

# 양모 케라토스의 분리 및 제조 필름의 구조분석

안형진 · 박영환

서울대학교 천연섬유학과

## 1. 서 론

현재 제조되고 있는 합성고분자 물질은 오랜 기간 안정하며 열, 자외선에 대해서 저항성을 가지도록 디자인되어 있어 분해가 잘 되지 않기 때문에 환경 오염이라는 새로운 문제점을 유발하고 있다. 최근 증대되고 있는 환경 문제에 대한 관심으로 이러한 합성고분자 화학물을 짧은 기간 내에 생분해되거나 자외선에 의해 광분해되도록 제조할 수 있는 기술에 대해 연구가 많이 진행되고 있으며, 한편으로는 자연적으로 생분해가 가능한 천연고분자를 이용하려는 노력도 이루어지고 있다.

천연고분자 물질 중 케라틴은 양모섬유를 구성하고 있는 주요 성분으로서 오랫동안 인간의 의복 제조에 이용되어 온 단백질 섬유이다. 특히 다른 단백질 고분자와는 달리 다양한 아미노산으로 구성되어 있어 잠재적인 반응성을 가지고 있으며 다량의 시스틴 아미노산도 함유하고 있는데 이러한 시스틴은 disulfide bond로 연결되어 단백질 펩타이드 사슬간을 고도로 가교화함으로써 유기용매에 용해되지 않는 특성을 부여하게 된다.[1] 따라서, 양모섬유는 그 자체로서는 용해가 불가능하며 산화제 또는 환원제에 의해 disulfide bond를 절단시켜 유도체의 형태로 용해를 시킴으로써 새로운 필름의 형태로 재생할 수 있다.

본 연구에서는 먼저 양모섬유를 과포름산에 처리하여 용해되는 성분인 soluble keratose와  $\text{NH}_4\text{OH}$  및 LiBr 포화용액에 각각 insoluble keratose를 용해시켜 분리된 성질이 다른 여러 케라토스로 필름을 제조하였다. 두 번째로, 제조된 여러 필름을 SEM(Scanning Electron Microscope) 촬영을 통하여 외형적 단면구조를 관찰하였으며 CD(Circular Dichroism), IR(Infrared spectroscopy), XRD(X-Ray Diffraction), DSC(Differential Scanning Calorimetry) 등의 기기분석을 함으로써 각 필름의 미세구조 차이를 규명하였다. 마지막으로 단백질 아미노산 조성 차이도 살펴보았다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1 양모섬유의 산화 및 분리

양모섬유는 실상태의 메리노 양모로서 아세톤, 석유에테르(diethyl ether), 에탄올 순으로 정제한 후[2] 충분히 수세하여 건조시켜 사용하였다. 양모섬유의 산화는 과포름산에 침지시켜 유도체화한 후[3] 용액상으로 존재하는 soluble keratose와 불용분인 insoluble keratose를 분리하였다. 각각의 케라토스의 함량 결정은 filter paper로 걸러서 시료의 처리전 초기 무게에 대해 filter paper의 무게 차이로 결정하였다. 본 연구에서 계산된 모든 시료 및 filter paper의 무게는 Moisture Analyzer(Mark 2 HP, Denver Instrument Company, USA)를 사용하여 완전 건조부게로 결정하였고 각 케라토스 함량 계산에 이용하였다. insoluble

keratose는 기존의 알려진 방법을[4] 따라서 1.5N NH<sub>4</sub>OH 용액에 용해시켜서 불용분인  $\beta$ -keratose와 NH<sub>4</sub>OH 용해분에 무수아세트산을 첨가하였을 때 발생하는 침전분인  $\alpha$ -keratose, 나머지 용액에 용해되어 있는 성분인  $\gamma$ -keratose로 분리하였다. Insoluble keratose를 LiBr 용액에 용해시키기 위하여 농도, 온도, 시간등 조건을 달리하여 LiBr 용해 최적조건을 규명하였다. 최적 조건에서 용해된 LiBr-insoluble keratose 용액과 불용분을 분리하여  $\sigma$ -keratose라 명명하였으며 투석시켜 얻은 침전분을  $\rho$ -keratose, 용해분을  $\tau$ -keratose로 각각 명명하였다.

## 2.2 케라토스 필름의 제조와 구조분석

분리하여 건조된 S,  $\alpha$ ,  $\rho$ -keratose를 잘 파쇄하여 98% 포름산에 용해시킨 후 각각의 케라토스-포름산 용액을 실온에 방치하면 두께 110 ~ 200 $\mu$ m의 케라토스 필름이 제조된다. 먼저 SEM(JSM-5410LV, JEOL, Japan)을 이용해서 수직으로 절단된 필름의 단면을 관찰하였다. Spectro-Polarimeter(CD6, Jobin-Yvon, France)로 CD(원색성)를 측정하여 포름산에 용해되어 있는 각각의 케라토스 용액의 2차 구조를 분석하였으며 FTIR spectrometer(M series, Midac corporation, USA)를 이용하여 케라토스 필름을 투과법 및 KBr-pellet법으로 분석하였다. 케라토스 필름의 결정구조를 분석하기 위하여 X-ray diffractometer(D/Max-3C, Rigaku, Japan)로 Wide Angle X-ray scattering(WAXS)분석을 하였으며 케라토스 필름의 결정화도 및 각 결정 피크를 분리하기 위하여 Gram/386 program(Galactic industries corporation, USA)의 curve fitting 기능을 이용하였다. 케라토스 필름의 열적 성질을 분석하기 위하여 DSC(TA2910, TA instruments, USA)를 사용하였으며 Pico Tag System(Waters, USA)을 이용하여 각각의 케라토스 아미노산 조성 차이를 비교하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 양모섬유의 산화

과포름산은 양모섬유 펩타이드 사슬내에 존재하는 시스틴의 disulfide bond를 절단한 후 존재하는 thiol group을 다시 sulfonic acid group으로 산화시켜 cysteic acid로 만들므로써 펩타이드 사슬간의 재결합이 불가능하여 용해가 가능한 형태가 되며 이러한 양모섬유의 산화유도체를 케라토스라 한다.

케라토스는 IR 스펙트럼상에서 시스틴이 산화된 cysteic acid의 sulfonic acid group에 대한 피크가 생성된다. 즉, S-O의 symmetric stretching에 의한 1040cm<sup>-1</sup>의 sharp peak과 S-O의 asymmetric stretching에 의한 1175cm<sup>-1</sup>의 broad peak이 나타난다.

본 연구에서는 24시간 과포름산에 침지시켜 양모섬유를 산화시킬 경우 용해 성분을 발견할 수 있었는데 이처럼 용해되어 나오는 케라토스를 soluble keratose로 명명하고 S-keratose로 표시하였다. S-keratose는 용매인 과포름산을 휘발시킬 경우 필름상으로 잘 형성되는 성질이 있으며 전체 양모섬유의 23.4%를 차지하는 성분이다.

## 3.2 NH<sub>4</sub>OH 및 LiBr에 의한 용해와 케라토스 분리

포름산의 산화과정에서 용해되지 않는 insoluble keratose는 약알칼리의 NH<sub>4</sub>OH 용액에 용해가 가능하다. 그러나 완전 용해되는 것은 아니며 또한 용해된 성분도 그 성질이 불균일하여 용매의 pH에 따라 그 용해성이 변화된다. 본 연구에서 분리된  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\nu$ -keratose는 36.1%, 14.7%, 49.5%로서 R. S. Aquith 등[3]의 값과 거의 유사한 것으로 보아 insoluble keratose는 적절히 분리되었음을 알 수 있다.

미처리 양모섬유를 고농도 LiBr 용액의 끓는 조건에서 처리할 경우 수축현상이 일어나는데 이것을 과수축(supercontraction)이라 하며, SS결합이 존재하지 않는 케라토스의 경우 그 연구가 행해진 바 없다. LiBr의 농도와 처리시간, 처리온도를 달리하여 insoluble keratose를 용해시켰을 때의 용해도 변화를 살펴본 결과 최적조건을 LiBr 농도 8M, 처리시간 8시간, 처리온도 90°C로 결정할 수 있었다. 그러나 용해도값은 90% 이상 증가하지 않으며 평형에도달하게 되는데 이러한 현상은 NH<sub>4</sub>OH 용액의  $\beta$ -keratose처럼 더 이상 용해되지 않는 성분이 존재함을 뜻하고 있다.

8M LiBr 용액에 용해된 케라토스 용액을 다량 존재하는 Li<sup>+</sup>와 Br<sup>-</sup> ion을 제거하기 위하여 투석을 행하는데 이러한 LiBr-keratose 용액은 증류수 투석과정에서 많은 양의 침전이 발생하게 된다. 이는 케라토스가 불균일한 여러 단백질 펩타이드 사슬로 구성되어 있어 다양한 등전점을 가지고 있기 때문으로 생각된다. LiBr 용액에 용해시 더 이상 용해되지 않는 성분인  $\sigma$ -keratose, 그리고 투석 과정에서 물에 용해 가능한 성분인  $\tau$ -keratose와 그렇지 않고 침전으로 존재하는  $\rho$ -keratose로 각각 분리하여 그 함량비를 비교하였을 때 각각의 함량비는 20.0%, 16.1%, 63.9%로 결정할 수 있었다.

## 3.3 케라토스 필름의 제조 및 구조 분석

여러 케라토스 중 가장 얻기 쉬운 침전 상태의  $\alpha$ ,  $\rho$ -keratose와 산화과정에서 용해되는 S-keratose만으로 포름산에 용해시켜 필름을 제조하였다. 세가지 케라토스 필름의 단면을 750배로 확대하여 SEM 관찰을 하였을 때 전반적으로 필름의 단면이 아주 치밀하게 구성되어 있음을 알 수 있었다.

### 3.3.1 Circular Dichroism 분석

원색 분석은 단백질의  $\alpha$ -helix 구조의 존재를 확인하는데 유용한 분석방법이다. 케라토스 2차 구조를 파악하기 위하여 필름 제조 전단계인 포름산에 용해되어 있는 케라토스 용액을 CD로 분석한 결과 상당량의  $\alpha$ -helix를 보유하고 있는 단백질인  $\alpha$ -keratose는 이미 보고된 CD 스펙트럼과 거의 일치하였다. S-keratose의 경우  $\alpha$ -keratose의 경우보다 더 명확하게 206과 225nm의 피크가 나타나는데 이는 전형적인  $\alpha$ -helix 구조의 CD 스펙트럼과 유사하며 훨씬 더 많은  $\alpha$ -helix 구조가 존재함을 예상할 수 있다. 그러나  $\rho$ -keratose의 경우 앞의 두 경우와는 다른 스펙트럼을 보이는데 random coil 구조일 경우 나타나는 190 ~ 200nm 사이에서 최대 피크를 볼 수 있으며  $\alpha$ -helix에 해당하는 피크도 존재하고 있다.  $\rho$ -keratose의 random-coil 구조는 필름상으로 제조되었을 때 S-keratose나  $\alpha$ -keratose와는 달리 상당한 양의  $\beta$ -sheet 구조로 전환되어 필름의 결정부분을 구성할 것으로 추측된다.

### 3.3.2 IR spectroscopy 분석

투과법으로 각각의 케라토스 필름의 IR spectroscopy 분석을 하였다. polypeptide의 특징

적인 밴드인 amide I과 amide II band는 인접한 펩타이드 사슬과 수소결합과의 vibrational interaction에 따라 가지게 되는 conformation에 따라서 각 밴드의 진동수들이 변하게 된다.[5] Fig. 1은 케라토스 필름의 구조적 차이를 비교할 수 있는 amide I과 II band 스펙트럼만을 확대한 것이다.

그림에서 보는 바와 같이 S-keratose 필름은  $1653\text{cm}^{-1}$ 에서, 나머지 두 필름은  $1657\text{cm}^{-1}$ 에서 최대 피크가 나타난다. 용액상에서  $\alpha$ -helix 구조를 많이 함유하고 있는 S-keratose는 필름상으로 형성되어도 그 구조가 안정화되어 있기 때문에  $1650\text{cm}^{-1}$  쪽으로 피크가 우세하게 나타나는 것이며 상대적으로  $\alpha$ -helix 구조 함량이 적은 두 필름은 random coil 구조의 amide I band인  $1660\text{cm}^{-1}$  쪽으로 피크가 전이되는 것이다. 더욱이 random coil 구조가 많이 존재하는  $\rho$ -keratose는 IR 스펙트럼상에서도  $\beta$ -sheet 구조에 해당하는  $1630\text{cm}^{-1}$ 의 shoulder peak이 나타나며 이는  $\rho$ -keratose 용액에 존재하는 random coil의 구조가  $\beta$ -sheet 구조로 전이됨을 알 수 있다.

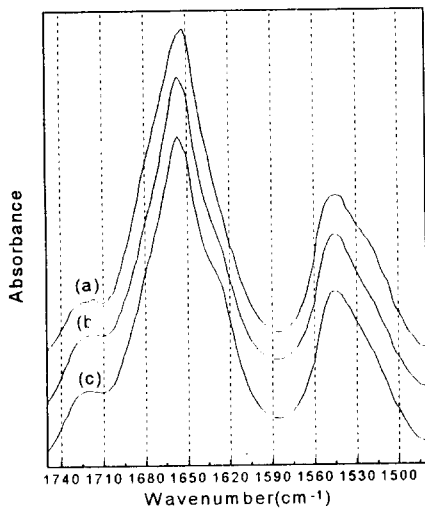


Fig. 1. IR spectra of keratose films. (a) S-keratose film (b)  $\alpha$ -keratose film (c)  $\rho$ -keratose film

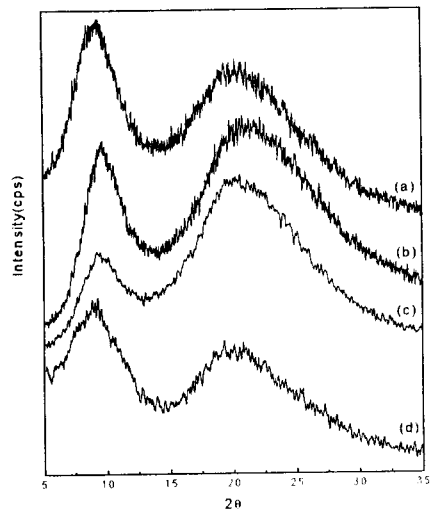


Fig. 2. X-ray diffractograms of keratose films. (a) S-keratose film (b)  $\alpha$ -keratose film (c)  $\rho$ -keratose film (d) untreated wool fiber

### 3.3.3 X-ray diffraction 분석

Fig. 2는 세 가지의 케라토스 필름과 미치리 양모섬유의 X선 회절 분석을 나타낸 것이다. 미치리 양모섬유의 경우 전형적인  $\alpha$ -helix 구조의 X-ray diffractogram을 보여주고 있다.

앞절에서 설명한 바와 같이 random coil이 많이 존재하는  $\rho$ -keratose는  $\beta$ -sheet 구조로 전이됨을 알 수 있는데 Fig. 2 (a)에서 S-keratose의 경우 거의 미치리 양모섬유와 유사하며  $\alpha$ 와  $\rho$ -keratose의 경우는  $2\theta = 20^\circ$  부근의 피크 강도가 커지며 반대로  $9^\circ$  피크는 감소하는 것을 알 수 있다. 전반적으로 XRD 곡선이 양모섬유의 것과 비슷한 것으로 보아 각 케라토스 필름에서는 사실상 새로운 결정 구조는 나타나지 않는 것으로 생각된다.  $\rho$ -keratose의

diffractogram상에서  $2\theta = 9^\circ$  피크가 감소하는 것은 CD와 IR 결과에서도 살펴본 바와 같이  $\alpha$ -helix 구조 함량이 적기 때문에 나타나는 현상으로 해석된다.

각 케라토스 필름의 결정화도를 구하기 위하여 M. Horikita 등[6]의 방법을 따라 곡선 근사(curve fitting)를 행하여 결정과 비결정의 피크를 분리하여 각 피크의 상대적 면적비로서 [7] 결정화도를 계산하였다. 계산된 결정화도는 S-keratose가 48.4%, p-keratose는 46.5%, a-keratose는 44.1%였다.

### 3.3.4 Differential Scanning Calorimetry 분석

DSC 분석에서 케라토스 필름들은 양모섬유와는 다른 거동을 보여서 250°C 이후 급격히 분해되며 280 ~ 300°C에서 최대 흡열 피크가 나타났으며 결정화도가 가장 높은 S-keratose 필름의 경우가 최대 열분해 온도가 가장 높게 나타났다. 열분해 온도는 280°C 부근에서 최대 피크를 나타내었고 a-keratose, p-keratose 순으로 최대 열분해 온도가 감소하는 경향을 보였다. 이와같이 세 필름의 열분해거동의 차이는 결정화도의 차이와 관계가 있는 것으로 추측된다.

또한 S-keratose의 경우 212°C 부근에서 다른 두 필름에 비해 뚜렷한 피크가 출현하는데 이는  $\alpha$ -helix 구조에 관련된 피크로 생각된다. 양모섬유에 비해 낮은 온도에서 피크가 출현하는 것은  $\alpha$ -helix 구조와 함께 존재하는 disulfide bond가 절단됨에 따라 안정성이 떨어지는데 따른 현상으로 생각할 수 있다. 그런데 다른 두 케라토스 필름의 경우 S-keratose보다 좀 더 높은 온도인 220°C에서 피크가 나타나며 그 크기도 작다. a-keratose의 경우 a-helix 구조가 많이 존재하는 물질로 알려져 있음에도 실제 p-keratose와 비슷한 경향을 보이는 것은 상당한 양이 존재하는  $\beta$ -sheet 구조가 a-helix 구조의 이완을 어느 정도 안정화시키거나 또는 거의 같은 위치에서 분해 피크가 나타나기 때문으로 생각된다.

이상의 결과로 볼 때 a-helix 구조가 많이 존재하는 S-keratose가 결정화도도 높으며 열적 성질 역시 우수함을 알 수 있다.

### 3.3.5 Amino acid 분석

케라토스 필름을 구성하고 있는 단백질 펩타이드 사슬의 아미노산 조성을 분석하였다.

S-keratose는 insoluble keratose와 아미노산 조성이 거의 유사하나 cysteic acid 함량이 다소 낮은 것으로 보아 산화과정에서 용해되는 부분은 케라틴 양모섬유중 황 함량이 낮은 부분 즉, SS 가교 형성이 덜 된 부분에서 주로 많이 용해되는 것으로 추정된다.

a-keratose의 아미노산 조성은 거의 전형적인 조성비이며 p-keratose의 경우는 a-keratose에 비해 high-sulfur protein 쪽으로 helix 형성아미노산 조성이 작은 반면 helix 파괴아미노산이 많이 분포하고 있다. 이것은 앞 절에서 설명한 a와 p-keratose의 a-helix 및  $\beta$ -sheet 구조 함량 차이와도 연관성이 있다.

세가지 필름을 모두 비교할 경우 어떤 특징적인 차이점을 발견하기는 힘드나 피브로인에 많이 존재하는 측쇄그룹의 크기가 작은 glycine, alanine, serine의 세 아미노산 함량이 S-keratose가 가장 많으며 p, a-keratose순인 것으로 보아 이러한 아미노산 조성 함량이 필름의 결정구조 형성에도 영향을 미칠 수 있을 것이다.

## 4. 결론

1. 양모섬유 산화과정에서 용해되는 S-keratose는 전체 함량의 23.4%를 차지하였으며 Insoluble keratose를  $\text{NH}_4\text{OH}$  용액에 용해시켜  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\nu$ -keratose를 분리하였고 계산된 함량 값은 보고된 값과 거의 일치하였다. LiBr 중성염에 농도와 시간, 온도 조건을 달리하여 insoluble keratose를 용해시켰을 때 최적조건이 LiBr 농도 8M, 처리시간 8시간, 처리온도 90°C임을 규명하였으며 이 조건에서 케라토스를 분리하였을 때 불용분, 용해분, 침전분을 각각  $\sigma$ ,  $\tau$ ,  $\rho$ -keratose로 명명하였고 그 함량비는 16.1%, 63.9%, 20.0% 이었다.

2. 분리된 케라토스중에서 S,  $\alpha$ ,  $\rho$ -keratose로 제조된 필름을 SEM 관찰을 행한 결과 외관상 아주 치밀한 단면구조로 이루어져 있었고 용액상의 CD 분석을 한 결과 S-keratose가 많은  $\alpha$ -helix 구조를 보유하고 있었으며  $\rho$ -keratose는 주로 random coil 구조로 이루어져 있었다. IR 분석을 하였을 때  $\rho$ -keratose에서 random coil이 전이되어 나타난  $\beta$ -sheet 구조의 피크를 확인할 수 있었다.

3. 각 케라토스 필름을 XRD로 결정구조를 분석한 결과 양모섬유와 유사한 X-선 회절곡선을 볼 수 있었다. 또한 곡선근사를 함으로써 각 결정 피크를 분리하여 결정화도를 계산하였을 때  $\alpha$ -keratose와 비교해서 S-keratose가 결정화도와  $\alpha$ -helix 결정 함량이 가장 높았으며  $\rho$ -keratose는  $\beta$ -sheet 구조의 결정 함량이 가장 많았다. DSC 분석을 통하여  $\alpha$ -helix 피크의 이완 온도와 분해 온도 피크를 비교함으로써 이러한 경향을 다시 확인할 수 있었다. 케라토스 필름의 아미노산 조성을 비교하였을 때  $\alpha$ -keratose에는 helix 형성아미노산,  $\rho$ -keratose에는 helix 파괴아미노산이 많이 존재하였고, S-keratose에는 비교적 측쇄가 간단한 아미노산의 함량이 많았다. 또한 insoluble keratose와 비교해서 cysteic acid 함량이 다소 낮은 것으로 나타났다.

## 참고문헌

- 1) E. H. Hinton, *Text. Res. J.*, 44, 233 (1974).
- 2) L. Arai et al., *6th Wool Text. Res. Conf.*, 2, p.285, Pretoria, 1980.
- 3) R. S. Asquith, and D. C. Parkinson, *Text. Res. J.*, 36, 1064 (1966).
- 4) W. G. Crewther, *Proc. Int. Wool Text. Res. Conf.*, 5th, Aachen, p.1, 1975.
- 5) T. Miyazawa, and E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 712 (1961).
- 6) Michiko Horikita, Mitsuhiro Fukuda, Akira Takaoka, and Hiromichi Kawai, *Sen-i Gakkaishi*, 45, 367 (1989).
- 7) J. F. Rabek, "Experimental Methods in Polymer Chemistry", John Wiley & Sons, p.508, 1980.