

5種의 海産 甲殼類殼皮에서의 Chitin 및 蛋白質含量에 관한 研究

李美淑·徐貞淑*·牟壽美**

韓南大學校 食品營養學科 · *嶺南大學校 食品營養學科 · **서울大學校 食品營養學科
(1984년 6월 12일 접수)

A Study on the Chitin and Protein Contents in Shells of 5 Marine Crustaceans

Mee-Sook Lee, Jung-Sook Seo* and Su-Mi Mo**

Department of Food and Nutrition, Han Nam University, *Department of Food and Nutrition,
Yeung Nam University, **Department of Food and Nutrition, Seoul National University

(Received June 12, 1984)

Abstract

The dried pure shells deprived of soft tissues were subjected to analysis of chitin-protein complexes from 5 species of marine crustaceans, including 2 species of crabs and 3 species of shrimps.

The protein fractions were obtained from chitin-protein complexes under the varying conditions of extractions and the crude chitin was prepared from the shells by the sulfurous acid process.

The crude chitin was purified through the extraction with several organic solvents such as dimethylacetamide, N-methylpyrrolidone.

The purified chitin was also examined using the phase contrast microscope.

Total protein contents of the shells were diverse, showing 9.6% for *Portunus trituberculatus*, 3.1%, *Charybdis bimaculata*, 9.4%, *Penaeus japonicus*, 10.9%, *Metapenaeus intermedius* and 5.8%, *Squilla oratoria*. Covalently bound protein varied with species from 2.1% for *Charybdis bimaculata* to 9.9% for *Metapenaeus intermedius*. The purified chitin contents of the shells were shown to 21.1% for *Portunus trituberculatus*, 6.2%, *Charybdis bimaculata*, 20.2%, *Penaeus japonicus*, 27.1%, *Metapenaeus intermedius* and 25.5%, *Squilla oratoria*. Exceptionally low analytical value obtained with *Charybdis bimaculata* are supposed to be due to the very young subjects.

The ratios of chitin to covalently bound protein in the shells were various such as 2.7 to 1 for *Portunus trituberculatus*, *Penaeus japonicus* and *Metapenaeus intermedius*, 3.1 to 1, *Charybdis bimaculata* and 6.1 to 1, *Squilla oratoria*.

The microscope finding of the purified chitin showed the filamentous form in all the specimen.

序 論

Chitin은 自然界에 널리 分布되어 있는 polysaccharide의 한 種類로서 그 構造는 poly- β -(1 \rightarrow 4)-N-acetyl-D-glucosamine으로 표시되며¹⁻⁴⁾ 蛋白質과 結合하여 glycoprotein 상태로 存在한다⁵⁾. 이러한 chitin은 특히 海洋의 無脊椎動物, 昆蟲類, 곰팡이류, 효모 등에 다량 存在하여^{2,6)} 그 형태를 유지시켜 주는 역할을 하고 있다.

최근에 이르러 이러한 chitin의 抽出溶媒⁷⁾, 物理的性質과 같은 基本的인 研究에서부터 chitin의 分離⁸⁾, chitin의 定量方法^{3,6,9)}, 消化率¹⁰⁾, 營養的 價値^{10,11)} 등에 대한 研究가 試圖되었고 현재 美國, 日本 等에서는 chitin을 대량 生産하여 여러 方面에 利用하고 있다. 이와 같이 chitin의 利用에 관한 범위가 넓어지면서 chitin이 外科用的 縫合絲²⁾, 抗生劑²⁾를 만드는 데도 쓰이며 傷處治癒를 증진시키고¹²⁾ bifidobacteria의 成長을 촉진시켜 젖당의 消化를 돕는다는 등^{2,13,14)}의 다양한 報告들이 발표되었다.

그러나 여러가지 生物로부터 抽出된 chitin은 각각 그 性質에 차이가 있고 이의 利用에 있어서도 그 特性이 조금씩 다르므로 實際的 利用度에 관하여는 아직 더 많은 研究가 요구되고 있는 실정이다. 따라서 本研究者들은 海洋의 無脊椎動物 中 甲殼類에 속하는 꽃게(*Portunus trituberculatus*), 두점박이꽃게(*Charybdis bimaculata*), 보리새우(*Penaeus japonicus*), 홍새우(*Metapenaeus intermedius*), 바다가재(*Squilla oratoria*) 등 5種을 택하여 현재 거의 廢棄狀態에 있는 이들 節肢의 營養學的 效果를 研究하여 食品工業에 利用하기 위한 一連의 研究를 계획한 바 本研究에서는 이를 위한 基礎資料로서 이들 節肢의 chitin-protein 結合狀態 및 程度와 chitin 含量을 測定하였고 또한 抽出된 chitin을 현미경으로 觀察하여 이를 比較檢討하였다.

材料 및 方法

1. 材 料

本實驗에 使用된 材料는 1983年 5月 初에 釜山 수산시장에서 구입한 무게가 180 \pm 10 g 되는 신선한 꽃게(*Portunus trituberculatus*), 30 \pm 5 g 되는 두점박이꽃게(*Charybdis bimaculata*), 2.5 \pm 0.5 g 되는 보리새우(*Penaeus japonicus*), 6.0 \pm 1.0 g 되는 홍새우(*Metapenaeus intermedius*), 25 \pm 5 g 되는 바다가재

(*Squilla oratoria*) 등 5種에서 筋肉成分을 완전히 제거하고 節肢부분만을 취하였다. 이 節肢부분을 증류수로 깨끗이 씻어 공기 中에서 말린 후 막자사발을 사용하여 대강 磨碎하고 이어서 waring blender를 사용하여 속도를 점차 증가시켜 가면서 30分 가량 잘게 磨碎하였다. 磨碎된 材料는 分析用 표준망체 20 mesh(0.84mm)를 통과한 부분만을 취하여 사용하였다.

2. 方 法

1) Chitin-protein complex의 分離

① 먼저 말린 節肢의 脫灰成分을 위해 EDTA technique²⁾을 使用하였다. 즉 Na₂-EDTA(disodium ethylenediaminetetraacetic acid)로 포화시키고 phosphate buffer를 使用하여 中性을 유지시킨 formalin 용액으로 실온에서 12시간 동안 위의 각 實驗材料를 처리하였다.

② 다음 蛋白質의 水素結合을 分離시키기 위해 실온에서 48시간 동안 7 M urea 용액으로 처리하였다.

③ 共有結合된 蛋白質을 分離시키기 위해 알칼리 처리를 하였는데 처음에는 0.01 N NaOH 용액으로 25°C에서 5시간, 다음에는 1 N NaOH 용액으로 50°C에서 6시간, 그 후에는 1 N NaOH 용액으로 100°C에서 48시간 동안 각각 처리하였다.

④ 以上과 같이 처리된 各 試料는 Lowry法^{15,16)}으로 蛋白質含量을 測定하였다. 즉 시료용액 0.5 ml에 reagent C*¹⁾ 5.0 ml를 가하여 잘 섞어서 실온에 10분간 방치하였다. 여기에 reagent D*²⁾ 0.5 ml를 신속하게 가하여 잘 혼든 다음 다시 실온에 10분간 방치한 후 600 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 蛋白質含量을 계산하였다.

reagent A; 2% Na₂CO₃ in 0.1 N NaOH

reagent B; 0.5% CuSO₄·5H₂O in 1% sodium tartarate

*¹⁾ reagent C; mix 50 ml of reagent A with 1 ml of reagent B

*²⁾ reagent D; mix 1 part phenol reagent with 2 parts water

2) Chitin 含量測定

Austin 등의 方法⁸⁾을 약간 改良하여 Fig. 1과 같이 粗chitin質을 分離하였다.

이와 같은 方法으로 얻은 粗chitin質에 대하여 LiCl, dimethylacetamide를 0.6:1:20 비로 섞은 다음 실온에서 1시간 동안 攪拌한 후 N-methylpyrrolidone

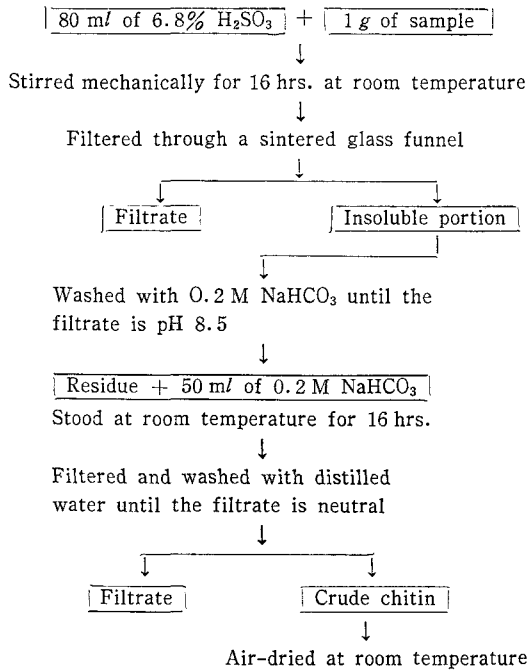


Fig. 1. Flow diagram of crude chitin extraction by sulfurous acid process.

을 위의 dimethylacetamide와 同量 加하여 실온에서 다시 2시간 동안 攪拌하였다. 이렇게하여 얻은 용액을 wool-felt를 사용하여 濾過한 후 그 濾過液을 취하여 15,000 r. p. m.으로 20분간 원심분리(Beckman, Model J₂-21)하여 그 上清液을 취하였다. 이것을 먼지를 피하여 방지하여 유기용매를 發散시켜 chitin의 沈澱物을 얻었다. 다음 chitin 沈澱物에 다량의 acetone을 넣어 여러번 洗滌하고 증류수로 다시 洗滌한 후 실온에서 말려서 精製chitin質을 얻었다.

3) 精製chitin質의 顯微鏡 標本製作¹⁷⁾

各 試料를 80% 및 90% alcohol로 各各 1시간씩

처리한 후 95% alcohol로 1시간씩 2번, 無水 alcohol로 1시간씩 3번 처리하여 脫水시켰다. 그런 다음 clearing을 위해 xylene으로 1시간씩 3번 처리하였고 infiltration을 위해 xylene-paraffin으로 2시간 처리한 후 다시 paraffin으로 1시간씩 3번 처리하였다. 이어서 包埋, 薄切한 후 PAS (periodic acid-schiff stain)法¹⁷⁾으로 染色하여 mounting 하였다.

以上과 같은 과정을 거쳐 製作된 精製chitin質의 標本을 顯微鏡(phase contrast microscope, Olympus model BHT)을 사용하여 400배의 比율로 觀察하였다.

結果 및 考察

1. Chitin-protein complex의 分離

各 試料에서 얻은 蛋白質分劃을 보면 Table 1과 같다.

總蛋白質의 含量은 꽃게가 9.6%, 두점박이꽃게 3.1%, 보리새우 9.4%, 홍새우 10.9% 및 바다가재 5.8% 로써 3.1% 에서부터 10.9% 까지 폭넓은 分布를 보이고 있다.

EDTA 처리에 의한 chelating作用만으로 얻은 蛋白質은 總蛋白質含量에 대하여 홍새우 6.4%에서 두점박이꽃게의 26.7% 까지로 나타났다. 또한 蛋白質變性劑로 7M urea 용액을 사용하여 처리한 결과 얻은 蛋白質은 꽃게가 5.1%, 두점박이꽃게 6.8%, 보리새우 0.1%, 홍새우 2.9% 및 바다가재 6.9% 로서 試料간에 차이가 있었으며 특히 보리새우는 0.1% 로서 매우 낮은 값을 나타내었다.

chitin과 共有結合으로 結合된 蛋白質含量을 살펴 보면 即 알칼리 처리로 分離된 蛋白質量을 보면 0.1N NaOH로 20°C에서 5시간 처리하였을 때 꽃게가 3.1%, 두점박이꽃게 1.9%, 보리새우 0.9%, 홍새우 2.5% 및 바다가재 1.8% 이었으며, 그 殘渣物質

Table 1. Protein fractions from chitin-protein complex

Organism	Total protein (%)	Physical association (%/total protein)		Covalently bound protein (%/total protein)			residual protein
		EDTA 20°C, 12hrs.	7M urea 20°C, 48hrs.	0.1N NaOH 20°C, 5hrs.	1N NaOH 50°C, 6hrs.	1N NaOH 100°C, 48hrs.	
<i>Portunus trituberculatus</i>	9.6	13.8	5.1	3.1	0.6	77.1	0.3
<i>Charybdis bimaculata</i>	3.1	26.7	6.8	1.9	12.2	51.7	0.7
<i>Penaeus japonicus</i>	9.4	20.9	0.1	0.9	0.1	77.8	0.2
<i>Metapenaeus intermedius</i>	10.9	6.4	2.9	2.5	1.2	86.9	0.1
<i>Squilla oratoria</i>	5.8	20.9	6.9	1.8	1.0	69.0	0.4

Table 2. Percentages of chitin and protein contents of dry shells

Organism	Crude chitin	Purified chitin	Covalently bound protein	Ratio of purified chitin to bound protein
<i>portunus trituberculatus</i>	31.8	21.1	7.8	2.7 to 1
<i>Charybdis bimaculata</i>	13.6	6.2	2.1	3.0 to 1
<i>Penaeus japonicus</i>	34.1	20.2	7.4	2.7 to 1
<i>Metapenaeus intermedius</i>	35.0	27.1	9.9	2.7 to 1
<i>Squilla oratoria</i>	32.6	25.5	4.2	6.1 to 1

을 다시 1N NaOH로 50°C에서 6시간 처리하였을 때 꽃게가 0.6%, 두점박이꽃게 12.2%, 보리새우 0.1%, 홍새우 1.2% 및 바다가재 1.0%로서 특히 두점박이꽃게가 현저하게 높은 함량을 보였다. 끝으로 그 殘渣物에 다시 1N NaOH로 100°C에서 48시간 동안 처리한 結果 꽃게가 77.1%, 두점박이꽃게 51.7%, 보리새우 77.8%, 홍새우 86.9% 및 바다가재 69.0%로서 전체 蛋白質의 대부분이 강한 알칼리 處理로 비로소 分離된 것임을 알 수 있었다. 그러나 이러한 알칼리 처리에도 불구하고 分離되지 않은 殘留蛋白質은 0.1%에서 0.7%까지였다.

以上과 같은 結果는 P.R. Austin等²⁾이 새우와 4종류의 게의 말린 껍질에서 蛋白質을 分離해내었을 때 12.3%에서 73.4%까지의 다양한 分布를 보인 것에 비하면 오히려 그 차이의 폭이 작은 것이라 할 수 있다.

2. Chitin 含量

各 試料에서 抽出된 chitin含量은 Table 2와 같다.

우선 粗chitin質의 含量을 살펴보면 꽃게가 31.8%, 두점박이꽃게 13.6%, 보리새우 34.1%, 홍새우 35.0% 및 바다가재 32.6%로 나타났는데 이들 中 두점박이꽃게는 13.0%로서 매우 낮은 값을 보였다. 이는 두점박이꽃게의 경우 다른 것과는 달리 아주 어린 動物을 사용한 때문이 아닌가 생각된다.

粗chitin質을 더욱 精製하여 抽出해낸 精製chitin質의 含量을 보면 꽃게가 말린 껍질의 21.1%, 두점박이꽃게 6.2%, 보리새우 20.2%, 홍새우 27.1% 및 바다가재 25.5%로서 여기에서도 역시 두점박이꽃게가 매우 낮은 값을 나타내었다.

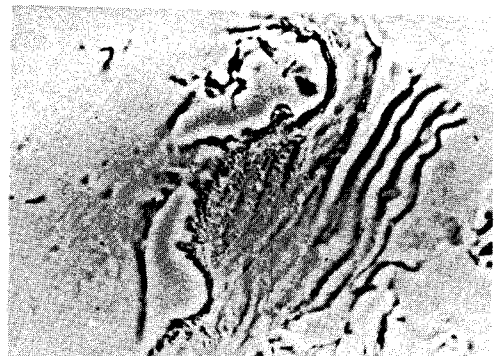
精製chitin質과 共有結合된 蛋白質含量과의 比를 살펴보면 꽃게, 보리새우 및 홍새우가 다같이 2.7:1이었고 두점박이꽃게가 3.0:1, 바다가재가 6.1:1이었다.

以上の 結果를 종합하여 보면 各 試料에 따라 chitin 含量에는 차이가 있음을 알 수 있으며 chitin-protein

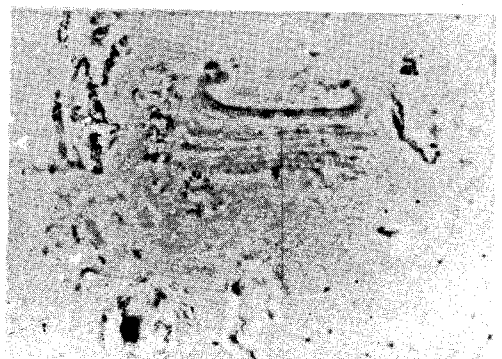
complex에서 chitin과 蛋白質 사이의 共有結合關係는 복잡함을 알 수 있다.

3. 精製chitin質의 顯微鏡所見

各 精製 chitin質의 標本을 phase contrast microscope를 사용하여 관찰하였으며 그 顯微鏡 사진은 Fig. 2와 같다.



Portunus trituberculatus



Charybdis bimaculata

각 標本에 있어 모두 纖維狀(filamentous)의 形態를 갖추고 있는 것을 알 수 있다.

要 約

바다의 無脊椎動物 中 甲殼類에 속하는 꽃게(*Portunus trituberculatus*), 두점박이꽃게(*Charybdis bimaculata*), 보리새우(*Penaeus japonicus*), 홍새우(*Metapenaeus intermedius*) 및 바다가재(*Squilla oratoria*) 등 5種을 택하여 이들의 말린 껍질에서 Ca과 같은 無機質을 除去하여 chitin-protein complex를 얻었다. 이 chitin-protein 複合物에 대하여 抽出條件을 달리하여 分離시켜 얻은 蛋白質量을 測定하였다. 또한 各 껍질試料를 H_2SO_3 등으로 처리하여 얻은 粗 chitin質 및 이것을 다시 精製하여 얻은 精製 chitin質의 含量을 測定하였고 한편 精製 chitin質을 位相差顯微鏡으로 觀察하였다.

그 結果를 綜合하면 다음과 같다.

1. 總蛋白質量은 3.1%에서 10.9%까지였으며 아주 어린 動物을 사용한 두점박이꽃게가 3.1%로서 가장 낮은 값을 나타내었다. 總蛋白質 中 EDTA처리로 分離된 蛋白質은 홍새우의 6.4%에서 두점박이꽃게의 26.7%까지이었으며 주로 水素結合을 끊은 7 M urea용액에 의해 分離된 蛋白質은 보리새우의 0.1%에서 바다가재의 6.9%까지로 나타났다.

共有結合된 蛋白質量을 구하기 위하여 알칼리 처리를 하였는데 격렬한 條件 即 1 N NaOH용액으로 100°C에서 48시간 처리로 分離된 蛋白質量은 두점박이꽃게의 51.7%에서 홍새우의 86.9%까지로 總蛋白質의 대부분을 차지하였다.

2. 粗chitin質의 含量은 꽃게가 말린 껍질의 31.8%, 두점박이꽃게 13.6%, 보리새우 34.1%, 홍새우 35.0% 및 바다가재 32.6%이었으며 精製chitin質의 含量은 꽃게가 21.1%, 두점박이꽃게 6.2%, 보리새우 20.2%, 홍새우 27.1% 및 바다가재 25.5%로서 두점박이꽃게가 매우 낮은 값을 나타내었다. 이는 두점박이꽃게의 경우 다른 것들과는 달리 매우 어린 動物을 사용한 때문인 것으로 생각된다.

精製 chitin質과 共有結合된 蛋白質量과의 比는 꽃게, 보리새우 및 홍새우가 다같이 2.7:1이었으며 두점박이꽃게가 3.0:1, 바다가재가 6.1:1이었다.

3. 精製chitin質의 顯微鏡所見을 보면 각 標本에 있어 모두 纖維狀의 形態를 갖추고 있었다.

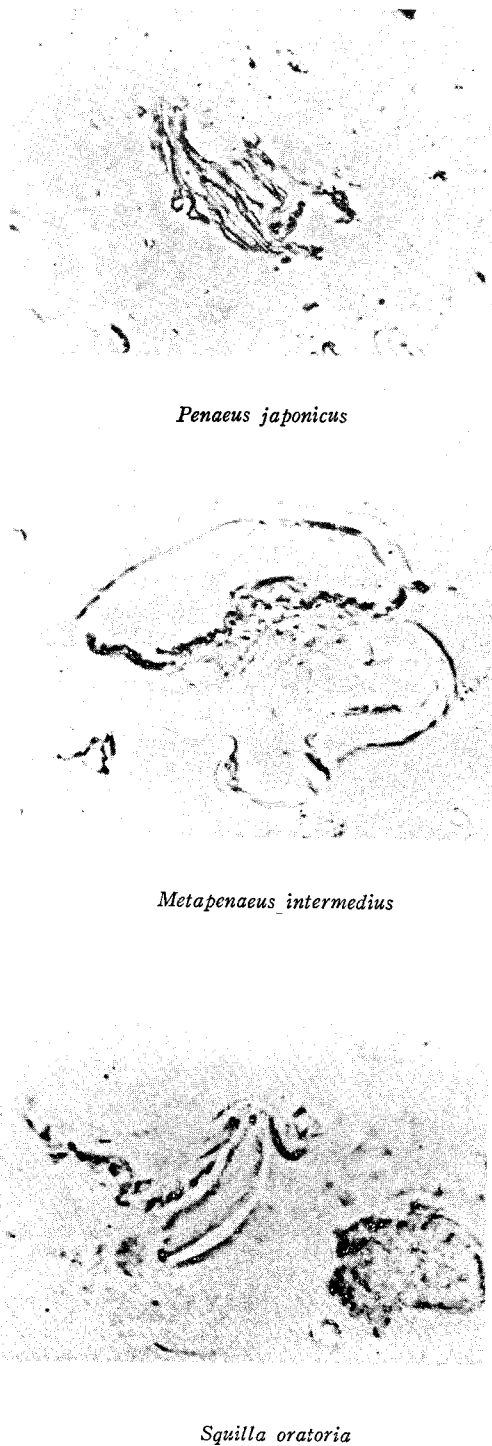


Fig. 2. Phase contrast microscopic photographs of purified chitins.

謝 辭

本研究를 위하여 많은 지도를 해주시고 물심양면으로 도움을 주신 영남대학교 의과대학 생화학교실의 이기녕박사님께 심심한 감사를 드립니다.

文 獻

1. Patton, R.S. and Chandler, P.T.: *J. Dairy Science*, **58**(3), 397(1975)
2. Austin, P.R., Brine, C.J., Castle, J. E. and Zikaakis, J. P.: *Science*, **212**(15), 749(1981)
3. Hackman, R.H. and Goldberg, M.: *Analytical Biochemistry*, **110**, 277(1981)
4. Lehninger, A. L.: *Principles of Biochemistry*, Worth, N.Y., 292(1982)
5. Hackman, R. H. and Goldberg, M.: *J. Insect. physiol.*, **17**, 335(1971)
6. Donald, W. W. and Mirocha, C.J.: *Cereal chemistry*, **54**(3), 466(1977)
7. Rutherford, F. A. and Austin, P. R.: *University of Delaware Sea Grant Report DELSG-13-78*, University of Delaware, Newark, (1978)
8. Austin, P. R., Brine, C. J., Reed, G. A., Whelan, H. A. and Zikakis, J. P.: *University of Delaware Sea Grant Report*, DEL-SG-01-80, University of Delaware, Newark, (1980)
9. Ride, J. P. and Drysdale, R. B.: *Physiological Plant Pathology*, **2**, 7(1972)
10. Patton, R. S., Chandler, P. T. and Gonzalez, O. G.: *J. Dairy Science*, **58**(3), 404(1975)
11. Lovell, R.T., Lafleur, J. R. and Hoskins, F. H.: *J. Agricultural Food chemistry*, **16**(2), 204 (1968)
12. Balassa, L.L. and Prudden, J. F.: *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan* MIT Sea Grant Report, (1978)
13. Pope, S., Tomarelli, R. M. and György, P.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **68**, 362(1957)
14. György, P., Kuhn, R., Rose, C.S. and Zilliken, F.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **48**, 202(1954)
15. Garvey, J.S., Cremer, N. E. and Sussdorf, D.H.: *Methods in Immunology* Addison-wesley, London, 71(1977)
16. Williams, C. A. and Chase, M. W.: *Methods in Immunology and Immunochemistry Academic press, N. Y.*, 249(1972)
17. 이삼열: 臨床病理檢査法(연세대학교 출판부, 서울), 548(1970)