J. Fd Hyg. Safety 13(1), 34 - 40(1998)

Chitin으로부터 다양한 Chitosan의 제조와 특성

조형재 · 황성규 · 이기창† · 이한섭* · 김판기*
명지대학교 화학공학과, *용인대학교 환경보건학과

Preparation and Charaterizations of Various Chitosan from Chitin

Hyung-Jae Cho, Sung-Kwy Hwang, Ki-Chang Lee†, Han-Seab Lee* and Pan-Gyi Kim*
Department of Chemical Engineering, MyongJi University, Yongin 449-728, Korea
**Department of Environmental Health, Yongin University, Yongin 449-714, Korea*

ABSTRACT—Chitin is known as biodegradable natural polymer. But, in spite of various application of chitin from waste marine sources, commercial use of chitin has been limited due to highly resistance to chemicals and the absense of proper solvents. Therefore, we studied that another viscosity chitosan were prepared from chitin which were deacetylated under various concentration of NaOH solution, reaction time and temperature by the application of Mima's method. The major parameters for these manufacturing methods were found to be concentration of alkali solution, reaction time and temperature etc. Besides, we studied that various chitosan derivatives were prepared from chitin by crosslinkage with epichlorohydrin and 1,3-dichloropropanol. The effects of these parameters on another viscosity(molecular weight) chitosan and crosslinked chitosan dervatives were investigated by various analysis apparatus. SEM analysis showed that both chitin and chitosan had a particle shaped morphology and another molecular weight chitosan according to the particle size was much smaller than that of chitin.

Key words Natural polymer, Polysacchride, Chitin, Chitosan, Crosslinked chitosan

인류는 오래전부터 천연자원으로부터 그 유용성을 추구하며 이용하여 왔다. 최근에 환경, 자원고갈 등의 문제로 천연자원의 중요성이 부각되고 있다. 이러한 천연자원의 일종으로 종전에는 이용되지 못하던 천연 생분해성고분자인 chitin과 chitosan의 이용이 늘고 있다. 자연계에서 cellulose 다음으로 많은 chitin은 다당류로서 거의 모든 동물류에 존재하고 있다. 구조는 cellulose와 유사하며 모노머인 glucose 고리에 존재하는 -OH기 중 두번째 -OH기가 $-NHCOCH_3$기로 치환되어 있는 N-acetyl-D-glucosamine으로 구성되어 있고 모노머 사이의 결합은 cellulose와 같은 β-1,4 결합으로 이루어진 선형의 천연고분자이다. 이러한 풍부한 천연고분자인 chitin은 중합도 즉, 분자량이 100만 이상이 된다. 1811년 프랑스에서 Braconnot[1]에 의해 곰팡이에서 관찰된 후, 1832년 Odier가 곤충으로부터 발견하여 갑옷 또는 껍질이란 의미로 chitin이라 하였다.[2]

Chitin의 구조형태는 β-2-acetamide-2-deoxy-D-glucose 단위로 이루어진 polysaccharide이며, 공식 명칭은 (1,4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glucan이다. Chitin을 deacetylation하여 N-acetyl기를 amino기로 치환한 chitin 유도체가 chitosan이다.[3] 이러한 chitin과 chitosan의 주요 용도를 살펴보면 초기에는 일본에서 식품공장의 폐수에서 유효물질을 회수하는 응집제에 국한되었으나 계속된 용도개발에 힘입어 환경, 식품, 의료, 효소 및 미생물의 담체, 농약, 주류산업 등의 다양한 분야에서 이용되고 있다. 이용분야의 한 예로 식품분야에서는 chitin을 가수분해하여 저분자량 물질로 제조하면 동물실험 결과 bifidobacteria를 증식시키는 효과를 나타낸다고 알려져있으며,[4] 식품에 첨가할 경우 점도 상승제와 안정제의 용도로 현재 사용되고 있는 microcrystalline cellulose보다 기능적으로 훨씬 우수하다고 알려져 있다.[5] 그리고 chitinase의 기질, 저칼로리 다이어트식품, 제약산업에서 정제의 접합제, 유화제와 빵부피를 증가시키는 첨가제[6,7]로서 사용할 수 있으며, chitosan은 육류보존제로 이용되는데 0.01% 농도 chitosan은 *Escherichia coli., Pseudomonas fragi., Bacillus subtilis* 등의 성장을 억제하며 고농도에서는 육류부패의 초기 원인균인 *Micrococcus varians, Lactobacillus plantarium* 등의 성장을 방지하고 저장기간동안 육류를

† Author to whom correspondence should be addressed.

잘 유지시키는 효과가 있으며,[8] 과실의 항진균제와 코팅제로서 품질향상과 보존에 효과가 있다고 알려져 있다.[9] 향후 가장 응용가능성이 큰 분야로는 식품 포장분야로서, 과실이나 육류는 단시간내에 산패되므로 보존기간을 연장시킬수만 있다면 생산자와 소비자를 만족시킬 수 있으므로 바람직하다. Chitosan으로부터 제조한 필름은 생분해성과 낮은 산소투과도를 나타낸다. 그러나 아직까지는 기존 제품과 같은 기계적 성질(brittleness, 습강도 등)을 만족하지 못하여 다른 합성고분자와 블렌드한 여러 연구가 시도되고 있다.[10-12] 이와 같이 chitin과 chitosan은 매우 다양한 특성을 지니고 있으므로 유용하게 이용할 수 있는 천연고분자이다. 그러나 대부분이 폐기되고 있고, 낮은 용해성으로 인하여 이용범위는 한정되어있다. 그러므로 chitin과 chitosan의 제조와 그 기능을 연구하는 것은 자원환경과 산업적인 측면에서 매우 중요하다. 본 연구에서는 활용분야는 크지만 용해성으로 인하여 이용에 제한이 있는 chitin을 이용하여 반응조건을 달리하여 저농도의 산성용액에서도 용해성을 나타내는 다양한 점도의 chitosan을 제조하고 2종의 가교제를 사용하여 결정성이 나타나는 가교 chitosan을 제조하여 보았다.

재료 및 방법

시약

다양한 chitosan 제조용 시약으로는 Sigma사의 chitin (from Crab shells)을 사용하였다. 가교 chitosan유도체 제조용으로 가교제인 epichlorohydrin(ECH)과 1,3-dichloropropanol(DCP)은 Aldrich Chemical사의 G.R급을 사용하였으며, 그 밖의 초산, 가성소다 등의 무기시약과 에테르, 에탄올 등의 용매는 국산제품을 정제하여 사용하였다.

측정기기

다양한 chitosan유도체의 분석과 입자의 구조적 특성은 다음의 기기와 분석방법을 이용하였다.

I.R에 의한 구조 분석 — 제조한 chitosan유도체의 구조분석은 KBr pellet법을 이용하여 Bio-Rad FTS형 FT-IR을 사용하여 400~4000 cm^{-1} 사이에서 나타나는 스펙트럼을 측정하였다.

DSC에 의한 열시차 분석 — DSC는 Shimadzu사 DSC-50을 이용하여 각각의 시료량을 1.0 mg을 취하여 질소 기류하에서 승온속도를 30 °C/min로 하여 열시차분석을 하였다.

SEM에 의한 구조변화 — Chitosan유도체의 형상변화, 결정형태와 표면구조를 관찰하기 위하여 시료를 solvent drying한 후 gold coating(IB-5, Eiko Co.)하여 RJ. Lee Group의 P-75 personal SEM을 이용하여 100~5000배의 배율로 관찰하였다.

BET에 의한 비표면적 측정 — 150°C에서 30분간 degassing 시켜 수분을 완전 제거한 후 Micromeritics사의 Pulse chemisorb 2700을 사용하여 질소흡착법에 따라서 제조한 chitosan유도체의 비표면적(Specific Surface Area)을 평균적으로 측정하여 결정하였다.

X-선 회절에 의한 결정성 분석 — Chitosan유도체의 결정구조는 Philips사의 X-ray diffractometer를 사용하여 powder method로 측정하였고 분석조건은 CuKα(Ni-filter), 50 Kv, 30 mA를 사용하여 2θ; 5~40° 범위에서 측정하였다.

점도 측정 — 겉보기 점도측정은 1.0% 초산수용액에 제조한 chitosan 유도체 1.0 g을 넣고 완전히 용해시킨 후, Brookfield 점도계 LVF형을 이용하여 spindle No. 3, 12 rpm에서의 겉보기 점도를 측정하였다.

Chitosan 제조방법

Chitosan 제조의 전처리 과정은 chitin을 약 24시간 정도 증류수나 알코올 용매하에서 팽윤시켜 용매가 잘 침투되게 하여 용해력을 향상시켰다. chitin을 탈아세틸화하여 chitosan으로 바꾸는 데는 고농도의 알칼리용액이 이용된다. 물론 알칼리농도와 반응온도를 높이면 반응속도가 빨라지나 chitosan의 분자내 사슬이 그 만큼 절단되어 점도와 평균분자량이 감소하게 된다. 그러므로 알칼리농도, 반응온도, 반응시간 등으로 점도, 탈아세틸화도 등을 조절하였다. chitosan의 제조방법에는 KOH 수용액을 이용하는 Horowitz[11]와 Horton[12]의 방법과 NaOH 수용액을 이용하여 탈아세틸화된 chitosan을 제조하는 Rigby[13]와 Mima[14] 등의 방법이 있는데 본 실험에서는 Mima의 방법을 응용하여 다양한 점도의 chitosan을 제조하였다. 즉, chitin을 47.0% NaOH 수용액으로 110°C에서 교반하면서 주쇄의 가수분해를 억제하며 반응시키고 이와 같은 알칼리 처리를 2회 반복하여 탈아세틸화된 chitosan을 제조[14]하는 것인데 본 연구에서는 각기 다른 점도(평균 분자량)을 가진 chitosan을 제조하기 위하여 서로 다른 알칼리 농도하에서 반응시간, 온도를 달리하여 반응을 진행하였다. 즉, chitin분말 5.0 g을 40~50% NaOH 수용액 200 ml와 반응온도는 90~130°C, 반응시간은 1~5시간으로 조절하여 탈아세틸화반응을 진행하였다. 제조한 다양한 chitosan을 증류수로 세척하여 중성처리하고 에탄올, 에테르 순으로 세척한 후, 60~70°C에서 감압건조 하였다.

가교 chitosan의 제조

본 연구에서는 또한 화학적으로 안정하여 견고하며, 결정

성을 나타내는 가교 chitosan유도체를 제조하였다. 즉, 가교 chitosan 제조는 가교제로 ECH와 DCP를 사용하였다. 즉, 각기 chitosan 1.87 g을 10.0%(w/w) 초산수용액으로 완전히 용해시킨 후 chitosan의 단위체의 10배에 해당하는 가교제(ECH, DCP)의 몰수를 각각 1시간에 걸쳐 적하한 후 상온 또는 질소 기류하에서 48시간 동안 가교반응을 실시한 후 반응생성물을 증류수로 중성처리하고 에탄올 및 무수 에테르의 순으로 세척하여 미반응 물질을 제거한 후, 70°C에서 진공건조(4.0 mmHg)시켜서 가교 chitosan유도체를 얻었다.

결과 및 고찰

Chitosan의 제조 확인

Mima의 방법[14]을 응용하여 chitin의 C_2 위치의 아세틸아미드기를 탈아세틸화하여 용해성이 우수한 chitosan을 제조하였다. Fig. 1의 탈아세틸화된 chitosan의 I.R spectrum에서는 2850 cm^{-1} 부근에서 C-H stretching이 나타나며 3260, 3100 cm^{-1}부근에서 N-H bending에 의한 특성흡수대가 chitin에서 보다 감소하였다. 이는 C=O와 N-H bending 사이에 작용하는 수소 결합력이 chitin과 chitosan이 서로 다르기 때문이다. 또한 1660 cm^{-1} 부근에서 C=O vibration 흡수대가 감소하고 1550 cm^{-1} 부근에서 amide의 vibration 흡수대만이 약간 남아있다. 이는 chitosan의 탈아세틸화 정도에 따라 약간의 차이가 나타나는 것으로 생각된다. Fig. 2의 가교제에 의한 가교화된 chitosan의 I.R spectrum에서는 전체적인 특성흡수대의 세기가 chitosan에서 보다 약해짐을 확인할 수 있었으며 특히, OH와 NH의 특성흡수대가 감소하고 1465 cm^{-1} 부근에서 DCP의 가교결합에 의하여 -CH_2 bending의 흡수대가 나타나 있다. 또한 Fig. 3은 chitin, chitosan의 DSC thermogram을 나타낸 것인데 chitin은 313.3°C에서 발열 피이크로써 T_m(최종분해온도)값을 나타내었

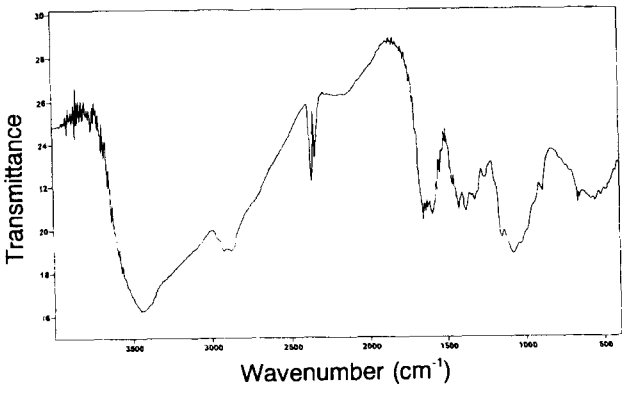


Fig. 1. IR spectrum of chitosan from chitin.

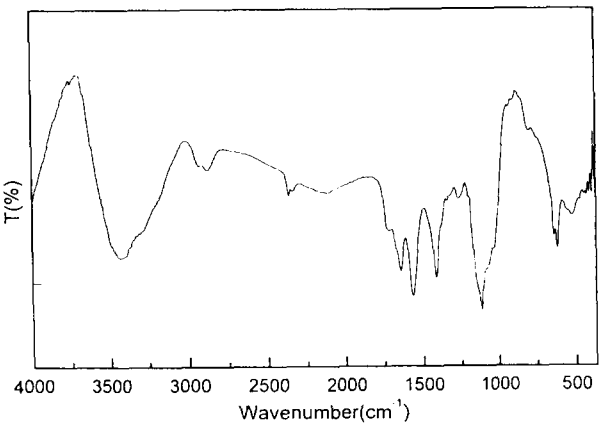
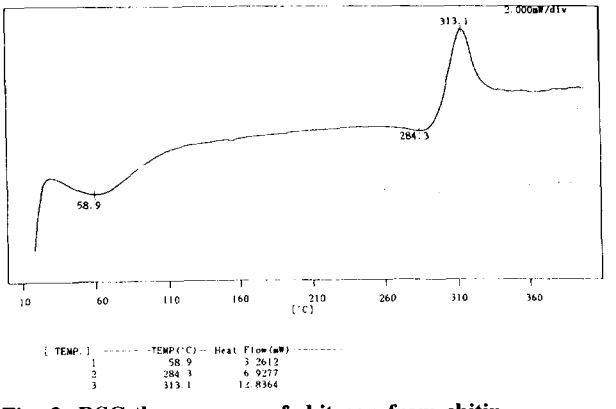


Fig. 2. IR spectrum of crosslinked chitosan [DCP] from chitosan.



TEMP.	TEMP(°C)	Heat Flow(mW)
1	58.9	3.2612
2	284.3	6.9277
3	313.1	12.8364

Fig. 3. DSC thermogram of chitosan from chitin.

으나 chitosan은 58.9°C에서 T_g(유리전이온도)를 형성한 후, 284.3 °C에서 분해되기 시작하여 313.1°C에서 T_m값을 나타내고 있다. 이와같이 chitin과 chitosan의 열시차 분석에서 차이가 나타나는 경향은 분자사슬과 분자내 수소 결합력의 감소로 인하여 열적 안정성이 저하되는 것으로 설명할 수 있다. 그러나 가교 chitosan(ECH)의 경우 오히려 70.9°C에서 T_g를 형성하고 각각의 domain형태의 흡열피이크로서 289.3, 323.2°C에서 T_m값을 나타내었는데 이는 결정성의 증가와 가교결합에 의한 결합력의 증가로 T_m값이 증가되었다고 설명할 수 있으며 가교구조화하면 T_g과 T_m값의 증가로 인한 내열성 및 가공성을 향상시킬 수 있는 이점이 있다고 설명할 수 있다. Fig. 4에는 chitin으로부터 chitosan과 가교 chitosan유도체를 제조하기까지의 제조과정을 나타내었다.

다양한 Chitosan의 제조법

Chitin은 cellulose와 유사한 구조를 지니고 있지만 화학

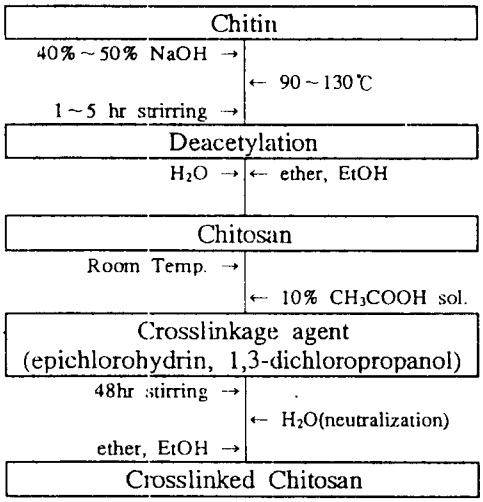


Fig. 4. Preparation of various chitosan derivatives from chitin.

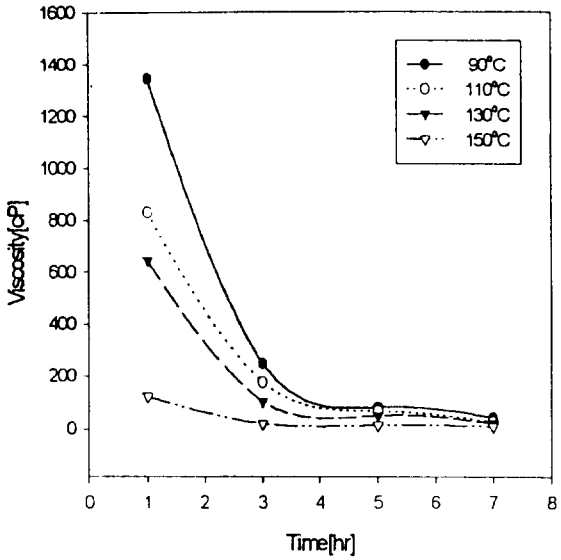


Fig. 5. The plot of reaction time and viscosity for preparation chitosan from chitin.

적 성질은 매우 다르고 chitinase 및 lysozyme 등에 의해 분해되거나 포름산, 염산 등의 용매에 팽윤될 뿐 유기용매에 대한 저항성이 강한데 이는 분자내의 강한 N-acetyl기가 형성한 micelle구조에 기인하여 hexafluoroisopropanol, DMAc 등과 같은 제한적인 용매만이 사용되는 것이 chitin연구의 제한이었다. 이와같이 chitin은 대부분의 유기용매에 불용성이지만 chitosan은 초산과 같은 저농도의 산성용액 중에서 비교적 우수한 용해성을 나타낸다. Fig. 5에 본 연구에서 제조한 다양한 chitosan의 반응시간, 반응온도에 따른 점도(분자량)를 나타내본 결과이다. Chitin의 아세틸아미드기는 산처리에 의하여 탈아세틸화하면 다당류의 가수분해를 일으키므로 알칼리처리를 이용해야 한다. 알칼리를 이용하면 다당류의 에테르 결합의 가수분해를 억제하며 동시에 탈단백질, 탈아세틸화 반응을 할수 있다는 장점이 있다. 그리고 탈아세틸화 반응할 때 반응시간을 높이거나 온도를 높이면 탈아세틸화는 높아지나 분자사슬의 크기, 즉 점도와 분자량은 감소하였다. 이와같이 요구되는 점도와 활용분야에 맞추어 chitin과 chitosan을 제조할 수 있다. 그러나 탈단백질, 탈아세틸화 등의 반응시 나오는 강산, 강염기 등의 폐액에 의한 폐액처리의 문제가 나타난다. 그러므로 앞으로 chitin, chitosan을 제조할 때 발생하는 폐액내의 물질 회수 또는 재활용 등의 연구에 힘써야 할 것으로 생각된다.

Chitosan의 구조적 특성

제조한 chitosan유도체의 표면구조를 주사현미경(SEM)을 이용하여 관찰하여 보았다. Fig. 6(a)는 chitin을 100배 확대한 사진이다. (b), (c), (d)는 본 실험에서 제조한 chitosan 중 일부를 선택하여 Brook field 점도계로 측정한 low(140 cp), medium(590 cp), high(1380 cp)-chitosan을 100배 확대한 사진이다. chitin에서 반응조건에 따라 chitosan으로 진행할수록 분자사슬이 절단되어 입자의 크기가 작아짐을 확인할 수 있었다. 또한 Fig. 7의 경우 chitin(a)의 경우 무정형의 굴곡이 있는 괴상구조인데 반하여 chitosan (b)의 경우 편상구조를 나타내고 있다. 가교 chitosan(c)의 경우는 가교화되어 결정성을 나타내고 있으며 이는 Fig. 8의 X-ray 회절분석에서도 나타나 있다. Chitin의 경우 2θ; 10°와 19° 부근에서 결정성을 나타내는 특성 피이크가 나타나 있다. Chitosan의 경우 2θ; 10° 부근의 피이크가 감소하여 오히려 무정형을 나타내어 결정화도가 감소하였다. 이와 같은 결정성의 감소는 chitin 내의 아세틸아미드기에 의한 강한 수소결합이 아미노기로 변화함으로써 수소결합력이 약화되기 때문이라고 생각된다. 그리고 가교제에 의한 가교 chitosan의 경우 가교결합에 의한 결정성의 증가로 여러부분에서 예리한 결정성 특성 피이크를 가지는 회절 양상을 나타내었다. Table 1에는 chitin으로부터 제조한 chitosan유도체의 비표면적과 점도를 나타내었다. 비표면적은 chitin 보다도 오히려 감소하거나 유사하였다. 이는 SEM의 구조와 X-선 회절분석 결과에서 보듯이 chitosan으로 탈아세틸화되므로써 무정형의 편상구조를 띠어 비표면적이 감소하기 때문이라 생각된다. 그러나 반응시간과 온도를 높이면 점도(평균 분자량)가 감소하고 분자사슬의 크기가 감소하여 비표면적은 약간 증가하고, 가교 chitosan의 경우 chitosan보다도 결정화되므로써 접촉할 수 있는 가용부위가 커져 그만큼 비표면적이 증가하였다.

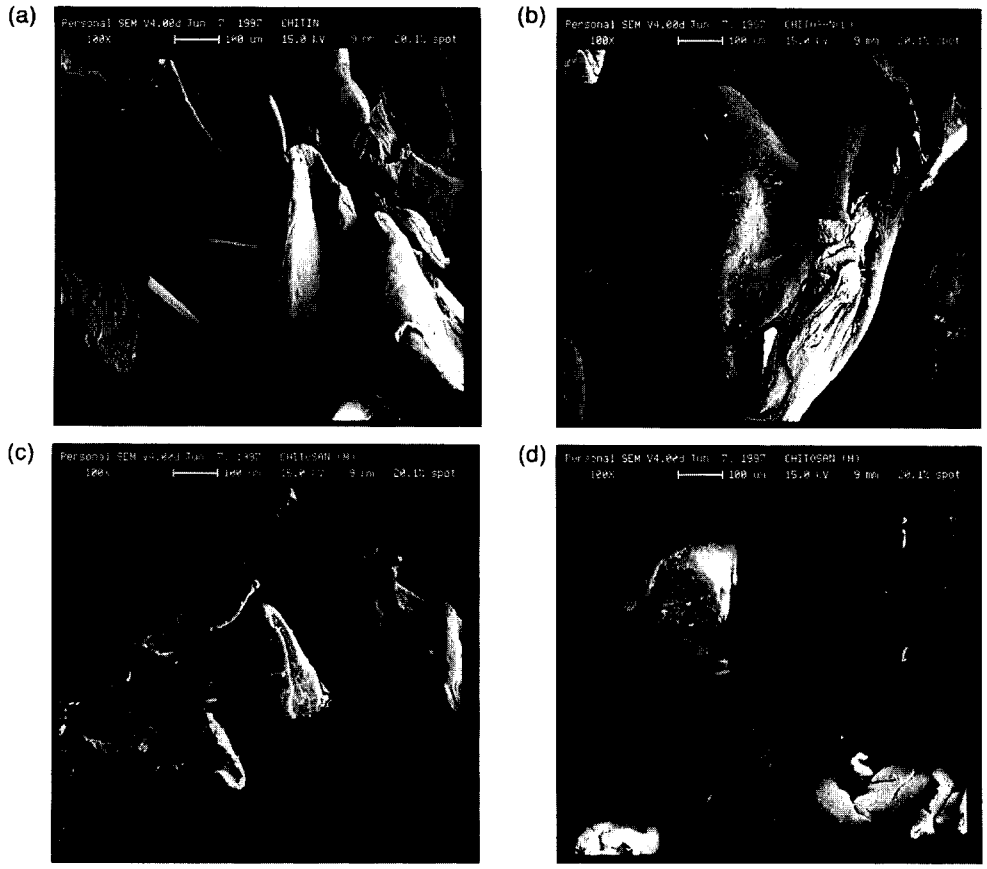


Fig. 6. SEM photographs of chitin (a), low (b), medium (c) and high(d) chitosan [× 100].

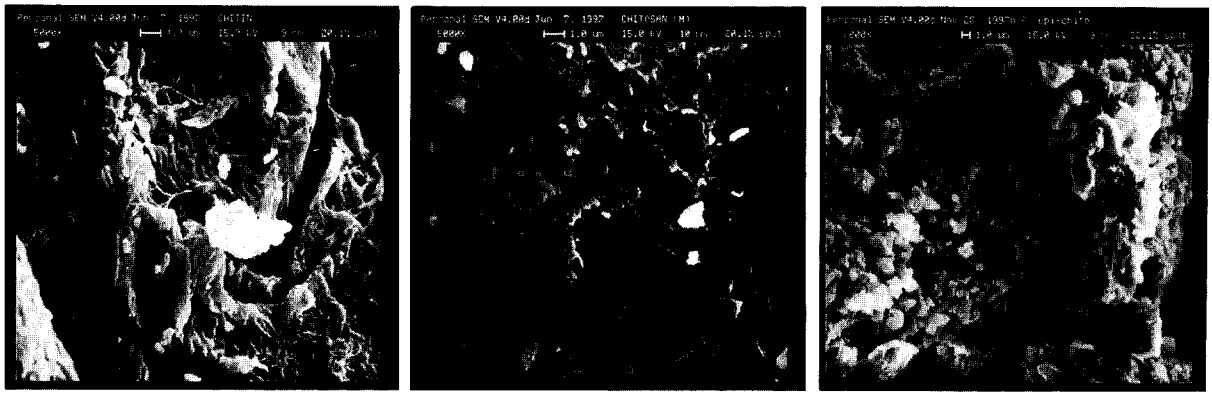


Fig. 7. SEM photographs of chitin (a), chitosan (b) and crosslinked chitosan [ECH] (c).

결 론

활용분야가 다양한 chitin유도체의 일종으로 저농도의 산성용액에서도 용해성이 우수한 chitosan을 알칼리 농도, 반응시간과 온도 등의 반응조건을 변화시켜서 다양한 점도의 chitosan을 제조하였고 또한, 1,3-dichloropropanol과 epichlorohydrin과 같은 2종의 가교제를 이용하여 결정성을 증가시킨 가교 chitosan을 제조하였다. 이에 대한 분석

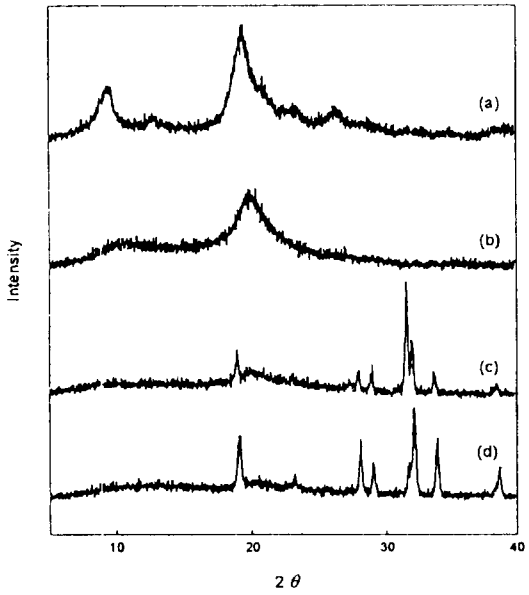


Fig. 8. X-ray diffraction patterns of various chitosan derivatives. (a) Chitin, (b) Chitosan, (c) Crosslinked chitosan (DCP), (d) Crosslinked chitos.

확인과 반응조건에 따른 점도가 다른 chitosan의 제조방법을 연구하였다. Chitin으로부터 chitosan을 제조할 때 알칼리처리를 하면 다당류의 에테르 결합의 가수분해를 억제하며 동시에 탈단백질, 탈아세틸화 반응을 할수 있다는 장점이 있다. 그리고 탈아세틸화 반응할 때 반응시간을 높이거나 반응온도를 높이면 탈아세틸화는 높아지나 분자사슬의 크기, 즉 점도와 분자량은 감소하였다. 그리고 무정형의 결정성이 낮은 chitosan을 가교제를 사용하므로써 결정성을 지닌 가교 chitosan을 제조할 수 있다. 이와 같이 반응온도, 반응시간, 알칼리 농도와 가교제에 따라 활용분야에 맞는 다양한 chitosan유도체를 제조할 수 있다.

Table 1. Surface area and viscosity by the major structural features of chitin, chitosan derivatives

Sample No.	Specific Surface Area [m^2/g]	Viscosity [cP]
Chitin	1.56	N/E*
Chitosan (high)	0.246	1380
Chitosan (medium)	1.593	590
Chitosan (low)	1.806	140
Crosslinked chitosan (ECH)	33.432	25
Crosslinked chitosan (DCP)	15.571	30

* N/E: Not Evaluated due to be different in solvent.

국문요약

수산계 폐기물로부터 chitin 유도체의 다양한 응용에도 불구하고 chitin의 상업적 이용은 적절한 용매의 부재와 화학적 저항성으로 인하여 제한적으로 이용되었다. 그러므로 Mima의 방법을 응용하여 NaOH 농도, 반응시간, 온도 등을 조절하여 탈아세틸화반응에 의한 다양한 점도가 다른 chitosan을 제조하였으며, 2종의 가교제를 이용하여 가교결합에 의한 결정성을 증가시킨 가교 chitosan을 제조하였다. 제조한 점도가 다른 chitosan과 가교 chitosan유도체를 다양한 분석기기를 이용하여 측정하였다. chitosan을 제조시 반응시간을 높이거나 반응온도를 높이면 탈아세틸화는 높아지나 분자사슬의 크기, 즉 점도와 분자량은 감소하였다. 반응온도, 반응시간과 알칼리 농도에 따라 활용분야에 맞는 chitosan을 제조할 수 있다.

참고문헌

1. Braconnot H.: *Ann, Chem. Phys.*, **30**, 265 (1811).
2. Odier A.: *Membrane Sci. Paris*, **1**, 29 (1823).
3. Jeuniaux C.: *Arch. Intern. Phys. Biochem.*, **72**(2), 329 (1964).
4. Austin P. R. and Sennet S.: Chitin in Nature and Technology, Plenum press, New York, 287, 1986.
5. Dunn H. J. and Farr M. P.: *U. S. Pat.*, 3,847,897, 1974.
6. Knorr D.: Food Tech., January, 85, 1984.
7. Hirano S.: Chitin and chitosan, Skjak-Braek Ed., Elsevier Applied Science, 37, 1988.
8. Darmadji P. and Izumimoto M.: *Meat Science*, **38**, 243 (1994).
9. Ghaouth A.E., Arul J. and Boulet M.: *J. Food Sci.*, **56**, 1618 (1991).
10. Sakurada I.: Polyvinyl Alcohol Fibers, Marcel Dekker, New York, 107 (1985).

11. Musuda M.: Polyvinyl Alcohol-Developments, C. A. Finch Ed., John Wiely and Sons, New York, 385 (1991).
12. Zhao W., Zhang Y. and Sun J.: *J. Macromol. Sci-Phys,* **B34**, 231(1995).
13. Horowitz S.T., Roseman S., Blumenthal H.J.: *J. Am, Chem. Soc.,* **79**, 5046 (1957).
14. Horton D. and Lineback D.R.: *Meth. Carbohydr. Chem.,* **5**, 403(1965).
15. Rigby, G.W.J: *U. S. Pat.*, 2,072,771, 1935.
16. Mima, S., Miya, M., Iwamoto, R. and Yoshikawa, S.: *J. Appl. Poly. Sci.,* **28**, 1909 (1983).
17. 이응호: 수산부산물을 이용한 키틴의 제조 및 이용에 관한 연구보고서, 한국과학재단, 1988.
18. 이용현, 정의준: chitin/chitosan 유도체의 구조, 분해효소, 이용 및 주류산업에의 활용, 주류공업, **14**, 73 (1994).