

## 제타 전위에 의한 참굴 패각의 특성연구

이승우, 신나영, 최청송  
서강대학교 화학공학과

### Characteristics of oyster shell using zeta potential

Seung Woo Lee, Na Young Shin, Cheong Song Choi  
Department of Chemical Engineering, Sogang University

Zeta potential measurement not only can provide surface information on colloidal biomaterials but more importantly can be used in bioprocess control and products quality control. In this study, zeta potentials for intracrystalline proteins of each layers from oyster shell prepared in 1mM NaCl at different pH were measured. Also, in forming calcite crystals with intracrystalline proteins as an additive extracted from oyster shell, the zeta potentials were measured. These studies were performed to verify the primary role of intracrystalline proteins in controlling the formation, morphological development and crystallography of the biocomposite.

#### 서론

참굴(*Crassostrea gigas*)은 우리나라 연안에 광범위하게 분포되어 있다는 점과 일생을 통해 활동범위가 거의 제한되어 있어 여러 가지 오염물질들을 농축시킨다는 점 때문에 오염물질 감시를 위한 지표생물로 이용되고 있다 [1]. 하지만 환경 오염 물질 등의 농축을 분석하기 위해 굴의 생체조직을 이용한 경우는 다수 있었으나 굴과 패각과의 연관성을 검토한 연구는 아직 없었다. 유기체가 생물학적으로 생성한 패각 결정은 대부분 탄산칼슘으로 이루어졌으며 성장환경에 따라서 고유의 결정구조특성, 형태 및 기계적 성질 등이 조절된다. 무척추 동물의 패각과 척추 동물의 hydroxylapatite는

유사한 기능을 지니는 기관이며[2~3] biomineralization을 통해 이러한 기관이 형성될 때 가장 중요한 인자로 인식되는 것은 이들 기관에 침입되어 있는 결정내부 단백질이다. 결정내부단백질은 연체 동물의 패각결정 형성 시 고체 구조의 특이성을 결정하고 calcification과정에서 미세한 구조적 골격을 이룬다고 알려졌다. 그러나 아직까지 패각형성과정에서의 특정 역할에 대해서는 제대로 규명되지는 못하였다[4~7]. 본 연구에서는 합성 탄산칼슘에 유기 매트릭스를 흡착하여 천연 패각과 제타 전위를 비교함으로써 유기 매트릭스와 무기물사이의 상관관계를 고찰하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1) 패각 전처리

패각을 6% 수산화칼륨, 또는 수산화나트륨 용액에 4시간 함침(impregnation)시킨 후 증류수로 세척하여 표면의 흙, 기타 유기물질 등을 제거하였다. 잔여 알칼리 제거와 표면 표백을 위해 1M 염산에 3분 동안 함침한 후 증류수를 이용 여러번 세척하고, 음파처리(Branson Sonifier)로 약 1분간 세척, 완전 건조하였다. 또한 미니 연삭기를 이용하여 패각의 각 층을 분리하였다.

### 2) 투석

투석하고자 하는 시료 30g과 50ml 증류수를 혼합한 투석액을 10 l, 2% 초산 또는 염산을 이용하여 투석(SIGMA 투석튜브, 12,000-14,000Da 분자량 컷오프)하였다. 이때 추출용매인 초산 또는 염산은 물론 투석액도 잘 섞이게 하기 위해 투석튜브를 회전축에 장착하여 회전시키며 투석하였다. 패각이 완전히 녹은 후(48h), 원심분리기(Dupont Instrument, Newton, CT)를 이용하여 15,000g에서, 10분 동안 원심분리하여 가용성단백질과 불용성단백질로 분리하고 가용성 단백질을 초순수 물을 이용, 4°C에서 재 투석하였다. 물을 여러 차례 갈아주며 투석한 후(72h) 다시 원심분리한 후, 동결건조(Labconco 동결건조기)하여 -4°C에서 보관하였다.

### 3) 제타전위 측정

패각을 각각 Quartx mortar 로 분쇄 후, 1mM 염화나트륨 500ml이 담겨 있는 비이커에 각 층별로 일정량의 particle을 넣고 12시간동안 분산시킨다. 일정량을 샘플링한 후 pH 7.5에서 11까지 0.5 간격으로 제타전위(Malvern

zetasizer 3000)를 측정한다.

pH는 염산 (5mM)과 수산화나트륨(30mM)으로 조정하였다.

또한 결정내부 단백질의 표면 퍼텐셜을 알아보기 위해서 안층과 중간층 그리고 바깥층의 가용성 단백질과 경질단백질을 일정한 농도에서 pH를 변화시켜가며 제타전위를 측정하였다.

결정내부 단백질이 제타전위에 미치는 영향을 알아보기 위해서 0.1g의 calcite를 함유하는 수용액에 각층에서 추출한 결정내부 단백질을 일정농도 넣고 흡착평형에 도달할 때까지 교반하였다 . 그후 12시간동안 분산시킨 후 상층액의 제타전위를 측정하였다.

### 결과 및 고찰

패각의 각 층으로부터 추출된 결정 내부 단백질을 탄산칼슘에 흡착시 각 층별로 40~50분 내에 평형에 도달하였다. 이렇게 단 시간 내에 흡착이 이루어진 것은 pore 표면적(전체 표면적당 1%)이 전체 표면에 비해 작기 때문에 pore 확산 저항이 매우 작은 것에 기인한 결과라고 판단된다. 단백질의 흡착량은 각층별로 다른 값을 보였으나 흡착 평형에 도달하는 시간은 비슷한 것으로 보아 흡착에 걸리는 시간은 단백질의 조성이나 구조에는 크게 영향을 받지 않는 것으로 보인다.

Calcite와 Aragonite의 제타전위를 측정한 결과 Aragonite는 pH 7부근에서 등전점을 가지며 calcite의 등전점은 본 실험의 pH 범위에서 산성 쪽으로 벗어난 곳에 존재할 것으로 추측된다. 일반적으로 양의 제타전위는  $Ca^{2+}$ ,  $CaHCO_3^+$ ,  $CaOH^+$ 이온들이 입자와 물의 계면에서 우세한 영향을 미치는 결과이며 음의 제타전위는  $CO_3^{2-}$ ,  $HCO_3^-$ 가 우세한 영향을 미치는 결과로 해석된다. 패각에서 분리된 각 층의 제타전위를 측정 결과, 주어진 pH영역에서는 모두 음의 전하를 가지고 있었다. 이 결과는 합성결정의 calcite와 aragonite와는 다른 전하의 분포를 보인다. 생물기원 탄산칼슘에서는 정상 패각에서 aragonite로 이루어진 myostracum만이 zero 전위에 가까울 뿐 본 연구 pH 범위에서는 등전점은 나타나지 않았다. 전체적으로 모든 pH영역에서 음의 제타전위를 갖는 것은 산성아미노산의 함량 때문으로 판단된다. 또한 pH 증가에 따라 용액 내에 OH<sup>-</sup>의 이온세기가 증가하는 것으로 판단된다.

패각으로부터 추출된 각 층별 결정내부 단백질의 제타 전위를 측정 한 결과, 각 층별 제타 전위의 변화폭이 크게 차이가 없고 유사한 경향을 보였다. 이는 단백질의 2차 구조 특성이 주요한 원인으로 작용하였다고 판단된다. 아래의 표는 패각 각층에 대한 단백질의 2차 구조를 분석한 결과다[8].

Assignment	Area %		
	outer	center	inner
<i>Alpha-helix</i>	19.8	21.3	18.0
<u>Beta-sheet</u>	<u>27.6</u>	<u>22.6</u>	<u>37.1</u>
Turns	9.57	16.5	24.4
Random	12.8	-	9.30
<u>Beta-anti</u>	<u>27.7</u>	<u>31.9</u>	<u>18.2</u>

Table. Secondary structure of the intracrystalline proteins of each layer.

표에서 보듯 패각 각 층에서의  $\alpha$ -helix와  $\beta$ -structure의 차이가 거의 없음을 알 수 있는데, 이로 인해 패각 각층별 제타 전위의 변화폭이 크게 차이가 없음이 확인되었다.

### 참고문헌

1. NAS : The International Mussel Watch. Washington D.C., National Academy of Sciences, pp. 248, (1980)
2. Hauschka, P. V. and Carr, S. A. : Biochemistry, 21, 2538-2547 (1982)
3. Kay, M. I., Young, R. A. and Posner, A. S. : Nature, 204, 1050-1053 (1964)
4. Berman A. : Science, 250, 664-667 (1990)
5. Given RK. : Eur J Biochem, 193, 409-420 (1990)
6. Madeleine : Current opinion in solid state & materials science , 3, 221-227(1998)
7. Shimahara K. : Methods Enzymol. 161, 417-423 (1988)
8. Choi, C. S. and Kim, Y. W. : Biomaterial, 21, 213~222 (2000)