韓蠶學誌 45(2), 121~125 (2003)
Korean J. Seric. Sci.
<論 文>

질산아연에 의한 작잠견피브로인의 용해와 특성

권해용* · 이광길 · 여주홍 · 박영환[1)]
농업과학기술원 잠사곤충부, [1)]서울대학교 농업생명과학대학

Dissolution of *Antheraea pernyi* Silk Fiber and Structure of Regenerated Fibroin from Zinc Nitrate Solution

HaeYong Kweon, Kwang-Gill Lee, Joo-Hong Yeo, and Young Hwan Park[1)]
Department of Sericulture and Entomology, NIAST, RDA, Suwon, 441-100, Korea
[1)]College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

ABSTRACT

Dissolution of *Antheraea pernyi* silk fiber was carried out in a zinc nitrate 6 hydrate ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) solution with various dissolving conditions. The solubility was significantly dependent on the concentration of zinc nitrate, dissolving temperature and time. Regenerated *A. pernyi* silk fibroin powder was obtained through dialysis process to remove chaotropic salt. FTIR and X-ray diffractometer showed that the conformation of regenerated *A. pernyi* silk powder was β-sheet structure.

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

서 론

오래전부터 가잠 견사와 더불어 의류용 소재로 널리 사용되어 온 대표적인 곤충유래 천연섬유인 작잠견사는 강신도 등 기계적, 물리적 성질을 비롯하여 염산과 같은 화학약품에 대한 안정성 등에서 가잠견사와는 다른 특성을 나타내고 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 피브로인 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 몇 가지 차오트로픽 염(chaotropic 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 and Park(2001)은 질산칼슘($Ca_2(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$)에 작잠견사를 녹여 제조한 재생 작잠 견피브로인

*Corresponding author. E-mail: hykweon@rda.go.kr

필름의 구조특성이 견사선에서 추출한 작잠 견피브로인과 유사함을 보고하였으며, 메탄올과 열 등 외부응력의 부가에 의한 재생필름의 conformation과 열특성의 변화를 보고하였다(Kweon *et al.*, 2000, Kweon *et al.*, 2001). 또한 염화아연을 사용한 작잠견사의 용해조건을 구명하고 제조한 재생작잠견 피브로인 분말은 β-sheet 구조임을 밝혔다(Kweon *et al.*, 2002). 이와같이 작잠견사의 용해 및 물리적 성질 등에 대한 기초적인 연구가 최근 몇몇 연구자들에 의하여 활발하게 진행되고 있으며, 향후 작잠 견피브로인의 응용가능성을 높이는 데 일조할 것으로 기대된다.

본 연구에서는 작잠 견피브로인을 활용하기 위한 기초연구의 일환으로 작잠견사의 차오트로픽 염일 것으로 기대되는 질산아연($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)에 의한 작잠견사의 용해 거동을 살펴보고 얻어진 재생 작잠 견피브로인 분말의 구조특성에 대하여 살펴보고자 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/*l*의 전처리용액에 작잠생사를 15분간 상온에서 침지한 후, 효소 alkalase 2.5L 1 g/*l*, sodium bicarbonate 5 g/*l*, 비이온계 계면활성제인 NP 1020 1 g/*l*의 혼합용액에 55℃, 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

$Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$의 농도, 처리온도(30~110°C), 그리고 처리시간에 따른 작잠견사의 용해도를 측정하였다. 작잠견사를 일정시간 질산아연 용액으로 처리한 후에 남아있는 불용물을 부직포를 사용하여 여과한 후 충분히 수세하여 불용물의 무게를 측정하여 질산아연에 의한 작잠견사의 용해도를 계산하였다.

3. 재생 작잠견피브로인의 적외선 분광분석

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

4. 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 Kα 단색광으로 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 작잠견사의 용해

최근 몇몇 연구자들에 의하면 LiSCN, $Ca_2(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $ZnCl_2$ 등 차오트로픽 염(chaotropic salt)을 사용하면 작잠견사를 용해시킬 수 있다고 보고하였다(Tsukada *et al.*, 1994, Kweon & Park 2001, Kweon *et al.*, 2002). 이들 염 이외에 작잠견사를 용해할 수 있는 염을 탐색하는 것은 작잠견사의 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 질산아연($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)을 사용하여 질산아연의 농도, 온도, 시간의 변화에 따른 작잠견사의 용해도를 살펴보았다. 표 1은 용해온도(90°C)와 시간(3 hrs)을 고정한 후 질산아연의 농도에 따른 작잠견사의 용해도를 나타낸 것이다. 질산아연 6수화물에 물을 공용매로 사용한 경우에는 10% 정도의 낮은 용해도를 나타내었으나 질산아연 6수화물 용융액에는 30% 정도의 용해도를 나타내어 질산아연으로 작잠견사를 용해하기 위해서는 질산아연 6수화물 용융액이 효과적인 것으로 판단되었다.

그림 1은 $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 용융액을 사용하여 용융액의 온도에 따른 작잠견사의 용해도를 3시간 동안 반응시킨 후에 측정하여 도시한 것이다. 용해시간이 3시간이 경과하여도 질산아연 용융액의 온도가 낮을 경우에는(80°C) 10% 정도의 용해도를 나타내었으나 질산아연 용융액의 온도가 증가함에 따라 용해도는 직선적으로 증가하여 110°C 이상의 온도에서는 거의 100% 용해되었다. 그러나 100°C이상의 온도에서는 작잠견사의 색이 용융액에 의하여 누렇게 변색이 되어 질산아연에 의한 작잠견사의 용해는 강한 산화반응이 동반되는 것으로 생각된다.

그림 2는 $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 용융액의 온도를 100°C와 110°C로 고정한 후 용해시간에 따른 작잠견사의 용해도를 측정하여 도시한 것이다. 100°C에서 처리하였을 때에는 50분 이후에는 용해도의 변화가 거의 없었으며 용해시간이 3시간이 경과하여도 55% 정도만이 용해되었다. 그러나 110°C에서는 10분만에 80% 정도의 작잠견사가 용해되었고 그

Table 1. Solubility of *Antheraea pernyi* Silk Fiber Dissolved in $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ solution at 90°C for 3 hrs

weight of $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (g)	Volume of Water (ml)	Solubility (%)
1190	423.7	12.6
1487.5	279.7	9.3
1785	153.6	9.9
2065	0	26.9

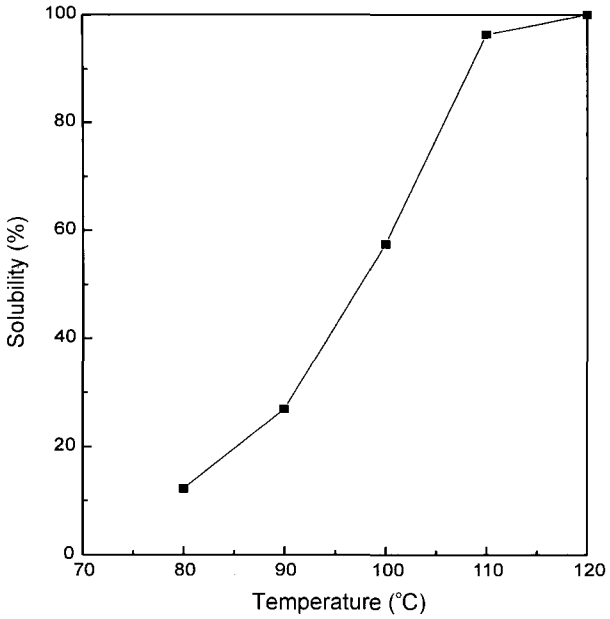

Fig. 1. Effect of temperature on the solubility of *Antheraea pernyi* silk fiber treated with $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ for 3 hrs.

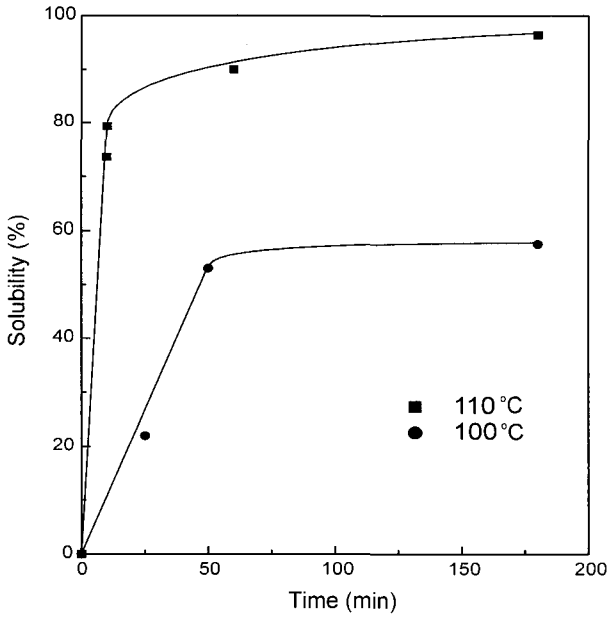

Fig. 2. Effect of time on the solubility of *Antheraea pernyi* silk fiber treated with $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$.

이후에도 다소 작잠견사가 용해되는 것으로 나타났다.

일반적으로 단백질을 용해하는 용도로 사용한 차오트로픽 염은 투석에 의하여 쉽게 제거할 수 있는 것으로 알려져 있으므로 작잠견피브로인 질산아연 용액을 증류수로 투석하였다. 투석시간이 경과함에 따라 차오트로픽염의 농도가 낮아지고 이에 따른 용해도의 감소로 인하여 작잠 견피브로인이 응집되어 침전되는 현상을 보였다.

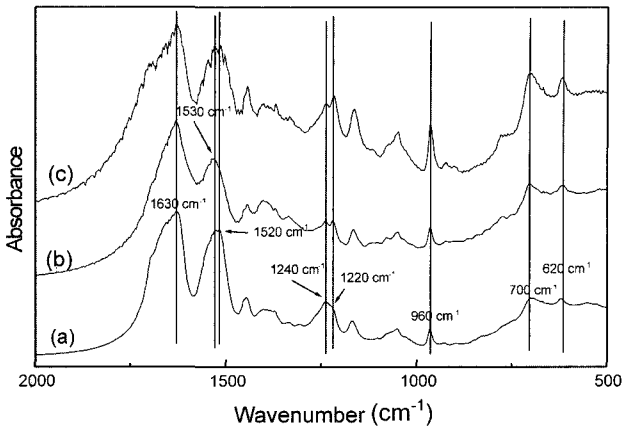

Fig. 3. FT-IR spectra of *Antheraea pernyi* silk fiber (a), regenerated silk fibroin powder (b), and insoluble fraction (c).

2. 작잠 견피브로인 분말의 구조 특성 분석

2.1. 적외선 분광분석

작잠 견피브로인 질산아연 용액을 투석하여 제조한 작잠 견피브로인 분말의 구조 특성을 분석하기 위하여 적외선 분광분석을 행한 후 그 결과를 그림 3에 나타내었다. 작잠 견사(그림 3(a))는 β-sheet 구조의 특성 피크인 1630, 1520, 960, 700 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(Kweon *et al.*, 2002, Kweon & Park 2001, Tsukada *et al.*, 1994). 질산아연 용해 후 얻어진 작잠 견피브로인 분말(그림 3(b))의 적외선 분광특성도 작잠견사와 거의 유사한 분광곡선을 나타내고 있으므로 투석이 진행되는 동안 침전된 작잠 견피브로인 분말의 분자쇄들이 β-sheet와 α-helix 구조로 이루어져 있음을 알 수 있다. 또한 1530과 1240 cm^{-1}에서 강한 적외선 분광특성을 나타낸 것은(그림 3(b)) 재생 작잠 견피브로인 분말의 구조가 작잠견사에 비하여 부분적으로 α-helix 및 random coil 구조가 강함을 반영하고 있다. 질산아연에 용해되지 않은 불용성 작잠견피브로인 분말(그림 3(c))의 적외선 분광 특성도 작잠 견사와 유사한 형태의 적외선 분광 곡선을 보여주고 있어 구조적으로 안정한 결정성 부위가 차오트로픽 염에 대한 용해저항성이 우수하다는 것을 보여주고 있다. 이러한 적외선 분광특성은 다른 차오트로픽염인 염화아연 처리 작잠 견피브로인 분말과 유사하였다(Kweon *et al.*, 2002).

2.2. X-선 회절 분석

작잠 견피브로인 분말을 구성하는 견피브로인 분자쇄의 규칙성의 살펴보기 위하여 X-선 회절분석법을 행하여 그 결과를 그림 4에 나타내었다. 질산아연으로 처리하여 제조한 작잠 견피브로인 분말은 $2\theta = 8.8$, 17.3, 19.5° 부근

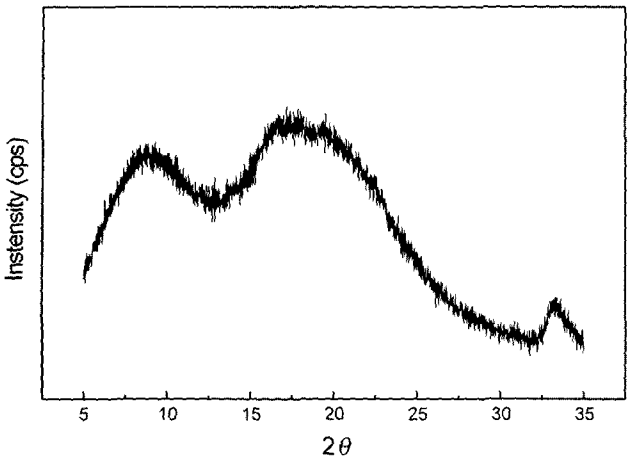

Fig. 4. X-ray diffraction pattern of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin powder from zinc nitrate solution.

에서 면간극 10.04, 5.12, 4.54Å에 해당하는 회절피크가 관찰되었다. $2\theta = 8.8°$의 회절 피크는 α-helix 구조를 반영하는 것이고, $2\theta = 17.3$, 19.5°의 회절피크는 β-sheet 구조를 반영한다(Kweon *et al.*, 2002, Tsukada *et al.*, 1994). 따라서 질산아연으로 용해하여 제조한 작잠견피브로인 분말은 α-helix 구조와 β-sheet 구조를 동시에 가지고 있는 것으로 판단되며 이는 적외선 분광분석 결과와도 잘 일치한다.

3. 고찰

본 실험에서 사용한 $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$는 현재까지 작잠견사를 용해시킬 수 있는 것으로 알려진 LiSCN이나 $Ca_2(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $ZnCl_2$와 마찬가지로 작잠 견단백질을 가용화할 수 있는 차오트로픽염인 것으로 사료된다. 그러나 질산아연의 경우 염화아연으로 처리한 경우에 비하여 차오트로픽 염의 농도, 온도, 시간 등 전반적으로 모든 용해조건에서 작잠견사에 대한 용해도가 낮은 것으로 나타났다(Kweon *et al.*, 2002). 이러한 용해특성의 차이를 명쾌하게 설명할 수는 없지만 2가지 가능성을 생각할 수 있다.

일반적으로 실크 피브로인을 용해하기 위하여 사용되는 차오트로픽 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. 따라서 작잠견사에 대한 질산아연과 염화아연간의 용해도의 차이는 염소이온의 mobility (7.91 $cm^2s^{-1}V^{-1}$)와 질산이온의 mobility(7.41 $cm^2s^{-1}V^{-1}$)의 차이에 의한 단백질의 팽윤력에 의하여 영향을 받은 것으로 생각된다(Chang 1990).

또한 Mafecka *et al.*(2003)에 의하면 용융온도가 36.4°C인 $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$는 용융되는 온도 부근에서 수분이 일부 제거되어 4수화물($Zn(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$)이 된 후 90°C 이상의 온도에서 급격하게 가수분해되면서 질산을 방출한다고 한다.

$$3Zn(NO_3)_2 \cdot 4H_2O \rightarrow Zn(NO_3)_2 \cdot 2Zn(OH)_2 + 4HNO_3$$

Kweon *et al.*(1998)에 의하면 비록 작잠견사가 무기산에 대한 가수분해안정성이 가잠견사에 비하여 높기는 하지만 무기산의 농도가 증가함에 따라 빠르게 가수분해된다고 한다. 따라서 질산아연에 의한 작잠견사의 용해도는 질산아연의 가수분해 생성물인 질산의 양과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되며 100°C 이상의 용액온도에서 작잠견사의 황변현상이나 질산아연 6수화물의 온도에 따른 작잠견사의 용해도곡선(그림 1와 2)은 이를 뒷받침하고 있다.

차오트로픽 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. 질산아연을 사용하여 작잠 견사를 용해한 경우에는 차오트로픽염을 제거하기 위하여 투석하는 과정에서 피브로인과 상호작용을 하던 질산아연이 지나치게 빠르게 제거됨으로 인한 전하간의 불균형에 기인한 피브로인 분자사슬의 2차구조의 변화에 그 원인이 있는 것으로 생각되나 차오트로픽 염을 사용한 경우 피브로인 분자사슬과 염간의 상호작용을 밝히기 위한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

적 요

질산아연 6수화물($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)에 의한 작잠 견사의 용해 조건을 살펴본 후 투석법에 의하여 얻은 작잠 견피브로인 분말의 적외선 분광 특성 및 X-선 회절 특성을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 작잠견사를 완전하게 용해할 수 있는 조건은 질산아연 6 수화물의 용융액을 사용하여 120°C 이상의 온도에서 3시간 이상 용해하는 것이다.

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

인용문헌

文豊(1987) マウスの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, pp. 220~226.

Chang, R (1990) Physical Chemistry 2nd Ed. Macmillan Publishing

Co. Inc. New York, P. 205.

Kweon, H. Y., K. G. Lee, S. O. Woo, and Y. H. Park (2002) Dissolution and Characteristics of *Antheraea pernyi* Silk Fibroin Regenerated form Zinc Chloride Solution. *Korean J. Seric. Sci.* 44: 87-92.

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., S. O. Woo, and Y. H. Park (2001) Effect of Heat Treatment on the Structural and Conformational Changes of Regenerated *Antheraea pernyi* Silk Fibroin Films. *J. Appl. Polym. Sci.*, 81: 2271-2276.

Kweon, H. Y., I. C. Um, and Y. H. Park (2000) Thermal behavior of regenerared *Antheraea pernyi* silk fibroin film treated with aqueous methanol. *Polymer* 41: 7361-7367.

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.

Kweon, H. Y., K. G. Lee, Y. W. Lee, J. H. Yeo, and I. C. Um (1998) Hydrolysis Behaviour of *Antheraea pernyi* Silk Fiber Treated with HCl. *Korean J. Seric. Sci.* 40: 163-168.

Małecka, B., R. Gajerski, A. Małecki, M. Wierzbicka, and P. Olszewski (2003) Mass spectral studies on the mechanism of thermal decomposition of $Zn(NO_3)_2 \cdot nH_2O$. *Thermochimica Acta* 404: 125-132.

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.