

## 아세틸키틴 : 그 製法과 膜의 性質

趙義煥 · 孔明宣

韓國 科學院 化學科

(1980년 5월 23일 접수)

## Acetylchitin: Its Preparation and Membrane Properties

Iwhan Cho and Moungh-Sun Kong

*Department of Chemistry, Korea Advanced Institute of Science, Seoul, 131 Korea*

(Received May 23, 1980)

요 약 完全히 아세틸화된 (degree of acetylation: 2) 아세틸키틴을 半透膜으로서의 性質을 調査하기 위해 過鹽素酸과 無水醋酸으로 0°C에서 5時間 反應하여 얻었다. 키틴의 아세틸화는 포름산에 對한 溶解性を 增加시키고 diacetylchitin의 경우 85%의 포름산수용액에서도 쉽게 녹았다. 한외여과 實驗을 위해 유리판 위에서 포름산에 녹인 1% 아세틸키틴 溶液으로 膜을 만들었으며 마른막의 두께는 7~8 $\mu\text{m}$ , 젖은막의 두께는 10~12 $\mu\text{m}$  이고 膜의 含水率은 25%로 키틴보다 매우 작은 값이다.

여러가지 分子量에 對한 rejection efficiency는 폴리에틸렌 글리콜, saccharides, 아미노酸, 無機鹽에 對하여 測定하였고 rejection efficiency의 限界는 分子量 7,500으로 純粹한 키틴의 10,000보다 작았다. 分子量이 비슷한 경우 rejection efficiency는 膜에 對한 親和性的의 差異로 分配係數를 測定하여 알 수 있었다. 아세틸키틴膜에서 saccharide, 아미노酸이 폴리에틸렌 글리콜類보다 親和성이 좋아 rejection efficiency가 작고 無機鹽인 경우 實際의 水和된 이온半徑이 크게 作用하여 有機溶質보다 컸다.

**Abstract :** Chitin was separated in a lean form from skeletal pens of squids and shells by acid and alkali treatment, and acetylchitins of different [degree of acetylation were prepared to investigate the film properties as semipermeable membrane.

A fully acetylated chitin (degree of acetylation, 2) was prepared by the acetylation of chitin in the presence of perchloric acid with calculated amount of acetic anhydride at 0°C for 5 hours. Acetylated chitins exhibited increased solubility in formic acid compared with chitin and diacetylchitin was easily soluble even in 85% aqueous formic acid.

Acetylchitin films for ultrafiltration study were prepared from formic acid solution by casting on a glass plate and by solidifying in ethanol. Thus prepared films had wet thickness 10-12 $\mu$ , and dry thickness 7-8 $\mu$ , indicating 25% water absorption.

Rejection efficiency towards various solutes of different molecular weight including polyethylene glycols, saccharides, amino acid were examined and molecular exclusion limit was found to be about 7,500. This value is smaller than that of chitin films (~10,000).

Measurements of the distribution coefficient for the solutes correlates well with the difference in rejection efficiency toward solutes of similar molecular weights.

## I. 諸 論

키틴은 셀룰로오스와 비슷한 構造를 가진 polysaccharide 로서 N-acetyl-D-glucosamine 이 1,4-β 結合을 하고 있으며 C-2位置에 히드록시基 代身에 아세틸 아미노基로 되어 있다. 키틴의 化學構造는 Fig. 1과 같다. 自然에 存在하는 키틴은 無機鹽인 炭酸칼슘과 단백질, 카로틴과 複合體(complex)를 이루고 있고 結晶構造의 分子사슬 排列에 따라 α, β, γ-키틴으로 나누어진다.<sup>1,2</sup> 現在 食用으로 쓰이고 있는 새우, 게껍질의 30%를 이루고 있는 키틴을 利用하기 위해서 많은 研究가 進行中이며 키틴纖維<sup>3</sup>, 織物處理, 酵素의 精製<sup>4</sup>, 食品添加劑<sup>5</sup>로 利用하려는 研究가 한창이고 한외여과 膜으로서 分子量 10,000이 exclusion limit로 밝혀졌으며<sup>6,7</sup> 反應性膜으로서 活用과 immobilization에 對한 研究도 進行中이다.

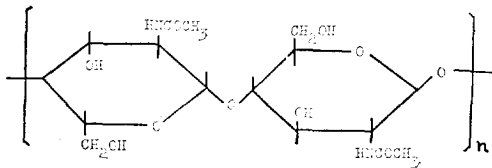


Figure 1. Chemical structure of chitin.

키틴은 셀룰로오스와 같이 여러가지 誘導體<sup>8~13</sup>가 알려져 있는데, 極斷的인 反應條件이 要求되고 어렵기 때문에 一般的인 活用性이 없었다. 아세틸키틴의 경우 1935年 Schorign, Hait<sup>13</sup>에 의해서 처음 發表되었으나 反應時間이 길어 分子量이 작고 아세틸化도가 작은 여러가지로 置換된 것이 얻어진다.

本 研究에서는 過鹽素酸과 無水醋酸을 使用하여 N-acetyl-D-glucosamin의 -OH基 2개가 完全히 置換된 diacetylchitin을 만들어 膜을 製造하였다.

傳統的인 逆 滲透膜은 셀룰로오스 아세테이트로부터 始作되었고 한외여과는 逆滲透와 區分된다. 한외여과<sup>14</sup>는 比較的 큰 分子量 즉, 단백질, 天然고무, 高分子, 複雜한 有機化合物 등을

溶液에서 溶質의 滲透壓을 초과할 정도의 壓力으로 效果的인 分離를 할 수 있고 clays, pigments, 鑛物質, 라텍스粒子, 微生物의 分離工程도 可能하며<sup>15</sup> 熱이나 化學物質에 敏感한 食用物質, 生化學物質, 藥品 등의 分離에 經濟적 方法이나 또한 여러가지 分子量의 溶質이 녹아있는 溶液中에서 特定한 溶質만을 濃縮제거하고 合成高分子의 分子量에 따른 分離도 可能하다<sup>16</sup>.

아세틸 키틴膜은 키틴보다 hydrophobic한 膜으로서 한외여과 實驗으로 키틴과 比較하여 더 작은 exclusion limit를 가져 키틴보다 작은 分子量의 物質을 效果的으로 分離가 가능하다.

## II. 實驗方法

### 2-1. 試 藥

무수초산 : 순수한 무수초산은 試藥用 무수초산을 오산화 인 (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)으로 一次 處理하고 ignited K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 넣고 137.8°~138°C에서 蒸溜하여 使用하였다.

포름 酸 : 試藥用 (88%) 포름酸을 結晶水를 잃은 黃酸구리로 먼저 水分을 제거하고 나머지 水分은 無水 프탈酸을 넣고 12時間 정도 還流시킨 後 蒸溜하여 使用하였다.

過鹽素酸 : 試藥用 60% 溶液을 그대로 使用하였다.

폴리에틸렌 글리콜 : 日本 和光純藥工業株式會社製品(平均分子量 各各 200, 400, 600...)을 그대로 使用하였다.

### 2-2. 키틴의 分類

뼈 오징어 (Loligo)의 뼈 (pen)의 안쪽 연한 炭酸칼슘層을 스페툴라로 긁어내고 키틴이 많은 부분만 골라내어 微細하게 부수고 5°C 以下에서 2N의 鹽酸溶液과 잘 攪拌하며 炭酸가스가 發生하지 않을 때 까지 反應시켜 炭酸칼슘을 完全히 제거한다. 酸處理가 끝난 키틴을 洗滌하고 乾燥한 後 1N의 NaOH 溶液에 넣고 12時間 이상 충분히 끓이면서 단백질을 加水分解시키고 Xanto-Protein 反應에 의해 누런 색이 나타나지 않을때 反應을 終結시킨다. 잘 洗滌한 後 眞空

乾燥器에서 乾燥한 後 막자사발에 넣고 微細한 粉末로 만든後 다음 反應에 使用하였다.

### 2-3. 아세틸키틴의 製造

精製된 무수초산(13.1l)을 100ml 플라스크에 넣고 얼음 中탕에 의해 충분히 冷却시킨 後 過鹽素酸 60% 溶液(5ml)을 滴下하여 1 時間에 걸쳐 攪拌해 주며 反應시키고 하루정도 방치한 後 使用하였다.

124ml의 無水초산을 500ml 플라스크에 넣고 얼음중탕에 의해 냉각시킨 後 앞에서 製造한 촉매(6.6ml)를 滴下하며 섞은後 키틴 粉末(10g)을 넣고 잘 攪拌시켜 주면서 5 時間 反應시킨 다음 洗滌한 後 70°C 眞空乾燥器에서 乾燥한 後 아세틸키틴을 收率 94%로 얻었다.

### 2-4. 製 膜

아세틸키틴의 溶媒로는 methanesulfonic acid, dichloroacetic acid, hexafluoroisopropanol 등이 있으나 溶媒蒸發이 느리기 때문에 ฟอร์ม산을 使用하였다. 아세틸키틴을 ฟอร์ม산에 重量으로 1%가량 넣고 12 時間 정도 攪拌하여 完全히 溶解시킨 後 濾過하여 注射器로 1cc씩 뽑아 一定한 넓이의 膜을 편평한 유리판위에서 製造하였다. 이 膜을 0.2% NaOH-에탄올 溶液에 담겨 殘存하는 ฟอร์ม산을 除去하고 5 日以上 蒸溜水에 담근 後 한외여과등 여러가지 實驗에 使用하였다. 여기서 얻은 막의 두께는 젖은막이 10~12 $\mu$ m, 마른막이 7~8 $\mu$ m, 젖은막의 밀도는 0.63g/cm<sup>3</sup>이고 막의 含水率은 25%이었다.

### 2-5. 아세틸 키틴의 確認

아세틸키틴의 確認을 위하여 膜을 製造하여 IR 스펙트럼을 얻었다. Infrared Spectrophotometer는 Perkin-Elmer Medel 267을 使用하였다. 아세틸키틴의 IR 스펙트럼은 Fig. 2와 같고 1750cm<sup>-1</sup>와 1230cm<sup>-1</sup>는 各各 카르보닐과 카르보닐 에스테르에 해당한다.

또 Fig. 3에서 반응이 덜 進行된 경우 OH기가 完全히 사라지지 않았지만 3480cm<sup>-1</sup> band가 현저히 줄어들었고 反應이 모두 進行된 diacetyl-

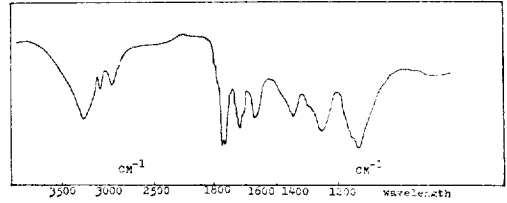


Figure 2. IR spectrum of diacetylchitin.

chitin은 3447cm<sup>-1</sup>까지 完全히 사라졌다. 1013cm<sup>-1</sup>와 1120cm<sup>-1</sup>는 各各 키틴의 1次, 2次 알콜을 나타낸다. Fig. 3에서 1013cm<sup>-1</sup>가 1120cm<sup>-1</sup>보다 먼저 사라지며, 750cm<sup>-1</sup>의 N-H out of bending, 3260cm<sup>-1</sup>의 N-H Stretching이 이에 앞서 사라지므로 NH>1次 OH>2次 OH 순으로 아세틸化됨을 알 수 있다. 키틴과 比較하여 3930cm<sup>-1</sup>, 2890cm<sup>-1</sup>, 2880cm<sup>-1</sup>의 C-H stretching도 현저하게 줄어지는데 이것은 micelle 構造의 파괴에 起因한다.

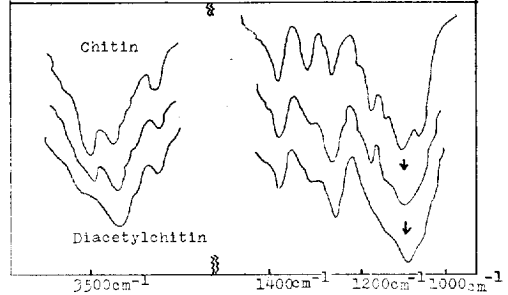


Figure 3. IR spectrum change of various acetylated chitin.

### 2-6. 한외여과 實驗

rejection efficiency는 kedem과 katchalsky<sup>19</sup>의 非平衡 熱力學으로 求하였는데 溶液의 부피와 溶質의 均衡式은 다음과 같다.

$$\frac{dV}{dt} = -A \cdot J_1 \dots \textcircled{1} \quad \frac{d(V \cdot C_i)}{dt} = -A \cdot J_2 \dots \textcircled{2}$$

J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, V, A, t는 各各 溶媒의 通過速度, 溶質의 通過速度, 溶液의 부피, 通過面積, 時間을 나타낸다. 위 式에 의해서 rejection efficiency R은

다음과 같다.

$$R = 1 - \frac{C_u}{C_s} = \frac{\ln C_s / C_{s0}}{\ln V_0 / V}$$

이로써 R은 rejection된 溶液의 濃度, 부피 原溶液의 濃度부피를 測定함으로써 求할 수 있다. 한의여과 實驗은 Amicon-stirred U.F. Model 3과 12를 使用하였고 그 大略의 構造는 Fig. 4와 같다.

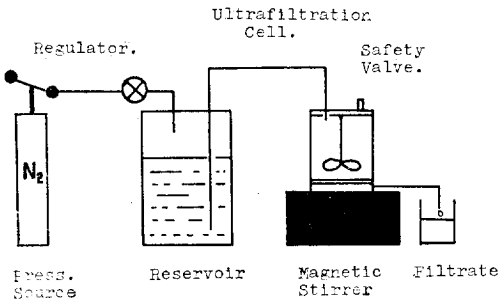


Figure 4. Schematic diagram of ultrafiltration apparatus.

溶液의 濃度는 1g/dl로 一定하게 하고 壓力은 2기압, induction period는 3時間으로 하여 試料를 얻었고 濃度測定은 differential refractometer (Bricephoenix model 2000-Vj)를 使用하였으며 standard curve가 直線關係를 유지하는 濃度範圍에서 實驗하였다.

### 2-7. 分配 係數

아세틸키틴膜에 對해 여러가지 溶質의 親和性을 알기 위해 分配係數를 測定하였다. 分配係數 ( $K_D$ )는 溶液과 膜內部가 平衡을 이룰 때 溶液의 濃度에 對한 膜內部濃度の 比로 나타난다.

$K_D = C_m^*/C_s^*$ ,  $C_s^* \times V_s = C_s \times V_s + C_m^* \times V_m$ 의 두식에서  $K_D = (C_s^* - C_s) / C_s \times V_m$ 으로 求할 수 있고  $C_s^*$ ,  $C_s$ ,  $C_m^*$ 는 各各 溶液의 처음濃度 膜과 溶液이 平衡을 이룰 때 溶液과 膜내부의 濃度를 나타내고  $V_s$ ,  $V_m$ 은 溶液과 膜의 부피를 나타낸다.

本 實驗에서는 膜의 두께와 面積을 測定하여 부피를 아는 0.5cm<sup>3</sup>의 膜을 10ml의 濃도가 알려진 溶液에 담가 充分히 接觸하며 溶液과 膜內

部가 平衡狀態를 이룰 때 濃度測定으로 分配係數를 求하였다.

## III. 結果 및 考察

### 3-1. Rejection Efficiency

여러가지 溶質에 對해서 測定한 rejection efficiency는 Table I과 II와 같다. 위 도표를 semi-log 그래프에 옮긴 것이 Fig. 5에 보였다.

Table I. Rejection Efficiency of Acetylchitin Films toward Various Solutes (applied pressure 2kg/cm<sup>2</sup>, 25°C)

| Compound | Molecular Weight | Rejection Efficiency (%) |
|----------|------------------|--------------------------|
| PEG      | 200              | 14                       |
| PEG      | 400              | 32.1                     |
| PEG      | 600              | 36.7                     |
| PEG      | 1,000            | 51.4                     |
| PEG      | 2,000            | 80.6                     |
| PEG      | 4,000            | 91.2                     |
| PEG      | 6,000            | 99.3                     |
| PVP      | 10,000           | 100                      |
| PEG      | 20,000           | 100                      |

Table II. Rejection Efficiency of Acetylchitin Films toward Various Solutes (applied pressure 2 kg/cm<sup>2</sup>, 25°C)

| Compound          | Molecular Weight | Rejection efficiency (%) |
|-------------------|------------------|--------------------------|
| L-Alanine         | 89               | 4.7                      |
| L-Histidine       | 155              | 6.3                      |
| L-Phenylalanine   | 165              | 6.5                      |
| Fructose          | 180              | 7.1                      |
| Glucose           | 180              | 7.4                      |
| Caffeine          | 194              | 11                       |
| Maltose           | 342              | 25.4                     |
| Raffinose         | 504              | 30.2                     |
| NaCl              | 58               | 4.7                      |
| MgSO <sub>4</sub> | 120              | 12.1                     |

profile은 "S"자형을 나타내며 分子量이 增加함에 따라 rejection efficiency는 增加한다. 또한 비슷한 分子量의 경우 아미노酸과 糖類는 폴리에틸렌 글리콜類보다 rejection efficiency가 작다. 이것은 Table III의 分配係數의 差異로서 알 수 있는데 膜에 對한 親和性이 크면 分配係數가 크

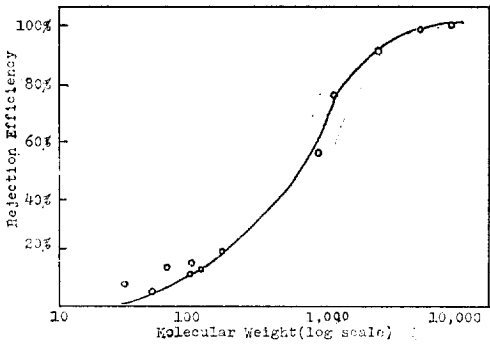


Figure 5. Solute rejection profile against molecular weight on semi-log coordinate.

고 rejection efficiency는 작다. 또한 無機鹽인 경우 커다란 rejection efficiency를 가지는데 有機溶質보다 水和된 이온半徑이 크게 作用하기 때문이다<sup>20</sup>. 아세틸키틴膜의 키틴보다 置換된 아세틸基의 作用으로 hydrophobic한 性質이 增加하여 膜이 치밀하고 팽윤이 덜 되며 分子量 7,500이 exclusion limit로서 키틴의 10,000보다 현저히 줄어들었다. 또한 키틴에 비해서 分子量 1,000 이상이 매우 가파른 곡선을 나타내고 있다.

Table III. Distribution Coefficient of Various Solutes in Acetylchitin Membrane.

| Compound    | Molecular Weight | Distribution Coeff. |
|-------------|------------------|---------------------|
| L-Alanine   | 89               | 62.3                |
| L-Histidine | 155              | 55.2                |
| Fructose    | 180              | 54.3                |
| Maltose     | 342              | 42.8                |
| Raffinose   | 504              | 36.4                |
| PEG 200     | 200              | 47.5                |
| PEG 400     | 400              | 38.7                |
| PEG 606     | 600              | 25.1                |
| PEG 1,000   | 1,000            | 15.6                |

### 3-2. Rejection Efficiency의 壓力 의존성

Rejection efficiency와 壓力의 關係를 PEG 2,000과 raffinose에 對해서 實驗한 結果를 Fig. 6에 보였다. PEG, 2,000의 경우 壓力이 增加함에 따라 rejection efficiency가 감소하는데 이것

은 膜의 細孔이 壓力이 커짐에 따라서 일그러져 빠져 나갈 수 있는 溶質分子가 약간 增加하기 때문이다<sup>21</sup>. raffinose에 對해서도 감소하나 그 變化정도가 작아 分子量이 작을수록 影響을 덜 받는 것을 알 수 있다.

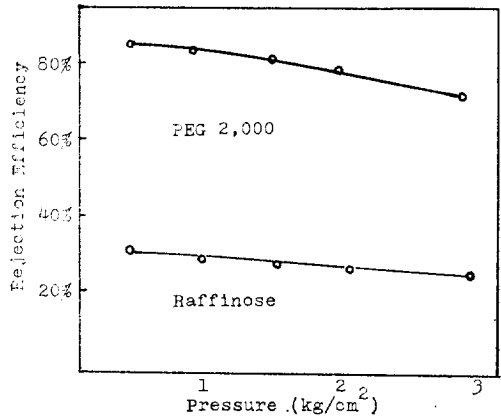


Figure 6. Dependence of rejection efficiency upon the applied Pressure.

### 3-3. Rejection Efficiency의 濃度 의존성

PEG, 4,000, PEG, 1,000, PEG, 200의 濃度와 rejection efficiency와 關係는 Fig. 7과 같으며 濃度가 점차로 增加할 수록 rejection efficiency가 약간 增加하였다. 이것은 溶質分子가 膜의 細孔을 막아 細孔을 빠져 나가는 溶液의 數가 감소하기 때문이다<sup>22</sup>. PEG, 200과 PEG 1,000은 약간씩 增加하였으나 PEG, 4,000보다 變化정도

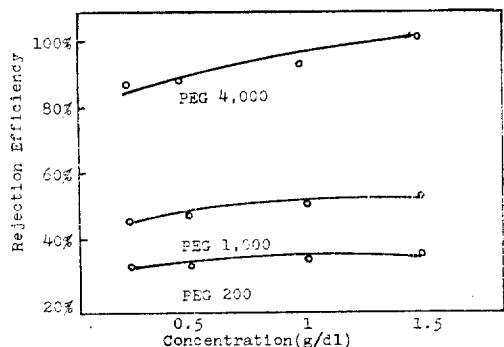


Figure 7. Dependence of rejection efficiency upon the solution concentration.

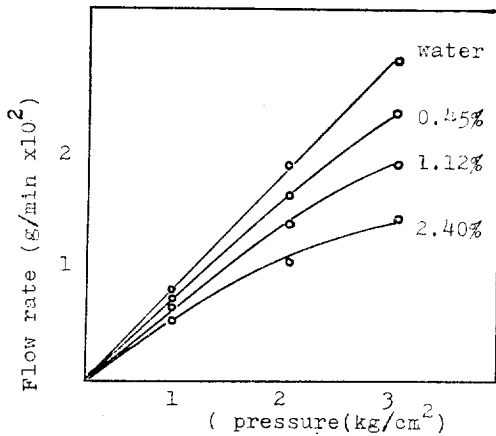


Figure 8. Effect of transmembrane on ultrafiltration flux PEG 20,000 solution.

가 심하지 않았고 分子량이 작을 수록 polarization 現象은 작아 變化에 敏感하지 않음을 알 수 있다.

### 3-4. 한외여과 速度와 濃度와의 관계

溶媒가 물인 경우 아세틸키틴의 한외여과 速度는 키틴에 對하여 1/3정도밖에 되지 않았다. 아세틸키틴 膜에서 壓力과 蒸溜水의 flux는 Fig. 8과 같고 直線관계를 이룬다. PEG. 2,000溶液에서 PEG의 濃度가 增加하면 한외여과 速度는 감소했으며 壓力이 增加함에 따라 한외여과 速度는 增加하였으나 그 정도는 濃度가 커질수록 감소하였다.

## IV. 결 론

키틴의 아세틸化는 溶媒에 對한 溶解性を 增加시키고 포름산뿐만 아니라 methanesulfonic acid, dichloro acetic acid 등에도 溶解되어 溶率이다양해진다. 또한 膜의 性質도 變하여 含水媒가 키틴의 61%에 비하여 25%로 매우 낮다. 키틴보다 hydrophobic한 性質이 增加하여 exclusion limit가 分子량 7,500으로 키틴보다 작은 값이고 키틴인 胍오징어에서 추출한 키틴은 물론 포름산에 溶解되지 않는 새우키틴으로부터 쉽게 求할 수 있다.

## Reference

1. Blackwell J., *Biopolymers*, **7**, 281 (1969).
2. K.M. Rudall and W. Kenchington, *Biol. Rev.*, **48**, 597.
3. S. Tokura, N. Nishi and J. Noguchi, *Poly. J.*, **11**, 781 (1979).
4. R. Bloch and M. M. Burger, *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, **58**, 13 (1974).
5. W. A. Bough, Food Product Development, **11**, 90 (1977).
6. Iwhan Cho and Young-Chul Lee, "Chitin Films" for Ultrafiltration", Korea Advanced Institute of science M. S.
7. Iwhan Cho and Young-Chul Lee, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2**, 52(1980).
8. I. B. Cushing, R. V. Davis, E. J. Kratoril and D. W. Mac Corquodare, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 4590 (1954).
9. P. Schorigin and E. Hait, *Chem. Ber.*, **67**, 1712 (1934).
10. P. Schorigin and N. N. Makarowa, *Chem. Ber.*, **68**, 969(1935).
11. S. Okimazu and R. Senju, *Nogei, Kagaku* **23**, 437 (1949).
12. S. Okimau, *Nogei Kagaku*, **32**, 383(1957).
13. P. Schorigin and E. Hait, *Chem. Ber.*, **68**, 971 (1935).
14. A. S. Michaels, *Chem. Engi. Prog.*, **64**, 31(1968).
15. K. W. Boddeker, *Ange. Chem. Int. Ed. Engl.*, **16**, 607 (1977).
16. R. W. Baker, *J. Appl. Poly. Sci.*, **12**, 369 (1969).
17. N. Nishi and J. Noguchi, *Poly. J.*, Japan, **11**, 27(1979).
18. R. A. A. Muzzarelli, "Chitin", Pergamon Press, New York, 1977.
19. O. Kedem and A. Katchalsky, *Biochem. Biophys. Acta.*, **27**, 229 (1958).
20. R. A. A. Muzzarelli, "Natural Chelating Polymers," Pergamon Press, New York, 1973.
21. S. Patai, Ed., "The Chemistry of the Ether Linkage," John Wiley and Sons, London, 1967.
22. A. J. Shor and K. Kraus, *I and EC Fundamentals*, **7**, 44(1998).