

카복실기가 있는 고분자를 이용한 Calcite 결정의 형태 조절

양태욱 · 김동환* · 허유진* · 조재영† · 김일원*†

서울대학교 화학생명공학부, *숭실대학교 화학공학과

(2016년 6월 25일 접수, 2016년 7월 6일 수정, 2016년 7월 7일 채택)

Regulating the Morphology of Calcite through Selective Binding of Polymers with Carboxylic Acids

Taewook Yang, Donghwan Kim*, Eugene Huh*, Jae Young Jho†, and Il Won Kim*†

School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Seoul 08826, Korea

*Department of Chemical Engineering, Soongsil University, 369 Sangdo-ro, Seoul 06978, Korea

(Received June 25, 2016; Revised July 6, 2016; Accepted July 7, 2016)

초록: 탄산칼슘 결정의 다형체 중 하나인 calcite는 여러 생체미네랄의 주된 구성성분이며, 생체단백질의 작용으로 복잡한 형상을 지니는 경우가 많다. 이러한 작용을 하는 대표적인 단백질인 Asprich는 카복실기가 풍부하며, Asprich에서 유래한 펩티드와 마그네슘 이온이 공존할 때 calcite 결정 형태에 대한 영향이 큰 것이 알려져 있다. 본 연구에서는 카복실기가 있는 합성 고분자를 이용하여 calcite 결정의 형상을 제어하였다. Poly(acrylic acid)와 poly(methacrylic acid)를 이용하였을 때는 Asprich 펩티드의 calcite 형태 조절 작용을 재현할 수 있었으나, poly(ethylene imine)과 poly(*N*-isopropylacrylamide)를 첨가하였을 때는 유사한 효과를 관찰할 수 없었다. 이러한 현상은 음이온성 고분자가 calcite의 {hk0} 결정면에 선택적으로 결합하는 경향으로 설명할 수 있다.

Abstract: Calcite is one of the anhydrous polymorphs of calcium carbonate. When it is found in biominerals, they often have complex morphologies controlled by associated proteins. Asprich, rich in carboxylic acid groups, is one of the representative proteins. In previous studies, peptides originated from Asprich showed extensive modification abilities of calcite morphologies, especially in the presence of magnesium ions. In the present study, synthetic polymers with carboxylic acid groups were utilized to regulate the morphologies of calcite. Poly(acrylic acid) and poly(methacrylic acid) were able to reproduce the controlling ability of Asprich peptides, but poly(ethylene imine) and poly(*N*-isopropylacrylamide) could not. The observed phenomenon can be explained through selective binding of the anionic polymers to the {hk0} planes of calcite.

Keywords: calcite, poly(acrylic acid), poly(methacrylic acid), selective binding, magnesium ion.

서론

탄산칼슘은 연체동물의 외골격을 구성하는 주요한 무기물이다.¹ 탄산칼슘 결정의 다형체(polymorph) 중 calcite는 연체동물 껍질의 각주층(prismatic layer)을, aragonite는 진주층(nacreous layer)을 주로 이루고 있다.^{2,3} 탄산칼슘 결정의 형태는 미량 존재하는 주위의 유기물이나 무기물에 의해 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 그 예로 연체동물의 한 종류인 *Atrina rigida*는 Asprich 단백질이 껍질의 형성에 관여하여 그 형태를 조절한다. Asprich 단백질은 아스파르트산(aspartic

acid)과 글루탐산(glutamic acid)이 풍부하게 존재하는 DEAD17(아미노산 배열: DEADE ADADE ADADE DE)과 acidic-2(아미노산 배열: ADNDA ADET D AADVG TEAED VADDE)를 반복 단위로 가지고 있다.⁴ 이를 바탕으로 Asprich, DEAD17, acidic-2 등을 첨가하여 calcite의 결정 형태를 조절할 수 있음이 보고되었다.^{5,6} 또한 DEAD17이나 acidic-2만 첨가할 때보다, 마그네슘 이온이 소량(Mg/Ca = 0.1) 추가되면 calcite 결정의 형태에 더 큰 영향을 주는 것으로 확인되었다.⁷

많은 연체동물이 서식하는 바닷물에 풍부하게 존재하는 마그네슘 이온은 calcite 결정의 핵생성과 성장을 방해하는 것으로 알려져 있다. 따라서 결정화 용액의 칼슘과 마그네슘의 비율을 변화시키며 탄산칼슘의 형태를 조절하는 많은 연구가 진행되고 있다.⁷⁻¹⁵ 자기조립 단분자막 위에 calcite 결정을 성

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: iwkim@ssu.ac.kr; jyjho@snu.ac.kr

©2016 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

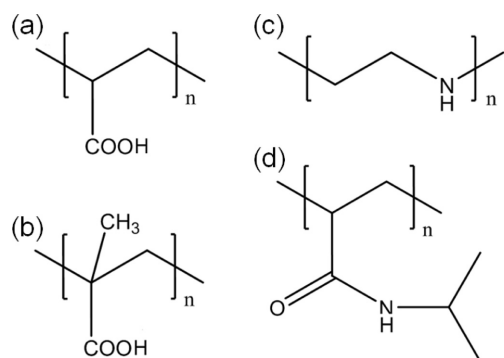


Figure 1. Polymers in the present study: (a) poly(acrylic acid) (PAA); (b) poly(methacrylic acid) (PMAA); (c) poly(ethylene imine) (PEI); (d) poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNiPAAm).

장시킬 때, 마그네슘 이온의 비율($Mg/Ca = 0 \sim 2.0$)이 증가함에 따라 calcite의 성장이 방해받아 결정의 크기가 점차 작아지는 것이 관측되었다.⁸ 전구체인 무정형 탄산칼슘으로부터 calcite로 변환되는 과정에서는 마그네슘의 비율($Mg/Ca = 0 \sim 10.0$)이 증가함에 따라 calcite 결정의 핵 생성이 방해를 받아 calcite로 변환되는 시간이 점차 길어지는 것으로 보고되었다.^{9,10} 또한 $Mg/Ca = 1$ 이하의 마그네슘을 첨가할 경우 calcite가 주로 형성되나, $Mg/Ca = 1$ 이상의 마그네슘을 넣었을 때는 aragonite의 형성이 유도되기 시작하여 $Mg/Ca = 5$ 이상인 경우 최종 생성물의 90% 이상이 aragonite로 형성되었다.¹⁰⁻¹⁵ 카복실기를 포함하는 화합물 또는 고분자를 같이 첨가하는 경우에도 마찬가지로 마그네슘의 비율이 증가할수록 aragonite가 우세하게 형성되었다.^{14,15} 한편, 마그네슘을 첨가하지 않은 상태에서 poly(acrylic acid)를 수 mM의 농도로 첨가하면 calcite가 응집된 형태로 성장하는 것으로 보고되었다.^{16,17} 또한 $Mg/Ca = 0.05$ 에서 양이온과 음이온을 동시에 가진 고분자를 수 mM의 농도로 첨가하였을 때도 역시 calcite가 응집된 형태로 성장함이 관측되었다.¹⁸

이에 따라 우리는 aragonite로의 변환이 일어나지 않는 낮은 비율의 마그네슘이 첨가된 조건에서($Mg/Ca = 0.1$) 생성되는 calcite가 응집되지 않도록 수 μM 농도의 고분자를 첨가하여 calcite 결정의 형태 변화를 관찰하였다. Asprich 단백질에 다량 존재하는 카복실기의 존재 유무가 calcite의 결정 형태에 미치는 영향을 살피기 위하여, 카복실기가 있는 poly(acrylic acid)(PAA)와 poly(methacrylic acid)(PMAA)를 첨가한 경우를 카복실기가 없는 poly(ethylene imine)(PEI)과 poly(*N*-isopropylacrylamide)(PNiPAAm)를 첨가한 경우와 비교하였다. 사용된 고분자들의 구조식은 Figure 1에 나타내었다.

실 험

시약. 실험에 사용된 염화칼슘($CaCl_2$, 97%, 무수물), 탄산

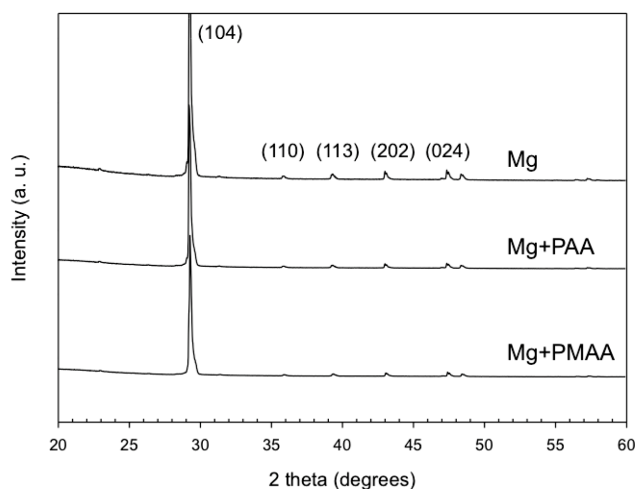


Figure 2. XRD patterns of calcite formed with magnesium ($Mg/Ca = 0.1$) in the presence and absence of $0.1 \mu M$ PAA or PMAA.

암모늄($(NH_4)_2CO_3$, ACS 시약 등급), 염화마그네슘($MgCl_2$, 99%, 육수화물)과 고분자 첨가물 poly(acrylic acid) (PAA, M_w : 1800), poly(methacrylic acid) (PMAA, M_w : 4000~6000, sodium salt), poly(ethylene imine) (PEI, M_w : 1300, 50 wt% 수용액), poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNiPAAm, M_w : 19000~30000)는 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. 탈이온수는 Millipore사의 Direct Q3를 사용하여 비저항 $18.2 M\Omega \cdot cm$ 이상으로 제조하여 사용하였다.

결정 제조. 탄산칼슘 결정의 제조는 염화칼슘 용액에 이산화탄소를 흡수시키는 방법을 이용하였다. 10 mM 염화칼슘 용액 3 mL를 유리 페트리 접시(지름 5 cm)에 담은 후, 파라핀 필름으로 봉하고 중심에 1~2 mm 크기의 구멍을 기체 이동을 위해 뚫었다. 이산화탄소 기체는 탄산암모늄의 분해로부터 만들었는데, 2 g을 데시케이터(700 mL) 바닥에 깔고 염화칼슘 용액이 담긴 페트리 접시를 위치시킨 후, 데시케이터를 밀봉하였다. 결정의 성장은 $15^\circ C$ 에서 48시간 동안 진행하였다. 마그네슘을 첨가했을 때는 염화마그네슘을 1 mM의 농도로 염화칼슘 용액에 첨가하였고, 그 외의 방법은 동일하게 진행하였다. 또한 고분자를 첨가했을 때는 각 고분자는 0.1, 1, 10 μM 등의 농도로 염화칼슘 용액에 첨가하였고, 그 이외의 방법은 동일하였다. 48시간 후에 결정화를 종료시켰는데, 용액의 pH는 첨가제의 유무에 관계없이 7.9~8.1로 유지되었다. 생성된 결정은 여과지(현대마이크로, 지름 55 mm, 기공 $5 \mu m$) 위에 polycarbonate track-etched membrane (Whatman, 지름 13 mm, 기공 $1 \mu m$)을 놓고 거른 후, $40^\circ C$ 에서 48시간 동안 건조하였다.

결정 분석. 건조된 탄산칼슘 결정이 다른 다형체가 생성되지 않은 순수한 calcite인지를 확인하기 위하여, X선 회절법(X-ray diffraction, XRD: Bruker AXS, $CuK\alpha$, $\lambda = 0.154 nm$)

을 이용하여 분석하였다. 결정의 형태를 관찰하기 위해서는 Au 코팅(Cressington sputter coater 108) 후에, 주사 전자 현미경법(scanning electron microscopy, SEM: JEOL, JSM-6701F)을 이용하였다. 결정의 형태를 바탕으로 결정면 분석을 위해서는 Shape(version 6.0, Shape software) 프로그램을 이용하였으며, 결정면의 분자모델 분석을 위해서는 calcite의 결정 구조와¹⁹ Mercury(version 2.3, Cambridge crystallographic data centre) 프로그램을 이용하였다.

결과 및 토론

Calcite 결정의 형태 변화. 본 연구에서 이용한 모든 조건에서 탄산칼슘은 calcite 다형체로만 결정화되었다. 대표적인 예로 마그네슘만 첨가하였을 때($Mg/Ca = 0.1$), $0.1 \mu M$ 의 PAA와 마그네슘을 첨가하였을 때, 그리고 $0.1 \mu M$ 의 PMAA와 마그네슘을 첨가하였을 때 생성된 결정들의 XRD 패턴을 Figure 2에 나타내었다. 모든 경우에 calcite의 주요 회절피크만이 관측되었다. 각 피크의 상대적인 강도는 미세하게 다르게 나타나는데, 이는 결정의 형태 변화에 따른 결정면 발현의 차이 때문인 것으로 보인다.^{20,21}

Calcite 결정의 형태가 마그네슘 그리고 PAA와 PMAA의 첨가 유무에 따라 변화하는 양상을 Figure 3에 나타내었다. Figure 3(a)는 고분자나 마그네슘의 첨가가 없는 경우인데, calcite가 $\{104\}$ 면으로 둘러싸인 전형적인 rhombohedral 형태로 관측되었다.^{7,12} Figure 3(b)는 마그네슘만을 $Mg/Ca = 0.1$ 의 농도로 첨가한 경우인데, 역시 rhombohedral 형태의 calcite가 관측되었지만 화살표와 확대된 그림에서 나타난 것처럼 모서리 부분에 새로운 결정면이 국지적으로 형성된 것을 확인할 수 있었다.

Figure 3(c)는 $0.1 \mu M$ PAA를 첨가한 경우이고 Figure 3(d)는 PAA가 추가로 마그네슘이 $Mg/Ca = 0.1$ 의 농도로 첨가된 경우이다. PAA만 첨가되었을 경우에는 calcite의 전형적인 $\{104\}$ 면들이 계단 형태로 형성되었는데, 이는 Asprich 단백질에서 유래한 DEAD17 또는 acidic-2를 첨가하였을 때와 유사한 현상이다.^{7,22} PAA와 마그네슘이 공존하는 경우에는 calcite의 새로운 결정면들이 발현하며 형태가 확연히 변화하는 것이 관측되었다. 이러한 현상도 DEAD17 또는 acidic-2가 마그네슘과 같이 첨가되었을 때와 매우 유사하였다.⁷ Figure 3(e)와 (f)는 PAA 대신에 PMAA가 첨가된 경우인데, calcite의 결정화에 두 고분자가 거의 동일한 효과가 있는 것으로 판단할 수 있었다. Figure 3(g)와 (h)는 각각 Figure 3(b)와 (d)에서 관측된 결정을 calcite 결정 구조에 기반하여 모사한 것이다. Figure 3(g)는 $\{104\}$ 면에 $\{110\}$ 면을 추가하여 모사하였고, Figure 3(h)는 $\{110\}$ 과 $\{120\}$ 면을 추가하여 모사하였다. 결정 형태 모사를 통해서 $\{hk0\}$ 면이 마그네슘 첨가로 발현되기 시작하며 PAA 혹은 PMAA 첨가를 통해 확장됨을 알

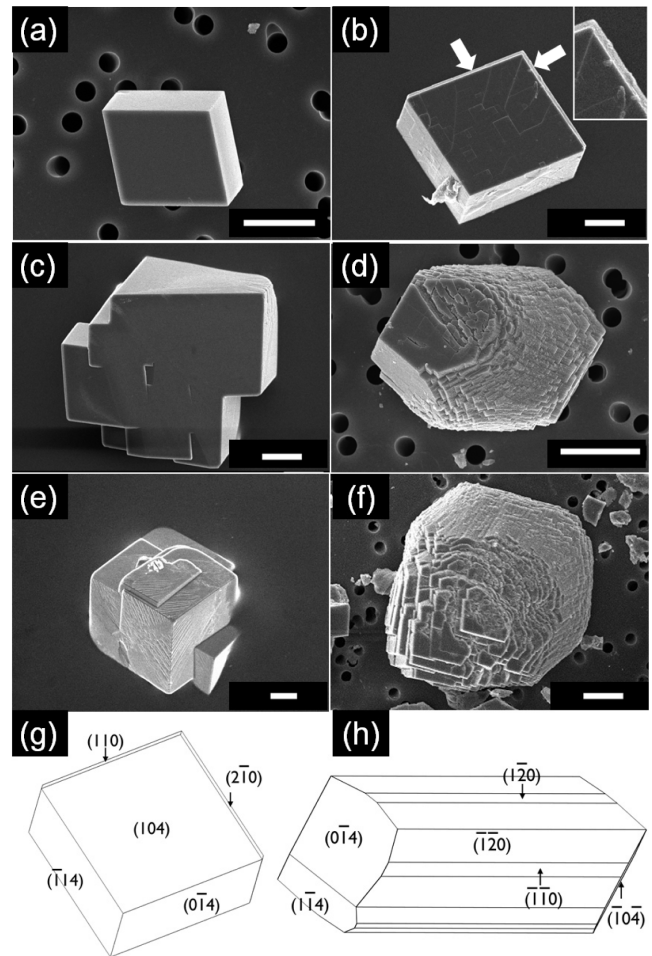


Figure 3. SEM images of the calcite crystals formed with: (a) no additive; (b) Mg ions; (c) $0.1 \mu M$ PAA; (d) Mg ions and $0.1 \mu M$ PAA; (e) $0.1 \mu M$ PMAA; (f) Mg ions and $0.1 \mu M$ PMAA. All scale bars are equal to $10 \mu m$. Morphology simulation results for the cases of (b) and (d) are shown in (g) and (h), respectively.

수 있었다. 결국, 카복실기를 지니는 PAA와 PMAA가 카복실기가 풍부한 Asprich 단백질의 결정화 제어기능을 유사하게 지니는 것으로 미루어, 카복실기가 핵심 작용기인 것으로 결론내릴 수 있었다. 또한 PAA와 PMAA를 첨가한 후 $\{hk0\}$ 면의 크기가 증가하는 것으로 보아, PAA와 PMAA는 $\{104\}$ 면에 비해 $\{hk0\}$ 면에 상대적으로 강한 결합을 하는 것으로 보인다.

Figure 4에는 대조군으로 이용한 PEI와 PNiPAAm를 첨가제로 이용한 calcite 결정화 결과를 보였다. PEI를 첨가하였을 때 Figure 4(a)에 보이는 것처럼 calcite의 표면이 다소 불균일하게 형성되었지만, 전체적인 rhombohedral 형태는 그대로 유지되었다. PEI와 마그네슘이 공존할 때도 Figure 4(b)에 보인 대로, 마그네슘만 첨가하였을 때의 Figure 3(b)와 거의 유사한 결정 형태가 유지되었다. PNiPAAm을 첨가하였을 경

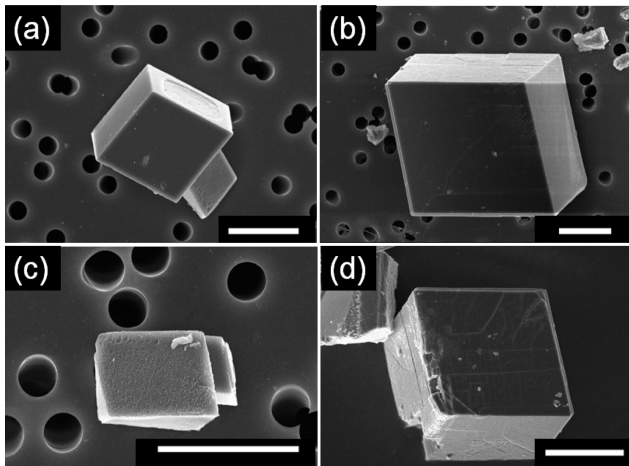


Figure 4. SEM images of the calcite crystals formed with: (a) 0.1 μM PEI; (b) Mg ions and 0.1 μM PEI; (c) 0.1 μM PNiPAAm; (d) Mg ions and 0.1 μM PNiPAAm. All scale bars are equal to 10 μm .

우에도 PEI를 넣어주었을 때와 정성적으로 비슷한 양상을 보였다. 표면의 불균일성이 PNiPAAm의 경우에 비해 상대적으로 증가한 것은 사용한 분자량이 19000~30000로서 PEI의 1300에 비해 크기 때문으로 추정된다. 결국, PEI와 PNiPAAm의 경우에는 calcite 결정과의 상호작용은 존재하지만 특정 결정면에 대한 선택성이 없기 때문에, calcite의 전체적인 결정 형태에 미치는 영향이 PAA와 PMAA에 비해 미미한 것으로 판단할 수 있다.

결정면의 분자 배열 분석. 카복실기를 지니는 PAA와 PMAA가 calcite의 특징한 결정면과 선택적인 결합을 하여 결정 형태에 영향을 주는 이유는 Asprich 단백질의 결정면 제어 능력과 동일하게 설명할 수 있다.⁷ Figure 5는 calcite의 (104) 면과 {hk0} 면의 대표적인 (110) 면의 분자 배열을 나타낸 것이다. Calcite의 결정구조에서 칼슘은 6개의 산소와 인접하여 있는데, 표면의 칼슘은 (104) 면에서는 5개의 산소 그

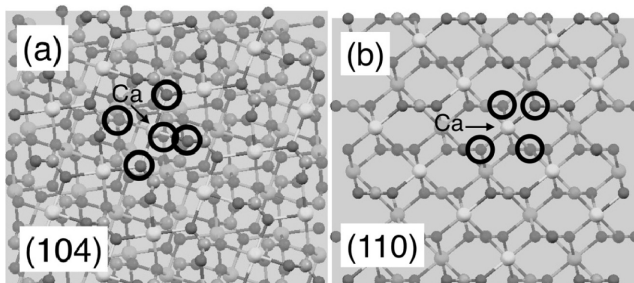


Figure 5. Molecular models of calcite: (a) one calcium on the (104) surface surrounded by five oxygens; (b) one calcium on (110) surrounded by four oxygens. Oxygens were marked by black circles. Similar models were also shown in reference 7.

리고 (110) 면에서는 4개의 산소와 인접하여 있음을 알 수 있다. 이러한 구조적 차이는 일반적인 결정화 조건에서 calcite 결정의 표면이 모두 {104} 면을 지니는 것과도 관계가 있다. 결국, 전하의 균형이 상대적으로 맞지 않는 {hk0} 면들은 음이온성 고분자들이 선택적으로 흡착할 수 있는 기회를 제공하게 되며, 이러한 선택적 흡착은 마그네슘이 존재하여 {hk0} 면이 국소적으로 발현되는 조건에서 결정화에 대한 영향이 극대화되는 것으로 판단할 수 있다.

한편, Hartman과 Perdok의 calcite에 대한 주기적 결합 사슬 모델(periodic bond chain model) 분석에서는 {104} 면은 평평한 특성이 강한 반면에 {110}과 {120} 면은 계단이나 kink를 형성하는 특성을 지니고 있음을 보였는데,²³⁻²⁵ Figure 3에 제시한 본 연구의 결정형태에서도 이러한 특성이 관측되었다.

고분자의 농도에 따른 변화. 본 연구에서는 고분자의 농도를 0.1, 1, 10 μM 로 변화시켜 calcite 결정화에 미치는 영향을 살펴보았다. 이미 Figure 3과 4에서 보인 결과는 고분자의 농도가 0.1 μM 일 때인데, 마그네슘과 PAA/PMAA의 협동 작용에 의해서 {104}로 둘러싸인 calcite의 전형적인 rhombohedral 결정형태가 새로운 {hk0}면의 발현으로 변화하는 것을 확인하였다. 하지만, 0.1 μM 의 농도에서는 Figure 6(a)와 (b)에 나타난 것처럼, rhombohedral 결정 형태도 동시에 부분적으로

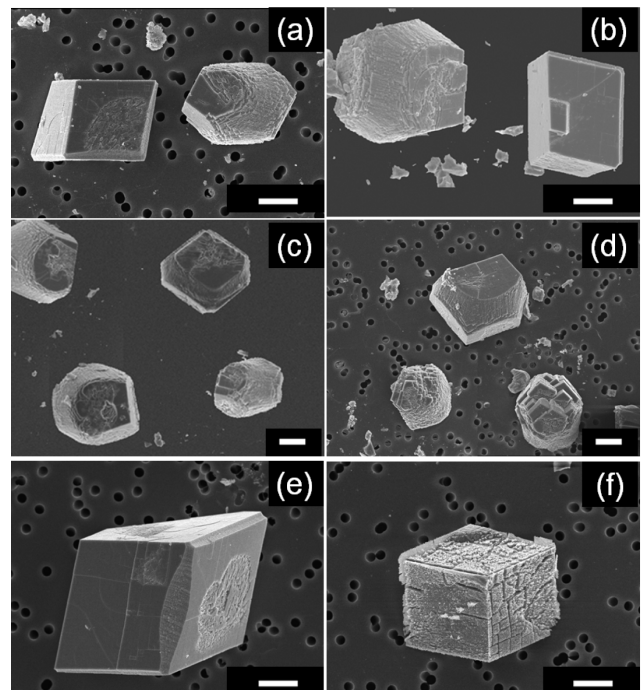


Figure 6. SEM images of the calcite crystals formed with Mg ions and: (a) 0.1 μM PAA; (b) 0.1 μM PMAA; (c) 1 μM PAA; (d) 1 μM PMAA; (e) 1 μM PEI; (f) 1 μM PNiPAAm. All scale bars are equal to 10 μm .

관측되는 것으로 보아, 전체 결정화도에 비해 첨가된 고분자의 양이 부족한 것으로 판단할 수 있다. PAA와 PMAA의 농도를 1 μM 로 10배 증가시켰을 때는, Figure 6(c)와 (d)에 보인 것처럼 calcite의 rhombohedral 결정이 완전히 사라지고 새로운 형태의 결정만 관측되었다. 한편, PEI와 PNiPAAm의 농도가 1 μM 로 증가되었을 때는 Figure 6(e)와 (f)에 보인 것처럼 결정면에 대한 작용이 증가하여 결정 표면의 불균일성이 Figure 4에 비해 더욱 증가하였으나, 역시 선택적 상호작용의 부재로 전체적인 rhombohedral 결정의 형태는 유지되는 것으로 보인다. 고분자의 농도를 10 μM 로 더욱 증가시켰을 때는, 결정이 고도로 응집되는 현상 때문에 결정면 분석이 불가능하여 따로 그림에 나타내지 않았다.

결 론

*Atrina rigida*의 Asprich 단백질은 소량의 마그네슘이 존재할 때, calcite 결정의 {hk0} 면을 발현시켜 결정 형태를 크게 변화시키는 것으로 알려져 있다.⁷ 본 연구에서는 카르복실산이 있는 PAA와 PMAA를 이용하여 이러한 Asprich 단백질의 작용을 재현하는데 성공하였다. 또한 대조군으로 카르복실산이 없는 PEI와 PNiPAAm을 이용한 경우에는 비선택적인 흡착의 효과는 관측되었으나, 마그네슘과 고분자의 협동 작용에 따른 {hk0} 면의 지배적인 발현이 나타나지는 않는 것을 확인하였다. 이러한 마그네슘과 고분자의 협동 작용은 Asprich 단백질의 경우에서와 마찬가지로, (i) 마그네슘에 의한 {hk0} 면의 국소적인 안정화, (ii) 안정화된 {hk0} 면의 전하 불균형에 따른 음이온성 고분자의 선택적인 흡착, (iii) 음이온성 고분자의 흡착에 따른 {hk0} 면의 지배적인 발현에 따른 것으로 설명할 수 있었다.

감사의 글: 이 논문은 2016년도 정부(교육부)의재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2015R1D1A1A01058116).

참 고 문 헌

1. H. A. Lowenstam and S. Weiner, *On Biomineralization*, Oxford University Press, New York, 1989.
2. N. Watabe, *J. Ultrastruct. Res.*, **12**, 351 (1965).
3. F. Nudelman, H. H. Chen, H. A. Goldberg, S. Weiner, and L. Addadi, *Faraday Discuss.*, **136**, 9 (2007).
4. B.-A. Gotliv, N. Kessler, J. L. Sumerel, D. E. Morse, N. Tuross, L. Addadi, and S. Weiner, *Chem. Bio. Chem.*, **6**, 304 (2005).
5. M. Ndao, E. Keene, F. F. Amos, G. Rewari, C. B. Ponce, L. Estroff, and J. S. Evans, *Biomacromolecules*, **11**, 2539 (2010).
6. I. W. Kim, J. L. Giocondi, C. Orme, S. Collino, and J. S. Evans, *Cryst. Growth Des.*, **8**, 1154 (2008).
7. I. W. Kim, S. Collino, and J. S. Evans, *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 3949 (2012).
8. Y.-J. Han and J. Aizenberg, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4032 (2003).
9. Y. Nishino, Y. Oaki, and H. Imai, *Cryst. Growth Des.*, **9**, 223 (2009).
10. E. Loste, R. M. Wilson, R. Seshadri, and F. C. Meldrum, *J. Cryst. Growth*, **254**, 206 (2003).
11. A. Katz, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **37**, 1663 (1973).
12. R. A. Berner, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **39**, 489 (1975).
13. G. Falini, M. Gazzano, and A. Ripamonti, *J. Cryst. Growth*, **137**, 577 (1994).
14. F. C. Meldrum and S. T. Hyde, *J. Cryst. Growth*, **231**, 544 (2001).
15. A. Sugawara and T. Kato, *Compos. Interface*, **11**, 287 (2004).
16. A. Kotachi, T. Miura, and H. Imai, *Chem. Mater.*, **16**, 3191 (2004).
17. T. Miura, A. Kotachi, Y. Oaki, and H. Imai, *Cryst. Growth Des.*, **6**, 612 (2006).
18. R. K. Pai and S. Pillai, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 13074 (2008).
19. D. L. Graf, *Am. Mineral.*, **46**, 1283 (1961).
20. B. D. Cullity and S. R. Stock, *X-ray Diffraction*, Prentice Hall, New Jersey, 2001.
21. S. Jung and I. W. Kim, *Polym. Korea*, **37**, 663 (2013).
22. S. Collino, I. W. Kim, and J. S. Evans, *Cryst. Growth Des.*, **6**, 839 (2006).
23. P. Hartman and W. G. Perdok, *Acta Crystallogr.*, **8**, 49 (1955).
24. W. M. M. Heijnen, *N. Jb. Miner. Mh.*, **8**, 357 (1985).
25. D. Aquilano, M. Calleri, E. Natoli, M. Rubbo, and G. Sgualdino, *Mater. Chem. Phys.*, **66**, 159 (2000).