

불용성 세리신의 산 가수분해

김정호 · 배도규

경북대학교 천연섬유학과

Acid Hydrolysis of Insoluble Sericin

Jeong Ho Kim and Do Gyu Bae

Natural Fiber Science, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the effects of hydrolysis conditions such as treatment times and concentrations on the solubility of insoluble sericin using the hydrochloric acid solution. When insoluble sericin was hydrolyzed by HCl solution, the solubility was increased with the higher treatment concentration. As the results of electrophoresis of sericin powder obtained by the HCl treatment, a distinguishable band was not confirmed. Average degree of polymerizations(A.D.P.) of sericin hydrolyzed by HCl solution were about 4.2~5.9 and average molecular weights(M.W.) were about 470~670. The longer hydrolysis time reduced the whiteness of sericin powder. As the results of amino acid analysis, the amino acid compositions of the sericin powder from HCl treatment were similar to that of insoluble sericin, but Tyr. and Arg. were not detected in the powder obtained by HCl treatment. In DSC analysis, thermal deformation and pyrolysis peak located at near 220°C and 330°C.

key words : Insoluble sericin, Soluble sericin, Hydrolysis, Degree of polymerization

서 론

견은 천연적으로 가지고 있는 좋은 광택이나 촉감, 생체 적합성 등으로 인해 오래 전부터 고급 섬유 소재로 사용되어 오고 있으며, 최근 화학 기술의 발달로 견이 섬유 소재뿐 아니라 응용 목적에 따라 여러 형태로 가공하여 다양한 용도로 사용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(배, 1994).

일반적으로 견은 제직 전이나 제직 후에 정련을 하여 세리신을 제거하는데, 일반적인 정련 방법은 약 알칼리(비누액) 상태에서 정련을 함으로써 정련 후 순수한 세리신만을 분리하는 기술을 확립하기 어려워서 현재까지 이를 수거하여 사용하지 못하고 폐수로 버려져 왔었다. 그러나 약제를 사용하지 않는 고온 고압의 상태에서 정련을 하게 되면 순수한 세리신 수용액을 얻을 수 있어서(加藤, 1988) 보다 쉽게 세리신의 회수가 가능 할 것이다. 정련된 세리신 용액을 수용성과 불용성으로 분리하여 분말화하면 이 자체로도 필요한 용도의 소재로 사용할 수 있다. 전체 세

리신중 불용성은 약 30%인데(塩澤, 1991) 필요시에 이를 가수분해하여 분자량별로 분획하면 다양한 용도의 소재로 사용할 수 있을 것이다. 실크 가수분해 방법에는 산 가수분해(Chen *et al*, 1991, Ailin *et al*, 1996)와 효소 가수분해(Chen *et al*, 1995)가 주로 이루어지며 최근 알칼리 가수분해(김·배, 1997)에 관해서도 보고 되어있다.

아직까지 세리신의 가수분해에 대한 연구는 피브로인에 비해 다양하지 않지만 정련 후 세리신을 수거하여 비의류용으로 사용할 수 있다면, 환경 오염이 되는 폐수도 줄이고 실크 전체의 1/4이나 점하면서도 폐기되어 버리는 세리신에서 피브로인과 더불어 고부가 가치를 재창출하는 소재로 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 아미노산의 조성이 피브로인과는 다르므로 기존의 피브로인이 갖지 못했던 특성들을 세리신에서 찾을 수 있을 것이다.

실제로 세리신은 산화반응을 억제하며, 피부 멜라닌의 생합성과 여러 음식물의 부패 반응의 원인이 되는 tyrosinase의 활동을 억제하는 것으로 연구 보고되

어 있으며(Kato *et al*, 1998), 이는 세리신이 음식물이나 화장품에 유용한 재료로 사용할 수 있음을 시사한다. 김치의 저장성을 높이는데 실크를 사용하여 효과가 있었다는 보고가 있는데(이 등, 1997) 세리신도 같은 기능을 할 수 있을 것으로 생각되며, 피브로인 및 세리신을 함유하는 단백질의 가수분해물을 아실화 시킴으로써 얻어지는 아실 아미노산이 화장품, 피부염증 등의 치료분야에 사용하기 위한 조성물을 제공하고 있으며(특허, 94-14305), 안료의 표면에 세리신 또는 피브로인을 코팅하는 것을 특징으로 하는 복합 안료는 파운데이션, 콤팩트, 립스틱, 마스크라 등의 화장품의 조성물로 사용된다고 한다(특허, 96-16870).

세리신을 가수분해하여 분자량별로 얻을 수 있다면 이처럼 다양한 용도로 사용할 수 있을 것으로 기대되어 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

시료는 절각견을 130°C에서 1시간 고온 고압 정련한 후 용액을 70°C에서 빙초산으로 pH 4로 조정하여 1시간 방치하였다. 이 때 수용성 세리신과 불용성 세리신은 상분리가 일어나는데 수용성 부분을 따라내고, 침전된 시료는 여과지(Advantec, No.5 C, 185 mm)를 이용하여 여과하였다. 잔류물은 증류수를 첨가하여 재 여과하고, 같은 방법으로 5반복 여과 후 잔류물을 수거하여 풍건 시켰다. 이를 분말화하여 가수분해시의 시료로 사용하였다. 가수분해 후 얻어진 수용액은 동결건조하여 이를 desiccator에 보관 후 필요시에 사용하였다. 기타 시약은 특급 이상의 것을 사용하였다.

2. 방 법

1) 염산 가수분해

염산처리 농도에 따른 용해도를 알아보기 위해 2g의 불용성 세리신 분말을 용비 1 : 50으로 하고, 염산 농도를 0.5N, 1N 용액으로 하여, 온도 95°C에서 각각 3, 6, 9, 12, 18, 24시간 가수분해하여 염산 농도와 처리 시간에 따른 용해도를 식 (1)과 같은 방법으로 구하였다.

$$\text{용해도}(\%) = \frac{\text{가수분해 전 무게} - \text{가수분해 후 불용해물의 무게}}{\text{가수분해 전 무게}} \times 100(\%) \quad (1)$$

기기 분석용 시료는 아래와 같은 조건으로 가수분해하여 준비하였다. 가수분해 후 NaOH 수용액을 사

용하여 세리신 수용액의 pH를 7로 조절한 후 가수분해 한 수용액을 여과지로 여과하여 원심분리기(Beckman, J2-21)로 20,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 상등액만을 취하여 동결건조기(ISE, Bondiro)로 48시간 동결건조하여 분말화 하였다.

Sericin powder : 40g

온도 : 95°C

용비 = 1 : 20

처리시간 : 6, 12, 24hr.

염산 농도 : 1N sol'n

시료 제조 과정은 Fig. 1 과 같다

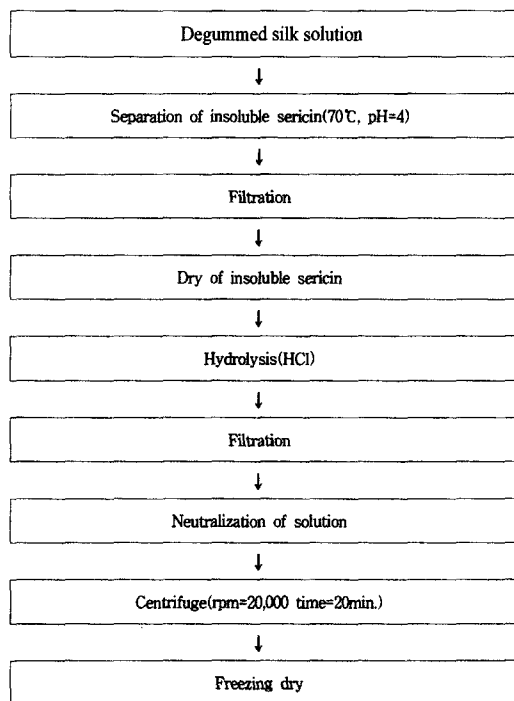


Fig. 1. Flow charts of sample preparation for instrumental analysis.

Table 1. The sample I.D. of soluble sericin obtained by various treatment conditions

Sample I.D.	Treatment conditions
IN	Insoluble sericin
H1	Treated time with HCl solution : 6hr.
H2	Treated time with HCl solution : 12hr.
H3	Treated time with HCl solution : 24hr.

2) SDS 전기영동

SDS-poly acrylamide gel electrophoresis를 행하여 가수분해된 수용성 세리신의 분자량 분포를 알아보았다. 전기영동에는 15% gel로 20 mA의 정전류에서 각 시료와 protein molecular weight marker (Promega, M.W.: 3.5~31KDA)를 1시간 30분간 영동 후 염색, 탈색, 건조하였다.

3) 알단기 정량에 의한 평균 중합도

불용성 세리신을 가수분해한 후 Ninhydrin반응을 시켜 UV-spectrophotometer(Beckman, DU 650)로 402nm에서 흡광도를 측정하였고, 불용성 세리신 1g을 6N HCl로 가수분해한 후 여과, 감압 건조, 수세, 건조 후 증류수를 첨가하여 10 ml로 정용하여 0.45 μ m membrane filter로 여과한 후 Ninhydrin반응시켜 흡광도를 측정하여 완전 가수분해된 세리신의 mol 흡광도 기준으로 하였다. Ninhydrin반응시 완전 가수분해액은 증류수를 첨가하여 0.1% 농도로 하고, 염산 가수분해한 용액은 1% 농도로 하여 10 ml로 정용하여 vial에 넣고, 1% Ninhydrin sol'n 5 ml를 첨가하여 밀폐한 후 100°C에서 5분간 처리하였다. 평균중합도는 식 (2)와 같은 방법으로 구하였다.

$$\text{평균 중합도} = \frac{\text{완전 가수분해한 용액의 mol 량 흡광도}}{\text{가수분해한 용액의 mol 량 흡광도}} \quad (2)$$

4) 백 도

가수분해한 분말의 백도를 알아보기 위해 색차계 (Minolta, CR-300)로 Lab계열의 색을 3회 측정하여 L값의 평균을 백도의 비교치로 하였다.

5) 아미노산 분석

염산처리로 얻은 분말과 불용성 세리신 분말 각 1g에 6N HCl을 첨가하여 10 ml로 만들어 ampule에 담아 질소가스를 7분간 충전 후 밀봉하여 110°C에서 24시간 가수분해하여 냉각하고 염산을 감압하여 제거하고 증류수로 2회 세척한 다음 건조시켰다. 건조시킨 시료를 구연산 완충액(pH 2.2)으로 용해하고 여과한 다음 10 ml로 정용하여 0.45 μ m membrane filter로 여과한 뒤 자동 아미노산 분석기 (Pharmacia Biotech, Co, Biochrom20)로 분리 정량 하였다.

6) DSC 분석

가수분해된 세리신 분말의 열적거동을 알아보기 위하여 DSC(Universal V1 11A TA Instruments)분석을 하였다. 승온 조건은 10°C/min., 분석 범위는 50~350°C에서 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 염산 가수분해

불용성 세리신의 염산 가수분해에 따른 용해도를 Fig. 2에 나타냈다. 1N HCl 용액이 0.5N에서 처리한 것보다 5%정도 용해도가 더 높았으며, 처리시간이 경과할수록 용해도도 증가하였다. 가수분해를 6시간 이상 처리했을 때에는 처리 시간의 증가에 따라 용해도의 증가폭이 감소하는 것으로 나타났다. 염산의 세리신 펩타이드에 대한 절단은 무작위로 일어날 것으로 생각되며 특정 아미노산 부위가 아닐 것으로 예상된다. 그러나 세리신이 불용성 고분자이기 때문에 염산의 가수분해는 불용성 고분자 마찰 부분에서부터 일어나고 처리 시간의 경과에 따라 점차 내부로 진입해서 최종적으로는 완전히 분해시키는 것으로 고려된다. 이 과정에서 비결정은 당연히 먼저 파괴되어 수용성화가 이루어지겠지만, 준결정은 완전히 분해되는데 처리 시간이 어느 정도 필요하다고 생각된다. 모든 세리신이 가용화된 다음에는 분자량의 감소가 계속해서 진행될 것으로 추론된다.

2. SDS 전기영동

각 조건에 따라 제작된 수용성 가수분해물에 대하여 전기영동을 실시하고 그 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 분자량 6,000~20,000 사이에 주로 분포하며 처리 시간에 따른 시료간의 차이는 인정되지 않았다. 전체적으로 염색정도가 약하다고 생각되어, 각 시료별로 전기영동후 일정량의 lower buffer를 수거하여 ninhydrin반응을 실시한 결과, 색이 발현한 것을 관찰

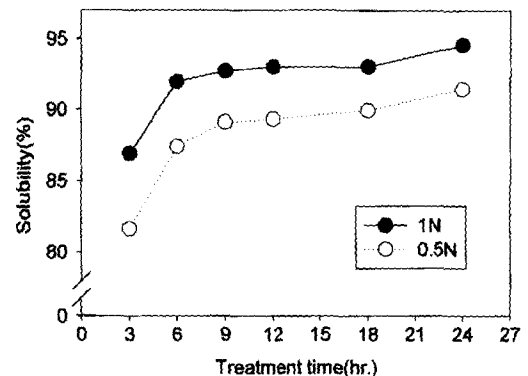


Fig. 2. The effects of concentration and time in HCl treatment on the solubility of insoluble sericin.

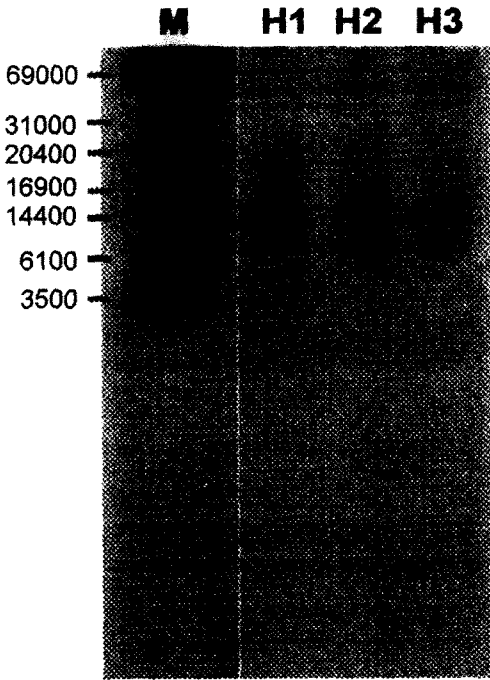


Fig. 3. 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
M : Standard protein markers.

하였다. 모든 시료에서 이러한 현상이 나타났으며, 발색정도도 아주 진하게 나타나, 아주 작은 분자량의 펩타이드나 아미노산이 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

3. 말단기 정량에 의한 평균 중합도

염산 가수분해시의 평균 중합도는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 가수분해 시간이 경과할수록 중합도가 낮아졌다가 처리시간이 12시간이 지나면서 평균 중합도는 다시 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Fig. 2의 결과에서 고찰한 바와 같이 가수분해 초기에는 용해도가 아주 높아서 6시간 처리할 때까지 많은 양이 용해되어 평균 중합도 측정 시 분자량이 큰 것과 작은 것이 혼재되어 있을 것으로 사료되며, 12시간까지의 계속된 처리로 용해도 증가는 비록 점감되었지만 이미 용해되어 있던 펩타이드나 수용성 고분자는 계속해서 분해되어 전체적으로 저분자가 많게 되어 평균 분자량이 낮아진 것으로 생각된다. 12시간 이상의 처리에서는 용해도 증가는 미미하지만, 수용성 고분자들은 계속해서 저분자화 되고 있을 것으로 생각되며 이때까지도 불용성으로 있던 세리신이

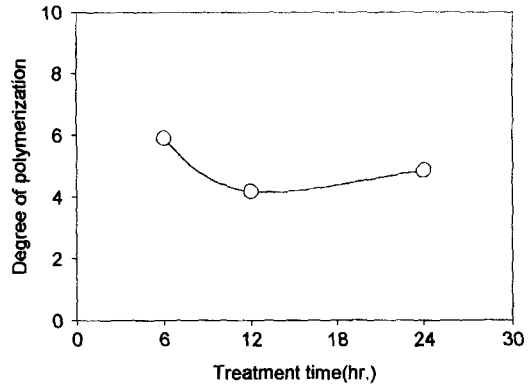


Fig. 4. The effects of the HCl treatment time on the A.D.P. of hydrolyzed sericin powders.

점차적으로 가용성화 됨으로써 분자량이 큰 수용성 세리신의 비율이 증가하여 평균 중합도는 약간 상승한 것으로 사료된다. 염산 가수분해시의 평균 중합도는 처리 시간별로 5.89, 4.18, 4.86 순 이었고, 평균 분자량은 668, 473, 552 순으로 나타났다. 이들의 분자량은 평균 아미노산 분자량에 평균 중합도를 곱하여 평균 분자량을 구할 수 있다. 평균 아미노산 분자량은 아미노산 분석에서 얻은 각 아미노산의 분자량에 그 함량비를 곱하여 모두 합한 값을 전체 아미노산의 함량으로 나누어 구했다.

이상의 결과를 전기 영동 실험 결과와 함께 비교, 검토해 보면 전기 영동상에서는 분자량이 3,500 이상인 것만 그림에 나타났는데, 실제로는 이보다 작은 분자량들의 펩타이드 및 아미노산이 말단기 정량으로 시험한 결과, 다량 존재하고 있음을 다시 한번 확인할 수 있었으며, 분자량 3,500 이상의 것을 제거한다고 해도 상당량의 저분자 펩타이드 및 아미노산을 얻을 수 있을 것이라 사료된다.

4. 백 도

가수분해로 얻어지는 수용성 분말의 백도는 상품성과 밀접한 관계가 있으며, 가급적 무색일수록 상품성을 높일 수 있다. 따라서, 이러한 측면을 고려하여 가수분해시 색을 발생시키지 않을 수 있다면 큰 의미를 가질 수 있을 것이다.

염산 가수분해시의 백도는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 가수분해 시간이 경과할수록 낮게 나타났다. 이는 산 가수분해시 세리신이 산화되어 황변되는 것으로, 일반적으로 산 가수분해가 실크 가수분해시 가장 널리 쓰이는 방법중 하나인데 단점 중 하나가 바로

이 황변현상이다. 그래서 Chen등(1992)은 가수분해 후 탈색을 위해 이온 교환 수지나, 활성탄 처리 및 산화 알루미늄을 사용하여 탈색하는 방법을 비교 연구하여 수율면에서는 활성탄 처리가, 백도는 이온교

환수지 처리가 가장 좋다고 하였다.

5. 아미노산 분석

염산 가수분해의 경우는 불용성 세리신과 비교해 아미노산 함량에 큰 차이는 없었으나 Tyr과 Arg.이 검출되지 않았다.

6. DSC 분석

염산 가수분해 방법에 의해 얻어진 수용성 세리신 분말의 열적 거동을 알아보기 위하여 DSC 분석을 행하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 염산 가수분해물에 대한 DSC 곡선중 주로 분자간 수소결합이 많이 관여되는 것으로 추론되는 200~240°C에서 열변성 peak가 나타난다. 전기영동상에서도 보았듯이 분자량 6,000정도와 그 이상의 분자량이 분포하는 것으로 보아, 염산 가수분해시는 알려진 것처럼 무작위로 펩타이드를 가수분해(Asquith, 1997)하여 전체적으로 평균 분자량이 작으나 분자량이 큰 것도 약간 혼재하는 것으로 사료되며, 이 큰 분자들내의 수소결합에 의해 열변성 peak가 나타난 것으로 사료된다. 대조구에서는 187°C와 231°C 부근의 두 곳에서 흡열 peak가 출현했는데 이 부근의 흡열 peak는 열변성을 나타내며 (Kaplan *et al.*, 1994), 처리구에서는 215~225°C 부근의 한 곳에서 흡열 peak가 나타났으며 대조구의 큰 흡열 peak인 231°C 부근의 peak에 비해 보다 낮은 온도에서 나타나고 있다. 이러한 현상은 가수분해 결과 분자간 수소결합을 할 수 있는 가능성이 감소되기

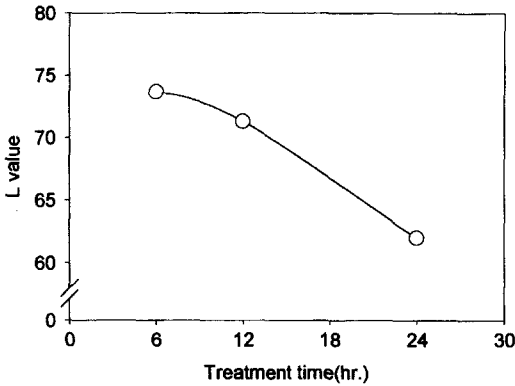


Fig. 5. The effects of HCl treatment time on the whiteness of hydrolyzed sericin powders.

Table 2. The composition of amino acids of sericins (unit : mol%)

Amino Acid	H1	H2	H3	IN
Asp	15.73	16.59	15.95	15.14
Thr	9.09	9.69	8.94	9.91
Ser	31.78	29.08	30.11	33.78
Glu	3.79	4.70	4.06	3.37
Pro	0.69	0.55	0.83	0.57
Gly	16.37	17.22	16.03	16.34
Ala	4.55	4.76	4.81	5.06
Cys	0.50	0.57	0.82	0.24
Val	4.43	5.05	5.84	3.76
Met	1.03	1.11	1.52	0.40
Ile	1.30	1.53	1.94	0.98
Leu	2.26	2.65	3.23	1.73
Tyr	0.00	0.00	0.00	3.97
Phe	1.92	1.55	1.32	1.01
His	2.72	1.42	1.32	1.59
Lys	3.86	3.54	3.27	2.14
Arg	0.00	0.00	0.00	0.64
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

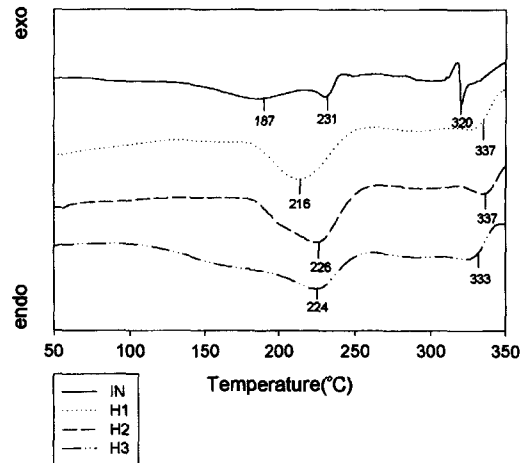


Fig. 6. DSC thermograms of sericin powders hydrolyzed by HCl treatment depending on various times.

때문이라고 사료된다. 열분해 peak는 대조구보다 약간 높은 온도에서 나타났는데 이는 가수분해 후 변화된 아미노산 함량이 다르기 때문에 이들의 열변성 온도도 달라 차이를 보이는 것으로 사료된다.

적 요

불용성 세리신을 가수분해하기 위해 염산 수용액을 이용하여 농도 및 시간별로 처리하여 처리조건이 가수분해에 미치는 영향에 대해 관찰되었다. 가수분해 후 분말화하여 분자량 분포와 분자량 및 백도를 측정하였고, 아미노산 분석을 통하여 세리신의 아미노산 조성의 변화를 시험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

염산 가수분해시 0.5N HCl보다 1N 처리시의 용해도가 5%가량 높았고, 처리 시간이 경과할수록 용해도가 증가하고, 6시간 이상의 처리에서는 그 증가 폭이 크지않았다. 가수분해된 세리신의 전기영동 결과는 인정할만한 특정 밴드는 나타나지 않았으며 분자량 6,000~20,000 사이에 많이 분포하는 것을 알았다. 가수분해된 세리신의 평균 중합도를 측정한 결과 4.2~5.9이었으며, 이를 분자량으로 환산하면 각각 470~670정도가 된다. 백도는 가수분해 시간이 경과할수록 감소하였다. 가수분해된 세리신의 아미노산 분석 결과 Tyr. 및 Arg.이 검출되지 않았다. DSC 분석시 세리신 가수분해물은 220°C 부근의 열변성 피크와 330°C 부근의 열분해 피크에서 흡열 피크가 관찰되었다.

참고문헌

Ailin Lu, Arai Mitsuo and Hirabayashi Kiyoshi

(1996) Production of tussah silk powder by hydrochloric acid hydrolysis, *J. Seric. Sci. Jpn.*, **65**(5), 393-394.

Asquith R. A. (1977) *Chemistry of Natural Protein Fibers*, plenum press, 66-69

배도규 (1994) 실크의 非衣類用 이용, *韓蠶學誌.*, **36**(2), 182-185.

Chen Kaili, Takano Ryo and Hirabayashi Kiyoshi (1991) Production of soluble fibroin powder by hydrolysis with hydrochloric acid and physical properties, *J. Seric. Sci. Jpn.*, **60**(5), 358-362.

Chen kaili, Takano Ryo, Hirabayashi Kiyoshi (1992) Production of silk powder and method of decolorization, *J. Seric. Sci. Jpn.*, **61**(1), 32-35.

Chen Kaili, Umeda Yumeda and Hirabayashi Kiyoshi (1995) Enzymatic hydrolysis of silk fibroin, *J. Seric. Sci. Jpn.*, **65**(2), 131-133.

加藤 弘 (1988) 絹纖維の加工技術とその應用, *纖維研究社*, 34-35.

Kaplan David, Adams W. Wade, Farmer Barry & Viney Christopher (1994) *Polymers*, MaplePress, 211-221.

Kato Norihisa, Sato Seiji, Yamanaka Atsushii, Yamada Hideyuki, Fuwa Naozumi, and Nomura Masakazu (1998) Silk Protein, Sericin, Inhibits Lipid Peroxidation and Tyrosinase Activity, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**(1), 145-147.

김남정, 배도규 (1997) 견 피브로인의 알칼리 가수분해, *韓蠶學誌.*, **39**(2), 197-202.

이성갑, 김동수, 오세욱 (1997) Cocoon Silk Fibroin 분해물의 첨가에 따른 김치의 저장성 향상, *한국농화학회지*, **40**(6), 541-545.

塩澤和男 (1991) 染色任上加工技術, *地人書館*, 149-153

특허 : 아실 아미노산, 공개번호 94-14305.

특허 : 화장료용 복합안료, 이의 제조방법 및 이를 함유하는 색조 화장료, 공개번호 96-16870.