

원재료에 따른 키틴/키틴산의 제조에 관한 연구

김태형, 공병기, 나재운*
 순천대학교 공과대학 고분자공학과
 (jwnah@sunchon.ac.kr*)

A Study on the Preparation of Chitin and Chitosan according to the Raw Materials

Tai-Hyoung Kim, Byeong-Gi Kong, Jae-Woon Nah*
 Dept. of Polymer Science and Engineering, Sunchon National University
 (jwnah@sunchon.ac.kr*)

서론

키틴은 지구생물자원중에서 셀룰로오스 다음으로 풍부한 물질로써 [1], 1970년대부터 시작된 새로운 생리활성 물질을 찾는 과정에서 키틴의 다양한 용도가 밝혀지면서, 외과용 인공피부, 생분해성 필름, 수처리용 응집제 및 화장품 원료등에 사용되기 위한 실용화 연구가 이루어져 왔다. 최근에는 고부가가치의 의학, 약학, 생물산업 및 화장품 재료로써 이용되어 진다. 특히, 키틴은 생분해성, 생체적합성, 무독성의 특성을 지니고 있어서 약물 전달체로써의 연구가 이루어지고 있다. [2,3] 이러한 응용성에도 불구하고 키틴은 구조적 특성에 따라 많은 물성의 변화를 가져오므로 실제의 적용에는 많은 한계가 있다.

키틴의 구조는 원재료의 결정구조에 따라 다르게 존재한다. α -키틴은 2개의 사슬이 서로 역평행하게 적층되어 있어서 가장 치밀한 형태이며, β -키틴은 사슬이 서로 평행하게 배열되어있는 형태로서 같은 사슬사이의 $C_3-OH \cdots O_5$ 와 서로 다른 사슬사이의 $-NH$ 그룹과 $-CO$ 그룹들이 수소결합을 형성하지만 α -키틴보다는 덜 치밀한 구조로 되어있다. [4] γ -키틴은 2개의 pyranose 단위마다 1개의 단위 사슬이 아래로 향한 배열을 하고 있다. 자연계에는 α -키틴이 가장 많이 분포해 있으며, 특히 절지동물 표피에 많이 포함되어 있다. β -키틴은 결정성 수화물 상태로 존재하며 결정 격자의 사슬사이에 물이 스며들기 쉽도록 허술하게 배열된 안정성이 적은 물질로서 갑 오징어의 뼈에 가장 많이 존재한다. [5]

α -키틴은 절지동물, 버섯, 그리고 *Entamoeba* [6]의 포낭에 존재하고, β -키틴은 *Loligo* [7]의 뼈로부터 얻을 수 있다. 마지막으로 γ -키틴은 딱정벌레의 고치와 *Loligo*의 위벽에 존재한다. 이러한 γ -키틴의 구조는 2개의 역평행 사슬과 하나의 평행 사슬로 되어 있다. [8]

α -키틴과 β -키틴의 구조는 X-선 회절분석에 의하여 연구되었다. [4,8] α -키틴과는 달리 β -키틴은 약한 분자간력에 의하여 많은 특성들이 나타난다. [4,9] α -키틴보다는 많은 용매에 대하여 높은 친화력과 여러가지 개질 반응에 더 높은 반응을 나타낸다. 이러한 α 와 β -키틴의 특성에 대한 연구는 많은 연구자들에 의하여 조사되었지만, [10-13] γ -키틴은 Rudall 등에 의하여 최초로 제안되었지만, 아직까지는 재료의 희귀성으로 인하여 아직까지는 밝혀진 바 없다.

본 연구에서는 Hackmann [14] 방법을 수정하여 계집질, 오징어연골, 투구풍뎅이의 껍질로부터 산과 알칼리 처리에 의하여 α, β, γ -키틴을 제조하고, 적외선 분광 스펙트럼과

고체 ^{13}C CP/MAS NMR 을 통하여 키틴의 분리를 확인하였다.

재료 및 방법

1) 키틴의 분리 : 실험재료로는 게껍질과 오징어 연골, 투구풍뎅이 껍질을 적당한 크기로 자른 후 볼밀을 사용하여 분쇄한 후, 20mesh 체를 통과한 분말형태로 된 것을 사용하였다. 키틴질에는 키틴외에 단백질, 탄산칼슘, 색소등이 존재하기 때문에 화학적 처리 방법에 따라 탄산칼슘 제거반응, 단백질제거반응, 색소제거반응으로 나누어 분리하였다. 탄산칼슘을 제거하기 위하여 실온에서 2N HCl 수용액(원료 중량의 10배에 해당하는 부피)에 6시간동안 처리한 후, 증류수로 충분히 씻어낸 후, 15°C이하에서 2N HCl 수용액(원료중량의 2.5배에 해당하는 부피)에 48시간 처리하였다. 증류수로 충분히 씻어낸 후 여과하여 40°C에서 건조시킨 후 무게를 재었다. 단백질을 제거하기 위하여 탄산칼슘제거반응 단계에서 얻은 잔재물 무게의 10배에 해당하는 부피의 4% NaOH 수용액으로 15°C이하에서 24시간 동안 처리하고, 증류수로 씻어낸 후 이 과정을 4회 반복하였다. 색소를 제거하기 위하여 단백질 제거 반응 단계에서 얻은 잔재물 무게의 10배에 해당하는 3% H_2O_2 /1N HCl 수용액으로 처리하고, 50% 에탄올로 60°C에서 reflux시킨후, 다시 3% H_2O_2 / 1N HCl 처리한 후 증류수, 에탄올, 에테르 순으로 세척한 후 감압 건조하여 시료용 키틴을 분리하였다.

2) 키토산의 제조 : 위에 분리한 키틴 분말시료 30g을 47% NaOH 수용액 300ml으로 110°C에서 1시간동안 탈아세틸화 반응을 행하여 키토산을 제조하였다. 탈아세틸화도의 향상을 위해 같은 방법으로 4회 반복하였으며 반응후 생성물을 증류수로 수회 세척하여 알칼리를 제거하였으며 에탄올, 에테르 순으로 세척한후 감압건조하여 시료용 키토산을 제조하였다.

3) 일반성분 : 수분은 105°C 건조법, 조단백질함량은 micro-Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 회분은 550°C회화법으로 분석하였다.

4) 키틴의 분자량 측정

키틴의 점도평균분자량은 Cannon-Fenske(Kimax No. 120)를 사용하여 25.0 ± 0.0 2°C에서 formic acid를 사용하여 측정하여 Mark-Houwink 식으로부터 계산하였다.

5) 적외선 분광 분석

본 연구에서 분리한 키틴의 구조 분석은 KBr 법을 사용하여, 적외선 분광광도계(FT-IR 8700, Shimadzu)을 이용하여 $4600 \sim 400\text{cm}^{-1}$ 의 범위에서 측정하였다.

6) 고체 CP/MAS ^{13}C -NMR 분석

고체 CP/MAS ^{13}C -NMR(Bruker, Avance 500)을 이용해 분말형태의 시료를 MAS spin rate 8567 Hz, NS(number of scanning) 876 그리고 AQ(aquisition time) 0.024sec의 조건으로 분석하였다.

결과 및 토론

Table 1. Chemical compositions of raw materials (g/100g dried shell)

	Moisture	Protein	Lipid	Ash
Crab shell	11.7	23.15	0.34	41.54
squid pen	6.75	74.01	0.33	0.51
Lucaninade cutidcle	5.98	62.24	0.41	9.20

Table 2. Elemental analysis of chitin and chitosan

	N	C	H		N	C	H
α -chitin	5.30	49.28	6.23	α -chitosan	7.56	40.35	7.24
β -chitin	5.09	46.38	6.59	β -chitosan	6.50	45.13	7.33
γ -chitin	7.49	48.52	6.88	γ -chitosan	7.31	60.05	7.13

Table 3. Degrees of deacetylation and molecular weights of various chitin and chitosans

Sample source	Degree of deacetylation(%)		Average molecular weight	
	Chitin	Chitosan	Chitin	Chitosan
Crab shell (α -form)	21.8	84.6	701KDa	603KDa
Squid pen (β -form)	32.3	97.9	612KDa	607KDa
Lucaninade cuticle (γ -form)	44.7	88.0	524KDa	329KDa

1) 원료의 일반성분: Table 1에 나타난 바와 같이 원재료의 수분함량은 5.98 ~ 11.7%의 범위였고 이중 게겍질의 수분함량이 11.7%로 가장 높았다. 회분함량은 0.5% ~ 41.54%의 범위로 원료간에 차이가 심했다. 조단백질의 함량이 가장 높았던 오징어연골의 경우는 회분 함량이 0.5%로 가장 낮았고, 조단백질의 함량이 23.15%로 게겍질의 경우 회분 함량이 41.54%로 가장 높게 나타났다. 이처럼 회분의 함량이 높을수록 조단백질의 함량은 낮은 경향을 나타내었다.

제조된 키틴의 질소함량을 측정해본 결과 질소함량이 α -와 β -키틴의 경우는 다소 낮게 나타났는데 비하여 γ -키틴의 경우 7.49%로 다소 높게 나타났다. 키틴의 질소 함량은 일반적으로 6 ~ 7% 범주에 속하며, 키틴의 질소함량이 이론치인 6.89%보다 높을 때는 키틴에 결합된 단백질이 불완전하게 제거 되었거나 탈아세틸화를 의미하며, 이론치보다 낮을 경우에는 hydrolytic deamination이 일어났을 수 있다.

2) 적외선 분광분석 결과

본 연구에서는 게겍질, 오징어 연골, 투구풍뎅이의 외피로부터 산과 알칼리 처리에 의하여 키틴을 분리하였다. Figure 1은 분리한 키틴의 $400\text{cm}^{-1} \sim 4600\text{cm}^{-1}$ 의 범위에서의 적외선 흡수 스펙트럼 측정 결과를 보여준다. 키틴의 적외선 흡수 스펙트럼 분석 결과 세 스펙트럼 모두 비슷한 모양을 보이는데, 키틴의 특성 band 인 1626cm^{-1} (C=O stretching 에 의한 amide II vibration)과 1150cm^{-1} (NH bending 에 의한 amide I vibration)에서 강한 흡수 피크가 나타남을 확인하였다. 적외선 흡수 스펙트럼 분석 결과 1660cm^{-1} 부근에서 특성 피크를 확인하였다. 또한 3450cm^{-1} (OH stretching), 2878cm^{-1} (CH stretching), 1310cm^{-1} (amide III) vibration) 부근에서 강한 peak를 나타내었다. 또한, 1660cm^{-1} 부근에서, α -키틴의 경우에는 흡수 피크가 doublet 으로 나타나며, β -키틴의 경우 singlet, γ -키틴의 경우에는 약한 doublet 으로 나타났다. 이것은 amide 그룹의 conformation 에 따라 두 가지 형태의 수소 결합이 존재하기 때문이라 할 수 있다. 즉, 알파 키틴의 경우에는 amide 그룹의 C=O (카르보닐)기가 근접한 amide II (NH) 와 수소결합을 형성할 경우 1660cm^{-1} 에서 흡수밴드를 나타내고, 또 동시에 같은 분자쇄의 6번 위치의 히드록시기(OH)와 카르보닐 그룹이 수소 결합을 형성할 경우는 카르보닐(C=O)의 결합 길이가 길어져 1620cm^{-1} 에서의 새로운 피크가 나타나 doublet으로 나타나게 되고, β -키틴의 경우에는 카르보닐기와 amide II 와의 수소 결합만 존재하기 때문에 1650cm^{-1} 부근에서 singlet으로 나타난다. γ -키틴의 경우는 두개가 혼재된 형태이므로 α -키틴과 β -키틴의 중간적인 성질을 나타내게 된다.

3) 고체상태의 ^{13}C -NMR 스펙트럼에 의한 키틴의 구조 분석

Figure 2는 α -, β -, γ -키틴의 고체 CP/MAS ^{13}C -NMR 스펙트럼의 Chemical shift의 피크를 나타내었다. Figure 2에서 나타나듯이 3번 탄소와 5번 탄소의 특성피크의 차이를 확인 할 수 있다. 이는 키틴의 입체 화학적 구조에 의하여 α -키틴의 경우 C3와 C5의 특성 피크가 분리되어 나타나는데 비하여 β -키틴의 경우는 단일 피크로 나타남을 볼 수 있다. 이것은 α -키틴의 경우, 3번위치의 히드록시기와 5번위치의 H_2OH 기가 분자간 강한 수소 결합에 의해 2개의 conformation을 나타냄으로써, 3번위치와 5번위치의 카본이 doublet로 분리되어 나타나는 반면, β -키틴의 경우, 분자간 수소 결합이 존재하지 않기 때문에 3번위치의 히드록시기와 5번위치의 CH_2OH 기가 입체적 장애의 영향으로 동일한 conformation을 나타내게 된다. γ -키틴의 경우는 α 와 β -키틴의 혼재된 형태이기 때문에, α -키틴에서처럼 분자간 수소 결합이 존재하므로 α -키틴과 동일하게 분리되어 나타나게 된다.

참고문헌

1. M. F. A. Goosen, "Applications of chitin and chitosan", 31, Technomic, USA, 1997.
2. M. N. V. R. Kumar, *Reactive & Functional Polymers*, **46**, 1 (2000).
3. K. Kurita, *Prog. Polym. Sci.*, **26**, 1921 (2001).
4. J. Blackwell, *Biopolymers*, **7**, 281 (1969).
5. K. Rudall, and M. W. Kenchington, *Biol. Rev.*, **49**, 597 (1973).
6. G. A. F. Roberts, "Chitin Chemistry", 33-35, Macmillan, New York, (1992).
7. J. Sugiyama, C. Boisset, and M. Hashimoto, *J. Mol. Biol.*, **286**, 247 (1999).
8. R. Minke, and J. Blackwell, *J. Mol. Biol.*, **120**, 167 (1978).
9. Jose Ruiz-Herrera and Alfredo D. Martinez-Espinoza, "Chitin and Chitinases", 39-53, Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, 1999.
10. K. Kurita, K. Tomita, T. Tada, S. Ishii, S. Nishimura, and K. Shimoda, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **31**, 485 (1993).
11. K. Kurita, K. Tomita, S. Issii, S. Nishimura, and K. Shimoda, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **31**, 2393 (1993).
12. K. Kurita, S. Ishii, K. Tomita, S. Nishimura, and K. Shimoda, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **32**, 1027 (1994).
13. S. B. Suh, S. J. Kim, Y. M. Lee, and J. J. Kim, *Polymer(Korea)*, **18**, 906 (1994).
14. R. A. A. Muzzarelli, "Chitin", 79-85, Pergamon Press, Oxford, 1990.

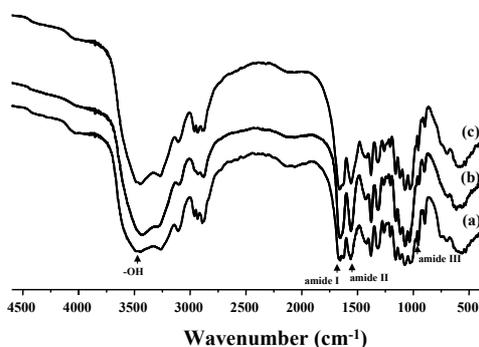


Figure 1. FT-IR spectra of α -chitin (a), β -chitin (b), and γ -chitin (c)

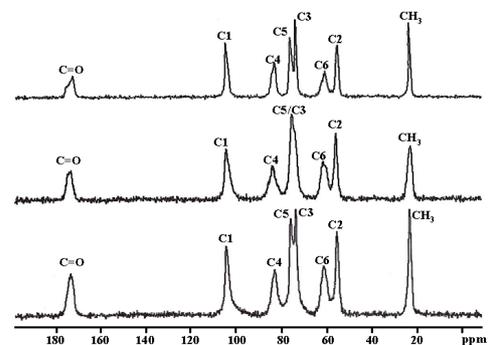


Figure 2. Solid state CP/MAS ^{13}C NMR spectra of α -chitin (a), β -chitin (b), and γ -chitin (c).