

크릴을 이용한 키토산 제조 및 품질 특성

김동수* · 김정룡 · 박인성¹ · 이성갑²

한국식품개발연구원 · ¹인성실업(주) · ²국립한경대학교 식품공학과

초 록 : 무한한 잠재 자원량으로 미래의 식량자원으로서의 주목받고 있는 크릴에서 단백질을 추출하고 난후 생기는 부산물인 키틴·키토산의 특성을 조사하였다. raw krill과 krill powder의 일반성분은 수분 79.1, 5.6%, 단백질 13.1, 56.1%, 지방 4.0, 18.8%, 회분 2.7, 11.4%, 기타 1.1%, 8.1%로 나타났고 크릴로부터 추출된 키틴의 수율은 3.7%로 나타났고 일반성분 분석 결과 수분 7.1%, 회분 0.4%, 질소함량 3.5%, 지방 3.1%로 나타났다. 추출된 키틴은 50% NaOH, 121°C에서 2시간 반응시켰을 때 가장 높은 탈아세틸화도인 82%의 수치를 나타냈다. 키토산 제조시 알칼리 농도와 반응온도가 일정할 때 반응 시간이 경과할수록 탈아세틸화도는 감소하였다. 키토산의 농도가 1%이고 shear rate 700 s⁻¹ 일때의 겔보기 점도는 0.09241 pa·s로 나타났다. 크릴로부터 추출된 키토산은 Sigma사의 chitosan보다 탈아세틸화도와 점도가 낮게 나타났다. (2000년 7월 21일 접수, 2000년 9월 30일 수리)

서 론

남빙양에서 어획되는 크릴(*Euphausia superba Dana*)자원은 이미 오래전부터 새로운 단백질원 및 식품소재로 각광을 받아 왔으나 최근까지도 식품산업에 이용되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서 단백질을 추출하고 남은 잔사를 이용하여 키틴, 키토산을 제조하여 산업적인 활용도를 높이고자 하였다. 키틴은 게 새우 등의 갑각류의 cuticle, 곰팡이의 균사, 조개류, 메뚜기, 바퀴벌레와 같은 곤충류의 cuticle, 오징어 등의 연체동물의 기관에 존재하는 것으로 2-acetoamino-2-deoxy-D-glucose(N-acetyl-D-glucosamine)이 β(1-4) 결합으로 이루어진 생체 고분자 물질로서 지구상에서 cellulose 다음으로 풍부한 천연 자원이다. 키틴의 주요 재원인 게, 새우 등의 수산 가공분야에서 유래되는 산업폐기물과 미생물 관련업계로부터 생산, 제조되고 세계적으로 연간 1.5×10⁵ metric tons으로 추정되고 있으며 이중 미국의 수산식품가공에서 나오는 키틴의 생산량이 연간 5.3~7.8×10⁶ kg에 달하고 있다.¹⁾

천연 다당류중 유일하게 염기적 특성을 갖고, 여타 키틴에 비해 약산에 대한 용해도가 좋으며 독성이 없고, 흡착성, 생분해성, 항종양활성, 면역증진작용 등 다양한 기능을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 미생물의 생장을 억제하여 식품보존제로서 이용이 가능하다.²⁾ 분자량 10,000~40,000의 키토산이 항균력이 크다고 알려져 있다.³⁾ 건강식품, 의약품, 사료, 토양개량제 등의 다양한 분야에 응용이 가능한 새로운 고부가 가치의 생물자원으로서 기대되고 있고 그 기능 중 식품업에 이용되고 있거나 응용될수 있는 것은 단백질 등의 고분자 물질의 흡착능, 항균 및 항 곰팡이성, 항 돌연변이원성, 지질 및 콜레스테롤 흡착과 체외 배출능, 색소 흡착능, 유화성, 점도 등이다.⁴⁾ 이러한 성질을 식품산업에 실질적으로 이용하기 위한 것으로는 과일

및 달걀의 표면처리를 함으로서 저장성의 향상, 두부 제조시 첨가로 단백질의 응고 및 저장성의 향상, 김치에 첨가하여 지나친 발효의 억제와 저장성 향상 등의 용도로 활용하기 위한 노력을 기울이고 있다. 본 실험에서는 무한한 자원량으로써 미래 식량으로서의 주목을 받고있는 크릴로부터 영양학적 가치가 높은 단백질을 회수하고 부산물로 생성되는 키틴을 활용하여 키토산을 제조하고 다양한 기능을 갖는 소재로 이용하기 위한 기본적인 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

시료

남빙양에서 Krill(*Euphausia superba Dana*)을 어획 후 바로 급속냉동된 것을 이용하여, 동결건조 후 powder 상태로 사용하였다.

일반성분 분석

수분, 지방, 단백질, 및 회분 등의 일반성분은 AOAC법에 따라 측정하였다.

키틴의 추출 및 분리

Romo 등⁵⁾과 Hackman⁶⁾ method를 변형하여 실시하였다. 시료에 단백질 제거를 위해 1 N NaOH를 사용하였고 증류수로 세척한 후 1 N HCl로 무기질을 포함한 산 가용성 성분을 제거, 여과하였다. 크릴로부터 키틴의 수율을 높이기 위한 온도 조건은 20, 40, 60, 80, 100°C 각각의 온도와 2, 4, 6시간동안 1 N NaOH로 추출하였으며, 1 N HCl로 처리한 후 methanol을 사용하여 색소를 제거한 다음 세척, 여과하였다. 이 과정에서 남은 잔사를 건조시켜 키틴을 얻었다.

키토산 제조

키틴을 50% NaOH를 사용하여 121°C에서 2, 3, 4, 5시간별로 반응시켜 탈 아세틸화시켜 키토산을 얻었다.

찾는말 : 크릴, 키틴, 키토산, 겔보기 점도
*연락처 : Tel : 82-31-780-9050; Fax : 82-31-780-9059
E-mail : dskim@kfri.re.kr

키토산의 탈 아세틸화도 측정

키토산의 탈아세틸화도는 콜로이드 측정법(PVSK 법)으로 측정하였다.²⁾ 즉, 시료와 standard chitosan(Sigma reagent)를 각각 0.5 g씩을 5% acetic acid 100 ml에 녹인 후 증류수 30 ml에 1 ml을 혼합한 후 0.1% toluidine blue solution을 2~3 drops 넣은 후 0.0025 N PVSK(potassium polyvinyl sulfate solution)으로 적정하는데 적정점은 액의 청색이 청자색으로 되고 백색 침전이 부유되기 시작하는 점으로 하였다. 계산식은 다음과 같다.

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

$$X = 1/400 \times 1/1000 \times f \times 161 \times V$$

$$Y = 0.5 \times 1/100 \times X$$

$$V = 0.0025N \text{ PVSK 소비량}(ml)$$

$$f = 0.0025N \text{ PVSK 규정도계수}$$

겉보기 점도

제조된 키토산을 건조시켜 5% acetic acid solution을 용매로 한 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0% 농도의 키토산 용액을 제조하여 원통형 점도계(Haake Viscometer RV20, U.K)로 전단속도 0~1000 1/s, 측정온도 25°C에서 구한 측정값들은 Hakke sofeware support version 1,2를 사용하여 분석하여 겉보기 점도를 측정하였다.

결과 및 고찰

크릴의 일반성분 분석

본 연구에서 사용한 raw 크릴과 크릴 powder의 일반성분 조성은 Table 1에 나타난 바와 같이 수분 79.1, 5.6%, 단백질 13.1, 56.1%, 지방 4.0, 18.8%, 회분 2.7, 11.4%, 기타 1.1, 8.1%로 나타났다. 크릴의 일반성분은 연구자가 사용한 크릴의 크기, 성별, 연령, 어획시기에 따라 다소간의 차이점이 있었으며⁷⁻⁹⁾ Grantham¹⁰⁾에 의한 크릴 일반성분의 standard analytical value를 보면 수분 80.1%(77.9~83.1%), 단백질 13%(11.9~15.4%), 지방 2.8%(1.3~5.1%), 회분 3% 내외라고 보고 되어

Table 1. General composition of raw krill and krill powder

Sample	Moisture	Protein	Fat	Ash	Others
Raw krill	79.1	13.1	4.0	2.7	1.1
Krill powder	5.6	56.1	18.8	11.4	8.1

Table 2. General composition of Anrartic Krill

Sample	Water	Protein	Fat	Ash	Researcher*
1	76.60	19.63	2.65	1.48	Hirano ⁶⁾
2	79.95	17.65	1.31	1.43	Suyama ⁷⁾
3	79.69	17.41	1.64	1.45	Suyama ⁸⁾
4	84.20	12.90	0.40	1.10	Suzuki ⁹⁾

*: reference¹⁶⁾.

1. 3: frozen sample.

2: collected from stomach of Antarctic whali.

4: shell is removed by peeling machine.

Table 3. Yields of Chitin at different extract temperature condition for 2hrs

Yield(%)	Temp(°C)				
	20	40	60	80	100
	1.3	2.6	2.3	2.4	2.2

Table 4. Yields of chitin at different extract time at 40°C

Yield(%)	Time(hr)		
	2	4	6
	2.5	3.7	2.8

있다. Raw krill의 경우 Grantham¹⁰⁾의 보고와 유사한 경향을 나타내고 있으나 단백질의 경우 함량이 낮았으며, 지방의 함량이 다소 높은 것으로 나타났다. 크릴 powder의 경우에는 Romo⁹⁾과 Ryung¹¹⁾등의 연구결과와 비교할 때 본 실험의 크릴의 단백질 함량이 가장 낮게 나타났으며, 지방의 함량이 다소 높게 나타난 결과를 보였다. 이러한 결과도 볼때 본 실험에서 사용한 크릴은 지방함량이 높은 시료인 것으로 생각된다.

키토신의 최적추출 조건과 특성

Table 3 및 Table 4는 키토신을 추출하기 위한 온도와 시간별 조건을 조사한 결과이다.

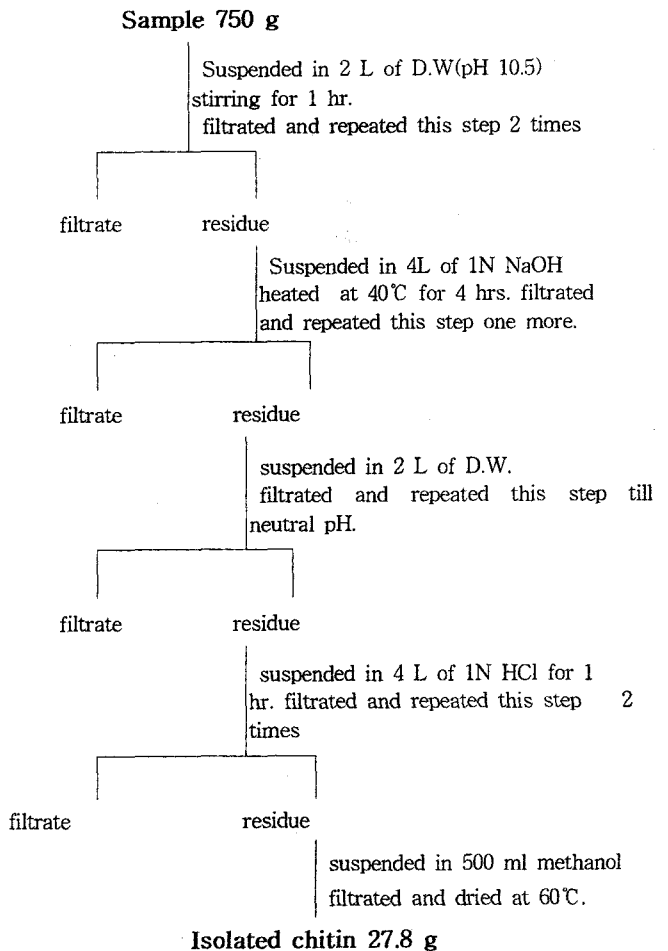


Fig. 1. Scheme of Optimum extraction method of chitin from krill.

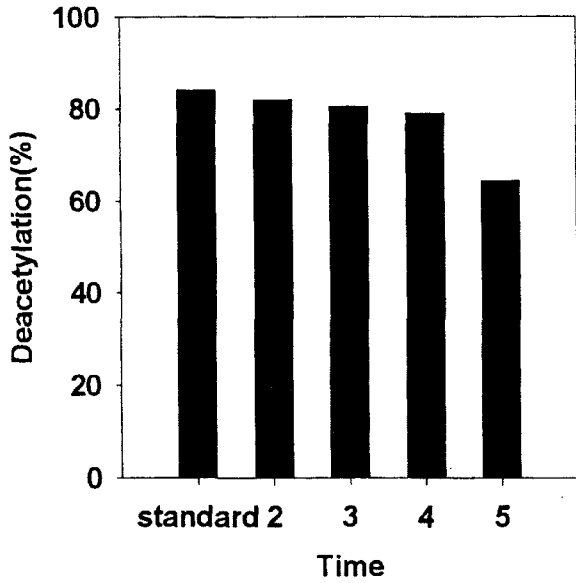


Fig. 2. Effect of time on the degree of deacetylation.

키토산을 추출하기 위해 20, 40, 60, 80, 100°C 각각의 온도에서 2시간씩 1N NaOH를 사용하여 단백질을 제거한 후 1N HCl로 탄산칼슘을 제거하고 methanol을 사용하여 색소를 제거, 여과, 건조했을 때 40°C에서 가장 높은 수율인 2.6%를 나타냈으며, 각 온도에 대한 각각의 수율은 1.3, 2.3, 2.4, 2.2%의 결과를 보였다(Table 3). 40°C의 온도에서 시간별 조건을 검토하기 위하여 2, 4, 6시간씩 1N NaOH로 처리한 후 증류수로 수세, 1N HCl처리, methanol로 색소를 제거한 후의 결과는 4시간동안 처리했을 때 3.7%로 가장 높은 수율을 보였으며, 2, 4시간 처리했을 때는 각각 2.52, 2.84%의 수율을 나타내었다(Table 4). 이런 결과를 토대로 크릴로부터 키토산을 얻기 위한 최적 조건은 Fig. 1과 같은 방법으로 추출한 결과 약 3.7%의 수율인 약 28g의 키토산을 얻었다.

본 연구에서 추출한 키토산과 Romo⁹⁾과 Ryung¹¹⁾이 추출한 키토산의 수율을 비교했을 때 Romo의 경우에는 키토산의 함량이 약 6.00%, Ryung의 경우에는 키토산의 함량이 약 5.82%로 보고된 것과는 달리 3.7%의 낮은 수율을 나타내고 있는데 이것은 일반성분의 함량에서 보면 Ryung과 Romo의 경우보다 lipid의 함량이 높게 나타났기 때문에 상대적으로 키토산의 함량이 적게 나온 것으로 사료된다.

크릴로부터 추출한 키토산의 일반성분 분석의 결과는 수분 7.1%, 회분 0.4%, 질소함량 3.5%, 지방 3.1%로 나타났다. 상업적 chitin 제품의 질소 함량은 6~7%로 보고¹²⁾되어 있는데, 본 실험의 결과는 이 보고와는 다소 차이가 있었다.

크릴 키토산의 특성

크릴에서 추출한 키토산을 50% NaOH을 사용하여 121°C에서 2, 3, 4, 5시간 각각에서 탈 아세틸화 과정을 거쳐 키토산을 제조한 결과 키토산으로의 평균 수율은 약 80%를 보였다.

standard chitosan과 각각의 시간에서 얻어진 키토산을 가지고 탈아세틸화도를 측정된 결과 Fig. 2와 같이 나타났다.

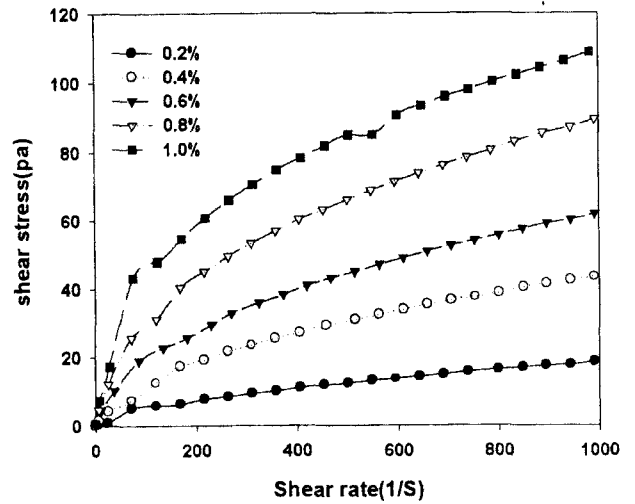


Fig. 3. Shear stress vs shear rate plot of standard chitosan on each concentration.

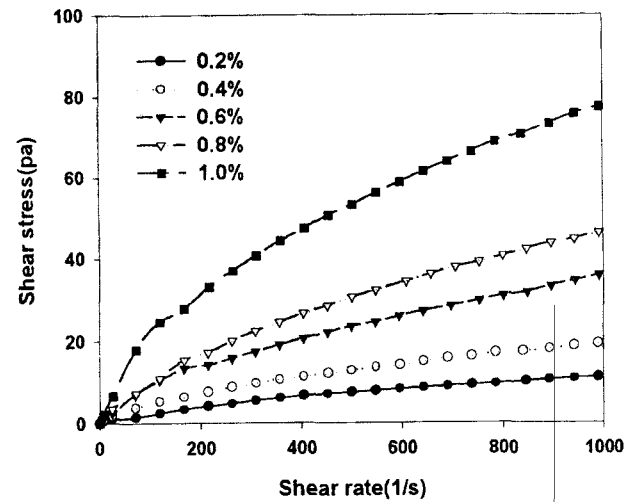


Fig. 4. Shear stress vs shear rate plot of krill chitosan on each concentration.

standard chitosan(Sigma reagent)의 탈아세틸화도는 84%로 가장 높은 것으로 나타났고 크릴로부터 추출한 키토산의 경우에는 121°C, 50% NaOH에서 2시간 동안 반응시켰을 때 82% 정도의 탈아세틸화도를 나타내었으며, 반응시간이 증가할수록 탈아세틸화도가 감소하는 경향을 나타내었다. 3, 4, 5시간동안 반응시켰을때의 탈아세틸화도는 80, 79, 74%의 결과를 나타내었다. Lee¹³⁾등의 보고에 의하면 홍게로부터 얻어진 키토산은 100°C의 경우 1시간 까지는 탈아세틸화도가 급격히 증가하여 약 65%로 나타나고 이후에는 아주 완만하게 증가하여 6시간이 되어도 80%에 도달하지 않고 120°C의 경우에는 20분 이후부터 탈아세틸화는 아주 완만하게 진행이 되어 1시간정도 반응시켰을 때 탈아세틸화도가 80%에 도달한다고 보고되어 있는데, 본 실험에서의 경우 2시간 반응시켰을 때 82%의 가장 높은 탈아세틸화도를 나타내고, 그 이후 점차 감소하는 경향을 나타내어 Lee¹³⁾의 보고와 완전히 일치하지 않았다. 또, Wu와 Bough¹⁴⁾는 새우 껍질을 이용하여 100°C, 50% NaOH용액에서

Table 5. Apparent viscosities of various concentration krill chitosan and standard chitosan at 700 s⁻¹

	Unit(pa/s)				
	Cconcentration(%)				
	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
standard chitosan	0.02154	0.05190	0.07463	0.11034	0.13826
krill chitosan	0.01298	0.02268	0.04189	0.05357	0.09241

Standard is Sigma chitosan reagent. chitosan in 5% acetic acid.

탈아세틸화도가 1시간에서 73%이고 5시간에서 80%에 도달한 것으로 보고하였는데 본 실험의 121°C, 2시간에서의 82%에 비해 탈아세틸화정도가 낮았다. 원료 및 처리조건 즉 NaOH의 농도와 반응시간에 따라 키토산의 탈아세틸화도가 다르겠지만 위의 결과로부터 121°C, 2시간반응이 가장 효율적인 조건이라 생각된다.

키토산의 품질을 결정하는 것은 각각의 상품의 특성에 따라 점도 및 중합도, 탈아세틸화 도는 중요한 인자로 되어 있다.¹⁵⁾ 본 실험에서는 standard chitosan(Sigma reagent)와 탈아세틸화도가 가장 높은 키토산에 대하여 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0% 농도 별로 점도를 측정하였다. Shear rate(1/s)와 shear stress(Pa)에 대한 관계는 Fig. 3, Fig. 4과 같다. 즉, shear rate가 증가함에 따라 shear stress가 증가 하였으며, 의사 가소성 유체(pseudoplastic fluid) 특징을 나타내었다. 장¹²⁾등의 결과에서는 탈아세틸화 과정에서 알칼리 용액의 농도, 반응 온도가 일정할 때 반응 시간이 길어질수록 점도는 감소하는 경향을 나타내고 Sigma사 키토산이 흥계에서 추출한 키토산보다 점도가 낮은 경향을 나타냈으나, 본 실험에서는 Sigma사 키토산의 점도가 크릴추출 키토산의 점도보다 높은 결과는 나타냈다. 농도가 1% 이고 shear rate 700 s⁻¹ 일때의 겔보기 점도는 standard chitosan은 0.13826 Pa · s, krill chitosan은 0.09241 Pa · s로 나타났다(Table 5.).

감사의 글

이논문은 1999년도 수산특정연구 사업의 연구비에 의하여 연구된 결과의 일부입니다. 본 연구를 지원해 주신 해양수산부와 인성실업(주)에 진심으로 감사드립니다.

참고문헌

1. Austin, P. R., Brine, C. J., Castle, J.E. and Zikakis, J.P. (1981) Chitin. *New facts of research science* **212**, 749.
2. Hong, S.P. and Kim, D.S. (1995) About application of chitosan. *Bull. Food Tech.* **8**, 49-60.
3. Kim, K. O., Moon, H. A., and Jeon, D. W., (1995) The effect of low molecular weight chitosan on the characteristics of kimchi during fermentation. *Kor. J. Food Sci, Technol.* **27**, 420-427.
4. Knorr, D. (1984) Use of chitinous polymers in food a challenge for food research and development. *Food Technol.* **38**, 85.
5. Romo, C. R. and Anderson, C. G. (1979) Determination of optimum parameters for protein isolation from krill(*Euphasia superba*) waste products. *J. Food Sci.* **44**, 1425.
6. Hackman, R. H. (1954) Studies on chitin I. Enzymatic degradation of chitin and chitin esters. *Aust. J. Biol. Sci.* **7**, 168.
7. Hirano, T., Kikuchi, T. and Okada, I. (1964) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **30**, 267-271.
8. Suyama, M., Nakajima, K. and Nonaka, J. (1965) *ibid.* **31**, 302-306.
9. Suzuki, T.(1978) The 5th International Ocean Development Conference, Session C-2, Tokyo, Sept. pp. 33-36.
10. Grantham, G. J.(1977) In "The Utilization of krill, Southern Ocean Fisheries Survey Programme," FAO, pp. 3-16.
11. Ryung-Yang. (1992) A Basic Study on chitin from Krill and kruma Prawn for Industrial Use. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **24**, 14.
12. Chang, H.-J. and Jeo, D.-W. (1994) In vitro study on the functionality in digestive tract of chitin and chitosan from Crab Shell. *Kor. J. Food technol.* **26**, 348-354.
13. Lee, W.-J. and Oh, H.-I. (1995) Effects of reaction temperature, time and particle size on the physicochemical properties of chitosans. *Kor. J. Food Technol.* **27**, 997-1002.
14. Wu, A. C. M. and Bough, W. A. (1978) A study of variables in the chitosan manufactory 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.
15. Food Chemicals. (1987) chitin, chitosan products in Japan. *Food chemical newspaper, co.*, 4, p. 135.
16. Suzuki, T (1981) Fish and krill protein processing technology. *Applied science publishers.* 193-197.

Study on the Manufacturing of Chitosan Using Krill(*Euphausia superba Dana*) and Quality Characteristics

Dong-Soo Kim*, Jeong-Ryong Do, In-Sung Park¹ and Seong-Kap Rhee²(*Korea Food Research Institute, San #46-1, Baekhyun-dong, Bundang, Songnam, Kyonggi 463-420; ¹In-Sung corporation co., #113-2 Hannam, Yongsan 140-210; ²National Han Kyong University, Department of Food Science & Technology, Ansong, Kyonggi 456-749, Korea*)

Abstract : For the use of Antarctic krill(*Euphausia superba Dana*) as food resource, general composition, extracting condition of chitin and quality characteristics of chitosan were investigated. General composition of frozen krill(*Euphausia superba Dana*) was consisted of moisture 79.0%, protein 13.1%, lipid 4.0%, VBN 7.7mg%, ash 2.7%, others 1.2% and that of dried krill powder was moisture 5.6%, protein 56.1%, lipid 18.8%, ash 11.4%, others 8.1%. The condition of chitin extraction from krill powder was treated with 1N NaOH at 40°C for removing protein, 1N HCl for excepting mineral substances and methanol for decoloring. The yield of chitin by new procedure developed was 3.7%. The composition of extracted chitin contents was moisture 7.1%, ash 0.4%, protein 3.5%, lipid 3.1%. The results of degree of deacetylation in chitosan at 50% NaOH, 121°C, for 2 hrs was showed 82%. At the same alkali concentration and reaction concentration, a longer reaction time gave a decreased degree of deacetylation. The apparant viscosity was 0.09241 Pa in 1% chitosan from krill and 0.13826 Pa in standard chitosan.

Key words : krill, chitin, chitosan, apparent viscosity.

*Corresponding author