

염화아연에 의한 작잠견피브로인의 용해와 특성

권해용 · 이광길 · 우순옥 · 박영환¹
농업과학기술원 잠사곤충부, ¹서울대학교 농업생명과학대학

Dissolution and Characteristics of *Antheraea pernyi* Silk Fibroin Regenerated from Zinc Chloride Solution

HaeYong Kweon, KwangGill Lee, Soon Ok Woo and Young Hwan Park¹

Department of Sericulture and Entomology, NIAST, RDA, Suwon 441-100, Korea

¹College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Suwon 441-711, Korea

ABSTRACT

Dissolution of *Antheraea pernyi* silk fiber was carried out in a zinc chloride solution with various dissolving conditions. The solubility was significantly dependent on the concentration of zinc chloride, dissolving temperature and time. The proper conditions of dissolution were found as 8 M zinc chloride, 70°C temperature and 30 min dissolving time. Regenerated *A. pernyi* silk fibroin powder was obtained through dialysis. FTIR and XRD showed that regenerated *A. pernyi* silk powder was composed of a β -sheet as well as an α -helix conformation.

Key words : *Antheraea pernyi* silk fibroin, zinc chloride, structural conformation

서 론

작잠 견사는 오래전부터 가잠 견사와 더불어 의류용 소재로 널리 사용되어 온 대표적인 곤충유래 천연섬유이다. 그러나 강신도 등 기계적, 물리적 성질을 비롯하여 염산과 같은 화학약품에 대한 안정성 등 작잠견사는 가잠견사와는 다른 특성을 지니고 있다. 또한 아미노산 조성 측면에서도 작잠 견사는 알콜대사를 촉진시켜 숙취를 해소시키며 알콜로 인한 간의 손상을 예방하는 효과가 있는 것으로 알려진 alanine(文 1987), 혈중 콜레스테롤치를 저하시키는 것으로 알려진 glycine(Sugiyama *et al.* 1985) 및 치매 예방의 효과가 있는 것으로 알려진 tyrosine(岸本 1985) 등 기능성 아미노산을 많이 함유하여 의약품 또는 건강식품 소재로의 응용가능성이 풍부하다. 뿐만 아니라 포유동물의 세포 인식 부위로 알려진 arg-gly-asp tripeptide sequence를 가지고 있으므로(Ruoslahti & Pierschbacher 1986, Minoura *et al.* 1995) 생체조직공학용 scaffold로서의 응용 가능성도 높을 것으로 기대되는 대표적인 천연고분자 중의 하나이다.

그럼에도 불구하고 작잠 견피브로인의 응용에 대한 연구는 그다지 많지 않다. 그 이유는, 작잠 견피브로인은 분자쇄간에 수소결합 등이 강할 뿐만 아니라 작잠 견피브로인을 구성하고 있는 소수성 부분이 물과 접촉할 때 생기는 피브

로인 분자쇄간의 소수성 상호작용이 강하기 때문에 화학적으로 매우 안정된 상태로 존재하므로 일반적으로 가잠 견피브로인의 용해에 사용되는 염이나 각종 유기용제에 용해되지 않는 특성이 있는 것으로 알려져 있다. 현재까지 작잠 견피브로인에 대한 대부분의 연구는 작잠의 후부 견사선에서 추출한 피브로인을 소재로 한 기초적인 연구에 머물고 있다(Tsukada 1986). 최근의 연구에 의하면, 단백질을 용해하는 능력이 있다고 알려진 몇가지 차오토로픽 염(chotropic salt)이 작잠 견사를 용해시키는 것으로 보고되고 있다. 예를 들면, Tsukada *et al.*(1994)는 LiSCN에 작잠견사를 녹여 얻은 재생 작잠 견피브로인 필름과 후부 견사선에서 추출한 작잠피브로인 필름의 conformation, 동점탄성, 분자량 등을 분석한 결과 재생 작잠 견피브로인의 분자량이 후부견사선 피브로인의 분자량보다 작았으나 구조 및 열 특성 등에는 큰 차이가 없다고 하였다. Kweon & Park(1999)은 $\text{Ca}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 에 작잠견사를 녹여 얻은 재생 작잠 견피브로인필름을 메탄올로 처리하여 재생필름의 conformation과 열특성의 변화를 보고하였다. 이와같이 작잠 견사의 용해 및 물리적 성질 등에 대한 기초적인 연구가 최근 몇몇 연구자들에 의하여 활발하게 진행되고 있으며, 이러한 연구는 작잠 견피브로인의 응용가능성을 높이는 데 일조할 것으로 기대된다.

본 연구에서는 작잠 견피브로인을 활용하기 위한 기초 연구의 일환으로 작잠견사를 용해할 수 있을 것으로 기대되는 새로운 형태의 차오트로픽 염인 염화아연에 의한 작잠견사의 용해 거동을 살펴보고 얻어진 재생 작잠 견피브로인 분말의 구조특성과 열적 특성에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 작잠견사의 정련

작잠생사를 효소정련법에 의하여 정련을 행하여 세리신을 제거하였으며 약 13%의 연감율을 보였다. 정련은 sodium silicate 2 g/l, sodium hydrosulfite 0.5 g/l의 전처리용액에 작잠생사를 15분간 상온에서 침지한 후, 효소 alkalase 2.5 L 1 g/l, sodium bicarbonate 5 g/l, 비이온계 계면활성제인 NP 1020 1 g/l의 혼합용액에 55°C, 60분간 처리하였으며 이를 다시 비이온계 계면활성제 NP 1020 2 g/l, sodium hydrosulfite 0.5 g/l 혼합용액에 처리한 후 수세하여 정련제를 제거하고 건조하여 실험재료로 사용하였다.

2. 작잠견사의 용해도

염화아연의 농도(5~8 M), 처리온도(30~110°C), 그리고 처리시간에 따른 작잠견사의 용해도를 측정하였다. 작잠견사를 일정시간 염화아연 용액으로 처리한 후에 남아있는 불용물을 부지포를 사용하여 여과한 후 충분히 수세하여 불용물의 무게를 측정하여 염화아연에 의한 작잠견사의 용해도를 계산하였다.

3. 작잠분말의 제조 및 형태 관찰

염화아연에 녹아있는 작잠 피브로인 용액으로부터 염을 제거하기 위하여 투석을 행하였다. 이때 투석막에는 흰색 가루가 많이 묻어있는 형태로 나타내며 투석막 안은 침전된 형태의 작잠분말이 얻어졌다. 따라서 충분히 투석한 후에 투석막으로부터 작잠분말을 회수, 건조하였다. 회수 건조한 작잠 분말의 형태를 주사전자현미경(Model JSM 5410V, Jeol, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

4. 작잠분말의 특성 분석

4.1. X-선 회절 분석

X-선 회절분석은 Bruker Co.(Germany)의 소각과 광각 X-선 산란분석기(model : GADDS)를 사용하여 40 kV, 30 mA의 조건하에서 Cu K α 단색광으로 측정하였다.

4.2. 적외선 분광분석

Midac Co.(USA)의 적외선 분광분석기(Model M series)를 사용하여 KBr pellet법으로 적외선 분광분석을 행하였다.

결과 및 고찰

1. 작잠견사의 용해

최근 Kweon & Park(2001)과 Tsukada *et al.*(1994)은 Ca₂(NO₃)₂ · 4H₂O, LiSCN 등 차오트로픽 염 chaotropic salt)을 사용하면 작잠견사를 용해시킬 수 있다고 보고하였다. 이들 염 이외에 작잠견사를 용해할 수 있는 염을 탐색하는 것은 작잠 견사의 구조 특성 연구 또는 작잠 견피브로인을 이용한 비섬유용 응용을 위한 기초자료로서 중요한 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 작잠견사를 용해시킬 수 있을 것으로 기대되는 염화아연을 사용하여 염화아연의 농도, 온도, 시간의 변화에 따른 작잠견사의 용해도를 살펴보았다. 그림 1은 염화아연의 농도를 5~8 M로 변화시켜가면서 100°C에서 3시간 동안 처리하였을 때 용해도를 나타낸 것이다. 작잠견사는 5 M의 염화아연으로 3시간동안 100°C에서 처리하였음에도 30 wt.% 정도의 용해도를 보였으며 염화아연의 농도가 7 M로 증가함에 따라 용해도도 직선적으로 증가하여 50 wt.% 정도의 용해도값을 보였다. 특히 염화아연 8 M 농도에서는 95 wt.% 이상의 높은 용해도값을 나타내었다. 염화아연은 수용액상에서 pH 4 부근의 산성을 띄는 것으로 알려져 있다.

그림 2는 염화아연의 농도를 8 M로 고정하고 온도를 변화시켜가면서 작잠견사의 용해도를 측정하여 도시한 것이다. 용해온도가 30°C에서는 10 wt.% 정도의 용해도값을 보였으나 온도가 증가함에 따라 용해도값이 급격하게 증가하여 70°C 이상의 온도에서는 거의 100% 용해되었다.

그림 3은 염화아연의 처리 시간에 따른 용해도의 변화를 살펴보기 위하여 8 M 농도에서 온도를 변화시켜가면서 용

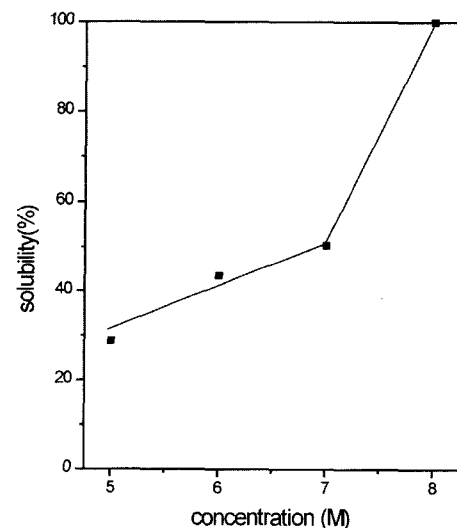


Fig. 1. Effect of concentration of zinc chloride on the solubility of *Antheraea pernyi* silk fiber treated at 100°C for 3 hrs.

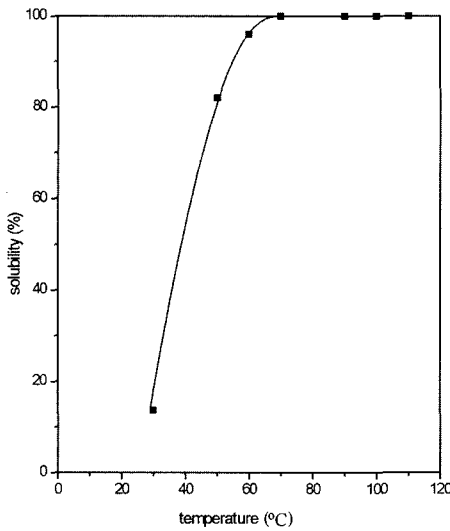


Fig. 2. Effect of temperature on the solubility of *Antheraea pernyi* silk fiber treated with 8 M zinc chloride for 3 hrs.

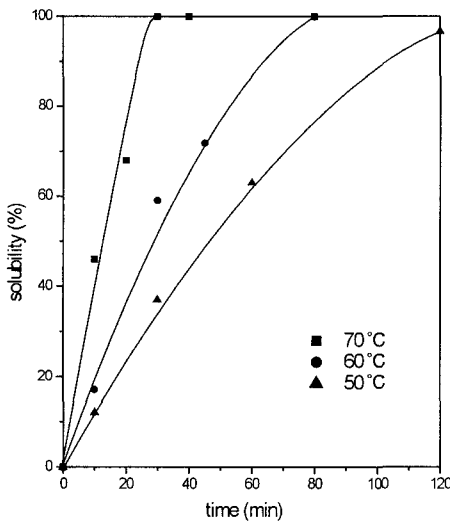


Fig. 3. Effect of time on the solubility of *Antheraea pernyi* silk fiber treated with 8 M zinc chloride.

해도를 측정하여 도시한 것이다. 처리온도가 높을수록 작잠 견사는 빠르게 용해되는 것으로 나타났으며 특히 70°C에서 처리하였을 경우에는 30분, 60°C에서는 80분, 50°C에서는 120분의 시간이 경과하면 작잠견사는 대부분 용해되었다.

염화아연으로 작잠 견사를 용해하면 매우 점도가 높은 용액이 제조된다. 이 고농도의 작잠 견피브로인 염 용액으로부터 순수한 작잠 견피브로인 용액을 얻기 위하여 투석막을 사용하여 작잠 견사를 용해하는 데 사용한 차오트로픽 염인 염화아연을 제거하였다. 투석이 진행되면서 셀룰로오스 투석막의 표면은 점차 하얀 색의 염으로 코팅되었으며

투석막 안에서는 작잠 견피브로인에 응집되어 침전되는 것을 관찰되었다.

1.2. Morphology

투석하는 동안에 얻어진 작잠 견피브로인 분말의 형태를 주사전자현미경으로 관찰한 결과 그림 4와 같이 무정형의 모폴로지를 보여주었다.

2. 작잠 견피브로인 분말의 구조 특성 분석

2.1. 적외선 분광분석

작잠 견피브로인 염화아연 용액을 투석하여 얻은 작잠 견피브로인 분말의 구조 특성을 분석하기 위하여 적외선 분광분석을 행한 후 그 결과를 그림 5에 나타내었다. 작잠 견사(그림 5(a))는 β -sheet 구조의 특성 피크인 700, 1220, 1528, 1627 cm^{-1} 에서 강한 흡수대를 보였으며 또한 620 cm^{-1} 에서 α -helix의 특성 흡수대를 나타내어 β -sheet 구조와 α -helix 구조가 함께 있는 구조를 잘 반영하고 있다

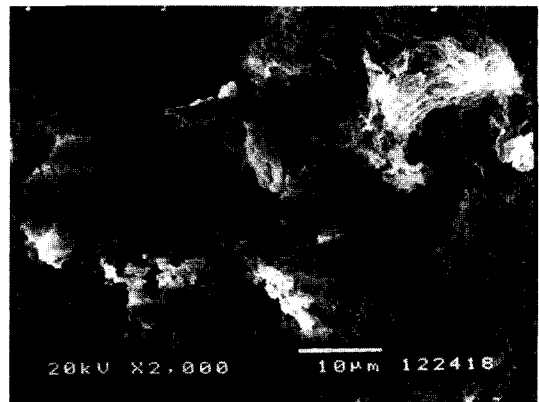


Fig. 4. Scanning electron micrograph of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin powder.

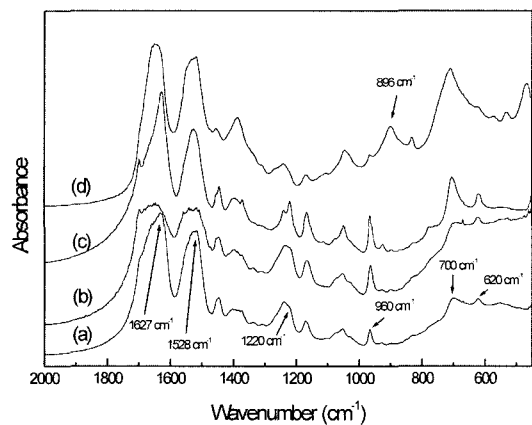


Fig. 5. FT-IR spectra of *Antheraea pernyi* silk fiber (a), insoluble fraction (b), regenerated silk fibroin powder precipitated (c), and lyophilized(d).

(Kweon & Park 2001, Tsukada *et al.* 1994). 염화아연에 용해되지 않은 불용성 작잠견피브로인 분말(그림 5(b))의 적외선 분광 특성도 작잠 견사와 유사한 형태의 적외선 분광 곡선을 보여주고 있어 구조적으로 안정한 결정성 부위가 차오토로픽 염에 대한 용해저항성이 우수하다는 것을 보여주고 있다. 그러나 염화아연을 사용하여 제조한 재생작잠 견피브로인 분말은 적외선 분광분석 결과 서로 다른 적외선 분광곡선을 나타내는 것을 얻을 수 있었다. 투석중 침전된 작잠 견피브로인 분말(그림 5(c))은 작잠견사와 비슷한 위치에서 β -sheet 구조와 α -helix 구조의 특성 피크를 보여주고 있으나 작잠 견피브로인 동결건조 분말(그림 5(d))은 작잠 견피브로인의 β -sheet 구조를 나타내는 특성 피크와 함께 896 cm^{-1} 에서 새로운 적외선 흡수대가 나타났다. 이 흡수대는 α -helix 구조의 특성을 반영하는 것으로 알려져 있으며 알콜 등으로 결정화시킬 경우에는 이 적외선 흡수대가 사라지는 것으로 보고되고 있다(Kweon & Park 1999, 2001, Woo *et al.* 2000).

2.2. X-선 회절 분석

작잠 견피브로인 분말을 구성하는 견피브로인 분자체의 규칙성의 살펴보기 위하여 X-선 회절분석법을 행하여 그 결과를 그림 6에 나타내었다. 염화아연으로 처리하여 제조한 작잠 견피브로인 분말은 $2\theta = 8.8, 17.3, 19.5^\circ$ 부근에서 면간극 10.04, 5.12, 4.54Å에 해당하는 회절피크가 관찰되었다. $2\theta = 8.8^\circ$ 의 회절 피크는 α -helix 구조를 반영하는 것이고, $2\theta = 17.3, 19.5^\circ$ 의 회절피크는 β -sheet 구조를 반영한다(Kweon & Park 2001, Tsukada *et al.* 1994). 따라서 염화아연으로 용해하여 제조한 작잠견피브로인 분말은 α -helix 구조와 β -sheet 구조를 동시에 가지고 있는 것으로 판단되며 이는 적외선 분광분석 결과와도 잘 일치한다. 게다가 작잠분말(그림 6(a))은 $2\theta = 11.0, 16.4, 21.9, 24.6, 28.0, 30.3, 30.8, 32.8, 33.4^\circ$ 의 위치에서 매우 날카로운

회절 피크를 보여주고 있다. 이들 회절피크는 투석막에 침착된 결정성이 높은 흰색 분말이 섞여 있기 때문인 것으로 판단되었다. 이 흰색 분말은 작잠 견사를 용해하는 데 사용된 염화아연일 개연성이 높으므로 염화아연의 X-선 회절곡선을 살펴보았다(그림 6(b)). 그 결과 작잠 분말에서 관찰되는 날카로운 회절 피크는 이를 용해하기 위하여 사용한 차오토로픽 염인 염화아연의 회절 피크임을 확인하였다.

3. 고찰

실크 피브로인을 용해하기 위하여 사용되는 차오토로픽 염은 실크 피브로인의 고차구조를 파괴시켜 변성이 일어나게 만듦으로서 피브로인의 소수성 결합력을 감소시키는 작용을 하기 때문에 단백질의 용해제로 사용될 수 있다. 이러한 효과는 염이 해리되면서 생긴 이온이 피브로인과 물의 접촉시에 생기는 물의 엔트로피 감소를 억제하기 때문이라고 한다. 반면에 단백질의 구조를 안정화시키는 염을 안티 차오토로픽 염(antichaotropic salt) 또는 코스모트로픽 염(kosmotropic salt)라고 한다(Hamaguchi & Geiduschek 1962).

본 실험에서 사용한 염화아연은 현재까지 작잠 견사를 용해하는 것으로 보고된 LiSCN이나 $\text{Ca}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 과 마찬가지로 피브로인을 가용화하는 능력이 있으므로 차오토로픽 염의 일종이다. 차오토로픽 염에 의한 가용화 기구를 본 실험에서 관찰된 결과를 토대로 모식도를 그려 그림 7에 나타내었다. 그림 7에서 보는 바와 같이 처음 작잠 견사는 가지런하게 분자체간에 소수성 결합과 수소결합에 의하여 분자배열을 하고 있는 상태로 있다. 이것을 진한 염화아연 수용액에 침지하면 먼저 바깥쪽 분자체부터 이온화되고 수화된 염이 단백질 사슬에 침입하여 반대 전하를 가지는 아미노산 잔기와 결합함으로써 서서히 피브로인 분자체간에 결합력이 약화되어 팽윤되다가 8 M의 염화아연 수용액에서 70°C 에서 20분가량 처리하면 피브로인 분자체간에 결합력이 완전히 깨어져 투명하고 점도가 높은 작잠 피브로인 염화아연 용액을 얻을 수 있다. 용해에 사용한 차오토로픽 염을 투석법에 의하여 쉽게 제거할 수 있다. LiSCN이나 $\text{Ca}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 을 사용하여 작잠견사를 용해한 경우에는 이들 차오토로픽 염을 제거하여도 어느 정도 안정된 형태의 작잠 견피브로인 수용액을 얻을 수 있는 것으로 보고되어 있다. 그러나 본 실험에서 사용한 염화아연의 경우에는 염화아연이 투석막을 통하여 제거되는 동안에 일부 염화아연이 투석막에 침착됨과 동시에 작잠 견피브로인의 용해도가 급격하게 감소하여 그림 7에서 보는 바와 같이 피브로인 분자체간에 소수성 상호작용이 발생하여 작잠 피브로인 분자체간에 응집현상이 나타나고 결국에는 피브로인이 침전되었다. 이 과정에서 작잠 견피브로인의 2차구조는 적외선 분광곡선(그림 5)와 X-선 회절 분석 결과(그림 6)에서

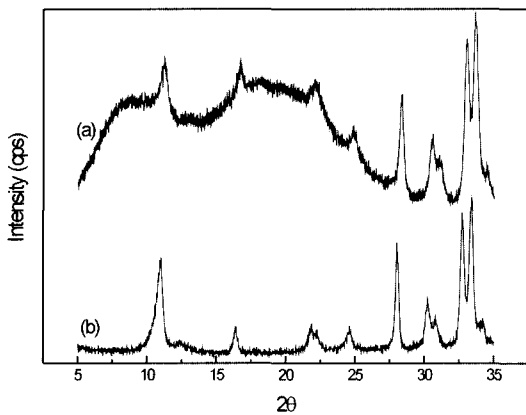


Fig. 6. X-ray diffractograms of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin powder (a) and zinc chloride (b).

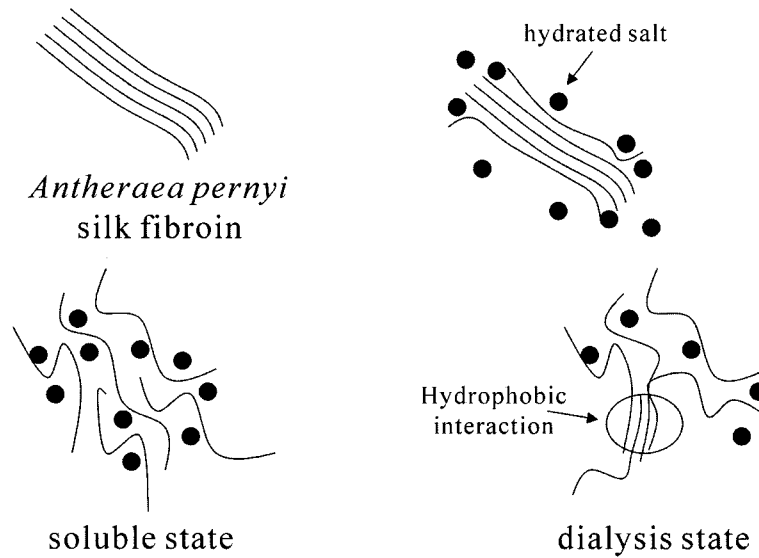


Fig. 7. Molecular state scheme of *Antheraea pernyi* silk fibroin during treatment of zinc chloride.

보는 바와 같이 β -sheet 구조와 α -helix 구조로 전이된다. 차오토로픽 염을 제거하기 위하여 행하는 투석과정에서 사용한 염의 종류에 따라 왜 작잠 피브로인의 안정화 정도가 다른가에 대한 연구는 단백질과학의 측면에서도 매우 중요한 과제라고 생각되나 현재까지 명확하게 구명되지 않았다. 염화이연을 사용하여 작잠 견사를 용해한 경우에는 염화이연을 제거하기 위하여 투석하는 과정에서 피브로인과 상호작용을 하던 염화이연이 지나치게 빠르게 제거됨으로 인한 전하간의 불균형에 기인한 피브로인 분자사슬의 2차구조의 변화에 그 원인이 있는 것으로 생각되나 차오토로픽 염을 사용한 경우 피브로인 분자사슬과 염간의 상호작용에 대한 보다 엄밀한 연구가 앞으로 진행되어야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과는 염화이연을 사용하여 재생 작잠 견피브로인을 얻기 위해서는 투석법을 사용하는 것이 적합하지 못하다는 것을 알 수 있었다. 따라서 염화이연을 사용하여 작잠 단백질을 용해시킨 경우에는 단백질-염 용액으로부터 순수하게 작잠 견단백질을 분리하기 위한 연구가 필요하며 현재 이에 대한 연구를 진행중에 있다.

적 요

염화이연에 의한 작잠 견사의 용해 조건을 살펴본 후 투석법에 의하여 얻은 작잠 견피브로인 분말의 형태와 적외선 분광 특성 및 X선 회절 특성을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 작잠 견사는 고농도의 염화이연 수용액에 용해되었으나 용해 조건을 조절하여 완전하게 작잠 견사를 용해할 수 있

었다.

2. 재생 작잠 분말의 구조 특성을 살펴보기 위하여 적외선 분광분석과 X선 회절분석을 행한 결과 작잠분말은 β -sheet 구조와 α -helix 구조로 이루어져 있었다.

3. 염화이연을 사용하여 제조한 작잠 견피브로인 용액으로부터 순수한 작잠 견피브로인을 얻기 위한 새로운 방법이 개발되어야 함을 알 수 있었다.

인용문헌

文豊 (1987) 마우스의急性アルコール性肝障害に對するアラニンとオルニチン投與による保護作用の機序. 慈惠醫大誌, **102**: 1231-1241.

岸本康 (1985) 生命を作る物質 講談社, 東京, pp220-226.

Hamaguchi, K. and E. P. Geiduschek (1962) *J. Am. Chem. Soc.*, **84** : 1329.

Kweon, H. Y. and Y. H. Park (2001) Dissolution and Characterization of Regenerated *Antheraea pernyi* Silk Fibroin. *J. Appl. Polym. Sci.*, **82**: 750-758.

Kweon, H. Y. and Y. H. Park (1999) Structural and Conformational Changes of Regenerated *Antheraea pernyi* Silk Fibroin Films Treated with Methanol Solution. *J. Appl. Polym. Sci.*, **73**: 2887-2894.

Minoura N., S. I. Aiba, M. Higuchi, Y. Gotoh, M. Tsukada and Y. Imai (1995) Attachment and Growth of Fibroblast Cells on Silk Fibroin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **208**(2): 511-516.

Ruoslahti, E. and M. D. Pierschbacher (1986) Arg-Gly-Asp: a Versatile Cell Recognition Signal. *Cell* **44**: 517-518.

Sugiyama, K., Y. Kushima, K. Muramasu (1985) Effect of sulfur-containing amino acid and glycine on plasma cholesterol level

- in rats fed on a high cholesterol diet. *Agric. Biol. Chem.*, **49**: 3455-3461.
- Tsukada, M., G. Freddi, Y. Gotoh, and N. Kasai (1994) Physical and Chemical Properties of Tussah Silk Fibroin Films. *J. Polym. Sci., Polym. Phys.* **32**: 1407-1412.
- Tsukada, M. (1986) Structural Changes Induced in Tussah Silk (*Antheraea pernyi*) Fibroin Films by Immersion in Methanol. *J. Polym. Sci., Polym. Phys.* **24**: 1227-1232.
- Woo, S. O., H. Y. Kweon, I. C. Um, and Y. H. Park (2000) Structural Characteristics of Regenerated *Antheraea pernyi* Silk Fibroin Film treated with Ethanol. *Korean J. Seric. Sci.*, **42**(2): 114-119.