

프로테아제 처리가 모발의 염색성 및 형태적 특성에 미치는 영향

김홍희 · 권태종[†]

건국대학교 공과대학 미생물공학과

Effect of Protease on the Morphological Properties and Dyeability of Human Hair

Hong-Hee Kim and Tae-Jong Kwon[†]

Dept. of microbiological Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

(Received: March 24, 2008/Revised: April 14, 2008/Accepted: April 22, 2008)

Abstract— The tannin acid and the enzymes have been used in order to improve the ruggedness in laundry and the absorption of dyes and pigments in the textile industry for several years. The enzyme processing on the protein fiber minimizes the damage of the entire fiber and improves the dyeability by effectively modifying only the hydrophobic surface. This study tried out the structural observation by applying the *Castanea crenata sieb. et. zucc.* containing abundant tannin to the hair dyeing as the natural dyeing pigment along with Protease of *Rhizopus sp.* The dyeability was improved as compared to the dyeing using only the synthetic tanning and iron mordant. When the depth of pigment was higher in accordance with the surface observation, the enzyme dissolution had impact on dyeing and so the keratin layer on the hair surface. Accordingly, it was found that the appropriate depth was between 0.01 and 0.03%. It was estimated that 0.1% protease would treated within 30min. Consequently, it would cause the good reaction with the functional group of tannin pigment.

Keywords: tannic acid, protease, natural hair dye, amino acid

1. 서 론

모발염색은 노화현상으로 생성된 흰머리를 감추거나 적극적인 패션의 수단으로 현대인에게 널리 이용되어지고 있다. 하지만 반복적인 시술에 의한 합성염모제사용은 두피와 모발의 손상을 주는 문제점들이 제기되고, 친환경적이고 건강을 중시하는 소비자 트렌드의 반영으로 천연재료를 이용한 제품개발이 전반적인 뷰티산업과 모발염색 시장에 영향을 주고 있다. 모발염색에도 천연소재를 이용한 헤나염모제, 오징어 먹물, 녹차 등 다양한 제품들이 출시되고 있지만 염색성과 견뢰성을 높이기 위해 금속매염제의 과다사용으로 인한 문제점들이 발생할 수 있다. 천연염료의 사용뿐만 아니라 금속매염제를 대체할 수 있는 소재의 개발

이 필요한 시점에서 효소는 생화학적 고분자촉매로서 상온, 상압 및 중성의 온화한 조건에서 최적의 작용이 이루어지는 이점으로 인해 최근 에너지 절약, 공해문제 및 기질보호 등의 측면에서 효소의 이용이 실용화되고 있어¹⁾ 모발염색 적용 가능성을 높여준다. 효소는 수년간 텍스타일 산업에 이용되고 있다²⁾. 아밀라제는 호발 (desizing)에 사용되며, 셀룰라아제는 데님 마무리와 셀룰로오스 섬유 의 생물 광택내기 (bio-polishing)에 사용되었다. 프로테아제는 가죽, 실크 및 양모의 가공에 사용되며, 펙티나제, 리파제 및 디아스테라제는 면직물의 생물 제작 (bio-preparation)에 사용되었다³⁻⁵⁾. 모직물의 방축가공을 목적으로 시도된 효소의 이용은 scale제거를 위한 염소처리, 산화제처리 등으로 인해 황변 및 축감불량 등의 문제점을 보완하는 방법으로

[†]Corresponding author. Tel.: +82-2-450-3517; Fax.: +82-2-3437-8360; e-mail: hheek2325@hanmail.net

Middlebrook 등은 비교적 온건한 조건에서 단백질 분해효소인 Trypsin이나 Papain으로 양모를 처리하여 방축성을 부여하였다⁶⁾. Padma 등은 면과 실크에 금속매염제 대신 사상균의 효소인 아밀라제 (*Aspergillus niger*), 프로테아제 (*Aspergillus oryzae*) 및 리파제 (*A. niger*)를 이용하였고 또한 탄닌산을 효소와 함께 사용하여 염료흡수와 세탁 견뢰성의 현저한 개선을 관찰하였다⁷⁾. 본 연구는 천연모발염색제의 기초연구로서 프로테아제 (*Rhizopus* sp.)와 Tannic acid염료의 상호작용으로 인한 모발의 염색성 및 형태적 특성 변화를 관찰하여 모발염색에서의 효소사용 가능성을 알아보고자 하였다.

2. 실험

2.1 실험 재료

본 실험에 사용된 모발시료 채취는 약물복용, 흡연, 화학적 시술여부 등 외부환경 조건에 적합한 21세의 건강한 여대생 모발을 채취하여 모발 끝 쪽 손상부위를 시료길이 10 cm로 맞추어 가위로 잘라내고 hair tress 무게 1g씩 나누어 윗부분을 실리콘 처리하였다. 모발시료에 Wella제품의 탈색제 파우더와 9% hydrogen peroxide을 1:2로 혼합하여 일반적인 염색방법으로 도포하고 30분간 자연방치한 후 수세하여 사용하였다. 본 연구에 사용한 실험 재료는 Table 1과 같다.

2.2 실험 방법

2.2.1 프로테아제를 이용한 모발 염색

본 실험에서 사용한 모발염색은 염료로 5g의 밤외피 분말을 100ml 증류수에 혼합하여 2 μ m여과지로 여과시킨 용액을 Tannic acid염료로 사용하였고, 각 실험에 사용된 염료의 양은 10ml씩 동일 분량을 사용하였다.

Table 1. Specification of materials

Materials	weight	pH	concentration(%)	
Dyestuff	^a Tannic acid dyestuff	g/ml	4.9	5%
	^b TA	g/ml	4.1	10%
Mordants	FeCl ₃	g/ml	2.4	0.1%
	^c TFC	g/ml	3.5	5%
Enzyme	Protease	0.51 units/mg	7.2	0.01%~0.1%

^aTannic acid dyestuff ; 5% solution of *Castanea crenata* sieb. et. zucc.

^bTA; Tannic acid(gallotannin, Sigma)

^cTFC; Solution of Tannic acid and FeCl₃

Tannic acid와 FeCl₃혼합용액 (이하 TFC용액으로 약칭)은 100ml 증류수에 10g의 Tannic acid (gallotannin, Sigma)와 1g의 FeCl₃을 혼합한 용액을 금속매염제 대체로 사용하였다. 프로테아제는 100ml 증류수에 0.1g 혼합하고 약 35 $^{\circ}$ C에서 일정시간 pH 7.2 완충용액 (KH₂PO₄/NaOH)로 보정한 후 사용하였다.

2.2.2 모발표면 색상 값

분광광도계 (X-rite SP60 sphere spectrophotometer, Japan)를 이용하여 표면색상 값의 CIELAB 명도지수인 L*, 색좌표 지수인 a*, b*값을 구하였다.

2.2.3 모발의 물리적 특성

모발에 가해지는 힘과 변형과의 관계로부터 유도되는 성질의 변화를 알아보기 위하여 Insteron사 (USA)의 4302 기기를 이용하여 모발 시료당 10회 인장강도 및 탄력성을 측정하여 평균값을 처리하였다.

2.2.4 모발 표면 관찰

모발 시료를 각각 1cm 크기로 채취하여, 알루미늄 stub위에 carbon tape으로 부착시키고, Pt-Pd로 이온증착 시킨 (Hitachi E-1030, Japan)후 주사전자현미경 (Hitachi S-4700, Japan)상에서 가속전압 15kV로 관찰하였다.

2.2.5 모발단백질의 아미노산 함량 측정

시료 0.5g을 18ml test tube에 칭량하여 6 N HCl 3ml를 가한다음 진공펌프를 이용하여 test tube를 sealing하였다. Sealing한 test tube는 110 $^{\circ}$ C로 setting된 heating block에 24시간동안 가수분해시켰다. 가수분해가 끝난 시료는 50 $^{\circ}$ C, 40 psi의 rotary evaporator로 산을 제거한 후 Sodium loading buffer로 10ml 정용한 다음, 이중 1ml를 취하여 membrane filter 0.2 μ m로 여과하여 아미노산분석기 (S433-H)로 정량 분석하였다.

Table 2. Enzymatic treatment conditions for processing

Processing	Treatment time (min)	Enzyme conc.(g/ ℓ)	pH	Temperature(°C)
Simultaneous-treatment	60	0.01	7.2	35
Pre-treatment	10	0.01	7.2	35

3. 결과 및 고찰

3.1 모발의 염색성

효소와 Tannic acid 염료로 염색한 모발의 색상 값과 효소를 처리하지 않고 TFC 용액으로 염색한 모발과의 색상 값을 비교한 결과 Fig. 1과 같이 나타났다. 효소처리모발에 비해 효소처리 모발에서 L* 값이 상대적으로 낮아져 염색성이 우수한 것으로 나타났고, *Rhizopus* sp. 프로테아제 처리 모발의 L* 값이 가장 낮았다. 특징적인 것은 3가지 효소처리모발의 b* (yellowness) 값이 모두 효소처리모발에 비해 현저하게 낮아졌다. 이러한 결과는 색상에서 노랑기미가 제거되었음을 짐작하게 하고 효소가 모피질층 비결정영역의 멜라닌세포에 관여함을 간접적으로 추측할 수 있다. 따라서 동양인의 모발 탈색과정에서 나타나는 붉은 색소와 주황 또는 노랑기미의 색소를 제거하기 위해 보색을 사용하는 대신 효소를 응용할 수 있을 것으로 기대된다. Tannic acid 염료와 효소간의 흡착 기구를 Fig. 2와 같이 제안할 수 있다. 효소의 작용은 모표피층의 케라틴을 유연하게하고 팽윤시켜 염료반응 작용기를 증가시켜 Tannic acid 염료의 모발표면 흡착을 용이하게 한 것으로 사료된다. 또한 효소처리 모발의 경우 b* 값뿐만 아니라 a* 값도 0에 가까워짐으로써 무채색에 가까운 색상을 나타내고 있음을 알 수 있다.

3.2 모발의 물리적 특성

Fig. 3은 정상모발, 1회 탈색모발, Tannic acid 염료와 TFC 용액으로 염색한 모발, Tannic acid 염료와 프로테아제 (*Rhizopus* sp.) 처리 염색모발의 인장강도를 나타낸 것이다. 정상모발에 비해 1회 탈색한 모발의 인장강도는 6.6% 감소하였다. 1회 탈색한 모발에 Tannic acid 염료와 TFC 용액으로 염색한 모발의 인장강도는 0.109kgf로 20% 감소하였다. Tannic acid 염료와 0.1% 프로테아제 (*Rhizopus* sp.) 를 동시에 혼합하여 염색하였을 때 인장강도는 5% 감소한 것으로 가장 정상모발에 가깝게 나타났다. Cookson 등은 양모섬유와 같은 단백질 섬유에 있어서의 화학결합 중 인장강도에 더욱 영향을 미치는 것은 이황화물 결합 보다 펩티드 결합이라고 보

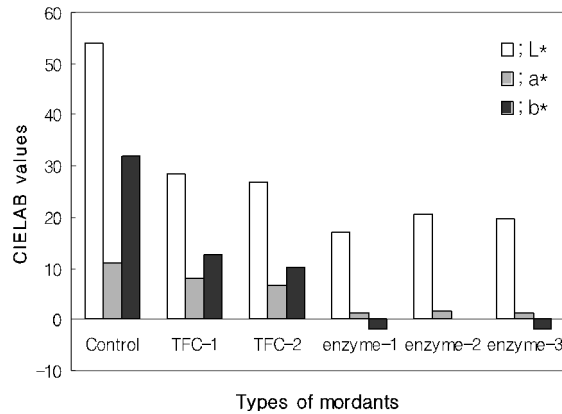


Fig. 1. Color properties of dyed hair with TFC solution and Enzyme. TFC-1; 5% solution of tannic acid and FeCl₃, TFC-2; 10% solution of tannic acid and FeCl₃, Enzyme-1; 0.01% protease of *Rhizopus* sp., Enzyme-2; 0.01% collagenase of *Clostridium histolyticum*, Enzyme-3; 0.01% protease of *Bacillus* sp.

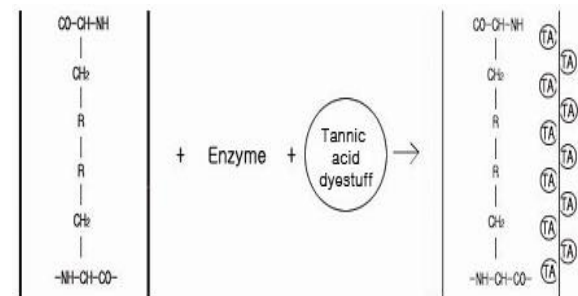


Fig. 2. Hair dyeing formation enzyme and tannic acid.

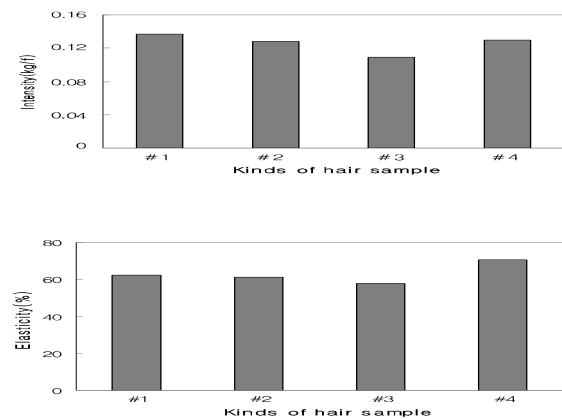


Fig. 3. Intensity of hair dyed with various dyestuffs. #1; virgin hair, #2; the 1st bleached hair, #3; Tannic acid dyestuff with TFC solution, #4; Tannic acid dyestuff with TFC solution and protease.

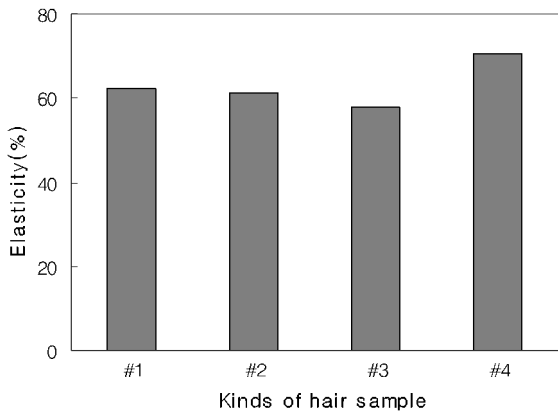


Fig. 4. Elasticity of hair dyed with various dyestuffs. #1; virgin hair, #2; the 1st bleached hair, #3; Tannic acid dyestuff with TFC mordant, #4; Tannic acid dyestuff with TFC mordant and protease.

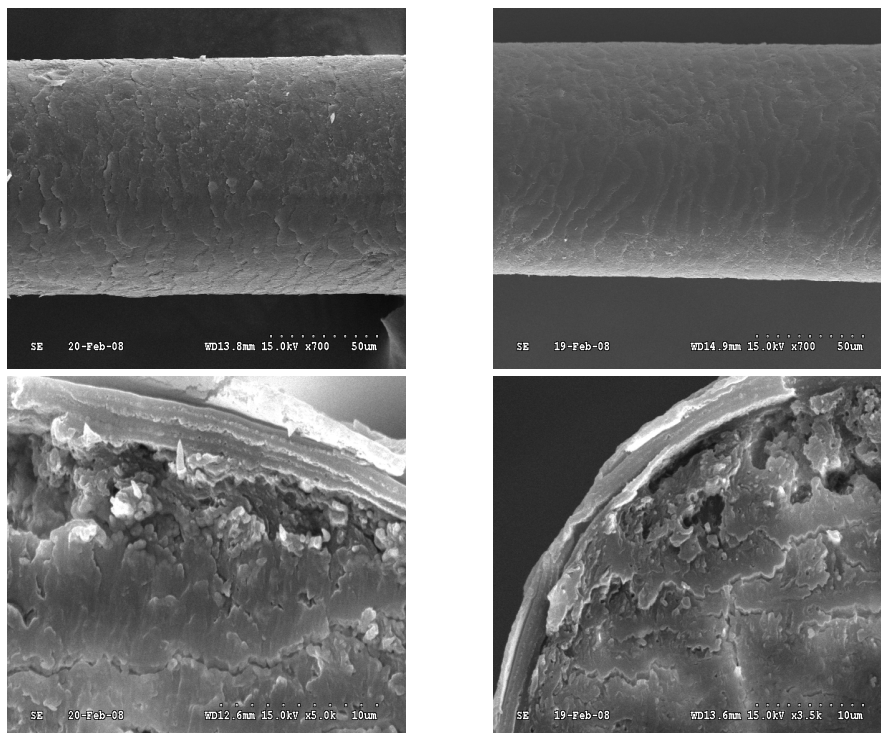
고하였다⁸⁾. 모발의 탄력성은 정상모발에 비해 1회 탈색한 모발과 Tannic acid염료와 TFC용액으로 염색한 모발은 각각 1.6%와 6.9% 감소하였고, 프로테아제를 처리한 모발은 13% 증가하였다(Fig. 4). 본 실험에서도 프로테아제의 작용이 펩티드 결합에 관여함으로써 단단해진 모발의 구조가 유연해져 인장강도가 회복된 것으로 보이고 프로테아제와 Tannic acid간의 양호한 상호작용이 있는 것으로 판단된다.

3.3 모발 표면 관찰

3.3.1 프로테아제처리 방법에 따른 모발표면 관찰

프로테아제 (*Rhizopus sp.*)를 이용한 모발염색의 형태적 관찰을 위한 실험방법은 Padma⁷⁾의 방법을 일반적인 모발염색방법에 적용시켜 Tannic acid염료와 프로테아제를 동시에 혼합하여 모발에 도포하는 염색과 모발에 먼저 프로테아제를 10분간 처리한 후 Tannic acid염료를 도포하는 염색을 실험하여 프로테아제 처리 시 나타나는 형태적 관찰을 비교하였다. 프로테아제처리 방법에 따른 모발표면 관찰 결과 Fig. 5와 같이 나타났다.

Fig. 5의 (a)사진은 0.1% 농도의 프로테아제를 Tannic acid염료와 동시에 염색한 모발의 표면 관찰로 프로테아제와 Tannic acid염료의 반응이 동시에 일어나 모발표피층이 프로테아제의 케라틴 분해 작용이 간접적인 영향을 받은 것으로 나타났다. Fig. 5의 (b)사진은 0.1% 프로테아제를 10분간 처리하여 Tannic acid염료로 염색한 모발의 형태적 관찰로 프로테아제의 직접적인 케라틴 분해 작용의 영향을 받아 모표피층이 녹아 층간 경계 면이 없어진 것으로 관찰되었다. 0.1% 농도를 60분간 염색한 모발은 동시효소처리법과 선행효소처리법



(a) 0.1% protease simultaneous treatment (b) 0.1% protease pre-treatment

Fig. 5. Surface and cross section of protease treated hair.

모두 모표피의 최외각층을 손상 시키는 것으로 확인되어 적정농도와 염색시간이 필요하다.

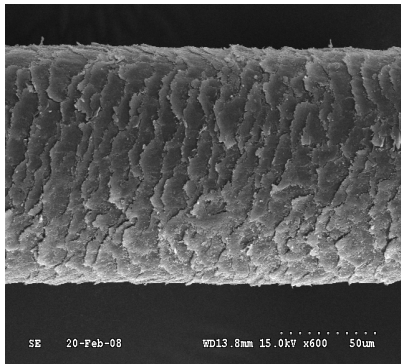
3.3.2 프로테아제처리 농도에 따른 모발표면 관찰

프로테아제 (*Rhizopus sp.*)를 0.01%에서 0.1%까지 농도 변화에 따른 표면관찰 사진은 Fig. 6과 같이 나타났다. 0.01%와 0.03% 농도의 프로테아제를 처리한 모발표면은 모표피의 비늘 층 끝 쪽 부위가 대부분 들떠 있는 상태로 보였고, 0.05%에서 0.08% 까지 농도를 높였을 때 모발표면은 모표피의 비늘 층 끝 쪽 부위가 탈락되어 비늘층간 거리가 줄어들었다. 0.1%의 농도일 때의 모발표면 사진은 모표피의 케라틴이 프로테아제의 분해 작용으로 인해

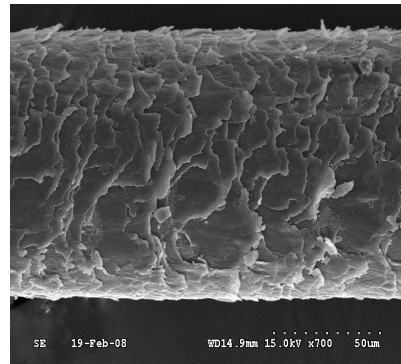
녹아내려 비늘 층의 경계가 흐릿한 것으로 관찰되었다. 본 실험에서 모발염색시간이 60분간일 경우, 프로테아제의 적정농도는 0.01%에서 0.03% 사이인 것으로 나타났다.

3.3.3 시간경과에 따른 모발표면 관찰

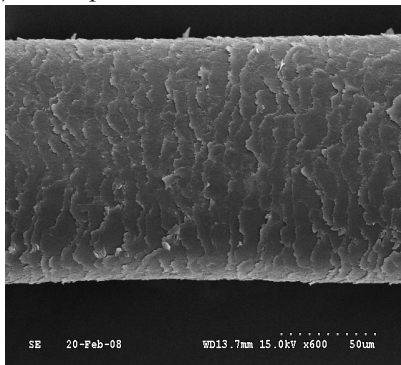
Fig. 6에서 살펴본 것과 같이 0.1% 농도로 60분간 Tannic acid염료와 동시에 염색했을 경우 모표피 비늘 층이 효소의 분해 작용을 받아 층간 구분이 어려웠다. 같은 농도의 프로테아제를 시간대별로 모표피층이 분해되어지는 현상을 관찰한 결과를 살펴보면 다음과 같다(Fig. 7). 시간 10분이 경과 되면서 프로테아제의 작용을 받아 모표피 비늘



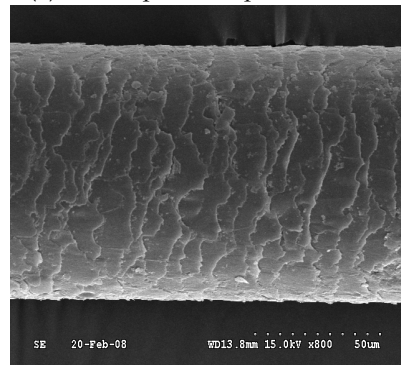
(a) 0.01% protease simultaneous treatment



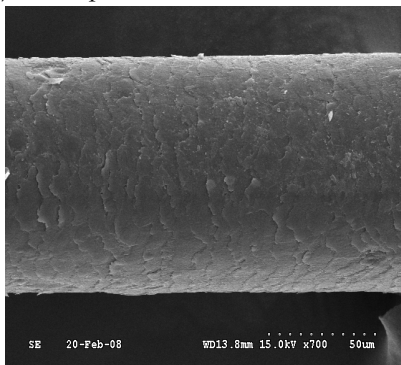
(b) 0.03% protease pre-treatment



(c) 0.05% protease simultaneous treatment



(d) 0.08% protease simultaneous treatment



(e) 0.1% protease simultaneous treatment

Fig. 6. Surface of protease treated hair at various protease concentration for 60min.

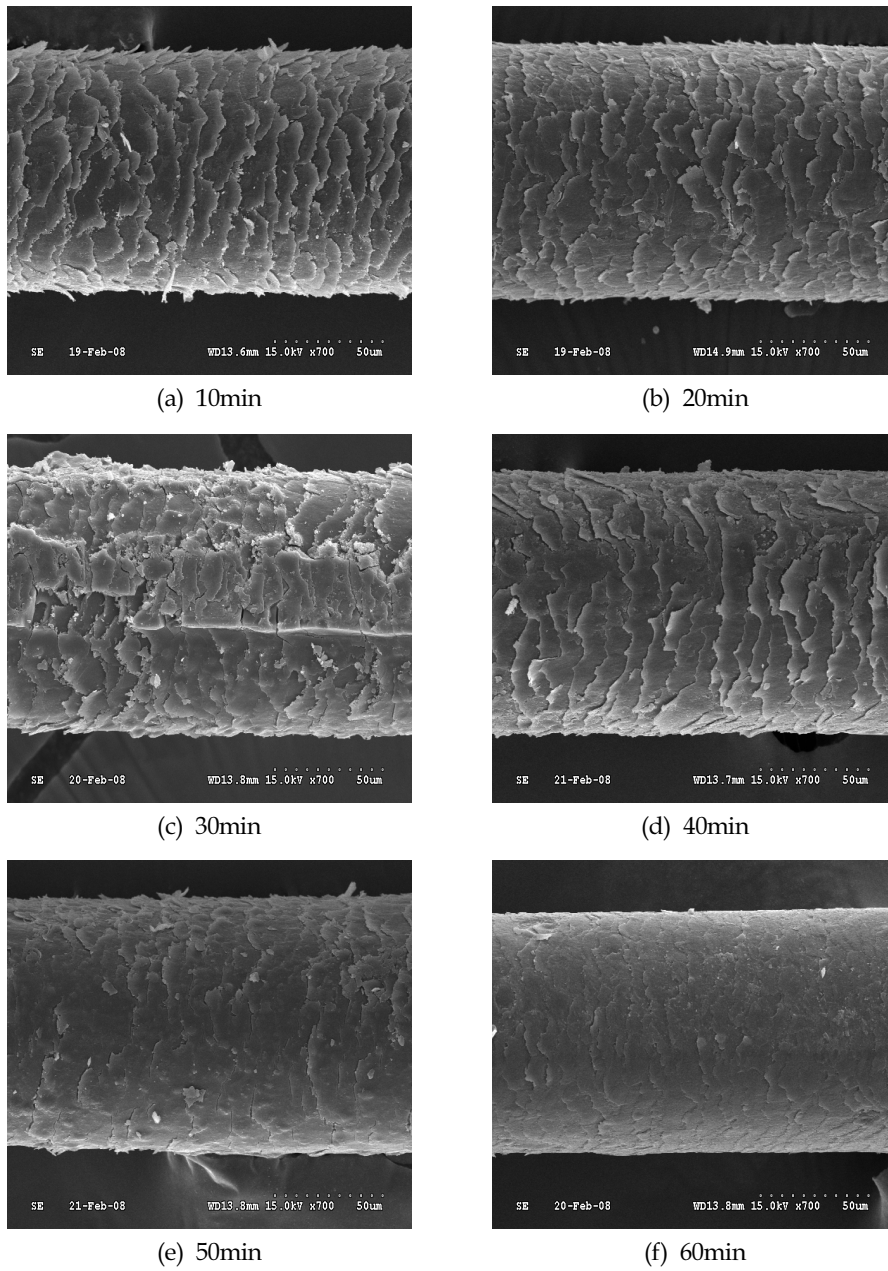


Fig. 7. Surface of protease treated hair at various treatment time(0.1% protease).

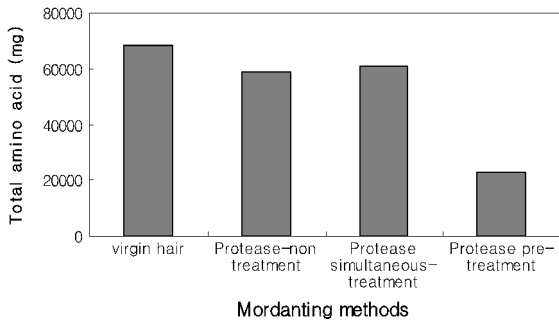


Fig. 8. Total quantity of amino acid ingredients according to mordanting methods.

층 끝 쪽 부분이 들뜨는 것으로 시작해서 30분이 경과될 때 최외각 층의 케라틴이 부서지는 현상이 관찰되었다. 40분이 경과되면서 30분 경과될 때 부서지는 케라틴 조각의 탈착으로 많이 안정화 되었지만 50분이 경과되면서 케라틴 끝 쪽 부분의 탈락현상이 나타났다. 그리고 60분이 되었을 때 모표피층간 경계가 흐릿해진 결과를 나타내어 프로테아제에 의한 모발손상을 알 수 있었다. 본 실험을 통해서 염색시간이 60분일 경우 프로테아제의 적정농도가 0.01에서 0.03%이고, 농도를

높여 0.1%로 처리할 경우에는 염색시간을 30분 이하로 하는 것이 프로테아제의 반응을 최적화 하는 것으로 보였다.

3.4 염색 모발의 아미노산 성분 분석

프로테아제와 Tannic acid염료를 동시에 처리했을 때 serine, glutamic acid, proline, cystine, tyrosine, phenylalanine, histidine, lysine, arginine의 성분함량이 프로테아제를 처리하지 않고 Tannic acid염료와 TFC용액으로만 염색한 모발에 비해 높게 나타났다. 특히 serine과 cystine에서 정상모발과 비슷한 함량수치를 나타내었고 threonine, glutamic acid, valine, lysine, arginine은 정상모발의 아미노산 수치에 비해 많이 감소하였다. 정상모발에 비해 프로테아제를 처리하지 않고 Tannic acid염료와 TFC용액으로 염색한 모발은 전체 아미노산 함량이 14.42% 감소하였고, 프로테아제를 Tannic acid염료와 동시에 염색한 모발은 11.05% 감소하였으며, 프로테아제를 10분간 먼저 처리한 후 Tannic acid염료로 염색한 모발은 66.59%나 감소한 것으로 나타났다. 따라서 프로테아제와 Tannic acid염료를 동시에 염색한 모발에서 전체아미노산의 함량이 가장 적게 감소하였다.

4. 결 론

프로테아제처리가 모발의 염색성 및 형태적 특성에 미치는 영향에 대한 고찰 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 프로테아제를 처리한 모발의 염색 결과 전체 명도 값이 감소하여 Tannic acid염료와 TFC용액으로만 염색한 모발에 비해 염색성 개선효과를 나타내었다. L*값뿐만 아니라 a*와 b*값이 많이 감소하여 모발염색에서 보색으로 프로테아제의 활용이 가능할 것으로 기대된다.
2. 프로테아제의 작용이 모발의 펩티드 결합에 관여함으로써 모발의 구조를 유연하게 하여 인장강도와 탄력성이 높아졌다.
3. 프로테아제를 이용한 모발염색방법으로는 Tannic acid염료와 동시에 처리했을 때 모표피층의 최소손상과 전체아미노산의 함량이 적게 감소하였다.

4. 프로테아제를 0.01%에서 0.1%까지 농도변화를 주었을 때의 모발표면은 농도가 높아질수록 효소의 분해 작용의 영향을 많이 받아 케라틴층이 용해되었고, 0.1% 농도의 프로테아제를 처리할 때에는 시간을 단축시키면 모표피층의 소수성기만 팽윤시켜 Tannic acid염료의 작용기와 양호한 반응을 일으켜 염착성 향상을 기대할 수 있다.

참고문헌

1. C. A. Anderson, H. J. Katz, M. Lipson, and G. F. Wood, Stereoscan Microscopy of Chlorine/Resin-Treated Wool, *Textile Research Journal*, **40**, 29-34(1970).
2. E. Tsatsaroni and M. Liakopoulou-Kyriakides, Effects of enzymatic treatment on the dyeing of cotton and wool fibres with pigments, *Dyes and pigments*, **29**(3), 203-209(1995).
3. M. Liakopoulou-Kyriakides, E. Tsatsaroni, P. Laderos and Georgiadou, Dyeing of cotton and wool fibres with pigments from Crocus Sativus -effect of enzymatic treatment, *Dyes and pigments*, **36**(3), 215-221(1998).
4. S. M. Burkinshaw and B. bahojb-Allafan, The development of a metal free, tannic acid based after treatment for nylon 6,6 dyed with acid dyes-pat-1: different enzymes, *Dyes and pigments*, **58**, 205-218(2003).
5. S. M. Burkinshaw and B. bahojb-Allafan, The development of a metal free, tannic acid based after treatment for nylon 6,6 dyed with acid dyes-pat-3: different enzymes, *Dyes and pigments*, **60**, 91-102(2004).
6. W. R. Middlebrook and H. Phillips, The Application of Enzymes to the Production of Shrinkage-Resistant Wool, *JSDC*, **57**(5), 137(1941).
7. S. Padma, P. S. Vankar, R. Shanker and A. Verma, Enzymatic natural dyeing of cotton and silk fabrics without metal mordants, *Journal of Cleaner Production*, **15**, 1441-1450(2007).
8. P. Cookson and F. Harrigan, "Wool Dyeing", D. M. Lewis Edition, p. 275, 1992.