

오징어 연골을 이용한 Chitosan 및 Acetylchitosan의 제조와 특성

최현미 · 황선영 · 박성민* · 이근태[†]
 부경대학교 식품공학과, *부경대학교 공동실험실습관

Chitosan and Acetylchitosan from Squid Pen and Their Characteristics

Hyeon-Mee CHOI, Sun-Young HWANG, Seong-Min PARK*
 and Keun-Tai LEE[†]

Department of Food Science and Technology, Pukyong National University,
 Pusan 608-737, Korea
 *Cooperative Laboratory Center of Pukyong National University,
 Pusan 608-737, Korea

In order to utilize the processing wastes of squid, chitosan was prepared by intermittent deacetylation treatment of β -chitin contained richly in the pen of squid. Acetylchitosan also was synthesized from squid pen chitosan with anhydrous acetic acid and their characteristics were investigated. The amounts of nitrogen and ash of squid pen chitosan were $5.8 \pm 0.2\%$ and $0.2 \pm 0.03\%$ respectively, the yield of squid pen chitosan was $25 \pm 3\%$, the degree of deacetylation was 92%, and the molecular weight was 1.15×10^6 . Acetyl contents of N-acetylchitosan powder, acetylchitosan bead, N-ACF-1 (N-acetylchitosan film-1) and N-ACF-2 (N-acetylchitosan film-2) were 55.9%, 63.2%, 56% and 58.7% respectively. Two major peaks, amide I ($1,653 \text{ cm}^{-1}$) and II ($1,558 \text{ cm}^{-1}$) bent, on FT-IR spectra of the N-acetylchitosan from squid pen were almost similar to these of β -chitin. While there was a broad single peak at $1,601 \text{ cm}^{-1}$ assigned to be an amide I bend in squid pen chitosan. The CP/MAS NMR spectra of β -chitin, squid pen chitosan and N-acetylchitosan from squid pen showed a relative broad and single peak at 74 ppm assigned to fifth carbon (C-5) and third carbon (C-3). In case of β -chitin and N-acetylchitosan from squid pen, single peak at 74 ppm was showed as the same of β -chitin type.

Key words: β -chitin, Squid pen chitosan, N-acetylchitosan, IR spectra, CP/MAS NMR spectra

서 론

전 세계적으로 볼 때 갑각류의 폐기물은 연간 1억 4,400만 톤 이상 (Kim et al., 1997)이며, 계절적 영향을 받지 않고 다량의 chitin을 생산할 수 있기 때문에 주로 게나 새우 등과 같은 갑각류로부터 chitosan이 제조되고 있다. 갑각류에 함유된 chitin은 α -chitin으로 황산에만 용해되어 (Austin et al., 1981) 다양한 기능성 소재로서 활용하기 어려우며, 강산 등에 녹일 경우 급속한 분해가 일어나 활용이 불가능하다는 단점을 가지고 있다.

이러한 문제점을 개선하기 위한 방안으로 화학적 수식에 의한 유도체 개발이 용이한 오징어 연골에서 유래한 β -chitin을 이용하여 chitosan을 원하는 형태로 제조하는 것이 보다 효과적이라 생각된다. 오징어 연골에 함유된 β -chitin은 α -chitin에 비해 분자사슬이 서로 같은 방향으로 줄지어 있기 때문에 분자간 수소결합이 약한 결정구조를 이루어 α -chitin 보다 화학적 수식이 쉽고, 개방된 구조이기 때문에 완만한 조건하에서도 쉽게 유도체를 만들 수 있다 (矢吹, 1992).

연체동물의 두족류에 속하는 오징어는 우리나라에서 단일 어종으로 국민 1인당 연간 소비량이 5위 이내를 차지할 정도로 많이 소비되고 있으며, 건제품을 제외한 제품의 가공 시에 연골 부분이 전량 폐기되고 있다. 오징어 연골은 건조 중량 당 41% 정도의

chitin을 함유 (Hirano, 1988)하고 있을 뿐만 아니라 회분이 거의 없으므로 (Kim and Lee, 1997) chitin 제조시 게나 새우의 외피를 원료로 제조할 때와 비교하여 탈회 처리를 하지 않아도 되므로 경제적인 면에서나 폐수처리 면에서 장점을 가지고 있다. 따라서 오징어 연골을 이용한 chitin과 chitosan의 산업적 이용은 수산가공 폐기물의 효과적 처리라는 의미에서 매우 중요하다고 할 수 있다.

지금까지 chitosan은 많은 기능성을 가졌음에도 불구하고, 상온에서 결정상으로 묶은 염산이나 유기산에는 녹지만 중성이나 알칼리 수용액과 같은 용매에는 용해되지 않기 때문에 산업적으로 활발히 이용되지 못하고 있다. 최근에 그 기능성을 개선시키기 위한 방안으로 화학적 수식에 의한 유도체 개발이 활발해짐으로써 chitosan의 화학수식에 의한 기능화 연구가 이루어지고 있다 (東市郎 등, 1995). 그 방법 중 하나로 분자 내 OH, NH₂, 방향족 등의 H를 RCO-로 치환하는 반응으로 아실화가 있는데 chitosan의 N-아실화는 카복실산, 산염화물, 산무수물 등에 의해 이루어진다. 그러나 아실화 중에서도 선택적으로 N-아실화 하여 N-acetylchitosan 만을 얻기는 어렵고, 수산기의 아실화가 수반되어 Fig. 1과 같이 3가지 종류의 아실화 chitosan이 만들어 질 수 있다. 이 세 종류의 아실화 chitosan 중 N-acyl chitosan은 음료나 술 정제 시에 사용되는 막이나 투석막, 콘택트렌즈 등에 이용되며 O-acyl chitosan은 유화제로도 사용된다 (Hirano, 1988).

Hirano et al. (1975)은 부분적으로 탈아세틸화된 chitin (탈아세틸화도 45~55%) 또는 그 수용액을 알콜류의 유기용매 중에 넣어 고도로 팽윤 시킨 후 acetic acid/dicyclohexyl carbodiimide

[†]Corresponding author: ktlee@pknu.ac.kr

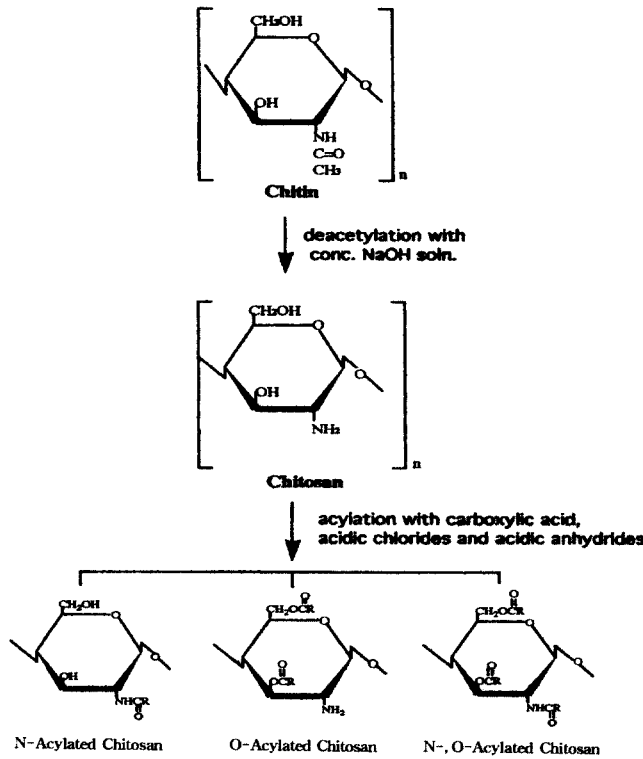


Fig. 1. Structures of chitin, chitosan and acylated chitosan.

(DCC) 또는 무수초산으로 재아세틸화함으로써 순수한 chitin을 얻을 수 있다고 하였다. 또한 β-chitin으로 되어 있는 오징어를 메탄올과 초산이 혼합된 용매에 용해한 다음 무수초산으로 선택적으로 N-아실화를 유도할 수 있기 때문에 탈아세틸화도가 0.0의 순수한 chitin을 얻을 수 있다고 하였다 (Moore et al., 1978).

지금까지 chitosan에 관한 연구는 게나 새우 껍질을 원료로 한 α-chitin을 원료로 하여 주로 이루어 졌고, 오징어 연골에 함유된 β-chitin을 이용한 chitosan의 구조분석 및 물리화학적 특성에 관한 연구 및 그 유도체 개발에 관한 연구결과는 미진한 실정이다.

본 연구에서는 오징어 연골을 이용하여 chitin, chitosan 및 아실화된 유도체인 N-acetylchitosan을 제조한 후, FT-IR spectra, CP/MAS NMR spectra를 이용하여 이들의 구조적 특징을 비교 분석하고, 탈아세틸화도와 분자량을 측정을 통해 물리화학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

강원도 강릉 지역의 수산 가공 공장에서 폐기되는 오징어 (*Ommastrephes barrami*) 연골을 수집하여 이물질들을 제거하고 수세한 후 40°C에서 12시간 열풍 건조시켜 50 mesh 정도로 분쇄한 다음 chitin 제조용 시료로 사용하였다.

2. Chitin 및 chitosan 제조

분쇄 오징어 연골에 1N NaOH 용액을 시료중량의 15배 가하여

실온에서 4시간 교반한 후 수세와 건조의 공정을 거쳐 chitin을 제조하였다. Chitin 100g에 40% NaOH용액 1.6L를 가하고 110~115°C에서 90분간 교반한 후 수세와 건조의 공정을 거쳐 1차 chitosan을 제조하였다. 1차 chitosan에 40% NaOH용액 1.6L를 가하고 110~115°C에서 30분간 교반한 후 수세와 건조의 공정을 거쳐 탈아세틸화된 2차 chitosan을 제조하였다. 1차와 2차 chitosan을 0.1N CH₃COOH 용액에 용해시킨 후 10% NaOH를 가하여 chitosan을 석출시키고 수세 후 동결 건조하여 정제된 3차 chitosan을 제조하였다.

3. 일반성분 분석

오징어 연골과 오징어 연골로부터 추출한 chitin과 chitosan의 수분은 상압가열건조법, 회분은 건식회화법, 질소량은 micro-Kjeldahl법에 따라 측정하였다 (AOAC, 1990).

4. N-acetylchitosan의 제조

(1) N-acetylchitosan 분말제조

N-acetylchitosan 분말은 Hirano et al. (1975)의 방법에 따라 chitosan 2g을 10% 초산 40mL를 넣어 용해하고 여기에 메탄올 160mL를 넣어 교반한 다음 2M 무수초산 200mL를 가해 실온에서 하루 밤 교반하였다. 이 때 형성된 겔에 메탄올을 가해 교반한 다음 겔만 따로 분리해 내어 에테르 수세 후 P₂O₅가 들어 있는 데시케이터에서 건조시켰다.

(2) N-acetylchitosan film의 제조

Chitosan 2g을 10% 초산용액 40mL에 용해시키고 메탄올 160mL로 희석하여 1% chitosan용액을 만든 다음 여과하여 일정한 유리판 (32cm×36cm)에 부은 후 50°C의 열풍건조기에서 건조시켰다. 2M 무수초산 200mL를 부어 12시간 둔 다음 유리판에서 필름을 떼낸 후 증류수로 수세하여 중화시킨 후 gel dryer로 두께에 따라 50~60°C에서 20~30분 정도 건조하여 필름을 제조하였다 (N-acetylchitosan film-1; N-ACF-1). 이 N-ACF-1에서 생긴 carbonyl group을 제거하기 위해 1M-KOH/MeOH에 4시간 정도 침지시킨 다음 증류수로 수세하여 중화시킨 후 gel dryer로 건조하여 필름 (N-acetylchitosan-film-2; N-ACF-2)을 제조하였다. Chitosan film (CHF)은 chitosan 2g을 1% 초산용액 200mL에 용해하여 1% chitosan을 만든 다음 여과하여 일정한 유리판 (32cm×36cm)에 부은 후 50°C의 열풍건조기에서 완전히 건조시켜 여기에 1N-NaOH를 동량 부어 2시간 정도 둔 다음 N-ACF-1과 마찬가지로 증류수로 중화시켜 gel dryer로 건조하여 필름을 제조하였다.

(3) N-acetylchitosan bead의 제조

Roberts and Taylor (1988)의 방법에 따라 표면활성제인 sorbitan monostearate 0.075g을 톨루엔 30mL에 용해한 다음 이것을 10% 초산용액에 녹인 키토산 용액 (2%, w/v) 10mL와 혼합하였다. 이 혼합물을 지속적으로 warning blender로 유화시키고 6.5mL의 무수초산을 첨가하는 동안 실온에서 천천히 교반하였다. 90분 후에 emulsion을 메탄올에 부어 1시간 동안 침지한 다음 메탄올을 따라내고 beads를 diethyl ether에 침지시킨 후 마지막으로 beads

를 여과하고 실온에서 건조하였다.

이 acetylchitosan bead는 N-acetylchitosan film을 만들 때 용매로 사용된 메탄올을 사용하지 않았는데 메탄올을 사용하여 bead를 만들었을 때 beads가 서로 부착하려는 경향과 기계적으로 약하여 건조 시에 구상 형태를 잃어버리기 때문에 본 실험에서는 chitosan을 10% 초산용액에 용해하여 무수초산과 반응시켜 beads를 제조하였다.

5. Chitin, chitosan 및 acetylchitosan의 물리화학적 특성

(1) I.R. spectrum 측정

Chitin, chitosan 및 acetylchitosan을 200 mesh로 마쇄한 후 각각의 시료분말 2 mg과 KBr 분말 (200 mesh) 100 mg을 정평하여 vibration mill에서 10분간 완전히 혼합한 후 pellet으로 만들어 FT-IR (BRUKER LTD: Germany, IFS-88)로 $4,000\text{ cm}^{-1} \sim 500\text{ cm}^{-1}$ 영역에서 측정하였다.

(2) NMR 분석

고분자의 화학구조 및 화학반응 위치 등을 알 수 있는 NMR분석은 Varian Unity Plus 300 MHz NMR Spectrometer를 사용하여 각 시료를 고체 상태로 25°C , 74.469 MHz에서 ^{13}C 을 측정하였다.

(3) 탈아세틸화도와 아세틸 함량 측정

Chitin, chitosan의 탈아세틸화도는 Sannan et al. (1978)의 방법에 따라 I.R. spectrum을 측정하여 A_{1550} 에서의 amide II bend와 A_{2878} 에서의 CH bend에 대한 흡광도 비 (A_{1550}/A_{2878})를 구한 후 Sannan et al. (1978)이 제시한 검량선을 이용하여 탈아세틸화도를 구하였다.

90% 이상의 탈아세틸화도는 탈아세틸화도가 높아도 amide I bend는 확실히 나타나지만 amide II bend는 불분명하고 또 CH 신축진동에 의한 A_{2867} 의 bend는 탈아세틸화도가 높아도 변화가 적은 것을 고려한 Miya et al. (1980)의 방법으로 IR spectrum을 측정하였다. A_{1655} 에서의 amide I bend와 A_{2867} 에서의 CH bend에 대한 흡광도 비 (A_{1655}/A_{2867})를 구한 후 Miya et al. (1980)이 제시한 검량선을 이용하여 탈아세틸화도를 구하였다. 또한 아세틸함량 (%)은 Domszy and Roberts (1985)의 방법으로 아래와 같은 식으로부터 구하였다.

$$\text{Acetyl (\%)} = (A_{1655}/A_{3450}) \cdot 100/1.33$$

(4) 고유점도 측정

고유점도는 시료를 각각 0.2 g을 formic acid 200 mL에 녹인 다음 Ubbelohde형 모세관 점도계를 사용하여 25°C 에서 측정하였으며 사용한 용매에 대한 각 시료 용액의 상대점도를 일정길이의 모세관을 통과하는데 소요된 시간의 비로 구한 다음 이로부터 비점도와 환원점도를 아래의 식으로부터 구하였다. 이 때 환원점도와 농도와의 관계를 작도하여 외삽법으로 고유점도를 구하였으며 시간이 경과함에 따른 변화를 관찰하였다.

$$\text{Relative viscosity; } \eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_s}$$

$$\text{Specific viscosity; } \eta_{sp} = \frac{(\eta - \eta_s)}{\eta_s} = \eta_{rel} - 1$$

$$\text{Reduced viscosity; } \eta_{red} = \frac{\eta - \eta_s}{C \cdot \eta_s} = \frac{\eta_{sp}}{C}$$

$$\text{Intrinsic viscosity; } [\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right) = (\eta_{red})_{C \rightarrow 0}$$

η_s : 용매의 점도, η : 용액의 점도, C: 용액의 농도

(5) Chitosan의 분자량 측정

Ubbelohde형 점도계를 사용하여 chitosan을 0.2 M AcOH-0.1 M AcONa 완충용액에 녹여 30°C 에서 고유점도를 구하고 고유점도와 분자량의 관계를 지수법칙으로 나타낸 Mark-Houwink식과 Rinaudo et al. (1988)이 구한 상수를 이용하여 분자량을 구하였다.

$$[\eta] = K \bar{M}^\alpha (K = 1.424 \times 10^{-5}, \alpha = 0.96)$$

$$\bar{M} = 10^{\frac{\log[\eta] - \log K}{\alpha}}$$

결과 및 고찰

I. 오징어 연골 chitin 및 chitosan의 일반성분

본 실험의 시료인 오징어 연골과 이로부터 제조한 chitin 및 chitosan의 일반성분 및 수율은 Table 1과 같다. 오징어 연골과 chitin, chitosan의 질소함량은 각각 12.1%, 8.1%, 5.8% 이었으며 회분함량은 각각 0.8%, 0.4%, 0.2%로 나타났다. 오징어 연골과 chitin, chitosan의 회분함량은 1% 이하로 세 시료 모두 비슷하였다. 탈단백 과정을 거쳤음에도 불구하고 chitin 및 chitosan의 질소함량이 8.1%, 5.8%인 것은 chitin 및 chitosan 자체가 가지고 있는 아미노기의 질소가 분석 중에 포집 되었기 때문이라 생각된다. 게나 새우의 갑각에는 일반적으로 질소함량이 8% 정도, 회분함량이 40% 정도인 것으로 알려져 있는데 (Kim et al., 1997) 오징어 연골은 게나 새우의 갑각에 비해 질소함량이 약간 높은 반면 회분은 매우 낮은 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 chitosan 제조의 중간단계인 chitin 제조시 탈회 과정을 생략할 수 있었는데 이러한 탈회 과정의 생략은 chitosan 제조 시간의 단축과 경비 절감 효과를 기대할 수 있으며, chitosan 제조시 발생하는

Table 1. Yield and chemical composition of squid pen, chitin and chitosan (dry basis)

	Squid		
	Pen	Chitin	Chitosan
Yield (%)	100	36 ± 1 ^a	25 ± 3 ^b (70%) ^c
Nitrogen (%)	12.1 ± 0.5	8.1 ± 0.3	5.8 ± 0.2
Ash (%)	0.8 ± 0.03	0.4 ± 0.05	0.2 ± 0.03
Moisture (%)	5.6 ± 0.1	3.7 ± 0.3	2.5 ± 0.4

Each value was expressed as the mean standard deviation for 5 samples.

a; chitin (g) / pen (g) 100 (dry basis)

b; chitosan (g) / pen (g) 100 (dry basis)

c; chitosan (g) / chitin (g) × 100.

폐수에 의한 환경 오염에 대한 부담도 어느 정도 경감할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 chitin의 수율은 36%로 일반적으로 계로부터 추출한 chitin의 수율(22~23%)에 비하면 높은 편이었으며 오징어 연골로부터 최종적으로 얻어지는 chitosan의 수율은 25%였다.

II. Chitin, chitosan 및 acetylchitosan의 물리화학적 특성

1. Chitin, chitosan 및 N-acetylchitosan의 구조특성

(1) I.R. spectra

Chitin, chitosan 및 N-acetylchitosan의 구조를 확인하기 위하여 I.R. spectrum을 분석하였다 (Fig. 2). Chitin은 1,653 cm⁻¹에서 amide I과 1,558 cm⁻¹에서 amide II에 의한 흡수 peak가 나타났다.

보통 계나 새우의 갑각으로부터 제조한 α-chitin에 있어서 amide I bend (-NH₂)는 1,640과 1,620 cm⁻¹에서 2개의 peak가 생기는 반면 (Kim et al., 1996)에 본 실험에 사용한 오징어 연골로부터 제조한 β-chitin은 1,653 cm⁻¹에서 1개의 단일 peak가 나타났다 (Fig. 3). 이 결과는 Kim et al. (1996)이 오징어 연골로부터 제조한 β-chitin의 FT-IR spectrum 결과와 일치하였다. 이러한 α-chitin과 β-chitin의 FT-IR spectrum 차이는 α-chitin에 비하여 β-chitin이 분자 내부 또는 분자와 분자 사이에 형성되어 있는 수소결합이 약해 상대적으로 낮은 결정구조를 이루고 있기 때문으로 생각되어진다. 이러한 결정구조의 차이는 사슬의 배열 특성으로 설명되어질 수 있는데, α-chitin은 분자사슬이 서로 역평행으로 줄지어 있으며 분자쇄 사이의 많은 수소결합에 의해 견고한 결정구조를

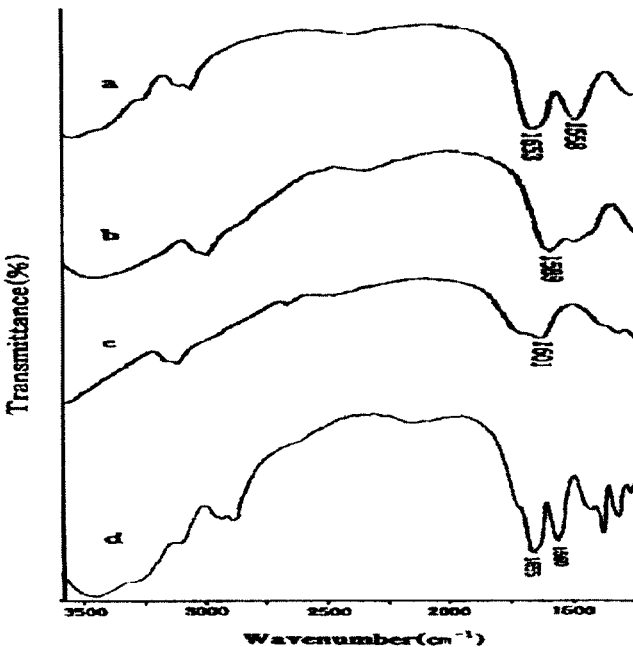


Fig. 2. Infra red spectra of chitin, chitosan and N-acetylchitosan. a, Chitin; b, Chitosan-1 (deacetylation for 90 min at 115~120°C); c, Chitosan-2 (re-deacetylation for 30 min with chitosan-1); d, N-acetylchitosan.

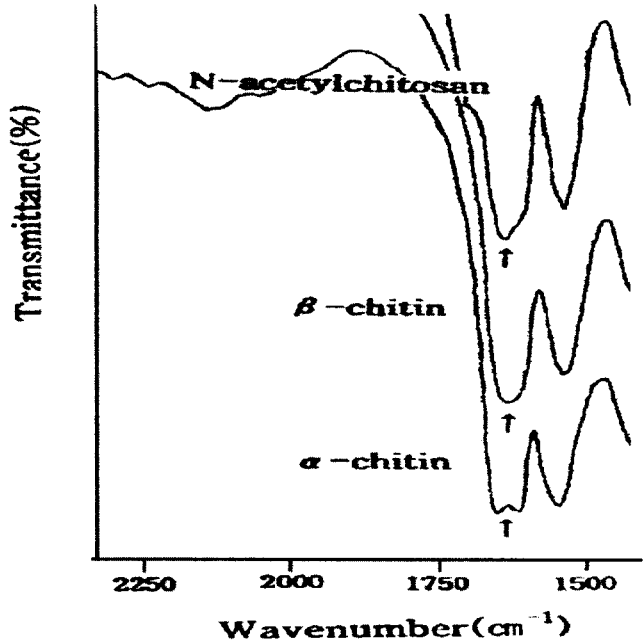


Fig. 3. Infra red spectra of amid I bend in chitin, chitosan and N-acetylchitosan.

이루고 있어 물에 의해 팽윤 되지 않지만 β-chitin은 모든 분자쇄가 같은 방향으로 병렬되어 사슬간에는 수소결합이 존재하지 않아 사슬 사이에 물분자가 침입하여 팽윤이 일어나게 되기 때문이다. 그러므로 β-chitin은 α-chitin에 비해 높은 반응성을 가질 수 있으며 따라서 탈아세틸화가 용이하다 (Kurita et al., 1994). Chitin과 chitosan의 I.R. spectrum을 살펴보면, chitin에서는 amide II bend가 1,558 cm⁻¹에서 나타났고, chitin을 110~115°C의 40% NaOH 용액에서 90분간 탈아세틸화한 chitosan-1에서는 1,589 cm⁻¹에서 나타났고, 또 이 chitosan-1을 동일한 조건에서 30분간 재탈아세틸화한 chitosan-2의 경우는 1,601 cm⁻¹에서 넓은 peak가 나타난 것으로 보아 amide I bend인 것으로 생각되어진다. 또한 N-acetylchitosan의 경우 β-chitin과 마찬가지로 1,655 cm⁻¹에서 amide I bend가 나타났으며, 1,560 cm⁻¹에서는 amide II bend가 나타났다. Kim et al. (1996)에 의하면 N-acetylchitosan도 1,640과 1,620 cm⁻¹에서 2개의 peak가 생긴다고 하였는데 본 실험에서 β-chitin으로 제조된 chitosan을 N-acetylation 한 결과 1,640 cm⁻¹에서 약한 peak가 나타났다.

(2) NMR 분석

본 연구에서는 chitin과 chitosan이 일반 용매에는 녹지 않으므로 고체 상태에서 측정할 수 있는 고체 고분해능 NMR (CP/MAS ¹³C-NMR)을 이용하여 chitin, chitosan 및 N-acetylchitosan의 구조를 분석하였다 (Fig. 4). Chitosan의 경우 90% 이상의 탈아세틸화가 진행되어 chitin에서 나타나는 22 ppm 부근의 CH₃와 173 ppm 부근의 C=O기의 peak가 거의 나타나지 않았다. 또한 탄소원자 C-3와 C-5가 α-chitin에 있어서는 73 ppm과 75 ppm에서 2개의 signal로 나타났는데, α-chitin 사슬들 중의 한 잔기에 있는 C-3 위 β-chitin에 있어서는 74 ppm에서 한 개의 signal로 나타났다. 이것

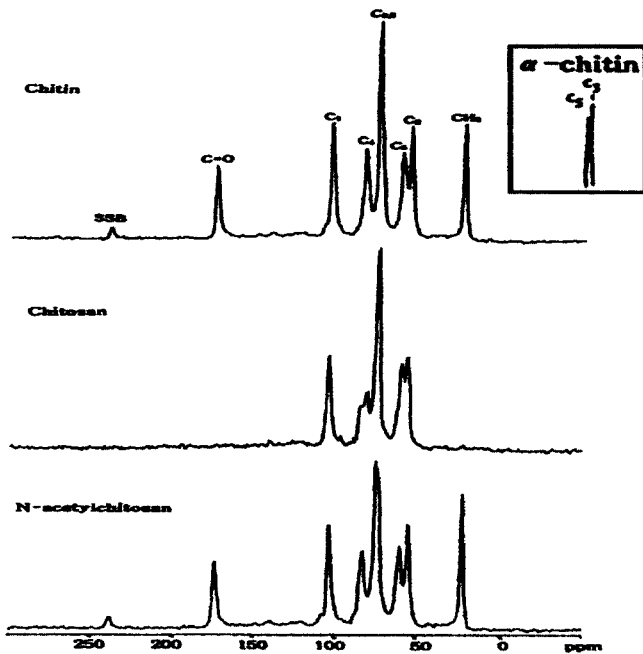


Fig. 4. CP/MAS ^{13}C NMR spectra of chitin, chitosan and N-acetylchitosan.

은 α -chitin의 경우 모든 OH기가 수소결합 형태인 역평행 구조를 가지고 치의 산소원자와 다른 사슬 중의 잔기 내 C-5 위치의 산소원자 사이에 수소결합이 형성되고, 동시에 CH_2OH 와 다른 잔기의 C-6에 결합된 산소원자 사이에 수소결합이 형성되어 있으며 반면에 β -chitin은 사슬의 방향이 같은 평행구조를 이루고 있어서 서로 다른 잔기의 C-2 위치에서만 수소결합이 일어나기 때문이다. 결국 α -, β -chitin에 있어서 C-3과 C-5의 화학적 이동 (chemical shift) 차이 때문이라고 생각된다. 또 N-acetylchitosan의 경우는 α -chitin처럼 뚜렷하지는 않지만 β -chitin과는 다른 signal을 확인할 수 있었다. Takai et al. (1988)은 β -chitin을 170°C 에서 2시간 가열하여 얻은 chitin의 경우 결정성과 수소 결합력을 증가시켜 C-3과 C-5의 단일 signal이 2개의 signal로 즉, α -chitin으로 변한다고 한 것과 비교하여 본 실험에서 재탈아세틸화한 chitosan을 이용하여 제조된 N-acetylchitosan은 α -chitin과 β -chitin이 공존하였다.

2. Chitin 및 chitosan의 탈아세틸화도와 분자량

Chitin과 chitosan의 탈아세틸화도를 측정하여 Table 2에 나타내었다. 일반적으로 게나 새우 chitin의 탈아세틸화도가 약 10~17%인데 비해 오징어 연골 chitin의 탈아세틸화도는 33.2% 정도로 비교적 높는데 이것은 1N NaOH를 사용하여 탈단백 하는 과정에서 β -chitin이 가지는 구조적 특성으로 인하여 어느 정도 탈아세틸화가 일어나기 때문이라고 생각된다. $110\sim 115^\circ\text{C}$ 에서 90분간 탈아세틸화 한 chitosan-1의 탈아세틸화도는 78.7%이었으며 이것을 30분 정도 재탈아세틸화한 chitosan-2는 92%의 탈아세틸화도를 나타내었다.

오징어 연골로부터 제조한 chitosan을 0.2M AcOH (CH_3COOH)-0.1M AcONa (CH_3COONa) 용액에 농도별로 녹여 Ubbelohde

Table 2. Degree of deacetylation of chitin and chitosan

	Degree of deacetylation (%)
Chitin	33.2
Chitosan-1 ^a	78.7
Chitosan-2 ^b	92.0

a; deacetylation for 90 min in 40% NaOH at $110\sim 115^\circ\text{C}$

b; re-deacetylation for 30 min at the same conditions of chitosan-1.

형 점도계로 측정된 고유점도는 9.3815 dL/g 이었다. 고유점도와 분자량과의 관계는 Mark-Houwink식, $[\eta]=\text{KM}^\alpha$ 로 나타낼 수 있으며 여기서 $[\eta]$ 은 고유점도로서 한 개의 독립된 고분자 사슬이 용액 내에서 차지하는 부피 (hydrodynamic volume)를 의미하며 K와 α 는 고분자의 특성과 용매의 조건에 따라 결정되는 상수이다. Rinaudo (1988)의 상수 $\text{K}=1.424\times 10^{-5}$, $\alpha=0.96$ 과 실험에서 구한 고유점도 9.3815 dL/g 을 Mark-Houwink 식에 대입하여 구한 chitosan의 분자량은 1.15×10^6 이었다 (Table 3). 이것은 Kim et al. (1997)이 보고한 외국산 오징어 연골 chitosan의 분자량 1.20×10^6 보다 약간 작았다.

Table 3. Intrinsic viscosity ($[\eta]$) and molecular weight (Mw) of chitosan manufactured from squid pen

$[\eta]$ (dL/g)	Mw ($\times 10^6$) [*]
9.3815	1.15

^{*}Calculated from Mark-Houwink's equation with Rinaudo constant ($\text{K}=1.424\times 10^{-5}$, $\alpha=0.96$), Mark-Houwink equation; $[\eta]=\text{KM}^\alpha$

3. Acetylchitosan 제조방법에 따른 아세틸 함량의 비교

Table 4는 acetylchitosan들의 아세틸 함량 (%)을 나타낸 것으로 N-acetylchitosan 분말의 아세틸 함량은 55.9%였고, acetylchitosan bead, N-acetylchitosan film-1 (N-ACF-1), N-acetylchitosan film-2 (N-ACF-2)는 각각 63.2%, 56.0%, 58.7% 으로 N-acetylchitosan 분말과 N-ACF-1의 아세틸 함량은 큰 차이를 나타내지 않았다.

Table 4. Acetyl content of chitosan derivatives (%)

	Acetyl (%)
N-acetylchitosan	55.9
Acetylchitosan bead	63.2
N-acetylchitosan film-1 (N-ACF-1)	56.0
N-acetylchitosan film-2* (N-ACF-2)	58.7

^{*}The film was treated with KOH/MeOH to remove the ester carbonyl group from N-acetylchitosan film-1.

荒木 et al. (1991)은 묽은 초산/메탄올 의 혼합 용매계에서 반응시키면 amino기가 선택적으로 아실화되며 일부 O-아실화가 일어난 것은 1M-KOH/MeOH에 4시간 침지하면 O-아실기를 선택적으로 제거할 수 있다고 하였다. 본 실험의 N-acetylchitosan film (N-ACF-1)을 1M-KOH/MeOH에 4시간 정도 침지시켜

만든 N-acetylchitosan film-2 (N-ACF-2)에서 아세틸 함량이 증가한 결과와 일치하였다. 또한 acetylchitosan bead가 63.2%로 아세틸 함량이 가장 높았던 것은 선택적으로 N-acetylation을 하기 위한 용매의 조건으로 사용하는 메탄올을 사용하지 않고 10% 초산만을 용매로 사용하였기 때문에 O-acyl화가 3번과 6번 탄소의 OH기에 어느 정도 일어났기 때문으로 생각되어진다.

4. Chitin, chitosan 및 N-acetylchitosan의 고유점도 변화

Chitin, chitosan 및 N-acetylchitosan을 포름산 (88~92%, 일급 시약)에 0.1%로 용해하여 실온에서 Ubbelohde형 점도계로 시간경과에 따른 고유점도 변화를 관찰하였다 (Fig. 5). Chitosan의 경우 chitin과 N-acetylchitosan에 비하여 전체적으로 고유점도가 높았고, 0 day에 비해 5일 경과 후 고유점도는 chitosan은 16.41 dL/g, chitin은 5.45 dL/g, N-acetylchitosan이 3.81 dL/g이었다. 그 후로도 계속 완만하게 감소하여 25일째는 chitosan은 14.39 dL/g, chitin은 1.31 dL/g, N-acetylchitosan이 1.06 dL/g으로 고유점도가 감소하였다. Chitin과 N-acetylchitosan은 chitosan에 비하여 고유점도가 크게 감소하였으며 특히, chitin의 경우 5일째 까지는 고유점도가 가장 큰 폭으로 저하되어 Jean et al. (1982)이 포름산에 용해된 1%, 2% chitin을 실온에 40일 동안 두었을 때 점도변화가 현저하다고 한 것과 같은 결과를 나타내었다. 또한 초기에 chitin보다 N-acetylchitosan의 점도가 낮은 것은 N-acetylchitosan의 아세틸화도가 chitin 보다 낮기 때문이라고 생각된다. 30일 경과 후에 chitin과 N-acetylchitosan의 고유점도가 거의 0에 가깝게 나타난 것으로 보아 이들 분자의 분해가 대부분 진행되었음을 알 수 있었다. 위의 결과로 보아 이미 만들어진 N-acetylchitosan 분말로 bead나 film을 제조하기 위해 포름산에 녹일 경우 너무 많은 분자량 저하가

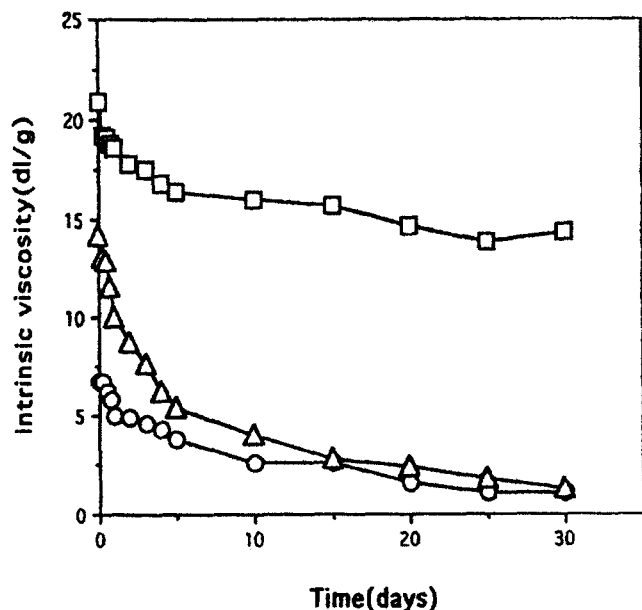


Fig. 5. Changes in intrinsic viscosity of squid pen chitin, chitosan and N-acetylchitosan in formic acids a function of time at room temperature.
—□—, chitosan; —△—, chitin; —○—, N-acetylchitosan.

일어나 bead나 film을 제조할 수가 없다. 따라서 이의 개선책으로 bead나 film을 만드는 과정 중에 아세틸화를 하는 것이 바람직하리라 생각된다.

요 약

- 오징어 연골과 chitin, chitosan의 질소함량은 각각 12.1%, 8.1%, 5.8%이며 회분함량은 각각 0.8%, 9.4%, 0.2%로 나타났으며 오징어 연골로부터 최종적으로 만들어지는 chitosan의 수율은 $25 \pm 3\%$ 이었다.
- 재탈아세틸화 하여 얻어진 chitosan의 탈아세틸화도는 92%로 이는 NMR을 분석한 결과 chitin의 NMR 분석에서 보여지는 CH_3 와 $\text{C}=\text{O}$ 기의 peak가 거의 나타나지 않았으며 또한 C_3 , C_6 가 α -chitin에서는 역평행 구조로서 2개의 signal로 나타나는데 본 실험에서는 β -chitin에서 보여지는 단일의 signal로 나타났다.
- Chitosan을 0.2 M AcOH-0.1 M AcONa 용액에 녹여 30°C에서 점도를 측정된 결과 Mark-Houwink 식과 Rinaudo의 상수로 부터 $[\eta] = 1.424 \times 10^{-5} M^{0.96}$ 이었으며 분자량은 1.15×10^6 이었다.
- I.R spectrum을 측정된 결과 chitin은 $1,653 \text{ cm}^{-1}$ 에서 amide I bend가, $1,558 \text{ cm}^{-1}$ 에서 amide II bend가 나타났으며 chitosan은 $1,601 \text{ cm}^{-1}$ 에서 1개의 넓은 bend가 생겼다. N-acetylchitosan의 경우 chitin과 마찬가지로 $1,655 \text{ cm}^{-1}$ 에서 amide I bend가, $1,560 \text{ cm}^{-1}$ 에서 amide II bend가 나타났다.
- 아세틸 함량은 N-acetylchitosan 분말이 55.9%, acetylchitosan bead가 63.2%, N-ACF-1이 56%, N-ACF-2가 58.7%이었다.
- Chitin, chitosan 및 N-acetylchitosan을 formic acid에 용해하여 실온에서 시간에 따른 고유점도 변화를 관찰한 결과 chitosan이 chitin, N-acetylchitosan 보다 비교적 점도가 높았지만 3개 모두 시간이 지남에 따라 점도가 현저히 저하되어 25일째에는 chitosan이 14.39 dL/g, chitin이 1.31 dL/g, N-acetylchitosan이 1.06 dL/g이었다.

참 고 문 헌

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of official Analytical Chemists. Arlington, 1298pp.
- Austin, P.R., C.J. Brine, J.E. Castle and J.P. Zikakis. 1981. Chitin; New facets of research. Science, 212, 749~753.
- Domszy, J.G. and G.A.F. Roberts. 1985. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. Makromol. Chem., 186, 1671~1677.
- Hirano, S. and Y. Ohe. 1975. A facile N-acylation of chitosan with carboxylic anhydrides in acidic solutions. Car. Res., 41, C1~C2.
- Hirano, S., Y. Ohe and H. Ono. 1976. Selective N-acylation of chitosan. Car. Res., 47, 315~320.
- Hirano, S. 1988. Production application of chitin and chitosan in Japan. Chitin and Chitosan Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan, 37~43.
- Kim, S.K. and E.H. Lee. 1997. Food industrial applications of chitin and chitosan. Korean J. Chitin and Chitosan, 2, 43~59.

- Kim, S.S., S.H. Kim and Y.M. Lee. 1996. Preparation, characterization and properties of β -chitin and N-acetylated β -chitin. J. Polymer Sci.:Part B: Polymer Physics., 34, 2367~2374.
- Kim, S.M., S.M. Park, H.M. Choi and K.T. Lee. 1997. Rheological properties of chitosan manufactured from the pens of domestic (*Todarodes pacificus*) and foreign (*Ommastrephes bartrami*) squid. J. Korean Fish. Soc., 30, 859~867.
- Kurita, K., S. Chikaoka, M. Kamiya and Y. Koyama 1988. Studies on Chitin 14. N-acetylation behavior of chitosan with acetyl chloride and acetic anhydride in a highly swelled state. Bull. Chem. Soc. Japan, 61, 927~930.
- Kurita, K., S. Ishii, K. Tomita, S.I. Nishimura and K. Shimoda. 1994. Reactivity characteristics of squid β -chitin as compared with those of shrimp chitin: high potentials of squid chitin as a starting material for facile chemical modifications. J. of Polym. Sci.:Part A: Polym. Chem., 32, 1027~1032.
- Miya, M., R. Iwamoto, S. Yoshika and S. Mima. 1980. I.R. spectroscopic determination of CONH content in highly deacylated chitosan. Int. J. Macromol., 2, 323~324.
- Moore, G.K. and G.A.F. Roberts. 1978. Studies on the acetylation of chitin and Chitosan, 421~429.
- Rinaudo, M. and A. Domard. 1988. Solution properties of chitosan. Proceedings of the 4th International Conference on Chitin and Chitosan, 71~86.
- Roberts, G.A.F. and K.E. Taylor. 1988. The Preparation and Characterisation of Chitin Beads for Use in Chromatography. Chitin and Chitosan Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan, 577~583.
- Sannan, T., K. Kurita, K. Ogura and Y. Iwakura. 1978. Studies on chitin (7. I.R. spectroscopic determination of degree of deacetylation). Polymer, 19, 458~459.
- Takai, M., Y. Shimizu and J. Hayashi. 1988. NMR and X-ray studies of chitin and chitosan in solid state. Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan, 431~436.
- 東 市郎 外 46人. 1995. キチン誘導体調製法 キチン, キトサンハンドブック, キチン, キトサン研究會編, 技報堂出版, pp. 221~248.
- 矢吹. 1992. キチン, キトサソの應用, キチン, キトサン研究會, pp. 1~21.

2001년 6월 20일 접수

2001년 9월 25일 수리