

키토산 제조시 반응 온도와 시간 및 입자크기가 키토산의 물리화학적 특성에 미치는 영향

이우진* · 한범구 · 박인호 · 박승현 · 오훈일** · 조도현

아주대학교 생물공학과

*삼아벤처, **세종대학교 식품공학과

Effects of Reaction Temperature, Time and Particle Size on the Physicochemical Properties of Chitosans

Woo-Jin Lee*, Beom-Ku Han, In-Ho Park, Seung-Heyon Park,
Hoon-Il Oh** and Do-Hyun Jo

Department of Biotechnology, Ajou University, *Sama Venture Co.

**Department of Food Science and Technology, Sejong University

Abstract

In order to study the effects of reaction temperature, time and particle size on the physicochemical properties of chitosan, commercially available chitin was treated with 50%(w/w) NaOH. To obtain 78% of deacetylation, a treatment of 6 hours at 100°C(Ch-100), 20 minutes at 120°C(Ch-120) or 10 minutes at 140°C(Ch-140) was necessary. The resulting chitosans showed a different viscosity; 180cps for Ch-100, 130cps for Ch-120, 30cps for Ch-140. The residence time at 80°C also decreased the viscosity of the chitosan but the reduction in the particle size of chitin largely favored deacetylation and resulted in a higher viscosity of the chitosan. Compared with chitin, the capacity of water and oil absorption of chitosan was not significantly improved. However, the capacity of dye absorption was increased by 4 times by the deacetylation. In addition the IR spectra of chitosans showed less sharp absorption bands than that of chitin.

Key words: chitin, chitosan, reaction conditions, physicochemical properties

서 론

키토산은 2-acetoamido-2-deoxy-D-glucose(N-acetyl-D-glucosamine)이 $\beta(1\rightarrow4)$ 결합으로 이루어진 생체 고분자 물질로 셀룰로오스 다음으로 지구상에 풍부한 천연자원이다. 키토산은 주로 게, 새우껍질, 갑각류 및 곤충류 등에 존재하며, 갑각류 가공 폐기물로부터 얻어지는 키토산의 세계적인 생산량은 연간 약 4만톤 가량이 된다⁽¹⁾.

이러한 키토산을 친한 NaOH나 효소적으로 탈아세틸화하면 2-amino-2-deoxy- β -D-glucose(glucosamine)의 중합체인 키토산이 얻어진다. 키토산은 천연 다당류 중 유일하게 염기적 특성을 갖고, 키토산에 비해 약산에 대한 용해도가 좋고 이용가능성도 증가한다. 또한 키토산과 더불어 인공피복, 생분해성 플라스틱, 화장품, 의약품, 응집제 등의 분야에서 실용화되고 있거나 실용화를 위한 연구가 활발히 진행되고 있다⁽²⁾.

식품과 관련된 현재까지의 연구를 보면 Knorr^(3,4)에

의하면 키토산과 키토산의 흡수성, 지방결합력, 색소흡착력 등을 조사하여 기능성 식품첨가물로 이용이 가능하다고 보고하였으며 조⁽⁵⁾는 저분자량 키토산을 물김치, 김치, 두부 등에 첨가한 결과 이들 제품의 저장수명을 어느정도 연장시킬 수 있다고 보고하였다. 이밖에 국내에서도 키토산의 일반적인 물성측정 방법으로 흡수성, 지방결합력, 색소흡착력 등을 보고하였다^(6,7).

키토산의 규격을 표시할 때 점도와 탈아세틸화도도 많이 표시하며 이것은 키토산 제조시 NaOH의 농도, 반응시간, 반응온도 등에 의해 결정되며, 이 중에서 NaOH의 농도는 50% 정도가 가장 효과적인 것으로 밝혀졌다^(6,8,9). 반응시간과 반응온도에 대하여서는 조 등⁽⁸⁾은 100°C에서 NaOH의 농도와 반응시간에 따른 키토산의 물성을 보고하였고, 안 등⁽⁶⁾은 100~110°C에서 47% NaOH로 2시간 반응시켜 생산한 키토산의 물성에 대해 보고하였다. 또한 佐藤道惇⁽⁹⁾은 100~130°C에서 온도증가에 따른 키토산의 점도와 탈아세틸화도를 예측하였다. 그러나 지금까지의 키토산제조에 관한 연구는 제조공정상의 비법으로 온도와 반응시간에 따른 체계적인 연구 결과가 거의 보고되지 않았고 particle size의 크기에

대한 연구도 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 동해에서 어획되는 홍게(*Chitinonecetes opilio*)를 약산, 약알칼리로 처리하여⁽²⁾ 공업적으로 생산된 키틴을 구입하여 탈아세틸 반응온도와 반응시간 및 particle size에 따른 키틴산의 물리화학적 성질을 조사하여 키틴산 이용에 대한 기초자료로 삼고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

홍게(*Chitinonecetes opilio*)로부터 게살을 제거하고 난 뒤에 약산과 약알칼리로 처리하여 얻어진 키틴(회분함량 3.5%)을 동우실업(강원도 속초시 소재)으로부터 구입하여 분쇄하지 않은 상태(1 cm×4~5 cm, W×L)로 사용하였으나 필요한 경우에는 cutting mill(동양과학)을 이용하여 0.5 cm×0.5 cm(W×L) 이하로 분쇄하여 사용하였다. NaOH는 식품공업용을 사용하였고 다른 분석용 시약은 Merck사나 Fluka사의 GR급을 사용하였다.

키틴산의 제조

키틴 160g을 미리 정하여진 온도로 예열한 50%(w/w) NaOH용액 4l에 가한 후에 교반하면서 제조하였다. 100℃에서는 6시간까지, 120℃와 140℃에서는 1시간에서 일정시간 간격으로 시료를 취해서 NaOH용액을 제거하고 물로 중화가 될 때 까지 6~8회 정도 세척한 후 40℃에서 하룻 밤동안 열풍건조하여 키틴산을 제조하였다.

키틴산의 물리화학적 특성 측정

점도는 키틴산을 0.1% 초산용액에 0.5%(w/v)가 되도록 녹여서 Brookfield점도계의 LV type spindle No.3를 사용하여 측정하였다. 탈아세틸화도는 polyvinylsulfate의 칼륨염(PVSK)을 이용한 colloidal침전법⁽¹⁰⁾을 이용하였다. 그러나 키틴의 경우에는 0.1% 초산용액에 불용성이므로 IR법으로 측정하였다⁽¹¹⁾. 즉, IR용 KBr에 1%(w/w) 되게 한 후 압력을 가하여 투명한 박막을 만든 후 Nicolet사의 제품(Magna-IR spectrophotometer 550)으로 500~4000 cm⁻¹에서 측정하여 2878 cm⁻¹(C-H group)과 1550 cm⁻¹(amide II group)을 기준으로 하여 다음의 식⁽¹²⁾으로 계산하였다.

$$\text{탈아세틸화도(\%)} = 98.03 - 34.68 (A_{1550}/A_{2878})$$

A: absorptivity

색소흡착 실험은 식용색소인 적색 40호(Red No.40)를 이용하여 실험하였다. 30 mesh를 통과한 시료 0.1g에 색소를 일정농도(5~20 mg dye/l water)가 되도록 증류수에 녹인 용액 10 ml를 가하여 10초간 교반하였다. 1 시간동안 20분 간격으로 5초씩 교반한 뒤에 원심분리(1,600g, 5 min)하여 상등액을 505 nm에서 측정하여 검량선과 비교하여 농도를 계산하였다.

수분 및 지방 흡수성 측정은 Lin 등의 방법⁽¹³⁾으로

하였다. 즉, 30 mesh를 통과한 시료 0.5g을 원심분리관에 넣고 전체 무게를 잰 후 수분흡수의 경우 증류수 30 ml를, 지방흡수의 경우에는 대두유(동방유량) 20 ml를 가하고 실온에서 교반한 뒤에 1시간 동안 15분 간격으로 5초씩 교반한 뒤에 원심분리(1,600g, 25 min)후 상등액을 제거하고 무게를 측정하여 건조시료 100g에 대한 수분흡수량(g)으로 나타내었다. 시료간의 유의성은 student t-test로 하였다.

결과 및 고찰

반응 온도와 시간에 따른 키틴산의 탈아세틸화도와 점도 키틴을 분쇄하지 않은 상태(1 cm×4~5 cm, W×L)에서 50% NaOH용액의 온도를 100℃, 120℃, 140℃로 달리하여 반응시간별로 탈아세틸화도와 점도를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 100℃의 경우에는 반응시간의 증가에 따른 탈아세틸화도가 1시간 까지는 급증하였으나 그 이후에는 아주 완만하여 6시간이 되어도 80%에 이르지 못하였으며 점도는 2시간 후에 급격히 감소하였으나 3시간 후에는 완만하게 감소하여 6시간에서는 180 cps에 이르렀다. 120℃의 경우에는 20분 이후부터 탈아세틸화는 아주 완만하게 진행이 되어 60분정도 반응시켰을 때 탈아세틸화가 80%에 도달하였으며 점도의 변화율은 반응 20분만에 급격히 감소하였으며 그 이후에는 시간에 따라 점점 감소하여 60분에서는 70 cps가 되었다. 140℃에서는 20분에 이미 80%의 탈아세틸화를 보였으며 40분 처리

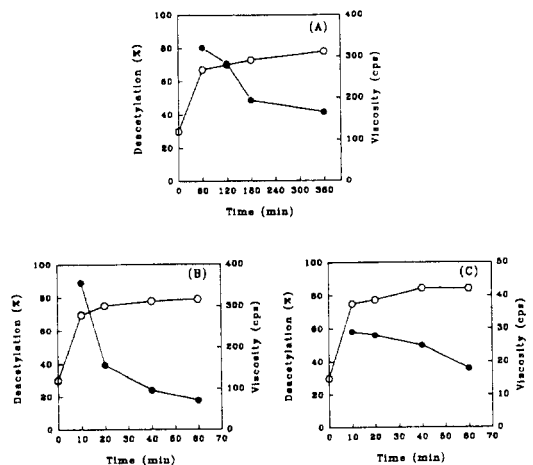


Fig. 1. Effect of the reaction temperature and time on the degree of deacetylation and the viscosity of chitosan obtained from the uncut chitin. The concentration of NaOH was 50%. The viscosity was measured with the 0.5% solution of chitosan in 0.1% acetic acid except that of the zero time, which was calculated on infrared spectroscopy

A: 100℃, B: 120℃, C: 140℃, ○: degree of deacetylation, ●: viscosity

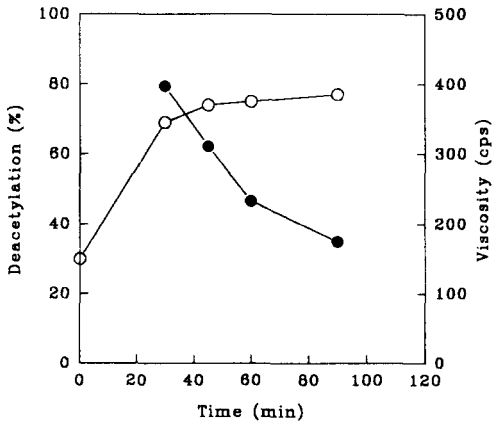


Fig. 2. Effect of size reduction on the deacetylation and viscosity of chitosan obtained from the chitin at 100°C. Chitin was cut into the size of 0.5 cm×0.5 cm(W×L). The viscosity was measured with the 0.5% solution of chitosan in 0.1% acetic acid except that of the zero time, which was calculated on infrared spectroscopy

○: degree of deacetylation, ●: viscosity

시에 탈아세틸화가 82%가 되었으며 그 이후에는 탈아세틸화의 변화가 거의 없었다. 점도 감소율은 140°C의 경우 100°C나 120°C에 비하여 40분 이후에 더 크게 나타났으며 점도의 감소율이 100°C나 120°C와는 다르게 시간에 따라 더 큰 값을 보인 것이 특징이다. Wu와 Bough⁽¹⁴⁾는 100°C에서 분자량의 감소와 탈아세틸화 증가 및 점도의 감소가 동일한 양상을 나타냄을 보임으로서 탈아세틸화가 진행됨에 따른 점도의 감소는 키토산이 분해되어 저분자량으로 되었기 때문으로 사료된다.

이와 같이 78~80% 정도의 탈아세틸화로 나타날 때의 점도는 처리온도에 대해서 각기 다르게 나타나서 100°C에서는 180 cps, 120°C에서는 70 cps, 140°C에서는 30 cps로 나타나서 동일 탈아세틸화에서 고점도의 키토산을 얻으려고 할 때는 100°C가 유리하나 저점도의 키토산을 얻으려고 하면 140°C로 처리하는 것이 유리했다. 그러나 80% 이상의 탈아세틸화를 얻으려면 140°C에서 40분 이상 반응시키는 것이 반응시간, 에너지 효율 등의 면에서 유리하다고 생각된다.

Wu와 Bough⁽¹⁴⁾는 새우껍질을 이용하여 100°C, 50% NaOH용액에서 탈아세틸화도가 1시간에서 73%이고 5시간에서 80%에 도달한 것으로 보고하였는데 이것은 본 실험결과와 일치한다. 그러나 한편 조 등⁽⁸⁾은 50% NaOH용액에서 반응시켰을 때 2시간이면 탈아세틸화가 93% 정도에 도달한다고 보고하여 이와같은 차이는 아마도 particle size의 영향이라고 생각된다(see Fig. 2).

키토산의 입자크기의 영향

키토산을 제조할 때 키토산을 구입상태의 크기인 1 cm×

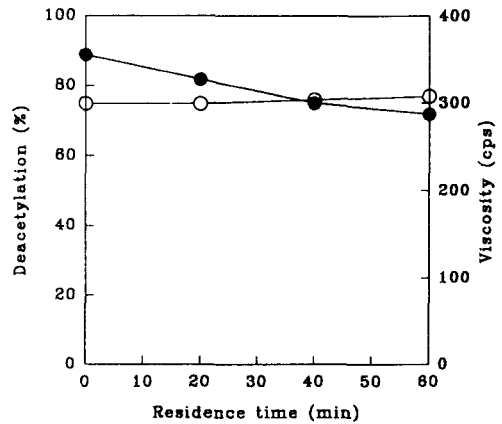


Fig. 3. Effect of the residence time at 80°C on the deacetylation and the viscosity of chitosan obtained from the uncut chitin. The reaction of deacetylation was done with 50% NaOH at 100°C for 45 minutes

○: degree of deacetylation, ●: viscosity

4~5 cm(W×L)로 사용하는 것이 0.5 cm×0.5 cm(W×L) 이하로 분쇄하여 사용하는 것보다 제조공정이 단순하여 유리하다. 그러나 키토산의 크기에 따른 NaOH의 침투속도나 반응 면적등이 차이가 있으므로 키토산을 0.5 cm×0.5 cm (W×L) 이하로 분쇄하여 탈아세틸화도와 점도를 100°C에서 비교하여 보았다(Fig. 2). 50분 정도에서 이미 78%로 탈아세틸화가 일어났으며 그 후에는 탈아세틸화도의 증가가 거의 없었으며 점도도 60분까지는 급격히 감소하였으나 그 이후에는 감소율이 둔화되어 90분에는 180 cps정도였다. 이는 키토산이 1 cm×4~5 cm(W×L)인 Fig. 1A와 비교하여 보면 60분에서는 68%의 탈아세틸화도와 점도 330 cps로 탈아세틸화도와 점도에 있어서 매우 큰 차이를 나타내고 있다. 이는 동일 온도로 동일 시간 반응시키더라도 키토산의 크기가 생성된 키토산의 물리화학적 성질을 결정하는 중요한 요인임을 보여주고 있다. 본 실험에서는 키토산 제조 후 NaOH의 제거가 용이하고, 원료인 키토산에서 별도의 분쇄공정을 피하기 위하여 1 cm×4~5 cm(W×L)를 사용하였다.

탈아세틸 반응 후 80°C에서 잔류시간의 영향

실제로 공장에서는 수톤의 반응탱크를 사용하기 때문에 100°C~140°C로 반응시킨 다음에 바로 냉각하는 것은 용이한 일이 아니나 실험실에서는 100°C~140°C로 반응시킨 후 1시간 정도면 80°C 정도가 되었다. 이러한 상황을 고려하여 100°C에서 45분간 반응시킨 후에 80°C로 유지시켰을 때의 탈아세틸화 정도와 점도의 변화를 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 탈아세틸화는 80°C로 유지하여 60분까지 거의 증가가 없었으나 반면에 점도는 350 cps에서 280 cps로 20% 정도가 감소하였다. 따라서 공업적인 시각에서 일정한 점도를 얻으려면 냉각시간을

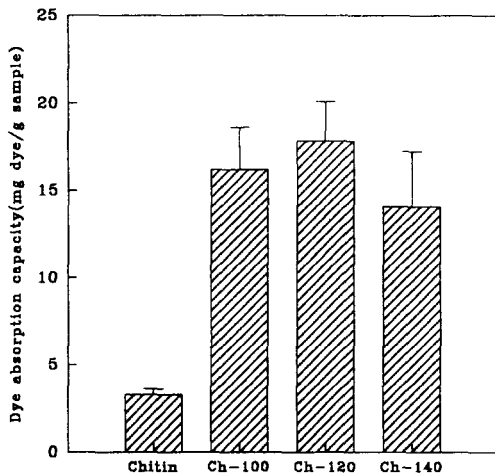


Fig. 4. Dye absorption capacity of chitin and chitosans with the same degree of deacetylation. The chitosan was obtained by the deacetylation of the uncut chitin with 50% NaOH

Ch-100: Chitosan obtained at 100°C for 6 hours.
 Ch-120: Chitosan obtained at 120°C for 20 minutes.
 Ch-140: Chitosan obtained at 140°C for 10 minutes
 Error bar represents the range of triplicates.

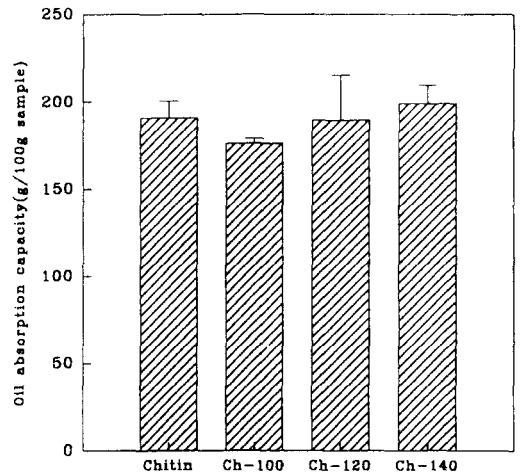


Fig. 6. Oil absorption capacity of chitin and chitosans with the same degree of deacetylation. The chitosan was obtained by the deacetylation of the uncut chitin with 50% NaOH

Ch-100: Chitosan obtained at 100°C for 6 hours.
 Ch-120: Chitosan obtained at 120°C for 20 minutes.
 Ch-140: Chitosan obtained at 140°C for 10 minutes
 Error bar represents the range of triplicates.

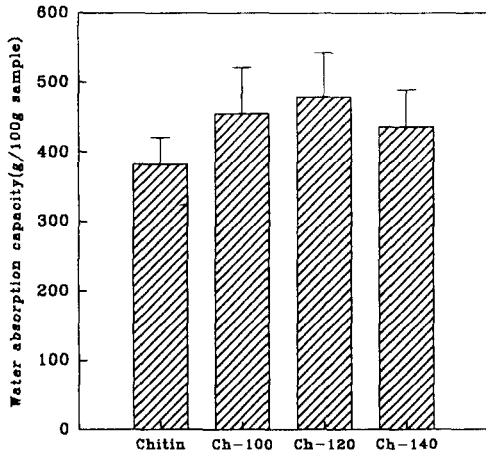


Fig. 5. Water absorption capacity of chitin and chitosans with the same degree of deacetylation. The chitosan was obtained by the deacetylation of the uncut chitin with 50% NaOH

Ch-100: Chitosan obtained at 100°C for 6 hours.
 Ch-120: Chitosan obtained at 120°C for 20 minutes.
 Ch-140: Chitosan obtained at 140°C for 10 minutes
 Error bar represents the range of triplicates.

고려하여 반응시켜야 됨을 보여준다.

동일한 탈아세틸화도에서의 색소흡수, 수분흡수, 지방흡수 및 IR의 비교

탈아세틸화가 78%이면서 점도가 다른 세가지 시료 즉,

100°C에서 6시간(Ch-100), 120°C에서 20분(Ch-120), 140°C에서 10분(Ch-140) 처리한 시료의 색소흡수능, 수분흡수능 및 지방흡수능을 측정하였다. 이들의 점도는 각각 180 cps, 130 cps, 30 cps이었으며 색소 흡수능력을 비교한 결과는 Fig. 4와 같다. 색소흡수능력은 키틴(3.3 ± 0.3 mg)에 비하여 4배 이상 높았으며 시료 1g당 14 ± 3.2 mg ~ 16 ± 2.2 mg의 색소를 흡착하였다. 이것은 적색색소 (Red No.40)가 SO₃ 기를 가지고 있어서 키토산의 NH₂와 결합하기 때문으로 생각되어진다. 키토산 Ch-100과 Ch-120 및 Ch-140는 점도차이에도 불구하고 색소흡수에 있어서는 유의성있는 차이를 보이지 않았다.

수분 흡수성은 Fig. 5와 같이 키틴은 시료 100g당 383 ± 38g의 수분을 흡수한 반면에 키토산은 시료 100g당 436 ± 54g ~ 479 ± 64g의 수분 흡수성을 보여 키틴에 비하여 많은 양의 수분을 흡수하였으나 student t-test에서 유의성은 없었다(P=0.05). 지방 흡수성은 Fig. 6에서 보는 바와 같이 키틴 100g당 191 ± 10g의 지방을 흡수하는 반면에 키토산의 경우에는 100g당 176 ± 3g ~ 200 ± 11g의 흡수를 보여 키틴과 키토산의 차이가 유의하지 않았다. 또한, 키틴과 키토산은 물에 용해되지 않았으며 이는 변동⁽⁷⁾의 보고와 일치하였다.

이들의 IR spectrum은 Fig. 7과 같다. 키틴의 경우에는 2878 cm⁻¹(C-H group), 1550 cm⁻¹(amide II group)의 근처의 peak가 관찰되었고 1,000 ~ 1,200 cm⁻¹ 사이가 여러개의 peak로 갈라져 있으나 키토산의 경우에는 이것이 아주 둔화되어 있으며 키토산 간에는 차이가 거의 없음을 보여주며 이는 Sannan⁽¹⁵⁾ 및 양⁽¹⁶⁾ 등의 결과와

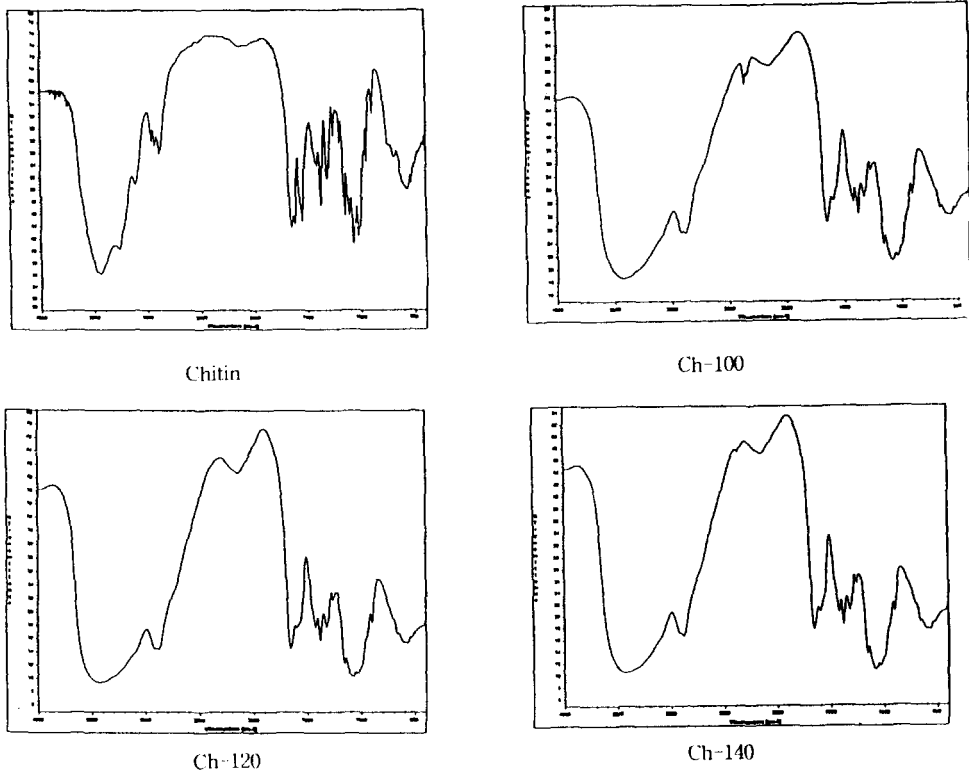


Fig. 7. IR spectrum of the chitin and some chitosans

Chitin: Chitin from Dong-Woo Co.
 Ch-100: Chitosan obtained at 50% NaOH at 100°C for 6 hours.
 Ch-120: Chitosan obtained at 50% NaOH at 120°C for 20 minutes.
 Ch-140: Chitosan obtained at 50% NaOH at 140°C for 10 minutes.

일치한다. 키토산은 아미드의 특성 peak가 1660과 1620 cm^{-1} 에서 나타났으며 동일 탈아세틸화를 갖는 Ch-100, Ch-120, Ch-140에서는 이 peak가 같은 수준으로 감소하여 동일수준의 탈아세틸화가 되었음을 알 수 있었으며 이는 본 실험의 PVSCK를 이용한 탈아세틸화도 측정법의 결과와 일치함을 보였다. 또한 3500~3100 cm^{-1} 사이에 둔화된 band(O-H와 NH)와 2900 cm^{-1} 부근에서 C-H의 peak가 관찰되었다.

세틸화도에서 높은 점도를 유지하였다. 한편 생성된 키토산은 키토산에 비하여 수분흡수, 지방흡수성에서 차이를 보이지 않았으나 색소흡수능력은 평균 4배이상 증가하였다. IR스펙트럼에서는 전반적으로 둔화된 모습을 보였으며 특히 1,000~1,800 cm^{-1} 에서 흡수pattern이 둔화되었다.

요 약

상업적으로 제조된 키토산으로부터 키토산을 제조할 때 반응온도, 시간, 키토산의 입자크기가 제조된 키토산의 물리·화학적 성질에 미치는 영향을 검토하였다. 78% 이상의 탈아세틸화를 시키기 위하여서는 100°C에서는 6시간, 120°C에서는 20분, 140°C에서는 10분 정도를 처리하였으며 이때 생성된 키토산의 점도는 각각 180 cps, 130 cps, 30 cps로 측정되었다. 또한 반응 후 잔류시간이 키토산의 점도를 감소시킴을 보였으며 키토산의 입자크기가 작은 경우에 탈아세틸화를 촉진시키며 동일한 탈아

문 헌

- Allan, G.C., Fox, J.R. and Kary, N.: A critical evaluation of the potential sources of chitin and chitosan. In "Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan" Edited by Muzzarelli R.A.A. and Parizer, E.R. p.64 (1978)
- Muzzarelli R.A.A.: Natural chelating polymers. Pergamon Press, Oxford p.96 (1973)
- Knorr, D.: Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.*, 47, 593 (1982)
- Knorr, D.: Use of chitinous polymers in food. *Food Tech.*, 38, 85 (1984)
- 조학래: 저분자량 키토산의 미생물에 대한 항균력 및 식품보장기능. 부산수산대학교 박사학위논문 (1983)

6. 안창범, 이응호: 갑각류 부산물을 이용한 키틴의 제조 및 이용에 관한 연구 1. 키틴, 키토산 및 미세결정화 키틴의 기능특성. 한국수산학회지, **25**, 45 (1992)
7. 변희국, 강옥주, 김세권: 키틴 및 키토산 유도체의 합성과 그 물리화학적 특성. 한국농화학회지, **35**, 265 (1992)
8. 조성관, 김선정, 정병욱, 김재진, 최규석, 이영후: 부분 탈아세틸화된 키토산의 폐수처리 효과. 한국공업화학회지, **5**, 899 (1994)
9. 佐藤道惇: キチン/キトサンの科學, キチン, キトサンの生産と利用の現狀, 食品化學新聞社, p.33 (1987)
10. 키친, 키토산 研究會編 키친: 키토산 實驗 뉴얼, 枝報堂出版 p.51 (1991)
11. 키친, 키토산 研究會編 키친: 키토산 實驗 뉴얼, 枝報堂出版 p.57 (1991)
12. Kenzo Shimahara and Yasuyuki Takiguchi: Preparation of Crustacean Chitin. In "Methods in Enzymology" edited by Willis A. Woods and Scott T. Kellogg, Academic Press, **161**, 417 (1988)
13. Lin, M.J.Y. and Humbert, E.S.: Certain functional properties of sun flower meal products. *J. Food Sci.*, **39**, 368 (1974)
14. Wu, A.C.M. and Bough, W.A.: A study of variables in the chitosan manufacture process in relation to molecularweight distribution, chemical characteristics and waste-treatment effectiveness. In "Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan." Edited by Muzzarelli R.A.A., Parizer, E.R. p.88 (1978)
15. Sannan, T., Kurita, K. and Iwakura, Y.: Solubility change by alkaline treatment and film casting. *Die Makromol. Chem.*, **176**, 1191 (1975)
16. 양 용, 현준호, 황윤희: Chitin의 산업적 이용을 위한 기초연구. 한국식품과학회지, **24**, 14 (1992)

(1995년 9월 7일 접수)