

## 견 피브로인 분말과 필름의 제조 및 구조 분석

최해경 · 남중희\*

농촌진흥청 잠사곤충연구소, \*서울대학교 농업생명과학대학

### Preparation and Structural Characterization of Silk Fibroin Powder and Film

Hae Kyong Choi and Joong Hee Hahm\*

National Sericulture and Entomology Research Institute, RDA, Suwon, Korea

\*College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea

#### Abstract

This study is undertaken to investigate proper condition and dissolution method of silk fibroin to use it functional material as powder or membrane. Silk fibroin was dissolved with calcium chloride ethanol aqueous solution and hydrochloric acid. When silk fibroin was dissolved with calcium chloride ethanol aqueous solution, main chain of silk fibroin was degraded and molecular conformation was changed. Silk fibroin powder was made from silk fibroin solution. It showed lower thermal decomposition temperature and crystallinity than those of the native silk fibroin. And its molecular conformation was random coil structure. By acid hydrolysis, main chain of silk fibroin was attacked randomly. Silk fibroin powder from hydrolysate showed high crystallinity and thermal decomposition temperature.  $\beta$ -form molecular conformation was found by IR and X-ray diffraction. Silk fibroin powder from dissolved part with hydrochloric acid showed low thermal decomposition temperature but high crystallinity. During acid hydrolysis, transition of molecular structure of silk fibroin occurred, and it changed to  $\alpha$ -helix. Silk fibroin film was achieved by casting silk fibroin solution onto glass plate. It was water soluble and had amorphous structure, but was made insoluble by ethanol solution or saturated vapor treatment, and its molecular conformation changed to  $\beta$  structure.

Key words : Silk fibroin, powder, film, neutral salt, acid hydrolysis

#### 緒 論

견 피브로인은 glycine, alanine, serine, tyrosine 및 그 밖의 소량의 아미노산이 사슬모양으로 탈수축합한 폴리펩타이드의 선상 고분자이며 이것이 평행하게 배열 집속하여 섬유를 구성하고 있다. 견 섬유는 우수한 특성을 가진 천연섬유로서 오래 전부터 섬유용 소재로 주로 연구·이용되어 오고 있다. 최근에는 천연 단백질 소재인 견을 이용하여 의료 및 산업 분야에 대한 응용 가능성이 다방면으로 검토되고 있다.

이 가운데서 특히 견 피브로인을 이용한 gel, 분말,

막 등이 다양하게 연구되고 있다. 견은 인체에 무해하고 유용한 단백질원으로 gel화한 견 피브로인을 이용하여 식품화 할 수 있으며(平林, 1988) 피브로인의 대부분을 차지하고 있는 아미노산인 glycine, alanine, tyrosine 등을 이용한 의약품 및 기능성 식음료로의 이용가능성이 검토되고 있다(Sugiyama *et al.*, 1985). 견에는 alanine이 1/3 정도 함유되어 있으며 이는 알콜 대사를 촉진시켜 숙취와 알콜에 의한 간장해를 예방하는 효과가 있으며(順田都三男, 1987) glycine은 쥐를 이용한 동물 시험에서 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추는 효과가 있음이 보고되었다. 견 피브로인 분

말은 흡습성, 자외선 차단력이 우수한 특성이 있으므로 화장품 및 정발 제품의 조제로 사용될 수 있다 (Hirabayashi *et al.*, 1991). 이러한 건 피브로인 분말은 조제법에 따라 분자량, 이차 구조, 입자의 형상, 크기 등이 다르기(Xuan Lu, 1994)때문에 각기 다른 방법으로 제조된 건 피브로인 분말은 성형물의 물성에 큰 영향을 끼친다. 그러므로 건 분말을 이용하기 위해서는 제조법을 달리한 건 피브로인 분말의 물성을 연구해야 할 필요성이 있다.

건 피브로인은 화학적 변화없이 용해되어 섬유나 필름으로 재생가능하다(Asakura *et al.*, 1988). 재생 건 피브로인 막은 분자 말단의 산성기, 염기성기 이외에 소량의 산성 아미노산과 염기성 아미노산을 보유하고 있는 폴리 아미노산 막으로 이온교환기를 갖고 있는 천연 단백질 막으로서 생체 적합성이 상당히 크다(Jianyong *et al.*, 1993). Sugiura(1973)는 재생 건 피브로인 막을 사용하여 투과 기능성막으로서 이용가능성을 연구한 바 있으며 건 피브로인막에 styrene을 graft 중합시킨 막에 대한 연구도 보고되고 있다. (Demura, 1973) 또한 건 피브로인 수용액에 효소를 첨가한 효소 고정화막을 제조할 수 있으며 이는 효소 고정화 후 활성이 높게 유지되고 효소 고정화막에서 효소의 손실이 매우 적으며 pH 안정성, 열안정성 등의 장점을 지닌 biosensor로의 이용 가능성도 연구되고 있다(Demura *et al.*, 1989).

위와 같이 건 피브로인은 특이한 분자구조를 가진 생체 고분자로서 유용성을 가지고 있고 있는데 응용에 따른 건 피브로인의 성형 가공을 위해서는 우선 건 피브로인 수용액을 필요로 하며 이를 위해 피브로인 분자간의 결합을 절단하여 수화 상태로 만드는 여러 종류의 용해제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Iizuka, 1980). 따라서 본 연구에서는 건 피브로인을 염산과 중성염을 사용하여 처리시간을 변화시키면서 건 피브로인 수용액을 만들고 이를 이용하여 분말과 필름을 제조했다. 이 때 각각의 용해 조건이 피브로인 구조에 미치는 영향을 알아보고, 피브로인을 분말이나 막 등의 기능성 소재로 이용하기 위한 적절한 용해 방법과 조건을 찾기 위하여 용해 조건에 따른 피브로인 분말과 필름의 특성을 알아보았다.

## 材料 및 方法

### 1. 건 피브로인 분말과 필름의 제조

시료로는 누에 고치를 사용하였으며 다음과 같은 방법으로 정련하였다. 마르세이유 비누 0.5%와 sodium carbonate 2% o.w.f. 용액으로 95°C에서 1 : 100

의 액비로 30분간 2회에 걸쳐서 정련을 행하였다. 그 후 열수로 수세하여 정련제를 제거하였다. 연감율은 23.5%였다. 용해제는 두가지를 사용하였다. 중성염으로는  $\text{CaCl}_2$ 를 사용하였으며 산가수분해는 2N 염산을 사용하였다. 중성염의 농도와 처리 온도를 변화시키면서 일정 시간동안 reflux하에서 일정 시간 동안 처리하였다. 처리 시간은 공통적으로 1, 3, 6, 9시간으로 했으며 액비는 1:50으로 하였다. 건 피브로인 수용액을 G-3 glass filter를 사용하여 불용해물을 감압여과하였고 이때 불용해물은 온수를 사용하여 수세, 건조 후에 무게를 측정하여 용해도를 산출하였다. 농축된 피브로인 수용액을 냉동 건조기(EYELA, FD-5N)를 이용하여 48시간 동안 동결건조를 하여 피브로인 분말을 얻었다. 또한 농축된 건 피브로인 수용액을 유리판 위에 casting한 후 RH 55%, 실온하에서 48시간 건조시켜서 필름을 얻었다. 제조된 필름은 RH 65%, 실온하에서 보관하였다. 밀폐된 항온조 내에 염의 포화 용액을 채워 습도를 조절하였다. 필름의 건조에는  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 를 사용하였으며 필름의 보관에는  $\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 를 사용하여 습도를 조절하였다. 제조된 건 피브로인 필름을 두가지 방법으로 불용화 처리하였다. 용제처리로는 제조한 필름을 20°C, 75%  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  수용액에 1시간 침지처리하여 불용화한 후 증류수로 수세하여 RH 65%, 실온하에서 건조 보관하였다. 피브로인 필름을 RH 100%로 조습한 밀폐된 항온조 내에서 상온에서 40시간 동안 습열 처리하였다.

피브로인의 용해 조건과 분말, 필름 시료명을 다음 표에 나타냈다.

### 2. 분석 방법

아미노산 조성분석은 농축된 건 피브로인 수용액을 6N HCl과 시험관내에 넣은 후 가수분해 반응중 아미노산의 산화를 방지하기 위하여 감압하에서 밀봉 처리한 후 110°C에서 40시간 처리하여 가수분해한 시료를 PITC(phenylisothiocyanate)유도체화하여 HPLC로 분석하였으며 건 피브로인 분말과 필름의 제조법에 따른 열적 거동을 살펴보기 위하여 DSC 2000(Dupont Co.)을 이용하여 질소 하에서 승온속도 10°C/min, 온도 범위 50~400°C에서 분석을 행하였다. 제조법에 따른 건 피브로인 분말과 필름의 형태 변화 여부를 관찰하기 위하여 SEM 분석을 행하였다. 이때 시료는 금도금 한 후 20 kV 가속전압하에서 SEM(Hitachi s-570)을 사용하여 관찰하였다. X-ray diffractometry(Rigaku, DMAXIIB)를 이용하여 회절 강도 곡선을 기록하였다, Ni-filter로 단색화한  $\text{CuK}\alpha$  조사에

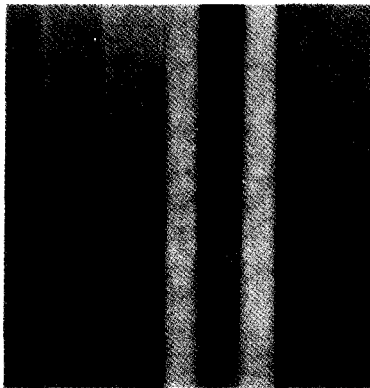
**Table 1.** Experimental conditions and sample I.D. for various treatments

Sample I.D.	Powder			Film		
	CaCl <sub>2</sub>	HCl		F	CaCl <sub>2</sub>	
		S	I		E	V
1	C1-P	H1-PS	H1-PI	C1-FF	C1-FE	C1-FV
3	C3-P	H3-PS	H3-PI	C3-FF	C3-FE	C3-FV
9	C9-P	H9-PS	H9-PS	C9-FF	C9-FE	C9-FV

Powder S: soluble, I: insoluble

Film, F: prepared freshly, E: 75% ethanolic aqueous solution treatment, V: saturated water vapor treatment

A B C M D E



**Fig. 1.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of silk. A: Sample I.D. PC-1, B: Sample I.D. PC-3, C: Sample I.D. PC-9, D: Sample I.D. PH-1S, E: Sample I.D. PH-3S, M: Standard protein marker.

의해  $20=5^{\circ}\sim 35^{\circ}$ , scan speed  $2^{\circ}/\text{min}$ , 40 kV, 30 mA의 조건에서 실시하였다. 원시료는 미세분말이 되도록 가위로 잘랐으며 견 피브로인 분말은 충분히 분쇄한 것을 사용하였다. 견 피브로인 필름은 그대로 사용하였다. Manjunath 등 (1973)이 제안한 식을 이용하여 order factor를 구하였다. 적외선 분광 분석은 시료를 미세한 분말로 만든 후 KBr pellet법으로 resolution  $2\text{ cm}^{-1}$ 로  $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 의 파장에서 BO-MEM FT-IR spectrometer로 흡광도를 조사한 후 Bhat 등 (1980)의 방법에 따라 IR 결정화도 지수를 계산하였다. 피브로인 분자쇄 중 random coil과 anti-parallel pleated sheet의 특성이 가장 뚜렷하게 나타나는 amide III 흡수대의 흡광도비로 표시하였다. 이때의 흡광도는 baseline법(Rabek, 1980)으로 구하였다. 용해 방법에 의한 견피브로인의 분자량 변화 및 분포를 조사하기 위하여 SDS-polyacrylamide gel elec-

trophoresis에 의해 측정했다. 영동에는 12.5% gel을 사용하였다. 영동 시료의 조제는 LAEMLI법 (1970)에 따랐으며 전용 완충액을 이용하여 40 mA의 정전류에서 약 3시간 영동했다.

## 結果 및 考察

### 1. 견 피브로인의 subunit 구조와 분자량 분포

Silk 피브로인의 분자량에 대한 연구 결과는 연구자에 따라 각각 다르다. 이는 연구에 사용한 재료가 재생 피브로인 수용액, 정련한 견, 액상견 등으로 각각 다르고, 측정방법 또한 염기성 아미노산을 결정한 경우, C-, N-말단기를 측정된 경우, x선 회절, 삼투압, 침강법(Morimoto *et al.* 1968), 전기영동 등으로 다양하여 측정치가 넓은 범위에 걸쳐 나타났다. Tashiro (1970)와 Otsuki(1972)는 익은 누에의 중부사선을 취하여 액상견의 초원심분석법에 의한 분자량은 320~420 kD이고 고분자량의 균일한 부분과 저분자량의 불균일한 부분으로 이루어졌다고 보고했다. Sasaki (1973)는 전기 영동법, 침강법으로 측정된 결과 피브로인의 분자량은 360~370 kD이고, 한 분자의 분자량이 280~300 kD인 heavy chain(H쇄) 1개에 몇 개의 light chain(L쇄)이 S-S결합으로 결합된 subunit 구조를 하고 있다고 보고했다. L쇄의 분자량은 20~30 kD이고 native 피브로인은 S-S결합이 한 분자당 2~3개 존재하는 HLn(n=2~3)의 구조로 존재하는 것으로 추정했다.

재생 견 피브로인은 main chain scission에 의한 심한 depolymerization이 일어나서 native silk 피브로인보다 분자량이 낮고 polypeptide의 분자량도 각각 다른 모습을 보인다. 400~450 kD의 분자량을 가진 tussah silk는 처리에 의한 disulfide linkage의 환원에 의해 결합이 끊어지므로 220 kD로 분자량이 감소함을 보인다(Tsukada *et al.*, 1994).

염화칼슘법과 염산법에 의한 얻어진 견 피브로인

수용액의 전기 영동 결과를 보면 용해 방법과 처리 시간에 따라 분자량의 변화가 일어남을 알 수 있다. 염화칼슘에 의한 용해된 견 피브로인의 전기 영동 패턴은 염의 작용에 의한 피브로인의 분자쇄에 절단이 일어남을 보여준다. 30 kD~20 kD에서 밴드가 나타나며 이것은 피브로인 분자쇄의 L쇄에 의한 것으로 생각된다. 이외의 특정 band는 나타나지 않고 있으며 고분자에서 저분자량에 걸쳐 여러가지 다양한 분자량의 펩타이드가 존재함을 보인다. 이는 견 피브로인이 공격을 받아 H쇄에서 분해가 일어난 결과 저분자화되었으며 절단되어 다양한 분자량으로 존재하고 있음을 나타낸다. 20 kD의 밴드는 1시간과 3시간 처리에서는 명확히 관찰되지만 처리 시간이 길어짐에 따라 이 밴드 역시 소실되므로 염화칼슘 처리에 의한 견 피브로인이 상해를 받아 분자간 수소 결합 뿐만 아니라 주쇄에도 절단이 일어남을 알 수 있다.

한편 염산에 의해 용해된 견 피브로인의 전기 영동 패턴은 H쇄는 물론 L쇄도 나타나지 않고 있으며 lane은 전체적으로 끌린 모습을 하고 있다. 이는 피브로인 분자쇄가 염산의 공격을 받아 분해가 일어났으며 용해된 견 피브로인이 특정한 분자량을 가지지 않고 다양한 분자량을 가지고 있음을 보여준다. 산의 공격에 대한 피브로인 peptide 분자쇄의 절단은 특정한 위치에서 일어나지 않으며 산이 공격하기 쉬운 비결정영역에서부터 절단이 일어나 이것이 준결정, 결정 영역으로 진행된다. 이는 산가수분해의 일반적 특징과 일치한다.

2. 아미노산 조성

두 용해법에서 피브로인의 용해 거동의 차이에 의한 피브로인의 조성을 알아보기 위하여 아미노산 분석을 행하였다. 대조는 정련한 누에고치로 하였다. 용해법

에 따라 아미노산 조성은 차이를 보인다. 용해가 완전히 일어난 염화칼슘법에서는 전체적인 아미노산 조성의 경향은 대조와 큰 차이를 보이지 않는다. 그러나 용해가 순차적으로 진행된 염산법에서는 염산 처리시 용해된부분과 용해되지 않고 남은 부분이 아미노산 조성에 있어서 상반되는 결과를 보였다. 견 피브로인은 천연적으로 존재하는 18종의 아미노산으로 구성되어 있으며 그 배열이 규칙성을 가지고 있다. 이를 가수분해되기 쉬운 정도에 따라 비결정 부분과 결정 부분으로 나눌 수 있다. 견을 구성하고 있는 아미노산의 대부분을 차지하고 있는 아미노산은 glycine, alanine, serine이다. Lucus 등(1957)은 정련견을 chymotrypsin 효소 분해 했을 때 용해된 부분과 용해되지 않고 남은 부분을 각각 Cs fraction, Cp fraction으로 나타냈다. 이중 Cp fraction은 Bombyx mori silk과 피브로인의 결정 부분을 구성하고 있는 부분으로 그의 배열 순서는 [Ser · Ala · Gly · Ala · Gly]임을 밝혔다. 이들 아미노산의 양은 대조에서 86%이고 염화칼슘법에서는 대조와 큰 차이를 보이지 않고 있다. 그러나 염산법에서 용해되지 않은 부분에 존재하는 이들 아미노산의 함량은 대조에 비해 높은 값을 보인다. 그리고 그 값도 처리 시간이 1, 3, 9 시간으로 진행됨에 따라 87.8%, 88.7%, 89.7%로 증가하는 추세를 보인다. 이는 산가수분해에 의해 공격받기 쉬운 비결정 부분이 먼저 용해된 결과 불용해물에는 용해되기 어려운 결정 부분의 비율이 처리 시간의 경과에 따라 점차 높아지므로 결정 영역을 구성하고 있는 아미노산인 Gly, Ala, Ser의 함량이 높게 나타났다고 생각된다.

Lucus 등(1957)의 연구에 의하면 비결정 부분의 전체적인 아미노산 조성은 결정 부분에 비해 Gly, Ala, Ser이 약 30% 적고 Tyr, Val, Glu, Ile, Ler 등의

Table 2. Amino acid composition analysis of silk fibroin (%)

	R	C-1	C-3	C-9	I-1	I-3	I-9	S-1	S-3	S-9
gly	46.5	49.8	50.1	51.2	52.6	48.8	48.6	47.0	43.9	44.5
ala	28.2	25.3	25.5	25.4	26.3	30.7	30.8	29.6	28.1	29.1
ser	11.3	8.5	10.3	9.6	8.9	9.2	10.3	8.5	9.5	10.5
asp	1.4	1.7	1.4	1.4	1.1	0.6	0.4	1.7	1.9	1.7
glu	1.1	1.4	1.1	1.1	1.4	0.7	0.4	1.4	1.8	1.4
arg	0.5	0.4	0.4	0.3	0.4	0.2	0.1	0.6	0.7	0.5
lys	1.2	1.2	1.1	1.3	1.0	1.0	1.0	1.3	1.4	1.2
thr	0.8	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.4	0.9	1.0	0.8
leu	0.8	0.6	0.6	0.6	1.8	0.9	0.7	0.6	1.0	1.1
phe	0.6	0.6	0.6	0.5	0.4	0.2	0.3	1.1	0.9	0.7

R: degummed cocoon, C: Fibroin soluble fraction in Calcium chloride -ethanol aqueous solution, S: Fibroin soluble fraction in HCl solution, I: Fibroin insoluble fraction in HCl solution.

극성이 높은 측쇄를 가진 아미노산이 많은 존재하고 있다. 산성 아미노산(Aspartic acid, Glutamic acid), 염기성 아미노산(Lysine, Histidine, Arginine)은 극성을 띠고 있으며 측쇄의 크기가 큰 아미노산으로서 피브로인의 무정형 부분을 구성하고 있다(Tsukada *et al.*, 1994).

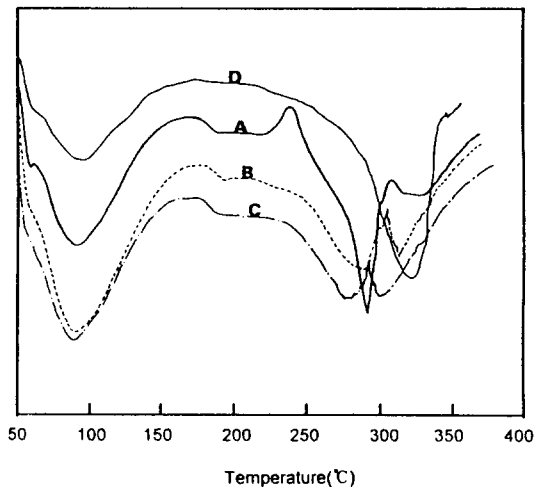
용해 방법에 의한 이들 아미노산 함량의 차이를 살펴보면 용해가 완전히 일어난 염화칼슘법에서는 대조와 차이를 보이지 않는다. 그러나 염산법에서는 용해된 부분과 용해되지 않고 남은 부분이 서로 반대의 경향을 보인다. 불용해물에서는 이들 아미노산의 함량은 처리 시간이 경과됨에 따라 감소하는 경향을 보인다. 그러나 용해물에서는 대조에 비해 상당히 높은 함량을 보인다.

### 3. 열분석

#### 1) 피브로인 분말

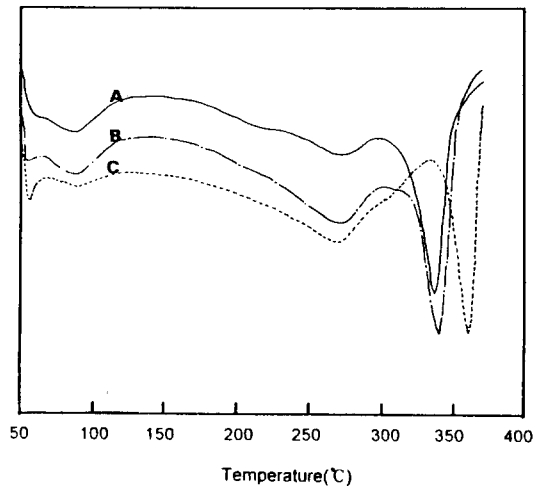
용해 방법에 따른 피브로인 분말의 열거동을 알아 보기 위하여 DSC 분석을 행하였다. DSC분석은 염화칼슘법에 의한 분말, 염산에 용해된 분말, 염산에 불용해한 분말의 세가지로 나누었다. 대조는 정련한 누에고치를 사용하였다. 건 피브로인의 열적 거동에서 280°C 부근의 흡열 peak는 건 피브로인의 열분해에 기인하는 것으로 이들 peak는 시료의 종류 및 가열 속도에 따라 다소 이동이 되는 것으로 알려져 있다. 건은 분자가 수소결합에 의해 결합된 extended confi-

guration을 가진 폴리펩티드 채로 구성되어 있고  $\beta$ -configuration의 파괴에 의해 흡열 peak이 나타난다. 100°C에서 나타나는 흡열반응은 흡수된 물의 휘발에 의한 것이다. 염화칼슘법에 의한 시료의 열분해를 살펴보면 열분해 온도는 대조에 비해 낮음을 알 수 있다. 시료는 두 가지의 흡열 peak를 나타내며 처리 시간에 따라 두 peak는 저온 측으로 이동함을 보인다. 처리 시간에서는 290°C 부근에서 날카로운 흡열 peak이 나타나고 325°C에서 흡열 peak을 보이나 처리 시간이 경과함에 따라 280°C 부근의 낮은 온도에서의 흡열 peak는 broad해지며 이 온도에서의 분해가 추가된다. 염산법에서 용해되지 않은 부분에 대한 DSC 분석의 결과는 위와는 다른 모습을 보인다. 이들은 처리 시간에 관계없이 대조에 비해 매우 높은 분해 온도를 보였다. 처리 시간이 길어질수록 결정 부분의 열분해에 의한 흡열 peak는 고온으로 이동하며 peak 모양이 날카로워지는 경향을 나타냈다. 9시간 처리시 360°C 정도의 고온에서 흡열 peak이 나타났다. 이 부분에서의 열분해는 배향되지 않은  $\beta$  sheet configuration을 가진 피브로인 분자의 분해를 나타낸다. 염산 분해 과정에서 가수분해가 진행됨에 따라 비결정 부분이 소실되어 잔사의 결정성이 높아진 결과이다(Ishikawa *et al.*, 1972). 그러나 이 부분이 차지하는 양은 점차 감소했고 대신 270~280°C 정도에서 열분해하는 부분의 양이 증가했다. 염산법에 의해 용해된 부분에 대한 DSC 분석의 결과 이들 분말의 열분해



**Fig. 2.** DSC thermogram of silk fibroin powder dissolved with  $\text{CaCl}_2$  solution.

A: Sample I.D. C1-P, B: Sample I.D. C3-P, C: Sample I.D. C9-P, D: Degummed cocoon silk



**Fig. 3.** DSC thermogram of remained fibroin powder hydrolyzed by HCl.

A: Sample I.D. H1-PI, B: Sample I.D. H3-PI, C: Sample I.D. H9-PI

온도가 염산법에 의한 잔유물은 물론 염화칼슘법에 의한 분말의 열분해 온도보다 매우 낮음을 알 수 있었다. 처리 시간에 따라 1시간 처리시 260.88°C, 3시간에서 244.16°C, 9시간처리시 239.49°C로 낮아지는 경향을 나타냈다. 또 83~94°C 저온측에서 흡열 peak도 나타났으며 9시간 처리시 149.78°C, 190.62°C에서도 흡열 peak를 나타냈다. Green 등(1970)은 poly( $\beta$ -alkyl-L-aspartates)의 DSC곡선을 해석하고 190°C에서부터  $\alpha$ -helix결정내에서 분자 운동이 활발해지며 213~238°C에서  $\alpha$ -helix가 extended  $\beta$ -form으로 전이함에 따라 흡열 peak이 나타난다고 하였다. 따라서 염산법에 의한 용해 부분에서 나타나는 주된 흡열 peak은  $\alpha$ -helix 결정의 붕괴에 의한 것으로 생각되며 처리 시간이 길어질수록  $\alpha$ -helix 특유의 열분해 거동을 나타내고 있다.

**2) 피브로인 필름**

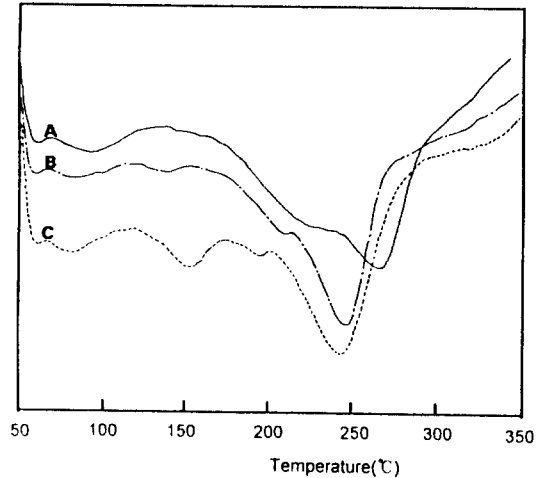
염화칼슘법에 의해 얻어진 견 피브로인 수용액으로 제조한 필름의 열분해 거동을 살펴보았다. 견의 열적 거동에서 100°C 부근의 흡열 peak는 내부 수분의 증발에 기인하며, 280°C 부근의 흡열 peak는 견 피브로인의 열분해에 기인하는 것으로 이들 peak는 시료의 종류 및 가열 속도에 따라 다소 이동되는 것으로 알려져 있다(Ishikawa *et al.*, 1972).

피브로인의 열분해온도는 3시간 처리시 284°C, 9시간 처리시 270°C로서 용해 시간이 길어질수록 낮아지고 있으며, 피브로인 분자가 염화칼슘 처리에 의해 분해되고 있음을 나타낸다. 피브로인 필름을 에탄올 수용액에 침지처리하면 시료의 열분해 온도는 3시간 처리시 291°C, 9시간 처리시 281°C로 무처리 필름에 비하여 각각 10°C 내외의 증가를 보인다. 또, 습열 처리한 시료의 열분해 온도는 3시간 처리시 282°C, 9시간 처리시 279°C로 나타났다. Figure 5에서 피브로인 필름의 열분해 온도는 무처리 270°C, 습열 처리 279°C, 용제처리 280°C 순으로 고온측으로 옮겨감을 알 수 있다. 피브로인 필름은 불용화 처리에 의해 결정성이 증가하므로 열분해 온도가 높아지며 흡열 peak도 날카로워지는 모습을 보인다.

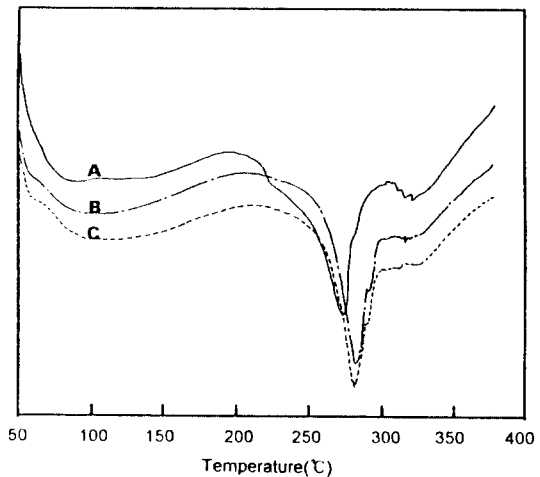
**4. SEM 관찰**

**1) 피브로인 분말**

용해된 견 피브로인 수용액을 냉동건조시켜 얻은 분말의 자세한 morphology를 알기위해 SEM관찰을 행하였다. 염화칼슘법에 의해 얻어진 견 피브로인 분말은 광택있는 얇은판이 적층된 모양이며 처리시간이 길어짐에 따라 판 내부에서 길기로 균열이 발생하고 있는 모습이였다. 이것을 더 작게 조각내어

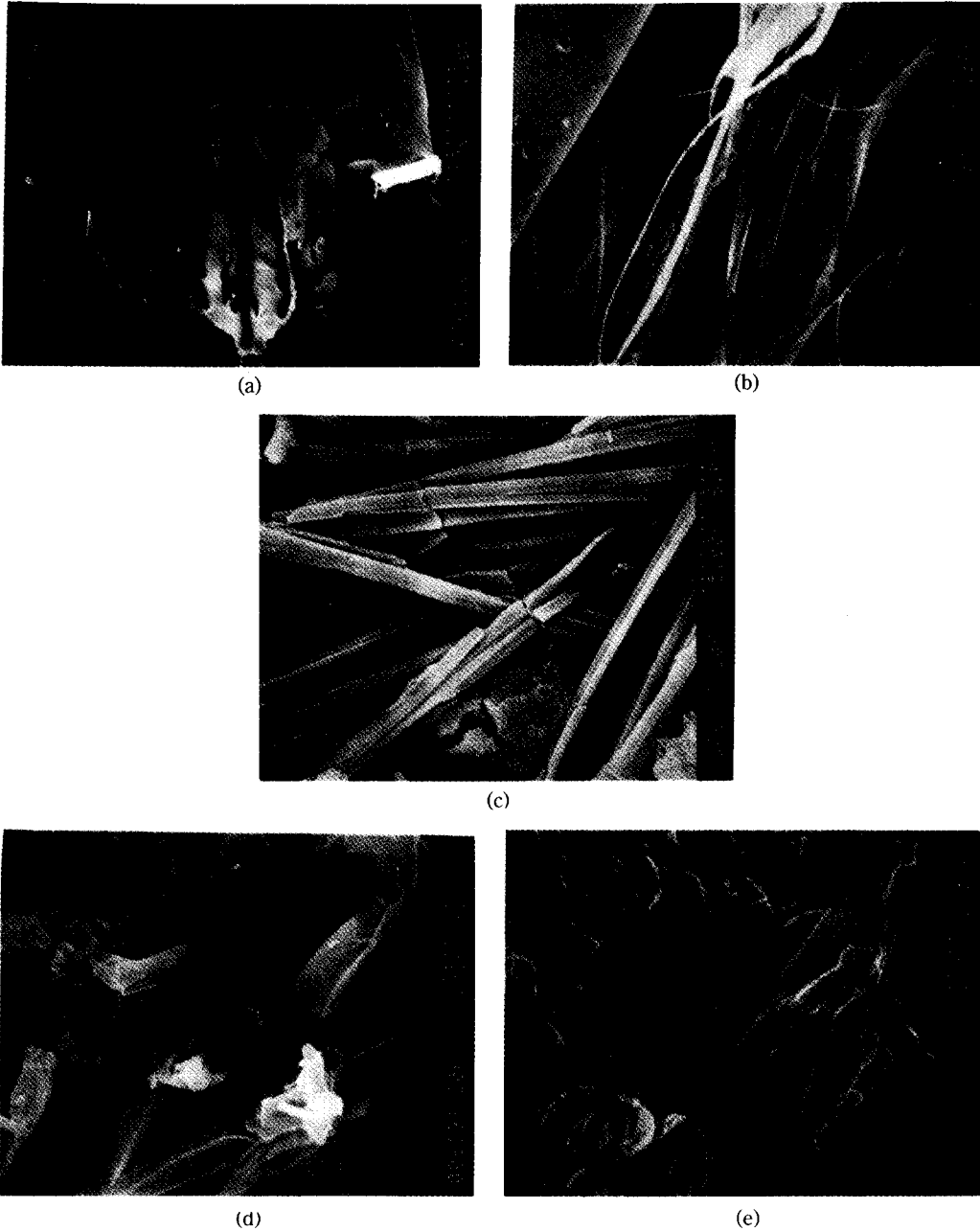


**Fig. 4.** DSC thermogram of silk fibroin powder hydrolyzed by HCl. A: Sample I.D. H1-PS. B: Sample I.D. H3-PS, C: Sample I.D. H9-PS.



**Fig. 5.** DSC thermogram of silk fibroin film treated with ethanol and saturated vapor. A: Sample I.D. C9-F. B: Sample I.D. C9-FE, C: Sample I.D. C9-FV.

관찰하면 각각은 구형의 분말임을 알 수 있었다. 염산법으로 용해시켰을 때 용해된 부분을 동결건조하여 얻은 분말을 확대하여 보면 가는 막대 모양의 입자로 이루어졌음을 알 수 있으며 막대 모양의 입자들은 bundle을 이루고 있다. 염산에 용해시켰을 때 용해되지 않은 잔유물의 SEM 관찰 결과 피브로인의 fibril 부분에서 분해가 일어남을 알 수 있으며 처리 시간이



**Fig. 6.** SEM photographs of silk fibroin powder.

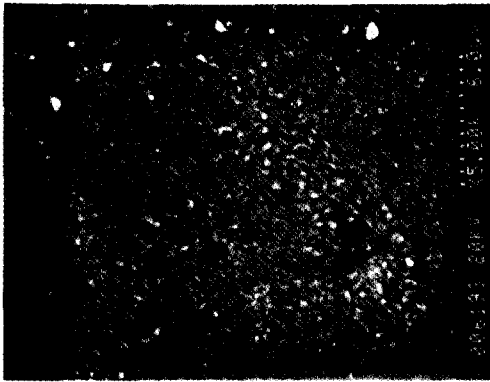
*a: Sample I.D. PC-1, b: Sample I.D. PC-9, c: Sample I.D. PH-3S, d: Sample I.D. PH-3I, e: Sample I.D. PH-9I.*

경과함에 따라 fibril의 모습은 붕괴되고 있음을 나타낸다.

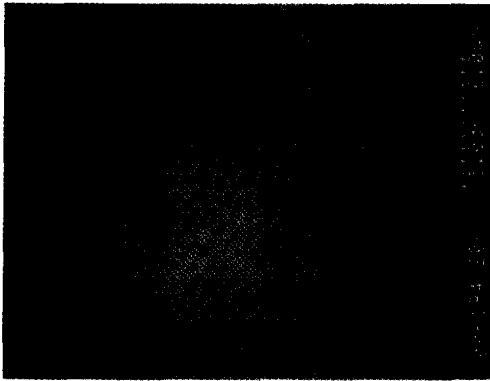
## 2) 피브로인 필름

염화칼슘법에 의해 얻어진 견 피브로인 수용액을

casting하여 필름을 얻었다. Figure 7은 피브로인 필름의 표면과 이면 사진이다. 필름의 표면에는 용제의 휘발에 의한 요철이 관찰되고 있으며 필름의 bottom부분은 유리판에 접촉되는 부분으로 이 부분에서

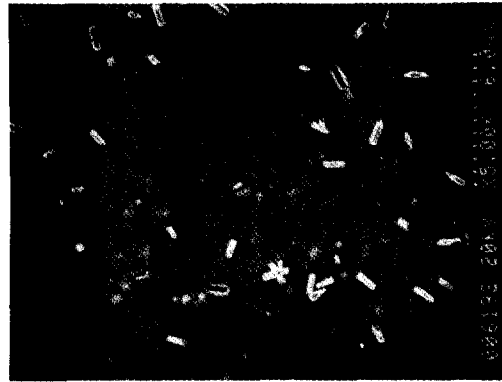


(a)

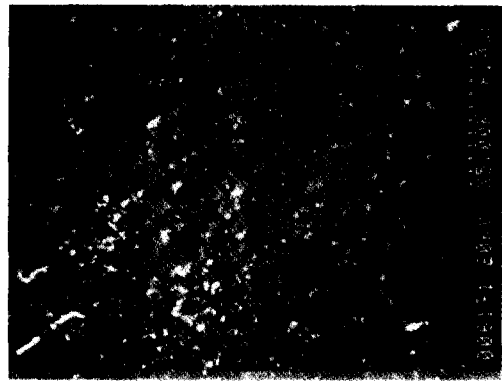


(b)

**Fig. 7.** SEM photographs of silk fibroin film Top: Sample I.D. C3-FF, Bottom: Sample I.D. C3-FF (bottom side).



(a)



(b)

**Fig. 8.** Top: Sample I.D. C3-FE, Bottom: Sample I.D. C3-FV.

는 용매의 증발이 장애를 받아 평활한 모습을 띠고 있음을 알 수 있다.

불용화처리 전후의 bottom의 모양은 별로 변화를 보이지 않으나 Fig. 8에서 필름의 표면 모양은 변화를 보이고 있다. 필름의 표면에 있는 수많은 요철모양은 불용화처리에 의해 미세한 요철로 바뀌었으며 특히 에탄올 처리시에는 표면에서 직육면체의 결정이 생성된 모습을 보이고 있다. Demura(1989)는 견 피브로인을 불용화하면 견 피브로인의 결정구조는 막의 표면 부근에 집중적으로 형성된다고 추정하고 불균일구조 모델을 제시하고 있다. Tsukada(1985)는 건조 온도를 달리하여 제조한 견 피브로인 막의 분자 형태를 연구하고 막의 surface에서 spherulites 존재를 확인하고 이들 spherulites를 형성하는 분자들은 silk II형 결정구조를 취하고 있음을 밝히고 있다. 이로 미루어 표면에 형성된 작은 요철 모양들은 결정화

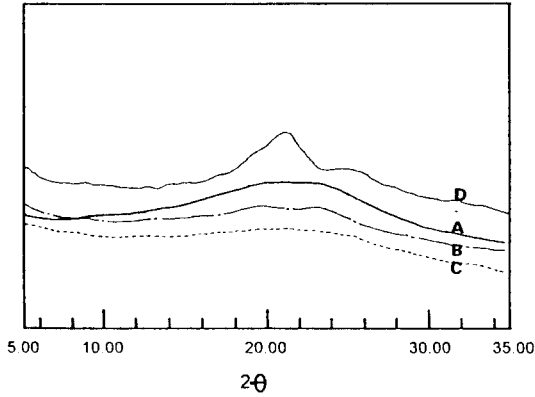
과정에서 생성된 spherulite나 그 밖의 결정으로 추정된다.

## 5. X-선 회절

### 1) 피브로인 분말

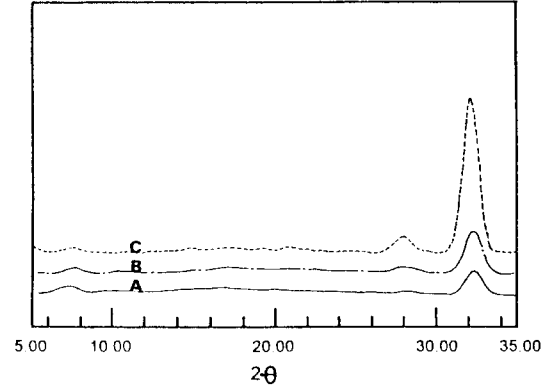
용해 방법에 따른 견 피브로인 분말의 결정성의 차이를 알아보았다. Figure 9을 보면 염화칼슘법에 의해 얻어진 견 피브로인 분말의 X-선 회절 강도곡선은 처리시간에 관계없이 이 분말이 결정 영역을 가지지 않고 무정형을 띄고 있음을 보여준다. 그리고 처리 시간이 길어짐에 따라 결정 영역이 완전히 소실해 감을 보여준다. 염산법에 의해 얻어진 견 피브로인 분말을 용해된 부분과 용해되지 않는 부분으로 나누어 X-선 회절 강도곡선을 구했다. Figure 10에서 염산에 용해되지 않은 잔유물의 X-선 회절 강도곡선으로부터 처리시간이 경과함에 따라 분말의 결정성이 증가하고 있음을 알 수 있다.  $2\theta = 21^\circ, 25^\circ$  부근에서





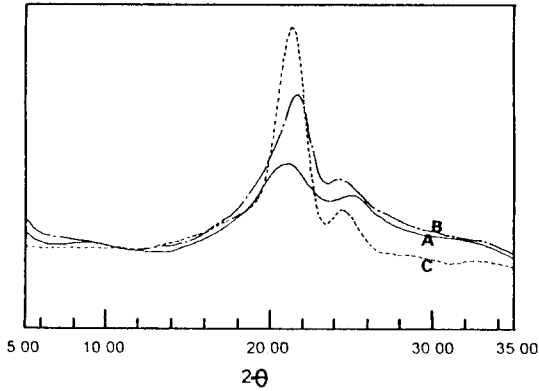
**Fig. 9.** X-ray diffractogram of silk fibroin powder dissolved by  $\text{CaCl}_2$  solution.

A: Sample I.D. C1-P, B: Sample I.D. C3-P, C: Sample I.D. C9-P, D: Degummed cocoon silk.



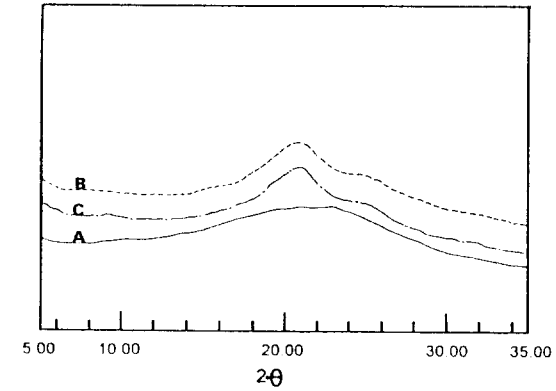
**Fig. 11.** X-ray diffractogram of silk fibroin powder hydrolyzed by HCl.

A: Sample I.D. H1-PS, B: Sample I.D. H3-PS, C: Sample I.D. H9-PS.



**Fig. 10.** X-ray diffractogram of remained fibroin powder hydrolyzed by HCl.

A: Sample I.D. H1-PI, B: Sample I.D. H3-PI, C: Sample I.D. H9-PI.



**Fig. 12.** X-ray diffractogram of silk fibroin film treated with ethanol and saturated vapor.

A: Sample I.D. C1-FF, B: Sample I.D. C1-FE, C: Sample I.D. C1-FV.

peak가 나타나며 이들 peak는 silk II형의 결정 구조의 (201)면, (300)면에 각각 잘 부합하고 있다(Hirabayashi *et al.*, 1980). (201)면은 인접 분자쇄의 분자간 거리에 대응하는 회절로 간주되고 있다(Marshi *et al.*, 1977). 처리 시간이 경과함에 따라  $21^\circ$ 에서 나타나는 peak는 더욱 명확해지고 결정성이 증가하고 있음을 보인다. 염산 처리에 의해 용해된 부분에 대한 결정성을 알아보기 위하여 X-선 회절 강도곡선을 구했다. Figure 11을 보면 처리 시간에 관계없이 공통적으로  $33^\circ$  부근에서 peak이 나타나고 있으며 처리 시간이 경과함에 따라 이 각도에서의 peak는 점점 증가하고 있다. 이 영역에서의 peak는 가잠견 피브로인에 대한

X-선 회절 강도곡선에서는 나타나지 않고 있으며 tussah silk에 산가수분해를 하여 결정성이 증가되었을 때 나타나는 특징적인 peak이며 tussah silk는  $\beta$ 구조를 띠고 있는 가잠견과는 달리  $\alpha$ -helix결정 구조를 가지고 있다고 알려지고 있다(Bhat *et al.*, 1980). 일반적으로 고분자의 중합도가 저하하면 결정화가 쉬워진다는 사실은 잘 알려져 있다. 견 피브로인이 가수분해되면 분자쇄가 절단되므로 새로운 말단이 생성되기 때문에 비평형 위치에 고정된 분자부분이 그 구속을 풀게 되어 열역학적으로 안정한 위치로 전위한다. 즉, 결정화의 기회가 주어진다. 염산법에 의해 얻어진 분말의 결정은 염산 가수분해에 의해 절단된

**Table 3.** Values of the X-ray order factor of silk fibroin powder

silk fibroin	X-ray order factor
control	40.00
Sample I.D. C1-P	23.70
Sample I.D. C3-P	18.32
Sample I.D. C9-P	-
Sample I.D. H1-PI	36.73
Sample I.D. H3-PI	58.20
Sample I.D. H9-PI	77.78
Sample I.D. H1-PS	42.56
Sample I.D. H3-PS	64.71
Sample I.D. H9-PS	94.83

**Table 4.** Values of the X-ray order factor of silk fibroin film

silk fibroin film	X-ray order factor
Sample I.D. C1-FF	-
Sample I.D. C3-FF	-
Sample I.D. C9-FF	-
Sample I.D. C1-FE	36.11
Sample I.D. C3-FE	40.00
Sample I.D. C9-FE	27.78
Sample I.D. C1-FV	32.35
Sample I.D. C2-FV	28.17
Sample I.D. C3-FV	22.97

분자가 절단된 후 재결정화의 기회를 얻어 더 안정한 β구조보다는 결정화가 용이한 α-helix 구조로 전이했다고 생각된다.

**2) 피브로인 필름**

Table 4의 결과로부터 염화칼슘법에 의해 얻어진 견 피브로인 분말은 거의 무정형을 띄고 있으나 이때 얻어진 견 피브로인 수용액으로부터 제조한 필름에 불용화처리를 하면 결정성이 증가하는 것을 알 수 있다. 염화칼슘에 처리하는 시간이 증가할수록 얻어진 필름의 결정화도는 낮아져서 9시간 처리시에는 거의 무정형의 구조를 보이는데 이는 염화칼슘 처리에 의해 견 피브로인 분자쇄에 절단이 일어났기 때문으로 생각된다.

Figure 4, 5에서 염화칼슘법에 의해 얻어진 견 피브로인 분말과 용제처리 및 습열처리에 의해 얻어진 필름의 X-ray 회절 강도 곡선을 살펴보면 용제 처리에 의해 필름의 결정성이 증가했음을 알 수 있다. 2θ=21°에서 살펴보면 용제 처리에 의해 필름의 결정성이 증가했음을 알 수 있다. 불용화 처리에 의한 효과는

**Table 5.** Values of the IR crystallinity index of silk fibroin powder

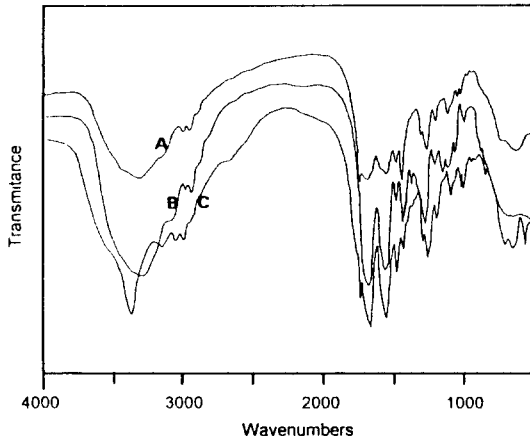
silk fibroin	IR crystallinity index
control	61
Sample I.D. C1-P	-
Sample I.D. H1-PI	70
Sample I.D. H9-PS	42

용제 처리나 습열 처리 모두 비슷한 결과를 나타냈으나 용제 처리가 상대적으로 높은 결정화도를 보인다. 에탄올 수용액 처리에 의한 결정화 기구는 혼합액 중의 물분자가 피브로인을 팽윤시킴과 동시에 random coil형 분자 구조에서 어느 정도 생성되어 있다고 예상되는 분자내 또는 분자간 수소 결합을 절단하고 알콜 분자가 수화 상태에 있는 견 피브로인 분자로부터 물을 탈수시켜 안정된 silk II형으로 결정화시킨다고 추정할 수 있다(Magoshi, 1974).

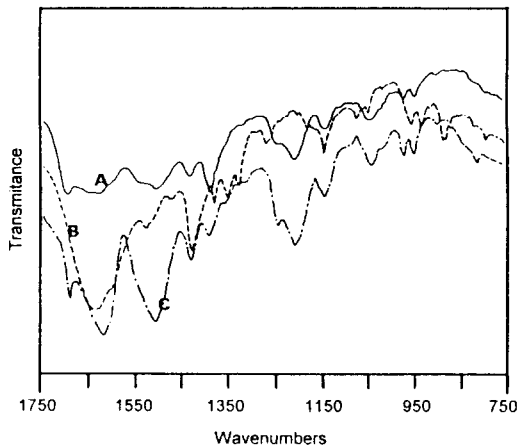
**6. 적외선 분광분석**

**1) 피브로인 분말**

Silk 피브로인의 IR spectrum은 일찍이 연구되었다. 모든 흡수 밴드는 amide group에 의한 것이다. 이 중에서도 1700~800 cm<sup>-1</sup>의 범위에서 피브로인의 특징이 잘 나타난다. 견 피브로인의 특성 IR spectrum 흡수대는 다음과 같다. Random coil구조를 가진 피브로인은 1660, 1540, 1235, 650 cm<sup>-1</sup>에서 각각 amide I, II, III, V에 의한 흡수를 보이며 β 구조로 전이가 일어나면 1630, 1530, 1265, 700 cm<sup>-1</sup>로 흡수대가 이동한다(Magoshi *et al.*, 1977). 또, 1660, 1550, 1270, 617 cm<sup>-1</sup>에서 α-helix 결정 구조에 의한 흡수를 나타낸다. IR crystallinity index는 A<sub>1265 cm<sup>-1</sup></sub>/A<sub>1235 cm<sup>-1</sup></sub>를 사용한다. Amide III 흡수대인 1265 cm<sup>-1</sup>, 1235 cm<sup>-1</sup>에서는 random coil이나 β 구조 모두 좋은 resolution을 보이므로 견 피브로인의 IR Crystallinity Index를 정량적으로 산출하기에 가장 적합한 흡수대로 알려져 있다. IR crystallinity index를 살펴보면 대조에 비해 염화칼슘 처리 시료는 거의 무정형으로 나타났고, 염산 처리 불용해물은 대조보다 높은 결정화도를 보였다. 산 가수분해에 의해 생성된 분말을 대조보다 낮은 값을 나타냈는데 이는 X-ray order factor의 수치와는 다른 결과이다. IR crystallinity index가 X-선 회절법에서 얻은 결과보다 낮은 이유는 β 구조와 random coil 구조의 비로서 결정화도를 구하기 때문에 이 시료가 가진 α-helix 결정 구조의 기여가 낮았기 때문이라고 생각된다. 용해 방법에



**Fig. 13.** IR Spectrum of silk fibroin powder. A: Degummed cocoon silk, B: Sample I.D. C1-P, C: Sample I.D. H1-PI.



**Fig. 14.** IR Spectrum of acid hydrolyzed silk fibroin with hydrogen chloride.

A: Degummed cocoon silk —  
B: Sample I.D. H9-PS ----  
C: Sample I.D. H1-PI - - - -

따라 얻어진 견 피브로인 분말의 IR spectrum은 차이를 보인다. 대조구로 사용한 누에고치의 IR spectrum 중 amine III 밴드를 살펴보면 random coil 부분과  $\beta$  구조가 공존하고 있음을 보여준다. 또  $1630\text{ cm}^{-1}$ 에서  $\beta$  구조에 의한 amide I 밴드를 나타내고 있다. 염화칼슘법에 의한 견 피브로인 분말의 IR spectrum은 염의 적용에 의해 견 피브로인의 분자 구조에 변화가 일어났음을 보여준다. Amide III 밴드에서  $\beta$  구조의  $1265\text{ cm}^{-1}$ 의 peak은 손실되고 random coil에

의한 흡수만을 보이고 있다. 또  $1660, 1540\text{ cm}^{-1}$ 에서 random coil에 의한 amide I, II 흡수를 나타내고 있다. 이상의 결과로부터 염화칼슘의 적용에 의해 견 피브로인은  $\beta$  구조에서 random coil로 분자 구조가 변화함을 알 수 있다. 염산에 처리했을 때 용해된 부분에 대한 IR spectrum은 DSC에 의한 열분해 거동과 유사한 경향을 보이고 있다.  $1630\text{ cm}^{-1}$ 에서  $\beta$  구조에 의한 amide I 밴드에 흡수가 여전히 나타나고 있으나 amide III 밴드에서의 흡수는 감소하고 있으며 대신  $890, 1107, 1310\text{ cm}^{-1}$ 에서  $\alpha$ -helix 구조에 의한 흡수를 보인다.

Figure 13에서 염산에 의해 용해되지 않은 부분에 대한 IR spectrum을 살펴보면 가수분해시킨 견 피브로인의 흡수는 예리하게 나타나고 있으며 결정 부분이 상대적으로 많음을 나타내고 있다. Amide III에서  $\beta$  구조에 의한 특성 흡수대가 명료해졌으며  $1630, 1530\text{ cm}^{-1}$ 에서  $\beta$  구조에 의한 amide I, amide II에 해당하는 흡수를 보이고 있다. 견 피브로인은 용해 방법에 따라 분자 구조에 변화가 일어난다. 염산에 용해되지 않은 잔유물에 대한 IR spectrum으로부터 견의 결정성 부분에 존재하는 구조는  $\beta$  구조임을 확인할 수 있다. 견 피브로인의 결정을 구하고 있는  $\beta$  구조는 중성염 처리에 의해서 random coil로 전이하며, 염산에 처리했을 때는  $\beta$  구조는 감소하고 대신  $\alpha$ -helix 구조가 생성된다.

## 摘 要

특이한 분자 구조를 가진 생체 고분자로서 유용한 견 피브로인은 다양하게 성형 가공할 수 있으며 이를 위해서는 견 피브로인 수용액을 필요로 한다. 견 피브로인의 용해 조건이 형성되는 견 피브로인의 분말과 필름에 미치는 영향을 알아보기 위하여 중성염과 산 가수분해법으로 견 피브로인을 용해시킨 수용액으로부터 견 피브로인 분말과 필름을 제조하고 이들의 특성을 아미노산 조성 분석, SEM, DSC, IR, X-ray Diffraction 등의 방법을 통하여 조사 분석한 결과는 다음과 같다.

1. 염화칼슘법과 염산법에 의해 피브로인을 용해시켰을 때 처리에 따라 아미노산 조성은 달랐으며 분자량도 차이가 있었다.

2. 분말의 구조 분석 결과, 염화칼슘법에 의한 처리에서 열분해 온도는 대조에 비해 낮게 나타났고 무정형의 분자 구조를 띄고 있음을 알 수 있었다. 염산 처리에 의한 잔유물은 대조보다 높은 온도에서  $\beta$  구조에 의한 분해 거동을 보였으며 높은 결정화도를

나타냈다. 한편 염산에 용해된 부분은 열분해 분석 결과  $\alpha$ -helix에 의한 흡열 peak을 나타냈다.

3. 염화칼슘법에 의해 형성된 견 피브로인 필름은 무정형에 가까운 결정 구조를 가지고 있지만 불용화 처리에 의해 결정성이 향상됨에 따라 피브로인 필름의 흡습율은 감소하였으며, 열분해 온도가 증가했다.

### 引用 文 獻

- 平林, (1988) 蠶絲科學と技術, 27: 24  
 順田都三男, 文 豊, 堀田正晴 (1987) Phama Medica, 5: 75  
 Asakura, T., *et al.* (1988) Makromol. Chem. Rapid Commun, 9: 835  
 Bhat and Nadiger (1980) J. Appl. Polym. Sci., 25: 921  
 Demura, M., and T. Asakura (1989) Sen-i Kakkashi, 45: p-252  
 Hirabayashi, K., K. Chen, D. Akiyama and Z. Ayub (1991) First International Silk Conference, 224  
 Jianyong, C., A. Tanioka and N. Minoura (1993) Sen-i Kakkashi, 49: 486  
 Laemmler (1970) Nature, 227: 680  
 Lucas, F., J. Shaw and S. Smith (1957) Biochem. J., 66: 468  
 Mankunath, Venkataraman and Stephen (1973) J. Appl. Polym. Sci., 17: 1091  
 Morimoto *et al.*, (1968) J. Cell. Biol., 38: 604  
 Otsuki, E., Y. Tashiro, and T. Shimadzu (1972) Biochem. Biophys., 257: 198  
 Rabek (1980) "Experimental Method in Polymer Chemistry", pp. 241~243, pp 507~510, John Wiley & Sons, N. Y.  
 Sasaki, T., and H. Noda (1973) Ibid., 310: 91  
 Sugjura, M. (1973) Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 47: 563  
 Sugiyama, K., Kushima, Y. and Muramatsu K. (1985) Agric. Biol. Chem., 49: 3455  
 Tashiro, T. and E. Otsuki (1970) Biochem, Biophys., 214: 265  
 Tsukada, M., G. Freddi, Y. Gotoh and N. Kasai (1994) J. Polym. Sci. Polym. Phys. Edn., 32: 1407  
 Xuan Lu, D. Akyama and K. Hirabayashi (1994) J. Seric. Sci. Jpn., 63(1): 21