

수산계 폐자원인 꽃게껍질로부터의 다양한 키틴의 제조

김종완 · 황성규 · 이기창 · 이한섭* · 박종주**

명지대학교 화학공학과, *용인대학교 환경보건학과

**명지대학교 화학과

Preparation and Characterization of Various Chitin from *Protunus Trituberculatus* Shells Such As Waste Marine Sources

Jong Woan Kim, Sung Kwy Hwang, Ki Chang Lee,

Han Seab Lee* and Jong Joo Park**

Department of Chemical Engineering, MyongJi University, Yongin, Korea

*Department of Environmental Health, Yongin University, Yongin, Korea

**Department of Chemistry, MyongJi University, Yongin, Korea

ABSTRACT

Chitin is known as biodegradable natural polymer. In spite of various application of chitin derivatives from waste marine sources, commercial use of chitin has been limited due to high resistance to chemicals and the absence of proper solvents. We chitin prepared through the decalcification, bleaching and deproteination from *Protunus trituberculatus* shells by change of Hackman's method. Also, Microcrystalline chitin made by hydrolysis that was reduce made of resistance solvents used by dilute hydrochloric acid, ultrasonic and hydrogen peroxide. Crosslinked chitin derivatives were prepared from chitin with crosslink agents(epichlorohydrin, 1,3-dichloropropanol) followed by crosslinkage at 6C position. The effects of these parameters on chitin dervatives were investigated by IR, DSC, XRD, BET, PSA and SEM. SEM analysis showed that both chitin and crosslinked chitin had a particle shaped morphology.

Keywords : *Protunus trituberculatus*, Chitin, Microcrystalline, Crosslinked, Waste marine sources

I. 서 론

최근에 천연고분자와 생분해성고분자 재료는 치료를 위한 약물방출조절용 매트릭스, 봉합사, 인공 피부 등의 의료부분과 범용 플라스틱, 농업용과 포장용 필름 등의 환경 부분에서 연구되고 있다. 자연계에서 cellulose 다음으로 지구상에 많이 존재하는 생분해성고분자의 일종으로 종전에는 이용되지 못하던 키틴유도체의 이용이 늘고 있다. 키틴은 glucosamine으로 이루어진 다당류로서 갑각류, 곤충류, 버섯, 연체동물과 조개류 그리고 곰팡이 등의 골격재료나 박테리아의 세포벽에 존재하며 종에 따라서 함량이 다르다.¹⁾ 게, 새우 등의 갑각류의 껍질

은 키틴과 30%이상의 단백질 및 탄산칼슘, 색소 등으로 구성되어 있으므로 빠른 부패에 의한 악취발생, 낮은 용해도 등으로 인하여 폐기물로 취급되어 왔으나 최근 자연자원의 활용면에서 환경, 식품, 의료 등의 용도로 이용되고 있다. 전세계적으로 해마다 폐기되는 키틴의 양은 150,000톤으로 추산되나 실제 산업에 이용되는 양은 약 35,000톤 정도뿐이다.²⁾ 이러한 풍부한 생물자원으로써 키틴은 분자량이 100만 이상이며, 키틴은 β -1,4 결합을 하고 있는 선상중합체로서 섬유상 구조를 쉽게 이루고 있다. 또한 키틴은 cellulose와 유사한 구조를 가지고 있으나 chitinase 및 lysozyme 등에 의해 분해되거나 포름산, 염산 등의 용매에 팽윤될 뿐 대부분의 유기

용매에 용해되지 않으므로 가공이 어려워 키틴 자체 보다는 키틴유도체로 이용하고 있다. 그 이유는 키틴 분자내의 아세틸아미드기와 C-6의 히드록시기의 강한 수소결합에 의한 micelle 구조 때문이다.³⁾ 이용분야의 예로 환경분야를 살펴보면 키틴유도체는 중금속 이온에 대한 우수한 선택적 흡착능으로 중금속 흡착제,⁴⁾ 폐수처리제,⁵⁾ 제지폐수 응집제⁶⁾ 등의 환경분야에서 요구되는 좋은 조건들을 구비하고 있으므로 이 분야에서의 용도가 더욱 확대될 것이다. 또한 식품분야에서는 키틴을 가수분해하여 저분자량 물질인 Microcrystalline chitin(MCC)으로 제조하면 동물실험결과 biofidobacteria를 증식시키는 효과를 나타낸다고 하며, 식품에 첨가할 경우 점도상승제와 안정제의 용도로 현재 사용되고 있는 Microcrystalline cellulose보다 기능적으로 훨씬 우수하다고 알려져 있다.⁷⁾ 그리고 chitinase기질, 다이어트 식품, 제약산업에서 접합제, 유화제와 빵부피를 증가시키는 첨가제로서 사용할 수 있으며⁸⁾ 또한 수의임상분야에서 키틴유도체를 함유한 생리활성 물질을 외상을 입은 동물에 처방하여 부작용이 없이 치료효과를 보았다고 한다.⁹⁾ 본 연구에서는 수산계 폐기물로만 인식되어온 꽃게의 등껍질을 이용하여 활용분야가 다양하지만 용해성과 가공성이 어려워 이용하기 부적당한 키틴을 과량의 산-염기처리를 하는 기존방법을 응용하여 제조하고 이를 다시 반응 조건을 달리하여 다양한 키틴유도체를 제조하였다. 이에 따르는 키틴유도체의 분석확인 및 구조적 특성 및 구조변화를 관찰하여 활용분야에 따라 요구되는 키틴유도체의 제조방법을 연구하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시약

키틴 제조용 원료는 수산계 폐기물인 꽃게(*Protonus trituberculatus*)의 등껍질 부분을 구입, 선별하여 증류수로 여러번 세척한 후 건조하고 파쇄하여 사용하였다. 키틴의 용해시 용매로 이용한 N,N-Dimethylacetamide(DMAc)와 Lithium chloride(LiCl)은 미국 Aldrich Chem.사의 특급을 사용하였다. 다양한 키틴유도체의 제조를 위하여 hydrogen peroxide(H_2O_2), 가교제인 epichlorohydrin(ECH), 1,3-dichloropropanol(DCP)은 Aldrich Chem.사의 G.R급을 사용하였으며, 그 밖의 무기시약과 에테르, 에탄올 등의 용매는 국산인 덕산화학 제품을 그대로

사용하였다.

2. 분석 방법

키틴유도체의 분석과 구조적 특성은 다음의 기기와 분석방법을 이용하였다.

1) IR에 의한 구조 분석

꽃게의 등껍질로부터 제조한 키틴유도체의 구조 분석은 KBr pellet법을 이용하여 미국 Bio-RAD사의 FTS형 FT-IR을 사용하여 $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 사이에서 나타나는 IR 스펙트럼을 측정하였다.

2) DSC에 의한 열시차 분석

DSC는 일본 Shimadzu사 DSC-50을 이용하여 각각의 시료량을 0.5 mg을 취하여 질소 기류하에서 승온속도를 $20^\circ\text{C}/\text{min}$ 로 하여 열시차 분석을 하였다.

3) SEM에 의한 구조변화

제조한 키틴유도체의 형태변화와 표면구조를 관찰하기 위하여 시료를 완전 건조한 후 골드로 이온코팅(IB-5, Eiko Co.)하여 미국 RJ. Lee Group사의 P-75 personal SEM을 이용하여 가속전압 5~20 kV인 상태에서 100~5000배의 배율로 관찰하였다.

4) 점도 측정

제조한 키틴유도체의 겔보기 점도측정시 측정용 매로는 LiCl와 DMAc용액을 사용하였는데 LiCl/DMAc용액을 만드는 과정은 우선 수분을 제거하기 위하여 120°C 에서 2시간 건조시킨 LiCl을 5.0%(w/w)가 되도록 DMAc용액에 넣어서 용해시켰다. 후에 제조한 키틴유도체 1.0 g을 LiCl/DMAc용액 50 ml에 넣고 완전 용해시켜 만든후, Brookfield점도계 LVF형을 이용하여 20°C , spindle No. 1, 100 rpm에서 점도를 측정하였다.

5) X-선 회절(X-ray diffraction) 분석

제조한 키틴유도체의 결정구조는 X-ray diffractometer(X' pert, Philips사)를 사용하여 분말처리 방법으로 측정하였으며 이때의 분석조건은 $\text{CuK}\alpha$ (Ni-filter), 50 kV, 30 mA를 사용하여 2θ ; $5\sim 40^\circ$ 의 범위에서 측정하였다.

6) BET에 의한 비표면적 측정

제조한 키틴유도체는 150°C 에서 30분 동안 탈수 분 반응을 실시하여 수분을 완전히 제거한 후 미국 Micromeritics사의 pulsechemisorb2700을 사용하여 질소흡착에 따른 공극내의 비표면적을 측정하였다.

7) PSA에 의한 평균 입자크기의 측정

제조한 키틴유도체의 평균 입자크기(Mean Particle Size)는 이스라엘제 Galai-cis-1 Particle Size

Table 1. Composition of protunus trituberculatus shells

Composition	Content(%)
Ash	57.9
Chitin	17.1
Protein	10.3
Lipid	0.3
Moisture	12.9
Others	1.5
Total	100

Analysers를 사용하였으며 시료가 증류수에 팽윤되는 것을 고려하여 15초간 분산시킨 후 즉시 측정하고 이를 3회 반복 측정하여 그 평균값으로 결정하였다.

3. 키틴의 제조

꽃게의 등껍질 부분을 선별하여 증류수로 깨끗이 수세하여 이물질을 제거하였다. Table 1에서와 같이 꽃게의 등껍질은 회분의 함량이 비교적 높고 단백질 함량은 낮다고 보고되어 있다.¹⁰⁾

갑각류의 껍질에는 키틴이외에 단백질, 색소, 탄산칼슘 등을 포함하고 있으므로 Hackman의 단리법¹¹⁾에서 응용하였다. 즉, 실온의 2N-HCl 수용액에 36시간동안 침적, 분해시키고 15°C, 3.0% NaOH 용액에서 24시간 침적하여 이를 다시 3회 반복처리한 후 3.0 % H₂O₂ 수용액에서 6시간 처리하는 방법이 지만 본 연구에서는 과량의 산-염기처리와 반응시간을 줄이기 위하여 반응시간과 조건을 달리하여 제조하였다.

1) 탈탄산칼슘 반응

입자크기를 최소화하여 반응면적을 크게하기 위하여 분말형태로 파쇄한 꽃게의 등껍질을 증류수에 청결하게 세척한 후, 감압건조하였다. 건조시킨 200 g을 실온에서 2N-HCl 수용액에 12시간 동안 침적시켜서 탄산칼슘을 석출한후, 분리하여 증류수에 수회 세척하고 감압건조하고 분해하는 탈탄산칼슘 반응을 실시하였다. 이렇게하면 조직내에 엉겨있던 탄산칼슘(CaCO₃)이 CO₂와 CaCl₂로 분해된다.

2) 탈색소 반응

탈탄산 칼슘반응을 실시한 계껍질을 증류수로 충분히 세척한 후, 5.0% H₂O₂/0.5N-HCl 수용액으로 12시간동안 교반하여 색소를 산화시켰다. 일반적으로 색소와 지방질은 유기용매로 처리하여 제거할 수도 있으나 탈탄산칼슘과 단백질 제거단계에서 지방

질은 거의 제거되고 색소도 제거되므로 과산화수소를 사용하는 표백만으로 백색의 키틴 분말을 만들 수 있다.

3) 탈단백질 반응

키틴은 알칼리에 안정하므로 꽃게 등껍질은 알칼리 처리를 하였다. 알칼리의 농도와 온도, 반응시간 등을 조절하면 꽃게 등껍질의 조직에 결합하여 있는 단백질을 충분히 제거할 수 있다. 본 실험에서는 탈탄산칼슘과 탈색소 반응을 실시한 후 중성처리한 키틴분말을 10°C이하의 5.0% NaOH 용액에서 5시간 교반하였다. 이와같은 반응을 2회 반복처리한 후에 증류수로 충분히 세척하여 중성처리한 후 건조시켜서 백색의 키틴분말 약 90 g을 얻었다.

3. 키틴유도체의 제조

1) Microcrystalline chitin(MCC)의 제조

키틴을 가수분해하는데는 chitinase와 같은 효소를 사용할 수 있으나 상업적으로 효소의 가격은 1g 당 250\$ 이상의 고가로 시판되고 있어서 경제적으로 이용하기가 부적합하다.¹²⁾ 그러므로 대부분이 강산으로 처리하여 사용하는데 10°C이하에서 12M-HCl,¹³⁾ 56.0% methanesulfonic acid¹⁴⁾ 등의 산 만을 사용하는 방법과 인산과 2.5M-HCl을 사용하여 고온에서 키틴을 팽윤시킨 후 고회전 혼합기를 이용하는 방법¹⁵⁾ 그리고 여러번 진한 산-염기로 반복처리한 뒤 강염산으로 처리하는 방법¹⁶⁾ 등이 있다. 이러한 공정은 강산을 이용하므로 MCC 제조후 사용된 산회수의 문제점이 나타난다. 그러나 MCC는 물리/화학적 방법을 동원하여 키틴의 결정화도와 분자량을 적정하게하여 이용하는 것으로서 분산능력이 우수하여 분산제로서의 가능성이 나타나고 있다. 본 연구에서는 강산을 사용하는 대신에 묽은염산을 사용하고 초음파와 과산화수소를 첨가하는 방법¹⁷⁾을 응용하여 산의 농도를 줄이는 대신에 산과 키틴입자와의 반응을 더욱 용이하게 하기위하여 물리적 방법인 초음파 반응시간을 연장시키는 방법을 사용하였다. 이 방법은 묽은염산을 사용하므로 산회수의 문제를 어느정도 해결할 수 있으며 80°C정도에서 반응을 시키므로 고압반응기가 필요가 없다. 이와같은 물리/화학적 방법으로 MCC를 제조하였다. 즉, 키틴 2.0 g을 10.0% 염산수용액 250 ml에 넣고 80°C에서 10시간 동안 교반하였다. 후에 30.0%의 과산화수소수용액을 5.0 ml를 넣고 Branson 1200(50 KHz) 초음파 발생기로 5시간 동안 처리하여 겔상태로 되는 것을 육안적으로 관찰

한 후, 백색 겔형태의 MCC를 제조하였다. 이를 중성이 될 때까지 세척한 후 유리판 위에 평평하게 바르고서 냉동건조하였다.

2) 가교키틴의 제조

본 연구에서는 또한 고분자 가교반응에 일반적으로 이용되는 가교제 중 ECH과 DCP를 사용하여 기존 키틴구조보다 결정성을 증가시켜서 내약품성이 우수하며 화학적으로 안정한 가교키틴을 제조하여 보았다. 각각 시료 11.0 g에 5.0%(w/w)LiCl/DMAc 용액을 300 ml를 가하고 항온조내에서 5°C이하의 저온으로 유지하면서 24시간 동안 교반한 후 각각, ECH와 DCP를 키틴의 단위체 glucosamine의 10배에 해당되도록 가하고 같은 조건에서 48시간 동안 가교반응을 실시하였다. 반응생성물은 증류수와 에탄올로 씻어서 용매와 미반응의 ECH와 DCP를 제거하고, 다시 0.1N-NaOH 수용액으로 3회 반복처리한 후 증류수, 에탄올 및 에테르의 순으로 씻은 후에 70°C에서 감압건조시켜 2종의 가교키틴을 제조하였다.

III. 결과 및 고찰

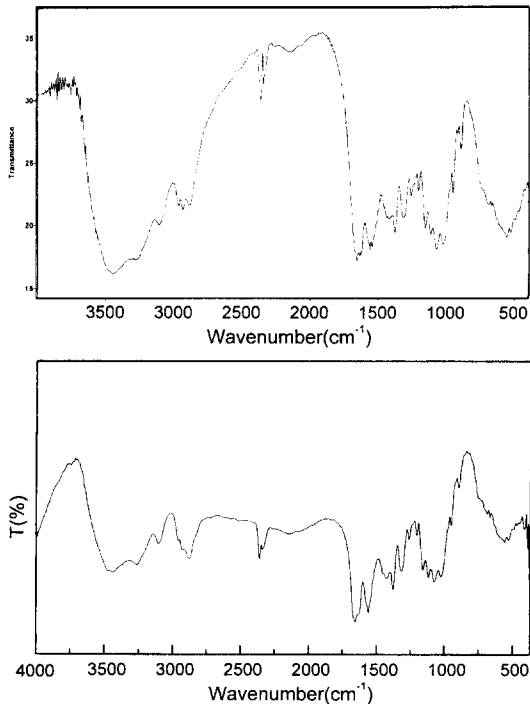


Fig. 1. IR spectrum of chitin(a) and MCC(b) from protunus trituberculatus shells.

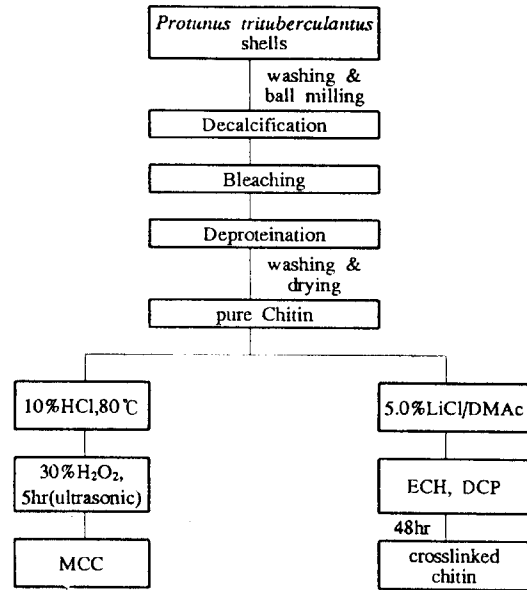


Fig. 2. Preparation of various chitin from protunus trituberculatus shells.

1. 키틴의 제조 확인

제조한 키틴의 IR 스펙트럼을 Fig. 1에 나타내었다. 키틴의 경우, 3200~3500 cm⁻¹부근에서 O-H stretching과 1650 cm⁻¹부근에서 amide I, amide II의 vibration을 확인할 수 있었다. 또한 3260, 3100 cm⁻¹에서 N-H bending stretching에 의한 특성흡수대를 확인할 수 있었다. MCC는 키틴의 화학적 구조를 바꾸는 것이 아니고 glucosamine으로 연결되어 있는 β-1,4 중합체 결합구조를 물리, 화학적 방법으로 끊어지게 하는 방법이므로 키틴과 MCC의 스펙트럼에서의 차이는 크지 않게 나타난다. Fig. 2는 꽃게 등껍질부분으로부터 키틴과 그 유도체를 제조하기까지의 제조과정을 나타낸 것이다.

3. 키틴유도체의 구조적 특성과 구조변화

꽃게로부터 제조한 키틴유도체의 형태변화와 입자의 표면구조를 주사현미경(SEM)을 이용하여 관찰하였다. Fig. 3(a)의 키틴의 경우 무정형의 굴곡이 있는 피상구조를 나타내고 있고 MCC(b)의 경우는 처리공정으로 인한 약간의 표면균열 및 침식현상을 나타내는 편상구조로 되어 있다. 가교키틴(c)의 경우는 X-선 회절분석에서도 볼수 있듯이 가교반응에 의한 결정상을 관찰할 수 있다. 그러나 결정성이 완전히 발달하지 못하여 결정표면에 무정형 입자들

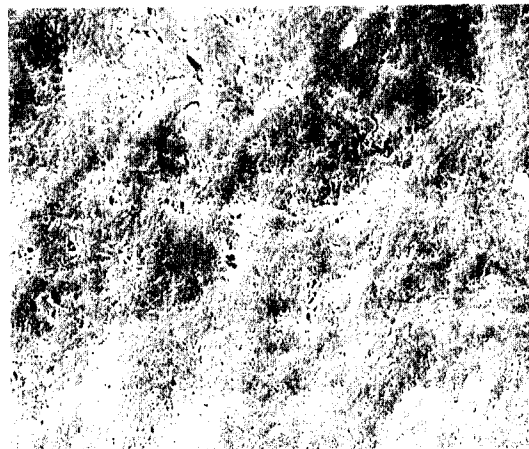


Fig. 3. SEM photographs of chitin(a), MCC(b) and crosslinked chitin[DCP](c).

이 달라 붙어 있는 결정상태를 보이고 있다. Fig. 4에는 키틴의 DSC 열시차분석을 나타낸 것이다.

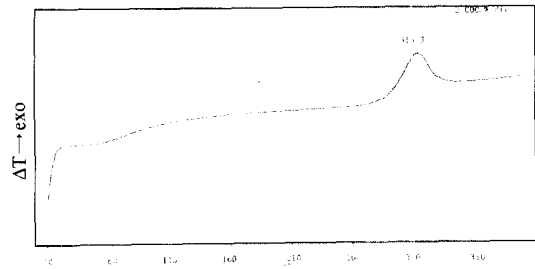


Fig. 4. DSC thermogram of chitin from protunus trituberculatus shells.

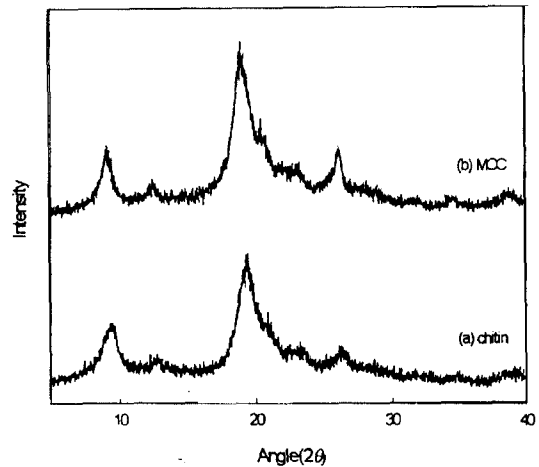


Fig. 5. X-ray diffraction patterns of chitin(a) and MCC(b).

313.3°C에서 발열피크로써 T_m (최종분해온도)값을 나타내었다. 키틴유도체의 X-ray 회절분석 결과는 Fig. 5, 6과 같다. 키틴의 경우 20; 10°와 19° 부근에서 결정성을 나타내는 특성 피크가 나타나 있다. 그리고 물리, 화학적 처리를 한 MCC의 경우 IR 스펙트럼에서 확인하였듯이 화학적 구조변화가 일어난 것이 아니므로 키틴의 경우와 비슷한 회절양상을 관찰하였다. 그러나 Fig. 6의 가교제(ECH)에 의한 가교 키틴의 경우 가교결합에 의한 결정성의 증가로 20; 19°와 28° 부근의 결정성 특성 피크가 키틴에서 보다 더욱 크게 증가된 회절양상을 나타내고 있다.

Table 2에는 꽃게로부터 제조한 키틴유도체의 비표면적을 나타내었다. 키틴 I은 본연구에서제시한 방법으로 반복처리한 것이며 키틴 III은 상용 키틴이다. 키틴 III보다도 키틴을 반복처리 제조하는 횟수에 따라 비표면적이 증가하였으며 입자크기는 약간

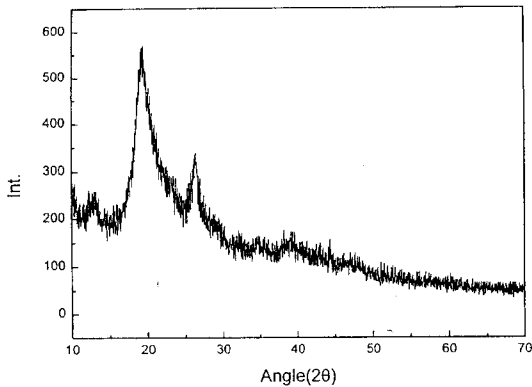


Fig. 6. X-ray diffraction patterns of crosslinked chitin [ECH].

Table 1. BET surface area and GMPS by the major structural features of chitin derivatives

Sample No.	Specific surface area[m ² /g]	GMPS [μm] ^(a)
Chitin I	30.36	18.54
Chitin II	24.43	19.37
Chitin III ^(b)	5.78	N/E ^(c)
Crosslinked chitin(ECH)	58.46	10.41
Crosslinked chitin(DCP)	89.29	9.85

* (a) GMPS: Geometric mean particle size

(b) Chitin III: Chitin from crab shells of sigma chem. Co.

(c) N/E: Not evaluated

감소하였다. 이는 키틴분자내의 사슬이 반복처리 과정에서 저분자화되어 비표면적이 증가하는 것으로 설명할 수 있으며 비표면적의 증가와 입자크기의 감소는 chitinase 또는 가수분해시 흡착 및 반응할 수 있는 부위를 증대시킬 수 있다고 생각된다. 가교 키틴은 가교제에 의하여 가교화되므로써 결정성의 증가로 비표면적이 증가하였고 입자크기는 감소하였다. 이는 중금속 흡착제 또는 폐수처리제로 이용시 그 흡착부분의 증가에 의한 흡착능 향상에 대한 가능성을 나타낸다고 생각된다.

IV. 결 론

환경오염과 자원고갈 등의 문제로 자원활용의 차원에서 중전에는 이용되지 못하고 수산계 폐자원으로 인식되어 오던 꽃게의 등갑질을 선별하여 활용분야가 다양한 키틴을 탈탄산칼슘, 탈색소와 탈단백질 반응을 통하여 제조하였고 저분자 물질인 Micro-

crystalline chitin(MCC)을 효소분해에 의한 방법이 아닌 묽은염산과 초음파를 이용한 물리, 화학적 방법으로 제조하였으며, 2종의 가교제(epichlorohydrin, 1,3-dichloropropanol)를 이용하여 화학적으로 안정하고 결정성을 증가시킨 가교키틴을 제조하였다. 이에 대한 IR, DSC의 분석확인과 비표면적(BET), X-선 회절분석, 입자크기(PSA), 주사현미경(SEM) 등을 이용하여 제조한 키틴유도체의 입자의 구조적 특성과 표면구조 변화 등을 연구하여 활용분야에 따르는 제조방법을 제시하였다. 그러나 더욱 키틴유도체의 이용분야와 생산단계에서 단가를 낮추는 방법과 생산단계에서 발생하는 강산, 강염기 등의 폐액처리 문제에 대한 연구에 노력하여야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Muzzarelli R.A.A.: Introduction of chitin, Chitin, Pergamon press, Oxford, 5, 1977.
- Tsurutani R., Yoshimura M.: Proceedigs of the 7th chitin-chitosan Symposium, Japanese Soc. for chitinand chitosan, **23**, 1993.
- Roberts G.A.: Structures, chitin chemistry, Macmillan, **52**, 1992.
- 차월석, 김종수: 새우껍질로부터 얻어진 키토산을 이용한 중금속 흡착에 관한 연구, 공업화학회지, **9**(4), 504, 1998.
- 최규석, 조성관: 부분 탈아세틸화된 키토산의 폐수처리 효과, 공업화학회지, **5**(5), 899, 1988.
- 정병욱, 정택상: Chitosan계 고분자 응집제 개발에 관한 연구, 공업화학회지, **9**(3), 451, 1998.
- 김종준, 전동원: 키틴/키토산의 산업적 응용, 고분자과학과 기술, **8**(5), 579, 1997.
- Hirano S.: Application of chitosan, Chitin and chitosan, Skjak-Braek Ed., Elsevier Applied Science, 37, 1988.
- Brzeski M. M., Ramisz A.: Advances in Chitin and chitosan, C. J. Brine Eds., Elsevier Applied Science, New York, 79, 1990.
- 김성배, 박태경: 새우껍질로부터 키틴의 분리, 생물공학회지, **9**(2), 174, 1994.
- Hackman R. H.: methods for preparation of chitin, *J. Bio. Sci.*, **7**, 168, 1954.
- Zikakis J. P., Castle J. E.: seperation of chitin from crab shells, *Methods Enzymol.*, **161**, 490, 1988.
- Shimahara K., Takiguchi Y.: characterization of prepared chitin by acid, *Methods Enzymol.*, **161**, 417, 1988.
- Hirano S., Nagao N.: Properties for complexes of chitosan/polyacrylic acid, *Agric. Biol. Chem.*, **52**(8),

- 211, 1988.
- 15) Dunn H. J., Farr M. P. : New methods for chitin analysis, U. S. Pat., 3,847,897, 1974.
- 16) Smirnof W. A. : Acid-catalyzed and Alkali-catalyzed chitin, U. S. Pat., 3,862,007, 1975.
- 17) 김성배 : 계집질로부터 Microcrystalline chitin 제조와 특성, 생물공학회지, **11**(4), 481, 1996.
- 18) 차월석, 나재운 : chitin, chitosan의 생산과 응용, 생물공학 News, **2**(4), 307, 1995.