

Chitin과 Cellulose 복합체로부터 새로운 생분해성 CHITULOSE film의 개발

류 영 석 · 이 충 우 · *홍 범 식 · 윤 정 원
수원대학교 공과대학 유전공학과
*고려대학교 자연과학대학 식량공학과

Development of New Biodegradable CHITULOSE film from Composite of Chitin and Cellulose

Young Seok Ryu, Chung Woo Lee, *Bum Shik Hong and Jeong Weon Yoon

Department of Genetic Engineering, College of Engineering
The University of Suwon, P. O. Box 77, Korea

*Department of Food Science and Industry, College of Science and Technology
Korea University, Chochiwon, Chungnam 339-800, Korea

ABSTRACT

A Chitulose film was made by dissolving chitin and cellulose in a dimethylacetamide/LiCl solvent system. This film was completely degraded in 20 days in soil and penetrated by soil microorganisms in 16-26 hours. A permeability analysis of the film showed that water permeability was in the range of 0-187.5 1/m²/day, depending upon the ratio of chitin to cellulose and decreased with increasing a cellulose content in the Chitulose film. The permeabilities of organic compounds, Na⁺ and oxygen change with the composition of the Chitulose film. The film was tested with a burned 2~3degree rat for exploring its use as artificial skin. The rat was completely cured within 31 days without inflammation.

서 론

현재 전세계에서 생산되고 있는 플라스틱의 총 생산량은 약 7천만톤에 이르고 있으나 종이나 유리 등에 비해서 생산비가 30~60%가 싼 범용 플라스틱으로서 그 양이 계속 늘어나고 있다. 그러나 이것은 토양속에서 분해되지 않아 매우 심각하게 생태계의 자연 순환 질서를 변화시키고 있다(1, 2). 그러므로 생분해성 고분자 물질에 관한 관심도가 높아져 가고 있다. Chitin은 풍부한 미이용 생물자원으로서, 구조는 2-acetamide-2-deoxy- β -D-glucan이 β -1, 4

합을 하고 있는 중합체로 단단한 섬유상 구조를 쉽게 이룰 수 있다(3, 4). Chitin은 게, 새우 등의 갑각류, 갑충, 메뚜기 등과 곤충류, 균류의 세포벽 등 생물중에 존재하며, 안전성이 높으며, 독성이 낮고, 화학반응성이 좋은 것 등의 이점이 있으며, 내화학약품성이 높고, 유기용매에도 녹기 힘들다(5, 6).

지금까지의 개발 및 이용도를 살펴보면 일본의 가화성 공업은 나일론과 폴리아우레탄 수지로 된 합성 섬유에 chitin을 코팅하여 Biochitin이라는 의료용품으로 개발을 하였고, 화장품, drug carrier 등으로도 이용될 수 있으며 인공신장(7) 등 인공폐, 인공심장

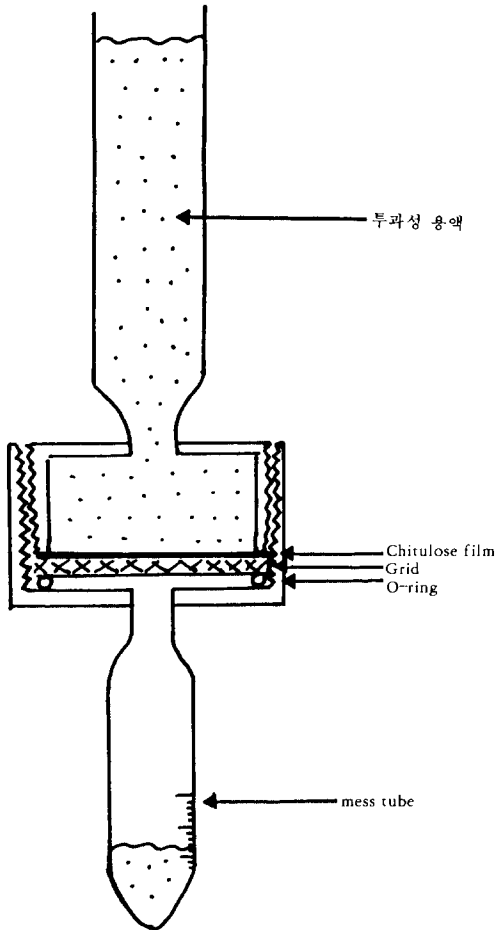


Fig.1. Apparatus for permeability measurement.

(8) 등 인공장기를 비롯하여 인공혈관(9), 인공혈액, 안과용, 인공피부용, 치과용, 고분자의 양(10) 또는 일반 의료용품(11)에 응용되거나 개발중에 있다.

그러나 chitin은 인장강도가 약하며 고온에서 변성이 일어나므로 본 연구에서는 chitin과 유사한 구조를 가진 cellulose를 혼합하여 새로운 "Chitucose"라는 혼합고분자 film을 만들어 생분해성에 대한 기초자료를 비교 검토하였다.

재료 및 방법

Chitucose film의 제조

전처리된 chitin과 α -cellulose (SIGMA 제품)를 각각 0~2% (w/w)씩 N, N,-dimethylacetamide

(DMAc)와 lithium chloride(LiCl) 용매에 혼합하고 실온에서 3시간 동안 교반하여 완전히 용해시켰으며, 용해된 chitin+ α -cellulose 에멀전을 양쪽 끝에 50 μ m 두께의 테이프로 부착시킨 유리판(10cm \times 10cm)에 붓고, 유리봉으로 밀어서 균일하게 도포한 다음 methanol에 침지하여 용매를 제거하여 film을 제조하였다.

이 film은 무색의 투명한 형태로서 Chitucose film이라 명명하였다.

Chitucose film들의 투수도 실험

그림 1과 같은 투과도 장치를 고안하여 물기등의 높이가 20cm되게 한 후, 이 수압에 의해서 film(1.5cm ID)을 투과하는 수분의 양을 측정하였다.

Chitucose film들의 유기산, 아미노산 및 당의 투과도 실험

여러 가지 유기물 용액을 제조하여 위와 같은 투수도 장치로 투과량을 측정하였고, 유기산은 0.1N NaOH로 중화시키는데 필요한 양으로 계산하였으며, 당정량은 Anthrone method(12)로, 아미노산은 Lowry method(13)로 정량하였다.

Chitucose film들의 토양 미생물에 의한 분해도 및 투과도 실험

밭, 도로변, 강가주변, 또는 낙엽속의 썩은 흙을 채취하여 약절구에 넣어 혼합한 후 그중에서 1g을 취해서 L. B broth 10ml와 함께 cap tube에 25 $^{\circ}$ C에서 2~3일간 배양한 후 이 토양 미생물 배양액을 각종 film이 장치된 투과장치 윗쪽에 500 μ m를 채우고 투과장치 밑에는 L. B broth 5ml가 든 tube를 밀봉하여 매달았다.

이러한 실험장치를 25 $^{\circ}$ C로 배양하면서 film이 토양 미생물에 의해서 균열이 가거나 구멍이 나서 미생물들이 밑의 배지 속으로 투과되면 균 증식으로 인한 배지 색깔의 변화를 관찰하여, film의 토양 미생물에 의한 투과시간을 측정하였다.

토양 속에서 Chitucose film들의 자연 분해도 검토
종이 위에 Chitucose film을 올려놓고 토양 속 20cm 밑에다 매몰시킨 후, 10일 후, 1개월 후, 2개월 후에 이 film을 꺼내어 자연 분해 정도를 주사전 자현미경(Hitachi, S-510)으로 관찰하였다.

Chitucose film들의 1% NaCl 투과도 실험

1% NaCl 용액을 제조해서 투과도 장치에 일정량

(10ml)을 넣고 mess tube로 투과된 용액을 24시간 동안 측정하였으며, 이 용액을 적당히 희석하여 atomic absorption spectrometer (GBC SCIENTIFIC EQUIPMENT PTY, STD, MODEL, 903)로서 투과된 Na^+ 이온이 양을 측정하였다.

Chitulose film들의 산소 투과도 실험

Chitulose film의 산소 투과도를 측정하기 위하여 산소 투과도 측정장치의 한쪽에는 산소를, 다른 쪽에는 질소를 같은 압력으로 주입한 후 질소 쪽으로 투과되는 산소의 양을 측정하였다(Fig. 2).

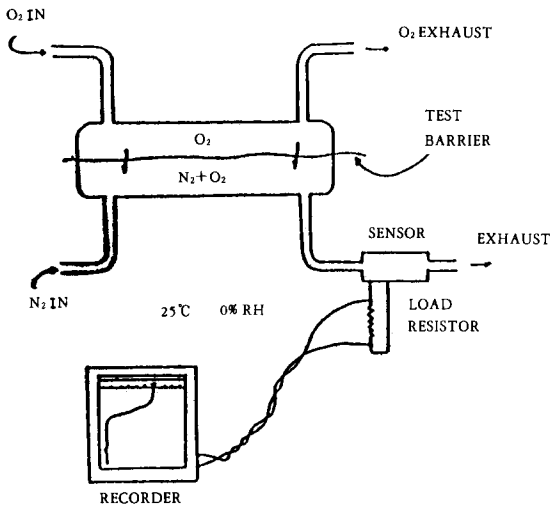


Fig. 2. Apparatus for O_2 permeability measurement.

Rat(쥐) 피하에서 Chitulose film의 생체분해도

400g 정도의 Rat 등 부위 6~7cm 정도로 털을 제거한 후 ether로 마취시켜 등 부위 피부를 5cm 정도로 절개한 후 피하에 일정 크기의 멸균한 film을 매몰한 다음, 절개시킨 부위를 수술용 봉합사로 피매었다.

1주일 후에 매몰되었던 film을 꺼내어 수세한 후 생체내에서의 분해 정도를 전자현미경으로 관찰하였다.

Chitulose film을 인조피부로서 Rat(쥐) 피부의 화상부위에 대한 실험

등 부위 털을 제거한 Rat를 ether로 마취한 후 담배불용 라이트로 2~3도 가량의 화상을 입힌 다음, 면도칼로 조심스럽게 화상을 입은 표피를 긁어내고 70% 알코올로 소독한 후 멸균된 Chitulose film을 부착하였다.

그 위에 거즈와 붕대로서 이 film을 잘 고정시켜서 매 주일 치유되는 과정을 관찰하였다.

결과 및 고찰

Chitulose film들의 광학현미경과 전자현미경 관찰

현미경 관찰 결과 cellulose 및 chitin의 microfament가 잘 섞여져 film이 형성되어 있는 것을 알 수 있었으며, Chitulose film(chitin 1% : cellulose 2%) 역시 chitin과 cellulose의 microfament가 서로 잘 혼합되어 양질의 film이 형성되어 있는 것을 알 수 있었고(Fig. 3), 전자현미경 관찰에서는 균일하지만 약간의 기포가 나타났다(Fig. 4).

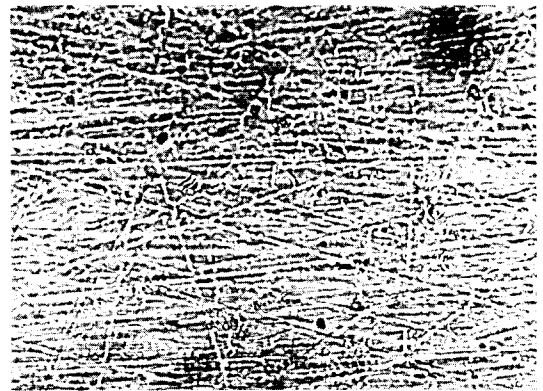


Fig.3. Light Microscopy Photographs of the Chitulose film(x200). (Chitin 1%:Cellulose 2%)

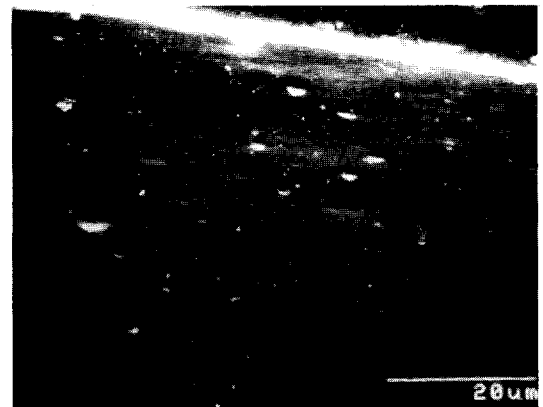


Fig.4. SEM photograph of outer surface of Chitulose film. (Chitin 1.5%:Cellulose 1%)

Chitulose film들의 생분해도 실험

Chitulose film을 토양 내 매몰 30일 후에 전자현미경으로 관찰한 결과, 거의 분해된 것을 확인할 수 있었으며 (Fig. 5), 이때 chitin 1% film과 Chitulose film<chitin 1% : cellulose 3%>보다 Chitulose film<chitin 1.5% : cellulose 0.5%>이 토양 미생물에 의한 분해가 빨리 진행되었다 (Table 1).

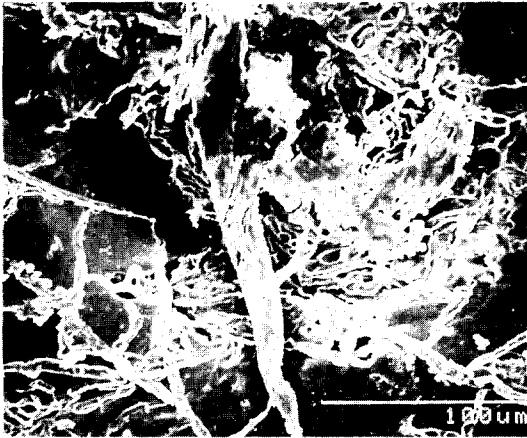


Fig.5. SEM photograph of surface of Chitulose film (Chitin 1.5%:1%) 30 days burying in soil

Table 1. Permeability of Chitulose films by soil microorganisms.

| Film number | Composition(w/w) | | Thickness (μm) | Area (mm ²) | Permeability time(h) |
|-------------|------------------|-----------|----------------|-------------------------|----------------------|
| | Chitin | Cellulose | | | |
| 1 | 1 | 0 | 4 | 0.64 | 24.5 ± 2.8 |
| 2 | 1 | 1 | 5 | 0.64 | 26.7 ± 4.4 |
| 3 | 1 | 2 | 3 | 0.64 | 9.1 ± 4.2 |
| 4 | 1 | 3 | 5 | 0.64 | 24.6 ± 17.7 |
| 5 | 1 | 0.5 | 4 | 0.64 | 12.3 ± 5.8 |
| 6 | 1.5 | 1 | 6 | 0.64 | 16.8 ± 2.7 |
| 7 | 1.5 | 0.5 | 6 | 0.64 | 16.8 ± 0.0 |
| 8 | 0 | 1.3 | 4 | 0.64 | 19.3 ± 18.1 |

Chitulose film들의 투수도 실험

Film 건조방법에서는 풍건보다 증탕을 하여 용매를 제거했을 때가 인장강도와 투과도 등의 안전성이 높게 나타났고, cellulose 함량이 높으면 투수량이 감소했으며 Chitulose film이 대체적으로 투수량이 높았고, 특히 Chitulose film<chitin 1.5% : cellulose 0.5%>에서는 투수량이 187,500ml/m²/를 제

Table 2. Water permeability through various Chitulose films.

| Film number | Film Composition(w/w) | | Thickness (μm) | Drying Method of film | Amount of Water Permeated (ml /m ² /day) |
|-------------|-----------------------|-----------|----------------|-----------------------|---|
| | Chitin | Cellulose | | | |
| 1 | 1 | 0 | 2.4 | boiling | 37500 |
| 2 | 1.3 | 0 | 4.0 | boiling | 78750 |
| 3 | 1.5 | 0 | 5.0 | boiling | 52500 |
| 4 | 2.0 | 0 | 7.1 | boiling | 24000 |
| 5 | 0 | 1.3 | 3.0 | boiling | 15000 |
| 6 | 0 | 2.0 | 2.0 | boiling | 15000 |
| 7 | 0 | 4.0 | 2.0 | boiling | 1875 |
| 8 | 0 | 5.0 | 4.2 | boiling | 0 |
| 9 | 0 | 6.0 | 7.5 | boiling | 0 |
| 10 | 1 | 1 | 1.5 | boiling | 35625 |
| 11 | 1 | 2 | 3.0 | boiling | 16875 |
| 12 | 1 | 3 | 3.0 | boiling | 11250 |
| 13 | 1.3 | 0.2 | 5.0 | boiling | 24375 |
| 14 | 1 | 0.5 | 4.0 | boiling | 101250 |
| 15 | 1.5 | 0.5 | 7.5 | boiling | 187500 |
| 16 | 1.5 | 1.0 | 7.0 | boiling | 56250 |
| 17 | 1 | 1 | 2.0 | air drying | 18750 |
| 18 | 1 | 2 | 2.0 | air drying | 0 |

거했을 때가 인장강도나 투과도 등의 안전성이 day로 매우 높았다 (Table 2).

Chitulose film은 무색 투명으로서 인장력도 chitin 이나 cellulose film보다 크게 나타났으므로 chitin과 cellulose의 혼합비율을 변화시켜서 여러 가지로 투과도와 인장력 등의 물리적 성질이 다양한 Chitulose film을 제조할 수 있다고 여겨졌다.

Chitulose film들의 유기물 용액과 1% NaCl에 대한 투과도

Chitulose film을 가지고 여러 가지 기본적인 유기물의 투과도를 실험한 결과 Chitulose film<chitin 1% : cellulose 0%>에서 0.1M citric acid의 투과량이 52,500ml/m²/day로 다른 film에 비해서 가장 높았으며, 0.01M 포도당에서는 Chitulose film<chitin 1.0% : cellulose 0.5%>이 41,250ml/m²/day로 투과량이 가장 높았으며, 0.1M HCl도 Chitulose film<chitin 1% : cellulose 0.5%>에서 투과도가 가장 높았고, chitin film<chitin 1% : cellulose 0%>에서 가장 낮은 것으로 보아 (Table 3) Chitulose film의 조성 및 유기물의 종류 또는 극성을 띄거나 양쪽성

Table 3. Permeabilities of organic compounds through various Chitulose films.

| Film (components) | organic solution (amount of permeates) | | | | |
|-------------------------------|--|--------------------------------------|--|---|---|
| | H ₂ O (ml/m ² /day) | 0.1M HCl (ml/m ² /day) | 0.1M Citric acid (ml/m ² /day) | 0.01M Glucose (ml/m ² /day) | 0.01M Glycine (ml/m ² /day) |
| chitin 1.0% cellulose 0% | 37500 | 11250 | 52500 | 18750 | 52500 |
| chitin 1.0% cellulose 0.5% | 101250 | 33750 | 45000 | 41250 | 75000 |
| chitin 1.5% cellulose 0.5% | 187500 | 22500 | 18750 | 26250 | 26250 |
| chitin 1.5% cellulose 1.0% | 56250 | 26250 | 7500 | 7500 | 11250 |
| chitin 0% cellulose 2.0% | 15000 | 22500 | 26250 | 11250 | 33750 |

물질 등의 투과도가 달라, 필름종류에 따라서 선택적인 투과가 이루어진다는 것을 알 수 있었다.

한편, 1% NaCl 투과량은 Chitulose film<chitin 1% : cellulose 0.5%>에서 NaCl의 총투과량이 3.6ml/m²/day로 가장 높은 투과량을 보였으며, Chitulose film<chitin 1% : cellulose 3%>이 0.5ml/m²/day로 가장 낮은 투과량을 보였다.

이에 반해서 Na⁺ 투과량이 chitin film 1%에서 11,400ml/m²/day로 가장 높았으며, Chitulose film<chitin 1% : cellulose 0.5%>이 940ml/m²/day로 가장 낮은 투과량을 보였으므로 (Table 4) NaCl 용액의 총투과량과 Na⁺ 이온의 투과량이 서로 다르게 나타나는 것으로 보아 수분과 Na⁺ 이온의 투과도를 달리하는 필름을 제조하여 바닷물 등에서 염분 제거용 필름으로 Chitulose film이 이용될 수 있다고 여겨졌다.

Chitulose film들의 산소 투과도 실험

산소 투과도는 Chitulose film<chitin 1% : cellulose 3%>에서 14cm³/m²/day로 거의 투과되지 않는데 반하여 Chitulose film<chitin 1% : cellulose 0.5%>이 산소 투과 (Table 5)가 17,850cm³/m²/day로 매우 높게 나타나 필름의 조성을 조절함으로써 산소 투과도도 조절할 수 있으며, 신선한 야채의 보존기간 연장 또는 지방 산화방지용 식품 포장재료로의 산업적 이용이 기대된다.

Table 4. NaCl permeability through various Chitulose films.

| Number | Film Composition(w/w) | | Amount of 1% NaCl Permeate (ml/m ² /day) | Amount of Na ⁺ Ion Permeate (ppm) |
|--------|-----------------------|-----------|--|--|
| | Chitin | Cellulose | | |
| 1 | 1.5 | 0.5 | 3.3±2.7 | 7480±2370 |
| 2 | 1 | 0 | 3.5±1.1 | 11400±1500 |
| 3 | 0 | 1.3 | 3.1±0.7 | 9440±1250 |
| 4 | 1 | 1 | 3.2±2.8 | 7900±3021 |
| 5 | 1 | 2 | 1.4±1.1 | 11270±5155 |
| 6 | 1 | 3 | 0.5±0.3 | 1616±5170 |
| 7 | 1 | 0.5 | 3.6±1.3 | 940±6100 |
| 8 | 1.5 | 1 | 3.5±1.2 | 7150±2830 |

Table 5. O₂ permeability through various Chitulose films.

| Number | Film Composition(w/w) | | O ₂ (cm ³ /m ² /day) |
|--------|-----------------------|-----------|---|
| | Chitin | Cellulose | |
| 1 | 0 | 1.3 | 14350 |
| 2 | 1 | 3 | 14 |
| 3 | 1 | 0 | 12750 |
| 4 | 1 | 0.5 | 17850 |
| 5 | 1 | 2 | 5292 |
| 6 | 1 | 1 | 348 |

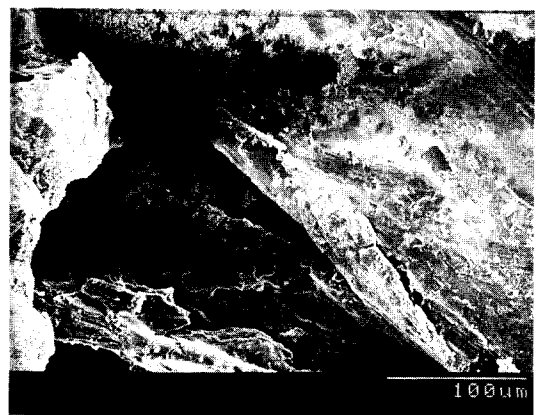


Fig. 6. SEM photograph of Chitulose film(Chitin 1.5%:Cellulose 1.0%) after 7 days subcutaneous imbedding in rat.

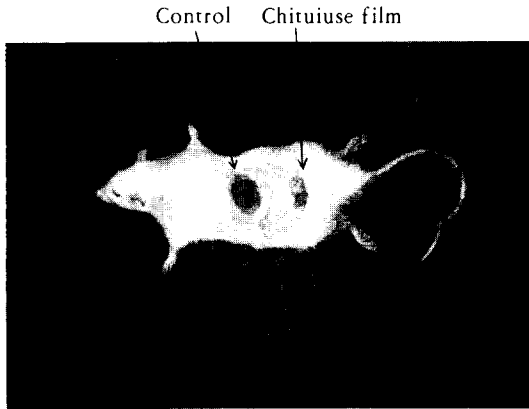


Fig. 7. Healing with Chitulose film(Chitin 1%: Cellulose 1%) as artificial skin on a rat with 2~3 degree burn after 6 days.

Chitulose film들의 Rat(쥐) 피하 매몰 실험

생체 적합성과 생체 흡수성을 보기 위해서 흰쥐의 등부위 피하에 매몰시켜 분해도를 관찰하였으며, 흰 쥐 피하에 매몰시켜 7일이 경과된 후에는 Chitulose film이 일부만 분해되었으나, 30일 후에는 완전히 분해 흡수되는 것으로 보아 생체 적합도와 생체 흡수성이 높다는 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

Chitulose film의 인조피부 대용 실험

인공피부로서의 이용 가능성을 알아보기 위해 백서의 등 부위에 인위적으로 2~3도 화상을 입힌 후 멸균된 Chitulose film을 부착시켰더니 염증은 나타나지 않고, 6일 후에는 상처가 치유되기 시작하여 상처부위가 줄어들면서 15일 후에는 딱지가 떨어져 나갔으며, 20일 후에 털이 돌아나고, 30일 후에 완전히 치유되어 필름을 부착하지 않은 control보다 빨리 치유되는 등 인조피부로서 이용 가능성이 있는 것으로 사료되었다(Fig. 7, 8).

요 약

Chitin과 cellulose를 dimethylacetamide/LiCl 용매에 용해시켜 유리판 위에서 Chitulose film을 제조하였다. 이 film은 토양속에서 20일 후에 거의 분해되었고, 토양 미생물을 16~26hr 후에 투과시켰다. 한편, 필름의 투과도를 검토해 본 결과 물의 투과도는 Chitulose film에서 chitin, cellulose의 혼합 비율

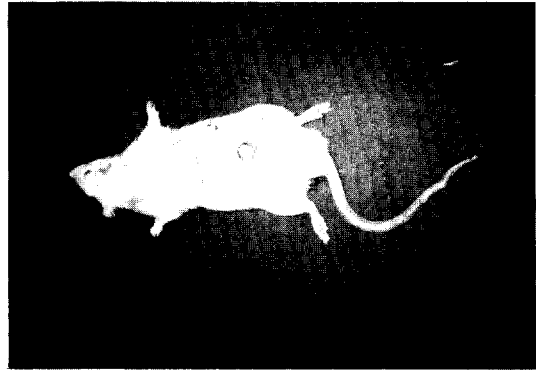


Fig. 8. Healing with Chitulose film(Chitin 1%: Cellulose 1%) as artificial skin 2~3 degree burn of rat after 31 days.

에 따라 0~187,500ml/m²/day로 cellulose 함량이 높을 수록 투과도가 낮게 나타났으며, 풍건보다는 중탕에 의한 필름건조방법으로 제조된 것이 우수하였다.

각종 유기물의 최대, 최소투과도는 Chitulose film의 종류에 따라 달리 나타나 chitin과 cellulose의 조성에 따라 선택적 투과성을 나타내었다. Na⁺ 이온에 대한 투과도도 달리 나타나 보였고, 산소 투과도도 역시 Chitulose film의 조성에 따라 14~17,850 cm³/m²/day로 큰 차이를 보였다. 2~3도 화상을 입힌 쥐에다 Chitulose film을 인조피부로 사용한 결과 염증없이 14일 후에 딱지가 떨어졌고, 31일 후에 완치되는 것이 관찰되었다.

감 사

본 연구를 수행하는데 도움을 주신 주식회사 서통의 이광호 박사에게 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. J. Migrom(1972), Incentives for Recycling and Refuse of Plastics, Rep. of Arthue D. Little Inc., Cambridge, Mass.
2. Nomura Report (1987).
3. G. O. Aspinall (1985), The polysaccharides Vol 3, Academic Press, pp. 417~450.

4. N. Nishi, S. Tokura and J. Noguchi (1979), *Polym. J.*, **11**, 27.
5. 浦上 忠 (1990), キチン, キトサンの 膜利用技術, 食品化学新聞社(日本) 別册 フードケミカル-1, pp. 61~69.
6. J. W. Yoon (1991), 생리활성물질 chitin의 개발, 제1회 생분해성 고분자연구회 심포지움, pp. 86~92.
7. C. F. Gutch (1975), *Ann and Rev. Biophys. Bioeng.*, **4**, 405.
8. 김계용 (1982), *Polymer*, **5**, 222.
9. J. H. Harrison (1958), *Am. J. Surg.*, **95**, 3.
10. 안광덕 (1977), *Polymer*, **1**, 253.
11. 森有日 (1982), “最尖端 の 醫療技術, 材料, 新藥開發,” シ-エムシ-, 東京, pp. 23~38.
12. T. A. Scott and E. H. Melvin (1953), *Anal. Chem.*, **25**, 1956.
13. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. J. Farr and J. R. Randall (1951), *J. Biol. Chem.* **193**, 265.