

화학공정 기반 기술개발 사업

Development of Main Technology for Chemical Process

고분해성 계면활성제 개발

A Study on the Development of Highly-degradable Protein Surfactants

연구기관

한국화학연구소

과학기술처

이 페이지는

여백입니다

제 출 문

과학기술처 장관귀하

본 보고서를 "화학공정 기반 기술개발 사업" 과제(세부과제명 : 고분해성 계면활성제 개발에 관한 연구)의 보고서로 제출합니다.

1996. 12.

연 구 기 관 : 한국화학연구소

총괄연구책임자 : 이 정 민

세부과제책임자 : 이 병 민

연 구 원 : 강 호 철

" : 윤 정 호

" : 박 종 목

이 페이지는

여백입니다

요 약 문

I. 제목

고분해성 계면활성제 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

오늘날 계면활성제는 여러 산업분야에서 광범위하게 사용되고 있고 또한 종류도 다양하다. 하지만 이들의 사용이 증가되면서 생활 환경에 여러가지 영향을 미치게 되었고 그 문제점들이 나타나게 되었다. 따라서 계면활성제의 성능 제일주의로 생각하는 관점에서 환경오염과 인체에 미치는 영향을 고려하게 되었다. 1990 년대에 들어 몬트리올 의정서, 리오데자네이로의 지구보고서 등 환경문제가 국가의 산업발전과 기업의 활동에 가장 큰 영향을 주는 것이 현실로 다가왔다. 현재 환경문제와 관련하여 세계개발은 크게 고분해성, 인체의 대한 저독성, 무자극성 등의 방향으로 바뀌고 있다. 또한 피부에 대한 안전성을 이유로 천연물질로부터 유래된 계면활성제의 개발에 많은 연구가 진행되고 있다. 최근 친수성 부분을 당류나 단백질류로 하는 계면활성제의 개발연구도 활발하게 진행되고 있으며 일부는 상품화되어 있다. 이러한 계통의 물질은 인체접촉이 많은 부분에 우선적으로 사용되며 비이온계 계면활성제에 비하여 기포력, 세척력이 우수하며 단백질을 변형시키는 작용이 적다. 다른 음이온계 계면활성제에 비하여 독성, 자극성이 거의 없어 인체에 직접 접촉되는 분야에 사용할 수 있음을 보여주고 있다. 그러나 이러한 계면활성제들은 그 안정성과 계면활성성능 등의 문제로 현재 일부 제품에만 소량

응용되고 있는 실정이다. 이러한 계면활성제는 우선 lecithin 과 그 유도체를 들 수 있으며 그 외에도 glycolipid, saponin 등을 천연에서 분리하거나 또는 미생물을 배양함으로써 얻어 사용하려는 연구도 진행되고 있다.

환경적, 공업적 측면에서 볼 때 산업폐기물로 환경오염원이 되는 다음과 같은 물질에서 단백질 원료를 쉽게 구할 수 있다. 피혁산업의 폐기물로 얻어지는 콜라겐, 식용으로 적합하지 않은 육류부위, 수산가공산업의 부산물인 어피, 탈지된 콩, 면화류 등으로 부터 얻을 수 있다. 이러한 물질들은 소량이 비료와 사료로 사용되고 대부분이 폐기되고 있다. 최근에, 아미노산과 펩티드 유도체들은 인체에 이로운 여러가지 특성들이 밝혀지고 있다. 그 특성들은 피부와 머리카락의 세포보호 및 손상된 세포를 회복시키는데 관련되어 있다고 보고되고 있다. 그리고 이의 다기능성, 광학활성 등 아미노산의 다양한 기능을 살린 기능성 재료를 개발하려는 연구도 활기를 띠고 있다. 따라서 단백질계 계면활성제는 최근의 활발한 연구개발로 인해 화장품분야를 시작으로 다방면에 걸쳐 그 특성이 알려져 새로운 기능성 소재로서 종류와 용도가 폭 넓게 확산되고 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구에서는 단백질 가수분해물을 친수기 원료로 사용하고 지방아실클로라이드(fatty acyl chloride)를 소수기 원료로 사용하여 단백질계 계면활성제 제조기술 개발을 목적으로 수행하였다. 단백질 가수분해물의 평균분자량 및 지방족 사슬의 길이에 따른 반응성 및 계면활성제로의 활용성에 관한 고찰을 하였다.

1. 단백질 가수분해물의 활용

2. 단백질계 계면활성제의 반응조건
3. Acyl glycine, acyl peptide의 제조
4. 단백질계 계면활성제의 정제 및 분석
5. 친수기의 분자량에 따른 단백질계 계면활성제의 물성

IV. 연구개발결과

미생물에 의해 쉽게 분해되며 인체에 대한 자극성을 줄이면서 성능이 우수한 계면활성제를 합성하기 위하여 다음과 같이 선별적으로 반응시켰다. 생분해되기 쉬운 구조를 가진 fatty acid chloride (capryloyl chloride, lauroyl chloride, palmitoyl chloride, stearoyl chloride)와 단백질 가수분해물(glycine, peptide-185, peptide-245, peptide-300, peptide-410)을 이용하여 단백질계 계면활성제의 효율적인 합성·정제과정을 연구하였다. acyl glycine 4종류(capryloyl glycine, lauroyl glycine, palmitoyl glycine, stearoyl glycine), acyl peptide 16종류(capryloyl peptide-185, lauroyl peptide-185, palmitoyl peptide-185, stearoyl peptide-185; capryloyl peptide-245, lauroyl peptide-245, palmitoyl peptide-245, stearoyl peptide-245; capryloyl peptide-300, lauroyl peptide-300, palmitoyl peptide-300, stearoyl peptide-300; capryloyl peptide-410, lauroyl peptide-410, palmitoyl peptide-410, stearoyl peptide-410)를 최적의 조건에서 합성하였으며 순수하게 정제할 수 있었다.

합성과정에서의 연구는 다음과 같다. 반응장치를 단순화 할 수 있었고 반응율을 대부분 80% - 94%로 높일 수 있었다. acyl glycine, acyl peptide의 반응조건(반응온도, 반응물비, 반응 pH, 반응온도)을 최적화할 수 있었다.

정제과정에서의 연구는 다음과 같다. 정제장치를 간편화 시켰고

2단계 정제과정으로 완전한 정제가 가능했다. 정제과정에서 유기용매의 사용단계를 줄이고 생성물의 손실을 최대한 줄일 수 있었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

단백질은 동물, 식물에서 얻을 수 있는 풍부하고 값 싼 자원이다. 피혁산업, 육류가공산업, 수산가공산업, 농산물가공산업의 부산물로부터 나오고 있는 단백질원은 대부분 폐기되어 환경을 오염시키고 있다. 이를 활용하므로서 환경오염원을 차단할 수 있다. 기존의 아미노산, 펩티드의 사용처는 직물산업의 첨가제로 사용되었다. 그 자체나 유도체가 혼합물 형태로 제조되었고 정제과정이 세련되지 못했기 때문에 사용용도의 제한이 많았다. 현재는 아미노산, 펩티드 유도체들의 여러가지 특성이 밝혀지고 있다. 이들은 피부와 머리카락의 세포보호 및 손상된 세포를 회복시키는데 관련되어 있다고 보고되고 있다. 이러한 특성들이 알려지면서 유럽과 일본 등 선진국에서는 샴푸, 크림, 로션 등에 사용하기 시작했고 사용량이 점점 증가하고 있다. 하지만 국내에서는 계면활성제 제조회사가 중소기업형태이므로 기술개발에 대한 적극적인 투자가 어려운 실정이다. 따라서 연속적인 정부차원의 연구가 이루어져야 한다고 본다. 단백질계 계면활성제는 환경적합성, 인체안정성, 고기능성, 편리성을 고루 갖춘 세제에 가장 접근하고 있는 것 중의 하나이다. 단백질계 계면활성제의 특성은 비이온계의 저자극성과 음이온계의 성능을 동시에 가지고 있다. 따라서 주방용 세제, 샴푸, 로션 등 인체접촉이 가장 많은 분야에 우선적으로 사용되어야 한다.

SUMMARY

This study relates to develop protein surfactant having high foaming stability, cleaning properties, biodegradation and safety. Protein surfactants have provided a means of retaining the mildness of the nonionic surfactants, maintaining the foaming power and detergency of anionic surfactants.

Protein surfactants have potential for use as surfactants, but the potential has been limited by the cost of their commercial preparation. A series of long chain acyl peptides were easily prepared by treating an acid chloride with the appropriate peptides in an aqueous system. Two series of acylated glycines and peptides[(1) the acyl glycine derivatives, varying the length and nature of the acyl chain(acyl glycine); (2) The capryloyl , lauroyl, palmitoyl and stearyl derivatives of peptides(acyl peptide-185, acyl peptide-245, acyl peptide-300 and acyl peptide-410)] were synthesized and purified.

이 페이지는

여백입니다

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	17
Chapter 2. Related previous research area	31
Chapter 3. Results and discussion	33
I. Experimental sections	33
1. Apparatus and reagents	33
2. Synthetic procedures	34
3. Purification and analysis	39
II. Result and discussion	41
1. Reaction condition	41
2. Syntheses of acyl glycines	49
3. Syntheses of acyl peptides	50
4. Purification	52
5. Analysis and physical properties	54
Chapter 4. Goal and attainability	63
Chapter 5. Plans	65
Chapter 6. References	67

이 페이지는

여백입니다

목 차

제 1 장 서 론	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황	31
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	33
제1절 실험 방법	33
1. 사용 기기 및 시약	33
가. 사용 기기	33
나. 시약	33
2. 단백질계 계면활성제의 합성	34
가. Acyl glycine	34
(1) Capryloyl glycine	34
(2) Lauroyl glycine	34
(3) Palmitoyl glycine	35
(4) Stearoyl glycine	35
나. Acyl peptide	35
(1) Acyl peptide-185	35
① Capryloyl peptide-185	35
② Lauroyl peptide-185	36
③ Palmitoyl peptide-185	36
④ Stearoyl peptide-185	37
(2) Acyl peptide-245	37
① Capryloyl peptide-245	37
② Lauroyl peptide-245	37
③ Palmitoyl peptide-245	37

④ Stearoyl peptide-245	38
(3) Acyl peptide-300	38
① Capryloyl peptide-300	38
② Lauroyl peptide-300	38
③ Palmitoyl peptide-300	38
④ Stearoyl peptide-300	38
(4) Acyl peptide-410	39
① Capryloyl peptide-410	39
② Lauroyl peptide-410	39
③ Palmitoyl peptide-410	39
④ Stearoyl peptide-410	39
3. 단백질계 계면활성제의 정제 및 물성	39
가. 정제	39
나. 물성	40
제2절 결과 및 고찰	41
1. 반응조건	41
가. Acyl glycine	42
나. Acyl peptide	47
2. Acyl glycine의 합성	49
3. Acyl peptide의 합성	50
가. Acyl peptide-185	50
나. Acyl peptide-245	50
다. Acyl peptide-300	51
라. Acyl peptide-410	51
4. 정제	52

5. 분석 및 물성	54
가. 구조분석	54
(1) NMR	54
① Acyl glycine	54
② Acyl peptide	54
(2) IR	55
(3) GC	56
나. 물성	58
(1) 표면장력	58
(2) 기포력	60
(3) 유화력	60
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대의기여도	63
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	65
제 6 장 참고문헌	67

이 책이기는

여기입니다

List of Figures

Fig. 1. Protein hydrolysis and acylation.	29
Fig. 2. Added NaOH solution volume against reaction time for acyl glycine at various pH.	46
Fig. 3. Added KOH solution volume against reaction time for acyl glycine at various pH.	46
Fig. 4. Added NaOH solution volume against reaction time for lauroyl peptide-185 at various mole ratios.	48
Fig. 5. Added KOH solution volume against reaction time for acyl glycine at pH 11.60.	49
Fig. 6. Structures of acyl glycines and acyl peptides.	55
Fig. 7. Surface tension against aliphatic chain length for acyl peptides.	59
Fig. 8. Surface tension against hydrophilic part for acyl peptides.	59
Fig. 9. ^1H NMR spectrum of capryloyl glycine.	69
Fig. 10. ^1H NMR spectrum of lauroyl glycine.	69
Fig. 11. ^{13}C NMR spectrum of lauroyl glycine.	70
Fig. 12. ^1H NMR spectrum of stearoyl glycine.	70
Fig. 13. ^1H NMR spectrum of palmitoyl glycine.	71
Fig. 14. ^1H NMR spectrum of capryloyl peptide-185.	71
Fig. 15. IR spectrum of capryloyl peptide-185.	72
Fig. 16. IR spectrum of lauroyl peptide-185.	72
Fig. 17. IR spectrum of palmitoyl peptide-185.	73
Fig. 18. IR spectrum of stearoyl peptide-185.	73
Fig. 19. IR spectrum of capryloyl peptide-245.	74
Fig. 20. IR spectrum of lauroyl peptide-245.	74

Fig. 21. IR spectrum of palmitoyl peptide-245.	75
Fig. 22. IR spectrum of stearoyl peptide-245.	75
Fig. 23. IR spectrum of capryloyl peptide-300.	76
Fig. 24. IR spectrum of lauroyl peptide-300.	76
Fig. 25. IR spectrum of palmitoyl peptide-300.	77
Fig. 26. IR spectrum of stearoyl peptide-300.	77
Fig. 27. IR spectrum of capryloyl peptide-410.	78
Fig. 28. IR spectrum of lauroyl peptide-410.	78
Fig. 29. IR spectrum of palmitoyl peptide-410.	79
Fig. 30. IR spectrum of stearoyl peptide-410.	79

List of Tables

Table 1. Amino acids found in proteins.	23
Table 2. Protein composition of skim milk of various breeds.(g/l).	25
Table 3. Properties of some principal proteins of cow milk.	25
Table 4. Common amino acids in some caseins.	26
Table 5. Comparative analysis of collagens from different source.	27
Table 6. N-Acylsarcosinates, $RCON(CH_3)CH_2CO_2M$	28
Table 7. Acylated protein hydrolysate.	28
Table 8. Reaction yields of lauroyl glycine at various pH(NaOH).	43
Table 9. Reaction yields of lauroyl glycine at various mole ratios(NaOH).	43
Table 10. Reaction yields of lauroyl glycine at various pH(KOH).	44
Table 11. Reaction yields of lauroyl glycine at various reaction mole ratios(KOH).	44
Table 12. Reaction yields of lauroyl peptide-185 at various mole ratios.	47
Table 13. Reaction yields of lauroyl peptide-185 at various pH.	48
Table 14. Reaction yields of acyl glycine at pH 11.60.	49
Table 15. Reaction yields of acyl peptide-185 at pH 11.17.	51
Table 16. Reaction yields of acyl peptide-245 at pH 11.17.	51
Table 17. Reaction yields of acyl peptide-300 at pH 11.17.	52
Table 18. Reaction yields of acyl peptide-410 at pH 11.17.	52
Table 19. Data of GC retention time of various amino acids.	57
Table 20. Surface active properties of synthesized protein surfactants.	62

이것이 바로

여러분의

제1장 서론

1990 년대에 들어 몬트리올 의정서, 리오데자네이로의 지구보고서 등 환경문제가 국가의 산업발전과 기업의 활동에 가장 큰 영향을 주는 것이 현실로 다가왔다. 자연계에서는 미생물이 하나의 환경 생태계를 형성하여 다양한 유기물을 생물학적으로 분해, 제거함으로써 자연정화에 기여하고 있는데 이러한 환경 생태계는 그 정화능력에서 한계가 있어 유기물이 과도하게 유입되었을 때는 생태계가 파괴되고 환경오염이 발생하게 된다. 따라서 어떤 화학물질의 환경생태계에 있어서의 거동을 파악하는 것은 아주 중요한데 그것의 척도가 생분해도(biodegradability)이다. 현재의 환경문제에 관련된 세제개발은 크게 생분해성, 인체의 독성, 무자극성 등의 방향으로 바뀌고 있다. 또한 피부에 대한 안전성을 이유로 천연물질로부터 유래된 계면활성제의 개발에 많은 연구가 진행되고 있다.

천연의 계면활성제인 비누는 2,000 여년 전에 등장하여 현대 문명의 산물이라 할 수 있는 합성세제가 등장하기 이전에는 주요한 세제원으로 사용되었다. 1930 년대 세제의 수요가 증대하면서 유지자원의 한계에 부딪히게 됨에 따라 합성세제가 새로운 세제원으로 개발되었다. 1940 년대 초 ABS(alkylbenzene sulfonate)가 독일에서 개발되어 훌륭한 세제원으로서 합성세제의 대명사가 되었다. 현재 ABS 는 환경오염의 원인이 된다는 사실이 알려져 그 사용이 제한되고 있다. 생분해성이 나쁘기 때문에 ABS 를 주원료로 사용하였을 때 하수처리장의 발포현상 등으로 하수처리에 곤란을 겪으면서 세제의 생분해성이 사회문제가 되었다. 이런 현상들이 제기되면서 소수성기를 직쇄화하는 등 생분해성이 크게 개선된 LAS(linear alkyl benzene sulfonate)

가 개발되어 ABS를 대체하면서 세제의 연성화가 이루어지기 시작하였다. LAS 등장 이후에도 AS(alkyl sulfate), AES(alkyl ether sulfate), AOS(α -olefin sulfonate) 등 생분해성이 우수한 합성세제들이 상업화되었다. 합성세제는 우수한 세정력과 편리성이 인식되고 효율적인 자원이용을 추구하면서 급속한 성장을 하였다. 우리나라도 합성세제가 도입된 이래 비누소비량을 추월하여 현재 합성세제의 사용량이 전체 사용량의 70%를 상회한다. 최근에는 사회분위기를 반영하여 환경적 합성, 인체안정성, 고기능성, 편리성을 갖춘 세제의 개발이 추진되고 있다. 세제는 대중과 가장 친숙한 소비재 중의 하나이기 때문에 세제의 환경문제에 관한 관심이 지대하리라 생각된다. 최근 친수성 부분을 당류나 단백질로 하는 계면활성제의 개발연구도 활발하게 진행되고 있으며 일부는 상품화되어 있다. 이러한 계통의 물질은 많은 부분에 우선적으로 사용되며 비이온계 계면활성제에 비하여 기포력, 세척력이 대단히 우수하며 단백질을 변형시키는 작용이 적다. 기존의 다른 음이온계 계면활성제에 비하여 과도하게 피부물질을 제거하지 않아 독성이 거의 없어 자극이 적은 샴푸, 화장품 등으로 사용할 수 있음을 보여주고 있다. 그러나 이러한 계면활성제들은 그 안정성과 계면활성능력 등의 문제로 현재 일부 제품에만 소량 응용되고 있는 실정이다. 이러한 계면활성제는 우선 lecithin과 그 유도체를 들 수 있으며 그 외에도 콜라겐, 펩티드, glycolipid, saponin 등을 천연에서 분리하거나 또는 미생물을 배양함으로 부터 얻어 사용하려는 연구도 진행되고 있다.

단백질과 그 유도체의 공업적인 사용초기에는 대부분이 콜라겐이었고 불순물을 많이 함유한 상태로 제조되어 그 자체로 직물산업에 사용되었다. 정제과정이 세련되고 상품의 질이 높아지면서 크림,

로손, 화장품 등 여러분야로 확산되었다. 수용성의 단백질 가수분해물의 첨가는 피부자극으로부터 피부를 보호하고 피부조직을 재건하도록 피부를 자극한다는 사실이 밝혀져 있다. 이런 아미노산들은 피부의 NMF(natural moisturizing factor)의 40% 정도를 형성한다. ABS, AS, AES, AOS 등 기존의 음이온계 계면활성제는 기포력과 세척력이 뛰어나지만 피부와 눈에 자극적이어서 피부손상을 야기한다. 비이온계 계면활성제는 피부와 눈에 대한 자극성은 별로 없으나 기포력, 세척력 등의 성능면에서 음이온계 계면활성제보다 열등하다. 단백질계 계면활성제는 샴푸, 세면비누, 주방용세제 등 인체에 밀접한 관련을 가지는 분야에서 매우 자극성이 적고 안전하다고 알려져 있다. 또한 기포력이나 세척력에서도 성능의 손실이 거의 없다. 이 사실은 비이온계의 저자극성과 음이온계의 성능을 유지시켜 음이온성계 세제의 기능을 보강시켜 주는 방향을 제시한다. 따라서 단백질계의 화학적 변환을 통해 세제의 유해영향을 감소시킨다. 즉, 단백질의 카르복실기의 에스테르화 반응이나 아미드화 반응을 통해 목적을 달성한다. 기본적으로 단백질계 세제는 sulfate 나 sulfonate 계 만큼 피부로부터 탈지하지않기에 특히 피부세척제로서 바람직하다.

아미노산은 아미노기와 카르복실기를 가진 화합물로서 단백질, 효소중의 구성성분으로 생체에 필수적인 화합물이다. 아미노산은 수용액에서 산성형(aminoacid form) 및 양성이온형(zwitterion form)을 취할수 있으며 안정한 양성이온형으로 존재한다.



또한 아미노산들이 서로간에 아미드결합으로 연결되어 있는 분자들을 펩티드라고 한다. 동물과 식물로 부터 얻을 수 있는 천연단백질을 완전히 가수분해하면 22종의 아미노산으로 분리된다.(22종의 아미노산 중 hydroxy proline과 cystine은 생체내에서 proline과 cysteine으로부터 만들어 질 수 있기에 생체내의 아미노산 구성성분은 실질적으로는 20 종이다.) Table 1에 단백질로부터 얻어지는 아미노산들의 구조와 특성을 나타내었다. 특히 카제인이나 콜라겐은 단백질 원료로서 쉽게 구할 수 있는데 특성은 다음과 같다. 카제인은 우유의 주 성분으로서 Table 2와 Table 3에서 보듯이 분자량 20,000 - 30,000 정도이며 아미노산 조성은 Table 4와 같다. 그리고 콜라겐은 장력이 매우 큰 불용성섬유를 형성하는 것을 특징으로 한다. 포유동물에 있어서는 가장 많은 단백질이며 포유동물 전체 무게의 1/4을 이룬다. 피부, 뼈, 힘줄, 연골 및 이빨 등의 중요한 섬유상 요소이다. 미숙한 콜라겐은 285,000의 분자량을 가지고 있으며 크기가 같은 세 개의 폴리펩티드 사슬로 이루어져 있다. 콜라겐에 있는 세 가닥들 각각은 약 1000개의 아미노산 잔기들로 구성되는데 아미노산 구성성분은 Table 5와 같다. 콜라겐을 젤라틴으로 만들 때는 다음과 같은 방법에 의해 만든다. 3% NaOH나 1% H₂SO₄로 전처리하여 수용액 중에서 여러 차례의 가열과정을 거치면 완전히 젤라틴으로 변환할 수 있다. 또한 카제인과 젤라틴은 필요한 분자량 크기로 잘라낼 수 있는데 다음과 같다. 동·식물 단백질의 가수분해는 산, 염기에 의한 화학적 분해법과 효소에 의한 효소적 분해법이 있다.(Fig. 1) 화학적 분해법에서는 산가수분해법이 많이 사용되는데 산 수용액에서 온도와 시간의 조절로 가수분해 정도를 조절할 수 있다. 효소적 분해법은 pepsin, papain, chymotrypsin, trypsin 등의 효소를 이용하여 적합한 pH, 온도(pH=1.87

~ 8.5, 37 ~ 44° C)에서 특정 펩티드결합을 끊기 때문에 단백질을 선택적으로 가수분해할 수 있다.

공업적인 관점에서 볼 때 최근 제조기술의 발달로 종래 고가였던 아미노산이 비교적 염가로 얻어지게 되었다. 그리고 이의 다기능성, 광학활성 등 아미노산의 다양한 기능을 살린 기능성 재료를 개발하려는 연구도 활기를 띠고 있다. 그중에서도 아미노산계 계면활성제는 최근의 활발한 연구개발로 인해 화장품분야를 시작으로 다방면에 걸쳐 그 특성이 알려져 새로운 기능성 소재로서 종류와 용도가 폭 넓게 확산되고 있다. 아미노산을 기본골격으로 하는 계면활성제는 출발물질을 아미노산으로하는 방법과 이외의 물질에서 출발하여 생성물을 아미노산 구조를 갖는 방법으로 구별할 수 있다. 전자의 방법으로 얻어진 것을 아미노산계 계면활성제, 후자를 아미노산 형태 계면활성제로 별도로 분류하기도 하지만 보편적으로 구별하지 않는다. 아미노산계 계면활성제는 환경, 피부에 대한 높은 안정성, 피부와 모발에 대한 친화성, 아미노기에서 유래하는 특수한 회합체형성, 항산화능 등 다양한 기능을 가지고 있는 그 특성을 활용해 넓은 용도가 개척되어지고 있다. N-acylaminoalkanoic acid와 그 유도체는 “Medialan”과 “Lamepon”이란 상품명으로 독일에서 처음으로 상업적으로 생산되었다. 이들은 쉽게 구할 수 있는 정제하지않은 아미노산 유도체들이다(Table 6 과 Table 7). Lamepon 은 가죽가공공정에서 쉽게 얻을 수 있는 가수분해 단백질로부터 유도된 아미노산 및 펩티드의 fatty acyl 유도체이다. Lamepon 과는 대조적으로 Medialan 은 쉽게 원료 물질로부터 만들 수 있는 합성 아미노산인 N-methyl glycine (sarcosine)의 유도체이다. acylamino acid 의 알칼리금속염은 세척력과 기포력에서 비누보다도 칼슘 안정성은 더 좋다고 알려져있다. 부가

적으로 이것은 뛰어난 저자극성을 나타내고 피부나 머리카락에 강하게 흡수된다. acyl sarcosine 보다 효율적인 acyl amino isobutyrate 알칼리 금속염도 개발되었는데 이 화합물은 습윤(wetting), 분산(dispersing), 유화제(emulsifying agent)로 유용하고 피부를 보호하고 경수에 덜 민감하다. 단백질계 계면활성제는 피부와 눈 등 인체에 자극적이지 않고 친화성이 있다. 또한 세척성과 기포성이 비이온계 보다 뛰어난 특성과 생분해성이 좋은 이유로 현재 관심이 고조되고 있는 분야이다.

단백질계 계면활성제 제조에는 여러가지 합성방법을 이용할 수 있다(Fig. 1). 이용할 수 있는 합성방법들을 열거하면 다음과 같이 요약할 수 있다.

- (1) 아미노산과 fatty acyl chloride 와의 반응
- (2) 지방산 무수물과 아미노산과의 반응
- (3) 지방산과 아미노산과의 반응
- (4) Lactam 으로 부터 acylamino acid 의 합성
- (5) 단백질 가수분해물의 acylation
- (6) Amidomethylation 으로 부터 acyl glycine 의 제조

단백질은 피혁산업의 폐기물로 얻어지는 콜라겐, 식용으로 적합하지 않는 육류부위 및 수산가공산업의 부산물인 어피, 탈지된 콩·면화 부산물 등으로부터 쉽게 얻을 수 있다. 이러한 물질들은 소량이 비료, 사료로 사용되고 대부분이 폐기되고 있다. 본 연구에서는 단백질 가수분해물과 acyl chloride 를 이용하여 계면활성제를 개발하고, 펩티드의 평균분자량에 따른 acyl peptide 의 반응조건, 반응성 및 물성을 연구한다.

Table 1. Amino acids found in proteins

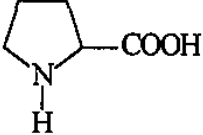
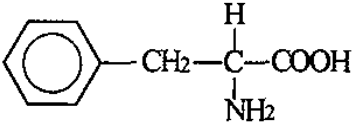
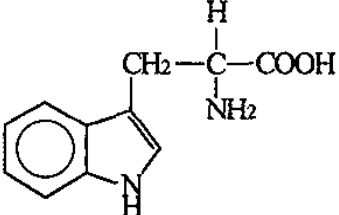
Name	Structure	Melting or decomposition temp.(°C)	Solubility in water (g/100 ml at 25 °C)
Glycine	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	233 d	25
Alanine	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	297 d	17
Valine	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	315	9
Leucine	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	337	2
Isoleucine	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	284	4
Proline		220	162
Phenylalanine		283	3
Tryptophan		289	1
Methionine	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	283	3
Serine	$\text{HO}-\text{CH}_2-\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	228	5

Table 1. (Continued)

Threonine	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	257	very soluble
Cysteine	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HS}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	-	very soluble
Tyrosine	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	344	0.04
Asparagine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{C}-\text{CH}_2-\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} \end{array}$	236	2.4
Glutamine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} \end{array}$	186	3.6
Aspartic acid	$\begin{array}{c} \text{HO} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{C}-\text{CH}_2-\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} \end{array}$	269	0.4
Glutamic acid	$\begin{array}{c} \text{HO} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} \end{array}$	247	0.7
Lysine	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	255	very soluble
Arginine	$\text{NH}_2-\text{C}(\text{NH})=\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	230 d	very soluble
Histidine	$\text{Imidazole ring}-\text{CH}_2-\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	287	0.04

Table 2. Protein composition of skim milk of various breeds.(g/l)

Protein component	Ayrshire	Brown Swiss	Guernsey	Holstein	Jersey	Molecular weight
α -casein	17.1	18.3	19.2	15.8	18.3	30,000
β -casein	8.5	8.4	8.2	6.0	7.6	24,100
γ -casein	0.8	1.1	1.4	2.0	1.3	30,000

Table 3. Properties of some principal proteins of cow milk.

Protein	Concentration (g/liter)	Molecular weight	pI
α_{s1} -Casein	13.7	30,000	4.1
κ -casein	3.7	20,000	3.7
β -Casein	6.2	24,100	4.5
γ -Casein	1.2	30,000	5.8 - 6.0
β -Lactoglobulin	3.0	18,300	5.3
α -Lactalbumin	0.7	14,200	5.1
Bovine serum albumin	0.3	69,000	4.7
Immunoglobulin(IgG)	0.6	160,000	5.6 - 6.0

Table 4. Common amino acids in some caseins.

Amino acid	α_{S1} -Casein B	α_{S2} -Casein A	κ -Casein B	β -Casein A
Aspartic acid	7	4	4	4
Asparagine	8	14	7	5
Threonine	5	15	14	9
Serine	8	6	12	11
SerP	8	11	1	5
Glutamic acid	24	25	12	18
Glutamine	15	15	14	21
Proline	17	10	20	35
Glycine	9	2	2	5
Alanine	9	8	15	5
Cysteine	0	2	2	0
Valine	11	14	11	19
Metionine	5	4	2	6
Isoleucine	11	11	13	10
Leucine	17	13	8	22
Tyrosine	10	12	9	4
Phenyl alanine	8	6	4	9
Tryptophan	2	2	1	1
Lysine	14	24	9	11
Histidine	5	3	3	5
Arginine	6	6	5	4
Glutamic acid	0	0	1	0
Total residues	199	207	169	209

Table 5. Comparative analysis of collagens from different source.

Amino acid	Ox skin	Ox skin(soulable)	Lungfish skin
Lysine	25.7	24.0	24.2
Hydroxylysine	6.6	7.8	5.3
Histidine	4.3	1.9	5.1
Arginine	44.7	47.1	51.0
Aspartic acid	49.4	44.6	48.6
Glutamic acid	71.5	73.7	78.9
Ammonia	44.0	36.3	46.8
Proline	118.6	111.3	126.0
Hydroxyproline	92.6	102.3	73.1
Serine	38.4	39.7	43.7
Threonine	18.0	18.2	26.1
Glycine	335.0	341.0	311.0
Alanine	109.7	115.1	128.0
Valine	19.9	19.0	21.3
Methionine	6.2	5.1	4.0
Isoleucine	13.5	10.4	12.2
Leucine	26.9	24.0	25.2
Tyrosine	5.1	2.8	1.1
Phenylalanine	13.4	11.8	15.3
Nitrogen	18.6	17.7	18.2

Table 6. N-Acylsarcosinates, RCON(CH₃)CH₂CO₂M.

Trade name	RCO-	M	Concn. (wt. %)	Functions*	Maker
Hamposyl C	Cocoyl	H	100	C, D, E	GWR
Hamposyl C-30	Cocoyl	Na	30	C, D, E	GWR
Hamposyl L	Lauroyl	H	100	C, D, E	GWR
Hamposyl L-30	Lauroyl	Na	30	C, D, E	GWR
Hamposyl O	Oleoyl	H	100	C, D, E	GWR
Maprosyl 30	Lauroyl	Na	30	C, D, E	OXR
Sakosyl LC	Cocoyl	Na	100	C, D, E	CGY
Sacosyl O	Oleoyl	Na	100	C, D, E	CGY

* C: Corrosion inhibitor

GWR: W.R.Grace & co.,organic chemicals div.

D: Detergency

OXR: Onyx chemical co.

E: Emulsification

CGY: CIBA-GEIGY corp., dyestuff & chemicals division

Table 7. Acylated protein hydrolysate.

Trade name	Fatty acid	Cation	Concn. (wt. %)	Fuctions
Maypon 4C	Coco	K	36	D
Maypon 4CT	Coco	TEA*	38	D
Maypon K	Oleic	Na	44	D,E
Maypon UD	Undecylenic	K	35	D

* TEA: triethanolammonium

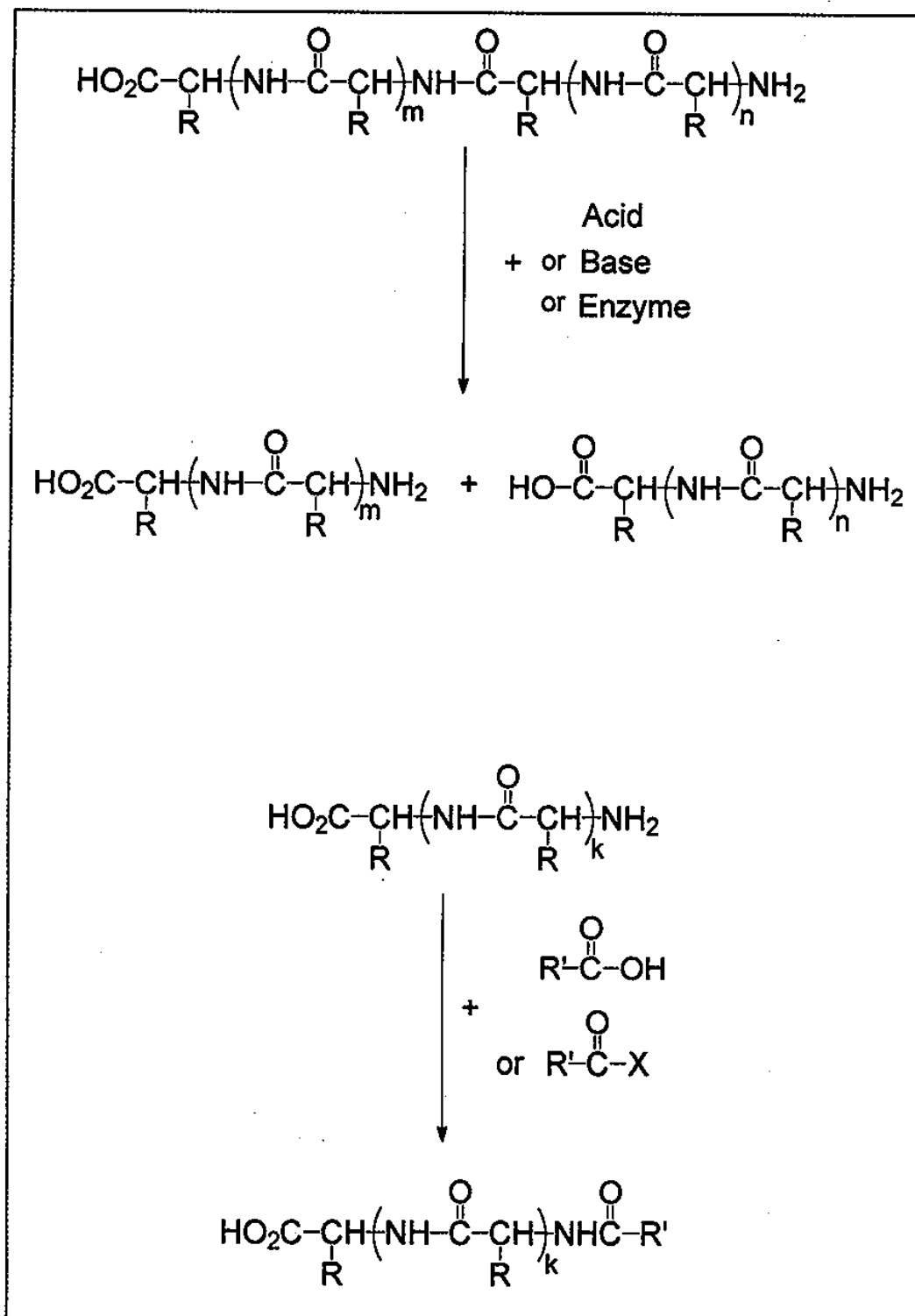


Fig. 1. Protein hydrolysis and acylation.

이 책이 주는

여백입니다

제 2 장 국내외 기술개발 현황

계면활성제 산업은 기술집약적인 고부가가치의 산업이다. 하지만 전형적인 중소기업형 산업으로 영세한 규모의 업체들이 난립해 있고 기술 축적수준 또한 낮아 열악한 환경을 벗어나지 못하고 있다. 계면활성제는 초기에는 섬유용으로 사용되었으나 비섬유용으로 수요구조가 조정되면서 플라스틱, 화장품, 세제 등의 분야로 수요영역이 확대되었다. 의약, 화장품용 계면활성제의 95년도 국내생산은 4500 톤으로 94년에 비해 16.9 % 감소하였다. 이는 의약, 화장품용 계면활성제 시장에 대기업들의 사업 진출과 수입완제품의 증가를 의미한다. 또한 세제용 기존 세제의 수요량은 정체상태인 반면에 천연원료를 사용한 세제의 사용은 증가 추세이다.

공업적으로 사용된 단백질과 그 가수분해물들은 초기에는 대부분이 콜라겐이었고 정제하지 않고 제조되어 그 자체로 직물산업에 사용되었다. N-Acylaminoalkane acid와 그 유도체는 Medialan과 Lamepon이란 상품으로 상업적으로 생산되고 있다. Lamepon은 가죽가공공정에서 쉽게 얻을 수 있는 가수분해 단백질로부터 합성된 유도체이고 Medialan은 합성 아미노산인 N-methyl glycine(sarcosine)의 유도체이다.

공업적인 관점에서 볼 때 최근 제조기술의 발달로 종래 고가였던 아미노산이 비교적 염가로 얻어지게 되었다. 그리고 이의 다기능성, 광학활성 등 아미노산의 다양한 기능을 살린 기능성 재료를 개발하려는 연구도 활기를 띠고 있다. 그중에서도 아미노산계 계면활성제는 최근의 활발한 연구개발로 인해 화장품분야를 시작으로 다방면에 걸쳐 그 특성이 알려져 새로운 기능성 소재로서 종류와 용도가 폭 넓게 확산되고 있다. 아미노산계 계면활성제는 환경, 피부에 대한 높

은 안정성, 피부와 모발에 대한 친화성, 아미노기에서 유래하는 특수한 회합체형성, 항산화능 등 다양한 기능을 가지고 있는 그 특성을 활용해 넓은 용도가 개척되어지고 있다.

현재 국내의 계면활성제 관련업체들에서는 단백질계 물질의 초기적인 상태의 생산에 머물고 있다. 피혁산업의 폐기물로 얻어지는 콜라겐, 식용으로 적합하지 않는 육류부위 및 수산가공산업의 부산물인 어피, 탈지된 콩·면화 부산물 등으로부터 단백질을 얻을 수 있는데 대부분이 폐기되고 있다. 이중 일부는 다음과 같이 사용되고 있다. 콜라겐을 정제해서 섬유용으로 생산하거나, 젤라틴으로 가공해서 화장품용으로 제조하는 초보적인 수준에 있다. 필요한 단백질계 계면활성제는 전량 수입에 의존하고 있다. 계면활성제 관련업체들이 영세한 규모라서 연구할 인적자원, 물적자원도 없는 열악한 실정이다. 따라서 이러한 기반기술의 개발을 위하여 정부차원에서 꾸준히 투자하여야 한다.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 실험 방법

1. 사용 기기 및 시약

가. 사용 기기

FT-IR spectrophotometer (Digilab FTS 80)

Mass spectrometer(Jeol)

Tensiometer(Kruss K12)

Nuclear magnetic resonance spectrometer (Bruker AM 300)

Nuclear magnetic resonance spectrometer (Bruker AMX 500)

High performance liquid chromatography (Waters)

Gas chromatography (Hewlett Packard 5890)

나. 시약

glycine(98%, Aldrich), capryloyl chloride(97%, Fluka), lauroyl chloride(98%, Fluka), palmitoyl chloride(EP, TCI), stearoyl chloride(95%, Fluka), potassium hydroxide (EP, Junsei), sodium hydroxide(EP, Junsei), casein hydrolyzate[peptide-185(Mw=185, Fluka)], casein hydrolyzate[peptide-245(Mw=245, Fluka)], casein hydrolyzate[peptide-300(Mw=300, Fluka)], casein hydrolyzate[peptide-410(Mw=410, Fluka)], acetone(EP, 동양화학), chloroform (EP, 동양화학), diethyl ether(EP, Junsei)

2. Protein계 계면활성제의 합성과 정제

가. Acyl glycine

(1) Capryloyl glycine

100 ml beaker, magnetic stirrer, mechanical stirrer, 온도계를 준비하고 glycine 3.83g(0.05 mole)을 가한다. 2N KOH수용액으로 상온에서 교반하면서 녹여 pH=11.6이 되게 한다. capryloyl chloride 8.39g(0.05 mole)을 5분간에 걸쳐 천천히 첨가한다. pH=11.6을 유지하기 위하여 2N KOH수용액을 가한다. 반응진행도를 추적하기 위하여 반응시간에 대한 pH를 유지하기 위하여 적가한 2N KOH의 양(ml)을 도시한다. 반응종료시간은 20분이었다. capryloyl chloride 0.05 Mole을 10분간에 걸쳐 적가한다. 반응종료시간은 20분이었다. 반응이 종료되면 미반응의 capryloyl chloride를 caprylic acid로 만들기 위하여 40°C에서 30분 가열한다.

(2) Lauroyl glycine

100 ml beaker, magnetic stirrer, mechanical stirrer, 온도계를 준비하고 glycine을 가한다. 알칼리 수용액으로 교반하면서 녹여 일정한 pH가 되게 한다. lauroyl chloride를 5분간에 걸쳐 적가한다. pH를 유지하기 위하여 알칼리 수용액을 가한다. 반응조건을 확립하기위한 실험이므로 다음과 같은 변화를 주었다. lauroyl chloride와 glycine의 반응몰비는 1:1, 0.9:1, 0.5:1, 0.3:1로 변화시켰다. pH는 9.10, 9.60, 10.60, 11.60으로 변화시켰고, 알칼리 수용액은 2N KOH, 2N KOH수용액을 사용하였다. 반응진행도를 추적하기 위하여 반응시간에 대한 pH를 유지하기 위하여 적가한 알칼리 수용액의 양(ml)을 도시한다. 반응이 종료되면 미반응의 lauroyl chloride를 lauric acid로 만들기 위하여

40°C로 30분 가열한다.

(3) Palmitoyl glycine

250 ml beaker, magnetic stirrer, mechanical stirrer, 온도계를 준비하고 glycine 1.53g(0.02 mole)을 가한다. 2N KOH수용액으로 상온에서 교반하면서 녹여 pH=11.6이 되게 한다. palmitoyl chloride 0.02 mole을 아세톤 10 ml에 녹여서 5분간에 걸쳐 천천히 첨가한다. pH=11.60을 유지하기 위하여 2N KOH수용액을 가한다. 반응진행도는 다음과 같이 알 수 있었다. 반응시간에 대한 pH를 유지하기 위하여 적가한 2N KOH의 양(ml)을 도시한다. 반응종료시간은 50분이었다. 반응이 종료되면 미반응의 palmitoyl chloride를 palmitic acid로 만들기 위하여 40°C에서 30분 가열한다.

(4) Stearoyl glycine

palmitoyl glycine의 합성방법과 모든 조건이 같다. 단, palmitoyl chloride 대신에 stearoyl chloride 6.55g(0.02 mole)을 사용하였다.

나. Acyl peptide

(1) Acyl peptide-185

① Capryloyl peptide-185

250 ml beaker, magnetic stirrer, 온도계를 준비하고 평균분자량이 185인 펩티드(peptide-185) 7.40g(0.04 mole)을 물 20 ml에 녹인다. 2N KOH수용액으로 상온에서 교반하면서 녹여 pH=11.1 ~ 11.2가 되게 한다. capryloyl chloride 4.55g(0.028 mole)을 5분간에 걸쳐 천천히 첨가

한다. pH=11.1 ~ 11.2를 유지하기 위하여 2N KOH수용액을 가한다. 반응진행도를 추적하기 위하여 반응시간에 대하여 pH를 유지하기 위하여 적가한 2N KOH의 양(ml)을 도시한다. 반응종료시간은 15분이었다. 반응이 종료되면 미반응의 capryloyl chloride를 caprylic acid로 만들기 위하여 40°C에서 30분 가열한다.

② Lauroyl peptide-185

250 ml beaker, magnetic stirrer, 온도계를 준비하고 평균분자량이 185인 펩티드(peptide-185) 5.9g(0.032 mole)을 물 20 ml에 녹인다. 2N KOH수용액으로 상온에서 교반하면서 녹여 pH = 10.1 ~ 10.2가 되게 한다. lauroyl chloride 를 5분간에 걸쳐 적가한다. pH를 유지하기 위하여 알칼리 수용액을 가한다. 반응조건을 잡기위한 실험이므로 다음과 같은 변화를 주었다. lauroyl chloride의 양은 peptide-185에 비해 0.5, 0.7, 0.9, 1.2몰비로 변화시켰다. 그리고 별도로 pH=11.1 ~ 11.2, 0.7:1몰비 조건으로 반응시켰다. 반응진행도를 추적하기 위하여 반응시간에 대한 pH를 유지하기 위하여 적가한 알칼리 수용액의 양(ml)을 도시한다. 반응이 종료되면 미반응의 lauroyl chloride를 lauric acid로 만들기 위하여 40°C로 30분 가열한다.

③ Palmitoyl peptide-185

250 ml beaker, magnetic stirrer, 온도계를 준비하고 평균분자량이 185인 펩티드(peptide-185) 5.55 g(0.03 mole)을 물 20 ml에 녹인다. 2N KOH수용액으로 상온에서 교반하면서 녹여 pH=11.1 ~ 11.2가 되게 한다. palmitoyl chloride 5.77g(0.021 mole)을 아세톤 10 ml에 녹여 5분간에 걸쳐 천천히 첨가한다. pH=11.1 ~ 11.2를 유지하기 위하여 2N KOH

수용액을 가한다. 반응진행도를 추적하기 위하여 반응시간에 대하여 pH를 유지하기 위하여 적가한 2N KOH의 양(ml)을 도시한다. 반응종료시간은 15분이었다. 반응이 종료되면 미반응의 palmitoyl chloride를 palmitic acid로 만들기 위하여 40°C에서 30분 가열한다.

④ Stearoyl peptide-185

palmitoyl peptide-185의 반응조건과 같다. 단, peptide-185 3.70 g(0.02 mole)을 사용하였고 palmitoyl chloride대신에 stearoyl chloride 4.58 g(0.014 mole)을 아세톤 10 ml에 녹였다.

(2) Acyl peptide-245

① Capryloyl peptide-245

capryloyl peptide-185의 반응조건과 같다. 단, peptide-245 7.35 g(0.03 mole), capryloyl chloride 3.52(0.021 mole)을 사용하였다.

② Lauroyl peptide-245

capryloyl peptide-185의 반응조건과 같다. 단, lauroyl chloride 4.69 g(0.021 mole)을 사용하였다.

③ Palmitoyl peptide-245

palmitoyl peptide-185의 반응조건과 같다. 단, peptide-245 7.35 g(0.03 mole)을 사용하였고 palmitoyl chloride 5.75 g(0.021 mole)을 아세톤 10 ml에 녹여서 사용하였다.

④ Stearoyl peptide-245

palmitoyl peptide-185의 반응조건과 같다. 단, peptide-245 4.90 g(0.02 mole)을 사용하였고 stearoyl chloride 4.58 g(0.014 mole)을 아세톤 10 ml에 녹여서 사용하였다.

(3) Acyl peptide-300

① Capryloyl peptide-300

capryloyl peptide-185의 반응조건과 같다. 단, peptide-300 6.00 g(0.02 mole), capryloyl chloride 2.35 g(0.014 mole)을 사용하였다.

② Lauroyl peptide-300

lauroyl peptide-185의 반응조건과 같다. 단, peptide-300 4.50 g(0.0150 mole), lauroyl chloride 2.34 g(0.0105 mole)을 사용하였다.

③ Palmitoyl peptide-300

palmitoyl peptide-185의 반응조건과 같다. 단, peptide-300 6.00 g(0.02 mole)을 사용하였고 palmitoyl chloride 3.84 g(0.014 mole)을 아세톤 10 ml에 녹여서 사용하였다.

④ Stearoyl peptide-300

stearoyl peptide-185의 반응조건과 같다. 단, peptide-300 4.00 g(0.0133 mole)을 사용하였고 palmitoyl chloride 3.84 g(0.0093 mole)을 아세톤 10 ml에 녹여서 사용하였다.

(4) Acyl peptide-410

① Capryloyl peptide-410

capryloyl peptide-185의 반응조건과 같다. 단, peptide-410 8.20 g(0.02 mole), capryloyl chloride 2.35 g(0.014 mole)을 사용하였다.

② Lauroyl peptide -410

lauroyl peptide-185의 반응조건과 같다. 단, peptide-410 6.15 g(0.0150 mole), lauroyl chloride 2.34 g(0.0105 mole)을 사용하였다.

③ Palmitoyl peptide-410

palmitoyl peptide-185의 반응조건과 같다. 단, peptide-410 8.20 g(0.020 mole)을 사용하였고 palmitoyl chloride 3.84 g(0.014 mole)을 아세톤 10 ml에 녹여서 사용하였다.

④ Stearoyl peptide-410

stearoyl peptide-185의 반응조건과 같다. 단, peptide-410 5.47 g(0.0133 mole)을 사용하였고 palmitoyl chloride 3.84 g(0.0093 mole)을 아세톤 10 ml에 녹여서 사용하였다.

3. 단백질계 계면활성제의 정제 및 분석

가. 정제

반응혼합물에서 미반응의 아미노산, 펩티드, 지방산을 제거하기 위하여 다음과 같이 2단계의 정제과정을 거쳤다.

1단계로 아미노산, 펩티드를 제거하기 위하여 pH=4.5 ~ 5.5로 5N H₂SO₄수용액으로 산성화한다. 이 과정중에 겔이 형성이 되는데 소량의 diethyl ether(반응생성물 0.05 mole에 대하여 15 ml)를 가하여

겔을 파괴하고 여과하여 건조한다. 단, capryloyl glycine, capryloyl는 diethyl ether로서 추출한다.

2단계로 diethyl ether, acetone, chloroform을 선택적으로 사용함으로써 지방산은 완전히 제거되었다.

나. 물성

(1) 표면장력(dyne/cm)

pH=7, 25°C, 0.1 % 수용액의 조건에서 측정한다(acyl glycine에서는 pH=10).

(2) 기포력 시험(mm/mm)

25°C에서 100 ml 실린더에 0.1% 용액(acyl glycine에서는 pH=10, acyl peptide에서는 pH=7) 25 ml를 넣고 20회 흔들어서 놓은 다음 거품의 높이를 읽고 5분이 지난후에 거품의 높이를 읽는다.

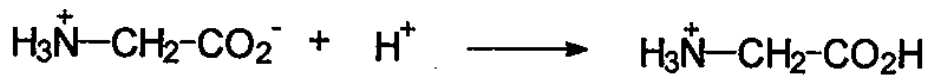
(3) 유화안정성(min.)

25°C, pH=7에서 0.01 % 수용액(acyl glycine에서는 pH=10, 0.1% 수용액)을 100 ml실린더에 정확히 20 ml넣고 톨루엔 10 ml를 첨가한 후 20회 흔들어서 놓은 후 수용층이나 톨루엔 층이 80 % 회복되는데 걸리는 시간을 측정하였다.

제2절 결과 및 고찰

1. 반응조건

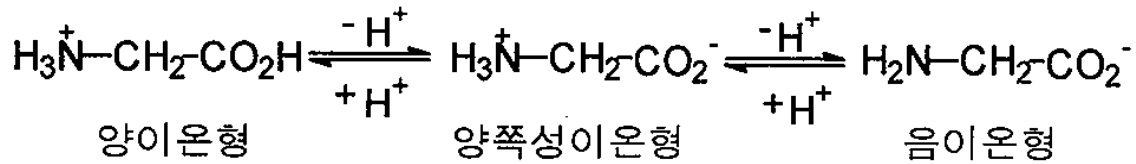
아미노산이나 펩티드들의 산과 염기에 대한 특별한 조건 아래에서의 특성을 살펴보면 아래와 같다. 대표적으로 glycine의 산 수용액을 염기성 수용액으로 적정을 하면 다음과 같이 나타낼 수 있다. 다른 여러가지의 아미노산이나 펩티드들의 행동도 glycine과 같이 표현할 수 있다. pH와 pK에 따른 아미노산의 양이온형, 양쪽성이온형, 음이온형으로 존재하는 농도에 대한 표현이다. 반응할 수 있는 형태인 음이온형은 pH - pK의 관계식으로 나타낼 수 있다.



$$K_1 = \frac{[\text{H}^+][\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CO}_2^-]}{[\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}]}$$

$$K_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2^-]}{[\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CO}_2^-]}$$

$$\frac{[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2^-]}{[\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CO}_2^-]} = 10^{\text{pH} - \text{pK}_2}$$



아미노산이나 펩티드를 친수기로 이용하여 계면활성제를 합성하려면 반응성이 높은 지방족의 소수성 물질을 선택해야한다. 이 실험에서는 acyl chloride를 선택하여 반응시간과 반응에 필요한 장치가 가장 간단하고 생성수율이 뛰어난 조건을 확립하였다.

아미노산이나 펩티드가 acyl chloride와 반응하려면 음이온형이 되어야 반응이 가능하게 된다. 그러므로 이 반응에서는 높은 pH를 유지하는 조건에서 반응이 진행되도록 Schotten-Baumann조건을 유지하여야 한다. 따라서 pH와 반응 몰비율의 가장 적절한 조건을 구하기 위하여 다음과 같은 실험을 한다. pH와 반응몰비 조절은 양쪽성이온형과 음이온형의 양을 결정하기 때문에 가장 중요한 반응결정요소이다. 그리고 반응의 진행도를 추적하기 위한 방법은 여러가지 방법이 가능하지만 용매가 물인 관계로 물을 제거시켜야 하는 전처리 과정이 필수적이다. 하지만 전처리 과정없이 반응을 추적할 수 있는 방법이 있다. pH를 유지하기 위하여 반응시간에 따른 적가된 NaOH, KOH수용액의 양을 도시함으로써 반응의 진행도를 알 수 있었다.

가. Acyl glycine

Fig. 2는 capryloyl glycine(Cap Gly)합성에서의 반응진행도를 나타낸 것이다. NaOH용액으로써 pH를 조절하고 반응물을 동등한 몰비율 (capryloyl chloride : glycine = 1 : 1)로 반응시킨 경우이다. pH가 높아질수록 반응곡선의 곡선부분은 위로 상승하고 반응종료시간이 짧아진

Table 8. Reaction yields of lauroyl glycine at various pH(NaOH).

pH	반응시간(min.)	반응율(%)
9.60	122	75.9
10.60	40	86.6
11.60	29	89.3

Table 9. Reaction yields of lauroyl glycine at various mole ratios(NaOH).

반응몰비 (capryloyl chloride / glycine)	반응시간(min.)	반응율(%)
1	40	89.3
0.9	40	90.7
0.5	39	91.1
0.3	29	92.7

다. pH=9.60에서의 반응종료시간은 122 분, pH=10.60에서는 41 분이 소요되지만, pH=11.60에서는 30분 만에 반응이 완결된다. 즉, pH가 높아질수록 glycine은 양쪽성이온형보다 음이온형이 많아진다. pH=9.60일 때는 음이온형이 동량 존재하지만, pH=11.60일 때는 음이온형이 100 배 많이 존재하기 때문에 반응에 훨씬 유리해지고 당연히 반응 종결시간이 짧아진다. Table 8에 반응종결시간과 반응율을 나타내었다. 또한 반응몰비 1:1일 때 pH=9.60, 10.60, 11.60에서는 75.9%, 86.6%, 89.3%의 반응율을 보였다. 또한 pH=9.60에서의 반응몰비 1:1, 0.9:1일 경우에는 반응율이 75.9%에서 83.8%로 차이가 커졌다. 그 이유는 pH의 증가에 따라 반응할 수 있는 형태인 음이온형이 많아지고, pH=9.60에서는 음이온형이 50% 존재하므로 0.9:1 반응몰비로 반응시

켰을 때 필연적으로 반응속도는 빨라지고 반응율은 높아진다.

Table 9는 pH=11.60에서의 glycine과 lauroyl chloride의 반응 중 반응몰비를 1:1, 0.9:1, 0.5:1, 0.3:1로 반응시킨 경우이다. 생성된 lauroyl glycine의 반응율은 89.3% ~ 92.7%로 차이는 크지 않았다. 음이온형이 양쪽성이온형보다 100 배 더 존재하는 pH 조건에서는 반응몰비 1:1인 경우가 가장 좋은 반응조건이 됨을 알 수 있었다.

Table 10. Reaction yields of lauroyl glycine at various pH(KOH).

pH	반응시간(min.)	반응율(%)
9.10	130	79.4
9.60	89	87.7
11.60	30	94.0

Table 11. Reaction yields of lauroyl glycine at various reaction mole ratios(KOH).

반응몰비 (lauroyl chloride / glycine)	반응시간(min.)	반응율(%)
1	30	94.0
0.5	30	94.6

KOH로 pH를 조절하여 반응조건을 확립할 경우에도 NaOH의 경우와 비슷한 결과가 나타났다. Fig. 3과 같이 일정한 pH를 유지하기 위한 KOH 소요량과 반응시간의 도시를 보면, pH=9.10, 9.60, 11.60에서 반응종료시간이 130분, 89분, 30분으로 pH가 높아질수록 반응이 더욱 일찍 종결됨을 볼 수 있다. 반응종결시간과 반응율은 Table 10에 나타내었다. 반응종결시간은 pH=9.60 이하에서는 30분정도 빨라졌지만 pH=11.60에서는 비슷하게 나타난다. 하지만 반응율은 KOH용액을 사용하였을 때가 NaOH용액을 사용한 경우보다 훨씬 높다. 반

응몰비 1:1일 때 pH=9.60에서 반응율은 87.7%로 NaOH경우의 75.9%보다 12% 정도 높다. pH=9.10인 경우에도 반응율은 79.4%로 더 높다. pH=11.60인 경우에는 94.0% 반응율로 동일한 조건의 NaOH용액을 사용했던 경우의 90.7% 보다도 3.3% 더 높다. 생성물의 칼륨염이 물에 더 잘 용해되기 때문이다. 또한 pH=11.60에서의 반응몰비가 1:1, 0.5:1인 경우의 반응율은 각각 94%, 94.6%로 거의 차이가 나지 않았다(Table 11). 앞의 NaOH용액을 사용한 경우의 설명과 같이 충분한 음이온형의 존재로 설명할 수 있다. pH=11.60에서 반응몰비 1:1의 반응과 동일한 조건에서와 같이 pH조절을 위해 적가한 KOH용액량과 동량의 KOH용액을 한꺼번에 넣고 반응을 시킨 경우에는 반응종료시간 70분이었고 반응율은 85.3%로 9%정도 떨어졌다. pH=11.60 이상의 pH도 반응을 저하시키는 요인이다.

따라서 이상에서와 같이 반응시간이 짧고 반응율을 높일 수 있는 방법을 확립할 수 있었다. KOH용액을 알칼리로 사용하고 pH=11.60에서 1:1의 반응몰비로 반응시키는 경우가 가장 좋은 조건이었다. NaOH용액을 알칼리로 사용할 경우에는 pH=11.60에서 1:1의 반응몰비로 반응시키는 경우가 좋은 조건이었다. 즉 $\text{pH}-\text{pK}=2$, 반응몰비가 1:1인 조건이 acyl chloride와 아미노산, 펩티드와의 반응에서 가장 좋은 반응조건이었다.

$$\frac{[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2^-]}{[\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CO}_2^-]} = 10^{\text{pH}-\text{pK}_2}$$

또한 낮은 pH에서는 약간의 과량으로 반응몰비를 변화시켰을 경우에 반응율을 높일 수 있었다(NaOH용액을 사용하였을 때, pH=9.60에서의 반응몰비 0.9:1인 경우가 1:1인 경우 보다 반응율을 8% 높일 수 있었다.).

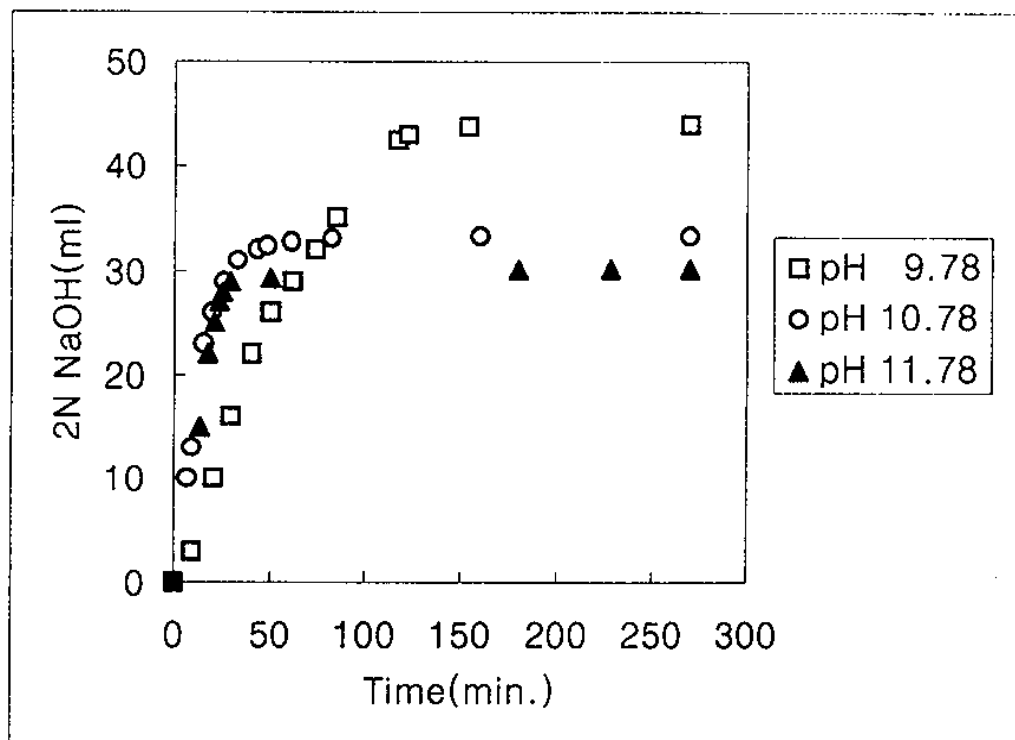


Fig. 2. Added NaOH solution volume against reaction time for acyl glycine at various pH.

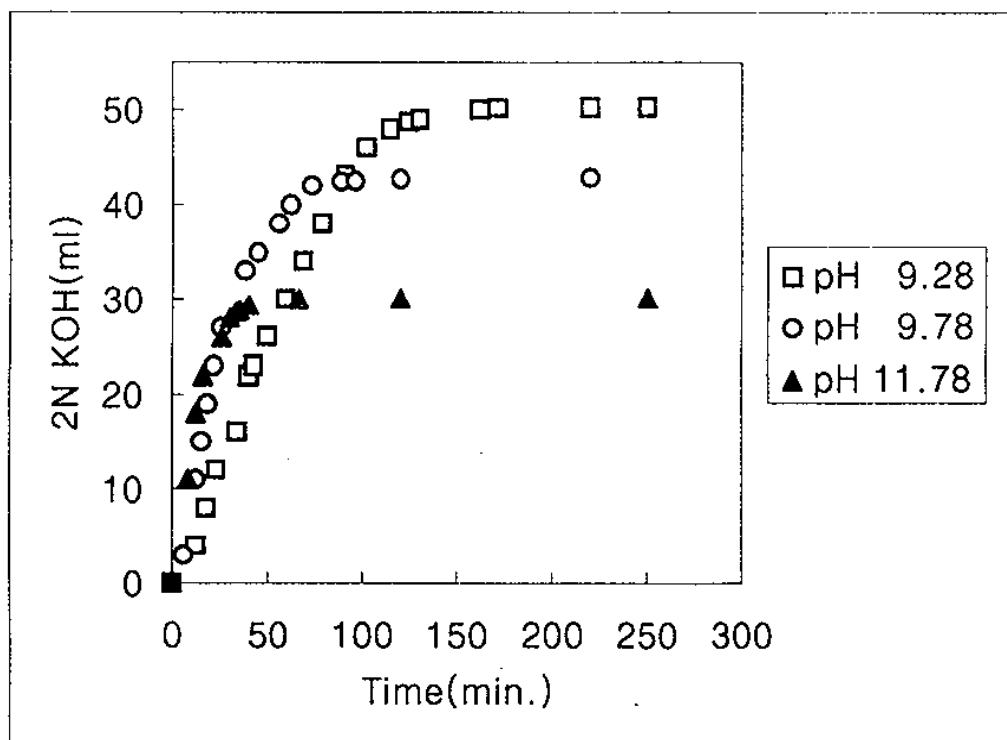


Fig. 3. Added KOH solution volume against reaction time for acyl glycine at various pH.

나. Acyl peptide

문헌에 의하면 glycyl glycine의 $pK_a=8.17$ 로 발표되어 있으며 glycyl glycine, glycyl leucine, glycyl glycyl glycyl glycine의 pK_a 값을 직접 측정해보면 $pK_a=8.17$ 로 나타난다. 따라서 acyl glycine에서 구한 반응에 적합한 $pH=10.17$ ($pH = pK_a + 2$)인 조건을 적용하였다. Table 12와 Fig. 4는 $pH=10.17$ 에서의 lauroyl peptide-185합성에서의 0.5:1, 0.7:1, 0.9:1, 1.2:1(acyl chloride:peptide)반응몰비에 따른 반응율, 반응시간을 나타낸다. 생성된 lauroyl peptide-185의 반응율은 70.7% ~ 81.9%로 나타난다. 0.7:1몰비 이하에서는 반응율이 80% 이상으로 높았다. 그 이유는 반응하기 어려운 아미노산 형태인 aspartic acid, glutamic acid 등의 존재 때문이다. 따라서 $pH=10.17$ 인 조건에서는 반응몰비가 0.7:1몰비일 때에 반응율이 가장 높았다.

Table 12. Reaction yields of lauroyl peptide-185 at various mole ratios.

반응몰비 (acyl chloride / peptide)	반응시간(min.)	반응율(%)
0.5	11	81.9
0.7	11	80.8
0.9	14	75.4
1.2	20	70.7

Table 13은 $pH=9.17, 10.17, 11.17$ 에서의 lauroyl peptide-185합성에서의 반응율, 반응시간을 나타낸다. 2N KOH수용액으로 pH 를 조절하고 반응물을 0.7:1몰비로 반응시킨 결과이다. pH 가 높아질수록 반응율은 증가하고 반응시간은 짧아지는 경향을 보인다. 15분 이내에 반응이 종결된다. pH 가 높아질수록 펩티드는 양쪽성이온보다 음이온형이 많

아지기 때문이다. peptide-185는 평균분자량이 185로서 복잡한 분자량의 분포를 갖는 혼합물이다. 따라서 여러종류의 아미노산들과 펩티드들로 구성되어 있으므로 펩티드의 $pK_a=8.17$ 임에도 불구하고 아미노산들의 pK_a 도 고려해야 한다. $pK_a=11.17$ 일 때 가장 높은 반응율을 보였다. 따라서 가장 적합한 반응조건은 $pH=11.17$, 0.7:1몰비일 때였다.

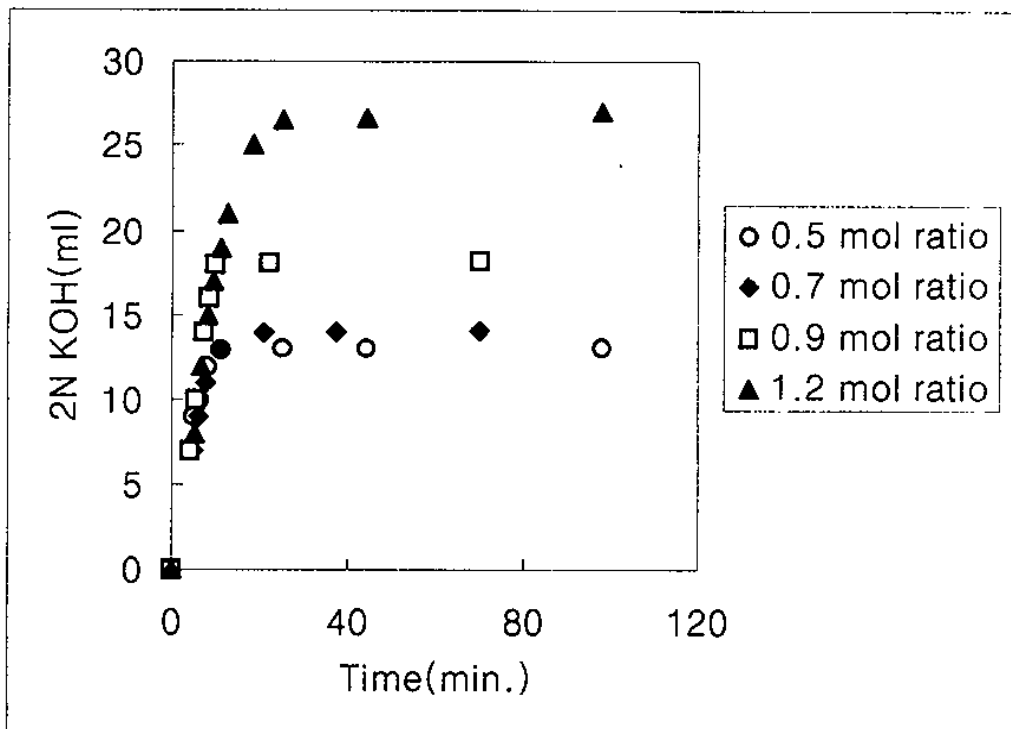


Fig. 4. Added KOH solution volume against reaction time for lauroyl peptide-185 at various mole ratios.

Table 13. Reaction yields of lauroyl peptide-185 at various pH.

pH	반응시간(min.)	반응율(%)
9.17	13	74.2
10.17	11	80.8
11.17	10	91.8

2. Acyl glycine의 합성

위의 조건설정을 위한 실험에서와 같이 glycine은 $pK=9.60$ 이므로 $pH=11.60$ 에서 반응시켰으며 반응시간에 대한 KOH용액 소요량으로 반응진행도를 추적하였다(Fig. 5). 반응종료시간은 Table 14에서와 같이 stearoyl glycine(Ste Gly), palmitoyl glycine(Pal Gly), lauroyl glycine(Lau Gly), capryloyl glycine(Cap Gly) 순서로 지방족 사슬이 짧아질수록 반응소요시간은 110분에서 20분 정도로 짧아졌고 반응율은 높아진다.

Table 14. Reaction yields of acyl glycine at pH 11.60

Acyl glycine	반응시간(min.)	반응율(%)
Capryloyl glycine	17	96.0
Lauroyl glycine	30	94.0
Palmitoyl glycine	50	90.0
Stearoyl glycine	118	50.0

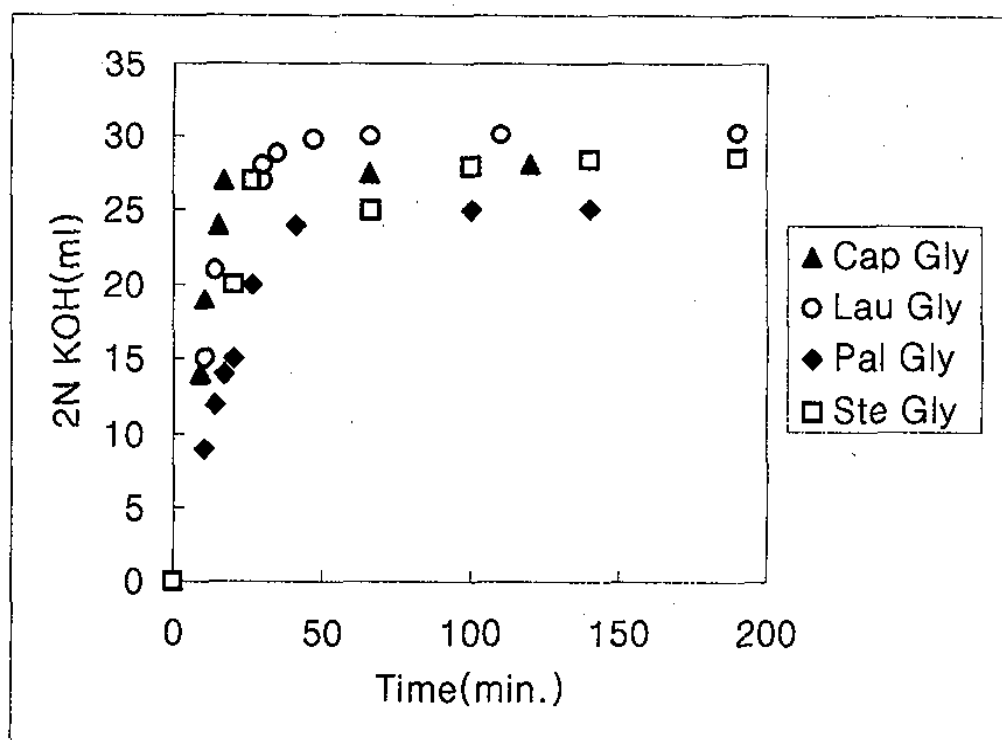


Fig. 5. Added KOH solution volume against reaction time for acyl glycine at pH 11.60.

3. Acyl peptide의 합성

위의 조건설정을 위한 실험에서와 같이 펩티드들은 다음과 같은 조건에서 합성하였다. 25°C, pH=11.17, 0.7:1몰비에서 반응시켰으며 반응시간에 대한 2N KOH용액의 소요량으로서 반응을 추적하였다. 반응종결시간은 Table 16, 17, 18, 19에서와 같이 capryloyl peptide, lauroyl peptide, palmitoyl peptide, stearoyl peptide의 순서로 지방족 탄소사슬이 짧아질수록 반응시간은 짧아지고 반응율은 높아진다. 하지만 반응은 30분 이내에 모두 완결되었다. 또한 펩티드의 평균분자량이 크질수록 용해도는 낮아지고 점도가 높아지는 고분자의 특성이 나타난다. 반응이 진행될수록 반응성은 낮아지며 반응시간이 오래 걸린다. palmitoyl peptide, stearoyl peptide의 합성에서는 이러한 영향을 제거하기 위하여 palmitoyl chloride, stearoyl chloride를 아세톤에 녹여 반응시켰다. 반응은 30분 이내에 완결되었다.

가. Acyl peptide-185

반응종료시간은 Table 16에서와 같이 25분 이내의 반응소요시간을 보였다. 반응율은 capryloyl peptide-185, lauroyl peptide-185, palmitoyl peptide-185, stearoyl peptide-185에서 각각 92.7%, 91.8%, 79.0%, 69.0%로 높았다. 정제를 한 후 각각 4.23g, 5.05g, 8.6g, 7.15g의 acyl peptide-245를 얻었다.

나. Acyl peptide-245

반응종료시간은 Table 17에서와 같이 25분 이내의 반응소요시간을 보였다. 반응율은 capryloyl peptide-245, lauroyl peptide-245, palmitoyl peptide-245, stearoyl peptide-245에서 각각 89.7%, 84.2%, 74.7%,

64.8%로 높았다. 정제를 한 후 각각 5.13g, 7.30g, 10.34g, 8.46g의 acyl peptide-245를 얻었다.

Table 15. Reaction yields of acyl peptide-185 at pH 11.17

Acyl peptide-185	반응시간(min.)	반응율(%)
Capryloyl peptide-185	11	92.7
Lauroyl peptide-185	16	91.8
Palmitoyl peptide-185	24	79.0
Stearoyl peptide-185	24	69.0

Table 16. Reaction yields of acyl peptide-245 at pH 11.17

Acyl peptide-245	반응시간(min.)	반응율(%)
Capryloyl peptide-245	14	89.7
Lauroyl peptide-245	16	84.2
Palmitoyl peptide-245	25	74.7
Stearoyl peptide-245	25	64.8

다. Acyl peptide-300

반응종료시간은 Table 18에서와 같이 30분 이내의 반응소요시간을 보였다. 반응율은 capryloyl peptide-300, lauroyl peptide-300, palmitoyl peptide-300, stearoyl peptide-300에서 각각 88.1%, 81.3%, 74.7%로 높았다. 정제를 한 후 각각 2.61g, 3.40g, 11.41g, 4.65g의 acyl peptide-300을 얻었다.

라. Acyl peptide-410

반응종료시간은 Table 19에서와 같이 30분 이내의 반응소요시

간을 보였다. 반응율은 capryloyl peptide-410, lauroyl peptide-410, palmitoyl peptide-410, stearoyl peptide-410에서 각각 82.7%, 87.0%, 80.5%로 높았다. 정제를 한 후 각각 4.22g, 3.51g, 11.08g, 5.45g의 acyl peptide-410을 얻었다.

Table 17. Reaction yields of acyl peptide-300 at pH 11.17

Acyl peptide-300	반응시간(min.)	반응율(%)
Capryloyl peptide-300	12	88.1
Lauroyl peptide-300	12	81.3
Palmitoyl peptide-300	24	69.0
Stearoyl peptide-300	28	-

Table 18. Reaction yields of acyl peptide-410 at pH 11.17

Acyl peptide-410	반응시간(min.)	반응율(%)
Capryloyl peptide-410	16	82.7
Lauroyl peptide-410	17	87.0
Palmitoyl peptide-410	21	80.5
Stearoyl peptide-410	28	-

4. 정제

반응혼합물은 그 상태로도 계면활성제로서 사용될 수 있지만 본 연구에서는 정제된 상태의 계면활성제를 분리·정제하여 정확한 물성을 측정하는데 목적이 있다. 반응혼합물 속에는 미반응된 아미노산이나 펩티드, 그리고 지방산, acyl aminoacid, acyl peptide가 섞여있다. 따라서 다음과 같은 여러가지 방법을 사용하여 반응혼합물에서 필요한 성분을 정제하였다.

1단계는 pH를 조정하여 아미노산, 펩티드를 분리한다. pH를 4.5 ~ 5.5로 내리면 아미노산, 펩티드는 수용액에 녹아 있지만 지방산, acyl glycine, acyl peptide는 수용액에 녹지않는다. 반응혼합물에서 정제하기 위하여 pH를 내리면, pH=6.5 정도에서 겔상태가 된다. 겔상태가 되면 실험하기가 곤란해 진다. 겔상태가 되면 diethyl ether를 소량(실험방법에서의 조건에서는 15 ml) 가하고 교반하면 겔이 파괴된다. 가장 좋은 방법은 pH=7에서 diethyl ether를 가하는 방법인데 겔이 생성되더라도 곧 파괴되다. 겔이 생성된 상태에서는 diethyl ether를 가해서 파괴시킬 수는 있지만, 교반기의 부하가 많이 걸리고 소요시간이 길다. 과량의 diethyl ether의 사용은 정제과정을 더욱 어렵게 한다. 그리고 30분 교반후 여과하고 건조시키면 아미노산이나 펩티드가 완전히 제거된다. 단, capryloyl glycine, capryloyl peptide는 pH를 4.5 ~ 5.5로 내려서 diethyl ether로 추출한다.

2단계는 미반응 지방산과 acyl glycine, acyl peptide의 용매추출에 의한 분리과정이다.

capryloyl glycine, capryloyl peptide의 정제에서는 diethyl ether(생성물 0.05mole일 때 5 ml)로 추출할 때, capric acid를 제거할 수 있었다.

lauroyl glycine, lauroyl peptide, palmitoyl glycine, palmitoyl peptide의 정제에서는 아세톤(생성물 0.05mole일 때 5 ml)으로 추출할 때, lauric acid, palmitic acid를 제거할 수 있었다.

stearoyl glycine, stearoyl peptide의 정제에서는 chloroform(생성물 0.05mole일 때 5 ml)으로 추출할 때, stearic acid를 제거할 수 있었다.

5. 분석 및 물성

가. 구조분석

(1) NMR(Nuclear Magnetic Resonance)

① Acyl glycine

Fig. 10은 DMSO-d₆에 녹인 lauroyl glycine의 ¹H-NMR spectrum이다. 0.84 ppm의 삼중선은 12번 탄소의 메틸기 수소이고 1.22 ppm의 피이크는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11번 탄소의 메틸렌기 수소들이 중첩되어 단일선처럼 나타난다. 1.46 ppm의 다중선은 3번 탄소의 수소이고 2.08 ppm의 삼중선은 2번 탄소의 수소이다. Fig. 10에는 나타나지 않지만 미반응 지방산의 2번 탄소의 수소는 2.16 ppm의 chemical shift를 보이며 삼중선으로 나타난다(lauroyl glycine을 D₂O에 녹였을 때는 lauroyl glycine의 chemical shift는 2.13 ppm, lauroyl acid는 2.08 ppm으로 chemical shift는 역전되어 나타난다.). lauroyl glycine과 lauroyl acid가 섞여 있을 때에 다른 공명 피이크의 chemical shift는 구별할 수 없기 때문에 2.08 ppm의 삼중선은 중요하다. 3.68 ppm의 이중선은 2'번 탄소의 수소이고 8.04 ppm의 삼중선은 lauroyl chloride와 glycine이 아미드 결합을 한 아미드 피이크로서 lauroyl glycine이 형성되었음을 보여준다. Fig. 11은 lauroyl glycine의 ¹³C-NMR spectrum이다. capryloyl glycine, palmitoyl glycine 과 stearoyl glycine의 ¹H-NMR spectrum 해석도 lauroyl glycine과 동일하다. 하지만 1.22 ppm의 적분비만 다르게 나타난다. 지방족 탄소에 붙어 있는 수소의 수와 적분비가 비례한다(Fig. 9, Fig. 12, Fig.13).

② Acyl peptide

Fig. 14는 DMSO-d₆에 녹인 capryroyl peptide-185의 ¹H-NMR

spectrum이다. 친수기인 펩티드는 평균분자량 185를 가지므로 여러 종류의 아미노산 및 펩티드로 구성되어 분자량에 따른 분포를 가지는 복잡한 혼합물이다. 따라서 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 보듯이 피이크들이 복잡하게 중첩되어 해석을 어렵게한다. 하지만 lauroyl glycine에서 처럼 2.13ppm의 특징적인 삼중선이 보인다. 즉 아미드 결합을 한 화합물에서의 2번 탄소의 수소의 chemical shift이다. 2.13ppm의 삼중선은 펩티드에서 다른 성분과 중첩이 잘 안보이는 경우도 있으므로 해석을 어렵게 한다.

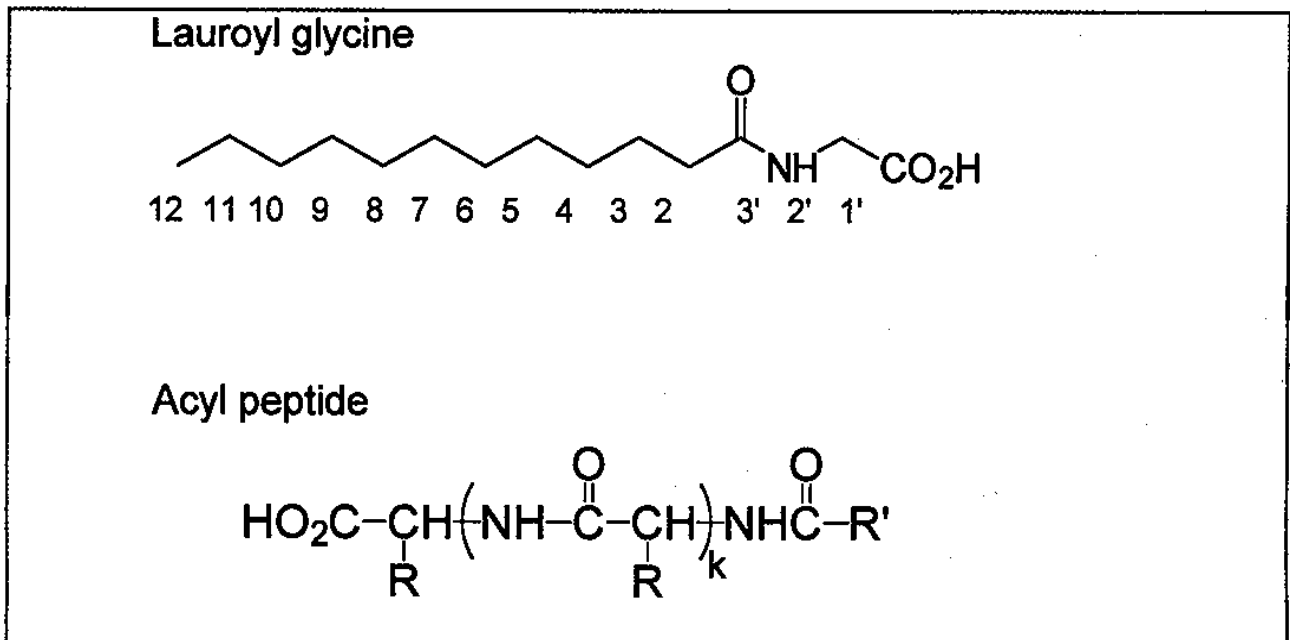


Fig. 6. Structures of acyl glycines and acyl peptides.

(2) IR(Infrared Spectroscopy)

Fig. 15에서 Fig. 30까지는 acyl peptide의 IR spectrum이다. acyl peptide의 특징적인 적외선 흡수띠의 분석은 다음과 같이 할 수 있다. 3300cm^{-1} 에서 아미드의 N-H신축진동띠가 명확하게 보이고 COOH의 O-H신축진동띠가 보인다. 3100cm^{-1} 에서 $\nu(\text{C}=\text{O})$ 와 $\delta(\text{N-H})$ 의 조화진동띠가 보인다. 2900cm^{-1} 에서 지방족의 CH_2 , CH_3 신축진동띠가 보인

는데 각각의 펩티드마다 지방족사슬이 길어질수록 흡수띠의 세기가 증가하는 것을 볼 수가 있다. 1710cm^{-1} 에서 COOH의 C=O신축진동띠가 보인다. 1660cm^{-1} 에서 아미드의 C=O신축진동띠(amide I), 1550cm^{-1} 에서 아미드의 N-H굽힘진동띠(amide II)가 보인다.

(3) GC(Gas Chromatography)

HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용한 아미노산이나 펩티드의 분석을 위한 여러가지 검출기가 개발되고있다. RI(refraction index)검출기는 분석물질에 상관없이 감응을 하지만 감도가 좋지 못하다. UV(ultraviolet)검출기는 감도는 뛰어나지만 방향족 등 자외선에 활성을 나타내는 관능기가 없을 경우 검지하기가 불가능하다. 따라서 DNFB(2,4-dinitrofluorobenzene)을 사용한 Sanger법, phenyl isothiocyanate를 이용한 Edman degradation을 이용한 방법이나 ninhydrin을 이용한 방법을 사용할 수 있다. 그러나 기기장치의 복잡한 변경과 분석에 요하는 시간이 길다는 단점을 가지고 있다.

이에 반해 GC는 분석에 소요되는 시간이 짧고 기존의 기기로 손쉽게 사용할 수 있다. silylation후 아미노산과 그 유도체는 GC로 분석하는 방법이 잘 알려져 있으며 acyl aminoacid의 분석시에도 이러한 방법을 이용하였다. 이 분석법의 유리한 점은 빠르고 정확하게 분석할 수 있을 뿐 아니라 반응혼합물 중에 존재할 수 있는 지방산, 아미노산, 펩티드, acyl aminoacid, acyl peptide 등과 같은 물질도 동일한 방법으로 유도체화 시킨 후 동시에 분석할 수 있었다. 이 분석법의 유리한 점은 빠르고 정확하게 분석할 수 있을 뿐 아니라 반응혼합물 중에 존재할 수 있는 지방산, 아미노산, 펩티드 등과 같은 물질도 동일한 방법으로 유도체화 시킨 후 동시에 분석할 수 있었다.

silylation reagent로는 Sil-Prep Kit(제조)와 Power Sil-Prep (Alltech)을 사용했는데 이들의 성분은 다음과 같다.

Sil-Prep Kit; HMDS:TMCS:Pyridine (3:1:9)

HMDS; hexamethyldisilazane

TMCS; trimethylchlorosilane

Power Sil-Prep Kit; TMSIM:BSA:TMCS (3:3:2)

TMSIM; trimethylsilylimidazole

BSA; bis(trimethylsilyl)acetamide

TMCS; trimethylchlorosilane

Table 19. Data of GC retention time of various amino acids

Silylated sample	GC retention time
Glycine	5.75 min.
Capryloyl glycine	14.41 min.
Lauroyl glycine	17.64 min.
Palmitoyl glycine	19.91 min.
Stearoyl glycine	21.54 min.
Caprylic acid	7.55min.
Lauric acid	12.64 min.
Palmitic acid	14.96 min.
Stearic acid	17.72 min.

본 실험에서 사용한 column은 capillary column으로 J&W DB-1HT column (30m X 0.32 Mm)을 사용하였다. 검출기는 FID를 사용하였고 분석시 temperature Programming은 초기온도 80℃, 초기시간 3분, 온도 상승율 12℃/분, 최종온도 350℃의 조건에서 주로 행하였다. 시료를

silylation한 후 GC로 분석하였다. 분석에 소요되는 시간은 silylation 반응에 소요되는 시간이 10분 정도, GC로 분리하는데 소요되는 시간은 5분 ~ 30분 정도이므로 GC분석의 총소요 시간은 15분 ~ 40분으로 짧은 시간내에 분석할 수 있었다. Table 20에 각 성분에 대한 retention time을 나타내었다.

나. 물성

(1) 표면장력

기름과 물의 접촉면에서 접촉력을 낮추는 방법은 유화, 세척 등 많은 분야에 있어서 중요하다. 두종류의 액체간의 계면장력을 결정하는 중요요소는 두종류의 분자사이에 작용하는 응집력이다. 기름과 물의 경계면에 계면활성제가 첨가되면 기름과 물분자가 직접 접촉되지 않고 계면활성제 분자를 통하여 접촉된다. 따라서 기름과 계면활성제, 물과 계면활성제 사이의 응집력이 물과 기름사이의 응집력보다 더 큰 영향을 준다. 계면활성제는 기름쪽의 소수부분과 물쪽의 친수성부분사이에 흡착이 일어나기 때문에 기름과 소수성부분 사이의 응집력이 중요하다. 따라서 계면활성제는 기름과 물 사이의 계면장력을 적게한다. 낮은 농도의 수용액에서도 표면장력을 효과적으로 저하시키는 특성을 가지고 있다.

본 실험에서는 25°C, pH=7, 0.1%수용액에서 행하였다. (acyl glycine의 경우는 pH=10) 4종의 acyl glycine, 16종의 acyl peptide의 표면장력을 Table 21에 나타내었다. Fig. 7에서 보면 친수기에 따라서도 표면장력의 변화를 볼 수가 있다. 지방족 탄화수소의 갯수가 8 ~ 18, 펩티드의 평균분자량은 185 - 410일 때 표면장력은 38.3 dyne/cm ~ 25.2 dyne/cm으로 모두 낮다. palmitoyl glycine, stearoyl glycine일 때도 24.5

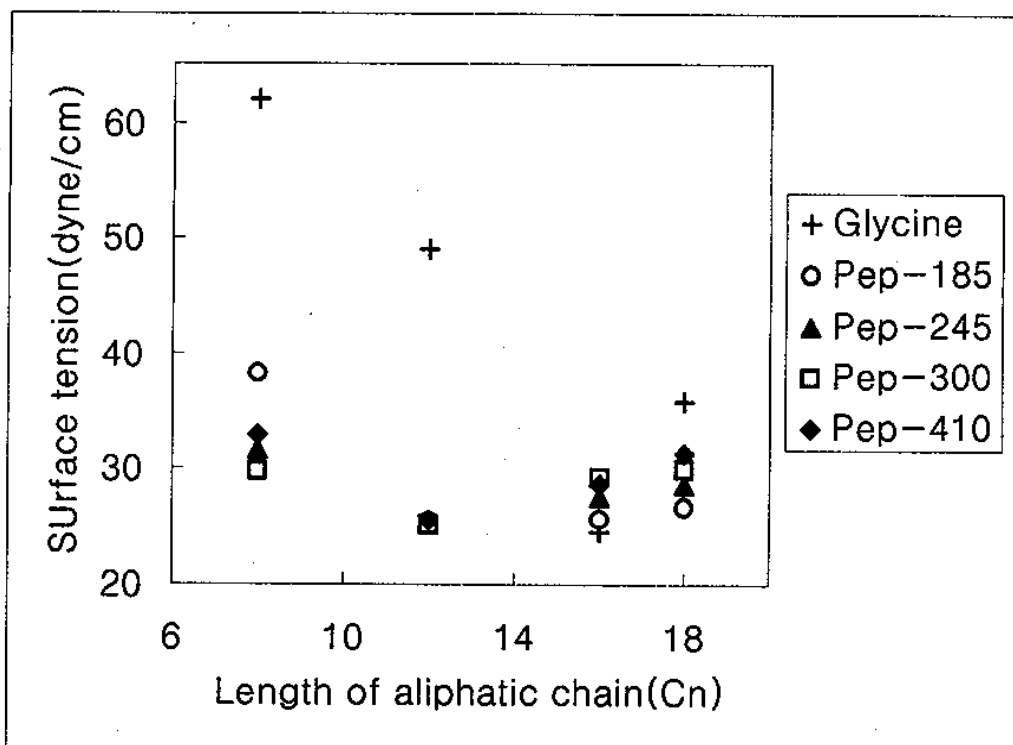


Fig. 7. Surface tension against aliphatic chain length for acyl peptides.

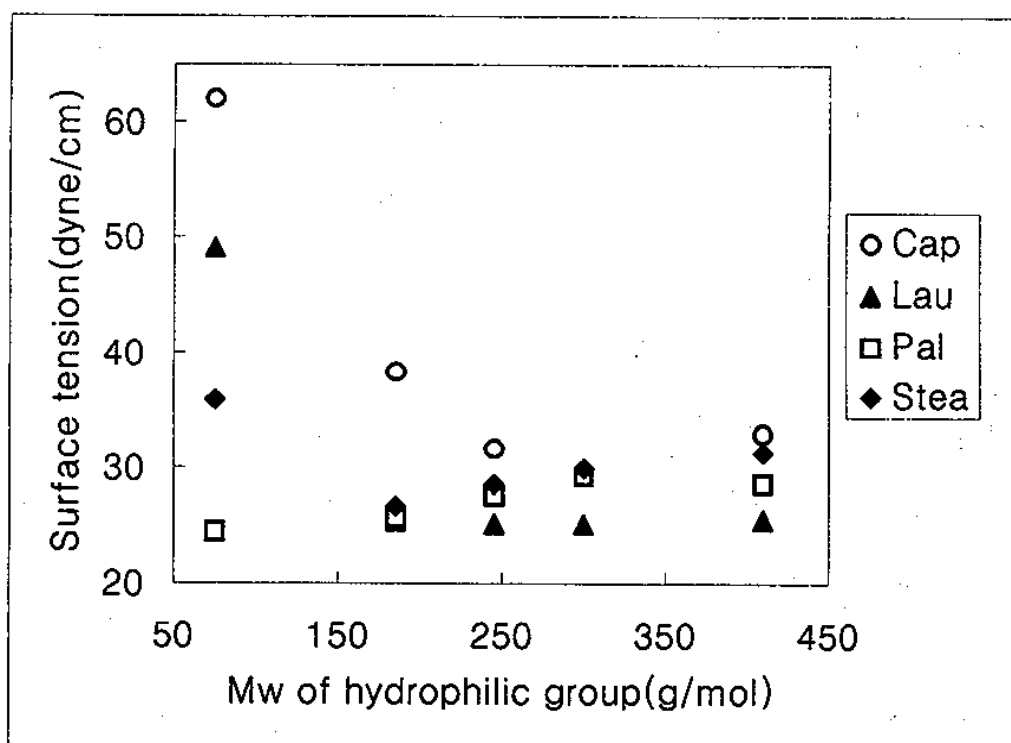


Fig. 8. Surface tension against hydrophilic part for acyl peptides.

dyne/cm, 35.8 dyne/cm로 낮다. 친수기성분이 펩티드와 glycine을 일 때를 비교하면 펩티드계의 표면장력이 현저히 낮다. 그리고 펩티드일 때 표면장력이 최소가 되는 지점은 대부분 지방족 사슬의 탄소수가 12개 일 때임을 볼 수 있다. Fig. 8에서 보면 지방족 탄소사슬의 갯수에 따라 표면장력의 변화를 볼 수가 있다. 펩티드계인 평균분자량 185이상에서는 표면장력의 변화는 미세하고 대부분 표면장력이 낮다. 하지만 glycine계에서는 지방족 탄소사슬의 갯수가 12개 이하일 때는 62 dyne/cm, 49 dyne/cm로 다른 것들 보다 조금 높은 편이다.

(2) 기포력

거품을 만들려면 액체, 기체 외에 기포를 안정화시켜야 한다. 계면활성에는 거품을 만드는 작용 뿐만 아니라 생성된 거품의 수명을 오래가게 하는 역할을 수행해야 한다. 기체, 액체 사이에서 표면장력을 저하시켜 기포를 생성하게 쉽게한다. 계면활성제는 기포 표면에 흡착되어 흡착막을 만들어 거품속의 기체입자를 안정화시켜 수명을 길게 한다. 본 실험에서는 25°C, pH=7, 0.1%수용액에서 행하였다. 4종의 acyl glycine, 16종의 acyl peptide의 기포력과 기포안정성 실험결과를 Table 21에 나타내었다. capryloyl peptide, lauryloyl peptide, palmitoyl peptide에서는 기포력이 45 mm ~ 18 mm, 기포안정성은 40 mm ~ 15 mm로 우수했다. lauroyl glycine, palmitoyl glycine은 기포력이 22 mm ~ 25 mm로 높았다.

(3) 유화력

에멀전은 액체가 분열하여 미세한 액적이 되는 과정과 그 액적이 재결합하여 원래의 액체로 되돌아 가려는 성질이 상호경쟁과

정의 균형으로 이루어진다. 분열은 빠른과정이고 재결합은 느린과정으로 유화에 있어서는 중요한 요소이다. 또한 에멀전의 안정성은 분산상과 연속상의 상분리가 일어나는 시간을 측정하여 평가할 수 있다.

본 실험에서는 25°C, pH=7, 0.01% 수용액에서 행하였다.(acyl glycine의 경우는 pH=10, 0.1%수용액) 4종의 acyl glycine, 16종의 acyl peptide의 기포력과 기포안정성 실험결과를 Table 21에 나타내었다. acyl glycine, capryloyl peptide, lauroyl peptide, palmitoyl peptide에서는 5분 ~ 48분 이상으로 모두 유화력이 우수했다.

Table 20. Surface active properties of synthesized protein surfactant.

	Surface tension (dyne/cm)	Foming test (mm/mm)	Emulsion stability(min.)
Capryloyl glycine	62.0	1/0	14
Lauroyl glycine	49.0	22/2	6.4
Palmitoyl glycine	24.5	25/23	5
Stearoyl glycine	35.8	5.0/4.5	*
Capryloyl peptide-185	38.3	38/27	34
Lauroyl peptide-185	25.5	25/17	37
Palmitoyl peptide-185	25.7	18/15	28
Stearoyl peptide-185	26.7	6/6	7
Capryloyl peptide-245	31.6	30/26	28
Lauroyl peptide-245	25.2	18/9	35
Palmitoyl peptide-245	27.6	20/20	29
Stearoyl peptide-245	28.6	3/3	7
Capryloyl peptide-300	29.7	45/38	33
Lauroyl peptide-300	25.2	12/7	48
Palmitoyl peptide-300	29.2	22/21	31
Stearoyl peptide-300	30.0	2/2	5
Capryloyl peptide-410	32.9	43/40	33
Lauroyl peptide-410	25.5	10/2	39
Palmitoyl peptide-410	28.6	18/15	24
Stearoyl peptide-410	31.3	2/2	9

(*: 0.01% 용액에서 90 분 이상 안정)

제4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

미생물에 의한 분해를 쉽게 일으키며 인체에 대한 자극성을 줄이면서 성능의 손실이 없는 계면활성제구조를 만들기위해 다음과 같이 선별적으로 반응시켰다. 생분해되기 쉬운 구조를 가진 fatty acid chloride(capryloyl chloride, lauroyl chloride, palmitoyl chloride, stearoyl chloride)와 단백질 가수분해물(glycine, peptide-185, peptide-245, peptide-300, peptide-410)을 이용하여 protein계 계면활성제의 효율적인 합성·정제과정을 연구하였다. acyl glycine 4종류(capryloyl glycine, lauroyl glycine, palmitoyl glycine, stearoyl glycine), acyl peptide 16종류(capryloyl peptide-185, lauroyl peptide-185, palmitoyl peptide-185, stearoyl peptide-185; capryloyl peptide-245, lauroyl peptide-245, palmitoyl peptide-245, stearoyl peptide-245; capryloyl peptide-300, lauroyl peptide-300, palmitoyl peptide-300, stearoyl peptide-300; capryloyl peptide-410, lauroyl peptide-410, palmitoyl peptide-410, stearoyl peptide-410)를 최적의 조건에서 합성하였으며 순수하게 정제할 수 있었다.

합성과정에서의 연구는 다음과 같다. 반응장치를 단순화 할 수 있었고 반응율을 대부분 80% - 94%로 높일 수 있었다. acyl glycine, acyl peptide 의 반응조건(반응온도, 반응몰비, 반응 pH, 반응온도)을 최적화할 수 있었다.

정제과정에서의 연구는 다음과 같다. 정제장치를 간편화 시켰고 2단계 정제공정으로 완전한 정제가 가능했다. 정제과정에서 유기용매의 사용단계를 줄이고 생성물의 손실을 최대한 줄일 수 있었다.

이 페이지는

여백입니다

제5장 연구개발결과의 활용계획

단백질은 동물, 식물에서 얻을 수 있는 풍부하고 값 싼 자원이다. 피혁산업의 폐기물인 콜라겐, 식용으로 사용되지 못하는 육류부위, 유지를 뽑아낸 콩류 등 폐기물로서 나오는 단백질을 원료로 사용할 수 있기 때문에 환경측면에서도 우리사회에 벌써 기여하고 있다. 기존의 아미노산, 펩티드의 사용처는 직물산업의 첨가제로 사용되었다. 그 자체나 유도체가 혼합물 형태로 제조되었고 정제과정이 세련되지 못했기 때문에 사용용도의 제한이 많았다. 최근 제조기술의 발달로 종래 고가였던 아미노산이 비교적 염가로 얻어지게 되었다. 그리고 이의 다기능성, 광학활성 등 아미노산의 다양한 기능을 살린 기능성 재료를 개발하려는 연구도 활기를 띠고 있다. 특히 아미노산, 펩티드 유도체들의 여러가지 특성 중에서 이들은 피부와 머리카락의 세포의 보호 및 손상된 세포를 회복시키는데 관련되어 있다고 보고되고 있다. 화장품분야를 시작으로 다방면에 걸쳐 그 특성이 알려져 새로운 기능성 소재로서 종류와 용도가 폭 넓게 확산되고 있다. 이러한 특성들이 알려지면서 유럽과 일본 등 선진국에서는 샴푸, 크림, 로션 등에 습윤(wetting), 분산(dispersing), 유화제(emulsifying agent)로 사용하기 시작했고 사용량이 점점 증가하고 있다. 하지만 국내에서는 계면활성제 제조회사가 중소기업형태이므로 기술개발에 대한 적극적인 투자가 어려운 실정이다. 따라서 연속적인 정부차원의 연구가 이루어져야 한다고 본다. 단백질계 계면활성제는 환경적 합성, 인체안정성, 고기능성, 편리성을 고루 갖춘 세제에 가장 접근하고 있는 것 중의 하나이다. 단백질계 계면활성제의 특성은 비이온계의 저자극성과 음이온계의 성능을 동시에 가지고 있다. 따라서 주

방용 세제, 샴푸, 로션 등 인체접촉이 가장 많은 분야에 우선적으로 사용되어야 한다.

제6장 참고문헌

1. Paquest, A. ; Bergeron, M. *Can. J. Chem.* **1982**, 60,1806.
2. Jugermann, E.; Gerecht, J. F.; Krems, I. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 172.
3. Narayana, K.; Narasinga, M. S. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 259.
4. Scafidi, A. A.; Beatriz, M. *Cosmetics and Toiletries.* **1980**, 95, 65.
5. Bonadeo, I.; Variati, G. L. *Cosmetics and Toiletries.* **1977**, 92, 45.
6. Sokol, P. E. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1975**, 52, 101.
7. Muscio, O. J. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1982**, 59,217.
8. Bickford, W. G.; Krauczunas P.; Wheeler, H. H. *Oil and Soap.* **1942**, 19, 23.
9. *U. S. Pat.* 3,230,210
10. *U. S. Pat.* 3,168,510
11. *U. S. Pat.* 3,138,581
12. *U. S. Pat.* 2,728,759
13. *U. S. Pat.* 3,954,725
14. *U. S. Pat.* 5,314,878
15. *U. S. Pat.* 5,356,637
16. Antonini, A.; Sibader. *Cosmetics and Toiletries.* **1988**, 103, 57.
17. Kanari, M; Kawasaki, Y. *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.* **1993**, 27, 498.
18. Bennet, H. P. J.; Browne, C. A.; Solomon, S. *J. Liquid Chromatogr.* **1980**, 3, 1353.
19. Hamiton, P. B. *Anal. Chem.* **1963**, 35, 2055.
20. Kraak, J. C.; Jonker K. M.; Huber, J. F. K. *J. Cheromatogr.* **1977**, 142,

671.

21. Richter, W. O.; Jacob, B.; Schwandt, P. *Anal. Biochem.* **1983**, *133*, 288
22. Stern, E. S; Johnsoen, V. L. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1977**, *28*, 227.
23. Magot, A.; Erwin, F.; Renken, A. *Process Biochem.* **1994**, *29*, 257.
24. Mhaska, S. Y.; Prasad, R. B. M.; Lakshminarayama, G. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, *12*, 1015.
25. Mhaska, S. Y.; Lakshminarayama, G. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1993**, *70*, 1.
26. Veis, A. *The Macromolecular Chemistry of Gelatin*; Academic Press: New York, **1964**.
27. Gustavson, K. H. *The Chemistry and Reactivity of Collagen*; Academic Press: New York, **1955**.
28. McKenzie, H. A. *Milk Proteins*; Academic Press: New York, **1970**.
29. Varnam, A. H.; Sutherland, J. P. *Milk and Milk Products*; Champman & Hall: London, **1994**.

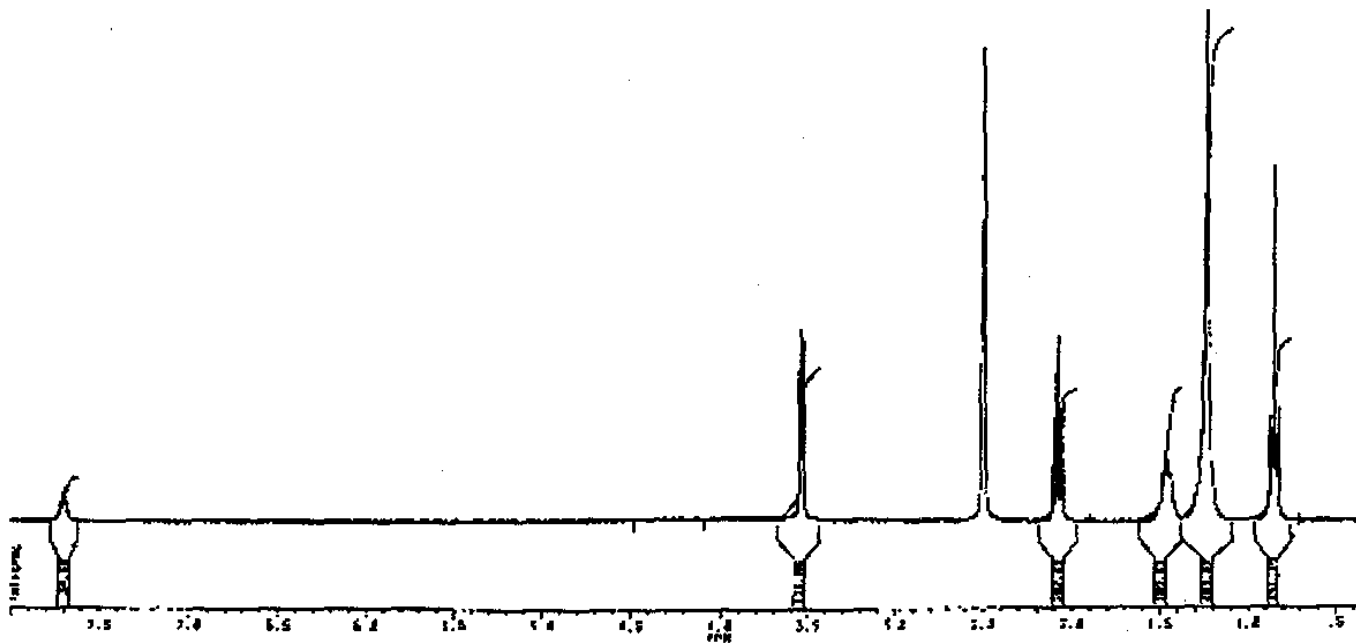


Fig. 9. ^1H NMR spectrum of capryloyl glycine.

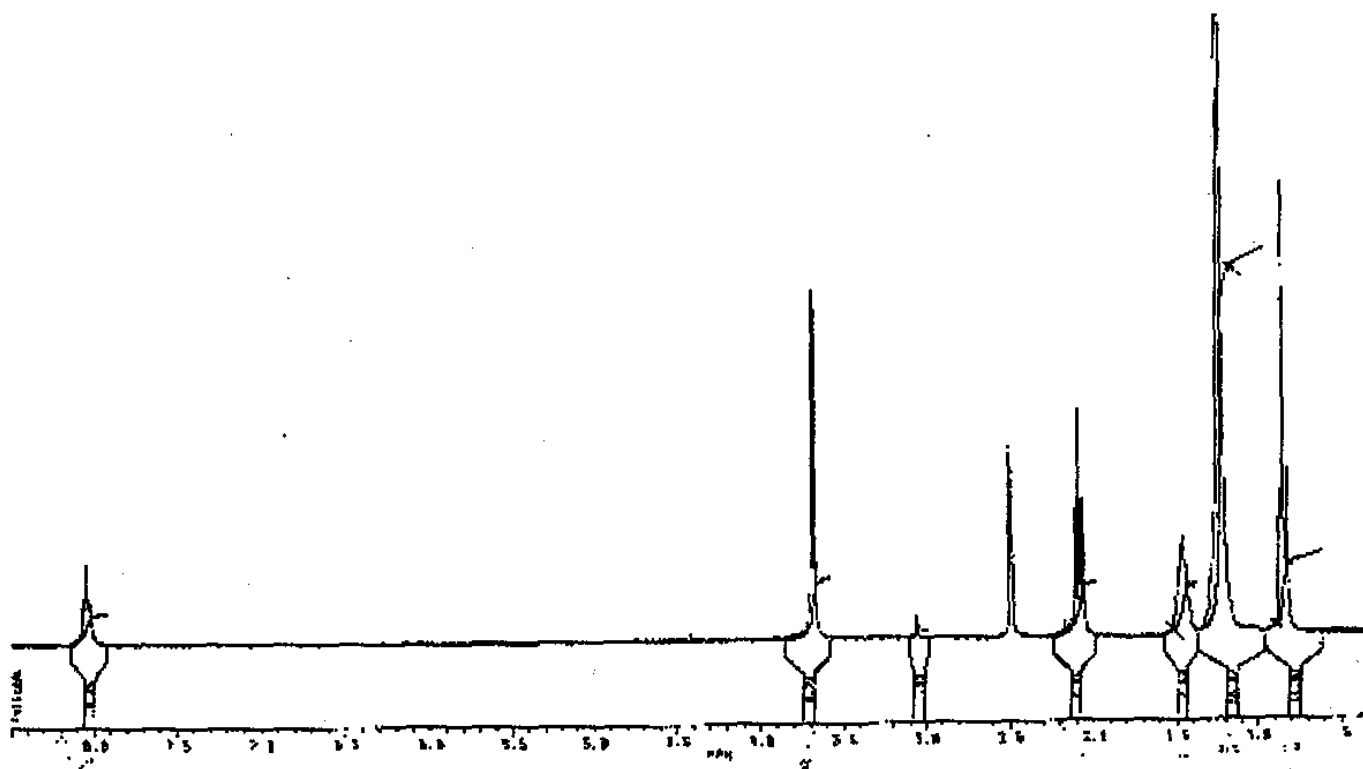


Fig. 10. ^1H NMR spectrum of lauroyl glycine.

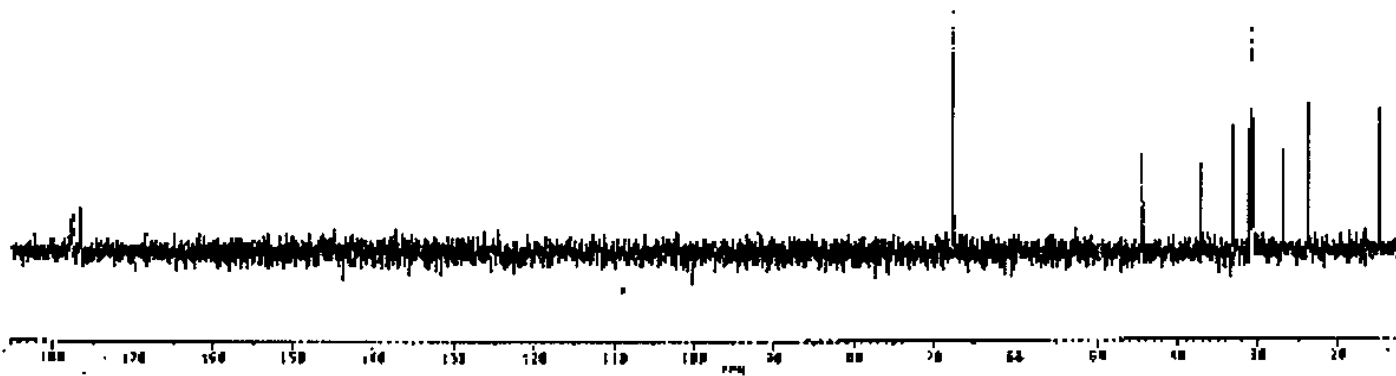


Fig. 11. ^{13}C NMR spectrum of lauroyl glycine.

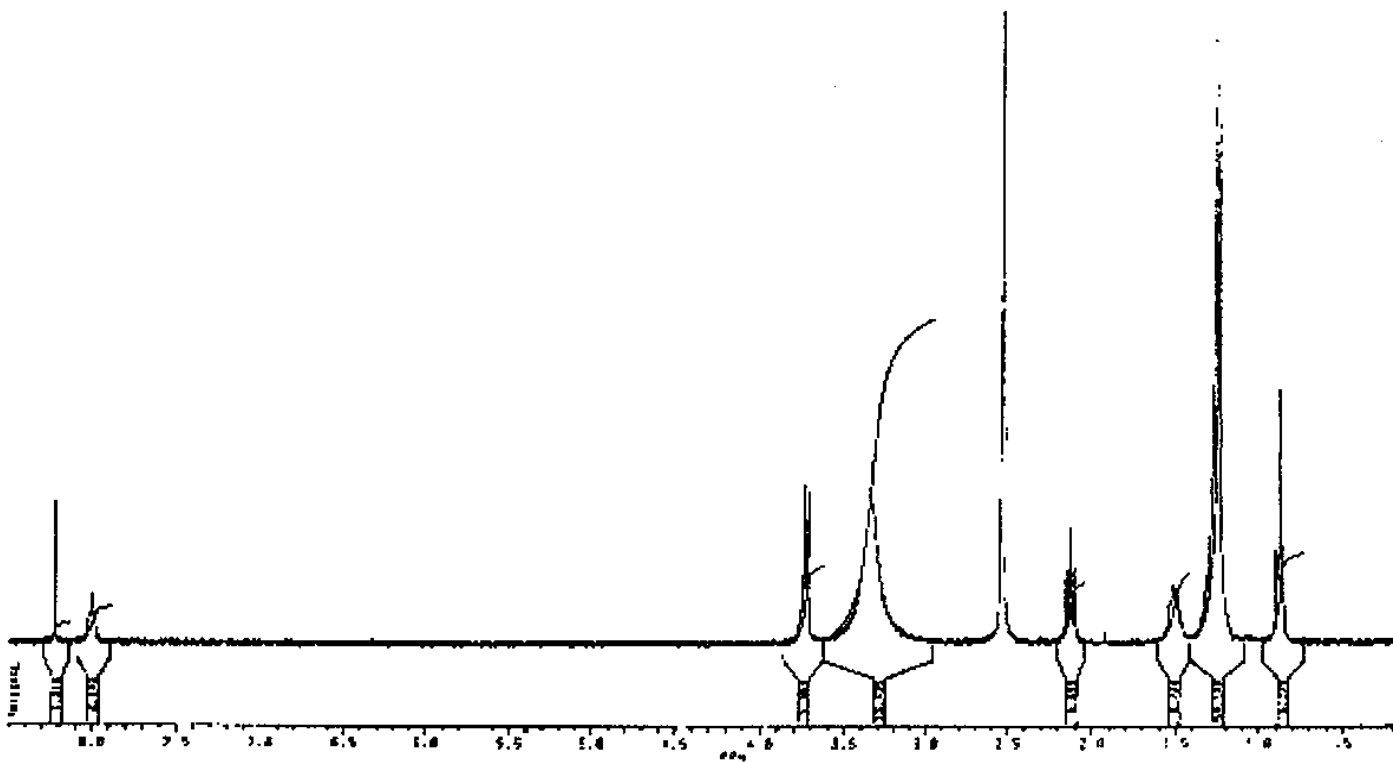


Fig. 12. ^1H NMR spectrum of stearyl glycine.

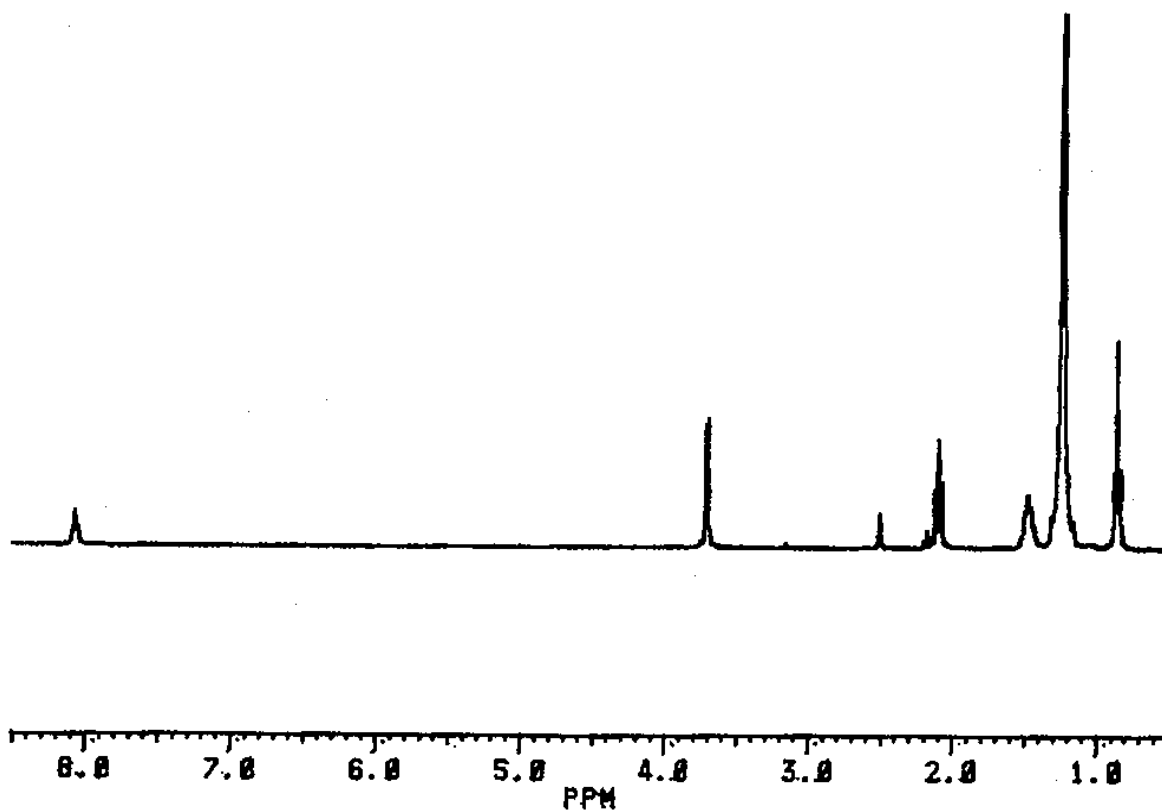


Fig. 13. ^1H NMR spectrum of palmitoyl glycine.

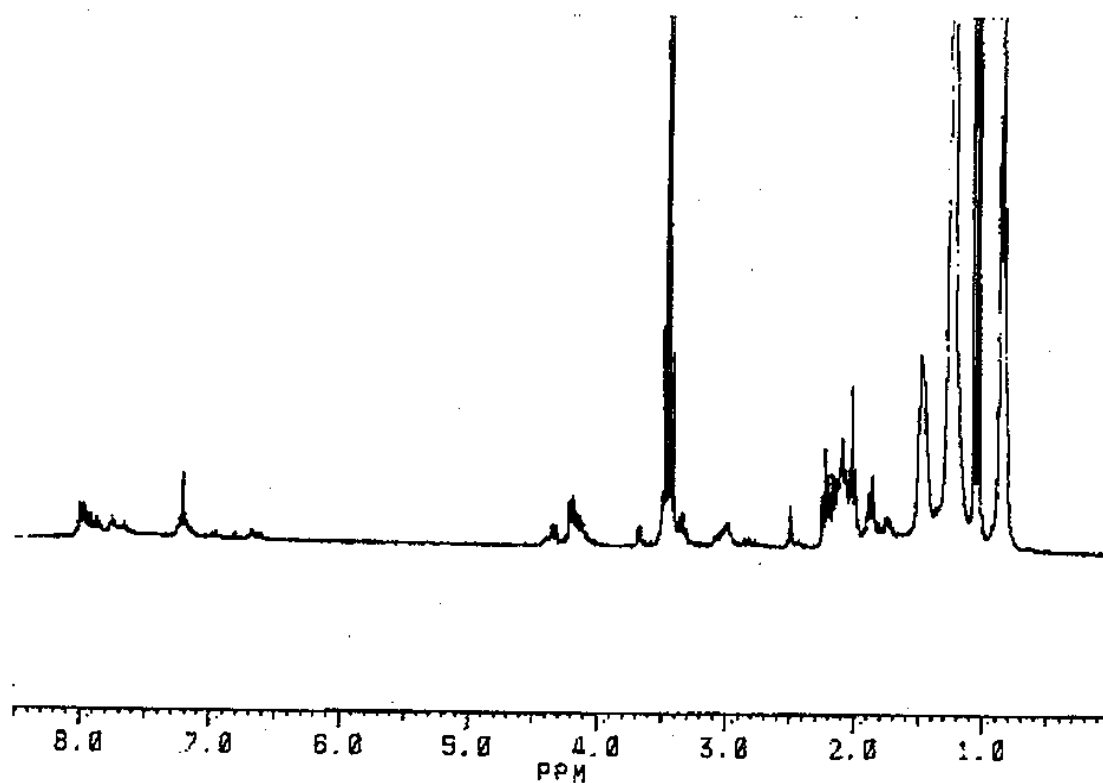


Fig. 14. ^1H NMR spectrum of capryloyl peptide-185.

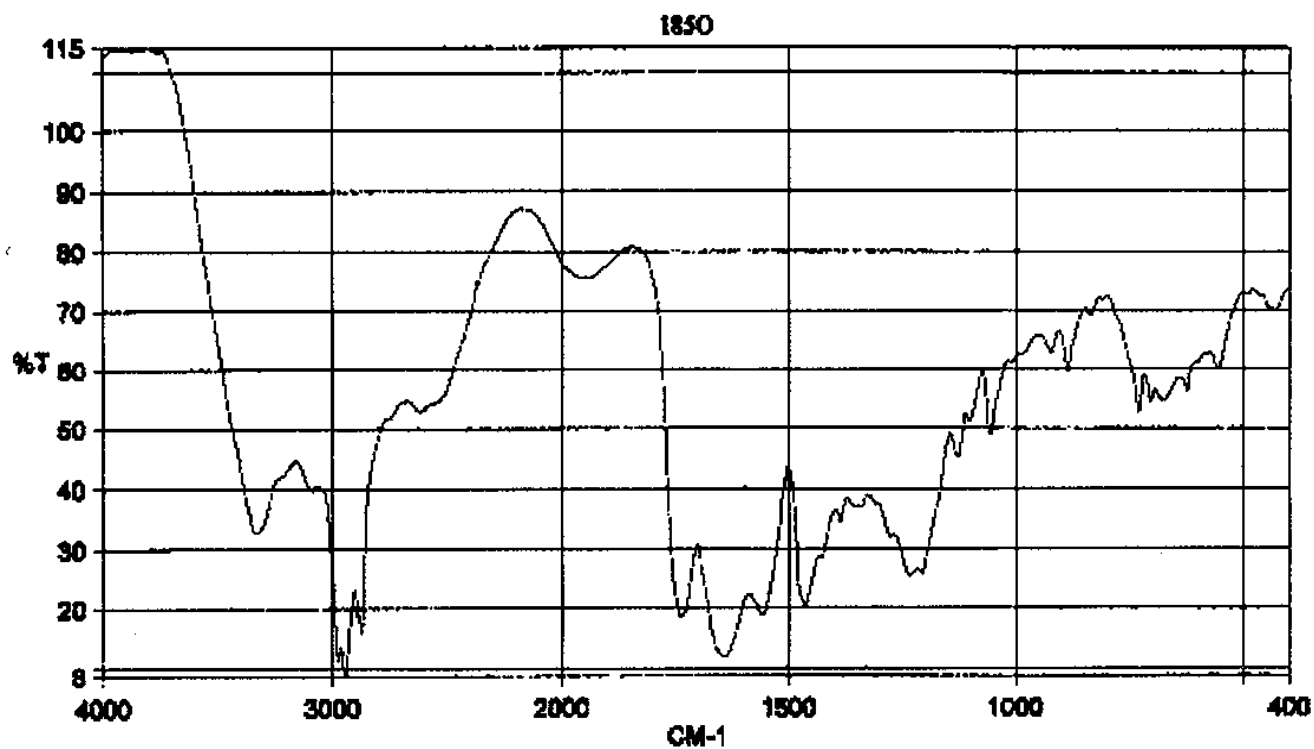


Fig. 15. IR spectrum of capryloyl peptide-185.

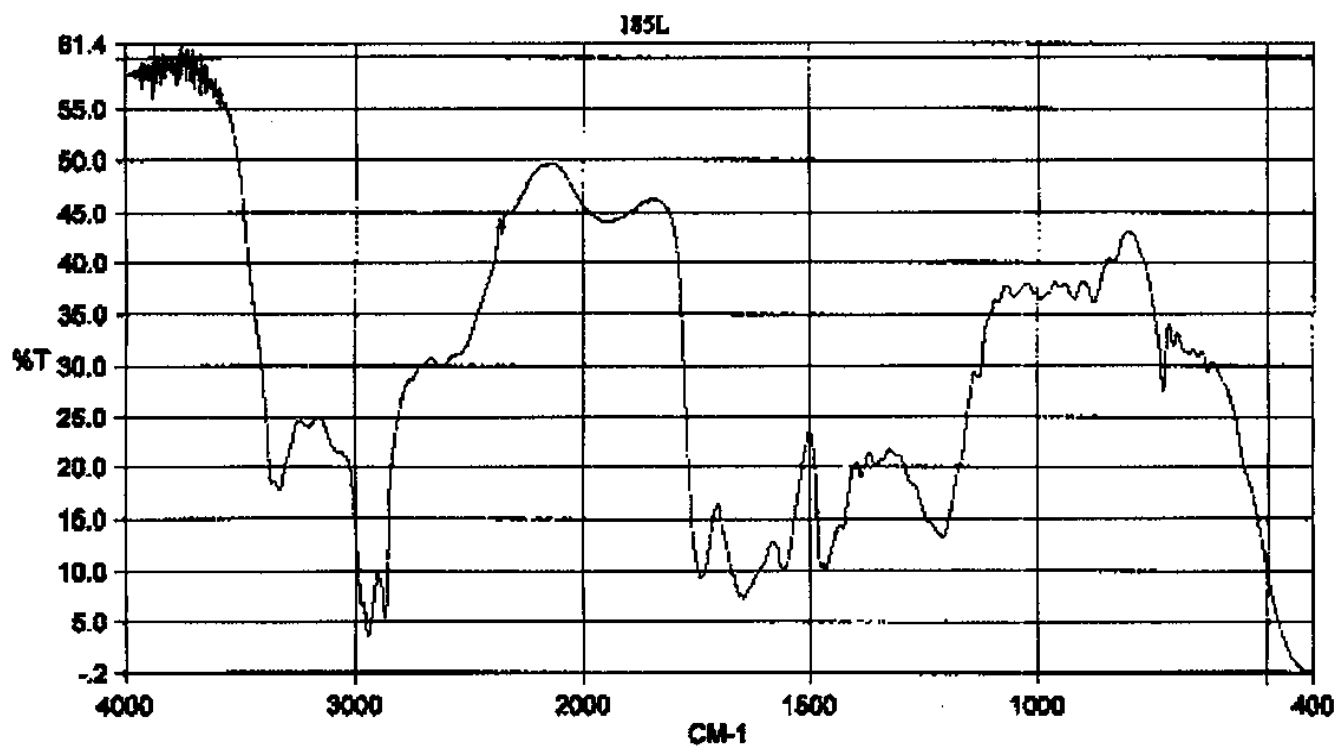


Fig. 16. IR spectrum of lauroyl peptide-185.

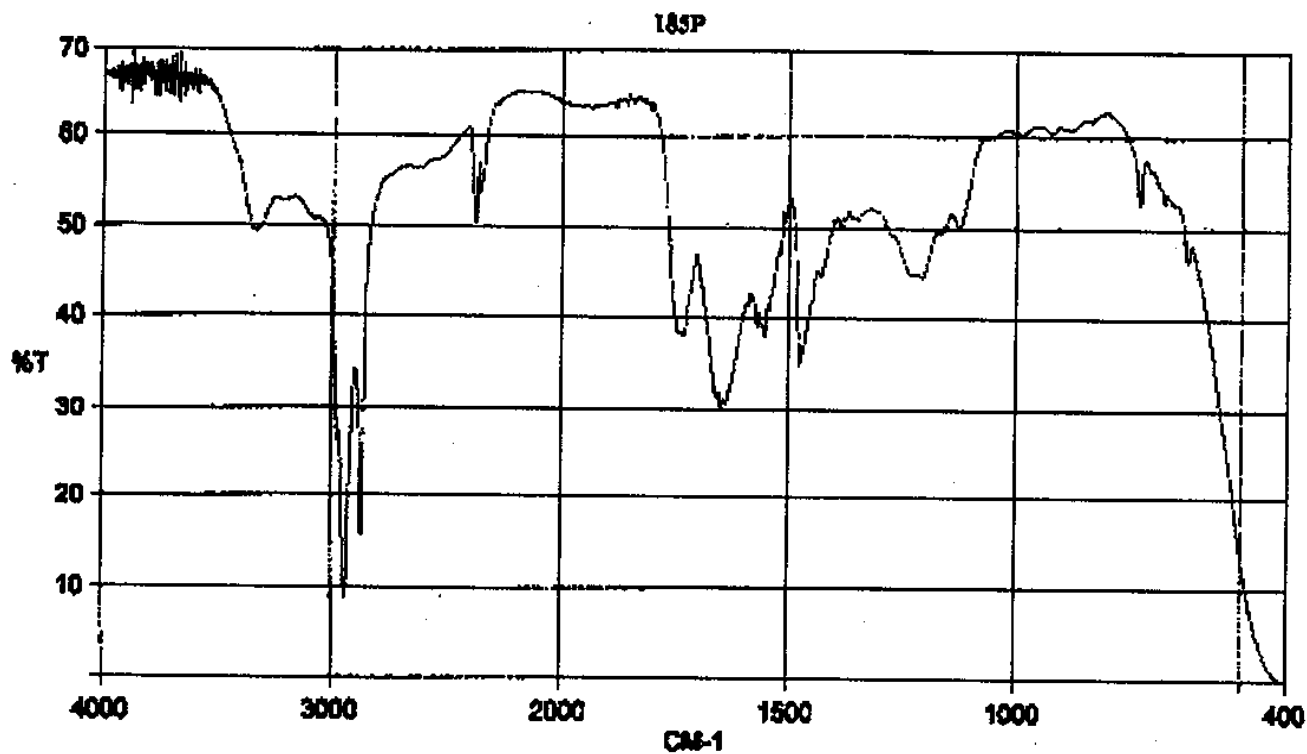


Fig. 17. IR spectrum of palmitoyl peptide-185.

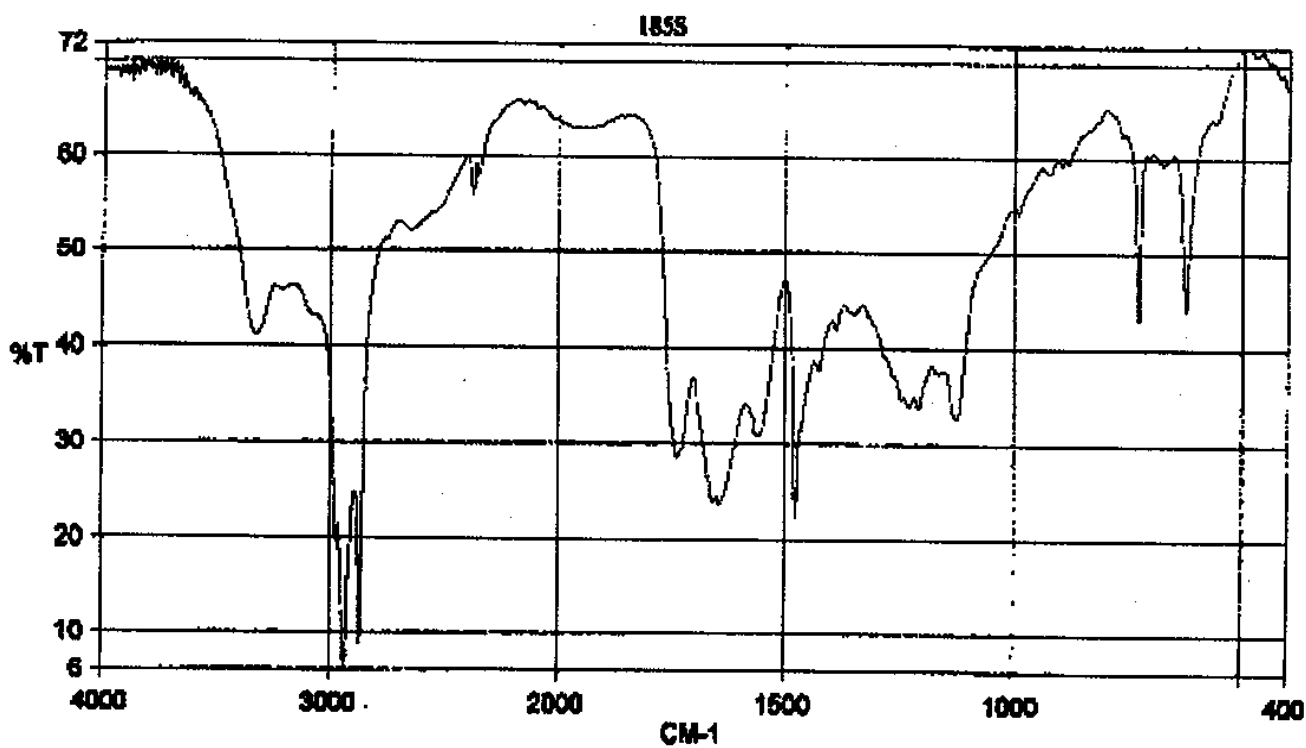


Fig. 18. IR spectrum of stearoyl peptide-185.

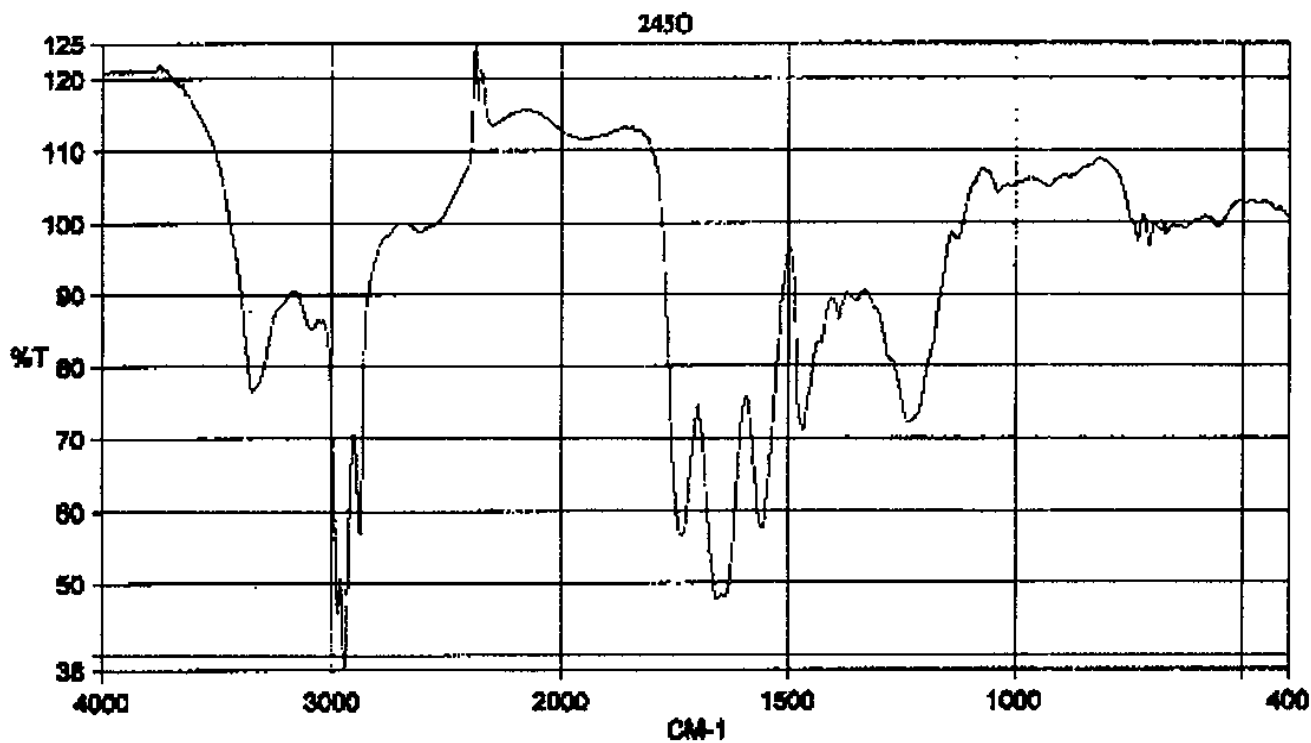


Fig. 19. IR spectrum of capryloyl peptide-245.

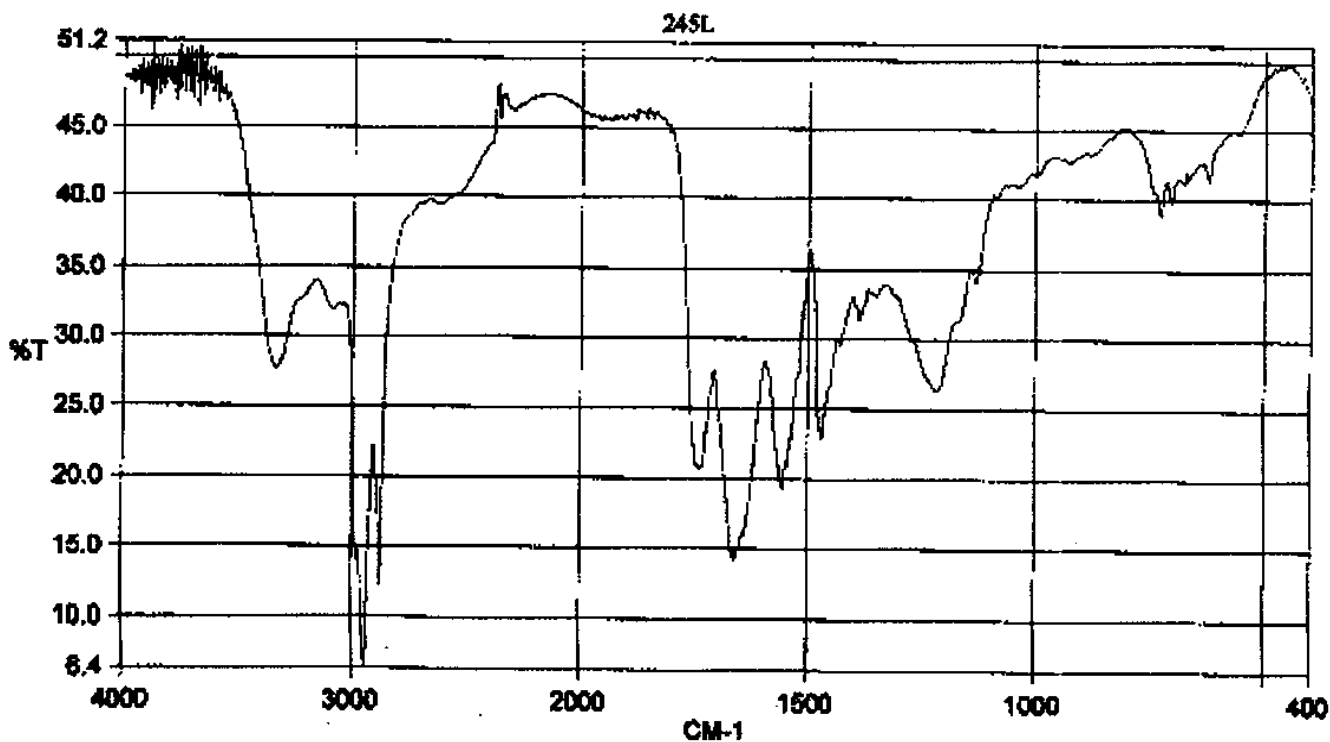


Fig. 20. IR spectrum of lauroyl peptide-245.

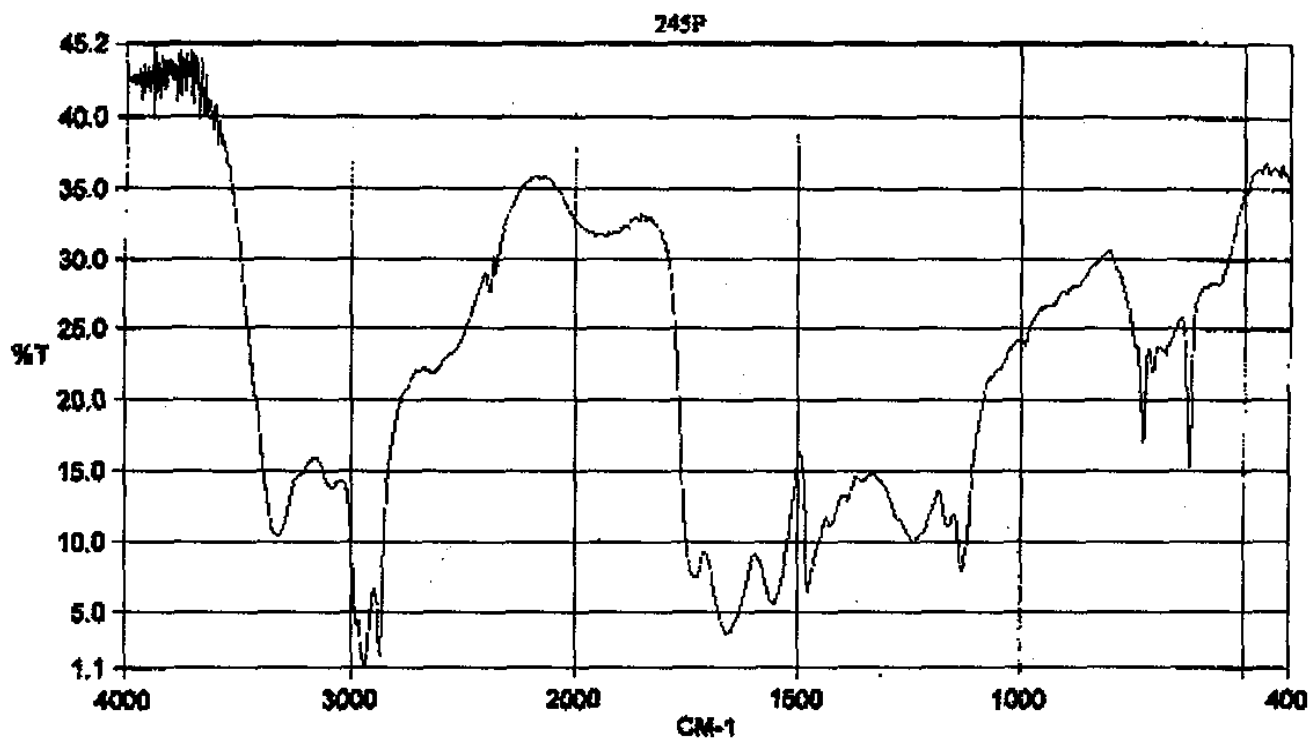


Fig. 21. IR spectrum of palmitoyl peptide-245.

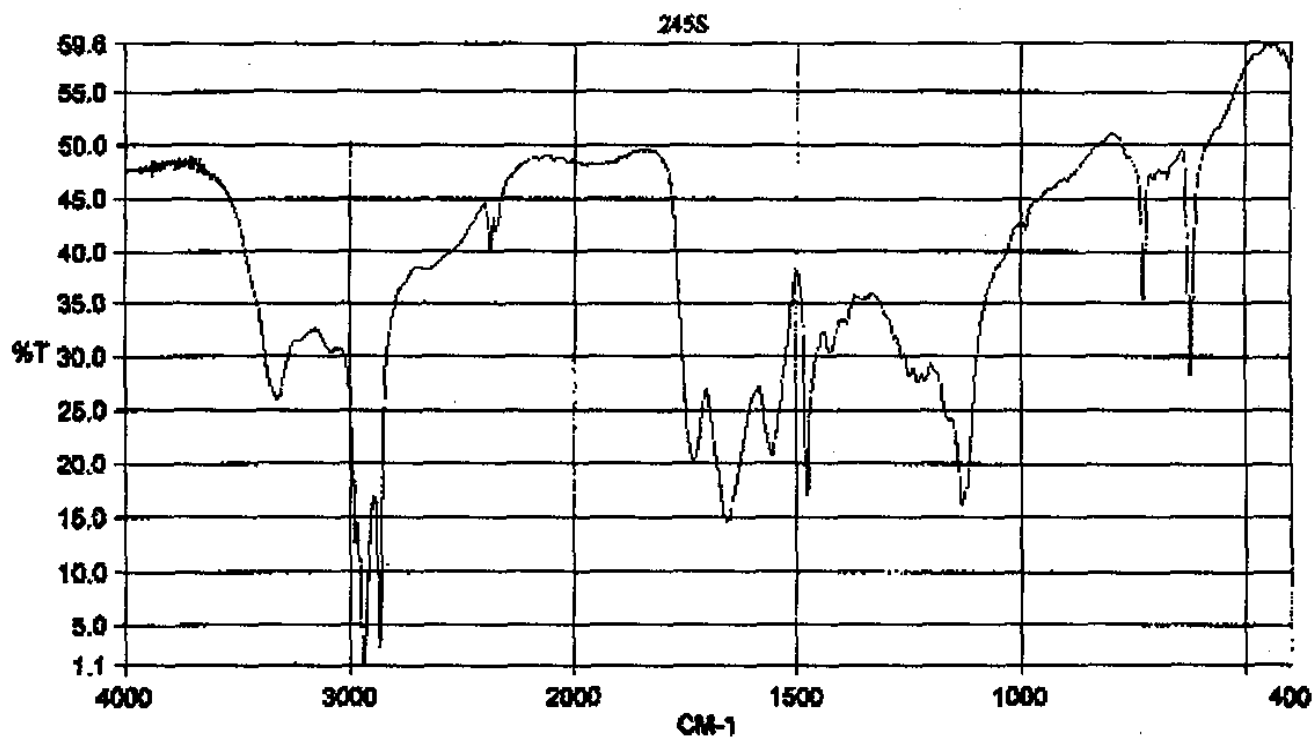


Fig. 22. IR spectrum of stearoyl peptide-245.

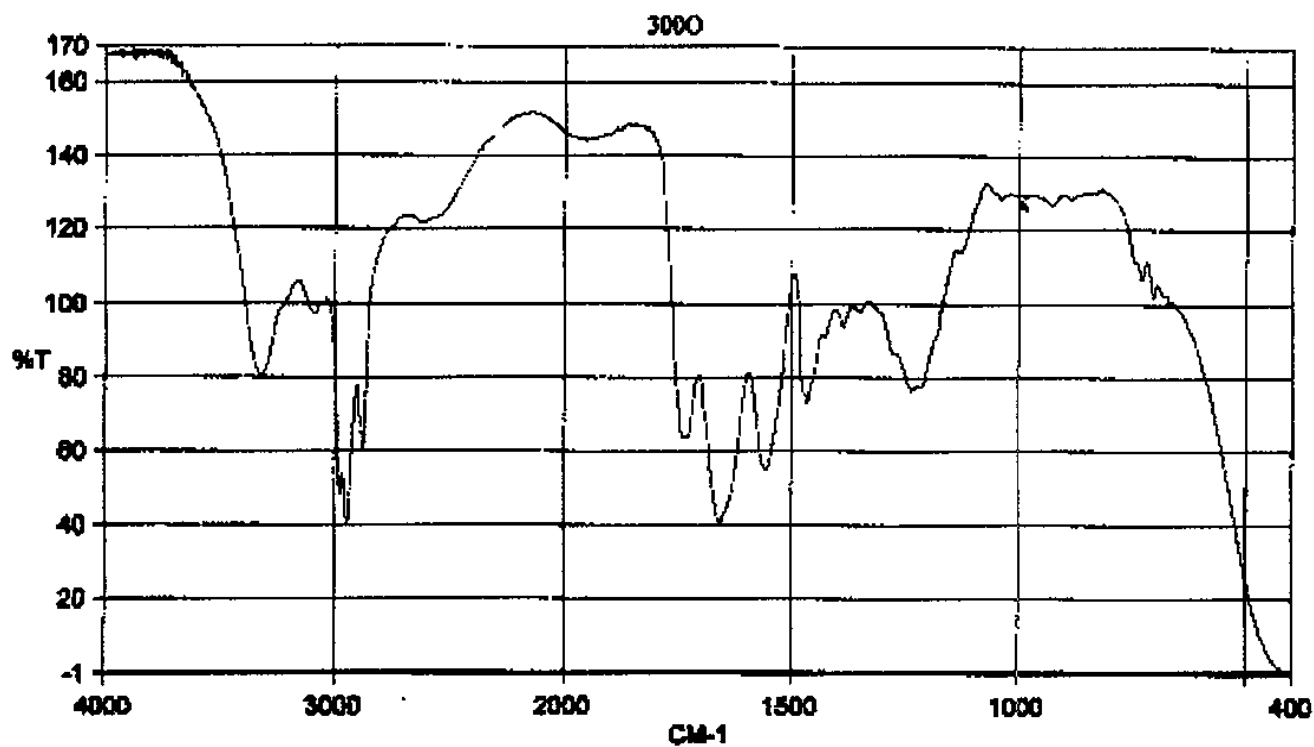


Fig. 23. IR spectrum of capryloyl peptide-300.

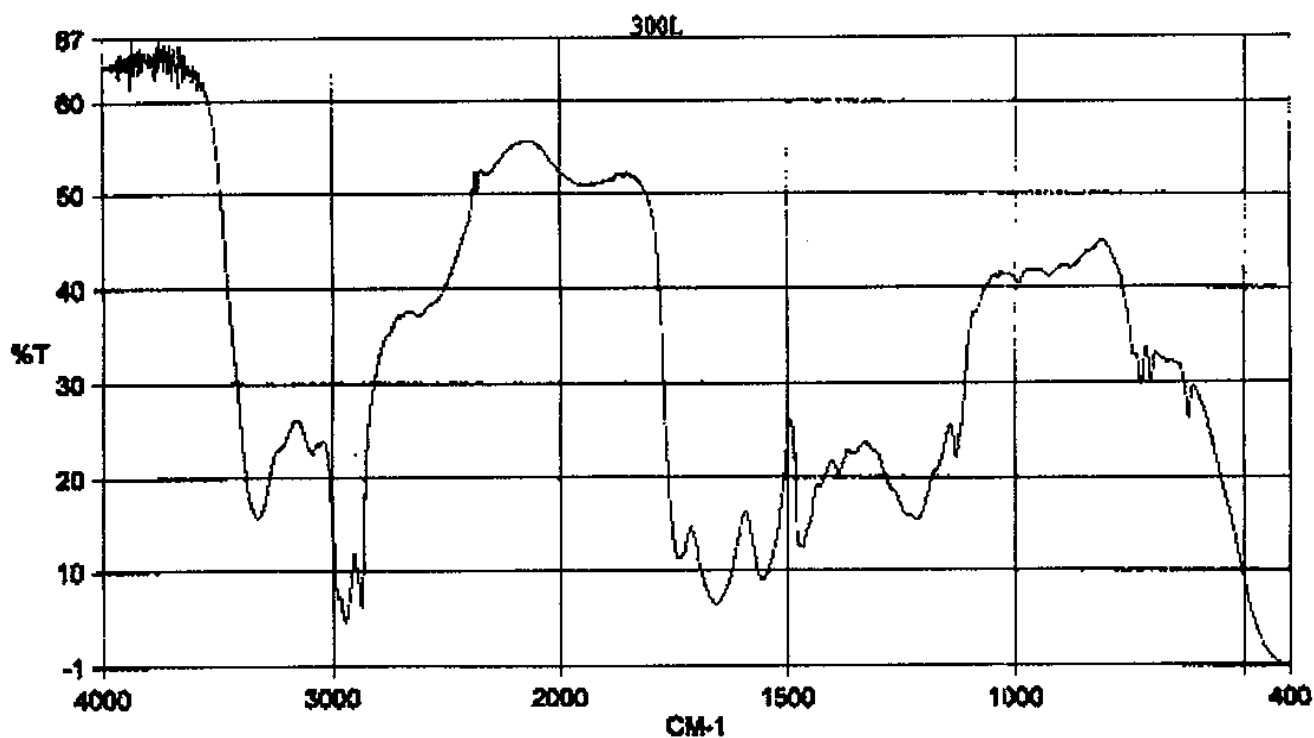


Fig. 24. IR spectrum of lauroyl peptide-300.

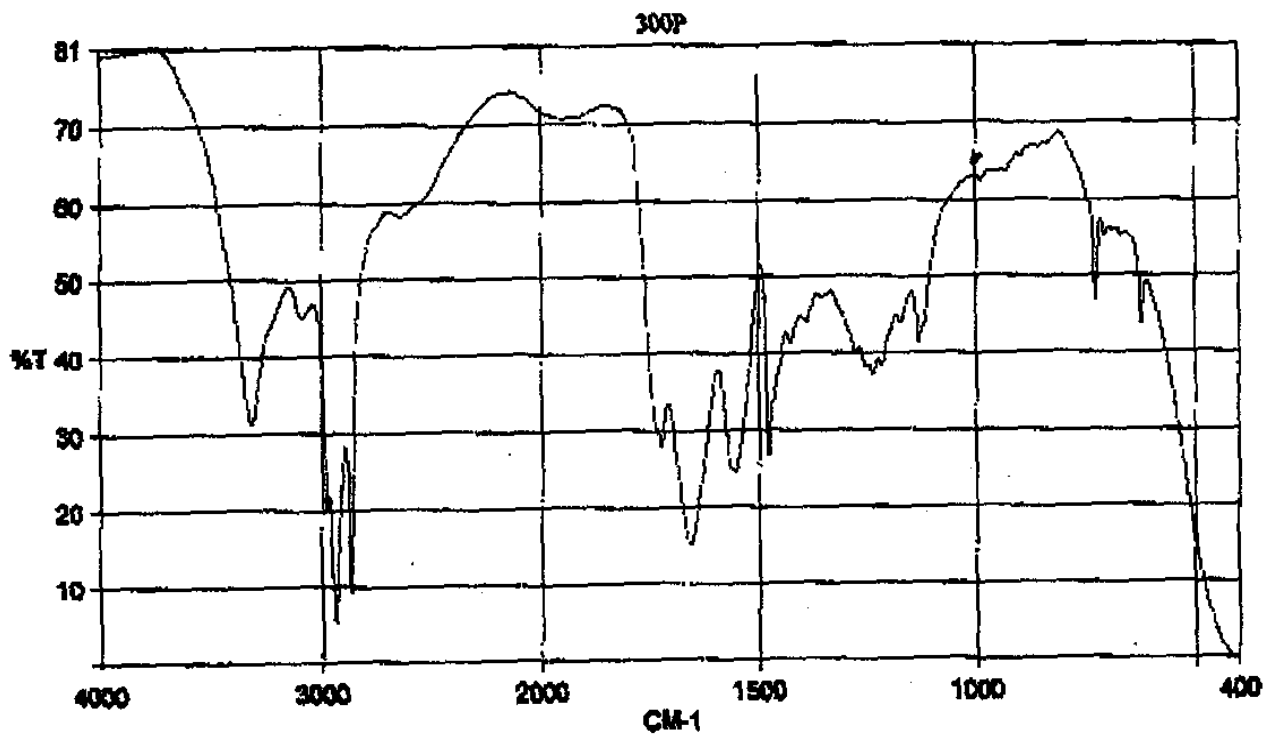


Fig. 25. IR spectrum of palmitoyl peptide-300.

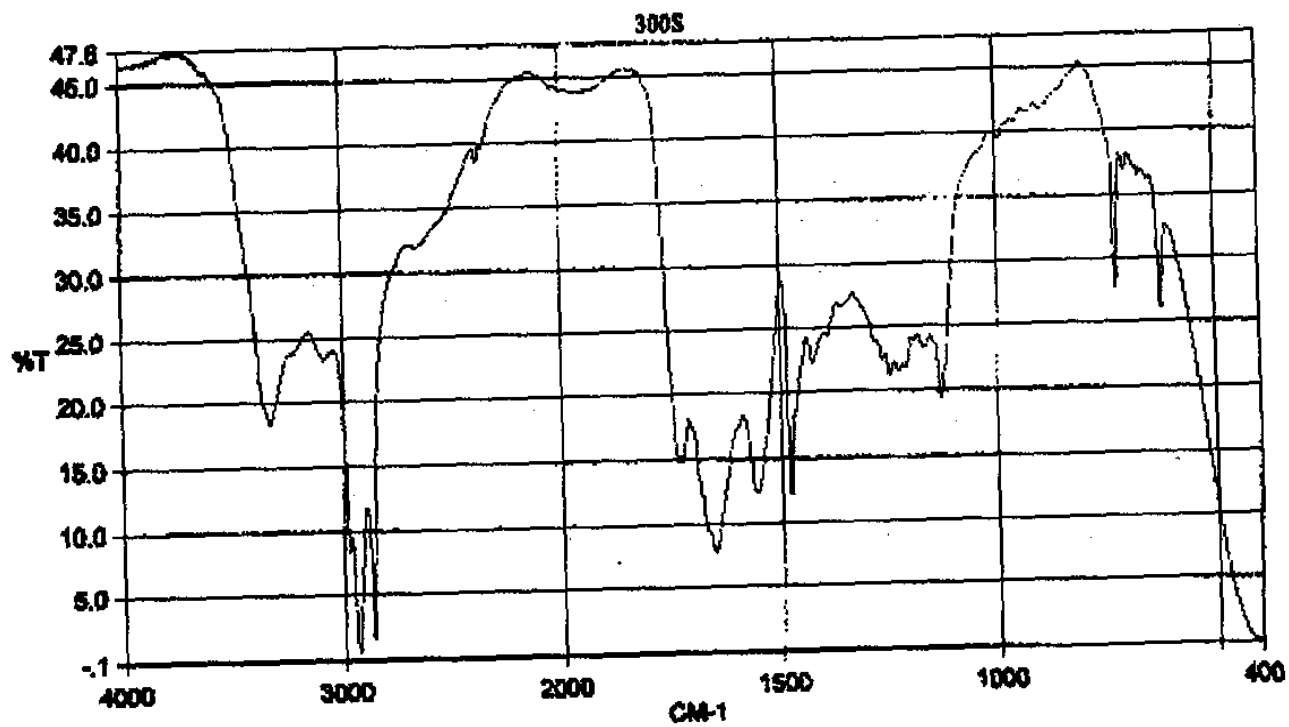


Fig. 26. IR spectrum of stearoyl peptide-300.

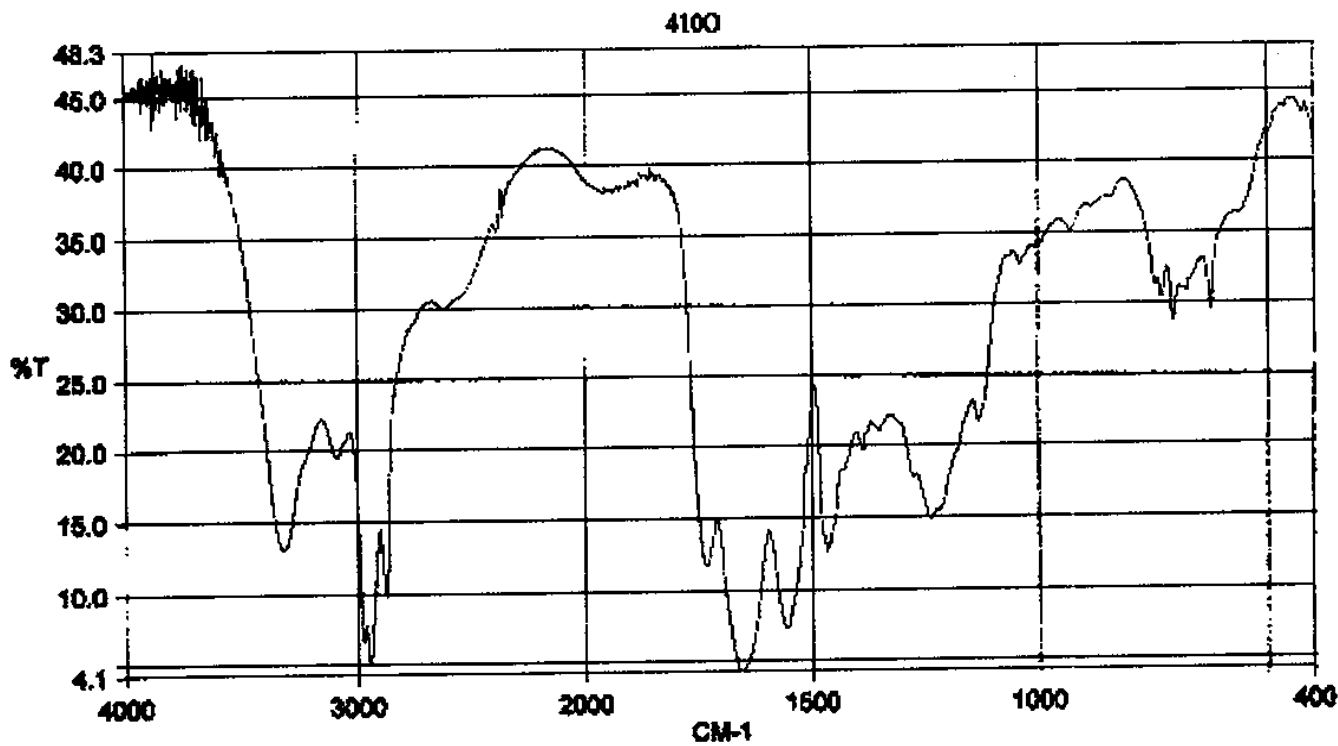


Fig. 27. IR spectrum of capryloyl peptide-410.

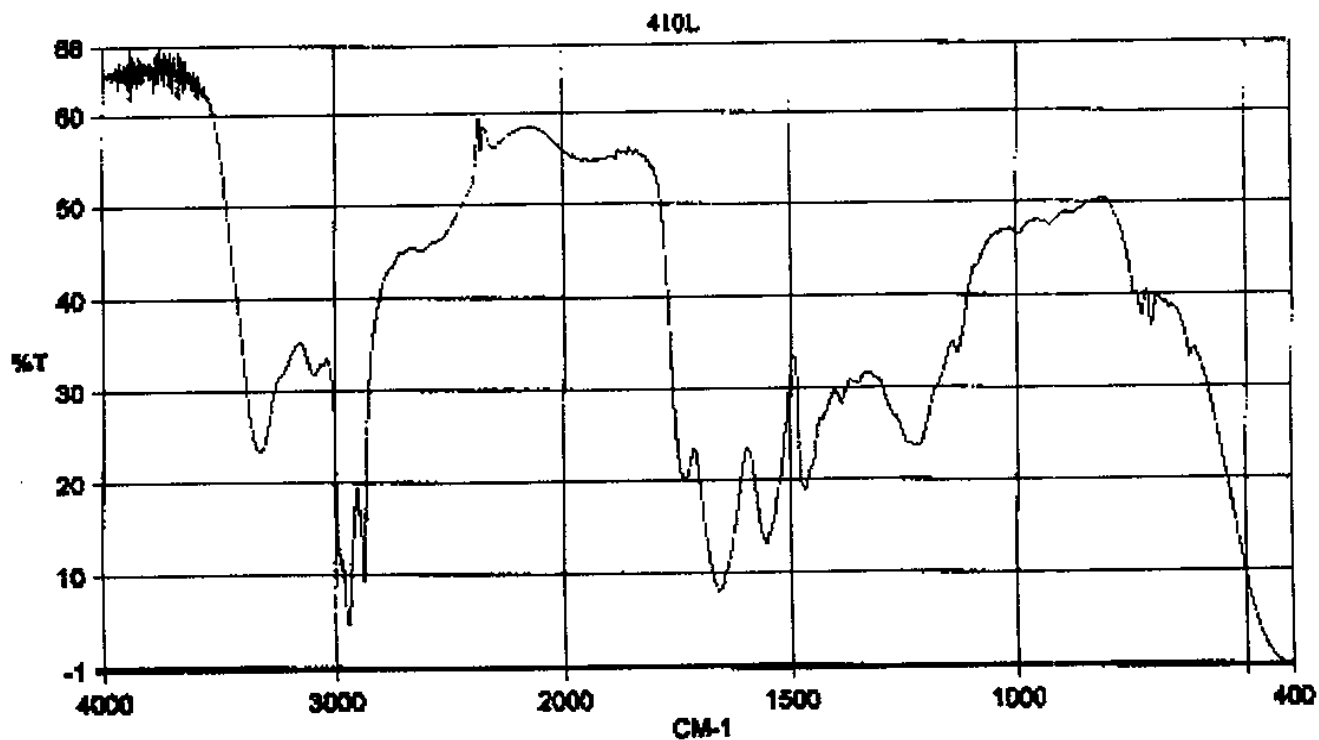


Fig. 28. IR spectrum of lauroyl peptide-410.

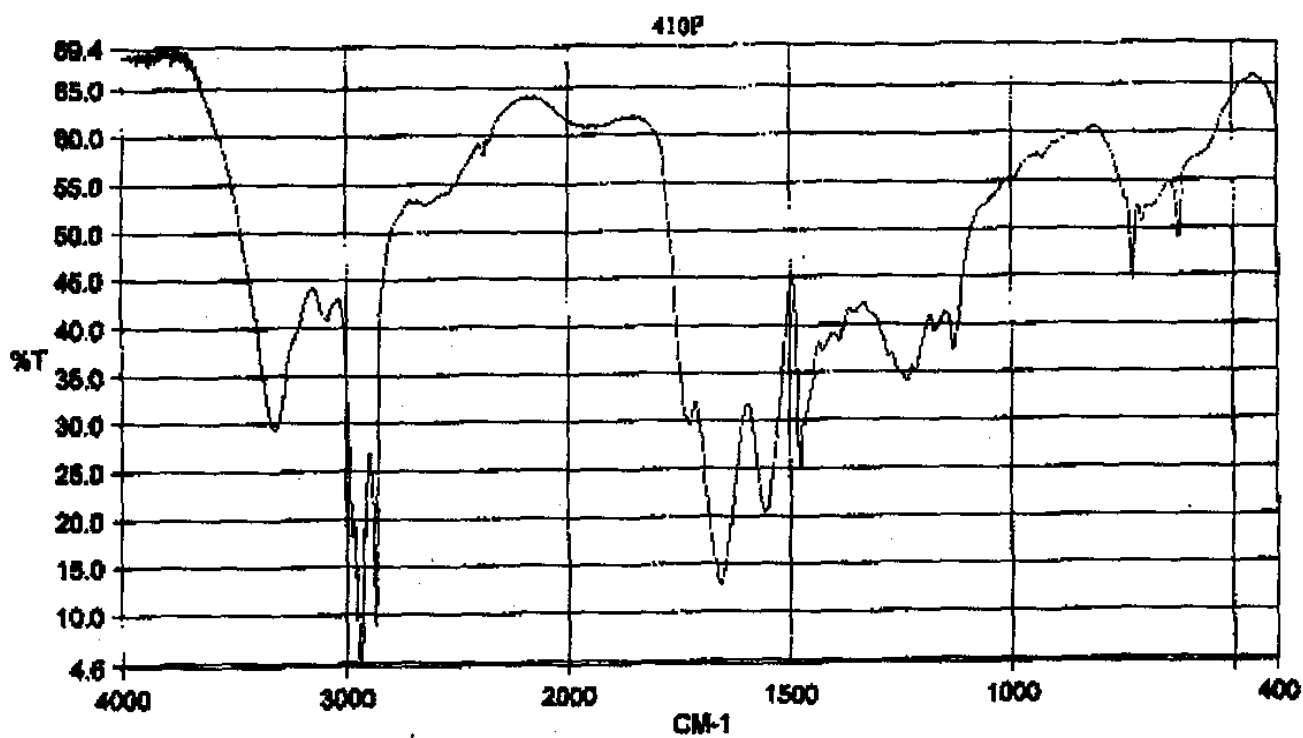


Fig. 29. IR spectrum of palmitoyl peptide-410.

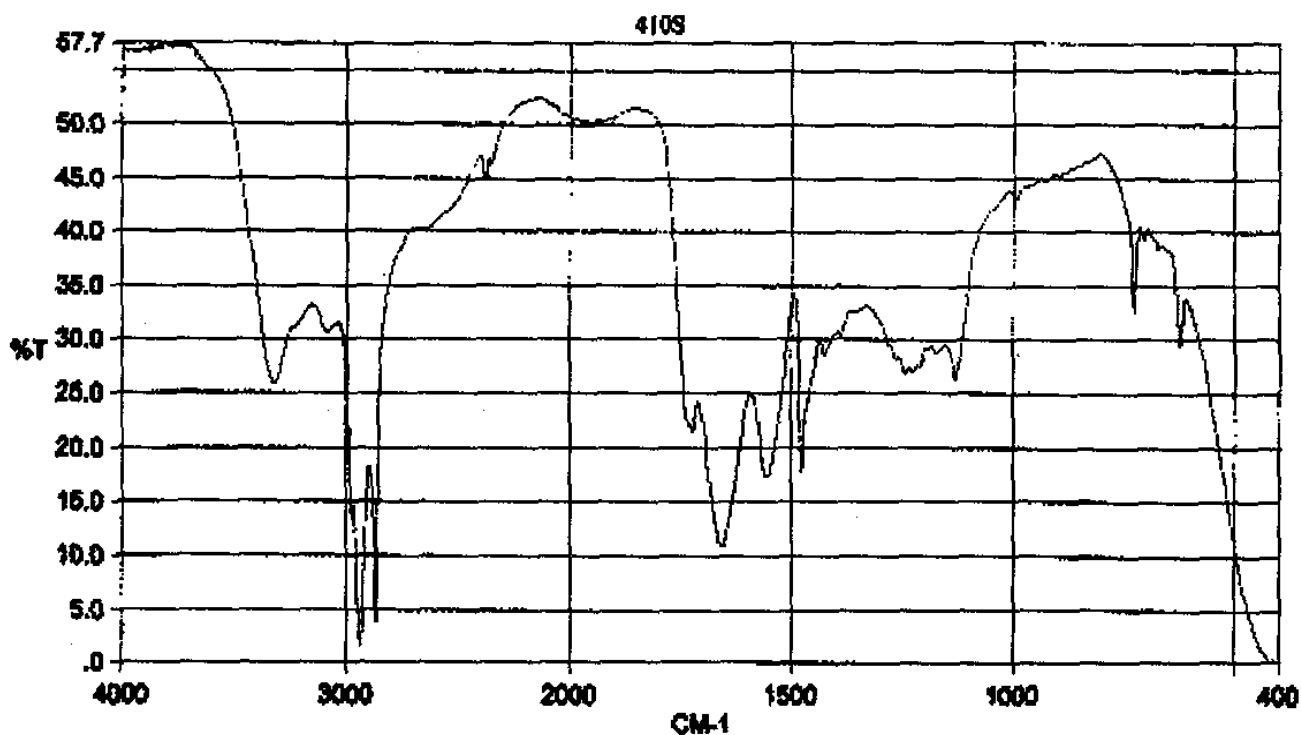


Fig. 30. IR spectrum of stearoyl peptide-410.