

## 견 피브로인의 알칼리 가수분해

김남정 · 배도규\*

잠사곤충연구소, \*경북대학교 농과대학

## Hydrolysis of Silk Fibroin on Alkali Conditions

Nam Jung Kim and Do Gyu Bae\*

National Sericulture and Entomology Research Institute, RDA, Suwon, 441-100 Korea

\*College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701 Korea

### ABSTRACT

To hydrolyze silk fibroin was treated with NaOH solution on various concentrations and times. And it was examined that the addition effects of NaHSO<sub>3</sub> in NaOH solution on the solubility and colouring of silk fibroin. As obtained results are as follows; The more increasement of concentration and time of NaOH treatment, the more increasement of solubility but solubility was slight above 3% concentration of NaOH. Fibroin yield was decreased above 3% concentration. This was due to formation of peptide or amino acids below molecular weight 3,000. Most of molecular weight distribution came out to be under 3,000 in 2% concentration and 4hrs of NaOH treatment. The more increasement of adding concentration of NaHSO<sub>3</sub>, the more reduction of solubility but white index of powder increased. In the results of FT-IR spectras of silk fibroin powder obtained by various concentrations of NaHSO<sub>3</sub> treatment, the absorbent peak at 3,400 cm<sup>-1</sup> which was considered as -CH=N- (azomethine) was disappeared by the more addition of NaHSO<sub>3</sub>. It showed that absorbent peak of β-fibroin moved into low temperature region and transferred to α- and random coil structure through the DSC experiment. In the results of amino acid analysis, alkali hydrolysis reduced the oxy amino contents acid like serine and tyrosine, but increased the glycine content by the more addition of NaHSO<sub>3</sub>.

Key words : Silk fibroin, Alkali hydrolysis, Solubility, White index

### 서 론

견은 천연섬유중에서 제일의 장섬유로서 독특한 광택, 촉감, 흡습성, 방습성 및 생체 적합성 등의 가능성이 좋아 오래전부터 중요한 섬유소재로 이용되어 왔다. 최근에는 견사를 섬유로서의 이용 뿐만 아니라 견 피브로인의 특성을 이용한 각종 용도로서의 응용이 진행되고 있어 새로운 바이오소재로 주목받고 있다.

견 피브로인은 인체에 무해한 유용 단백질원으로, 피브로인의 대부분을 차지하고 있는 glycine, alanine, tyrosine 등의 아미노산을 이용한 의약품 및 기능성 식품으로서의 이용 가능성이 검토되고 있다(Chen *et*

*al*, 1991. 順田都三男 *et al*, 1987. Sugiyama *et al*, 1985). 또한, 견은 식품뿐만 아니라 피부에 대한 자극이 없고 적절한 흡습성·보습성과 염색성·공기의 투과율이 좋고 자외선을 흡수 하는 기능이 있어 피부를 보호하기 위한 화장품의 원료소재로도 적합하다(Kanebo, 1992. 間, 1995).

이와 같이 견 피브로인의 분자량은 수십만 이상의 고분자로서 그대로는 응용이 어렵기 때문에 저분자화시키지 않으면 안된다. 이를 위해 피브로인 분자간의 결합을 절단하여야 하는데 지금까지 주로 염산, 황산, 인산 및 개미산 등을 이용한 산가수분해법이 이용되어 왔다(Ajisawa, 1968). 견 피브로인에 산처리율을 하게 되면 견단백질의 peptide 결합이 절단되어

가수분해가 일어나게 되어 수용성 분말을 제조하였다(Chen, 1991. Lu *et al*, 1994). 그러나 이러한 산처리 방법으로 제조된 수용성 건분말은 공극율이 적고, 아미노산이나 올리고 펩타이드로 분해되어 있기 때문에 소화·흡수가 좋아 식품으로 활용하기에는 좋으나, 낮은 수율과 가수분해 정도에 따라서 연한 갈색의 색깔을 띄게 되는 단점이 나타나게 된다. 한편, 알칼리에 의한 건 피브로인의 가수분해는 산가수분해보다 단시간내에 가수분해되는 특징이 있는 것으로 알려지고 있으나(최, 1974. Bhat *et al*, 1980) 아직 자세한 실험이나 보고가 없는 실정이다.

이에 본 연구에서는 산가수분해 방법에 의한 건 분말의 제조에서 발생하는 낮은 수율이나, 변색 및 제조비용의 문제점을 극복하기 위하여 알칼리 가수분해 방법을 검토하였다. 본 실험에서는 건 피브로인에 NaOH 용액을 사용하여 처리농도 및 시간에 따른 가수분해 정도를 알아 보았으며, 아울러 가수분해에 의해 수반되는 황변을 방지하여 백색의 분말을 얻기 위해 NaHSO<sub>3</sub>를 첨가한 실험을 통하여 그 효과를 시험하였다. 또한 각 조건에 따른 백도를 측정하여, 백색 건 분말의 제조 가능성에 대해서도 검토되었으며, DSC, IR, Amino Acid 분석 등을 통하여 건 피브로인 구조에 미치는 알칼리 가수분해의 영향도 함께 고찰되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

시료로는 파사를 사용하였으며 다음과 같은 방법으로 정련하였다. 15% o.w.f. 마르세이유 비누와 10% o.w.f. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(Sodium Carbonate) 용액으로 95°C이상에서 1:50의 액비로 2시간 정련하였다. 처리 후 열수와 냉수로 여러번 수세를 행한 다음 실온에서 건조하여 연감율을 산출하였고 이때 연감율은 21.4%였다.

이렇게 정련된 시료는 dessicator에 보관하여 필요할 때 사용하였다. 실험용 시약은 모두 특급이상의 것을 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 가수분해

NaOH의 농도를 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 로 조정하여 95°C에서 1:40의 액비로 1, 2, 4, 6, 8 시간씩 처리하였다. 생성된 가수분해액을 중화하기 위해 염산(HCl) 수용액을 사용하여 건 피브로인 수용액의 pH를 7.0 으로 조절하였고, glass filter G-2를 사용하여

불용해물을 여과 하였다. 이때 불용해물은 증류수를 사용하여 수세-건조하였으며, 무게를 측정하여 용해도를 구하였다. 용해된 시료는 중공사막(hollow fiber, AMICON Co., MW=3,000)을 사용하여 탈염을 행하였다. 중화에 의하여 생성된 염을 제거한 후 농축된 피브로인 수용액을 냉동건조기(Ilshin, Bondiro, Korea)로 48시간 동안 동결 건조를 행하였다.

용해도 (%)

$$= \frac{\text{가수분해 전 무게} - \text{불용해물의 무게}}{\text{가수분해 전 무게}} \times 100$$

#### 2) NaHSO<sub>3</sub> 첨가효과

2% 농도의 NaOH와 0%, 5%(SB5), 10%(SB10), 20%(SB20), 30%(SB30), 50%(SB50) o.w.f. 농도의 NaHSO<sub>3</sub>를 첨가하여 95°C에서 1:40의 액비로 4시간 동안 처리한 후, 염산 수용액으로 중화시켰다. 중화된 용액은 filter paper(Whatman, Grade2)를 사용하여 불용해물을 여과하였고, 투과된 용액은 60°C에서 열풍 건조하였다. 이렇게 해서 얻어진 분말은 기기분석용 시료로 사용되었다. 이때 용해도는 위와 같은 방법으로 구하였다.

#### 3) 분석 방법

건 피브로인 분말의 분자량 분포를 알아보기 위하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(Hoefler mightysmall SE245)으로 측정하였다. 전기영동에는 15%gel을 사용하였고 시료의 조제는 Laemli법(1970)에 따랐으며 전용 완충액을 이용하여 40 mA의 정전류에서 약 30분 영동했다. 영동 종료후 gel을 0.02% Coomassie Brilliant Blue R-250과 10% 초산-45% 메탄올 수용액에서 2시간동안 염색한 후 7.5% 초산-5% 메탄올 수용액에서 염색액이 탈색될 때까지 행하였다.

건 피브로인 분말의 백도는 건조된 시료를 분쇄하여 분말을 만들어 색차계(NIPPON DENSHOKU, SQ-300)로 시료당 3 반복으로 하여 백도를 측정하였다.

IR-spectrum 분석은 KBr법에 의하여 적외선 분광광도계(Nicolet MAGNA-IR)로 range 4000~400 cm<sup>-1</sup>에서 측정하였다.

건 피브로인 분말의 열적거동을 살펴보기 위해 DSC(Seico SSC5200H Disk Station)를 이용하여 행하였고 승온속도 5°C/min, 온도범위 50~350°C에서 분석하였다.

Amino Acid 분석은 Waters사의 Pico · Tag 방법을 사용하여 분석하였다. 분석은 Waters 600S controller, Waters 626 pump, Waters 486 Tunable absorbance detector, HP 3395integrator로 이루어진 HPLC system을 사용하였다. 아미노산의 검출은 254

nm에서 흡광도를 측정하고 Amino acid standard는 Pierce사의 Free amino acid standard H를 사용하였으며, 조성비는 각 피크의 면적을 표준 피크에 대한 면적비로서 상대적 몰(mol)농도를 계산하고 전체 아미노산의 몰수에 대한 각 아미노산의 백분율 값으로 계산하였다.

**결과 및 고찰**

**1. 견 피브로인 가수분해**

NaOH 1, 2, 3, 4, 5%의 각 농도에서 1, 2, 4, 6, 8 시간으로 처리한 후의 견 피브로인의 용해도를 보면 그림 1과 같다. 1~5%의 농도에서 1시간 처리한 용해도는 67%에서 90%이상으로 가수분해가 급격하게 일어났음을 알 수 있다. 그러나 NaOH 농도 3%이상에서는 처리시간이 경과하더라도 용해도의 증가는 완만했다. 이러한 결과는 NaOH에 의한 가수분해 정도는 처리시간보다는 NaOH 농도에 더 영향을 받는다는 것을 시사해주는 것으로, NaOH가 견 피브로인을 급격하게 팽윤시킴과 동시에 random coil형 분자구조에서 어느정도 생성되어 있는 분자내 또는 분자간 수소결합을 절단하기 때문에 반응 초기에는 용해도가 급격히 증가 되었다고 생각 된다. 그러나 반응시간이 지속됨에 따라 compact한 구조를 가진 결정성 부분에도 가수분해가 일어나기 시작하는데 이 때에는 시간의 경과가 필요한 것으로 고려된다. 또한, NaOH로 가수분해시킬 때 견 피브로인 주쇄중에 포함되어 있는 특정 아미노산이 다른 아미노산에 비해 보다 빨리

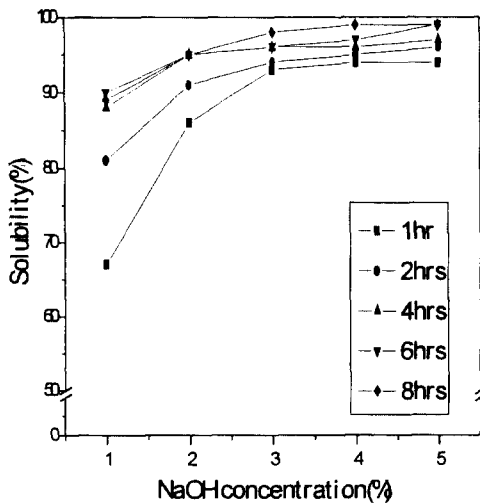


Fig. 1. Solubility curves of silk fibroin treated with various NaOH concentrations and times.

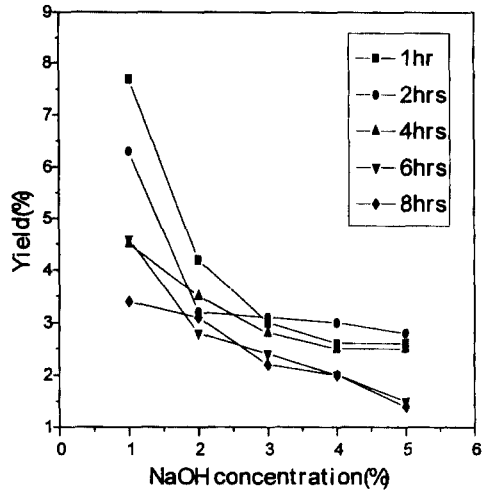


Fig. 2. Yield curves of silk fibroin treated with various NaOH concentrations and times.

분해되는 결과로 처리시간 초기에는 쉽게 가수분해되는 아미노산의 분해가 급격히 일어나고 시간의 경과와 더불어 상대적으로 분해가 어려운 아미노산에서도 점진적으로 가수분해가 일어나는 것으로 생각 된다. 이러한 이유 때문에 처리초기에는 용해도가 급격히 증가하고 처리후기에는 용해도 증가가 상대적으로 적은 것으로 생각된다.

그림 2는 NaOH로 가수분해해서 얻은 견 피브로인 수용액을 탈염과 건조를 행한 다음 얻은 분말의 수율이다. 그림에서 보는 바와 같이 분말의 수율은 거의 10% 미만이었고, 특히 2% 이상의 농도에서는 수율이 상당히 감소하는 경향을 보였다. 이는 농도 및 처리시간이 증가 할수록 용해도가 높아진 것과는 반대의 결과로서 가수분해에 의해 보다 많은 저분자량의 peptide 및 아미노산이 생성되어 분자량 3,000 이하 물질을 제거하는 중공사막으로 탈염하는 과정 중 소실되었기 때문이라고 고려된다.

가수분해로 얻은 분말의 분자량 분포를 알아보기 위해서 15%SDS-polyacrylamide gel전기영동을 실시하고 그 결과를 그림 3에 나타냈다.

가수분해 조건은 NaOH 농도 2%, 처리시간 4시간으로 하였으며 이 때에는 탈염을 행하지 않은 상태로 준비하였다. NaOH 2%의 농도에서 4시간 처리된 견 피브로인의 분자량 분포는 NaOH의 견 피브로인 분자쇄의 절단이 일어나서 특정한 분자량의 band는 나타나지 않고 3,000이하에 전체적으로 분포되어 있는 저분자화가 된 것을 관찰되었다. 이는 알칼리에 의해 견 피브로인의 비결정영역에서부터 무질서하게 절단

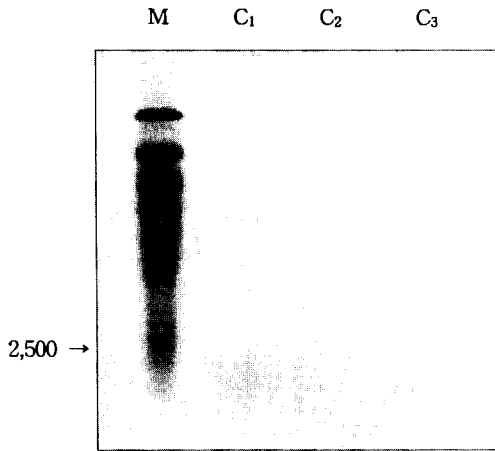


Fig. 3. 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of silk fibroin. M: standard protein markers. C<sub>1, 2, 3</sub>: silk fibroin treated with 2% concentration of NaOH for 4 hrs.

이 일어나 준결정, 결정영역으로 진행되어 몇 개의 peptide 및 amino acid 형태로 되었음을 시사한다.

2. NaHSO<sub>3</sub> 첨가 효과

견 피브로인의 가수분해 결과로 황변된다는 것은 가수분해 과정에서 견 피브로인이 산화되어, 원래는 가지고 있지 않았지만, 황색을 띄는 분자구조 즉 발색단을 생성시키는 결과라고 생각된다. 그래서 황변현

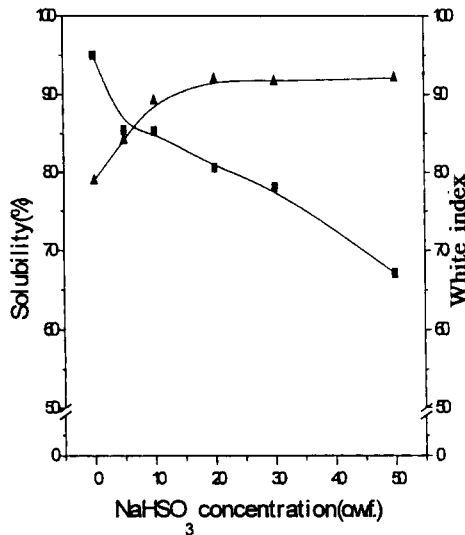
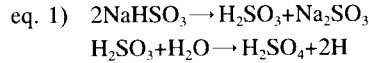


Fig. 4. Solubility and White index curves of silk fibroin treated with NaHSO<sub>3</sub> concentrations. ■: Solubility, ▲: White index.

상을 방지하기 위해서 NaOH 2% 농도에 환원제인 NaHSO<sub>3</sub>를 0%, 5%, 10%, 20%, 30%, 50% o.w.f. 농도로 첨가하여 시험한 결과를 그림 4에 나타내었다.

먼저 NaHSO<sub>3</sub> 첨가에 따른 용해도의 변화를 보면, NaHSO<sub>3</sub> 첨가농도가 많을수록 용해도는 감소하였고, NaHSO<sub>3</sub> 농도가 30% o.w.f.에서는 용해도가 80%이하, 50% o.w.f.의 농도에서는 70%이하로 저하되었다. 이러한 이유는 NaHSO<sub>3</sub>가 용액에서 분해되어 황산을 생성하여 NaOH를 중화시켜 알칼리 농도를 낮추는 역할을 하기 때문인 것으로 생각된다(eq. 1). 한편, NaHSO<sub>3</sub> 첨가농도가 증가할수록 백도도 따라서 증가하였는데, 이는 NaHSO<sub>3</sub>가 환원제로 작용하여 가수분해 과정중의 산화를 방지하거나 생성된 가수분해 도중 생성된 발색단을 표백하기 때문인 것으로 추론된다.



3. NaHSO<sub>3</sub> 처리에 의한 견 피브로인 구조분석

1) FT-IR Spectras 분석

그림 5는 NaHSO<sub>3</sub> 첨가에 의한 견 피브로인의 백색 현상을 규명하기 위하여 FT-IR Spectras로 분석한 것이다. 일반적으로 3,100~3,500 cm<sup>-1</sup>에 나타날 수 있는 흡수 peak로는 hydroxy기와 primary, secondary amines기와 amide기가 대표적이다(Hobart et al, 1981). 특히 3,400 cm<sup>-1</sup>의 범위에서 나타난 peak은, amine기가 알칼리의 영향으로 산화되어 -CH=N- (azo-methine)

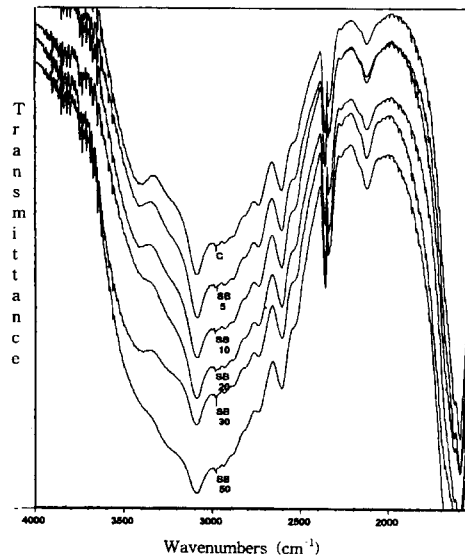


Fig. 5. FT-IR spectras of silk fibroin treated with various NaHSO<sub>3</sub> concentrations.

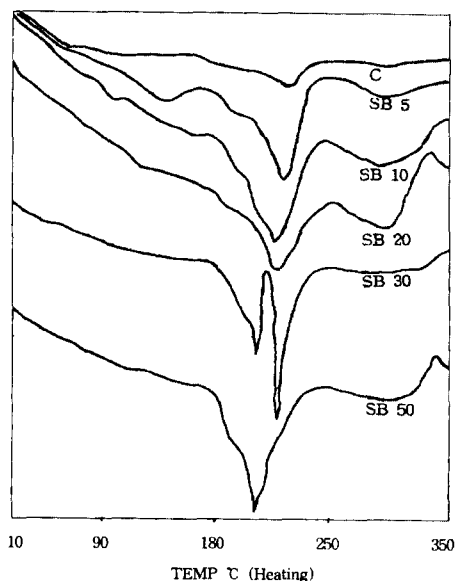


Fig. 6. DSC thermogram of silk fibroin treated with various NaHSO<sub>3</sub> concentrations.

기로 변환되었다고 추정된다. 그리고, 3,400 cm<sup>-1</sup> 흡수 peak이 NaHSO<sub>3</sub> 첨가농도의 증가에 따라 색을 띠는 -CH=N- (azo-methine)기의 흡수 peak이 사라지는 것을 볼 수 있다. 또한 생사의 FT-IR Spectras 분석의 경우에는 3,400 cm<sup>-1</sup>에서 흡수 peak이 나타나지 않은 것으로 보아(배, 1995) -CH=N- (azo-methine)기가 색을 띠게 하는 원인임을 시사해준다.

2) DSC 측정

견 피브로인의 열적 성질을 분석하기 위하여 DSC를 이용하여 열적거동을 살펴 보았다. 가수분해된 시료 및 NaHSO<sub>3</sub>의 농도별 시료들의 열 분해 온도는 225°C에서 NaHSO<sub>3</sub>의 첨가 농도가 증가할수록 흡열 peak이 저온 측으로 이동 하는 것을 볼 수 있었다(그림 6).

최(1995)등은 염화칼슘법에 의한 피브로인 열분해 온도는 280°C 전후이고 염산법으로는 250°C 전후로 보아, 이때 주된 흡열 peak은 α-helix 결정의 붕괴에 의한 것으로 추정 하였고 Green(1970) 등은 poly(β-alkyl-L-aspartates)의 DSC곡선을 해석해 213~238°C에서 α-helix가 extended β form으로 전이함에 따라 흡열 peak이 나타나고 190°C에서부터 α-helix 결정내에서 분자운동이 활발해진다고 하였다. 따라서 NaHSO<sub>3</sub>를 첨가할수록 extended β form에서 α-helix 및 random coil의 구조전이가 일어났음을 뒷받침 해주고 있다.

3) Amino Acid 분석

NaOH처리에 의해 견 피브로인은 peptide 결합의 분열이 일어남과 동시에 두드러지게 나타나는 현상은 hydroxy amino acid(Tyr., Thr., Ser.) 잔기와의 반응이다. NaOH는 피브로인 분자쇄의 serine과 tyrosine 잔기에 배위하여 피브로인 분자사이의 수소결합을 절단함으로써 팽윤, 분산되는 과정을 거쳐 마지막으로 이들 잔기를 일부분 분해시키는 것으로 볼 수 있는데 이는 hydroxy amino acid가 알칼리에 아주 민감하게 반응하는 것을 의미한다. 그러나, 산성(Asp., Glu.)이나 염기성(Arg., His., Lis.) 아미노산은 알칼리에 대한 반응성

Table 1. Amino Acid compositions of silk fibroin powder. (unit : mol%)

Amino Acids	H*	C	SB 5	SB 10	SB 20	SB 30	SB 50
Glycine	44.5	55.67	55.08	55.5	65.32	66.43	68.9
Alanine	29.1	18.47	30.1	33.69	25.30	21.43	20.82
Valine	-	-	-	-	-	-	-
Leucine	1.1	0.31	0.45	0.40	0.29	0.28	0.26
Isoleucine	-	0.37	0.66	0.43	0.25	0.24	0.21
Serine	10.5	5.89	4.5	4.63	5.33	6.20	6.32
Threonine	0.8	0.31	0.25	-	-	-	-
Aspartic Acid	1.7	4.93	2.59	1.52	0.81	0.81	0.84
Glutamic Acid	1.4	4.97	2.97	1.1	0.60	0.57	0.52
Phenylalanine	0.7	0.76	0.93	1.14	0.58	0.61	0.67
Tyrosine	-	0.03	0.31	0.28	0.2	0.12	0.16
Lysine	1.2	-	0.85	0.04	0.26	0.01	0.16
Histidine	-	0.06	-	-	-	-	-
Arginine	0.5	0.05	0.33	0.27	0.16	0.14	0.14
Proline	-	0.52	1.01	0.63	0.40	0.39	0.40
Cystine	-	0.7	1.18	0.86	0.52	0.49	0.47
Methionine	-	-	-	-	-	-	-

H\* : Fibroin soluble fraction in HCl solution (reaction time : 9hrs)

이 낮았고, 비극성(Gly., Ala., Val., Phe 등)에서도 반응성이 크지 않았다. 한편  $\text{NaHSO}_3$  첨가농도의 증가에 따라 산성(Asp., Glu.)amino acid은 감소하는 반면에 glycine 함량이 증가하고 있음을 알 수 있었다. 그리고 NaOH 단독 및  $\text{NaHSO}_3$  첨가 가수분해한 아미노산조성이 산 가수분해에 비해 glycine 함량이 많았다(표 1).

## 적 요

견 피브로인을 가수분해 시키기 위해 NaOH를 농도 및 시간별로 처리해서 적정 처리농도와 시간을 산출하고 가수분해에 의한 황변을 방지하기 위해  $\text{NaHSO}_3$ 를 첨가한 후 그 효과를 검토하였으며, IR · DSC · 아미노산조성 분석 등을 통하여 견 피브로인의 구조변화를 관찰해 본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. NaOH 처리농도와 시간이 증가 할수록 용해도는 증가하였으나, NaOH 농도 3% 이상에서는 그 정도가 미미하였다.

2. NaOH 처리농도와 시간이 증가 할수록 수율은 감소하였는데 이는 분자량 3,000이하의 peptide 혹은 amino acid가 많이 생성 되었기 때문이다.

3. NaOH 처리농도 2%에서의 분자량 분포는 3,000이하가 대부분인 것으로 나타났다.

4.  $\text{NaHSO}_3$  첨가 농도의 증가에 따라 용해는 감소하였으나 피브로인 분말의 백도는 증가 되었다.

5.  $\text{NaHSO}_3$  첨가 농도의 증가에 따라 구해진 피브로인 분말의 FT-IR 시험 결과,  $-\text{CH}=\text{N}-$  (azomethin)기로 보여지는  $3,400 \text{ cm}^{-1}$ 에서의 흡수 peak이 사라졌다. 또한 DSC 시험 결과,  $\beta$ -fibroin의 흡열peak은 저온쪽으로 이동하여  $\alpha$ - 및 random 형태로 전이 되었다는 것을 알 수 있었다. 아미노산 분석 결과, 알칼리 가수분해는 serine 및 tyrosine의 감소를 나타냈고,  $\text{NaHSO}_3$ 를 첨가할수록 glycine의 함량은 증가함을 알 수 있었다.

## 인용문헌

- Ajisawa, A.(1968) Studies on the dissolution of silk fibroin. *Sen-i Gakkaishi.*, **24**(61).
- 배도규(1995) 세리신 정착 기구에 관한 연구, *韓蠶學誌.*, **37**(2) : 137~141.
- Bhat, N.V. and Nadiger G.S.(1980) Crystallinity in silk fiber, partial acid hydrolysis and related studies, *J. Appl. polym. Sci.*, **25** : 921.
- Chen, K. Takano, R and Hirabayashi, K.(1991) Production of soluble fibroin powder by hydrolysis with hydrochloric acid and physical properties, *J. Seric. Sci. Jpn.*, **60**(5) : 358~362.
- Chen, K. Iura, K. Aizawa, R. and Hirabayashi, K. (1991) The Digestion of Fibroin by Rat, *J. Seric. Sci. Jpn.*, **60**(5) : 402~403.
- 최병희(1974) 제사학, 향문사, pp. 60~63.
- 최해경, 남중희(1995) 견 피브로인 분말과 필름의 제조 및 구조분석, *韓蠶學誌.*, **37**(2) : 142~153.
- Green(1970) *J. Eur. Polym.*, **6**(7).
- Hobart, H. Willard(1981) Instrumental Methods of Analysis 6th ed, D. Van Nostrand, 181
- Kanebo, Ltd.(1992) Silk report, pp. 27~29.
- 間 和夫(1995) 絹の多面的利用の可能性, *蠶絲科學と技術.*, **33**(4) : 10~13.
- Laemmler, U. K.(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** : 680.
- Lu, X. Akiyama, D. and Hirabayashi, K.(1994) Production of silk powder and properties, *J. Seric. Sci. Jpn.*, **63**(1) : 21~27.
- Sugiyama, K. Kushima, Y. and Muramatsu, K.(1985) Effects of sulfur containing amino acids and glycine on plasma cholesterol level in rats fed on a high cholesterol diet. *Agric. Biol. Chem.*, **49** : 3455~3461.
- 順田都三南, 文 豊, 堀田正晴(1987) *Phama. Medica.*, **5** : 75.