

토하(*Caridina japonica*)로 부터 추출, 제조한 Chitin, Chitosan의 특성

박원기 · 김희경* · 김광윤** · 범희승*** · 김지열**

동신대학교 식품영양학과

*삼천리제약 연구소

**전남대학교 의과대학 핵의학과

Characteristics of Chitin and Chitosan Derived from *Caridina japonica*

Won-Ki Park, Hee-Kyung Kim*, Kwnag-Yoon Kim**, Hee-Seung Bom***† and Ji-Yeul Kim**

Dept. of Food and Nutrition, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

*Research Institute of Samchulli Parmaceutical Co., Suweon 445-930, Korea

**Dept. of Nuclear Medicine, Chonnam University Medical School, Kwangju 501-190, Korea

Abstract

The aim of the present study was to investigate the characteristics of chitin and chitosan derived from *Caridina japonica* (CJ) which is using as one of fermented products in the Chonnam province of Korea. Percent of chitin produced from CJ was $9.6 \pm 0.2\%$. Percent of chitosan derived from chitin was $72.5 \pm 3.6\%$. Viscosities of chitin and chitosan were 94.4 and 96.7 cps. Molecular weights of them were 4,398,900 and 4,101,000, respectively. Percents of protein bound to chitin and chitosan were 2.7% and 2.6%, respectively.

Key words : *Caridina japonica*, chitin, chitosan

서 론

Chitin은 갑각류, 곤충, 곰팡이 및 효모의 외골격을 구성하는 polysaccharide로서 최근에 다양한 분야에 널리 응용되고 있는 biomass이다¹⁾. Chitin과 chitin의 탈아세틸화 산물인 chitosan은 효소고정화제²⁾, 토양개량제³⁾, 항균제⁴⁾로서의 효과가 보고되었으며, 항종양능⁵⁾과 면역활성제⁶⁾, 트롬보키네이스와의 작용으로 인한 혈액응고제로의 활용⁷⁾, 중금속킬레이팅 특성을 이용한 응집제로의 활용⁸⁾, 화학착화제로 활용하기 위한 이온교환수지로의 개발⁹⁾ 등에 대한 연구들이 이루어져 왔다. 또한, 최근에는 방사성독소의 오염 방지에도 효과가 있다고 보고된 바 있다^{10,11)}. 이와같이 여러분야에 응용하기 위하여 새우, 게 등의 갑각에서 chitin/chitosan을 분리하여 그 생화학물성에 대하여 조사되긴 하였지만¹²⁻¹⁴⁾, 토하종의 chitin/chitosan에 대해서는 연구된 바 없다.

본 연구의 대상인 토하(생이 : *Cardina japonica* DE

MAN)는 본래 심산계곡천의 일급수에서 서식하고 있으며, 세계적으로 유일하게 한국 전남의 토하젓(fermented shrimp product)은 발효식품의 상태로 반찬 등 전통식품으로 오래전부터 이용되어 왔는데, 토하의 표피에 존재하는 chitin은 그대로 식용하게 되므로 그 신체 조절기능 효과를 기대할 수 있다. 이런 면에서 본 연구에서는 토하를 식품공업에 이용하기 위한 일련의 기초 연구로 토하표피로부터 추출, 정제된 chitin, chitosan 및 함유단백질을 정량하고 그 특성을 분석함으로써 향후 연구의 기초자료로 삼고자 하였다.

재료 및 방법

생토하 및 건조토하의 무게 및 길이 측정

본 실험에 사용된 토하는 1993년 12월 9일 전남 영암군 금정면 아천리 계곡천에서 동면중인 것을 일반적인 채집방법으로 채집하여¹⁵⁾ 동정하였으며¹⁶⁾, 채집한 표본은 5%의 에탄올에 담가 표면의 이물질을 제거한

† To whom all correspondence should be addressed

후, 4% 포르말린으로 24시간 고정하고 3차 탈이온수로 깨끗이 씻어 95% 에탄올에 보존하였다. 개체의 크기를 나타내기 위해서 일반적인 새우류 길이 측정 방법¹⁹⁾인 눈구멍 뒷가장자리에서부터 갑각의 맨 뒷가장자리까지를 몸길이라고 하였으며, 표본병에서 100개체를 무작위 추출하여 개체별 생체 길이를 측정하였다. 길이를 측정할 후 이를 탈이온수에 깨끗이 씻어 칭량저울(Sartorius, Model R200D)로 무게를 측정할 후, 대한약전에서 권고하는 시험법¹⁷⁾에 따라 전기오븐(Kwang Myung Co., Korea)에 넣어 110°C에서 3시간 동안 완전히 건조한 후 같은 방법으로 건조중량을 측정하였다.

토하로 부터 chitin, chitosan의 제조 및 특성분석

Chitin 및 chitosan의 무기물 함량 측정

토하에 포함된 chitin의 추출 및 chitosan의 제조는 Hackman법¹⁸⁾을 사용하였으며, 시료를 3군으로 나누어 각각 다른 날 시험하였다. 토하로 부터 추출한 chitin의 함량은 chitin의 무게를 측정하여 토하중량에 대한 %로 표시하였으며, 제조된 chitosan의 함량은 chitosan의 무게를 측정하여 chitin의 무게에 대한 %로 표시하였다. 토하 chitin 및 chitosan의 무기물함량은 강열잔분시험법¹⁶⁾에 따라 측정하였다.

토하 chitin 및 chitosan의 FT-IR 스펙트럼 측정

토하 chitin, chitosan의 검정을 위해 FT-IR (JASCO Model 100, Japan)분석 시스템을 이용하여 KBr disc법으로 400~4600cm⁻¹의 범위 내에서의 NH의 흡광도를 조사하였다.

토하 chitin, chitosan의 점도 및 분자량 측정

토하 chitin, chitosan의 점도는 Physica 점도계 (Model SM-HM MC10, Germany)을 이용하여 측정하였고, 점도측정 시료로 Austin 등²⁰⁾의 방법에 따라 chitin은 DMAC(dimethylacetamide)에 5% LiCl(lithium chloride)을 용해시킨 용액을, 그리고 chitosan은 0.5% acetic acid 용액에 용해시킨 0.5% chitosan 용액 각각 600ml를 사용하였다. 토하 chitin, chitosan의 분자량을 측정하기 위하여, GPC 분석시스템 (JASCO Model LC-900, JASCO Co., Japan)을 이용하여 평균 분자량을 구하였다.

토하 chitosan의 탈아세틸화도 측정

Chitosan의 amino기 측정은 colloid 적정법에 따라 다음과 같이 적정하였다. 즉, 0.5% acetic acid 용액에

용해시킨 0.5% chitosan 용액 1ml에 증류수를 일정액 첨가하고, methylene blue 용액 수방울을 넣고, N/1200 potassium polyvinyl sulfate(PVSK) 용액으로 적정하였다. 청색의 용액이 백색분말이 형성되며, 청자색으로 되는 점을 종말점으로 하였으며, 동일 chitosan 용액에서 총 5회의 적정으로 amino기 함량은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Amino기 함량(\%)} = \frac{1.61 \times \text{적정수(ml)} \times \text{PVSK시약의 ester화도}}{100}$$

그리고, chitosan의 탈아세틸화도는 chitosan의 amino기 함량의 이론치가 10이므로 함량에 10을 곱하여 나타내었다.

Chitin 및 chitosan과 결합되어 있는 단백질 함량

토하 chitin, chitosan과 결합되어 있는 단백질의 정량을 위하여 HPLC(Jasco Co., Japan)의 amino acid OPA (Ortho-Phthal-Aldehyde) 분석시스템을 이용 분석하였다. 즉, 표준물질로 쓰인 OPA법 측정용 단백질 표준시료 농도에서 각각 50nmol/ml의 농도로 토하 chitin, chitosan과 결합되어 있는 단백질 함량과 비교하였다.

결과 및 고찰

토하의 몸길이 및 무게

생토하의 무작위 추출에 의한 총 100개체의 길이는 1.6cm에서 2.80cm의 범위였으며, 평균 2.2±0.4cm이었고, 무게는 0.01g에서 0.09g의 범위로 평균 0.04±0.03g이었다. 건조시 토하의 길이는 2.1±0.5cm(범위 1.1~3.0cm), 건조중량은 0.013±0.001g(범위 0.001~0.024g)이었다.

토하 chitin의 추출 및 chitosan의 제조

토하 시료를 세군으로 나누어 각각 다른 날 측정할 토하 chitin, chitosan의 함량은 Table 1과 같다. 본 연구에서 분석한 토하 중에 함유된 chitin의 중량%는 평균 9.6±0.2%였고, 여기에서 제조된 chitosan은 chitin 중량의 72.5±3.6%였다. 이 등²¹⁾은 몇가지 갑각류에서 chitin의 함량을 분석한 결과, 홍새우 27.1%, 바다가재 25.5%, 꽃게 21.1%, 보리새우 20.2%, 두점박이 꽃게 6.2%로 보고하였다. 또한 失¹⁹⁾은 chitin이 털게에서 18.4%, 가자미에서 9.0%, 무당게에서 10.4% 함유되어 있음을 보고하였는데, 이들과 비교시 토하의 chitin 함량은 낮았다.

토하 chitin, chitosan의 FT-IR 측정

토하 chitosan의 확인을 위해 chitosan의 FT-IR spectrum을 측정하였으며(Fig. 1), 표준시료인 Sigma사의 chitosan과 비교하여 동일한 spectrum을 나타내었으므로, 토하에서 추출, 정제한 물질도 순수한 chitosan으로 확인할 수 있었다. Chitosan FT-IR spectrum은 3400cm⁻¹ 부근에서 O-H 신축진동을, 2900cm⁻¹ 부근에서 C-H 결합의 신축진동을, 1650cm⁻¹에서 CH₂ 결합의 진동을, 1200cm⁻¹ 부근의 N-acetyl기의 신축진동을 관찰할 수 있었으며, 1000~1100cm⁻¹에서 glycoside결합의 ester결합에서의 산소 및 OH기에 부착되어 있는 C-O결합을 확인할 수 있었다. 또한, 1655cm⁻¹, 1550cm⁻¹ 및 1300cm⁻¹에서의 진동은 amide의 신축진동으로 판단되었다.

토하 chitin, chitosan의 점도 및 분자량 측정

토하 chitin, chitosan의 점도 및 분자량은 Table 2와 같다. Shimahara 등²³⁾은 새우의 갑각에서 분리하여 제조한 chitin의 분자량이 1,800,000~3,500,000임을 보고 하였는데, 토하 chitin은 이것의 1.3~2.4배 수준이었다. 한편 Mioshi 등²³⁾은 균류 중에서 chitin을 추출하여 *Mucor rouxii*에서는 160, *Cunninghamella blakesleana*에서는 140, *Rhizopus delemar*에서는 120의 분자량을

Table 2. Viscosities and molecular weights of chitin and chitosan produced from *Caridina japonica*

Sample	Viscosity (cps)	MW	MN	d=MW/MN
Chitin	94.4	4,398,900	399,000	11.0
Chitosan	96.7	4,101,000	460,000	8.9

cps : centipois, MW : molecular weight, MN : molecular number

Table 1. Dry weights of chitin and chitosan produced from *Caridina japonica* (C. J.)

Group	Dry weight of C. J. (g)	Chitin		Chitosan	
		Weight (g)	Chitin/C. J. (%)	Weight (g)	Chitosan/Chitin (%)
1	23.53	2.21	9.39	1.71	77.50
2	23.37	2.23	9.56	1.57	70.50
3	22.94	2.25	9.79	1.56	69.43
Mean±SE	23.28±0.25	2.23±0.02	9.58±0.16	1.62±0.07	72.47±3.58

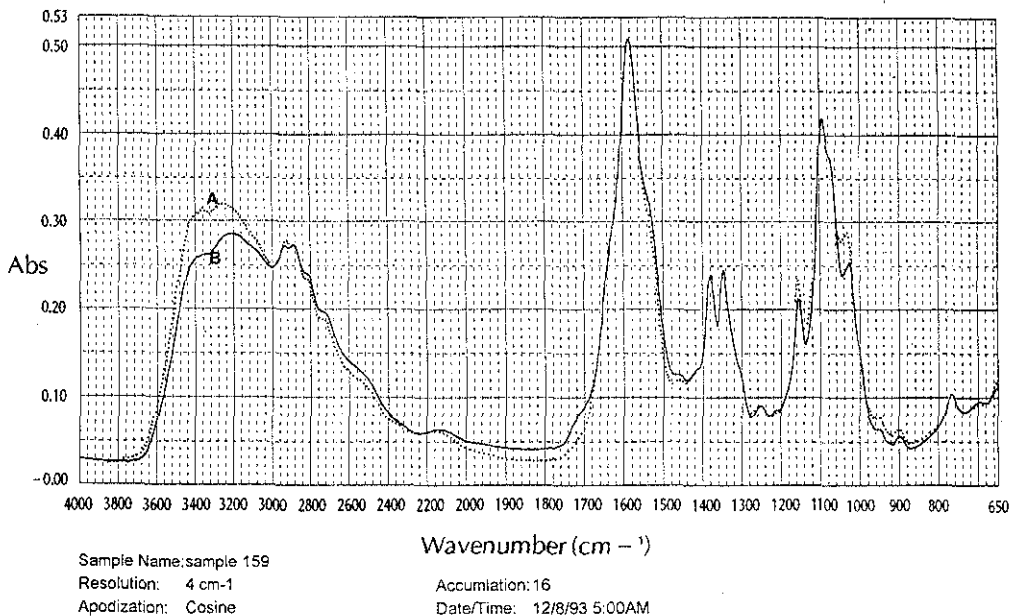


Fig. 1. FT-IR spectrum of standard chitosan (A) and chitosan (B) from *Caridina japonica* (C. J.). Both standard and chitosan from C. J. shows similar spectrums.

갖는다고 보고하였고, 변 등²⁶은 붉은 대게 (*Chionoecetes japonicus*)에서 분리한 chitosan의 분자량이 250,000~350,000이라고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 토하에서 분리한 chitin, chitosan의 분자량은 기타 갑각류 및 균류에서 분리한 것에 비해 분자량이 매우 높다는 사실을 알 수 있었다.

토하 chitosan의 탈아세틸화도 측정

토하를 다섯 군으로 나누어 측정한 chitosan의 탈아세틸화도의 측정치는 77.28, 79.21, 77.28, 80.05, 78.08% (평균 $78.48 \pm 1.16\%$)로 각종 분야에 응용할 수 있는 탈아세틸화 정도가 70~80%이므로, 토하 chitosan의 응용가능성을 보여주는 자료라고 할 수 있다.

토하 chitin, chitosan에 함유된 protein의 분석

토하 chitin에는 2.7%, 토하 chitosan에는 2.6%의 단백질이 결합되어 있었다. 이것은 Shimahara 등²⁷이 새우에서 분리하여 제조한 chitin중의 단백질함양 0.6~0.9%에 비해 다소 높은 수준이었다.

요 약

본 연구에서는 전남지방에서 전통식품으로 섭취되고 있는 토하 (*Caridina japonica*)를 식품공업에 이용하기 위한 일련의 기초연구로 토하표피로부터 chitin을 추출, chitosan을 제조하고 그 함유단백질을 정량, 그 특성을 검토하였다. 토하 중에 함유된 chitin의 중량%는 평균 $9.6 \pm 0.2\%$ 였고, 여기에서 제조된 chitosan은 chitin 중량의 $72.5 \pm 3.6\%$ 였다. 토하 chitin 및 chitosan의 확인을 위한 FT-IR spectrum상 표준시료인 Sigma사의 chitin, chitosan과 비교하여 동일한 spectrum을 나타내었으므로, 토하에서 추출, 제조된 물질도 chitin, chitosan임을 확인할 수 있었다. 토하 chitin, chitosan의 점도는 94.4, 96.7cps였고, 분자량은 4,398,900 및 4,101,000이었으며, chitosan의 탈아세틸화도는 78.48%였다. 토하 chitin 중에는 단백질이 2.7%, 토하 chitosan 중에는 2.6% 결합되어 있었다.

문 헌

1. キチン, キトサン 研究會 : 最後のバイオマズキチン, キトサン. 技報堂出版, 東京, p.51 (1990)
2. Mitutomi, M., Uchida, Y. and Ohtakara, A. : Immobilization of thermostable-galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus* on chitin and some properties of the immobilized enzyme. *J. Ferment. Technol.*, **63**, 325 (1985)
3. Adachi, K., Kobayashi, M. and Takahashi, E. : Effect of the application of lignin and/or chitin to soil inoculated with *Fusarium oxysporum* of the variation of soil microflora and plant growth. *Soil. Sci. Plant Nutr.*, **33**, 245 (1987)
4. Kendra, D. F. and Hadwiger, L. A. : Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycology*, **8**, 276 (1984)
5. Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M. : Antitumor effect of hexa-N-acetyl-chitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.*, **151**, 403 (1986)
6. Suzuki, S., Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y. and Suzuki, M. : Immunopotentiating effect of N-acetyl-chito-oligosaccharides. *Chitin in Nature & Technology*, Plenum Press, New York, p.485 (1986)
7. Hirano, S., Tanabe, Y., Hasegawa, M., Tobetto, K. and Nishioka, A. : Effect of sulfated derivatives of chitosan on some blood coagulant factors. *Carbohydr. Res.*, **137**, 200 (1985)
8. 橋本正憲, 石井保, 大井康裕 : 汚泥脱水法. 特開昭, p. 57 (1982)
9. Uragami, T., Yoshida, F. and Sugihara, M. : Facilitation of active transport of organic ions through crosslinked chitosan membrane. *Sepa. Sci. Technol.*, **23**, 1067 (1988)
10. 김광윤, 범희승, 김희경, 최근희, 김지열 : 수용성 카이토산에 의한 체내방사성스트론튬의 제거. 대한핵의학회지, **27**, 123 (1993)
11. 김희경, 김광윤, 범희승, 최근희, 김지열 : 마우스에서 경구투여한 방사성스트론튬의 제거에 대한 경구투여 카이토산과 알긴산의 효과. 대한핵의학회지, **27**, 130 (1993)
12. 矢野勲 : えびかに類の外皮の構造と形成. 化學と生物, **15**, 328 (1977)
13. Takanori, S., Kurita, K. and Iwakura, Y. : Studies on chitin. 2. Effect of deacetylation solubility. *Macromol. Chem.*, **177**, 3589 (1978)
14. Ronald, H. H. and Goldberg, M. : Light-scattering and infrared-spectrophotometric studies of chitin and chitin derivatives. *Carbohydr. Res.*, **38**, 35 (1974)
15. 김훈수 : 한국동식물도감. 제19권, 동물편 (새우류). 문교부, 서울, p.97 (1977)
16. 보건사회부 : 대한약전. 제6개정판, 문성사, 서울, p. 1370 (1992)
17. 보건사회부 : 대한약전. 제6개정판, 문성사, 서울, p. 1298 (1992)
18. Hackmen, R. H. : Studies on chitin 1. Enzymic degradation of chitin and chitin esters. *Aust. J. Biol. Sci.*, **7**, 168 (1954)
19. 김훈수 : 한국동식물도감. 제19권, 동물편 (새우류). 문교부, 서울, p.97 (1977)
20. Austin, P. R., Brine, C. T., Castle, J. E. and Zikaakis, J. P. : Chitin : New facets of research. *Science*, **212**, 749 (1981)

21. 이미숙, 서정숙, 모수미 : 5종의 해산갑각류각피에서의 chitin 및 단백질함량에 관한 연구. 한국영양식품학회지, **13**, 307(1984)
22. Shimahara, K., Takiguchi, Y., Ohkouchi, K., Kitamura, K. and Okada, O. : Chemical composition and some properties of crustacean chitin prepared by use of proteolytic activity of *Pseudomonas maltophilia* LC102. In "Chitin, Chitosan, and related enzymes" Zikakis, P. J.(ed.), Academic Press, New York, p.239 (1984)
23. Mioshi, H., Shimura, K., Yatanabe, K. and Onodera, K. : Characterization of some fungal chitosans. *Bio-sci. Biotech. Bioch.*, **56**, 1901 (1992)
24. 변희국, 장옥주, 김세원 : 키틴 및 키토산 유도체의 합성과 그 물리화학적 특징. 한국농화학회지, **35**, 265 (1992)

(1994년 2월 16일 접수)