

## 생체적합성과 생분해성을 갖는 키틴유도체의 합성과 물성 V -라이소자임에 의한 액정성 키틴 유도체의 생분해특성-

김선정 · 이영무

=Abstract=

### Synthesis and Physical Properties of Biocompatible and Biodegradable Chitin Derivatives V.

#### -Biodegradation of Liquid Crystalline Chitin Derivatives by Lysozyme-

Seon Jeong Kim and Young Moo Lee

The ether-type chitin derivatives were synthesized by reacting chitin with chloropropane, propylene oxide and chloropropane diol to form propyl chitin(PPC), hydroxypropyl chitin(HPC) and dihydroxypropyl chitin(DHPC). These derivatives formed a lyotropic cholesteric liquid crystallinity in concentrations over 30 wt% solution in formic acid (99%). Cast films from liquid crystalline solutions were degraded by lysozyme in pseudo-extra cellular fluid(PECF) solutions, at pH 1.2, pH 6.7 and pH 8.2. Three ether-type chitin derivatives rapidly degraded within the first week, and showed a decreased mechanical strength in neutral pH range. Dihydroxypropyl chitin showed the best biodegradation among these derivatives.

**Key words :** Propyl chitin, Hydroxypropyl chitin, Dihydroxypropyl chitin, Liquid crystal, Biodegradation

## 서 론

키틴은 자연에 풍부하게 존재하는 천연 고분자이며 원료의 추출원에 따라  $\alpha$ -키틴,  $\beta$ -키틴 그리고  $\gamma$ -키틴으로 분류할 수 있다. 그 중  $\alpha$ -키틴은 게, 새우 등의 껍질 부분에 존재하며 X선 결정 구조 분석에 의하면 사방정계이며 분자 사슬들이 서로 엇갈린 교대배열하여 입체 구조상 분자 내 분자간의 많은 수소결합을 이루며 일반적으로 유기용매에 용해성이 매우 낮다<sup>1-5</sup>). 키틴은 셀룰로오스와 유사한 다당류 구조를 갖고 있으며 다당류 분해효소인 키틴나제(chitinase) 나 식물, 동물 그리고 인체내에 존재하는 라이소자임에 의해 분해된다<sup>6-8</sup>). 특히 라이소자임은 인체 세포 내의 과립구(granulocyte)와 단핵세포(monocyte)에 의해

생성되고 혈액속의 혈청에 0.36~0.78 mg/dl 정도가 있으며, 눈물, 콧물 그리고 침 등의 외분비 체액에도 존재하며 그람의 세포벽을 아미노당을 함유한 다당류 분자를 기질로 하여 분해하는 항생효과를 갖고 있다. 그리고 라이소자임은 다당류 분자를 기질로 글루코오스 단위의 1-4 결합에서 에테르 산소와 1번 탄소 위치에 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>6-10</sup>).

지금까지 키틴의 분해에 대해 연구 보고된 것으로는 T. Miyazaki 등은 라이소자임에 의한 카르복시메틸 키틴에 분해 정도를 연구하였고<sup>11</sup>), S. Tokura 등은 키틴과 그 유도체 함유의 라이소자임에 의한 생분해와 면역학적 평가를 연구하였으며<sup>12, 13</sup>), N. Tachibana 연구팀에 의해 키틴과 흡수성 용합사의 생체내 분해의 기계적 성질 변화<sup>14</sup>) 등에 관

한 보고가 있다. 그러나 액정 형성된 키틴 유도체에 대한 분해의 기계적 성질 및 특성에 대해서는 보고된 바 없다.

전보<sup>15, 16)</sup>에서는 계첩질로부터 얻은 α-키틴을 주로 6번 탄소의 수산기에 알킬화염소와 같은 알킬화 시약과 반응시켜 에테르형태의 키틴 유도체를 합성하였고 이들을 solid state <sup>13</sup>C-NMR 과 FT-IR 을 이용하여 그 구조를 확인하였으며, 이들의 유기용매에 대한 용해도가 키틴에 비해 증가된 것을 알았다. 또한 이들 유도체들의 액정형성능을 하였고<sup>[16]</sup>, 이들 중에서 키틴과 히드록시프로필 키틴의 열적 성질을 검토하였고 동역학적 분석을 통해 유리전이 온도(Tg)가 각각 236 과 252℃임을 알았고 β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub> 전이거동도 살펴보아 133과 142℃가 됨을 알았다<sup>17)</sup>.

본 연구에서는 전보에서 얻은 에테르형 키틴 유도체를 용액 상으로 액정을 형성시켜 필름을 제조하고 이것을 효소인 라이소자임에 의한 분해 정도와 기계적 특성의 변화를 검토하고자 한다.

## 실 험

### 1. 시 약

키틴은 crab-shell 로부터 제조한 Tokyo Kasei Co. 제품을 60 mesh의 분말 상태로 하여 오븐에서 48시간 동안 60℃에서 감압 건조하여 사용하였고, 클로로프로판(특급 시약) 및 클로로프로판 디올(특급 시약) 은 Tokyo Kasei Co. 제품을 사용하였고 산화프로필렌(일급 시약)은 Yakuri Pure Chemical Co., 이소프로필 알코올(일급 시약) 및 수산화나트륨(일급 시약)은 덕산화학과 Sinyo Pure Chemical Co. 제품을 사용하였다. 라이소자임(Sigma Chem. Co.)은 chicken egg white로 부터 추출한 58,100 unit/mg solid를 사용하였다.

### 2. 합성 및 필름 제조

α-키틴을 NaOH 수용액을 이용하여 알칼리 키틴을 제조한 후 클로로프로판, 산화프로필렌 그리고 클로로프로판 디올을 사용하여 전보<sup>15)</sup>와 같은 조건하에서 각각 키틴 유도체를 합성하였다. 이들 유도체들은 프로필 키틴(PPC), 히드록시프로필 키틴(HPC), 그리고 디히드록시프로필 키틴(DHPC) 이다. 합성한 에테르 형태의 키틴 유도체들을 각각 포름산(99%) 에 용해시켜 고분자 용액의 농도가 30 wt% 이상에서 편광현미경을 이용하여 전보<sup>16)</sup>와 같이 액정현상을 관찰하였다. 액정이 형성된 용액을 유리판에 유연시켜 60℃의 진공 오븐에서 건조시킨 후 에탄올에 침적시켜 필름을 제조하였다.

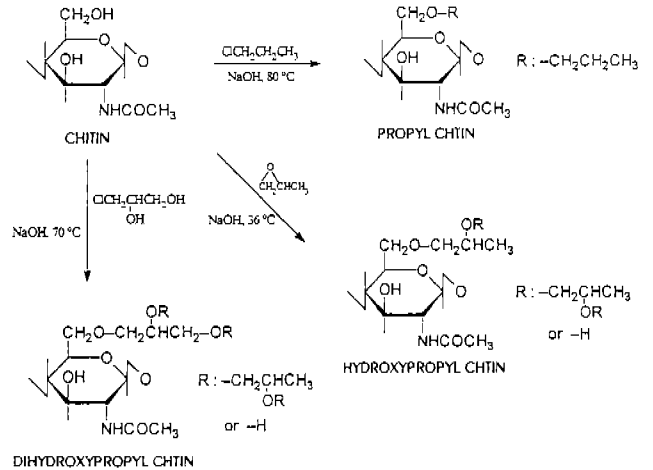


그림 1. (a) 키틴, (b) 프로필키틴, (c) 히드록시프로필 키틴 그리고, (d) 디히드록시프로필 키틴의 화학구조식

Fig. 1. Chemical structure of (a) chitin, (b) propyl chitin, (c) hydroxypropyl chitin and (d) dihydroxypropyl chitin

### 3. 분해도 및 팽윤도 측정

제조한 키틴 유도체들의 생분해 정도를 측정하기 위하여 각각의 시험관에 라이소자임 58,100 unit/mg을 넣고 pH 1.2, pH 6.7, pH 8.2 그리고 유사 체액의 용액으로 제조하여 각각의 효소 용액의 시험관에 시료를 넣어 배양기에서 37℃를 유지하여 시간의 변화에 따른 효소 분해 정도를 무게감소의 비율로 측정하였다. 그리고 분해 정도에 따른 필름의 기계적 성질의 변화는 Universal Testing Machine (Instron Co. Model 4201) 으로 측정하였다. 팽윤도는 pH 1.2, 6.7, 8.2 그리고 유사 체액에서 각각의 시료를 침적시켜 37℃를 유지한 배양기에서 1일이 경과한 후 무게에 대한 비로 측정하였다.

$$\text{팽윤도}(\%) = \frac{(B-A)}{A} \times 100$$

A: 건조시의 시료 무게

B: 팽윤시의 시료 무게

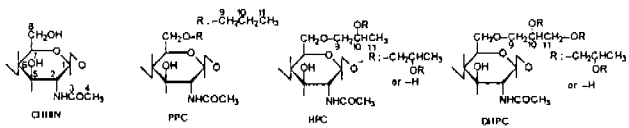
## 결과 및 고찰

α-구조의 키틴으로부터 프로필 키틴(PPC), 히드록시프로필 키틴(HPC) 그리고 디히드록시프로필 키틴(DHPC)을 각각 합성하였으며<sup>15)</sup>, 합성한 유도체들의 화학적 구조식을 Fig. 1에 나타냈다. 키틴과 에테르 키틴의 FT-IR 분석에서 키틴은 3400 cm<sup>-1</sup>의 히드록시기와 2970 cm<sup>-1</sup>의 메

표 1. 키틴과 유도체들의 고체 <sup>13</sup>C-NMR

Table 1. Solid State CP/MAS <sup>13</sup>C-NMR Chemical Shifts of Chitin and Chitin Derivatives

	Chitin	PPC	HPC	DHPC
C <sub>1</sub>	103.6	103.6	103.7	103.7
C <sub>2</sub>	54.7	54.8	54.7	54.5
C <sub>3</sub>	172.8	172.2	172.3	172.4
C <sub>4</sub>	22.3	33.4	22.4	22.3
C <sub>5</sub>	72.9	73.0	72.9	72.8
C <sub>6</sub>	82.5	82.6	82.6	82.4
C <sub>7</sub>	75.1	75.1	75.3	75.3
C <sub>8</sub>	60.4	60.4	60.3	62.6
C <sub>9</sub>	—	75.1	72.9	62.6
C <sub>10</sub>	—	40.0	66.2	72.8
C <sub>11</sub>	—	10.8	19.1	62.6



텔기가 나타났고 치환체를 도입시킴에 따라 디히드록시프로필 키틴은 3400 cm<sup>-1</sup>에서 히드록시기의 신축진동 피크가 강하게 나타났고 알킬기 중에서 2970 cm<sup>-1</sup>의 메틸기와 2940 cm<sup>-1</sup>의 메틸렌기가 약간 분리되어 나타난 것을 확인하였다. 키틴 및 유도체들의 solid state <sup>13</sup>C-NMR 분석결과<sup>15, 16</sup>는 Table 1과 같다. 키틴은 3번 위치의 탄소의 피크가 172.8 ppm, 4번 위치의 탄소의 피크가 22.3 ppm 그리고 아세틸아미노 글루코오스 단위의 6번 탄소, 즉 8번 위치는 60.4 ppm 에서 나타났으며 전체적으로 8개의 chemical shift 가 나타났다. 그리고 5번과 7번 탄소의 피크가 75.1 과 72.9 ppm 에서 명확하게 갈라진 2개의 피크로 나타났다. 따라서 α-키틴임을 알 수 있었다<sup>19</sup>. 프로필 키틴은 8번 탄소에 프로필기를 도입시킴에 따라 9번 탄소와 10번 탄소가 새로운 피크로 40.0과 10.8 ppm 에서 나타났다. 히드록시프로필 키틴은 히드록시프로필기에 의한 새로운 피크가 72.9(C<sub>9</sub>), 66.2(C<sub>10</sub>) 그리고 19.1(C<sub>11</sub>) ppm 에서 나타났다. 디히드록시프로필 키틴은 일차 알코올(C<sub>3</sub>) 위치에서 ether linkage 와 C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>의 유사성에 의해 62.6 ppm 에서 broad spectrum peak를 확인하였다.

Fig. 2 는 pH의 변화에 따른 유도체들의 여러가지 조건에서 팽윤 정도를 나타냈다. pH의 범위는 생체적합성 재료의 특성을 고려하여 체온과 같은 조건인 37°C에서 *in vitro*의 실험으로 인체의 위에서 분비되는 위산(pH 1.2), 담즙(pH 6.7), 소화 장액(pH 8.2) 그리고 유사체액(pH 7.4)과

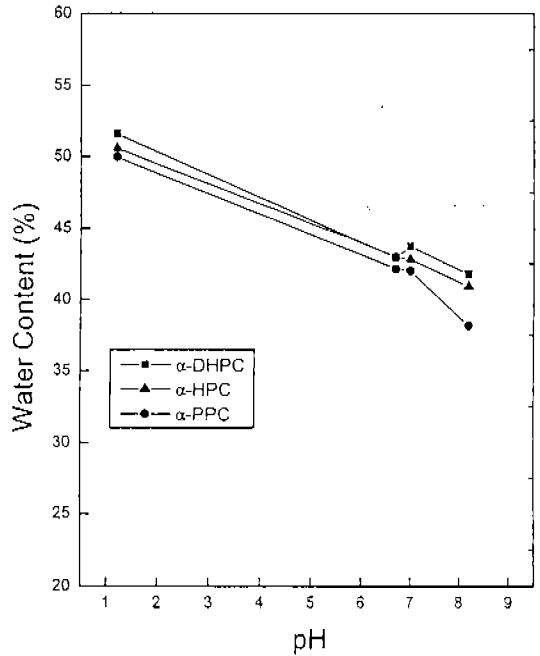


그림 2. 여러 pH에서 키틴 유도체의 팽윤도

Fig. 2. Water content of chitin derivatives stored at various pH ranges

같은 조건의 pH에서 각각 실험한 결과 팽윤도는 산성 영역에서 크다가 pH가 증가할 수록 감소하였다. 일반적으로 키틴은 분자내 아세트아미노기의 존재로 인해 산성에서 용해되는 현상과 관련되므로 이러한 결과가 나온 것으로 생각할 수 있다<sup>20</sup>. 그리고 합성한 유도체들과 키틴과 비교 실험을 시도하였으나 순수키틴은 유기용매에 대한 용해성 저하<sup>4, 15</sup>로 필름의 제조가 불가능하여 부득이 합성한 유도체들만의 비교특성실험이 되었다.

키틴의 분해 대사 작용의 과정은 키틴 분해 효소중의 하나인 라이소자임에 의해 1-4 위치의 ether linkage가 가수분해 되어 oligochitin으로 되고 더욱 분해가 진행되어 N-acetylglucosamine으로 변화하며 최종적으로 체내의 대사 작용에 의해 생체내의 glycogen이나 glycoprotein으로 흡수하게 된다<sup>14, 21</sup>.

키틴 유도체가 pH 7.4인 유사 체액 내에서 라이소자임에 의해 분해되는 정도를 37°C의 *in vitro* 하에서 시간에 따라 측정된 결과(Fig. 3), 실험 초기부터 1주일까지 급격한 분해를 나타냈고, 그 이후부터 일정한 분해율을 보여주었다. 전체적으로 키틴유도체들은 중성영역에서 높은 분해도를 나타내었으며 그 중에서도 가장 수용성 작용기가 많은 DHPC가 좀 더 큰 분해정도를 나타냈다. 그리고 키틴 유도체가 인체의 위산과 같은 pH 1.2 조건에서 라이소자

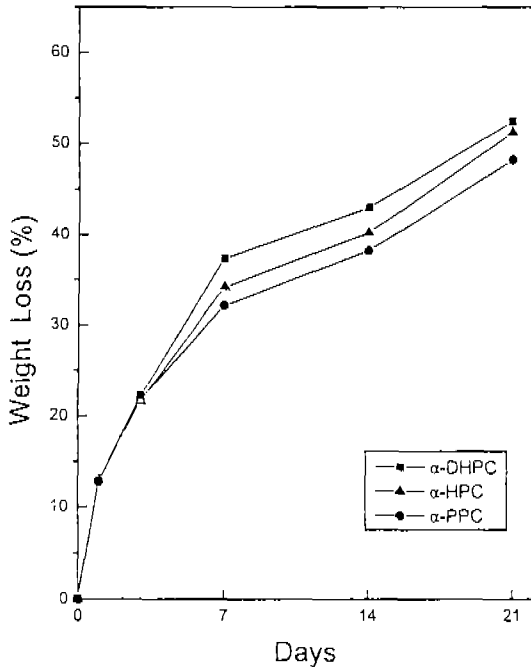


그림 3. 37°C, 유사체액에서 라이소자임에 의한 키틴유도체의 *in vitro* 분해도

Fig. 3. *In vitro* biodegradable kinetics of chitin derivatives by lysozyme in pseudo-extra cellular fluid(PECF) at 37°C

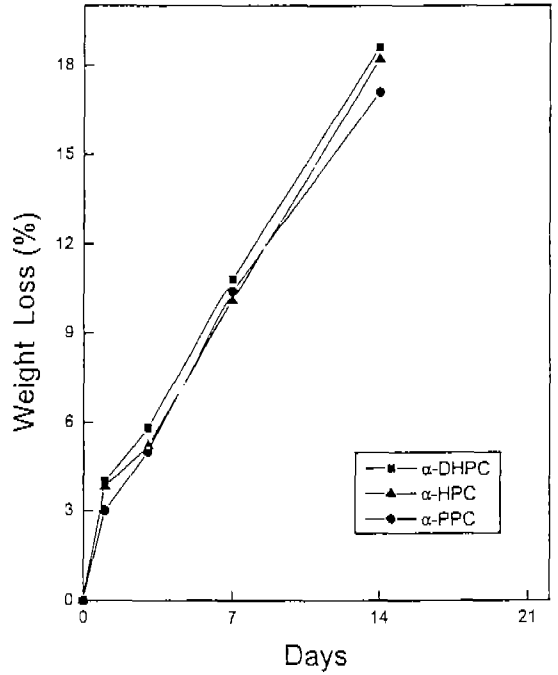


그림 4. 37°C, pH 1.2 에서 라이소자임에 의한 키틴유도체의 분해도

Fig. 4. *In vitro* biodegradable kinetics of chitin derivatives by lysozyme in pH 1.2 at 37°C

입에 의해 분해된 정도(Fig. 4)는 14일이 경과했을 때 18% 정도로 다른 조건, 중성이나 염기성 영역보다 저하되었는데 이것은 라이소자임의 activity가 산성 영역인 pH 1.2에서 감소했기 때문으로 생각되며 용액에 침지 시킨후 2주일이 되었을 때 시료들은 필름의 형태가 초기의 상태와 비교하여 변형되어 그 이후의 측정은 어려웠다. *In vitro*의 pH 조건을 담즙액과 같은 pH 6.7에서의 분해율을 측정할 결과(Fig. 5), 처음 1주일 동안 급격한 분해율을 나타내어 약 26%가 분해하였고, 3주일이 지났을 때 대부분의 시료는 50% 이상의 분해 정도를 보였다. 이것은 라이소자임의 활동도가 가장 좋은 중성에서 효소 작용이 활발하여 나온 결과라고 생각된다. 소화 장액과 같은 pH 8.2에서 분해도를 시간에 따라 측정한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 이것은 처음 1주일 동안은 급격한 분해를 나타냈고 대체로 중성 조건(pH 7)과 유사한 경향의 분해형태를 나타냈지만 3주일이 경과했을 때 중성조건보다 약 10% 정도 분해정도가 감소하였다.

Table 2는 키틴 유도체들의 액정 형성 농도인 30 wt% 포름산(99%) 용액을 유리판에 유연시킨 후 60°C의 감압오븐에서 건조시키고 에탄올에 침적하여 제조한 필름의 인

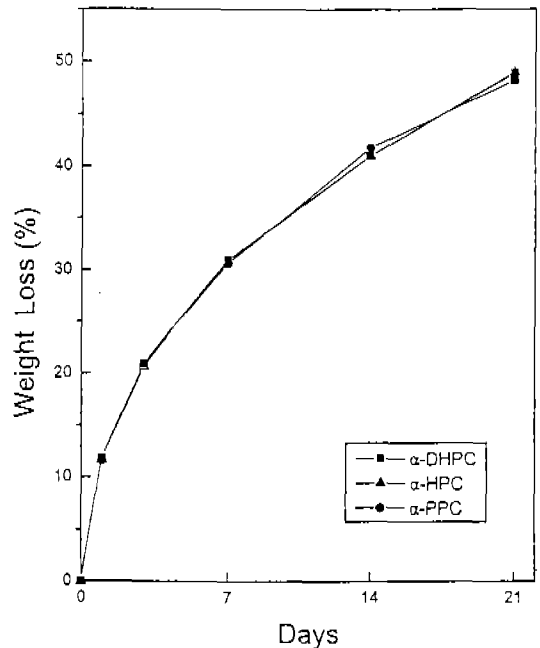


그림 5. 37°C, pH 6.7 에서 라이소자임에 의한 키틴유도체의 *in vitro* 분해도

Fig. 5. *In vitro* biodegradable kinetics of chitin derivatives by lysozyme in pH 6.7 at 37°C

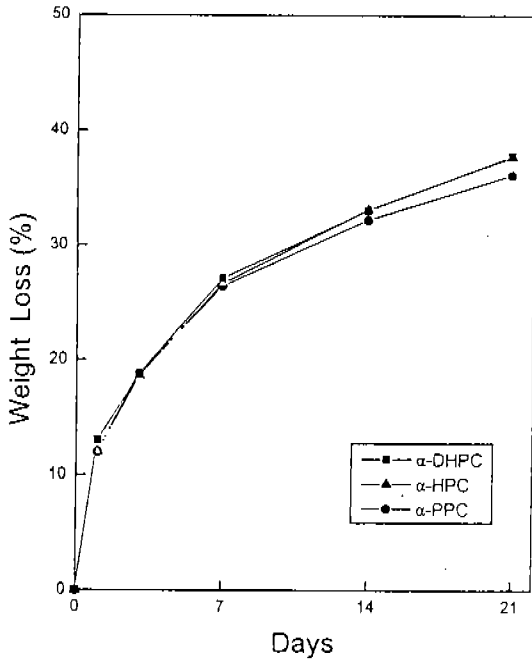


그림 6. 37°C, pH 8.2 에서 라이소자임에 의한 키틴유도체의 *in vitro* 분해도

Fig. 6. *In vitro* biodegradable kinetics of chitin derivatives by lysozyme in pH 8.2 at 37°C

장강도와 신장율을 건조 상태와 24시간 증류수에 침지시킨 습윤 상태로 분류하여 측정된 결과로서 인장 강도는 건조 상태에서 우수하게 나타났으며 신장율은 습윤 상태에서 더 증가하였다. 이것은 습윤 상태에서는 물 분자가 고분자 사슬에 수화하여 분자 사슬들이 팽윤되어 신장율이 증가되었다고 생각된다.

Fig. 7~10은 위와 같은 네가지 pH 영역에서 처리한 시료들을 시간에 따라 취하여 그 인장 강도의 변화를 나타낸 그림들이다. 먼저 Fig. 7은 유사 체액(pH 7.4)에서 효소 분해에 의한 시간의 경과에 따라 기계적 강도의 변화를 나타낸 것으로 초기 1주일 동안 기계적 강도가 크게 감소하였다. 이것은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 초기 1주일간 분해율이 급격히 증가하였으므로 기계적 인장 강도도 크게 감소한 것으로 보인다. 산성 영역인 pH 1.2 기계적 강도의 변화(Fig. 8)는 처음 1주일 동안 급격한 기계적 강도의 감소와 함께 2주일이 지났을 때 대부분의 유도체 시료들은 형태의 변형이 초래되어 인장강도의 측정이 불가능하였다. 이것은 산성의 영역에서 장기간 경과됨에 따라 시료가 일부 용해현상이 나타난 것으로 생각된다. pH 6.7에서 시간의 변화(Fig. 9)에 따른 기계적 강도의 변화로 2주일이

표 2. 건조상태와 습윤상태에서 키틴 유도체들의 기계적 성질  
Table 2. Mechanical Properties of Chitin Derivatives in Dry and Wet States

Sample	Tensile Strength at Break (kg/mm <sup>2</sup> )		Elongation at Break (%)	
	Dry	Wet	Dry	Wet
α-Propyl Chitin	4.6	3.5	7.2	16.5
α-Hydroxypropyl Chitin	5.2	3.7	7.6	18.5
α-Dihydroxypropyl Chitin	5.7	3.2	8.2	20.1

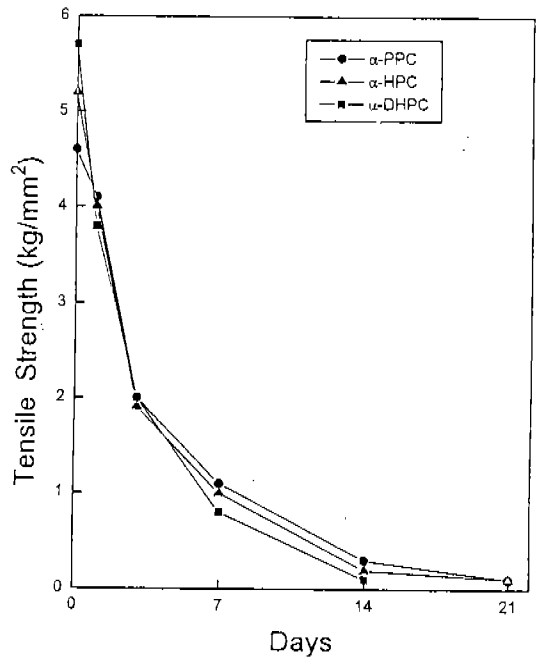


그림 7. 37°C, 유사체액에서 *in vitro* 분해도에 따른 키틴유도체의 기계적 강도의 변화

Fig. 7. Effect of *in vitro* biodegradable kinetics of tensile strength of chitin derivatives by lysozyme in pseudo-extra cellular fluid (PECF) at 37°C

지났을 때 시료들은 형태를 갖추고 있지만 라이소자임의 activity가 높은 중성영역에서 높은 분해도에 의해 시료가 부분적으로 crack 이 생겨 인장 강도의 측정이 불가능하였다. 염기성인 pH 8.2(Fig. 10)에서 기계적 강도가 초기 1주일 동안 급격한 감소를 보인 반면 다른 조건의 시료들 특히 중성영역보다 분해정도가 낮기 때문에 3주일까지 일부 시료는 인장 강도의 측정이 가능하였다.

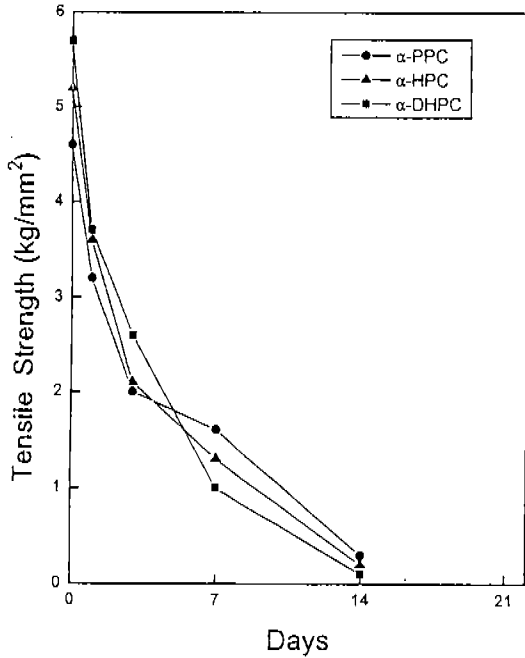


그림 8. 37°C, pH 1.2에서 *in vitro* 분해도에 따른 키틴유도체의 기계적 강도의 변화

Fig. 8. Effect of *in vitro* biodegradable kinetics on tensile strength of chitin derivatives by lysozyme in pH 1.2 at 37°C

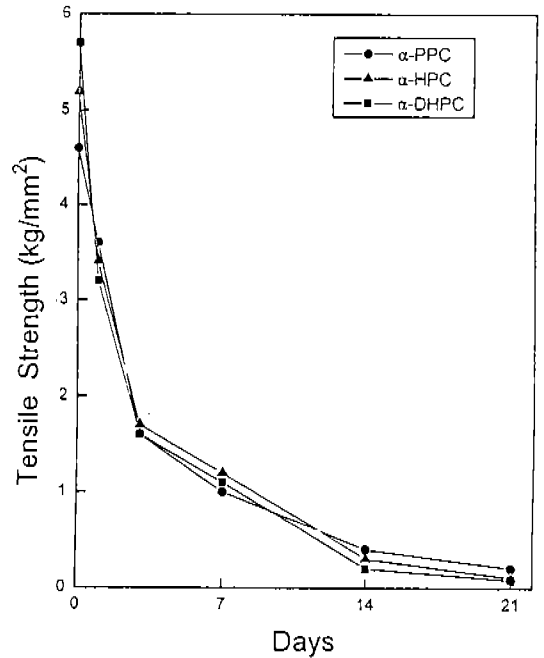


그림 10. 37°C, pH 8.2에서 *in vitro* 분해도에 따른 키틴유도체의 기계적 강도의 변화

Fig. 10. Effect of *in vitro* biodegradable kinetics on tensile strength of chitin derivatives by lysozyme in pH 8.2 at 37°C

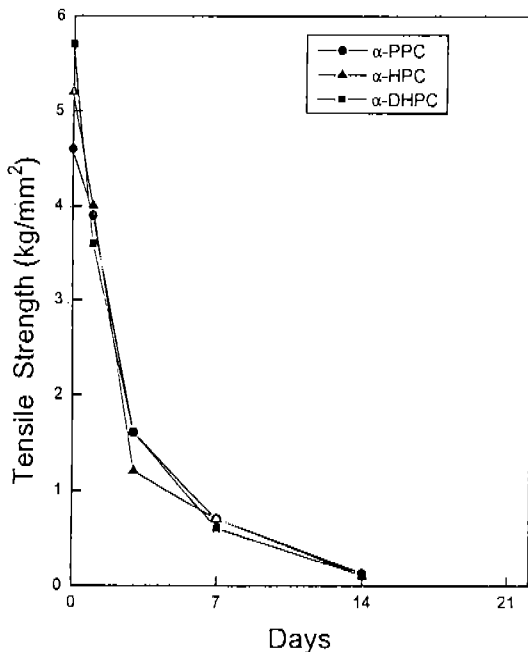


그림 9. 37°C, pH 6.7에서 *in vitro* 분해도에 따른 키틴유도체의 기계적 강도의 변화

Fig. 9. Effect of *in vitro* biodegradable kinetics on tensile strength of chitin derivatives by lysozyme in pH 6.7 at 37°C

## 결 론

키틴의 용해성을 증가시키기 위해 에테르 형태의 키틴 유도체인 프로필 키틴, 히드록시프로필 키틴 그리고 디히드록시프로필 키틴을 합성하였다. 합성한 키틴 유도체는 FT-IR과 solid state <sup>13</sup>C-NMR 에서 글루코오스 아세틸아미노 고리의 6번 탄소 위치에 각각의 치환체가 도입되었음을 확인하였다. 키틴 유도체들은 포름산(99%)에 용해시켜 30 wt% 고분자용액에서 콜레스테릭한 유방성 액정을 형성하였다. 그리고 합성한 키틴유도체의 액정형성된 용액으로부터 제조한 필름의 라이소자임에 의해 *in vitro* 분해실험은 대부분 초기 1주일까지 급격한 분해율을 나타냈었다. 중성영역의 무게 감소와 기계적 강도의 감소가 산성이나 염기성 영역에서 보다 증가하였다. 시료들중에서 디히드록시프로필 키틴(DHPC) 이 가장 큰 생분해 정도를 나타냈다.

## 감 사

본 연구는 1993년 교육부 신소재 연구 결과에 의해 이루

어졌으며 이에 감사드립니다.

### Reference

1. N. Nishi, J. Noguchi, S. Tokura and H. Shiota, Polym. J., 27 (1979)
2. O. Somorin, N. Nishi, S. Tokura, J. Noguchi, ibid, 11, 391 (1979)
3. K. Kaifu, N. Nishi, T. komai and O. Somorin, ibid, 13, 241 (1981)
4. R. A. Muzzarelli, Chitin, pp 45-51, Pergamon Press (1977)
5. S. Tokura, 4th Inter. Conf. Chitin and Chitosan, pp 45-50, Norway (1988)
6. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrback, The Enzymes, Vol. 4, pp 431-445, New York and London, Academic Press (1960)
7. E. Zeffren and P. L. Hall, The Study of Enzyme Mechanisms, pp 209-221, New York, John Wiley & Sons
8. 김윤수, 생화학 Vol. 1 pp 9-13, Vol. 7 pp 24-43, 의학문화사
9. N. W. Tietz, Textbook of Clinical Chemistry, p 601, W. B. Saunder Co. (1986)
10. N. C. Price and L. Stevens, Fundamentals of Enzymology, pp 366-378 Oxford New York, Oxford University Press (1989)
11. T. Miyazaki and Y. Matsushima, Bullt. Chem. Soc. Jap., 41 (11), 2754 (1968)
12. S. Tokura, N. Nishi, S. Nishimura and O. Somorin, Sen-i Gakkaishi, 39(12), 507 (1983)
13. K. Nishimura, S. Nishimura, N. Nishi, I. Saiki, S. Tokura and I. Azuma, Vaccine, 2, 93 (1984)
14. M. Tachibana, A. Hiroyuki, K. Fukasawa, N. Nagasue and T. Nakamura, Jap. J. Surg., 18(5), 533 (1988)
15. S. J. Kim, S. S. Kim and Y. M. Lee, Makromol. Chem., in press (1993)
16. S. J. Kim and Y. M. Lee, J. Kor. Ind. & Eng. Chem., 3(3), 516 (1992)
17. S. S. Kim, S. J. Kim, Y. D. Moon and Y. M. Lee, Polymer, in press (1994)
18. C. A. Homsy, J. Biomed. Mater. Res., 4, 341 (1970)
19. M. Takai, Y. Shimizu and J. Hayashi, 4th Inter. Conf. Chitin and Chitosan, pp 431-436, Norway (1988)
20. S. J. Kim, Y. M. Lee, Y. K. Sung, I. K. Kang and Y. H. Park, J. Kor. Ind. & Eng. Chem., 4(4), 785 (1993)
21. 矢吹 稔 外 多, キチン・キトサン, 4章, 日本 技報堂出版 (1992)

### =국문초록=

키틴의 글루코사민 단위에 클로로프로판, 산화프로필렌 그리고 클로로프로판 디올을 반응시켜 프로필 키틴(PPC), 히드록시프로필 키틴(HPC), 디히드록시프로필 키틴(DHPC) 등의 에테르 형태의 키틴 유도체를 합성하였고 이들을 99 % 포름산에 용해시켜 고분자 농도 30 wt% 이상에서 콜레스테릭 한 유방성 액정을 형성하였다. 액정이 형성된 용액으로부터 필름을 제조하여 라이소자임이 포함된 유사 체액, pH 1.2, pH 6.7 그리고 pH 8.2 용액에서 *in vitro* 분해 정도를 관찰한 결과 처음 1주일에서 급격하게 분해되었으며 중성 영역에서 큰 무게 감소와 기계적 강도가 감소하였다. 세가지 시료들 중 DHPC가 가장 좋은 생분해 정도를 나타냈다.