

해산 이매패류 패각의 CaCO₃ 결정 구조에 대한 X-ray 회절 분석

남기웅¹, 이승우², 송재희³, 정희도³, 박경일¹

¹군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

²한국지질자원연구원

³국립수산과학원 갯벌연구소

Analysis of CaCO₃ structure of marine bivalves using X-ray diffraction

Ki-Woong Nam¹, Seng-Woo Lee², Jae-Hee Song³, Hee-Do Jeung³ and Kyung-Il Park¹

¹Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Republic of Korea

²Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources (KIGAM), 124, Gwahak-ro Yuseong-gu, Daejeon 305-350, Republic of Korea

³Tidal Flat Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute (NFRDI), 11 Seollim-gil, Gunsan, Jeonbuk 573-882, Republic of Korea

ABSTRACT

This study investigated spectroscopic characteristics of shell crystals of eight marine bivalve species using X-ray diffraction (XRD) analysis; moreover, the Family level relatedness of shellfish was investigated. In XRD analysis, the shells of *Ruditapes philippinarum*, *Meretrix lusoria*, *Anadara granosa*, and *Fulvia mutica* were found to have orthorhombic aragonite CaCO₃ crystals, while shells of *Patinopecten yessoensis* and *Crassostrea gigas* had trigonal-rhombohedral calcite crystals. The shells of *Mytilus coruscus* and *Atrina pectinata* were determined to have a mixture of aragonite and calcite crystals. XRD information revealed the Family level-specific characteristics of shellfish; the results agreed with the current taxonomic system. In conclusion, spectroscopic characteristics of shell crystals indicated Family-level characteristics of shellfish and suggested a more intense species-level investigation; this technology may be useful in identifying shellfish species using small quantities of shells.

Key words: X-ray diffraction (XRD), CaCO₃ structure, bivalve, shell, crystallography

서론

연체동물의 패각은 구조적으로 가장 잘 보존되어 있는 부분으로 계통분류학적 진화 (phylogenetic evolution) 의 특성을 연구하는데 유용하게 이용되고 있다 (Chateigner *et al.*,

2000). 이러한 패각의 연구는 패각의 미세구조 분석을 통하여 보다 심화된 정보를 획득할 수 있다 (Gregoire, 1972; Wilbur, 1972, Watabe, 1984, 1988; de Paula and Silveira, 2009). 패각 미세구조 연구와 관련하여 최근 X-ray diffraction 이나 적외선 분광기술 등 전자기 스펙트럼의 분석을 통하여 패각의 texture에 대한 정보를 분석하는 시도가 진행되고 있다.

전자기 스펙트럼 (electromagnetic spectrum) 이란 전자기파를 파장에 따라 분해하여 배열한 것으로서 이 전자기 스펙트럼 중 X-ray Diffraction (XRD) 는 X선을 시료에 조사하여 발생하는 특정 X선의 회절각과 강도를 분석해 함유된 결정성 물질의 종류와 양에 관계되는 정보를 알아보는 방법이다. 최근 까지 XRD 방법을 이용해 무척추동물의 패각은 CaCO₃ 결정

Received: November 13, 2015; Revised: December 22, 2015; Accepted: December 30, 2015

Corresponding author : Park, Kyung-Il

Tel: +82 (63) 469-1882 e-mail: kipark@kunsan.ac.kr
1225-3480/24596

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

중 Aragonite, Calcite 또는 그 혼합으로 구성되어있음이 알려져 있다 (de Paula and Silveira, 2009). 보다 세부적으로는 각 패류가 갖는 X선의 회절각과 회절강도의 특성은 패류의 종에 따른 고유 특성을 나타낼 수 있고 이러한 특성은 패류의 계통분류학적 유연관계를 조사하는데 유용하게 이용될 수 있음이 보고된 바 있다 (Cater and Clark II, 1985; Chateigner *et al.*, 2000; Fryda *et al.*, 2010).

따라서 본 연구는 국내에 서식하며 과 (Family) 가 다른 8종의 패류를 대상으로 패각의 결정에 대한 X선 회절 분석을 수행함으로써 과 수준에서 회절정보의 유용성을 확인하고 이러한 정보가 기존에 알려진 패류의 계통분류학적 유연관계와 유사한지 확인하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

1. 시료 준비

본 연구에 사용된 시료는 전라북도 군산시 해망동 소재의 수산시장에서 구입한 굴 (*Crassostrea gigas*), 큰가리비 (*Patinopecten yessoensis*), 키조개 (*Atrina pectinata*), 지중해담치 (*Mytilus galloprovincialis*), 새꼬막 (*Scapharca subcrenata*), 말백합 (*Meretrix petechialis*), 바지락 (*Ruditapes philippinarum*), 새조개 (*Fulvia mutica*) 를 사용하였다. 그리고 동해안 바지락은 경북 울진군에서 채집한 바지락을 사용하였다. 시료의 계통분류학적 위치는 Table 1과 같았다. 준비된 패류는 개각하여 연체부를 제거한 후 1M HCl 용액에 24시간 동안 침지한 후 증류수로 세척하였다. 이후 실온에서 건조한 뒤 각 개체별로 막자사발을 이용해 분쇄하였으며, 망목 200 μm 의 sieve (Chung Gye Sang Gong Sa, Korea)를 통과한 분말을 사용하였다.

2. 패각 결정 분석 (XRD)

패각결정의 분광학적 특성은 X선 회절분석기 (X-ray diffractometer, XRD, EMPYREAN, PANalytical, Netherlands) 를 사용하여 측정하였다. 이를 위해 200 mg 의 패각 분말을 XRD 홀더에 담은 후 시편대 위에서 300 rpm 으로 회전시켰다. 측정 시 X-ray radiation source로는 CuK α (λ = 1.5056 Å) 가 사용되었으며, X-ray의 회절각 2 theta(θ) = 5-90° 범위에서 0.2626°의 step size와 1.48°/min의 주사속도로 X-선 회절강도를 측정하였다. X-선 회절정보에 의한 형태적 상관성은 Highscore plus software (PANalytical, Nederland) 를 이용하여 패각의 주요 구성성분인 Ca, C, O, Mg, Al, Fe, Si, P, Sn, Mo, Mn, Cd, Ti, B, Pb, Au, Ag, Ni, Co, Bi, Cu, Sr, Rb, As가 나타낼 수 있는 결정구조에 관한 library (Crystallography Open Database; www.crystallography.net) 에서 비교하였으며, 구성 비율은 Rietveld method을 이용하여 측정하였다 (Rietveld, 1969). 각 시료의 X선 회절분석은 3회 반복하여 그 평균값을 data로 활용하였다.

3. 패각의 종, 지역, 개체간 분광학적 유연관계

굴, 큰가리비, 키조개, 새꼬막, 말백합, 바지락, 지중해담치, 새조개 등 8종의 X-선 회절 정보와 적외선 스펙트럼을 이용하여 종간 유연관계를 조사하였다. 이를 위하여 각 시료의 2θ intensity를 Highscore plus software (PANalytical, Nederland) 를 이용하여 background를 제거 하고 raw data를 excel 파일 (XLSX file format) 로 추출하였다. 그 후, excel 2007을 이용하여 각 시료별 가장 강도 높은 2θ의 회절강도 값을 기준으로 normalization 하였으며, 0.1이하 (normalized data) 의 값은 분석에서 제외하였다. 이후, 각 시료가 나타내는 모든 회절각에 대한 회절강도를 통계분석

Table 1. Taxonomic position of the clams used in the present study

Class	Subclass	Order	Family	Species	
Bivalvia	Eupteriomorphia	Ostreoida	Ostreidae	<i>Crassostrea gigas</i>	
			Pectinidae	<i>Patinopecten yessoensis</i>	
		Pterioda	Pinnidae	<i>Atrina pectinata</i>	
		Mytiloida	Mytilidae	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	
	Pteriomorphia	Arcoida	Arcoidae	<i>Scapharca subcrenata</i>	
	Heterodonata	Veneroida		Veneridae	<i>Ruditapes philippinarum</i>
					<i>Meretrix petechialis</i>
			Cardiidae	<i>Fulvia mutica</i>	

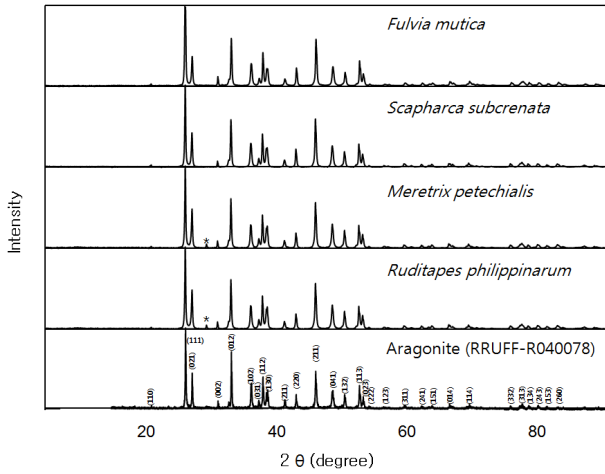


Fig. 1. XRD pattern of aragonite in clams. Asterisk (*), species specific peak at 31.2°.

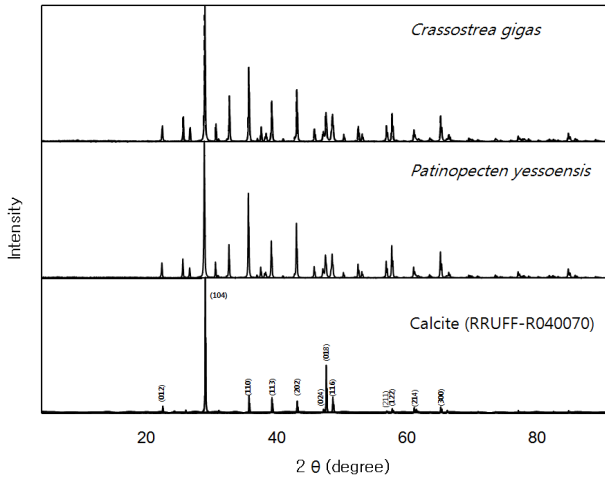


Fig. 2. XRD pattern of calcite crystal in *C. gigas* and *P. yessoensis*.

software (SPSS ver 12.0) 를 이용해 Minkowski (3) 거리에 근거한 dendrogram을 작성하여 근연관계에 대한 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

패각결정이 나타내는 분광학적 특성을 분석하기 위해 XRD 분석을 수행한 결과, 바지락, 백합, 꼬막, 새조개는 주로 aragonite로 이루어진 패각을 보유하고 있는 것으로 분석되었으며 (Fig. 1), 참굴과 가리비는 주로 calcite로 이루어진 패각을 보유하는 것으로 확인되었다 (Fig. 2). 그러나 지중해담치와 키조개는 단일결정형을 가진 것이 아니라 aragonite와 calcite가 혼합된 결정으로 분석되었다 (Fig. 3).

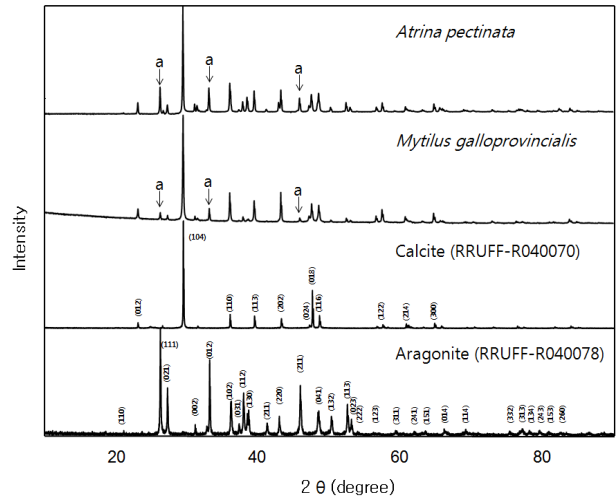


Fig. 3. XRD patterns of mixture of aragonite and calcite crystals in *A. pectinata*, *M. galloprovincialis* and the references. Arrows, species specific peaks at various angles of diffraction.

본 연구에서 바지락, 백합, 꼬막, 새조개의 패각의 XRD 패턴은 (111), (012), (211) 면에서 주요 회절이 나타났으며, 이러한 패턴은 aragonite 광물의 XRD 패턴 (Kontoyannis *et al.*, 1997; Antao and Hassan, 2009) 과 회절각은 동일하였지만, 강도는 종에 따라 차이가 있었다. 같은 패류 간에도 각 면에 대한 회절 강도의 비율은 미세한 차이를 나타내었지만 큰 차이를 나타내지는 않았다. 또한 같은 aragonite 패각을 가진 패류 간에도 30°영역 (31.2°) 에서 바지락과 백합의 경우에만 미약한 회절을 나타내었으며, 새조개와 피조개는 회절이 나타나지 않았으며, 바지락에서도 개체에 따라 나타나는 경우와 그렇지 않은 경우가 있었다 (Data not shown). 이는 calcite의 주요 회절면인 104면과 그 회절영역 (29.4°) 이 비슷하지만 측정의 분해능을 올려서 확인 할 경우 미세한 차이가 있음이 확인되었다 (RRUFF database).

굴과 가리비의 패각 XRD 패턴은 (104), (018), (110), (113), (202), (116) 면에서 주로 회절이 나타났으며, 이러한 패턴은 calcite 광물의 XRD 패턴 (Sitepu *et al.*, 2005) 을 포함하지만 보다 다양한 회절각을 나타내는 것으로 나타났다. 이는 순수한 방해석에 비하여 패류의 패각에는 다른 원소 (Mg, Si, Al, Fe, Sr, Na, P, Ti) 의 함량에 의한 결정구조의 차이에 의한 것으로 추정된다 (Tsai, 2013).

지중해 담치와 키조개의 XRD 패턴은 가장 다양한 패턴을 나타내었으며, calcite의 패각에 aragonite에서 나타나는 회절 영역의 혼합으로 나타났으며, 단일 결정형을 가진 종들과는 달리 혼합 결정형을 가지고 있는 담치와 키조개 간에도 두드러진 차이를 나타내어 혼합비율이 다를 수 있음을 시사하였다. 이렇게

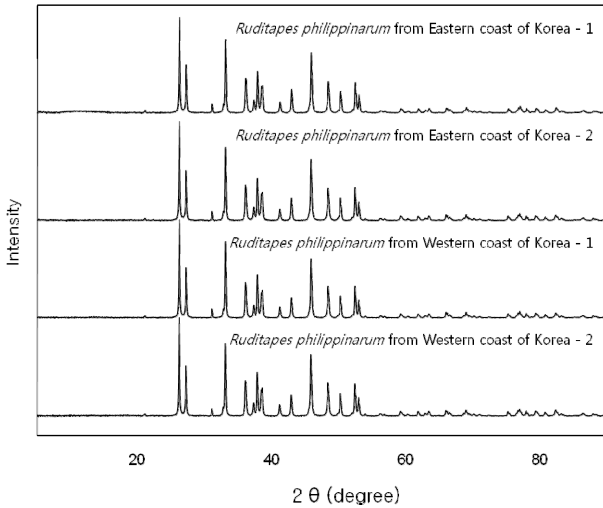


Fig. 4. XRD patterns of *R. philippinarum* from the eastern and the western coasts of Korea.

혼합형인 지중해담치와 키조개의 결정 혼합비를 확인하기 위해, rietveld method에 의거하여 정량분석을 수행한 결과 그 비율이 aragonite : calcite = 3:7 (지중해담치, GOF: 47.26, Rwp: 16.354), 4:6 (키조개, GOF: 46.08, Rwp: 16.135)의 구성비를 가지고 있었다. 이러한 결과는 Weiner and Traub (1980) 과 Nishida *et al.*, (2012) 이 XRD분석을 통해 굴 (*Crassostrea gigas*, *C. irredescens*) 이 calcite로 이루어진 패각을 가지고 있고, 담치 (*Mytilus californianus*) 와 진주조개 (*Pinctada radiata*) 은 aragonite와 calcite의 혼합된 패각을 가지고 있음을 보고한 내용과 동일한 결과였다.

Kim *et al.* (2014) 은 백합 패각에서 극소량의 Calcite의 혼합과 바지락의 패각내의 Quartz (SiO₂) 혼합을 보고 하였으며, XRF (X-ray fluorescence) 분석을 통하여 굴의 패각내에 NaCl결정의 존재 가능성에 대해 보고하였다. 또한 Yang *et al.*, 2010은 패류의 단면의 외부, 중간, 내부의 aragonite XRD pattern 및 패각 형태가 다름을 보고 하였다. 이러한 결과는 패류의 패각이 완전히 순수한 단일 결정형태가 아님을 의미하며, 같은 aragonite로 구성된 패각일지라도 그 패류의 생애 및 습성에 따라 구성이 다를 수 있음을 시사한다. 한편, 동서해안산 바지락을 이용해 지역간 패각의 분광학적 차이를 비교한 결과 동일 종내에서는 서식지역 및 개체가 다르더라도 X선 회절정보의 차이가 나타나지 않음을 확인하였다 (Fig. 4). 그러나 Trinkler *et al.* (2011) 의 보고에 의하면 바지락 (*R. philippinarum*) 의 세균성 질병인 brown ring disease (BRD) 에 의해 패각이 변형된 경우 XRD-회절분석과 유사한 방법인 Raman microspectrometry로 조사한 결과 패각의 microstructure의 변형이 나타남을 확인하였다. 따라서 이러한 사실은 같은 종이더라도 병리적 영향에 의해 패각의

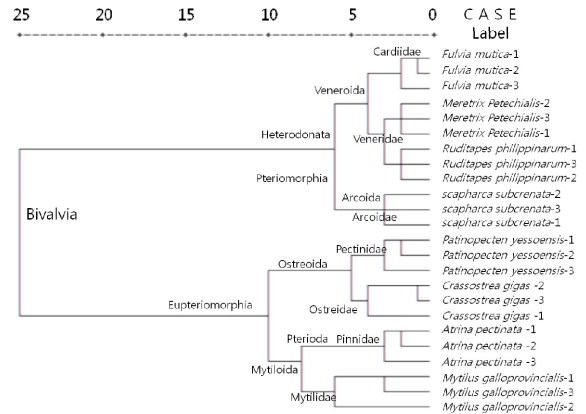


Fig. 5. Dendrogram of XRD patterns of bivalves used in the present study.

변이가 나타날 수 있음을 의미한다.

한편, 본 연구를 통하여 과 (Family) 수준에서 각기 다른 8종의 해산 이매패를 대상으로 X-선 회절분석을 수행하여 패각의 결정 (結晶) 에 대한 분광학적 특성을 바탕으로 패류간 분류학적 근연관계를 조사한 결과 동일종 또는 근연관계가 과 (Family) 수준 이상 가까운 종의 결정 구성이 유사하거나 동일함을 확인하였다 (Fig. 5). 이러한 결과는 기존에 널리 알려져 있는 Min *et al.* (2004) 과 Hong *et al.* (2006) 의 분류체계와 매우 유사한 결과를 나타냄으로써 패각의 결정에 대한 분광학적 특성이 계통분류학적 지표로서 (phylogenetic indicator) 유용하게 이용될 수 있음을 시사하고 있다. 그러나 Trinkler *et al.* (2011) 의 보고와 같이 질병 등에 의해 패각의 결정구조의 변화가 나타날 수 있으므로 본 연구의 목적과 같이 종 동정에 사용될 경우 이러한 패각 변형의 유무를 고려하여야 할 것으로 판단된다. 또한 본 연구에서는 각 시료에 대한 전체 X선 회절각과 모든 회절강도에 대한 정보를 이용하여 dendrogram을 작성하였으나 향후 보다 많은 패류의 회절정보가 축적될 경우 종특이 회절각 (finger print 영역) 을 설정하면 보다 정확한 종특이적 분석이 가능할 것으로 기대된다. 한편, XRD 기법은 미량의 시료만으로도 분석이 가능하며, 또한 분석 후 시료의 회수가 용이하다는 장점을 가지고 있다. 따라서 이 기술은 종 동정이 어려운 패각 단편의 분석에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 국립수산과학원 갯벌연구소의 연구지원 (R2015006) 하에 수행되었습니다.

요 약

본 연구는 해산 이매패 8종에 대해 패각 결정 (結晶) 에 대한 분광학적 특성을 XRD 기법을 이용하여 조사하고 중간 근연관계에 대해 기존의 조사와 비교하였다. XRD 분석을 수행한 결과, 바지락, 백합, 꼬막, 새조개의 패각은 CaCO_3 의 orthorhombic 결정형인 aragonite였으며, 가리비와 굴의 패각은 trigonal-rhombohedral 결정형인 calcite였다. 담치와 키조개의 경우 aragonite와 calcite가 혼합된 결정으로 분석되었다. XRD를 이용하여 측정된 패각의 x-선 회절정보는 패류별 특이성을 나타내었으며, 이러한 특성을 이용한 과 (Family) 간 근연관계를 조사한 결과 현재 알려진 분류체계를 잘 대변하고 있었다. 결론적으로 패각 결정 (結晶) 에 대한 분광학적 특성은 조사된 패류의 과 (Family) 수준에서 특이성을 잘 나타내며, 향후 종수준의 연구를 통한 종 동정을 위한 추가 연구가 필요함을 시사하였다. 또한 이러한 기술은 소량의 패각을 이용하므로 미확인 소량 절편의 패류 종 파악에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

REFERENCES

- Antao, S.M. and Hassan, I. (2010) Temperature dependence of the structural parameters in the transformation of aragonite to calcite, as determined from in situ synchrotron powder X-ray-diffraction data, *The Canadian Mineralogist*, **48**: 1225-1236.
- Carter, J.G. and Clark II, G.R. (1985) Classification and phylogenetic significance of molluscan shell microstructure. *In*: Molluscs, (Ed. by Bottjer, D.J., Hickman, C.S., Ward, P.D., Broadhead, T.W.). pp. 50-71. Notes for a short course, University of Tennessee Department of Geological Sciences Studies in Geology 13.
- Chateigner, D., Hedegaard, C. and Wenk, H.R. (2000) Mollusc shell microstructures and crystallographic textures. *Journal of Structural Geology*, **22**: 1723-1735.
- de Paula, S.M. and Silveira, M. (2009) Studies on molluscan shells: Contributions from microscopic and analytical methods. *Micron*, **40**: 669-690.
- Frýda, J., Klicnarová, K., Frýdová, B. and Mergl, M. (2010) Variability in the crystallographic texture of bivalve nacre. *Bulletin of Geosciences*, **85**: 645-662.
- Grégoire, C.H. (1972) Structure of the molluscan shell. *In*: Chemical Zoology VII. Mollusca. (ed. by Florkin, M. and Scheer, B.T.). pp. 45-101, Academic Press, New York, London.
- Kim, J.H., Chung, C.W. and Lee, J.Y. (2014) Effects of crushed shells on the physical properties of cement mortar. *Journal of the Korea Institute of Building Construction*, **14**: 94-101.
- Kontoyannis, C.G., Orkoulas, M.G. and Koutsoukos, P.G. (1997) Quantitative analysis of sulfated calcium carbonates using Raman spectroscopy and X-ray powder diffraction. *Analyst*, **122**: 33-38.
- Min, D.K., Lee, J.S., Koh, D.B. and Je, J.G. (2004) Mollusks in Korea. Min Molluscan Research Institute, Seoul.
- Islam, K.N., Bakar, B.Z.B.A., Noordin, M.M., Hussein, M.Z.B., Rahman, N.S.B.A and Ali, M.E. (2011) Characterisation of calcium carbonate and its polymorphs from cockle shells (*Anadara granosa*). *Powder Technology*, **213**: 188-191.
- Hong, S. Y. (2006) Marine Invertebrates in Korean Coasts. Academy Publishing Company, Inc., Seoul.
- Nishida, K., Ishimura, T., Suzuki, A. and Sasaki, T. (2012) Seasonal changes in the shell microstructure of the bloody clam, *Scapharca broughtonii* (Mollusca: Bivalvia: Arcidae). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **363-364**: 99-108.
- Rietveld, H. M. (1969) A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. *Journal of Applied Crystallography*, **2**: 65-71.
- Sitepu, H., O'Connor, B.H. and Li, D. (2005) Comparative evaluation of the March and generalized spherical harmonic preferred orientation models using X-ray diffraction data for molybdenite and calcite powders. *Journal of Applied Crystallography*, **38**: 158-167.
- Tsai, W.T. (2013) Microstructural Characterization of Calcite-Based Powder Materials Prepared by Planetary Ball Milling. *Materials*, **6**: 3361-3372
- Trinkler, N., Bardeau, J.F., Marin, F., Labonne, M., Jolivet, A., Crassous, P. and Paillard, C. (2011) Mineral phase in shell repair of Manila clam *Venerupis philippinarum* affected by brown ring disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, **93**: 149-62.
- Watabe, N. (1984) Shell. *In*: Biology of the Integument, 1. Invertebrates (ed. by Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G. and Richards, S.). pp. 448-485. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Watabe, N. (1988) Shell structure. *In*: The Mollusca, 11. Form and Function. (ed. by Trueman, E.R. and Clarke, M.R.). pp. 69-104. Academic Press Inc., San Diego.
- Weiner, S. and Traubt, W. (1980) X-ray diffraction study of the insoluble organic matrix of mollusk shells. *FEBS Letters*, **111**: 311-316.
- Wilbur, K.M. (1972) Shell formation in mollusks. *In*: Chemical Zoology VII. (ed. by Florkin, M. and Scheer, B.T.). pp. 103-145. Academic Press, New York, London.
- Yang, W., Kashani, N., Li, X.W., Zhang, G.P. and Meyers M.A. (2011) Structural characterization and mechanical behavior of a bivalve shell (*Saxidomus purpuratus*). *Materials Science and Engineering: C*, **31**: 724-729.