



Segrete eleganze

Sericina

Struttura e Caratterizzazione

Parole chiave

Sericin
Caratterizzazione
Peso molecolare

Anna Maria Motta, Fabiano Vicentini, Robin Variati
Variati, Concorezzo (MB);

Pierangelo Francescato, Giovanna Speranza
Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi di Milano

Raniero Mendichi
Istituto per lo Studio delle Macromolecole, CNR, Milano

cosmetic.info@variati.it

INTRODUZIONE

Un'antica imperatrice stava passeggiando quando notò un bruco, lo sfiorò con un dito e dal bruco spuntò un filo di seta!

Da una leggenda raccontata 'in punta di dita', la scoperta delle proprietà della seta si svela tra le mani delle donne che per prime la lavorarono. Originariamente, infatti, la seta veniva lavorata manualmente in acqua calda, dove le donne tenevano a lungo immerse le loro mani. Nonostante ciò, il ripetuto contatto con la seta si svelò miracoloso ed esse, anziché divenire logore e sciupate, apparivano ogni giorno più giovani e lisce. Fu evidente che nell'acqua, dove era posta a bagno la fibra, doveva disperdersi una sostanza dalle straordinarie proprietà idratanti e protettive per la pelle.

Struttura e composizione della Seta

La seta è un polimero naturale di natura proteica prodotto da un'ampia varietà di insetti ed aracnidi, ma quella comunemente utilizzata per la produzione dei tessuti viene ottenuta dal baco da seta (*Bombyx mori*) (1-3).

I bozzoli di *Bombyx mori* sono costituiti essenzialmente da due tipi di proteine: la **fibroina**, una proteina fibrosa e le **sericine**, una famiglia di proteine adesive. Le sericine avvolgono la fibroina in più strati successivi, facilitando la formazione del bozzolo e cementando insieme le fibre di seta (1,2,4).

Sericina e fibroina differiscono considerevolmente nella composizione chimica.

La fibroina, proteina *core*, costituisce più del 70% del bozzolo ed è una glicoproteina idrofobica secreta nella parte posteriore della ghiandola serigena.

Le sericine, proteine 'colla', costituiscono il 20-30% del bozzolo e vengono secrete nella regione media della ghiandola serigena. Si tratta di glicoproteine solubili in acqua a caldo, costituite da differenti polipeptidi di peso molecolare compreso tra 24 e 400 kDa, caratterizzati da un elevato contenuto in serina (40% ca) e glicina (16%). Dal bozzolo sono state isolate tre principali frazioni di sericina con pesi molecolari di 150, 250 e 400 kDa (3,5), la cui struttura secondaria è una miscela di *random coil* e β -*sheet* senza elementi di alfa elica.

Degumming e Sericine

Il termine sgommatura (*degumming*) indica il processo di separazione della sericina dalla fibroina, tramite il quale vengono allontanate anche le impurezze naturali o acquisite durante le operazioni di filatura e torcitura, quali grassi, cere, sali inorganici (5). Il *degumming* costituisce, inoltre, una fase necessariamente preliminare alle operazioni di tintura della seta, in quanto la presenza di sericina ostacolerebbe la penetrazione degli agenti coloranti nella fibra, mentre la seta sgommata, morbida, liscia e di colore bianco brillante, ne risulta facilmente predisposta.

Il contenuto di sericina nella seta grezza, valutato in termini di perdita di peso in seguito al processo di *degumming*, varia dal 17% (in alcune varietà di seta cinese e giapponese) fino al 38% (in alcune varietà thailandesi). Il contenuto medio di sericina nella seta italiana è il 23% ca. I processi utilizzati per il *degumming* sono molteplici e variano dalla semplice estrazione della sericina con acqua a caldo sotto pressione, al trattamento con alcali, acidi o enzimi idrolitici.

I metodi più moderni prevedono l'uso di autoclavi dove è possibile controllare pressione, temperatura (130°C) ed utilizzare tensioattivi a pH neutro, garantendo un minor tempo di lavorazione ed un ambiente che non rovini la fibroina.

Se la proteina allo stato nativo non presenta una struttura omogenea, le sericine ricavate dai prodotti di *degumming* ed utilizzate industrialmente a livello cosmetico risultano maggiormente disomogenee. Oltre a ciò, va considerata la variabilità in dipendenza del metodo di *degumming* selezionato.

Anche il colore risulta differente, passando dal crema al giallo chiaro fino al marrone, a seconda delle tecniche utilizzate.

E' stato recentemente dimostrato che le sericine ottenute utilizzando tre diversi metodi di sgommatura e cioè sgommatura con acqua ad alta temperatura e alta pressione (HTHP), sgommatura con alcali e sgommatura con sapone ed alcali (SPA) differiscono non solo nel contenuto di proteina (98, 92 e 67% nei tre casi rispettivamente), ma anche nella distribuzione dei pesi molecolari (20-205 kDa, 20-97 kDa, e 20-43 kDa, rispettivamente) e nella struttura secondaria dei peptidi.

La determinazione dei pesi molecolari nella caratterizzazione dei prodotti di *degumming* risulta, perciò, controversa, sebbene di notevole interesse accademico, scientifico ed applicativo. In letteratura sono riportati dati contrastanti, che generano confusione sull'argomento.

Anche la dimensione delle macromolecole e la conformazione (compatta, flessibile, rigida) restano temi dibattuti e aperti.

NUOVI STUDI SULLE SERICINE

Le stesse proprietà di rivestimento, che consentono alla sericina di proteggere la crisalide durante la delicata fase di metamorfosi, possono traspirarsi anche alla cute per la sua protezione. La sericina crea un film adeso alla cheratina, in grado di svolgere, attraverso un duplice meccanismo, un'azione fortemente idratante.

I valori al corneometro della *Trans Epidermal Water Loss* (TEWL) sono risultati sensibilmente ridotti in studi clinici condotti *in vivo* (6).

Il mantello serico sulla superficie cutanea crea un ambiente favorevole alla crescita dei fibroblasti ed ai processi rigenerativi tessutali, migliora la funzione barriera delle pelli sensibili, protegge dagli agenti esterni, previene le smagliature e riduce visibilmente rughe ed irregolarità (7).

La sericina svolge un'azione protettiva anche sul capello, conferendogli una maggiore pettinabilità e lucentezza e riducendo le irritazioni dovute ai tensioattivi.

E' stata investigata, inoltre, la correlazione tra attività cosmetica e peso molecolare. Alcuni studi recenti, ad esempio, hanno rivelato proprietà antiossidanti, chelanti ed inibenti della tirosinasi per le sericine idrolizzate di peso molecolare compreso tra 250 e 4000 Da (8,9).

Le sericine presenti sul mercato mostrano tuttora un'ampia variabilità di valori di peso molecolare o, talvolta, carenza di dati che ne documentino l'attendibilità.

Da questa mancanza di chiarezza insieme alla crescente importanza di avere dati certi correlabili ad una definita efficacia cosmetica, i ricercatori della Variati, in collaborazione con il Dipartimento di Chimica Organica e Industriale dell'Università degli Studi di Milano e l'Istituto per lo Studio delle Macromolecole del CNR di Milano hanno messo a punto una metodica di frazionamento e caratterizzazione molecolare di alcuni derivati naturali ottenuti da seta.

MATERIALI E METODI

Campioni

La componente principale del campione di partenza è stata la proteina sericina da acqua di torcitura della seta. Gli altri campioni erano costituiti da proteine e peptidi ottenuti mediante diverse fasi idrolitiche del campione di partenza e di due campioni analoghi presi dal mercato. Sono stati utilizzati sette campioni in polvere identificati nel seguente modo:

- VAR1 acqua da torcitura della materia prima,
- VAR2 idrolisi forte,
- VAR3 Sericina L (idrolisi con metodo Variati, Concorezzo (MI),
- VAR4 idrolisi blanda,
- VAR5 Sericina B (idrolisi con metodo Variati, Concorezzo (MI),

- VAR6 prodotto del mercato,
- VAR7 prodotto del mercato.

Frazionamento e Caratterizzazione

Il frazionamento è stato eseguito mediante un sistema cromatografico *size exclusion chromatography* (Sistema SEC modulare Waters composto da: Alliance 2695 [degasaggio, pompa, iniettore], forno colonne, diode array UV 996, rifrattometro differenziale (DRI) 2414 come rivelatore di concentrazione) (10,11) con colonne e fase mobile acquosa al fine di quantificare le varie componenti dei campioni.

La caratterizzazione molecolare dei prodotti è consistita, principalmente, nella misura della distribuzione dei pesi molecolari (MWD) mediante un rivelatore *multi angle laser light scattering* (12) (Fotometro MALS Dawn DSP-F Wyatt (Santa Barbara, CA, USA) con cella a flusso K5 e con luce incidente laser He-Ne, =632.8 nm, con polarizzazione verticale) in linea al sistema SEC, in grado di misurare, direttamente ed in modo assoluto, senza riferimenti a standard, il peso molecolare delle frazioni eluite dalle colonne SEC e le dimensioni delle macromolecole. La MWD dei campioni è stata analizzata anche mediante SEC convenzionale, con un solo rivelatore di concentrazione (in alternativa, rifrattometro differenziale DRI 2414 o fotometro UV (diode array UV 996) ed una calibrazione con vari tipi di standard SEC con MWD molto stretta, al fine di evidenziare il più adeguato standard di calibrazione per la migliore stima dei pesi molecolari ed al contempo conoscere la conformazione della sericina.

La composizione dei vari componenti dei campioni è stata analizzata con un rivelatore *diode array UV* in linea al sistema SEC. In linea generale, tutti i campioni hanno presentato una completa solubilità nella fase mobile SEC utilizzata. Soltanto le soluzioni della materia prima di partenza (VAR1), hanno mostrato una leggera opalescenza e qualche difficoltà di filtrazione dovuta alla presenza di una piccola frazione di aggregati ad alto peso molecolare. L'utilizzo di vari disaggreganti (SDS, urea) non ha eliminato il problema. In ogni caso, la frazione in peso di aggregati ad alto peso molecolare era minima, tale da non compromettere la caratterizzazione della MWD del campione.

RISULTATI

In sequenza sono riportati i risultati inerenti ai sette campioni analizzati.

Frazionamento SEC

In *Figura 1* è riportata la sovrapposizione del segnale di concentrazione DRI dei sette campioni iniettati nel sistema SEC-MALS. Il frazionamento SEC ottenuto è risultato efficace ed ha evidenziato varie frazioni nei campioni sufficientemente distinte tra di loro.

Già da questa prima analisi si è potuto notare che la sericina è un sistema proteico non omogeneo in peso molecolare e che una disomogeneità ulteriore può derivare da differenti metodiche idrolitiche. In particolare, il campione VAR2, fortemente idrolizzato, ha mostrato un'assoluta anomalia rispetto agli altri sei.

Caratterizzazione MWD mediante SEC-MALS

Il confronto della MWD differenziale e cumulativa dei tre campioni VAR1, VAR5 e VAR6 è riportato rispettivamente nelle *Figure 2,3*. In termini qualitativi, analizzando il confronto della MWD, è evidente che nei campioni sono presenti componenti prevalentemente proteiche con peso molecolare che oscilla tra alcune centinaia g/mole a più di 1×10^5 g/mole. Si può dedurre quindi che i campioni analizzati siano costituiti sostanzialmente da proteine, peptidi ed alcune frazioni di proteine fortemente aggregate.

In *Figura 2* sono riportati anche i pesi molecolari delle componenti principali dei campioni. Il picco principale (M_p) del campione di partenza VAR1 ha un peso molecolare di circa 17.000

g/mole. I campioni idrolizzati hanno un peso molecolare di picco M_p di circa 4.500 g/mole.

Nella *Figura 4* viene riportato il confronto della MWD differenziale dei campioni VAR1 e dei campioni ottenuti per idrolisi VAR2, VAR3, VAR4.

Analizzando le curve riportate in *Figura 4*, si possono fare le seguenti considerazioni in termini di distribuzione dei pesi molecolari dei campioni:

- VAR2 è anomalo, cioè molto degradato;
- VAR4 è poco degradato rispetto a VAR1;
- L'idrolisi intermedia del campione di partenza VAR1 produce MWD incentrata intorno a tre picchi principali con peso molecolare di circa 4.500, 2.310, 1.170 g/mole.

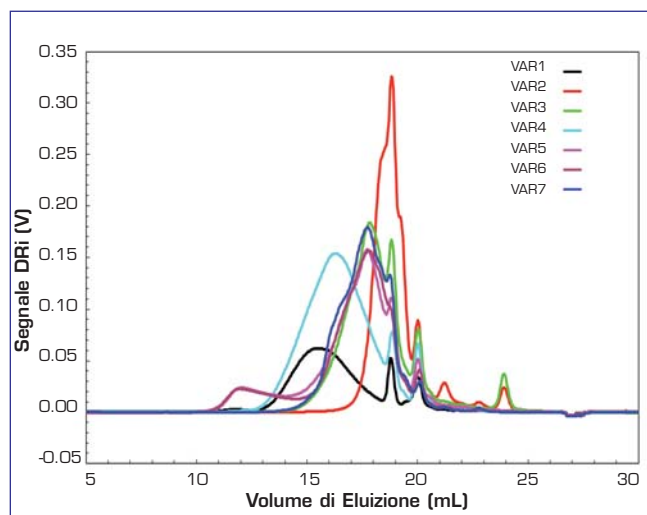


Figura 1 Sovrapposizione segnale DRI dei sette campioni esaminati

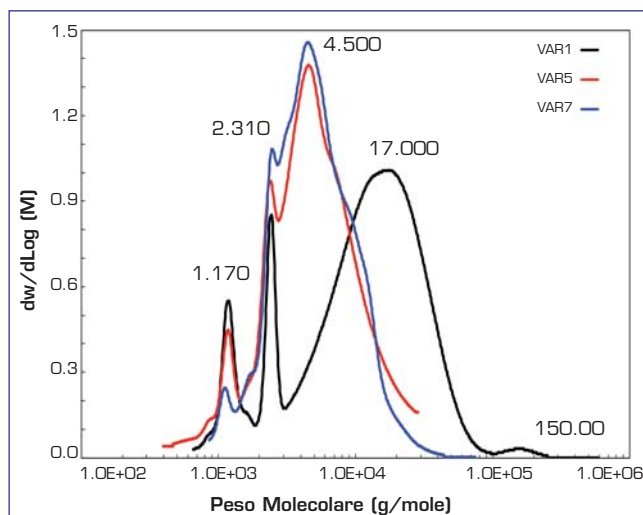


Figura 2 MWD differenziale dei campioni VAR1, VAR5, VAR7

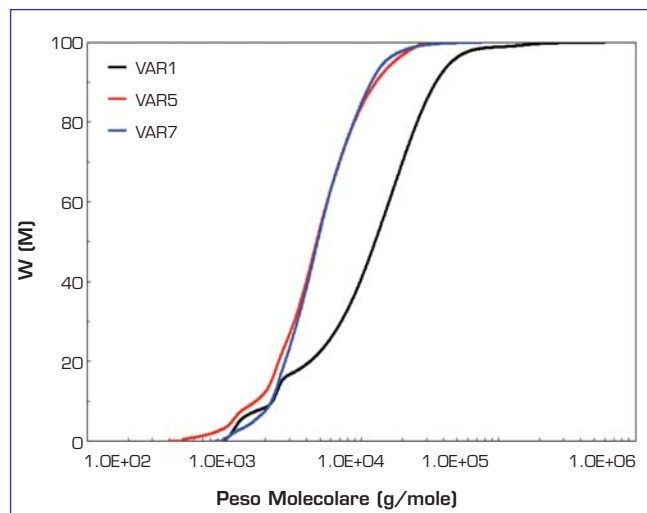


Figura 3 MWD cumulativa dei campioni VAR1, VAR5, VAR7

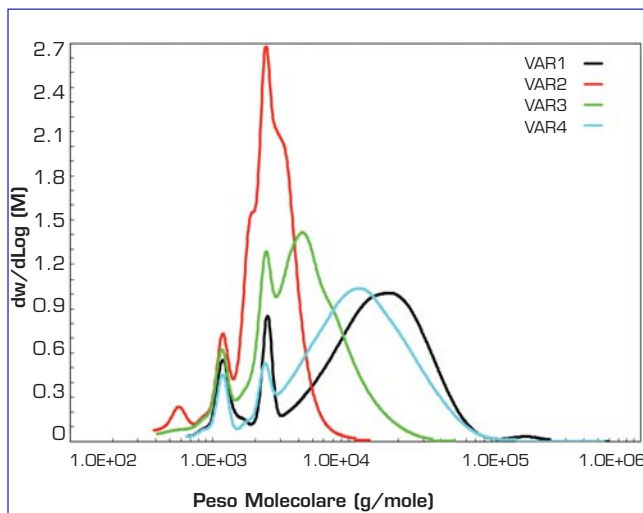


Figura 4 MWD differenziale dei campioni VAR1, VAR2, VAR3, VAR4

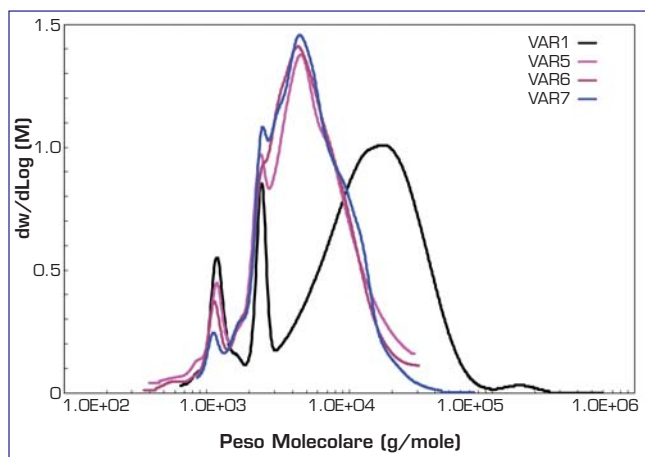


Figura 5 MWD differenziale dei campioni VAR1, VAR5, VAR6, VAR7

Nella Figura 5 viene riportato il confronto della MWD differenziale tra VAR1 e VAR5, VAR6, VAR7. La MWD di VAR5, VAR6, VAR7 è incentrata intorno ai tre picchi principali con peso molecolare di circa 4.500, 2.310, 1.170 g/mole.

I dati di caratterizzazione SEC-MALS dei sette campioni di proteine da sericina sono riportati in Tabella 1, in particolare il peso molecolare del massimo picco cromatografico (M_p); le medie dei pesi molecolari: numerica (M_n), ponderale (M_w) e z (M_z); l'ampiezza della distribuzione: M_w/M_n e M_z/M_w .

E' stata inoltre riportata anche la massa recuperata (*Recovered Mass*) di campione in uscita dalle colonne SEC espressa in percentuale rispetto alla massa di campione iniettata in colonna. Analizzando i dati riportati in Tabella 1, in particolare M_p , sono sostanzialmente confermate le considerazioni precedentemente presentate. In aggiunta, si può notare che la MWD dei campioni è relativamente ampia per VAR1 e VAR4, mentre, per i campioni idrolizzati, tende ad una sostanziale uniformità delle componenti.

Analisi dei componenti campioni mediante spettroscopia UV

Il segnale 3D del rivelatore *diode array* UV in linea per il campione VAR1 ha mostrato che quasi tutte le componenti assorbono alla lunghezza d'onda 274 nm, tipica per le proteine.

Anche lo spettro UV di alcune delle componenti del campione VAR7 ha evidenziato l'assorbimento intorno a 274 nm, confermando la prevalente natura

proteica. In questo caso, però, si sono notate alcune differenze dovute alla presenza di altre componenti, quali diversi tipi di peptidi e/o polipeptidi, saccaridi più o meno legati alle componenti proteiche e peptidiche.

Caratterizzazione MWD mediante SEC convenzionale

Ai fini del controllo di qualità dei prodotti, si è ritenuto utile caratterizzare la MWD dei campioni anche mediante SEC convenzionale, con la quale i risultati dipendono dalla dimensione delle molecole e, dunque, dagli standard utilizzati nella calibrazione.

La conformazione sconosciuta della sericina (compatta, flessibile o rigida) ha reso indispensabile il confronto tra diversi standard per individuare la calibrazione più in linea con i risultati ottenuti tramite SEC-MALS.

Nella Figura 6 vengono riportate le curve di calibrazione assoluta ottenuta mediante SEC-MALS con i campioni in analisi e della calibrazione relativa con alcuni standard: polietilene ossido (PEO) e polietilene glicole (PEG), polisaccaride Pullulan, proteine globulari.

• I campioni in analisi non hanno struttura globulare e quindi la calibrazione con proteine globulari sovrastima significativamente il peso molecolare. La conformazione delle proteine e dei peptidi dei campioni è

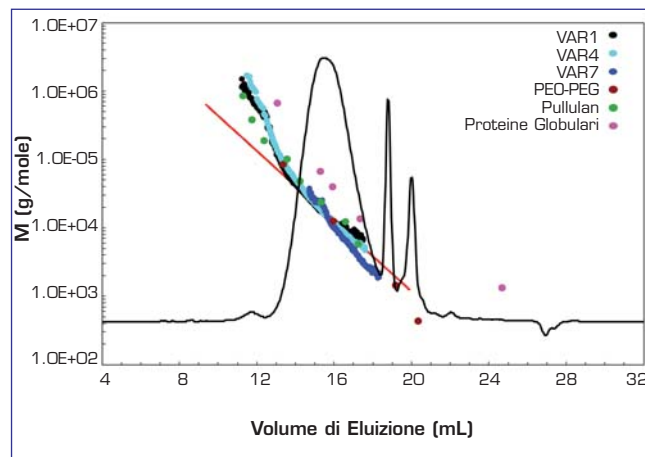


Figura 6 Curva di calibrazione assoluta mediante SEC-MALS, e calibrazione relativa mediante standard MWD narrow PEO-PEG, Pullulan, Proteine Globulari

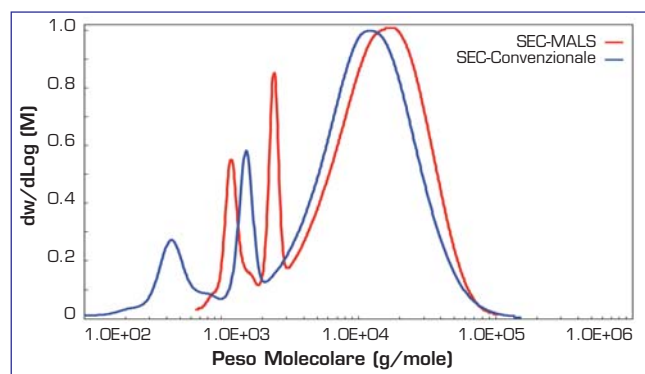


Figura 7 Confronto MWD differenziale campione VAR1 ottenuta mediante SEC-MALS e calibrazione relativa PEO-PEG

sostanzialmente estesa, cioè fibrosa, nella maggior parte delle componenti.

- La calibrazione relativa più vicina alla calibrazione assoluta SEC-MALS è quella ottenuta con standard a MWD *narrow* PEO-PEG.

Il confronto della MWD differenziale del campione VAR1, ottenuta mediante la calibrazione assoluta SEC-MALS e la calibrazione relativa costruita con standard PEO-PEG a MWD *narrow*, è riportato in Figura 7. Confrontando i dati sul peso molecolare riportati in Tabella 1 (SEC-MALS) e in Tabella 2 (SEC convenzionale), e in Figura 7, si può concludere che una calibrazione relativa, costruita con standard PEO-PEG, fornisce una MWD sufficientemente accurata dei campioni soprattutto per un controllo di qualità dei prodotti.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In letteratura sono pochi gli studi eseguiti sulle sericine relativi alla identifi-

Tabella 1 Dati di caratterizzazione SEC-MALS dei sette campioni in studio

Campione	M _p (g/mole)	M _n (g/mole)	M _w (g/mole)	M _z (g/mole)	M _w /M _n	M _z /M _w	Recovered Mass (%)
VAR1	16.953	5.406	15.572	27.447	2.9	1.8	69.1
VAR2	2.364	1.978	2.564	3.118	1.3	1.2	72.8
VAR3	4.235	2.870	5.060	8.617	1.8	1.7	77.3
VAR4	11.077	5.415	13.277	25.431	2.5	1.9	97.8
VAR5	4.547	3.330	6.144	10.164	1.8	1.7	96.3
VAR6	4.371	3.504	5.967	9.617	1.7	1.6	91.9
VAR7	4.475	3.915	6.153	10.126	1.6	1.6	91.7

cazione dei parametri molecolari e quelli riportati presentano dati discordanti riconducibili al fatto che non esiste uno standard definito.

Scopo dello studio è stato, quindi, sviluppare una metodica di caratterizzazione che meglio identificasse i principali parametri molecolari e che fosse riproducibile per controlli qualitativi in scala industriale.

È stato utilizzato un metodo SEC-MALS per la caratterizzazione della distribuzione dei pesi molecolari, delle dimensioni e della conformazione della sericina.

Lo studio ha dimostrato che i campioni di sericina sono formati da almeno tre componenti:

- 1 una principale ad *alto* peso molecolare, costituita da proteine aggregate e molto diversa nei sette campioni;
- 2 una a *medio* peso molecolare, costituita da sericina non aggregata;
- 3 una costituita da proteine e peptidi a *basso* peso molecolare.

Il picco principale del campione di partenza VAR1 ha peso molecolare circa 17.000 g/mole. Il campione VAR2, fortemente idrolizzato, è risultato anormale rispetto agli altri sei. Il campione VAR4, ottenuto per idrolisi blanda, non ha evidenziato importanti differenze rispetto a VAR1, mentre il campione VAR3, ottenuto per idrolisi più spinta, produce MWD incentrata intorno a tre picchi principali: 4.500, 2.310, 1.170 g/mole. Anche la MWD dei tre prodotti finiti, VAR5, VAR6, VAR7, è incentrata intorno ai tre picchi principali con M_p della stessa dimensione.

Lo spettro UV in linea ha evidenziato, per tutte le frazioni, l'assorbimento in-

torno a 274 nm, confermandone la natura proteica prevalente. Sono, tuttavia, emerse alcune differenze, tra le varie frazioni, dovute ad altre componenti, che testimoniano la relativa complessità di composizione che può derivare dall'idrolisi di un prodotto naturale.

La caratterizzazione SEC convenzionale ha permesso di evidenziare che i campioni non hanno struttura globulare e che, quindi, la calibrazione con proteine globulari sovrastima significativamente il peso molecolare. La conformazione delle proteine e dei peptidi dei campioni è sostanzialmente estesa, cioè fibrosa, nella maggior parte delle componenti. La calibrazione relativa più vicina alla calibrazione assoluta SEC-MALS è sicuramente quella ottenuta con standard a MWD *narrow* PEO-PEG.

I dati ottenuti in questo studio hanno permesso di caratterizzare gli ingredienti Variati (Sericina B, Sericina L)* sia sotto il profilo del peso molecolare quanto della conformazione, portando alla conclusione che il processo idrolitico messo a punto nei suoi laboratori è in grado di ottenere un *range* medio di peso molecolare plausibile anche di attività antiossidanti, chelanti ed inibenti della tirosinasi, come descritto da Kato N *et al* (8) e da Wu JH *et al* (9).

Inoltre, lo studio strutturale di identificazione degli standard analitici ha permesso di ricavare informazioni in merito anche alla conformazione dei prodotti e mettere a punto una metodica riproducibile in scala industriale per il controllo costante dei parametri dichiarati.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Hardy JC, Römer LM, Scheibel TR (2008) Polymeric materials based on silk proteins *Polymer* **49** 4309-4327

Tabella 2 Dati di caratterizzazione SEC convenzionale (PEO-PEG) dei sette campioni in studio

Campione	M _p (g/mole)	M _n (g/mole)	M _w (g/mole)	M _z (g/mole)	M _w /M _n	M _z /M _w
VAR1	13.773	2.305	13.123	27.026	5.7	2.1
VAR2	1.450	505	1.662	2.399	3.3	1.4
VAR3	3.205	1.144	3.797	7.053	3.3	1.9
VAR4	8.571	1.425	11.398	35.995	4.7	3.2
VAR5	3.434	1.410	5.197	11.241	3.7	2.2
VAR6	3.298	1.590	4.599	7.937	2.9	1.7
VAR7	3.420	1.847	4.722	8.824	2.6	1.9

- 2 Heim M, Keerl D, Scheibel T (2009) Spider silk: from soluble protein to extraordinary fiber *Angew Chem Int Ed* **48** 3584-3596

- 3 Kundu SC, Dash BC, Dash R, Kaplan DL (2008) Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: potential for biomedical and biotechnological applications *Prog Polym Sci* **33** 998-1012

- 4 Sprague KU (1975) The *Bombyx mori* silk proteins: characterization of large polypeptides *Biochemistry* **14** 925-931

- 5 Gulrajani ML (1992) Degumming of silk *Rev Prog Coloration* **22** 79-89

- 6 Variati (1996) *Valutazione del potere idratante di prodotti cosmetici in un test di utilizzo pratico attraverso misurazioni corneometriche* Pavia, Settembre (Lo studio è stato effettuato su un *panel* di 25 volontari trattati con una crema contenente 0.5 e 1% di sericina e placebo. I valori rilevati dopo 7, 15, 30 e 45 giorni hanno mostrato un evidente attività idratante da parte delle creme con sericina, proporzionale alla percentuale di attivo)

- 7 Rigano L, Leporatti R, Lionetti N, Mieli C (2005) *Sericina integra*. Una molecola bioadesiva dalla seta *Cosmet Technol* **8**(1) 15-22

- 8 Kato N, Sato S, Yamanaka A *et al* (1998) Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity *Biosci Biotechnol Biochem* **62** 145-147

- 9 Wu JH, Wang Z, Xu SY Enzymatic production of bioactive peptides from sericin recovered from silk industry wastewater *Process Biochem* **43** 480-487

- 10 Mendichi R (2002) Caratterizzazione della distribuzione delle masse molarie mediante cromatografia ad esclusione sterica (SEC) con calibrazione relativa ed universale. In: *Esercizi, Esperimenti, Metodi di Analisi di Polimeri Associazione Italiana Macromolecole* (AIM), Milano, p 52-64

- 11 Mendichi R, Giacometti Schieroni A (2001) Use of a multi-detector size exclusion chromatography system for the characterization of complex polymers *Curr Trends Polymer Sci* **6** 17-32

- 12 Wyatt PJ (1993) Light scattering and absolute characterization of macromolecules *Anal Chim Acta* **272** 1-40

* *Sericina L, Sericina B* prodotte e distribuite da Variati, Concorezzo (MI)
email cosmetic.info@variati.it - www.variati.it