

곤충유래 키틴/키토산의 구조특성

이광길 · 이용우 · 권해용 · 여주홍 · 박인규* · 남 진* · 설광열

농업과학기술원 잠사곤충부
*서울대학교 농업생명과학대학

Structural Characteristics of Insect Chitin/Chitosan

Kwang Gill Lee, Yong Woo Lee, Hae Yong Kweon, Joo Hong Yeo
In Kyu Park*, Jin Nam* and Kwang Youl Seol

Department of Sericulture & Entomology, National Institute of Agriculture Science &
Technology, Suwon, 441-100, Korea

*College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University,
Suwon, 441-744, Korea

ABSTRACT

The chitin was isolated from various kinds of insects such as exuvia of *Psacotheta hilaris* Pascoe, silkworm pupa, *Agrius convolvuli* or from cuticle of cockroach by treatment with dilute HCl and NaOH. The chemical and crystalline structure was characterized by FT-IR and X-ray diffractometer. All of the chitins extracted from insects showed characteristic α -chitin peaks at the Bragg angle $2\theta=9.3^\circ$, 19.4° , and 23.5° by X-ray diffraction analysis. The transition from chitin to chitosan was confirmed by IR spectra and the degree of deacetylation of the crab shell, silkworm pupa, cockroach, and *Psacotheta hilaris* Pascoe was 70.9, 76.4, 75.5, and 74.1%, respectively. The double diffraction peaks of insect chitosan were observed at $2\theta=10^\circ$ and 20° , indicating the characteristic of hydrated crystalline structure of chitosan.

Key words : Chitin, Chitosan, Insect, Silkworm pupa, α -chitin

서 론

일반적으로 게껍질이나 새우로부터 추출되는 키틴은 N-acetyl- β -D-glucosamine 잔기가 1 → 4 결합한 대표적인 천연고분자로서 자연계에서 셀룰로오스 다음으로 많이 존재한다. 키틴은 게나 새우 등 갑각류 이외에 오징어와 같은 연체동물, 곰팡이, 효모, 버섯 등의 세포벽에도 존재하며 누에, 풍뎅이, 귀뚜라미 등 곤충류에도 다량 존재하는 것으로 알려져 있다. 키틴은 아미노아세틸기간에 형성된 분자 주쇄간의 강한 결합력과 높은 결정성 때문에 적절하게 용해 또는 팽윤시킬 수 있는 용매가 발견되지 않고 있으며, 키틴의 결정구조는 채취되는 동물이나 식물의 종류

및 부위에 따라서 α , β , γ 형의 결정구조로 분류된다 (Roberts 1992).

키틴의 탈아세틸화 산물인 키토산(poly-D-glucosamine)의 결정구조는 여러 가지 polymorph이 보고 되어 있으나 크게 나누면 수화형 구조와 무수형 구조로 나눌 수 있다(Ogawa 1991). 또한 키틴은 반응성이 풍부한 아미노기(-NH₂)와 수산기(-OH)가 존재하며 급속이온 흡착성, 항균성, 생체적합성, 창상치료 촉진효과 및 황산화유도체의 항응혈작용 등의 가능성이 있는 것으로 밝혀져 (大浦와 皆川 1992, Hirano et al. 1985) 醫用소재로서의 적용 가능성이 높은 것으로 평가되고 있다. 최근 키틴/키토산에 대한 연구 동향은 의용소재, 향장첨가물 및 의약품 등의 분야로 집중되고 있다.

키틴/키토산에 대한 연구는 주로 게나 새우 등 갑각류에서 분리한 재료를 중심으로 연구가 진행되어

본 논문은 농촌진흥청 특정과제 연구비 지원에 의하여 수행된 연구과제 중 일부입니다.

왔으며 최근 Haga and Zhang(1998)은 누에와 딱정벌레 키틴/키토산의 성분 분석을 보고한 바 있으나 곤충유래 키틴/키토산의 구조적 특성에 대한 체계적인 연구결과는 보고되어 있지 않다. 한편 최근에 들어 곤충의 제대 및 대량사육 기술체계가 확립되어가고 있으므로 곤충자원의 활용도를 높이기 위한 기초연구의 일환으로 누에 번데기, 울도하늘소, 박각시나방, 바퀴벌레 등의 곤충으로부터 키틴을 추출한 후 탈아세틸화시켜 키토산을 제조하여 그 구조 특성을 구명하기 위하여 X-선 회절분석과 적외선 분광분석을 행하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

곤충유래 키틴/키토산을 제조하기 위하여 누에번데기 (silkworm pupa), 울도하늘소(*Psacotheta hilaris* Pascoe) 및 박각시나방(*Agrius convolvuli*) 탈피각, 바퀴벌레 (cockroach)의 껍질 등을 실험재료로 사용하였다.

2. 키틴/키토산의 제조

1) 키틴의 제조

곤충 키틴의 제조 방법은 상기 실험재료에서 di-phenol류 및 calcium carbonate 등의 무기염류를 제거하기 위하여 질소기류하에서 1 N 염산수용액으로 100°C에서 30분간 처리한 후 증류수로 중성이 될 때까지 세척하여 진공건조하였다. 또한 탈피각 등에 남아있는 단백질 및 지질을 제거하기 위하여 1 N 수산화나트륨으로 80°C에서 36시간동안 처리하였으며 매 12시간 마다 수산화나트륨 용액을 교환하였다. 수산화나트륨 처리후에는 증류수로 중성이 될 때까지 세척한 후 진공건조하여 키틴을 제조하였다.

2) 키토산의 제조

위에서 제조한 키틴을 40% 수산화나트륨용액에 넣고 질소기류하에서 110°C에서 4시간 동안 탈아세틸화 반응후 증류수로 수회 세척하여 키토산을 제조하였다. 제조된 키토산을 정제하기 위하여 2% 아세트산으로 녹인 후 불용성 물질을 제거하였으며, 1 N 수산화나트륨을 서서히 첨가하여 정제된 곤충 키토산을 제조하였다.

3. 분석

1) 구조분석

곤충 키틴/키토산의 구조 특성을 파악하기 위하여 일본 Rigaku사의 D-MAX-3 Diffractometer를 이용하여 30 kV, 20 mA에서 Cu K α 단색광으로 측정하였

다. 적외선 분광분석은 FT-IR spectrometer(M series, Midac Co., USA)를 이용하였으며 키틴은 KBr을 혼합하여 제조한 펠렛으로, 키토산은 2% 아세트산에 녹여서 만든 필름으로 적외선 분광분석을 행하였다.

2) 탈아세틸화도 측정

곤충 키토산의 적외선 분광스펙트럼에서 1655 cm⁻¹과 3450 cm⁻¹의 상대적인 흡광도를 이용하여 Baxter et al.(1992)의 식 (1)에 따라 탈아세틸화도를 구하였다.

$$D(\%) = 100 - \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times 115 \quad (1)$$

여기서, D는 탈아세틸화도

A₁₆₅₅는 1655 cm⁻¹에서의 흡광도

A₃₄₅₀는 3450 cm⁻¹에서의 흡광도이다.

3) 평균분자량 측정

굴절률(viscotek LR125 detector) 및 점도, 광산란 검출기(viscotek Model T60 detector, Dual mode)를 장착한 겔투과 크로마토그래피(GPC, Viscotek Co.)를 이용하여 곤충 키토산의 분자량을 측정하였다. 표준 물질은 PEO(polyethylenoxide)를, 칼럼은 Tosoh PW XL(7.8 mm ID×30 cm)를 사용하였으며, 칼럼의 온도는 35°C를 유지하였다. 용출액은 0.2 M sodium nitrite와 0.2 M acetic acid 혼합액을 사용하였으며 유속은 1 ml/min으로 하였다. 시료는 2% 아세트산에 녹여서 0.2 μ m의 syringe용 여과기로 여과하였다.

결과 및 고찰

1. 곤충 키틴의 구조특성

바퀴벌레, 박각시나방, 누에번데기, 울도하늘소 등 곤충으로부터 추출한 키틴의 X-선 회절 분석 결과를 살펴보면 그림 1과 같다. 곤충 키틴은 모두 2 θ =9.3°에서 면간격 9.53 Å인 (020)면의 회절 피크가 나타나고 2 θ =19.4°에서 면간격 4.57 Å에 해당하는 (110)(040)면에 대한 회절 피크가 나타나며 2 θ =23.5°에서 3.78 Å에 해당하는 (130)면에 대한 회절 피크가 나타났다.

키틴의 결정구조는 생물체의 종류와 추출 부위에 따라 차이가 있으며 현재까지 키틴은 α , β , γ 형의 결정구조를 가지는 것으로 알려져 있다. 오징어껍질 등에서 발견되는 β -키틴은 인접하는 분자쇄가 평행하게 배열되어 있으며 자연계에서 존재비율이 적다. 게나 새우 등 갑각류에서 흔히 발견되는 α -키틴은 키틴 분자쇄가 서로 역방향으로 배열되어 분자내 및 분자간 수소결합을 이루고 있으며 결정구조가 매우 안정한

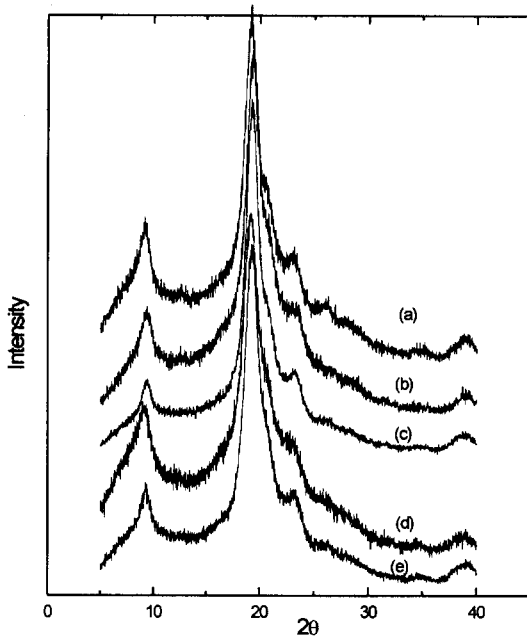


Fig. 1. X-ray diffractograms of various insect chitins. (a) crab shell, (b) cockroach, (c) *Agrius convolvull*, (d) silkworm pupa and (e) *Psacotheta hilaris* Pascoe

것으로 알려져 있다. 또한 사방정계의 결정구조로 되어 있는 α -키틴의 결정격자상수는 $a=4.74 \text{ \AA}$, $b=18.86 \text{ \AA}$, $c=10.32 \text{ \AA}$ 로 알려져 있으며 γ -키틴의 구조는 아직 확실하게 밝혀져 있지 않다(Roberts 1992).

본 실험에서 사용한 곤충으로부터 추출한 키틴의 경우 그림 1에서 보는 바와 같이 전형적인 α -키틴의 X-선 회절곡선을 나타내고 있었으며 누에번데기, 울도하늘소 등 곤충의 종류에 상관없이 동일한 결정구조로 이루어져 있었다.

곤충 키틴의 적외선 분광 스펙트럼을 그림 2에 나타내었다. 키틴의 경우 3460 cm^{-1} 에서 수소결합에 참여하는 OH 신축진동 흡수대와 3270 cm^{-1} 의 NH 신축진동 흡수대가 나타나고 있으며 박각시나방, 울도하늘소 등 곤충 키틴의 amide I 즉 C=O 기의 신축진동 흡수대가 1660 cm^{-1} 과 1620 cm^{-1} 로 분리되어 두 개의 피크로 나타났다. 대표적인 키틴의 결정구조인 α -키틴과 β -키틴의 적외선 분광 스펙트럼상의 차이는 amide I의 흡수대가 α -키틴의 경우에는 두 개의 흡수대로 나타나며 β -키틴의 경우에는 하나의 흡수대로 나타나는 것이다(Takai *et al.* 1989).

곤충 키틴의 적외선 분광분석 결과 곤충의 종류와 무관하게 실험에 사용한 곤충은 모두 α -키틴의 결정구조를 가지고 있는 것으로 판단되며 이는 X-선 회절

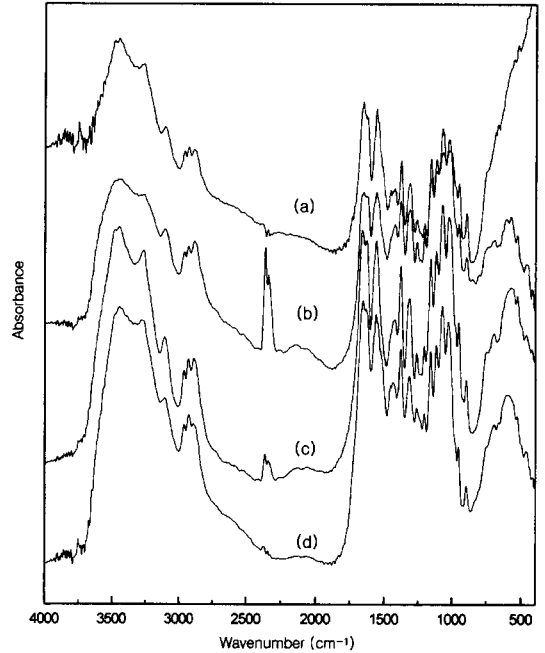


Fig. 2. IR spectra of various insect chitins. (a) silkworm pupa, (b) crab shell, (c) *Psacotheta hilaris* Pascoe and (d) *Agrius convolvull*

분석의 결과와 잘 일치한다.

2. 곤충키토산의 적외선 분광분석 및 분자량

곤충 키틴을 수산화나트륨으로 처리함으로써 얻어지는 탈아세틸화 산물인 키토산은 개미산, 아세트산 등의 묽은 산에 용해되는 특성이 있다. 곤충 키토산을 2% 아세트산에 녹여 제조한 필름의 적외선 분광 스펙트럼은 그림 3과 같다. 곤충 키틴(그림 2)은 1650 cm^{-1} 부근에서 나타나는 C=O 기의 적외선 흡수대가 뚜렷하게 나타나지만 그림 3에서 보는 바와 같이 곤충 키토산에는 C=O기에 기인하는 흡수대가 사라져 탈아세틸화 반응에 의하여 곤충 키틴이 키토산으로 전환되었음을 확인하였다.

키토산의 탈아세틸화도를 측정하는 방법은 FT-IR, NMR, UV, GPC, colloidal titration, elemental analysis, circular dichroism, picric acid method 등이 있으나 적외선 분광분석을 이용하는 것이 간단하면서도 빠른 방법이므로 본 연구에서는 Baxter *et al.* (1992)의 식에 의하여 곤충 키토산의 탈아세틸화도를 계산하여 표 1에 나타내었다. 시판 계절집 키토산의 경우 70.9%의 탈아세틸화도를 나타내었으며 누에번데기, 바퀴벌레, 울도하늘소 등 곤충 키토산의 경우에는 다소 높은 74.1~76.4%의 탈아세틸화도값을 나타

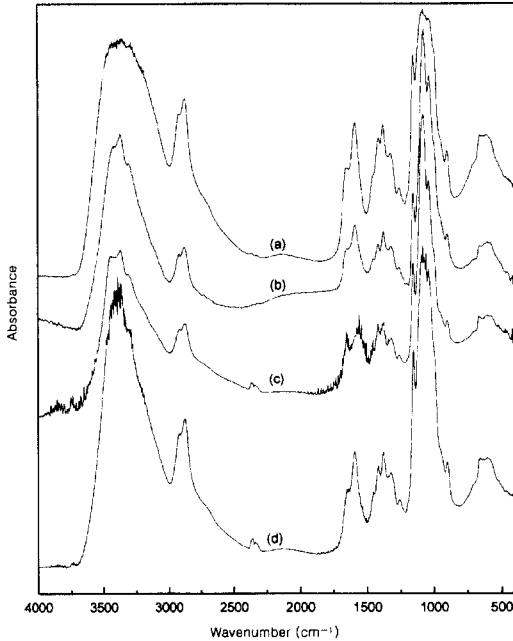


Fig. 3. IR spectra of various insect chitosans. (a) silkworm pupa, (b) *Psacotheta hilaris* Pascoe, (c) crab shell and (d) cockroach

Table 1. Degree of deacetylation and molecular weight of insect chitosan

Origin of chitosan	Degree of deacetylation(%)	Molecular weight
Crab shell	70.9	200,000
Silkworm pupa	76.4	193,000
Cockroach	75.5	169,100
<i>Psacotheta hilaris</i> Pascoe	74.1	132,800

내었다. 또한 곤충 키토산의 성질에 많은 영향을 미칠 것으로 생각되는 분자량을 GPC를 이용하여 측정한 결과 13만~19만 정도의 분자량을 가지는 것으로 나타났다.

키토산은 키틴의 탈아세틸화 산물로서 키토산의 탈아세틸화도와 분자량은 인장강도, elongation 등 물리적 성질(Blair *et al.* 1987, Mochizuki *et al.* 1989, Chen *et al.* 1994), 형태학적 구조(Samuels 1981), 결정화도(Ogawa *et al.* 1992), 열적 성질 및 투과성질(Chen and Hwa 1996) 등에 영향을 끼치는 중요한 요소라고 알려져 있다. 분자량의 감소없이 키토산의 탈아세틸화도를 높이는 방법으로 알칼리 처리방법

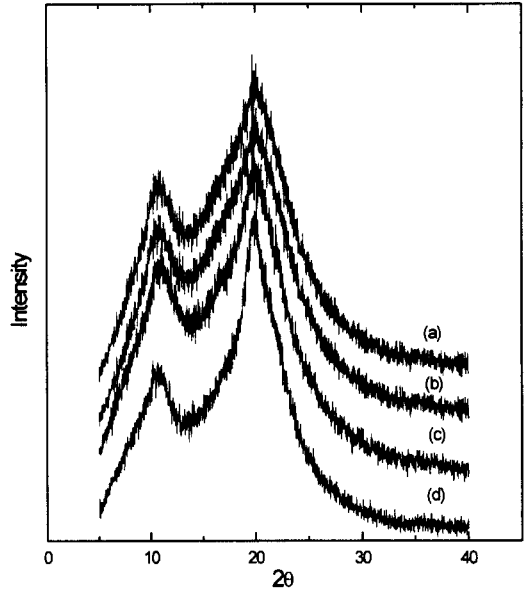


Fig. 4. X-ray diffractograms of various insect chitosans. (a) crab shell, (b) cockroach, (c) silkworm pupa and (d) *Psacotheta hilaris* Pascoe

(Mima *et al.* 1983)과 초음파를 이용하는 방법(Wang and Qin 1989) 등이 보고되어 있다.

3. 곤충 키토산의 구조

곤충 키토산의 결정구조를 살펴보기 위하여 X-선 회절분석을 행한 후 그 결과를 그림 4에 나타내었다. 누에 번데기, 울도하늘소, 바퀴벌레 등 곤충 키토산의 경우에는 그림에서 보는 바와 같이 10° 부근과 20° 부근에서 강한 회절 피크를 보였으며 계집질에서 추출한 키토산도 같은 위치에서 강한 회절 피크를 나타내었다.

키토산은 Tendon, L-2 결정, anhydrous 등 여러 가지 결정구조들이 보고(Clark and Smith 1937, Sakurai *et al.* 1985, Ogawa *et al.* 1984)되어 있으나 크게 나누면, 키토산의 결정구조는 수화형 결정구조와 무수형 결정구조로 나눌 수 있다(Ogawa 1991, Ogawa *et al.* 1992). 이들간의 차이는 단위격자내에 존재하는 물분자 개수의 차이에 따른 것으로 단위세포내의 키토산 분자간의 밀착정도에 기인하는 것으로 알려져 있다. Annealed polymorph는 무수형태로서 화학적, 생물학적 활성을 상실하는 것으로 알려져 있으며, 수화형태의 결정구조와 무수형태의 결정구조간의 X-선 회절곡선의 차이는 수화형태는 10° 부근에서 (020)면에 기인하는 강한 회절 피크를 나타내고 무수형태는 15° 부근

에서 (120)면에 기인하는 강한 회절 피크를 나타내며 이들 회절 피크는 각각의 회절곡선상에서 가장 낮은 각에서 나타나는 회절 피크이다(Ogawa 1991). 따라서 누에 번데기, 울도하늘소, 바퀴벌레 등에서 추출한 곤충 키토산은 10° 부근에서 강한 회절피크를 나타내고 있으므로 생물학적, 화학적 활성이 있는 것으로 알려진 수화형태의 결정구조로 되어 있음을 알 수 있었다.

본 실험에서 사용한 누에번데기, 울도하늘소, 바퀴벌레 등 곤충유래 키틴/키토산의 경우 계집질 유래 키틴/키토산과 구조 특성에서는 큰 차이가 발견되지 않았으며, 곤충 키틴/키토산에도 구조 특성의 차이는 없었다. 그러나 곤충키토산은 생물학적, 화학적 활성을 나타낼 것으로 기대되므로 앞으로 곤충 키토산의 응용가능성에 대한 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 판단된다.

적 요

누에번데기, 울도하늘소, 박각시나방, 바퀴벌레 등 곤충자원에서 추출한 키틴과 이것을 탈아세틸화시켜 제조한 키토산의 구조 특성을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. X-선 회절 분석과 적외선 분광분석 결과 곤충유래 키틴은 2θ=9.3°, 19.4°, 23.5°에서 강한 회절 피크를 나타내고 amide I의 흡수대가 2 개의 피크로 나타나는 등 곤충의 종류와 무관하게 모두 전형적인 α-키틴의 결정구조로 이루어져 있었다.
2. 곤충유래 키토산의 형성은 적외선 분광분석 결과 카르보닐기의 사라짐으로 확인하였으며 탈아세틸화도 74.1~76.4 %, 분자량은 13만~19만이었다.
3. 곤충키토산은 2θ=10°, 20°부근에서 강한 X-선 회절피크를 나타내어 화학적, 생물학적 활성을 띠는 수화형태의 결정구조를 가지고 있었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 농업특정연구개발사업 과제의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 관계자 여러분들께 감사의 말씀을 드립니다.

인용문헌

Baxter, A., M. Dillon, K. D. A. Taylor, and G. A. F. Roberts(1992) Improved method for IR determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, **14**: 166-169.
 Blair, H. S., J. Guthrie, T. Law, and P. J. Turkington

(1987) Chitosan and Modified Chitosan membranes. 1. Preparation and Characterization. *J. Appl. Polymer Sci.*, **33**: 641-656.
 Chen, R. H., J. H. Lin, and M. H. Yang(1994) Relationship between the chain flexibilities of chitosan molecules and the physical properties of their casted films. *Carbohydrate Polym.*, **24**: 41-46.
 Chen, R. H. and H. D. Hwa(1996) Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. *Carbohydrate Polym.*, **29**: 353-358.
 Clark, G. L. and A. F. Smith(1937) *J. Phys. Chem.*, **40**: 863-879.
 Haga, A., and M. Zhang(1998) Preparation of chitin from cuticle of silkworm and beetle. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **67**: 17-21.
 Hirano, S., Y. Tanaka, M. Hasegawa, K. Tobetto and A. Nishioka(1985) Effect of sulfated derivatives of chitosan on some blood coagulation factors. *Carbohydr. Res.*, **137**: 205-215.
 Mima, S., M. Miya, R. Iwamoto, and S. Yashikawa (1983) Highly Deacetylated Chitoans and its Properties. *J. Appl. Polym. Sci.*, **28**: 1909.
 Mochizuki, A., Y. Sato, H. Ogawa, and S. J. Yamashita(1989) Pervaporation separation of water-ethanol mixtures through polysaccharide membranes 3. the permselectivity of the neutralized chitosan membrane and the relationships between its permselectivity and solid state structure. *J. Appl. Polym. Sci.*, **37**: 3385-3398.
 Ogawa, K., S. Hirano, T. Miyaniishi, T. Yui, and T. Watanabe(1984) *Macromolecules*, **17**: 973-975.
 Ogawa, K.(1991) Effect of heating on aqueous suspension of chitosan on the crystallinity and polymorphs. *Agric. Biol. Chem.*, **55**: 2375-2379.
 Ogawa, K., T. Yui, M. Miya(1992) Dependence on the preparation procedure of the polymorphism and crystallinity of chitosan membranes. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**(6): 858-862.
 大浦武彦, 皆川英彦(1992) 西日皮膚, **54**: 998.
 Roberts, G. R. T.(1992) "Chitin Chemistry", Macmillan.
 Sakurai, K., T. Shibano, K. Kimura, and T. Takahashi (1985) Crystal structure of chitosan. II. molecular packing in unit cell of crystal. *Sen-i Gakkaishi*, **41**: T361-368.
 Samuels, R. J.(1981) Solid state characterization of the structure of chitosan films. *J. Polym. Sci., Phys.*, **19**: 1081.
 Takai, M., Y. Shimizu, J. Hayashi, Y. Uraki, S. Tokura(1989) "Chitin and Chitosan" p434, Elsevier Applied Science.
 Wang, W. and W. Qin(1989) *Chemistry Bulletin* (in Chinese), **9**: 44.