

## 생체복합체의 재생패각 합성전략: 참굴 패각의 변형에 따른 키틴 합성 및 패각재생

이승우\*<sup>†</sup> · 박승빈\* · 용동희\*\* · 최청송\*\*

\*KAIST 생명화학공학과  
305-701 유성구 구성동 373-1  
\*\*서강대학교 공과대학 화공생명공학과  
121-742 서울시 마포구 신수동 1  
(2007년 12월 27일 접수, 2008년 3월 10일 채택)

### Biom mineralization Strategy of Biocomposites on Regenerated Shell: Chitin Synthesis and Regenerated Shell Formtation by Deformed Oyster Shell

Seungwoo Lee\*<sup>†</sup>, Seungbin Park\*, Donghee Yeong\*\* and Cheongsong Choi\*\*

\*Department of Chemical & Biomolecular Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 335 Gwahangno, Yuseong-Gu, Daejeon 305-701, Korea

\*\*Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Sogang University, 1 Shinsu-Dong, Mapo-Gu, Seoul 121-742, Korea  
(Received 27 December 2007; accepted 10 March 2008)

#### 요 약

생체복합재료인 참굴 (*Crassostrea gigas*) 패각은 생성되는 형태에 따라 정상패각과 재생패각으로 구분되었다. 산과 알칼리를 이용한 탈 석회화과정 및 단백질제거반응을 통해 재생패각 내에서 얻어진 유기막이 키틴 특성을 가지고 있음을 FT-IR (Fourier transform infrared spectrometer)과 XRD (X-ray Diffractometer)를 통해 확인하였다. 불용성단백질의 함량은 정상패각이 재생패각과 비교하여 두배 이상 이었던 반면 수용성단백질 2차구조는 재생패각의 경우 random과 같은 불규칙구조가 많은 부분을 차지하고 있음을 확인할 수 있었다. 수용성단백질의 아미노산 조성과 단백질 2차구조 분석을 통해 재생패각의 탄산칼슘 합성전략을 분자수준에서 논의하였고 재생패각 형성과 관련된 생광물화 전략이 패각의 재료학적 특성에 미치는 결과로써 해석되었다.

**Abstract** – The normal shell and the regenerated oyster shell, *Crassostrea gigas*, are separated according to the characteristics of inner shell morphology. To study characteristics of chitin obtained from the regenerated shell, chitin prepared by acid and alkali process is analyzed by FT-IR (Fourier transform infrared spectrometer) and XRD (X-ray Diffractometer). The content of insoluble protein in the normal shell was more than doubled as compared with that in the regenerated shell. A comparison of secondary structure of the normal shell and the regenerated shell revealed that the content of random of the regenerated shell was above 47%, indicating an amount in the structural unordered state. Through amino acid composition analysis and secondary protein structure of soluble protein isolated from the normal shell and the regenerated shell, it was found that there are differences in biom mineralization strategy of the regenerated shell as compared to the normal shell. The relatively low hardness of the regenerated shell is caused by the change of amino acid composition and ordered secondary protein structure as compared to hardness of the normal shell.

Key words: *Crassostrea gigas*, Regenerated Shell,  $\beta$ -chitin, Biocomposites, Amino Acid Composition, Secondary Protein Structure

#### 1. 서 론

식물이나 동물의 뼈대를 구성하는 기본적인 성분은 셀룰로오스, 키틴과 콜라겐이다. 특히 키틴은  $\beta(1-4)$  N-아세틸- $\beta$ -D-글루코사민 잔기가 5,000개 이상 탄소결합한 분자량 100만 이상의 선형 다당류

로서 많은 무척추동물의 지지체를 이루는 중요한 성분으로 알려져 있다[1]. 갑각류의 외피와 같은 광물화된 조직 내에서는  $\alpha$  형태의 키틴[2]이 주로 관찰되는 반면에 연체동물이나 완족류에서는  $\beta$ 형태의 키틴이 많이 관찰되고 있다[3].

현재 키틴의 주요 출처로는 갑각류의 껍질인데, 건조 중량을 기준으로 15~20% 키틴, 24~25% 단백질 그리고 40~50%의 탄산칼슘으로 구성되어 있다. 자연계에 존재하는 키틴은 셀룰로오스와 같이 결정성을 나타내는 구조를 갖고 있어 화학약품에 매우 안정하며 물

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jacklee@kaist.ac.kr

<sup>‡</sup>이 논문은 서강대학교 최청송 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

에서도 거의 팽윤 되지 않기 때문에 가공이 어려워 키틴 보다는 그 유도체로 바꾸어 여러 용도로 사용되고 있다[4-6].

현재 인공피부나 화상 치료제로서 사용되고 있는 합성고분자재료는 물리적, 기계적 내구성이 우수하며 생체에 대해서 불활성이기는 하지만 생체와 친화성이 없다는 점에서 간접적인 치료수단이 될 수 있을 뿐 진정한 의미에서의 인공피부로 분류될 수 없다[7]. 또한 생체에서 유래되는 돈피 등도 생체와 직접적인 친화력이 없다는 점에서 합성고분자재료와 다를 바가 없다. 생체에 흡수되어 진피의 상처를 치유할 수 있는 기능을 가지는 고분자 재료는 아직까지 발견된 바 없으나 최근에 이르러 키틴과 키토산을 인공피부와 화상치료제로서 이용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다[8, 9].

일반적으로 이매패류와 같은 패각에 존재하는 키틴은 단백질과 결합하여 뼈대구조를 형성한다고 알려져 왔다[10]. 진복이나 진주 조개와 같은 부유생물의 패각에서 합성되는 유기매트릭스 중 하나는 silk fibroin 형태의 키틴이므로 패각형성 과정에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있는[11] 반면에 참굴, 홍합과 같은 부착 패각류내에서 합성되는 키틴의 경우는 그 생성경로 및 특성에 관한 연구가 미비하지만 일정 크기 이상의 막의 형태로 존재한다는 것이 보고된 바 있다[12].

키틴에 관한 연구는 산업적 상품으로의 광범위한 응용 가능성으로 인해 앞으로는 더욱 주목될 연구분야가 될 것이다. 특히 본 연구를 통해 우리나라에서 널리 양식되고 있는 참굴을 소재로 하여 이들 패각의 형상과 특징을 이용하여 정상패각과 재생패각으로 구분하였으며 연체동물의 패각형성 과정시 키틴과 단백질의 상호작용 및 특성을 규명하고자 하였다. 본 연구를 통해 얻어진 정보는 이매패류의 생광물화과정(Biomineralization)을 보다 정확히 이해할 수 있는 핵심정보로 활용될 수 있을 뿐만 아니라 환경친화적이며 식품, 제약, 신소재 등 산업 전반에 걸쳐 이용될 수 있는 생체고분자 응용 연구에 적용될 수 있을 것으로 기대한다.

## 2. 실험

### 2-1. 패각의 전처리 및 키틴추출

패각의 전처리 및 재생패각의 분리는 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

남해와 통영으로부터 양식된 참굴 패각을 5% 수산화나트륨 용액에 5시간 동안 담근 후 증류수로 세척하여 굴껍질 표면의 흙 및 기타 유기물질을 제거하였다. 잔여 알칼리 제거와 표면 처리를 증류수를 이용 여러 번 세척하고, 초음파 세척기(Branson Sonifier)를 사용하여 약 1분간 세척한 후 완전 건조하였다. 건조된 패각을 Fig. 1과 같이 형상학적 특성을 기준으로 정상패각과 재생패각으로 구분, 분리하였다. 재생패각은 원층(original layer)위에 또 다른 층이 합성됨으로써 층과 층 사이에 일정한 공간을 가진 패각으로 정의하였다(Fig. 1b).

재생패각으로부터 키틴의 추출은 다음과 같다. 재생패각으로부터 분리된 유기막(Fig. 2) 으로부터 키틴을 추출하기 위하여 다음과 같은 탈석회화 과정을 수행하였다. 1M 아세트산을 이용하여 상온 하에서 교반과 함께 진행하였으며 얻어진 유기막은 증류수를 이용하여 3회 세척 후 건조하였다. 탈 석회화과정을 거친 유기막으로부터 불용성 단백질을 제거하기 위하여 5% 수산화나트륨을 이용하여 60°C에서 1시간 동안 유기막과 수산화나트륨을 1:15(weight (g)/

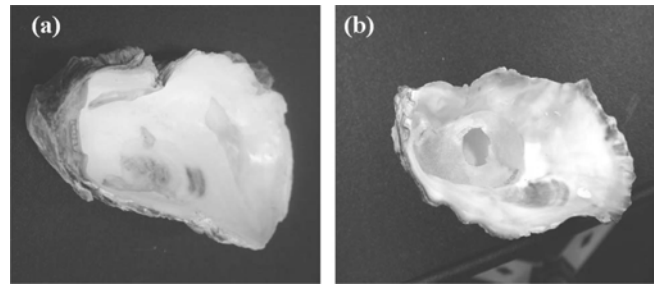


Fig. 1. The photography showing the inner structure of oyster shell, *Crassostrea gigas*. (a) normal shell and (b) regenerated shell in deformed shell.

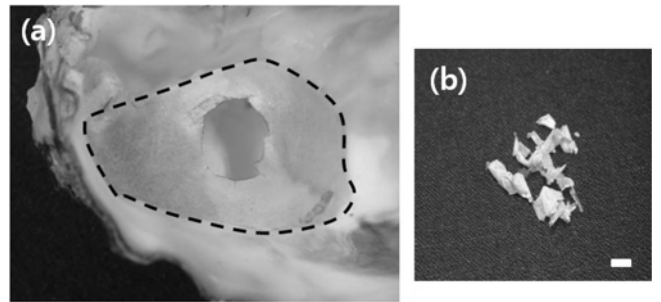


Fig. 2. (a) The dotted line showing the regenerated shell and (b) organic membrane from regenerated shell was obtained after chemical treatment (scale bar: 1 cm).

volume(ml)) 비율로 조절한 상태에서 단백질제거반응(deproteinization)을 진행하였다. 고온공정은 키틴의 탈 아세틸화도를 증가시켜 키토산으로 전환시키므로 60°C에서 분리, 실험하였다. 분리, 건조 후 푸리에 변환 적외선 분광기(FT-IR) 및 X-선 회절분석기(XRD)를 이용하여 분석하였다.

패각내 단백질의 분리와 정제는 다음과 같은 방법으로 진행하였다. 패각의 전처리 과정을 통해 구분된 정상패각과 재생패각내 수용성 단백질을 얻기 위하여 재생패각의 원층(original layer) 위에 형성된 층(Fig. 2 dotted line)과 재생패각의 원층에 해당되는 정상패각내 영롱한 빛을 띠는 진주층(또는 folia)만을 선택적으로 각각 분리하였다.

패각내 분리된 각 층(15 g)은 0.5 M EDTA (pH 8.0) 150 ml 용액에 사용하여 4°C에서 이틀 동안 교반하면서 탈 석회화 하였다. 탈 석회화 과정 후 수용성 단백질을 분리하기 위해 원심분리기(25,000 × g, 20 min)를 이용하여 상층액(supernatant solution)을 분리하였고 동량의 초순수를 사용하여 희석 후 한외여과(ultrafiltration, 0.1 μm)하였다. 여과액은 투석튜브(Sigma, D-9402)를 사용하여 4°C에서 초순수(1 liter)를 이용하여 교반과 함께 투석하였다. 수소이온 농도지수(pH)를 이용하여 투석 정도를 결정한 후 투석액은 -25°C에서 보관된 에탄올을 이용하여 침전법을 통해 정제하였다. 에탄올에 의해 생성된 침전체는 원층액(50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, pH 7.18)를 사용하여 용해 후 4°C에서 초순수(1 liter)를 이용하여 교반과 함께 재투석하였다. 패각내 수용성 단백질은 재투석한 액을 동결건조(Eyela, FD-81)함으로써 얻을 수 있었다.

### 2-2. 분석

아미노산 조성분석은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 분리 정

제된 참굴 패각내 수용성 단백질을 100  $\mu$ l 증류수에 현탁 (suspension) 한 후 20  $\mu$ l씩 취하여 완전히 말린다. 시료를 110  $^{\circ}$ C에서 24시간동안 6N 염산을 이용하여 진공에서 가수분해하였다. 가수분해된 아미노산을 PITC (phenylisothiocyanate)로 유도체화시킨다. 시료를 완전히 말린 후 pH 6.3, 200  $\mu$ l의 1.4 mM NaHAc, 0.1% TEA, 6% CH<sub>3</sub>CN에 녹인다. 원심분리(microcentrifuge) 후 상층액을 각각 50  $\mu$ l씩 따서 합쳐 섞은 후 FPLC (Waters PicoTag System)의 autosampler에 장착한다. 컬럼은 PicoTag이며 Photodiode array detector (Waters 990 254 nm)를 사용하였으며 60% CH<sub>3</sub>CN으로 선형 그라디언트를 사용하였고 Beckman 6300 아미노산분석기를 이용하여 수행하였다.

수용성단백질 2차구조분석은 다음과 같이 측정하였다. 수용성 원편광 이색성(Circular Dichroism) 분석기는 광학활성물질의 원편광에 대한 흡수가 왼쪽 원편광과 오른쪽 원편광이 다른 현상을 통해 단백질의 folding과 unfolding을 측정함으로써 이를 통해 단백질의 이차구조를 알 수 있는 분석기이다[13]. 앞절에서 언급한 분리 정제 방법을 통해 얻어진 정상/재생패각의 수용성 단백질은 완충액 (0.02 mM NaHPO<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, pH 7.18)을 사용하여 0.1 mg/ml로 시료를 준비 후 원편광 이색성 분석기(Jasco 720 spectro-polarimeter)를 사용하여 이차구조를 분석하였다. 분석 전 완충액에 대한 감쇄하였고 N<sub>2</sub>가스를 이용하여 측정 장치내 far-UV 분광기에 영향을 줄 수 있는 잔여산소의 발생을 차단하였다. 분석은 측정 영역 200 nm에서 250 nm이며 대역폭(bandwidth) 1nm이고 주사속도(scan rate)는 1 nm/s의 조건으로 측정하였다.

분광학적 분석은 FT-IR (Fourier transform infrared spectrometer)과 XRD (X-ray Diffractometer)를 사용하였다. FT-IR의 스펙트럼은 KBr pellets을 사용해 FTX 3000MX로 측정되었으며 Pellets은 KBr과 chitin을 혼합해서 만들었다. 이때 KBr 200 mg과 sample 2 mg을 혼합해 20 mg을 취해 IR을 사용하여 측정하였다.

키틴의 구조와 결정성을 확인하기 위하여 XRD (CuK $\alpha$ =1.54 $\text{Å}$ )를 이용하였다. 재생패각으로부터 얻어진 유기막의 결정학적 특성을 규명하기 위한 기준물질로 이용하기 위하여 상용화 시약  $\alpha$  키틴 (Sigma, C-9752)을 사용하였다.

패각의 경도측정은 다음과 같이 측정되었다. 정상패각의 folia층과 재생패각의 단면을 분리하여 시편을 제작한 후 경도를 측정하였다. 경도는 비커스 경도 측정기(Vickers' hardness tester, Shimadzu Co., HMV-2 series, Japan)를 이용하여 측정하였다. 실험은 연속강성도 측정방식(continuous stiffness measurements)에 따라 측정하였으며 압입자는 다이아몬드 비커스 사면(four-side) 피라미드를 이용하였다.

### 3. 결과 및 토의

#### 3-1. 유기막 특성 분석

이매패류의 패각내 두층의 형성으로 인한 재생패각의 발생이 처음으로 보고된 것은 Blake와 Evans에 의해서였다[14]. Blake와 Evans에 의하면 parasitic boring polychaetes 등이 패각 외부로부터 침입하여 패각내 구멍을 뚫고 침입함으로써 이를 생체조직이 인지한 후 1차적으로 conchiolin이라 불리는 유기물을 배출하여 침입자와 패각의 구멍을 생체조직으로부터 격리한 후 그 위에 탄산칼슘을 합성함으로써 재생패각(regenerated shell)을 합성하는 것으로 보고된 바 있다. 하지만, 이후의 연구는 생리학적 현상에 치중한 연구가

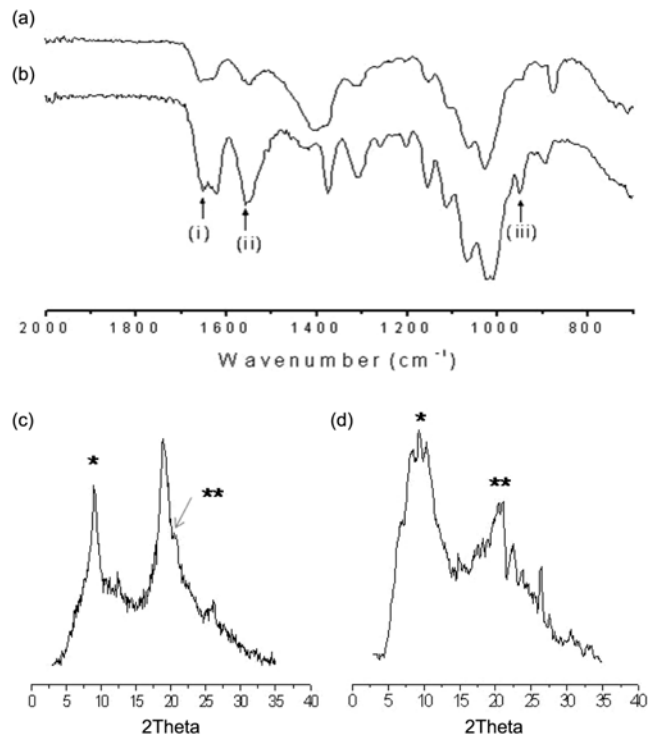


Fig. 3. FT-IR spectra of (a) organic membrane from regenerated shell after chemical treatment and (b) chitin (Sigma) (I: amide I, II: amide II, III: amide III). XRD diffraction profile of (c) chitin (Sigma) and (d) organic membrane after chemical treatment. XRD profiles of chitin (Sigma) and the membrane from regenerated shell were obtained at 9.1 (\*, Fig. 3c), 20.3 (\*\*, Fig. 3c) and 9.2 (\*, Fig. 3d), 20.3 (\*\*, Fig. 3d) by crystalline structure, respectively.

주를 이루었고 상대적으로 conchiolin의 특성 및 역할에 대한 깊이 있는 연구는 진행되지 않았다.

탈 석회화과정을 통해 얻어진 유기막내의 과당류의 존재를 확인하기 위하여 단백질제거반응을 거쳐 유기막내의 불용성 단백질을 제거한 후 푸리에 변환 적외선 분광기 (FT-IR)와 X선 회절 분석기 (XRD)를 사용하여 분석하였다(Fig. 3). 푸리에 변환 적외선 분광기 (FT-IR) 분석을 통해 추출된 과당류로부터 -OH 특성과 amide 그룹 (amide I: 1,660  $\text{cm}^{-1}$ [-C=O], II: 1,550  $\text{cm}^{-1}$ [-NH]; III: 973  $\text{cm}^{-1}$ [-NH])의 특성을 확인할 수 있었다(Fig. 2a-b). 일반적으로  $\alpha$  키틴과  $\beta$  키틴은 amide 그룹의 구조에 따라 두 가지 형태의 수소 결합이 존재하는데  $\alpha$  키틴의 경우, amide I에서의 흡수 밴드가 이중선으로 나타나며,  $\beta$  키틴의 경우, 단일 피크로 나타난다고 알려져 있다[15].

X선 회절 분석기 (XRD)로 분석한 결과 키틴과 재생패각으로부터 얻어진 탈 석회화 과정을 거친 유기막을 분석한 결과 시약 키틴의 경우 9.1(\* in Fig. 3c), 19.2, 20.3(\*\* in Fig. 3c) 2(theta) 값에서, 재생패각으로부터 화학 처리된 유기막은 9.2(\* in Fig. 3d), 20.3(\*\* in Fig. 3d)의 2(theta) 값에서 각각의 특성 피크를 확인할 수 있었다(Fig. 2c-d). 일반적으로 X선 회절 분석기를 사용하여 분석하기 경우,  $\alpha$  키틴은 9.6, 19.6의 2 $\theta$  값에서 특성을 보이며  $\beta$  키틴은 9.1, 20.3의 2 $\theta$  값에서 특성을 보인다고 알려져 있다[15]. 따라서 분광학적 분석을 통해 재생패각으로부터 얻어진 유기막은  $\beta$  키틴 구조를 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

**Table 1. The amounts of chitin and insoluble protein**

	Normal	Regenerated
Chitin	trace	0.5 g/15 g deformed shell powder
Insoluble proteins	3.05 g / 1 g insoluble matrix	1.24 g / 1 g insoluble matrix

**3-2. 정상패각과 재생패각의 키틴 및 불용성단백질의 함량**

Table 1은 정상패각과 재생패각 조직에 함유된 키틴과 경단백질의 함량을 보여주고 있다. 재생패각의 경우 키틴의 함량이 과량(전체중량의 3%) 포함되어 있는 반면 불용성단백질의 경우는 정상패각이 재생패각보다 두배 이상의 함량(3.05/1.24=2.45)을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

참굴과 같은 이매패류의 패각 형성과정은 템플릿(template)과 불용성단백질 그리고 수용성단백질의 상호 유기적인 작용에 의해 합성된다고 알려져 왔다[16]. 따라서 재생패각내 불용성단백질의 함량이 상대적으로 적은 이유는 재생패각의 합성과정이 정상패각의 과정과 일정부분 차이가 있을 수 있다는 사실을 의미하는 결과일 수 있다. 아울러 재생패각내 많은 양의 키틴이 존재한다는 것은 이들이 재생패각의 합성과정에 참여할 뿐만 아니라 Blake와 Evans[14]에 의해 제안된 외부침입자와 생체조직을 격리하는 차폐막의 역할을 수행한다고 하는 것을 보여주는 결과라 할 수 있다.

**3-3. 정상패각과 재생패각의 아미노산 조성분석**

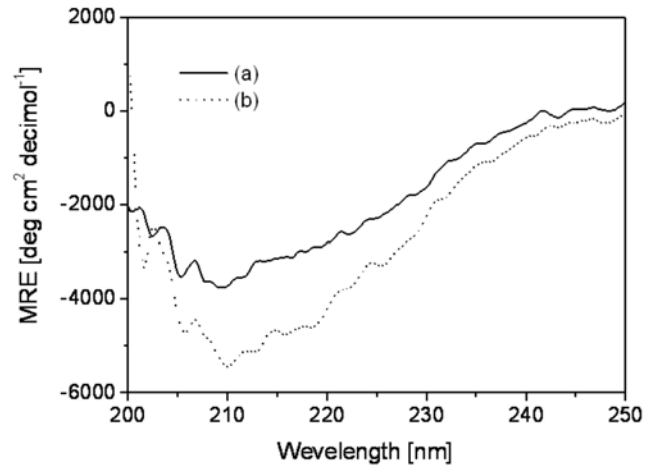
정상패각과 재생패각내 수용성단백질의 아미노산 조성을 분석한 결과 재생패각의 수용성단백질이 정상패각과 비교하여 약 7% 적은 산성 아미노산의 함량을 보였다(Table 2).

일반적으로 Asp(Aspartic acid)와 Glu(Glutamic acid)와 같은 산성아미노산은 해수내의 칼슘이온과 결합하여 탄산칼슘의 결정성장점(crystal site)으로 작용한다[17]. 아울러, 패각내 수용성단백질 아미노산 조성이 패각 형성과정에 있어 중요한 역할을 담당하는 이유 중 하나는 Gly(Glycine)과 Asp(Aspartic acid)의 반복적인 배열에 있다. Weiner와 Traub[3]은 진주조개의 일종인 *Pinctada fucata*에서 칼슘 결합을 촉진하는 수용성 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과, Gly-Xaa-Asn(Xaa=Asp, Asn or Glu)의 반복적인 배열이 결정성장점으로 작용할 뿐만 아니라 균일한 배향성을 갖는 이유가 된다고 보고한 바 있으며 Davis 등[18]은 탄산칼슘을 만들어 내는 내이(inner ear)의 구조 단백질 아미노산 조성으로부터 Gly-Xaa-Yaa(Xaa=Asp, Asn or Glu; Yaa=any amino acid)의 반복 배열을 확인한 바 있다. 따라서 재생패각내 수용성 단백질 산성아미노산의 함량이 정상패각과 비교하여 상대적으로 적다는 것은 정상패각의 진주층이 갖는 규칙적 배열 및 배향성이 재생패각에서는 상대적으로 감소할 수 있다는 것을 의미하는 결과라 할 수 있다.

불용성단백질과 템플릿을 연결하는 가교역할을 담당하는 것으로

**Table 2. Amino acid compositions of the proteins in the soluble protein obtained from normal shell and regenerated. (Unit: mole %)**

	Normal	Regenerated
Nonpolar group (Val, Leu)	22.97	15.50
Acidic group (Asp, Glu)	42.65	35.24
Basis group (Lys, Arg)	4.18	4.66
Neutral group (Gln, Cys)	30.20	44.61



**Fig. 4. Circular Dichroism spectra of (a) the soluble protein from normal shell and (b) the soluble protein from regenerated shell.**

알려진 Val (Valine)과 Leu (Leucine)[19]의 경우 정상패각이 재생패각보다 상대적으로 많은 양(약 33%)을 함유하고 있는데 이는 정상패각과 재생패각내 불용성 단백질의 함량과 비교할 때 유사한 결과라 할 수 있다. 아울러 염기성 아미노산 조성의 함량은 큰 변화가 없었던 반면 중성의 아미노산의 함량은 변화의 폭이 상대적으로 컸다. 특히, Cys(Cystein)의 경우 참굴(*Crassostrea gigas*) 조직 내에서 키틴을 가수분해하여 N-아세틸글루코사민을 생성하는 반응을 촉매하는 효소인 키틴나아제(chitinase)의 키틴 결합이 Cys에서 진행되는 점 [20]을 고려해 볼 때 재생패각내 Cys의 상대적으로 높은 함량 또한 재생패각의 합성과 밀접한 관련이 있을 것으로 판단된다.

**3-4. 정상패각과 재생패각의 결정내부단백질 2차 구조**

원편광 이색성 분석을 통해 정상패각과 재생패각 수용성단백질내 이차구조를 분석한 결과 정상패각의 흡착 band의 경우(Fig. 4a) 205 nm( $\pi$ - $\pi^*$  transition, beta-strand), 212 nm( $n$ - $\pi^*$  transition, beta-strand)에서의 강한 특성피크와 225 nm( $n$ - $\pi^*$  transition, alpha-helix)에서 특성 피크를 확인할 수 있었던 반면 재생패각의 경우는 202 nm( $\pi$ - $\pi^*$  transition, random)와 205 nm( $\pi$ - $\pi^*$  transition, beta-structure)에서 강한 특성 피크를 확인할 수 있었다. 두 층 모두  $\beta$  구조와 random 구조가 많은 양을 차지하고 있는 공통점 이외에 재생패각의 경우 상대적으로 random 형태의 구조가 많은 양을 차지하고 있는 차이점을 보였다(Fig. 4, Table 3) 아울러 두 패각 모두  $\alpha$ -helix와 turn 구조는 상대적으로 유사한 양을 함유하고 있음을 확인할 수 있었다. 흥미로운 점은 재생패각의 단백질 2차구조 중 많은 양을 차지하는 불규칙구조(unordered structure)인 random 구조는 참굴의 유생(larvae)이 초기 자신의 패각을 합성하는 단계(수정 후 24시간 이내)에서 과량 분비되는 것으로 앞서 연구 결과에서 확인된 바 있다[21]. 따라서 재생패각내 random 구조가 상대적으로 많은 것 또한 패각

**Table 3. CD secondary structure analysis of normal shell and regenerated shell (Unit: %)**

	$\alpha$ -helix	$\beta$ -strand	Turn	Random
Normal	11.7	38.1	12.8	37.4
Regenerated	13.1	27.4	13.3	47.2

**Table 4. Vickers microhardness of normal shell and regenerated shell**

	Normal	Regenerated
Mean (kg <sub>f</sub> )	491.3	232.0
STDEV	104.52	15.83
CV	21.27	6.82
Ttest	0.00002191703	

STDEV: Standard Deviation, CV: Coefficient of Variation

의 재생과정에 따른 특성으로 해석될 수 있을 것이다.

정상패각과 재생패각내 일정부분 이상을 차지하는 β 구조 또한 β 구조 내에 존재하는 산성아미노산(Asp, Glu)과 탄산이온과의 분자간격 특성을 고려해 볼 때 그 어떤 2차 구조(α-구조, turn, random) 들보다도 선택적 배향성을 가지게 할 수 있는 2차 구조라 할 수 있다. 일반적으로 정상패각 및 재생패각 모두 영롱한 빛을 띠는 진주층(folia)을 합성하는데 이들 패각의 진주층은(001)면 방향으로 성장한다고 알려져 있으며[12, 22] 이들 산성아미노산의 분자 간격(0.69 nm)은 진주층(001)면에서의 칼슘간격(약 0.8 nm)와 매우 유사한 값을 가지게 된다. 그러므로 β 구조는 참굴 패각의 folia가 갖는 선택적 배향성과 상호작용력을 가질 것으로 판단된다. 물론 이를 명확히 규명하기 위해서는 수용성단백질의 3구조에 대한 이해와 칼슘 및 탄산이온과의 입체화학적 효과 등에 관한 심도 깊은 분자공학적 접근이 요구될 것이다.

**3-5. 정상패각과 재생패각의 재료학적 특성**

정상 및 재생패각의 구조적, 형태학적 합성에 관여하는 불용성 단백질의 함량차이(Table 1)와 수용성단백질의 조성(Table 2) 및 단백질 2차구조의 차이(Fig. 4와 Table 3)를 고려해 볼 때 이들 패각내 유기매트릭스의 차이가 재생패각의 합성에 영향을 미치며 나아가 패각의 균일한 배향 등에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단된다. 이를 규명하기 위하여 재생패각과 정상패각의 파괴인성과 같은 재료학적 특성을 분석하였다. 정상패각과 재생패각의 경도를 측정한 결과, 정상패각은 491.2 kg<sub>f</sub> 강도를 가지는 반면 재생패각은 232.0 kg<sub>f</sub> 강도를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 재생패각이 정상패각에 비해 패각 단면의 수직방향에서의 압력에 상대적으로 취약하다는 것을 의미한다. 이는 재생패각의 합성전략이 정상패각의 그것과는 차이가 있음을 의미하는 결과라 할 수 있다. 일반적으로 이매패류 유생이 산란된 후 초기 패각 형태를 이루는데 소요되는 시간은 30일 정도로 알려져 있다[23]. 이에 반해 노칭(notching)된 패각의 합성은 빠른 속도로 진행된다는 연구결과가 보고된 바 있다[24, 25]. 이를 통해 재생패각의 합성전략은 외부침입자로부터 1차적으로 생체조직을 격리시킨 후 빠른 성장을 통해 생존을 확보하는 전략을 구사할 것이라 판단된다. 이 과정에서 키틴과 단백질과의 상호결합과 긴밀한 협조가 이루어질 것이며 균일한 배향보다는 빠른 성장에 초점을 맞춘 합성전략이 구사될 수 있을 것으로 여겨진다.

**4. 결 론**

우리나라 연안에서 널리 양식되고 있는 참굴의 재생패각 내에서 β-키틴의 존재를 확인하였다. 재생패각과 정상패각에서의 아미노산 조성 및 단백질 2차구조 분석을 통해 균일한 배향성을 가지게 할 수 있는 Gly-Xaa-Asn(Xaa=Asp, Asn or Glu)의 반복적인 배열을

구성요소인 산성아미노산의 양과 단백질 2차구조 중 β-구조의 양이 상대적으로 적고 불규칙구조인 random 구조가 상대적으로 많은 양 포함되어 있음을 알 수 있었다. 이는 재생패각의 합성전략이 정상패각과는 차이가 있음을 보여주는 결과며 이러한 차이가 패각의 강도에 영향을 주게 되어 재생패각의 약한 파괴강도를 유발한 것으로 판단된다.

재생패각 합성시 가장 중요한 합성전략은 재료학적 특성에 충실한 패각 합성보다는 탄산칼슘의 빠른 성장에 기인한 외계와 생체조직의 차단막 형성이 주 목적임을 알 수 있다. 이에 따라 재생패각에서 분비된 유기매트릭스가 정상패각 합성에 관여하는 유기매트릭스 뿐만 아니라 일반적인 패각합성에 관여하는 유기매트릭스와도 뚜렷한 차이를 보였다.

본 연구를 통해 얻어진 정보는 생광물화과정중 생체복합체인 패각의 재생과정에 대한 이해의 폭을 넓히고 연안 생태계의 환경지표의 하나로 이용될 수 있으며 유기막 형태의 키틴을 이용한 생체재료 연구의 기반연구로서 활용될 수 있으리라 확신하다.

**감 사**

최충승 교수님의 명예로운 정년퇴임을 축하 드립니다. 학문의 은사(恩師)이시자 선배로서 항상 본을 보여주시고 모든 일에 최선을 다하는 자세를 가르쳐주신 최교수님께 진심으로 감사 드립니다.

**참고문헌**

- Willis, J., "Cuticular Proteins in Insects and Crustaceans," *Am. Zool.*, **39** 600-609(1999).
- Jeuniaux, C., in; M. Florin and E.H. Stotz (Ed.), *Comprehensive Biochemistry (Chitinous Structure)*, Elsevier, New York, 595-631(1971).
- Weiner, S. and Traub, W., "X-ray Diffraction Study of the Insoluble Organic Matrix of Mollusk Shell," *FEBS Lett.*, **111**, 311-318 (1980).
- Fereidoon, S., Janak, K. and Jeon, Y. J., "Food Applications of Chitin and Chitosans," *Trends in Food Sci. & Tech.*, **10**, 37-51 (1999).
- Park, J. K., "Industrial Application of Chitinase and Chitosanase," *J. Chitin & Chitosan*, **7**, 1-7(2002).
- Shagemasa, Y. and Minami, S., "Applications of Chitin and Chitosan for Biomaterials," *Biotech. Gen. Eng. Rev.*, **13**, 1353-1359(1995).
- Kifune, K., in; C. J. Brine, P. A. Sandford and J. P. Zikakis (Ed.), "Advances in Chitin and Chitosan," Elsevier Science, London, 9-15(1992).
- Kifune, K., *Medical application of chitin/chitosan*, Gibodang Press, Japan(1994).
- Hirano, S., Nagamura, K., Zhang, M., Kim, S. K., Chung, B. G., Yoshikawa, M. and Midorikawa, T., "Chitosan Staple Fibers and Their Chemical Modification with Some Aldehydes," *Carbohydrate Polymer*, **38**, 293-298(1999).
- Jeuniaux, C., in S. P. Colowick and N. O. Kaplan (Ed.) *Methods in enzymology*, Acad. Press, New York, 644-650(1966).
- Falini, G., Weiner, S. and Addadi, L., "Chitin-Silk Fibroin Interactions: Relevance to Calcium Carbonate Formation in Invertebrates," *Calcified Tissue International*, **72**, 548-554(2003).

12. Lee, S. W. and Choi, C. S., "The Correlation Between Organic Matrices and Biominerals (myostracal prism and folia) of the Adult Oyster Shell," *Micron*, **38**, 58-62(2007).
13. Kranz, B., Burck, J., Franzreb, M., Koster, R. and Ulrich, A. S., "Circular Dichroism Analysis of Peniciline G Acylase Covalently Immobilized on Silica Nanoparticles," *J. Collid. Interface Sci.* **316**, 413-419(2007).
14. Blake, J. A. and Evans, J. W., "Polydora and Related Genera as Bores in Mollusk Shells and Other Calcareous Substrates," *The Veliger*, **15**, 235-249(1973).
15. Kwon, J. K., Kong, B. G. and Jang, M. K., "Thermodynamic Characterization of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -Chitin," *J. Chitin & Chitosan*, **7**, 154-160(2002).
16. Mann, S., *Biomineralization principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. 1<sup>st</sup> ed., Oxford University Press, New York(2001).
17. Lowenstam, H. A. and Weiner, S., *On biomineralization*. 1<sup>st</sup> ed., Oxford University Press, New York(1989).
18. Davis, J. G., Oberholtzer, J. C., Burns, F. R. and Greene, M. L., "Molecular Cloning and Characterization of an Inner Ear-Specific Structural Protein," *Science*, **267**, 1031-1034(1995).
19. Bowen, C. E. and Tang, H., "Conchiolin-Protein in Aragonite Shells of Mollusks," *Comp. Biochem. Physiol.*, **115A** (4), 269-275(1996).
20. Badariotti, F., Thuau, R., Lelong, C., Dubos, M. P. and Favrel, P., "Characterization of An Atypical Family 18 Chitinase from the Oyster *Crassostrea gigas*: Evidence for a Role in Early Development and Immunity," *Dev. & Comp. Immunol.*, **31**, 559-570(2007).
21. Lee, S. W., Hong, S. M. and Choi, C. S., "Characteristics of Calcification Processes in Embryos and Larvae of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*," *Bull. Mar. Sci.* **78**, 309-316(2006).
22. Addadi, L. and Weiner, S., "Interactions Between Acidic Proteins and Crystals: Stereochemical Requirements in Biomineralization," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 4110-4114(1985).
23. Medakovic, D., Popovic, S., Crzeta, B., Plazonic, M. and Hrs-Brenko, M., "X-ray Diffraction Study of Calcification Processes in Embryos and Larvae of the Brooding Oyster *Ostrea edulis*," *Mar. Biol.*, **129**, 615-623(1997).
24. Mount, A. S., Wheeler, A. P., Paradkar, R. P. and Snider, D., "Hemocyte-Mediated Shell Mineralization in the Eastern Oyster," *Science*, **304**, 297-300(2004).
25. Cho, S. M., "Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) on the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*," Ph.D. Dissertation-Gyeongsang National University, Korea(2006).