

반응표면분석에 의한 Chitosan 제조조건 모니터링

정용진 · 이명희 · 이기동
경북과학대학 전통발효식품과

Monitoring for the Process Conditions of Chitosan Using Response Surface Methodology

Yong-Jin Jeong, Myung-Hee Lee and Gee-Dong Lee
Department of Traditional Fermented Food, Kyongbuk College of Science

Abstract

Response surface methodology was used for monitoring physicochemical properties of chitosan with preparation of chitosan. Deacetylation degree of chitosan was in proportion to NaOH concentration for deacetylation of chitosan. The solubility of chitosan was maximized in 52% (concentration of NaOH), 109°C (deacetylation temperature) and 123 min (deacetylation time). Viscosity of chitosan was mainly influenced by concentration of NaOH, and was greatly decreased with the increase of concentration of NaOH. The optimum condition ranges for preparation of chitosan was 52~54% NaOH, 100~115°C in deacetylation temperature and 100~140 min in deacetylation time.

Key words: chitosan, deacetylation, viscosity, solubility, monitoring

서 론

Chitosan의 제조 원료가 되는 chitin은 게, 새우 등 갑각류의 껍질, 곤충류의 cuticle층, 연체동물의 골격과 껍질 등에 존재할 뿐만 아니라 버섯과 같은 균류의 세포벽에도 함유되어 있는 poly-β(1,4)-N-acetyl-D-glucosamine 형태의 천연 고분자 물질로, 지구상에서 cellulose 다음으로 풍부한 유기화합물이다^(1,3). Chitin은 높은 온도에서 강알칼리로 처리하면 chitin내의 아세틸기가 떨어져 나가 70~95% 정도 탈아세틸화되어 chitosan이 생성되는데, 이렇게 생성된 chitosan은 chitin과 달리 묽은 산 용액에 용해되어 점성이 있는 용액이 되며 분자내 유리아미노기가 존재하여 여러 분야에서 다양한 용도로 활용이 가능하다^(2,3). 최근에 고분자물질의 응집제, 화장품에서의 흡습제뿐만 아니라 식품분야에서도 콜레스테롤 강하제, 보조제, 포장제, 제산제, 유화제, 착색제 및 탈색제, 보습제 등으로 이용되고 있으며^(4,6) Kim과 Jeon⁽⁷⁾은 chitin과 chitosan에 대한 안정성 실험결과 인체에는 안전하다고 보고되어 이용

가능성이 한층 광범위 해지고 있다.

Chitosan의 품질은 탈아세틸화 정도에 따라 구분되어 표시되는데 탈아세틸화는 chitosan 제조시 NaOH의 농도, 반응시간, 반응온도 등의 탈아세틸화 조건에 의해 결정된다. 그러나 현재까지 chitosan 제조과정의 품질변화에 관한 연구는 대부분이 NaOH 농도, 반응시간 및 온도 등의 요인변수들 중 한가지를 제외한 나머지 요인변수들을 일정하게 하여 한가지 요인에 따른 조건을 확립하는 one-factor-at-time 방법을 활용하고 있는 실정이다^(2,5). 그러나 chitosan 제조과정에서 NaOH 농도, 반응시간 및 온도등의 요인별 상호작용에 따른 공정상의 최적화를 위하여 chitosan 제조과정중의 물리화학적 성질 및 품질변화에 대한 예측모델의 개발이 요구된다⁽⁶⁾.

따라서 본 연구에서는 chitin의 탈아세틸화 과정에서 생성되는 chitosan의 점도, 용해도 및 탈아세틸화도의 변화를 반응표면분석에 의하여 모니터링하였다.

재료 및 방법

재료

동해에서 어획되는 홍게(*Chitonocetes opilio*)를 약

Corresponding author: Yong-Jin Jeong, Department of Traditional Fermented Food, Kyongbuk College of Science, Chilkok, Kyongbuk 718-850, Korea

산, 약알칼리로 처리하여 공업적으로 생산된 chitin을 (주)영덕키토산으로부터 구입하여 사용하였다.

실험계획

Chitosan 제조조건에 따른 영향을 모니터링하고자 중심합성실험계획¹⁾에 따라 각각의 설정된 조건에서 chitosan을 제조하였으며, 반응표면분석을 위해서 SAS (statistical analysis system)를 이용하였다. 그리고 4차원 반응표면을 그리기 위해서 Mathematica program을 이용하였다. Chitosan 제조 방법은 Johnson과 Peniston의 방법⁽¹⁰⁾에 준하였으며, NaOH의 농도(40~60%, X_1), 탈아세틸화 온도(80~120°C, X_2) 및 탈아세틸화 시간(60~180 min, X_3)이었으며, 이들 요인변수들은 -2, -1, 0, 1, 2로 5수준으로 부호화 하였다(Table 1). 또 chitosan의 품질특성에 관련된 반응변수(Y_n)로는 탈아세틸화도(Y_{Da}), 용해도(Y_{sol}) 및 점도(Y_{vis})로 하였고, 3개의 chitosan 제조 조건이 5수준을 갖도록 중심합성계획을 수립하고 16개의 설정된 조건으로 실험을 실시하였다.

탈아세틸화도 및 용해도 측정

Chitosan의 탈아세틸화도의 측정은 Kina⁽¹¹⁾ 등의 colloid 적정법으로 정량하였으며, 용해도는 Rutherford와 Austin의 방법⁽¹²⁾에 따라 실시하였다.

점도 측정

Chitosan의 점도는 각각 5% lithium chloride (LiCl)를 함유한 N,N-dimethylacetamide (DMAC-5% LiCl) 용액과 1% 초산용액에 chitosan을 1% 농도로 첨가하여 실온에서 1.5시간 동안 교반한 후 Brookfield viscometer (Modle RVT, Brookfield Engineering Laboratories, Inc, Stoughton, MA)를 사용하여 측정하였다. 20°C에서 spindle No. 1으로 5, 10, 20, 50 및 100 rpm에서 각각 측정된 값을 평균하여 centipoise (cp)로 나타내었다⁽¹⁾.

결과 및 고찰

탈아세틸화도의 변화

Chitin의 탈아세틸화에 따른 chitosan의 이화학적 특성을 알아보기로 점도, 용해도 및 탈아세틸화도의 변화를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 중심합성계획에 의해 설계된 조건으로 chitosan의 탈아세틸화도의 변화에 대한 반응표면은 Fig. 1에 나타내었다. Chitosan의 제조에 있어서 세 가지 요인변수인 NaOH 농도(40~60%), 탈아세틸화 온도(80~120°C) 및 탈아세틸화 시간(60~180 min)이 각각 변화됨에 따라 chitosan의 탈아세틸화도에 대한 반응표면회귀식은 다음과 같다.

Table 1. Experimental data on deacetylation, solubility and viscosity degree of chitosan under different conditions based on central composite design for response surface analysis

Chitosan processing conditions ¹⁾			Physicochemical properties of chitosan		
NaOH concentration (%)	Temperature (°C)	Time (min)	Deacetylation (%)	Solubility (%)	Viscosity (cp)
45 (-1)	90 (-1)	90 (-1)	70	64	165
45 (-1)	90 (-1)	150 (1)	72	63	138
45 (-1)	110 (1)	90 (-1)	71	70	122
45 (-1)	110 (1)	150 (1)	71	71	118
55 (1)	90 (-1)	90 (-1)	80	73	70
55 (1)	90 (-1)	150 (1)	82	74	65
55 (1)	110 (1)	90 (-1)	82	78	50
55 (1)	110 (1)	150 (1)	81	77	45
50 (0)	100 (0)	120 (0)	80	82	95
50 (0)	100 (0)	120 (0)	79	82	92
60 (2)	100 (0)	120 (0)	92	68	20
40 (-2)	100 (0)	120 (0)	68	64	185
50 (0)	120 (2)	120 (0)	78	82	85
50 (0)	80 (-2)	120 (0)	77	67	98
50 (0)	100 (0)	180 (2)	78	78	90
50 (0)	100 (0)	60 (-2)	78	76	102

¹⁾The number of experimental conditions by central composite design.

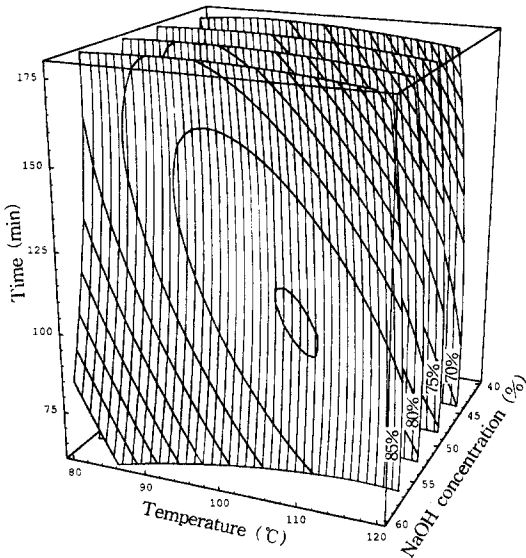


Fig. 1. Response surface for deacetylation degree of chitosan at constant values (70-75-80-85%) as a function of NaOH concentration, temperature and time in chitosan processing.

$$\begin{aligned}
 Y_{DA} = & -41.062500 + 0.462500X_1 + 1.143750X_2 \\
 & + 0.356250X_3 + 0.002500X_1X_2 - 0.000833X_1X_3 \\
 & - 0.002083X_2X_3 + 0.005000X_1^2 - 0.005000X_2^2 \\
 & - 0.000417X_3^2
 \end{aligned}$$

Chitosan의 탈아세틸화도에 대한 R²는 0.9410으로 유의성이 1% 이내의 유의수준에서 인정되었다. Chitin의 탈아세틸화에 대한 chitosan 제조조건의 영향(Table 3)은 NaOH 농도에 대한 F-ratio가 23.321로서 1% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되어 NaOH 농도의 영향을 크게 받고 있었으며, 설정된 범위 내에서는 탈아세틸화 온도 및 시간의 영향은 거의 없었다. Chitin의 탈아세틸화에 대한 4차원 반응표면은 Fig. 1과 같

으며, NaOH 농도가 증가함에 따라 탈아세틸화도가 비례하여 증가하는 것으로 나타났다. Lee 등⁽¹³⁾은 NaOH의 농도가 증가함에 따라 탈아세틸화도가 증가하였으나 NaOH 농도의 증가에 비례하여 증가하지는 않았으며, 50% NaOH으로 3시간 처리시 90°C에서 130°C까지는 온도상승에 비례하여 탈아세틸화도가 크게 증가하였다고 보고하여 본 실험 내용과는 상반되는 결과였다. 그리고 설정된 실험구간내에서 온도와 시간은 chitin의 탈아세틸화에 거의 영향을 미치지 않아 온도와 시간의 변화에 따른 탈아세틸화도의 변화는 거의 없었다. 이러한 결과는 Lee 등⁽¹⁴⁾이 120°C의 경우에 20분 이후부터 탈아세틸화는 아주 완만하게 진행되어 60분 정도 반응시 탈아세틸화도가 80%에 도달하여 아주 완만하게 진행되었다고 보고한 내용과 유사한 결과로서 60분 이후에는 온도와 시간이 탈아세틸화도의 변화에 거의 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다. 실험계획 범위 내에서 탈아세틸화도에 대한 최소치는 NaOH 농도(40.09%), 탈아세틸화 온도(99.34°C) 및 탈아세틸화 시간(112.14 min)에서 68%로 나타났다. 최대 탈아세틸화도는 NaOH 농도(59.98%), 탈아세틸화 온도(101.13°C) 및 탈아세틸화 시간(118.95 min)에서 90%로 나타났으며, 정상점은 안장점의 형태를 나타내었다(Table 2).

용해도 변화

Chitosan의 제조에 있어서 NaOH 농도, 탈아세틸화 온도 및 탈아세틸화 시간이 각각 변화됨에 따라 생성된 chitosan의 용해도에 대한 반응표면회귀식은 다음과 같다.

$$\begin{aligned}
 Y_{sol} = & -662.062500 + 18.025000X_1 + 4.825000X_2 \\
 & + 0.341667X_3 - 0.015000X_1X_2 - 0.160000X_1^2 \\
 & - 0.018750X_2^2 - 0.001389X_3^2
 \end{aligned}$$

용해도에 대한 R²는 0.8445로 유의성이 10% 이내의

Table 2. Predicted levels of chitosan process conditions for the optimum responses of deacetylation degree, solubility and viscosity of chitosan by the ridge analysis

Condition	Physicochemical properties of chitosan					
	Deacetylation (%)		Solubility (%)		Viscosity (cp)	
	min	max	min	max	min	max
NaOH concentration (%)	40.09	59.98	40.78	51.28	59.95	40.56
Temperature (°C)	99.34	101.13	92.26	109.58	101.80	94.79
Time (min)	112.14	118.95	118.96	123.86	117.01	107.82
Responses	67.51	89.84	57.03	79.39	22.23	189.02
Morphology	saddle point		maximum		saddle point	

Table 3. Analysis of variables for regression model of deacetylation degree, solubility and viscosity of chitosan on chitosan processing

Processing conditions	F-ratio		
	Deacetylation	Solubility	Viscosity
NaOH concentration (%)	23.321 ³⁾	5.462 ²⁾	81.458 ³⁾
Temperature (°C)	0.368	3.385 ¹⁾	3.679 ¹⁾
Time (min)	0.285	0.383	1.225

¹⁾Significant at 10% level.

²⁾Significant at 5% level.

³⁾Significant at 1% level.

유의수준에서 인정되었다. Chitosan의 용해도에 대한 탈아세틸화의 영향은 Table 3에 나타난 것처럼 탈아세틸화를 위한 NaOH 농도에서 F-ratio가 5.462로서 5% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되어 NaOH 농도의 영향을 주로 받고 있었으며, 탈아세틸화 온도의 영향도 3.386로서 10% 이내의 유의수준에서 인정되었다. 그러나 탈아세틸화 시간은 크게 영향을 미치지 않았다. 생성된 chitosan의 용해도에 대한 4차원 반응표면은 Fig. 2와 같이 나타났다. NaOH 농도가 증가함에 따라 생성된 chitosan의 용해도가 비례하여 증가하는 것이 아니라 NaOH 농도가 51%에서 용해도가 가장 높게 나타났으며, 51% 이상의 높은 농도에서 생성된 chitosan의 용해도는 상대적으로 떨어졌다. 탈아세틸화 온도와 시간 또한 증가함에 따라 용해도가 증가하

는 것이 아니라 109°C까지는 온도가 증가함에 따라 증가하였으나 그 이상의 온도에서는 온도의 증가와 함께 감소하였으며, 시간은 123분까지 시간의 경과에 따라 증가하지만 그 이상에서는 다시 감소하였다. 실험계획 범위 내에서 용해도에 대한 최솟치는 NaOH 농도(40.78%), 탈아세틸화 온도(92.26°C) 및 탈아세틸화 시간(118.96 min)의 조건으로 생성된 chitosan에서 57%로 나타났고 최대 용해도는 NaOH 농도(51.28%), 탈아세틸화 온도(109.58°C) 및 탈아세틸화 시간(123.86 min)에서 79%로 나타났으며, 정상점은 최대점의 형태를 나타내었다(Table 2).

점도의 변화

NaOH 농도, 탈아세틸화 온도 및 탈아세틸화 시간이 각각 변화됨에 따라 생성된 chitosan의 점도에 대한 반응표면회귀식은 다음과 같으며,

$$Y_{vis} = 1285.125000 * -24.887500X_1 * -3.831250X_2 - 2.135417X_3 + 0.057500X_1X_2 + 0.017500X_1X_3 + 0.009583X_2X_3 + 0.090000X_1^2 - 0.005000X_2^2 + 0.000694X_3^2$$

R2는 0.9703으로 유의성이 1% 이내의 유의수준에서 인정되었다. Chitosan의 점도에 대한 탈아세틸화 조건의 영향은 Table 3와 Fig. 3에 나타난 것처럼 탈아세틸

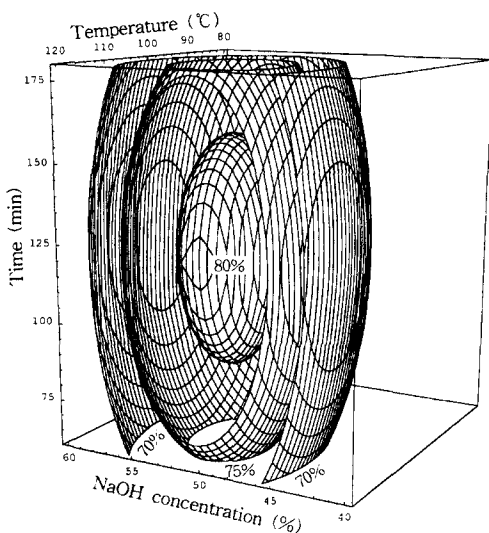


Fig. 2. Response surface for solubility of chitosan at constant values (70-75-80%) as a function of NaOH concentration, temperature and time in chitosan processing.

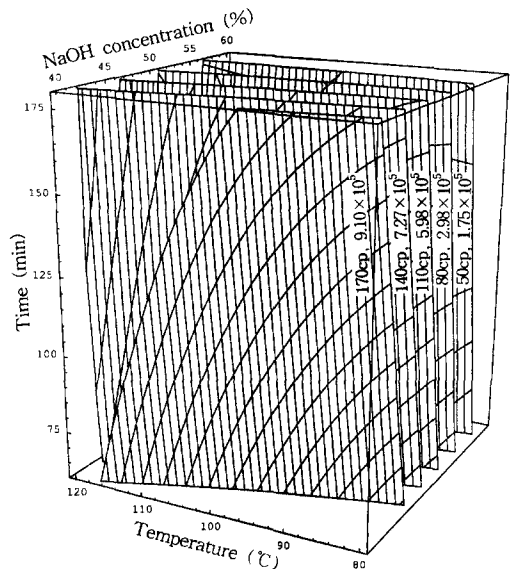


Fig. 3. Response surface for viscosity of chitosan at constant values (viscosity: 50-80-110-140-170 cp) as a function of NaOH concentration, temperature and time in chitosan processing.

화를 위한 NaOH 농도에서 F-ratio가 81.458로서 1% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되어 NaOH 농도의 영향을 주로 받고 있음을 알 수 있었으며, NaOH 농도가 증가함에 따라 점도가 급격히 감소하였다. 탈아세틸화도의 증가와 점도의 감소와는 서로 반비례 관계에 있음을 알 수 있었다. 그러나 탈아세틸화 온도와 시간은 F-ratio가 각각 3.679 및 1.225로서 점도에 크게 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 Lee 등⁽¹⁴⁾이 120°C의 경우에는 반응 20분만에 급격히 감소하였으며 그 이후에는 시간의 경과에 따라 점점 감소하여 60분에서는 70 cp가 되었다고 보고한 내용과 유사한 결과로서 60분 이후에는 온도와 시간이 탈아세틸화에 거의 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었으며, 50% NaOH 용액 및 100°C에서 반응시간이 증가함에 따라 점도가 급격히 감소하여 6시간 경과시 180 cp가 되었다고 하였으나 본 실험에서는 140 cp 이하로 나타나 상이한 결과를 나타냈다. 실험계획 범위 내에서 점도에 대한 최소치는 NaOH 농도(59.95%), 탈아세틸화 온도(101.80°C) 및 탈아세틸화 시간(117.01 min)에서 22 cp로 나타났으며, 최대 점도는 NaOH 농도(40.56%), 탈아세틸화 온도(94.79°C) 및 탈아세틸화 시간(107.82 min)에서 189 cp로 나타내는 안장점의 형태를 나타내

고 있었다(Table 2).

Chitosan 제조조건 최적화

Chitosan의 제조조건을 최적화하기 위하여 각 반응 표면을 겹쳐서 탈아세틸화도 및 용해도 모두 최대치를 얻을 수 있는 4차원 반응표면을 Fig. 4와 같이 나타내었다. 각 반응표면을 겹쳐서 그린 반응표면으로부터 예측된 최적조건은 Fig. 4의 어두운 부분에 나타내었으며, 최적 조건범위는 NaOH 농도가 52~54%, 탈아세틸화 온도가 100~115°C 및 탈아세틸화 시간이 100~140분으로 나타났다. 이 같은 예측 결과에 대한 모델식의 신뢰성을 확인하기 위하여 최적조건 범위내의 임의의 최적조건(NaOH 농도 53%, 탈아세틸화 온도 108°C 및 탈아세틸화 시간 117 min)으로 탈아세틸화 시킨 후 이들의 이화학적 특성을 측정하여 본 결과, 실제 측정된 값(탈아세틸화도 80.9%, 용해도 81.0%, 점도 120.0 cp)은 예측된 값(탈아세틸화도 81.5%, 용해도 81.3%, 점도 118.8 cp)과 유사한 수준으로 비교되었다.

이상의 결과와 같이 4차원 반응표면분석으로 chitosan 제조조건 범위를 구할 수 있었으며, chitin의 탈아세틸화에 따른 chitosan의 탈아세틸화도, 용해도 및 점도의 변화를 모니터링할 수 있었다.

요 약

반응표면분석에 의하여 chitosan 제조조건에 따른 chitosan의 이화학적 특성을 모니터링하였다. 탈아세틸화도는 NaOH 농도가 증가함에 따라 급격히 감소하였다. Chitosan의 용해도는 NaOH 농도가 51%에서 가장 높았으며, 탈아세틸화 온도 및 시간은 각각 109°C, 123분에서 가장 높았다. Chitosan의 점도에 대한 탈아세틸화 조건의 영향은 NaOH 농도의 영향을 주로 받고 있었다. Chitin의 탈아세틸화에 따른 chitosan의 최적 제조조건범위는 NaOH 농도(52~54%), 탈아세틸화 온도(100~115°C) 및 탈아세틸화 시간(100~140 min)이었다.

문 헌

1. Austin, P.R., Brine. C.J., Castle, J.E. and Zikakis, J.P.: Chitin: New facets of research. *Science*, **212**, 749-753 (1981)
2. Knorr, D.: Use of chitinous polymers in food. *Food Tech.*, **38**, 85-97 (1984)
3. Muzzarelli, R.A.A.: Chitin. *Pergamon Press*, Oxford, p. 94-101 (1977)

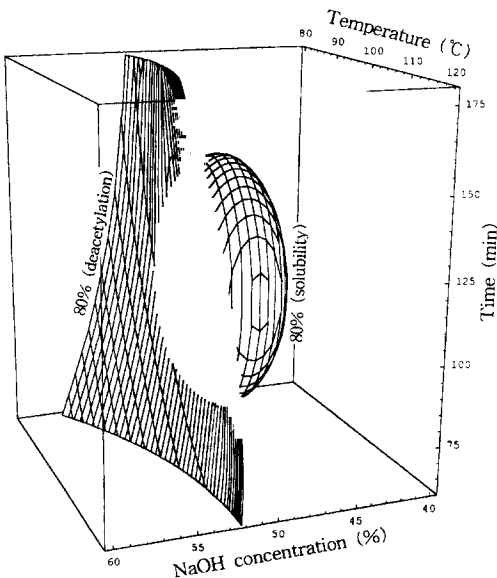


Fig. 4. Superimposed response surfaces {(A): NaOH concentration, temperature and time, (B): NaOH concentration and time, and (C): temperature and time} for optimization of physicochemical properties (deacetylation degree: 80% and solubility: 80%) of chitosan as a function of NaOH concentration, temperature and time in chitosan processing.

4. Bough, W.A.: Chitosan - a polymer from seafood waste, for use treatment of food processing wastes and activated sludge. *Process Biochem.*, **11**, 13-16 (1976)
5. Bough, W.A. and Landes, D.R.: Recovery and nutritional evaluation of proteinaceous solids separated from whey by coagulation with chitosan. *J. Dairy Sci.*, **59**, 1874-1880 (1976)
6. No, H.K. and Meyers, S.P.: Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing streams. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 580-583 (1989)
7. Kim, S.K. and Jeon, Y.J.: Safety of chitin and chitosan for food pharmaceutical uses. *Korean J. Chitin and Chitosan*, **2**, 3-14 (1997)
8. Mudahar, G.S., Toledo, R.T., Floros, J.D. and Jen, J.J.: Optimization of carrot dehydration process using response surface methodology. *J. Food Sci.*, **54**, 714-719 (1989)
9. Motycka, R.R., Devor, R.E. and Bechtel, P.J.: Response surface methodology. *J. Food Sci.*, **57**, 190-196 (1992)
10. Johnson, E.L. and Peniston, Q.P.: Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production.. In "Chemistry & Biochemistry of marine food products", R.E Martin, G.J. Flick, C.E. Heband, and D.R. ward, ADI publishing Co., Westport, CT. p.415-422 (1982)
11. Kina, K. Tamura, K. and Ishibashi, J.: The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Japan Analyst*, **23**, 1082-1100 (1974)
12. Rutherford, F.A. and Austin, P.R.: Chitin solvents, complexes, and physical properties. November: 1-25. Sea Grant College Program University of Delaware (1978)
13. Lee, K.T., Park, S.M. and Baik, O.D.: Preparation and rheological properties of chitin and chitosan. 1. Effect of preparation condition on the degree of deacetylation and the molecular weight of chitosan. *J. Korean Fish. Soc.*, **28**, 392-396 (1995)
14. Lee, W.J., Han, B.K., Park, I.H., Park, S.H., Oh, H.I. and Jo, D.H.: Effect of reaction temperature, time and particle size on the physicochemical properties of chitosans. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 997-1002 (1995)

(1998년 6월 16일 접수)