

## 키토산 분자량과 탈아세틸화도 조절 및 이에 따른 필름 특성

황권택, 박현진, 정순택\*, 함경식\*, 유용권\*\*, 조건식\*\*\*

고려대학교 생명공학원, 목포대학교 식품공학과\*, 목포대학교 원예육종학과\*\*, Bio Tech Co. Ltd.\*\*\*

### Controlling of Molecular Weight and Degree of Deacetylation of Chitosan and Its Characteristics in Film Formation

Kwon T. Hwang, Hyun J. Park, Soon T. Jung\*, Kyung S. Ham\* YongK. Yoo\*\*,

Gun S. Cho\*\*\*,

*Graduate school of Biotechnology, Korea University*

*\*Department of Food Engineering, Mokpo National University*

*\*\*Department of Horticultural Breeding, Mokpo National University,*

*\*\*\*Bio Tech, Co. Ltd.*

#### Abstract

Applications of chitosan are related to molecular weight and degree of deacetylation(DOD) of chitosan completely. The molecular weight and DOD were greatly affected by the concentration of solution, time and temperature. The degree of demineralization was not significantly different at 50°C and 70°C after 30 minutes. Deproteinization decreased as process time increased. The nitrogen content was reached to 6.92% after 90 minute at 80°C, which is similar to theoretical nitrogen content of chitin. The DOD was 82.84% after 2 hours reaction and increased as the reaction time increased in the process. Viscosity and molecular weight are increased as recycling number of concentrated NaOH solution increased. Chemical, biological and physical properties of chitosan depend on the DOD and molecular size of the molecule. Tensile strength of the films from acetic acid solutions was between 28.9~33.6 MPa and was generally higher than that of the films from lactic acid. Elongation of the films from lactic acid was between 97.0~109.7% and was generally higher than that of the films from the acetic acid. Water vapor permeability of the films prepared from lactic acid solutions was between 1.9~2.3 ng · m/m<sup>2</sup> · s · Pa and was generally higher than that of the films from the acetic acid.

key word : chitosan, deacetylation, molecular weight, chitosan film

#### 서 론

탄수화물에서 유래된 chitin은 지구상에서 cellulose 다음으로 많이 존재하는 천연고분자로서 주로 게, 새우껍질, 갑각류 및 곤충류의 외피, 연체동물 그리고 곰팡이 효모, 버섯 등의 세포벽에 다량 존재한다.

Corresponding author: Hyun J. Park, Graduate school of Biotechnology, Korea University, 1, 5ka, Anam-dong, Sungbuk-ku, Seoul, 136-701 Korea

지구상에 연간  $1 \times 10^9$ 톤이 넘는 양이 생합성되고 가공 폐기물로부터 chitin의 세계적인 생산량은 약 4만 톤에 달하고 있다<sup>(1)</sup>. 최근 chitin 및 chitosan이 생분해성<sup>(2,3)</sup> 항미생물성<sup>(4)</sup>, 생체적합성<sup>(5)</sup> 및 금속이온 흡착성<sup>(6)</sup>, 선택적 투과성 막<sup>(7)</sup> 등의 다양한 기능들이 밝혀지면서 의공학을 비롯한 식품, 천연농약 등 광범위한 곳에서 이용되어지고 있다. 우리 나라 갑각류의 총 생산량이 10만여톤에 이르며 갑각류 생산의 50%가 게로 알려져 있다. 수산가공업체로부터 배출되는 갑

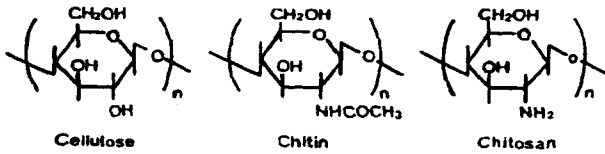


Fig. 1 Structures of chitin, chitosan and cellulose

각류 폐기물은 연간 수 만톤에 달하며 이를 방치시 심각한 환경문제를 야기할 수가 있다.

Chitin은 갑각류의 구조 탄수화물로서 Poly-N-acetyl-D-glucosamine으로 불리며, cellulose와는 C-2 hydroxyl groups이 Acetoamide groups으로 치환되어 있을 뿐 구조적으로 거의 동일하다.(Fig. 1) 또한 chitosan은 Poly-D-glucosamine로 chitin의 Acetoamide groups에서 deacetylation 된 물질이다. chitosan의 원료는 생산 원에 따라 그 성질에 큰 차이가 있으며 제조원의 종류에 따라 제거되어야 할 성분이 다르기 때문에 제조 방법 또한 약간의 차이가 있다. 지금까지 갑각류 폐기물로부터 chitin을 분리하기 위하여 여러 방법들이 개발되어 왔으나<sup>(8-10)</sup> 주로 화학적 처리에 그 기초를 두고 있다. Chitin은 물에 용해되지 않으나 formic acid-dichloro-acetic acid, methane, trichloroacetic acid-dichloroethane, dimethylacetamide lithium chrolide (LiCl) 등에 용해되고 100°C 정도의 강알칼리로 처리하면 70~95%가 deacetylation되어 chitosan이 만들어진다. Chitosan은 chitin보다 분자량이 작고 물이나 alcohol에는 용해되지 않지만 formic acid, lactic acid, acetic acid, ascorbic acid 등 유기산 수용액이나 묽은 염산과 같은 무기산에 용해되어 점성이 있는 용액으로 된다.

Chitosan의 여러 생리 활성 능력은 chitosan 분자량과 Degree of Deacetylation(DOD)에 크게 영향을 받는 것으로 보고되고 있어 chitosan을 생산할 때 chitosan의 분자량과 DOD를 조절하는 것이 매우 중요하다. 그의 예를 보면, 분자량이 1~5×10<sup>5</sup>, DOD가 64~65%인 chitosan을 액상비료로 사용될 때 식물 virus의 감염을 막을 수 있는 것으로 알려졌다<sup>(11)</sup>. 분자량이 5~10×10<sup>4</sup>, DOD가 99%인 chitosan은 alcohol/water mixtures의 분리에 사용되어질 수 있다는 보고가 있고, Biomedical 응용 쪽에서는 분자량이 1.5~6×10<sup>5</sup> 정도의 chitosan이 혈액 응고능, hypocholesterlemic activity 등을 나타내는 것으로 알려졌다. 응집제로서 분자량이 1.5×10<sup>6</sup>, DOD가 80% 이상인 chitosan이 단백질의 응집능력이 우수한 것으로 알려져 있다<sup>(12)</sup>. Chitosan은 항균성에서도 우수한 능력을 보이는데 분자량이 6,000~50,000 정도에서 김치의 장기간 저장이 가능하다는 보고를 하였다<sup>(13)</sup>. 요즘 관심이 모아지고 있는 생분해성 수지로서 DOD가

99.8%에 이르는 chitosan을 cellulose와 혼합하여 생분해성 plastics가 가능하다는 보고가 있다<sup>(14)</sup>. 이와 같이 chitin, chitosan은 분자량과 degree of deacetylation에 의해 다양한 응용성을 가진 것으로 잘 알려져 있다.

현재 원료 게 껍질로부터 chitin을 얻고 chitosan을 제조하는 과정은 화학적 처리와 효소처리로 크게 구분되어 있으나 산업적 생산은 주로 화학적 생산에 그 기초를 두고 있다<sup>(15-19)</sup>. 게 껍질로부터 chitosan을 얻기 위해서는 탈회분과정과 탈단백질과정 그리고 chitin 상태에서 탈아세틸화를 거쳐 chitosan이 만들어지게 된다. 탈회과정은 5% 정도의 HCl 용액으로 상온에서 CaCO<sub>3</sub>를 녹여내는 과정이고 이를 충분히 세척한 후 5% NaOH 용액으로 상온에서 60°C 정도에서 가열, 게 껍질에 잔류하는 단백질을 제거하는 단계를 탈단백질화 과정이라 한다. 이 두 과정에서 생성되는 폐액은 쉽게 중화처리가 가능하나, chitin에서 chitosan의 제조과정인 탈아세틸화 공정은 적어도 50% NaOH 용액에 100°C 이상의 온도에서, 수 시간을 반응시켜야 탈아세틸화가 이루어지는데 이 때 폐기되는 다량의 강 알칼리 용액으로 말미암아 환경오염의 가능성을 가지고 있다.

본 실험에서는 대게(*Chionoecetes Opilio*)의 가공 폐기물을 재료로 분리조건을 달리하여 chitin, chitosan을 효율적으로 분리할 수 있는 조건을 설정하고 반응과정에서 발생하는 강 알칼리성용액을 수회 반복 재 사용하여 이에 생산되는 chitosan의 특성에 대하여 조사하였으며 만들어진 chitosan으로 film으로서의 응용가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에서 chitin, chitosan 제조에 사용한 원료는 산업폐기물인 대게(*Chionoecetes Opilio*) 껍질로서 경북 영덕군에 소재한 게 가공업체로부터 구입하였다. 구입한 게 껍질은 물로 세척하여 불순물을 제거하고 60°C에서 24시간 건조하여 분쇄하지 않은 상태(1 cm × 5~7 cm, W×L)로 사용하였다.

### 실험방법

#### 일반성분 분석

수분은 상압 가열건조법, 회분은 직접회화법, 조지방은 개량식 지방 추출기를 이용하여 soxhlet method로 각각 정량하였고<sup>(15)</sup> 단백질함량은 micro kjeldahl method<sup>(16)</sup>로 질소량을 측정후 산출하였다.

## 키토산 분자량과 탈아세틸화도 조절 및 이에 따른 필름 특성

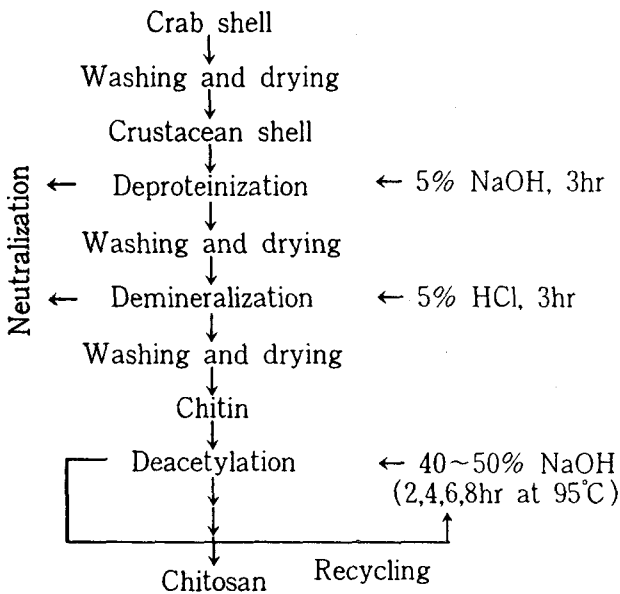


Fig. 2 Preparation process of chitin and chitosan from crab shell

### Chitin 및 chitosan의 질소함량

chitin 및 chitosan의 질소함량은 일차로 chitin함량을 측정 후 먼저 2g의 시료를 100°C 상에서 1N HCl과 5% NaOH로 각각 1시간씩 반응시킨 후 Whatman No. 4 여과지로 거른 다음 acetone으로 충분히 세척하고 105°C에서 항량이 될 때까지 건조시켜 chitin 함량을 조사한 다음, 이 건조된 chitin으로부터 micro kjeldahl method를 사용하여 전체 질소함량을 구하였다.

### Chitin의 제조

노 등<sup>(17)</sup>에 의하면 키틴 분리 공정에서 게 껍질 입자크기는 키틴의 질소 및 회분함량에는 큰 영향을 미치지 않으나 키틴의 수율에 영향을 미친다고 하였다. 따라서 본 실험에서는 산업적인 키틴 제조를 위하여 파쇄하지 않은 상태(1cm×5~7cm, W×L)의 원료 게껍질을 사용하여 키틴을 분리하였다. 장 등의 방법<sup>(18)</sup>에 준하여 대게껍질 50 g에 5% HCl 1000ml를 가하여 30, 50 및 70°C에서 각각 30, 60, 90, 120분 침지시켜 회분을 제거하였다. 회분을 제거한 후 흐르는 물로 게 껍질이 중성에 이르기까지 충분히 반복 수세하였으며 60°C에서 24시간 건조하여 직접 회화법에 의해 회분 함량을 측정하였다. 단백질의 제거효율을 측정하기 위하여 5% HCl용액 1000ml에 50 g의 대게 껍질을 넣고 상온에서 24시간 동안 탈회분한 후, 일정량의 탈회분된 시료에 5% NaOH 1000ml를 가하여 탈회분 공정과 동일한 조건으로 단백질을 제거하였다. 이를 흐르는 물로 중성에 이르기까지 반복 수세

한 후 60°C에서 24시간 건조하여 실온에서 보관 사용하였으며 micro kjeldahl법으로 질소량을 측정하였다.

### Chitosan의 제조

키토산은 노<sup>(17)</sup>, 장<sup>(18)</sup>, 이<sup>(19)</sup> 등의 방법에 준하여 Fig. 2와 같이 게껍질을 상온에서 충분한 양의 5% HCl과 5% NaOH에 각각 24시간 침지시켜 회분 및 단백질을 제거하였으며 이를 흐르는 물에 수세 60°C에서 24시간 건조하여 키틴을 얻었다. 키토산은 얻어진 키틴 질로부터 고온, 높은 알칼리농도의 조건에서 탈아세틸화 반응이 이루어지면 키토산이 얻어지게 된다. 탈아세틸화 반응은 순환식 Water bath(HANBAIK, HB-205, KOREA)와 연결된 유리채킷에 50% NaOH 1300 ml를 가하여 95±1°C가 유지되도록 한 후 키틴 50 g을 시간에 따른 탈아세틸화 반응 정도를 알아보기 위하여 2시간 간격으로 8시간 동안 침지반응시켜 탈아세틸화하였다. 완료된 반응물을 흐르는 물에서 충분히 수세한 후 60°C (dry oven)에서 24시간 건조하여 chitosan시료를 만들었으며 실온에서 보관한 후 필요에 따라 분쇄기(IKA, MFCSI, GERMANY)로 마쇄하여 사용하였다. 상기의 탈아세틸화 반응 후 여액의 50% NaOH에 동일한 양(50 g)의 키틴을 가하여 4회에 걸쳐 탈아세틸화를 반복 실시하였으며 각각의 탈아세틸화도 및 점도의 변화를 측정하였다.

### Chitosan의 탈아세틸화도 측정

건조한 키토산 0.5g을 정밀히 달아 5% (w/v) 초산에 녹여 정확히 100ml로 하였다. 이 키토산 초산용액을 1ml 취해 200ml 삼각 플라스크에 취하고 이에 증류수 30ml를 가해 교반, 혼합하였다. 지시약으로 0.1% 툴루이딘 블루 용액 2~3방울을 가해 0.0025N 폴리비닐 황산칼륨용액(Wako pure chemical industries, Ltd. JAPAN)으로 적정하였다. 탈아세틸화도의 계산은 다음과 같다.<sup>(15)</sup>

$$\text{탈아세틸화도}(\%) = \frac{X / 161}{X / 161 + Y / 203} \times 100$$

$$X : 1/400 \times 1/1000 \times F \times 161 \times V$$

$$Y : 0.5 \times 1/100 - X$$

$$V : 0.0025N \text{ 폴리비닐 황산칼륨 용액 소비량 (ml)}$$

$$F : 0.0025N \text{ 폴리비닐 황산칼륨 용액 규정도 계수}$$

### 점도 및 분자량 측정

점도는 제조한 키토산을 1% (v/v) 초산용액에 1% (w/w)가 되도록 하여 일정한 속도에서 교반하여

녹여서 Brookfield형 회전점도계(Brookfield, RVTDV-IIICP, U. S. A.)를 사용하여 측정하였다. 이 때에 Spindle RV-3을 사용하여 20 rpm에서 측정하였으며, 분자량은 점도를 측정한 후 회전점도계에 의한 키토산의 점도와 분자량 관계값<sup>(20)</sup>을 이용하여 계산하였다.

**Chitosan film의 제조**

키토산 필름의 제조는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 2% acetic acid, lactic acid에 각기 제조한 chitosan의 최종농도가 2%(w/w)되도록 용해시킨 후 Whatman No. 4를 이용 filtration하여 불용성물질을 제거한다. 여과된 chitosan solution에 plasticizer PEG(Poly Ethylene Glycol 400)을 chitosan total weight에 동량 되도록 첨가하여 잘 혼합시켜 전체적으로 충분히 균질화를 시킨다. 잘 교반된 chitosan solution을 유리판의 크기가 30cm×30cm 인 평형이 맞추어진 유리판에 기포가 생기지 않게 잘 부어 실온에서 3일간 건조기를 이용하여 건조시킨 다음, 60°C에서 24시간 건조시켜 실험용 필름으로 사용하였다.

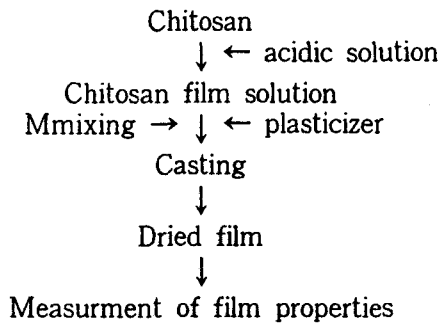


Fig. 3 Preparation of chitosan film

**Film thickness의 측정**

Film thickness은 0.005mm의 정밀도를 가진 micrometer(Mitutoyo, Japan)를 사용하여 중심부위를 중심으로 5군데 이상을 측정, 평균으로 전체두께를 환산하였고, 수증기 투과도용 시료의 경우 중심부와 8부위의 두께를 측정하여 그 평균값을 투습계수 계산에 사용하였다.

**기계적 물성측정**

모든 시료는 25°C, 50%의 상대습도로 조절된 항온 항습기에서 72시간을 저장하여 수분함량을 조절한 후 필름의 물성측정에 사용하였다.

인장강도(Tensile strength)와 신장률(Elongation) :

인장강도(Tensile strength)와 신장률(Elongation)은 ASTM D882-88에 따라 Instron (Model 1125, Instron Engineering Corp., Canton, USA)을 사용하여 측정하였다. 원래 film 시료로부터 20개의 시료(2.5cm×10cm)를 잘라 72시간 25°C, 50%RH에서 conditioning한 후 Instron으로 인장강도를 측정하였다. Instron의 grip간 거리는 50mm이고 cross head speed는 500mm/min으로 조절하였다. 측정된 필름의 인장강도의 값은 Pascal(Pa)로, 신장률은 %로 표시하였다.

$$\text{인장강도(Pa)} = \frac{\text{필름이 끊어질 때의 강도(kg} \times 9.8\text{N/kg)}}{\text{필름의 너비(m)} \times \text{필름의 두께(m)}}$$

수증기 투과도(Water vapor Permeability) : 수증기 투과도는 ASTM E-96-90에 따라 cup method를 사용하여 측정하였다. 수증기 투과도 측정에 사용된 cup에 16ml의 증류수를 넣고 수증기투과도 측정용 필름을 투습컵 위에 덮은 후, 용기의 직경과 같은 직경의 뚜껑을 덮어 용기내의 수증기가 내부 직경의 원형만을 통하여 외부로 통과하도록 밀봉한다. 장착시킨 필름의 초기 수증기 흡습의 안정화를 위하여 25°C, 50%RH로 조절하고 2m/sec의 풍속으로 순환하는 항온 항습기에 필름을 안정화시킨 후, 2시간 간격으로 투습컵의 무게를 0.0001g의 정밀도로 측정하였다. 시간의 변화에 따른 투습컵의 무게 감소 값으로부터 필름의 수증기 투과도 계수를 구하였다. 이때 필름의 하부와 증류수의 표면사이에 있는 공기의 저항에 의한 영향을 Mchugh et al<sup>(21)</sup>와 Gennadios et al<sup>(22)</sup>의 방법에 따라 보정하였다. 초기 컵 내부의 평균 공기 층의 간격과 최종공기 층의 간격을 수증기 투과도의 계산에 사용하였으며, 각 필름의 수증기 투과도 계수는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값으로 나타내었다.

**결과 및 고찰**

**게 껍질의 일반성분 조성**

Green과 Kramer<sup>(23)</sup>에 의하면, 갑각류(게, 새우, crawfish 및 바다가재)의 껍질에는 일반적으로 단백질이 30~40%, 회분(대부분 탄산칼슘) 30~50% 및 키틴 20~30%로 구성되어 있으며, 이들 비율은 갑각류의 종류와 수확 계절에 따라 차이가 있다고 보고하였다.

본 실험에서 사용하는 대게(Chionoecetes Opilio)껍질의 일반성분 조성은 Table 1과 같이 수분 8.24%, 지방 3.65%, 단백질 28.73%, 회분 35.51%, 키틴 23.55%, 기타 0.32%로 나타났다.

Table 1. Chemical composition of Chionoecetes Opilio shell

Composition	Value(%)
Moisture	8.24
Crude protein	28.73
Crude fat	3.65
Crude ash	35.51
Chitin	23.55
Others	0.32
Chitin nitrogen	6.92

노 등<sup>(17)</sup>의 연구 보고에 의하면 단백질 29.19%, 지방 1.35%, 회분 40.60%, 키틴 26.65%로 나타났으며 각 성분마다 약간의 차이는 보이나 대체로 그 성분 조성은 본 실험의 결과와 유사한 것으로 나타났다. 또한 효소로 개살 정미성분을 분해 추출하고 남은 꽃게의 일반성분은 단백질 15.82%, 지방 3.03%, 회분 65.24%, chitin 15.8%로 본 실험에서 사용된 대게 껍질에 비해 단백질 및 chitin 함량이 낮은 반면 회분 함량이 높았다. 이는 본 실험에 사용한 대게 껍질이 비교적 chitin의 우수한 원료임을 잘 나타내고 있다.

침지 온도 및 시간에 따른 탈회분 및 탈단백질 효과 일반적으로 갑각류의 껍질에 존재하는 chitin의 존재형태는 단백질 및 탄산칼슘과 강하게 결합되어 있는 형태이므로 그로부터 chitin을 분리하기 위해서는 주로 2가지의 주요한 과정 즉, 단백질 제거과정과 회분(CaCO<sub>3</sub>) 제거과정을 거쳐야 한다고 알려져 있다. 단백질 제거를 위하여 papain이나 trypsin을 이용한 효소 처리법, urea 첨가법이 제시되었으며 mineral 제거를 위해서는 EDTA 사용할 수 있다는 것이 제시되었다. 그러나 산업적 이용성의 면에서 볼 때 산과 알칼리로 처리함으로써 chitin을 추출하는 방법이 효율성이 크다고 하였다<sup>(24)</sup>. 한편 산과 알칼리에 의한 탈회분 및 탈단백질시 적절한 교반에 의해 상당한 에너지 소모를 요구하므로 자연침지에 의한 탈회분 및 탈단백질 효과를 검토해 보았다.

실험에서 사용된 대게 껍질의 회분 및 단백질함량은 각각 35.51%, 28.67%였다. 원료를 5% HCl로 각각 30, 50°C 및 70°C에 30분 간격으로 120분 침지시킨 후의 회분량은 Fig. 3과 같았다. 5% HCl로 30°C에서 30분 침지시켰을 때 회분함량이 3.22%를 나타냈고 60분 후 1.07%로 감소하였다. 이후 처리시간이 지남에 따라 회분함량은 더이상 감소되지 않았다. 50°C 및 70°C에는 30분 처리했을 때 1.46%, 1.19%의 회분함량을 나타냈다. 본 실험에서 온도 및 시간에 따른 탈회분 효과를 조사한 결과, Fig. 4에서와 같이 온도에 따른 회분의 제거 효율은 커다란 차이를 보이지 않았

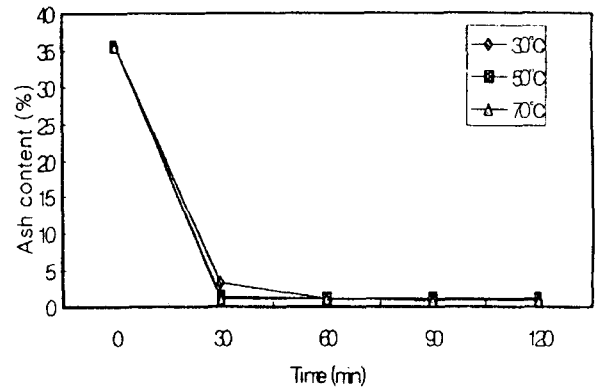


Fig. 4 Changes of ash content with various temperatures by 5% HC solution treatment.I

다. 노 등<sup>(17)</sup>에 의하면 원료중량의 15배에 해당하는 1N HCl로 실온에서 30분처리했을때의 회분함량이 0.10%정도로 가장 효율적이라고 보고하였다. 이는 효율적인 탈회분을 위해서는 원료내의 minerals와 충분히 반응할 수 있는 적절한 양의 산이 공급되어야 한다<sup>(25,26)</sup>는 것에 기인한 것이라 할 수 있었다. 한편 조 등<sup>(27)</sup>은 꽃게 껍질을 탈회분시 원료 중량의 15배 해당하는 1N HCl과 2N HCl로 실온에서 30분 처리했을때의 회분함량이 각각 1.51%, 1.07%를 나타냈고 2N HCl로 3시간 처리했을 때 0.30%의 회분이 잔존하였다고 보고하였다.

탈단백질은 탈회분된 시료에 5% NaOH를 가하여 각각 30, 50°C 및 70°C에서 30분 간격으로 120분 반응하였다. 이때 최적 탈단백질 조건은 Table 1에서 chitin 질소의 함량이 6.92%를 나타내므로, 회분과 단백질을 제거시킨 후 측정된 조키틴의 질소 함량이 이와 유사할 때 최적조건으로 간주하였다. 탈단백질과정에서 추출온도와 시간이 탈회분된 시료의 질소 함량은 30°C에서 5% NaOH로 30분 침지할 때 8.99%였으며 시간이 경과함에 따라 8.87, 8.72, 8.58%로 감소하였다. 한편 50°C 및 70°C에서도 추출시간의 증가함에 따른 질소함량은 감소하는 경향이었으며, 추출온

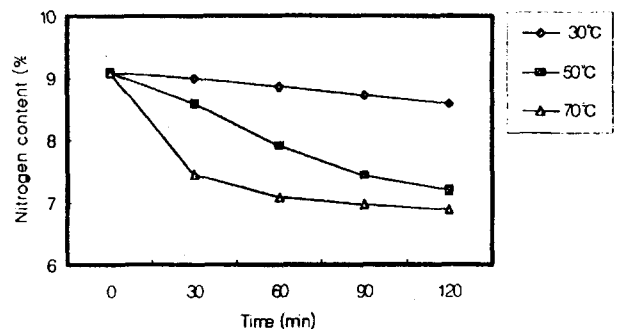


Fig. 5 Changes of nitrogen content with various temperatures by 5% NaOH solution treatment.

도의 증가에 의해서도 질소함량은 감소함을 보였다. 전반적인 키틴의 질소함량은 6.92%보다 높았으나 70°C에서 90분 침지함으로 대략 질소함량 6.92%에 근접하여 가장 효율적으로 이루어졌다. 이후 시간의 경과에 따라 미미한 감소를 보였다. 한편 탈회분과정 없이 탈단백질 과정을 실시하였을 때의 질소 함량은 Fig. 5와 같았다. 즉 30°C에는 뚜렷한 감소를 보이지 않았으나 50°C 및 70°C 에서는 비교적 뚜렷이 감소하여 70°C 90분에 2.58%를 나타냈으며 이후 더 이상 감소하지 않았다. 결국 이들 탈단백질 효율은 회분의 존재유무에 관련 없이 동일한 양상을 보였다. Chitin의 이론적인 질소함량은 6.89%이며 일반적으로 종류와 연구자에 따라 다소 차이가 있으나 6~7% 범주에 속한다고 보고되었다<sup>(28)</sup>. 탈단백질 과정은 반응시간보다는 반응 온도에 더 큰 영향을 받았다. Chitin의 질소함량이 이론치인 6.89%보다 높을 때는 chitin에 결합된 단백질이 불완전하게 제거되었거나 탈아세틸화를 의미하며, 이론치보다 낮을 경우에는 hydrolytic deamination이 일어났거나 제품이 오염된 것을 의미한다고 보고된 바 있다<sup>(29)</sup>.

Astin 등<sup>(8)</sup>은 blue crab, stone crab, red crab, horseshoe crab 과 brin shrimp의 껍질에 있는 단백질을 제거하기 위해 EDTA, 7M Urea, 0.1% NaOH, 1N NaOH로 처리해도 단백질이 0.1~0.5% 잔존해 있다고 보고하였다. 한편, 알칼리 처리에 의해 제거된 단백질은 다시 회수하여 이용할 수 있다고 알려졌다. 탈회분은 일반적으로 실온에서 묽은 염산(2.5~10%)으로, 탈단백질은 65~100°C에서 묽은 NaOH용액(1~10%)으로 행해졌으며, 반응시간은 제조방법에 따라 30분<sup>(30)</sup>에서 수일간에 이르렀다. 그러나 장시간의 처리는 chitin분자의 분해를 초래할 수 있으므로 이를 최소화하며 회분 및 단백질을 효과적으로 제거할 수 있는 조건을 선정하는 것이 필요한 것으로 사료된다.

침지 시간 및 횟수에 따른 탈아세틸화도의 변화

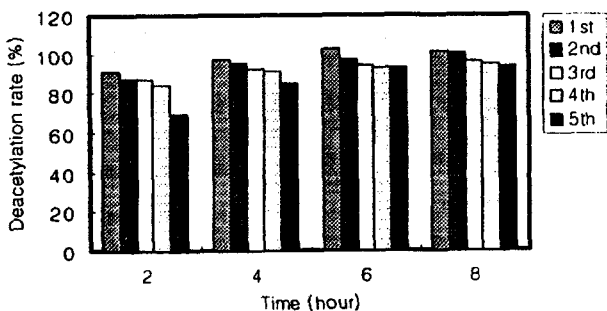


Fig. 6 Changes of deacetylation with various reaction times and recycling numbers of concentrated NaOH solution (50% w/w)

본 실험에서 키틴을 분쇄하지 않은 상태에서 95±1°C의 50% NaOH용액에 침지시간을 달리하여 제조한 키틴산의 탈아세틸화도를 조사한 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 침지시간에 따른 탈아세틸화도는 2시간 후 82.84%를 나타내었으며 침지시간이 증가할수록 탈아세틸화도는 증가하였다. 한편 조 등<sup>(30)</sup>은 50% NaOH 용액에서 반응시켰을 때 2시간이면 탈아세틸화도가 92%정도에 도달한다고 보고하였으며, 대게 껍질을 이용하여 100°C의 50% NaOH를 사용하여 탈아세틸화하였을 때 탈아세틸화도가 1시간까지는 급증하였으나 그 이후에는 완만하여 6시간이 되어도 80%에 이르지 못하였다고 보고도 있다. Wu와 Bough<sup>(31)</sup>는 새우껍질을 이용하여 100°C 50% NaOH 용액에서 탈아세틸화도가 1시간에 73%이고 5시간에 80%에 도달하였다고 보고하였다. 이러한 data간에 차이는 제조방법과 갑각류의 종류차이에 따른 것으로, 제조방법을 달리함으로 키틴산의 탈아세틸화도는 99%까지 가능한 것으로 보고되었다.

한편 위와 동일한 방법으로 탈아세틸화한 후 여액의 50% NaOH에 50g의 chitin을 4회 연속 탈아세틸화하였을 때 각각의 탈아세틸화도 변화는 횟수를 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 2시간 침지시켰을 때 1회 2시간에 82.84% 였으나 2회 76.85%, 3회 79.95%, 4회 78.84% 및 5회 침지 시에는 69.49%로 급격히 감소하였다. 이는 탈아세틸화에 필요한 50%

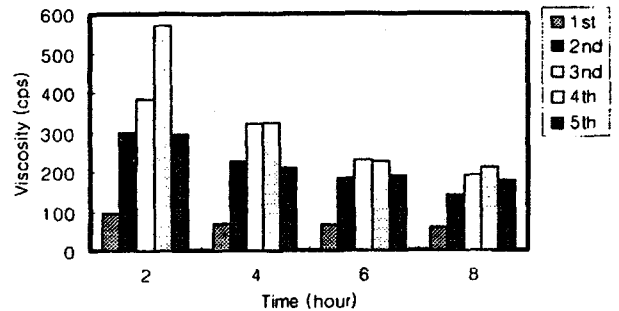


Fig. 7 Changes of viscosity with reaction times and the number of times.

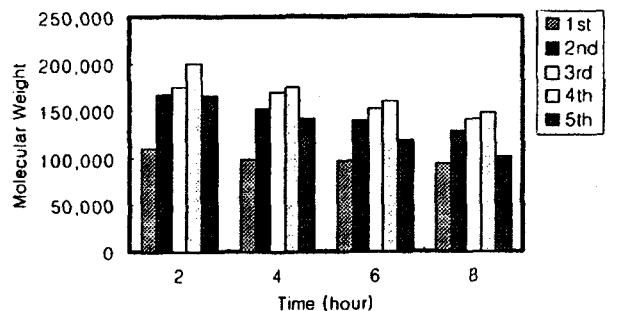


Fig. 8 Changes of molecular weight with reaction times and the number of times.

키토산 분자량과 탈아세틸화도 조절 및 이에 따른 필름 특성

Table 2. Tensile Strength, Elongation and Water Vapor Permeability of chitosan based film with various reaction times and solvents. <sup>a</sup>

Solvents	reaction period	reaction time	MW	DOD (%)	Tensile Strength(MPa)	Elongation (%)	Water Vapor Permeability (ng · m/m <sup>2</sup> · s · Pa)
Acetic acid	2hr	1st	110,000	91.1	31.5 ± 4.2 <sup>a</sup>	54.5 ± 8.6 <sup>ab</sup>	2.0 ± 0.23 <sup>ab</sup>
		2nd	167,000	88.0	33.6 ± 3.7 <sup>b</sup>	51.6 ± 8.4 <sup>b</sup>	1.9 ± 0.11 <sup>ab</sup>
		3rd	175,000	86.7	30.4 ± 3.6 <sup>a</sup>	49.2 ± 8.8 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.36 <sup>ab</sup>
	6hr	1st	97,000	102.2	29.5 ± 3.2 <sup>b</sup>	62.6 ± 13.2 <sup>ab</sup>	1.7 ± 0.29 <sup>ab</sup>
		2nd	139,000	97.4	29.9 ± 3.7 <sup>ab</sup>	68.3 ± 12.7 <sup>b</sup>	1.8 ± 0.25 <sup>ab</sup>
		3rd	152,000	94.4	28.9 ± 3.3 <sup>b</sup>	56.1 ± 6.7 <sup>ab</sup>	2.6 ± 0.25 <sup>b</sup>
Lactic acid	2hr	1st	110,000	91.1	15.0 ± 2.5 <sup>a</sup>	99.5 ± 14.5 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.20 <sup>ab</sup>
		2nd	167,000	88.0	14.0 ± 2.7 <sup>a</sup>	101.1 ± 14.1 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.13 <sup>ab</sup>
		3rd	175,000	86.7	11.7 ± 2.5 <sup>a</sup>	104.8 ± 16.3 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.10 <sup>a</sup>
	6hr	1st	97,000	102.2	14.7 ± 2.8 <sup>a</sup>	97.0 ± 17.6 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.35 <sup>ab</sup>
		2nd	139,000	97.4	17.2 ± 2.3 <sup>b</sup>	109.7 ± 17.4 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.68 <sup>a</sup>
		3rd	152,000	94.4	17.0 ± 3.8 <sup>b</sup>	103.4 ± 22.5 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.33 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup> Chitosan dissolved in 2% different organic acid solutions; Acetic acid, Lactic acid; values refer to means and standard deviations of films; values within the same type organic acid with different letter superscripts are significantly different from those determined by Duncan's multiple range test ( $\alpha = 0.05$ ).

NaOH의 양의 감소로 인해 탈아세틸화 반응의 감소로 기인된 것으로 생각되었다. 따라서 50% NaOH의 재사용을 통해 균일한 탈아세틸화도를 얻기 위해서 반응 후에 NaOH의 첨가에 의한 탈아세틸화도의 변화 및 효율에 대한 연구가 필요한 것으로 사료된다.

침지 시간 및 횟수에 따른 점도 및 분자량의 변화 No 등<sup>(28)</sup>의 보고에 의하면 키토산의 질소 함량은 7.06~8.1% 범주이였으며, 탈아세틸화도는 43~99%, 분자량은  $0.12 \sim 1.5 \times 10^6$  사이였다고 하였다. 침지 시간 및 반응횟수에 따른 점도 및 그에 따른 분자량의 변화는 Fig. 7, 8과 같았다. 즉 점도는 2시간 침지한 경우 95cps, 4시간 후 70cps, 6시간 후 65cps, 8시간 후는 60cps로 감소하였다. 한편 분자량의 경우에 있어서도 시간이 경과함에 따라 110,286, 99,000, 96,666, 94,300으로 변화하였다. 100°C에서 45분 반응시켰을 때 점도는 350cps이며, 80°C를 유지하여 60분 경과함에 따라 280cps로 20% 감소하였다고 보고와 장 등<sup>(32)</sup>은 탈아세틸화과정에서 알칼리용액의 농도, 반응온도가 일정할 때 반응시간이 길어질수록 점도는 감소하는 경향을 보여 100°C 50% NaOH에 각각 30분, 2시간, 6시간 침지 시켰을 때 이들 키토산의 점도는 421, 319, 140cps로 점차 감소하였다고 하였다. 한편 침지 횟수에 의한 점도 및 분자량의 변화는 1회 침지 반응

시 시간의 경과에 따라 점도는 95cps 이하를 나타내었으며, 분자량은 110,286 이하를 나타냈다. 그리고 횟수를 계속함에 따라 점도 및 분자량은 증가하였다. 장 등<sup>(32)</sup>에 의하면 chitin질의 처리조건 및 동일한 반응시간에 대해 온도에 따라 점도 및 분자량이 다양한 수치를 나타낸다고 하였으며, 탈아세틸화도가 93%로 같을지라도 점도는 각각 80cps, 3670cps의 현저한 차이를 나타냈다고 보고하였다. 그러므로 균일한 제품을 제조하기 위해서는 탈아세틸화 공정에서의 일정한 온도 유지와 chitin질의 처리조건의 균일화가 필요한 것으로 사료된다.

침지 횟수와 반응시간으로 부터 제조된 chitosan으로부터 chitosan film 형성능력 및 물성의 비교

Chitin sample을 각기 강알칼리용액에서 2시간과 6시간동안  $95 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 50% NaOH용액에 침지시켰고 1회에서 3회까지 강알칼리용액을 반복사용하여 키토산을 제조하였으며, chitosan film제조를 위한 solvents로서 acetic acid와 lactic acid를 사용하여 chitosan film을 제조하였으며 필름의 물성은 Table 2에 나타내었다. 각각의 solvent에서 1회에서 3회까지 반복 사용한 결과 제조된 키토산의 분자량은 증가하고 DOD는 감소하였다. 제조된 키토산을 acetic acid와 lactic acid에 용해하여 제조된 필름의 인장강도와 신장률은 50%

NaOH용액을 반복사용에 따라 별 유의차를 보이지 않았지만, 사용된 유기산에 따른 인장강도와 신장률에는 큰 차이를 보여주었다. 실례로, 1회에서 3회까지 반복사용된 용액에서 2시간, 6시간 침지반응으로 제조된 chitosan을 acetic acid로 chitosan film을 제조한 경우 필름의 인장강도는 33.62~28.88 MPa를 나타내었으나, lactic acid로 제조한 chitosan film의 인장강도는 17.16~11.69 MPa로 낮게 나타났다. 본 결과는 Caner et al.<sup>(33)</sup>와 Lim 등<sup>(34)</sup>이 보고한 acetic acid에 녹인 chitosan film이 lactic acid에 녹인 chitosan film보다 강한 기계적인 물성을 갖는다는 보고와 유사한 것으로 나타났다. 제조된 필름의 수증기투과도는 50% NaOH용액을 반복사용에 따라 별 유의차를 보이지 않았지만, 사용된 유기산에 따른 수증기투과도는 약간의 차이를 보여주었다. Acetic acid에 용해하여 제조된 chitosan film의 수증기 투과도는 lactic acid에 용해하여 제조한 chitosan film의 수증기투과도보다 낮은 것으로 나타났다. 실례로, 1회에서 3회까지 반복사용된 용액에서 2시간 침지반응으로 제조된 chitosan을 acetic acid로 제조한 chitosan film의 수증기투과도는 1.9~2.1 ng·m/m<sup>2</sup>·s·Pa 정도이었으나, lactic acid에 녹인 chitosan film의 수증기투과도는 2.1~2.2 ng·m/m<sup>2</sup>·s·Pa로 나타났다. 상기의 결과는 Lim 등<sup>(34)</sup>과 Park 등<sup>(35)</sup>이 보고한 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

**요 약**

탄수화물에서 유래되는 chitin은 cellulose와 유사한 poly-β(1,4)-N-acetyl-D-glucosamine의 섬유상의 중합체로서 물과 유기용매 녹지 않으나 acetyl amino group을 탈아세틸화 시키면 키토산으로 되어 묽은 산 용액에 용해되어 점성이 있는 용액이 되므로 화학, 의학 및 식품 산업분야 등에 다양한 용도로 이용되고 있다.

본 실험에서는 게 가공 폐기물로부터 부가가치가 높은 chitin 및 키토산을 제조하였으며 침지조건을 달리하여 제조한 키토산의 특성을 조사하였다. 원료인 게껍질의 일반 성분은 수분 8.24%, 지방 3.65%, 단백질 28.73%, 회분 35.5%, chitin 23.55%로 나타났다. chitin의 제조는 5% HCl과 5% NaOH를 침지 온도와 시간을 달리하여 탈회분, 탈단백질하여 제조하였다. 탈회분은 온도에 따라 큰 변화는 없었으며, 30℃에서 30분 반응하였을 때 회분함량이 3.22%, 60분 후 1.07%로 감소했다. 50℃ 및 70℃에서는 30분 처리하였을 때 1.46%, 1.19%를 나타낸 후 시간이 증가하여도 감소량이 뚜렷하지 않았다. 탈단백질은 위와 동일한 조건으로 침지하였으며 시간이 경과함에 따라

감소하였고 70℃에서 90분 반응하였을 때 chitin의 질소 함량 6.92%에 근접하였다. 키토산 제조는 chitin을 50% NaOH에 침지 시간을 달리하여 탈아세틸화하였다. 탈아세틸화도는 2시간 침지 후 82.84%를 나타내었으며 시간이 경과할수록 증가하였다. 한편 침지 후 여액의 NaOH를 다시 사용하였을 때 키토산의 점도 및 분자량은 시간의 경과에 따라 감소하였다. 즉 점도는 2시간 경과함에 따라 95 cps, 4시간 70 cps, 6시간 65cps, 8시간 60cps로 감소하였으며, 분자량은 110,286, 99,000, 96,666, 94,300으로 감소하였다. 횡수에 따른 점도 및 분자량은 시간의 경과에 따라 증가하였다.

반복사용된 반응용액에서 제조된 키토산은 기계적인 물성변화는 거의 없었고, 각 solvent에서 반응시간 경과에 따라 약간 증가함이 있었고 acetic acid에 용해하여 제조한 chitosan film의 TS가 lactic acid chitosan film보다 우수함을 알수 있었다. 수증기투과도의 경우 lactic acid에 용해하여 제조한 chitosan film이 acetic acid에 용해하여 제조한 chitosan film보다 큰 수증기투과도를 보였다.

**감사의 글**

본 연구는 한국학술진흥재단 97학제간 연구사업비의 지원에 의하여 수행된 연구결과로서 이에 깊은 감사를 드립니다.

**문 헌**

1. 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)
2. Struszczyk, H., Wawro, D. and Niekraszewics, A.: "Advances in Chitin and Chitosan", Brine, C. J., Sandford, P. A. and Zikakis, J. P. (Ed.), Elsevier Applied Science, London, p. 580 (1992)
3. Xu, J., McCarthy, S. P. and Gross, R. A.: Macromolecules, 29, 3436 (1996)
4. euba, J. L. and Stossel, P.: "Chitin in Nature and Technology", Muzzarelli R., Jeuniaux, C. and Gooday G. W. (Ed.) p. 215 Plenum Press, New York, (1986)
5. K. Kifune, "Advances in Chitin and Chitosan", C. J. Brine, P. A. Sandford, and J. P. Zikakis Eds., Elsevier Applied Science, London, p. 9 (1992)
6. Maruca, R., Suder, B. T. and Wightman, J. P.: J. Appl. Polym. Sci., 27, 4827 (1992)
7. Shieh, J. J., Robert, Y. and M. Huang.: J. of Membrane



- Science 127, 185 (1997)
8. Austin, P. R., Brine, C. J., Caste, J. E. and Zikakis, J. P.,: Chitin : New facts of research. Science 212, 749 (1981)
  9. Rudell, K. M.: Chitin and its association with other molecules. J. Polymer Sci., Part C, 28, 82 (1969)
  - 10.No, H. K., Mayers, S. P. and Lee, K. S.: Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. J. Agri. Food. Chem., 37, 575 (1989)
  - 11.Skjak-Bræk, G., Anthonsen, T. and Sandford, P.: Chitin and Chitosan-Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan. Trondheim, Norway, August 22 (1988)
  - 12.Jun, H. K., No, H. K. and Mayers, S. P.: Chitosan as a coagulant for recovery of proteinaceous solids from tofu wastewater. J. Agr. and Food Chem. 42(8), 1834 (1994)
  - 13.Kim, K.O., Moon, H.A., and Jeon, D. W.: The effect fo low molecular weight chitosans on the characteristics of kimchi durint fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 27(3), 420 (1995)
  - 14.Nishiyama, M.: Biodegradable plastics derived from homogenized cellulose and chitosan. International symposium of biopolymer-based films for food and industrial uses. Held at Mokpo National University, Mokpo, Korea, March 29 (1996)
  - 15.식품 공전 (한국식품공업협회), 588 (1996)
  - 16.신효선: 식품분석, 신광출판사, p.75 (1996)
  - 17.노홍균, 이문이: 게 가공 폐기물로부터 키토산의 분리. 한국영양식품과학회지, 24(1), 105 (1995)
  - 18.장동석, 조학래, 구효영, 최위경: 게 가공폐기물을 이용한 식품보존료의 개발에 관한 연구. 한국수산학회지, 22(2), 70 (1989)
  - 19.이우진, 한범구, 박인호, 박승현, 오훈일, 조도현: 키토산 제조시 반응온도와 시간 및 크기가 키토산의 물리화학적 특성에 미치는 영향, 한국식품과학회지, 27(6), 997 (1995)
  - 20.廣井 治, 川 和男, 藤田孝夫,: 日本特許, 昭和 56-33401
  - 21.Mchugh, T. B., Avena-Bustillos, R. and Krochta, J. M.: Hydrophilic edible films : Modified procedure for water permeability and explanation of thickness effects. J. Food Sci., 58, 899 (1993)
  - 22.Gennadios, A. and Weller, C. L.: Edible films and coatings from wheat and corn protein. Food Technol., 44, 63(1990)
  - 23.Green, J. H. and Kramer, A.: "Food Processing Waste Management". AVI Publishing Co., Westport, CT, p.214 (1984)
  - 24.Knorr, K.: Use of chitinous polymers in food. Food Technol., 38(1), 85 (1984)
  - 25.Johnson, E. L. and Peniston, Q. P.: Utilization of shellfish waste for chitin and Chitosan production. Ch. 19. In "chemistry and Biochemistry of Marine Food Products" Martin, R. E., Flick, G. J., Hebard, C. E. and Ward, D. R.(ed.), AVI Publishing Co., Westport, CT, p.415 (1982)
  26. Shahidi, F. and Synowiecki, J.: Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab(*Chionoectes opilio*) and shrimp(*pandalus borealis*) processing discards. J. Agric. Food Chem., 39, 1527 (1991)
  - 27.조정숙, 한정준, 이철호: 꽃게 껍질에서 분리제조한 키토산 필름의 물성에 관한 연구, 한국식품과학회지, 24(6), 574 (1992)
  - 28.No, H. K. and Mayers, S. P.: Preparation and Characterization of chitin Chitosan-A. review. J. Aquatic Food product Technol., 4, 27 (1995)
  29. Ruthertord, F. A. and Austin, P. R.: Marine chitin properties and solvents. In "Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan" Muzzarelli, R. A. A. and Pariser, E. R.(ed.), MIT Sea Grant Program, Cambridge, MA., p.182 (1978)
  - 30.조성관, 김선정, 정병욱, 김재진, 최규석, 이영후: 부분 탈아세틸화된 키토산의 폐수처리 효과. 한국공업화학회지, 5, 899 (1994)
  - 31.Wu, A. C. M. and Bough, W. A.: A study of variables in the Chitosan manufactory process in realties to molecular weight 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)
  - 32.장현주, 전동원, 이서래: 게껍질 Chitin 및 Chitosan의 소화관내 기능성에 관한 in vitro 연구, 한국식품과학회지, 26(4), 348 (1994)
  - 33.Caner, C., Vergano, P. J. and Wiles, J. L.: Chitosan film mechanical and permeation properties as affectde by acid, plasticizer and storage. J. of Food Sci. 63(6), 1049 (1998)
  - 34.Lim, J. W., Weller, C. L. and Ham, K. S.; Characteristics of Chitosan films as Affected by the Type of Solbent Acid. Food Sci. Biotechnol. 7(4), p263 (1998)
  - 35.Park, H. J., Jung, S. T., Seong, J. J., Kang, S. G., Vergano, P. J. and Testin, R. F.: Mechanical and Barrier Properties of Chitosan-based Biopolymer Film. Chitin and Chitosan Research 5(1), 19 (1999)