韓蠶學誌 43(2), 116~124(2001)
Korean J. Seric. Sci.
< 論 文 >

# 견 피브로인의 인산화와 그 특성

문장희 · 김정호 · 배도규 · 신봉섭*
경북대학교 농과대학
*상주대학교 섬유공학과

# Phosphorylation of silk fibroin and its properties

Jang Hee Moon, Jeong Ho Kim, Do Gyu Bae and Bong Seop Shin
*Natural Fiber Science, Kyungpook National University, Taegu, Korea 702-701, KOREA*
**Department of Textile Engineering, Sangju University, Sangju 742-711, Korea*

## ABSTRACT

To improve the functional properties as a food, silk fibroin was phosphorylated with STMP. In the phosphorylation reaction of silk fibroin, the degree of phosphorylation was increased with high alkali index and treatment temperature. Depending on treatment time and concentration of STMP it was rapidly increased up to 1hr. and 50%, but slowly above that time and 100%. It was indicated in the results of FT-IR analysis and $^{31}P$ NMR spectroscopy of phosphorylated fibroin that it had a close α-helix and poly-phosphate structure. The more phosphorylation of fibroin made more turbidity, foam expansion and foam stability, but less solubility. Emulsifying activity was increased up to P100, but slightly decreased above P100 and emulsifying stability was constantly increased on the progressing of phosphorylation.

**Key words :** Fibroin powder, Phosphorylation, EDTA, $^{31}P$ NMR, FT-IR, Foam and emulsifying properties

## 서 론

견섬유는 피브로인과 세리신이라는 두 단백질로 구성되어 있는데, 그 중 피브로인은 곤충을 통하여 순수한 단백질을 대량으로 쉽게 얻을 수 있으며 생체적합성이 우수하여 분말, 막, 다공질체 및 겔 등의 형태로 성형이 가능하다. 또한, 결정성, 용해성, 분자 형태 및 분자 응집성 등은 메탄올과 같은 용제 처리나 연신, 열처리 등의 방법으로 쉽게 조절할 수 있으며 우수한 반응기가 피브로인 측쇄에 존재하므로 화학적 개질이 가능하다는 특징이 있다(박, 1998). 견 피브로인의 이러한 특징은 견 피브로인 분말이나 수용액 상태로 상품화를 가능하게 하였을 뿐만 아니라 피부친화성, 자외선 차단성, 뛰어난 보습성, 분말의 부드러운 감촉 등은 화장품 소재로 응용될 수 있음을 시사해 주며, 이미 부분적으로는 상품화가 이루어진 상태이다.

식품 및 화장품 분야의 응용 예를 들면, 견 피브로인은 높은 염료친화성에 의한 색소고정화(JP 07-267822) 능력이 우수하므로 천연색소를 결합하여 보습성과 내광성이 있는 색소물질(colorant)로 개발되어(JP 07-179776) 식용 및 화장품용으로 응용되고 있으며, 저분자화된 견 피브로인 분말 및 수용액은 빵, 과자, 드링크제, 감미료, 건강보조식품 등으로 사용되고 있다.

견 피브로인이 기능성 식품 소재로 사용될 때는 콜레스테롤치 저하, 알코올 대사 촉진, 혈당치 저하, 파킨슨씨병 등 치매의 예방 및 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 이러한 기능은 견 단백질에 포함되어 있는 아미노산 즉, glycine(45%), alanine(30%), serine(12%), tyrosine(5%) 등의 약리 효과와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Sugiyama *et al.*, 1985; Chen *et al.*, 1993; 岸体, 1973).

일반적으로 식품 단백질(soy, milk casein, egg, wheat, whey)은 자연상태에서는 반드시 최고의 기능성을 보유하고 있지는 않으므로, 이의 향상을 위해 식품 단백질에 화학적 및 효소적 개질 방법이 도입되고 있다. 개질에 따른 악영향이 비교적 적은 방법 중 하나인 인산화 반응은 인산기의 공유결합으로 인해 음전하와 수화기가 증가되어 단백질의 기능성 향상에 유용하게 이용된다.

인산화 반응은 화학적인 방법과 효소적인 방법이 있는데, 화학적 인산화 반응시약으로는 phosphorus oxychloride ($POCl_3$)와 sodium trimetaphosphate(STMP)가 식품단백질을 대규모로 인산화 시키는데 가장 대표적인 시약들로 보고되고 있다(Mathesis and Whitaker, 1984; Matheis, 1991).

효소적 인산화는 kinase에 의해서 인산화가 일어나며

kinase는 단백질 인산화에 촉매역할을 하는 AMP의 한 형태로 가격이 고가이며, 이 kinase가 인식하는 sequence가 일치해야 하는 높은 기질 특이성이 요구되는 것이 단점이다(Schwenke, 1997).

본 연구에서는 견 피브로인을 STMP로 인산화하고 그에 따른 특성 평가를 통하여 기능성 식품소재로써의 응용 가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 가. 견 피브로인 분말 제조

절각견을 고압염색기(제작)에서 1시간 동안 130°C에서 정련한 후 깨끗이 세척하고 풍건시켜 준비한 정련 견사를 40% LiBr 용액(100°C)에서 3시간 용해시킨 후(北條舒正, 1980) cellulose membrane(dialysis tubing, M.W.= 12,000)으로 실온에서 흐르는 물에 4일간 투석을 하였다. 그 다음 glass filter(G-3)로 여과한 후, 원심분리기(L8-55M, Beckman)에 의해 20,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하고 상등액을 취하여 glass filter(G-4)로 다시 여과하여 얻은 견 피브로인 수용액을 48시간 동결 건조하여 분말화하였다.

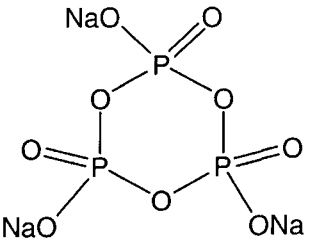

**Fig. 1.** Structural formula of STMP.

#### 나. cyclic-Sodium trimetaphosphate(STMP)의 제조

STMP(M.W=306)는 Bell(1950)의 방법에 따라 $NaH_2PO_4$를 electric furnace로 530°C에서 5시간 가열한 후, 미세한 분말로 만들어 다시 같은 조건에서 2시간 동안 추가로 가열하였다(Pass and Sutcliffe, 1968).

이렇게 하여 제조된 STMP는 결정성이고 수용성이며, 식(1)과 같이 $NaH_2PO_4$의 polyanionic aggregation(molecular dehydration)에 의해 생성되고 구조식은 Fig. 1과 같다.

$$3(NaH_2PO_4) \xrightarrow{530°C,\ 5\ hr} (NaPO_3)_3 + 3H_2O \quad (1)$$

### 2. 방 법

#### 가. 견 피브로인의 인산화 반응

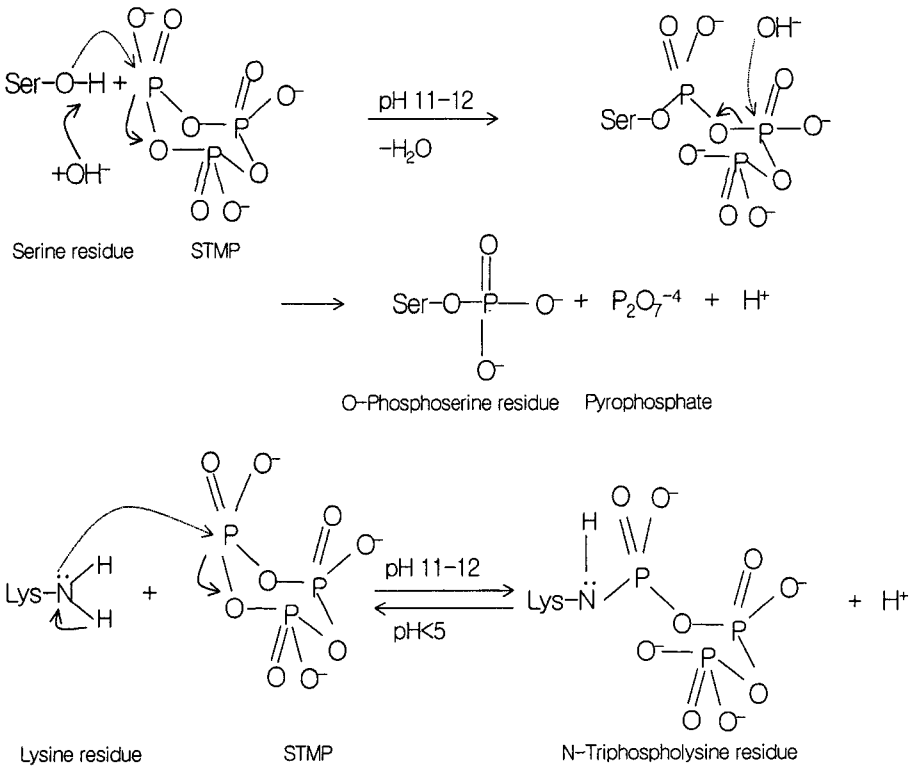


**Fig. 2.** Phosphoesterification and phosphoramidation of soy protein with STMP in alkali(Figure from "sung *et al.*(1983)").

견 피브로인 용액(0.5%, w/v)에 STMP를 가하고 교반하면서 0.1 N NaOH 용액으로 pH를 일정하게 유지시켰다. 인산화 반응의 적정 조건을 구하기 위하여 pH(9.5, 10.5, 11.5, 12.5), 처리 온도(25, 35, 45°C), 처리 시간(0.5, 1, 2, 3, 4 hr)과 STMP 농도(50, 100, 150, 200 o.w.f(on the weight of fibroin))의 4가지 조건별로 실험을 행하였다.

먼저, 적정 pH를 구하기 위해 처리 온도(35°C), 처리 시간(2 hr), STMP 농도(100% o.w.f)를 고정시킨 후, 적정 pH를 구했으며, 온도, 시간, STMP 농도 순으로 적정 조건을 설정하였다.

**나. 인산화 정도 측정**

Fig. 2는 soy 단백질의 STMP-인산화 과정을 나타낸 것으로써, 인산화 정도는 인산화 반응의 결과로써 용액 내에 존재하는 pyrophosphate($P_2O_7^{-4}$)를 EDTA 적정법으로 측정할 수 있다.

인산화 반응이 끝난 견 피브로인 100 m*l* 용액을 trichloro acetic acid(10%, w/v)를 사용하여 pH 2 이하로 떨어뜨려 단백질을 침전시킨 후, 20,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 pyrophosphate를 함유한 상등액을 취하여 zinc acetate 용액 15 m*l*을 가했다. 그 후 3 N NaOH로 pH 3.8~3.9로 조절하여 pyrophosphate와 zinc ion이 결합된 zinc pyrophosphate 침전물을 얻었다.

Zinc acetate 용액은 16 g의 zinc acetate를 50 m*l* acetic acid에 가한 후, 증류수를 첨가하여 전체 용액을 400 m*l*로 만들었다.

Zinc pyrophosphate 침전물을 glass filter(G-4)로 분리하여 ammonia/ammonium chloride buffer(pH 10)에 용해시켰다(Flaschka *et al.*, 1969). 이 buffer 용액에 지시약(Eriochrome Black T)을 소량 넣고, 0.01 M EDTA 용액으로 적정하였다(Greenfield and Clift, 1975). 이 때 EDTA는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 pyrophosphate와 당량대 당량으로 결합하게 되며, 견 피브로인의 인산화 정도는 반응 가능한 총 아미노산의 몰에 대한 EDTA 몰 비로 나타내었다.

**다. 인산화된 견 피브로인 시료 준비**

견 피브로인 수용액을 적정 처리 pH, 온도, 시간으로 고정하고 STMP의 농도를 50, 100, 150 및 200%(o.w.f)로 하여 각각 인산화 반응을 시켰다. 반응이 끝난 후 원심분리-냉동건조하는 방법으로 분말을 제조하였다. 각 sample의 I.D.는 Table 1과 같다.

**라. 인 결합 위치 분석**

(1) Fourier transform-infrared(FT-IR) 분석

FT-IR 분석은 KBr-pellet 방법으로 4,000-500 $cm^{-1}$ 범위에서 BoMEM (Aride-Zone) FT-IR로 측정하였다.

(2) $^{31}P$ Nuclear magnetic resonance(NMR)

$^{31}P$ NMR 분석은 $H_3PO_4$(85%)을 external standard로 하고, 시료는 각각 0.05 g 견 피브로인/1 m*l* $D_2O$, 0.05 g 인산화된 견 피브로인/1 m*l* $D_2O$로 하여 pH 8.0로 조정하여 Table 2와 같은 조건으로 측정하였다(Matheis *et al.*, 1983).

$$P_2O_7^{-4} + \text{Protein} \xrightarrow[\text{Protein Removal}]{\text{TCA 10\%(pH<2)}} P_2O_7^{-4}$$

$$P_2O_7^{-4} \xrightarrow[\text{pH 3.8 - 3.9}]{\text{Zinc Acetate}} Zn_2P_2O_7 + 4CH_3COO^-$$

$$Zn_2P_2O_7 \xrightarrow[\text{pH 10}]{\text{Ammonia/ammonium chloride Buffer}} 2Zn^{+2} + P_2O_7^{-4}$$

$$\xrightarrow[2H_3In]{\text{Eriochrome Black. T}} 2ZnH_2In + 2H^+ + P_2O_7^{-4}$$

RED

$$\xrightarrow[HY_4]{\text{EDTA 0.01M}} Zn_2Y + 2\,HIn^{-2} + 8H^+ + P_2O_7^{-4}$$

BLUE

**Fig. 3.** Mechanism of EDTA titration in phosphorylated silk fibroin solution. ($H_3In$ : Eriochrome Black. T, $HY_4$ : EDTA)

**Table 1.** Sample I.D. of each phosphorylated silk fibroin

| Sample I.D. | Description |
|---|---|
| NP | Non-phosphorylation of silk fibroin |
| P50 | Phosphorylated silk fibroin treated by 50%(o.w.f) STMP |
| P100 | Phosphorylated silk fibroin treated by 100%(o.w.f) STMP |
| P150 | Phosphorylated silk fibroin treated by 150%(o.w.f) STMP |
| P200 | Phosphorylated silk fibroin treated by 200%(o.w.f) STMP |

**Table 2.** Operating Conditions for $^{31}P$ NMR analyzer

| Items | Conditions |
|---|---|
| Instrument | Varian, 300NB |
| Frequency | 121.478 MHz |
| Number of scan | Silk fibroin : 1000<br>Phosphorylated silk fibroin : 5000 |
| Tipping pulse | 80° |
| Repetition time | 2 seconds |

**마. 인산화된 견 피브로인의 특성**

(1) 탁도

인산화된 견 피브로인의 탁도는 1% 견 피브로인 용액(w/v)을 사용하여 UV-Vis spectrophotometer(DU-650, Beckman)로 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 용해도

용해도는 탁도 측정에 사용된 1% 용액을 원심분리(20,000 rpm, 20분)한 후, 10배 희석하여 자외선 영역의 최

대 흡수파장인 276 nm에서 UV-Vis spectrophotometer로 측정하여 흡광도를 용해도의 척도로 하였다.

(3) 거품 팽창성과 거품 안정성

Volumetric corning tube(15 m*l*)에 각 시료 0.05 g를 증류수 5 m*l*에 용해하여 shaker(150 rpm)로 shaking을 1분간 행한 후, 생긴 거품의 양을 측정하여 거품 팽창성으로 하고, 30분 뒤에 남은 거품의 양을 다시 측정하여 거품 안정성으로 하였다(Yasumatsu *et al.*, 1972). 실험은 3회 반복으로 이루어졌으며, 그 평균값을 취하였다.

(4) 유화력과 유화안정성

시료 0.7 g을 증류수 10 m*l*에 용해한 후, corn oil 10 m*l*을 가하고 Lab. stirrer로 1분간 혼합한 후 5분간 원심분리(3,200 rpm)하여 tube의 높이를 측정하였다. 유화력은 식(2)와 같이 tube의 유화 층의 높이를 전체 층의 높이로 나눈 값으로 하였다.

$$\text{Emulsifying properties} = \frac{\text{Height of emulsified layer}}{\text{Height of total layer}} \times 100(\%) \quad (2)$$

위의 시료를 80°C에서 30분간 가열한 후, 위와 같은 조건으로 다시 원심분리하고 tube의 높이를 측정하여 식(2)에 의해 구한 값을 유화안정성으로 하였다(Franzen and Kinsella, 1976).

## 결과 및 고찰

### 1. 인산화 반응

화학적 인산화 반응에서 인이 결합하는 위치는 식품단백질에 따라 달라진다. 인산화된 casein은 O-P 에스테르 결합 형태이고, 인산화된 β-lactoglobulin은 N-P 형태이다. lysozyme과 다른 단백질(ovalbumin과 protamin)에서는 N-P와 O-P의 결합형태가 동시에 나타난다(Matheis and Whitaker, 1984).

본 연구에 사용된 cyclic-STMP는 알칼리 상태에서 친수성이 강하고 dipeptide나 가교된 di-starch phosphate 합성시 아미노기와 수산기를 활성화시킨다고 한다(Rabinowitz, 1971).

알칼리 조건의 인산화 반응에서는 STMP와 1차 수산기인 serine의 반응이 2차 수산기인 threonine의 반응보다 선호하며, 인산화된 반응물은 안정한 O-phosphoserine이 형성됨과 동시에 동일한 양의 pyrophosphate가 생성 되고, lysine의 ε-아미노기는 인산화 되면 ε-N-lysinotriphosphoramidate를 형성시킨다(Fig. 2).

Fig. 4는 인산화 반응시 적정의 pH를 구하기 위해 pH

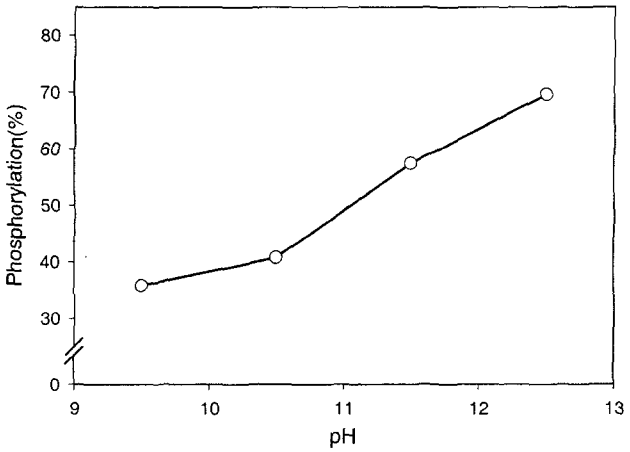


**Fig. 4.** Effect of pH on the phosphorylation of silk fibroin at 35°C, 2 hrs and 100%(o.w.f.) STMP.

9.5, 10.5, 11.5, 12.5에서 인산화 정도를 나타낸 그림으로써 pH 9.5에서 10.5까지는 조금씩 증가하다가 pH 10.5 이상에서는 급격하게 증가하였다. 이것은 Fig. 2의 인산화 반응식에서 알 수 있는 바와 같이 인산화 반응 결과로 생성된 $H^+$ 이온은 강알칼리 조건일수록 더 쉽게 제거될 수 있고, 따라서 인산화 정도가 더 크게 된다는 것을 나타낸다.

식품단백질이 알칼리 상태에서 가공 처리되면 인체에 유해한 lisinoalanine(LAL)을 생성하게 되는데, 알칼리도가 클수록 LAL이 더 많이 생성되는 것으로 알려져 있다.

Friedman 등(1984)은 soy protein으로 알칼리 가수분해시 생성되는 LAL에 대해 여러 가지 조건별로 실험을 행했는데, 처리 pH가 8이상에서는 LAL의 양이 서서히 증가하기 시작하여 처리 pH 12.5에서 가장 많이 생성되었고, 처리 온도가 25°C에서는 LAL이 조금씩 생성되기 시작하여 85°C일 때 최고치에 이르고, 처리시간은 10분부터 생성되어 처리 시간이 길수록 많이 생성된다고 보고하였다.

본 실험에서는 단백질의 알칼리 처리와 고온 및 장시간 처리시 생성되는 LAL을 최소화하는 조건과 인산화 정도를 함께 고려하여 적정처리 pH를 12로 하였다.

Fig. 5는 처리 온도에 따른 인산화 정도를 나타낸 것으로써 처리 온도가 높을수록 인산화의 정도는 증가되지만, LAL의 생성을 고려하여 적정 온도를 35°C로 하였다.

Fig. 6은 처리 시간을 0.5 hr에서 4 hr까지로 하였을 때의 인산화 반응의 정도를 나타낸 것으로써 1 hr 처리까지는 급격하게 증가하다가 1 hr 이후에는 서서히 증가하는 경향을 보여 비교적 단시간 내에 인산화가 많이 진행됨을 알 수 있었고, 적정시간은 2 hr로 하였다.

Fig. 7은 처리 pH, 온도 및 시간을 각각 고정하고, STMP 농도(o.w.f)에 따른 인산화 정도를 나타낸 그림으로써 전반적으로 STMP 농도가 증가할수록 인산화 정도도 증가

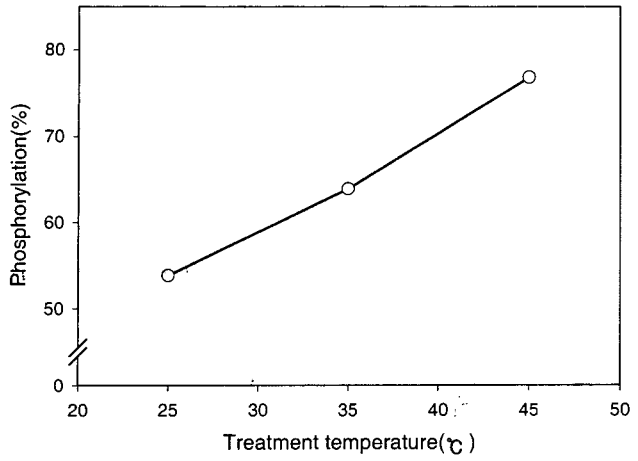


**Fig. 5.** Effect of treatment temperature on the phosphorylation of silk fibroin at pH 12, 2 hrs and 100%(o.w.f.) STMP.

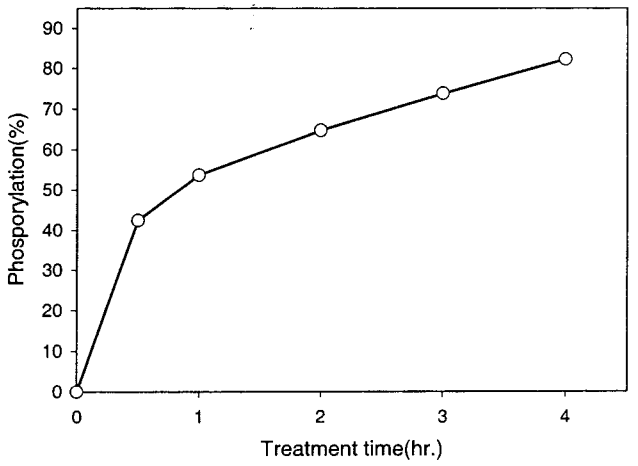


**Fig. 6.** Effect of treatment time on the phosphorylation of silk fibroin at pH 12, 35°C and 100%(o.w.f.) STMP.

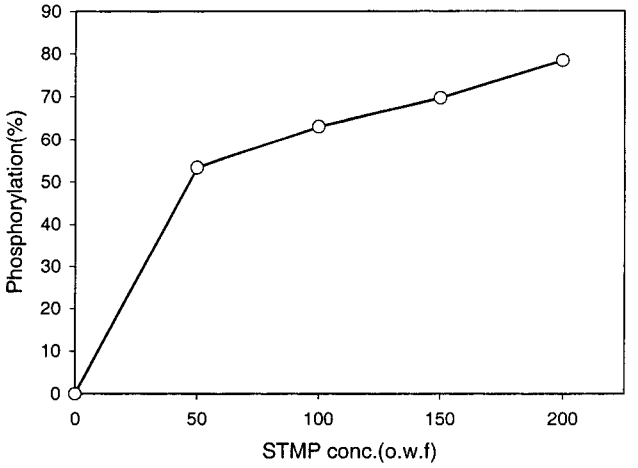


**Fig. 7.** Effect of STMP concentration on the phosphorylation of silk fibroin at pH 12, 35°C and 2 hrs.

되었고, STMP 농도 50%까지는 인산화가 급격히 이루어졌지만, 그 이상의 농도에서는 인산화의 증가 정도가 미약한 것으로 나타났다.

이러한 현상은 견 피브로인의 1차 수산기인 serine의 함량이 다른 아미노산보다 많으므로 serine에 인산화가 일어나는 phosphoesterification이 우선적으로 일어난 다음 함량이 적은 2차 수산기에의 phosphoesterification 혹은 phosphoramidation 반응이 일어난 결과라고 고찰된다.

한편, sung 등(1983)은 soy protein은 인산화 반응시 수산기에 지배적으로 인산 에스테르화가 일어나는 것이 가능하며, lysine의 인산화 반응으로 생성된 phosphoramidation 반응물은 알칼리 상태에서 ε-아미노기의 작용으로 생성되는 lysinoalanine을 일시적으로 방지하는 효과가 있을 것이라고 보고하였다.

## 2. 인산화된 견 피브로인의 인 결합 분석

인산화 반응 결과로 인은 특정부위에 결합하게 되는데 이 결합 위치의 분석방법에는 (i) 인 결합의 pH 안정성에 의한 O-P, N-P의 구분, (ii) 반응기(수산기, 타이로실, 아미노, 이미다졸, 구아디노, 카르복실과 술포히드릴기 뿐만 아니라 펩티드 결합)의 손실 분석, (iii) 아미노산의 분석, 그리고 (iv) $^{31}P$ NMR spectroscopy가 있다(Matheis and Whitaker, 1984). 본 연구에서는 견 피브로인의 인산화 반응 위치를 규명하기 위해 FT-IR분석과 $^{31}P$ NMR spectroscopy를 행하였다.

### 가. FT-IR 분석

견 피브로인의 FT-IR spectra는 실크의 미세구조 정보를 얻기 위한 수단으로 일찍부터 활용되어 왔으며, amide I, II, III와 V 밴드는 각각 1,700 – 1,600 $cm^{-1}$, 1,570 – 1,500 $cm^{-1}$, 1,300 – 1,200 $cm^{-1}$와 700 – 630 $cm^{-1}$에서 나타난다고 하였다(Bae, 1988).

Amide I은 stretching(υC=O), amide II는 bending(δN-H), amide III는 stretching(υC-N), 그리고 amide V는 bending (δN-H) 운동을 나타내는 것으로써, 이들 peak의 위치에 따라 견 피브로인의 구조적인 특성들이 나타나는데, Kondo 등(1967)은 α-helix 구조의 amide I, II, V의 peak는 각각 1,650, 1,545, 620 $cm^{-1}$에서, random coil은 1,655, 1,535, 650 $cm^{-1}$에서, β-sheet는 1,630, 1,530, 690 $cm^{-1}$에서 나타난다고 보고하였다.

Fig. 8은 견 피브로인과 인산화된 견 피브로인의 FT-IR spectra로 amide I과 II의 peak가 각각 1,651과 1,540 $cm^{-1}$에서 나타나므로 α-helix에 가까운 형태로 고려된다. 그리고, 인산화가 진행되더라도 amide I과 II의 peak는 shift가 일어나지 않는 것을 알 수 있다.

이러한 사실을 확실히 하기 위하여 각각의 spectra에서

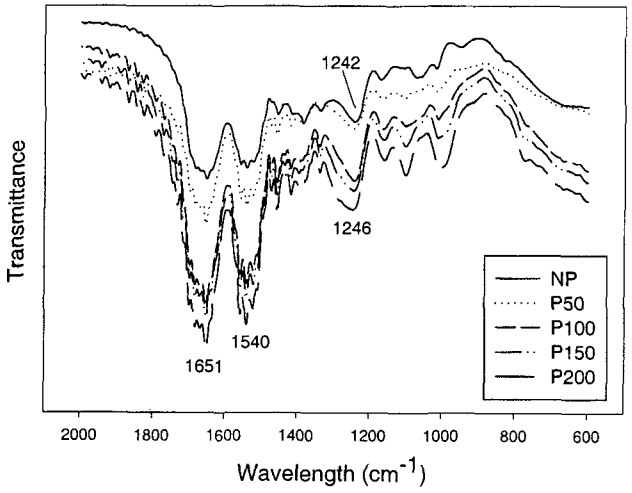


**Fig. 8.** FT-IR spectra of silk fibroin and phosphorylated silk fibroins from 2,000 $cm^{-1}$ to 600 $cm^{-1}$.

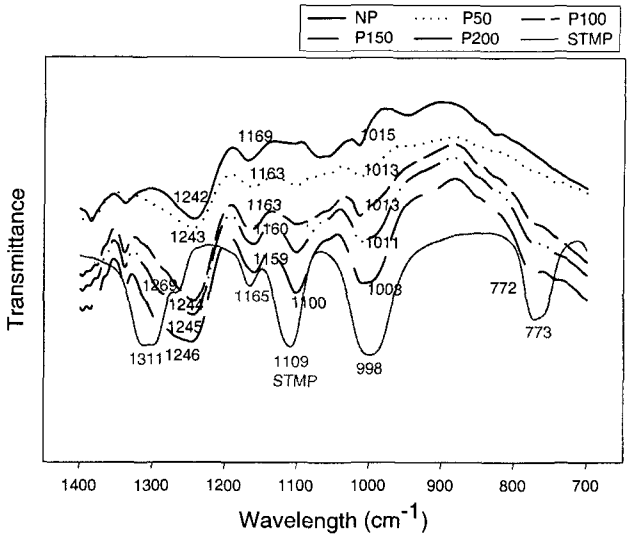


**Fig. 9.** FT-IR spectra of silk fibroin, phosphorylated silk fibroins and STMP from 1,400 $cm^{-1}$ to 700 $cm^{-1}$.

**Table 3.** The relative values of amide I and II on FT-IR spectra (baseline method)

| Band | Sample[1)] | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | NP | P50 | P100 | P150 | P200 |
| Amide I | 109.0 | 115.0 | 122.4 | 122.8 | 113.2 |
| Amide II | 79.0 | 87.0 | 91.0 | 90.7 | 86.4 |
| Amide II/I | 0.72 | 0.76 | 0.74 | 0.74 | 0.76 |

[1)]refers to Table 1.

바탕선법(base line method)으로 amide I과 II의 peak를 정량적으로 분석하여 그 비를 Table 3에 나타내었다. amide II/I의 값은 큰 차이가 없어 아미노기에 의한 인산화 반응(phosphoramidation)이 주반응은 아니라고 고려되었다.

한편, amide III band의 peak는 NP 시료가 1,242 $cm^{-1}$에서 나타나는 것에 비해 인산화가 진행될수록 왼쪽으로 약간 shift되어 P200의 경우에는 1,246 $cm^{-1}$에서 peak가 나타났고, 또한 NP에서는 나타나지 않았던 shoulder도 점점 뚜렷하게 나타났다.

이러한 현상을 좀 더 자세히 알아보기 위해 Fig. 9에서는 Fig. 8의 1,400 $cm^{-1}$ – 700 $cm^{-1}$의 범위의 FT-IR spectra를 자세히 나타내었고, STMP의 FT-IR spectra도 같이 나타내었다. STMP의 FT-IR spectra에서 인을 함유하는 특징적인 peak는 1,311[υ(P=O)], 1,269[υ(P=O)], 1,165[υ(P=O)], 1,109[υ(P=O)], 998[υ(C-O)]과 773 $cm^{-1}$[υ(P-O)]이었다(Nyquist and Kagel, 1977; Corbridge, 1995; Nyquist and Potts, 1972).

1,246 – 1,242 $cm^{-1}$ 부근의 amide III peak는, STMP의 인에 의한 1,269 $cm^{-1}$의 특징적인 peak가 견 피브로인-인 형태로 결합된 시료에 나타나 shoulder를 생성한 것으로 사료된다. NP 시료의 에스테르 band는 1,300 – 1,200 $cm^{-1}$ 사이에 존재하므로, 인산화된 시료의 이 부근의 peak는 amide III, 에스테르 band 및 견 피브로인에 인이 결합된 형태의 peak가 중첩되어 나타나게 되어 인 결합 위치를 알기에는 어려운 상황이다.

한편, NP 시료의 spectra에서는 나타나지 않았던 특징적인 peak가 인산화가 진행됨에 따라 1,100 $cm^{-1}$와 772 $cm^{-1}$에서 출현함을 확인할 수 있었다.

1,100 $cm^{-1}$에서의 peak는 Nyquist와 Kagel(1977), Corbridge (1995)는 R-O-P와 ϕ-O-P의 υ(P=O)가 1,380 – 1,080 $cm^{-1}$ 부근에서 강한 peak가 나타난다는 보고와 같이 R(ϕ)-O-P 형태의 υ(P=O)에 의한 것이라고 생각된다.

그리고, 772 $cm^{-1}$의 peak는, 인을 함유한 유기화합물의 특징적인 peak가 R-O-P와 ϕ-O-P 형태에서 υ(C-O)가 각각 1,080 – 980 $cm^{-1}$, 1,260 – 1,180 $cm^{-1}$에서, υ(P-O)가 각각 860 – 770 $cm^{-1}$, 980 – 900 $cm^{-1}$에서 나타난다는(Nyquist and Potts, 1972; keller, 1986) 보고와 같이, 인산화 반응 결과로 생성된 R-O-P 형태의 υ(P-O)에 기인한 것으로 보여진다.

NP 시료에서는 υ(C-O)에 기인한 것으로 보여지는 peak가 1,015 $cm^{-1}$에서 나타났는데 인산화가 진행될수록 shoulder를 생성함과 동시에 오른쪽으로 shift됨을 알 수 있다. 이것은 인산화 됨에 따라 998 $cm^{-1}$에서의 인의 특징적인 peak의 영향으로 생각된다.

이를 확실히 하기 위하여 인산화된 시료의 IR-spectra data를 NP 시료의 IR-spectra data로 나눈 값들을 도시하여 Fig. 10에 나타내었다.

그림에서 알 수 있듯이 1,010 $cm^{-1}$ 부근의 shoulder는 사

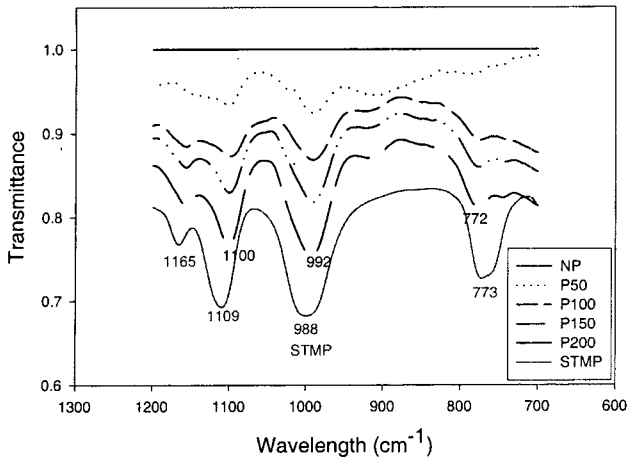


**Fig. 10.** FT-IR spectra of silk fibroin, phosphorylated silk fibroins and STMP from 1,200 $cm^{-1}$ to 700 $cm^{-1}$.

라지고, 992 $cm^{-1}$에서 강한 peak를 나타내고 있다. 이것은 인산화 반응 결과로 견 피브로인에 결합되어 있는 인의 특징적인 peak만 남아서 보여지는 것으로 생각된다.

1,165 $cm^{-1}$에서의 약한 peak도 같은 현상으로 보여지며, Nyquist와 Kagel(1977)은 P-NHR의 형태의 특징적인 인 peak는 δ(N-H)는 1,570 – 1,360 $cm^{-1}$, υ(C-N)은 1,210 – 1,090 $cm^{-1}$, υ(P-N)은 990 – 780 $cm^{-1}$에서 나타난다는 결과 보고로 볼 때, 인산의 반응 결과 O-P 형태뿐만 아니라 N-P 형태로도 결합이 이루어진다는 것을 알 수 있다.

이상의 FT-IR spectra 결과에서 인산화는 R-O-P, ϕ-O-P 두 가지 형태 모두 가능하고, 아미노기에서는 반응이 일어나지 않지만 N-P 형태도 가능하다고 보여진다.

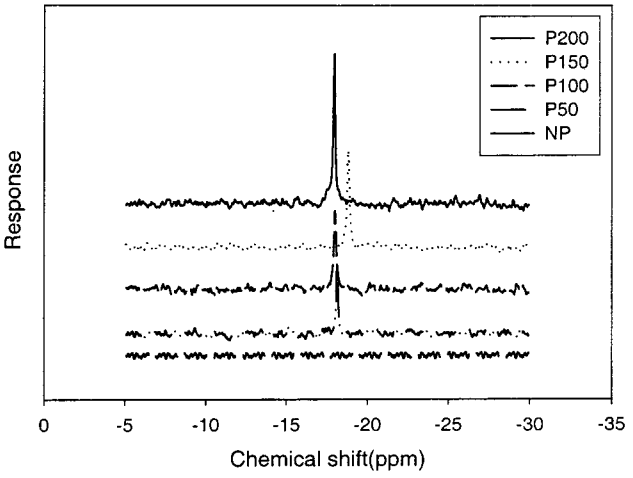


**Fig. 11.** $^{31}P$ NMR spectra of silk fibroin and phosphorylated silk fibroins at pH 8.0 and room temperature. $H_3PO_4$ (85%) was the external standard. The number of scans were 1000 for silk fibroin and 5000 for phosphorylated silk fibroin.

### 나. $^{31}P$ NMR 분석

Fig. 11은 각 시료의 $^{31}P$ NMR spectra를 나타낸 것으로서, NP 시료의 경우 $^{31}P$ peak가 나타나지 않았으며, 인산화된 시료들의 chemical shift는 −17.950~−18.822 ppm 범위에서 일어났다. $^{31}P$ NMR 분석에서 polyphosphate의 비말단 phosphate는 −17.4~−22.5 사이에서 chemical shift가 나타난다고 하는 보고를 고려하면(Matheis *et al.*, 1983), 견 피브로인과 인의 결합은 monophosphate 뿐만 아니라 polyphosphate 형태의 결합도 존재한다는 것을 시사하고 있다.

## 3. 인산화된 견 피브로인의 특성

### 가. 탁도

Fig. 12는 인산화 정도에 따른 탁도 변화를 나타낸 것으로써 인산화 정도가 증가할수록 탁도도 증가하였다.

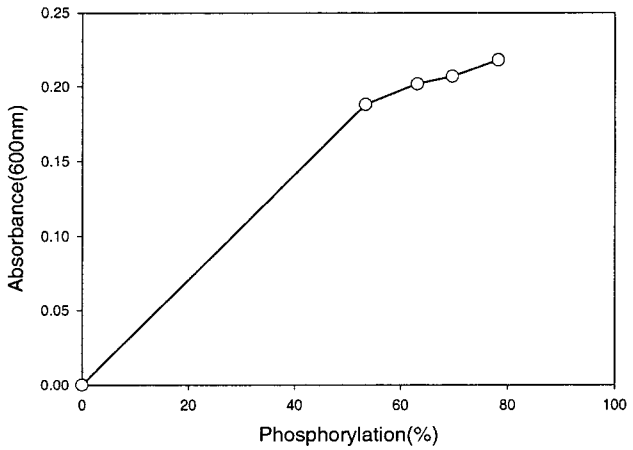


**Fig. 12.** Effect of phosphorylation on the turbidity of silk fibroin. Each sample was 1% solution(w/v).

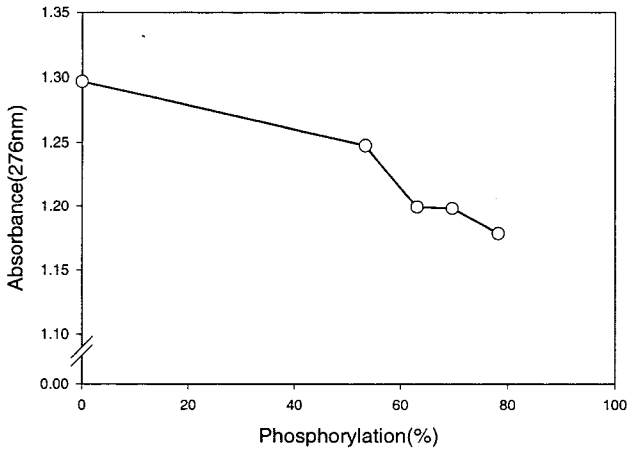


**Fig. 13.** Effect of phosphorylation on the UV-absorbance of silk fibroin. Each sample was 0.1% solution(w/v) after centrifuging at 20,000 rpm for 20 min.

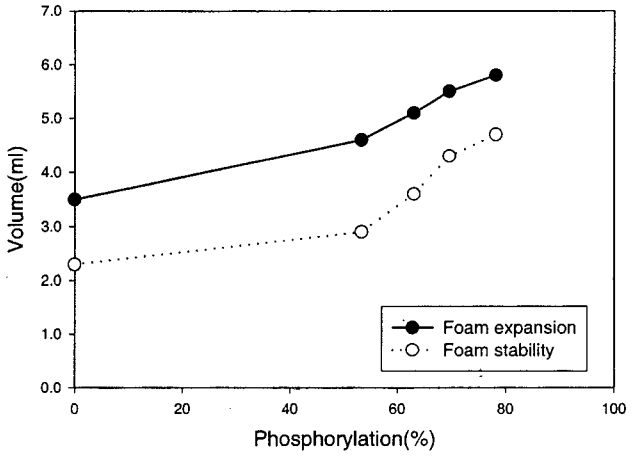


**Fig. 14.** Effect of phosphorylation on the foam expansion and foam stability of silk fibroin.

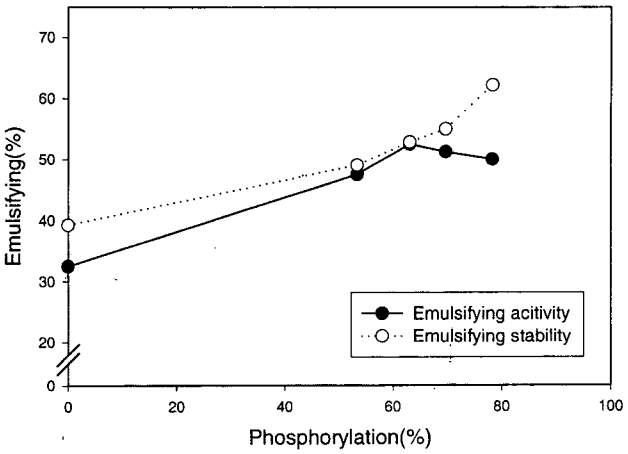


**Fig. 15.** Effect of phosphorylation on the emulsifying activity and emulsifying stability of silk fibroin.

이것은 인 결합에 따른 회합성이 증가되어 탁도를 증가시키는 원인으로 고찰되었다.

**나. 용해도**

Fig. 13은 탁도 시험에 사용된 용액을 원심분리하여 상등액을 시료로 하여 용해도를 나타낸 것으로써 인산화가 63% 된 시료 P100까지는 용해도가 급격히 감소하다가 그 이상의 시료에서는 서서히 감소하는 경향을 보여 인산화 정도가 증가할수록 용해도도 감소하였다.

**다. 거품 팽창성과 거품 안정성**

Fig. 14는 각 시료의 거품 팽창성과 거품 안정성을 나타낸 것으로써 인산화가 많이 될수록 거품 팽창성 및 거품 안정성은 계속적으로 증가하는 것으로 나타났다. 일반적으로 인산화는 음전하의 도입으로 단백질의 탁도와 거품 팽창성과 거품 안정성을 증가시킨다고 보고되고 있다 (Schwenke, 1997).

이러한 이유로써, Kinsella(1981)는 단백질 용액의 표면층에 이웃하는 거품 사이의 정전기적 반발력에 의해 거품팽창성과 거품안정성이 증가되며, 인접한 거품은 표면층에서 단백질의 엉김을 최소화하기 위해 임계거리에서 정전기적 반발력에 의해서 서로 떨어져 있다고 보고하였다. 실제로, $POCl_3$와 STMP로 처리된 soy 단백질과 yeast 단백질에서는 거품성이 크게 증가되었다고 보고되고 있다 (Matheis and Whitaker, 1984). 인산화된 견 피브로인은 무처리 시료에 비하여 거품성은 1.6배, 거품안정성은 2배가 증가되었다.

**라. 유화력 및 유화 안정성**

Fig. 15는 각 시료의 유화력과 유화안정성을 나타낸 것으로 시료 P100(인산화가 63% 됨.)이 유화력이 가장 좋았으며, 그 이상에서는 약간 감소하는 경향이었고, 유화안정성은 인산화가 많이 될수록 계속적으로 유화력이 증가되었다.

이러한 현상은 거품 팽창성과 거품 안정성에서 설명한 바와 같은 이유 때문인 것으로 생각된다.

견 피브로인의 유화력은 최고 18%, 유화안정성은 21%가 증가되었다.

이상으로 견 피브로인을 인산화 반응 조건별로 실험을 행하여 적정 조건을 구하였으며 기기분석을 통하여 견 피브로인 중의 특정 아미노산과 인의 결합 부위 및 형태에 대해 고찰하였고, 인산화에 따른 제 물성의 변화를 비교 검토하였다.

## 적 요

STMP로 견 피브로인을 인산화 시키는 반응에서, 처리 조건별로 실험하여 적정 조건을 구하였고, 인이 결합되는 위치를 규명하기 위해 FT-IR과 $^{31}P$ NMR 분석을 행했고, 인산화된 견 피브로인의 특성을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 견 피브로인을 STMP로 인산화 시킬 때, 알칼리도가 클수록, 처리 온도가 높을수록 인산화 정도가 증가되었다.

2. 처리시간에 따른 인산화 정도는 1 hr까지는 급격하게 증가하였고, 1 hr 이후에는 서서히 증가되어 비교적 단시간에 인산화가 많이 진행되었다.

3. STMP 농도에 따른 인산화 정도는 50%까지는 급격히 증가되지만, 100% 이상에서는 증가가 미약하였다.

4. 인산화된 견 피브로인의 FT-IR 분석에서, 각 시료는 α-helix에 가까운 형태이었고, 아미노기에 의한 인산화 반응(phosphoramidation)은 고려되지 않았다.

5. $^{31}P$ NMR 분석 결과에서는 인산화가 polyphosphate 형태로 되어 있다는것을 알 수 있었다.

6. 인산화가 많이 될수록 탁도와 거품팽창성, 그리고 거품안정성은 증가하였으며, 용해도는 오히려 감소하였다. 무처리 시료에 비해 거품팽창성은 1.6배, 거품안정성은 2배로 증가하였다.

7. 유화력는 시료 P100까지는 증가되다가 그 이상에서는 약간 감소하는 경향으로 나타났으며, 유화안정성은 인산화 정도가 많이 될수록 증가하였다. 유화력은 최고 18%, 유화안정성은 21%가 증가되었다.

## 참고문헌


Bae, D. G., Studies on the sorption and permeation of acid dyes through silk fibroin membrane, *Doctor degree of seoul national university*, 1988.

Bell, R. N., sodium metaphosphates, *Inorganic Syntheses*, edited L. F. Audreith and J. C. Bailer v.3, McGraw-Hill book co, New York, 103-106, 1950.

Chen, K., Takano, R., and Hirabayashi, K., The factors related to solubility of fibroin peptides, *J. Seric. Sci. Jpn.*, 132-136, 1993.

Corbridge, D. E. C., Analysis and Characterization, *Phosphorus An outline of its chemistry, Biochemistry and Technology*, Fifth edition, Elsevier science, England, 1140-1146, 1995.

Flaschka, H. A., Barnard, A. J., and Sturrock, P. E., EDTA titrations, *Quantitative Analytical Chemistry*, Vol. 2, N.Y.A Barnes & Noble Books, 137-147, 1969.

Franzen, K. and Kinsella, J., Functional properties of succinylated and acetylated soy protein, *J. Agric. Food Chem.*, 788-795, 1976.

Friedman, M., Levin, C. E., and Noma, A. T., Factors governing lysinoalanine formation in soy proteins, *J. Food Sci.*, 1282-1288, 1984.

Greenfield, S. and Clift, M., *Analytical chemistry of the condensed phosphates*, Pergamon press, 63, 1975.

岸体 康, 生命を作る物質, 220-226, 講談社, 東京, 220-226, 1973.

Keller, R. J., *The sigma library of ft-ir spectra Edition 1.*, Sigma chemical company, INC., 1515-1547, 1986.

Kinsella, J. E., Functional properties of proteins: possible relationships between structure and function in foams, *Food Chemistry*, 273, 1981.

北條舒正 編, 續絹絲の化學, 294-295, 1980.

Kondo, Y., Hirabayashi, K., Iziuka, E., and Go, Y., Studies on the fine structure of silk fibroin (III) Conformation of the presence of α-helical conformation in Antheraea pernyi silk fibroin, *Sen-i Gakkaishi*, 311-315, 1967.

Matheis, G. and Whitaker, J. R., Chemical phosphorylation of food proteins: an overview and a prospectus, *J. Agri. Food Chem.*, 699-705, 1984.

Matheis, G., Phosphorylation of food proteins with phosphorus oxychloride-improvement of functional and nutritional properties: a review, *Food Chemistry*, 13-26, 1991.

Nyquist, R. A. and Kagel, R. O., *Organic Materials, Infrared and Raman Spectroscopy Part B*, Edited E. G. Brame, Jr. and J. G. Grasselli, Marecl Dekker, INC., New York and Basel., 514-521, 1977.

Nyquist, R. A. and Potts Jr, W. J., Chapter 5. vibrational spectroscopy of phosphorus compounds, *Analytical of phosphorus compounds*, edited M. M. Halmann, Wiley-intersiceince, New York, 189-293, 1972.

박영환, 견 피브로인을 이용한 최근소재개발 동향, *Korean J. Seric. Sci.*, 203-212, 1998.

Pass, G. and Sutcliffe, H., The preparation of sodium trimetaphosphate, *Inorganic Chemistry, preparations, reactions and instrumental methods*, Chapman And Hall, London, 23, 1968.

Patent : JP 07-179776.

Patent : JP 07-267822.

Rabinowitz, J., The mechanism of the trimetaphosphate-induced peptide synthesis, *Tetrahedron* 27 : 1205, 1971.

Schwenke, K. D., Enzyme and chemical modification of proteins, *Food proteins and their applications*, edited S. Damodaran and A. Paraf, Marcel Dekker, New York, 393-423, 1997.

Sugiyama, K., Kushima, Y., and Muramatsu, K., Effects of sulfur-containing amino acids and glycine on plasma cholesterol level in rats fed on a high cholesterol diet, *Agri. Biol. Chem.*, 3455-3461, 1985.

Sung, H., Chen, H., Liu, T., and Su, J., Improvement of the functionalities of soy protein isolate through chemical phosphorylation, *J. Food Sci.*, 716-721, 1983.

Yasumatsu, K., Sawada, K., Moritaka, S., Misaki, M., Toda, J., Wada, T., and Ishii, K., Whipping and emulsifying properties of soybean products, *Agric. Biol. Chem.*, 719-727, 1972.