

키토산 제조에서의 탈아세틸화 반응에 관한 연구

이천우 · 이현주 · 김 광[†]

동아대학교 공과대학 화학공학과
(1997년 9월 4일 접수, 1998년 7월 1일 채택)

A Study on Deacetylation of Chitin for Preparation of Chitosan

Cheon Woo Lee, Hyun Joo Lee and Kwang Kim[†]

Dept. of Chem. Eng., Dong-A University, Pusan 840, Korea
(Received 4 September 1997; accepted 1 July 1998)

요 약

키토산을 탈아세틸화하여 순수 키토산을 제조하는 반응에 있어서 알칼리 용액의 농도, 온도, 반응시간과 탈아세틸화도의 관계를 연구하여, 부분 탈아세틸화된 키토산으로부터 탈아세틸화도가 완전히 이루어진 키토산을 제조할 수 있었다. 탈아세틸화 반응에서 얻어지는 중간 생성물 키토산은 큰 분자사슬이 절단되지 않도록 단계적으로 증류수 세척에 의하여 중화 시킴으로서, 최적농도와 알칼리 가수분해 반응시간에 의하여 탈아세틸화도가 높은 키토산을 제조할 수 있었다. 알칼리 용액의 농도가 47%이고, 반응온도가 25-110 °C인 범위에서 구한 탈아세틸화 반응의 활성화에너지는 7 kcal/mol이었다.

Abstract—The relationships between the concentration of alkali solution for hydrolysis, reaction temperature, reaction time and deacetylation of chitin were studied for the preparation of pure chitosan. It was possible to prepare complete deacetylation of chitosan products from low degrees of deacetylation. The intermediate products of partially deacetylated chitosan through the deacetylation process was intermittently washed with distilled water to neutralize preventing serious degradation of molecular chain. It could be prepared the highly deacetylated chitosan by the concentration and reaction time of alkaline hydrolysis. The activation energy was presented 7 kcal/mol by the deacetylation of chitin in the range of 25-110 °C with 47 % alkali solution.

Key words : Chitin, Chitosan, Deacetylation, Alkali Treatment

1. 서 론

키토산[(1-4)-2-amino-deoxy- β -D-glucan]은 많은 아민기를 포함하고 있는 양이온성의 고분자 전해질로서, 이러한 성질로 인해 생체 흡수성 봉합실, 인공피부, 면역부활제, 항콜레스테롤제, 종양전이 억제제, 약물 전달을 위한 캡슐제조 등의 의약품분야[1-6], 보습제, 린스제, 피막형성제, 감촉개량제 등의 화장품 분야[7], 감미제, 조미제 등의 식품분야[8], 항균·항곰팡이제, 응집제 등의 환경분야[9, 10]에 이용될 수 있는 잠재적인 산업적 유용성을 지닌 생분해성 물질이다. 상업적으로 유용한 키토산은 게와 새우 껍질로부터 추출한 키토인[(1-4)-2-acetamino-deoxy- β -D-glucan]을 강한 알칼리 조건하에서 탈아세틸화하여 얻어진다[11-13]. 게껍질은 주로 키토인(25-35%), 탄산칼슘(40-50%), 단백질(20-30%)로 구성되며, 키토인은 회분(0.1%)을 포함하고 아세틸함량은 96-97%이다[14]. 그러나, 계절적으로 한정된 공급, 높은 공정비, 공정 상의 어려움, 키토산의 일정하지 않은 물리·화학적 성질로 인해 키토산을 공업적으로 이용하는데에 제한이 많았다

[15].

일반적으로 높은 탈아세틸화 키토산은 키토인 분말을 진한 알칼리 용액 중에서 가열하는 불균일 반응으로 제조되며, 균일반응으로 50% 정도 탈아세틸화한 키토인은 수용성이 된다[16-17]. 불균일계 반응에서 알칼리는 주로 NaOH, KOH가 이용되고, 알칼리 농도 40-60 wt%, 반응온도 100-180 °C의 조건이 일반적이다[18-19]. 키토인을 키토산으로 전환하는 중전의 공정으로는 높은 탈아세틸화도를 가진 키토산을 제조하기는 어려우며[20], 키토인과 키토산의 각종 기능에 큰 영향을 미치는 탈아세틸화도에 대한 연구 역시 체계적으로 이루어지지 않고 있다. Wu와 Bough의 방법[21]에 따르면 80% 이상 키토인을 탈아세틸화하기 위해서는 100 °C에서 50 wt% NaOH 용액에서 5시간 이상 반응시켜야 한다.

탈아세틸화도가 90% 이상인 키토산을 얻기 위한 시도가 있었으나, 분자량 저하가 수반된다[22-24]. 키토인을 알칼리 처리하는 과정에서, 저분자화를 억제시키기 위하여 중간 생성물을 물로 세척하는 방법에 의해 분자 사슬을 절단시키지 않으면서 탈아세틸화도 100%에 가까운 키토산을 얻었다는 보고가 있다[25]. 그러나 탈아세틸화 할 때 주요변수인 반응온도, 반응시간, 알칼리 용액의 농도와 탈아세틸

[†]E-mail : kkim@seunghak.donga.ac.kr

화도의 관계에 대하여 불분명한 자료만 보고되어 있으며, 다당류의 주사슬에 부착되어 있는 아세트아미드기의 알칼리 가수분해에 요구되는 변수에 대한 속도론적 연구로 연결되지 않아서, 키틴에서 키토산으로의 가시적인 변화 관찰에만 머물러 있다. 글리코시드 결합의 분해시 활성화 에너지를 측정하기 위해 산 가수분해에 대한 속도론적 연구[26]와, 알칼리 가수분해에 대한 속도론적 연구[27]가 이루어졌으나, 반응 온도가 균일 반응이 일어나는 25-40 °C인 범위내에서만 진행되었다.

따라서 본 연구에서는 키틴 분말을 알칼리 용액에서 장시간 반응시키는 연속적인 방법과, 중간 생성물을 중화시키면서 가수분해를 행하는 단절적인 방법에 의하여 키토산을 제조하여, 그 특성을 밝히고, 균일 반응이 일어나는 온도 영역 및 불균일 반응이 일어나는 각 온도 영역에서 알칼리 처리 시간과 키틴 반응의 속도론적 관계를 검토하였다.

2. 실험

2-1. 키틴의 탈아세틸화 반응

Sigma사로부터 구입한 키틴(practical grade)을 분쇄하고, 170-250 mesh로 분획하여 평균 입자 크기를 약 70 µm로 조절하였다. 키틴 분말을 질소 가스 존재 하에 혐기적으로, 온도센서가 부착된 3L 4구 플라스크를 사용하여 기계적 교반을 하며, 균일 반응으로 일정 온도를 유지하였다. 상온에서 NaOH 농도 20, 30, 40, 47 및 50 wt%로 117시간 탈아세틸화 반응을 시행하였고, 또한 탈아세틸화 반응이 높은 47-50 wt%의 NaOH농도 중에서, 초기 가수분해 반응성이 높은 47%에서 온도 25-110 °C로 변화시켜 반응시간에 따른 키틴의 탈아세틸화 반응을 조사하였다. 모든 시료는 반응 완료 후, 약 80 °C의 증류수로 세척을 하여 중성이 되었을 때 여과하여 동결 건조시켜 탈아세틸화도를 측정하였다.

2-2. 고탈아세틸화 키토산의 제조

알칼리 처리에 의해 키틴으로부터 탈아세틸화된 키토산을 얻을 수 있다. 그러나 연속적인 알칼리 처리에 의하면 탈아세틸화도를 현저하게 높이지는 못하면서 분자사슬이 절단되므로, 분자사슬의 절단을 피하고 탈아세틸화도가 높은 키토산을 얻도록 반복처리하였다.

키틴 분말을 47-50 wt% NaOH 용액에서 110-120 °C, 1시간 반응시킨 뒤 중성이 될 때까지 80 °C의 증류수로 세척한다. 이러한 알칼리 처리와 세척과정을 3회 반복하여 탈아세틸화도가 95%에 이르는 키토산을 얻었다. 높은 탈아세틸화도를 가진 고순도 키토산을 제조하기 위해, 탈아세틸화도 95%의 키토산 20g을 2% 아세트산 수용액 1/에 녹인 후, 3/의 1N NaOH 수용액에 기계적 교반을 하며 흘려보내 가는 섬유질상으로 변형된 키토산을 얻었다. 이러한 섬유질상의 키토산을 다시 알칼리 반응을 하여 고탈아세틸화된 키토산을 얻었다.

2-3. 탈아세틸화도의 측정

2-3-1. 적정에 의한 측정

탈아세틸화도는 Senju와 공동 연구자들[29]이 글리콜 키틴의 탈아세틸화도의 측정에 사용했던 방법에 따라 측정했다.

키틴 1g을 40 wt% 수산화나트륨 수용액 25g과 실온에서 3시간 반응시킨 뒤, 0 °C 이하에서 75g의 분쇄된 얼음을 가하여 교반하면서 녹여 알칼리 키틴 용액을 만든다. 키틴 질량 분율 0.01이 되도록 한 알칼리 키틴 용액(10g)을 증류수 50g으로 희석하고 1N HCl 24 ml로 pH 11이 되도록 조절하였다. Fig. 1에서와 같이 키틴의 탈아세틸화 단위인 D-glucosamine양을 구하기 위해 이 용액을 pH 11 부근부터 적정하였다. 적정곡선의 변곡점 사이의 구간이 초기 키틴용액내

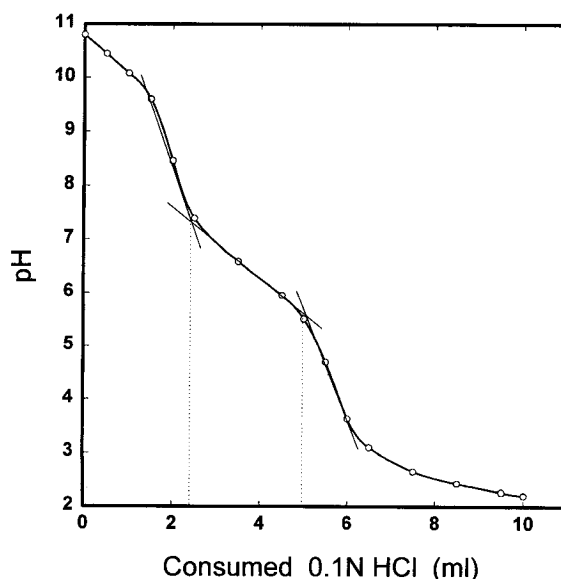


Fig. 1. Titration curve for 2.75×10^{-4} mol D-glucosamine with 0.1N HCl.

의 유리 아미노기의 양이 된다. 용액의 적정은 pH meter(Fisher Scientific Accumet® pH Meter 900)를 사용하여 0.1N HCl 표준 용액(factor 1.001)으로 하였다.

키틴의 탈아세틸화도는 다음과 같이 용액내 아미노기를 유리시키는데 소모된 산의 양으로 계산하였다.

Degree of deacetylation=

$$\frac{A}{\frac{1}{M_N} [W_A \times X_A - (A - B)(M_N - M_G) - M_{GT}] + A} \times 100$$

여기서 M_N , M_G , W_A , X_A 는 각각 N-acetylglucosamine의 분자량, 키토산의 구성단위인 glucosamine의 분자량, 알칼리 키틴 용액의 질량, 키틴 질량 분율을 나타낸다.

소모된 산의 양(A mol)은 가수분해된 키틴용액에서의 glucosamine 양과 일치하는 것으로, 용액내의 전체 glucosamine의 양(M_{GT} g)은 A와 glucosamine의 분자량인 161의 곱으로 구할 수 있었다.

분모 중의 $[W_A \times X_A - (A - B) \cdot (M_N - M_G) - M_{GT}]$ 는 N-acetylglucosamine의 전체량으로 표시된다. 여기서, B는 Fig. 1에서 표시된 초기 키틴내에 있는 glucosamine의 몰수로 표현된다[30]. 따라서, $(A - B) \cdot (M_N - M_G)$ 는 탈아세틸화에 의해 감소된 시료의 양을 의미한다.

2-3-2. IR spectra에 의한 측정

키틴과 탈아세틸화 반응시킨 키토산 3mg(200 mesh)을 300mg의 KBr(200 mesh)에 섞은 뒤, 200mg의 혼합된 분말을 감압하 60 °C에서 12시간 건조시킨 뒤 Shimadzu사의 IR spectrophotometer(FTIR-8601PC)를 사용하여 IR spectrum을 측정하였다.

2-4. 주사전자현미경(Scanning electron microscopy, SEM) 분석

탈아세틸화가 진행됨에 따라 키틴의 표면구조가 변화되는데, 이때 표면상태의 변화를 관찰하기 위해 SEM(HITACHI Co., S-2400)으로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 탈아세틸화 반응의 속도론

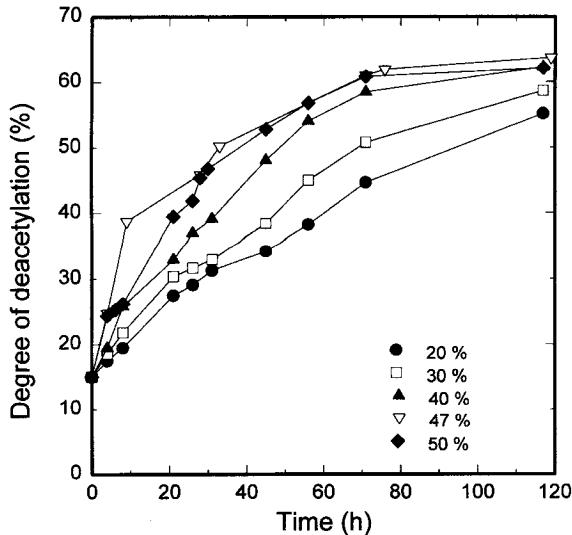


Fig. 2. Effect of NaOH concentration on the deacetylation of chitin. (Temp.: 25 °C)

NaOH 농도를 20, 30, 40, 47, 50 wt%로 변화시키면서 25 °C에서 알칼리 가수분해를 행하였으며, NaOH 농도 47 wt%에서는 반응 온도를 60, 80, 110 °C로 높여 가수분해시켰다.

알칼리 용액 하에서 탈아세틸화에 대한 속도식은 아세트아미드기와 NaOH에 대한 2차식이 된다. 또한, NaOH가 충분히 공급된 경우에는, 아세트아미드기의 농도에만 관계되므로, 준 일차 반응식으로 가정할 수 있다.

Fig. 2는 평균 입자가 70 μm인 키틴 분말을 상온에서 NaOH 농도를 변화시키면서 탈아세틸화 반응을 진행시켰을 때, 균일계에서 탈아세틸화도의 시간적 진행을 나타내었다. NaOH 농도가 각각 47, 50 %일 때, 119, 117시간에서 탈아세틸화도가 64, 68 %가 되고, 반응 시간을 120시간까지 연장해도 탈아세틸화도는 증가하지 않는다. 또한, 수용성을 나타내는 탈아세틸화도 범위(45-55 %)에 이르는 반응 시간은 저농도(20, 30 wt%)에서는 70시간, 40 wt% 이상 고농도에서는 45시간이었다. 수용성 키틴의 효율적 제조를 위한 NaOH 농도는

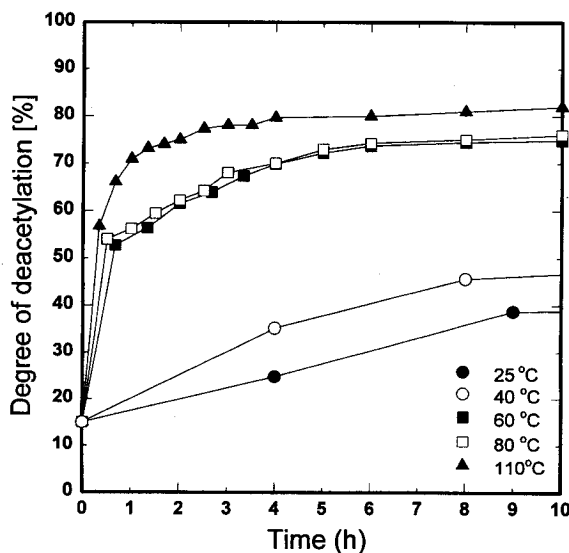


Fig. 3. Effect of reaction temperature on the deacetylation of chitin. (NaOH conc.: 47 %)

47 wt%이었으나, 25 °C에서는 70 % 이상 탈아세틸화한 키틴산을 제조하기 어려웠다.

Fig. 3은 NaOH 용액의 농도를 47 wt%로 선택하여, 온도 변화에 따른 불균일계에서의 탈아세틸화 반응을 나타낸 것이다. 시간경과에 따라 연속적으로 반응이 진행되었으며, 불균일 반응계에서는 반응 온도가 60 °C 이상인 고온에서 Fig. 2의 결과보다 탈아세틸화도가 높았으며, 60 °C와 80 °C보다 110 °C에서 탈아세틸화도가 상대적으로 높았다. 각 반응온도에서 평형도달시간 및 탈아세틸화도는 110 °C일 때 3시간에서 78 %이고, 80 °C와 60 °C일 때는 6시간에서 각각 74 %이었다. 또한 불균일계의 탈아세틸화 반응은 각 온도에서 일정한 정도의 반응에 도달한 후에는 시간이 더 경과하여도 탈아세틸화도가 더 높아지지 않았다.

3-2. 고탈아세틸화 키틴산의 제조

키틴을 알칼리용액으로 처리하여 탈아세틸화 반응을 일으키는 과정 중에 증류수로 세척하는 단절적인 처리방법으로 중간 세척과정이 없는 연속적인 방법보다 탈아세틸화도가 높은 키틴산을 제조할 수 있었다.

Fig. 4는 고탈아세틸화된 키틴산을 효율적으로 제조하기 위해 불균일계에서 알칼리 반응을 행한 결과이다. 연속적인 방법과 반응 중 매시간 중성처리를 위한 증류수 세척과정을 반복하는 단절적인 방법 및 이 방법에 의한 생성물을 섬유질 형태로 변형시킨 후 재차 알칼리로 반응시키는 방법으로 구분하여 각각의 탈아세틸화도를 나타내었다.

110 °C에서 47 wt% NaOH 알칼리용액의 불균일계 반응에서 3차에 걸친 증류수 세척과정을 진행했을 때 탈아세틸화도는 96 %에 도달하였다. 또한, 각 구간별 중간 생성물의 형태변화를 통한 탈아세틸화도의 증가는 평균 4 %로 100 %에 가까운 순수 키틴산의 제조를 위한 효과적인 탈아세틸화 반응을 위해 키틴의 형태를 섬유질로 변화시킬 필요가 있었다.

3-3. 탈아세틸화된 키틴산의 SEM 분석

키틴에서는 아세틸기, 키틴산에서는 아미노기가 각각 결합되어 있으므로 이들 기능기의 차이에 의해 결정구조가 각기 달라진다. 키틴

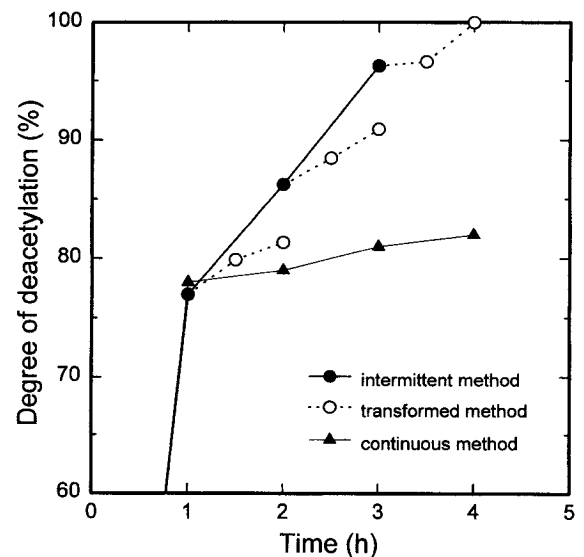


Fig. 4. Relationship between preparation of highly deacetylated chitin and alkali treatment with transforming the chitin. (NaOH conc.: 47 wt%, Temp.: 110 °C)

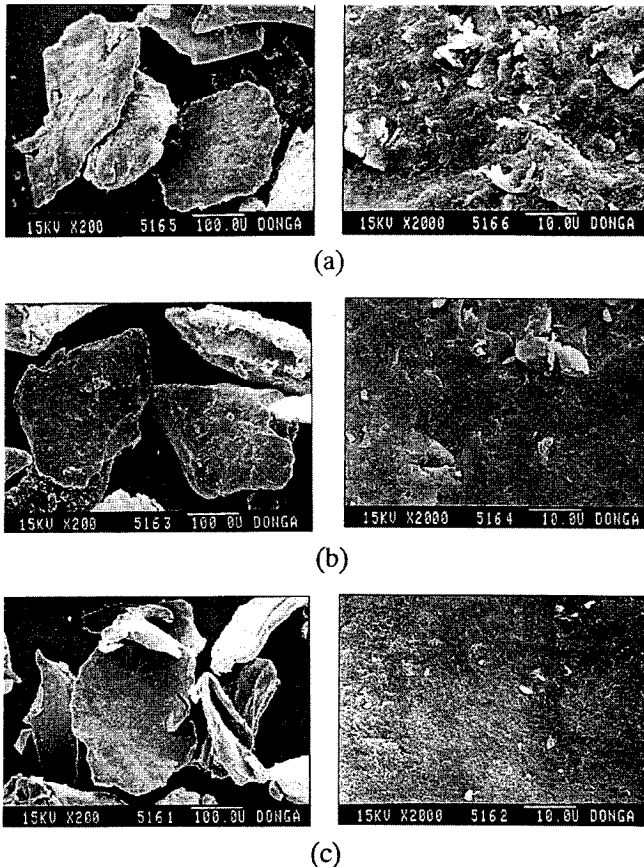


Fig. 5. SEM microscopic pictures of (a) 75 % chitosan, (b) 85 % chitosan and (c) 95 % chitosan; left side($\times 200$), right side($\times 2000$), respectively.

의 탈아세틸화는 알칼리 처리와 중화과정에 따라 진행되므로 입자 표면의 형태 변화를 살펴볼 필요가 있다. Fig. 5에는 탈아세틸화도가 다른 키토산의 표면을 SEM을 이용하여 관찰하여 나타내었다. 알칼리 중화처리 과정을 통하여 (a), (b) 및 (c)의 고탈아세틸화 키토산으로 진행됨에 따라 표면상태는 매끈해지고 결정성이 저하된 팽윤형 입자로 변화되어, 키토산 입자보다 키토산이 산성 범위를 갖는 용매에서 쉽게 가용화될 수 있는 표면구조로 이루어져 있음을 관찰할 수 있었다.

3-4. 키토산 및 탈아세틸화된 키토산의 IR 분석

Fig. 6에 키토산과 탈아세틸화된 키토산의 IR spectra를 나타내었는데, 아마이드기와 수산기에 관련된 중요한 밴드를 관찰할 수 있었다.

$1,619\text{ cm}^{-1}$ 밴드는 수산기에 결합된 $\text{C}=\text{O}$ 진동에 의한 것으로, $1,655\text{ cm}^{-1}$ 밴드는 아마이드기 진동과 결합된 $\text{C}=\text{O}\cdots\text{N}-\text{H}$ 기로 인한 것이며 [31], (a) 키토산으로부터 (b), (c), (d) 순으로 탈아세틸화가 진행됨에 따라 (e) 순수 키토산에 이르기까지 뚜렷하게 감소하였다. N-H 굽힘 진동이 C-N 신축 모드와 혼합되어 아마이드 II($1,550\text{ cm}^{-1}$) 위치에서 나타났다는 [32-33].

또한, 다양한 CH , CH_2 그리고 CH_3 의 신축주파수들은 $2,840\text{--}2,962\text{ cm}^{-1}$ 의 범위내에서 관찰되었다. $2,840\text{ cm}^{-1}$ 에서의 약한 밴드는 대칭 CH_2 신축 모드에 의한 것일 수 있으며, 비대칭 CH_2 신축 모드는 $2,929\text{ cm}^{-1}$ 밴드의 원인이 된다.

CH_2 밴드 모드에 의하여 $1,430\text{ cm}^{-1}$ 이나 $1,420\text{ cm}^{-1}$ 밴드에 수직 밴드가 나타나며, $1,315\text{ cm}^{-1}$ 밴드는 CH_2 흔들진동과 아마이드 III 모

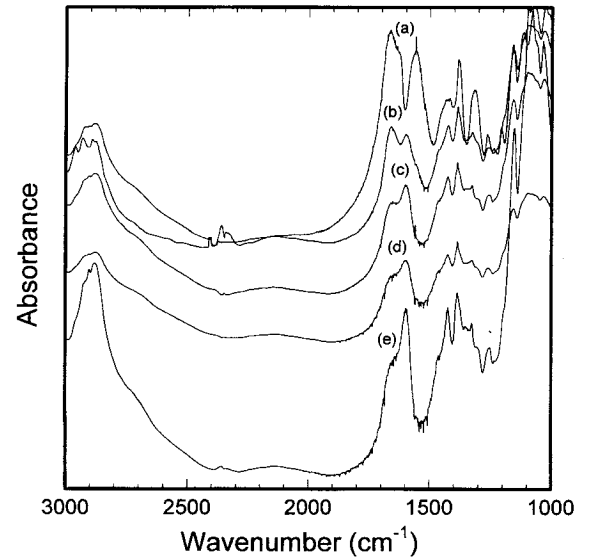


Fig. 6. Infrared spectra of (a) chitin, (b) 75 % chitosan, (c) 85 % chitosan, (d) 95 % chitosan, (e) pure chitosan.

드의 중첩된 진동에 의한 것으로 볼 수 있다. $1,655\text{ cm}^{-1}$ 의 아마이드 I 밴드는 키토산에서의 아미노 함량을 나타내는데 [34], (a) 키토산으로부터 (e) 순수 키토산으로 탈아세틸화가 진행되며 아세틸 함량의 정량적인 감소는 아마이드 I 밴드와 아마이드 II 밴드의 흡광도 증가와 잘 일치하였다.

3-5. 키토산의 탈아세틸화 반응의 활성화 에너지

탈아세틸화를 위한 알칼리 가수분해 반응의 온도 의존성을 검토하기 위하여 탈아세틸화반응에서 각 온도에 따른 반응속도상수 k 를 결정하였다.

$$k = \frac{2.303}{t - t_0} \log \frac{C_0}{C_0 - C} \quad (1)$$

C_0 는 아세트아미드기의 초기 농도이며, C 는 시간 t 에서 아미노기의 농도를 나타낸다. 그런데, $(V_\infty - V)$ 와 $(V_\infty - V_0)$ 는 C_0 및 $(C_0 - C)$ 에 비례하므로, k 는 적정할 때 소모되는 염산의 부피로 바꾸면 식 (2)가 된다.

$$k = \frac{2.303}{t - t_0} \log \frac{V_\infty - V_0}{V_\infty - V} \quad (2)$$

V_0 는 초기시간 t_0 에서 알칼리 키토산 용액 10g에 의해 소모된 0.1N 염산의 부피(ml)이고, V 는 시간 t 에서의 부피이며, V_∞ 는 가수분해가 충분히 진행되었을 때의 부피이다.

NaOH 농도가 47 wt%이고 $25\text{--}110^\circ\text{C}$ 인 조건에서 진행된 탈아세틸화 반응의 결과를 Fig. 7에 나타내었다. Fig. 8은 $\log(V_\infty - V)$ 의 값을 시간에 대해 25°C 에서 NaOH 농도를 20-50 wt%로 변화시켜 탈아세틸화한 반응을 나타내었다.

Fig. 7과 8에서 $\log(V_\infty - V)$ 와 시간과의 선형적인 관계로부터 키토산의 탈아세틸화 반응들은 유사 일차 반응이라는 가정을 확인할 수 있었다. Fig. 7과 8의 온도와 농도변화에 의한 각 직선의 기울기에 대해 각각의 속도상수 k 를 구하여 Table 1에 나타내었다. 110°C 반응 온도에서 0.917 h^{-1} 이었고, 47% 알칼리농도에서는 0.322 h^{-1} 이었다.

키토산의 탈아세틸화 반응에서 활성화 에너지 값은 Sannan 등 [27]에 의해 10% 알칼리 농도와 $25\text{--}40^\circ\text{C}$ 반응온도의 키토산의 가수분해에

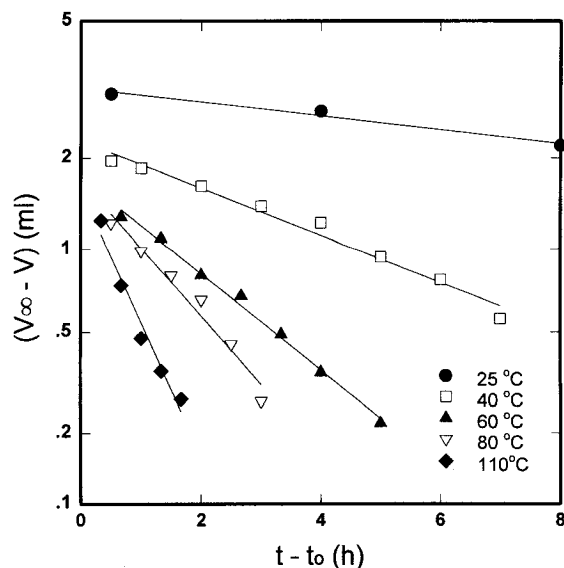


Fig. 7. The plots of $\log(V_{\infty} - V)$ vs. $(t - t_0)$ at different temperature on alkali hydrolysis. (NaOH conc. 47 %)

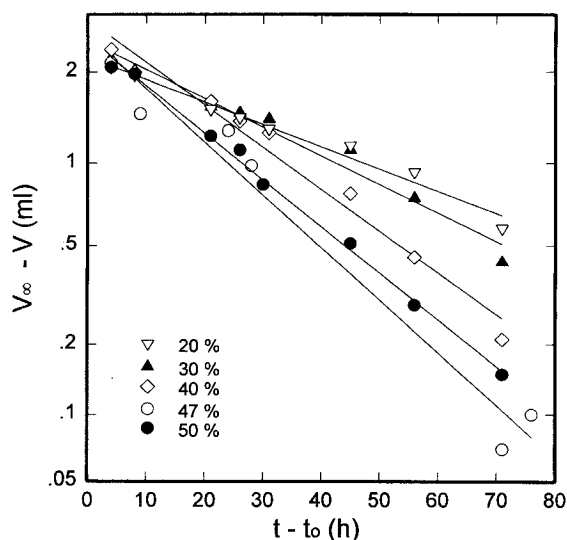


Fig. 8. The plots of $\log(V_{\infty} - V)$ vs. $(t - t_0)$ in different NaOH concentration at 25 °C on alkali hydrolysis.

Table 1. Relationship between the rate constants and the concentration of alkali solution and reaction temperature

Conc. of alkali solution(%)	Rate constant of homogeneous (: $k[h^{-1}]$)	Reaction temperature(°C)	Rate constant of heterogeneous (: $k[h^{-1}]$)
20	0.015	25	0.049
30	0.019	40	0.163
40	0.028	60	0.333
47	0.037	80	0.473
50	0.032	110	0.917

의한 활성화 에너지 값은 22 kcal/mol로 보고되었다. Fig. 9에 나타난 Arrhenius plot에 의한 직선의 기울기로부터 7 kcal/mol의 값을 구하였다. 따라서, 키틴의 분자사슬의 절단을 일으키지 않는 범위에서 알칼리 농도와 반응온도를 증가시키면 보다 용이한 탈아세틸화 반응

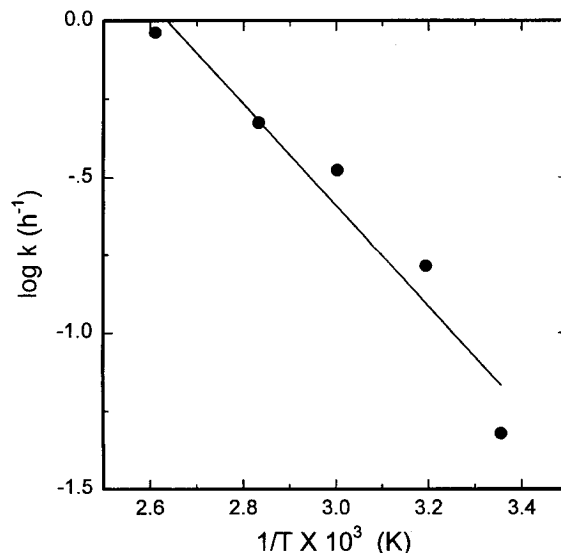


Fig. 9. The Arrhenius plot of $\log k$ vs. $1/T$ at the deacetylation of chitin.

응을 유도할 수 있다.

4. 결 론

실온에서 NaOH 농도를 20-50 %로 변화시키며, 탈아세틸화 반응을 조사한 결과, 47 %의 알칼리 농도에서 초기탈아세틸화 반응이 비교적 신속히 진행되었으며, 탈아세틸화를 높일 수 있었다. 고탈아세틸화된 키토산은 47 % NaOH 농도에서 단절적인 탈아세틸화 반응 과정으로부터 얻은 중간 생성물인 키토산을 섬유질 형태로 변화시키고, 재차 알칼리 가수분해를 행하여 얻을 수 있었다. SEM 관찰을 통해, 키토산이 키틴보다 산성 영역에서 쉽게 가용화될 수 있는 표면 구조를 가지고 있다. 그리고, 키틴에서 점점 탈아세틸화가 진행되어 키토산으로 변화하는 과정에서, IR spectra에서는 아미드 I 밴드가 점점 감소하여 소멸됨으로 거의 완전히 탈아세틸화가 진행된 것을 알 수 있었다. 각 온도별 속도상수 k 값에서 구한 활성화에너지 값은 7 kcal/mol이었다.

감 사

본 논문은 1997년도 동아대학교 공모과제 연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Ryu, B.-H. and Greenspan, P.: *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **10**(5), 525(1995).
2. Aiba, S., Minoura, N. and Fujiwara, Y.: *Int. J. Biol. Macromol.*, **7**, 120(1985).
3. Aiba, S., Izume, M., Minoura, N. and Fujiwara, Y.: *Carbohydr. Polym.*, **5**, 285(1985).
4. Aiba, S., Izume, M., Minoura, N. and Fujiwara, Y.: *Br. Polym. J.*, **17**, 38(1985).
5. Aiba, S., Izume, M. and Minoura, N.: *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **59**, 793(1985).
6. Jung, K. T., Shul, Y. G., Lee, H., Lee, M. S. and Nam, S. I.: *HWA-*

- HAK KONGHAK, **36**, 249(1998).
7. Masato, I.: *BIO INDUSTRY*, **6**(7), 75(1989).
 8. Sakai, K.: *New Food Industry*, **31**(6), 17(1989).
 9. Baba, Y., Yamashita, T., Kawano, Y. and Uchida, Y.: *The Chemical Society of Japan*, **1**, 48(1996).
 10. Uchida, Y.: *Chemical Industry*, **10**, 37(1991).
 11. Austin, R. R., Brine, C. J., Castle, J. E. and Zikakis, J. P.: *Chitin: New facets of research. Science*, **212**, 744(1981).
 12. Muzzarelli, R. A. A.: "Chitin", Pergamon Press, Oxford(1977).
 13. Muzzarelli, R. A. A.(ed.): *Proceedings of the 3rd International Conference on Chitin/Chitosan*, Plenum Press(1985).
 14. Masato, I.: *BIO INDUSTRY*, **6**(7), 557(1989).
 15. Rane, K. D. and Hoover, D. G.: *Food Biotech.*, **7**, 11(1993).
 16. Sannan, T., Kurita, K. and Iwakura, Y.: *Makromol., Chem.*, **176**, 1191(1975).
 17. Sannan, T., Kurita, K. and Iwakura, Y.: *Makromol., Chem.*, **177**, 3589(1976).
 18. Kurita, K., Sannan, T. and Iwakura, Y.: *Makromol. Chem.*, **178**, 3197(1977).
 19. Domard, A. and Rinaudo, M.: *Int. J. Biol. Macromol.*, **5**, 49(1983).
 20. Muzzarelli, R. A. A., Tanfani, F., Emanuelli, L., Muzzarelli, M. G. and Celia, G.: *J. Appl. Biochem.*, **3**, 316(1981).
 21. Wu, A. C. M. and Bough, W. A.: *Proceeding of the First International Conference of Chitin/Chitosan*, Muzzarelli, R. A. A. and Pariser, E. R.: Eds. MIT, Cambridge, Mass, 88(1978).
 22. Horowitz, S. T., Roseman, S. and Blumenthal, H. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5046(1957).
 23. Wolfrom, M. L., Maher, G. G. and Chaney, A.: *J. Org. Chem.*, **23**, 1990(1958).
 24. Wolfrom, M. L. and Shen Han, T. M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 1764(1959).
 25. Mima, S., Miya, M., Iwamoto, R. and Yoshikawa, S.: *Journal of Applied Polymer Science*, **28**, 1909(1983).
 26. Meyer, K. H. and Wehrli, H.: *Helv. Chim. Acta*, **20**, 353(1937).
 27. Sannan, T., Kurita, K. and Iwakura, Y.: *Polymer Journal*, **9**(6), 649(1977).
 28. Cosio, I. G., Fisher, R. A. and Carroad, P. A.: *J. Food Sci.*, **47**, 901(1982).
 29. Senju, R. and Okimasu, S.: *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **23**, 432(1950); *C. A.*, **46**, 8018(1952).
 30. Elek, A. and Harte, R. A.: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **8**, 267(1936).
 31. Darmon, S. E. and Rudall, K. M.: *Discussions Faraday Soc.*, **9**, 251(1950).
 32. Fraser, R. D. B. and Price, W. C.: *Nature*, **170**, 490(1952).
 33. Miyazawa, T., Shimanouchi, T. and Mizushima, S.: *J. Chem. Phys.*, **29**, 611(1958).
 34. Miya, M., Iwamoto, R., Yoshikawa, S. and Mima, S.: *Int. J. Biol. Macromol.*, **2**, 323(1980).