

계 加工廢棄物을 이용한 食品保存料의 開發에 관한 研究

張東錫·趙鶴來·具孝英·崔渭卿*

釜山水產大學 食品工學科

A Development of Food Preservative with the Waste of Crab Processing

Dong-Suck CHANG, Hak-Rae CHO, Hyo-Young GOO and Wi-Kung CHOE*

*Department of food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan
Pusan 608-737, Korea*

This experiment was carried out to develop the preparation method of chitosan which has strong antimicrobial activity, and also tried to investigate as a natural food preservative with this chitosan. The antimicrobial activity of chitosan was the strongest when deacetylation of chitin was conducted at 146°C for 8 hours with 50% sodium hydroxide. The growth of *Escherichia coli* was completely inhibited by adding this low molecular weight chitosan (M. W. 35,000) at the level of concentration of 75ppm to the medium. The antimicrobial activity was strong enough against such Gram positive bacteria as *Staphylococcus* sp. and *Bacillus* sp.. The growth of these strains was inhibited by the concentration of 50ppm but it was varied in its kinds against Gram negative bacteria. The concentration of chitosan required for growth inhibition of microorganisms was 100ppm against *Pseudomonas* sp. and *Vibrio* sp., 2,000ppm against *Salmonella* sp.. The growth of *Saccharomyces* sp. was inhibited by the concentration of 100ppm, but *Hansenula* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. and *Mucor* sp. did not inhibited by even more than the concentration of 5,000ppm. The shelf life of Mulkimchi (pickle type Kimchi), containing 0.2% chitosan was 10 days longer than control stored at 5 °C.

緒 論

계, 새우 등 甲殼類는 우리 나라에서 연간 10만톤 가량 漁獲되고 있는데 (농림 수산 통계 연감, 1987), 可食部를 제외한 전체 중량의 75%가 廢棄物로 방치되어 악취 등 환경위생 면에서 뿐만 아니라 연안 해수의 오염원으로도 문제시 되고 있다. 그런데 이 加工廢棄物 건조 중량의 13~17% 가량이 chitin인데 그 화학구조는 poly-β(1, 4)-N-acetyl-D-glucosamine으로서 cellulose와 유사하나 화학반응

성이나 物性 등은 cellulose와는 전혀 다르다. Chitin은 물과 유기용매에 녹지 않으나 脫 acetyl化 시키면 chitosan으로 되어 (Fig. 1) 묽은 酸용액에 녹아 粘稠한 고분자의 cation性 용액이 되므로 고분자 물질의 凝集劑(Bough, 1975; 外山, 1985), 吸濕·保水劑(三田, 1987), 抗 cholesterol·抗癌劑(平野, 1986), 食品素材(井爪, 1987), 酵素 固定化劑(Bissett and Sternberg, 1987)등 여러 분야에서 유용하게 이용될 수 있다.

* 태창기업(주)

Tae Chang Co. LTD. Pusan 609-022, Korea

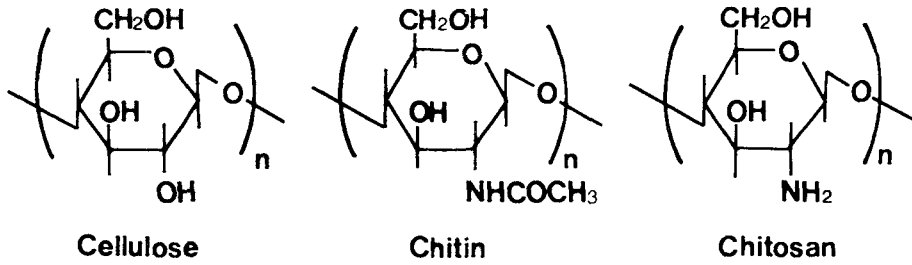


Fig. 1. Chemical structures of cellulose, chitin and chitosan.

한편 식품의 대량생산 및 소비시대에 접어들면서 식품 보존료의 사용이 점차 늘어나고 있는 실정인데, 이들 식품 보존료는 대부분 화학 합성품으로서 發癌性, 急慢性毒性, 突然變異誘發性등이 문제되는 것이 많아 人體에 害가 없는 천연물로서 抗菌作用을 나타내는 물질의 개발이 시급하다고 하겠다.

그런데 chitosan의 항균력에 대해서는 Dutkiewicz (1983), Kendra and Hadwiger(1984), 内田(1988)의 보고가 있으나 아직까지 불명확한 점이 많고, 식품 보존에 관련된 보고도 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 chitosan을 식품 보존료로 이용하기 위한 연구의 일환으로 항균력이 강한 chitosan의 제조 방법을 밝히고, 식품의 품질 저하에 관여하는 미생물에 대한 항균력을 검토하였으며, 실제 식품 보장 효과를 실험하였다.

材料와 方法

1. 材 料

1) Chitosan 제조용 원료

Chitosan 제조용 원료로는 경북 영덕군 소재 A社의 수산 가공 폐기물인 대게(*Chionoecetes opilio*)의 껍질을 수거하여 사용하였다.

2) 供試菌株

항균 실험용으로 사용된 균주는 표준 균주와 실험실에서 분리, 同定한 균주를 사용하였는데, 사용된 균주와 그 출처는 Table 1과 같다.

2. 方 法

1) Chitosan의 제조

게 껍질에 함유되어 있는 탄산칼슘은 게 껍질을 충분한 양의 5% 염산 용액에 담구어 수시로 교반시키면서 溶出시켜 제거하였다. 단백질은 탄산칼슘을 제거한 게 껍질을 다시 5%의 수산화나트륨 용액 속에 담구어 95~100℃로 5시간 가열하여 제거

Table 1. The list of microorganisms submitted for the test of antimicrobial activity of chitosan.

	Strain	Source
Bacteria	<i>Escherichia coli</i> ATCC 1129	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATU 27853	
	<i>Salmonella typhimurium</i>	
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	sea water
	<i>Bacillus cereus</i> IAM 1110	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	
	<i>Micrococcus</i> sp.	soil
Yeasts	<i>Saccharomyces diastaticus</i> NCYC 361	
	<i>Hansenula anomala</i> CBS 2872	
Molds	<i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 20235	
	<i>Penicillium funiculosum</i> ATCC 9644	
	<i>Mucor</i> sp.	air
	<i>Helminthosporium</i> sp.	air

하였으며, 이를 수세한 후 日光下에서 脫色, 건조시켜 chitin을 얻었다. Chitin을 진한 수산화나트륨 용액 속에서 가열하여 deacetylation시킴으로서 chitosan을 얻을 수 있었는데, 사용된 deacetylation 조건으로 수산화나트륨 용액의 농도는 40~60%, 가열시간은 각 농도 별로 3시간과 8시간이었으며, 가열온도는 96℃~162℃의 범위였다(Fig. 2).

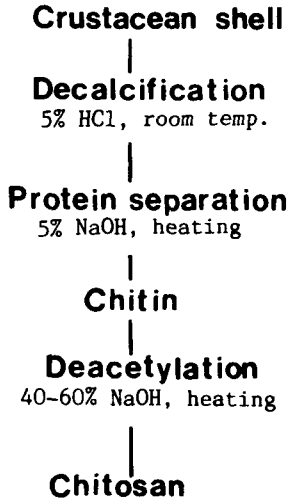


Fig. 2. Preparation procedure of chitosan.

2) 분자량 측정

Chitosan 용액의 분자량은 다음의 Staudinger 식 (Muzzarelli, 1976)에 적용시켜 구하였다.

$$[\eta] = K \cdot M_w^a$$

여기서 $[\eta]$: 極限粘度 (dl/g)

$$K : 8.93 \times 10^{-4} \text{ (cm}^3 \cdot \text{mol/g}^2\text{)}$$

M_w : 분자량

$$a : 0.71$$

極限粘度는 chitosan을 0.2M acetic acid+0.1M sodium chloride+4.0M urea의 용매에 녹여서, Ostwald形 점도계를 사용하여 30℃ 水槽상에서 相對粘度를 구한 다음 松村(1974)의 방법에 따라 極限粘度를 구하였다.

3) 항균력 시험

① 항균력 시험용 배지의 결정

Peptone, yeast extract 등 각종 배지 성분의 0.5% 용액 5ml씩에다 1% chitosan 용액을 1ml 가량씩 가하여 용해성을 육안으로 관찰하였는데, 사용한

배지 성분들 중에서 chitosan과 응집, 침전 현상을 일으키지 않고 서로 잘 섞일 수 있는 성분들로 배지를 구성하였다.

② 항균력 시험

Chitosan 1g을 증류수 100ml에 가해 멸균시킨 후 acetic acid 0.3ml를 가해 용해시켜 항균력을 측정하였다.

항균력 시험은 멸균 증류수로 희석한 chitosan 용액과 供試菌을 접종한 배지를 섞어 시험관에 일정량씩 분주한 다음, 균의 생육 최적 온도에서 배양하면서 균의 증식도나 증식 억제에 필요한 最少生育阻害濃度(MIC)를 조사하였다. 供試菌의 접종량은 대수 증식 중기의 배양액을 최종 배지 액량에 대해 0.3%가 되도록 가하였으며, 균의 증식도는 spectrophotometer를 사용하여 540nm에서의 흡광도로 나타내었다. 이때 배양액을 vortex mixer로 세차게 교반시켜 chitosan에 응집된 균체를 고루 분산시켜 측정하였다.

4) 물김치 저장 실험

물김치(간절임 배추 13%(w/w), 간절임 무우 29%, 마늘 2%, 파 1.7%, 생강 1.3%, 제품의 최종 식염 농도 1.9%)에 chitosan을 0.1%(w/w) 및 0.2%가 되도록 첨가하여 20℃와 10℃에서 발효시키면서 물김치의 熟成度를 비교해 보았는데, 熟成度는 pH를 측정하여 나타내었다.

結果 및 考察

1. 항균력 시험용 배지의 결정

Peptone, yeast extract 등 고분자 peptide나 단백질은 함유한 유기 성분들은 chitosan에 의해 고분자의 응집, 침전이 일어났으므로 그대로 항균력 시험용 배지성분으로 사용할 수가 없었다. 따라서 본 실험에서는 포도당을 炭素源으로, casamino acid를 窒素源으로 하여 식염을 0.5%씩 첨가한 Glucose-casamino acid medium을 사용하였다. 또 효모류나 젖산균과 같이 營養要求性이 복잡한 균의 배양을 위해서는 yeast extract, beef extract, malt extract를 透析시켜 chitosan 응집성 고분자 물질을 제거시킨 다음, 이들 성분이 각각 0.2%씩 함유되도록 한 용액에 포도당, casamino acid, 식염을 첨가한 배지를 사용하였다.

2. Chitosan의 항균력 시험

1) 고분자 chitosan

고분자 chitosan은 폐수 처리 시 단백질 응집제로 주로 이용되는데, chitin을 常法과 같이 50% 수산화나트륨 용액으로 96℃에서 3시간 deacetylation 시켜 얻은 분자량 2,800,000의 고분자 chitosan의 항균력을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다.

Chitosan이 250ppm 첨가된 배지에서는 대조구와 별 차이가 없이 대장균의 증식이 일어났으나, 500 ppm 첨가로는 9시간, 1,000ppm 첨가로는 30시간 가량 유도기가 연장되었으며, 2,000ppm의 첨가로는 증식이 완전히 억제되었다. 한편 chitosan 용해에 사용된 acetic acid도 균의 증식에 영향을 미쳤을 가능성이 있었다. 그래서 가장 고농도의 chitosan

첨가구인 2,000ppm 첨가 시 배지 속에 함유되게 되는 acetic acid의 농도는 0.06%였으므로, Glucose-casamino acid medium에 acetic acid만을 0.06% 가하여 균 증식의 억제 여부를 조사한 결과, 이 정도 농도의 acetic acid만으로는 균의 증식에 별 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 chitosan 용액의 첨가로 인한 균 증식 억제 효과는 chitosan 그 자체 만에 의한 것임을 알 수 있었다.

이와 같이 고분자 chitosan은 항균력을 보유하고 있기는 하였으나 미약하였으므로, chitosan의 제조 방법을 달리하여 항균력이 큰 chitosan 제조를 試圖하였다.

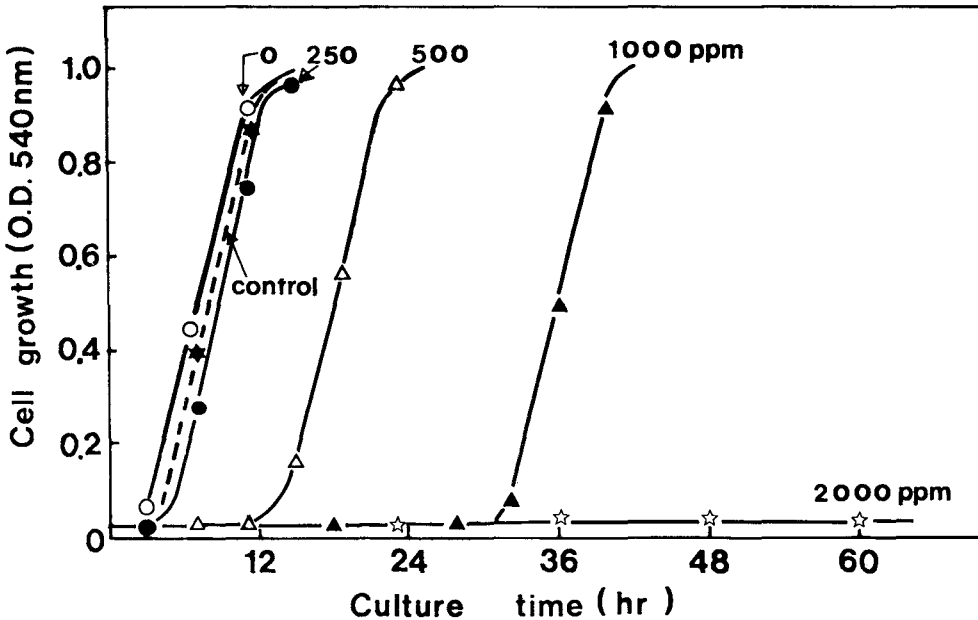


Fig. 3. Comparison of growth of *Escherichia coli* in Glucose-casamino acid medium containing various contents of high molecular weight(M. W. 2,800,000) chitosan, without chitosan (O — O) and acetic acid as control (★--★).

2) Deacetylation 처리 조건별 chitosan의 항균력 비교

Chitin의 deacetylation처리 시 수산화나트륨 용액의 농도를 40~60%로 하고 이 범위 내에서 각 농도 별로 3시간과 8시간씩 boiling하여 얻어진 chitosan의 분자량과 항균력을 비교한 결과는 Table 2와 같다.

40% 용액에서 3시간 boiling시켜 얻은 분자량 820,000의 chitosan은 1,000ppm으로도 균의 증식을 억제시킬 수 없었으나, 50% 농도까지는 처리 용액의 농도와 시간이 증가할수록 분자량은 감소하였

으나 항균력은 증가하는 경향을 나타내었다. 따라서 50% 용액으로 8시간 boiling시켜 얻은 분자량 35,000의 chitosan은 75ppm으로도 균의 증식을 억제시킬 수 있어서 전체 처리구 중 가장 높은 항균력을 나타내었다.

그러나 55% 이상의 농도의 수산화나트륨 용액으로 처리 시 얻어지는 chitosan은 분자량의 크기와 항균력은 별 상관 관계가 없었는데, 이는 deacetylation 처리 조건이 너무 苛酷하여 chitosan분자의 활성기인 amino기가 손상을 받았기 때문으로 추정된다.

Table 2. Antimicrobial activity of chitosan against *Escherichia coli* by deacetylation conditions

Deacetylation condition			Molecular weight	Chitosan conc. (ppm)						
NaOH(%)	Boiling point(°C)	Time(hr)		50	75	100	250	500	750	1000
40	133	3	820,000	G	G	G	G	G	G	G
		8	275,000	G	G	G	G	G	G	NG
45	138	3	293,000	G	G	G	G	G	G	NG
		8	97,000	G	G	G	G	NG	NG	NG
50	146	3	95,000	G	G	G	G	NG	NG	NG
		8	35,000	G	NG	NG	NG	NG	NG	NG
55	153	3	68,000	G	G	G	G	NG	NG	NG
		8	29,000	G	G	NG	NG	NG	NG	NG
60	162	3	32,000	G	G	G	NG	NG	NG	NG
		8	11,000	G	G	G	G	G	G	G

E. coli was cultured in Glucose-casamino acid medium at 35°C for 72 hrs.

G; Growth, NG; No Growth.

3) 저분자 chitosan

50% 수산화나트륨 용액에서 8시간 deacetylation 시켜 얻은 분자량 35,000의 chitosan으로 대장균의 증식에 대한 영향을 조사한 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

Chitosan 50ppm 첨가로 유도기가 대조구에 비해 18시간 가량 연장되었으며, 100ppm 첨가로는 증식이 완전히 억제되어 배양 10일이 경과하여도 균의

증식 기미를 볼 수가 없었는데, 분자량 2,800,000의 고분자 chitosan을 사용한 앞의 결과(Fig. 3)에서 2,000ppm으로 균의 증식을 억제시킨 점을 미루어 보면, 본 저분자 chitosan은 고분자에 비해 항균력이 약 20배 가량 증가된 것으로 추정할 수 있었다. 따라서 이후부터는 본 저분자 chitosan을 高抗菌性 저분자 chitosan이라 稱하였으며, 균종별 항균력 실험이나, 식품 보장 효과 실험에 제공하였다.

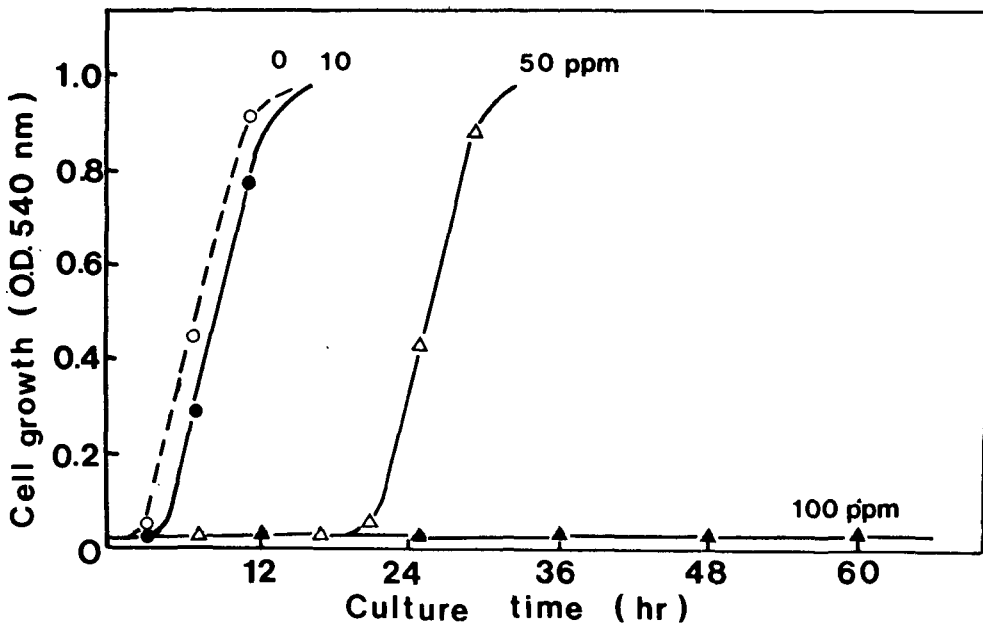


Fig. 4. Comparison of growth *Escherichia coli* in Glucose-casamino acid medium containing chitosan of low molecular weight (M. W. 35,000).

3. 高抗菌性 저분자 chitosan의 균종별 항균력 시험

1) 세 균

高抗菌性 저분자 chitosan의 각종 세균류에 대한 항균력을 Fig. 5에 나타내었다. *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus* sp. 등 Gram 양성균은 모두 50ppm 첨가로 균의 증식을 억제시킬 수

있었으며, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus* 등의 Gram 음성균은 50ppm으로 유도기가 다소 연장되었고, 100ppm 첨가로는 증식이 억제되었다. 그런데 *Salmonella typhimurium*은 2,000ppm이 첨가되어야 증식이 억제 되었으므로 세균에 대한 chitosan의 항균력은 균종간에 다소 차이가 있는 것을 알 수 있었다.

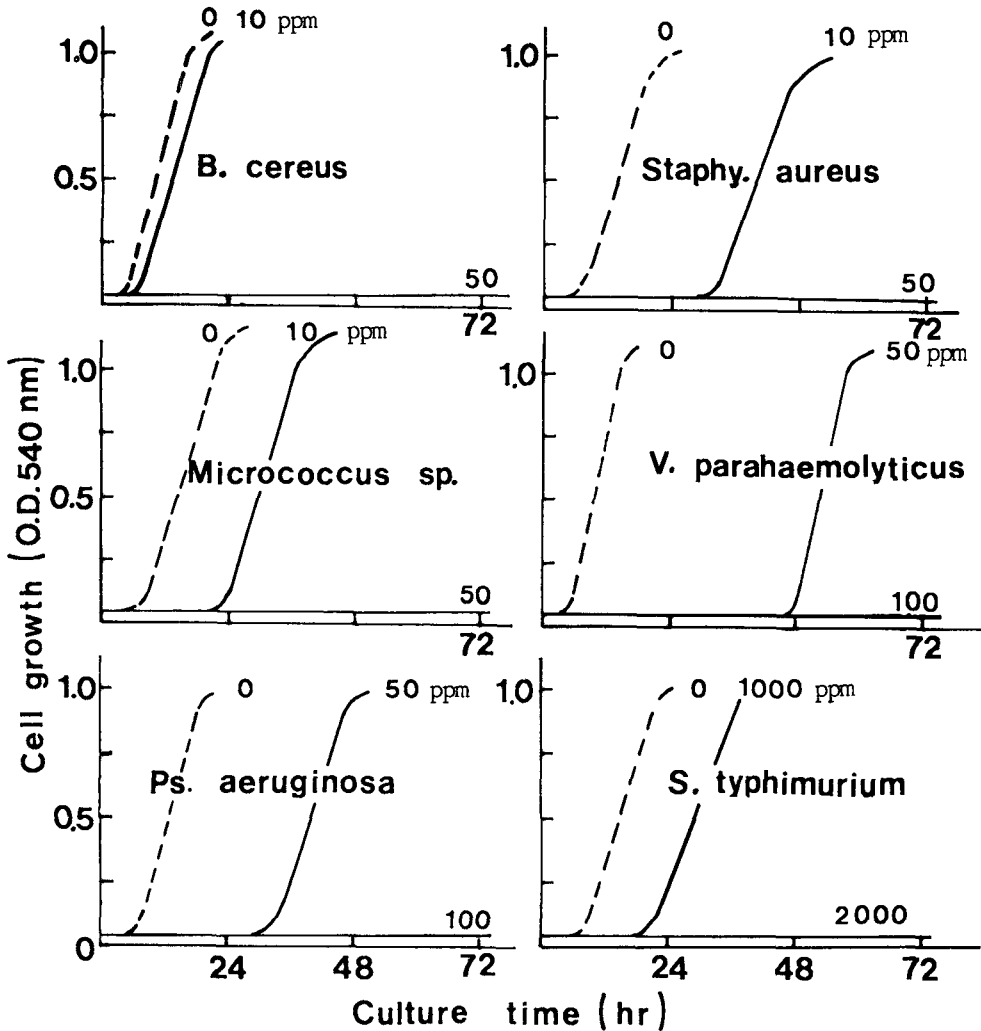


Fig. 5. Comparison of growth of bacteria in Glucose-casamino acid medium containing chitosan of low molecular weight (M. W. 35,000).

2) 효 모

*Saccharomyces diastaticus*는 100ppm으로 증식이 억제되었으나, *Hansenula anomala*는 5,000ppm이 첨

가되어도 증식이 일어났으므로 (Fig. 6) 효모류는 균종간에 항균력의 敏感度에 차이가 매우 클 것으로 추정되었다.

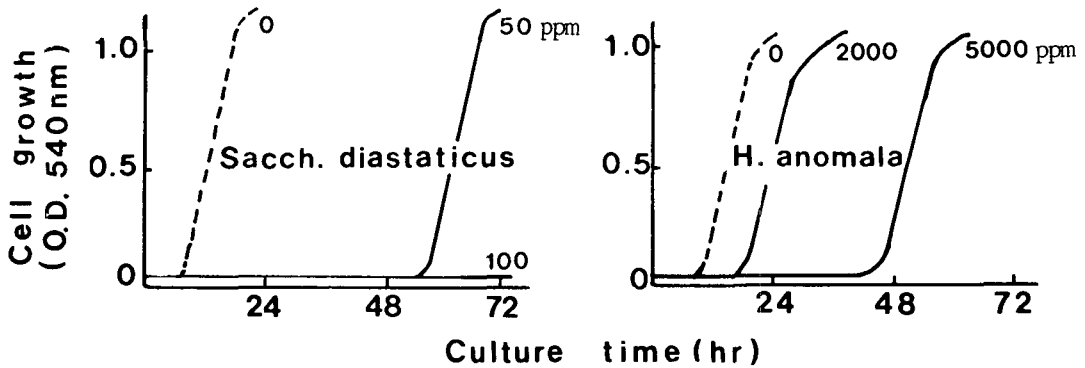


Fig. 6. Comparison of growth of yeasts in Glucose-casamino acid medium containing chitosan of low molecular weight (M. W. 35,000).

3) 곰팡이

곰팡이류는 Table 3에 나타난 바와 같이 *Aspergillus parasiticus*와 *Helminthosporium* sp. 가 5,000 ppm 첨가로 각각 2일과 4일간의 증식 억제 효과가 있었으나 이후 대조구와 마찬가지로 증식이 일어

났으며, *Penicillium funiculosum*과 *Mucor* sp.는 증식에 아무런 영향도 받지 않았다. 따라서 곰팡이류가 chitosan의 항균력에 가장 민감하지 않은 것으로 추정되었다.

Table 3. Comparison of the time(day) required for growth inhibition of molds in Glucose-casamino acid medium by concentration of added chitosan

Strain	Chitosan conc. (ppm)					
	0	10	100	1000	3000	5000
<i>Aspergillus parasiticus</i>	1	1	1	1	2	3
<i>Penicillium funiculosum</i>	1	1	1	1	1	1
<i>Mucor</i> sp.	1	1	1	1	1	1
<i>Helminthosporium</i> sp.	2	4	4	5	5	6

M. W. of chitosan; 35,000.

4. 식품 保藏效果 실험

Chitosan은 용액 속의 단백질을 결합시켜 침전되게 되므로 chitosan을 식품 보존료로 이용하려면 단백질 함량이 높은 液狀食品에는 적용시키기 곤란하리라 추정되었다. 따라서 본 연구에서는 물김치를 대상 식품으로 하여 chitosan에 의한 熟成 지연 효과를 검토해 보았다.

물김치를 담글 때 처음부터 chitosan을 첨가하여 발효시킬 때에는 chitosan의 항균력에 耐性を 나타내는 균의 증식에 의한 異常 발효가 일어날 가능성이 있었다. 따라서 김치의 맛이 가장 좋은 시기인 pH 4.2~4.6 부근 (최, 1987)까지 숙성을 시킨 물김치에다 chitosan을 첨가하여 저온 저장을 하면서 이 pH 범위가 그대로 유지될 수 있는 기간을 조사해 보았다.

물김치를 15℃에서 pH 4.3으로 까지 발효시킨 다음 chitosan을 각각 0.1% 및 0.2%씩 되도록 첨가하여 5℃에서 저장실험을 행한 결과는 Fig. 7에 나타난 바와 같다. 저장 중 대조구는 완만한 속도로 계속적인 pH의 저하가 나타났으나, 0.1% 첨가 시에는 6일간, 0.2% 첨가 시에는 10일 가량 pH의 변동이 없었다. 따라서 chitosan의 첨가로 물김치의 저장 수명을 연장시킬 수 있음을 알 수 있었다.

要 約

게 껍질 속에 함유된 chitin으로 부터 높은 항균력을 나타내는 chitosan의 제조 방법과 특성을 究明하였으며, 이 chitosan을 이용하여 식품의 변질에 관련된 미생물을 중심으로 항균력을 조사하여 천

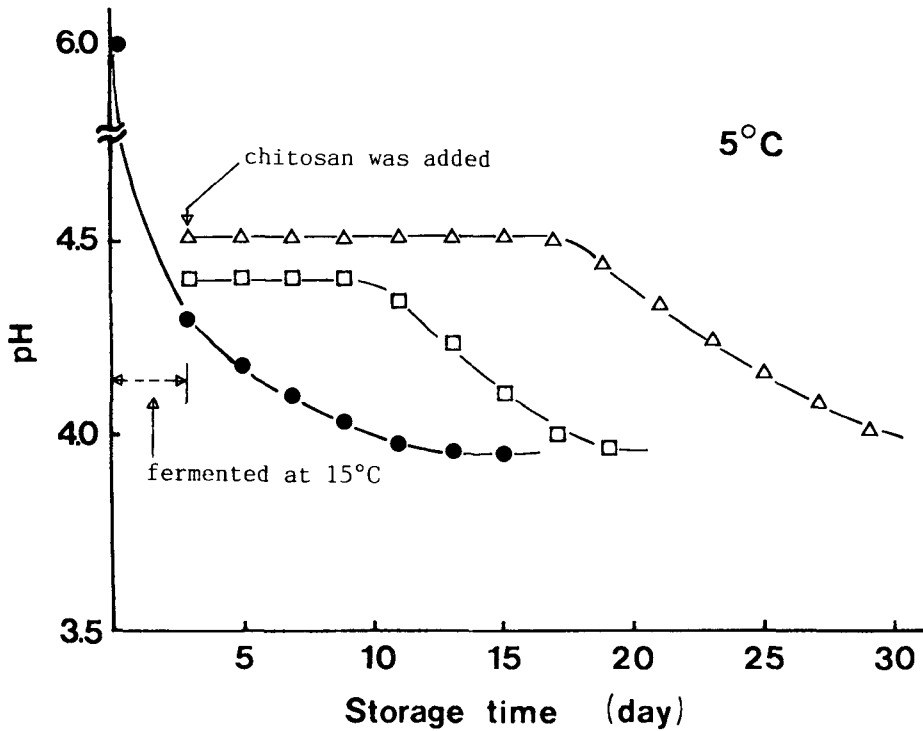


Fig. 7. The preservative effect of chitosan for Mulkimchi stored at 5°C.

● - ●; control, □ - □; 0.1% △ - △; 0.2%

연 식품 보존료로 이용 가능성을 검토하였다.

1. 常法에 따라 조제한 분자량 2,800,000의 고분자 chitosan은 2,000ppm의 농도로 대장균의 증식을 억제시킬 수 있는 등, 항균력을 保有하고 있기는 하였으나 微弱하였다.

2. Deacetylation 처리 시 50% 수산화나트륨 용액에서 8시간 boiling시켜 얻은 분자량 35,000의 저분자 chitosan은 75ppm으로 대장균의 증식을 억제시킬 수 있어서 고분자 chitosan에 비해 20배 가량 항균력이 증대되었다.

3. 세균에 대한 chitosan의 항균력에 있어서 *Bacillus* sp. 나 球菌類 등의 Gram 양성균은 50ppm 첨가로 균의 증식이 억제되었으나, Gram 음성균에 대해서는 균종에 따라 차이가 커 *Pseudomonas* sp. 와 *Vibrio* sp. 는 100ppm으로, *Salmonella*는 2,000ppm으로 증식을 억제시킬 수 있었다.

4. 真菌類에 있어서 *Saccharomyces* sp.는 100ppm으로 억제되었으나, *Hansenula* sp.는 5,000ppm에서도 증식이 일어나 효모류는 균종간에 차이가 컸으며, 곰팡이류에 대해서는 별 효과가 없는 것으로 나타났다.

5. 숙성시킨 물김치에 chitosan을 첨가하여 저장 수명을 연장시킬 수 있었는데, chitosan 0.2% 첨가 후 5°C에 저장함으로써 무첨가구에 비해 10일 가량 품질을 안정하게 유지시킬 수 있었다. 따라서 이 chitosan은 천연 식품 보존료로 이용 가능하다고 하겠다.

謝 辭

본 연구는 1988년도 韓國學術振興財團의 학술 연구 조성비 지원에 의하여 이루어 졌음을 밝히며, 아울러 감사를 드리는 바입니다.

參 考 文 獻

- Bissett, F. and D. Sternberg. 1987. Immobilization of *Aspergillus* beta- glucosidase on chitosan. *Appl. Environ. Microbiol.* 35(4), 750~755.
- Bough, W. A. 1975. Reduction of suspended solids in vegetable canning waste effluents by coagulation with chitosan. *J. Food Sci.*, 40, 297~301.

- Dutkiewicz, J. 1983. Some aspects of the reaction between chitosan and formaldehyde. *J. Macromol. Sci. Chem.*, A20(8), 877~885.
- Kendra, D. F. and L. A. Hadwiger. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.*, 8, 276~281.
- Muzzarelli, R. A. A. 1976. Chitin, Pergamon press, pp. 1~309.
- 농림수산통계연감. 1987. 농수산부. p. 250.
- 최신양. 1987. 김치의 저장 유통 기간 연장에 관한 연구. *식품기술정보*, 2(40), 26~34.
- 平野茂博. 1986. 키친, 키토산의 과학. *高分子加工*, 35(9), 28~34.
- 外山章夫. 1985. 키토산의有效利用法. *食品と科學*, 1, 107~113.
- 松村 剛. 1974. 粘度. 超遠心および光散亂. *生化學實驗講座 4, 糖質の化學(下)*, 東京化學同人, pp. 441~448.
- 三田康藏. 1987. 키토산의性質と化粧品原料としての利用. 別冊 *フードケミカル-1, 키친/키토산의科學*, 食品科學新聞社, pp. 70~78.
- 井爪正人. 1987. 키친. 키토산. *食品新素材의開發と應用*. *シーエムシー*, 東京, pp. 303~311.
- 内田 泰. 1988. 키친, 키토산의抗菌性. *푸드케ミル-2*, 22~29.

1989년 4월 13일 접수

1989년 5월 3일 수리