

## Protease의 전처리에 의한 새우껍질로부터 키틴의 분리와 정제

류병호 · 이상훈\*

경성대학교 식품공학과, \*부산시 수질검사소

### Isolation and Purification of Chitin from Shrimp Shells by Protease Pretreatment

Ryu Beung Ho and Lee Sang Hoon\*

Department of Food Science and Technology, KyungSung University,  
Water Quality Institute of Pusan 616-080, Korea

#### Abstract

Chitin was prepared from *Solenocera prominentis* by deproteinization pretreatment of Neutrase. The optimal enzyme concentration of neutrase, pH, and temperature on deproteinization were 3.0 mg/ml, pH 6.0 and 50°C as indicated by the minimum protein remaining on the chitin. The residual protein, the degree of deacetylation, Ca and P content in chitin prepared from *Solenocera prominentis* were similar with commercial chitin. The molecular weight was  $1.2 \times 10^6$  dalton and the yield of chitin was 25.8%.

Key words: chitin, *Solenocera prominentis*, protease treatment

## 서 론

키틴은 새우, 게 등의 껍질, 곤충류의 갑각류, 버섯, 균류, 세포벽의 구성성분으로 N-acetyl-D-glucosamine 잔기가  $\beta$ -1,4 결합을 하고 있는 다당류이다. 키틴은 연간 10억톤 정도로 생산되고 있으며 이 지구상에서 가장 풍부한 생물자원인 셀룰로오스 다음으로 많은 양이 생산되고 있다<sup>(1)</sup>. 이와같이 풍부한 생물 자원인 키틴은 식품<sup>(2)</sup>, 의약품<sup>(3)</sup>, 화장품 및 공업용<sup>(4)</sup>으로 이용이 증가되고 있으며 새로운 기능성 소재로서 많은 연구 개발이 이루어지고 있다<sup>(5,6)</sup>. 키틴은 현재 묽은 염산으로 칼슘을 제거한 후 가성소다 용액으로 높은 온도에서 장시간 단백질을 제거 공정을 거쳐 만들어진다<sup>(7)</sup>. 강산과 강 알칼리로 처리하여 만든 키틴은 중합체가 화학적 반응을 일으킬 수 있어 순수하고 천연물성 그대로의 중합체를 얻기가 곤란하다. 키틴은 의료용 재료, 식품가공 및 효소이용 분야에서는 가능하면 종래의 키틴보다 분자량이 큰 키틴의 중합체를 요구하고 있다<sup>(8)</sup>.

그러므로 키틴의 제조시 산, 알칼리 처리법보다 개선된 방법이 바람직스럽다. Herzog 등<sup>(9)</sup>은 왕새우 껍질의 제단백을 위하여 pronase와 papain을 사용하여 처리하였고, Shimahara 등<sup>(10)</sup>은 protease을 생산하는 *Pseudomonas*

*maltophilia*을 이용하여 제단백하여 키틴을 제조하였다.

따라서 본 연구에서는 protease인 Neutrase를 사용하여 대봉 수염새우의 껍질로부터 제단백하여 키틴을 분리 정제하였다.

## 실험재료 및 방법

### 재료

시료인 대봉수염새우(*Solenocera prominentis*)는 부산 자갈치 시장에서 구입하여 사용하였다.

### 시료의 처리

대봉수염새우를 먼저 씻은 후 육질은 제거하고 얻은 껍질을 3일 동안 건조한 다음 막자사발에서 잘게 갈아 20 mesh체에 걸러 키틴 제조용 원료로 사용하였다.

### 일반성분

수분과 회분은 상법으로 분석하였고, 단백질은 semi-micro Kjeldahl법<sup>(11)</sup>, 지방질은 Soxhlet추출법<sup>(12)</sup>으로 분석하였다.

### 무기질의 정량

분말시료 10g을 Kjeldahl flask에 넣고 진한 HNO<sub>3</sub>을 가하고 가열하여 분해하고 다시 여기에 HNO<sub>3</sub> 10 ml와 10% HClO<sub>4</sub> 10 ml를 가한 후 가열하고 무색이 될 때까지 분해시킨 다음 여과하여 일정량으로 하였다.

Corresponding author: Department of Food Science and Technology, KyungSung University, Pusan 608-736, Korea

칼슘, 철, 망간 및 구리의 정량은 분해액을 일정량 취하여 원자 흡광 분광 광도계(Varian AA-875)로 정량하였으며 인은 molybden blue 비색법<sup>(13)</sup>으로 측정하였다.

**Protease**

본 실험에서 제단백에 사용된 protease는 Neutrase(1.5 Au/g, Novo Co.)를 사용하였다.

**키틴의 제조**

새우껍질 10g을 500 ml 삼각 후라스크에 넣고 Neutrase 2.0g(1.5 Au/g)을 0.1 M acetate 완충 용액(pH 6.0) 250 ml에 녹힌 용액(0.2 ml의 톨루엔 첨가)을 넣은 다음 혼합액을 항온조(50℃)에서 48시간 진탕 배양하였다. 이를 여과한 후 증류수로 잘 씻은 다음 0.1 M EDTA·2Na (pH 6.0)을 250 ml 넣은 다음 상온에서 가끔 흔들어 주면서 6일동안 방치하였다. 이때 2일마다 새로운 0.1 M EDTA·2Na(pH 6.0)을 교환해 주었다. 이를 여과한 잔사를 증류수로 씻은 후 다시 알코올로 씻었다. 이 잔사를 40℃에서 건조하여 시료용 키틴으로 하였다<sup>(7)</sup>.

**탈 아세탈화도**

Rupley의 방법<sup>(14)</sup>에 준하여 키틴을 진한 염산으로 40℃에서 2시간 30분동안 분해하여 N-acetyl-D-glucosamine(GlcNAc)은 Reissig법<sup>(15)</sup>에 따라, glucosamine은 Tsuji 등의 방법<sup>(16)</sup>에 따라 3-methyl 2-benzothiazole hydrazone hydrochloride를 사용하여 정량하였다.

$$\text{탈아세탈화도(\%)} = \frac{[\text{mol, GlcN}]/(\text{mol GlcNAc} + \text{mol GlcN})}{1} \times 100$$

**적외선 흡수 spectrum**

적외선 흡수 분광 광도계(Spectrophotometer, Shimadzu, IR-408) 박막법에 의하여 측정하였다. 키틴산의 박막은 1% 키틴산을 함유하는 0.5% 초산용액을 유리판 상에서 건조시킨 다음 에탄올 용액 중에 팽윤시켜 박리시킨 후 데시케타 중에서 암모니아수로 시료중의 초산을 중화시켜 물로 씻은 다음 감압건조하여 측정시료로 하였다<sup>(17)</sup>.

**분자량의 측정**

분자량은 극한점도법으로 측정하였다<sup>(18)</sup>. 미세분말 3g을 먼저 95±2℃로 조절한 50% NaOH용액(w/w) 100 ml에 현탁시킨 후 온도를 유지하면서 정확히 2.5시간 탈아세탈화 반응을 시켰다. 반응 종료 후 실온까지 냉각시킨 다음 여과하여 증류수로 충분히 행구어 NaOH를 제거하고 건조하여 점도측정용 시료로 하였다. 키틴의 극한 점도수는 점도측정용 시료를 0.2 M acetic acid + 0.1 M NaCl + 4 M urea 용액에 용해시킨 후 Ostwald 점도계를 이용해서 25℃에서 구하였다. 구해진 극한 점도수와 Lee의 정수<sup>(18)</sup>를 통용한 변형된 Staudinger식 ( $\eta = K \cdot M^\alpha$ ,  $\eta$ =극한점도,  $K=8.93 \times 10^{-4}$ ,  $\alpha=0.71$ )으로부터 분자량을 계산하였다.

**결과 및 고찰**

**시료의 일반성분과 무기질의 함량**

원료 새우 껍질의 단백질량은 23%였고 지방질은 3.6%였으며 회분은 50%이었다(Table 1). 무기질 함량은 칼슘이 8.5%, 인이 2.3%이었으며 망간, 구리는 극미량이었다(Table 2).

**Neutrase에 의한 새우 껍질중 단백질 제거의 조건**

Neutrase를 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/ml로 조절하여 pH 6.0, 50℃에서 48시간동안 새우껍질 현탁액에 넣고 제단백 효율을 실험한 결과는 Fig. 1에 나타내었다.

Neutrase를 농도별로 첨가하여 시간 경과에 따른 단백질 제거효과를 조사한 결과 48시간에서 Neutrase를 3.0 mg/ml 첨가하였을 때 단백질이 0.12% 남아있어 높은 제거 효과를 나타내었고, Neutrase를 4.0 mg/ml 첨가시에는 0.12%, 5.0 mg/ml 첨가시에는 농도의 차이에 따른 단백질 제거 효과가 무시할 만큼 작게 나타났다.

한편 최적 pH를 알아보기 위하여 Neutrase농도를 3.0 mg/ml로 고정하여 첨가하고 pH를 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 및 8.0으로 조절하여 수소농도이온에 의한 단백질의 제거효과를 조사하였다. Fig. 2에 나타난 바와같이 pH 6.0일 때 잔존하는 단백질은 0.12%로 가장 효과가 좋았고, pH 5.0일 때는 0.21%, pH 7.0일 때는 0.23%이었다. 그리고

**Table 1. Proximate composition of *Solenocera prominens* shells (g/100g dried shell)**

Sample	Moisture	Ash	Protein	Lipid	Carbohydrate
Whole shells	12.2	50.0	23.0	3.6	11.2
Back shells	11.4	47.2	22.1	1.9	17.4

**Table 2. Minerals content of *Solenocera prominens* shells (mg/100g sample)**

Sample	Na	K	Ca	Mg	P	S	Fe	Mn	Cu
Whole shells	82	68	8520	740	2312	410	2	2	1
Back shells	63	950	8766	1031	2690	405	3	2	1

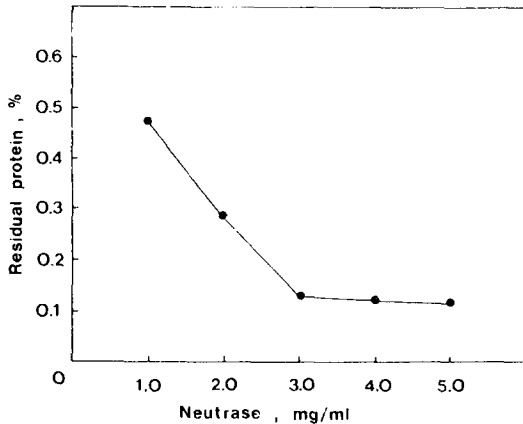


Fig. 1. Effect of Neutrased concentration on deproteinization of *Scienocera prominens* shells

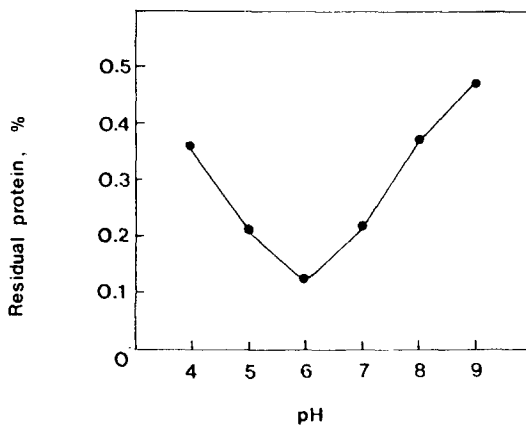


Fig. 2. Effect of pH on deproteinization of *Scienocera prominens* chitin by Neutrased

최적온도는 Fig. 3에서 보는 바와같이 50°C에서 처리했을 때 잔존하는 단백질량은 0.12%로 가장 효과적이었고 40°C일 때는 잔존하는 단백질이 0.24%, 60°C 때에는 0.19%이었다. 따라서 단백질을 제거하기 위한 Neutrased의 최적농도는 3.0 mg/ml, 최적 pH는 6.0, 최적온도는 50°C이었다. Neutrased는 곰팡이으로부터 분리 정제한 효소로 trypsin이나 chymotrypsin과 다르게 단백질의 특정한 펩티드 결합만 분해하는 것이 아니고, 광범위하게 분해한다<sup>(20)</sup>. 그리고 Neutrased는 수용액에서 안정하고 특히 온도 범위가 넓으며, 칼슘이온의 존재하에서 더욱 효과적으로 작용한다<sup>(20)</sup>.

#### 키틴의 수율 및 화학조성

Neutrased를 사용하여 제단백시킨 후 만든 키틴의 수율 및 단백질, 칼슘 및 인의 함량은 Table 3과 같다. Chitin에

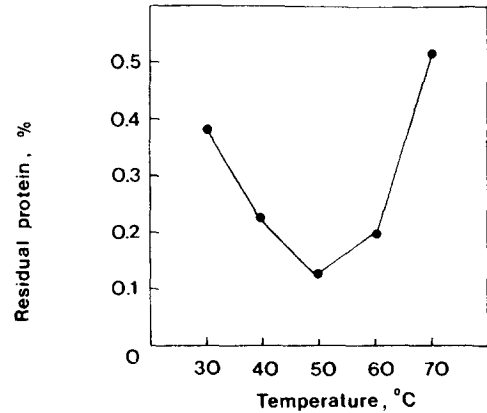


Fig. 3. Effect of temperature on deproteinization of *Scienocera prominens* chitin by Neutrased

Table 3. Comparison of yield and compositions of protein, calcium, phosphorus of chitin prepared from *Solenocera prominens* shell and commercial chitin

Chitin	Yield (%)	Protein (%)	Calcium (mg/100g)	Phosphorus (mg/100g)
Prepared chitin	25.8	0.1	220.6	18.3
Commercial chitin <sup>1)</sup>	—	0.1	170.0	20.2

<sup>1)</sup>Obtained from Kyowa Reizou Co.(Japan).

잔존하는 단백질량은 새우껍질에서는 23%였으나 이를 Neutrased로 처리하여 제거한 키틴에서는 0.12%이었다.

한편 Neutrased를 처리한 후 무기질을 제거하기 위하여 0.1 M EDTA·2Na로 처리했을 때 Ca는 처음에는 8520 mg/100g에서 220.6 mg/100g, 인의 경우도 2312 mg/100g에서 18.3 mg/100g까지 제거되었다. 이러한 결과는 Table 3에서 보는 바와같이 시판되고 있는 키틴의 단백질, 칼슘 및 인의 양과 거의 비슷하였다.

새우껍질을 Neutrased를 이용하여 단백질을 제거한 후 키틴을 만들었을 때의 수율은 25.8%이었다. 이러한 수율은 Hackman 등의 방법<sup>(7)</sup>에 따라 만든 키틴의 수율인 27.5%와는 시료에 따라 다르지만 높거나 거의 비슷한 결과를 나타내었다.

Herzog 등<sup>(9)</sup>은 왕새우 껍질을 papain을 사용하여 20 시간 동안 처리하였을 때 새우껍질의 단백질이 20.8%에서 완제품인 chitin에서는 0.7%로 감소하였다고 보고한 바 있다. Shimahara 등<sup>(10)</sup>은 새우껍질에 단백질 분해 효소를 분비하는 *Pseudomonas maltophilia* LC102를 접종하여 7일 동안 배양했을 때 새우껍질의 25.4%의 단백질이 키틴에서는 0.3%만 남아 있었다고 하였다.

#### 키틴의 IR Spectrum

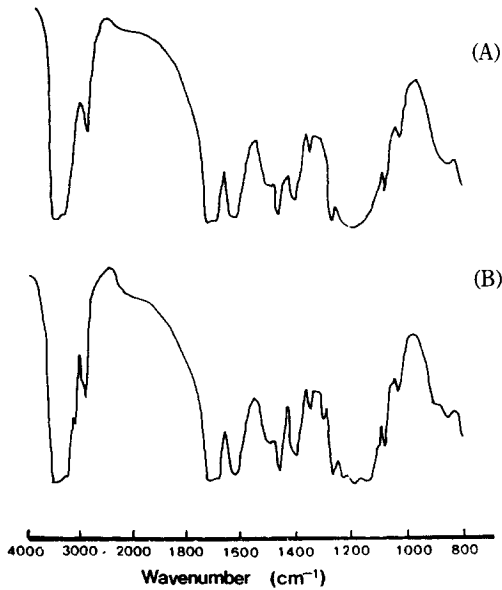


Fig. 4. IR spectra of *Scienocera pnomnents* chitin(A) and commercial chitin(B)

Table 4. Degree of deacetylation and molecular weight of prepared and commercial chitin samples

Sample	Degree of deacetylation(%)	Molecular weight
Prepared chitin	11.0	$1.2 \times 10^8$
Commercial chitin <sup>1)</sup>	10.4	$1.8 \times 10^6$

<sup>1)</sup>Obtained from Kyowa Reizou Co.(Japan).

Neutrase로 처리하여 추출 정제한 키틴을 표준 키틴과 비교한 IR Spectrum은 Fig. 4와 같다. 키틴산에서 확인 되는  $1655 \text{ cm}^{-1}$ (amide)과  $1735 \text{ cm}^{-1}$ (C=O)의 신축 진동을 관찰할 수 있으며 대롱 수염새우와 표준 키틴산의 IR Spectrum은 동일하였다.

탈 아세틸화도와 분자량

Table 4에서와 같이 본 실험에서 만들어진 키틴과 시판 키틴의 탈 아세틸화도는 11.0% 및 10.4%이었다. 본 실험에서 만들어진 키틴의 탈아세틸화는 Berkeley<sup>(19)</sup>와 Muzzarelli의 결과<sup>(21)</sup>와 유사하였고 안과 이<sup>(22)</sup>가 보고한 탈아세틸화도 11-18%와 비슷하거나 약간 낮은 수치였다. 이와같이 탈아세틸화도는 키틴의 제조방법과 시료에 따른 차이 때문이다.

키틴의 분자량은  $1.2 \times 10^8$  dalton이었고 시판 키틴은  $1.8 \times 10^6$  dalton으로 Neutrase로 처리하여 만든 키틴의 분자량이 다소 높았다. Santoso 등<sup>(23)</sup>은 인도네시아산 새우의 껍질에서 분자량이 큰 키틴을 얻었다고 하였다. 이러한 결과로 보아 Neutrase로 처리하여 분자량이 비

교적 높은 키틴을 만들 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

대롱새우껍질로 부터 Neutrase처리로 단백질을 제거하고 0.1 M EDTA·2Na로 무기질을 제거하여 키틴을 분리 정제하였다. 키틴의 정제시 Neutrase 3 mg/ml를 첨가하여 pH 6.0, 50°C 에서 처리하였을때 단백질 제거 효과가 가장 좋았다. Neutrase처리에 의한 단백질 제거, 탈 아세틸화도 그리고 칼슘, 인함량은 시판 키틴과 거의 비슷하였다. 분자량은  $1.2 \times 10^8$  dalton이었고 키틴의 수율은 28.5%이었다.

감사의 말씀

본 연구는 1993년도 경성대학교 교비지원금의 일부로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

문 헌

1. 平野茂博, 키틴, 키토산의 利用. シエムシ, p.645 (1986)
2. Knorr, D.: Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.*, 38(1), 85 (1984)
3. Sugano, M., Fujikawa, T., Hiratsuji, Y., Nakashima, K., Fukuda, N. and Hasegawa, Y.: A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33, 787 (1980)
4. Sannan, T., Kurita, K. and Iwakura, J.: Studies on chitin. *Makromol. Chem.*, 176, 1191 (1964)
5. 佐藤道鎔, 키틴, 키토산의 應用, 키틴, 키토산 研究會編. 技報堂出版, p.211 (1980)
6. Hackman, P.H.: Studies on chitin. *Aust. J. Biol. Sci.*, 7, 168 (1954)
7. Austin, P.R., Brine, C.J., Castle, J.E. and Zikakis, J.P.: Chitin, new facet of research. *Science*, 212, 749 (1981)
8. Muzzarelli, R.A.A.: Chitin. Pergamon Press Oxford, p.89 (1977)
9. Herzog, K.H., Grossman, H. and Lieflander, M.: Zur Chemie eines Chitin-Proteidsaus Flu-β-krebs (Astacus fluviatilis). *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem.*, 356, 1067 (1975)
10. Shimahara, K., Takiguchi, Y., Ohkuchi, K., Kitamura, K. and Okada, O.: Chemical composition and some properties of crustacean chitin, prepared by use of proteolytic activity of *Pseudomonas maltophilia* LC 102. In "Chitin, Chitosan and Related Enzymes". Zikakis (ed). Academic Press Inc., New York, p.239 (1984)
11. 辛孝善: 食品分析. 新光出版社, p.86 (1985)
12. AOAC: Official methods of analysis, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists. *Washington D.C.*, p.14 (1980)
13. 윤일섭, 이동화, 오 섭, 홍영석: 식품분석. 형설출판사, p.85 (1975)
14. Rupley, J.A.: The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloride and the preparation of low-molecular

- weight substrate for lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta.*, **83** (1964)
15. Reissig, J.L., Strominger, J.L. and Leloir, L.F.: A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. *J. Biol. Chem.*, **217**, 959 (1955)
  16. Tsuji, A., Kanoshita, T. and Hoshino, M.: Analytical chemical studies on amino sugars, II, determination of hexosamines using 3-method-2-benzo-thiazolone hydrazone hydrochloride. *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 1505 (1969)
  17. 키친, 키토산 研究會編: 키친, 키토산 實驗マニュアル, 技報堂出版, p.57 (1991)
  18. 키친, 키토산 研究會編: 키친, 키토산 實驗マニュアル, 技報堂出版, p.65 (1991)
  19. Berkeley, R.C.W.: Chitin, chitosan and their degradative enzymes. In "Microbial Polysaccharides and Polysaccharases". Berkeley et al. eds. Academic Press. London, New York. p.205 (1979)
  20. Novo, N.: Neutrase, product sheet, In *Enzyme Process division*, p.213, (1990)
  21. Muzzarelli, R.A.A.: "Chitin", Pergamon Press, New York, p.91 (1977)
  22. 안창범, 이용호: 갑각류 부산물을 이용한 키틴의 제조 및 이용에 관한 연구. *한국수산학회지*, **25**(1), 45 (1992)
  23. Santoso, U., Wada, M., Koguchi, T., Iijima, T., Yamada, K., Tadokoro, T. and Maekawa, A.: Isolation and purification of chitin from Indonesia shrimp shells using actinase E. *Agri. Sci. Tokyo Nogyo Daigaku*, **38**, 27 (1993)
- 
- (1994년 4월 4일 접수)