(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0127845
(43) 공개일자 2016년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08J 3/075 (2006.01) *A61L 27/22* (2006.01)
C08J 3/24 (2006.01) *C08L 89/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08J 3/075 (2013.01)
A61L 27/225 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0049859
(22) 출원일자 2015년04월08일
심사청구일자 2015년04월08일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박원호
서울특별시 용산구 이촌로 201 한가람아파트 204동 2103호
임동수
경기도 평택시 진위면 하북1길 6-7
(74) 대리인
김홍균

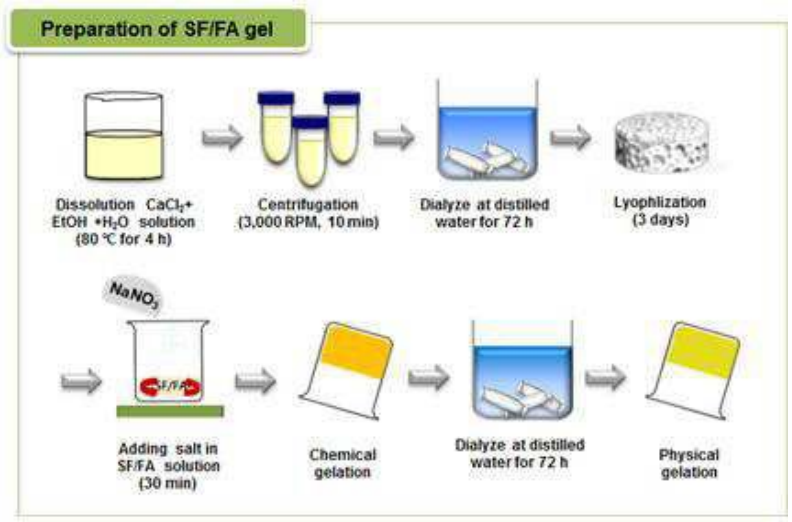
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **질산염 첨가를 통해 제조된 실크 피브로인 겔 및 그의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 재생 실크 피브로인을 이용하여 신속히 형성되는 겔 및 그의 제조방법에 관한 것으로 더욱 상세하게는 재생 과정을 거친 실크 피브로인 스펀지나 분말을 포름산에 용해한 용액에 염 첨가를 통해 기존의 겔화에 오랜 시간이 소요되는 단점을 보완한 유기겔을 제조하는 방법 및 유기겔의 포름산을 물로 치환함으로써 얻어지는 실크 피브로인 수화겔의 제조방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C08J 3/24 (2013.01)
C08L 89/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

재생 실크 피브로인 스펀지나 분말을 포름산 용매에 1~10 wt% 농도로 용해시켜 용액을 제조하는 단계; 및

상기 용액에 0.1~8 wt% 질산염을 첨가하여 겔화하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 질산염 첨가를 통해 제조된 실크 피브로인 유기겔의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 겔화는 수 분 내에 완료되는 것을 특징으로 하는 질산염 첨가를 통해 제조된 실크 피브로인 유기겔의 제조방법.

청구항 3

제1항에 따라 얻어지는 실크 피브로인 유기겔로서, 상기 실크 피브로인 유기겔은 질산은, 질산리튬, 질산나트륨, 질산칼륨, 질산칼슘으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 질산염을 첨가하는 것을 특징으로 하는 실크 피브로인 유기겔.

청구항 4

제1항에 따라 얻어지는 실크 피브로인 유기겔을 물로 치환함으로써 얻어지는 실크 피브로인 수화겔의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 재생 실크 피브로인을 이용하여 신속히 형성되는 겔 및 그의 제조방법에 관한 것으로 더욱 상세하게는 재생 과정을 거친 실크 피브로인 스펀지나 분말을 포름산에 용해한 용액에 염 첨가를 통해 기존의 겔화에 오랜 시간이 소요되는 단점을 보완한 겔을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 재생 실크 피브로인(RSF) 겔은 조절가능한 기계적 특성을 얻도록 조정될 수 있는 다공성 미세구조를 가지는 것으로 알려져 있다. 상기 피브로인 겔은 고강도, 다공성 및 생체적합성으로 인하여 조직공학을 위한 3D 다공성 스캐폴드와 같은 적용을 위한 잠재적인 흥미로운 생체 재료이다.

[0003] RSF의 겔화 시간은 용액 내 피브로인의 pH 및 농도에 의존한다. 피브로인 겔의 잠재적 중요성은 세포 성장을 위하여 원하는 pH가 7.2 - 7.4인 생체 의학 연구에 있다. 1 내지 10 g/L 범위의 농도의 RSF는 pH 7에서 겔화에 30 내지 60 일이 걸리는 반면, 10 내지 100 g/L의 더 높은 단백질 농도의 RSF는 겔로 전환되는데에 pH 7에서 10 내지 20일의 걸리는 것으로 관찰된다. 더 높은 단백질 농도의 용액으로부터 제조되는 RSF겔은 세포 진입 및 성장에 적합한 다공성을 가지지 않는다. 따라서, pH 7에서 더 낮은 단백질 농도의 RSF로부터 미세다공성 겔을 형성하는 것이 바람직하다. 더 높은 온도 범위에의 연장된 노출은 단백질 침전 및 미세다공성 구조 손실을 초래하며, 이는 RSF에 대하여 예상되는 적용을 위하여 바람직하지 않다. 이러한 용액의 겔화를 위하여 상당히 장시간이 요구되며, 이 시간 동안 무균 환경이 유지되지 않는다면 실크 용액/겔 내에서 균류 성장이 관찰된다. 조직공학에 있어서 그 잠재적인 적용을 고려하여, 세포주가 독성 환경에 가하여지지 않도록 항균제의 사용이 불가피하다. 따라서, pH 7 및 실온에서 RSF의 겔화 시간을 감소시킬 필요가 있다. 국제 유변 학회, 2008, 8, 3-8, 포스터 및 Phys, Chem. Chem. Phys., 2010, 12, 3834-3844에서 Lele 등은 재생 피브로인 용액의 겔화 메커니즘을 연구하였다. 이들은 또한 형성되는 실크 수화겔의 구조 및 특성을 연구하였다.

[0004] Dr. David L. Kaplan의 논문 "Silk Polymer Desinsn for Improved Expression and Processing"을 참조할 수 있으며, 이는 실크 피브로인의 겔화가 실크 피브로인 농도, 겔 형성 온도 및 pH, 및 피브로인 단백질의 분자조

직에 있어서 1차 서열-특이적 특징과 관련될 수 있는 단백질 구조에 의존하는 실크 겔화 조절을 개시한다.

[0005] 나아가, 상기 문헌은 또한 실리카 나노복합체 형성을 위한 실크-R5 융합체의 클로닝, 발현 및 기능을 연구하는 실크 - 무기 나노 복합체 - 실리카 시스템에 대하여 기재한다.

[0006] Wong 등의 논문 "Novel Nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins"을 참조할 수 있으며, 이는 융합 (키메릭) 단백질을 이용하여 실리카 복합체를 합성하기 위한 신규한 생체모방 나노복합체 접근법을 개시한다. 융합 단백질은 면역학, 암 연구 및 약물 전달(17-20)을 포함하는 생체 의학 분야 및 재료 과학 [자기 조립 물질 (예를 들어, 겔), 양자점 바이오컨쥬게이트, 센서 및 무기 재료 합성(21-27)]과 같은 광범위한 영역에 적용된다.

[0007] 2008/10에 발행된 Cheng Cheng 등의 논문 "Composite Material Made of Regenerated Silk Fibroin and Silica Sol"을 참조할 수 있으며, 상기 문헌은 재생 실크 피브로인 용액 및 실리카 졸을 혼합하여 실크 피브로인/실리카 복합 재료를 생산하였음을 개시한다. 실크 단백질과 실리카 사이의 상호 작용이 있는지, 나아가 이러한 상호 작용이 복합 재료의 기계적 특성을 향상시킬 수 있는지 여부를 조사하기 위하여, 실크 피브로인/실리카 복합 재료의 구조 및 특성을 주사 전자 현미경법 (SEM) 및 라만 분광법과 함께 동적 기계 분석(DMA)에 의하여 연구하였다. 상기 SEM 결과는 복합체 내 실크 피브로인과 실리카 간의 좋은 양립성을 밝혔다. 나노 크기의 실리카 입자가 실크 피브로인의 연속 매트릭스 내에 균일하게 분산되었다. 상기 복합 재료의 라만 스펙트럼은 실크 피브로인이 베타 시트 구조를 우세하게 가짐을 나타냈다. 순수한 실크 피브로인 재료와 비교하여, 상기 복합체는 더 나은 동적 기계적 특성을 보였다.

[0008] 특허 출원 WO 200512606을 참조할 수 있으며, 상기 출원은 수성 실크 피브로인 용액 및 이의 제조 방법, 섬유, 실크 폼, 필름 및 실크 수화겔의 제조 방법을 청구한다. 상기 PCT 출원의 제 30면에, 실크 피브로인 용액의 겔화에 대한 이온, pH, 온도 및 PEO의 영향에 대한 연구가 논의된다.

[0009] 상기 종래 기술 조사는 겔화를 촉진시킴으로써 겔화 시간을 감소시키는 방법을 교시하는 문헌이 없음을 밝힌다. 특히 어떠한 종래 기술 문헌도 촉진제를 이용하는 실크 피브로인의 겔화 시간의 촉진 공정을 교시하고 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 주요 목적은 천연 단백질 성분을 함유하는 실크 피브로인과 화학적 가교제인 질산염을 이용하여 실크 고분자 내 화학적 가교반응을 일으켜 신속히 형성되는 겔의 겔화 시간 및 점도의 조절이 가능한 실크 피브로인 유기겔의 제조방법 및 이를 물로 치환함으로써 얻어지는 수화겔의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기한 목적을 달성하기 위해, 본 발명은, 재생 실크 피브로인 스펀지나 분말을 포름산 용매에 1~10 wt% 농도로 용해시켜 용액을 제조하는 단계; 및

[0012] 상기 용액에 0.1~8 wt% 질산염을 첨가하여 겔화하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 질산염 첨가를 통해 제조된 실크 피브로인 유기겔의 제조방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은, 상기 겔화는 수 분 내에 완료되는 것을 특징으로 하는 질산염 첨가를 통해 제조된 실크 피브로인 유기겔의 제조방법을 제공한다.

[0014] 이에 더해, 본 발명은, 상기 제조방법으로 제조된 실크 피브로인 유기겔로서, 상기 실크 피브로인 유기겔은 질산은, 질산리튬, 질산나트륨, 질산칼륨, 질산칼슘에서 선택된 1종의 질산염을 첨가하는 것을 특징으로 하는 실크 피브로인 유기겔 및 실크 피브로인 유기겔을 물로 치환함으로써 얻어지는 실크 피브로인 수화겔의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에서는 천연 단백질 성분을 함유하는 실크 피브로인과 화학적 가교제인 질산염을 이용하여 실크 고분자 내 화학적 가교반응을 일으켜 신속히 형성되는 겔의 겔화 시간 및 점도의 조절이 가능한 실크 피브로인 겔의 제조가 가능한 효과가 있으며, 또한, 단순히 질산염 첨가에 의해 반응이 진행되고 수 분 내에 겔화하므로 전체적

인 반응 공정이 간단하고 시간적으로 경제성이 있고 또한 제조된 유기겔을 물로 용이하게 치환함으로써 수화겔을 제조할 수 있어 바이오산업으로의 적용이 용이한 효과를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 질산염 첨가에 따른 실크 피브로인 용액의 ATR-IR 스펙트럼을 나타낸 도면

도 2는 질산염 첨가량에 따른 실크 피브로인 용액의 겔화 시간을 나타낸 도면

도 3은 질산염 첨가량에 따른 겔 점도 변화를 나타낸 도면

도 4은 실크 피브로인 겔 형성에 대한 모식도를 나타낸 도면

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명에 대하여 설명한다.

[0018] 본 발명은 천연 단백질 성분을 함유하는 실크 피브로인과 화학적 가교제인 질산염을 이용하여 실크 고분자 내 화학적 가교반응을 일으켜 신속히 형성되는 겔의 겔화시간 및 점도의 조절이 가능한 실크 피브로인 겔의 제조방법을 개시한다.

[0019] 일반적으로 기존의 실크 피브로인의 겔화는 구조적인 변화로 일어나며 상세하게는 -helix에서 -sheet로 단백질의 2차 구조의 전환으로 결정화가 진행되면서 일어나게 되는데, 겔화 속도가 현저히 느려 시간이 오래 소요되는 단점을 가져 가공 분야로의 적용 가능성을 저해시키는 요인이 된다.

[0020] 또한, 전형적인 물리적 가교를 갖는 수화겔 형성 방법은 온도나 pH를 변화시키는 방법이지만 이와 같은 조건은 겔화에 긴 시간이 소요되므로 바이오 산업 등의 적용 가능성을 저해시키는 요인이 된다.

[0021] 본 발명은 기존의 실크 피브로인을 이용한 겔화 시 오랜 시간이 소요되는 단점을 보완하기 위해 염 첨가를 통하여 실크 피브로인 겔의 제조시간이 현저히 단축시키는 제조방법에 관하여 개시한다.

[0022] 본 발명에 따른 실크 피브로인의 제조방법은 겔화 시간을 기존의 6일 내지 3시간에서 수 분 이내로 현저히 단축시키는 것을 특징으로 한다. 상기 겔화시간은 1 ~ 15분 범위 인 것이 바람직하다.

[0023] 단순히 염 첨가에 의해 반응이 진행되고 수 분 내에 겔화하므로 전체적인 반응 공정이 간단하고 시간적으로 경제성이 있고 또한 제조된 유기겔을 물로 용이하게 치환함으로써 수화겔을 제조할 수 있어 바이오산업으로의 적용이 용이한 효과가 있다.

[0024] 본 발명의 목적에 따라, 실크 피브로인 겔의 겔화 시간을 감소시키기 위한 공정들을 시도하였다. 본 발명에서는 포름산 용매를 사용하며 염 첨가를 통해 신속한 겔화와 함께 화학적 가교를 갖는 겔을 제조할 수 있으며, 실크 피브로인 함량이나 염 첨가량의 변화에 따라 특성조절을 용이하게 할 수 있다.

[0025] 따라서, 본 발명은

[0026] (1) 재생 실크 피브로인 스펀지나 분말을 포름산 용매에 1~10 wt% 농도로 용해시켜 용액을 제조하는 단계;

[0027] (2) 상기 용액에 0.1~8 wt% 질산염을 첨가하여 겔화하는 단계; 및

[0028] (3) 제조된 유기겔을 수화겔로 전환하기 위해 물로 치환하는 단계;

[0029] 를 포함하고, 상기 질산염의 첨가량을 달리하여 화학적 가교를 갖는 신속한 겔화를 일으켜 제조되는 것을 특징으로 하는 염 첨가를 통해 제조된 실크 피브로인 유기겔 및 수화겔의 제조방법을 제공한다.

[0030] 여기서, 상기 질산염은 질산은, 질산리튬, 질산나트륨, 질산칼륨, 질산칼슘에서 선택된 1종인 것을 특징으로 한다.

[0031] 상기 재생 실크 피브로인 스펀지나 분말은

[0032] (1) 탄산수소나트륨 용액에 실크 생사를 혼합하여 정련한 후, 건조시키는 단계;

[0033] (2) 정련된 실크 피브로인 생사를 염화칼슘/에탈올/증류수를 혼합한 3성분용매로 용해 후 여과 시키는 단계;

[0034] (3) 여과된 용액 내의 염을 제거하기 위해 셀룰로오스 투석막을 이용하여 투석하는 단계;

[0035] (4) 투석하여 얻은 재생 실크 피브로인 수용액 내의 침전물을 원심분리를 통해 제거하여 재생 실크 피브로인 수

용액을 제조하는 단계;

[0036] (5) 상기 재생 실크 피브로인 수용액을 동결 건조시켜 재생 실크 피브로인 스펀지나 분말을 제조하는 단계; 를 통하여 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 여기서, 상기 탄산나트륨 용액과 실크 생사의 중량비는 50 : 1이며, 0.5 wt%의 탄산나트륨 용액을 사용하는 것이 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 이하 상이한 질산나트륨 첨가량을 이용한 다양한 시험 결과를 나타낸 도 1, 2 및 3에 대하여 상세히 설명한다.

[0039] 도 1은 질산나트륨 염 첨가에 따른 실크 피브로인 용액의 ATR-IR 스펙트럼을 도시하고 있다. (a)는 실크 피브로인 용액, (b)는 질산나트륨 1% 첨가된 용액, (c)는 질산나트륨 4% 가 첨가된 용액을 나타내고 있다.

[0040] 제조된 실크 피브로인 겔의 단백질 2차 구조 변화를 표면적외선분광법을 이용하여 측정하였다. 측정 결과 제조된 실크 피브로인 겔은 질산나트륨 염 첨가량에 관계없이 실크피브로인 용액과 같은 피크를 나타냈으며 이는 단백질의 2차 구조가 -sheet로 변화하지 않고 -helix 상태의 겔이 형성되었음을 의미한다.

[0041] 도 2는 질산나트륨 염 첨가량에 따른 실크 피브로인 용액의 겔화 시간을 도시하고 있는데, 각각 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 3.5%의 질산나트륨을 첨가하였다.

[0042] 질산나트륨이 실크 피브로인 용액의 겔화 시간에 미치는 영향을 확인하기 위해 각 질산나트륨 첨가량에 따른 겔화 시간을 측정하였다. 질산나트륨 첨가량이 증가할수록 반응의 가속화가 일어나 겔화 시간이 감소하는 경향을 보였다.

[0043] 도 3은 질산나트륨 첨가량에 따른 겔 점도 변화를 도시하고 있다. (a)는 실크 피브로인 용액, (b)는 질산나트륨 0.1% 첨가된 용액, (c)는 질산나트륨 0.4% 가 첨가된 용액, (d)는 질산나트륨 1% 첨가된 용액, (e)는 질산나트륨 4% 첨가된 용액을 나타내고 있다.

[0044] 질산나트륨 첨가량에 따른 실크 피브로인 겔 점도 변화를 확인하기 위해 염 첨가 시점부터 점도를 측정하였다. 실크 피브로인 용액은 점도의 변화가 관찰되지 않았으나, 질산나트륨의 첨가량이 증가할수록 반응 속도가 증가하였지만, 이와 반대로 질산나트륨의 첨가량이 감소할수록 겔화가 일어난 후의 최대 점도가 증가하는 경향을 보인 것을 알 수 있다.

[0045] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 구체적으로 설명하나, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명의 한 형태를 예시하는 것에 불과할 뿐이며, 본 발명의 범위가 하기 실시예 및 실험예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0046] [실시예 1]

[0047] 재생 실크 피브로인 수용액을 제조하기 위하여 0.5 wt% 탄산수소나트륨 용액에 대해 실크 생사의 중량비가 50:1이 되도록 정련 후 24시간 동안 건조시킨다. 정련된 피브로인 생사를 염화칼슘/에탈올/증류수의 몰비가 1:2:8이 되도록 혼합한 3성분용매로 용해/여과시킨다. 여과된 용액 내의 염을 제거하기 위하여 셀룰로오스 투석막(cut off 12,000 ~ 14,000)을 이용하여 투석을 진행하고 투석하여 얻은 재생 실크 피브로인 수용액은 원심분리를 통해 수용액 내에 남아있는 침전물을 제거하여 실크 피브로인 수용액을 제조한다. 재생 실크 피브로인 수용액에 동결 건조 과정을 거쳐 재생 실크 피브로인 스펀지를 제조한다. 제조된 스펀지는 포름산 용매에 5 wt% 농도로 용해되고 질산나트륨을 0.5% 첨가하여 신속한 겔화를 일으켜 실크 피브로인 겔이 제조된다.

[0048] [실시예 2]

[0049] 질산나트륨을 1% 첨가한 것을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법으로 실크 피브로인 겔을 제조하였다.

[0050] [실시예 3]

[0051] 질산나트륨을 4% 첨가한 것을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법으로 실크 피브로인 겔을 제조하였다.

[0052] [실시예 4]

[0053] 실시예 1과 동일한 방법으로 실크 피브로인 유기겔을 제조 후 투석 과정을 거쳐 포름산을 물로 치환함으로써 실크 피브로인 수화겔을 제조하였다.

[0054] [비교예 1]

[0055] 재생 실크 피브로인 수용액을 만들기 위하여 정련된 피브로인 생사를 염화칼슘/에탈올/증류수의 몰비가 1:2:8이 되도록 혼합한 3성분용매로 용해/여과시킨다. 여과된 용액 내의 염을 제거하기 위하여 셀룰로오스 투석막(cut off 12,000 ~ 14,000)을 이용하여 투석을 진행하고 투석하여 얻은 재생 실크 피브로인 수용액은 원심분리를 통해 수용액 내에 남아있는 침전물을 제거하여 실크 피브로인 수용액을 제조한다. 제조된 재생 실크 피브로인 수용액을 37를 유지하며 -helix가 -sheet로 전환되며 분자 간 소수성 상호작용에 의해 물리적 가교가 형성되는 실크 피브로인 물리겔을 제조하였다.

[0056] 상기 실시예 1, 2 및 3과 비교예 1 의 방법을 통해 실크 피브로인 겔을 제조하는 과정에서 실크 피브로인 용액의 겔화 시간을 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

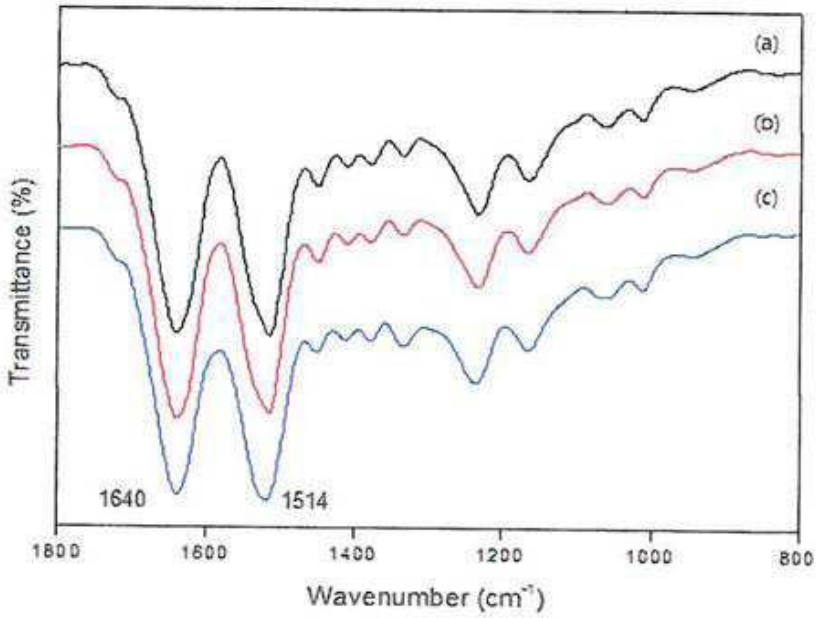
[0057]

	겔화시간(min)
실시예 1(질산나트륨 0.5%)	6
실시예 2(질산나트륨 1%)	2
실시예 3(질산나트륨 4%)	1
비교예 1	180

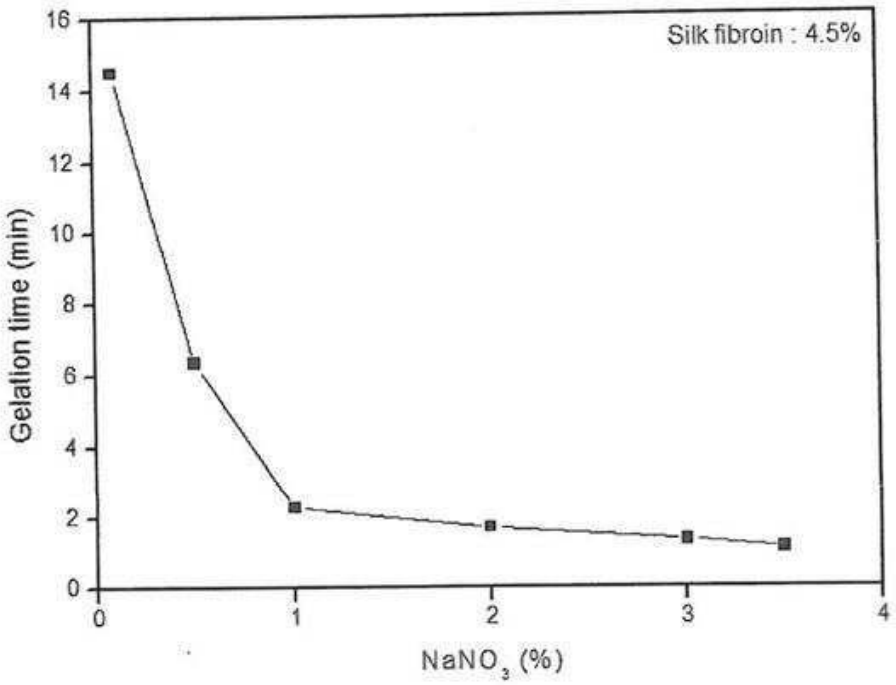
[0058] 상기 표 1에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따라 제조한 실크 피브로인 겔의 겔화시간이 비교예 대비 월등히 짧은 것을 알 수 있다.

도면

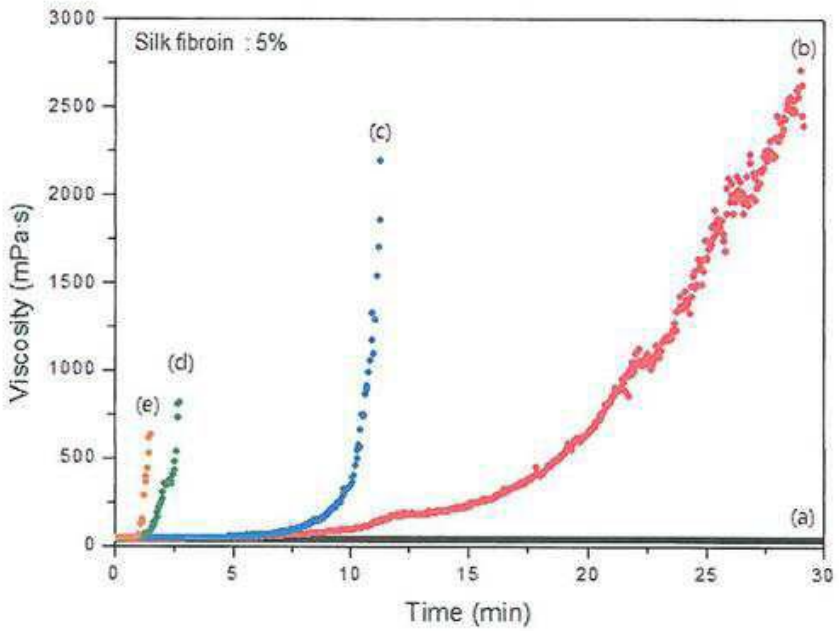
도면1


(a)
(b)
(c)
Transmittance (%)
1640
1514
1800
1600
1400
1200
1000
800
Wavenumber (cm-1)

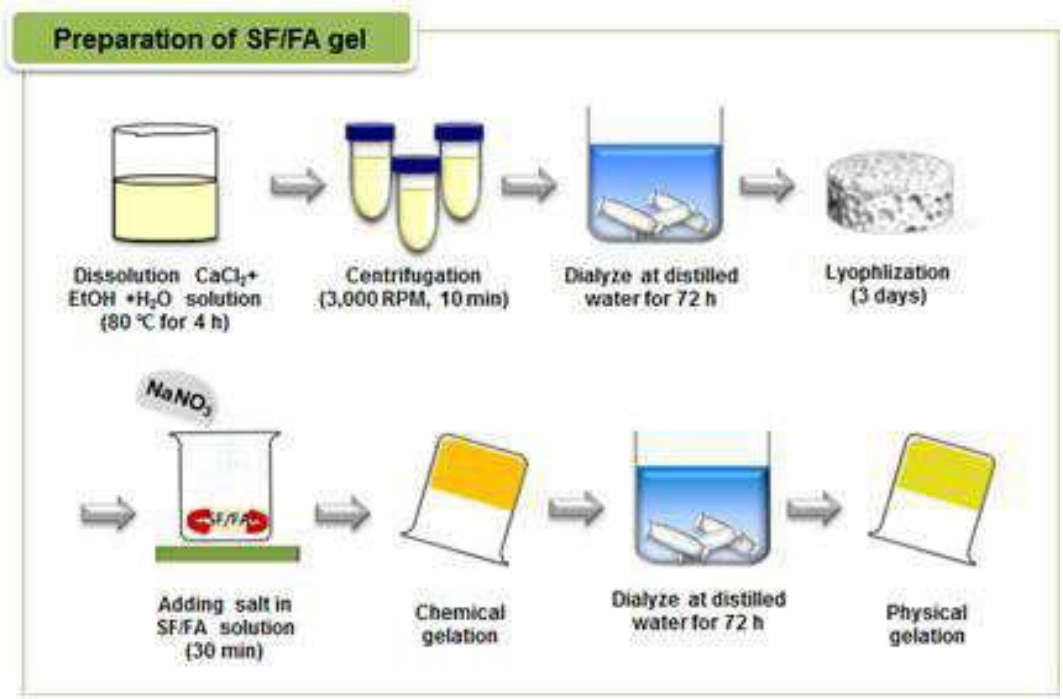
도면2


Silk fibroin : 4.5%
Gelation time (min)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
1
2
3
4
NaNO3 (%)

도면3


Silk fibroin : 5%
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
Viscosity (mPa·s)
Time (min)
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
0
5
10
15
20
25
30

도면4


Preparation of SF/FA gel
Dissolution CaCl2+ EtOH +H2O solution (80 ℃ for 4 h)
Centrifugation (3,000 RPM, 10 min)
Dialyze at distilled water for 72 h
Lyophilization (3 days)
NaNO3
Adding salt in SF/FA solution (30 min)
Chemical gelation
Dialyze at distilled water for 72 h
Physical gelation