

최 종  
연구보고서

실크 세리신의 나노입자화 및 피부친화형  
소재 적용기술 개발

Preparation of Silk Sericin Nanoparticles and Their  
Applicaton to Cosmetics

연구기관  
서울대학교

농 립 부

T001183

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “실크세리신의 나노입자화 및 피부친화형 소재 적용기술 개발에 관한 연구” 과제(세부과제 “활성화된 PEG와 세리신과의 결합체 합성 및 결합체의 나노입자 제조”, “실크 세리신 단백질의 추출, 특성조사 및 PEG 활성화”, “세리신/PEG 결합체 나노입자의 화장품 소재로서의 안전성 조사”)의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 7 월 25 일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 조 중 수

세부연구책임자 : 조 중 수

협동연구기관명 : 농업과학기술원

협동연구책임자 : 이 용 우

협동연구기관명 : 바이오랜드

협동연구책임자 : 김 기 호

# 요 약 문

## I. 제 목

실크 세리신의 나노입자화 및 피부친화형 소재 적용기술 개발에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

보습효과, 주름방지 및 항산화 기능을 갖는 견 세리신의 나노입자를 만들기 위하여 직물의 정련 과정에서 비누가 사용되어 세리신의 활용에 제한이 있기 때문에 세리신을 고온고압으로 얻어서 얻은 세리신의 특성 및 구조분석을 하고, 여러 가지 방법으로 활성화된 PEG와 화학결합을 시킨다. 얻어진 세리신/PEG 결합체의 확인, 구조분석, 열적 성질, 나노입자 제조시에 주름 방지 제인 retinol를 담지 시켜 주름방지 및 항산화 효과를 극대화하고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 제 1 세부과제

#### 1) PEG/sericin 결합체의 제조

*p*-nitrophenylchloroformate로 활성화된 PEG, tresylated PEG, cyanuric chloride에 활성화된 PEG, monoamine terminated PEG와 세리신을 결합시켰다.

#### 2) PEG/sericin 결합체의 NMR 측정

PEG와 sericin 결합여부를 확인하기 위하여 NMR을 측정함.

#### 3) PEG/sericin 결합체의 CD 측정

PEG/sericin 결합체의 수용액에서의 이차구조를 확인하기 위하여 CD를 측정함.

#### 4) PEG/sericin 결합체의 IR 측정

PEG/sericin 결합체의 고체상에서의 이차구조를 확인하기 위하여 IR을 측정함.

#### 5) PEG/sericin 결합체의 DSC 측정

PEG/sericin 결합체의 열적성질을 알아보기 위하여 DSC를 측정함.

#### 6) PEG/sericin 결합체의 아미노산 분석

Sericin의 어느 부위와 PEG가 결합하는가를 확인하기 위하여 아미노산 분석을 함.

7) PEG/sericin 결합체의 나노입자 제조

PEG/sericin 결합체의 나노입자를 제조하기 위하여 에탄올에 녹인 후에 24시간 투석에 의하여 나노입자를 제조함.

8) PEG/sericin 결합체 나노입자 크기 측정

PEG/sericin 결합체 나노입자의 크기를 DLS로 측정함.

9) PEG/sericin 결합체 나노입자 형태 관찰

PEG/sericin 결합체 나노입자의 형태를 SEM과 TEM으로 관찰함.

10) PEG/sericin 결합체 나노입자에 레티놀의 담지

PEG/sericin 결합체와 레티놀을 DMSO에 녹인 후 투석하여 레티놀을 나노입자에 담지함.

11) 레티놀이 담지된 나노입자의 크기 측정

레티놀을 나노입자에 담지시킨 후 크기를 DLS로 측정함.

12) 레티놀이 담지된 나노입자의 형태 측정

레티놀이 담지된 나노입자의 형태를 SEM으로 관찰함.

13) 레티놀이 담지된 나노입자에서의 레티놀의 *in vitro*에서의 방출실험

레티놀이 담지된 후 37°C, pH 7.4의 *in vitro*에서의 방출실험을 행함.

2. 제 1 협동과제

1) 고온고압에 의한 세리신 추출

온도, 압력 및 시간에 따른 고치와 생사에서 세리신을 추출함.

2) 효소처리에 의한 세리신 추출

pH, 효소농도, 온도 및 반응시간에 따른 세리신을 추출함.

3) 추출된 세리신의 특성시험

추출된 세리신의 분자량, 결정화도, 흡습성, 아미노산 조성, 중금속 함량 및 형태를 조사함.

4) 추출된 세리신의 구조특성

추출된 세리신의 구조는 IR 및 CD로 측정함.

5) 추출된 세리신의 NMR 측정

추출된 세리신의 구조적 특성을 NMR로 측정함.

6) 추출된 세리신의 열분석

추출된 세리신의 열분석을 DSC로 측정함.

7) PEG의 활성화

PEG를 nitrophenyl chloroformate, tresylated 및 phenyl chloroformate로 활성화함.

8) PEG 활성화의 확인

활성화된 PEG는 NMR로 확인함.

9) 기계적 분쇄에 의한 세리신 나노입자 제조

열수로 추출하여 동결건조한 세리신을 믹스기나 볼 밀 또는 울트라 밀을 사용하여 기계적으로 부수어서 세리신 나노입자를 제조함.

10) 알콜 처리 세리신 나노입자 제조

알콜을 세리신용액은 처리하여 처리되는 알콜/세리신의 비에 따라 세리신 나노입자를 제조함.

11) 세리신 나노입자의 아미노산 조성 비교

제조 조건에 따른 세리신 나노입자의 아미노산 조성을 비교함.

12) 제조 조건에 따른 세리신 나노입자의 DSC 시차열분석

DSC 시차열분석을 이용하여 제조 조건에 따른 세리신 나노입자의 열적성질을 비교함.

13) 제조 조건에 따른 세리신 나노입자의 FT-IR 적외선 분광분석

적외선 분광분석법으로 세리신 나노입자의 구조 특성 변화를 관찰함.

14) 제조 조건에 따른 세리신 나노입자의 CD 분석

알콜 첨가에 따른 세리신의 용액 상태에서의 구조특성을 관찰함.

15) 제조 조건에 따른 세리신 나노입자의 X-선 회절 분석

세리신 나노입자에 대한 결정구조상의 변화를 살펴봄.

16) 세리신 나노입자의 크기 측정

Dynamic light scattering (DLS)을 이용하여 나노입자의 크기를 측정함.

17) 세리신 나노입자의 형태 관찰

주사전자현미경을 이용하여 만든 나노입자의 형태를 관찰함.

### 3. 제 2 협동과제

#### 1) PEG/sericin 결합체 나노입자의 안점막자극 시험

나노입자의 안점막자극시험을 보기 위하여 토끼눈에 처치하여 안점막자극 시험함.

#### 2) PEG/sericin 결합체 나노입자의 피부감작성 시험

나노입자의 피 방법에 의하여 피부감작성 시험을 함.

#### 3) PEG/sericin 결합체 나노입자의 피부자극 시험

나노입자의 피부자극시험을 토끼를 이용하여 실시함.

#### 4) PEG/sericin 결합체 나노입자의 급성경구독성 시험

나노입자의 급성경구독성시험을 토끼의 경구에 투여하여 실시함.

#### 5) PEG/sericin 결합체 나노입자의 급성경피독성 시험

나노입자의 급성경피독성 시험을 토끼의 경피에 적용하여 실시함.

#### 6) PEG/sericin 결합체 나노입자의 보습력 시험

나노입자의 보습력을 세리신 및 증류수와 비교하여 측정함.

#### 7) 항산화 효과 측정

레티놀이 담지된 나노입자의 항산화 효과를 측정함.

#### 8) 주름개선 효과 측정

레티놀이 담지된 나노입자의 피부 주름개선 효과를 보기 위하여 피부탄력도 측정기 또는 image analyzer를 사용하여 측정함.

#### 9) Melanin 생성억제 효과 측정

레티놀이 담지된 나노입자의 tyrosinase 저해효과 및 melanocyte에서의 melanin 생성억제 효과를 측정함.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 제 1 세부과제

1) PEG와 sericin의 결합여부를 NMR로 확인 결과 3.48 ppm에서 활성화된 PEG의 메틸렌 양성자의 peak과 세리신의 7.09, 7.26 ppm으로 tyrosine peak이 down field로 이동되는 결과로 결합이 확인되었다.

2) PEC와 sericin 간의 결합에서 sericin의 결합부위를 확인하기 위하여 아미노산

분석의 결과 sericin의 serine 부위와 결합함이 확인되었다.

- 3) Sericin의 이차구조는 PEG와 결합함으로 random 구조에서  $\beta$ -구조로 바뀌어 CD와 IR로 확인되었다.
- 4) PEG와 sericin 간의 결합에 의하여 PEG의 melting point와 sericin의 decomposition 온도는 낮은 온도로 이동하였다.
- 5) PEG/sericin 결합체는 에탄올에 녹인 후 투석하면 나노입자가 만들어졌고 DLS로 측정한 결과 200~350 nm의 크기를 나타냈고 나노입자의 형태는 SEM과 TEM으로 관찰한 결과 구형을 나타냈다.
- 6) PEG/sericin 결합체 나노입자에 레티놀이 담지되었고 레티놀의 소수성으로 인하여 나노입자의 크기는 증가되었지만 나노입자의 모양은 구형이었다.
- 7) PEG/sericin 결합체 나노입자에 레티놀을 담지했을 때 37°C, pH 7.4의 *in vitro*에서 레티놀이 서서히 방출되었다.

## 2. 제 1 협동과제

- 1) 고온고압에 의한 세리신의 최적추출조건은 110 °C, 0.9 kg/cm<sup>2</sup> 및 6시간에서 최적의 수율이었다.
- 2) 효소처리에 의한 세리신의 최적추출조건은 pH 6-7, 50-60 °C, 효소농도 3% 및 반응시간 2시간에서 최적의 수율이었다.
- 3) 효소처리에 의한 세리신의 분자량은 8,500-11,000이었고 고온고압에서의 세리신의 분자량은 67,000이었으나 아미노산 조성에는 큰 차이가 없었다.
- 4) 추출된 세리신에는 중금속은 2 ppm이었고, 구조는 고온고압은 random coil이었으나 효소처리시에는 일부  $\beta$ -구조가 포함되었다.
- 5) 효소로 추출된 세리신의 열분해온도는 201°C이었고 NMR 측정결과 저분자화가 진행되었다.
- 6) PEG가 nitrophenyl chloroformate, phenyl chloroformate 및 tresylated로 활성화됨이 IR과 NMR로 확인되었다.
- 7) 알콜 처리 세리신나노입자 제조시험에서 알콜의 양이 증가됨에 따라 세리신 입자는 마이크로 단위의 구형 입자 형태를 나타내었다.
- 8) 알콜 처리 또는 기계적 처리에 의한 추출 세리신은 대조로 사용한 열수 추출 세



리신에 비하여 아미노산 조성상의 큰 변화는 나타나지 않았다.

- 9) 세리신의 1차 열분해에 따른 흡열피크가 200 ~ 220°C 부근에서 나타났으며, 300 ~ 320°C 부근에서 2차 열분해에 의한 흡열피크가 발생하였다.
- 10) 알콜을 첨가한 세리신 용액은 198 nm 부근의 CD peak가 204 nm 부근으로 이동하였다.
- 11) 알콜 첨가군이 물리적 처리군에 비하여 다소 결정성이 높은 것으로 나타났으나 이 둘간에 결정구조에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

### 3. 제 2 협동과제

- 1) 세리신을 tresylated, p-nitrophenyl 및 triazine으로 활성화된 PEG와 결합하여 만든 나노입자는 토끼의 안점막에 접촉 후 안점막자극시험에서 어떠한 안구병변도 유발되지 않았다.
- 2) 세가지 방법으로 만든 나노입자의 피부감작에 접촉알러지 유무를 기니픽에서 알아본 결과 어떠한 접촉 알러지도 유발하지 않았다.
- 3) 세가지 방법으로 만든 나노입자의 피부자극시험을 토끼에 시험 결과 비자극 물질로 관찰되었다.
- 4) 세가지 방법으로 만든 나노입자의 토끼에 대한 급성경구독성 시험 결과 독성을 유발하지 않았다.
- 5) 세가지 방법으로 만든 나노입자의 토끼에 대한 급성경피독성을 시험한 결과 어떤 증상도 나타나지 않았다.
- 6) 세가지 방법으로 만든 나노입자의 보습력을 측정한 결과 세리신 자체보다도 높은 보습력을 나타냈다.
- 7) 세리신을 p-nitrophenyl 및 triazine으로 활성화된 PEG와 결합하여 만든 나노입자에 레티놀을 담지시킨 시료의 안전성 시험결과 세리신-PEG 나노입자와 유사한 안전성을 나타내었다.
- 8) 세리신을 p-nitrophenyl 및 triazine으로 활성화된 PEG와 결합하여 만든 나노입자에 레티놀을 담지시킨 시료의 항산화 효과를 측정한 결과 DPPH방법으로는 IC50 값이 각각 75mg/ml 와 80mg/ml 이었으며 레티놀 함량을 기준으로 계산 되었을 때는 각각 0.86mg/ml 와 99.20mg/ml 였다. 또한 Fenton 반응을 이용한 과

산화지질 억제반응에서는 IC50 값이 각각 2.2mg/ml 와 2.5mg/ml 였으며 레티놀 함량을 기준으로 계산 되었을 때는 각각 25.3 $\mu$ g/ml 와 31.0 $\mu$ g/ml 였다.

9) 세리신을 triazine으로 활성화된 PEG와 결합하여 만든 나노입자에 레티놀을 담지시킨 시료를 함유한 에센스 제형에 대한 주름개선효과를 45일 동안 측정한 결과 29%의 개선효과를 나타내었다.

10) 세리신을 p-nitrophenyl 및 triazine으로 활성화된 PEG와 결합하여 만든 나노입자에 레티놀을 담지시킨 시료의 melanin 생성저해 효과와 tyrosinase 저해효과를 측정한 결과 유의할 만한 효과를 나타내지 않았다.

#### 4. 활용에 대한 건의

실크세리신의 화장품용으로 사용하기 위하여 세리신의 수용액에서 안정성을 높이고 크기를 나노입자화 하기 위하여 PEG와 결합시켜서 세리신의 나노입자화가 되었고 이러한 나노입자는 in vivo에서 안전하였고 뛰어난 보습력을 갖췄기 때문에 화장품으로서 상품의 가치가 크리라 알고 이미 국내특허출원 중에 있고 기업체에서는 상품화를 추진 중에 있다. 따라서 활용에 대한 건의로서 우리 농산물의 가격 경쟁력을 높이기 위하여 본 과제와 같은 BT와 NT의 첨단기법이 농업에서도 접목이 될 수 있기를 건의한다.

## SUMMARY

### I. Title

Preparation of silk sericin nanoparticles and their application to cosmetics

### II. The Purpose of the Research

The purpose of this research is to prepare PEG/sericin conjugate nanoparticles and to apply for the cosmetics.

### III. Methods

#### 1. The First Subject

##### 1) Preparation of PEG/sericin conjugate

The PEG/sericin conjugates were prepared by coupling of sericin and *p*-nitrophenylchloroformate, tresylated, cyanuric chloride or monoamine PEG.

##### 2) NMR measurement of PEG/sericin conjugate

NMR was measured to check coupling of PEG and sericin.

##### 3) CD measurement of PEG/sericin conjugate

CD was measured to check the secondary structure of sericin in the conjugate.

##### 4) IR measurement of PEG/sericin conjugate

IR was checked to check the secondary structure of sericin in the conjugate.

##### 5) DSC measurement of PEG/sericin conjugate

DSC was measured to check the thermal properties of the conjugate.

##### 6) Amino acid analysis

Amino acid was analyzed to check the reaction of sericin with PEG.

##### 7) Preparation of PEG/sericin conjugate nanoparticles

PEG/sericin conjugate nanoparticles were prepared by dialysis after dissolving the conjugate in EtOH.

##### 8) Measurement of size of PEG/sericin conjugate nanoparticles

PEG/sericin conjugate nanoparticles sizes were measured by DLS.

9) Observation of shapes of PEG/sericin conjugate nanoparticles

Shapes of PEG/sericin conjugate nanoparticles were observed by SEM and TEM.

10) Loading of retinol into PEG/sericin conjugate nanoparticles

Retinol was loaded into the PEG/sericin conjugate nanoparticles by dialysis.

11) Measurement of size of retinol loaded-PEG/sericin conjugate nanoparticles

Retinol loaded-PEG/sericin conjugate nanoparticle sizes were measured by DLS.

12) Observation of shapes of retinol loaded-PEG/sericin conjugate nanoparticles

Shapes of retinol loaded-PEG/sericin conjugate nanoparticle were observed by SEM.

13) In vitro retinol release from retinol loaded-PEG/sericin conjugate nanoparticles.

Release of retinol from retinol loaded-PEG/sericin conjugate nanoparticle was performed at 37°C and pH 7.4.

2. The First-Joint Subject

1) Extraction of sericin by autoclave

Sericin was extracted from cocoon silk or raw silk by the autoclave.

2) Extraction of sericin by enzymes

Sericin was extracted from cocoon silk (or raw silk) by the enzymes.

3) Characteristics of extracted sericin

The extracted sericin was characterized.

4) Structure of extracted sericin

The structure of extracted sericin was measured by IR and CD.

5) NMR measurement of extracted sericin

NMR was measured to check structure of the extracted sericin.

6) DSC measurement of extracted sericin

DSC was measured to check thermal properties of the extracted sericin.

7) Activation of PEG

PEG was activated with nitrophenyl chloroformate, tresylated or phenyl chloroformate.

8) Checking of activated PEG

Activation of PEG was checked by NMR.

9) Preparation of sericin nanoparticle by mechanical milling

Sericin nanoparticle was prepared by mechanical milling.

10) Preparation of sericin nanoparticle by alcohol treatment

Sericin nanoparticle was prepared by treatment of alcohol with sericin solution.

11) Amino acid composition analysis of sericin nanoparticle

Amino acid composition was compared according to preparation method.

12) DSC measurement of sericin nanoparticle

DSC was measured to check the change of thermal properties of sericin nanoparticle.

13) FT-IR measurement of sericin nanoparticle

FT-IR was measured to check the structural change of sericin nanoparticle

14) CD measurement of sericin nanoparticle

CD was measured to check the structural change of sericin nanoparticle

15) X-ray diffraction measurement of sericin nanoparticle

X-ray diffraction was measured to check the change of crystalline structure of sericin nanoparticle.

16) Size measurement of sericin nanoparticle

Sizes of sericin nanoparticles were measured by DLS.

17) Observation of shapes of sericin nanoparticle

Shapes of sericin nanoparticles were observed by SEM.

3. The Second-Joint Subject

1) Eye irritation test of PEG/sericin conjugate nanoparticles

Eye irritation of PEG/sericin conjugate nanoparticles was tested in the eye of the rabbit.

2) Skin sensitivity test of PEG/sericin conjugate nanoparticles

Skin sensitivity of PEG/sericin conjugate nanoparticles was tested by the GPMT method.

3) Skin irritation test of PEG/sericin conjugate nanoparticles

Skin irritation of PEG/sericin conjugate nanoparticles was tested in the skin of the rabbit.

4) Acute oral toxicity of PEG/sericin conjugate nanoparticles

Acute oral toxicity of PEG/sericin conjugate nanoparticles was performed in the oral of the rabbit.

5) Acute dermal toxicity of PEG/sericin conjugate nanoparticles

Acute dermal toxicity of PEG/sericin conjugate nanoparticles was performed in the skin of the rabbit.

6) Skin hydration test of PEG/sericin conjugate nanoparticles

Skin hydration of PEG/sericin conjugate nanoparticles was tested in comparison with sericin or water.

7) Antioxidation test

Antioxidation effect of retinol-loaded PEG/sericin nanoparticle was tested using DPPH method and TBA method.

8) Evaluation of anti-wrinkle effect

Anti-wrinkle effect of essence formulation containing retinol-loaded PEG/sericin nanoparticle was tested on the face skin of volunteers for 45 days by topical application.

9) Inhibition effect of tyrosinase activity and melanin formation in melanocyte.

Inhibition test of tyrosinase activity and melanin formation of retinol-loaded PEG/sericin nanoparticle was carried out.

## IV Results and Discussion

### 1. The First subject

- 1) From results of NMR measurement of PEG/sericin conjugate, methylene peaks of the PEG and tyrosine ones of the sericin were shifted to the down-field at 3.48 and, 7.09 and 7.26 ppm.
- 2) From result of amino acid analysis, serine of the sericin was reacted with activated PEG.
- 3) Change of secondary structure of the sericin occurred from random coil to  $\beta$ -structure.
- 4) Melting point of PEG and decomposition temperature of PEG in the conjugate was decreased by conjugation.
- 5) PEG/sericin conjugate nanoparticles were prepared by dialysis after dissolving the PEG/sericin conjugate in ethanol. The sizes of the nanoparticles were 200~350 nm and the shapes of the them were spherical.
- 6) Retinol was loaded into PEG/sericin conjugate nanoparticles and the sizes of the nanoparticles were increased due to the hydrophobic property of the retinol. The shapes of retinol loaded nanoparticles were spherical.
- 7) Retinol was slowly released from retinol loaded-nanoparticles at 37°C and pH 7.4.

### 2. The First-Joint Subject

- 1) The optimum conditions of extraction of sericin by autoclave from cocoon (or raw) silk were 110°C, 0.9 kg/cm<sup>2</sup> and 6h.
- 2) The optimum conditions of extraction of sericin from cocoon (or raw) silk by enzymes were pH 6~7, 50~60°C, 3 wt-% of enzyme, and 2h reaction time.
- 3) The molecular weight of sericin extracted by autoclave and enzyme was 67,000 and 8,500~11,000, respectively.
- 4) The content of heavy metal in the extracted sericin was 2 ppm and the

secondary structure of sericin extracted by autoclave and enzyme was random coil and partially  $\beta$ -structure, respectively.

- 5) The decomposition temperature of the extracted sericin by enzyme was 201°C and the molecular weight of the sericin was decreased by enzyme.
- 6) From the results of IR and NMR, PEG was activated with nitrophenyl chloroformate, phenyl chloroformate and tresylate.
- 7) In the preparation of sericin nanoparticle by alcohol treatment of sericin solution, increase of alcohol composition gave sericin nanoparticle more spherical shape.
- 8) Amino acid composition of sericin extracted by alcohol treatment or mechanical milling was not different from that of sericin extracted by autoclave.
- 9) The first decomposition temperature was occurred in the range of 200~220°C, followed by the second decomposition temperature of 300~320°C.
- 10) Alcohol treatment of sericin solution made CD peak of sericin shift from 198nm to 204nm.
- 11) Alcohol treated sericin nanoparticle showed higher crystallinity compared to mechanically made sericin nanoparticle, but not different in crystal structure.

### 3. The Second-Joint Subject

- 1) PEG/sericin conjugate nanoparticles did not show eye irritation in the rabbit eye.
- 2) PEG/sericin conjugate nanoparticles did not induce contact allergy in the guinea pig.
- 3) PEG/sericin conjugate nanoparticles did not show skin irritation in the skin of the rabbit.
- 4) PEG/sericin conjugate nanoparticles did not show acute oral toxicity in the rabbit.
- 5) PEG/sericin conjugate nanoparticles did not show acute dermal toxicity in the



rabbit.

- 6) PEG/sericin conjugate nanoparticles exhibited higher skin hydration than silk or water.
- 7) Retinol-loaded PEG/sericin nanoparticles did not show any irritation and toxicity in safety test
- 8) Retinol-loaded PEG/sericin nanoparticles exhibited antioxidation effect in the free radical scavenging test(DPPH method) and lipid peroxidation test(TBA method). The range of IC50 values is 75–80mg/ml in DPPH method and 25.3–31.0 $\mu$ g/ml in TBA method, respectively.
- 9) Anti-wrinkle effect of essence formulation containing retinol-loaded PEG/sericin nanoparticles was 29% in comparison of placebo formulation.
- 10) Retinol-loaded PEG/sericin nanoparticles did not exhibit inhibition effect of tyrosinase activity and melanin formation in melanocyte.

## CONTENTS

Chapter 1.	Summary of research project .....	20
1-1.	Purpose of research project.....	20
1-2.	Significance of research project.....	20
1-3.	Scope of research project.....	21
Chapter 2.	Status of research project in the domestic and foreign countries.....	23
2-1.	Domestic country.....	23
2-2.	Foreign country.....	23
2-3.	Position of research project in the domestic and foreign countries.....	23
Chapter 3.	Methods and results of the research project.....	25
3-1.	The First Project.....	25
3-1-1.	Materials and methods.....	25
3-1-2.	Results and discussion.....	26
3-2.	The First Cooperative Project.....	28
3-2-1.	Materials and methods.....	28
3-2-2.	Results and discussion.....	29
3-3.	The Second Cooperative Project.....	37
3-3-1.	Materials and methods.....	37
3-3-2.	Results and discussion.....	40
Chapter 4.	Accomplishment to the goal and contribution to the related fields.....	89

4-1.	The First Project.....	89
4-2.	The First Cooperative Project.....	90
4-3.	The Second Cooperative Project.....	91
Chapter 5.	Performance Plan of the research results.....	92
5-1.	Expected research results after 2 years of the research finish .....	92
5-2.	Performance plan of the research results.....	92
Chapter 6.	Information of foreign science and technology during performing research project.....	93
6-1.	Information of polymeric nanoparticles to biotechnology.....	93
6-2.	Information of preparation of the polymeric nanoparticles.....	93
6-3.	Information of coupling of synthetic polymers to the natural polymers.....	93
Chapter 7.	References.....	94

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	20
1 절	연구개발의 목적	20
2 절	연구개발의 필요성	20
3 절	연구개발의 범위	21
제 2 장	국내외 기술개발 현황	23
1 절	국내	23
2 절	국외	23
3 절	국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치	23
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	25
1 절	제 1 세부과제	25
1.	연구방법 및 내용	25
2.	연구결과 및 고찰	26
2 절	제 1 협동과제	28
1.	연구방법 및 내용	28
2.	연구결과 및 고찰	29
3 절	제 2 협동과제	37
1.	연구방법 및 내용	37
2.	연구결과 및 고찰	40
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	89
1 절	제 1 세부과제	89
2 절	제 1 협동과제	90
3 절	제 2 협동과제	91

제 5 장	연구개발결과의 활용계획.....	92
1 절	연구 종료 2년후 예상 연구성과.....	92
2 절	연구결과의 활용계획.....	92
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	93
1 절	고분자 나노입자의 생물공학에의 응용정보.....	93
2 절	고분자 나노입자의 제조방법에 대한 정보.....	93
3 절	생체고분자에 합성고분자를 결합시키는 방법에 대한 정보.....	93
제 7 장	참고문헌.....	94

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1 절 연구개발의 목적

보습효과, 주름방지 및 항산화 기능을 갖는 견 세리신의 나노입자를 만들기 위하여 직물의 정련 과정에서 비누가 사용되어 세리신의 활용에 제한이 있기 때문에 세리신을 고온고압으로 얻어서 얻은 세리신의 특성 및 구조분석을 하고, 여러 가지 방법으로 활성화된 PEG와 화학결합을 시킨다. 얻어진 세리신/PEG 결합체의 확인, 구조분석, 열적 성질, 나노입자 제조시에 주름 방지 제인 retinol를 담지 시켜 주름방지 및 항산화 효과를 극대화하여 고부가가치의 화장품을 개발하고자 한다.

## 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

- 가. 현재 사용되고 있는 천연 보습제인 히아루론산(hyaluronic acid)는 제조설비가 많이 들고 비싸며 알긴산은 사용감과 상용성이 떨어짐.
- 나. 합성보습제인 glycerin, 1,3-butylene glycol, PVP, polyglyceryl methacrylate 등은 피부자극성이 높고 사용감이 좋지 못함.
- 다. 천연고분자인 실크 세리신 단백질은 뛰어난 보습성을 가지고 있음.
- 라. 나노입자는 표면적이 넓고, 살균이 용이하여 화장품소재로 이용가능하다.
- 마. 물리적 방법에 의한 실크 세리신단백질 나노입자는 제조하기가 어렵고, 수용액 상태에서 불안정함.
- 바. 따라서 합성고분자인 폴리에틸렌글리콜(PEG)과 결합시키면 PEG가 유기용매에 잘 녹기 때문에 세리신/PEG 결합체도 유기용매에 녹아 나노입자 형성이 가능하며.
- 사. 이러한 세리신/PEG 결합체는 수용성이면서 장기간 안정성을 유지할 수 있다.
- 아. 또한 PEG는 독성이 없고, 생체 적합성이 우수하므로.
- 자. 천연 고분자를 이용한 새로운 화장품소재등 신 기능성 물질의 개발이 가능할 것임.

### 2. 경제·산업적 측면

- 가. 잠사업에 종사하는 인구의 급격한 감소로 새로운 활로 모색이 시급하다.
- 나. 최근 누에분말의 혈당강하, 실크분말의 치매예방 및 알콜대사 촉진 등 성인병에 대한 효능이 밝혀지면서 다시 활기를 띄고 있다.
- 다. 누에고치의 25%에 달하는 세리신이 정련 등의 공정에서 제거 폐기되므로 1997년 현재 유통되는 생사류 3,294 톤의 25%인 823.5 톤의 세리신이 폐기되고 있다.
- 라. 잠사업을 활성화시키기 위해서 양잠에서의 부산물인 세리신에 고부가 가치를 부여할 방안이 강구될 뿐만 아니라 첨단 신소재 개발에 대한 발상의 전환이 절대적으로 필요한 시기임.
- 마. 고압 및 효소로 추출된 실크 세리신 단백질은 우수한 피부친화성 소재로서 화장품 용도로 사용 가능하다.
- 바. 실크 신소재를 이용한 고부가가치의 첨단 신소재 물질로 농업의 국제 경쟁력 제고 및 수출기반 확충으로 외화획득의 발판을 구축할 수 있다.

### 3. 사회·문화적 측면

- 가. 우리나라 전통산업인 잠사업을 유지발전 시키기 위하여 양잠 부산물의 부가 가치를 높일 뿐만 아니라 환경오염을 줄일수 있는 큰 요인이 된다.
- 나. 실크 세리신은 대표적인 천연 고분자 물질로서 인체에 거부반응이 없는 우수한 피부친화성 물질이다.
- 다. 생활수준의 향상으로 천연물 선호의 고급화장품 소재개발에도 부응될 수 있음.

## 3 절 연구개발의 범위

### 1. 제 1 세부과제

#### 가. 제 1 차년도

활성화된 PEG와 sericin을 반응시키고 PEG/세리신 결합체의 나노입자를 제조하여 특성을 조사한다.

#### 나. 제 2 차년도

1 차년도에 만든 나노입자에 주름방지 효과가 있는 레티놀을 담지시킨다.

## 2. 제 1 협동과제

### 가. 제 1 차년도

고온고압과 효소처리에 의하여 실크단백질로부터 세리신을 추출 및 특성을 살피고 PEG를 활성화한다.

### 나. 제 2 차년도

기존의 분쇄방법과 세리신 수용액에 알콜을 첨가하여 제조한 나노입자의 특성을 분석한다.

## 3. 제 2 협동과제

### 가. 제 1 차년도

세리신/PEG 결합체 나노입자의 화장품소재로서 사용할 수 있는가를 알아보기 위하여 안전성과 보습력을 조사한다.

### 나. 제 2 차년도

레티놀이 담지된 세리신/PEG 결합체 나노입자의 안정성과 항산화 효과를 측정한다.



## 제 2 장 국내외 기술개발 동향

### 1 절 국내

1. 실크 피브로인이나 세리신을 물리적인 분쇄방법에 의하여 미립자를 제조하고 있으나 천연 고분자인 실크 단백질은 미세하게 분말화 하는데는 시간이 많이 소모되고 수율도 낮다. (잠사곤충 연구부).
2. 화장품 용도로 개발하기 위해서는 균일하고 입자가 극히 작은 나노 크기의 구형의 입자를 제조할 수 있는 기술 개발이 시급히 요구되는 실정임.

### 2 절 국외

1. 세리신의 보습효과 및 항산화 작용이 확인되었으며 화장품으로의 가능성이 있다는 보고는 되어있지만 구체적으로 상세하게 보고된 논문은 거의 없는 실정임.
2. 실크 세리신은 세린이 전체 아미노산 조성중 31 wt.-%을 차지하기 때문에 보습효과가 뛰어나다(Voegeli와 2인, 1993).
3. 실크 세리신은 주름살을 막아 주는 역할도 가능함(Engel와 3인, 1987).
4. 실크 세리신은 지질의 과산화반응과 티로시나제 활성을 억제에 의한 항산화 효과가 우수하다는 보고가 있다(Kato 외 5인, 1998).
5. 실크 세리신의 졸-겔 현상과 겔의 물리적 성질에 관한 보고가 있다(Zha와 2인, 1995).

### 3 절 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

1. 양잠 부산물인 누에고치로부터 실크 세리신을 이용하여 화장품용 소재적용을 위해 입자크기를 나노화 하여 산업용소재로 활용화되므로서 1차 산업 즉 농업원료를 2차 산업에 접목하여 직간접적으로 농업 생산성을 높일 수 있는 첨단기술개발이 현실화됨으로서 농업의 부가 가치를 높이고 농업의 경쟁력 제고에 기여하며 정밀화학업체와 협동 연구를 수행함으로써 실용화가 구체화되리라 전망된다.
2. 누에 고치로부터 얻은 실크 세리신은 뛰어난 보습성과 항산화 작용을 가지고 있으면서도 수용액에서 불안정하고 유기용매에 잘 녹지 않는 단점을 가지고 있어, 독성이 없고 생체적 합성이 좋은 PEG와 결합시킴으로서 수용액에서 안정되고

유기용매에 용해됨으로서 원료로 이용하고자 하는 크기의 나노입자를 만들 수 있고 여기에 주름 개선제인 retinol을 나노입자에 담지 시킴으로서 새로운 보습 및 주름개선용 화장품 소재 개발이 가능하리라 기대된다.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 1 절 제 1 세부과제

#### 1. 연구방법 및 내용

##### 가. PEG/sericin 결합체의 제조

*p*-nitrophenyl chloroformate, tresylate, cyanuric chloride 및 monoamine terminate로 활성화된 PEG와 세리신을 4℃의 0.1 M sodium borate (pH 9.4) 에서 12시간 반응시킨후 분자량 12,000 cut-off 투석막으로 2일간 투석 후 동결건조하였다.

##### 나. PEG/sericin 결합체의 NMR 측정

PEG와 sericin 간의 결합여부를 확인하기 위하여 AVANCE 600 NMR을 측정하였다.

##### 다. PEG/sericin 결합체의 CD 측정

PEG/sericin 결합체의 sericin의 용액 2차 구조를 확인하기 위하여 JASC) 715 원이색성 분광기로 측정하였다.

##### 라. PEG/sericin 결합체의 IR 측정

PEG/sericin 결합체의 sericin의 고체 2차구조를 확인하기 위하여 M series FT-IR 분광기로 측정하였다.

##### 마. PEG/sericin 결합체의 DSC 측정

PEG/sericin 결합체의 용융온도와 분해온도를 측정하기 위하여 승온온도를 10 ℃/min으로 하여 DSC 2910을 이용하여 측정하였다.

##### 바. PEG/sericin 결합체의 아미노산 분석

PEG가 sericin의 어느 부위와 결합하는가를 알아보기 위하여 아미노산 분석을 하였다.

##### 사. PEG/sericin 결합체의 나노입자 제조

PEG/sericin 결합체의 나노입자를 제조하기 위하여 결합체를 에탄올에 녹인 후 에 투석에 의하여 나노입자를 제조하였다.

##### 아. PEG/sericin 결합체 나노입자의 크기 측정

PEG/sericin 결합체 나노입자의 크기는 오츠카전자의 ELS-8000의 DLS를 이용

하여 측정하였다.

#### 차. PEG/sericin 결합체 나노입자의 형태 관찰

PEG/sericin 결합체 나노입자의 형태는 JSM 5410의 SEM과 TEM으로 관찰하였다.

#### 차. PEG/sericin 결합체 나노입자에 레티놀의 담지

PEG/sericin 결합체와 레티놀을 유기용매인 DMSO에 녹인 후 MWCO 12,000의 투석막을 이용하여 레티놀을 나노입자에 담지시켰다.

#### 다. 레티놀이 담지된 나노입자의 크기 측정

레티놀이 담지된 PEG/sericin 결합체 나노입자 크기는 오즈카 전자의 ELS-8000의 DLS를 이용하여 측정하였다.

#### 과. 레티놀이 담지된 PEG/sericin 결합체 나노입자 형태 관찰

레티놀이 담지된 PEG/sericin 결합체 나노입자 형태는 JSM 5410의 SEM으로 관찰하였다.

#### 하. 레티놀이 담지된 나노입자에서의 레티놀의 in vitro에서의 방출실험

레티놀이 PEG/sericin 결합체 나노입자에 담지된 후 37°C와 pH 7.4의 in vitro에서 시간에 따른 레티놀의 방출실험을 행하였다.

## 2. 연구결과 및 고찰

### 가. PEG/sericin 결합체의 제조

*p*-nitrophenylchloroformate로 활성화된 PEG, tresylated PEG, cyanuric chloride 에 의해 활성화된 PEG, monoamine terminated PEG와 세리신을 결합하여 합성된 결합체를 NMR, IR, CD를 이용하여 구조분석을 하였다.

Fig. 1(a)는 sericin, 1(b)는 PEG, 1(c)는 PEG/sericin mixture, 1(d)는 PEG/sericin 결합체의 NMR을 나타냈다. Fig. 1(d)를 보면 PEG와 Sericin의 결합여부를 NMR을 통해서 확인해 볼 수 있다. 3.48ppm에서 활성화된 PEG의 메틸렌 양성자의 peak과 1-7ppm사이에 세리신의 다양한 아미노산 peak들이 분포하고 있다. 특히 7.09, 7.26ppm으로 tyrosine peak이 down field로 이동되는 결과로 이 곳에서 결합이 일어나는 것으로 확인해 볼 수 있었다.

세리신의 2차구조에 대한 확인으로 수용액상에서는 CD를 고체상에서는 IR을 측

정해 본 결과 random구조에서  $\beta$ -구조로 바뀌고 있음을 확인해 볼 수 있었다. Fig. 2는 sericin 단독(a), cyanuric PEG/sericin(b), amine PEG/sericin(c), tresylated PEG/sericin(d) 및 p-nitro PEG/sericin (e)의 CD 결과로서 sericin 과 같이 대부분은 200nm에서 아래로 볼록한 peak이 나타나는 것으로 봐서 random구조를 유지하고 있지만 일부분이 218nm에서 아래로 볼록한 peak이 보여  $\beta$ -구조로 바뀌고 있음을 확인해 볼 수 있다. Fig. 3에서는 보편 결합체의 경우 amide I, amide II가 wavenumber가 작아지는 것으로 보아  $\beta$ -구조로 바뀌고 있음을 보여 주고 있다.

#### 나. PEG/sericin 결합체의 열적 성질

Fig. 4(a)는 sericin, 4(b)는 PEG, 4(c)는 sericin-PEG conjugate의 DSC 결과로서 PEG 단독의 용융온도가 56.45°C인 것에 비하여 sericin-PEG conjugate에서의 PEG의 용융온도는 52.45°C로 약 4°C 낮은 온도로 이동되었다. 또한 sericin 단독의 열분해온도는 198°C인 것에 비하여 sericin-PEG conjugate에서의 sericin의 열분해온도는 196°C로 이동되었다. 이것은 PEG가 sericin과 결합함으로 결정성이 감소되었기 때문이라고 생각된다.

#### 다. PEG/sericin 결합체의 나노입자 제조와 크기 측정

PEG/sericin 결합체를 에탄올에 녹인 후 투석에 의하여 나노입자를 제조하였다. PEG/sericin 결합체에서 PEG의 activation 방법에 따라서 제조된 나노입자의 크기는 큰 영향은 없었고 tresylated PEG의 경우 204.1 nm로서 가장 작은 크기를 나타냈다. 수평균값으로서 나타낸 것을 Fig. 5에 나타냈다.

#### 라. PEG/sericin 결합체의 나노입자 형태 관찰

투석방법에 의하여 만든 나노입자의 형태를 SEM과 TEM으로 관찰한 결과를 Fig. 6에 나타냈다. (a-1)과 (a-2)는 cyanuric PEG/sericin의 SEM과 TEM, (b-1)과 (b-2)는 p-nitro PEG/sericin의 SEM과 TEM, (c-1)과 (c-2)는 tresylated PEG/sericin의 SEM과 TEM, (d-1)과 (d-2)는 amine PEG/sericin의 SEM과 TEM의 결과로서 어느 것이나 원형의 나노입자를 나타냈고 크기도 DLS로 측정한 결과와 큰 차이가 없었다.

#### 마. PEG/sericin 결합체 나노입자에 레티놀의 담지

PEG/sericin 결합체 5 mg, 레티놀 2.5mg을 10ml DMSO에 녹인 후 MWCO

12,000의 투석막에 투석하면 약 10 wt.-%의 레티놀이 PEG/sericin 결합체 나노입자에 담지되었다.

#### 바. 레티놀이 담지된 나노입자의 크기 측정

레티놀이 PEG/sericin 결합체 나노입자에 담지됐을 때의 크기를 Fig. 7에 나타냈다. 그림에서 나타내는 바와 같이 367.2 nm의 크기를 나타냈다. 이것은 레티놀이 없는 PEG/sericin 결합체 나노입자에 비하여 상당히 커졌는데 레티놀이 소수성이 크고 나노입자의 core에서 소수성 결합을 이뤘기 때문이라고 생각된다.

#### 사. 레티놀이 담지된 나노입자의 형태 관찰

레티놀이 PEG/sericin 결합체 나노입자에 담지됐을 때의 형태를 SEM으로 관찰했는데 원형을 나타냈다(그림 생략).

#### 아. 레티놀의 in vitro에서의 방출

레티놀이 PEG/sericin 결합체 나노입자에 담지된 후 37℃와 pH 7.4의 incubator에서 방출실험한 것을 Fig. 8에 나타냈다. 그림에서 나타내는 바와 같이 레티놀이 나노입자에서 서서히 방출되고 있었는데 이것은 레티놀이 소수성으로서 물에 대한 용해도가 아주 작기 때문으로 생각된다.

## 2 절 제 1 협동과제

### 1. 연구방법 및 내용

#### 가. 고온고압에 의한 세리신 추출

온도, 압력 및 시간에 따른 고치(또는 생사)에서 세리신을 추출하였다.

#### 나. 효소 처리에 의한 세리신 추출

효소인 flavourzyme과 actinase을 사용하여 pH, 효소농도, 온도 및 반응시간에 따라 세리신을 추출하였다.

#### 다. 추출된 세리신의 특성조사

추출된 세리신의 분자량은 GPC로 결정화도는 DSC로, 중금속 함량은 AA로, 아미노산 조성은 아미노산 분석기로 흡습성은 무게변화로 측정하였다.

#### 라. 추출된 세리신의 구조 조사

추출된 세리신의 용액구조는 CD로 고체구조는 IR로 측정하였다.

마. 추출된 세리신의 NMR 측정

추출된 세리신의 구조적 특성은 NMR로 측정하였다.

바. 추출된 세리신의 열분석

추출된 세리신의 열분해온도는 DSC로 측정하였다.

사. PEG의 활성화의 확인

PEG를 nitrophenyl chloroformate, tresylated 및 phenyl chloroformate로 활성화하였고 NMR로 확인하였다.

아. 알콜 처리 혹은기계적 분쇄에 의한 세리신 나노입자 제조

열수로 추출하여 동결건조한 세리신을 믹스기나 볼 밀 또는 울트라 밀을 사용하여 기계적으로 부수어서 세리신 나노입자를 제조하였다. 또한 알콜을 세리신용액은 처리하여 처리되는 알콜/세리신의 비에 따라 세리신 나노입자를 제조하였다.

자. 세리신 나노입자의 아미노산 조성 비교

제조 조건에 따른 세리신 나노입자의 아미노산 조성을 비교하였다.

차. 제조 조건에 따른 세리신 나노입자의 DSC 시차열분석과 FT-IR 적외선 분광 분석

DSC 시차열분석을 이용하여 제조 조건에 따른 세리신 나노입자의 열적성질을 비교하였고 적외선 분광분석법으로 세리신 나노입자의 구조 특성 변화를 관찰하였다.

카. 제조 조건에 따른 세리신 나노입자의 CD 분석

알콜 첨가에 따른 세리신의 용액 상태에서의 구조특성을 관찰하였다.

타. 제조 조건에 따른 세리신 나노입자의 X-선 회절 분석

세리신 나노입자에 대한 결정구조상의 변화를 살펴보았다.

파. 세리신 나노입자의 크기 측정

Dynamic light scattering (DLS)을 이용하여 나노입자의 크기를 측정하였다.

하. 세리신 나노입자의 형태 관찰

주사전자현미경을 이용하여 만든 나노입자의 형태를 관찰하였다.

2. 연구결과 및 고찰

가. 정련조건에 따른 세리신의 추출시험

1). 고온고압에 의한 세리신의 추출

고온고압법에 의한 세리신의 최적 추출 조건은 처리온도 110℃(0.9kg/cm<sup>2</sup>)에서 최고의 수율을 나타냈으며(Fig. 9), 처리시간에 따른 수율변화는 처리6시간까지는 직선적으로 수율이 증가하였으나 6시간이후 거의 변화가 없었으며(Fig. 10) 고치보다는 생사로부터 얻어지는 세리신의 수율이 높게 나타났다.

2). 효소처리에 의한 세리신의 추출

세리신의 최적 추출 조건을 선정하기 위한 효소(Flavourzyme) 처리조건에 있어 pH는 6~7의 중성상태(Fig. 11), 처리온도는 50~60℃ 범위(Fig. 12)에서 최적의 수율로 세리신을 추출 할 수 있었다. 또한, 효소농도 3%(Fig. 13), 반응시간 2시간범위(Fig. 14)가 최적의 추출 조건으로 생각할 수 있으며 그 이상 고농도 및 장시간 처리를 할지라도 수율 증가에는 크게 영향을 미치지 않았다. 정련조건에 따른 세리신 추출시험에서 고온고압에 의한 견층과 생사의 연감율은 22% 내외, 회수율은 67~92% 이상이었으며 또한 견층에 있어서 단백질 분해효소인 Flavourzyme 과 Actinase 3%(w/w) 농도로 추출한 세리신은 연감율이 23% 회수율은 97% 이상으로 거의 모든 세리신 단백질을 회수 할 수 있었다. 회수된 모든 샘플의 용해성이 95% 이상으로 친수성 인자가 많음이 확인되었다. 특히, 효소처리에 의한 세리신 단백질의 회수율이 고온고압법에 비해 더 높게 나타났음을 알 수 있었다(Table 1).

Table 1. Extraction conditions of sericin according to various degumming method.

Sample		Conditions	Degumming ratio (%)	Recovery yield (%)	Solubility(%)
Cocoon	Flavourzyme	55℃, 3hrs	23	98	98
	Actinase	"	23	96	97
Shell	고온 고압	110℃, 6hrs	16	67	99
Raw Silk	Flavourzyme	55℃, 3hrs	21	88	99
	고온 고압	110℃, 6hrs	22	92	97



나. 정련조건별 추출세리신의 특성 시험

1). 추출세리신의 분자량, 결정화도 및 흡습성

정련 조건별 추출 세리신의 특성을 살펴보면 평균분자량이 8,500~67,000의 범위로 분포하고 있을 뿐 아니라 모든 샘플에 있어 흡습성이 95%이상으로 친수성 성질의 인자가 많음이 확인되었다. 또한 추출 조건에 따른 세리신의 결정화도는 고온고압처리 시료가 가장 낮게 나타났다. 이는 효소처리를 함으로써 저분자화가 진행되어 분자간 재배열이 발생, 결정성이 향상된  $\beta$ -sheet 구조로 전이가 일어난 것이 원인으로 생각되어진다(Table 2).

Table 2. Molecular weight(MW), crystallinity and hygroscopic ratio according to various extraction conditions of silk sericin.

샘플 (Sericin)	Mw	Crystallinity(%)	Hygroscopic ratio(%)
Flavourzyme	8,500~11,000	63	98
Actinase	7,800~10,500	65	97
고온 고압	67,000	40	98

2). 추출세리신의 아미노산 조성

추출방법에 따른 견세리신 단백질의 아미노산 분석 결과, 대조로 사용한 고온고압추출세리신과 효소 추출 세리신 간에 큰 유의차는 없었으며 특히, 아미노산중 세린의 함량이 두처리구 모두에서 현저하게 높은 것으로 나타나 추출 견세리신 단백질에는 친수성 인자가 많이 함유되어 있음을 확인되었다(Table 3).

3). 추출세리신의 중금속 함량

추출 조건별 견세리신 단백질의 중금속 함량을 분석한 결과 추출방법에 따라 약간의 함량차이는 인정되었으나 추출세리신에 있어서 비소, 수은 등은 모든 처리구에서 전혀 검출되지 않았다. 특히, 효소 추출세리신의 경우 중금속 검출

량이 화장품 적용 기준치(예: 화장품 첨가제 2ppm 이하)에 훨씬 미달되어 화장품 및 비누 등 피부친화성 소재 첨가제로 사용될 가능성이 높은 것으로 생각되어졌다(Table 4).

Table 4. Content of heavy metals by enzymatic treated and high pressure extracted sericin samples. (unit : ppm)

Heavy metals Samples	Pb	Cr	Cd	Zn	Cu	As	Hg
Flavourzyme	7.1	2.1	3.8	14.9	4.5	0.0	0.0
Actinase	5.2	3.4	3.5	16.7	3.8	0.0	0.0
고온 고압	0.0	0.0	0.0	6.2	0.0	0.0	0.0

#### 4). 추출세리신의 형태

추출 세리신의 입자 형태간에는 큰 차이가 확인되지 않았으나, Flavourzyme 및 Actinase 등 효소로 추출한 견세리신의 경우 표면이 거칠고 분해가 많이 일어났음이 SEM 사진을 통하여 확인되었다(Fig. 15).

#### 다. 추출조건별 세리신의 구조 특성

##### 1). FT-IR 적외선 분광분석

구조 특성 변화를 알아보기 위해 적외선 분광분석 결과(Fig. 16), 효소(Actinase)에 의한 저분자량 세리신의 구조적 차이는 고압정련으로 얻어진 세리신과의 차이를 거의 발견할 수 없었다. 한편, Actinase 효소 단독(c) 처리 시에도 특별한 피크에 영향을 미치지 않은 것으로 생각된다.

##### 2). CD spectra

용액 상에서의 구조특성을 살펴보기 위해서 원이색성 편광분석을 실시한 결과(Fig. 17), 세리신 1차 고압추출의 경우 random conformation 구조에 기인하는 전형적인 피크가 얻어졌으며, 효소처리세리신의 경우(b) 220nm 부근에서  $\beta$ -sheet에 기인한 negative peak 가 관찰되었다. 일반적으로 고압추출 자체는 random conformation 으로 생각되며 이를 효소분해 시 저분자화에 따른 구조변

화는  $\beta$ -sheet로 구조전이가 일부 일어날 수 있는 것으로 추측된다.

### 3). DSC 시차열분석

구조 차이에 따른 열적안정성을 조사하기 위한 시차주사열분석 결과(Fig. 18), 세리신 자체의 열분해에 따른 endothermic peak가 200~220°C 부근에서 발생하였다. 한편, 최대 열분해온도가 효소처리구의 경우(201°C) 미처리(204°C)에 비해서 다소 낮은 점과 좀 더 낮은 부근에서도 열분해가 일어난 점으로 미루어 볼 때, 분자량이 저하됨에 따른 열적안정성의 감소를 발견할 수 있었다. 그러나, 전체적으로는 현저한 열적 안정성에 차이를 나타내지는 못한 것으로 보여졌다.

### 4). $^1\text{H}$ NMR 핵자기공명 분석

세리신 및 효소가수분해에 의한 구조적 특성을 고찰하기 위하여 핵자기공명(NMR)분석을 행한 결과(Fig. 19), 고분자 세리신이 주쇄 및 측쇄의  $^1\text{H}$ 에 기인한 전형적인  $^1\text{H}$ -NMR 그림을 보여주고 있다. 반면, 효소 처리한 NMR 그림(b)은 크게 peak가 shift하지 않음을 보여주고 있다. 다만, 각 위치의 peak의 분열 및 약 1~2ppm 정도의 고자장 부위의 shift로 보아 수만 단위의 분자량이 효소에 의한 수천~수만 내외의 저분자화에 기인한 구조적 변화를 반영하고 있음을 알 수 있다. 특히, 제일 고자장에 peak shift는 Gly 및 Ser의 주 peak의  $^1\text{H}$ 이 구조적 차이를 반영하는 것으로 알려져 있는 데 효소처리에 의한 저분자화가 진행되어 구조의 변화가 일어났음을 나타내고 있다.

## 라. PEG의 활성화

### 1). FT-IR 적외선 분광 분석

적외선 분광분석 결과(Fig. 20 및 Fig. 21), 제조된 PEG 활성화물은  $2960\text{cm}^{-1}$ 과  $1970\text{cm}^{-1}$ 에서 각각  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$  stretching에 기인한 peak가 기준 PEG 활성화물과 일치하여 PEG의 활성화가 성공적으로 이루어졌음을 알 수 있었다.

### 2) $^1\text{H}$ NMR

Fig. 22은 시판 phenyl chloroformate PEG 을 대조로 직접 실험실에서 합성한 것을 비교한 것으로서  $^1\text{H}$  NMR 의 경우 양자 모두 거의 일치하고 있음을 나타내고 있다. 다만 1~2ppm부근에 있는 Methoxypolyethylene의 methyl group의  $^1\text{H}$  이라고 생각되어지는 peak의 분열강도가 약하긴 하나 전반적으로 peak가 거

의 일치하여 PEG의 활성화가 이루어졌음을 나타내고 있다.

앞에서와 마찬가지로 시판 *p*-nitrophenyl chloroformate PEG(Fig. 23)을 대조로 비교한 결과 역시 일치하고 있음을 알 수 있다. 특히 CH<sub>3</sub>O-의 methyl group의 <sup>1</sup>H에 유래하는 1.3ppm peak의 경우를 비롯하여 benzene ring에 붙은 NO<sub>2</sub>기의 <sup>1</sup>H환경을 반영하는 peak의 경우 강도는 다소 약하나(약 7.5~8.5ppm) 정확히 일치하고 있음을 나타내고 있어 합성하여 사용함에 아무런 문제가 없을 것으로 판단되었다.

Tresylated PEG 역시 그림에서 보는 것(Fig. 24)과 같이 거의 일치하고 있음을 나타내고 있다. 1.2ppm 부근의 methyl group을 비롯하여 모든 peak의 위치가 일치하고 있어 실험에 사용한 PEG의 활성화에 대하여는 본 연구의 신뢰성을 강하게 뒷받침하였다.

#### 마. 물리적 분쇄 및 알콜 처리에 따른 세리신 분말 제조 시험

##### 1). 세리신 분말 제조

동결건조한 세리신 스폰지를 기계적인 방법과 화학적으로 약제를 처리하는 방법에 의하여 세리신 분말을 제조하였다 (Table 5). 세리신 분말의 회수율은 90% 이상으로 높은 값을 나타내었으나, 흡습성은 기계적인 방법으로 제조한 세리신 분말은 60%정도의 값을 보여 70% 정도의 흡습성이 있는 알콜처리법으로 제조한 세리신 분말보다는 다소 낮은 값을 보였다.

Table 5. Preparation Conditions of Silk Sericin Powder

Treatment Method		Conditions	Yield (%)	Hygroscopic Ratio (%)
Mechanical Method	Mixer	10 min	92	62
	Ball Mill	200 rpm, 90 min	91	58
	Ultra Mill	14,000 rpm, 5 min	93	55
Chemical Method	250 ml/g	RT, 60 min	88	72
	500 ml/g	RT, 60 min	90	75
	1000 ml/g	RT, 60 min	87	70
	2000 ml/g	RT, 60 min	92	73

2) 기계적 분쇄에 의한 세리신 분말 제조

열수로 추출하여 동결건조한 세리신을 믹스기나 볼 밀 또는 울트라 밀을 사용하여 기계적으로 부수어서 제조한 세리신 분말은 불규칙한 형태를 띄고 있었으나 처리시간 및 분쇄방법을 조절함으로써 보다 미세한 분말을 얻을 수 있었다(Fig. 25).

3) 알콜 처리 세리신 분말 제조

알콜을 세리신용액은 처리하여 처리되는 알콜/세리신의 비에 따라 제조된 세리신 분말의 형태를 주사전자현미경으로 관찰한 결과(Fig. 26) 알콜의 양이 증가됨에 따라 세리신 입자는 마이크로 단위의 구형 입자 형태를 나타내었다. 특히 과량의 알콜을 첨가할수록 세리신 입자는 더 미세한 구형입자상으로 전이되었다.

4) 세리신 분말의 아미노산 조성

제조 조건에 따른 세리신 분말의 아미노산 조성을 비교한 결과(Table 6), 대조로 사용한 열수 추출 세리신에 비하여 알콜 처리 또는 기계적 처리에 의한 아미노산 조성상의 큰 변화는 나타나지 않았으나 기계적 분쇄구가 산성 아미노산의 비율이 다소 높게 나타났다.

Table 6. amino acid compositions of silk sericin powder

amino acid	sericin	alcohol treated	mechanical treated
asp	11.15	10.8	13.29
thr	3.73	3.2	5.34
ser	40.51	41.4	40.19
glu	3.17	2.7	4.14
gly	8.53	9.2	10.39
ala	2.38	2.2	4.08
val	1.41	1.4	3.39
leu	0.53	0.5	3.77
tyr	0.87	0.6	2.26
phe	0.16	0.15	1.16
his	1.34	1.36	1.53
lys	4.20	4.38	3.09
arg	3.34	3.38	2.20

## 바. 제조방법에 따른 세리신 분말의 특성 조사

### 1) DSC 시차열분석

구조 차이에 따른 열적안정성을 조사하기 위한 시차주사열분석 결과(Fig. 27과 Fig. 28), 세리신의 1차 열분해에 따른 흡열피크가 200 ~ 220°C 부근에서 나타났으며, 300 ~ 320°C 부근에서 2차 열분해에 의한 흡열피크가 발생하였다. 그러나 물리적 분쇄 또는 알콜 처리 등 세리신 분말의 제조방법에 따른 열적 거동에서는 별 차이가 없는 것으로 확인되었다.

### 2) FT-IR 적외선 분광분석

적외선 분광분석법으로 세리신 분말의 구조 특성 변화를 관찰한 결과(Fig. 29), 세리신 분말은 비결정 구조로 이루어져 있었으며, 물리적 분쇄 및 알콜 처리 등 제조 조건에 따른 세리신 분말간의 2차 구조상의 큰 변화는 관찰되지 않았다.

### 3) CD 측정

알콜 첨가에 따른 세리신의 용액 상태에서의 구조특성을 살펴보기 위해서 원색성 분석을 행한 결과(Fig. 30), 고압추출한 세리신 용액은 전형적인 random conformation 구조로 이루어져 있음을 확인하였다. 특히, 알콜을 첨가한 세리신 용액은 198 nm 부근의 CD peak가 204 nm 부근으로 이동하였다. 이러한 결과는 알콜 처리에 의하여 세리신 분자쇄간에 aggregation은 발생하나 세리신에는 피브로인보다도 측쇄의 길이가 긴 아미노산이 많이 존재하므로  $\beta$  구조로 전이되지 않는 것으로 판단되며, 앞서 관찰한 적외선 분광분석 및 시차열분석의 결과와 잘 일치하였다.

### 4) X-선 회절 분석

세리신 분말에 대한 결정구조상의 변화를 살펴보기 위하여 X-선 회절 분석을 행한 결과(Fig. 31), 알콜 첨가군이 물리적 처리군에 비하여 다소 결정성이 높은 것으로 나타났으나 이 둘간에 결정구조에는 큰 차이가 없는 것으로 나타나 앞서 행한 연구결과들과 잘 일치하였다.

## 사. 세리신 나노입자의 형태 및 크기 관찰

투석법에 의하여 세리신 나노입자를 제조하고 제조된 나노입자의 형태와 크기를 주사전자현미경과 광산란법에 의하여 측정하였다. 대표적인 세리신 나노입자의 형태는 Fig. 32에서 보는 바와 같다. 세리신 나노입자의 형태는 거의 대부분 구

형의 입자형태를 띄고 있었으며, 입자들간에 뭉쳐짐 현상에 의하여 크기가 달라지는 것으로 관찰되었다. 그리고 광산란법에 의하여 제조한 세리신 나노입자의 크기를 측정한 결과를 Table 7에 나타내었다.

Table 7. Particle size of sericin nanoparticles.

sample	CSE	CSP	CSS	NSE	TSE
particle size (nm)	175.7	156.3	246.5	192.1	916.7

### 3 절 제 2 협동과제

#### 1. 연구방법 및 내용

##### 가. PEG/sericin 결합체 나노입자의 안점막자극 시험

나노입자의 안점막자극 시험은 나노입자를 토끼눈에 넣고서 안점막자극 시험을 행하였다.

##### 나. PEG/sericin 결합체 나노입자의 피부감작성 시험

나노입자의 피부감작성 시험은 GPMT 방법에 의하여 행하였다.

##### 다. PEG/sericin 결합체 나노입자의 피부자극 시험

나노입자의 피부자극 시험은 토끼의 피부에서 자극시험은 행하였다.

##### 라. PEG/sericin 결합체 나노입자의 급성경구독성 시험

나노입자의 급성경구독성 시험은 토끼의 경구에 투여하여 실시하였다.

##### 마. PEG/sericin 결합체 나노입자의 급성경피독성 시험

나노입자의 급성경피독성은 토끼의 경피에 적용하여 실시하였다.

##### 바. PEG/sericin 결합체 나노입자의 보습력 시험

제조된 나노입자의 피부보습력은 corneometer를 사용하여 측정하였다.

##### 사. 항산화효과 측정

###### 1). DPPH radical 소거 효과 측정

자유라디칼을 소거하는 효과에 대한 측정은 0.3M DPPH 100 $\mu$ l에 시험 물질 A 및 시험물질 B 100 $\mu$ l를 각각 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반

응시킨 517nm에서 흡광도를 측정하였다(Y. Fugita et al., 1988). 소거 활성은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = 100 - \frac{\text{sample 흡광도값}}{\text{control 흡광도값}} \times 100$$

## 2). Hydroxyl radical 소거효과 측정

펜톤 반응(Fenton reaction)에 의한 지질 과산화 반응계를 이용한 TBA assay로 측정하였다(H. Ohkawa et al., 1979). 리놀레이트산 5 $\mu$ l에 30mM 염화제일철 8 $\mu$ l, 30mM 과산화수소 8 $\mu$ l 그리고 시험물질 A 및 시험물질 B를 각각 20 $\mu$ l를 가한후 TBA를 넣고 15분간 가열한 다음 냉각시키고, 부탄올을 첨가하여 532nm에서 흡광을 측정하였다.

## 아. 주름개선효과

Cutometer SEM 575에 의한 피부 탄력도 측정

피부 탄력성 증진에 따른 주름개선효과를 측정하기 위하여 15명의 왼쪽 눈 가장자리에 하루에 두 번 시험물질 B를 함유한 에센스 제형을 적용하고, 오른쪽 눈 가장자리에는 시험물질 B를 함유하지 않은 비교 제형을 적용하였다. 시험물질 A와 B중 B를 선택한 이유는 두가지 원료가 구조면에서와 레티놀 함입함량이 유사하고 실제 공정에서 B를 제조하는 것이 A를 제조하는 것보다 용이하다고 판단되어 시험물질 B를 선택하여 주름개선 효과를 측정한 것이다. 시험물질 B를 함유하는 영양에센스의 처방은 Table 8에 나타내었다. 각각의 시험물질 B를 매일 처리후 30일 및 45일이 경과한 다음, 피부 표면의 탄력성을 Cutometer SEM 575에 의해 측정하였다. 탄력도 값은 피검자 15명의 평균값을 구하여 나타내었다.

## <제조방법>

제형 : 원료물질 2, 3, 4, 5 및 6을 일정한 온도에서 균질화하여 비이온계 양친매성 지질이라 칭한다. 상기 비이온계 양친매성 지질과 원료물질 1, 7, 8 및 14를 혼합하고 일정한 온도에서 균질화하여 마이크로플루다이저를 통과하고 이어 원료물질 9를 일정한 온도에서 서서히 첨가하여 균질화한 후 다시 마이크로플루다이저에 재차 통과시킨다. 그리고 10, 11, 12, 13을 투입하여 분산시켜 안정화하고 숙성시킨다.



비교제형 : 원료물질 2, 3, 4, 5 및 6을 일정한 온도에서 균질화하여 비이온계 양친매성 지질이라 칭한다. 상기 비이온계 양친매성 지질과 원료물질 7, 8 및 14를 혼합하고 일정한 온도에서 균질화하여 마이크로플루다이저를 통과하고 이어 원료물질 9를 일정한 온도에서 서서히 첨가하여 균질화한 후 다시 마이크로플루다이저에 재차 통과시킨다. 그리고 10, 11, 12, 13을 투입하여 분산시켜 안정화하고 숙성시킨다.

Table 8. 시험물질 B를 함유한 영양 에센스의 처방.

번 호	원 료	중 량 부	비교제형
1	시험물질 B	6.5	-
2	시토 스테롤	13.0	13.0
3	폴리 글리세릴 2-올레이트	0.2	0.2
4	세라마이드	0.1	0.1
5	세테아레스-4	5.0	5.0
6	클래스테롤	0.3	0.3
7	디세틸포스페이트	미량	미량
8	농글리세린	미량	미량
9	마카데미아 오일	미량	미량
10	카르복시비닐폴리머	잔량	잔량
11	산탄검	미량	미량
12	방부제	미량	미량
13	향료	미량	미량
14	정제수	잔량	잔량

#### 자. 멜라닌 생성 저해효과

##### 1. Tyrosinase의 저해효과

Tyrosinase의 저해활성은 일반적으로 분광학적인 방법으로 측정되어지며 본 실험에서는 Vanni 등의 방법에 따라 측정되어졌다. 0.1M phosphate buffer (pH 6.8) 1.0ml, 0.3mg/ml L-tyrosine 수용액 1.0ml, 1250U/ml mushroom tyrosinase 0.1ml를 혼합 한후 여기에 시험물질 A 및 시험물질 B를 농도에 따라 각각 0.2ml를 첨가하여 37℃에서 10분간 효소반응을 진행시켰다. 반응용액의 흡광도를 475nm에서 측정하여 시료의 효소저해활성을 다음식에 따라 구하고 효소활성의 50%를 저해하는 값을 IC<sub>50</sub>으로 나타내었다.

$$\text{Inhibition \%} = [(A-B)/A] \times 100$$

A ; 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 474nm에서 흡광도

B ; 시료를 첨가한 반응용액의 475nm에서 흡광도

## 2. B-16 melanoma 세포에서 melanin 생합성 억제 효과 측정

B16 melanoma 세포에서 melanogenesis 저해효과는 Maeda와 Fukuda의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 우선, B16 melanoma 세포(ATCC CRL 6323)들을 T-25플라스크나 32mm petridish에  $5 \times 10^5$  세포를 투입하고, 5% fetal bovine serum(FBS)과 1% antibiotics-antimycotic 시약이 처리된 Dulbecco's modified Eagle's 배지(DMEM)에서 CO<sub>2</sub> 배양기(5% CO<sub>2</sub>, 37°C)로 10시간정도 배양한다. 시험물질 A 및 시험물질 B를 각각 다양한 농도로 플라스크에 처리하고, 상기와 동일한 조건에서 2일간 세포들을 배양한다. 그 후, melanin이 배출(secretion)된 배지를 수거하고, 세포들을 trypsin으로 처리하여 수거한 후, haemacytometer로 세포수를 측정한다. 미리 수거된 배지와 세포들을 원심분리(16000g, 30min)하여 상층액은 버리고, 세포와 melanin을 취한다. 이들을 5% trichloroacetic acid(TCA)과 ether:ethanol(3:1) 용액으로 각각 씻어준다. 그 후, 이들을 ether로 씻어준 후, 10% DMSO를 포함하는 1N NaOH 용액으로 melanin을 용해시켜 475nm에서 흡광도를 측정하여 정량한다.

## 2. 연구결과 및 고찰

### 가. 안전성 실험

시험물질 A : 세리신 / tresylated PEG 결합체

시험물질 B : 세리신 / p-nitrophenyl PEG 결합체

시험물질 C : 세리신 / O-methoxy PEG-6-chloro-s-triazine 결합체

의 안전성 시험을 수행한 결과는 다음과 같다.

### 1). 안점막자극 시험

본 시험에서는 시험물질 A, B, C 나노입자의 2% 수용액을 토끼의 안점막에 점

축 후 국소적으로 나타내는 안자극성을 검토하기 위하여 건강한 4마리 수컷 New Zealand White 토끼의 한쪽 눈에 시험물질을 1회 처치하고, 처치하지 않은 한쪽 눈을 대조군으로 하여 각막, 홍채 및 결막의 손상 정도를 식품의약품안전청 고시 제 96-8호 “의약품등의 독성시험기준 (1996. 4. 16. 제정)” 제 10조 국소독성시험법에 따라 실시한 결과 다음과 같은 결과, 전 동물에서 시험 전 기간을 통해 본 시험물질에 의한 것이라고 인정되는 임상증상, 체중변화의 이상은 관찰되지 않았다. 또한 검체 투여 후 1, 2, 3, 4 및 7일에 각각 홍채, 결막에 대한 안구 병변의 등급을 점수한 바, 검체 투여에 의해 유발된 어떠한 안구 병변도 관찰되지 않았으며 시험물질 A에 대한 안점막자극시험 사진을 Fig. 33과 Fig. 34에 나타내었다.

이상의 결과로 보아 시험물질 A, B, C 는 토끼의 안점막에 있어서 어떠한 안구 병변도 유발하지 않는 안전한 물질이라고 사료된다.

## 2). 피부감작성 시험

신약, 화장품 및 기타 사람의 피부와 접촉하게 되는 경우가 있는 물질들을 생산할 때는 접촉 피부 자극을 일으키는 알러지 유발능이 있는지 검토해 보아야 한다. 이에 대한 실험에는 주로 기니픽을 사용하며 Draize method, guinea pig maximization test(GPMT), Buehler method 등이 있으나 GPMT는 약한 자극을 유발하는 물질까지도 검출할 수 있어서 이 방법이 세계적으로 많이 사용되고 있다. GPMT에 대한 결과의 평가에 있어서는 양적평가(quantitative assessment)와 질적평가(qualitative assessment)로 나눌 수 있다. 양적평가는 Draize에 의하여 작성된 기준에 따라 각 개체에서 나타나는 병변의 정도를 0에서 3까지로 등급을 정한다. 이것은 기니픽에서의 시험결과와 사람에서의 반응에 대한 약간의 정보를 제시해줄 수 있다. 질적평가는 시험동물에서 양성반응을 나타낸 개체수를 백분율로 나타내는 방법으로 Draize에 의해 작성된 기준에 따라 등급을 정한다. 질적평가에 있어서는 시험동물 중 어느 한 개체에서라도 반응의 강도와 관계없이 양성반응을 나타내면 그 물질을 알러지 유발능이 있는 것으로 간주한다. 시험동물에서 시험물질에 의한 자극을 나타낸 개체수가 아무리 적더라도 물질을 생산한 후 사람에게 노출되는 수는 막대하여 상당한 수의 사람들이 손상을 입을 수도 있기 때문에 GPMT에 있어 양적평가보다는 질적평가에 더 큰 의미를

부여할 수 있다.

본 연구에서는 시험물질 A, B, C 나노입자의 생체에 대한 접촉 알러지 유무를 검색하기 위하여 기니픽에 있어서 본 제제의 피부감작에 의한 접촉 알러지 유무를 Maximization법에 따라 수행한 결과, 본 제제는 접촉 알러지 급수에 있어서 무반응(No reaction)으로 반응빈도에 있어서도 0%로 나타나 grade 1로 판정되어 시험물질 A, B, C 나노입자는 기니픽에 있어서 어떠한 접촉 알러지를 유발하지 않는 것으로 안전한 것으로 판정되었다.

### 3). 피부자극 시험

시험물질 A, B, C 나노입자에 대한 피부자극시험을 2마리의 수컷 토끼를 이용하여 식품의약품안전청 고시 제 96-8호 “의약품등의 독성시험기준 (1996. 4. 16. 제정)”에 준하여 1ml/head (0.5ml/site)로 경피 적용하여 시험한 결과 일반 증상, 체중변화 등에서 본 제제에 의해 기인된 것으로 생각되는 특이 병변은 관찰되지 않았으며, 홍반 및 가피, 부종 등의 피부자극반응은 “0”으로 “비자극 물질”로 판정되었다.

이상과 같은 피부반응의 결과를 평가하기 위하여 피부자극율(P.I.I.)을 산출한 결과, 시험물질 A, B, C 나노입자는 “비자극 물질”으로 관찰되어 피부자극에 대한 안전성이 높은 것으로 사료되며 시험물질 B에 대한 피부자극시험 사진을 Fig. 35과 36에 나타내었다.

### 4). 급성경구독성 시험

시험물질 A, B, C 나노입자의 토끼에 대한 급성경구독성 여부를 조사하기 위하여, 식품의약품안전청 고시 제 96-8호 “의약품등의 독성시험기준 (1996. 4. 16. 제정)”에 의거하여, 본 제제를 2% 수용액으로 하여 토끼에게 투여할 수 있는 최대 용량인 체중 kg당 5ml를 경구로 1회 적용하여 14일간 관찰하였다. 그 결과 모든 실험군의 일반적인 임상증상에서 아무런 이상이 발견되지 않았으며, 체중변화는 물론 어떠한 이상도 관찰되지 않았다. 따라서 LD<sub>50</sub>치는 토끼에서 체중 kg당 5ml 이상인 것으로 판단되었다.

이상의 결과로부터 시험물질 A, B, C 나노입자는 토끼에서 어떤 급성경구독성 및 부작용을 유발하지 않는 안전한 제제로 사료된다.

### 5). 급성경피독성 시험

시험물질 A, B, C 나노입자의 토끼에 대한 급성경피독성 여부를 조사하기 위하여, 식품의약품안전청 고시 제 96-8호 “의약품등의 독성시험기준 (1996. 4. 16. 제정)” 및 OECD(Organization for Economic Cooperation and Development) 독성시험 가이드라인의 급성경피독성시험법에 의거하여, 본 제제를 2% 수용액으로 하여 설정한 최대 용량인 체중 kg당 2ml를 경피에 1회 적용하여 14일간 관찰하였다. 그 결과 모든 실험군의 일반적인 임상증상에서 아무런 이상이 발견되지 않았으며, 체중변화는 물론 어떠한 이상도 관찰되지 않았다. 따라서 LD50치는 토끼에서 체중 kg당 2ml 이상인 것으로 판단되었다.

이상의 결과로부터 시험물질 A, B, C 나노입자는 토끼에서 어떤 급성경피독성 및 부작용을 유발하지 않는 안전한 제제로 사료된다.

#### 나. 보습력 시험

시험물질 A, B, C 나노입자의 보습력을 세리신 및 증류수와 비교하여 시험한 결과를 Fig. 37에 나타내었다. 시험물질 A, B, C는 모두 유사한 보습력을 나타내고 있으며 세리신 자체 보다도 높은 보습력을 가지고 있음을 알 수 있었다. 이것은 수용성인 PEG가 세리신에 결합됨으로서 더 높은 수분 유지력을 가지는 것으로 해석할 수 있다.

#### 다. 항산화 효과 측정

제조된 시험물질을 가지고 DPPH radical의 소거활성을 측정하였다. 시험물질 A와 시험물질 B에 대한 IC<sub>50</sub>값은 각각 75mg/ml, 80mg/ml로 비교적 우수한 DPPH radical 소거활성을 가지고 있음을 알 수 있었다(Fig. 38과 Fig. 39).

환원상태의 Fe(II)는 과산화수소를 환원시켜 hydroxyl radical을 생성시키며 이렇게 생성된 hydroxyl radical은 매우 짧은 반감기를 가짐으로서 생체물질들과 무작위적으로 반응한다. 그러므로 hydroxyl radical은 자유 라디칼 중 가장 강력한 세포 손상을 가져오는 radical의 하나로 피부노화를 야기시키는 주원인으로 알려져 있다(강상진 외, 1999). 이러한 hydroxyl radical을 소거하는 효과를 시험물질 A 및 시험물질 B 각각에 대하여 측정하였다. 각각에 대한 IC<sub>50</sub>값은 2.2mg/ml, 2.5mg/ml로 비교적 높은 소거활성을 나타내었다(Fig. 40과 Fig. 41).

#### 라. 주름개선 효과

시험물질 B를 함유하는 제형 에센스의 피부탄력성 증진에 따른 주름개선 효과를

Cutometer SEM 575를 사용하여 측정된 결과 Table 9 및 Fig. 42와 같이 주름 개선 효과가 있음을 알 수 있었다.

Table 9. 시험물질 B를 함유하는 에센스 제형의 주름 개선 효능 측정 결과.

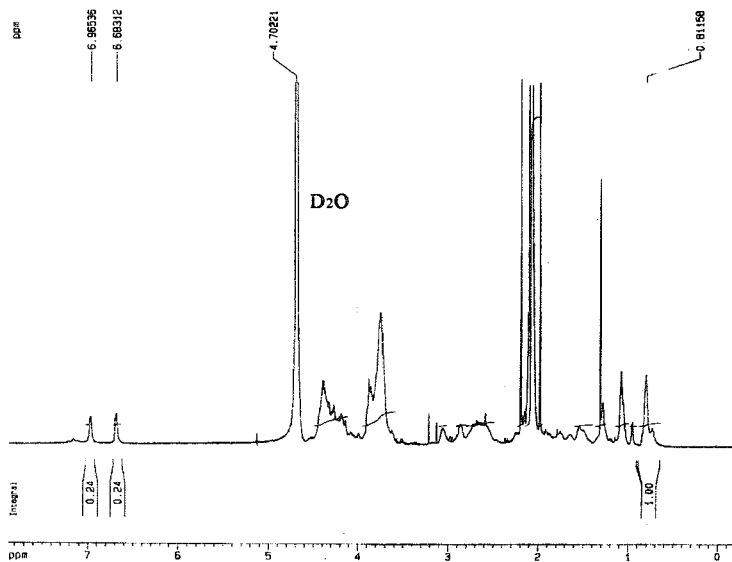
시 료	피부 탄력도 효과(%)	
	30일	45일
제형	17.7 ± 0.89	29.3 ± 1.47
비교 제형	8.4 ± 0.42	12.5 ± 0.63

(\*위의 값은 피검자 15명의 평균치)

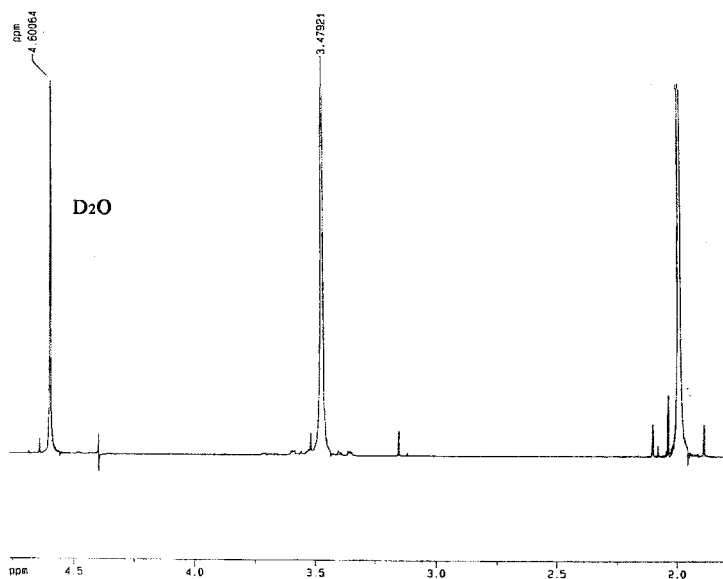
#### 마. 멜라닌생성 저해 효과

제조된 시험물질A 및 시험물질 B의 멜라닌 생성 저해 효과를 알아보기 위하여 mushroom tyrosinase의 활성 저해 효과와 melanoma cell에서의 멜라닌 합성 저해효과를 측정하였다. 그 결과 시험물질 A와 시험물질 B 모두 멜라닌 생성 저해 효과는 거의 없는 것으로 나타났다(data not shown).

(a) Sericin in D<sub>2</sub>O



(b) PEG in D<sub>2</sub>O



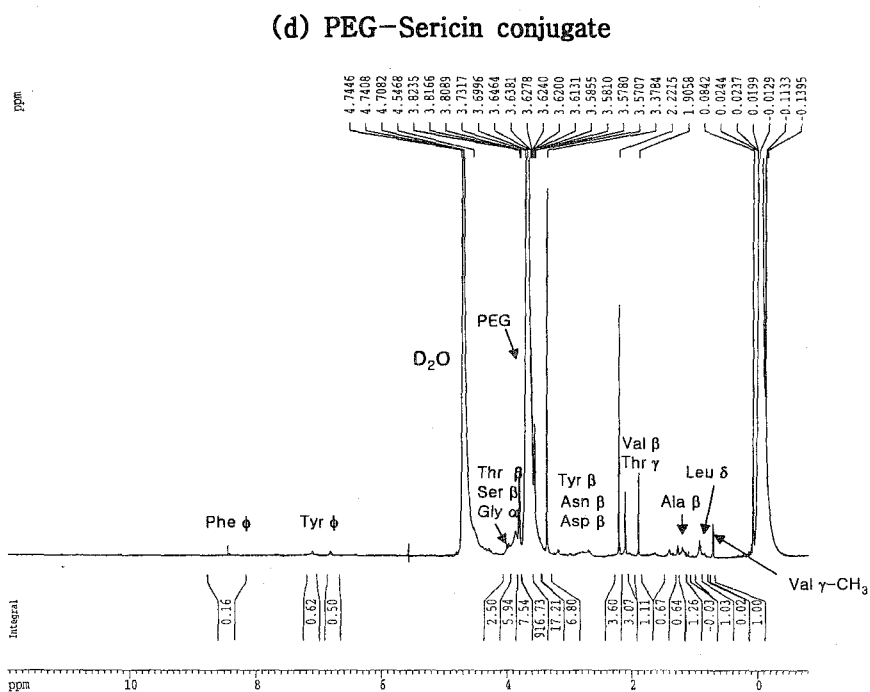
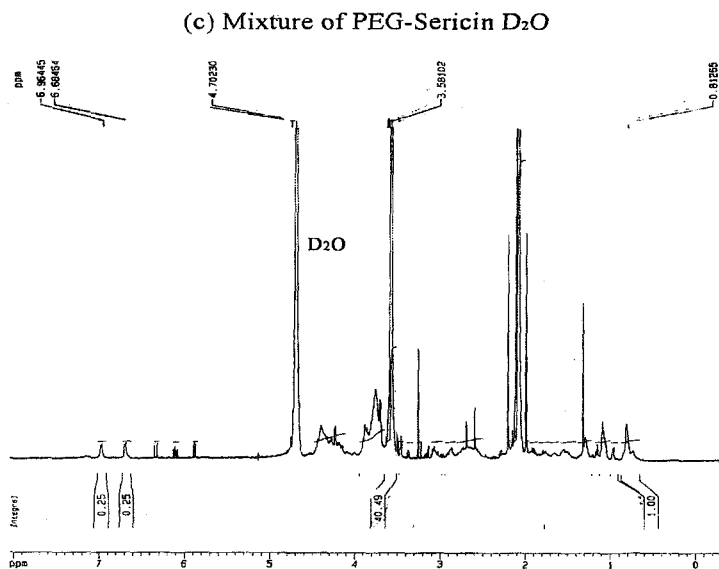


Fig. 1. <sup>1</sup>H-NMR spectra of sericin (a), PEG (b), sericin/PEG mixture (c), and PEG-sericin conjugate (d).



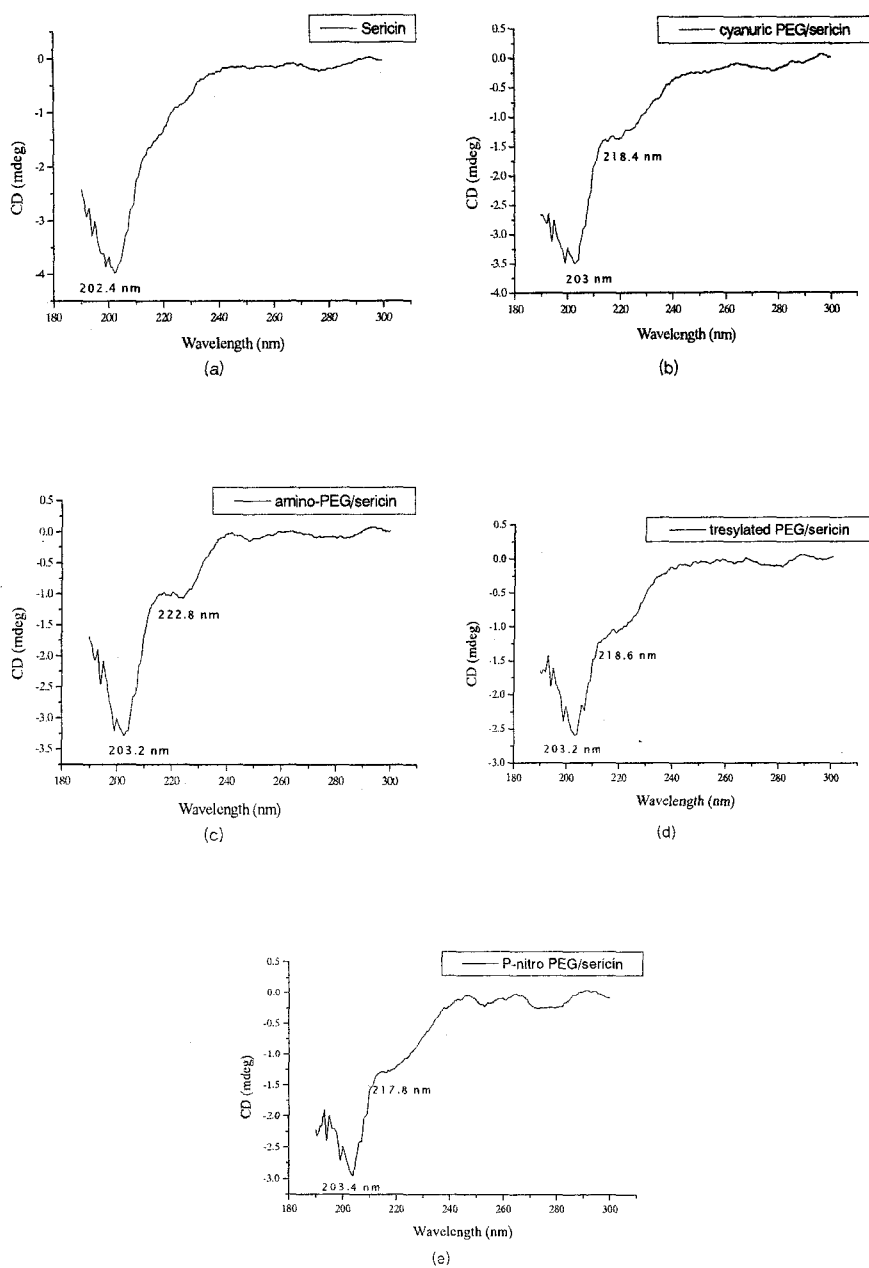


Fig. 2. CD spectra of sericin (a), cyanuric PEG/sericin (b), amine PEG/sericin (c), tresylated PEG/sericin (d), and *p*-nitro PEG/sericin (e).

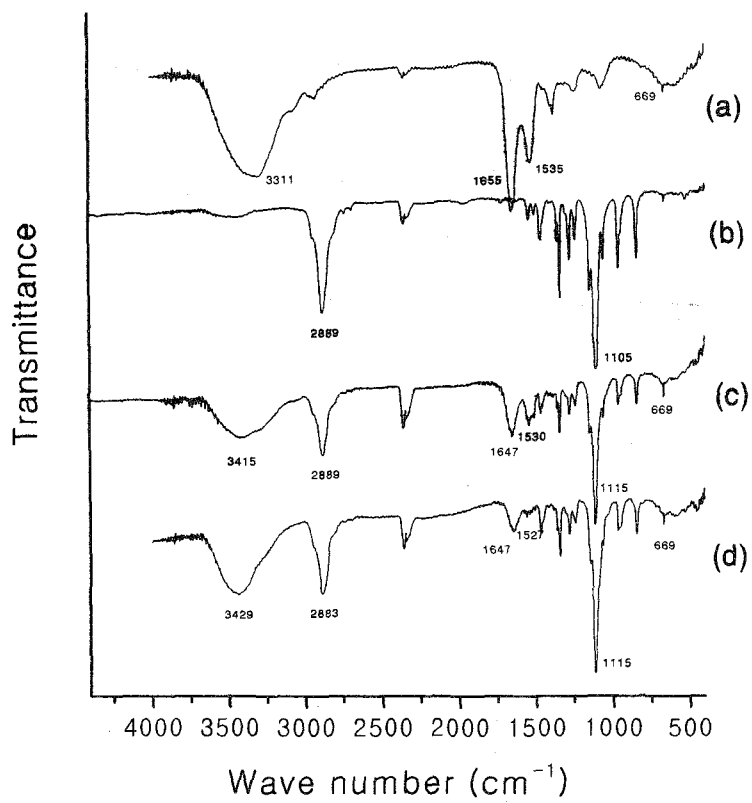


Fig. 3. IR spectra of films of Sericin (a), PEG (b), sericin/PEG mixture (c), and Sericin-PEG conjugate (d).

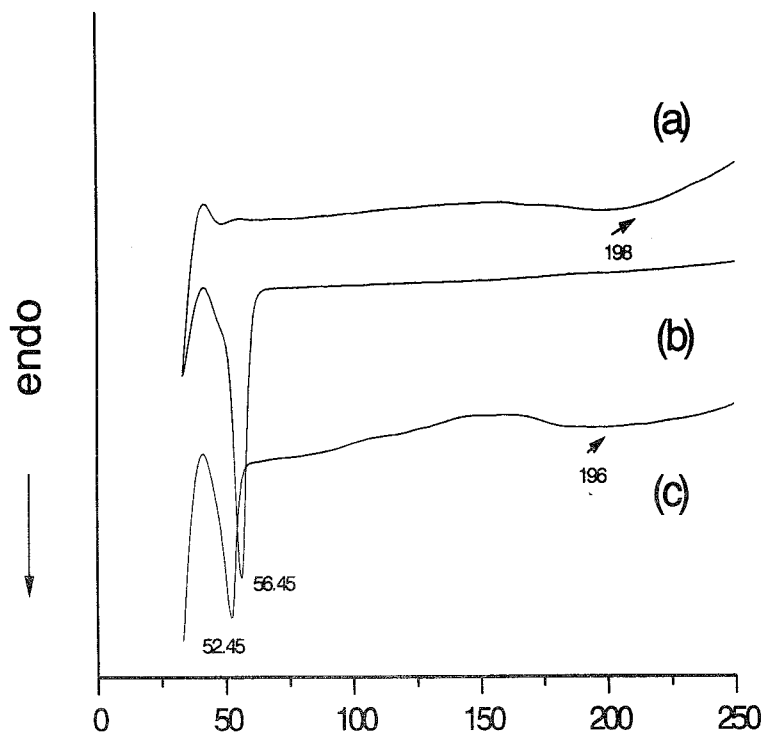
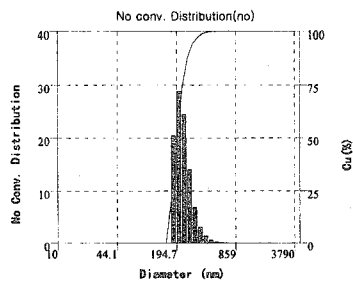
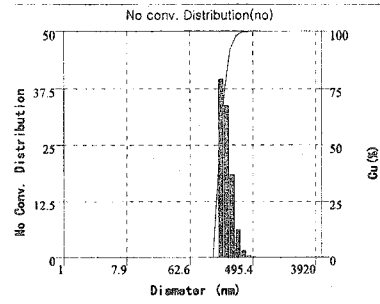


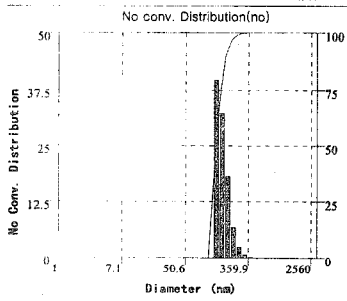
Fig. 4. DSC thermograms of sericin (a), PEG (b), and sericin-PEG conjugate (c).



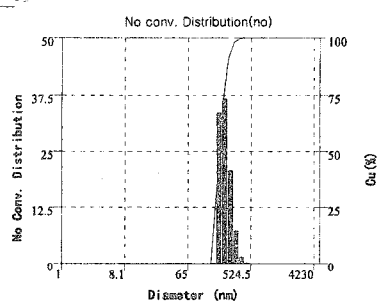
Cyanuric PEG  
349.2 nm



PNP PEG  
299.1 nm

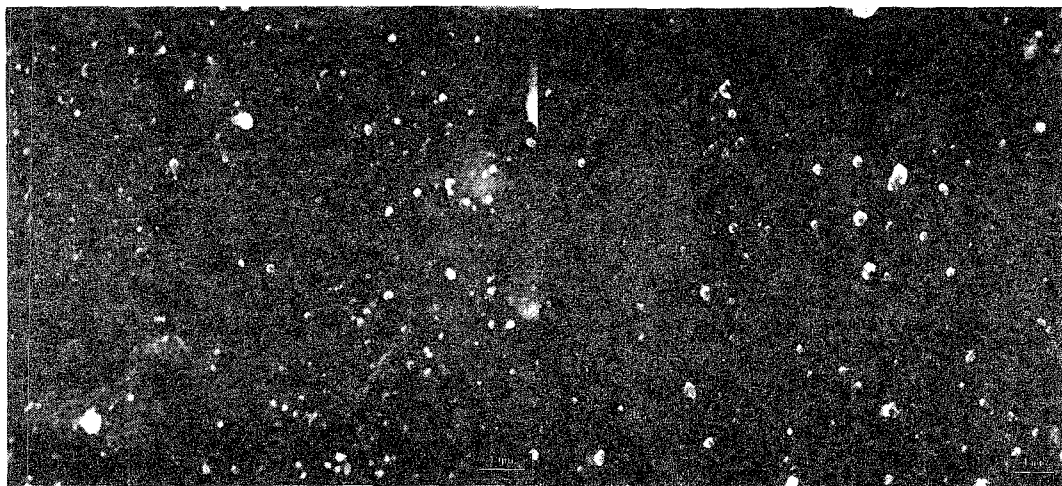


Tressylated PEG  
204.1 nm



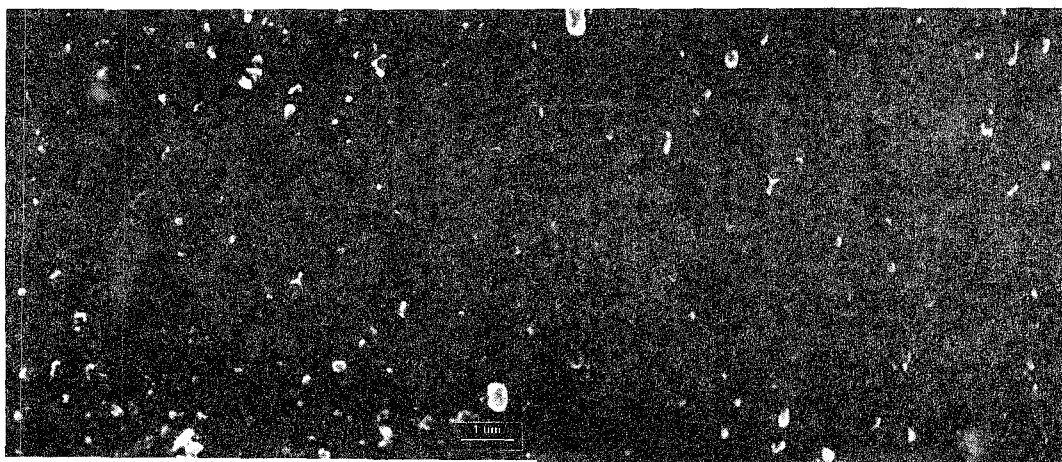
Amine PEG  
308.6 nm

Fig. 5. Size distribution of PEG/sericin conjugate.



(a-1)

(b-1)



(c-1)

(d-1)

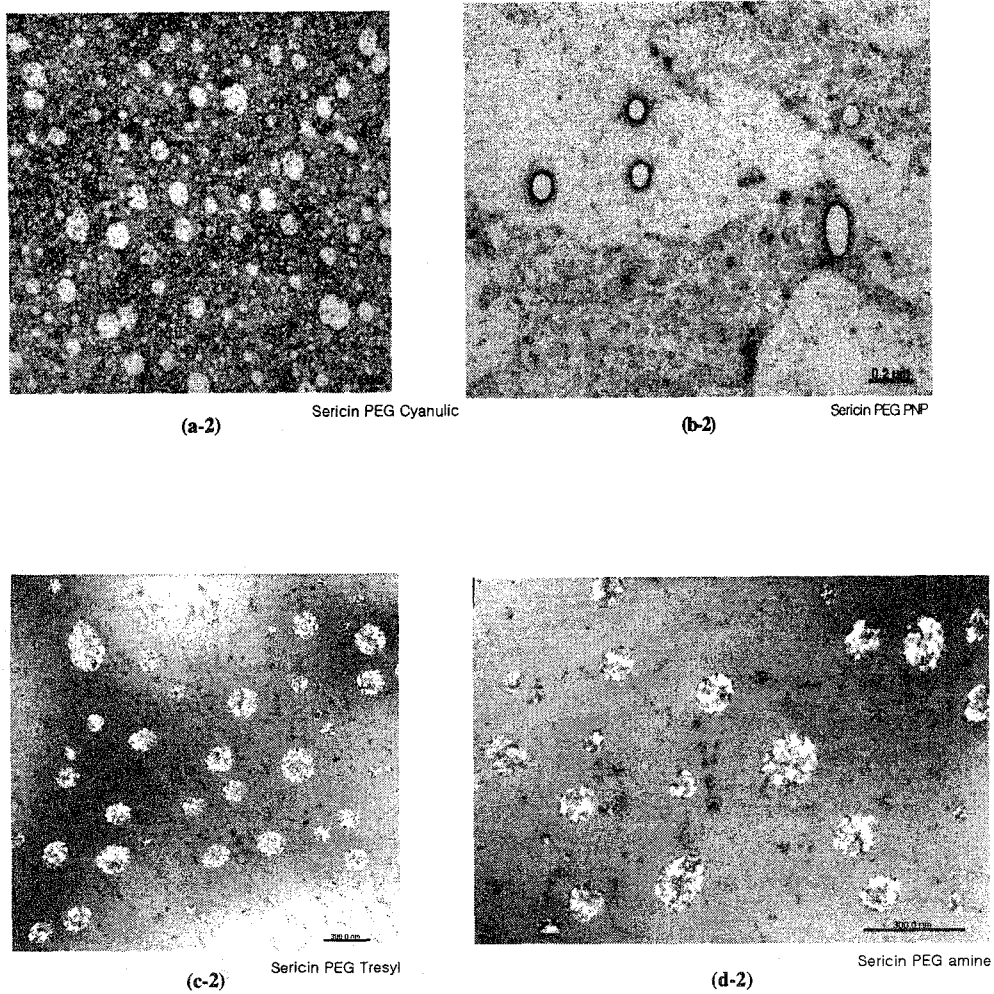


Fig. 6. SEM (1) and TEM (2) of PEG/sericin conjugate nanoparticles:

a: cyanuric PEG/sericin, b: *p*-nitro PEG/sericin, c: tresylated PEG/sericin, d: amine PEG/sericin.

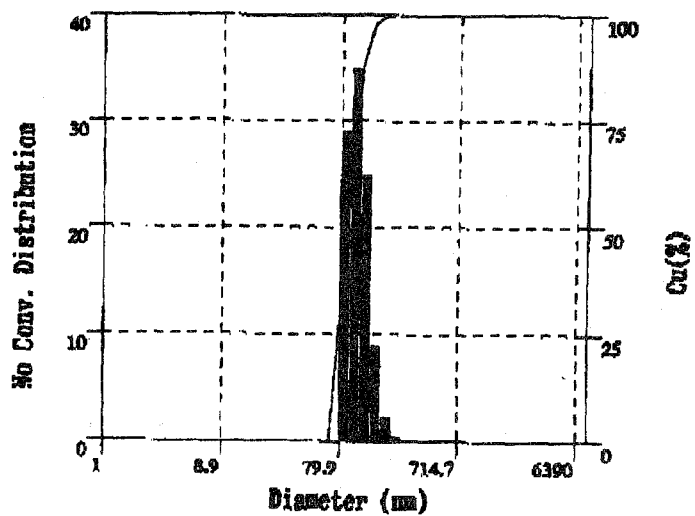


Fig. 7. Size distribution of retinol loaded-PEG/sericin conjugate nanoparticles.

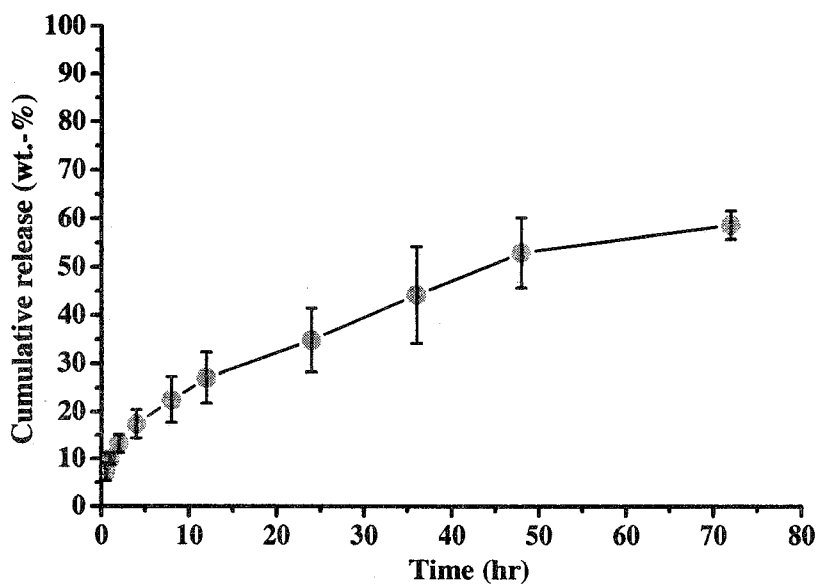


Fig. 8. Release behavior of retinol loaded-PEG/sericin conjugate nanoparticle.



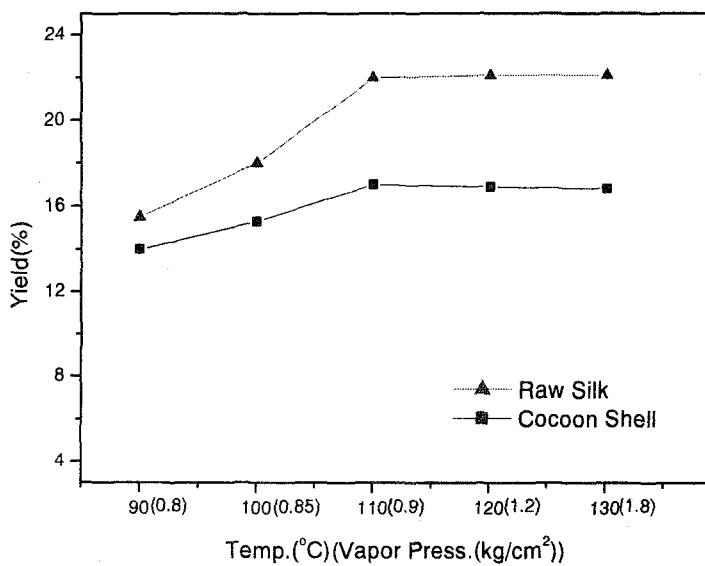


Fig. 9. Effect of temperature and pressure on sericin extraction

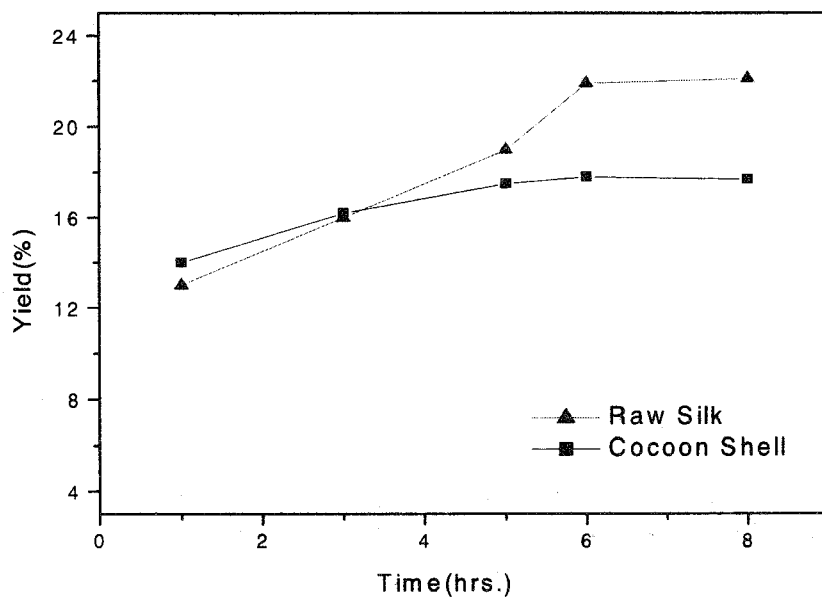


Fig. 10. Effect of time on sericin extraction at 110°C

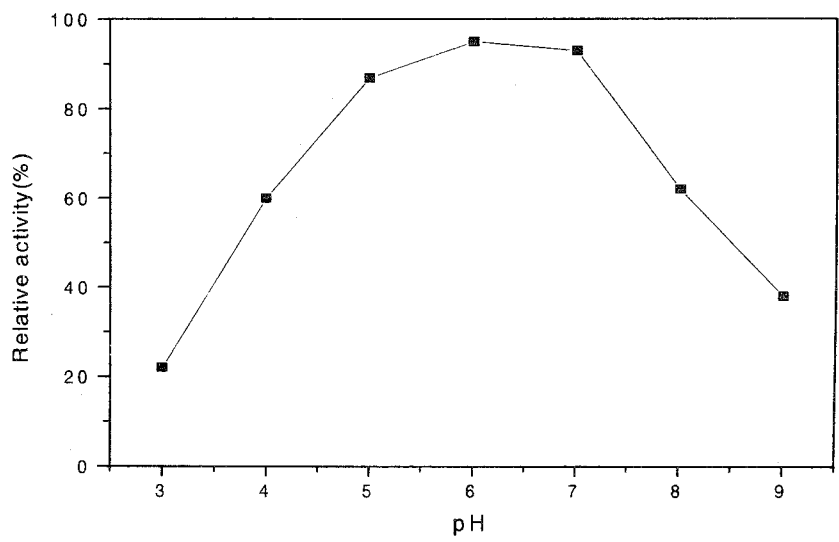


Fig. 11. pH dependence of activity of flavourzyme

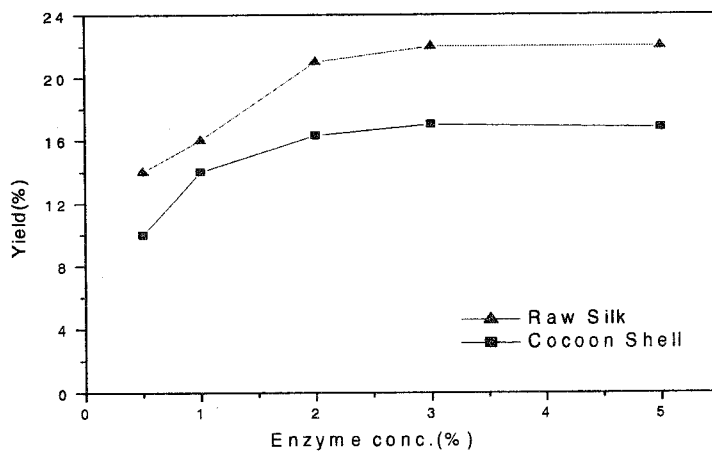


Fig. 12. Effect of enzyme concentration on sericin extraction

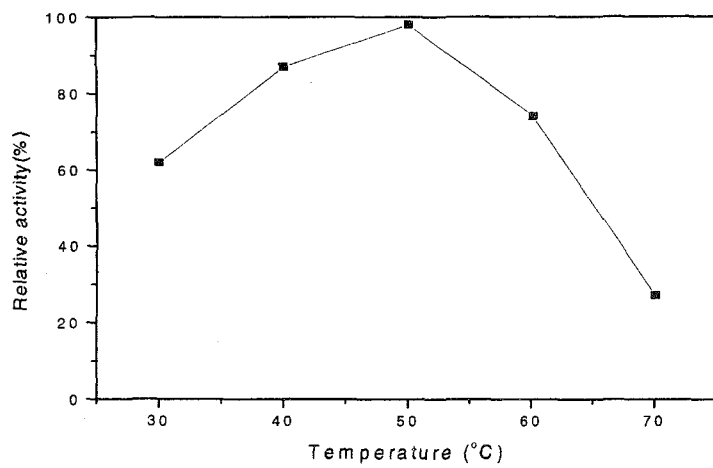


Fig. 13. Thermal stability of flavourzyme

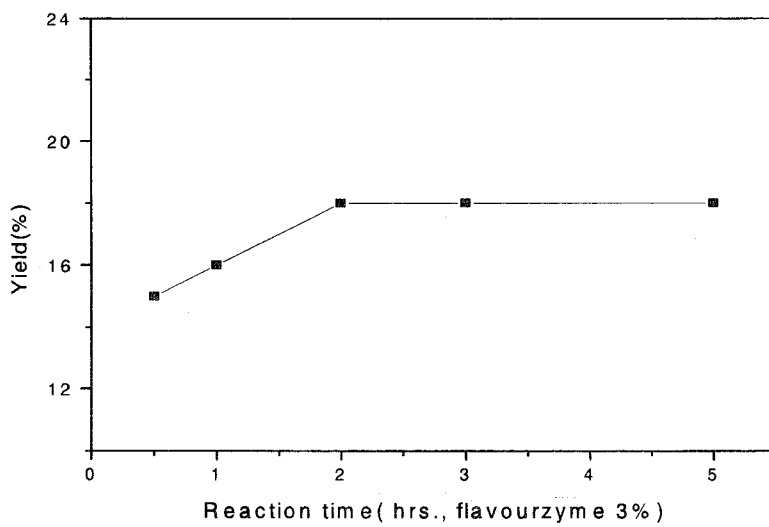
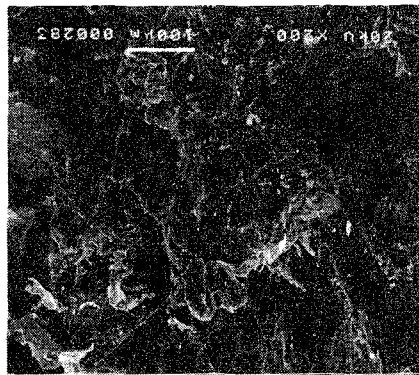


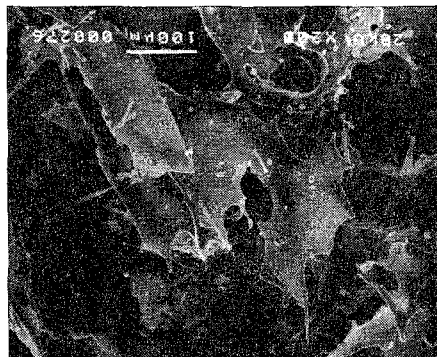
Fig. 14. Time dependence of activity of flavourzyme



② Actinase



① Flavourzyme



③ 고온 고압

Fig. 15. SEM photographs of sericin to various extraction methods.

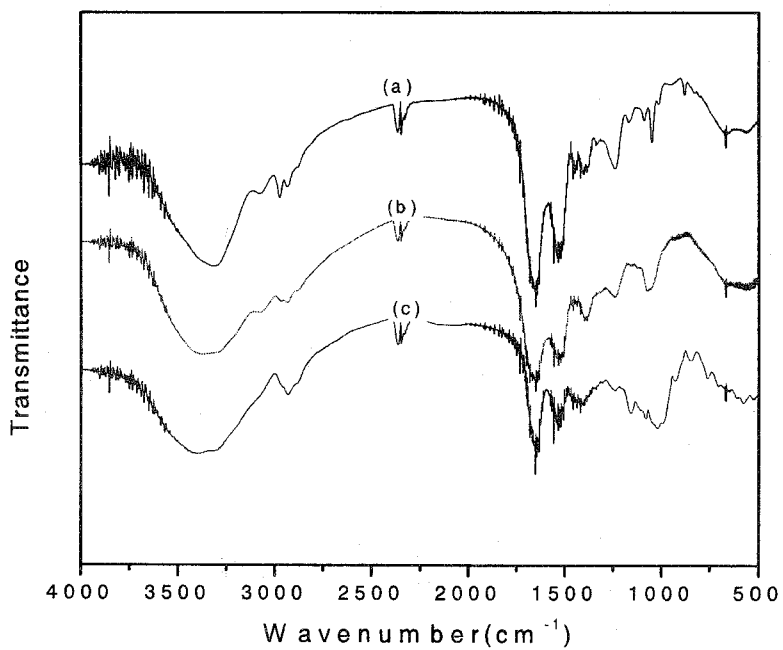


Fig. 16. FT-IR spectra of various extracted sericin: (a) Flavourzyme treated, (b) High pressure, and (c) Actinase only.



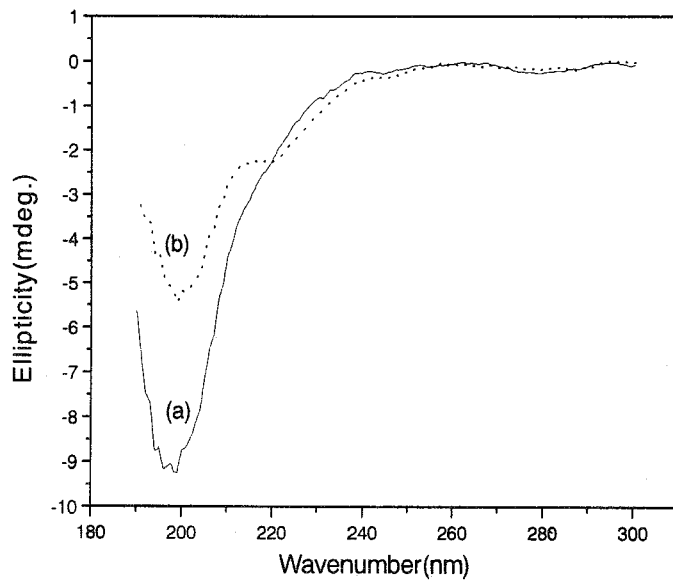


Fig. 17. Circular Dichroism spectra of sericin solution prepared at various extraction methods: (a) High pressure and (b) Enzyme treatment.

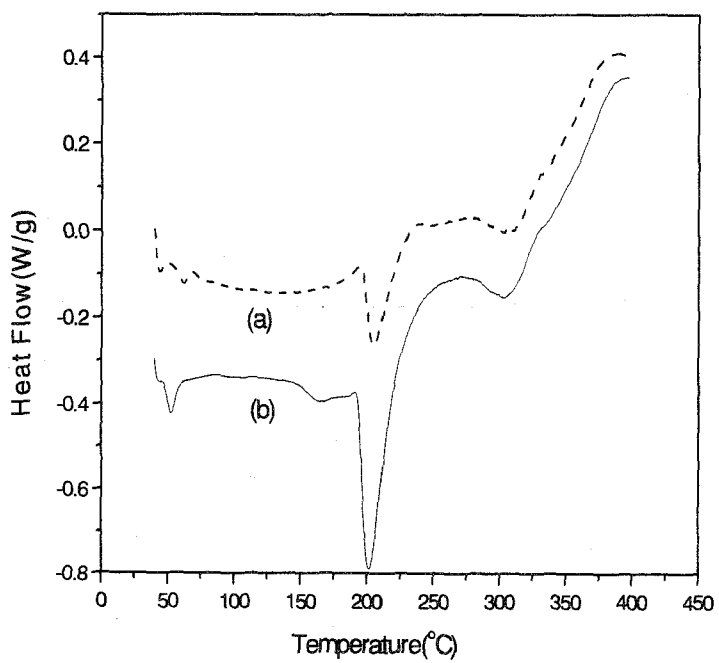


Fig. 18. DSC thermograms of sericin prepared at various extraction methods: (a) High pressure (b) Enzyme treatment.

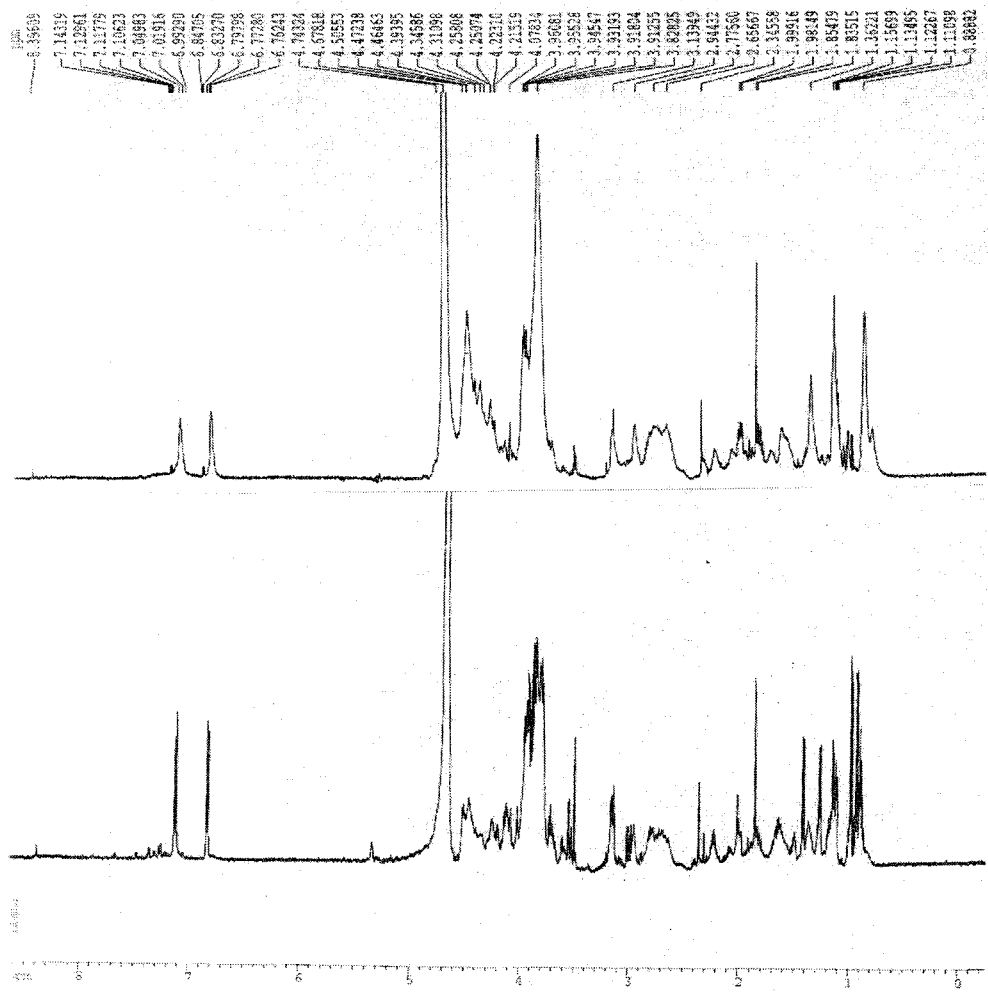


Fig. 19. <sup>1</sup>H-NMR spectra of (a) high pressure and (b) enzyme treated sericin.

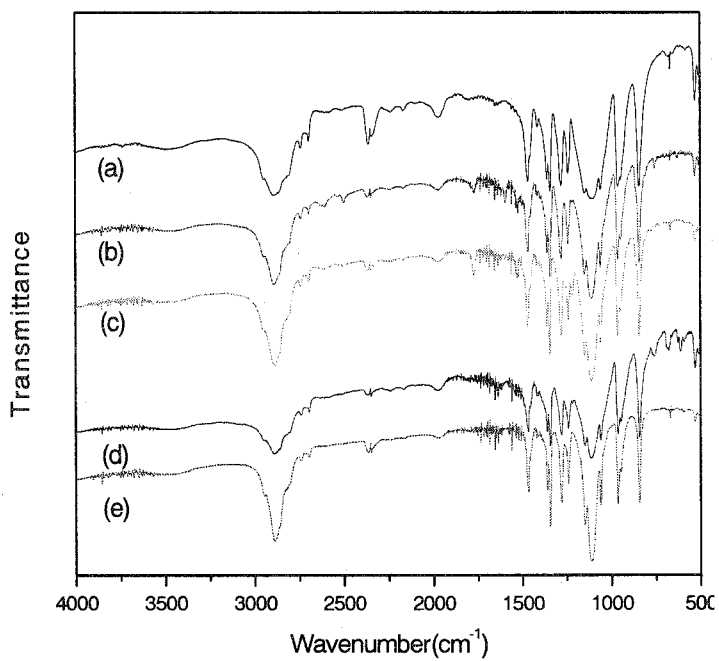


Fig. 20. FT-IR spectra of activated PEG from various methods: (a) PEG, (b) Prepared-nitrophenyl chloroformate PEG, (c) Standard nitrophenyl chloroformate PEG, (d) Prepared-tresylated PEG, and (e) Standard-tresylated PEG.

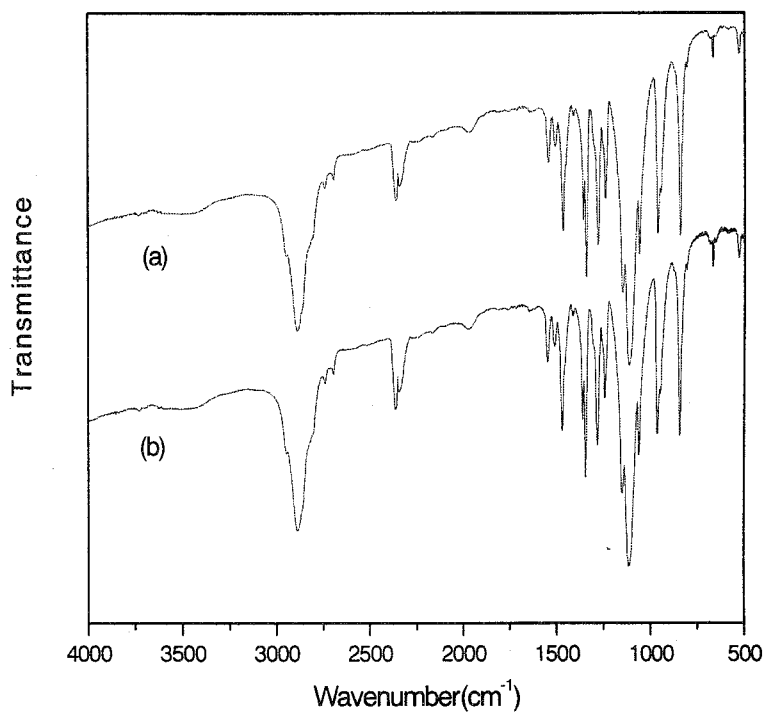


Fig. 21. FT-IR spectra of activated PEG from various methods: (a) Prepared-phenyl chloroformate PEG, and (b) Standard-phenyl chloroformate PEG.

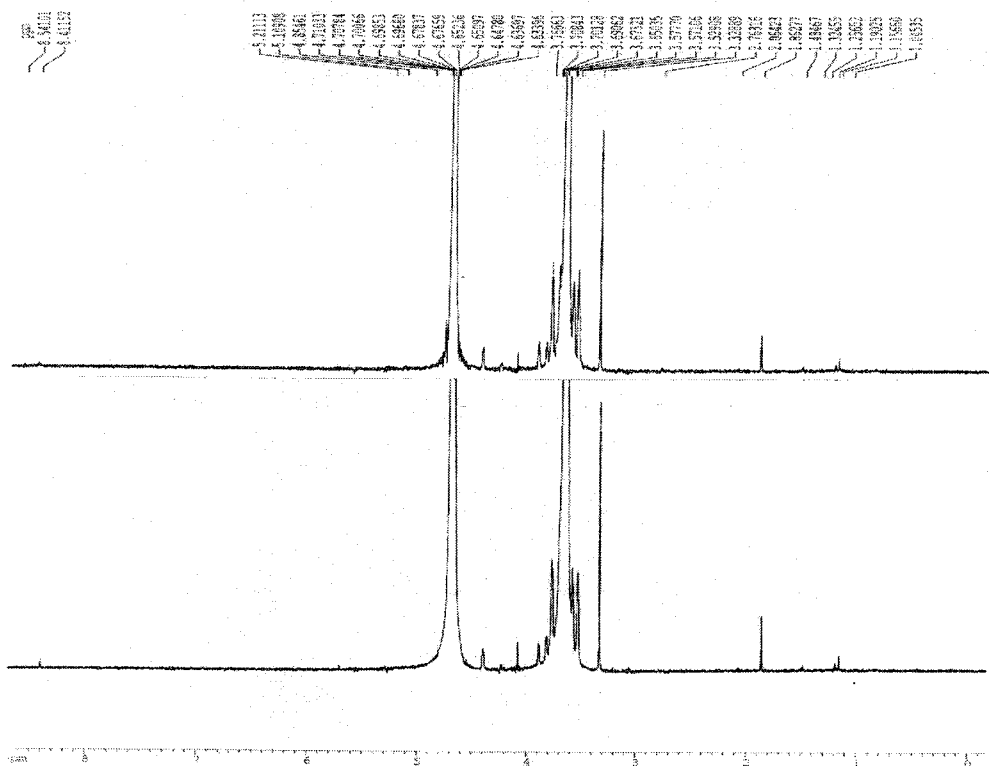


Fig. 22. <sup>1</sup>H-NMR spectra of phenyl chloroformate PEG: (a) Standard and (b) Prepared PEG.

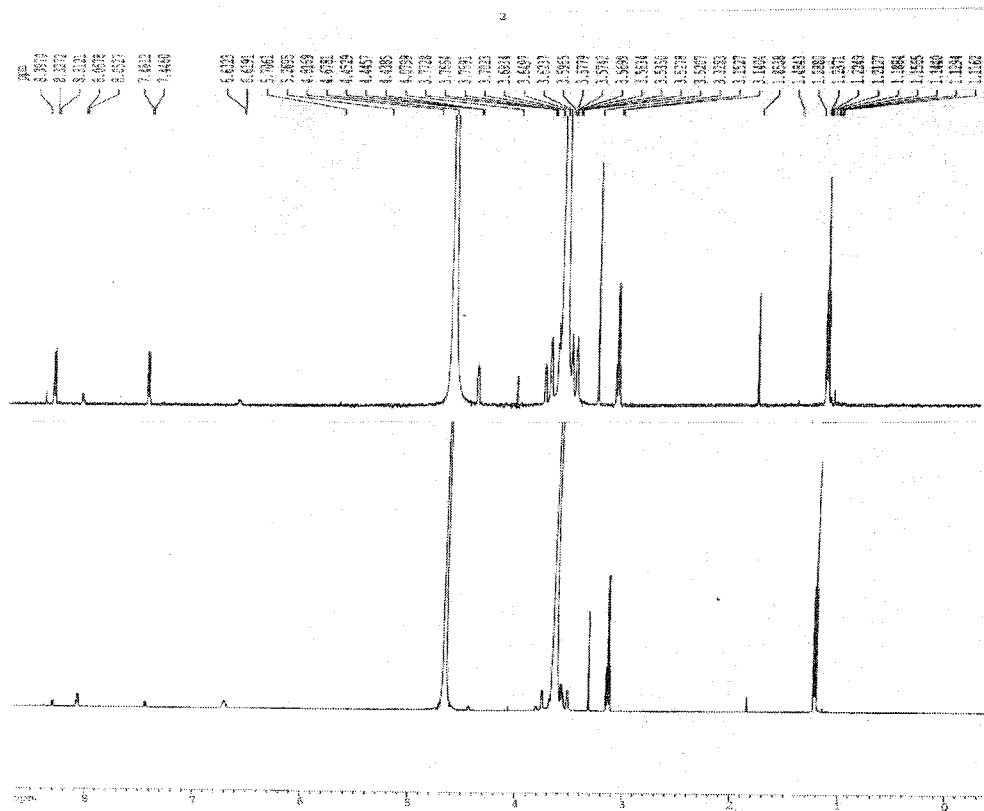


Fig. 23.  $^1\text{H-NMR}$  spectra of p-nitrophenyl chloroformate PEG: (a) Standard and (b) Prepared PEG.

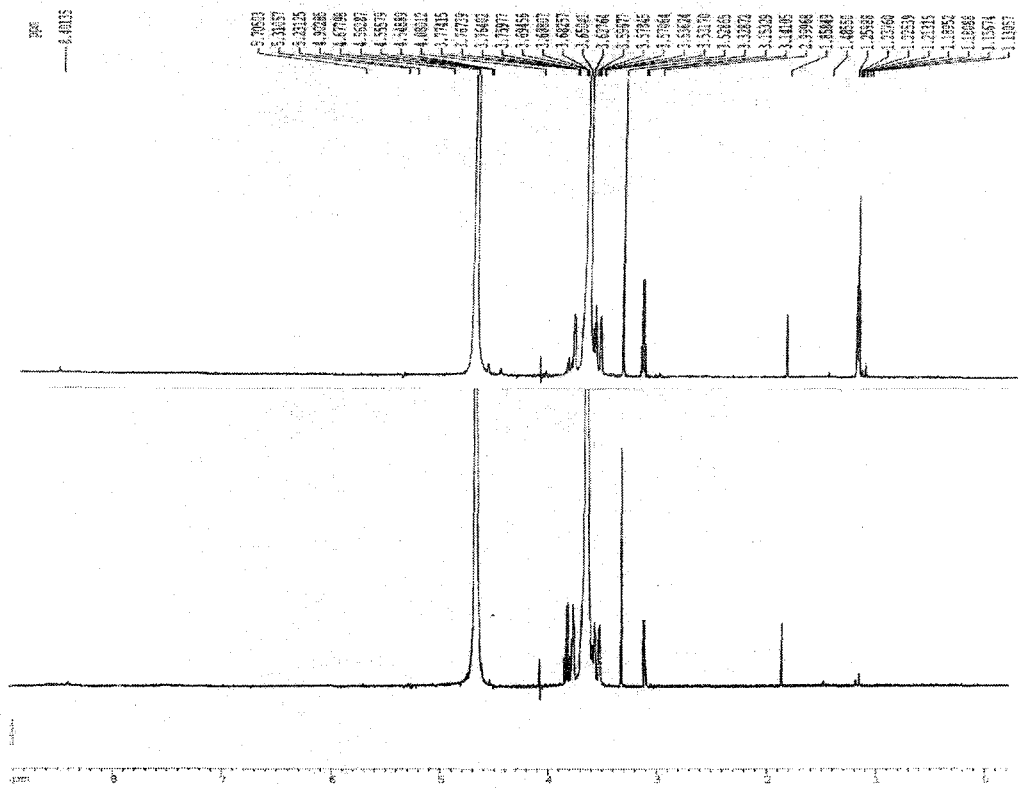


Fig. 24. <sup>1</sup>H-NMR spectra of tresylated PEG: (a) Standard and (b) Prepared PEG.



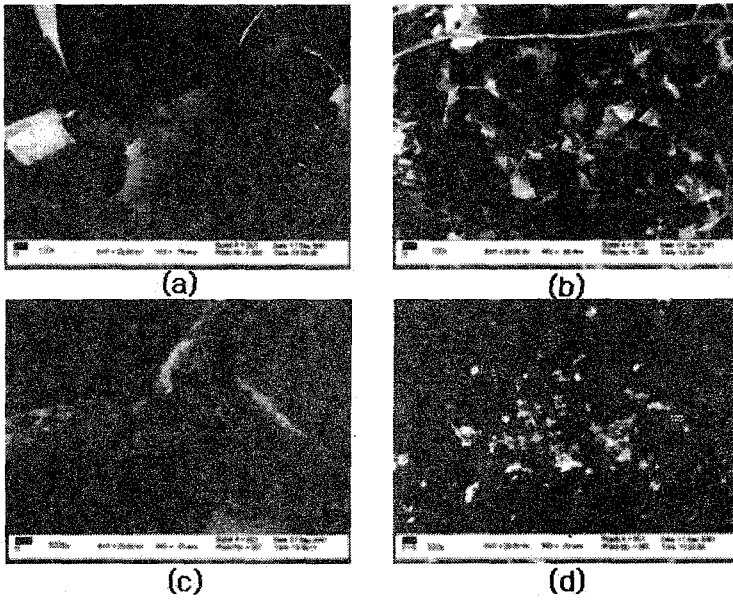


Fig. 25. SEM photographs of silk sericin powder obtained by physical treatment. (a) lyophilized sericin, (b) prepared by mixer, (c) by ultramill, and (d) ballmill.

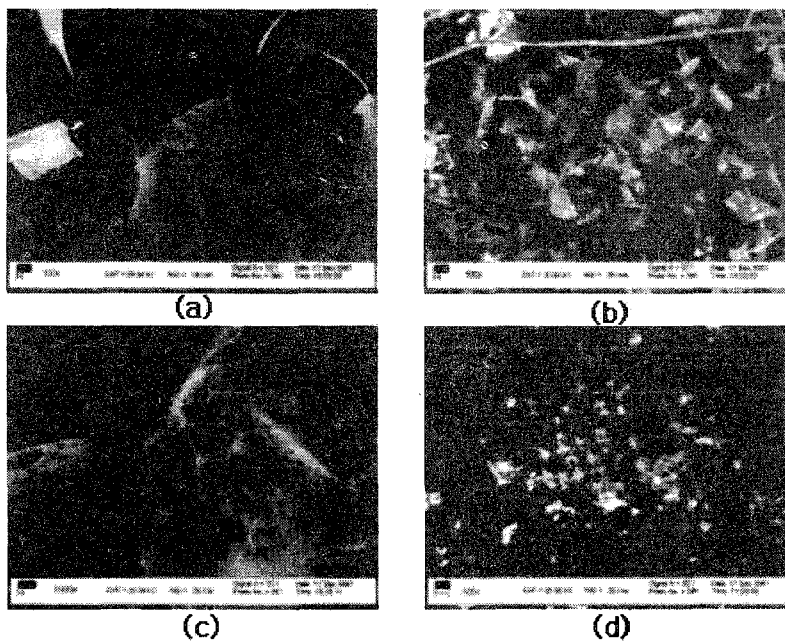


Fig. 26. SEM photographs of silk sericin powder by treatment with methyl alcohol. (a) 250 ml/g of sericin, (b) 500 ml, (c) 1000 ml, and (d) 2000 ml

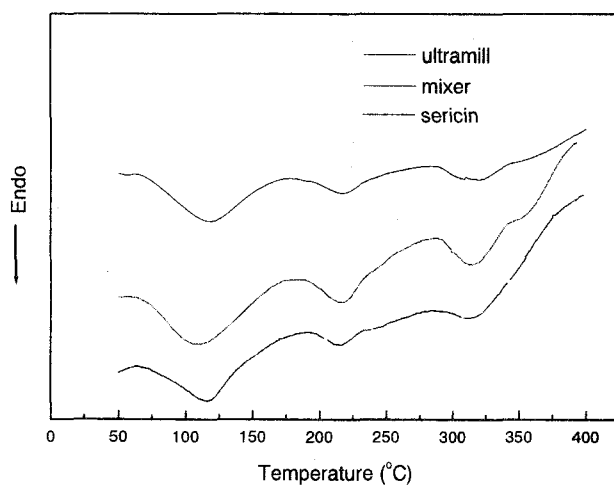


Fig. 27. DSC thermograms of silk sericin powder prepared by mechanical treatment.

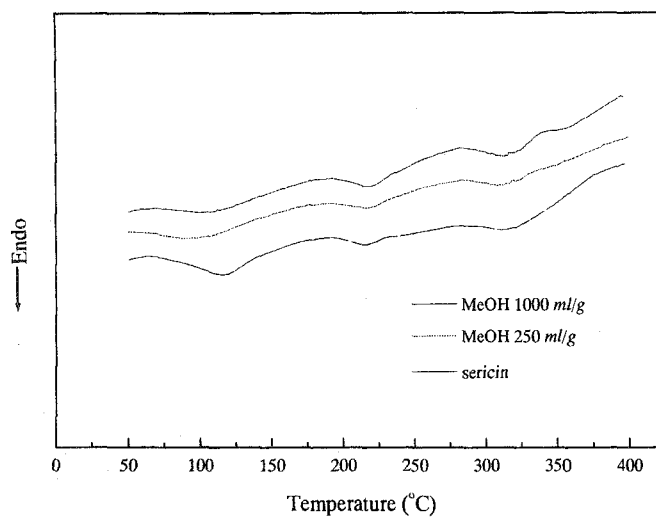
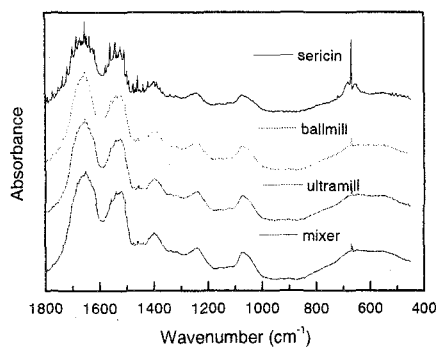
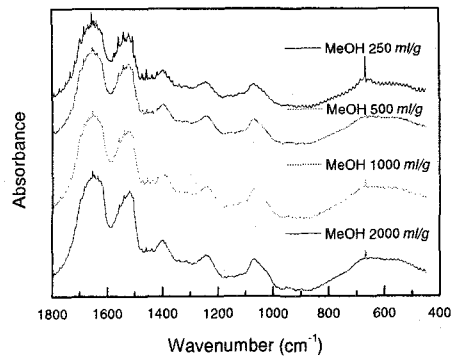


Fig. 28. DSC thermograms of silk sericin powder prepared by alcohol treatment.



(a)



(b)

Fig. 29. FT-IR spectra of silk sericin powder prepared by mechanical treatment (a) and alcohol treatment (b).

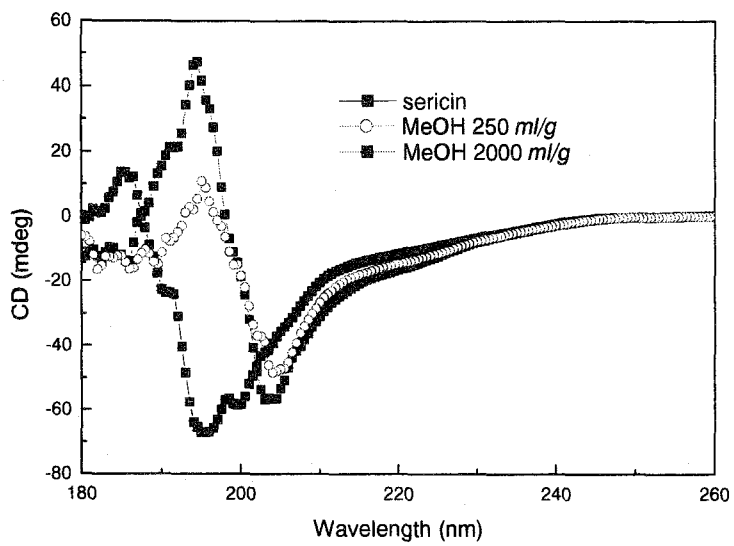
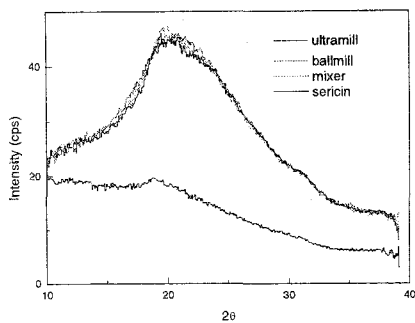
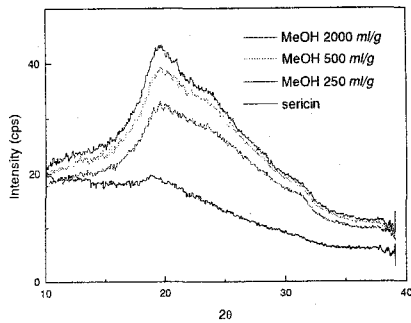


Figure 30. CD spectra of silk sericin solution.



(a)



(b)

Fig. 31. XRD spectra of silk sericin powder prepared by mechanical (a) and alcohol treatment (b).

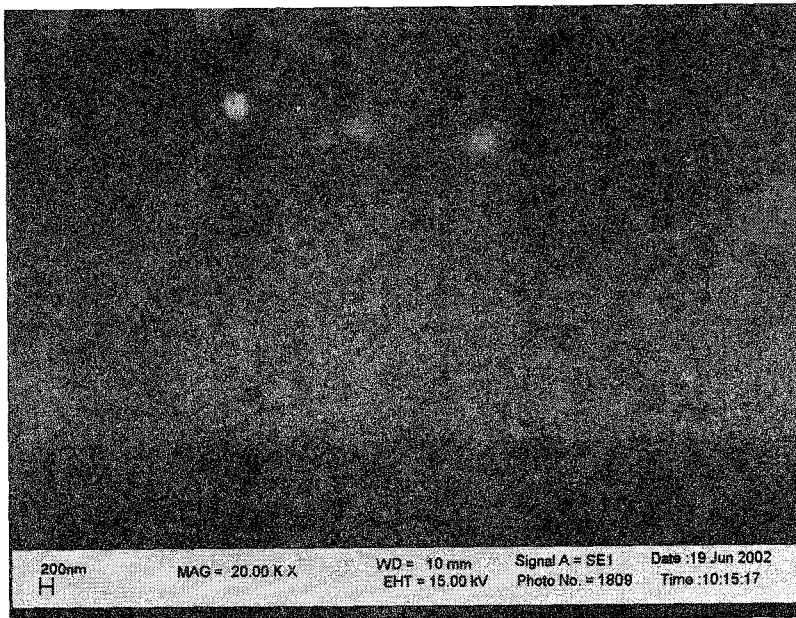


Fig. 32. SEM photographs of sericin nanoparticles.





Fig. 33. Control site of rabbit(animal No.1) 24hrs after saline topical application.



Fig. 34. Test site of rabbit(animal No.1) 24hrs after Sample A topical application (세척군).

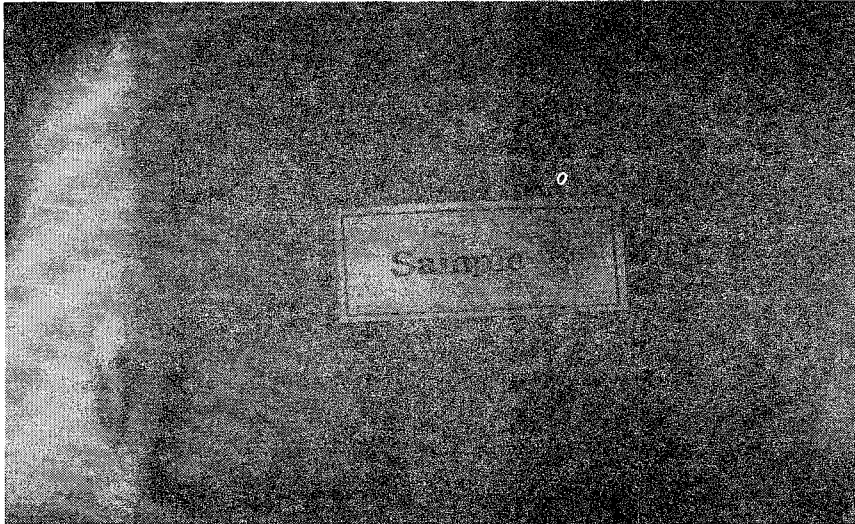


Fig. 35. Skin before topical application of Sample B.



Fig. 36. Application site on 24hrs after topical application of Sample B.

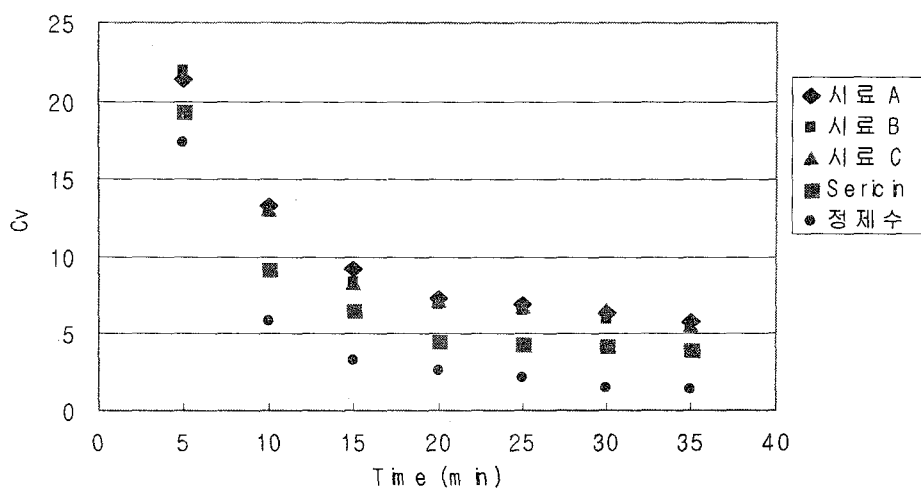


Fig. 37. Skin hydration test of PEG/sericin conjugate nanoparticles.

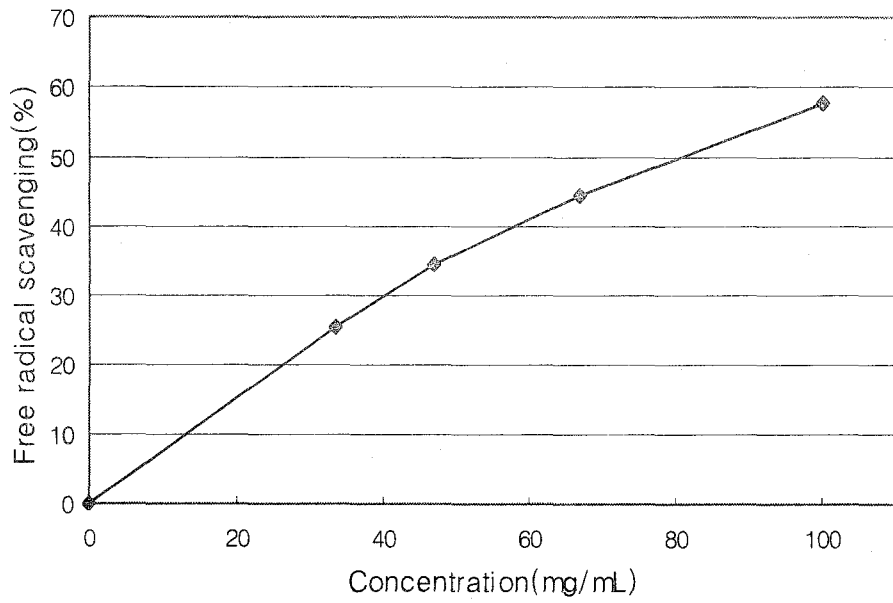


Fig. 38. DPPH radical 에 대한 소거 활성 효과(시험물질 A).

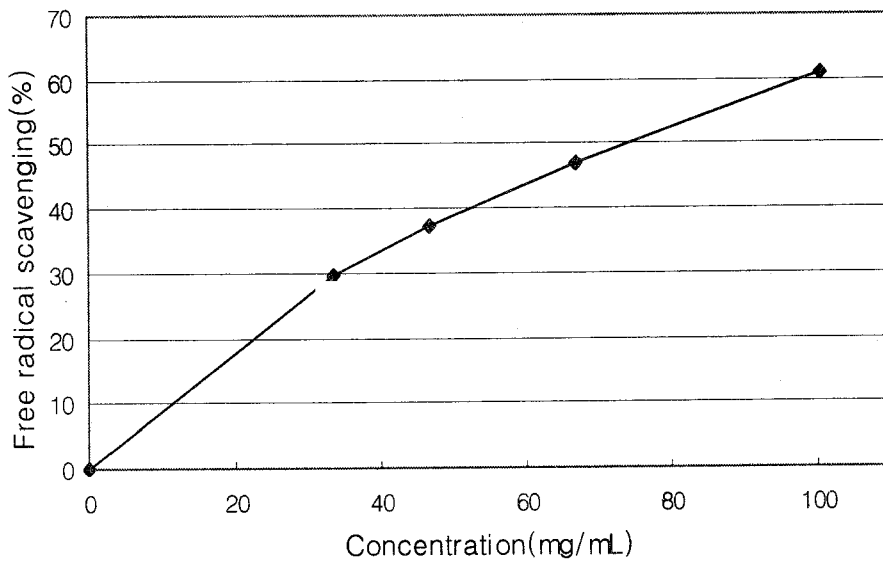


Fig. 39. DPPH radical 에 대한 소거 활성 효과(시험물질 B).

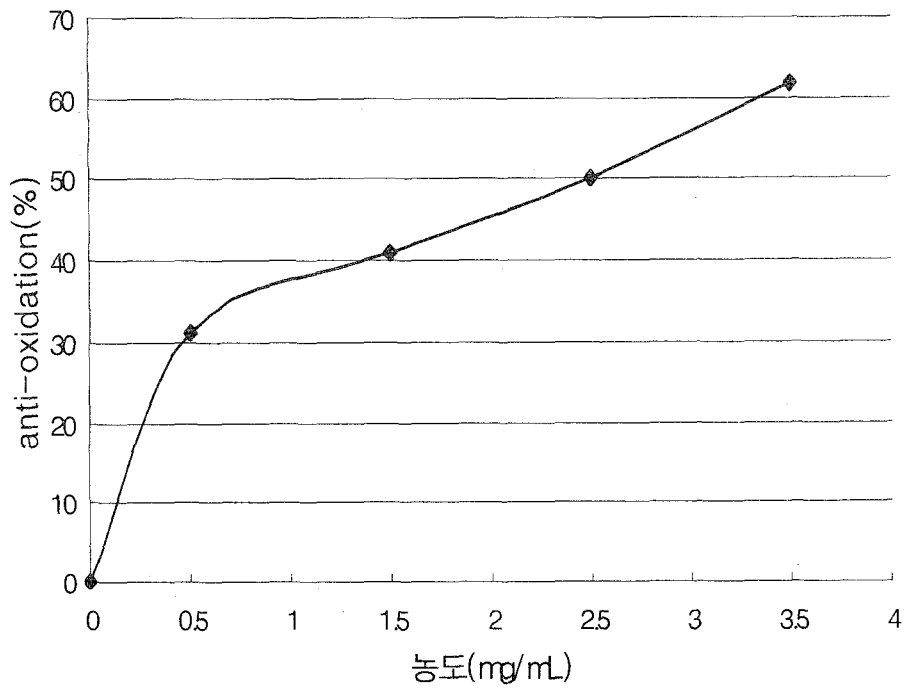


Fig. 40. Hydroxyl radical에 대한 소거 활성 효과(시험물질 A).



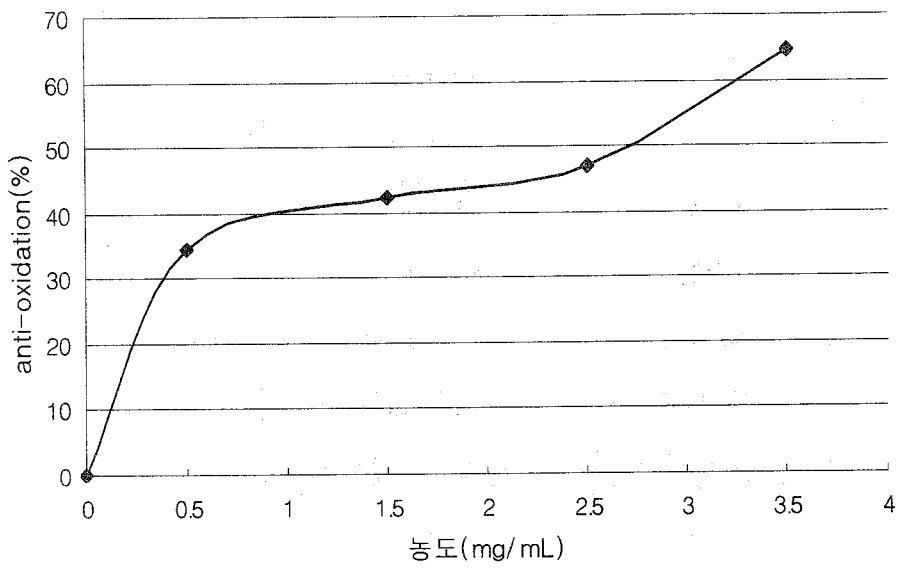


Fig. 41. Hydroxyl radical에 대한 소거 활성 효과(시험물질 B).

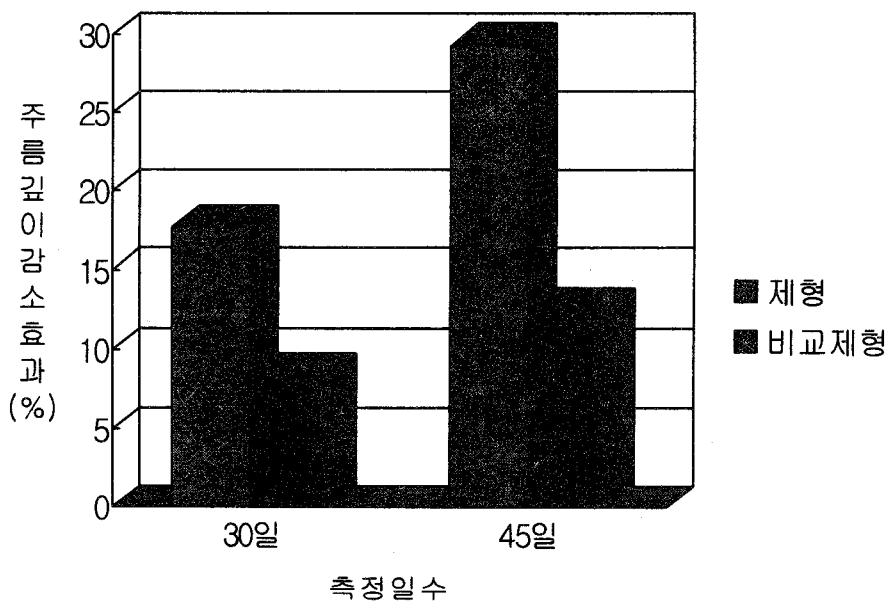


Fig. 42. 주름 개선 효과(시험물질 B)

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1 절 제 1 세부과제

연구 목표	평가의 착안점	목표달성도 및 관련분야에의 기여도
PEG/sericin 결합체의 합성 및 나노입자 제조	1. 활성화된 PEG와 세리신과의 결합체 합성 및 확인 완료 2. PEG/sericin 결합체의 구조 및 물성조사 완료 가. CD 측정 나. IR 측정 다. DSC 측정 라. 아미노산 분석 3. PEG/sericin 결합체의 나노입자 제조 완료 가. 나노입자 제조 나. 나노입자의 크기 측정 다. 나노입자의 형태 관찰	1. PEG와 세리신과의 결합체 합성 및 나노입자 제조 완료 (100%) 2. 농업분야에 첨단 분야인 NT 도입 성공 3. 화장품 원료로 가능성이 있음으로 상품화 준비중 (100%)
PEG/sericin 결합체의 합성 및 나노입자에 레티놀 담지	1. PEG sericin 결합체 합성 및 나노입자 제조 완료 2. 결합체 나노입자에 레티놀의 담지 완료 가. 나노입자에 레티놀의 담지 나. 담지된 레티놀의 정량 다. 레티놀이 담지된 나노입자의 크기 측정 라. 레티놀이 담지된 나노입자의 형태관찰 마. 나노입자에서의 in vitro에서의 방출실험	1. PEG/sericin 결합체 나노입자에 레티놀의 담지 및 in vitro에서의 방출 2. 나노입자에 레티놀의 담지로 고급 화장품원료로 가능성이 보임

## 2 절 제 1 협동과제

연구 목표	평가의 착안점	목표달성도 및 관련분야에의 기여도
세리신 단백질의 추출 및 PEG 활성화	1. 견사(또는 생사)에서 세리신 추 출 및 분획 완료 가. 고온고압법 나. 효소처리법 다. 추출된 세리신의 물성 및 구 조분석 2. PEG의 활성화 및 확인 완료 가. Phenyl chloroformate에 의한 방법 나. <i>p</i> -nitrophenyl chloroformate 에 의한 방법 다. tresylated에 의한 방법	1. 최적조건의 세리신 추 출조건 확립, 그들의 물 성 및 구조 분석 완료 (100%) 2. 경제성이 있는 세리신 추출방법 확립과 세리신 의 중요성 인식 3. 고분자화학을 농업분야 에 접목함
분쇄 및 알콜 처리에 의한 세리신 나노입자의 제조	1. 물리적 분쇄 및 알콜 처리에 의 한 세리신 나노입자 제조와 특성 조사 완료 가. 제조된 세리신의 특성조사 나. 제조된 세리신의 물성 및 구조 분석 다. 세리신 나노입자의 크기 분석 라. 제조된 세리신 나노입자의 형 태 관찰	1. 물리적인 분쇄나 세리 신 수용액에 알콜 첨가 로 인한 세리신 나노입 자 제조 완료 (100%)

### 3 절 제 2 협동과제

연구 목표	평가의 착안점	목표달성도 및 관련분야에의 기여도
PEG/sericin 결합체 나노입자의 안정성 조사	1. 나노입자의 화장품 소재로서의 안 정성 완료 가. 안점막 자극 시험 나. 피부 감작성 시험 다. 피부 자극 시험 라. 급성경구독성 시험 마. 급성경피독성 시험 2. 나노입자의 화장품소재로서의 보습 력시험 완료	1. 나노입자의 안정성 조 사 완료 (100%) 2. 나노입자의 보습력 측 정 완료 (100%) 3. 안전하고 보습력이 뛰 어나기 때문에 화장품소 재로서 생산 가능 (100%)
레티놀이 담지된 나노입자의 화장품소재로서의 안정성 조사	1. 레티놀이 담지된 나노입자의 화장품 소재로서의 안정성 완료 가. 안점막 자극 시험 나. 피부 감작성 시험 다. 피부 자극 시험 라. 급성경구독성 시험 마. 급성경피독성 시험 사. 항산화 효과 측정 아. 주름개선 효과 측정 자. 멜라닌생성 저해 효과 측정	1. 레티놀이 담지된 나노 입자의 안정성 조사 완 료 (100%) 2. 레티놀의 나노입자에의 담지완료(100%) 3. 레티놀이 담지된 세리 신/PEG 결합체 나노 입자의 화장품 소재로 서의 가능여부 조사와 료 (100%)

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 1 절 연구종료 2년후 예상연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	3	
산업재산권 등록	2	
기 타	-	

### 2 절 연구결과의 활용계획

1. 화학수식한 세리신의 나노입자가 화장품 소재로서 안전하고 보습효과가 뛰어나고 주름방지 효과가 우수하며 부산품인 세리신 단백질이 기능성 소재로서의 용도 적용에 따른 수용증대 및 농가소득 향상을 확대할 수 있다.
2. 실크 단백질인 세리신에 합성고분자를 접목시켜 나노입자화함으로써 농업분야에 첨단기법을 도입함으로써 1차산업 생산물의 부가가치를 높일 수 있다.
3. 산업용소재적용 기술개발의 기반확립으로 실크세리신 단백질의 피부친화형 첨단소재화로 산업화 및 실용화를 조기 실현가능할 것이다.
4. 생물신소재 분야에 고분자화학을 접목시킴으로써 첨단분야인 NT와 BT의 새로운 분야에로의 접근이 가능할 것이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1 절 고분자나노입자의 생물공학에의 응용

1. 미국 MIT Langer 교수팀은 고분자 나노입자에 항암제를 담지시킴으로써 항암제가 혈중에서 안정되게 오랫동안 순환된다는 정보를 입수하였다(Gref et al., 1994).
2. 동경대학 Kataoka 교수팀은 고분자미셀형에 바탕을 둔 고분자 나노입자에 항암제를 담지했을 때 부작용이 작고 약효가 오랫동안 지속되는 결과를 발표하였다(Yokoyama et al., 1999).
3. 게이오 Kawaguchi 교수팀은 온도감응성을 갖는 고분자 나노입자를 개발하여 생물공학에 응용하였다(Matsuoka et al., 1999).
4. Utah 대학의 Kim 교수팀은 생분해성을 갖는 고분자 나노입자에 항암제인 탁솔을 담지시켜 항암제의 독성을 줄이고 용해성을 증가시켰다(Suh et al., 1998).

### 2 절 고분자나노입자의 제조방법에 대한 정보

1. Kreuter 그룹에 의하여 고분자 나노입자 제조가 고분자중합시나 유기용매 확산에 의하여 만드는 방법의 정보를 입수하였다(Kreuter, 1994).
2. Kawashima 그룹에 의하여 고분자 나노입자 제조에 있어서 상분리 방법에 의하여 균일한 크기의 나노입자가 만들어지는 것을 보고하였다(Kawashima et al., 1998).
3. 경도대학의 Sunamoto 그룹에 의하여 생체고분자인 pullulan을 소수성기로 수식하면 고분자 나노입자가 제조되는 것을 보고하였다(Akiyoshi et al., 2000).

### 3 절 생체고분자에 합성고분자를 결합시키는 방법에 대한 정보

1. Gotoh 그룹에 의하여 실코 피브로인에 PEG를 결합하여 피브로인의 구조를 안정시킨다는 보고를 하였다(Gotoh et al., 1997).
2. Inada 그룹에 의하여 생체고분자인 단백질의 안정화를 피하기 위하여 PEG와 단백질을 결합시키는 방법을 보고하였다(Kodera et al., 1998).

## 제 7 장 참고문헌

잠사곤충부 (미발표 data)

R. Voegeli et al., *Cosmetics & Toiletries*, 108, 101(1993).

W. Engel et al., *Arztl Kosmetol.*, 17, 91(1987).

N. Kato et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 62, 145(1998).

L.J. Zhu et al., *J. Seric. Sci. Jpn.*, 64, 415(1995).

Federal Register, 38, 1500(1973).

B. Magnusson et al., *J. Invest. Dermatol.*, 52, 268(1969).

C.W. Scott et al., *J. Invest. Dermatol.*, 55, 335(1970).

FDA of USA (1959).

R. Gref et al., *Science* 263, 1600(1994).

J. Kreuter, Nanoparticles, in: J. Kreuter(Ed.), *Colloidal Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker Inc., New York, 1994, pp. 219-342.

M. Yokoyama et al., *J. Drug Targeting*, 7, 171(1999).

H. Matsuoka et al., *Polym. J.*, 31, 1139(1999).

H. Suh et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 42, 339(1998).

Y. Kawashima et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 45, 41(1998).

K. Akiyoshi et al., *Macromolecules*, 33, 487(1997).

Y. Gotoh et al., *Polymer*, 38, 487(1997).

Y. Kodera et al., *Prog. Polym. Sci.*, 23, 1233(1998).

Y. Fugita, I. Uehara., Y. Morimota., and T. Okud, *Yakugak Zasshi*, 108, 129-135(1988).

H. Ohkawa, H. Ohishi, *Anal. Biochem.*, 95, 351(1979).

A. Vanni et el. *Annali chimica*, 80, 35(1990).

K. Maeda and M. Fukuda, *J. Soc. Cosmetic. Chem.*, 42, 361(1991).

강상진, *대한화장품 학회지* 25(2), 59-77(1999).