

몇 가지 키토산 비드들의 물리화학적 특성에 관한 연구

하 병 조 · 이 옥 섭 · 이 윤 식*

태평양 기술연구원 · *서울대학교 공과대학 공업화학과
(1995년 10월 21일 접수, 1995년 12월 9일 채택)

Studies on the Physico-Chemical Properties on Several Chitosan Beads

Byung-Jo Ha, Ok-Sub Lee, and Yoon-Sik Lee*

Pacific R & D Center, 314-1, Bora-Ri, Kiheung-Up, Yongin-Kun, Kyounggi-Do 449-900, Korea

*Dept. of Chem. Tech., College of Eng., Seoul Nat'l Univ., Seoul 151-742, Korea

(Received October 21, 1995, Accepted December 9, 1995)

요 약 : 몇 가지 키토산 비드들을 W/O 에멀전법과 capillary extrusion법에 의해 제조하여, SEM 사진을 통해 표면 구조와 표면적의 차이를 관찰하였고, BET법으로 표면적을 측정하였으며, 피크린산 적정에 의해 유효 아민함량을 측정하여 상기 결과들과의 상관관계를 알아 보았다. W/O 에멀전법에 의해 제조한 비드의 경우 capillary extrusion법에 의해 제조된 비드들보다 입자의 크기가 작았으며, 반대로 표면적, 유효 아민함량은 높게 나타났다. 또한 비드의 표면적, 유효 아민함량, 겉보기 밀도(apparent density) 및 기계적 강도(hardness)는 제조시 건조방법에 따라 매우 큰 편차를 나타내었다. Hardness 측정결과 solvent dehydration법에 의해 건조된 비드들이 동결건조법에 의해 건조된 비드들에 비해 높은 강도를 나타내었다. 또한 겉보기 밀도에 있어서도 solvent dehydration한 비드들이 동결건조한 비드들에 비해 높은 겉보기 밀도를 보였다. SEM 사진 분석결과 solvent dehydration법에 의한 비드들은 매우 작은 pore들이 비드의 표면에 무수히 존재한 반면 동결건조한 비드에서는 벌집모양의 pore들이 존재하고 있음을 알 수 있었다. 피크린산 적정결과 solvent dehydration한 비드의 경우 동결건조한 비드보다 약 10배의 높은 유효 아민함량을 나타내었으며 비드의 표면적이 클수록 유효 아민함량은 높게 나타났다. 또한 fluorescamine을 반응시킨 후 형광현미경으로 관찰하여 비드의 표면과 내부의 pore 주위에 노출된 1차 아민의 존재를 정성적으로 확인할 수 있었다.

Abstract: Several chitosan beads were prepared by W/O emulsion and capillary extrusion methods. The surface structures were observed through SEM pictures, the surface areas were determined by BET method, the available amine contents were measured by picric acid titration method, and the results were correlated each other. The beads from W/O emulsion method were smaller in size but had higher hardness, surface area, and available amine contents than the ones from capillary extrusion method. Moreover, the surface area, available amine contents, apparent density and the hardness showed large differences according to the drying processes. As compared between the solvent dehydration and the freeze drying technique in W/O emulsion method, the former showed higher surface area, higher available amine contents and hardness than the latter. SEM pictures revealed that in case of solvent dehydration method, very small pores existed, whereas in case of freeze drying method, cell-like pores existed on the surface. The results of picric acid titration showed that the beads dried by solvent dehydration method were 10 times higher in amine contents than those from freeze drying method, and the amount of amine contents were increased as the surface area was increased. After fluorescamine was reacted with chitosan beads, the fluorescence labeled beads were observed through fluorescence microscope. The results showed that most of primary amine existed on the surface of beads and pores.

1. 서 론

키토산은 게, 새우 등의 껍질을 이루는 구성 성분인 키틴을 탈아세틸화하여 얻어지며, 화학적으로는 D-glucosamine의 pyranose 단위체가 β -(1→4) 결합을 하고 있다. 키토산의 조성과 구조는 셀룰로오스와 유사하나 C-2 위치에 1차 아민기가 있다는 점이 다르다[1-2].

키토산의 모노머 형태인 D-glucosamine의 염산염은 pKa값이 7.8 부근인데 비해, 수용액 상태에서 키토산의 pKa값은 6.1 부근인 것으로 알려져 있다[3-4]. 따라서 키토산은 pH 6.1 이하의 산성영역에서 양이온성을 띠게 되며, 그 이상에서는 전하를 잃게 되어 유리 아민으로 존재하게 된다[5]. 또한 중성영역에서 키토산의 아민기는 전자 주계로서 작용할 수 있어 금속이온과 배위결합에 의한 착물을 형성하게 된다[6]. 1970년경 중금속 폐수처리용 흡착제로 키토산이 사용된 이후로 의료, 농업분야 등 다방면에서 응용하고자 하는 연구가 진행되고 있다[7-9]. 키토산은 키틴과 달리 유기산과 일부 무기산에 용해되는 성질이 있으며 이와 같은 용해성을 이용하면 키토산을 여러 가지 형태로 성형 가공할 수 있게 된다.

최근 키토산을 비드, 마이크로스피어, 멤브레인 등의 형태로 제조하여 이들을 약물전달용 담체, 세포 및 효소 고정화용 담체, 분리막 등의 분야에 응용하고자 하는 연구가 활발한데 그 예로서는 첫째, chymotrypsin, alkaline phosphatase 등의 효소 고정화용 담체[10], 둘째, lysozyme, chitinase, phosphorylase 등의 분리를 위한 affinity chromatography용 충전제[11], 셋째, 구리, 수은, 은, 카드뮴, 철, 니켈, 납 등의 중금속 이온의 흡착제[12], 넷째, 세포 고정화용 담체[13], 다섯째, 약물의 서방성 향상, 안정화, 부작용억제를 위한 약물전달용 담체[14-15] 등으로 사용될 수 있음이 보고된 바 있다.

상기 목적으로 사용되는 비드들의 물리화학적 특성은 비드의 크기, 표면적, pore size, 겉보기 밀도, 표면에 노출된 유효아민함량에 따라 크게 달라지게 되며 일정한 기계적 강도를 필요로 한다. 그러나 키토산 비드의 산업적 응용가능성이 증가되고 있음에도 불구하고 비드의 제조시 물리화학적 특성변화, 특히 건조 과정에 따른 morphology 변화 및 유효 아민함량에 대한 체계적인 연구가 거의 보고되지 않았다.

따라서 본 논문에서는 키토산 비드의 제조방법과

건조방법에 따른 표면적 변화, pore size, 겉보기 밀도 및 기계적 강도를 측정하고, 또한 종래 고체상 펄티드 합성에서 널리 사용되어온 피크린산 적정법[20]을 통하여 용매에 노출된 유효아민 함량과 표면적과의 상관관계를 알아 보고자 한다. 또한 fluorescamine을 사용한 형광분석법[19]으로 비드내부에 존재하는 유효아민기의 분포를 정성적으로 관찰하고자 한다.

2. 실 험

2.1. 시약 및 기기

키토산은 일본 동경화성의 시약급을 사용하였다. 사용된 키토산의 점도 평균분자량은 8.2×10^5 , 탈아세틸화도 78%, $[\alpha]_D^{25} = -4.8$ (c 1.0, 1% acetic acid)이었다. Sorbitan mono-oleate(HLB=4.3)는 ICI사의 것을 사용하였다. 아세트산, 수산화나트륨은 동양화학의 1급 시약을, 에틸에테르, CH_2Cl_2 는 Junsei사의 1급 시약을 P_2O_5 하에서 정제하여 사용하였다. Fluorescamine(화학명: 4-phenylspiro[fluran-2(3H), 1'-phthalan]-3,3'-dione)과 TEA(Triethylamine)는 Aldrich사의 것을 사용하였다. TEA는 사용직전에 정제하여 사용하였으며, 피크린산은 Fluka사의 것을 사용하였다. 이외 시약들은 모두 시약급을 사용하였으며, 일반적인 방법에 따라 정제하였다[22].

자외선 흡수스펙트럼은 Beckman사의 DU-65 Spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. 전자현미경은 JEOL사의 JSM-35 Scanning Microscope, Specific rotation은 JASCO사의 Digital Polarimeter DIP-360, 기계적 강도는 Fudou Kogyo사의 Rheometer(model: NRM-2010J-CW)를 사용하였다. 표면적의 측정은 Quantachrome사의 Quantasorb M을 사용하여 측정하였다.

2.2. 키토산 비드의 제조

2.2.1. W/O Emulsion 상분리에 의한 방법

Span 80 3g, n-헥산올 1g을 톨루엔 500ml에 가해 녹이고, 여기에 키토산 용액(1%, in 1% acetic acid)을 가해 전량을 1ℓ 되도록 하였다. 400rpm으로 균일하게 교반하여 W/O 에멀전을 만들고, 이를 약 5°C로 냉각된 2.4ℓ의 5%~20% NaOH 용액에 가한 후 3시간 동안 교반하여 비드를 생성시켰다. 여기에 에탄올 2ℓ를 가한 후 다시 1시간 동안 교반하였다. 경

화된 비드를 여과하고 여액의 액성이 중성이 될 때까지 증류수로 세척하였다. 얻어진 비드의 절반을 취해 에탄올, 무수 아세톤, 무수 에틸에테르로 차례로 세척하고 최종적으로 G4 glass filter로 여과한 후 P₂O₅ 상에서 24시간 동안 수분을 제거한 후 다시 12시간 진공 건조하였다. 나머지 절반은 드라이아이스-아세톤(-78°C)에 비드를 급속 냉동시킨 후 24시간 동결 건조하였다.

2.2.2. Capillary Extrusion에 의한 방법

키토산 용액(1%, in 1% acetic acid)을 micro tube pump를 이용하여 capillary nozzle을 통해 약 5°C로 냉각된 12% NaOH 용액에 적가하여 일정한 크기의 액적이 생성되도록 하였다. 이때 capillary nozzle의 지름은 0.3mm, 방출량은 0.5ml/min, 질소기체의 유량은 0.5 l/min으로 조절하였다. 적가 완료후 약 3시간 동안 교반을 하여 액적을 비드 모양으로 성형하였다. 형성된 비드는 여액의 액성이 중성이 될 때까지 증류수로 세척하였다. 이하 2.2.1.과 동일한 방법으로 건조하여 두 종류의 비드를 얻었다.

2.3. 키토산 비드의 기계적 강도, 표면적 및 겔보기 밀도 측정

비드의 기계적 강도는 Rheometer를 사용하여 측정하였다. 이때 하중은 200g, 속도 5mm/sec, adaptor는 9번을 사용하였으며, 측정온도는 20°C이었다. 표면적은 표면적 측정장치(Quantachrome사, Quantasorb M)를 사용하여 측정하였다. 즉, 시료에 N₂ 기체를 흡착시킨 후 연속식 흐름으로 헬륨을 희석제로 하여 흡착질인 질소의 분압 P/P₀(P₀는 77°K에서 질소의 포화 증기압)의 변화에 따른 흡착량의 변화를 BET식으로 해석하여 표면적을 측정하였다. 겔보기 밀도는 비드의 단위부피당 무게를 측정하여 구하였다.

2.4. 유효 아민함량 분석

Glass filter가 달린 유리결럼(용량 3ml)에 시료 약 20mg을 무게를 정확히 측정하여 넣고, CH₂Cl₂(x2), 0.1M 피크린산/CH₂Cl₂(15min, x2), CH₂Cl₂(x2)을 순서대로 처리해 비드 표면의 아민기가 피크린산염을 형성하도록 하였다. 이것을 5% TEA/CH₂Cl₂(x2)로 처리하여 TEA-피크린산염을 형성시켜 CH₂Cl₂로 추출한 다음, 최종적으로 95% 에탄올로 세척하여

TEA-피크린산염을 모았다. 용액상의 TEA-피크린산염은 빛에 의해 분해되는 성질이 있으므로 빛을 차단하여 즉시 95% 에탄올로 희석한 후 최대 흡수파장 358nm($\epsilon=14500$)에서의 흡광도를 측정하여 이로부터 아민기의 함량을 정량적으로 구하였다.

2.5. Fluorescamine Staining에 의한 관찰

키토산 비드 약 10mg을 DMF, CH₂Cl₂, CHCl₃ 순으로 세척하고 10% TEA/CHCl₃로 다시 세척 여과하였다. 10mg의 fluorescamine[23]을 소량의 CHCl₃에 녹인 후 첨가하고 40°C에서 10분간 반응시켰다. 반응이 완결된 다음 CHCl₃, MeOH로 세척후 P₂O₅ 상에서 진공 건조하였다. 얻어진 fluorescamine으로 염색된 시료의 일부를 JB-4[®] Embedding Kit(Polysciences사)에 담고 JB-4[®] 용액(Polysciences사)을 2일간 실온에서 처리하여 비드를 고정시켰다. Microtome으로 약 3m의 두께로 얇게 자른 후 형광 현미경을 이용하여 비드의 내부와 표면을 관찰하였다. 이때 excitation은 380~425nm, emission은 450nm로 고정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 키토산 비드들의 물리적 특성

키토산 비드는 키토산의 산성 수용액을 알칼리 용액에 의해 코아세르베이션(coacervation)시키는 방법으로 각각 제조하였다[24]. 즉, 키토산을 초산 수용액에 용해시킨 후 친유성 유화제를 선택하여 물에 섞이지 않는 소수성 용매와 혼합하여 이를 알칼리 용액에 가하는 W/O 에멀전 상분리법과 capillary nozzle을 통해 키토산 용액을 알칼리 용액에 적가하는 capillary extrusion법을 사용하였다. 키토산 비드의 제조는 기본적으로 산-알칼리에 의한 중화반응으로 알칼리 용액의 농도가 5% 이하의 낮은 경우 비교적 느린 확산속도로 인하여 응집된 형태의 비드를 형성하고, 반면 알칼리 용액의 농도가 20% 이상으로 지나치게 높은 경우에는 빠른 확산에 의해 비드의 내부와 표면의 압력차가 생기게 되며 그 결과 비드 입자가 파괴된 형태를 보였다. 본 실험에서는 약 12%의 수산화나트륨 용액을 사용하여 비교적 양호한 상태의 비드를 얻을 수 있었다. 그러나 비드 제조 후 건조과정에서 혼입된 소량의 수분은 입자와 입자사이의 강한 응집을 유발하여 결과적으로 뭉쳐진 상태의 비드

입자를 생성하였다. 입자와 입자를 끌어 당기는 힘은 첫째, 반데르발스 인력과 같은 분자간 힘이 있으며, 둘째, 소량의 수분에 의한 모세관 인력, 셋째, 정전기 인력으로 구분할 수 있으며, 이러한 힘은 입자가 작을수록 지배적이 된다. 키토산 비드의 경우 두 번째 항이 주로 작용하는 것으로 여겨진다. 즉, 키토산 비드는 친수성의 성질이 강하므로 수분이 개재하게 되면 이것이 일종의 가교구조를 형성하여 서로 접촉 가능한 분자 거리에 있게 되며, 이 가교 액막은 수분량이 적고 접촉 면적이 클수록 표면장력에 의한 부착력이 크게 작용하는 특성이 있다. 물론 수분이 없어도 부착력이 없게 된다. 비드내에 미량의 수분이 완전히 제거되지 않으면 물 분자를 매개로 일종의 water bridge를 형성하게 되고, 이로 인하여 비드와 비드 사이의 부착력이 증가하게 되며 뭉쳐지게 된다. 반면, 물 분자가 과량으로 존재하게 되면 오히려 비드와 비드 사이의 water bridge는 없어지게 되며 부착력은 감소하게 된다. 따라서 본 실험에서는 소량의 수분을 탈수하여 제거할 수 있는 무수아세트 및 에테르로 solvent dehydration시킨 후, 다시 P₂O₅ 하에서 진공 건조하여 입자간의 응집을 방지할 수 있었다. 또한 물 분자가 과잉으로 존재하게 되면 입자간의 거리가 멀어지게 되고 부착력이 감소하게 되므로 수용액상에서 드라이아이스-아세트(-78℃)을 사용하여 동결건조함으로써 뭉쳐지지 않은 상태의 비드를 용이하게 얻을 수 있었다. 얻어진 비드의 평균 입자크기는 W/O 에멀전에 의해 제조하는 경우, solvent dehydration한 후 약 70 μ m의 평균 입자크기의 비드가 얻어졌으며, 동결건조에 의해 제조된 것은 약 500 μ m의 평균 입자크기를 나타내었다. Capillary extrusion에 의해 제조하는 경우, solvent dehydration한 후 약 1.8mm의 평균 입자크기의 비드가 얻어졌으며, 동결건조에 의해 제조된 것은 약 2mm의 평균 입자크기를 나타내었다. 제조된 비드들의 기계적 강도를 측정된 결과 건조 방법에 따라 강도가 매우 다르게 나타났다.

Table 1에서 볼 수 있듯이 W/O 에멀전에 의해 제조된 비드의 경우 solvent dehydration에 의해 건조한 경우 동결건조법에 비해 50배 이상의 높은 기계적 강도를 나타내었다. 그러나 비드의 제조방법에 따른 차이는 그다지 크지 않음을 알 수 있었다. BET법에 의해 측정된 표면적 측정 결과는 Table 2와 같다.

Table 2에서 볼 수 있듯이 W/O 에멀전법에 의해

Table 1. Hardness(g) of Chitosan Beads

Drying method Preparation method	Solvent dehydration	Freeze drying
W/O emulsion method	>1000	21
Capillary extrusion method	>1000	23

Table 2. Surface Area of Chitosan Beads^a

Drying method Preparation method	Solvent dehydration	Freeze drying
W/O emulsion method	112.2m ² /g (70 μ m)	11.2m ² /g (500 μ m)
Capillary extrusion method	1.5m ² /g (1.8mm)	3.0m ² /g (2.0mm)

^a Values in () are mean diameter of chitosan beads.

제조한 비드를 solvent dehydration하거나 동결건조시켰을 때 표면적은 각각 112.2m²/g, 11.2m²/g으로 나타났다. 또한 capillary extrusion법인 경우에는 solvent dehydration할 때 1.5m²/g, 동결건조할 때 3.0m²/g의 표면적을 각각 나타내었다. 이같은 결과는 일단 입자의 크기와 관련 있는 것 처럼 보인다. 즉, 입자가 작으면 표면적은 커지기 마련인데 W/O 에멀전법에 의해 만들어진 비드는 일반적으로 작은 크기를 갖고 있으므로 capillary extrusion법에 의해 만들어진 큰 크기의 비드에 비해 표면적이 크게 나타나고 있다. 그러나 건조방법에 따른 차이를 보면 W/O 에멀전법으로 만들어 solvent dehydration할 때 동결건조한 경우와 비교하여 약 1/7 크기와 10배의 표면적을 보였으나, capillary extrusion법으로 만들어진 비드의 경우 solvent dehydration할 때와 동결건조할 때 모두 비슷한 크기의 비드를 얻었으며 동결건조할 때 오히려 약간 높은 표면적을 보이고 있다. 즉, W/O 에멀전법의 경우 비드의 표면적은 건조방법에 따라 크게 달라졌으며 capillary extrusion법의 경우 건조방법에 따른 표면적의 차이가 적음을 알 수 있었다. 이와 같은 표면적의 차이를 SEM 사진을 통해 관찰하였으며 각각의 비드 입자들의 morphology를 Fig. 1와 Fig. 2에 나타내었다.

Fig. 1에서 볼 수 있듯이 solvent dehydration할 경우 W/O 에멀전 상분리법에 의해 제조된 비드의 표면에는 직경 약 100nm 크기의 무수히 많은 pore들이 존재하고 있음을 알 수 있다. 그러나 capillary

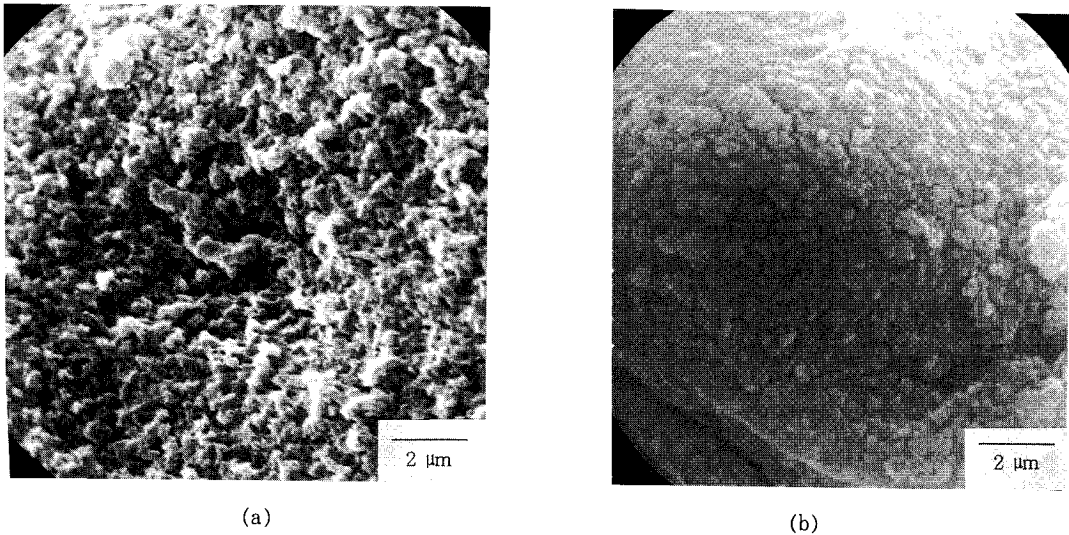


Fig. 1. Scanning electron microphotograph of chitosan beads dried after solvent dehydration (x7200). (a) W/O emulsion method, (b) capillary extrusion method.

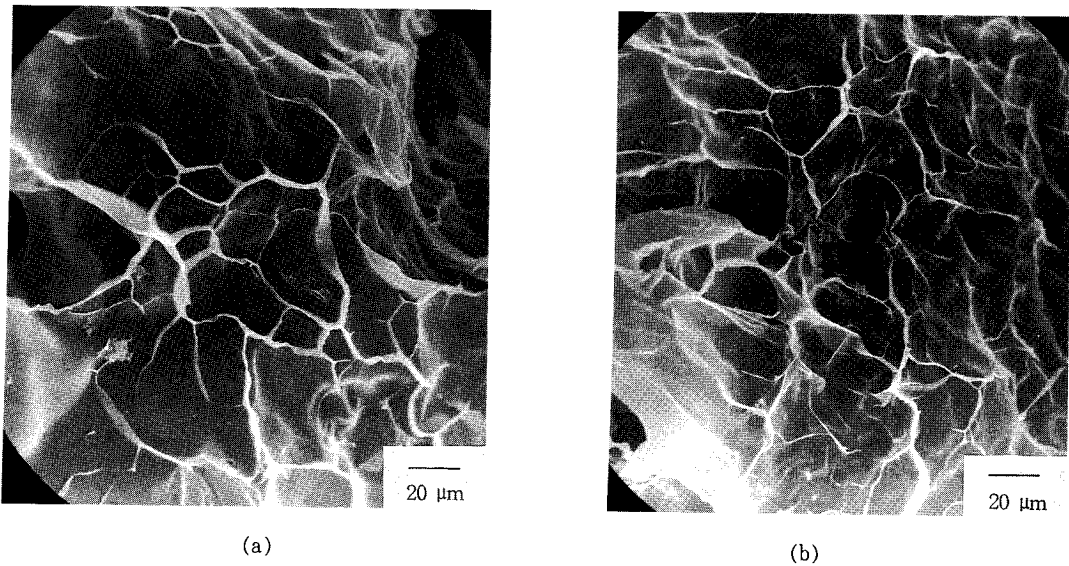


Fig. 2. Scanning electron microphotograph of chitosan beads by freeze drying (x400). (a) W/O emulsion method, (b) capillary extrusion method.

extrusion에 의해 제조된 비드의 표면에는 pore들이 사라지고 다만 표면에 심한 균열만을 보이고 있다. Fig. 2는 동결건조한 비드의 표면을 나타낸 SEM 사진이다. 그림에서 볼 수 있듯이 두 비드의 표면에 모두 벌집 모양의 pore들이 관찰되고 있다. 동결건조한

비드의 경우 제조방법에 관계없이 직경 10~20 μ m의 비교적 큰 크기의 벌집 모양 pore들을 보이고 있으며 스폰지와 유사한 형태를 나타내었다.

Fig. 3에는 키토산 비드들의 겉보기 밀도를 나타내었다.

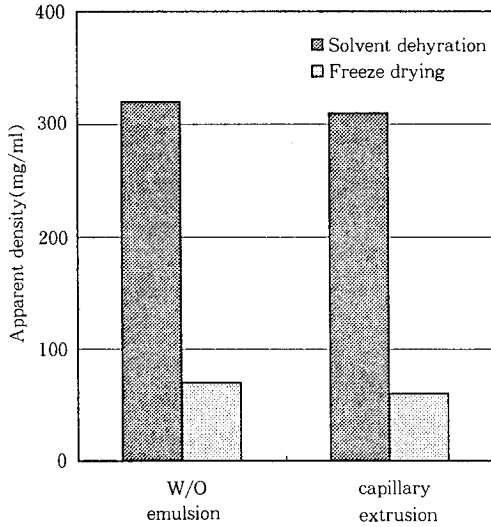


Fig. 3. The apparent density of chitosan beads.

Fig. 3에서 볼 수 있듯이 겔보기 밀도는 제조방법보다 건조방법에 크게 의존적임을 알 수 있다. 즉, solvent dehydration할 경우 매우 작은 pore들이 무수히 많이 존재하고 있어 단위 용적당 키토산 고형분의 농도가 높아지게 되고 결과적으로 겔보기 밀도의 증가를 가져왔다. 그러나 동결건조할 경우 pore들이 상대적으로 크며 그 결과 단위 용적당 키토산 고형분의 농도가 낮아지게 되고 따라서 겔보기 밀도도 상대적으로 감소한 것으로 볼 수 있다.

3.2. 피크린산 적정에 의한 유효 아민함량 분석

유효 아민함량의 분석을 위해 사용된 피크린산 적정법은 고체상 펩티드 합성시 폴리스티렌 계열의 고체상 지지체에 결합된 아민기의 양을 정량적으로 측정하는데 널리 이용되어 왔다[20]. 그러나 키토산 비드의 경우 폴리사카라이드의 일종으로 폴리스티렌에 비해 친수적 성질이 강하다. 따라서 본 실험조건에 맞게 약간 변형된 피크린산 적정법을 사용하였다. 즉, 폴리스티렌 계열의 지지체에 있어 통상 5분 정도의 피크린산에 노출시켰을 때 흡착 평형에 도달하지만 폴리사카라이드 계열인 키토산의 경우 흡착 평형에 도달하는 시간이 지연되어 약 15분 정도가 소요되었다. 키토산에 정전기적으로 결합된 피크린산은 TEA와 같은 염기를 가했을 때 탈착되어지며 이때 TEA-피크린산염을 형성하게 된다. 이때 최적 TEA 농도를 구하기 위해 일정농도의 피크린산 용액($1 \times 10^{-5}M$)에 TEA 농도를 점차적으로 증가시킨 결과

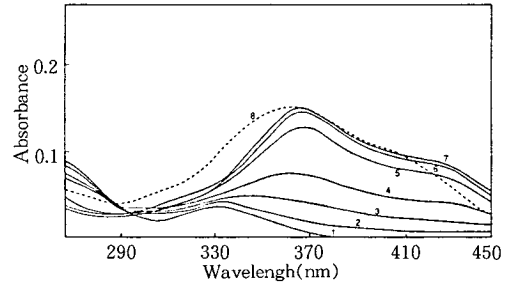


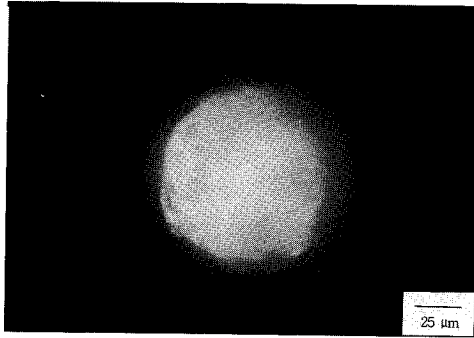
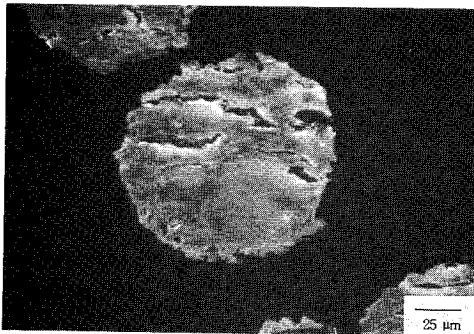
Fig. 4. Effect of TEA concentration on the absorbance of the ion pair complex of picric acid ($1 \times 10^{-5}M$) in CH_2Cl_2 (1-7). Condition : 1. [TEA]=0, 2. [TEA]= $9.8 \times 10^{-7}M$, 3. [TEA]= $9.8 \times 10^{-6}M$, 4. [TEA]= $2.45 \times 10^{-5}M$, 5. [TEA]= $4.9 \times 10^{-5}M$, 6. [TEA]= $9.8 \times 10^{-5}M$, 7. [TEA]= $1.47 \times 10^{-4}M$, 8. [TEA]= $1.47 \times 10^{-4}M$ (in 95% C_2H_5OH).

TEA와 피크린산의 농도가 대략 10:1 몰비에 도달했을 때 포화상태에 도달함을 알 수 있었다. 또한 유기용매의 종류에 대하여 검토한 결과 TEA-피크린산염의 CH_2Cl_2 용액의 최대 흡수파장(λ_{max})은 365nm 부근인데 반해, 95% 에탄올 용액의 λ_{max} 는 358nm 부근이었다. 따라서 피크린산 적정에 사용된 TEA의 양은 흡착된 키토산의 몰비에 대해 10배 이상으로 사용하였으며, 최종적으로 95% 에탄올로 묽혀 358nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

Table 3에는 피크린산 적정에 의해 구한 각 비드의 유효 아민함량을 나타내었다. 키토산 비드의 유효 아민함량은 제조방법에 따라 다르게 나타났다. Solvent dehydration시에는 제조방법에 따라 0.02~3.0mmol/g으로 큰 유효 아민함량의 차이를 보이고 있다. 그러나 동결건조할 경우 제조방법에 따른 차이가 적음을 알 수 있다. 피크린산 적정에 의해 제조된 키토산 비드들의 유효 아민함량을 측정된 결과 최대치는 약 3.0mmol/g이었다. 실험에 사용한 키토산은 분자량이 약 82만, 탈아세틸화도가 78%이므로 약 5700개의 모노머 단위중 글루코사민 단위는 4450개가 된다. 따라서 사용한 키토산의 단위 무게당 아민기의 함량의 이론치는 5.52mmol/g이 된다. 즉, 약 55%의 아민기만 표면밖으로 노출되어 있고 나머지는 비드의 내부에 묻혀 있는 것으로 추정된다. 반면 capillary

Table 3. Apparent Density of Chitosan Beads

Drying method	Solvent dehydration	Freeze drying
Preparation method		
W/O emulsion method	3.0 mmol/g	0.3 mmol/g
Capillary extrusion method	0.02mmol/g	0.25mmol/g

**Fig. 5.** Fluorescence microphotograph of chitosan beads prepared by W/O emulsion method, dried by solvent dehydration (x500).**Fig. 6.** Fluorescence microphotograph of cross-sectioned view of chitosan beads prepared by W/O emulsion method, dried by solvent dehydration (x500).

extrusion에 의해 제조한 비드를 동결건조한 경우는 유효 아민함량이 약 0.3mmol/g이므로 5.5%의 아민기만 표면으로 노출된 셈이 된다.

한편, 비드를 fluorescamine으로 반응시킨 후 형광 현미경으로 관찰한 결과 Fig. 5와 같이 강한 형광이 나타남을 알 수 있었다. Fluorescamine은 1차

아민과 선택적으로 반응하여 형광을 나타내므로 비드내 유효 아민을 정성적으로 관찰하는데 매우 효과적이었다.

또한, 비드내에 존재하는 유효 아민기의 분포상태를 알아 보기 위해 fluorescamine과 반응한 비드를 microtome으로 얇게 자른 후 내부를 관찰한 결과 Fig. 6과 같이 내부 pore 주위에서 강한 형광이 나타남을 알 수 있었다. 따라서 유효 아민기는 주로 비드의 표면과 내부의 pore 주위에 존재하고 있음을 알 수 있었다.

4. 결 론

몇 가지 키토산 비드들을 W/O 에멀전법과 capillary extrusion법에 의해 제조하였으며, SEM 사진을 통해 이들의 제조방법에 따른 표면구조와 표면적의 차이를 관찰하였고, 또한 피크린산 적정에 의해 각각에 대한 유효 아민함량을 측정하여 상기 결과들과의 상관관계를 알아 보았다. W/O 에멀전법에 의해 제조한 비드의 경우 capillary extrusion법에 의해 제조된 비드들보다 입자의 크기가 작았으며, 반대로 표면적, 유효 아민함량은 높게 나타났다. 또한 비드의 표면적, 겉보기 밀도, 유효 아민함량 및 기계적 강도(hardness)는 제조시 건조방법에 따라 매우 큰 편차를 나타내었다. 유기용매로 탈수한 후 건조하는 solvent dehydration 방법과 수용액 상에서 비드를 직접 건조시키는 동결건조 방법을 상호 비교한 결과 전자의 경우 비드의 표면적, 겉보기 밀도, 유효 아민함량 및 기계적 강도가 후자에 비해 높게 나타남을 관찰할 수 있었다. SEM 사진 분석결과 solvent dehydration 할 경우 매우 작은 pore들이 비드의 표면에 무수히 존재하고 있음이 관찰되었다. 피크린산 적정을 실시한 결과 solvent dehydration한 경우 동결건조한 경우에 비해 약 10배의 유효 아민함량을 나타내었다. 또한 fluorescamine을 반응시킨 후 형광현미경을 관찰한 결과 비드의 표면과 내부의 pore 주위에 노출된 1차 아민의 존재를 정성적으로 확인할 수 있었다. 결론적으로 W/O 에멀전법에 의해 비드를 제조하고 solvent dehydration한 경우 표면적, 유효 아민함량, 기계적 강도면에서 우수하며 고체상 펩티드 합성 또는 효소를 고정화하는데 있어 담체로서 유효하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 1994년 교육부 학술진흥재단의 연구비 지원에 의해서 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. R. A. A. Muzzarelli, "Chitin", Pergamon Press, Oxford(1977).
2. K. Ogawa, S. Hirano, T. Miyanishi, T. Yui, and T. Watanabe, *Macromolecules*, **17**, 973(1984).
3. J. W. Park and K. H. Choi, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **4**, 68(1983).
4. J. W. Park and K. H. Choi, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **5**, 3(1983).
5. P. Fäldt, B. Bergenstahl, and P. M. Claesson, *Colloids and Surfaces A*, **71**, 187(1993).
6. R. A. A. Muzzarelli, "Natural Chelating Polymers", Pergamon Press, Oxford(1977).
7. G. Skjåk-Break, T. Anthonsen, and P. Sandfjord(Eds.), "Chitin and Chitosan", Elsevier, New York(1989).
8. A. E. Pavlath, D-S. W. Wong, and T. F. Kumosinski, *Chem. Tech.*, **36**(Feb., 1993).
9. H. Struszczyk, *British Polymer Journal*, **23**, 261 (1990).
10. H. Kise and A. Hayakawa, *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 584(1991).
11. T. Baba, R. Yamaguchi, Y. Arai, and T. Itoh, *Carbohydr. Res.*, **86**, 161(1980).
12. T. Mitani, A. Moriyama, and H. Ishii, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 985(1992).
13. M-A. Shinonaga, Y. Kawamura, and T. Yamane, *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 90(1992).
14. S. Miyazaki, K. Ishi, and T. Nadai, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 10, 3067(1981).
15. T. Ouchi, T. Banba, and H. Masuda, *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A28**, 959(1991).
16. D. Knorr and R. A. Teutonico, *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 96(1986).
17. C. R. Carrara and A. C. Rubiolo, *Biotechnol. Prog.*, **10**, 220(1994).
18. H. Kusaoke and A. Kato, *SEM-I GAKKAISHI*, **49**, 202(1993).
19. M. L. Huguet, A. Groboillot, R. J. Neuffld, D. Poncelet, and E. Dellacherie, *J. Appl. Polym. Sci.*, **51**, 1427(1994).
20. B. F. Gisin, *Anal. Chim. Acta.*, **58**, 248(1972).
21. A. M. Felix and M. H. Jimenez, *Anal. Biochem.*, **52**, 377(1973).
22. D. D. Perrin and W. L. F. Armarego, "Purification of Laboratory Chemicals", 3rd ed., Pergamon Press, Oxford(1988).
23. M. Weigele, S. L. DeBernardo, J. P. Teng, and W. Leimgruber, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 5927 (1972).
24. Y. Ohya, T. Takei, H. Kobayashi, and T. Ouchi, *J. Microencapsulation*, **10**, 1(1993).