

Calcium Nitrate/에탄올 혼합 용액에 의한 작잠견사(繭絲)의 용해

이광길 · 조유영 · 여주홍 · 이희삼 · 김기영 · 박광영 · 권혜용*
농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과

Dissolution of *Antheraea pernyi* raw silk with calcium nitrate ethanol solution

Kwang-Gill Lee, You-Young Jo, Joo-Hong Yeo, Heui-Sam Lee,
Kee-Young Kim, Kwang-Young Park, HaeYong Kweon*

Sericultural & Apicultural Materials Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-853, Republic of Korea

ABSTRACT

Antheraea pernyi silkworm is one of typical wild silkworms, which spins a tawny color cocoon. The cocoon has been used as a resource for textile material due to strong chemical stability and good mechanical properties. In this study, to increase the solubility efficiency of *A. pernyi* silk fibroin, the composition of dissolution solvent were examined. Calcium chloride tertiary system, normally used for dissolution of *Bombyx mori* silk fibroin, does not act on *A. pernyi* silk fibroin. Calcium nitrate system dissolves *A. pernyi* silk fibroin, and calcium nitrate ethanol system do more easily than calcium nitrate system. Amino acid composition of *A. pernyi* silk fibroin obtained after dissolution is mainly composed of alanine, glycine, and serine. *A. pernyi* silk fibroin would be used for non-textile applications near future.

Key words : *Antheraea pernyi*, Dissolution, Calcium nitrate

서 론

작잠(*Antheraea pernyi*)은 가잠(*Bombyx mori*)과 더불어 대표적인 섬유 곤충으로 알려져 있다. 작잠사는 천잠사, 에리잠사 등과 더불어 대표적인 야잠사의 한 종류로 오랜기간 동안 고급 의복용 소재 뿐 아니라 수술용 봉합사로 사용되어 왔다. 최근 들어 작잠 실크단백질이 세포배양(Luan et al. 2006), 조직공학용 지지체(Zhao et al. 2011) 등 생체에 적용하기에 적합한 특성을 가지고 있는 것으로 밝혀지고 있다. 그러나 작잠견사는 가잠견사에 비해 화학약품에 대한 안정성이 우수하여 일반적인 용매에 용해되지 않을 뿐 아니라 염산과 같은 강산에 대한 가수분해 저항성도 높다고 보고되어 있다(Kweon et al. 1998).

작잠 실크단백질은 포유동물의 세포 인식 부위로 알려진 arg-gly-asp tripeptide sequence를 가지고 있는 것으로 알려져 있어(Ruoslahti & Pierschbacher 1986, Minoura et al. 1995) 생체조직공학용 scaffold로서의 응용 가능성도 높을 것으로 기대됨에도 불구하고 작잠 견피브로인을 이용한 소재 개발 연구 보고는 그다지 많지 않다. 그 이유

는, 작잠 견피브로인의 구조가 화학적으로 안정되어 있기 때문에 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, 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 견피브로인필름의 구조 특성이 견사선에서 추출한 작잠 견피브로인과 유사함을 보고하였다. 또한 염화아연과 질산아연을 사용한 작잠견사의 용해조건을 구명하고 제조한 재생작잠 견 피브로인 분말은 β -sheet 구조임을 밝혔다(Kweon et al. 2002, Kweon et al. 2003). 이와같이 작잠견사의 용해 및 물리적 성질

*Corresponding author. E-mail: hykweon@korea.kr

등에 대한 기초적인 연구가 최근 몇몇 연구자들에 의하여 활발하게 진행되고 있어 향후 작잠 견피브로인의 실용화 소재 개발 연구 등에 크게 기여할 것으로 기대된다.

본 연구에서는 작잠 견피브로인을 활용하기 위한 기초 연구의 일환으로 작잠견사를 질산칼슘 혼합용액 처리에 의한 작잠견사의 용해 거동을 살펴보고 얻어진 재생 작잠 견피브로인의 아미노산 조성을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

1. 작잠견사의 정련

작잠고치실은 알칼리 정련법에 의하여 정련하였다. 정련은 육비 1:50의 조건에서 Na_2CO_3 2.5 g/l 용액으로 95~100°C에서 30분간 처리한 후 미지근한 물로 세척하는 과정을 3회 반복 수행하였다. 정련 후 연감율은 처리 전 무게와 정련 처리후 무게를 측정하여 아래 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{연감율}(\%) = \frac{\text{정련전 작잠견사의 무게} - \text{정련후 작잠견사의 무게}}{\text{정련전 작잠견사의 무게}} \times 100$$

2. 작잠견사의 용해

작잠견사를 용해시키기 위하여 염화칼슘 : 에탄올 : 물 = 1 : 8 : 2 혼합용액과 $\text{Ca}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$:ethanol 혼합용액을 사용하였다. 먼저, 작잠견사의 적절한 용해제 선별을 위하여 작잠견사 1g을 1 시간 동안 각각 염화칼슘 에탄올 수용액과 질산칼슘수화물의 용용액을 사용하여 처리 온도에 따른 용해되는 정도를 분석하였다. 용해되는 시스템내의 변화를 주기 위하여 질산칼슘수화물에 에탄올을 첨가하여 용해되는 정도를 측정하였다. 용해제의 혼합 비율과 온도 등 용해 조건에 따른 용해도 측정은 처리 전 작잠견사의 무게(W_1)와 처리한 후에 남아있는 불용물을 부직포를 사용하여 여과한 후 충분히 수세하여 불용물의 무게(W_2)를 측정하여 다음 식에 의하여 작잠견사의 용해도를 계산하였다.

$$\text{용해도}(\%) = \frac{\text{처리전 작잠견사의 무게} - \text{처리후 불용물의 무게}}{\text{처리 전 작잠견사의 무게}} \times 100$$

3. 아미노산 조성 분석

아미노산 조성 분석은 Pico Tag System (Waters, USA)

를 사용하였다. 먼저 40 mg의 시료를 채취하여 vial에 담고 6 N 염산 15 ml를 가하여, 시험관의 산소 등을 질소로 치환한 후 105°C 오븐에서 20시간동안 가수분해하였다. 가수분해된 작잠 견사 용액으로부터 50 ul를 취하여 Pico Tag의 표준방법에 의하여 PTC-amino acid 유도체를 제조하여 분석용 시료로 사용하였다. 분석에 사용한 이동상 용액은 A 용액은 sodium acetate trihydrate 19.5 g, triethylamine 550 ul, 1l milli Q water를 혼합한 후 인산을 사용하여 pH 6.4로 고정하여 제조한 용액 935 ml와 CH_3CN 65 ml를 혼합하여 제조하였다. B 용액은 60%의 CH_3CN 을 그대로 사용하였다.

결과

작잠견사를 알칼리 정련법에 의하여 정련한 결과(Table 1) 작잠견사의 연감율은 16.8%로 측정되어, 가잠사의 연감율(25.4%)와 차이가 있었다.

작잠견사와 가잠견사 각각 1g을 1 hr동안 염화칼슘 에탄올 수용액을 사용하여 처리 온도에 따른 용해도를 측정 한 결과(Fig. 1) 가잠견사는 저온인 80°C에서도 거의 100% 용해되어 잔사가 관찰되지 않았으나 작잠견사는 거의 용해되지 않는 것으로 나타났다. 질산칼슘수화물 용용액에서의 용해도를 측정 한 결과(Fig. 2) 가잠견사는 수 분 내로 용해되는 것으로 확인되었으나 작잠견사는 80°C에서는 10% 내외가 용해되었으며 그 이후 처리 온도가 증가함에 따라 용해도가 증가하여 용해온도 100°C 이상에

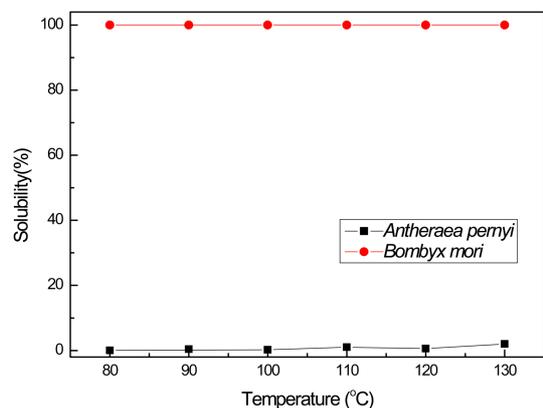


Fig. 1. Effect of temperature of calcium chloride solution on the solubility of *Antheraea pernyi* silk fiber for 1 h.

Table 1. Degumming loss percentage of *Antheraea pernyi* silk fiber

Materials	degumming ratio (%)	Reference
<i>A. pernyi</i> raw silk fiber	16.8	This study
<i>A. pernyi</i> silkworm cocoon	17.1	Shin et al. (2012)
<i>Bombyx mori</i> (BaegOkJam) fiber	25.4	Kweon et al. (2012)

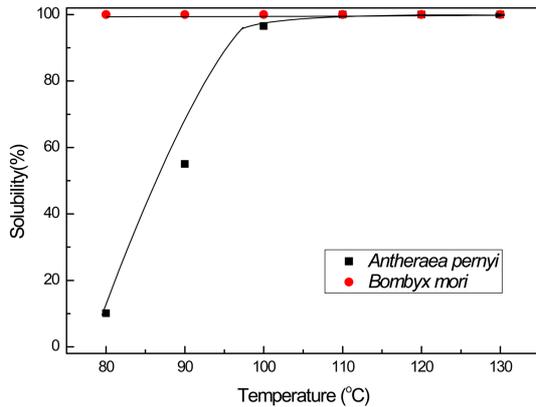


Fig. 2. Effect of temperature on the solubility of *Antheraea pernyi* silk fiber treated with molten calcium nitrate hydrate for 1 h.

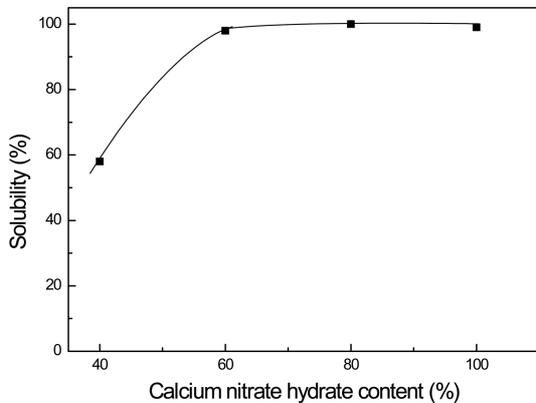


Fig. 3. Effect of calcium nitrate hydrate and ethanol ratio on the solubility of *Antheraea pernyi* silk fiber treated at 90°C for 1 h.

서 95% 이상의 용해율을 보였다.

질산칼슘과 EtOH 혼합비에 따른 작잠견사의 용해율의 변화를 확인하기 위하여 90°C에서 1시간 동안 처리한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 질산칼슘의 농도가 40%인 경우에는 58.7%의 용해도를 보인 반면 60% 이상 경우에는 거의 100% 용해되었다. 용해제 조성별 처리 시간에 따른 작잠견사의 용해도 곡선은 Fig. 4에 나타내었다. 질산칼슘($\text{Ca}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 100 g을 100 mL의 에탄올과 혼합한 저농도의 용해조건에서는 처리시간 2시간이 경과하여도 70%에 미치지 못하는 용해도를 보였으나, 300 g 이상의 질산칼슘을 녹인 경우에는 2시간 경과 후 거의 대부분 용해되는 현상이 확인되었다.

작잠 실크단백질의 아미노산 조성을 분석하여 Table 2에 나타내었다. 작잠견사를 용해하여 얻은 작잠 견단백질의 주요 아미노산 조성은 글리신(34.4%), 알라닌(34.0%), 세리신(12.1%)로 구성되어 있었고, 작잠정련사의 주요 아미노산 조성은 알라닌(37.3%), 글리신(30.2%), 세리신(12.4%) 순으로 구성되어 있었다. 반면, 가잠 고치를 강한

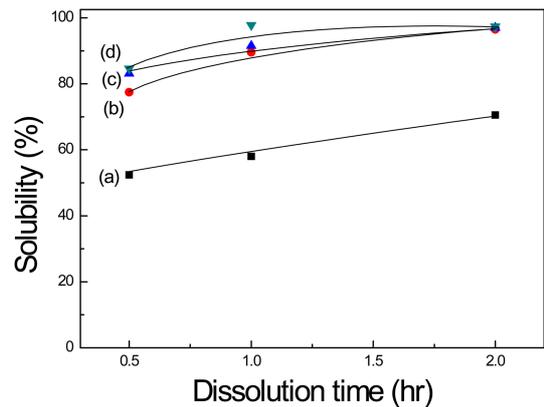


Fig. 4. Solubility curves of *Antheraea pernyi* silk fiber treated with calcium nitrate hydrate and ethanol mixed solution; (a) 100 g calcium nitrate hydrate/100 ml ethanol, (b) 200 g calcium nitrate hydrate/100 ml ethanol, (c) 300 g calcium nitrate hydrate/100 ml ethanol, and (d) 400 g calcium nitrate hydrate/100 ml ethanol.

Table 2. Amino acid composition of *Antheraea pernyi* silk protein

amino acid	<i>A. pernyi</i> degummed fiber	<i>A. pernyi</i> dissolved fibroin	<i>B. mori</i> acid powder
asp	5.1	6.2	2.9
glu	0.9	1.2	2.5
ser	12.4	12.1	18.0
gly	30.2	34.4	43.7
his	0.4	0.2	0.4
arg	3.2	2.9	0.7
thr	0.6	0.4	-
ala	37.3	34.0	26.0
pro	-	0.1	2.0
tyr	6.7	5.8	0.3
val	1.0	0.6	-
met	-	0.8	-
ile	0.4	0.5	0.7
leu	0.4	0.6	0.6
phe	1.4	-	0.2
lys	0.2	0.4	0.9

무기산으로 처리하여 제조한 실크 분말은 글리신(43.7%), 알라닌(26.0%), 세리신(18.0%)의 주요 조성을 나타내었다.

고 찰

1. 작잠견사의 정련

작잠은 산누에나방과에 속하는 대표적인 섬유 곤충으로 주로 중국, 한국, 일본 등에서 서식한다. 참나무 잎을 먹

는 작잠은 타원형의 담갈색 고치를 짓고 고치 표면은 참나무 잎이 묻어 있어 섯자리고치를 연상하게 된다(Shin et al. 2012). 작잠고치로 만든 작잠 견사(繭絲)는 가잠사와 더불어 가장 많이 사용되는 실크의 한 종류이다. 누에고치는 실크의 주성분인 피브로인과 교질상의 세리신으로 구성되어 있으며, 대개 섬유로 사용되는 고치실(繭絲)은 정련을 통하여 교질성 물질인 세리신을 제거한다. 작잠견사를 알칼리 정련법에 의하여 정련한 결과 (Table 1) 작잠견사의 연감율은 16.8%로 확인되었으며, 이는 작잠고치(17.1%), 가잠사(25.4%) 보다 낮은 값을 나타내었다 (Shin et al. 2012, Kweon et al. 2012). 작잠은 가잠과는 종속이 다른 곤충으로 세리신의 함량이 가잠에 비하여 낮은 특성이 있다. 작잠견사가 작잠고치에 비하여 세리신의 함량이 조금 낮은 것은 제사과정에서 물에 잘 녹는 세리신의 일부가 제거되었기 때문일 것으로 생각된다.

2. 작잠견사의 용해

작잠 누에고치는 소수성 아미노산인 알라닌이 많은 특이한 아미노산 조성을 가지고 있을 뿐 아니라(Kweon and Park 1994) 젠티식산(gentisic acid)과 실크단백질이 결합되어 있어(Tao et al. 1993) 화학적인 안정성이 강한 특성이 있다(Kweon et al. 1998). 최근에 LiSCN, $\text{Ca}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 등 차오토르픽염(chotropic salt)을 사용하면 작잠견사를 용해시킬 수 있다고 연구 결과가 보고되고 있으나(Tsukada et al. 1994, Kweon and Park 2001, Kweon et al. 2002, Kweon et al. 2003) 용해제로 사용되는 염의 양이 많고 처리 온도가 높아 효율성이 떨어지는 경향이 있다.

작잠견사의 용해 시스템을 구명하기 위하여 본 연구에서는 실크단백질의 일반적인 용해시스템으로 활용되는 염화칼슘 에탄올 수용액을 사용하여 처리 온도에 따른 용해도를 측정할 결과(Fig. 1) 가잠견사는 저온인 80°C에서도 거의 100% 용해되어 잔사가 관찰되지 않았으나 작잠견사는 거의 용해되지 않는 것으로 나타났다. 또한, 질산칼슘수화물 용액에서의 용해도를 측정할 결과(Fig. 2) 가잠견사는 수 분내로 용해되는 것으로 확인되었으나 작잠견사는 80°C에서는 10% 내외의 용해도를 보였으며 그 이후 처리 온도가 상승함에 따라 용해도가 증가하여 용해온도 100°C 이상에서 95% 이상의 용해율을 보였다. 이러한 결과는 질산칼슘에 의한 작잠사의 용해에 대하여 보고한 Kweon and Park(2001)의 보고와 일치하는 경향을 보였다. LiSCN, ZnCl_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 는 작잠 견단백질을 가용화할 수 있는 차오토르픽염으로 실크 피브로인의 고차구조를 파괴시켜 변성이 일어나게 만듦으로서 피브로인의 소수성 결합력을 감소시키는 작용

을 하기 때문에 단백질의 용해제로 사용될 수 있다. Kweon et al.(2003)은 이러한 효과는 염이 해리되면서 생긴 이온이 피브로인과 물의 접촉시에 생기는 물의 엔트로피 감소를 억제하기 때문이라고 하며, 수화된 이온의 mobility의 차이에 의한 단백질의 팽윤력에 의하여 영향을 받은 것이라고 하였다. 또한 Małecka et al.(2003)에 의하면 용융온도에 이른 질산수화물이 급격하게 가수분해되면서 방출하는 질산에 의한 작잠견사의 가수분해 가능성도 있다고 생각된다. Kweon et al.(1998)에 의하면 비록 작잠견사가 무기산에 대한 가수분해 안정성이 가잠견사에 비하여 높기는 하지만 무기산의 농도가 증가함에 따라 빠르게 가수분해된다고 하였다. 따라서 질산칼슘에 의한 작잠견사의 용해는 질산칼슘의 가수분해 생성물인 질산의 양과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되며 100°C 이상의 용액온도에서 작잠견사의 황변현상과 온도에 따른 작잠견사의 용해도곡선(Fig. 2)은 이를 뒷받침하고 있다.

작잠견사의 용해성의 효율을 높이기 위하여 질산칼슘과 EtOH 혼합비에 따른 작잠견사의 용해율의 변화(Fig. 3)를 살펴 본 결과 질산칼슘의 농도가 40%인 경우에는 58.7%의 용해도를 보인 반면 60% 이상의 경우에는 거의 100% 용해되었다. 이러한 결과에 대하여 명확하게 해석할 수는 없으나 질산염에서 질산이 해리되는 것과 연관이 있을 것으로 생각된다. 또한 질산염 처리 시간이 경과함에 따라 작잠견사의 용해도가 증가되었다(Fig. 4). 질산칼슘의 농도와 작잠사의 용해도에 대하여 보고한 Kweon and Park (2001)에 의하면 110°C의 용해조건에서 6M의 질산염에도 20% 가량만 용해된 반면 용액에서는 거의 100% 용해된다고 하였다. 본 연구의 결과 에탄올을 첨가함에 따라 60%의 질산칼슘만으로도 작잠견사를 용해할 수 질산칼슘의 농도를 줄일 수 있는 경제적인 효과도 기대된다.

3. 아미노산 조성 분석

작잠 실크단백질은 가잠 실크단백질과는 다른 화학구조를 가지고 있다. Table 2에 분석한 결과에서도 작잠견사를 용해하여 얻은 작잠 견단백질의 주요 아미노산 조성은 글리신(34.4%), 알라닌(34.0%), 세리신(12.1%)로 구성되어 있었고, 작잠정련사의 주요 아미노산 조성(알라닌(37.3%), 글리신(30.2%), 세리신(12.4%))순으로 구성되어 있어 알라닌의 비중이 높은 것으로 확인되었다. 반면, 가잠 고치의 산처리 분말은 글리신(43.7%), 알라닌(26.0%), 세리신(18.0%)의 주요 조성을 나타내었다.

적 요

작잠은 가잠과는 종속이 다른 섬유 곤충으로 우수한 섬유

유용 재료를 만든다. 최근 비섬유용 소재로 작잠 견단백질을 활용하기 위한 기초 연구의 일환으로 작잠 견단백질을 용해 조건에 대하여 연구 결과 작잠견사의 연감율은 16.8%로 나타났으며, 작잠견사는 염화칼슘 에탄올 혼합 용매에는 용해되지 않으나 질산칼슘수화물의 용용액에는 용해되었다. 질산칼슘과 에탄올의 조성비를 조정하여 낮은 농도의 질산칼슘 농도에서도 작잠견사가 용해되었다. 작잠 실크단백질의 주요 아미노산 조성은 알라닌, 글리신, 세리신으로 작잠 정련사와 유사한 조성을 보였다. 따라서, 금후 작잠 견단백질의 적절한 용해시스템 확보 및 소재 개발을 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ906973)의 지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

인용문헌

Kweon HY, Park YH (1994) Structural characteristics and physical properties of wild silk fibers; *Antheraea pernyi* and *Antheraea yamamai*. Korean J Seric Sci **36**(2), 138~146.
 Kweon HY, Lee KG, Lee YW, Yeo JH, Um IC (1998) Hydrolysis behaviour of *Antheraea pernyi* silk fiber treated with HCl. Korean J Seric Sci **40**(2), 163~168.
 Kweon HY, Park YH (2001) Dissolution and characterization of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin. J Appl Polym Sci **82**, 750~758.
 Kweon HY, Lee K, Woo S, Park YH (2002) Dissolution and characteristics of *Antheraea pernyi* silk fibroin regenerated form zinc chloride solution. Korean J Seric Sci **44**, 87~92.
 Kweon HY, Lee K, Yeo J, Park Y (2003) Dissolution and

characteristics of *Antheraea pernyi* silk fiber and structure of regenerated fibroin form zinc nitrate solution. Korean J Seric Sci **45**(2), 121~125.
 Kweon HY, Lee K, Park K, Kang S, Seok Y (2012) Degumming characteristics and color stability of GoldenSilk cocoon. Int J Ind Entomol **24**(1), 1~5.
 Luan XY, Wang Y, Duan X, Duan QY, Li MZ, Lu SZ, Zhang HX, Zang XG (2006) Attachment and growth of human bone marrow derived mesenchymal stem cells on regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin films. Biomed Mater **1**(4), 181~187.
 Małecka B, Gajerski R, MałECKI A, Wierzbicka M, Olszewski P (2003) Mass spectral studies on the mechanism of thermal decomposition of $Zn(NO_3)_2 \cdot nH_2O$. Thermochim Acta **404**, 125~132.
 Minoura N, Aiba SI, Higuchi M, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y (1995) Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin. Biochem Biophys Res Commun **208**(2), 511~516.
 Ruoslahti E, Pierschbacher MD (1986) Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. Cell **44**, 517~518.
 Shin BS, Joen JY, Kim JH (2012) Cocoon characteristics of *Antheraea pernyi* silkworm reared in Korean oak field. Int J Ind Entomol **25**(2), 205~208.
 Tao J, Jehan H, Jing W (1993) Studies on the chromogen of the tussah cocoon layer and its chromophoric mechanism. Sci China Ser B-Chem **36**(9), 1046~1051.
 Tsukada M (1986) Structural changes induced in tussah silk (*Antheraea pernyi*) fibroin films by immersion in methanol. J Polym Sci Pt B-Polym Phys **24**, 1227~1232.
 Tsukada M, Freddi G, Gotoh Y, Kasai N (1994) Physical and chemical properties of tussah silk fibroin films. J Polym Sci Pt B-Polym Phys **32**, 1407~1412.
 Zhao CX, Wu XF, Zhang QA, Yang SQ, Li MZ (2011) Enzymatic degradation of *Antheraea pernyi* silk fibroin 3D scaffolds and fibers. Int J Biol Macromol **48**(2), 249~255.