

키틴/키토산의 산업적 응용

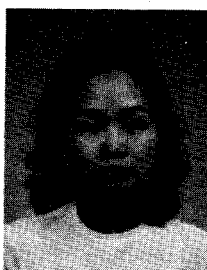
김 종 준 · 김 민 정 · 전 동 원

1. 키틴/키토산 연구개발의 역사적 배경

키틴/키토산 관련연구는 1960년대 중반 Italy의 Muzzarelli에 의하여 개시되었고 그에 의하여 1980년대 중반에 이르러 이론적인 체계가 확립되었다고 볼 수 있다. 키틴/키토산은 이미 19세기 초에 그 물질이 발견되었으나 최근의 20~30년 전까지도 체계적인 연구는 생물화학, 유기화학 분야에서 도외시 되어 왔다. 키틴/키토산이라는 천연고분자 화합물은 Muzzarelli에 의해서 결정구조, 분자량, 물질에 대한 흡착성, 몇 종류의 유도체 등이 개발되었으나 산업화되어 실제 인간생활에 도움을 주기에는 아직도 많은 시간을 요구하고 있는 상태이다.

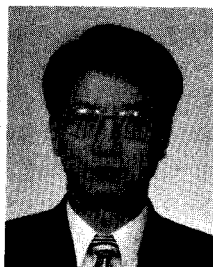
키틴/키토산과 화학적 구조가 거의 유사한 셀룰로오스에서도 체계적인 연구가 1930년대에 이르러서야 개시되었고 지금까지도 cellulose chemistry에서 큰 발전이 없었던 것처럼 키틴/키토산에서도 현대적인 연구가 1960년대 중반에 개시되기는 했지만 극히 일부의 사실만이 밝혀져 있고 산업화의 가능성들만 타진되고 있는 상태이며 진정한 산업화는 아직 이루어지지 않고 있는 실정이다. 키틴/키토산 관련 응용 및 산업화가 지연되고 있는 원인은 여러 이유가 제시될 수 있겠지만 가장 큰 원인은 셀룰로오스에서 적용될 수 있는 여러 현상들이 키틴/키토산에도 그대로 적용될 수 있으리라는 근본적인 오류 때문이라고 볼 수 있다. 셀룰로오스의 화학구조에서 glucose ring에 존재하는 3개의 -OH group 중에서 1개가 -NHCOCH₃으로 치환된 것이 키틴이며 -OH group 중의 1개가 -NH₂ group으로 치환된 것이 키토산이기 때문에 화학적 구조상으로는 셀룰로오스와 키틴/키토산이 거의 유사하지만 셀룰로오스에 적용되는 제반 물리화학적 현상이 키틴/키토산에서는 그대로 적용될 수 없음이 밝혀지고 있다.

그 한가지 예로서 최근 여러 종류의 polysaccharide에서 유래되는 oligomer들이 개발되어 시판되고 있지만



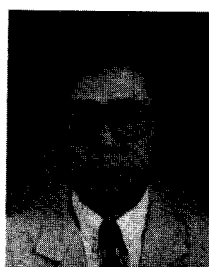
김민정

1996 이화여자대학교 의류직물학과 (석사)
1996~ 이화여자대학교 의류직물학과
현재 박사과정



김종준

1975 서울대학교 섬유공학과 (학사)
1990 노스캐롤라이나 주립대학교 (석사)
1992 노스캐롤라이나 주립대학교 (박사)
1994~ 이화여자대학교 의류직물학과
현재 부교수



전동원

1977 서울대학교 섬유공학과 (학사)
1979 서울대학교 섬유공학과 (석사)
1983 서울대학교 섬유공학과 (박사)
1983~ 이화여자대학교 의류직물학과
현재 교수

Industrial Application of Chitin/Chitosan

이화여자대학교 의류직물학과 (Dong Won Jeon, Min Jeong Kim, and Jong Jun Kim, Ewha Womans University, Dept. of Clothing and Textiles, 11-1 Daehyun-Dong, Seodaemun-Ku, Seoul 120-750, Korea)

(이소말토올리고당, 푸락토올리고당 등) 키틴/키틴산 oligomer들은 지금까지 산업화가 이루어지지 않고 있으며 실험실적으로도 완성단계에 이르지 못하고 있다. 앞으로 키틴/키틴산의 연구에서는 이 고분자화합물을 기존의 셀룰로오스와 유사한 화합물로 인식하지 말고 독자성을 갖는 고분자화합물로 인정하여 제반연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

키틴/키틴산 고분자화합물에 대한 공업특허가 처음으로 출원된 것은 대략 1960년대 말경이며 "chitosan production from chitin"이라는¹ 제목이었다. 1970년대의 키틴/키틴산의 산업적 응용은 폐수처리분야가 주응용분야였으며²⁻¹³ 수산물 가공업체에서 발생되어 폐기되는 갑각폐기물의 부패에 의한 오염을 방지하고 키틴/키틴산을 제조하여 폐수처리와 단백질질수에 응용하려는 연구개발이 주목적이었다. 키틴/키틴산은 순도가 높지 않아도 sludge처리와 유해 chemical의 흡착, 물 속에 용해되어 있는 금속이온의 흡착에 사용 가능하다.

1970년대 중반부터 키틴/키틴산을 이용하는 폐수처리 연구가 활발히 진행되었지만 대규모로 산업화된 경우는 지금까지 발견되지 않고 있다. 1997년 현재도 키틴/키틴산을 환경산업에 응용하려는 기초적 연구만이 진행되고 있으며 그 가능성만이 제시되고 있을 뿐 대규모로 산업화된 경우는 발견되지 않고 있다.

본 총설의 집필자들은 1960년대 초반부터 1997년 현재까지 거의 40년간에 걸친 키틴/키틴산의 연구, 개발 그리고 산업화과정의 배경을 간략히 서술함으로써 그 역사적 배경을 간단히 설명하고자 한다.

1.1 1960년대

Muzzarelli에 의해서 키틴/키틴산에 대한 체계적인 연구가 개시되었으며 그의 저서 "Chitin"에서는 키틴/키틴산의 물리, 화학적 특성, 키틴/키틴산의 추출법, 관련효소, 몇 가지 분야에서의 응용가능성(chromatographic application, medical, waste water treatment)에 대한 내용을 실고 있으며 또 하나의 저서 "Natural chelating polymer(이 중에서 키틴/키틴산 부분)"에서는 키틴/키틴산의 추출법, 효소에 의한 분해법, 미세구조, 키틴/키틴산 유도체 등이 서술되어 있다. 두권의 저서에 수록된 내용들을 검토해 볼 때 전부 실험적인 연구규모에서 행해진 연구결과들이며 키틴/키틴산의 물리적, 화학적 특성 연구가 주류를 이루고 있다. 키틴/키틴산 화합물을 이용하여 중금속이온 흡착능을 조사하기 시작한 것으로 보아 폐수처리에 이용될 수 있는 가능성을 타진한 것으로 판단되는데 이 당시에는 Muzzarelli 이외에 키틴/키틴산에 대하여 관심을 갖는 연구자는 극소수였던 것으로 추정된다. 그러나, Muzzarelli가 1960년대와 1970년대 연구하였던 분야는 현시점에서의 연구분야와 서로 비교해 보아도 커다란 차이점은 발견할 수 없다. 단지 키틴/키틴산이

정밀화학이나 생물산업 분야와 좀더 밀접한 연관성이 성립되고 있다는 점과 이를 만족시키기 위하여 순도가 높은 고품위의 제품과 차별화된 다양한 종류의 키틴/키틴산이 절대적으로 요구되고 있다는 점을 제외한다면 큰 차이점은 없다.

Chemical Abstract에서 키틴에 관한 항목이 보이기 시작하는 것은 1964, 1965년 경부터이고 1960년 이전에는 키틴/키틴산에 관련된 특허가 대략 40건 정도 출원된 것으로 조사되었으나 키틴/키틴산 원료의 제조에 관련된 상세한 내용의 특허는 발견되지 않는 것으로 보아 현시점에서 요구되고 있는 기능성이 부여되고 있는 특정한 품위의 키틴/키틴산이 요구되지 않고 있었음이 확인된다.

1.2 1970년대

1970년대 전반에는 세계각지에서 선진국을 중심으로 하여 키틴/키틴산에 대하여 관심을 갖는 연구자들이 나타나기 시작하였으며 응용연구분야 종사자들은 주로 키틴/키틴산의 추출법, 또는 분리법에 많은 시간을 할여하였다. 이 당시에 수득된 키틴/키틴산들은 순도가 지극히 낮으며 잔류석회질과 잔류단백질의 함량이 높기 때문에 고순도의 키틴/키틴산이 요구되는 응용분야에서는 사용될 수 없었고 단지 폐수처리 등에 사용될 수밖에 없었다.

1970년대의 주요 연구과제는 게, 새우, krill 등의 갑각폐기물로부터 키틴을 효율적으로 분리해내고 다시 키틴을 탈아세틸화시켜서 키틴산을 제조하는 것이 주목적이었으며^{4,14-24} 수득된 키틴/키틴산의 분자량, 결정화도, 물리적, 화학적 특성에 관한 연구가 병행되었다. 1970년대에 진행되었던 키틴/키틴산 관련분야 연구는 1978년 미국 MIT대학에서 제1회 학회가 개최됨으로써 정리되었다고 볼 수 있는데 발표내용은 대략 키틴/키틴산의 제조법, 키틴/키틴산의 물리적, 화학적 특성분석, 키틴/키틴산의 유도체제조법, 제반응용분야(medical, 폐수처리, 섬유가공, 농업관련) 등의 section으로 분류될 수 있는 것으로 보아 키틴/키틴산 관련연구가 다양해지고 학문적 수준도 향상되었음을 엿볼 수 있다. 그러나, 이 당시에도 관련분야 중에서 산업화된 예는 찾아볼 수 없으며 세계적 연구의 중심지는 미국과 유럽지역이라고 볼 수 있다. 대학이나 연구소가 주로 연구에 참여하고 있었으며 기업체들에서는 연구가 개시되지 못하였다. 대학의 연구수준이 기업의 연구수준을 월등히 능가하고 있는 상태였으며 기업체의 입장로서는 이 분야의 연구개발에 참여하여 이윤추구를 목적으로 하지 않고 있었다. 물론 국가적인 차원에서 이 분야에 대한 지원도 이루어지지 않았다.

Muzzarelli가 이론적인 연구를 수행하고 있었다면 산업적 측면에서의 키틴/키틴산 분야는 어떤 상황이었는가? 1960년 이전에는 키틴/키틴산 관련특허가 대략 40건 정도 출원된 것으로 조사되었으나 원료의 제조를 기술

하고 있는 상세한 특허가 발견되지 않는 것으로 보아 현 시점에서 요구되고 있는 기능성을 만족시킬 수 있는 특정한 키틴/키토산이 요구되지 않았음이 증명되고 있다. 대략 1978년 경부터 세계각국에서 특허출원이 증가되고 있는데 주로 물질의 분리, 회수분야에 해당되는 분야가 주류를 이루고 있고 몇 가지 예는 다음과 같다.

- Recovery of protein from fish processing liquid using chitosan solution as coagulant, JP 72001633

- Photographic materials containing chitosan compounds, JP 72008319

- Polyampholite production from chitosan and salicylaldehyde, SU 325234

1.3 1980년대

1980년대 초에 키틴/키토산 관련연구의 중심은 미국과 유럽지역에서 일본으로 옮겨지는 것처럼 보인다. 일본에서 이 분야연구가 가속되기 시작한 근본적 이유는 국가 project로 지정되면서 4~5년간에 걸쳐서 집중적인 투자가 이루어졌고 응용 가능한 모든 분야가 연구에 참여하였기 때문이다. 일본에서의 주연구분야는 식품관련분야,²⁵⁻³³ 의용재료분야,³⁴⁻⁴² 건강식품분야, 폐수처리분야 등인데 특히 건강식품분야가 활기를 띠었다. 1980년대 일본 내에서는 무려 1,000건에 달하는 특허출원이 이루어졌고 600~700편의 학술논문이 발표되었는데 연구개발의 주축이 기업이었음이 분명하다. 그러나, 현시점에서 평가해볼 때 기업체가 주축이 된 일본의 키틴/키토산 연구개발사업은 기업이윤추구에서 기대하였던 것만큼 도달되지 못하였던 것으로 평가된다.

1980년대 후반 일본은 한국의 동해안에서 폐기되는 지극히 양질의 홍게갑각을 대량으로 수입해 갔으며 일본으로 수출된 홍게갑각은 일본의 키틴/키토산 생산에 상당한 도움이 되었을 것으로 예측된다. 1980년대 후반부터 일본은 한국에 대하여 대대적인 키틴/키토산 홍보활동을 개시하였으며 지금까지도 계속되고 있다. 1980년대 일본 키틴/키토산 산업에서의 기현상이라면 키틴/키토산이 건강식품의 보조재료 이상으로는 인식되지 않고 있었으며 고부가가치의 창출이 기대되었던 분야에서는 기대하였던 예측에 미치지 못하였다는 점이다. 키틴/키토산을 신비의 생체 기능성물질로 세계적 홍보를 시작한 것은 일본이었으나 정작 일본내에서는 건강보조식품이외의 hit상품이 출현하지 않았다.

폐수처리분야에서도 대규모로 상업화된 케이스가 발견되지 않고 있으며 단지 극히 일부 고부가가치 창출분야에서 산업화된 것이 있다면 Unifica에서 생산되고 있는 wound dressing 등이 제시될 수 있다. 이 wound dressing제품은 가격 면에서 지극히 고가이기는 하지만 (6×6 cm piece가 15\$ 이상, 12×12 cm piece가 80\$ 이상) 세계적인 수요량이 크지 않은 것으로 판단되며 고

부가가치 제품으로서의 기대했던 이윤추구에는 미치지 못하는 것으로 판단된다. 일본에서 키틴/키토산 응용에서 식품분야 또는 건강보조식품분야가 주류를 이루었던 이유는 최종 제품개발에 장기간이 요구되는 제약을 비롯한 정밀화학분야의 참여가 부진하였고 더욱 근본적인 이유로서는 정밀화학분야에서 요구되는 극도의 고품위 키틴/키토산 원료의 제조가 원활치 않았기 때문으로 판단된다.

1982년 일본에서 제2회 세계학회가 개최되었고, 1985년 Italy에서 3회 학회가, 1989년 Norway에서 제4회 학회가 개최되었다. Norway의 제4회 학회에서는 관련연구의 주류가 고부가가치 창출 쪽으로 방향이 선회되면서 정밀화학이나 medical분야 응용이 강조되고 있음을 볼 수 있다. 일본에서 기능성식품으로 인식되기 시작하면서 우리 나라에서도 이의 영향을 받아 현재까지도 기능성이 강조되는 기능성식품 정도로서 밖에 인정받지 못하게 되었다.

1980년대에는 대학과 연구소의 연구수준이 기업체의 연구수준과 거의 동일하였던 것으로 평가되고 있다.

1.4 1990년대

1991년 가을 미국의 Princeton에서 제5회 학회가 개최되었는데 이 학회의 가장 중요한 특징은 fine chemical, 유전공학, 고순도 키틴/키토산의 제조, medical제품분야로 연구개발의 방향이 완전히 선회하였음을 보여주고 있으며 폐수처리, 농업관련분야 등 고부가가치 창출에 실패한 응용분야는 거의 자취를 감추게 되었다는 사실이다.

Princeton 학회는 많은 중요 의미를 내포하고 있는데 그 중의 하나가 키틴/키토산 관련연구가 다시 미국과 프랑스를 중심으로 하는 유럽에서 다시 활성화되기 시작하고 있다는 점이다. 지금까지 키틴/키토산은 가장 대표적인 천연고분자 화합물임에도 불구하고 연구자들의 주체가 주로 생물, 농업, 식품관련 전공자들이었으나 Princeton 학회에서는 천연고분자 화합물로서의 중요성이 인식되어 고분자 관련분야에 해당하는 한 분과위원회로서 활동하는 것도 바람직하다는 안이 제시된 바 있다. 1991년 Princeton 학회의 특징은 관련기업체들의 연구능력이 이미 대학이나 연구소의 연구개발능력을 월등히 능가해버린 것으로 평가되며 첨단분야의 연구개발이 어느 단계에 도달되었는지가 확연히 밝혀지지 않고 있는 상태였다. 단지 미국 정부 내에서도 비공개리에 다수의 연구개발자들에 의해서 연구개발이 진행되고 있음도 인정되었다.

1994년 Poland에서 제6회 학회가 개최되었는데 이 학회의 특징은 Poland 자국 연구자들이 참여자들의 참여율이 매우 높았으며 1991년 Princeton 학회와 비교할 때 연구자들의 참여가 다소 부진하였던 것으로 판단된다. 이러한 현상은 키틴/키토산 연구개발의 상황을 극단적으로 보여주는 한가지 예로 해석될 수도 있는데 1994년

Poland 학회의 특징은 학술적인 면이 다분히 강하였고 키틴/키토산 연구에 참여하고 있는 기업의 참여는 미진하였다는 점이다. 이러한 90년대 후반의 추세로 볼 때 앞으로도 이 분야의 연구개발의 결과는 대부분 미공개로 부쳐질 가능성이 크며 해외의 선진기술에 의존하기보다는 정밀화학, 생물공학과 연관하여 독자적인 연구가 강화될 것으로 예측된다.

1990년대 중반에 들어서서 세계학회 활동에서 발생한 또 한가지 특이 현상이라면 Italy의 Muzzarelli를 중심으로 하여 프랑스, 독일, 영국, 노르웨이 등이 주축이 되어 유럽 키틴/키토산 학회가 창립되었다는 점이다. 이 유럽 키틴/키토산 학회의 연구방향을 주목해야 할 필요가 있는데 지금까지의 기존의 학회들과 달리 정밀화학, 생명공학, 생물산업 쪽에 연구가 집중되고 있음을 볼 수 있다. 폐수처리, 농업분야, 식품관련분야는 거의 취급되지 않고 있는 것으로 판단되며 키틴/키토산 관련효소에⁴³⁻⁴⁶ 관하여 집중적으로 관심이 집중되고 있는 듯하다. 의용재료, 향장첨가물, 의약품 등의 분야로 관심이 집중되고 있음을 볼 수 있다.

1997년 9월 프랑스에서 제7회 세계학회가 개최기로 예정되어 있는 바 고부가가치 창출의 선두를 달리고 있는 유럽지역에서 학회가 개최된다는 점을 감안할 때 기대되는 바가 크며 21세기에 전개될 키틴/키토산 산업의 방향을 제시해 주지 않을까 기대된다.

우리 나라의 실정을 살펴보면 1996년 8월 한국 키틴/키토산 학회가 결성되어 다수의 키틴/키토산 연구자들이 참여하고 있으며 이를 계기로 국내에서도 유망적인 연구가 이루어질 수 있을 것으로 기대되며 1997년 중반기에 들어서서 또하나의 연구회가 결정될 움직임이 보이고 있어서 국내의 키틴/키토산 연구는 지극히 활성화되고 있음을 알 수 있다.

2. 키틴/키토산 관련산업의 시장성

키틴/키토산 관련산업은 최근에 이르러 고부가가치의 창출 쪽으로 추고되고 있다. 그러나, 고부가가치의 창출 개념은 1970년대 당시 키틴/키토산 연구라는 개념과 비교할 때 연구개발의 방향이 상당한 정도로 변질된 측면을 보여주고 있다.

앞서 언급하였듯이 연구의 초기에는 수산물폐기물에 의한 공해를 최소로 감소시키고 폐기물재활용의 측면에서 연구가 개시되었으나 30년의 세월이 흐른 지금의 시점에서는 수산물폐기물에 의한 공해를 격감시키고 산업폐기물의 재활용이라는 목표는 완전히 퇴색되어버렸다. 이러한 산업적 관점의 변화는 우리 나라를 비롯한 세계각국에서 많은 부작용이 발생하는 주요원인으로 작용하고 있다. 많은 공개

된 특허나 학술논문의 서론에는 다음과 같은 문구를 무수히 발견할 수 있다. “키틴이나 키토산은 셀룰로오스 다음으로 자연계에 풍부한 천연고분자 화합물로서...” 그러나, 키틴이나 키토산은 셀룰로오스와 달리 태양에너지에 의하여 생산될 수 없다는 점이 감안되어야만 한다. 셀룰로오스의 경우 넓은 토양에서 태양에너지에 의하여 생산될 수 있지만 동물의 갑각에서 수득되는 키틴은 화학적 처리 또는 생물학적 처리를 거쳐서 생산될 수밖에 없다. 1970년대말 버려지는 수산물폐기물 재활용이라는 개념 하에서 키틴/키토산 관련산업을 추진하였던 기업체들과 많은 연구자들은 최근 급변된 상황에 당황하지 않을 수 없게 되었다. 세계적으로 연간 폐기되고 있는 수산물폐기물은 수백억톤에 달하고 있는데 이것이 그대로 버려진다면 부패에 의한 공해가 심각하게 유발될 수 있다. 폐기되는 폐기물의 양이 수 백억톤이므로 이것으로부터 키틴/키토산이 생산된다면 수득율을 10%만 보아도 수 십억톤의 키틴/키토산이 생산되어 사용될 수 있으므로 셀룰로오스 다음으로 풍부한 천연자원으로 해석될 수 있겠으나 그 생산과정에서 발생하는 심각한 공해와 환경오염은 상상을 초월하고 있다. 1990년대 후반인 현시점에서 갑각으로부터 생물학적인 방법을 동원하여 키틴과 키토산을 제조함으로써 공해를 감소시킬 수 있다고 주장하는 연구자들도 다수 있으나 키틴/키토산을 대량 생산할 수 있는 유일한 방법은 아직까지도 HCl과 NaOH처리를 포함하는 화학적 방법밖에 없다고 보아도 과언이 아니다. 전세계적으로 생물학적인 방법을 이용하여 키틴/키토산을 생산하려는 연구가 개시된 지 20년이 지났으나 아직도 산업화되어 실제 생산이 이루어지고 있는 것은 발견되지 않고 있으며 대량생산의 주된 방법은 역시 HCl과 NaOH에 의한 화학적 방법에 의존하고 있는 실정이다. 생물학적인 방법이 적용될 수 있는 키틴제조는 원료는 결정화도가 낮고 분자량이 크지 않은 연질의 수산물갑각에서는 적용이 용이하나 결정화도가 높고 분자량이 큰 경질의 수산물갑각에는 적용이 곤란하며 수득되는 키틴과 키토산내부에 잔류하는 석회질과 단백질의 잔류함량을 어느 한계이하로 저하시킬 수 없다는 점도 생물학적 생산의 한계성을 말해주고 있다. 석회질과 단백질의 함량을 어느 한계이하로 만족시키기 위해서는 필히 화학적 처리법이 요구되고 있다.

키틴을 수득하는 공정과 키토산을 수득하는 공정에서 필연적으로 발생하는 HCl과 NaOH폐수, 그리고 석회질, 단백질의 유출은 환경오염의 주된 원인으로 인정되어 선진국들은 갑각으로부터 키틴/키토산의 생산을 기피하고 있다. 갑각으로부터 키틴을 수득하기 위해서는 석회질을 제거하기 위해서 0.5~5N 농도범위의 HCl수용액이 요구되며 단백질을 제거하기 위해서는 5~10% 농도범위의 NaOH수용액이 요구되고 있다. 산성인 HCl과 염기성인 NaOH를 서로 중화시킴으로써 산성 또는 염기성 폐

수의 처리가 가능해질 수 있다는 제안이 제시되고도 있지만 발생하는 HCl폐액과 NaOH폐액의 양이 서로 다르기 때문에 중화는 실제로 불가능하다. 그 이유는 석회질을 다수 포함하고 있는 갑각과 단백질을 다수 포함하고 있는 갑각에서 적용되어야만 하는 HCl과 NaOH의 절대량이 서로 달라지기 때문이다. 설사 HCl과 NaOH의 중화과정을 도입한다 할지라도 석출되는 석회질성분과 단백질성분의 다량 혼합함유로 인하여 혼합폐기물의 발생은 필연적이라 할 수 있다. 갑각으로부터 키틴 제조과정에서 발생하는 오염은 오히려 키틴으로부터 키토산을 수득하는 과정에서 발생하는 오염에 비하면 미미한 편이다. 키틴의 탈아세틸화 공정에서는 대략 40~50% 농도범위의 고농도 NaOH수용액이 사용될 수밖에 없는데 수득되는 키토산의 탈아세틸화도를 90% 이상으로 상승시키기 위해서는 키틴 10g당 NaOH수용액이 300mL 이상 첨가되어야만 바람직하므로 NaOH에 의한 오염은 피하기가 어려운 것으로 판단된다.

지금까지 제시되었던 이유들로 인하여 세계적 키틴/키토산의 시장상황은 끊임없이 변화되어온 것이 사실이다. 1980년대 중반까지는 고품위 키틴/키토산의 생산이 세계적으로 불가능했기 때문에 저품위 제품이 유통되었으며 갑각으로부터 분리, 추출된 키틴과 키토산이 그 자체로서 상품적 가치를 지니고 있었으나 대략 1992년을 정점으로 하여 저품위 키틴/키토산은 세계시장에서 가격이 형성되지 않고 있다. 저품위 키토산은 정제과정을 거친다 할지라도 여타의 화합물들처럼 고품위 키토산으로의 변환이 불가능하기 때문이다. 저품위 키틴/키토산을 생산하던 국가들은 공해의 배출을 감수하면서도 대량의 저품위생산을 계속하고 있으나 앞으로의 시장성은 전무하게 될 것으로 예측된다. 아이러니컬하게도 키틴/키토산 관련분야에서 우위를 점하고 있는 선진국들 중에서 갑각으로부터 키틴/키토산을 직접 생산하고 있는 국가는 하나도 없다는 사실이 키틴/키토산 시장의 변화를 확증해 주고 있다.

현시점에서 저급품 키토산의 가격은 대략 4~5\$ 선을 형성하고 있는데 이 가격은 국가적 환경에 따라서 그 해석이 달라질 수 있다. 공해배출을 철저히 규제하고 있는 국가에서는 폐수처리 비용에도 미치지 않기 때문에 셀룰로오스 다음으로 풍부한 천연자원이라는 표현은 더 이상의 설득력이 있을 수 없지만 공해배출의 규제가 심하지 않은 국가에서는 5\$ 이하의 가격으로도 키토산의 생산을 계속하고 있다. 앞으로 키틴/키토산의 시장성, 그리고 시장규모는 정밀화학과 생명공학분야에서 요구되는 특별하게 조절된 물성을 만족시키는 키틴/키토산이 저렴한 가격으로 대량 생산될 수 있느냐 없느냐에 달려 있으며 고부가가치의 상업적 응용분야를 추구하지 않는 한 전망이 밝다고 볼 수 없다.

본 총설의 투고자들은 미래의 불투명한 키틴/키토산 시장성에 대하여 주관적으로 논하기보다는 오히려 1980년대 후반을 기준으로 키틴/키토산 시장에 관한 규모를 서술함으로써 미래의 키틴/키토산 시장규모와 전망에 대한 예측을 가능하게 하는 것이 바람직한 것으로 사료되어 대략 1987, 1988년을 기준으로 하여 그 시장성에 대하여 논하기로 한다. 미국에서 예측하였던 키틴/키토산 시장규모는 아래에 제시된 바와 같으나 거의 10년이 지난 지금 이러한 예측은 빗나가고 있으며 예상하였던 것만큼 산업화도 이루어지지 않고 있는 실정이다.

이렇게 예측이 빗나가버린 근본적인 이유는 키틴/키토산이라는 고분자화합물의 특이성과 1980년대에 예측하였던 키틴/키토산의 특성과 효용성, 산업적 파급효과가 너무 과장되어 평가되었기 때문일 것이다. 그 한가지 실례로서 국내에서 요즈음 키토산이 지극히 우수한 항암력을 지니고 있는 것처럼 과장 광고되고 있었던 바 급기야 1997년 7월 키토산의 약리작용에 관한 과장광고가 사회적인 문제로 대두되기에 이르렀다. 일본에서 수행되었던 몇몇 연구결과를 참조해 볼 때 항암력이 발현되기 위해서는 지극히 좁은 특정 분자량 범위가 만족되어야 하는 것으로 밝혀졌으며 항암력을 발현할 수 있는 특정 분자량크기로 조절되지 않은 키토산은 아무런 효과가 없는 것으로 알려져 있다. 분자량이 조절되지 않은 키토산을 생쥐에 정맥 주사한 경우 죽음에 이른다는 사실도 보고된 바 있다.⁴⁷ 그러나, 특정 분자량범위로 조절된 키토산은 제조하기가 지극히 어려우며 세계적으로 이러한 기술은 극소수의 특정 연구자들이 보유하고 있을 뿐이며 대량생산이 될 수 없기 때문에 산업분야에서의 직접적인 응용은 요원한 상태라고 볼 수 있다. 표 1에서 보듯이 키틴/키토산의 응용분야는 몇 분야로 크게 분류될 수 있다. 큰 category로 분류하면 농업분야, 식품분야, 폐수처리분야, 의용분야(화장품, health care, immobilization and cell culture 분야까지 포함)로 분류될 수 있고 표 1은 1980년대 후반에 1999년을 예측한 잠재적 시장규모로 볼 수 있는데 의용 분야가 70%를 넘고 있는 바 10년 전인 1980년대에도 고부가가치를 창출할 수 있는 의용분야가 가장 중요시되고 있음이 증명된다. 특히 US market만을 두고 볼 때 의용분야는 80%를 넘어서고 있기 때문에 이미 10년 전에 키틴/키토산 산업의 방향은 극도의 고부가가치 창출이 기대되는 의용분야에 집중되고 있었음을 엿볼 수 있다. 1999년이 2년 남은 현시점에서 볼 때 세계적 규모로 의용분야의 시장은 전체 키틴/키토산 시장규모의 90%를 넘어서고 있는 것으로 판단되며 농업분야, 폐수처리분야, 식품분야는 시장성이 사라져 가고 있다고 평가해도 과언이 아닌 듯싶다. 단지 식품과 식음료 관련 분야는 이 분야에서 요구되는 특정한 키틴/키토산 관련 물질의 개발과 대량생산에 의해서 좌우될 것으로 예측된

표 1. Summary of Potential Market in 1999 (\$ million/year)

Application	US Market	World Market
Agriculture	70	230
Cosmetic and Toiletries	30	90
Food and Beverages	35	110
Health Care	480	1245
Immobilization and Cell Culture	25	45
Product Recovery and Separation	20	50
Waste Water Treatment	50	140
Total	710	1910

다. 앞에 제시된 바 있는 세계적 규모의 키틴/키토산 시장성에 관한 예측과 현재 우리나라의 키틴/키토산 시장을 서로 비교해 보는 것은 큰 의미를 가질 것으로 판단된다. 우리나라에서는 키틴/키토산이 응용될 수 있는 수많은 응용분야 중에서 선진국에서는 사라져 가고 있는 식품 및 식음료 관련분야에 의해서 100% 시장성이 형성되고 있다는 사실은 세계적인 키틴/키토산 시장성과는 정반대의 상황이 진행되고 있다고 볼 수 있다. 향후 3~4년 이내에 농업분야와 폐수처리분야의 시장성은 사라질 것으로 예측되며 식품관련분야의 시장성은 불투명한 것으로 예측된다. 단지 농업분야에서는 살포된 농약에 의한 제3의 오염을 방지할 수 있는 농약 독성 저하제, 생물학적인 무공해농약,⁴⁸ 농약의 방출을 서서히 조절하는 서방성 농약제제, 농작물의 발아를 촉진시키는 방법⁴⁹⁻⁵⁶ 등의 분야에 극소량 사용될 것으로 예측되며 폐수처리분야에서는 음용수의 고도정수처리, 극도의 독성을 갖는 난분리성 금속이온의 흡착과 분리, 선택적 흡착능이 유별나게 큰 chelate resin의 제조 등 극히 제한된 분야에 소규모로 사용될 것이 예측된다. 지금까지 제시된 응용분야 이외에 섬유산업에서의 소규모 응용이 고려될 수 있는데 미래의 섬유가공 분야가 인체에 독성이 없는 인체친화적 가공제가 사용되리라는 것을 감안한다면 키토산에 의한 인체친화적 가공은 바람직한 것으로 평가되며 실제로 키토산을 섬유산업에서 이용하려는 연구개발이 전세계적으로 활발히 진행되고 있는 실정이다. 키틴/키토산이 가식성 물질이라는 점은 섬유가공에서의 최종 목적인 무독성의 가식성 물질에 의한 가공을 실현시켜줄 수 있을 것으로 기대된다. 그러나, 섬유산업에서의 응용은 아직까지 초보단계에 머물고 있는 상태이며 해결되어야 할 문제점들이 산적되어 있는 상태인데 우선 키틴/키토산을 이용하는 가공에서 요구되는 이론적 background의 확립이 시급하다.

3. 키틴/키토산 산업에서의 응용 예

키틴/키토산 산업의 응용에서는 앞에서 언급하였듯이 21세기에 시장성이 확장될 분야만을 논하는 것이 의미가 있으며 시장성이 없는 것으로 예상되는 분야에 대해서는

논의하지 않는 것이 바람직한 것으로 사료되어 응용분야 시장성이 클 것으로 예상되는 의용분야와 더불어 식품관련분야에 대해서만 논의하기로 한다.

3.1 의용재료로서의 응용

의료생체 공학분야에서 지금까지 사용될 수 있는 소재의 대상은 한정되어 있다. 인체적합성이 우수하면서도 거부반응이 최소한으로 축소된 소재로서 합성고분자 소재가 주류를 이루어왔다. 최근에 이르러서는 합성고분자 소재 이외에 천연고분자 화합물로 대체하여 인체적합성이 우수한 생체적합성 소재를 개발하려는 경향도 보이고 있다. 흔히 사용되고있는 천연고분자 소재로서는 polysaccharide류가 주류를 이루고 있는데 dextran, xanthan, alginic acid, carrageenan, hyaluronic acid, 키틴, 키토산 등이 제시될 수 있다. 1990년대에 들어서면서 키틴/키토산을 이용하려는 연구, 개발이 활발히 전개되고 있다. 키틴/키토산은 그 연구의 초기목적이 수산폐기물의 재활용이라는 관점에서 시작되었기 때문에 폐수처리를 비롯한 단순한 응용이 주류를 이룰 수밖에 없었으나 순도가 높은 biomedical grade 키틴/키토산의 제조가능성이 제시되기 시작하면서 인체적합성 생체고분자 소재와 의약품의 원료로서 각광을 받기에 이르렀다. 1990년 이전부터 의약품 응용분야에서는 cholesterol 강하제, antitumor agent, 뼈형성 촉진제, DDS에서의 응용, 지혈제 등으로의 응용이 기대되고 있으며 생체적합용 재료로서는 wound dressing, wound ointment, 치과, 안과용 치료제, 정형외과재료, 수술용 봉합사 등에 이용되고 있다. 특히, 키틴/키토산이 이용되는 wound dressing과 wound ointment 분야는 잠재적 시장성이 큰 것으로 예측되어 세계적으로 많은 연구가 수행되고 있다. 그 몇 가지 사례로서는 DE 1906155(1964), DE 1906159(1964)는 키틴/키토산 관련 wound dressing에 관한 최초의 특허로서 분쇄된 키틴분말이 상처회복에 큰 도움을 준다는 내용이 담겨져 있으며 GB 1252373(1971)에도 유사한 내용이 실려 있다. US 3632754(1972), US 3914413(1975)에서는 키틴은 wound healing을 지극히 촉진시킨다는 사실이 밝혀졌으며 Balassa[*Am. J. Surgery*, 119, 560~564]는 키틴은 lysozyme에 의해서 분해되는 성질을 갖기 때문에 생리적으로 용해 가능하다는 사실을 지적하였다. Widra[EP 0089152 (1983)]와 Miyata[JP 86141373 (1986)] 등은 키토산을 keratin 또는 collagen과 복합시켜 필름을 제조하여 wound dressing을 제조하였다.

위에서 언급된 기공개된 특허들에서는 키토산을 단지 생체적합성 소재로서의 가능성만을 제시하였을 뿐 상업화시키지는 못하였으며 키토산이 tissue에 대하여 작용하는 biological 또는 histological 현상도 취급하지 못한 바 있다. 위에 제시된 특허들에서는 키토산이 단지 첨가

물로서 첨가되었을 뿐 키토산을 주성분으로 하는 wound dressing이 제조된 것은 아니다. Yano(*MieMed. J.*, **35**, 53~56 (1986)) 등은 collagen의 대량 합성시에 키틴이 관여하고 있다는 사실을 발표하였고 또한 키틴은 collagen의 피부접착을 촉진시켜준다는 사실도 증명한 바 있다. Ohshima(*Eur. J. Plastic. Surg.*, **10**, 66~69 (1987)) 등은 유기용매에 키틴을 용해시킨 다음 키틴용액을 비용매 속으로 삼출시키는 습식방법을 이용하여 수득되는 키틴 섬유를 환자의 상처에 접촉시켜본 결과 통증이 완화되고 상처부위에 쉽게 접착되어 피부재생이 촉진되었으며 상처에서 분비되는 삼출액(exudate)을 제거해주는 능력이 우수하다는 사실을 제시하였다. 향후 3~4년 뒤에는 키틴/키토산의 세계시장 규모가 20억 \$로 10년 전에 이미 예측되었고 health care분야만 12억 \$, 특히 wound care분야인 hemostat, ophthalmology, surgical sutures, wound dressing 분야만도 8억 \$ 정도의 시장성이 예측되고 있어서 wound care분야의 전망이 매우 밝은 것으로 예측되고 있다.

1990년대 초 Kendall Co.와 Unitica에서는 키틴으로부터 상처보호제를 제조할 수 있는 여러 가지 기술을 개발하였는데 이 두 기업에서 개발된 제조방법을 간단히 기술하면 아래와 같다.

키틴 thread를 직포 sheet상으로 습식방사시켜서 제조하게 되는데 이 sheet를 상처부위에 접촉시키면 상처의 회복속도가 가속화되고 고통과 공포감이 현저히 감소되는 것으로 보고되었다. 이 sheet는 체액에 의해서 용해되지 않으며 다른 인공피부와 달리 식염수에 침지시키지 않고도 직접 상처부위에 적용시킬 수 있다. Unitica의 wound dressing은 화상, 외상, 피부이식 부위에 사용될 수 있으며 1988년 처음 시판되었을 때 가격은 1500₩ (\$11.00 6×6 cm piece), 7200₩ (\$54.00 12×24 cm piece)이었다. 상처부위에 직접 키토산 아세테이트 용액을 적용시킴으로써 상처부위에 키토산 필름을 형성시킬 수 있는 또 다른 방법이 제시될 수 있는데 지금까지 사용되어 온 산성액성의 수용액과 달리 이 키토산 필름은 자체 무게의 50%까지 수분을 흡수할 수 있으며 lysozyme에 의해서 서서히 붕괴되기 때문에 상처가 완치된 후에 제거할 필요가 없다. 키토산 필름에서는 분자량이 낮은 키토산으로부터 제조된 것이 유리한 것으로 평가되고 있다. 키토산 아세테이트는 ammonium keratinate와 같은 음이온 하전물질과 결합할 수도 있는데 이 결합된 물질은 물과 섞이게 되면 순간적으로 반응하여 물에는 용해되지 않지만 산소투과능을 지니는 고분자물질이 생성된다. 키토산 sponge는 키토산용액에 공기를 불어넣어서 부풀리거나 또는 키토산용액에 계면활성제와 화학적 가공제를 첨가하여 제조할 수 있다. 키토산용액 중에 생성된 기포위에 분말상의 고체를 분산시킨 다음 methanol과 같은

용고액 중에서 키토산용액을 응고시키고 최종적으로 뜨거운 물로 세척하여 고체분말 물질을 제거한다. 키토산 상처보호제는 항생제와 같은 약리기능을 갖는 물질의 수송체로 작용할 수도 있는데 그 예를 들자면 키토산분말을 glycerol의 산성용액에 용해시킨 다음 중화시켰을 때 생성되는 gel이나 gellike membrane으로 사용할 수 있다. 만약 gel이 필요한 경우는 glycerol의 양을 줄이면서 암모니아 gas를 중화제로 사용하면 된다.

지금까지 앞에서 예시된 wound dressing들은 그 기체(support)로서 키토산 자체만을 사용하고 있지만 몇몇 연구자들은 wound dressing의 기체로서 silicon, polyurethane(PU) 등을 사용하는 경우도 제시하고 있는데 이런 경우에는 silicon이나 PU의 높은 투습성과 공기투과능을 십분 이용하려는 시도이다. 키틴이나 키토산은 상처가 치유되도록 돕는 작용을 하고 support는 상처를 보호하는 역할을 한다고 볼 수 있다. 키틴이나 키토산의 작용으로 상처의 치유가 완결되고 나면 support는 쉽게 제거할 수 있는데 이러한 support를 이용하는 방법도 세계적으로 많이 연구되고 있다. 비교적 최근에 제시된 방법으로서 키토산 변성유도체를 제조하여 사용하는 방법도 제안된 바 있는데 구체적으로는 키토산에 존재하는 $-NH_2$ 기와 levulinic acid를 서로 반응시켜서 methyl pyrrolidinone chitosan을 제조하여 사용하는 방법, 또는 키토산에 vinylpyrrolidone을 graft시킨 변성키토산의 사용가능성이 제시되고 있다. 지금까지 밝혀진 바에 의하면 methyl pyrrolidinone chitosan은 수용성을 가질 뿐만 아니라 제조된 후에 투석과정을 거치기 때문에 피부에 유해하게 작용할 수 있는 불순물이 전부 제거될 수 있으며 인체적합성 측면에서도 키틴/키토산 자체보다는 월등히 상승되며 필름형성능이 우수하며 lysozyme에 의한 분해속도도 현저히 상승되는 것으로 보고되었다. 키토산에 vinylpyrrolidone을 graft시키는 방법이 methyl pyrrolidinone chitosan을 제조하는 방법보다 유리한 것으로 평가되고 있다. 이들 변성키토산들은 물에 대한 용해성이 발현되기 때문에 우수성이 인정된다. 기존의 키틴이나 키토산은 물에 대한 용해성이 없으므로 성형시 유기용매나 계면활성제가 사용될 수밖에 없는데 최종 생산제품에서 이들 첨가물들의 잔류가 문제시될 수도 있다. 이 변성키토산들은 물에 가용이기 때문에 정제과정이 용이해지며 물을 이용한 성형이 가능하다는 점 등 많은 장점이 제시될 수 있으며 지금까지 알려진 어떠한 키틴, 키토산 변성유도체들보다 인체적합성이 우수하며 통증완화능력, 분해속도, exudate능력이 우수한 것으로 평가되고 있다. 대형상처를 치료하기 위한 wound filling의 제조에서는 키틴/키토산 필름을 분말상으로 분쇄한 다음 항균성을 갖는 치료제, 점증제, 분산제 등을 혼합하여 cream형으로 제조하면 바람직하데 wound filling의 제조에서

는 water soluble chitin의 사용 가능성을 타진하고 있다. Wound healing ointment가 제조되기 위해서는 키틴 분말을 지극히 빠른 속도와 고압으로 작은 직경의 구멍을 통과시켜서 키틴을 부풀린 다음 lyophilize시키고 분쇄하여 석유 jelly나 다른 물질 속에 분산시켜서 제조하는 방법이 알려져 있다.

안과분야에서도 키틴/키토산의 이용이 점점 증가되고 있는 추세인데 contact lens와 접안렌즈에서 가장 중요시하게 받아들여져야 할 특성은 가스의 선택적 투과성이라고 볼 수 있다. 렌즈의 착용 중에도 연속적으로 각막은 산소의 공급을 받아야만 하며 발생된 CO_2 는 밖으로 배출되어야만 하는데 선택적 투과성이 불량한 재질로 제조된 렌즈를 착용하여 각막이 산소결핍 상태에 이르게 됨과 동시에 CO_2 와 대사물질이 축적되면 고통이 수반된다. 키틴/키토산으로 제조된 렌즈는 높은 산소투과력을 지니고 있기 때문에 바람직하며 또한 안구의 상처치료가 매우 우수하여 손상된 안구에 키틴필름을 부착시키거나 키토산 액체를 주입시키면 상처치유가 가속화될 수 있다. 토끼에 대한 임상실험 결과 키토산은 각막의 치료를 촉진시킨다는 결과도 보고되어 있다. 키틴이나 키토산으로 contact lens를 제조하는 경우는 눈물 속에 포함되어 있는 lysozyme에 의해서 용해되는 것을 방지하기 위하여 aldehyde류를 포함하는 가교제로 가교를 시켜야만 하는데 가교도입에 의해서 필름의 물성이 급격히 변해가기 때문에 적절한 정도의 가교가 도입되어야만 하고 이 가교도입의 기술이 렌즈제조 기술의 가장 핵심요소라고 말할 수 있다. 인공렌즈를 안구에 삽입시키는 눈의 외과적 수술에서는 N-carboxyacetyl chitosan 또는 O-carboxyalkyl chitin을 함유하는 유동액이 사용되기도 하며 contact lens 세척액에 키틴을 첨가하기도 한다.

치과용재료로서 사용되는 경우 키틴은 이와 잇몸을 연결시켜주는 결합조직에 대한 재생능력이 매우 크기 때문에 사용이 촉진되고 있으며 정형외과 재료로서는 키틴필름과 키틴 yarn을 집합시킨 tow 또는 rod형태로 사용되고 있는데 키틴은 체내에서 서서히 흡수되어 tensile strength와 elastic modulus를 잃어가기 때문에 인공관절, 인공심장로서의 사용이 유망시되고 있다. 최근 일본에서는 개의 아킬레스건을 절단한 후 키틴 tow를 사용하여 연결시켰을 때 2~3개월만에 완전한 회복이 되었다는 보고도 있다.

1990년대 말 일본정부는 키틴으로부터 제조된 수술용 봉합사의 시판을 허가한 바 있다. 키틴봉합사는 강도가 매우 커서 봉합부위가 완치될 때까지 세포 속에 오랫동안 머물러 있을 수 있으며 서서히 용해되기 때문에 키틴봉합사를 차후에 제거할 필요는 없다. 생체 내에서 흡수되는 여타의 봉합사와 달리 알레르기반응을 일으키지 않으며 비뇨기관이나 창자내의 약alkali 체액 속에서도 안정성이

유지된다. 이제까지 전통적인 봉합사로 봉합된 부위와 비교할 때 키틴봉합사로 봉합된 부위에서는 collagen이 지극히 빠른 속도로 합성된다. 키틴봉합사는 키틴을 amide lithium chloride에 용해시킨 다음 butyl alcohol 용액 속으로 삼출시켜서 수득할 수 있는데 $5\ \mu\text{m}$ 정도의 직경을 갖는 filament를 얻는 것이 가능하다. 제조된 filament의 tensile strength는 대략 $50\ \text{kg/cm}^2$ 정도이다. Filament다발을 우선 꼬아서 따고 난 다음 실제적으로 사용될 수 있는 봉합사가 되도록 표면 coating하고 ethylene oxide로 살균하여 사용한다.

3.2 의약품 원료 및 화장품관련 첨가제로서의 응용

키틴이나 키토산이 의약품으로 인정되기에는 아직 이른 것으로 판단된다. 여러 가지 약리기능이 있는 것으로 보고되고 있는 것이 사실이지만 확실한 임상실험 data가 없고 특히 실험에 사용된 키틴이나 키토산들이 대부분 특정 분자량범위로 조절된 것이 한정적으로 사용되고 있기 때문에 우리가 일반적으로 말하는 키틴, 키토산들이 약리 기능이 있다고 말하는 것은 무리라고 판단된다. 약리 기능이 보고된 예로서는 우선 cholesterol강화제 또는 지방결합제로서의 작용이 보고된 바 있다.

JP 昭54-148090에서는 최초로 키토산이 cholesterol저하기능이 있다고 지적하였다. 키토산의 cholesterol강화작용은 불분명한 점도 있지만 대체적으로 탈아세틸화도가 높아질수록 즉 키토산에 존재하는 $-\text{NH}_2$ group의 함량이 상승될수록 cholesterol의 저해능이 상승되는 것으로 알려져있기 때문에 키토산은 cholesterol이나 담즙산과 일정한 상호작용을 유발하여 그 체내흡수를 저하시키는 것으로 평가되고 있다. 키토산이 cholesterol이나 담즙산과 작용하기 위해서는 용해상태가 필히 유지되어야만 하는데 경구 투여된 키토산은 액성이 산성으로 유지되고 있는 위 속에서는 $-\text{NH}_3^+$ 의 염상태를 유지하면서 용해될 수 있지만 장내에서는 액성이 alkali상태이므로 키토산의 용해성이 저하되고 그 결과 겔화될 수밖에 없다. 장내에서 키토산의 겔화는 cholesterol이나 담즙산에 대한 작용을 소실시키는 것으로 추정되고 있다. 최근의 발표에 의하면 위 속에서 용해된 키토산이 장내에서 겔화되는 것을 방지할 수 있는 유일한 해결책은 키토산의 분자량을 저하시키는 방법이 제시되었으나 어느 단계 이상으로 분자량이 저하되면 cholesterol에 대한 작용이 완전히 사라지는 것으로 보고되었다[M. Sugano, et al., *Lipids*, 23, 187 (1988)]. 분자량이 너무 작아지게 되면 분산성이 낮아지기 때문에 cholesterol이나 담즙산의 흡수저해능이 발현되지 않는 것으로 추정된다. 이러한 분산성에 의한 설명은 우수한 유효능을 보여주고 있는 MCC (micro crystalline chitin)에서도 어느 분자량 한계내에서만 분산성이 발현되고 있다는 사실과 어떤 연관성이 있는 것으로 추정되고 있다.

Cholesterol이나 담즙산의 흡수저해능이 발현되기 위해서는 특정 분자량범위가 만족되어야만 한다는 사실이 명백한데 이러한 현상은 키틴이나 키토산의 약리작용에서 경험하는 공통적인 현상이다. 다른 보고에서는 cholesterol이나 담즙산 흡수저해에서는 키토산분자량 2,000~20,000범위가 만족되는 것이 바람직하다고 지적하고 있다. 몇몇 키틴유도체들은 면역보조제로서 작용할 수 있음이 증명되었는데 20% 탈아세틸화 키틴은 장기간의 면역보조활성이 유지되는 것으로 알려져 있다. 80% carboxymethylated chitin은 치환도가 낮은 carboxymethyl chitin과 함께 단기간의 면역보조활성이 유지된다. Carboxymethyl chitin은 hapten수송체로 작용하면서 Freund's complete adjuvant 존재 하에서 hapten 특이성항체의 생성을 유도한다. Carboxymethyl chitin과 탈아세틸화 키틴은 종양의 성장을 억제시킬 수 있는 것으로 일부 확인되고 있다. 키틴 올리고머와 키토산 올리고머는 단독 또는 기존의 항암제와 혼합되어 종양의 치료에 사용될 수 있는데 이렇게 혼합 투여되면 기존 항암제의 투여량을 감소시킬 수 있어 기존 항암제에 의한 부작용을 현저히 감소시킬 수 있다. Bleomycin이나 cis-platin과 키토산을 혼합함으로써 bleomycin이나 cis-platin의 부작용을 현저히 저하시킬 수 있다는 보고도 접할 수 있다.

EP 240098에서는 PGL, ARX, AIDS, Kawasaki disease 등에 키틴이나 키토산을 포함하는 다당의 사용이 제안된 바 있는데 분자량이 낮은 것이 유리한 것으로 제시하고 있다. Suzuki는 1량체부터 4량체까지의 키틴 올리고머들은 sarcoma 180, Ehrlich carcinoma, leukemia L-120 등의 tumour cell에 효과적으로 작용하였음을 제시하고 있다. 투여량은 0.01~150 mg/kg 범위인데 투여시 키틴이나 키토산의 용해성으로 인하여 많은 제한을 받고 있다. 분자량이 적절히 낮은 키틴, 키토산 올리고머가 투여되는 경우는 수용성이 만족될 수 있는 바 독성이 없고 또 정맥주사가 가능해질 수 있지만 용해성이 우수하고 분자량범위가 요구되는 범위로 만족되는 키틴, 키토산 올리고머의 대량생산이 요원하기 때문에 적용에서 제한을 받을 수밖에 없다. Suzuki 이외의 많은 연구자들에 의해서* 항종양성의 효과가 제시되고 있으나 참고 문헌만을 제시하기로 하고 자세한 내용은 생략하기로 한다.

Biol. Pharm. Bull., **16**(1), 48 (1993).

Drug Des. Discov., **10**(4), 343 (1993).

Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **40**(2), 559 (1992).

Biochem. Biophys. Res Commun., **174**(2), 489 (1991).

J. Biomed. Matter Res., **20**(9), 1359 (1986).

Vaccine, **2**(1), 93 (1984).

Eur. J. Cancer., **12**(11), 877 (1976).

J. Histochem. Cytochem., **21**(1), 173 (1973).

Carbohydr. Res., **29**(1), 173 (1973).

Drug Des. Discov. (GBR), **10**(4), 343 (1993).

J. Natl. Cancer Inst., **47**(2), 377 (1971).

Vaccine (GBR), **11**(6), 670 (1993).

Int. J. Pharm. (NLD), **98**(1~3), 121 (1993).

J. Biocat. Compact. Polym. (USA), **8**(4), 351 (1993).

Chem. Pharm. Bull. (JPN), **40**(2) (1992).

Biotechnol. Bioeng. (USA), **42**(10), 1157 (1993).

Biochem. Biophys. Res. Commun. (USA), **174**(2), 489 (1991).

J. Biocat. Compat. Polym. (USA), **4**(4), 362 (1989).

J. Antibiot. (JPN), **43**(6), 648 (1990).

3.3 식품분야에서의 응용

식품분야에서의 응용은 앞에서 잠시 언급한 바 있지만 주로 일본과 한국에서 응용이 활발하게 전개되고 있으며 미국과 유럽에서는 이 분야에 대한 응용전개가 거의 없다고 보아도 무방하다. 특히 일본과 한국에서는 건강식품으로 선전되고 있다. 많은 가능성이 예측되고 있는 응용분야들 중에서 비교적 응용 가능성이 높게 평가되고 있는 한가지로서는 cholesterol과 담즙산 포획제로서의 가능성이다. 이 분야 응용에서는 적정 분자량이 만족되는 키토산이 절대적으로 요구되고 있다는 것은 주지의 사실이다. Lactose intolerance 현상은 유제품을 소화시키는 능력이 없는 특정인들에게서 나타나는 현상인데 키틴의 유도체인 alkyl-N-acetyl-D-glucosamine glycoside나 chitinase와 함께 키틴을 유제품에 첨가함으로써 해결될 수 있다고 알려져 있으나 아직까지 chitinase가 저렴하게 대량 생산되지 않고 있기 때문에 chitinase의 대량생산이 가능해져야만 lactose intolerance에 대한 활발한 응용이 전개될 수 있을 것으로 기대된다. 식품분야에서 가장 유용하게 사용될 수 있는 microcrystalline chitin(MCC)의 응용을⁵⁷⁻⁶⁵ 꼽을 수 있는데 MCC는 물리적/화학적 방법을 동원하여 키틴의 결정화도와 분자량을 적정수준까지 저하시킨 것으로 분산능이 매우 우수하여 분산제로서의 사용이 기대되고 있으며 MCC는 적정 조리온도에서 가열되면 pyrazine이 형성되는데 이 pyrazine은 식품의 맛과 향미성을 현저히 상승시키는 것으로 알려져 있다. 그러나, MCC는 제조과정 중에 분자구조 내에 인(P)성분을 소량 함유하게 되므로 키틴 자체가 아니고 일종의 키틴유도체로 인식되고 있기 때문에 완전한 식품첨가물로 인정받기 위해서는 안전성에 관한 검증이 이루어져야 할 것으로 판단된다.

MCC는 우수한 분산성과 유화성을 보여주기 때문에 coffee cream에 첨가되고 있는 분산을 촉진시키는 계면활성제 성분을 대체 가능한 것으로 판명되었으나 100% 대체는 불가능하며 50% 이하의 대체는 가능한 것으로 알

려져 있다.⁶⁶ 그러나, MCC의 제조기술이 앞으로 더욱 더 개선된다면 100%의 대체도 가능해지리라 예상되고 있다. 키틴/키토산은 식품에서 필수 불가결한 요소인 섬유질성분을 공급할 수 있으며 동물사료나 인간의 식품에 어느 정도 범위이하에서는 첨가되어도 별 문제가 없음이 판명되었다. 빵을 구울 때 밀가루에 2% 정도 MCC가 첨가되면 비체적을 현저히 상승시킬 수 있다는 사실도 발견되었다. 키틴이 첨가되는 경우에는 체적이 상승되지 않으나 MCC가 첨가되는 경우에는 비체적이 상승되는 것으로 보아 결정화도와 분자량의 크기가 적절하게 조절된 MCC가 훨씬 효과적이라는 사실이 증명되고 있다.

식품산업분야에서 응용이 유망시되고 있는 또 다른 분야는 천연 보존제로서의 역할이다. 키토산자체가 항균력을 지니고 있는 것으로 알려져 있기 때문에 무독성 천연 식품 보존제로서의 응용이 기대되고 있다. 그러나, 모든 키토산이 항균력을 보여줄 수는 없는 것으로 판단되며 어떤 특정 분자량범위를 만족시키도록 분자량이 조절되어야만 항균력이 발현되는 것으로 믿어지고 있다. 기존에 발표된 학술논문이나 기공개된 특허들에 의하면 비교적 분자량이 낮은 키토산들의 항균력이 우수한 것으로 기술되어 있지만, 최근에 실시된 정교한 실험결과에 의하면 키토산의 분자량 자체는 항균력에 큰 영향을 미치지 않으며 단지 $-NH_2$ 기가 항균작용을 일으킬 수 있는 환경조건에 의해서만 좌우될 수도 있다는 가설이 대두되고 있다.

몇몇 연구자들의 최근 실험결과에 의하면 분자량 10,000과 분자량 26,000에 해당하는 키토산을 사용하여 pH 5.5~6.0범위에서 *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranefaciens*, *Hansenula mrakii*, *Torulopsis etchellsii* 등에 대하여 적용시켜 본 결과 분자량 10,000과 분자량 26,000에 해당하는 키토산의 MIC값은 서로 일치하였으며 분자량이 61,000, 89,000정도로 상승되어감에 따라 MIC값도 약간 상승되어간다는 사실이 발견된 바 있다.⁶⁷ *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc plantarum*, *Bacillus subtilis* 등에서는 MIC값이 20~50 ppm범위로서 특히 우수한 항균력이 측정되고 있다. 그러나, 키토산이 보여줄 수 있는 항미생물성을 좌우하는 여러 인자들에 대한 연구가 선행되어야할 것으로 생각되는데 키토산의 분자량의 크기가 항미생물성에 크게 영향을 미칠 수 있다는 기존의 학설은 단지 분자량의 대소에 따라서 미생물과의 접촉상태가 달라질 수 있다는 새로운 가정에 부딪치게 된다. 키토산을 산성수용액으로 용해시켜서 미생물과 접촉

시킬 때 분자량의 크기에 따라서 키토산의 용해성이 광범위하게 변화되고 있는데 특히 pH가 5를 넘어서면 상태에서는 pH 조절과정에서 분자량의 대소에 따라서 용해성이 더욱 확연히 변화하게 되고 미생물과의 접촉상태도 변화될 수 밖에 없다.

단지 지금까지의 연구결과에서 수용되고 있는 사실로서 고분자량의 키토산보다는 저분자량의 키토산이 항균성이 우수하다는 결론은 부정할 수 없으나 고분자량의 키토산보다 저분자량 키토산의 용해성이 우수하며 pH가 7 근처로 변화될 때 고분자량의 키토산에서는 쉽게 겔화가 유발되지만 저분자량 키토산은 겔화에 의해 침전되는 능력이 현저히 낮다는 사실을 감안할 때 겔화가 잘 일어나지 않는 저분자량 키토산이 항균력에서 우수하리라는 것은 당연한 사실로 받아들여질 수도 있다. 그러나, 분자량이 매우 낮은 키토산들은 고분자량 키토산의 분자쇄를 절단하여 저분자화시키는 과정에서 산화제, 환원제 또는 효소에 의하여 $-NH_2$ 기의 함량이 현저히 낮아진 경우는 항균능력이 다소 저하될 수 있다. 분자량이 매우 낮은 키토산들은 항균작용을 보여주는 것이 아니고 반대로 균의 증식을 촉진한다는 결과도 최근 보고된 바 있다.

키토산의 항균작용에 대한 논란은 향후 계속될 것으로 보이며 항균 mechanism에 관한 규명이 이루어져야만 할 것이다. 키토산의 유도체인 N-carboxymethyl chitosan은 구워지지 않은 육류에 대하여 처리하면 냄새의 발산을 억제하며 여러 번의 냉동, 가열이 가해져도 육류의 보존기간을 연장시켜줄 수 있는 것으로 보고되었다.

키토산의 식품분야 응용에서 향후 가장 응용가능성이 크게 점쳐지고 있는 분야는 식품포장과 관련된 분야이다. 식품포장 분야는 크게 2분야로 구분될 수 있는데 하나는 식품의 보존기간을 연장시켜줄 수 있는 포장재 분야이고 다른 하나는 가식성 필름의 제조 분야이다. 과일이나 채소류는 지극히 짧은 시간 내에 부패되어 버리기 때문에 보존기간을 2~3일만 연장시켜 줄 수 있다면 생산자에게는 막대한 이익이 안겨지며 소비자측면에서는 신선한 과일이나 채소를 구입 가능하기 때문에 매우 바람직하다. 키토산으로부터 제조되는 필름은 식품산업에서 요구하고 있는 생분해성과 낮은 산소투과도를 동시에 만족시킨다는 점에서 절대적으로 우세한 장점을 지니고 있다. 키틴이나 키토산 필름은 인장강도, flexibility, 산소투과도, 생분해성을 만족스럽게 충족시키고 있지만 가교제를 사용하여 가교를 도입시키거나 또는 가소제를 약간 첨가하거나, 또는 키토산유도체로 변형시킴으로써 더욱 우수한 물성을 갖는 필름제조가 가능해진다.

이미 US 5015293에서는 키토산필름을 제조하는 공정에서 epichlorohydrin을 첨가하여 가교를 도입시킴으로써 37 μ m의 두께에서 2.7%의 신율, 136 MPa의 인장강도 등 우수한 물성 필름을 제조한 바 있다. 그러나, 이

필름은 epichlorohydrin 등 키토산이외에 이물질이 첨가되었기 때문에 가식성 필름으로 사용되기는 어려울 듯하다. 지금까지 제조된 바 있는 가교가 도입되지 않은 키토산필름들은 PP나 PE에 비해서 낮은 산소투과율을 보여주기는 하나 PP나 PE에 비해서 강도가 낮기 때문에 가교를 도입시키게 되면 PP나 PE와 거의 유사한 강도를 유지시키는 것이 가능하다. 가교가 도입되지 않은 키토산만으로 제조된 필름의 가장 큰 문제점은 습강도가 너무 낮다는 점인데 그 이유는 키토산필름을 제조할 때 키토산을 산성수용액에 용해시켜서 캐스팅한 다음 건조시켜서 필름을 수득하게 되는데 건조된 이 필름은 엄밀히 말해서 키토산 자체로 구성되는 것이 아니고 키토산의 산성염 즉 키토산의 $-NH_2$ 기가 산성염 상태로 변환된 상태이므로 수분과 접촉되면 즉시 용해되어버리기 때문이다. 습강도를 상승시키기 위해서는 $-NH_3^+$ 의 산성염 상태를 파괴시켜서 다시 키토산으로 변환시키면 유리한데 alkali를 사용하여 중화처리 과정을 도입하거나 가교를 도입시키는 방법이 제시될 수 있다. US 5015293에서는 키토산 자체만으로 필름을 제조하는 것 이외에 기존의 PP나 PE 필름 위에 미세분말 키토산을 분산시켜서 표면에 부착시키거나 키토산용액으로 도포하는 방법도 제시되고 있다. PP나 PE를 support로 사용하는 방법은 키토산 자체만으로 필름을 제조하였을 때의 낮은 강도를 보완할 수 있으며 키토산 사용량의 대폭 감소를 가능하게 하여 필름제조 공정이 간편화된다는 점에서 긍정적으로 받아들여질 수도 있으나 생분해성이 만족되지 않는다는 점과 가식성 필름의 제조가 불가능해질 수 있다는 단점도 제시될 수 있다. 필름을 굳이 제조하지 않고도 키토산을 과일이나 채소류에 적용시킬 수 있는 또다른 방법으로서 키토산이 용해된 액체를 채소류나 과일에 coating 분무시키는 방법이 제시될 수 있다. Coating 분무된 키토산 성분은 먹기 직전에 물로 세척하면 쉽게 용해되어 제거될 수 있다. 키토산용액 coating 분무의 또다른 장점으로서 과일이나 채소류 표면에 잔류하고 있는 유해농약성분이나 중금속성분이 키토산에 용이하게 흡착되기 때문에 식품류의 오염을 방지할 수 있다는 점도 제시될 수 있다. 고화된 키토산필름으로 포장할 때보다 액체상태의 키토산용액이 coating되는 과정에서 유해물질의 흡착이 우수한 것은 당연하므로 키토산 coating/분무의 방법은 앞으로 상용화될 가능성이 매우 높다. 키토산의 coating/분무과정에서 해결되어야 할 문제점으로서 키토산용액의 제조가 엄밀히 검토되어야 한다. 키토산용액 제조에 사용되는 키토산의 분자량이 적절히 조절되어야만 용액의 제조가 간편해질 뿐만 아니라 용액의 점도도 적정수준을 유지해야만 과일이나 채소류에의 분무/coating이 가능해지기 때문이다. 분자량이 너무 큰 키토산이 사용되면 용해성이 낮아서 키토산용액을 제조하기 어려우며 용액이 제조되

었다 할지라도 분무/coating이 제대로 수행될 수 없으며 키토산의 분자량이 너무 낮은 것이 사용되면 용액의 제조와 분무는 용이해지나 coating능력이 급격히 저하되어 바람직하지 않다. 특히 사과와 같은 과일류의 표면은 비친수성의 wax성분을 다량 함유하고 있기 때문에 키토산 용액의 점도가 너무 낮으면 분무한 후에 흘러내려버리기 때문에 coating이 불가능해지게 된다. 키토산 자체로 필름을 제조하지 않고 식품이나 과일, 채소류의 포장에서 유용하게 사용될 수 있도록 고안된 것이 N, O-carboxymethyl chitosan(NOCC)의 사용이다.

NOCC는 키토산과 monochloroacetic acid를 서로 반응시킴으로써 제조될 수 있는데 키토산 내부에 존재하고 있는 $-CH_2OH$ 기와 $-NH_2$ 가 chloroacetic acid와 반응함으로써 $-CH_2OCH_2COO^-Na^+$, $-NHCH_2COO^-Na^+$ 형태로 변환됨으로써 수용성이 발현될 뿐만 아니라 지극히 우수한 필름형성능이 부여되기 때문에 키토산 자체가 보여주는 여러 물성이 상당히 보완될 수 있다. 우선 중성의 물에 대하여 용해성을 갖기 때문에 산성수용액에서만 용해될 수 있는 키토산의 용해성 한계를 극복할 수 있으며 키토산보다 용해되었을 때 점도가 매우 커서 소량 사용이 가능하며 필름형성능도 월등히 우수하다. 또한 NOCC는 키토산 필름보다도 우수한 산소와 CO_2 에 대한 선택적 투과성을 보여주기 때문에 식품의 보존기간을 월등히 오래 지속시켜주는 것으로 알려져 있다. 그러나, NOCC를 사용하는 가식성 필름의 제조에서는 NOCC가 키토산 유도체라는 점때문에 인체에 대한 안전성이 완전히 검토된 후에야 가능해질 것으로 보인다. 미국의 Hazelton연구소 연구결과에 의하면 쥐에 대한 생체실험 결과 사료에 5% 정도 첨가되었을 때 무독함이 증명되었다고 하나 키토산 자체에 비한다면 안전성에서 뒤지는 것만은 사실인 듯하다. 캐나다에서는 먹기 전에 물로 세척하여 제거하거나 껍질을 깎아먹는 과일류에 대해서는 사용이 허가된 바 있다. NOCC의 제조에서는 해결되어야 할 많은 문제점이 제시될 수 있는데 NOCC제조에 사용되는 출발 키토산의 품위에 따라서 그 제조조건이 차별화 되어야만 하며 수득되는 NOCC도 출발 키토산에 따라서 많은 차이점을 보여주고 있다. 키토산과 chloroacetic acid를 서로 반응시켜서 NOCC를 제조할 때 그 반응계는 불균일 반응계가 형성될 수밖에 없는데 isopropanol속에서 키토산을 팽윤시킨 다음 chloroacetic acid를 첨가함으로써 carboxymethylation 반응을 진행시키게 된다. 불균일 반응계이기 때문에 키토산의 팽윤성과 분자량의 크기, 탈아세틸화도 등에 의해서 반응의 양상이 광범위하게 변화되고 있다. NOCC로부터 제조되는 필름의 강도를 상승시키기 위해서는 높은 점도를 보여줄 수 있는 NOCC가 수득되어야만 하는데 이를 충족시키기 위해서는 결정화도와 분자량이 높은 계합각 유래 키토산이 출발원료로 사용되는 것이 바람직하지만

isopropanol에 의한 키토산의 팽윤성이 저하되고 carboxymethylation 고분자반응이 원활하지 않게 되어 carboxymethyl기의 치환도를 어느 한계 이상으로 상승 시키기가 어려워지며 키토산 입자표면과 내부에서 carboxymethylation 정도의 차이가 발생되기 때문에 결과적으로 NOCC를 물에 용해시켰을 때 불용성분의 함량이 커지게 된다. NOCC 필름을 제조하는 경우 불용성분의 다량 함유는 필름의 제조를 불가능하게 하기 때문에 불용성분의 함량은 NOCC제조에서 조절되어야만 하는 가장 중요한 요소이다. 결정화도가 낮고 분자량이 낮은 새우갑각 유래 키토산을 NOCC제조에 사용하는 방법도 고려될 수 있는데 이 경우에는 carboxymethylation 고분자반응은 상당한 정도로 촉진될 수 있지만 carboxymethyl기의 치환율이 어느 한계 이상으로 상승되면 생성되는 NOCC가 반응계 내에서 입자상태를 잃어버리고 용해되어버리기 때문에 수득되는 NOCC의 회수가 불가능하게 된다. 용해된 NOCC를 비용매속에서 재침전시켜서 NOCC를 수득할 수 있는 방법도 고려될 수 있으나 대량생산에서는 불가능한 방법임이 틀림없다. 결국 NOCC제조에서 해결되어야 할 가장 중요한 문제점은 carboxymethyl기의 치환도를 상승시켜서 불용성분의 함량을 최소화시키면서도 NOCC의 회수과정에서 NOCC의 입자상태를 그대로 유지시켜서 회수가 용이해지도록 반응계를 조절하는 것이라고 볼 수 있다. 앞의 문제점을 해결하기 위해서는 출발 키토산을 엄밀하게 판정하여 선택, 사용할 필요가 있으며 carboxymethyl기의 치환도를 적절히 조절하는 것이 필요하다.

US 461995에서는 수득되는 NOCC의 반응계내에서의 용해를 방지하고 입자상태로 회수하기 위하여 carboxymethyl기의 치환도를 1.0이하로 조절하기 위하여 탈아세틸화도가 낮은 키토산을 별도로 제조하여 사용한 예도 발견되고 있다. 식품산업 분야에서 키틴/키토산의 사용이 기대될 수 있는 또다른 분야는 biomass 회수분야이다. 키토산은 식품폐수 중에 포함되어 있는 단백질의 회수능력이 우수하기 때문에 단백질회수에 유용하게 적용될 수 있을 것으로 기대된다. 회수된 단백질은 품위가 낮기 때문에 사람이 먹을 수는 없으나 사료첨가물로 이용될 수

있으며 단백질과 키토산이 서로 섞여있는 상태이므로 키틴산/단백질 복합사료의 제조가 용이해진다고 볼 수 있다. 단백질회수의 구체적인 방법으로는 1% 농도 미만의 키토산 수용액을 폐수에 가함으로써 단백질을 응결시키는 방법이 시도되고 있다.

참 고 문 헌

1. JP 昭45-13599.
2. JP 昭59-52503.
3. SU 1035056.
4. JP 昭58-29801.
5. JP 昭58-58200.
6. JP 昭57-135099.
7. SU 783329.
8. JP 昭51-60677.
9. JP 昭49-28115.
10. JP 昭47-1633.
11. US 4609470.
12. US 3862122.
13. IT 1213615.
14. JP 昭59-160509.
15. SU 802290.
16. JP 昭55-12109.
17. US 4195175.
18. SU 730695.
19. JP 昭53-59700.
20. JP 昭51-6720.
21. JP 昭51-31788.
22. DE 2222733.
23. JP 昭48-19213.
24. JP 昭48-43429.
25. JP 昭55-141171.
26. JP 昭52-38108.
27. US 3833744.
28. JP 昭63-294761.
29. JP 平2-257829.
30. JP 平3-280852.
31. JP 平3-285634.
32. JP 平3-290170.
33. JP 平4-11856.
34. US 4309534.
35. US 4363801.
36. JP 昭56-94322.
37. JP 昭54-148090.
38. US 4223023.
39. JP 昭53-136584.
40. US 4167447.
41. JP 平3-262531.
42. JP 平4-1139.
43. JP 平6-205687.
44. JP 平7-31387.
45. EP 673425.
46. JP 平6-277504.
47. S. Hirano, "Functionality of Chitosan and Its Products", Symposium on Health Foods, 1997.
48. JP 平4-243993.
49. JP 平3-198702.
50. JP 昭63-297305.
51. US 4886541.
52. EP 328540.
53. JP 昭63-33310.
54. JP 平5-65368.
55. JP 平5-213686.
56. JP 平4-243993.
57. US 5100655.
58. US 5089278.
59. US 4948881.
60. US 4632131.
61. US 4625737.
62. US 4532321.
63. US 4034121.
65. US 4286087.
66. Unpublished Data.
67. Unpublished Data.