

갑각류인 꽃게 껍질을 이용한 키틴/키토산의 제조에 관한 연구

황 용 현 · 정 덕 채*

(주)동보화학 기술연구소
*인천대학교 화학과

A Study on the Preparation of Chitin/Chitosan Using *Protunus Trituberculatus* Shells Such as Crustacea

Hwang, Yong-Hyun · Jung, Duk-Chai*

DONGBO S. C. CORP. Research Ins., Cheonan 333-890

*Dept. of chemistry, Incheon University

(Received Feb., 27, 1998)

ABSTRACT

Chitin/chitosan be known as biodegradable natural polymer. However, commercial use of chitin has been limited due to highly resistance to chemicals and the absense of proper solvents. Therefore, we was studied that chitin was prepared by the application of Hackman's method from *Protunus trituberculatus* shells. And another viscosity chitosan were prepared from chitin which were deacetylated under various concentration of alkali, reaction time and temperature by the application of Mima's method. And crosslinked chitin/chitosan was preparaed from chitin/chitosan with crosslink agent followed by crosslinkage. The major parameters for chitosan manufacturing methods were found to be concentration of alkali solution, reaction time and temperature etc. The effects of these parameters on chitin, another viscosity(molecular weight) chitosan and crosslinked chitin/chitosan were investigated by various analysis apparatus.

I. 서 론

자연계에서 셀룰로오스 다음으로 많은 키틴은 다당류로서 갑각류, 곤충류, 연체동물과 조개류 등의 거의 모든 동물류에 존재하고 있으며 종에 따라서 그 함량이 다르다¹⁾. 게, 새우 등의 갑각류의 껍질은 키틴과 30% 이상의 단백질, 탄산칼슘, 색소 등으로 구성되어 있어서 부패에 의한 악취 등으로 인하여 폐기되어 졌으나 최근에 환경, 식품, 의료 등의 용도로 이용되고 있다. 키틴의 구조는 셀룰로오스의 단

위체인 glucose의 -OH기가 -NHCOCH₃로 치환된 N-acetyl-D-glucosamine으로 구성되어 있고 셀룰로오스와 같은 β -1,4 결합으로 이루어진 천연생분해성 고분자이다. 키틴은 단위체의 구조에 따라 α , β , γ 의 polymorphic form으로 구분할 수 있는데 이들 구조 중 α -키틴이 가장 치밀한 형태이다. 키틴의 N-acetyl group을 deacetylation하여 amino group으로 치환된 키틴유도체가 키토산이다²⁾. 키틴/키토산은 1960년대에 Muzzarelli¹⁾에 의하여 체계적으로 연구가 시작되었으며 1970년대에는 식품공장의 폐수에서 유효물질을 회수하는 응집제로 사용

하기 시작하였고 지속적인 연구에 의해 환경, 의료, 식품, 효소 및 미생물의 고정화 담체, 농약 등의 다양한 분야에서 이용되고 있다. 한 예로 식품분야에서는 키틴을 가수분해하여 저분자 물질로 제조시 biofidobacteria를 증식시키는 효과를 나타낸다고 알려져 있으며³⁾, 점도상승제와 안정제로 식품에 첨가할 경우 microstructure cellulose보다 기능적으로 훨씬 우수하다고 알려져 있다⁴⁾. 그리고 chitinase의 기질, 저칼로리 식품, 접합제, 유화제와 식품첨가제^{5,6)}로서 사용할 수 있다. 또한 의약품분야에서는 키틴/키토산의 항균성을 이용하면 구강내 미생물을 멸균시키고 치아부식을 예방할 수 있는 치분첨가제 또는 치약으로 사용할 수 있으며⁷⁾, 수의임상분야에서 키토산을 함유한 생리활성 물질을 외상 입은 동물에 처방하여 부작용이 없이 치료효과를 보았다⁸⁾. 그 밖의 생체적합성⁹⁾과 항종양성¹⁰⁾ 등의 의료분야에서 요구되는 좋은 조건들을 구비하고 있다. 이와같이 키틴과 키토산은 매우 다양한 특성을 지니고 있으므로 유용하게 이용할 수 있는 천연고분자이다. 그러나 대부분이 폐기되고 있고, 낮은 용해성으로 인하여 이용 범위는 한정되어 있다. 그러므로 키틴/키토산의 제조와 그 기능을 연구하는 것은 자원환경과 산업적인 측면에서 매우 중요하다.

본 연구에서는 키틴을 갑각류인 꽃게의 등껍질로부터 제조하였고, 키틴을 다시 반응조건을 달리하여 용해성이 우수한 키토산을 제조하였으며 가교제인 epichlorohydrin을 이용하여 결정성이 나타나는 가교 키틴/키토산을 제조하여 보았다.

II. 실험

1. 시 약

키틴/키토산 제조용 원료는 갑각류인 꽃게(*Protunus trituberculatus*)의 등껍질 부분을 선별하여 증류수로 깨끗이 세척하여 건조하고 파쇄기를 이용하여 파쇄하였다. 키틴의 용매로 이용한 N,N-Dimethylacetamide(DMAc)와 Lithium chloride(LiCl)은 Aldrich사의 특급을 사용하였다. 가교 키틴/키토산의 제조를 위하여 가교제인 epichlorohydrin은 Aldrich사의 G. R급을 사용하였으며, 그 밖의 가성소다, 초산 등의 용매는 국산제품을 그대로 사용하

였다. 키틴/키토산유도체의 분석과 구조적 특성은 다음의 기기를 이용하였다. Bio-RAD FTS형 FT-IR을 사용하여 IR 스펙트럼을 측정하였고, TGA/DTA에 의한 열중량 분석은 시료 양을 약 10.0mg을 취하여 Setaram사의 TGA/DTA 92형을 이용하여 질소 기류하에서 승온속도를 10°C/min로 하여 20~400°C까지의 열중량 감소 즉, 열적 안정성을 측정하였다. DSC에 의한 열시차 분석은 Shimadzu사 DSC-50을 이용하여 각각의 시료량을 약 0.5mg을 취하여 질소 기류하에서 승온속도를 30°C/min로 하여 분석을 하였다. 형태변화와 표면구조를 관찰하기 위하여 RJ. Lee Group의 P-75 personal SEM을 이용하였으며 결정구조는 X'pert, philips사의 X-ray diffractometer를 사용하여 2θ:5~40°의 범위에서 측정하였다. 또한, 키토산 입자내의 비표면적을 측정하기 위하여 Micromeritics사의 ASAP 2700을 사용하여 200°C에서 질소흡착법을 이용하여 측정하였으며 키틴유도체의 평균 입자 크기는 Galai-cis-1 Particle Size Analyser를 사용하였으며 시료가 증류수에 팽윤되는 것을 고려하여 15초간 분산시킨 후 즉시 측정하고 이를 3회 반복측정하여 그 평균값으로 결정하였다.

2. 키틴의 제조

꽃게의 등껍질은 회분의 함량이 비교적 높고 단백질 함량은 낮다고 보고되어 있으므로¹¹⁾ Hackman의 단리법¹²⁾에서 응용하여 반응시간과 조건을 달리하여 제조하였다.

우선, 파쇄한 꽃게의 껍질분말을 증류수에 청결하게 세척한 후 감압건조하였다. 건조시킨 분말 200g을 상온에서 2N 염산용액에 12시간 동안 침적시켜서 탄산칼슘을 석출한 후, 분리하여 증류수에 수회 세척하고 감압건조하여 조직내에 있던 탄산칼슘이 이산화탄소와 염화칼슘으로 분해되는 탈탄산칼슘 반응을 실시하였다. 탈탄산칼슘 반응을 실시한 게껍질을 5.0% H₂O₂/0.5N 염산수용액으로 12시간 동안 교반하여 색소를 산화시키는 탈색소 반응을 실시하였다. 일반적으로 색소와 지방질은 유기용매로 처리하여 제거할 수도 있으나 탈탄산칼슘과 단백질 제거단계에서 지방질은 거의 제거되고 색소도 제거되므로 과산화수소를 사용하는 표백만으로 키틴을 얻

을 수 있다. 키틴은 알칼리에 안정하므로 알칼리 처리를 하였다. 알칼리의 농도와 온도, 반응시간 등을 조절하면 꽃게 껍질의 조직에 결합하여 있는 단백질을 충분히 제거할 수 있다. 본 실험에서는 탈탄산칼슘과 탈색소 반응을 실시한 후 중성처리한 키틴을 10℃ 이하의 5.0% 가성소다 용액에서 5시간 교반하였다. 이와같은 반응을 2회 반복처리한 후에 증류수로 충분히 세척하여 중성처리한 후 건조시켜서 백색의 키틴 약 90g을 얻었다.

3. 키토산의 제조

전처리 과정으로 키틴을 하루정도 증류수에서 팽윤시켜 용매가 잘 침투되게 하여 용해력을 향상시켰다. 키틴을 탈아세틸화하여 키토산으로 바꾸는 데는 고농도의 알칼리용액이 이용된다. 물론 알칼리농도와 반응온도를 높이면 반응속도가 빨라지겠으나 키토산의 분자내 사슬이 그 만큼 절단되어 점도와 평균 분자량이 감소하게 된다. 그러므로 알칼리농도, 반응온도, 시간 등을 조절하였다. 키토산의 제조시 가성소다를 이용하여 제조하는 방법에는 Rigby¹³⁾와 Mima¹⁴⁾ 등의 방법이 있는데 본 실험에서는 Mima의 방법을 응용하여 다양한 점도의 키토산을 제조하였다. 즉, 키틴을 47.0% 가성소다 용액으로 110℃에서 교반하면서 주쇄의 가수분해를 억제하며 반응시키고 이와 같은 알칼리 처리를 2회 반복하여 탈아세틸화된 키토산을 제조¹⁴⁾하는 것인데 본 연구에서는 각기 다른 점도를 나타내는 키토산을 제조하기 위하여 다른 가성소다의 농도하에서 반응시간, 온도를 달리하여 반응을 진행하였다. 즉, 키틴 분말 5.0g을 40~50% 가성소다용액과 반응온도는 90~150℃, 반응시간은 1~7시간으로 조절하여 키토산을 제조할 수 있는 탈아세틸화 반응을 진행하였다. 제조한 다양한 키토산을 증류수로 중성처리하고 에탄올, 에테르 순으로 세척한 후, 60~70℃에서 감압건조하였다.

4. 가교 키틴/키토산의 제조

본 연구에서는 또한 화학적으로 안정하여 견고하며, 결정성을 나타내는 가교 키틴/키토산을 제조하였다. 즉, 키틴 11.0g에 5.0%(w/w) LiCl/DMAc 용액을 300mL를 가하고 항온조내에서 5℃ 이하로 유

지하면서 24시간 동안 교반한 후 가교제로서 epichlorohydrin을 키틴의 단위체 glucosamine의 10배에 해당되도록 가하고 같은 조건에서 48시간 동안 가교반응을 실시하였다. 반응생성물은 증류수와 에탄올로 씻어서 용매와 미반응의 epichlorohydrin을 제거하고, 다시 0.1N 가성소다용액으로 3회 반복처리한 후 증류수, 에탄올 및 에테르의 순으로 씻은 후에 70℃에서 감압건조시켜 가교 키틴을 제조하였다. 가교 키토산은 키토산 1.87g을 10.0%(w/w) 초산 수용액 100mL에 완전히 용해시킨 후 가교 키틴의 제법과 같은 방법으로 가교 키토산 유도체를 얻었다.

III. 결과 및 고찰

1. 키틴의 제조 확인

갑각류인 꽃게껍질에는 키틴만이 존재하는 것이 아니고 탄산칼슘, 색소, 단백질 등이 존재하므로 화학적 처리법인 Hackman의 단리법¹²⁾을 이용하여 제조하였다. 제조한 키틴의 IR 스펙트럼을 Fig. 1(a)에 나타내었다. 키틴의 경우, 3200~3500cm⁻¹부근에서 O-H stretching과 1650cm⁻¹부근에서 amide I, amide II의 vibration을 확인할 수 있었다. 또한 3260, 3100cm⁻¹에서 N-H bending stretching에 의한 특성흡수대를 확인할 수 있었다. 또한, 가교반응시킨 가교 키틴의 I.R 스펙트럼을 Fig. 1(b)에 나타내었다. 2890cm⁻¹과 1465cm⁻¹부근에서 epichlorohydrin의 가교결합에 의한 -CH₂ stretching 흡수대가 약간 크게 나타나 있고 3200~3600cm⁻¹부근의 -OH stretching 흡수대는 약간 감소하였으며 1150~1040cm⁻¹부근의 C-OH의 stretching 흡수대가 약간 약하게 남아 있다. 키틴의 NH는 CH₃CO기가 결합되어 보호기로 작용하여 반응성이 나타나지 않고, 일반적으로 C₃-OH기 보다 C₆-OH기가 반응성이 크므로 C₆-OH기 중 일부가 epichlorohydrin에 의하여 가교화 된 것으로 예상할 수 있다.

2. 키토산의 제조 확인

Mima의 방법¹⁴⁾을 응용하여 키틴의 C₂ 위치의 아세틸아미드기를 탈아세틸화하여 용해성이 우수한 키토산을 제조하였다. Fig. 2(a)의 탈아세틸화된 키토산

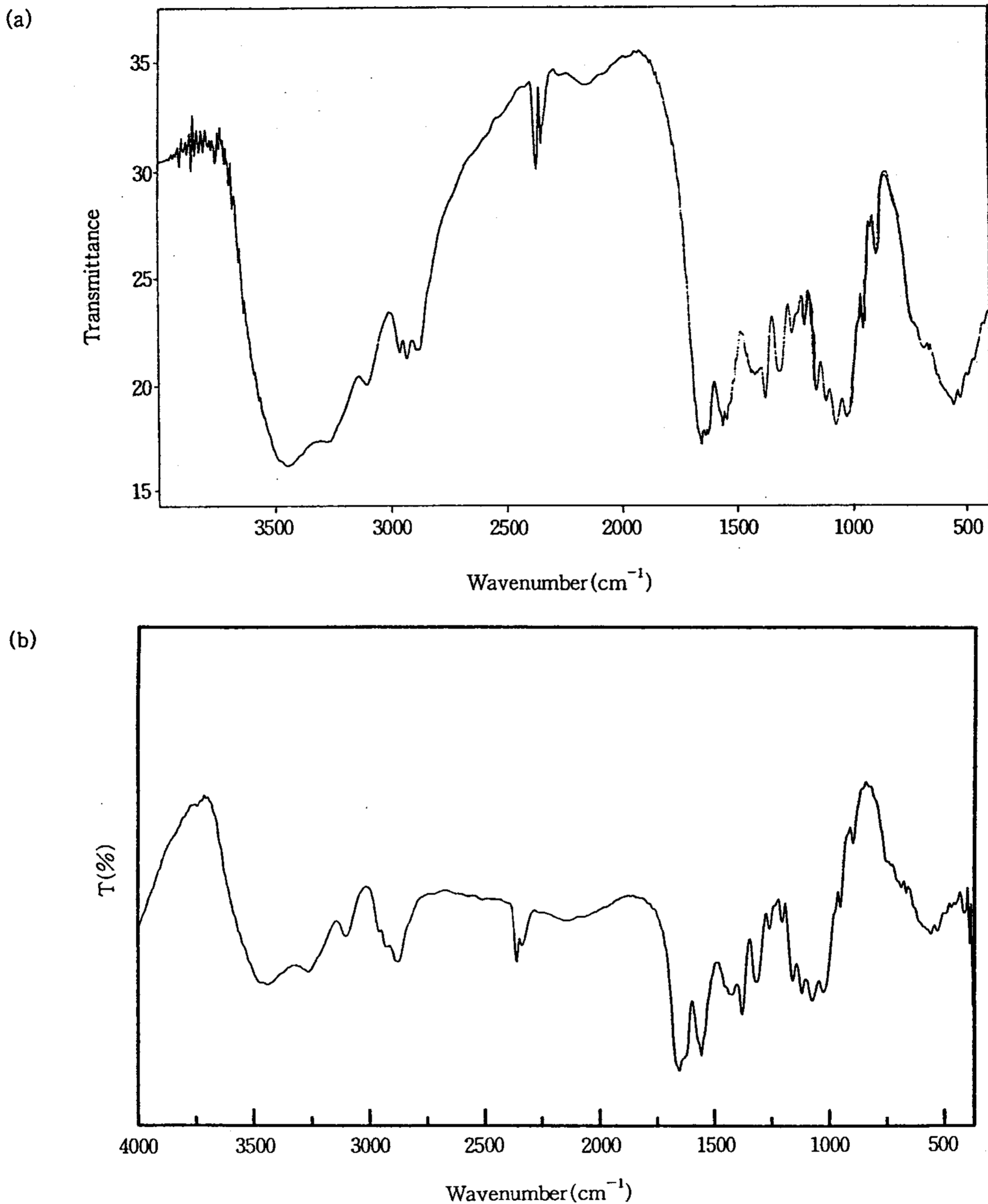


Fig. 1. IR spectrum of Chitin(a) and crosslinked chitin(b).

토산의 I.R에서는 2850cm^{-1} 부근에서 C-H stretching이 나타나며 $3260, 3100\text{cm}^{-1}$ 부근에서 N-H bending stretching에 의한 특성흡수대가 키틴에서 보다 감소하였다. 이러한 현상은 C=O와 N-H ben-

ding 사이에 작용하는 수소 결합력이 키틴과 키토산이 서로 다르기 때문이다. 또한 1660cm^{-1} 부근에서 C=O vibration 흡수대가 감소하고 1550cm^{-1} 부근에서 amide의 vibration 흡수대만이 약간 남아 있

다. 이는 키틴산의 탈아세틸화 정도에 따라 약간의 차이가 나타나는 것으로 생각된다. Fig. 2(b)의 가교 키틴산의 I.R에서는 전체적인 특성 흡수대의 세기가 키틴산에서 보다 약해짐을 확인할 수 있었으

며, 특히 키틴산 OH, NH의 특성흡수대가 epichlorohydrin과의 가교결합에 의하여 감소함을 확인하였다. 또한 Fig. 3은 키틴/키틴산의 DSC thermogram을 나타낸 것인데 키틴은 313.3℃에서 발열피이크로

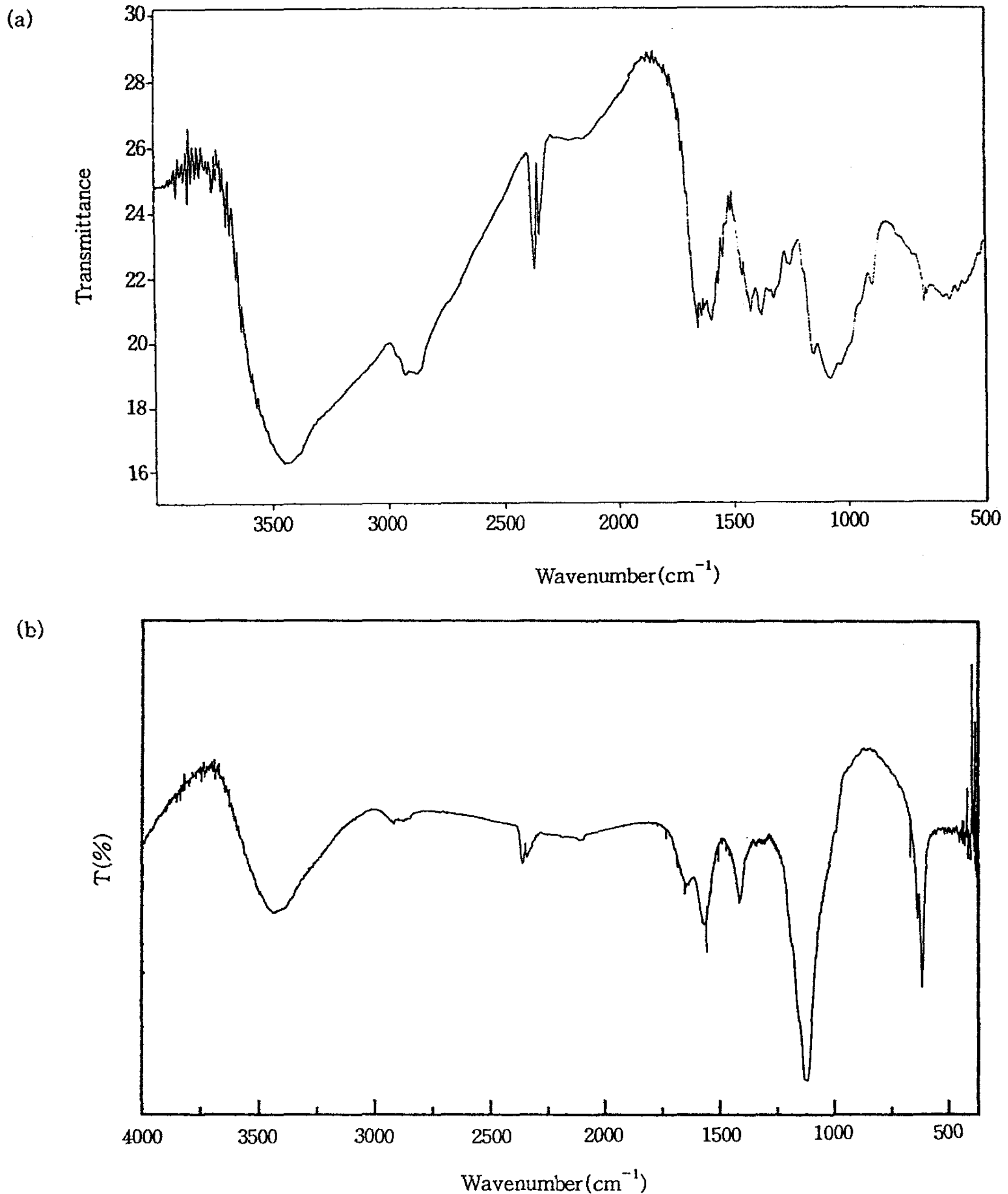


Fig. 2. IR spectrum of Chitosan(a) and crosslinked chitosan(b).

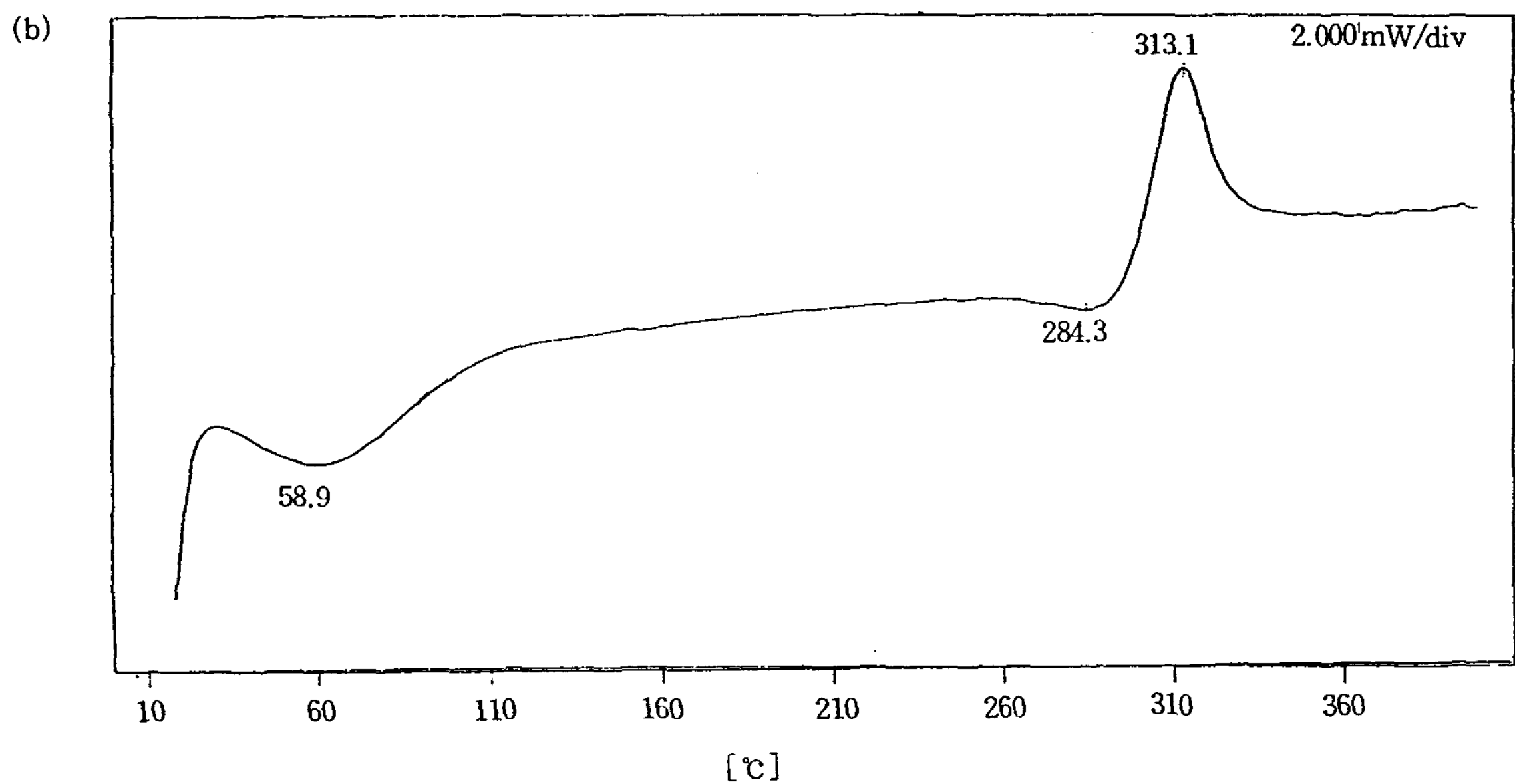
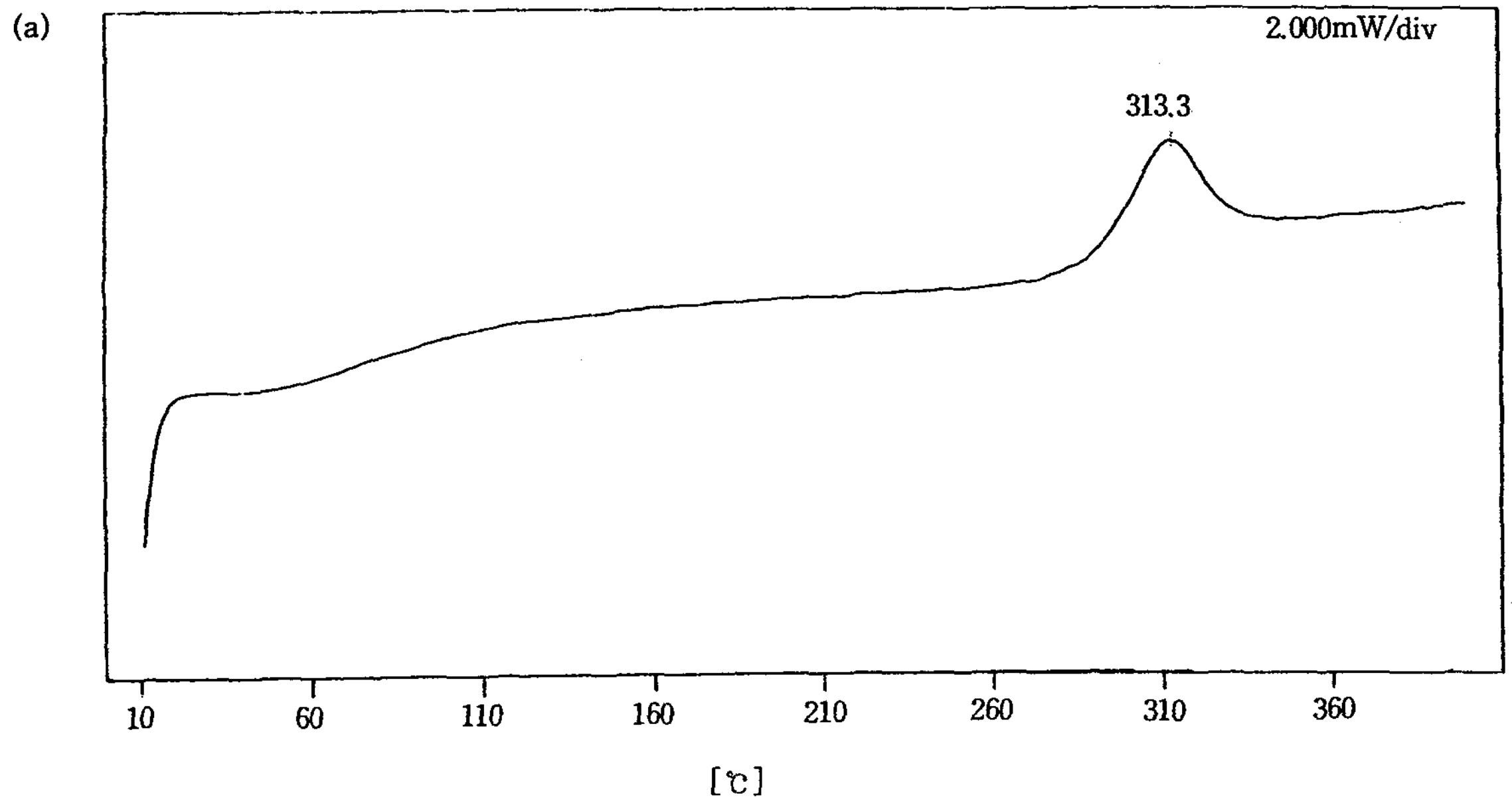


Fig. 3. DSC thermogram of Chitin(a) and chitosan(b).

써 최종 분해온도(T_m)값을 나타내었으나 키토산은 58.9°C에서 유리전이온도(T_g)를 형성하고 284.3°C에서 분해되기 시작하여 313.1°C에서 T_m 값을 나타내고 있다. 이는 Fig. 4의 TGA/DTA에 의한 열중

량 분석과도 같은 경향을 나타내고 있다. 이와같이 키틴/키토산의 열시차와 열중량 분석에서 차이가 나는 이유로는 분자사슬과 분자내 수소결합력의 감소로 인하여 열적 안정성이 저하되는 것으로 설명할

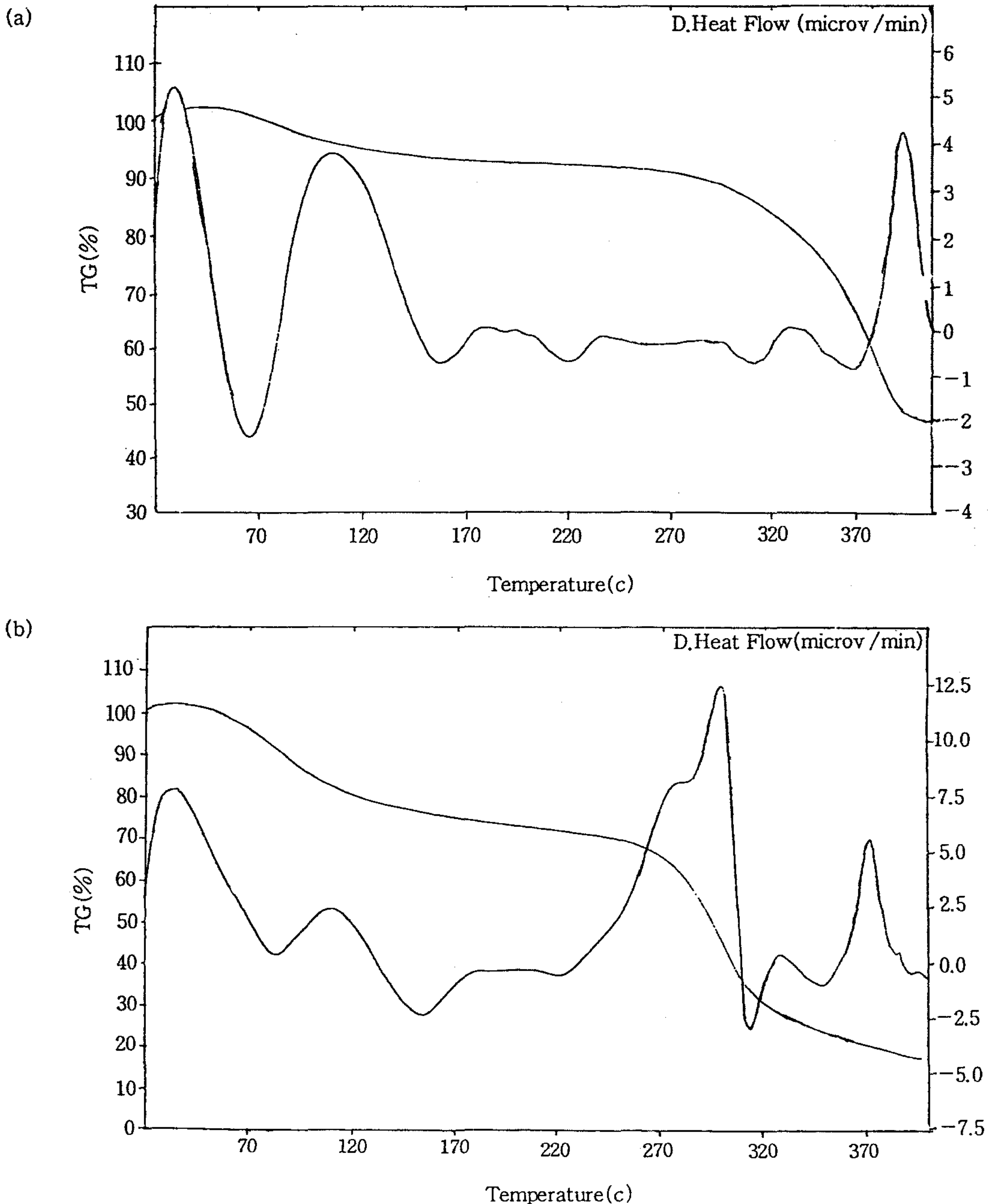


Fig. 4. TGA/DTA thermogram of Chitin(a) and chitosan(b).

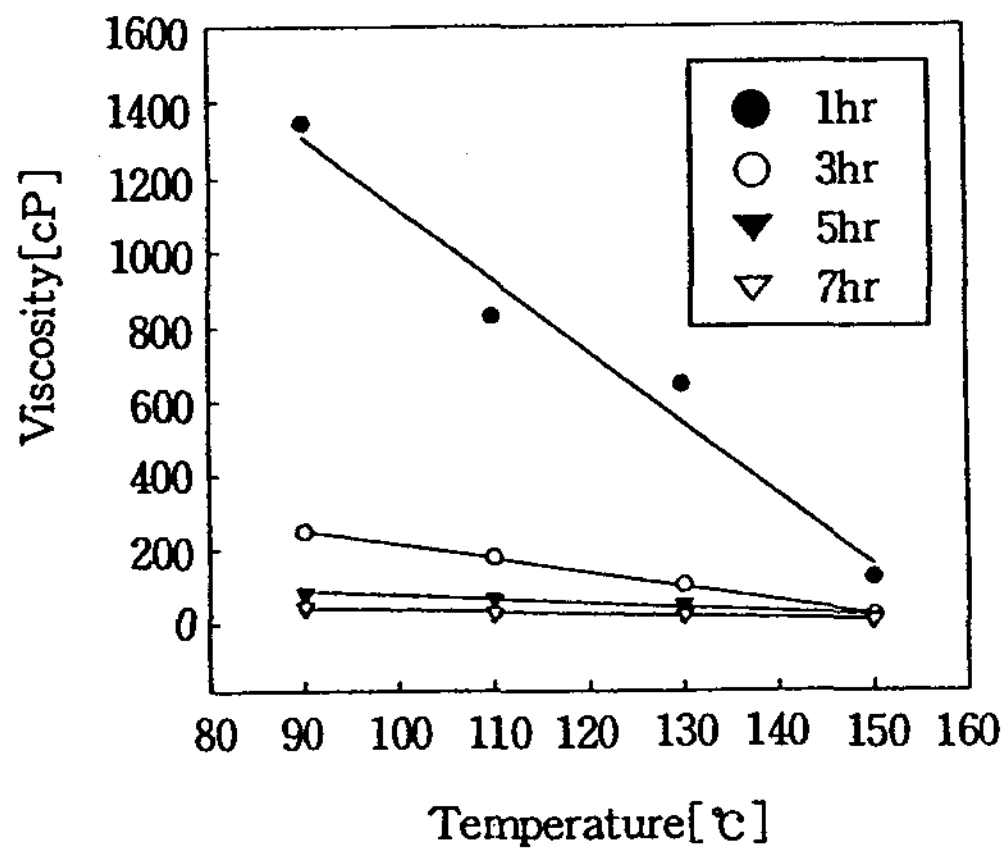


Fig. 5. The plot of reaction temperature and viscosity for preparation chitosan from chitin.

수 있다. 그러나 가교 키토산의 경우 오히려 70.9°C에서 T_g를 형성하고 289.3, 323.2°C에서 T_m값을 나타내었는데 이는 결정성의 증가와 가교결합에 의한 결합력의 증가로 T_g와 T_m값이 증가되었다고 설명할 수 있다. Fig. 5는 본 연구에서 제조한 다양한 키토산의 반응온도, 시간과 점도를 플롯해 본 결과이다. 키토산은 산처리에 의하여 탈아세틸화하면 다당류의 가수분해를 일으키므로 알칼리처리를 이용해야 한다. 알칼리를 이용하면 다당류의 에테르 결합의 가수분해를 억제하며 동시에 탈단백질, 탈아세틸화 반응을 할 수 있다는 장점이 있다. 그리고 탈아세틸화 반응할 때 반응시간을 높이거나 반응온도를 높이면 탈아세틸화는 높아지나 분자사슬의 크기, 즉 점

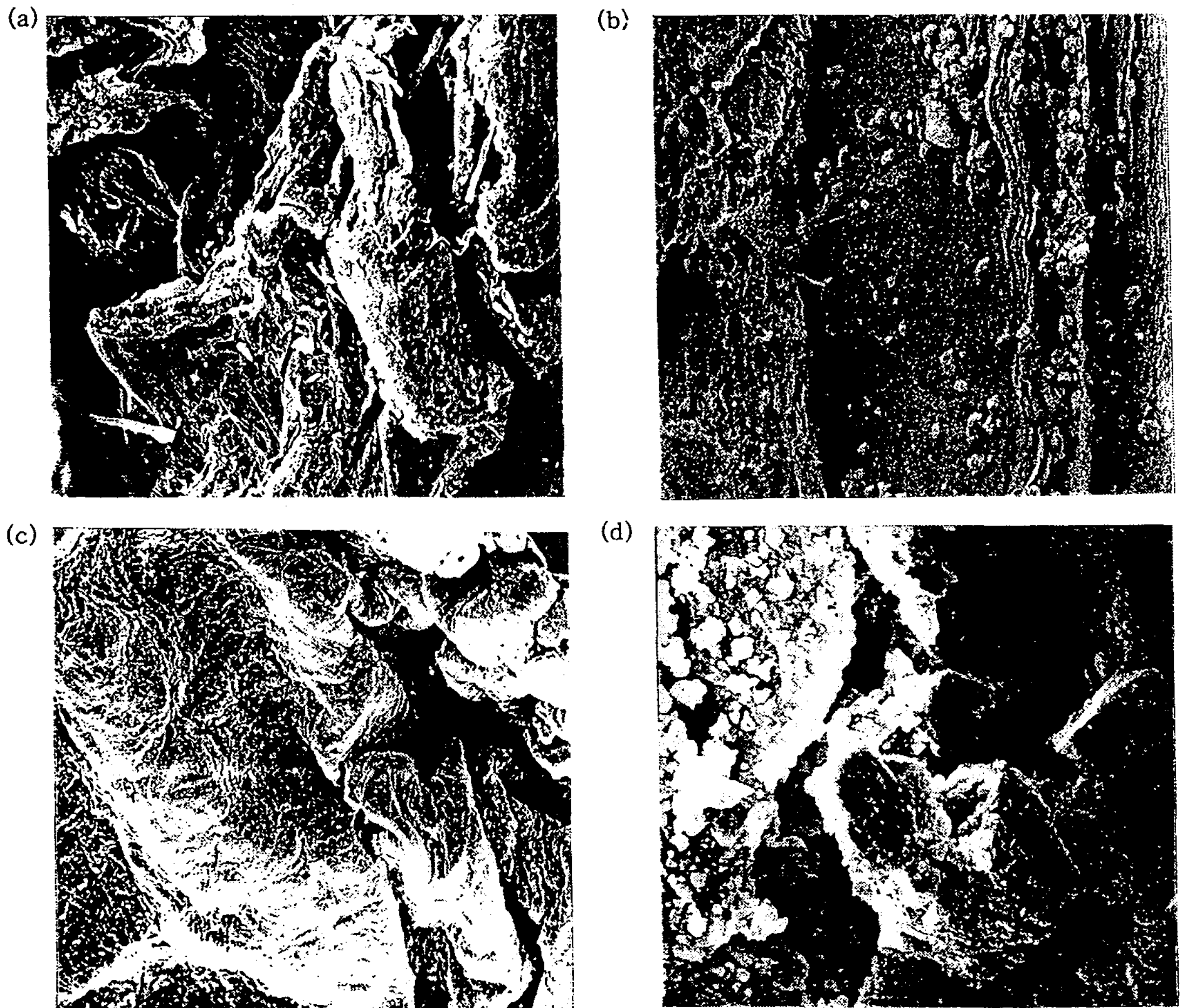


Fig. 6. SEM morphology of Chitin(a), crosslinked chitin(b), chitosan(c) and crosslinked chitosan(d).

도와 분자량은 감소하였다. 이와 같이 활용분야에 맞추어 키틴/키토산을 제조할 수 있다. 그러나 탈단 백질, 탈아세틸화 등의 반응시 나오는 강산, 강염기 등의 폐액에 의한 폐액 처리의 문제가 나타난다. 그러므로 앞으로 키틴/키토산을 제조할 때 발생하는 폐액 내의 물질 회수 또는 재활용 등의 연구에 힘써야 할 것으로 생각된다.

3. 키틴/키토산 유도체의 구조적 특성

꽃게로부터 제조한 키틴유도체의 형태변화와 표면구조를 SEM을 이용하여 관찰하여 보았다. Fig. 6의 키틴(a)의 경우 무정형의 굴곡이 있는 피상구조를 나타내고 있고, 가교 키틴(b)의 경우는 X-선 회절분석에서도 볼 수 있듯이 가교반응에 의한 결정상을 관찰할 수 있다. 키토산(c)의 경우 편상구조를 나타내고 있으며 가교 키토산(d)의 경우는 가교화되어 결정성을 나타내고 있다. 키틴유도체의 X-ray 회절분석 결과는 Fig. 7과 같다. 키틴(a)의 경우 2θ ; 10° 와 19° 부근에서 결정성을 나타내는 특성피크가 나타나 있다. 그러나 키토산(b)의 경우 2θ ; 10° 부근의 피크가 감소하여 오히려 무정형을 나타내어 결정화도가 감소하였다. 이와같은 결정성의 감소는 키틴 내의 아세틸아미드기에 의한 강한 수소결합이 아미노기로 변화함으로써 수소결합력이 약화되기 때문이라고 생각된다. 그리고 가교 키토산(c)의

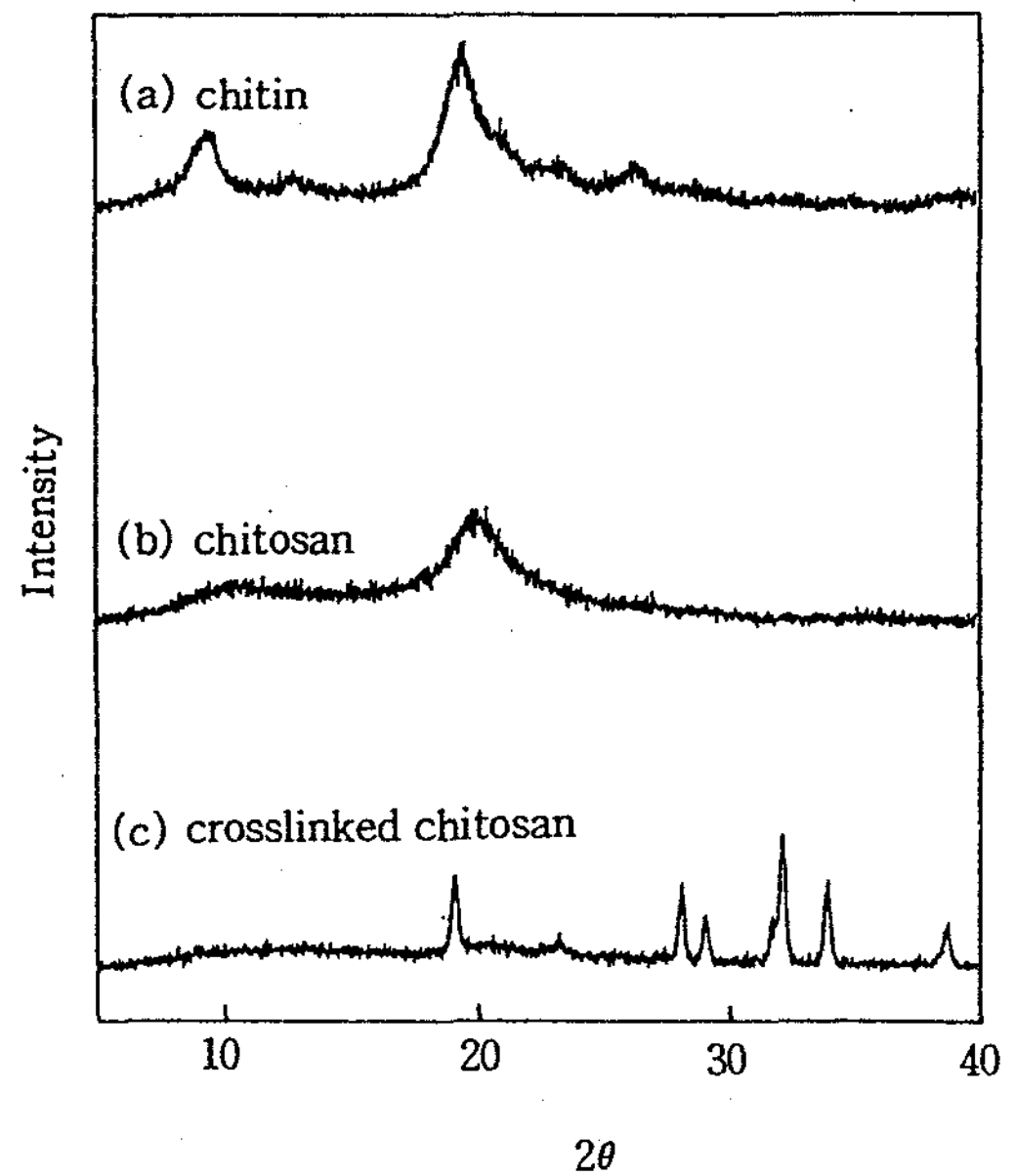


Fig. 7. X-ray diffraction patterns of various chitin derivatives.

경우 가교결합에 의한 결정성의 증가로 여러 부분에서 예리한 결정성 특성 피크를 가지는 회절 양상을 나타내었다.

Table 1과 2에 꽃게로부터 제조한 키틴유도체의 비표면적과 키틴의 평균 입자크기와 제조한 키토산

Table 1. Major structural features of chitin derivatives

Sample No.	Specific surface area(m ² /g)	GMPS(μm) ^{a)}
Chitin I	30.4	18.54
Chitin II	24.4	19.37
Chitin III ^{b)}	1.6	N/E ^{c)}
Crosslinked chitin	58.4	10.41

* ^{a)} GMPS : Geometric Mean Particle Size

^{b)} Chitin III : Chitin from Crab shells of Sigma Chem. Co.

^{c)} N/E : Not Evaluated

Table 2. Major structural features of chitosan derivatives

Sample No.	Specific surface area(m ² /g)	Viscosity(cP)
Chitosan(high)	0.25	1380
Chitosan(medium)	1.6	590
Chitosan(low)	1.9	140
Crosslinked chitosan	16.5	25

의 점도를 나타내었다. 이때, 반응조건을 달리하여 제조한 키토산의 점도 측정방법은 1.0% 초산수용액에 녹여 Brookfield 점도계 LVF형을 이용하여 spindle No. 1, 6rpm에서 점도를 측정하였다. 키토산 I은 본 연구에서 제시한 방법을 반복처리한 것이며 키토산 III은 상용 키토산이다. 비표면적의 경우, 키토산 III보다도 키토산을 반복처리 제조하는 횟수에 따라 비표면적이 증가하였으며 입자크기는 약간 감소하였다. 가교 키토산은 가교화 됨으로써 결정성의 증가로 비표면적이 증가하였고 입자크기는 감소하였다. 이는 키토산의 분자내 사슬이 처리과정에서 절단되어 비표면적이 증가하는 것으로 설명할 수 있으며 비표면적의 증가와 입자크기의 감소는 chitinase 또는 가수분해시 흡착 및 반응할 수 있는 부위를 증대시킬 수 있다고 생각된다. 제조한 키토산 유도체의 비표면적은 키토산보다도 오히려 감소하거나 유사하였다. 이는 SEM의 구조와 X-선 회절분석 결과에서 보듯이 키토산으로 탈아세틸화 됨으로써 무정형의 편상구조를 띠어 비표면적이 감소하기 때문이라 생각된다. 그러나 반응시간과 온도를 높이면 점도가 감소하고 분자사슬의 크기가 감소하여 비표면적은 약간 증가하고, 가교 키토산의 경우 키토산보다도 결정화 됨으로써 접촉할 수 있는 가용부위가 커져 그만큼 비표면적이 증가하였다.

IV. 결 론

환경오염과 자원고갈 등의 문제로 자원 재활용의 차원에서 갑각류의 일종인 꽃게껍질을 이용하여 탈탄산칼슘, 탈색소와 탈단백질 반응을 통하여 키토산을 제조하였으며, 용해성을 향상시킨 키토산을 가성소다의 농도, 반응시간과 온도 등을 변화시켜 점도가 다른 키토산을 제조하였으며 또한, 가교제인 epichlorohydrin을 이용하여 결정성을 증가시킨 가교 키토산/키토산을 제조하였다. 이에 대한 키토산유도체의 분석확인 및 입자의 구조적 특성 등을 연구하여 활용분야에 따르는 제조방법을 연구하였다.

(1) 키토산으로부터 키토산을 제조할 때 알칼리처리를 하면 다당류의 에테르 결합의 가수분해를 억제하며 동시에 탈단백질, 탈아세틸화 반응을 할 수 있다는 장점이 있다.

(2) 탈아세틸화 반응할 때 반응시간을 높이거나 반응온도를 높이면 탈아세틸화는 높아지나 키토산 분자사슬의 크기, 즉 점도와 분자량은 감소하였다.

(3) 무정형의 낮은 결정성을 나타내는 키토산/키토산을 가교제를 사용함으로써 결정성을 지닌 가교 키토산/키토산을 제조할 수 있다.

(4) 반응온도, 반응시간, 알칼리 농도와 가교제에 따라 활용분야에 맞는 키토산/키토산 유도체를 제조할 수 있다.

문 헌

1. R. A. A. Muzzarelli, Chitin, Pergamon press, Oxford, 5(1977).
2. C. Jeuniaux, *Arch. Intern. Phys. Biochem.*, 72 (2), 329(1964).
3. P. R. Austin, S. Sennet, Chitin in Nature and Technology, Plenum press, New York, 287(1986).
4. H. J. Dunn, M. P. Farr, U. S. Pat., 3,847,897, (1974).
5. D. Knorr, *Food Tech.*, January, 38, 85(1984).
6. S. Hirano, Chitin and chitosan, Skjak-Braek Ed., Elsevier Applied Science, New York, 37(1988).
7. J. Bowszyc, B. Raszeja-Kotelba, in Proceedings of the 2nd National Seminar on Chitin and Chitosan, SFI Bulletin, 25(1982).
8. M. M. Brzeski, A. Ramisz, Advances in Chitin and chitosan, C. J. Brine Eds., Elsevier Applied Science, New York, 79(1990).
9. K. Kifune, Advances in Chitin and chitosan, C. J. Brine Eds., Elsevier Applied Science, New York, 79(1992).
10. J. L. Leuba, P. Stossel, Chitin in Nature and Technology, Plenum press, New York, 215(1986).
11. 김성배 · 박태경, *생물공학회지*, 9(2), 174 (1994).
12. R. H. Hackman, *J. Bio. Sci.*, 7, 168(1954).
13. G. W. Rigby, U. S. Pat., 2,072,771(1935).

14. S. Mima, M. Miya, R. Iwamoto and S. Yoshikawa, *J. Appl. Poly. Sci.*, 28, 1909(1983).

15. 차월석·나재운, *생물공학 News 총설*, 2(4), 307(1995).