서 용해시킨 피브로인 분자가 탈염 과정을 거쳐 W/O 에멀전에서 탈수되면서  $\beta$ -sheet 구조를 형성하면서 얻어졌다. Figure 6에서는 미세구의 형성 과정을 단순화시켜 분자수준에서 도식화하였다. ① 섬유상의 피브로인은 350과 25 kD 크기의 분자사슬이 규칙적이고 반복적인 수소결합으로 이루어진  $\beta$ -sheet 구조를 형성하고 있다. ② 수용액상에서는 피브로인 분자사슬이 절단되어 다양한 크기를 가지게 되고 수소결합은 대부분 사라지게 된다. 일부 분자사슬은 회합체를 형성하고 있다. ③ W/O 에멀전의 불연속상에 해당하는 물방울 형태의 피브로인 수용액은 탈수되면서 다시  $\beta$ -sheet의 구조가 형성되고 불용성 미세구가 얻어진다. 그러나 크기가 작거나 수소결합으로 미세구에 결합하지 못한 피브로인 분자사슬은 미세구로부터 서서히 방출될 것으로 예상

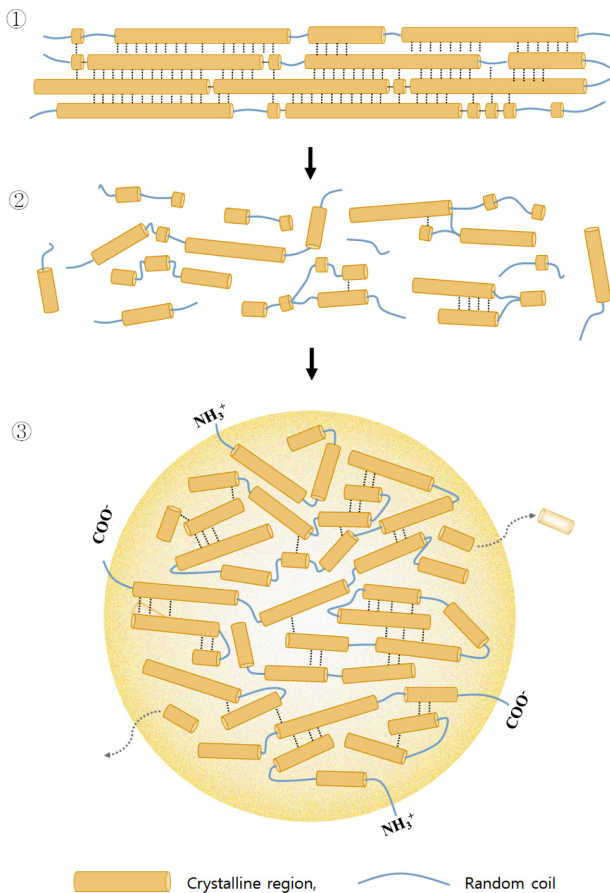


Figure 6. Schematic diagram of fibroin microsphere formation.

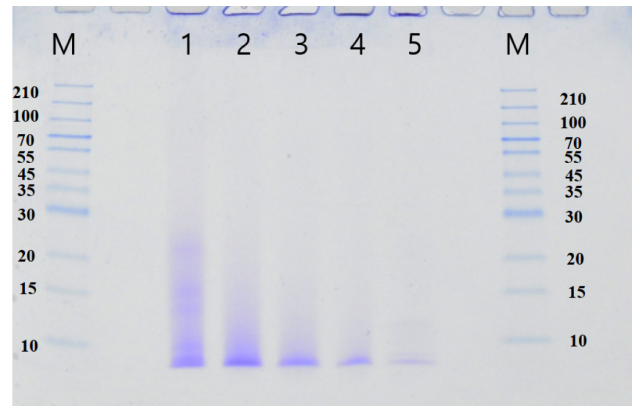


Figure 7. SDS-PAGE of fibroin microspheres containing varying amounts of thermolysin. M: size marker (kD), 1) microspheres only, microspheres with thermolysin 2) 0.06%, 3) 0.28%, 4) 0.56%, 5) 2.8% (w/w).

된다. 피브로인 수용액의 분자량 분포에서도 분획번호보다 크기가 작은 피크 3, 4가 관찰된 바 있다(Figure 1(a)). 실제로 미세구 현탁액에서 25 kD 이하의 크기의 단백질이 방출되는 것을 SDS-PAGE로 관찰하였다.

미세구를 약물전달체와 같은 생체 소재로 사용하는데 피브로인 분자사슬 조각의 방출은 바람직하지 않다. 따라서 피브로인 미세구에서 크기가 작은 단백질 분자사슬의 방출을 막기 위하여 펩타이드 결합을 촉진하여 피브로인 분자사슬 조각을 연결시키는 thermolysin을 사용하였다. 피브로인 대비 0.6%부터 2.8%까지 thermolysin 첨가하여 미세구를 제조하고 SDS-PAGE로 분석하여 피브로인 분자사슬 조각의 방출을 조사하였다(Figure 7). 미세구에 포함된 thermolysin의 양이 증가할수록 방출되는 단백질의 농도와 분자량과 줄어들었다. 피브로인 중량비 2.8%의 thermolysin이 포함된 미세구에서는 방출되는 피브로인 분자사슬이 대부분 사라졌다. 미세구에 포함된 thermolysin이 작은 펩타이드를 서로 연결시켜 방출을 억제한 것으로 추정된다. 원래 thermolysin은 단백질분해 효소이지만 펩타이드 합성이나 결합에 많이 사용되며, 수분의 농도가 낮을수록 펩타이드 합성속도가 증가하고 기질 mmol 당 40  $\mu$ L에서 최대 속도를 나타낸다.<sup>21</sup> 따라서 W/O 에멀전을 감압건조시키는 과정에서 수분이 제거되면서 thermolysin이 피브로인 분자사슬 조각을 결합시키는 반응이 진행되었을 것으로 추정된다.

## 결론

피브로인 미세구를 제조하는데 사용한 피브로인 수용액의 분자량은 누에의 실샘에서 분리되는 원래의 피브로인 분자와 매우 달랐다. 피브로인 분자는 가용화 과정에서 일부 분해되어 넓은 범위의 분자량 분포를 보이고 100 nm 유체역학적 직

경의 분자회합체도 존재했다. W/O 에멀전을 감압건조시켜 표면이 매끄럽고 구형에 가까운 미세구를 제조하였다. 고배율로 관찰된 미세구 표면의 굴곡은 피브로인 분자회합체들이 응집하여 형성된 입자 때문일 수 있다. 미세구의 불용성 및 구조 안정성을 부여하는  $\beta$ -sheet의 형성과 실크섬유에서 관찰되는 피브로인 분자의 결정성을 일부 회복하였음을 확인하였다. 아울러 thermolysin을 이용하여 방출되는 피브로인 분자사슬 조각을 제거하는 방법을 제시하였다.

**감사의 글:** 본 연구는 한국연구재단 기초연구(2010-0022812)와 2015년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비(관리번호-520150060)로 연구하였습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **24**, 401 (2003).
2. C. Z. Zhou, F. Confalonieri, N. Medina, Y. Zivanovic, C. Esnault, T. Yang, M. Jacquet, J. Janin, M. Duguet, R. Perasso, and Z. G. Li, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 2413 (2000).
3. J. Magoshi, Y. Magoshi, and S. Nakamura, *J. Appl. Polym. Sci.*, **41**, 187 (1985).
4. Z. H. Ayub, M. Arai, and K. Hirabayashi, *Biosci. Biotech. Bioch.*, **57**, 1910 (1993).
5. S. Nagarkar, A. Patil, A. Lele, S. Bhat, J. Bellare, and R. A. Mashelkar, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **48**, 8014 (2009).
6. S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, and E. Schacht, *Biomacromolecules*, **12**, 1387 (2011).
7. S. Y. Cho, H. H. Park, and H. J. Jin, *Polym. Korea*, **36**, 651 (2012).
8. O. Etienne, A. Schneider, J. A. Kluge, C. Bellemin-Laponnaz, C. Polidori, G. G. Leisk, D. L. Kaplan, J. A. Garlick, and C. Egles, *J. Periodontol.*, **80**, 1852 (2009).
9. E. J. Kim, S. Y. Lee, and W. Hur, *J. Appl. Polym. Sci.*, **121**, 3460 (2011).
10. J. M. Anderson and M. S. Shive, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **64**, 72 (2012).
11. Y. Zhang, H. F. Chan, and K. W. Leong, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **65**, 104 (2013).
12. Y. Lee, J. Kwon, G. Khang, and D. Lee, *Tissue Eng. A*, **18**, 1967 (2012).
13. Y. Iwasaki, S. I. Sawada, K. Ishihara, G. Khang, and H. B. Lee, *Biomaterials*, **23**, 3897 (2002).
14. G. Khang, *Infl. Regen.*, **32**, 178 (2012).
15. B. Panilaitis, G. H. Altman, J. Chen, H. J. Jin, V. Karageorgiou, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **24**, 3079 (2003).
16. K. S. Hossain, N. Nemoto, and J. Magoshi, *Langmuir*, **15**, 4114 (1999).
17. K. S. Hossain, E. Ohyama, A. Ochi, J. Magoshi, and N. Nemoto, *J. Phys. Chem. B*, **107**, 8066 (2003).
18. J. H. Yeo, K. G. Lee, Y. W. Lee, and S. Y. Kim, *Eur. Polym. J.*, **39**, 1195 (2003).
19. Z. Cao, X. Chen, J. Yao, L. Huang, and Z. Shao, *Soft Matter*, **3**, 910 (2007).
20. X. Hu, D. Kaplan, and P. Cebe, *Macromolecules*, **39**, 6161 (2006).
21. M. Erbedinger, X. Ni, and P. J. Halling, *Biotechnol. Bioeng.*, **59**, 68 (1998).