

게껍질로부터 CM-Chitin의 합성

안종일 · 김승환 · 유영진 · 박창호
임헌선* · 박찬구* · 박은경**

국립공업기술원
*(주) 금호화성 · **명지대학교

Synthesis of CM-Chitin from Crab Shells

Ahn, C.I. · Kim, S.H. · Yoo, Y.J. · Park, C.H.
Lim, H.S.* · Park, C.K.* · Park, E.K.**

National Industrial Technology Institute
*Kum Ho Chemicals Co. · **Myung-Ji University

(Received July. 22, 1993)

ABSTRACT

Chitin was isolated from crab shells by modified Hackman's method, which was treated again with aqueous sodium hydroxide solution to give alkali chitin(sodium alkoxide of chitin).

And after, the alkali chitin is allowed to react with monochloroacetic acid to synthesize 6-O-(carboxymethyl) chitin [CM-Chitin] under diminished pressure.

In order to synthesize high performance CM-Chitin as hygroscopic agent, it was measured that the yield and degree of substitution of each CM-Chitin according to molar ratio(monochloroacetic acid equivalent mol/N-acetyl-D-glucosamine residue) and their moisture-absorption and moisture-release properties were measured and compared with those of hyaluronic acid.

The moisture-absorption and moisture-release properties of CM-Chitin, especially 0.8 in degree of substitution, were found quite similar to those of hyaluronic acid.

The preliminary results show that CM-Chitin might be used as hygroscopic agent instead of hyaluronic acid in field of cosmetics.

I. 서 론

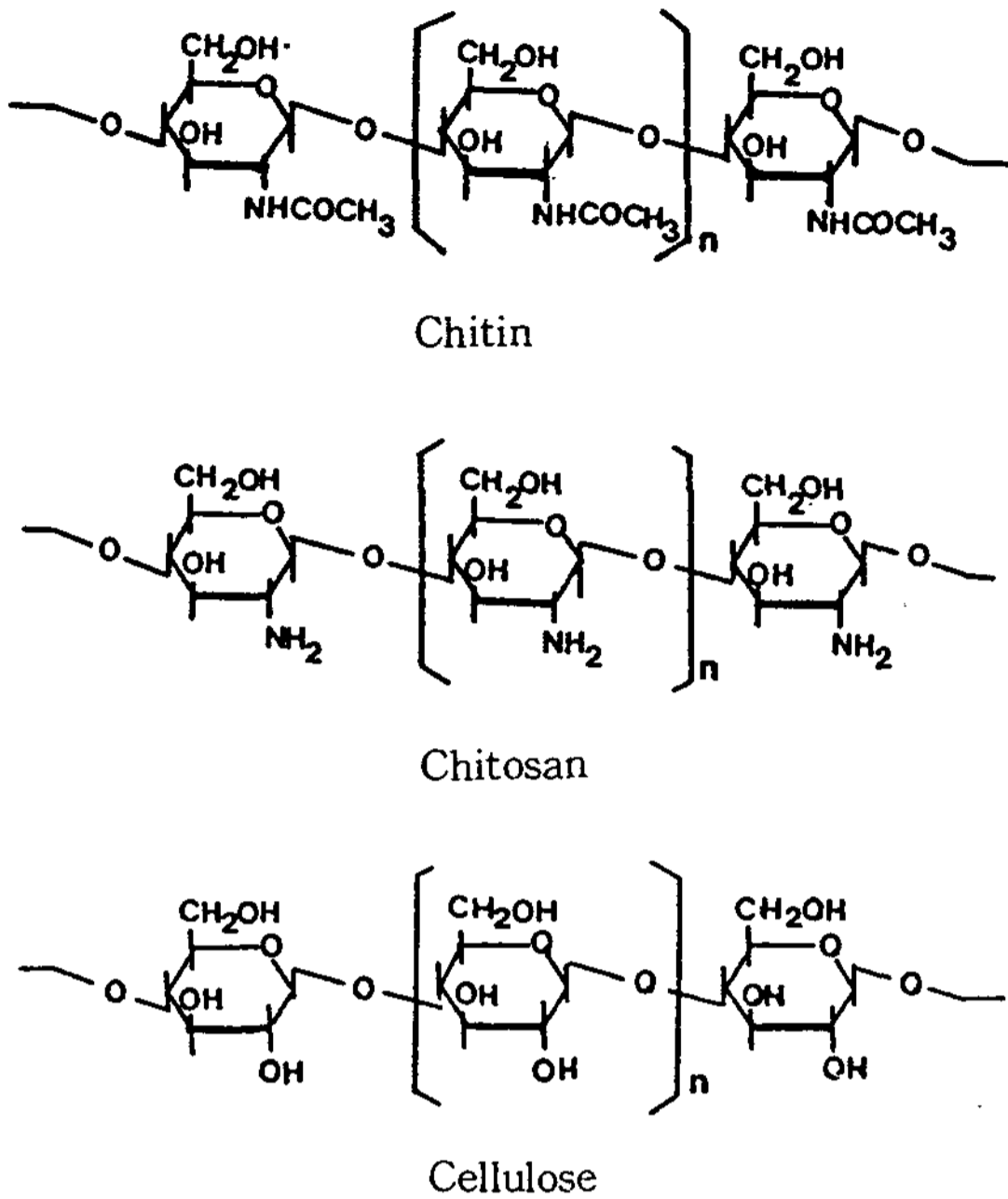
갑각류의 외피조직 성분으로 알려지는 chitin은 cellulose와 비슷한 화학구조를 갖고 천연에 널리 존재하며 생물에 의한 생산량이 연간 1,000억톤을 상회하는 biomass 자원이다.

Chitin은 amino 당으로 구성되어 있는 다당류의 일종으로서, 원료가 되는 게, 새우 등의 껍질에 붙어 있는 단백질이 부패하여 악취를 낼 뿐만아니라 그들

의 강한 수소결합으로 인하여 용해성이 좋지않아 산업 폐기물로 취급되어 왔으나 최근에는 그 폐기물들이 각 분야의 소재로 주목되게 이르러 폐기물 처리 문제와 자원 이용면에서 chitin에 대한 많은 연구가 진행 중에 있다.¹⁻⁵⁾

Chitin은 N-acetyl-D-glucosamine의 1, 4 결합에 의해 이루어진 다당류의 일종으로서 cellulose의 glucose잔기 중 C₂의 수산기가 acetamide group으로 치환된 구조를 가지고 있고, chitosan은 chitin의 탈아세틸화물으로써 C₂ 위치에 amino기가 결합된 구조

를 보인다(Scheme 1).



Scheme 1. Structure of Chitin, Chitosan and Cellulose.

Chitin 유도체는 수처리제, 기능성식품, 섬유처리제 및 토양개량제 등에 폭넓게 응용되고 있으며, 특히 chitosan은 반응성이 좋은 amino group을 가지고 있어 cellulose의 반응성에 amino group의 반응성이 부과된 화학반응에 의해 기능성 재료로서의 분자설계가 가능하여 봉합사, 인공신장 및 상처치료 촉진제 등 의료용 재료로서의 연구도 활발히 이루어지고 있다.^{6,7)}

현재 화장품의 흡·보습제로 사용되고 있는 hyaluronic acid(HA)는 동, 식물계에 널리 분포되어 있으나 그 양이 적고 고가인 문제점이 있어, 본 연구에서는 세정제, 화장품 등의 유화안정제, 보습제, 대전방지제로 사용되는 chitin의 유도체인 CM-Chitin을 합성하여 그들의 흡·보습력을 HA와 비교하여 그의 대체품으로서 가능성을 검토하였다.

II. 실험방법

1. 시약, 재료 및 분석기기

Chitin은 경북 울진근해에서 어획된 붉은게로부터 추출하여 사용 하였으며, 이때 탈단백 및 탈칼슘을

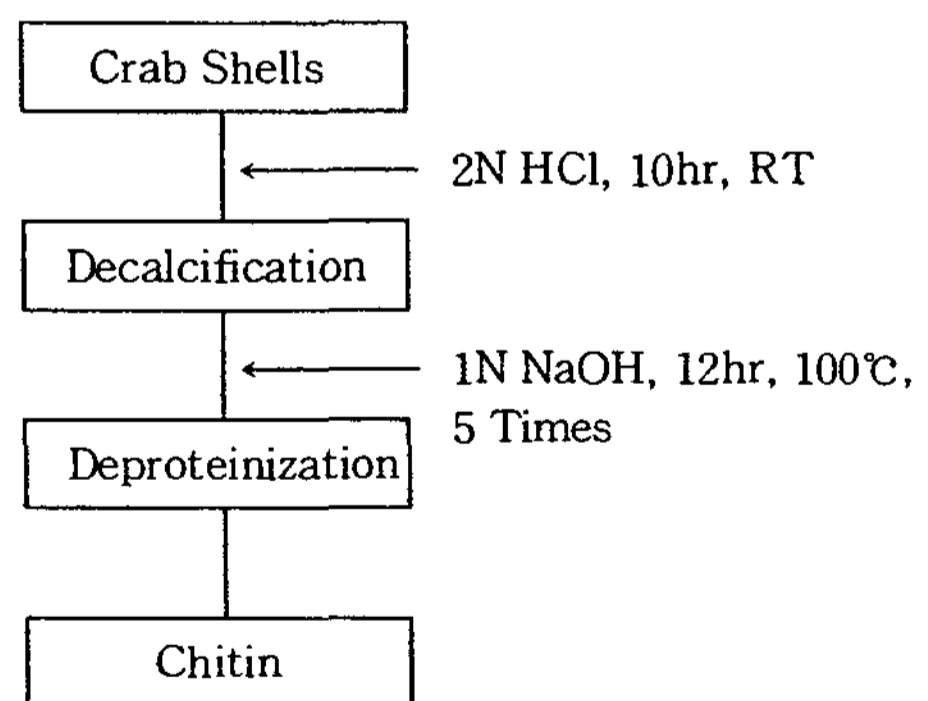
위하여 사용한 산 및 알칼리는 Junsei Chemical Co.의 시약 1급을, 용매인 acetone, alcohol과 치환체인 monochloroacetic acid 및 중화제인 acetic acid는 Yakuri pure Chemical Co.를 합성물의 정제를 위한 투석은 Union Carbide Co.의 membrane(MW 12,000)을 적당한 크기로 잘라 사용하였다. Chitin 및 CM-Chitin의 구조확인 및 치환도 측정을 위하여 Nicolet 800의 FT-IR과, Gemini 200 ¹³C NMR을 사용하였다.

2. Chitin의 추출

Chitin의 추출을 위하여, 먼저 게를 압착시켜 내용물을 분리시키고 수세한 후 건조시킨 게껍질을 잘게 분쇄한 후, Hackman법⁸⁾을 개량하여 Scheme 1과 같이 처리하였다.

잘게 부순 게껍질을 실온, 2N HCl 수용액에서 10시간 침적시킨 후 다시 4℃, 2N HCl 수용액에서 24시간 방치시켜 수세, 건조하여 탄산칼슘을 제거 하였으며, 이를 다시 100℃, 1N NaOH 수용액에서 12시간 동안 5회 처리한 후 수세 및 건조시켜 단백질을 분해 제거하였다. 이를 분쇄하여 40~60mesh의 chitin을 얻었다.

IR(cm⁻¹, KBr) : 3,200~3,400(OH),
1,655(C=O of acetyl) 1,100(C-O-C)



Scheme 1. Preparation of Chitin

3. Alkali Chitin의 제조

40~60 mesh의 chitin 분말 4g을 0.2% sodium dodecyl sulfate 계면활성제가 함유되어 있는 80ml의 42% NaOH 수용액에서 분산시켜 실온, 20mm Hg 감압하에서 4시간 동안 교반한 후 유리여과기를

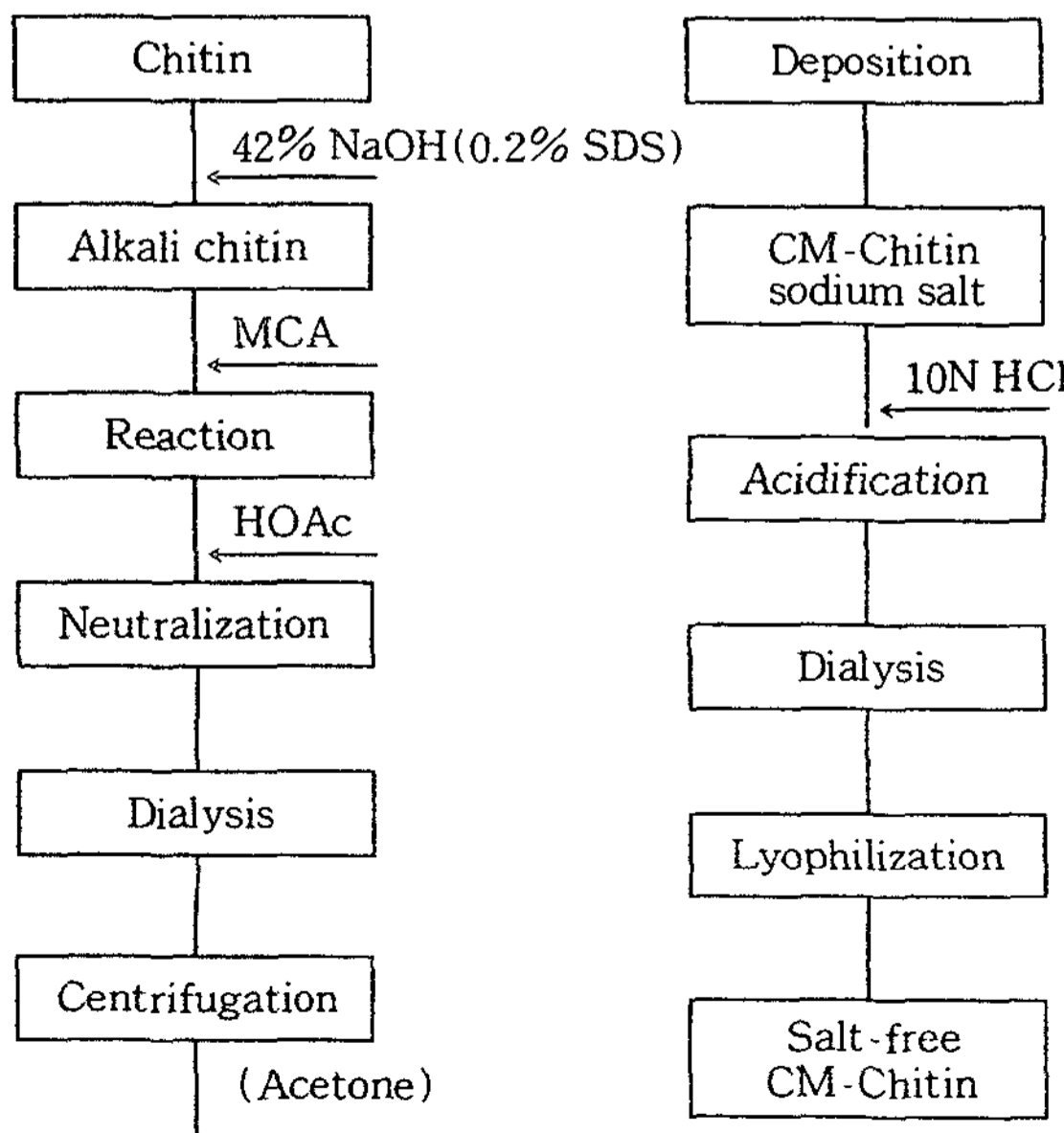
통해 여과시켜 케이크상의 젖은 alkali chitin 14.4g을 얻었다.

4. CM-Chitin의 합성^{9~12)}

실험 3에서 얻은 alkali chitin 14.4g에 잘게 부순 얼음조각 60g을 넣고 30분간 강하게 교반하여 높은 점도의 alkali chitin을 얻었다.

25% NaOH 수용액 112mℓ로 묽힌 후 0℃로 냉각시켜, N-acetyl-D-glucosamine 단위에 8, 10, 12, 14 및 16 당량의 monochloroacetic acid(MCA)를 NaOH 수용액에서 중화시킨 70mℓ를 소량씩 교반시키며 첨가하였다.

다시 실온에서 24시간 동안 방치시킨 후 acetic anhydride 8mℓ를 30분 동안 소량씩 첨가하며 교반한 후, acetic acid로 중화시켜 금속이온 및 반응부산물을 제거하기 위하여 membrane(MW 1,200)을 이용하여 탈이온화된 물로 2일 동안 투석하였다. 이후 7,000rpm에서 25분간 원심분리시켜 미반응의 chitin을 제거하고 이를 1.5ℓ의 acetone에 24시간 침적시켜 여과 및 풍건한 후, 다시 30mℓ ethanol에 재분산 및 여과하여 Na염 형태인 CM-Chitin을 얻었다. 이를 물 120mℓ에 용해시키고 10N HCl 용액으로 산성화한 후, 다시 1일 동안 투석하여 동결건조시켜 salt-free인 백색 flake의 CM-Chitin을 얻었다. CM-Chitin 합성과정을 Scheme 2에 나타내었다.



Scheme 2. Preparation of CM-Chitin

IR(cm^{-1} , film) : 3,300(OH), 1,735(C=O of CM), 1,655(C=O of N-acetyl), 1,150(C-O-C)

^{13}C NMR(ppm, D_2O) : δ 178(C=O of CM), 176(C=O of N-acetyl), 20(CH_3 of N-acetyl)

5. 흡습 및 보습성의 측정¹³⁾

합성한 CM-Chitin을 현재 흡·보습제로 사용하고 있는 HA와 비교하기 위하여 반응조건에 따라 얻어진 서로다른 치환도의 CM-Chitin과의 흡·보습력을 비교, 측정하였다. 흡습성은 건조된 sample 0.5g을 30mℓ 칭량병에 넣어 20℃에서 황산암모늄포화 수용액을 사용하여 상대습도 81% 및 탄산칼륨 포화수용액으로 상대습도 43%로한 데시케이터에서 측정하였다.

흡습률은 다음 식에 의해 산출했다.

$$\text{흡습률}(\%) = 100(W_n - W_o) / W_o$$

W_o : 방치전 중량

W_n : 방치후 중량

보습성은 10% wet sample을 탄산칼륨 포화수용액을 사용하여 상대습도 43% 및 실리카겔 데시케이터에서 측정하였다.

수분 잔존률은 다음 식에 의해 산출했다.

$$\text{수분 잔존률}(\%) = 100H_n / H_o$$

H_n : 방치후의 수분량

H_o : 첨가 수분량

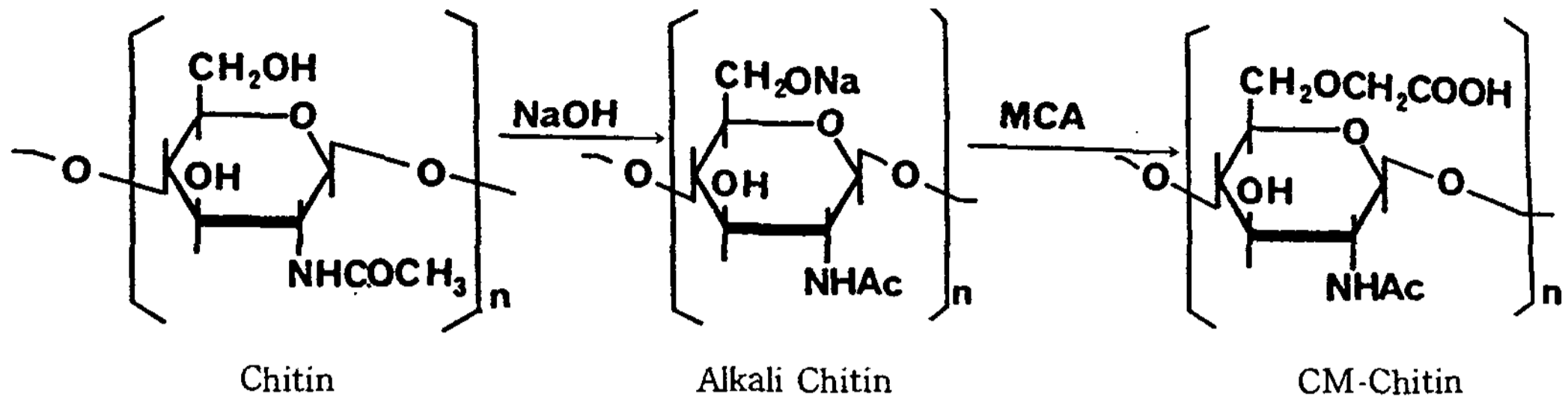
6. 치환도 측정

원소분석에 의해 측정된 치환도¹⁴⁾에 대하여 IR spectrum에서 $1,735\text{cm}^{-1}$ 와 $1,655\text{cm}^{-1}$ 의 흡수비와의 관계를 나타낸 Nishimura¹⁵⁾의 calibration curve를 이용하여 치환도를 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. CM-Chitin의 합성

경북 울진 근해의 게로부터 Hackman법에 의해 얻은 순백색 chitin은 Fig. 1의 IR spectrum에서와 같이 $3,200\sim 3,400\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH stretching, $1,655\text{cm}^{-1}$ 에서 acetamide의 C=O stretching band를 보



Scheme 3. Synthetic route of CM-Chitin from Chitin

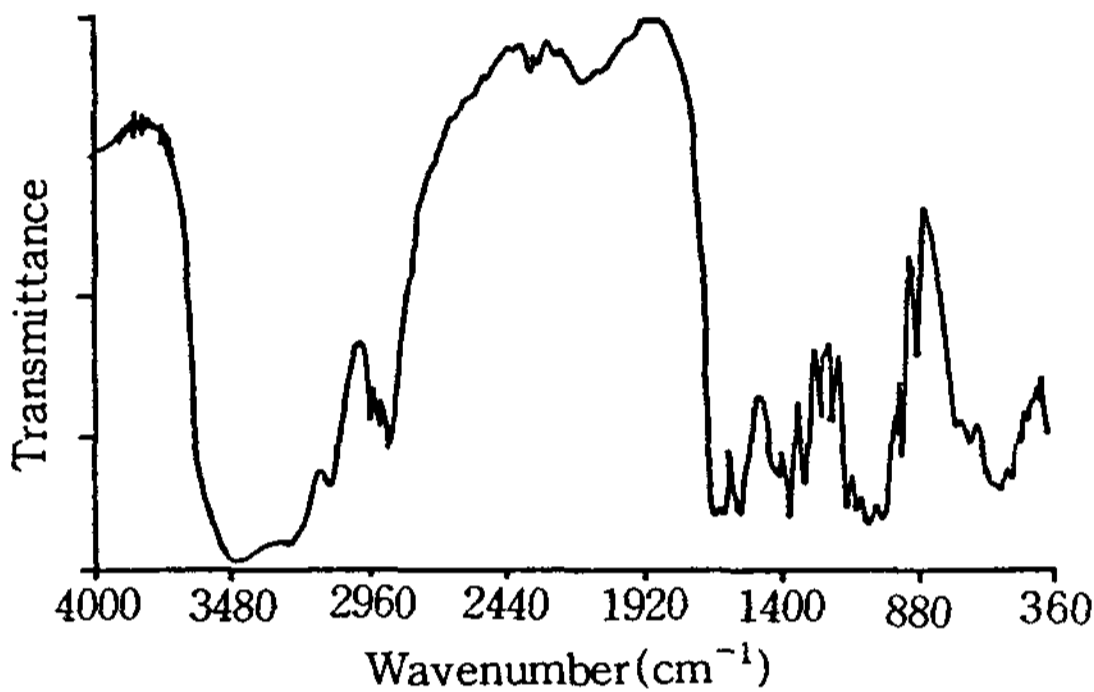


Fig. 1. IR Spectrum of Chitin(KBr)

였다.

Scheme 3의 반응식에 따라, 40~60mesh의 chitin 분말로부터 alkali chitin의 제조에 있어서 낮은 농도의 알칼리 용액은 물 용해성 유도체의 수율을 감소시키며, CM-Chitin의 합성을 위해 케이크상의 alkali chitin을 얼음조각에 넣을 때 gel이 형성되어 용해가 어려우므로 기계적인 교반이 요구된다.

MCA 양은 N-acetyl-D-glucosamine 잔기에 대한 몰비로서 8, 10, 12, 14, 및 16으로 변화시켜 반응시킨 결과 Table 1에 나타난 것처럼 수율 78~88%

Table 1. DS^a and Yield of CM-Chitin according to reaction condition.

Substrate	Reagent	Molar ratio of Reagent /substrate	DS	Yield (%)
Chitin	MCA	8	0.3	78
		10	0.6	80
		12	0.7	82
		14	0.8	88
		16	0.8	85

a : Degree of substitution of carboxymethyl group on C6

의 6-O-(carboxymethyl) chitin[CM-Chitin]을 얻었다.

이때 MCA의 양이 14몰비일 때 88%의 가장 높은 수율로 CM-Chitin을 얻은 것은, 미반응체의 제거를 위한 원심분리 과정에서 물의 불용물인 침전물이 적은 것과 관련이 있으며, 한편 MCA양 8몰비에서 가장 낮은 78% 수율은 원심 분리에서 가장 많은 침전물이 있어, 침전물의 양이 수율에 영향이 있는 것으로 나타났다.

IR Spectrum은(Fig. 2) 1,655cm⁻¹에서 acetamide의 C=O와 1,735cm⁻¹ 부근에서 carboxyl기의 C=O stretching이 보였으며, ¹³C NMR(Fig. 3)에서도 176ppm에서 acetamid의 C=O와 178ppm에서 carboxyl기의 C=O, 또한 acetamide의 CH₃이 25ppm 근처에서 singlet으로 나타났고, 특히 C1의 chemical shift가 103ppm에서 보인 것은 인접한 산소의 영향으로 downfield 된 것으로 생각되어 CM-Chitin이 합성 되었음을 알 수 있었다.

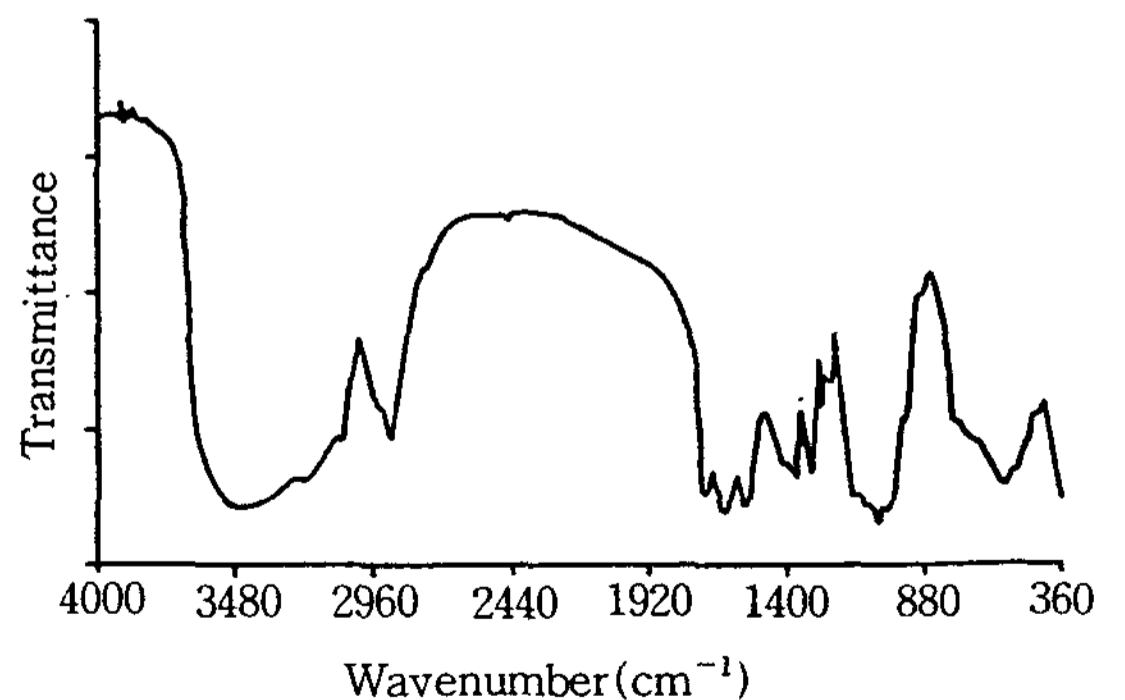


Fig. 2. IR Spectrum of CM-Chitin(film).

또한 치환도의 측정에는 ¹H NMR에 의해 C2 위치의 acetamide proton과 C6 위치의 carboxymethyl proton의 적분비로 계산하려 했지만 당구조의 특이

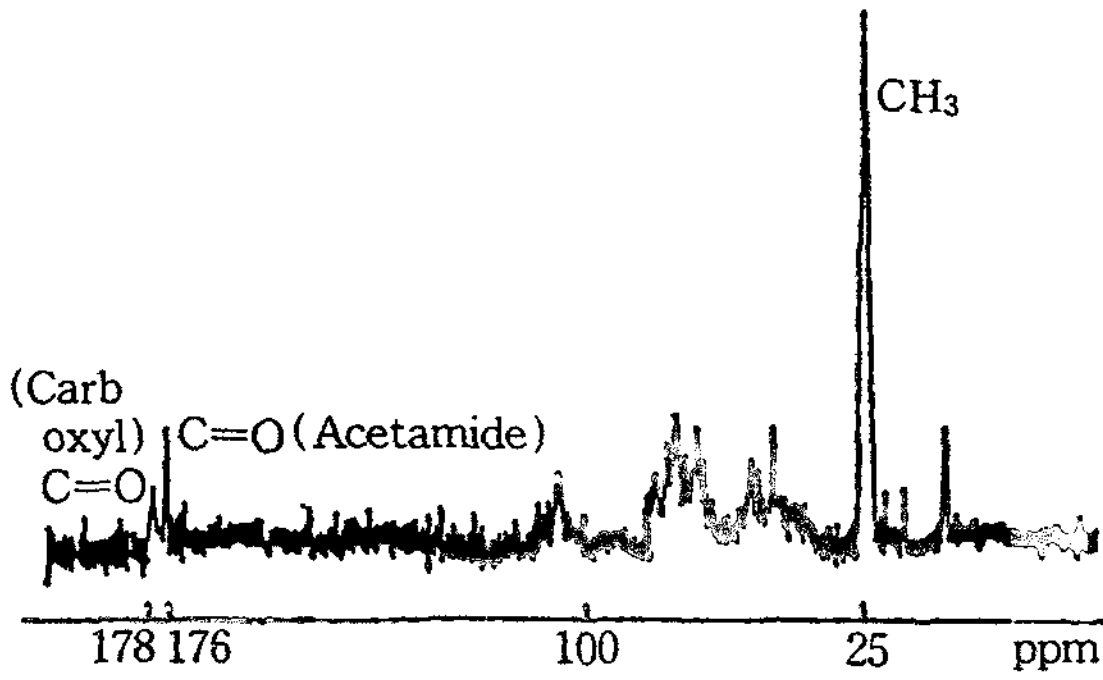
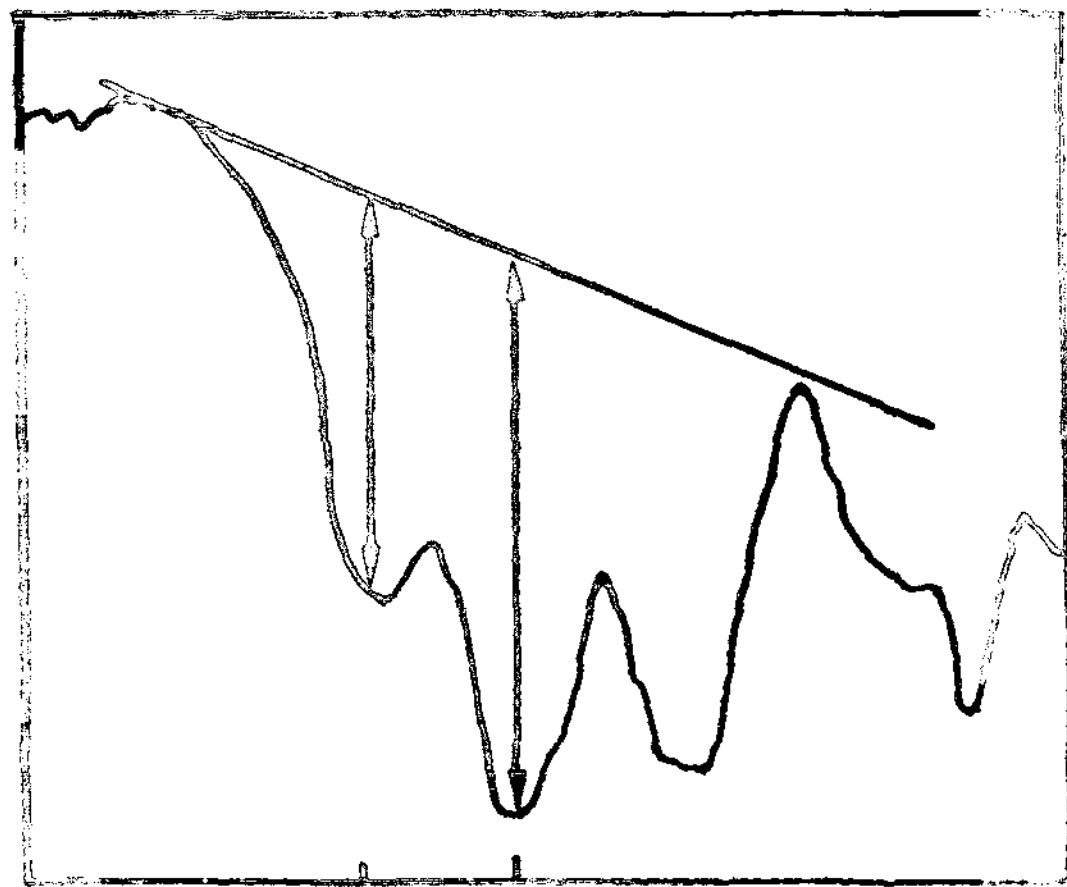
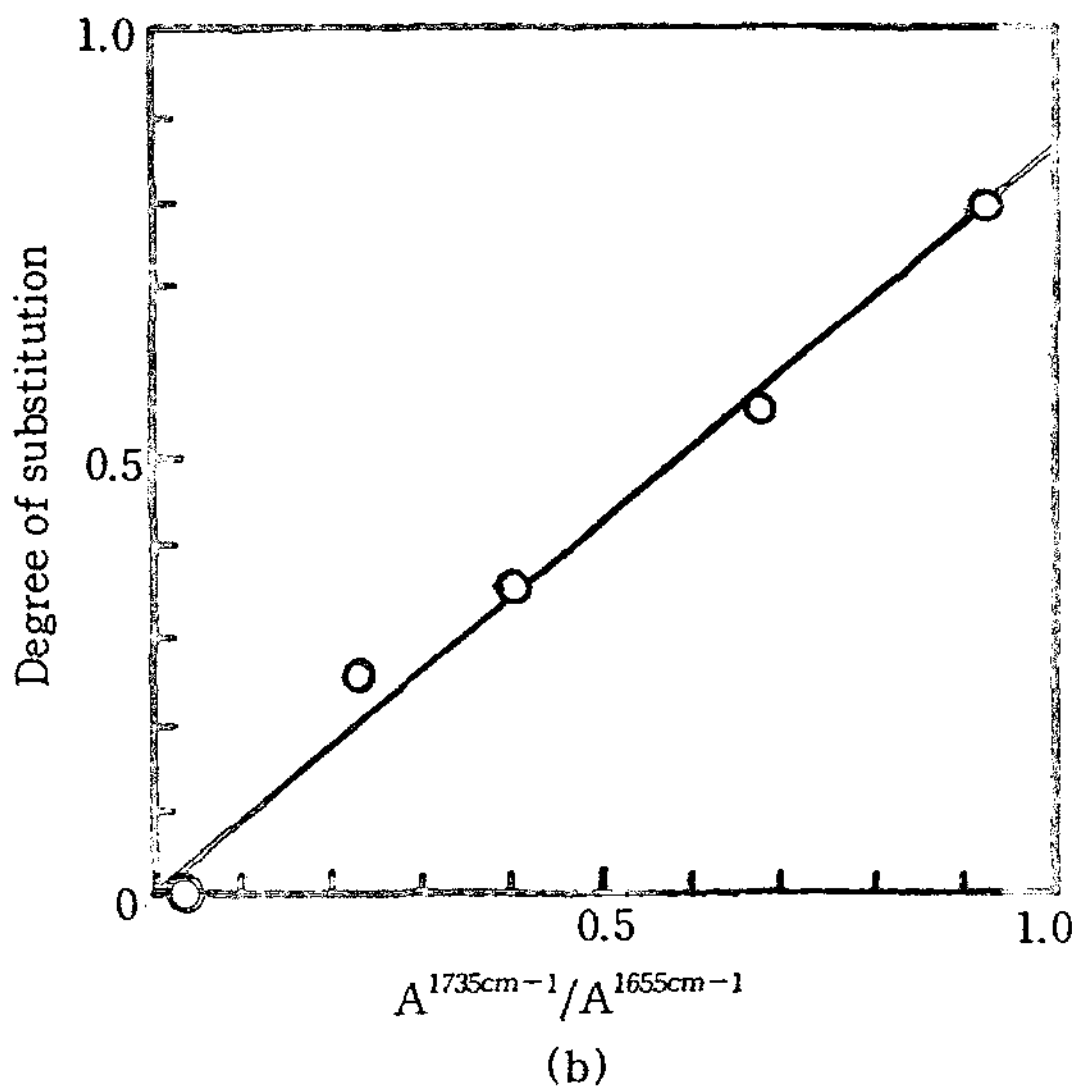


Fig. 3. ¹³C NMR Spectrum of CM-Chitin(D₂O).



1735 1655
Wavenumber (cm⁻¹)
(a)



$A_{1735\text{cm}^{-1}} / A_{1655\text{cm}^{-1}}$
(b)

Fig. 4. (a) IR Spectrum of CM-Chitin.
(b) Calibration curve for the determination of degree of substitution.

성으로 ¹H NMR spectrum이 깨끗하지 못해 IR을 이용한 Nishimura 방법에 의하여 다음과 같이 측정하였다. O-carboxymethyl group에 C6에 도입되어도 C2위치의 acetamide에 의한 1,655cm⁻¹의 흡광도는 변화되지 않기 때문에, 원소분석으로 얻은 각 치환도에 대하여 acetamide에 의한 1,655cm⁻¹에서 C=O의 흡광도와 C6에 결합되어 있는 CM-Chitin에 만 존재할 수 있는 carboxyl 기의 흡광도 비를 측정하여 Fig. 4의 calibration curve를 작성하여 반응조건에 따른 CM-Chitin의 치환도를 구하였다.

이때 MCA양이 증가할수록 치환도는 커지나 14, 16에서는 거의 같은 0.8의 치환도를 보인 것으로, MCA 양만이 증가에 의한 치환도의 증가는 한계가 있는 것으로 생각된다.

3. 흡·보습성의 측정

화장품 등에 흡·보습제로 사용되는 HA를 반응조건에 따라 합성한 치환도가 서로 다른 CM-Chitin과 흡·보습량의 경시변화를 실험하였다. Fig. 5 및 6에

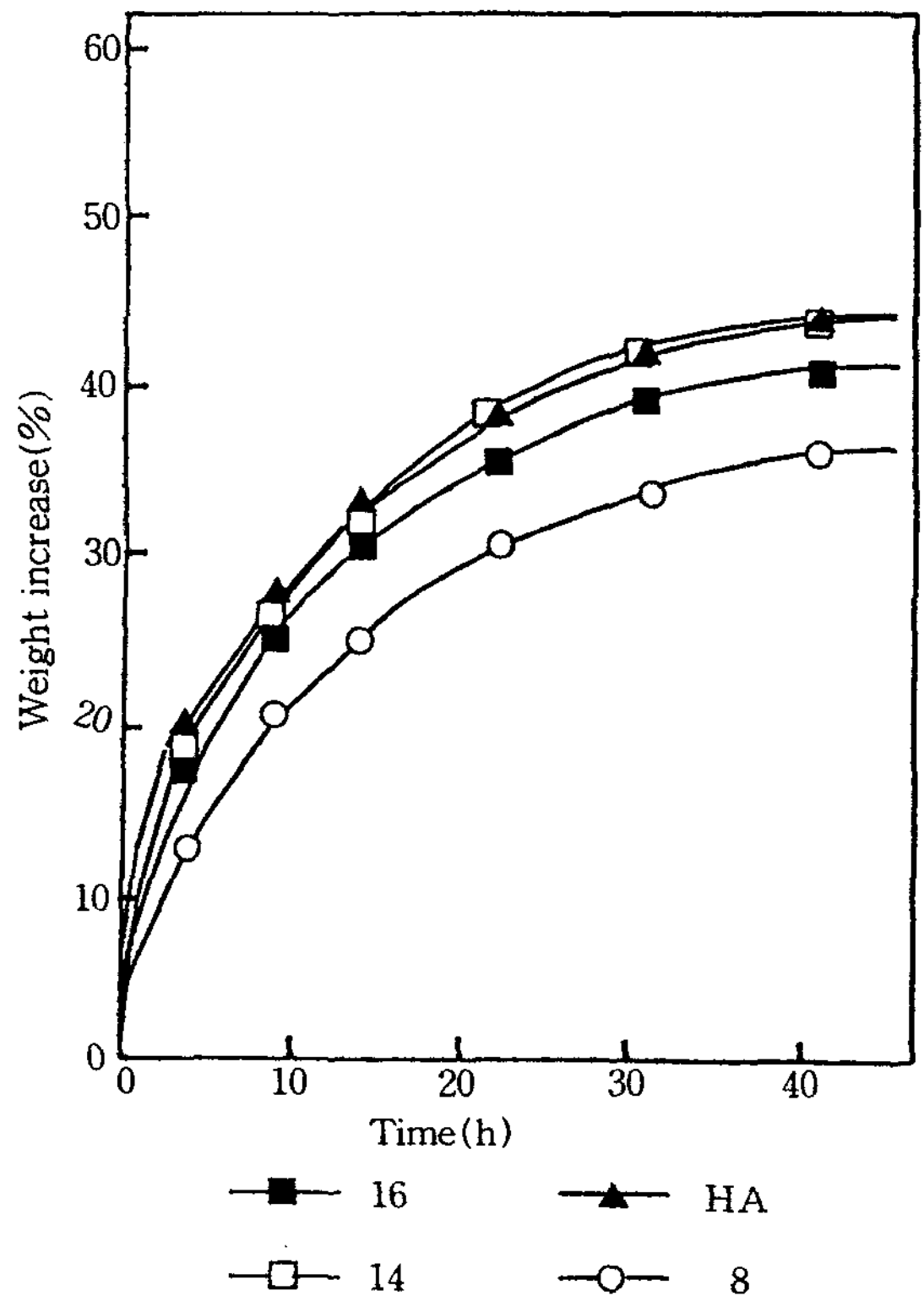


Fig. 5. Water uptake by dry samples at 81% relative humidity at 20°C.

서 나타난 바와같이 흡습성에서는 치환도 0.3의 경우 가장 낮은 흡습률을 보였으며, 치환도 0.8의 CM-

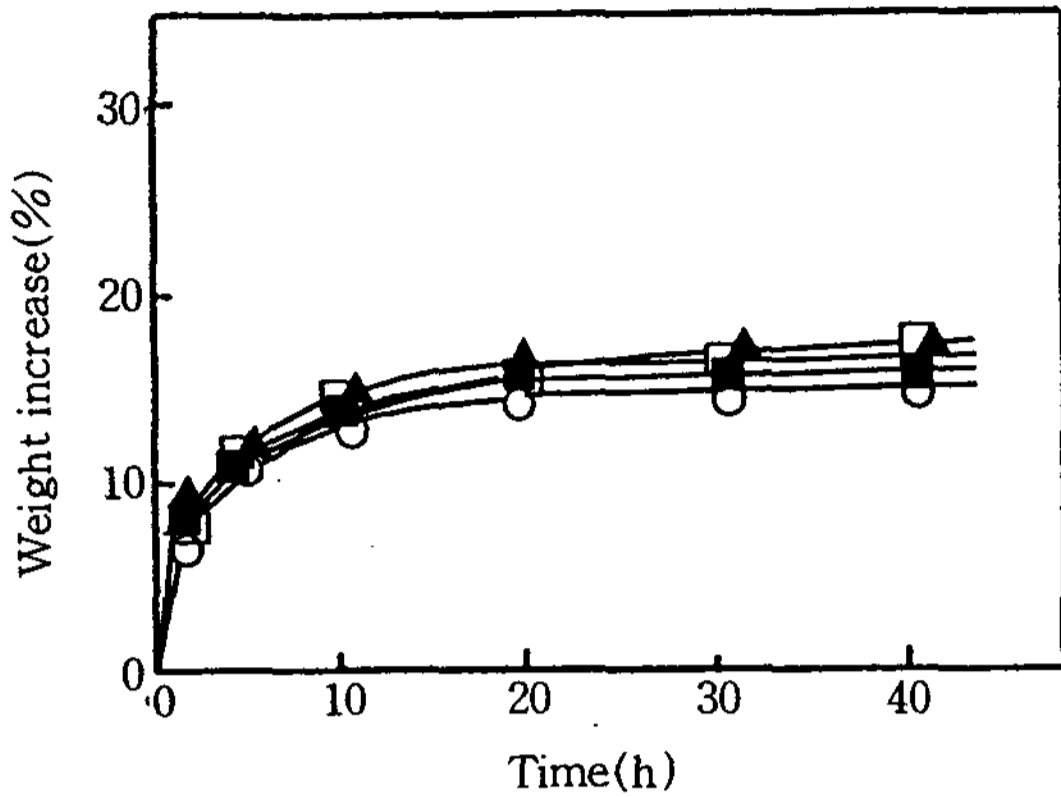


Fig. 6. Water uptake by dry samples at 43% relative humidity at 20°C.

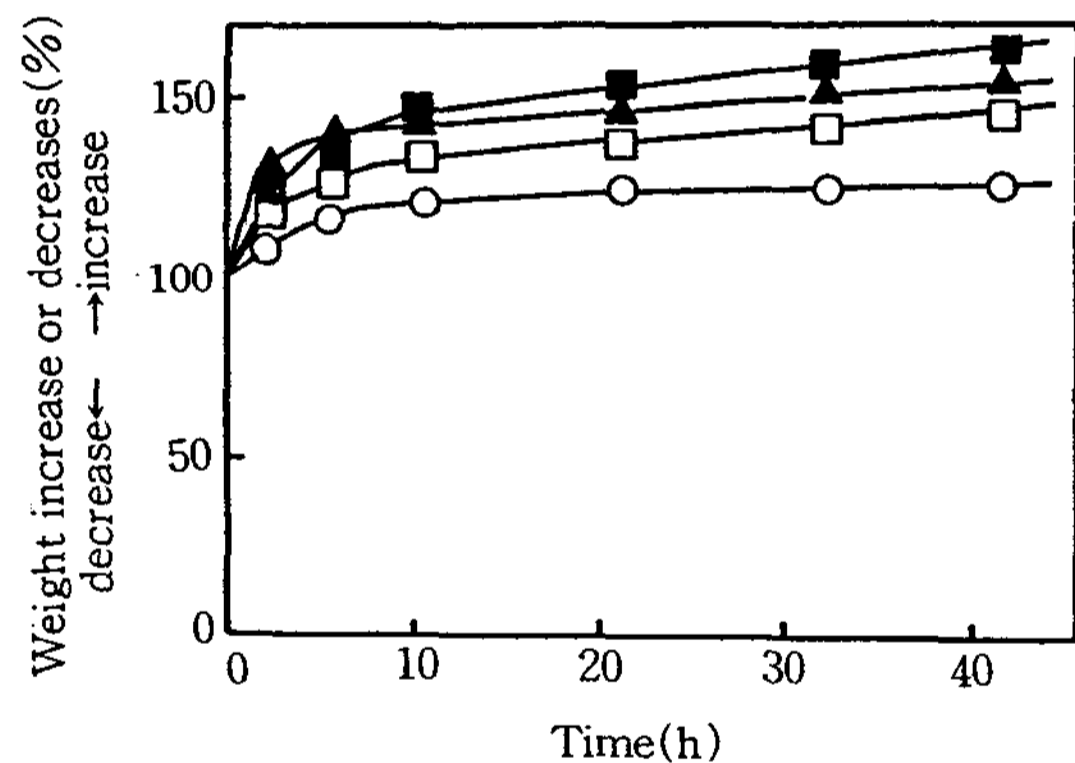


Fig. 7. Water uptake and water holding capacity of wet samples at 43% relative humidity at 20°C

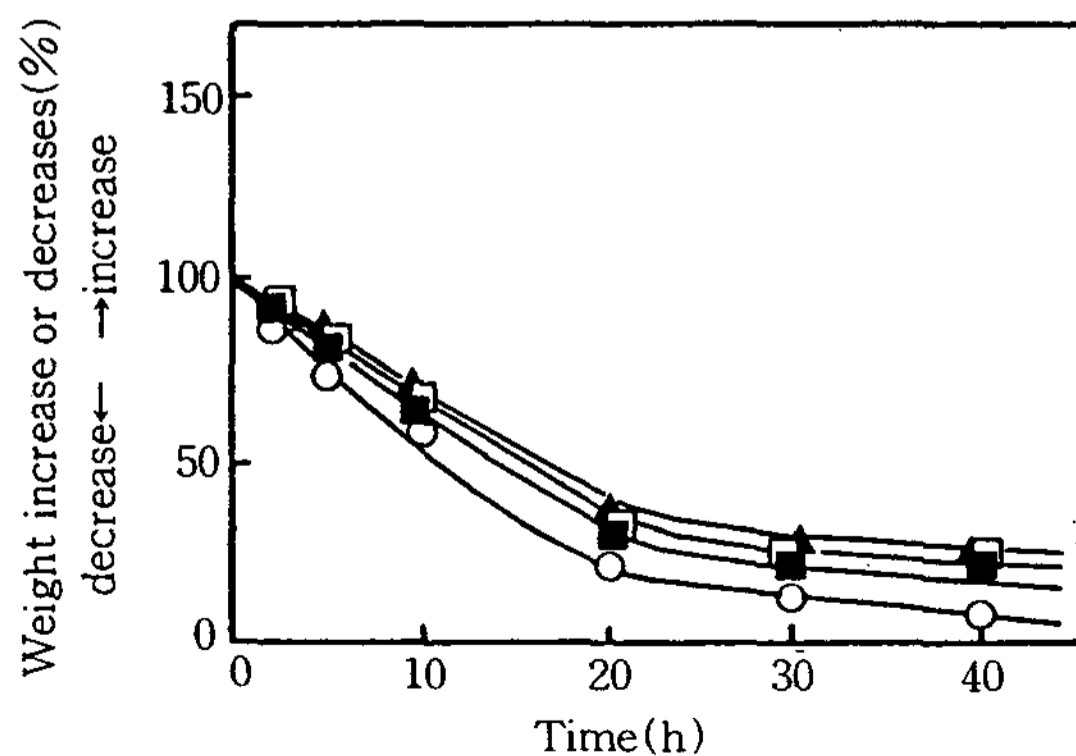


Fig. 8. Water holding capacity of wet samples in silica-gel desiccator at 20°C

Chitin이 가장 우수하게 HA와 유사한 양상을 보인 것으로 치환도가 흡습성에 절대적인 영향을 주는 것으로 생각된다. Fig. 7 및 8의 보습력 실험에서도 치환도 0.8의 CM-Chitin이 가장 우수한 수분잔존률을 보였으며 10시간 후에는 거의 일정한 보습량을 유지하는 것으로 미루어 치환도 0.8의 CM-Chitin은 HA의 대체품으로서 사용이 가능할 것으로 생각된다.

IV. 결 론

계껍질로부터 Chitin 유도체인 6-O-(carboxymethyl) chitin[CM-Chitin]의 합성에 있어서

1. 개량된 Hackman 법에 의해 계껍질로부터 23% 수율의 Chitin을 얻었다.

2. 42% NaOH 수용액에 의한 alkali chitin을 제조하여 몰비(monochloroacetic acid equivalent mol/N-acetyl-D-glucosamine residue)가 14 이상일 때 치환도 0.8, 88% 수율의 CM-Chitin을 합성하였다.

3. 치환도 0.8인 CM-Chitin과 hyaluronic acid (HA)와 흡·보습력을 비교 측정한 결과 거의 대등한 성능이 있어 HA의 대체품으로서 사용 가능성을 확인하였다.

감 사

본 연구는 국립공업기술원 '93 수탁연구사업으로 수행 되었습니다.

문 헌

1. 戶倉清一, 西則雄, 化學と生物, 15, 766(1977)
2. 平野戊傳, 蛋白質, 核酸·酵素, 22, 1431(1977)
3. 栗田惠輔, 化學の領域, 35, 9(1981)
4. 平野戊輔, 纖維と工業, 42, 226(1986)
5. 戶倉清一, 西則雄, 高分子, 35, 452(1986)
6. Seiichi Kataoka, Kobunshi Ronbunshu, 39, 759(1982)
7. S. Hattori, etal J. Colloid and Interface Sci., 104, 72(1985)
8. R. H. Hackman, Austr. J. Biol. Sci., 7, 168 (1954)
9. R. SenJu, S. Okimasu Nippon Nogei Kagaku Kaishi 23, 432(1950)

10. S. Okimasu, Nippon Nogei Kagaku Kaishi 32, 432(1950)
11. H. Yamado, T. Iomoto, Carbohydr. Res., 92, 160(1981)
12. R. Trujillo, Carbohydr. Res., 7, 483(1968)
13. 外岡憲明, 松原懸吉 等, 香粧會誌, 6, 244(1982)
14. S. Tokura, N. Nishi, A. Tsutsumi, O. Somorin, Polym. J., 15, 485(1983)
15. S. I. Nishimura, etal Carbohydr. Res., 146, 251(1986)