

산성 수열반응을 통한 키토산으로부터 레볼린산의 생산

정귀택[†]

부경대학교 생물공학과
608-739 부산시 남구 용소로 45
(2013년 11월 28일 접수, 2013년 12월 26일 수정본 접수, 2013년 12월 29일 채택)

Production of Levulinic Acid from Chitosan by Acidic-Hydrothermal Reaction

Gwi-Taek Jeong[†]

Department of Biotechnology, Pukyong National University, 45 Yongso-ro, Nam-gu, Busan 608-739, Korea
(Received 28 November 2013; Received in revised form 26 December 2013; accepted 29 December 2013)

요 약

최근 목질계, 미세조류, 해양 거대조류 등의 재생가능한 자원으로부터 생산된 많은 화학물질들이 화학산업에 도입되고 있다. 키토산/키토산은 지구상에서 두 번째로 풍부한 자원이며, 게, 새우, 곤충과 같은 갑각류의 껍질로부터 얻을 수 있다. 본 연구에서는 키토산으로부터 levulinic acid의 생산을 위하여 고온 산 가수분해와 실험계획법을 적용하여 반응 온도, 촉매량, 반응시간의 반응조건을 최적화 하였다. 결과적으로 반응온도와 촉매농도는 높을수록 levulinic acid의 생성이 증가하였고, 반응시간은 일정시간 이후에는 크게 영향을 미치지 못하였다. 최적 반응조건을 조사한 결과, 반응온도 175 °C, 촉매농도 2.4%, 그리고 반응시간 40.7분의 조건에서 2.7 g/L의 levulinic acid를 얻었다.

Abstract – Recently, many chemicals produced from renewable resources such as lignocellulosics, micro-algae and marine macro-algae, were introduced to chemical industry. Chitin/chitosan is secondly abundant feedstock on Earth. It is easily obtained from crustaceans' shells such as crab, shrimp and insects. In this work, we performed the acidic-hydrothermal hydrolysis to produce levulinic acid from chitosan using statistical approach. By design of response surface methodology, the effect of reaction temperature, catalyst amount, and reaction time and their reciprocal interactions were investigated. As a result, higher reaction temperature and catalyst amount increased the higher concentration of levulinic acid. However, reaction time did not caused large increase of levulinic acid after some reaction period. Levulinic acid of 2.7 g/L produced from chitosan in the optimized condition of reaction temperature of 175 °C, sulfuric acid of 2.4% and reaction time of 40.7 min.

Key words: Chitosan, Levulinic Acid, Acidic-hydrothermal Reaction, Statistical Methodology

1. 서 론

재생 가능한 자원인 바이오매스의 탄수화물은 그 기본 단위가 육탄당인 glucose, galactose, mannose, fructose와 오탄당인 arabinose, xylose로 구성되어 있으며, 화학, 생물학적인 과정을 통하여 효과적으로 ethanol, butanol, lactic acid, 5-hydroxymethylfurfural, levulinic acid, furfural 등의 다양한 종류의 연료 및 화학물질로의 전환 연구가 진행되고 있다[1-6].

키토산(chitin)의 생산량은 연간 약 1천억 톤으로 추정되고 있다. 이는 식물에 의해 생산되는 셀룰로오스(cellulose)에 필적하는 많은 양이

다[7]. 키토산(chitin)은 게, 새우 등 갑각류의 껍데기, 곤충의 외골격, 오징어 등 연체동물의 골격성분 및 곰팡이, 효모, 버섯 등 진균류의 세포벽에 존재하는 천연 고분자 다당류를 통칭한다[8]. 키토산은 약산에 용해되지 않아 탈아세틸기화 과정을 거쳐 키토산(chitosan)으로 전환하여 사용하고 있다. 키토산과 키토산의 화학구조는 식물의 아밀로오스(amylose)와 셀룰로오스의 구조와 유사하게 구성되어 있다. 다른 점으로는 키토산과 키토산은 셀룰로오스의 구조에 질소 성분이 부가된 형태를 띠고 있는 글루코사민(glucosamine)으로 구성되어 있다[7,8]. 현재 키토산/키토산의 이용은 식품 및 의료분야에 주로 이용되고 있으나, 바이오연료와 화학소재의 자원으로서의 키토산/키토산의 연구 및 사용은 거의 없는 실정이다[7,9-11].

미국 에너지성에서는 향후 석유로부터 분리되는 많은 화학 물질을 대체하기 위하여 당(sugar)을 기반으로 생물공정과 화학공정을 이용하여 얻을 수 있는 12가지의 기본 구성화합물(Top Value Added Chemicals from Biomass)에 levulinic acid를 포함하였다[12]. Levulinic acid와

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gtjeong@pknu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

그 유도체들은 플라스틱 합성이나 정밀화학에서 사용되고 있는 석유로부터 얻는 화학중간체들을 대체할 수 있다고 알려져 있다. 그 예로 levulinic acid는 2-methyl-THF, *g*-valerolactone, angelilactones, 1,4-pentanediol, levulinate esters, *b*-acetylacrylic acid, diphenolic acid, *d*-aminolevulinate, acrylic acid 등의 다양한 화합물로 전환될 수 있다. 또한 levulinic acid의 화학전환으로 얻은 액체 연료는 당의 발효를 통해 얻는 바이오에탄올을 대체가능하다고 평가되고 있다. 그러나 아직 levulinic acid의 높은 생산비로 인하여 상용화에 걸림돌이 되고 있다[2,3,5,13].

반응표면설계법(Response Surface Methodology; RSM)을 이용하면 불연속적인 실험 자료들을 연속적으로 분석하여 객관적이고 신뢰도가 높은 분석 결과를 짧은 시간 내에 얻을 수 있고, 얻어진 여러 독립 변수들의 영향을 종합적으로 분석 가능한 것으로 알려져 있어 다양한 공정의 분석에 사용되고 있다[1,5,14].

본 연구에서는 화학중간체로 사용되는 levulinic acid를 생산하는데 있어 해양 바이오매스인 키토산을 이용하여 잠재적인 자원으로 사용될 수 있는지 평가하기 위하여 산가수분해방법과 반응표면분석법을 적용하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험재료

실험재료로 사용한 키토산(Chitosan, Deacetylated chitin, Poly(D-glucosamine) - medium molecular weight; Sigma-Aldrich, Co. LLC, USA)은 점도 200~800 cP (1 wt% in 1% acetic acid (25 °C, Brookfield)), dilute aqueous acid에 용해가능하고, 75~85% deacetylation의 특성을 가진 재료를 사용하였다. Sulfuric acid (Sigma-Aldrich Co., USA), calcium carbonate (Sigma-Aldrich Co., USA), levulinic acid (Acros Organics, USA) 및 기타 시약은 시약급의 제품을 사용하였다.

2-2. 실험방법

키토산으로부터 산가수분해법을 이용하여 levulinic acid로의 전환 실험은 세 가지 반응인자(반응온도, 반응시간, 촉매농도)에 대하여 수행하였다. 각각의 전환 실험은 50 mL 규모의 회분식 스테인리스 스틸 재질의 반응기를 사용하였다. 각각의 실험은 반응기에 키토산 2 g과 30 mL의 황산 수용액을 넣은 후 5분간 담지한 후 혼합하면서 시작하였다. 반응은 반응기 내의 온도가 설정한 반응온도에 도달하는 시점에 시작하였으며, 대략 5분 정도가 필요하였다. 반응기는 오일 중탕을 이용하여 150~200 °C의 조건으로 조절하여 설정된 반응시간 (9.8~60.2분) 동안 반응 후 즉시 수돗물을 사용하여 실온으로 빠르게 냉각시켜 반응을 중지시켰다. 반응기와 기름 중탕의 온도는 PID 온도컨트롤러를 이용하여 조절하였으며, 반응기 내의 반응물의 반응도를 높이기 위하여 마그네틱 바를 이용하여 약 200 rpm으로 교반하면서 반응을 수행하였다. 반응 종료 후 생산물은 15,000 rpm 속도로

20분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액은 calcium carbonate를 이용하여 pH를 6으로 조절한 다음 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 중화 후 생성된 CaSO₄를 제거한 상등액을 levulinic acid 농도 분석에 사용하였다[1,5].

2-3. 실험계획 및 통계분석

키토산으로부터 levulinic acid로의 전환 실험에 반응표면분석법을 통한 실험 계획을 구성하기 위하여 Design-Expert 7 software (Stat-Ease, Inc. USA)를 이용하여 5-수준-3-인자의 중심합성회전설계법(central composite rotatable design; CCRD)을 사용하였다. 반응온도, 촉매농도, 반응시간을 반응인자로 도입하여 8개의 요인적인 점, 6개의 축의 점, 6개의 중앙 점이 포함된 20가지의 실험을 계획하였다[1,5]. 키토산의 levulinic acid로의 전환에 관련된 인자들의 상관관계를 평가하기 위한 변수들은 반응온도(150~200 °C), 촉매농도(0.3~3.7 wt%), 반응시간 (9.8~60.2분)으로 설정하였다. Table 1과 2에 독립 인자, 수준, 그리고 실험계획을 나타내었다[1,5,14].

통계분석은 Design-Expert 7 software를 사용하여 실험계획에 의해 구성된 실험조건으로부터 얻은 결과(Table 2)를 바탕으로 다양한 회귀분석을 통하여 quadratic response surface model을 구성하였고[1,5,14], 모델의 2차 계수는 인자의 소거 없이 회귀분석을 통하여 분석하였다. 측정계수(R²)와 변이분석(ANOVA)으로부터 모델의 질을 평가하였다.

2-4. 분석 방법

Levulinic acid의 농도는 HPLC (Agilent 1100, USA)를 사용하여 분석하였다. 칼럼은 Bio-rad사의 Aminex 87H 칼럼을 사용하였고, 이동상으로는 5 mM의 sulfuric acid를 0.6 mL/min으로 흘려주었다. 칼럼의 온도는 65 °C로 유지하면서 굴절률 검출기를 사용하여 크로마토그램을 얻었다.

3. 결과 및 고찰

계, 새우 등과 같은 해양 생물유래의 키틴 및 키토산은 인체에 무해하고, 무미/무취한 천연 고분자 다당류이다. 재생 가능하여 고갈의 가능성이 없고, 우수한 생체 적합성, 성형성 및 기능성 등의 다양한 특성을 가지고 있어 고부가가치 소재로 알려져 있으나, 그 사용이 제한되어 왔다[7-11]. 본 연구에서 사용한 키토산은 기본 구성 성분이 질소를 함유한 당의 구조를 띠는 glucosamine이다. 이러한 glucosamine은 glucose와 유사한 구조를 가지고 있어, 이로부터 levulinic acid와 같은 화합물질로의 전환에 사용 가능하리라 판단된다[7,8].

본 연구에서는 해양자원에서 유래한 키토산을 산 촉매를 사용하여 levulinic acid로 전환하고자 하였다. 반응조건의 최적화를 위하여 Design Expert 프로그램을 사용하여 반응표면분석법 중 5-수준-3-인자의 중심합성회전설계법을 적용하였다. Table 2에 실험에 적용한 실

Table 1. Experimental factors and their levels in the central composite design

Factors	Symbol	Coded factor levels				
		-1.68	-1	0	1	1.68
Reaction temperature (°C)	A	149.8	160	175	190	200.2
Catalyst amount (wt%)	B	0.3	1	2	3	3.7
Reaction time (min)	C	9.8	20	35	50	60.2

Table 2. Experimental design and data for 5-level-3-factor response surface analysis in central composite rotatable second-order design

Run	Reaction temperature (°C), A	Catalyst amount (wt%), B	Reaction time (min), C	Levulinic acid (g/L)
1	175	3.7	35	2.75
2	175	2	35	2.59
3	175	2	35	2.08
4	175	2	35	2.38
5	175	2	9.8	1.55
6	175	2	35	1.84
7	160	3	20	2.34
8	175	2	35	2.72
9	175	2	35	2.62
10	160	3	50	2.70
11	175	2	60.2	2.89
12	190	1	50	2.41
13	190	3	50	2.56
14	175	0.3	35	0.12
15	160	1	50	0.31
16	149.8	2	35	1.26
17	190	1	20	1.29
18	160	1	20	0.00
19	190	3	20	2.67
20	200.2	2	35	2.71

Table 3. ANOVA results for the response surface quadratic model for levulinic acid formation

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob. > F ^{a,b}
Model	11.507	9	1.279	14.292	0.0003
A-Temperature	2.644	1	2.644	29.551	0.0004
B-Catalyst	7.649	1	7.649	85.505	< 0.0001
C-Time	1.246	1	1.246	13.934	0.0047
AB	1.326	1	1.326	14.826	0.0039
AC	0.006	1	0.006	0.072	0.7947
BC	0.292	1	0.292	3.268	0.1041
A ²	0.392	1	0.392	4.379	0.0659
B ²	1.839	1	1.839	20.557	0.0014
C ²	0.102	1	0.102	1.135	0.3145
Residual	0.805	9	0.089		
Lack of Fit	0.208	4	0.052	0.437	0.7789
Pure Error	0.597	5	0.119		
Cor Total	12.312	18			

^aProb.>F is level of significance.^bValues of "Prob.>F" less than 0.05 indicate model terms are significant.

험설계를 바탕으로 실험변수의 조건과 20가지의 조건으로 실험을 수행하여 얻은 결과를 나타내었다. 실험 결과에 따르면, 175 °C, 2% H₂SO₄, 60.2분의 실험조건(Run 11)에서 가장 높은 2.89 g/L의 levulinic acid가 생성되었다. 또한 160 °C, 1% H₂SO₄, 20분의 조건(Run 18)에서는 levulinic acid가 검출되지 않았다.

Table 2의 실험계획에 의해 수행하여 얻은 실험결과를 Design Expert 프로그램을 사용하여 다중회귀분석(ANOVA)을 수행하여 얻은 결과를 Table 3에 나타내었다. 모델의 2차 계수는 인자의 소거 없이 회귀분석을 통하여 분석하였고, 계수를 계산한 후에 *p*-values를 이용하여 인자의 중요성을 확인하였다. 인자의 계수의 *p*-values가 0.05보다 작으면 중요하다고 판단하였으며, 0.1 이상의 경우는 중요성이 낮다고 판단하였다. 분석하여 얻은 모델식은 세 개의 1차식의 계수(A, B, C)와 하나의 cross-product 계수(AB), 하나의 2차식의 계수(B²)가

중요한 인자로 확인되었다. 반응변수로 반응온도, 촉매량, 그리고 반응시간을 독립변수로 설정하고, levulinic acid 생성량을 종속변수로 설정하여 다중 회귀분석을 수행(R²=0.935)하여 각각의 변수에 대한 통계분석을 통하여 모델 추정식은 다음과 같았다.

$$Y=2.379+0.486A+0.827B+0.334C-0.478AB-0.033AC-0.224BC-0.167A^2-0.363B^2-0.085C^2$$

Y는 생산물 (levulinic acid, g/L); A, B, C는 각각 반응인자로써 반응온도(°C), 촉매농도(wt%), 반응시간(min)이다.

Fig. 1에 반응온도, 촉매농도, 반응시간이 키토산으로부터 levulinic acid으로의 생성에 미치는 영향을 나타내었다. Fig. 1(A)는 일정한 반응시간 35분에서의 반응온도의 영향을 나타낸 것이다. Levulinic acid의 농도가 낮은 촉매농도에서는 반응온도의 증가에 따라 선형적

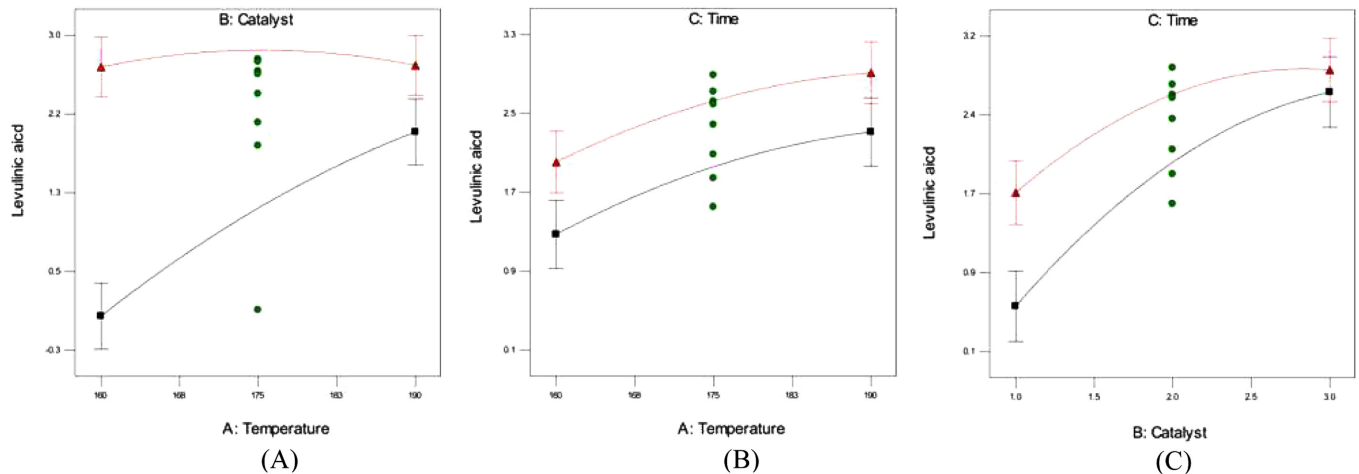


Fig. 1. Effects of reaction temperature, catalyst concentration and reaction time on levulinic acid production from chitosan. (A) At a constant reaction time of 35 min; (B) At a constant catalyst concentration of 2%; (C) At a constant reaction temperature of 175 °C.

으로 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 높은 촉매농도에서는 반응온도에 큰 영향을 받지 않는 것으로 판단된다. Fig. 1(B)는 2%의 촉매농도 조건에서 반응온도에 의한 영향을 나타낸 것이다. 반응시간에 관계없이 반응온도가 증가함에 따라 선형적으로 levulinic acid의 생성이 증가하였다. Fig. 1(C)는 175 °C의 조건에서 촉매농도에 의한 영향을 나타낸 것이다. 촉매농도가 증가할수록 levulinic acid의 생성도 선형적으로 증가하는 경향을 나타내었다. Fig. 1의 결과에 의하면 반응온도와 촉매량은 levulinic acid의 생성에 직접적인 영향을 미치는 반면에 반응시간은 일정 반응시간 이후에는 상대적으로 미치는 영향이 낮은 것으로 판단된다.

Fig. 2는 키토산으로부터 levulinic acid으로의 생성에 반응온도, 촉매농도, 반응시간이 미치는 상호작용에 의한 영향을 나타내었다. Fig. 2(A)는 일정 반응시간 35분의 조건에서 levulinic acid의 생성에 미치는 반응온도와 촉매농도의 상호관계를 나타내었다. 낮은 반응온도에서는 촉매농도가 증가함에 따라 levulinic acid의 생성이 선형적으로 증가하였다. 높은 반응온도에서는 촉매농도의 증가에도 큰 변화를 나타내지 않았다. 낮은 촉매농도에서는 반응온도가 증가함에 따라 levulinic acid의 양도 증가하였다. 높은 농도(2~3%)의 촉매조건에서

는 반응온도에 의한 영향이 미미하였다. 높은 농도의 촉매조건에서 levulinic acid의 생성이 높게 유지되었다. Fig. 2(B)는 일정 촉매농도 2%의 조건에서 levulinic acid의 생성에 미치는 반응온도와 반응시간의 상호관계를 나타내었다. 전반적으로 반응온도와 반응시간이 증가할수록 levulinic acid의 농도도 증가하는 경향을 나타내어, 높은 반응온도와 긴 반응시간의 조건에서 높은 levulinic acid 생성을 얻을 수 있었다. Fig. 2(C)는 일정 반응온도 175 °C의 조건에서 levulinic acid의 생성에 미치는 촉매농도와 반응시간의 상호관계를 나타내었다. 낮은 촉매농도 조건에서는 반응시간이 증가함에 따라 levulinic acid의 생성이 선형적으로 증가하였으나, 높은 촉매농도에서는 반응시간의 증가에는 큰 변화를 보이지 않았다. 반응조건에 촉매농도의 증가는 대부분의 반응시간 조건에서도 levulinic acid의 선형적인 증가를 보였다. Fig. 2의 결과를 종합하여 키토산으로부터 levulinic acid으로의 생성에 반응온도, 촉매농도, 반응시간이 미치는 상호작용에 의한 영향을 비교하면, 반응온도와 촉매농도는 높을수록 levulinic acid의 생성이 증가하였고, 반응시간은 일정시간 이후에는 크게 영향을 미치지 못한 것으로 판단된다. 청각(*Codium fragile*)을 이용하여 levulinic acid로의 전환을 연구한 결과와 비교하면, 반응온도가 높고

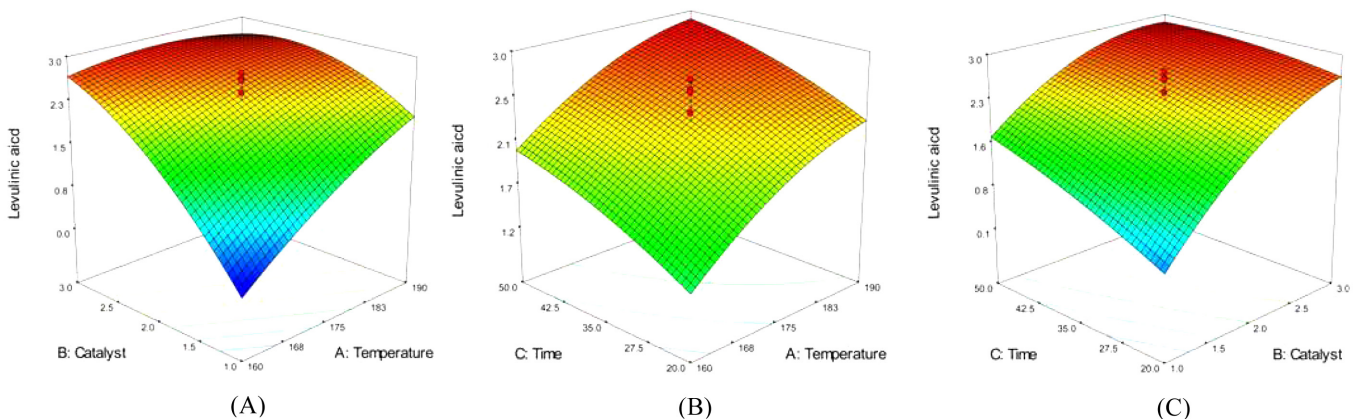


Fig. 2. Response surface plot representing the effect of reaction temperature, catalyst concentration, reaction time, and the reciprocal interaction of these factors on the production of levulinic acid from chitosan at a constant reaction condition. (A) At a constant reaction time of 35 min; (B) At a constant catalyst concentration of 2%; (C) At a constant reaction temperature of 175 °C.

Table 4. Comparison of levulinic acid production from several marine biomass

Materials	Reaction condition	Levulinic acid	References
<i>Gelidium amansii</i>	160 °C, 3.0% sulfuric acid, 43.1 min	9.74 g/L	[5]
<i>Codium fragile</i>	160.7 °C, 3.9% sulfuric acid, 39.1 min	4.26 g/L	[1]
Chitosan	175 °C, 2.4% sulfuric acid, 40.7 min	2.7 g/L	This work

반응시간이 짧을 때 levulinic acid의 생성은 높았으며, 높은 촉매 농도와 긴 반응시간에서는 낮았다고 보고되었다[1]. 이는 과다한 촉매와 긴 반응시간에 의해 청각의 당 성분이 levulinic acid로 전환된 후 과반응되어 humic acid로 전환된 결과로 보고하였다[1,2,6,13].

반응표면분석법을 적용하여 실험한 범위 내에서 키토산으로부터 levulinic acid로의 전환을 위한 반응변수의 최적화를 수행한 결과, 반응온도 175 °C, 촉매농도 2.4%, 반응시간 40.7분의 조건에서 2.7 g/L의 levulinic acid가 생성되었다.

Table 4에 해양유래 자원을 이용한 levulinic acid 생산 결과를 비교하였다[1,5]. 홍조류인 우뚝가사리를 사용한 경우에서 가장 높은 levulinic acid를 보였다. 이러한 결과는 키토산을 사용한 본 연구 결과에 비하여 높은 농도의 levulinic acid로 전환된 결과이다. 이는 다른 비교 결과와 비교해서 우뚝가사리의 구성성분의 특이점으로 인한 것으로 판단된다. 본 연구에 사용한 키토산은 질소가 함유된 당의 형태인 glucosamine으로 구성된 고분자 물질인 반면에, 녹조류인 청각[1]은 arabinose, galactose, mannose가 주요 구성 당이고, glucose, xylose, rhamnose, fructose가 소량 구성되어 있고, 홍조류인 우뚝가사리[5]는 galactose와 쉽게 levulinic acid로 전환가능하다고 알려진 1,3-anhydro-L-galactose로 구성되어 있어 높은 농도의 levulinic acid로 전환된 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 갑각류 껍질의 주요 구성성분인 키틴에서 유래된 키토산을 석유유래 화합물질의 대체에 사용가능한 levulinic acid의 생산을 위하여 산 가수분해와 실험계획법을 적용하여 반응조건을 최적화 하였다. 키토산으로부터 levulinic acid로의 반응인자들의 상호작용을 비교하면, 반응온도와 촉매농도는 높을수록 levulinic acid의 생성이 증가하였고, 반응시간은 일정시간 이후에는 크게 영향을 미치지 못하였다. 디자인된 실험계획에 따라 실험 후 얻은 결과를 바탕으로 최적 반응조건을 조사한 결과, 반응온도 175 °C, 촉매농도 2.4%, 그리고 반응시간 40.7분의 조건에서 2.7 g/L가 levulinic acid를 얻었다. 이 결과는 해양자원 중 게나 새우의 주요 구성성분인 키틴/키토산을 이용하여 석유유래의 연료와 화합물질들을 대체할 수 있는 화합물질의 생산가능성에 대한 기본 정보를 제공하고자 하였다.

감 사

이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2013년)에 의하여 연구되었습니다.

References

- Jeong, G. T. and Park, D. H., "Production of Levulinic Acid from Marine Algae *Codium fragile* Using Acid-hydrolysis and

- Response Surface Methodology," *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, **26**, 341-346(2011).
- Hayes, D. J., Fitzpatrick, S., Hayes, M. H. B. and Ross, J. R. H., "The Biofine Process - Production of Levulinic Acid, Furfural, and Formic Acid from Lignocellulosic Feedstocks," pp. 139-164. In: B. Kamm, P. R. Gruber, M. Kamm (eds.), *Biorefineries - Industrial Processes and Products*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2006).
- Han, J. G., Oh, S. H., Choi, W. Y., Woong, K. J., Seo, H. B., Jeong, K. H., Kang, D. H. and Lee, H. Y., "Enhancement of Saccharification Yield of *Ulva pertusa kjellman* for Ethanol Production Through High Temperature Liquefaction Process," *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, **25**(4), 357-362(2010).
- Demibras, A., "Progress and Recent Trends in Biofuels," *Prog. Energy Combust. Sci.*, **33**, 1-18(2007).
- Jeong, G. T. and Park, D. H., "Production of Sugars and Levulinic Acid from Marine Biomass *Gelidium amansii*," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **161**, 41-52(2010).
- Cha, J. Y. and Hanna, M. A., "Levulinic Acid Production Based on Extrusion and Pressurized Batch Reaction," *Industrial Crops and Products*, **16**, 109-118(2002).
- Coh, B. Y., Lee, J. W., Kim, E. S. and Park, Y. S., "Industry Analysis : Chitosan," *J. Chitin Chitisan*, **8**(3), 127-133(2003).
- Korea Institute for Advancement of Technology, "Chitin/chitosan," Report MDB03077, 1-22(2003).
- Diab, M. A., El-Sonbati, A. Z., El-dien, I. M. and Bader, D. M. D., "Thermal Stability and Degradation of Chitosan Modified with Phenylacetic Acid," *Korean J. Chem. Eng.*, **30**(10), 1966-1971(2013).
- Al-Deyab, S. S., El-Newehy, M. H., Nirmala, R., Abdel-Megeed, A. and Kim, H. Y., "Preparation of Nylon-6/Chitosan Composites by Nanospider Technology and Their Use as Candidate for Antibacterial Agents," *Korean J. Chem. Eng.*, **30**(2), 422-428(2013).
- Kang, M. K., Hong, S. K., Seo, Y. C., Kim, Y. O., Lee, H. Y. and Kim, J. C., "Chitosan Microgel: Effect of Cross-linking Density on pH-dependent Release," *Korean J. Chem. Eng.*, **29**(1), 72-76(2012).
- The Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) and the National Renewable Energy Laboratory (NREL), Top value added chemicals from biomass, volume I - Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. <http://www.osti.gov/bridge>(2004).
- Kim, J. S., "Production of Levulinic Acid from *Gelidium amansii* Using Two Step Acid Hydrolysis," *Korean Chem. Eng. Res.*, **51**(4), 438-442(2013).
- Jeong, G. T., Yang, H. S., Park, S. H. and Park, D. H., "Optimization of Biodiesel Production from Rapeseed Oil Using Response Surface Methodology," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **22**(4), 222-227(2007).