

키토산의 색소 Toluidine Blue O에 대한 흡착 특성

박노동^{1*} · 조유영¹ · 김광윤² · 범희승² · 오창석² · 이현철²

¹전남대학교 농과대학, ²전남대학교 의과대학

초록: 자연계에 풍부한 천연고분자물질인 키토산을 탈아세틸화하여 얻어지는 키토산을 색소의 흡착제로 이용하고자, 색소 Toluidine Blue O(TBO)에 대한 키토산의 흡착 특성을 연구하였다. 키토산과 TBO의 흡착반응에는 키토산 입경, 키토산의 양, TBO의 초기 농도, 반응액의 pH, 반응시간 등이 중요한 인자로 작용하는 것으로 밝혀졌다(1995년 7월 15일 접수, 1995년 10월 6일 수리).

서 론

키토산은 poly-β-(1 → 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose의 구조를 가진, 자연계에 셀룰로스 다음으로 풍부하게 분포하는 천연고분자물질이며, 이를 화학적으로 탈아세틸화시킨 것이 곧 키토산이다.¹⁻³⁾ 키토산은 무독성이며 생분해성인 선형 polyamine으로서 전하 밀도가 높은 polyelectrolyte이며, 반응성이 강한 아미노기와 히드록시기를 가지고 있다.³⁾ 이들은 분말, 용액, 섬유, 필름 등 다양한 물성의 소재로 이용 가능한 성질을 가지고 있으며, 현재 금속이온과 고분자물질의 응집제, 화장품, 의약품, 분리막, 고정화효소의 지지체 등의 소재로 사용되고 있다.⁴⁾

키토산/키토산과 색소와의 흡착에 관한 연구는 Giles 등에 의하여 최초로 이루어졌으며,^{5,6)} 흡착된 색소의 양은 pH 의존적이었다. 키토산/키토산 흡착제-색소의 흡착은 키토산의 탈아세틸화도, 흡착제와 색소의 화학구조에 따라서 이온결합, van der Waal's force, 수소결합, 소수성 상호작용 등의 힘이 작용하는 것으로 보인다.⁷⁾

본 연구에서는 키토산/키토산을 이용하여 염료공장에서 폐기되는 색소를 흡착하여 폐수를 정화하고 또 색소를 회수하고자 하는 목적으로 비단 등의 염색에 사용되는 Toluidine Blue O를 염료로 사용하여 키토산과의 흡착 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

키토산 및 키토산

계 키토산 (평균 분자량 170만, 탈아세틸화도 13%, 단백질 함량 0.1% 이하)과 키토산(평균 분자량 80만, 탈아세틸화도 90%)은 (주)금호화학 (서울)에서 구입하여 사용하였다.

갑오징어 키토산과 키토산은 전남 해남지방에서 수집한 갑오징어의 널을 재료로 하여 Hackman의 방법에⁸⁾ 따라 조제하였으며, 재생키토산은 Molano 등의 방법에⁹⁾ 따라

조제하였다.

본 실험에 사용된 키토산과 키토산 등의 시료는 따로 언급이 없는한 850~600 μm 1.1%, 600~425 μm 3.3%, 425~300 μm 16.6%, 300~150 μm 79.0%의 입경 분포를 가졌으며 수분 함량은 0.5% 이하였다.

색소

본 실험에 주로 사용된 색소는 미국 Sigma사에서 구입한 Toluidine blue O (3-Amino-7-(dimethylamino)-2-methylpheno-thiazin-5-ium Chloride, color index CI 520 40, TBO)였으며, 그리고 Methyl Green (CI 42590)과 Coomassie Brilliant Blue R250 (CI 42660, CBB-R250)도 사용하였다.

색소 TBO의 흡착 및 정량법

흡착제에 대한 색소 TBO의 흡착실험은 별도의 언급이 없는한 다음과 같이 실시하였다. 즉, 키토산 500 mg을 시험관에 넣고 0.005% TBO 용액 5 mL씩을 가하고 실온에서 3분간 진탕한 다음 원심분리하여(10,000 rpm, 3 min) 상등액의 흡광도를 측정하여 미흡착된 색소의 양을 측정하고, 시험관에 가한 색소의 총량에서 이를 감하여 흡착된 TBO의 양을 계산하였다.

TBO의 정량은 흡광분광광도계 (UV/Visible Absorption Spectrophotometer, Shimadzu Model 1201)를 사용하여 파장 624 nm에서 흡광도를 측정하고 미리 작성한 TBO의 표준곡선에서 그 농도를 읽었다. 이 표준곡선은 0~0.003% TBO 농도 범위에서 직선관계를 유지하였다.

결과 및 고찰

색소 TBO의 농도의 영향

키토산 500 mg에 여러 농도의 TBO용액 5 mL씩을 가한 다음 그 흡착률을 조사하여 TBO의 농도가 흡착에 미치는 영향을 알아보았다. Fig. 1에서 보인 바와 같이 0.001~0.02% 범위에서 60~75%의 흡착율을 보였으며,

찾는말: 키토산, 키토산, Toluidine blue O, 흡착

*연락처

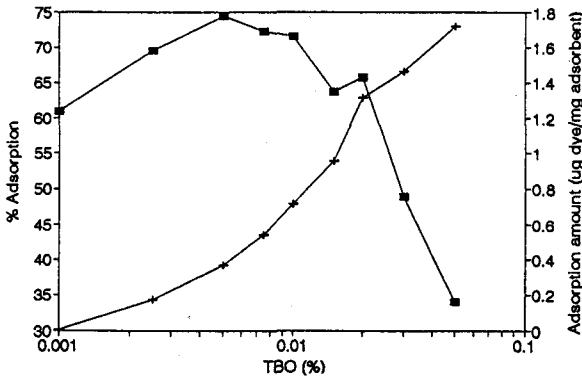


Fig. 1. Effect of Toluidine Blue O concentration on the dye adsorption onto chitosan. Chitosan 500 mg was added into 5 ml of various concentration of TBO, mixed for 3 minutes, and measured the unadsorbed amount of dye at 624 nm. ■-■, % adsorption; +-+, adsorption amount.

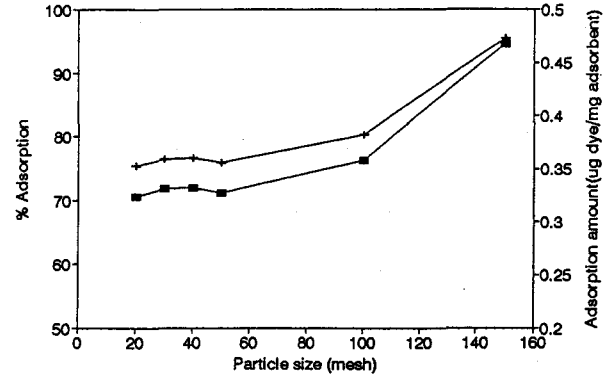


Fig. 3. Effect of particle size of chitosan on Toluidine Blue O adsorption. Five ml of 0.005% TBO solution was added to 500 mg chitosan of various particle size and mixed for 3 minutes. ■-■, % adsorption; +-+, adsorption amount.

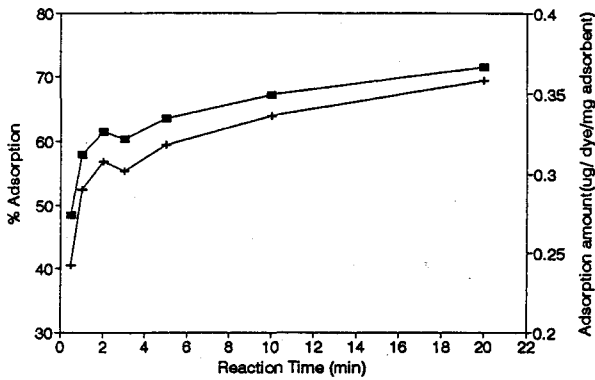


Fig. 2. Effect of reaction time on Toluidine Blue O adsorption onto chitosan. Chitosan 500 mg was added into 5 ml of 0.005% TBO solution and mixed for various duration. ■-■, % adsorption; +-+, adsorption amount.

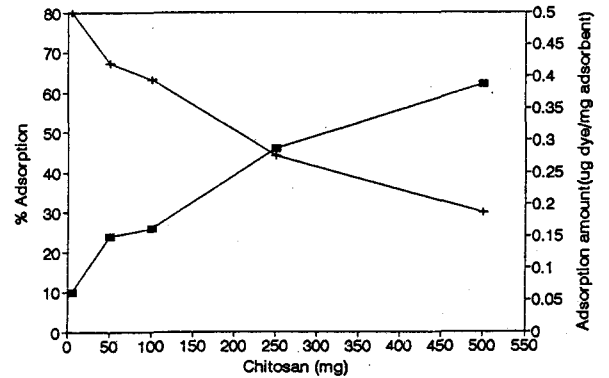


Fig. 4. Effect of the amount of chitosan on Toluidine Blue O adsorption. Various amount of chitosan was added into 5 ml of 0.003% TBO solution. ■-■, % adsorption; +-+, adsorption amount.

0.02% 이상에서는 흡착율이 급격히 감소하였다. 그러나 키토산 단위 무게당 흡착된 색소의 양은 TBO의 농도가 증가함에 따라 최고 1.72 $\mu\text{g}/\text{mg}$ chitosan까지 증가하였다. 이것은 키토산과 키틴의 색소 흡착능이 색소의 농도가 증가함에 따라 증가하였다는 Knorr 등의 보고와¹⁰⁾ 일치하는 것이다. 한편, 이는 키토산을 이용하여 용액중의 색소를 제거하고자 할 경우 희석하기 전 진한 용액 상태에서 키토산을 가하면 적은 양의 흡착제를 가하여서 보다 효율적으로 색소를 제거할 수 있음을 의미하는 것이다.

반응시간의 영향

Seo 등은 키토산과 methyl orange와의 흡착평형에 4 일간이 소요된다고 하였다.¹¹⁾ 색소와 흡착제 사이에 충분한 반응 기회를 제공한다면 흡착량은 증가할 것으로 예상되지만 실용적 측면에서 적절한 반응시간을 결정할 필요가 있다. Fig. 2에 보인 바와 같이 키토산과 TBO 사이의 흡착반응은 초기 신속한 반응과 후기 느린 반

응의 2 phase로 일어나며, 초기 아주 신속히 일어나는 3분 동안에 반응이 거의 완료되었으며, 그 후에는 아주 느리게 진행되었다. 그러므로 이후의 실험에서는 3분간의 진탕으로 반응을 종결시켰다.

키토산의 수분 함량의 영향

색소 TBO의 흡착은 시험한 키토산의 수분함량 0~25% 범위에서 수분함량의 영향을 거의 받지 않았다(미발표 자료, data not shown).

키토산의 입자 크기의 영향

키토산의 입자 크기가 색소 TBO의 흡착에 미치는 영향을 조사하고자 키토산 분말을 입자의 크기별로 분별한 다음 키토산 입경별 TBO의 흡착율을 측정하였다. Fig. 3에 나타낸대로 20~50 mesh 사이의 입경의 범위에서는 TBO의 흡착율이 거의 변화가 없었으나, 전체적으로 보면 입자의 크기가 작을수록 흡착율이 증가하여 입경 100 μm (150 mesh) 이하의 키토산의 경우 94.6%의 흡착율을 보였다. 이는 입경이 작을수록 단위면적당 흡

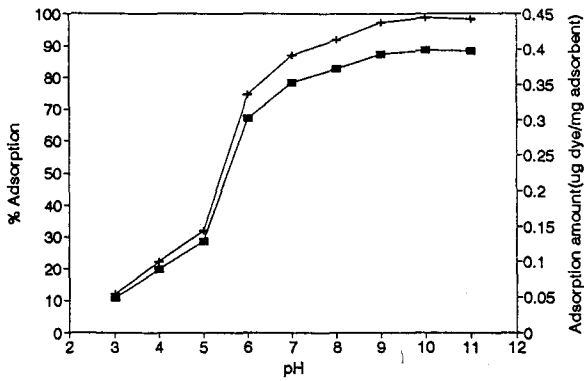


Fig. 5. Effect of pH on Toluidine Blue O adsorption to chitosan. Chitosan 500 mg was added into 5 ml of 0.005% TBO solutions which were dissolved in 0.1 M glycine-HCl buffer (pH 3.0), 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4-5), 0.1 M phosphate buffer (pH 6-8), and 0.1 M glycine-NaOH buffer (pH 9-11). ■—■, % adsorption; +—+, adsorption amount.

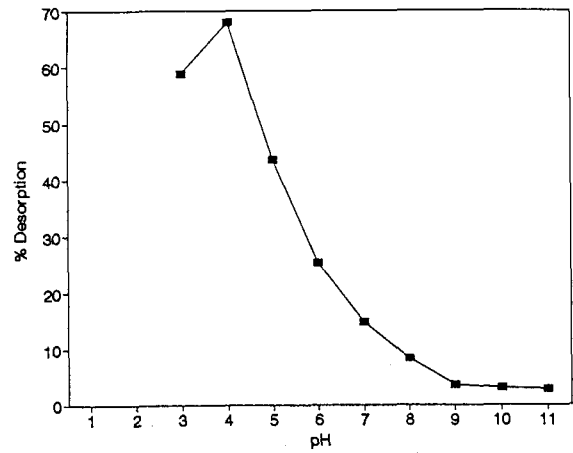


Fig. 6. Effect of pH on the dye desorption from chitosan-Toluidine Blue O complex. Chitosan 500 mg was mixed with 5 ml of 0.005% TBO solution for 3 minutes, centrifuged and supernatant was removed. TBO was desorbed from chitosan-TBO complex by adding 5 ml of the appropriate buffer solution described in Fig. 5.

착 면적이 증가하기 때문으로 보인다. 키토산 단위 무게당 TBO의 흡착량도 입경이 작을수록 증가하였다.

McKay 등은¹²⁾ 색소 Acid Blue 25, Acid Blue 158, Mor-dant Yellow 5의 흡착에 키토산의 입자 크기는 영향을 거의 미치지 않았으나, 분자량이 큰 Direct Red 84의 흡착은 입경이 작을수록 더 많이 흡착하였다고 보고한 바 있다. 이들은 키토산/키토산 입자 내부로의 색소의 확산 침투 능력을 색소 흡착에 중요한 인자로 간주하였다.

키토산 양의 영향

시험관에 0.003% TBO 5 mL를 가하고 키토산의 양을 5~500 mg을 가하여 키토산의 양에 따른 색소의 흡착율을 평가하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 키토산의 양이 증가함에 따라 색소의 흡착율은 증가하였다 (Fig. 4). 이는 키토산의 양의 증가로 색소에 대한 흡착 면적이 증가한 때문으로 보인다. 이때 키토산 단위 무게당 TBO의 흡착량은 키토산의 양이 증가함에 따라 점점 감소하였다. 동일한 조건에서 대조로 시험한 500 mg의 활성탄은 95% 흡착율을 나타냈다.

반응액의 pH의 영향

반응액의 pH는 키토산과 색소 TBO의 흡착에 상당한 영향을 미칠 것으로 예상된다. 색소 TBO를 여러 pH의 완충용액에 녹이고, 먼저 이 실험 pH 범위에서 TBO의 색깔 변화 유무를 흡광도를 측정하여 조사하였던 바, 흡광도의 변화가 거의 관찰되지 않음을 확인하였다. 여기에 일정량(500 mg)의 키토산을 가하여 진탕시켜 반응시킨 다음 흡착율을 측정하였다. Fig. 5에 보인 바와 같이 색소 TBO는 알칼리 조건에서 키토산에 보다 많이 흡착되었으며, pH 10까지 그 흡착율이 증가하였다. pH 10에서의 TBO 흡착량은 pH 3에서의 그것에 비하여 8.2 배나 높았다.

이는 색소나 키토산이 반응액의 pH에 따라 그 하전

밀도가 영향을 받는데 기인한 것으로 여겨졌다. TBO는 중성 pH에서 +1가의 하전을 갖지만 용액의 pH가 알칼리성으로 기울어지면 어떤 pH 이상에서는 중성을 띠게 된다. 한편 키토산의 아미노기의 pKa값은 약 6.3 범위로 추정되므로,¹¹⁾ 이 pH 이상에서는 전하를 갖지 않게 된다. 본 실험결과는 반응용액의 pH 변화가 리간드와 흡착제의 하전에 변화를 초래하여 흡착제-리간드의 상호결합에 영향을 미칠 수 있음을 시사하였다. 키토산-색소 TBO의 결합은 알칼리 조건에서 정전기적 인력 보다는 소수성 상호작용, van der Waals' force, 수소결합 등의 힘이 더 중요해 보인다. Giles 등은^{5,6)} Sulfonated azo dyes와 키토산과의 흡착이 pH가 증가함에 따라 감소하는 것을 밝힌 바 있다.

흡착제-색소 흡착반응의 pH 의존성을 이용하여 일단 키토산에 흡착된 색소를 탈착 회수할 수 있었다. Fig. 6은 키토산에 먼저 TBO를 흡착시킨 다음 상등액을 제거하고 여기에 pH가 다른 일정량의 완충액을 가하여 탈착된 색소를 정량한 결과인데, 탈착용액의 pH가 산성으로 기울어질수록 색소의 탈착이 촉진되어 pH 4에서 최대 탈착효율을 보였다. 이 탈착 특성은 키토산-TBO 흡착이 알칼리성 조건에서 보다 잘 일어났던 흡착특성을 그대로 반영하는 것이었다. 이때 pH 4에서 보다 pH 3에서 더 낮은 탈착율을 보인 것은 용액의 pH가 4 이하로 낮아지면 키토산의 물성이 변하여 부분적으로 용해되어 젤 형태로 된 탓에서 기인하는 것으로 보인다.

키토산 유래 흡착제의 색소 흡착 효율 비교

색소 0.005% TBO용액, 0.005% CBBR-250 또는 0.01% Methyl Green 5 mL에 게에서 유래한 키토산과 키토산, 감오징어 넬에서 유래한 넬가루, 탈회분말, 키토산, 키토산 500 mg을 각각 가하여 반응시킨 다음 각 흡착제에 흡착된 각 색소의 양을 정량 비교하였다 (Table 1).

Table 1. Adsorption of Toluidine Blue O, CBBR-250 and Methyl Green to chitin and chitosan from crab shell and squid pen

Source	% Adsorption		
	TBO	CBB-R250	Methyl Green
Red crab chitin	91.1	87.6	76.7
Red crab chitosan	71.9	99.6	81.0
Squid pen powder	83.7	86.0	90.8
Demineralized squid pen	88.3	98.8	88.3
Squid pen chitin	68.6	79.6	66.8
Squid pen chitosan	93.2	98.2	98.5

Five hundred mg of chitin or chitosan was added into 5 ml of dye solution containing 0.005% TBO, 0.005% CBB-R250, or 0.01% Methyl Green.

Table 2. Comparison between batch and elution methods in % adsorption to chitosan of TBO

TBO solution added (mL)	% Adsorption	
	Batch method	Elution method
2.5	88.2	90.6
5	77.9	82.9
10	79.8	78.2
15	76.6	76.9
20	74.8	76.8
25	74.0	75.0
30	79.4	74.7
50	72.5	72.9

0.01% TBO was adsorbed to 250 mg chitosan in flask for batchwise or 1 cm column for elution test.

흡착제-색소의 흡착은 각 색소의 성질과 흡착제의 종류에 따라 다소 차이를 보였다. 갑오징어 널 키토산이 다른 흡착제에 비하여 가장 높은 흡착율을 보였으나, 널 키토산은 그 흡착율이 비교적 낮았다.

놀랍게도, 갑오징어 널가루의 TBO 흡착율은 83.7%로서 예상보다 상당히 높은 흡착율을 나타냈다. 이는 계로부터 추출한 키토산이나 키토산에 비해 결코 뒤지지 않는 양질의 흡착제로 평가되었다. 따라서 갑오징어 널가루는 다른 정제과정을 거치지 않더라도 그 자체로서 염색 색소의 종류에 따라 염색폐수 정화에 직접 이용 가능할 수도 있을 것으로 보였다.

흡착 처리 방법에 따른 TBO의 흡착

흡착제 키토산에 색소 TBO를 흡착시키는 방법의 효율과 키토산 단위무게당 처리할 수 있는 일정 농도 색소용액의 부피를 알아보고자, 키토산 250 mg을 삼각플라스크에 가하고 소정의 색소용액(0.01% TBO)을 가하여 흡착시키는 회분식 방법과, 직경 1 cm의 유리대롱에 같은 양의 키토산을 가하고 소정의 색소용액을 가하여 유출시키는 유출식 방법을 채용하여 흡착율을 측정 비교하였다.(Table 2).

Table 2에서 보는 바와 같이 키토산의 TBO흡착은 흡착방법에 영향을 받지 않았으며, 회분식이나 유출식 모두 키토산 250 mg당 50 mL의 0.01% TBO 용액을 72% 이상의 효율로 흡착하였다. 이는 키토산 kg당 TBO 14 g (47 mmol)을 흡착한 셈이며, 이는 Giles와 Hassan이 보고한⁵⁾ 중성 pH에서 키토산 kg당 Congo Red 47 mmol의 흡착량과 유사한 값이다. 그러나 붉은대게 키토산에서 조제한 키토산이 CBB-R250을 0.832 mg/g chitosan (~1 mmol/kg) 흡착하였다는 변 등의 보고와는¹³⁾ 상이한 것이다.

이상의 결과를 종합하건대, 키토산은 색소 TBO의 효율적 흡착제로 판단되었으며, 이 흡착반응에는 키토산의 입경, TBO의 초기 농도, 반응용액의 pH 등이 중요한 인자로 작용하는 것으로 보였다.

참 고 문 헌

1. Roberts, G. A. F. (1992) in Chitin Chemistry, McMillan, London, pp1-53.
2. Muzzarelli, R. (1977) in Chitin, Pergamon Press, Oxford, pp87-154.
3. Hirano, S. (1989) Production and application of chitin and chitosan in Japan, in Chitin and Chitosan, ed. by G. Skjak-Braek, T. Anthonsen and P. Sandford, pp37-43, Elsevier Applied Science, London.
4. 일본 키토산 키토산 연구회 (1990) 키토산 키토산의 응용, 기보당출판, 동경, 일본.
5. Giles, C. H. and Hassan, A. S. A. (1958) Adsorption at organic surfaces. 5. A study of the adsorption of dyes and other organic solutes by cellulose and chitin. *J. Soc. Dyers Color.* **74**, 846-857.
6. Giles, C. H., Hassan, A. S. A., and Subramania, R. V. R. (1958) Adsorption at organic surfaces. 4. Adsorption of sulfonated azo dyes by chitin from aqueous solution. *J. Soc. Dyers Color.* **74**, 682-688.
7. Roberts, G. A. F. (1992) in Chitin Chemistry, McMillan, London, pp229-238.
8. Hackman, R. H. (1954) Chitin I. Enzymatic degradation of chitin and chitin esters. *Austr. J. Biol. Sci.* **7**, 168-178.
9. Molano, J. A., A. Duran, and E. Cabib (1977) A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Anal. Biochem.* **83**, 648-656.
10. Knorr, D. (1983) Dye binding properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.* **48**, 36-41.
11. Seo, T., T. Kanbara, and T. Iijima (1988) Sorption of Methyl orange by chitosan gels having hydrophobic groups. *J. Appl. Pol. Sci.* **36**, 1443-1451.
12. McKay, G., H. S. Blair and J. R. Gardner (1987) Two resistance mass transport model for the adsorption of Acid dye onto chitin in fixed beds. *J. Appl. Pol. Sci.* **33**, 1249-1257.
13. 변희국, 강옥주, 김세권 (1992) 키토산 및 키토산 유도체의 합성과 그 물리화학적 특성. *한국농화학회지* **35**, 265-271.

Adsorption of Toluidine Blue O onto Chitosan

Ro-Dong Park^{1*}, Yoo-Young Cho¹, Kwang-Yoon Kim², Hee-Seung Bom², Chang-Seok Oh² and Hyun-Chul Lee² (¹College of Agriculture and ²Medical School, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, South Korea)

Abstract : Chitosan, a deacetylated polymer of chitin, was applied and characterized as an adsorbent for a dye Toluidine Blue O. The adsorption of Toluidine Blue O by chitosan was affected by the particle size and mass of chitosan, initial dye concentration, reaction time, and solution pH. More dye was adsorbed the smaller the chitosan particles. When initial ratio of dye to chitosan was over 1:500, the adsorption of dye was rapidly declined. Adsorption rate of dye to chitosan showed 2 phases, rapidly occurred one at the beginning within 3 min and thereafter very slowly occurred one. The amount of dye adsorbed was increased with increase in pH.

*Corresponding author