

반고형 피브로인 단백질 겔의 제조 및 유동특성

허 원 · 이신영*

강원대학교 공과대학 생물공학과

Preparation of Semi-solid Fibroin Gel and its Flow Property

Won Hur and Shin-Young Lee*

Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract Fibroin is an insoluble structural protein from *Bombyx mori*. It can be solubilized by dissolving in a hot CaCl₂ solution and subsequent dialysis. The aqueous solution is unstable and a transition from aqueous fibroin molecules rich in random coil is undergo to one rich in β -sheet content, resulting in hydrogelation. However, fibroin gel is so fragile and plastic that its mechanical property should be reformed for various applications. In this report, a semi-solid form of fibroin gel was prepared using glycerol and ethanol and was investigated to analyze their flow properties. A fibroin gel with 80% glycerol showed pseudoplastic and thixotropic properties. The square root of its yield stress varied linearly with fibroin concentration and it extrapolated to zero shear stress at 0.2% fibroin. A fibroin gel with 40% ethanol was shown to be highly thixotropic but its shear-thinning behavior was only observed above a certain level of shear rate. Its pseudoplasticity was restored by a high rate of shear stress.

Keywords: fibroin, fibroin gel, flow property, semi-solid gel

서 론

피브로인은 양잠누에 (*Bombyx mori*)의 고치에서 생산되는 섬유의 중심가닥을 구성하는 antiparallel β -sheet의 구조를 가지는 불용성 단백질이다 [1]. 피브로인은 heavy chain, light chain 및 P25 단백질로 구성되어 있으며, 이중 피브로인의 대부분을 차지하는 heavy chain은 글리신, 알라닌 및 세린이 반복되는 결정성 영역을 형성하는 11개의 도메인, 중간부분 그리고 C-말단 N-말단의 비결정성 영역으로 구성되어 있으며 [2] 다른 단백질과 비교하여 비교적 크기가 작은 아미노산인 글리신, 알라닌 및 세린의 조성 비율이 약 86%로 매우 높다 [3]. 또한 구조 단백질인 피브로인은 오랫동안 수술용 봉합사로 사용되어 생체적합성이 확인되어 있다 [4].

따라서 불용성 피브로인을 가공하여 생체재료로 사용하기 위하여, 고온의 고농도의 염용액을 이용하여 피브로인을

녹이고 이후 투석 탈염하여 수용액 상태인 재생 피브로인을 만든다. 가용화된 재생 피브로인 분자의 -(glycine-alanine-glycine-alanine-serine-glycine)_n-과 같은 반복되는 아미노산 서열은 nematic 액정배열을 형성하고 있으며 [5], 시간의 경과에 따라 액상상태의 random coil 구조의 비율이 감소하고 서로 다른 분자쇄 사이에 β -sheet를 형성하여 겔을 형성한다 [6,7]. 최근에는 β -sheet를 형성하여 겔이 만들어지는 hydrogelation 속도가 불특정 정도, 온도 및 피브로인의 농도 등으로 조절됨이 보고되었다 [8].

그러나 피브로인 겔은 약해서 쉽게 부수지며 유동성이 없다. 2% (w/v) 피브로인 겔의 최대 파괴강도는 22.2 N/m²으로 보고되어 있다 [9]. 따라서 콜라겐을 첨가하여 가교시켜 강도를 증가시키거나 [10], polyacrylamide와 semi-interpenetrating network 구조를 형성시켜 강도가 높은 하이드로 겔을 제조하고 있다 [11]. 혹은 글리세롤을 소량 첨가하여 식감이 개선된 노인용 경구용 소재로 개발하거나 [12], 물리적인 처리과정을 최적화하여 주사용 제제로 사용할 수 있는 점탄성의 피브로인 겔을 개발하고 있다 [8]. 본 연구에서는 피브로인 겔을 유동성을 높이기 위하여 첨가물을 사용하여 반고형의 겔을 제조하고자 하였다. 이를 위하여 유동성

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6273, Fax: +82-33-243-6350

e-mail: sylee@kangwon.ac.kr

겔을 형성하는 첨가제 및 그 농도를 조사하고 재생 피브로인의 분자량 분포를 확인하였다. 회전점도계를 사용하여 제조된 유동성 겔이 유동 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 동결건조된 재생 피브로인은 고농도의 염용액에 가용화시키는 방법 [13]을 일부 변형하여 제조하였다. 즉 시중에서 구입한 실크섬유를 탄산나트륨 수용액 0.3%에 침지 후 가열하여 세리신을 제거하고 회수하여 건조시킨 후 끓는 50% (w/v) $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 수용액에 투입하여 가용화시키고 냉각시킨 후 molecular weight cut-off (MWCO)가 10 kDa인 투석막에 넣어 밀봉하고 수조에 넣어 전기전도도가 $200 \mu\text{S}/\text{cm}$ 이하가 될 때까지 증류수를 교환하여 주어 CaCl_2 를 제거하여 제조되었다. 투석이 끝난 피브로인 수용액은 -20°C 에서 냉동하여 동결건조기 (FD8505, Ilshin Lab, Korea)를 사용하여 건조된 분말로 제조하여 보관하고 실험 직전에 녹여서 사용하였다.

분자량분포 측정

가용화된 피브로인의 분자량 분포를 알아보기 위해 Fast protein liquid chromatography (Pharmacia FPLC system, Pharmacia, Kalamazoo, MI, USA)에 분획범위가 20~10,000 kDa인 TSKgel 4000 sw column ($300 \times 7.8 \text{ mm ID}$ Toso Haas, Montgomeryville, PA, USA)을 사용하고 유동상으로 Tris 완충용액 (20 mM, pH 7.0)을 1.0 mL/min의 속도로 흘려주며 겔 투과 크로마토그래피를 수행하였다. 분자량을 측정하기 위하여 표준물질로 blue dextran (2,000 kDa), thyroglobulin (669 kDa), appoferritin (443 kDa), β -amylase (200 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), albumin (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), cytochrome C (12.4 kDa) aprotinin (6512.4 Da) 과 tyr-ala (252.3 Da)을 사용하였다.

피브로인 겔 제조

동결건조된 피브로인 분말을 서서히 교반되는 용액에 소량씩 첨가하여 용해시킨다. 용해된 피브로인의 수용액의 최종 pH는 피브로인의 농도와 무관하게 5.2~5.3 범위에서 관찰되어 따로 pH를 조절하지 않고 피브로인 용액을 바로 밀폐된 용기로 옮긴 후 겔이 형성될 때까지 상온에서 보관하였다.

유동특성의 측정

회전점도계인 Brabender viscometer (Viscotron, model

No.803401, Duisburg, Germany)를 사용하여 시료의 유동 특성을 측정하였다. 측정용 컵 (E17)에 시료액을 스펀들의 표면에 일치하도록 첨가하고 온도가 일정한 항온수조의 물을 순환시켜 시료액이 투입된 측정용 챔버를 20°C 로 열적 평형 상태를 만든 후에 회전 스펀들의 회전속도를 1에서 128 rpm으로 증가시키면서 각각의 회전속도에서 토오크의 변화를 측정하였다. 필요한 경우 회전 스펀들의 회전속도를 128에서 1 rpm으로 감소시키면서 다시 측정하였다. 전단응력 (τ)와 전단속도 ($\dot{\gamma}$)는 스펀들의 회전속도와 이에 측정된 토오크 값으로부터 각각의 식 (1) 및 (2)에 의하여 구하였다.

$$\tau = B \cdot S \cdot Y \quad (1)$$

$$\dot{\gamma} = N \cdot X \quad (2)$$

여기서 S는 토오크 값이며 글리세롤을 표준물질로 사용하여 Y 값을 0.1195로 결정하여 Pascal (Pa) 단위로 전단응력을 환산하였고, 회전속도인 N과 스펀들의 외경과 챔버의 내경으로부터 결정되는 X값은 제조사의 매뉴얼에서 제공되는 값을 사용하였다.

시료의 유동특성은 항복응력을 항을 포함하는 Herschel-Bulkley 모델 [14]에서 제시하는 다음의 식을 적용하여 분석하였다.

$$\tau = \tau_y + K\dot{\gamma}^n \quad (3)$$

여기서 τ 는 전단응력 (Pa), τ_y 는 항복응력 (Pa), $\dot{\gamma}$ 는 전단속도 (s^{-1}), K는 점도지수 ($\text{Pa} \cdot \text{s}^n$)이며 n은 유동지수이다. 식 (3)의 τ_y 는 다음 식 (4)의 Casson 모델 [14]을 이용하여 구하였다.

$$\tau^{1/2} = \tau_y^{1/2} + K_c \dot{\gamma}^{1/2} \quad (4)$$

여기서 K_c 는 Casson 점도 ($\text{Pa} \cdot \text{s}$)^{1/2}이다.

결과 및 고찰

재생 피브로인 수용액의 분자량 분포 및 거동

고농도의 칼슘염 용액을 이용하여 가용화시키고 투석을 통하여 탈염시켜 얻은 피브로인의 분자량을 겔 투과 크로마토그래피를 사용하여 조사하였다. 수용액 상태의 피브로인 시료는 크로마토그램에서는 분자량의 상한분획한계에 해당하는 10.5 min 지점에서 sharp 피크 (peak 1)와 14 min에서 30 min까지 넓은 영역에서 broad 피크를 (peak 2) 나타내었다 (Fig. 1(b)). 따라서 수용액 상태의 재생 피브로인은 약 600 kDa의 크기의 고분자 펩타이드부터 칼럼의 분획한계인 20 kDa 이하까지 넓은 범위의 분자량 분포를 가지는 것으로 나타났다. 그러나 이 시료를 끓기 직전까지 가열한 후

얼음물에서 급랭시켜 다시 분석하면 상한분획한계의 peak 1은 감소하고 하한분획한계의 바깥에 새로운 피크 (peak 3,4)가 관찰되었다 (Fig. 1(c)). 반면 같은 방법으로 시료를 가열한 후 공기중에서 서서히 상온으로 냉각시킨 시료를 분석한 크로마토그램에서는 peak 1의 크기가 증가하였으나 새로운 피크가 나타나지 않았다 (Fig. 1(d)).

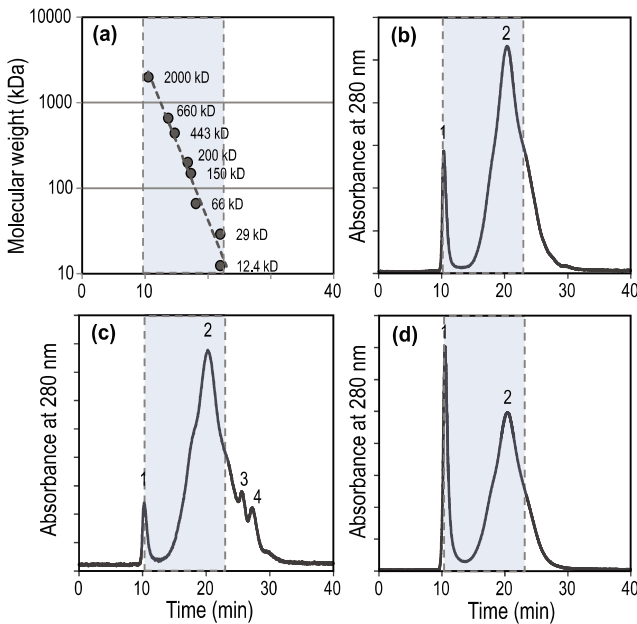


Fig. 1. Gel permeation chromatographs of (A) molecular weight standards, (B) a freshly prepared aqueous fibroin solution, (C) a quick-cooled aqueous fibroin after heat treatment and (D) a slowly-cooled aqueous fibroin after identical heat treatment.

분획한계상한에서 관찰되는 peak 1은 피브로인 분자들이 서로 뭉쳐서 형성된 거대 단백질 분자로 판단된다. 그 이유는 피브로인 분자는 원래 물에 녹지 않으며, 가용화된 재생 피브로인 분자도 시간의 경과에 따라 분자들간의 수소결합에 의하여 액상상태의 random coil 구조에서 서로 다른 분자간의 β -sheet를 형성하여 겔을 형성하기 때문이다 [6]. 최근에는 이 과정에서 수용액상태의 피브로인이 에멀전을 형성하고 직경 100~200 nm의 micelle 구조를 가지게 되고 서로 뭉쳐 거대단백질 분자를 형성한다고 보고되었다 [15]. 유전자 염기서열로 계산된 피브로인의 heavy chain의 분자량은 391,367 Da이다 [2]. 따라서 Fig. 1에서 peak 1은 피브로인이 응집된 거대 단백질 분자로 볼 수 있으며 peak 2는 피브로인이 고온의 염용액에서 가용화될 때 일정한 크기의 피브로인 분자쇄로 분해되었음을 나타내고 있다. 동시에 피브로인 분자쇄들이 엉기어 peak 1을 형성하고 있으며 열을 가하면 거대 단백질에서 일부 피브로인 분자쇄가 일시적으로 분리됨을 알 수 있다.

따라서 피브로인 분자쇄가 서로 뭉쳐져 단백질 콜로이드를 형성하고 이들이 서로 연결되어 3차원적 망상구조를 형성

하는 분산계를 형성하여 반고형의 겔을 형성하는 것으로 추정할 수 있다. 그러나 재생 피브로인 수용액으로부터 형성되는 겔은 유동성이 없고 쉽게 부숩으므로 가공하거나 첨가물로 사용하기에는 제약이 많다. 피브로인 수용액에 글리세롤을 첨가하면 겔형성 속도가 빨라지고 얻어진 겔의 강도는 감소하는 것으로 보고되었다 [16]. 겔화 속도의 증가는 글리세롤이 물분자를 단백질 내부에서 배제시켜 단백질 분자쇄간의 소수성 상호작용을 증가시켜 단백질이 안정화된 구조를 가질 수 있다는 보고로 설명된다 [17]. 또한 글리세롤이 첨가되어 망상구조의 응집력이 낮아져 겔의 강도가 약해진 것으로 추정할 수 있으며 글리세롤을 더 첨가하거나 글리세롤과 유사한 물질을 첨가하면 외부자극에 의하여 구조가 약화되는 유동성을 가지는 피브로인 겔을 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

유동성 겔 형성

유동성을 가지는 겔을 얻기 위하여 피브로인을 에탄올 (ethanol), propanol, 1,3-butylene glycol 및 글리세롤 (glycerol)을 각각 20%에서 80% (w/w)까지 포함하는 수용액에 피브로인을 0.5, 1, 1.5 및 2% (w/v) 첨가하여 겔 형성을 조사하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Propanol 40% 용액에서는 피브로인이 1% 첨가되면 겔을 형성하였고 피브로인의 농도가 2%까지 높아지면 20%에서 60%의 propanol 수용액에서도 겔을 형성하였다. 반면 1,3-butylene glycol 용액에서는 피브로인이 1% 첨가되면 60% 이상, 1.5% 이상 첨가되면 40% 이상의 1,3-butylene glycol 용액에서 모두 겔을 형성하였다. 피브로인이 1.5% 이상 포함된 모든 글리세롤 용액에서 그리고 피브로인이 1% 및 0.5%에서는 각각 글리세롤이 50% 및 60% 이상 포함된 용액에서 겔이 형성되었다. 반면 에탄올 수용액에서는 어떤 농도이상에서는 겔을 형성하지 않아 글리세롤과 상반되는 겔형성 조건을 보여주고 있다. 아울러 이렇게 형성된 피브로인 겔은 증류수만 사용하여 형성된 피브로인 겔과 달리 모두 고점도의 반고체상태의 유동성을 가지는 것으로 관찰되었다.

이중 육안으로 관찰하여 비교적 점도가 높게 보이는 80%의 글리세롤 수용액에 피브로인의 농도가 각각 0.5, 1, 1.5 및 2% (w/v) 첨가되어 제조된 반고체 겔의 유동특성을 조사하였다. Fig. 3은 각각의 시료의 전단응력 (τ)과 전단속도 ($\dot{\gamma}$)의 관계를 보여주고 있다. 피브로인의 농도가 증가할수록 낮은 전단속도에서 전단응력이 크게 증가하므로 피브로인의 농도에 비례하여 항복응력이 증가하고 있음을 나타내고 있으며 동시에 전단속도가 증가할수록 전단응력이 증가가 완화된 의기소성 (pseudoplastic) 거동을 나타내었다. Fig. 3에 따로 나타내지 않았으나 전단시험 후 전단속도를 감소시키면서 측정된 전단응력은 낮은 값을 나타내어 하강곡선이 상승곡선과 일치하지 않는 hysteresis loop를 형성하였다. 이것으로부터 피브로인 겔은 3차원 망상구조의 파괴 혹은 변화를 동반하는 유동성의 변화 즉 불완전한 회복을 나타내는

thixotropy 거동을 보임을 알 수 있다.

다른 생물고분자에서도 이와 유사한 유변적 특성이 빈번하게 관찰되고 있다. 식품의 원료로 사용되는 대부분의 단백질 및 다당의 겔은 점탄성을 나타내며 전단응력에 의하여 비공유결합적 가교구조의 와해를 나타낸다 [14]. 아울러 이러한 생물고분자 겔의 유변학적인 특성은 생물고분자의 종류, 온도 및 분자량 등에 의하여 결정된다 [18,19]. 이와 같은 유변학적 특성을 나타내는 수학적 모델이 개발되어 있으며 일반 유동 모델의 인자로부터 분산계의 입자들의 응집력 및 응집된 입자의 수 등을 추정할 수 있는 수학적 방법들이 제시되고 있다 [20].

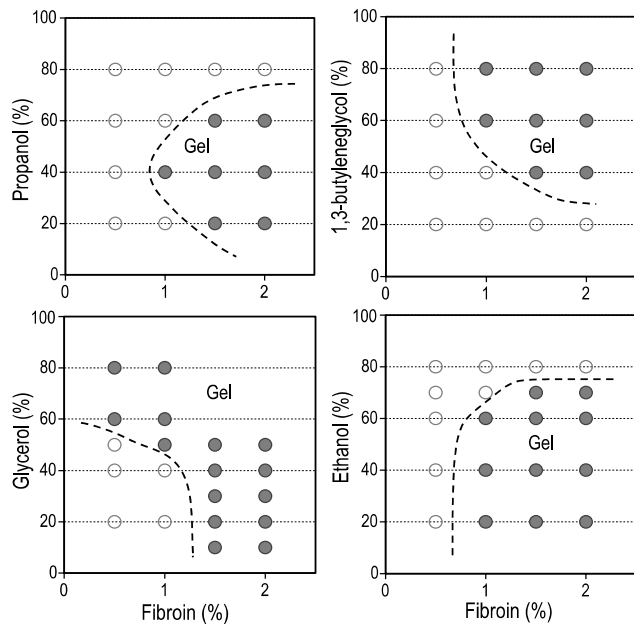


Fig. 2. Gelation of fibroin solutions containing varying levels of glycerol, 1,3-butylene glycol, propanol and ethanol. ● : gel formed, ○ : failed in gel formation.

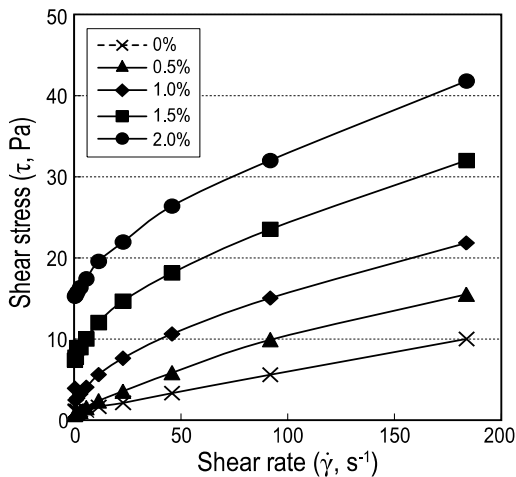


Fig. 3. Plot of shear stress (τ) versus shear rate ($\dot{\gamma}$) for glycerol-fibroin gel of varying fibroin concentration at 20°C.

글리세롤-피브로인 겔의 유동특성 분석

피브로인 겔의 유동특성을 수학적 모델을 이용하여 분석하기 위하여, 제조된 피브로인 겔 시료의 항복응력을 Casson 모델을 이용하여 분석하였다. 각각의 시료의 전단속도와 전단응력의 평방근 값이 높은 상관관계를 가지는 것을 확인하고 (Fig. 4(a)) 전단응력의 평방근 축의 절편으로부터 항복응력의 평방근 값과 항복응력의 값을 계산하여 피브로인의 농도에 따른 변화를 Fig. 4(b)와 Fig. 4(c)에 나타내었다.

Table 1. Parameters of Casson and Herschel-Bulkley model were determined for glycerol-fibroin gel

| | Fibroin (%) | | | |
|---|-------------|--------|--------|--------|
| | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 |
| Casson model | | | | |
| Yield stress (τ_y , Pa) | 0.246 | 2.324 | 7.051 | 13.979 |
| Casson viscosity (K, $\text{Pa}^{1/2} \cdot \text{s}^{1/2}$) | 0.246 | 0.240 | 0.227 | 0.201 |
| Correlation coefficient (r^2) | 0.9986 | 0.9894 | 0.9979 | 0.9994 |
| Herschel-Bulkley model | | | | |
| Flow behavior index (n) | 0.681 | 0.637 | 0.644 | 0.516 |
| Consistency index (K, $\text{Pa} \cdot \text{s}^{-n}$) | 0.387 | 0.640 | 0.962 | 1.658 |
| Correlation coefficient (r^2) | 0.9943 | 0.8915 | 0.9897 | 0.9914 |

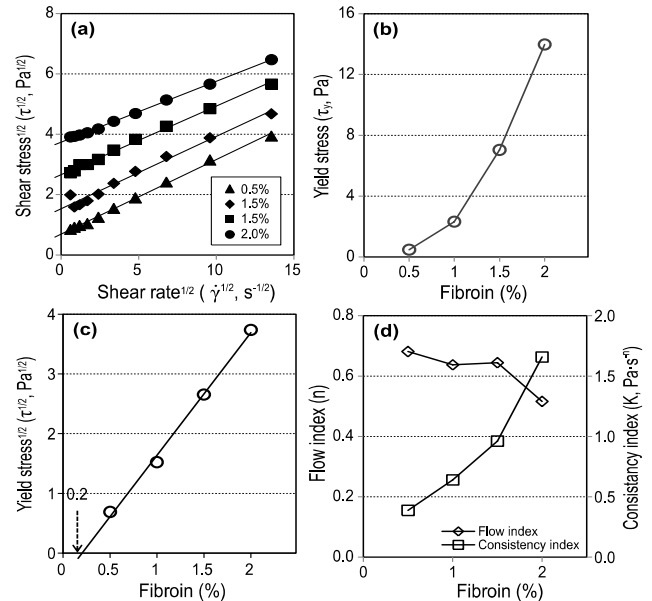


Fig. 4. (a) Plot of square root of shear stress (τ) versus shear rate ($\dot{\gamma}$) for glycerol-fibroin gel of varying fibroin concentration, (b) estimated yield stress (τ_y) from Casson model, (c) a straight-line relationship between square root of yield stress and fibroin concentration, and (d) determined flow index (n) and consistency index (K) from Herschel-Bulkley model.

피브로인의 농도가 0.5, 1, 1.5 및 2%로 증가하면 항복응력은 0.479, 2.324, 7.051 및 13.979 Pa로 상승하였다. 아울

러 Casson 점도는 0.246, 0.240, 0.227 및 0.201 (Pa·s)^{1/2}로 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 여기서 얻어진 항복응력을 이용하여 Herschel-Bulkley 모델로부터 점조도지수 (K) 및 유동지수 (n)를 얻어 Table 1에 표시하였다. Herschel-Bulkley 모델에서 유동지수 n 값은 0.681, 0.637, 0.644 및 0.516으로 피브로인의 농도의 증가에 따라 의가소성 (pseudoplasticity)이 증가하는 경향을 보였으며 피브로인 2%에서는 유동지수가 급격히 감소하여 의가소성이 급격하게 증가함을 Fig. 4(d)에서 보여주고 있다. 점조도지수 K 값은 0.387, 0.640, 0.962 및 1.658 Pa·sⁿ으로 피브로인의 농도에 비례하여 증가하였다.

농도 의존적으로 의가소성 및 점조도지수가 증가하는 현상은 여러 종류의 생물고분자에서 관찰되고 있다 [21]. 특히 단백질의 경우 혈액의 항복응력은 피브린노겐의 농도의 제곱에 비례하며 [22] 바이러스 용액에서도 농도에 비례하여 항복응력이 증가한다고 보고되었다 [23]. 특히 Fig. 4(c)에서 항복응력의 평방근은 피브로인의 농도와 직선형태의 상관관계를 보여주고 있으며 직선의 연장선이 x축과 교차하는 지점에서 항복응력이 0이 되는 피브로인의 농도는 0.2%로 확인되었다. 이와 같은 현상은 전분 호화액에서 2~3% 범위에서 항복응력이 사라지는 현상과 유사하다 [24]. 아울러 0.2% 이하의 피브로인 수용액은 겔을 잘 형성하지 않는 점과 관련이 있다고 추정된다.

에탄올-피브로인 겔의 유동특성

에탄올 40% (v/v)을 포함한 수용액에서 피브로인 농도를 각각 1, 1.5, 2 및 2.5 % (w/v)로 달리하여 만들어진 겔의 유동특성을 조사하기 위하여 먼저 전단속도의 변화에 따른 전단응력을 회전 점도계로 측정하여 Fig. 5에 나타내었다.

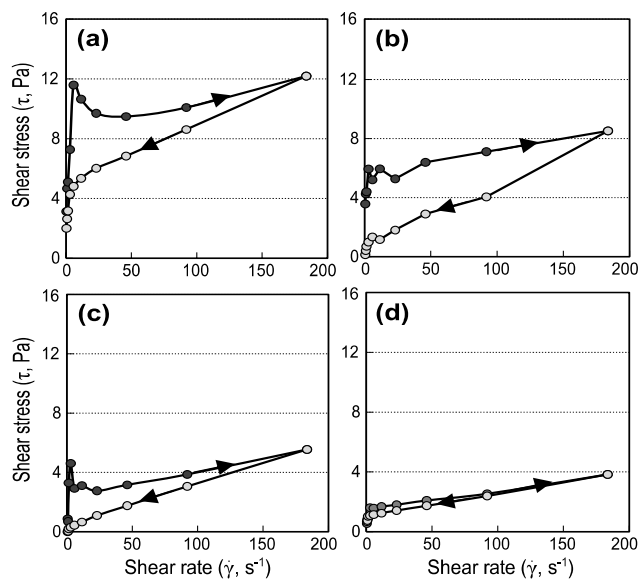


Fig. 5. Flow curves of ethanol-fibroin gel with varying fibroin concentration of (a) 2.5%, (b) 2%, (c) 1.5%, and (d) 1% (w/v) at 20°C.

피브로인 2.5%에서 전단응력은 최대 12.1 Pa로 나타나 글리세롤을 첨가하였을 때보다 낮은 값을 보이고 있다. 전단속도가 5.74 s⁻¹까지 증가할 때 전단응력도 같이 선형적으로 증가하였으나 그 이후부터는 급격하게 감소한 후 다시 완만하게 증가하는 모습을 나타내었다. 피브로인의 농도가 2, 1.5 및 1%의 시료에서도 전단속도가 낮은 영역에서 전단응력이 직선적으로 증가하다 이후 급격하게 그 증가비율이 감소하는 현상을 나타내었다. 의가소성 유체에서는 전단속도가 증가하면서 전단연화 (shear-thinning)가 연속적으로 일어나는 반면에 에탄올-피브로인 겔에서는 특정한 전단속도에서 갑자기 전단연화가 발생하였다. 급격한 전단연화가 발생하는 전단속도 측정점은 피브로인 농도가 2%까지는 2.87 s⁻¹이고 2.5%에서는 5.76 s⁻¹으로 증가하였다. 전단이력 후 전단속도를 점차 감소시키면서 측정된 전단응력은 일반적인 의가소성의 유체에서 보이는 연속적인 전단연화 현상을 나타내었다.

Table 2. Parameters of Casson and Herschel-Bulkley model were determined for ethanol-fibroin gel

| | Fibroin (%) | | | |
|---|-------------|--------|--------|--------|
| | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 2.5 |
| Casson model | | | | |
| Yield stress (τ _y , Pa) | 0.710 | 0.028 | 0.297 | 2.751 |
| Casson viscosity (K, Pa ^{1/2} · s ^{1/2}) | 0.078 | 0.167 | 0.170 | 0.140 |
| Correlation coefficient (r ²) | 0.9873 | 0.9862 | 0.9807 | 0.9626 |
| Herschel-Bulkley model | | | | |
| Flow index (n) | 0.489 | 0.705 | 0.563 | 0.414 |
| Consistency index (K, Pa · s ⁻ⁿ) | 0.167 | 0.124 | 0.320 | 0.945 |
| Correlation coefficient (r ²) | 0.9672 | 0.9979 | 0.9734 | 0.9906 |

따라서 에탄올-피브로인 겔 역시 thixotropy 거동을 보이며 이에 수반하는 3차원 망상구조의 파괴 혹은 완화의 정도를 나타내는 hysteresis loop의 면적은 피브로인의 농도가 1, 1.5, 2 및 2.5%에서 35, 177, 416 및 400 Pa·s⁻¹로 계산되었고 그 결과를 Fig. 6(a)에 나타내었다. 에탄올-피브로인 겔은 글리세롤-피브로인 겔보다 겔보기 점도가 낮고 전단속도가 낮은 영역에서 3차원 망상구조의 변화를 일으켜 급격한 전단연화를 나타내는 것으로 보인다. 그러나 하단 곡선은 전단속도가 낮아지면 전단응력이 더 빠르게 감소하는 의가소성을 나타내므로, 에탄올-피브로인 겔은 전단가공을 통하여 의가소성 겔로 유동특성을 변화시킬 수 있음을 알려주고 있다. 따라서 전단이력을 거친 하단곡선의 유동특성을 Herschel-Bulkley 모델을 통하여 분석하였다. 먼저 Casson 모델을 이용하여 피브로인의 농도가 1, 1.5, 2 및 2.5%로 달라지면 항복응력은 0.710, 0.028, 0.297 및 2.751 Pa로 피브로인의 농도가 1.5%에서 가장 낮았으나 2% 이상에는 항복응력은 다시 빠르게 상승하였다 (Fig. 6(a) and (c)). 아울러 Casson 점도는 0.078, 0.167, 0.170 및 0.140 (Pa·s)^{1/2}로 변화하였다. 여기서 얻어진 항복응력을 이용하여 Herschel-Bulkley 모델로부터 에탄올-피브로인 겔의 점조도지수 (K)

및 유동지수 (n)를 얻어 Table 2에 표시하였다. Herschel-Bulkley 모델에서 유동지수 n 값은 0.489, 0.705, 0.563 및 0.424로 피브로인의 농도가 1%일 때 가장 높고 농도가 변하면 감소하여 의가소성 (pseudoplasticity)이 증가하는 경향을 Fig. 6(d)에서 보여주고 있다. 점조도지수 K 값은 0.387, 0.640, 0.962 및 1.658 $\text{Pa} \cdot \text{s}^{-n}$ 으로 피브로인의 농도에 비례하여 증가하였다.

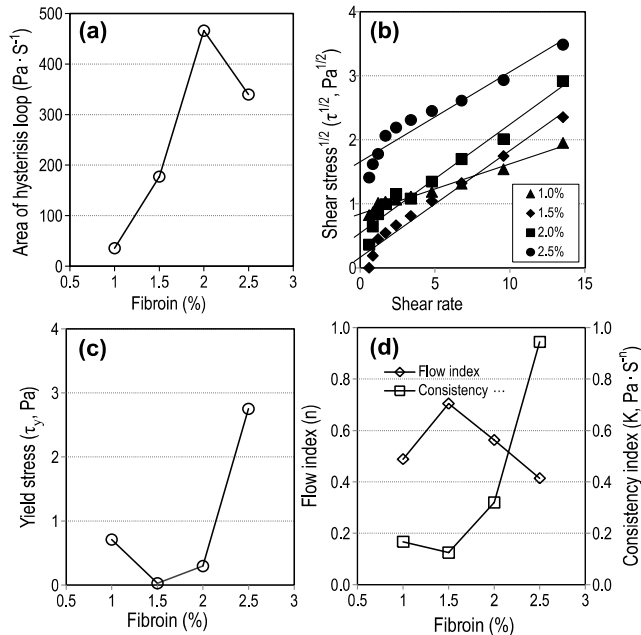


Fig. 6. (a) The area of hysteresis loop for ethanol-fibroin gel of varying fibroin concentration (b) plot of square root of shear stress (τ) versus shear rate ($\dot{\gamma}$) for ethanol-fibroin gel samples, (c) estimated yield stress (τ_y) from Casson model at varying fibroin concentration, and (d) determined flow index (n) and consistency index (K) from Herschel-Bulkley model.

피브로인 1%로 제조된 에탄올-피브로인 겔의 hysteresis loop의 면적은 높은 농도의 피브로인겔에 비하여 현저하게 낮은 값을 나타내어 전단처리를 통한 망상구조의 완화현상이 적었던 것으로 판단된다. 동시에 항복응력도 2%의 피브로인 겔보다 높으며 유동지수도 0.489로 전단처리된 1.5 및 2%의 피브로인 겔보다 낮은 값을 나타내어 더 현저한 의가소성을 보이고 있다. 그러나 1.5%의 피브로인 겔의 경우처럼 전단처리의 강도가 높으면 항복응력이 감소하고 유동정도가 증가하여 의가소성이 약화되었으나 피브로인의 양을 증가하면 다시 항복응력과 유동정도가 회복됨을 알 수 있다. 따라서 피브로인의 농도와 전단처리 정도를 조절하면 원하는 유동특성을 가진 에탄올-피브로인 겔을 얻을 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 전단처리를 통한 단백질의 유동성의 변화에 대한 보고는 많지 않으나 글루텐/글리세롤 겔은 전단처리를 통하여 용해도가 감소하고 disulfide 결합의 수가 감소하여 망상구조의 변화를 가져왔다고 보고되었다 [25].

요 약

피브로인은 누에고치가 생산되는 불용성 단백질이다. 고온의 염화칼슘용액에서 가용화시킨 후 탈염하여 물에 녹게 만들 수 있다. 그러나 수용액은 불안정하여 피브로인 분자는 랜덤코일에서 β 병풍구조의 비율이 증가하는 구조로 전이되고 겔을 형성한다. 그러나 피브로인 겔은 약하고 탄성이 없어 소재로 응용하는데 어려움이 있다. 본 연구에서는 글리세롤과 에탄올을 사용하여 반고형의 피브로인 겔을 제조하고 이들의 유동 특성을 조사하였다. 80%의 글리세롤로 만들어진 피브로인 겔은 의가소성 및 thixotropic 특성을 나타내었으며 항복응력의 제공값 값이 피브로인의 농도와 선형적으로 비례하였으며 항복응력이 없어지는 피브로인의 농도는 0.2%로 확인되었다. 40% 에탄올에서 만들어진 피브로인 겔은 매우 심한 thixotropic 특성을 보였으며 전단속도가 어떤 값 이상이 되면 급격한 전단연화 현상을 나타내었다. 이 피브로인 겔은 전단이력 후 의가소성을 회복하는 특성을 나타내었다.

접수 : 2009년 11월 17일, 게재승인 : 2009년 12월 25일

REFERENCES

- Zhou, C., F. Confalonieri, M. Jacquet, R. Perasso, Z. G. Li, and J. Janin (2001) Silk fibroin: Structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins :Struct. Funct. Genet.* 44: 119-122.
- Zhou, C. Z., F. Confalonieri, N. Medina, Y. Zivanovic, C. Esnault, T. Yang, M. Jacquet, J. Janin, M. Duguet, R. Perasso, and Z. G. Li (2000) Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Res.* 28: 2413-2419.
- Inoue, S., K. Tanaka, F. Arisaka, S. Kimura, K. Ohtomo, and S. Mizuno (2000) Silk fibroin of *Bombyx mori* secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J. Biol. Chem.* 275: 40517-40528.
- Altman, G. H., F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, and D. L. Kaplan (2003) Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24: 401-416.
- Braun, F. N. and C. Viney (2003) Modeling self assembly of natural silk solutions. *Int. J. Biol. Macromol.* 32: 59-65.
- Marsh, R. E., R. B. Corey, and L. Pauling (1955) An investigation of the structure of silk fibroin. *Biochim. Biophys. Acta.* 16: 1-34.
- Wang, H., Y. Zhang, H. Shao, and X. Hu (2005) A study on the flow stability of regenerated silk fibroin aqueous solution. *Int. J. Biol. Macromol.* 36: 66-70.

8. Yucel, T., P. Cebe, and D. L. Kaplan (2009) Vortex-induced injectable silk fibroin hydrogels. *Biophys. J.* 97: 2044-2050.
9. Miyaguchi, Y. and J. Hu (2005) Physicochemical properties of silk fibroin after solubilization using calcium chloride with or without ethanol. *Food Sci. Technol. Res.* 11: 37-42.
10. Lv, Q., K. Hu, Q. Feng, and F. Cui (2008) Fibroin/collagen hybrid hydrogels with crosslinking method: Preparation, properties, and cytocompatibility. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* a84: 198-207.
11. Mandal, B. B., S. Kapoor, and S. C. Kundu (2009) Silk fibroin/polyacrylamide semi-interpenetrating network hydrogels for controlled drug release. *Biomaterials* 30: 2826-2836.
12. Hanawa, T., A. Watanabe, T. Tsuchiya, R. Ikoma, M. Hidaka, and M. Sugihara (1995) New oral dosage form for elderly patients: Preparation and characterization of silk fibroin gel. *Chem. Pharm. Bull.* 43: 284-288.
13. Sugino, R., H. Masuda, J. Yao, T. Kameda, K. Enomoto, S. Amiya, A. Suzuki, and T. Asakura (2000) Structural characterization of regenerated *Bombyx mori* silk fibroin. *Polymer preprints, Japan* 49: E 529.
14. Mitchell, J. R. (1980) The rheology of gels. *J. Texture Studies* 11: 315-337.
15. Jin, H. J. and D. L. Kaplan (2003) Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature* 424: 1057-1061.
16. Lee, K.-G., Y.-W. Lee, J.-H. Yeo, J. Nam, H.-Y. Kweon, and Y.-H. Park (1999) Structural characteristics of silk fibroin gel on the preparation conditions. *Korean J. Seric. Sci.* 41: 41-47.
17. Gekko, K. and S. N. Timasheff (1981) Mechanism of protein stabilization by glycerol: Preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* 20: 4667-4676.
18. Picout, D. R. and S. B. Ross-Murphy (2003) Rheology of biopolymer solutions and gels. *Scientific World J.* 3: 105-121.
19. Ross-Murphy, S. B. (1995) Structure-property relationships in food biopolymer gels and solutions. *J. Rheol.* 39: 1451-1463.
20. Kirsanov, E. A., S. V. Remizov, N. V. Novoselova, and V. N. Matveenko (2007) Physical meaning of the rheological coefficients in the generalized casson model. *Moscow Univ. Chem. Bull.* 62: 18-21.
21. Marcotte, M., A. R. Taherian Hoshahili, and H. S. Ramaswamy (2001) Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. *Food Res. Int.* 34: 695-703.
22. Merrill, E. W., C. S. Cheng, and G. A. Pelletier (1969) Yield stress of normal human blood as a function of endogenous fibrinogen. *J. Appl. Physiol.* 26: 1-3.
23. Kupke, D. W. and J. W. Beams (1977) Solid-like character of virus solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 1993-1996.
24. Kim, N.-S. and Y.-J. Nam (1989) Rheological properties of gelatinized millet starch dispersions. *Korean J. Food Sci. Technol.* 21: 742-748.
25. Morel, M.-H., A. Redl, and S. Guilbert (2002) Mechanism of heat and shear mediated aggregation of wheat gluten protein upon mixing. *Biomacromolecules* 3: 488-497.