

오징어 연골을 이용한 Chitosan 및 N-acetylchitosan film의 제조 및 특성

최현미 · 이근태
부경대학교 식품공학과

Chitosan and N-acetylchitosan film from Squid Pen and Their Characteristics

Hyeon-Mee CHOI and Keun-Tai LEE

Department of Food Science and Technology, Pukyong National University,
Pusan 608-737, Korea

In order to utilize the processing wastes of squid, chitosan was prepared by intermittent deacetylation treatment of β -chitin richly contained in the pen of squid, and then their characteristics of chitosan and N-acetylchitosan film were studied. The acetylation time of N-acetylchitosan film-1 (N-ACF-1) manufactured from chitosan solution by treating with acetic anhydride was about 12 hrs. In SEM photomicrographs, the surface of chitosan film was regularly arranged netlike, and that of N-acetylchitosan film-2 (N-ACF-2) was rough like snowflake and larger than chitosan film. The chitosan film (thickness 0.02 mm, time 60 min) had the highest tensile strength (1,240 kg/cm²) and elongation (58.25%), N-ACF-1 (thickness 0.02 mm, time 60 min) had the highest water permeability (539 g/m² · 24 hrs), oxygen permeability (20,000 cm³/m² · 24 hrs · atm) and water uptake (350%) among the tested films.

Key words: Chitosan film, N-acetylchitosan film-1 (N-ACF-1), Ester carbonyl group, N-acetylchitosan film-2 (N-ACF-2)

서 론

오징어 연골 chitin의 구조는 β -chitin으로서 α -chitin인 갑각류 외피 chitin에 비하여 개방된 구조라서 완만한 조건하에서 쉽게 유도체를 만들 수가 있다. 즉, 게, 새우 속에 함유되어 있는 β -chitin은 황산에만 용해되어 다양한 기능성 소재로서 활용하기 어려우며 강산 등에 녹일 경우 급속한 분해가 일어나 활용이 불가능하다. 그리고 β -chitin의 경우 α -chitin과 달리 포름산에 용해되지만 시간이 경과됨에 따라 분해가 진행되어 이용하기 어렵다. 따라서 이러한 문제점을 개선하기 위한 방안으로 화학적 수식에 의한 유도체 개발이 요구된다. 또한 chitin/chitosan은 막 형성능이 있기 때문에 formic acid-dichloroacetic acid 혼합 용액에 chitin을 용해시킨 후 에탄올로 응고시킴으로써 chitin film을 제조할 수 있으며 (Tokura et al., 1979), chitosan을 무수초산과 과염소산으로 처리하여 chitosan aceate를 만든 후 포름산에 용해시켜 필름과 섬유를 제조할 수 있다고 하였다 (Kim et al., 1990). 특히 최근에 생분해성 고분자 물질의 필요성이 강조되면서 chitosan의 아실화에 의해 제조된 film은 식용과 생분해성 필름 등에 다양하게 사용될 수 있는데 Jin et al. (1996)은 chitosan을 초산이 섞인 메탄올과 hexanomic anhydride로 불균일한 조건하에서 아실화하여 제조한 chitosan film으로 토양 속에서의 생분해성을 시험한 결과 N-acetylation이 N-hexanoylation 보다 분해가 더 빨리 진행된다고 하였다. 따라서 본 연구에서는 오징어 연골로부터 chitosan을 제조한 다음 여기에 화학적 수식을 행하여 N-acetylation하는 과정 중의 film을 제조하여 film 자체의 특성에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

강원도 강릉 지역의 수산 가공 공장에서 폐기되는 오징어 (*Octopus bartrami*) 연골을 수집하여 이물질 제거하고 수세한 후 40°C에서 12시간 열풍 건조시켜 50 mesh 정도로 분쇄한 다음 chitin 제조용 시료로 사용하였다.

2. Chitin 및 chitosan 제조

50 mesh 정도로 분쇄한 오징어 연골에 1N NaOH 용액을 가하고 실온에서 4시간 교반하여 탈단백한 다음 제조된 chitin 100 g에 40% NaOH용액 1.6 l를 가하고 110~115°C에서 90분간 탈아세틸화한 다음 증류수로 수세한 후 열풍 건조하였다 (1차 chitosan). 제조된 1차 chitosan을 110~115°C에서 30분간 재탈아세틸화하고 증류수로 수세한 후 열풍 건조하여 2차 chitosan을 얻었다. 이 2차 chitosan을 정제하여 필름을 만드는데 사용하였다.

3. Chitosan 및 N-acetylchitosan film의 제조 및 필름두께 측정

1% chitosan용액을 만든 다음 Fig. 1과 같이 chitosan 및 N-acetylchitosan film-1을 두께에 따라 제조하였으며 N-acetylchitosan film-2는 Fig. 2와 같은 반응 매카니즘으로 만들어진다. 필름의 두께는 0.001 mm의 정밀도를 가진 micrometer (Mitutoyo, Japan)로 중심과 주위 부분을 10회씩 측정하여 각 부위의 변이가 5% 이내의 것만을 선택하여 사용하였다. 투습도 측정용 시료는 그 평균값을 사용하여 투습 계수의 계산에 사용하였으며, 인장강도 측정용 시료 역시 길이 방향으로 5부위의 두께를 측정하여 그 평균값을 필름의 인장강도로 하였다.

4. SEM에 의한 표면 관찰

필름의 표면을 관찰하기 위하여 필름을 Gold coating (두께: 100~150 Å)을 행한 후 SEM (HITACHI S-2400, Japan)으로 가

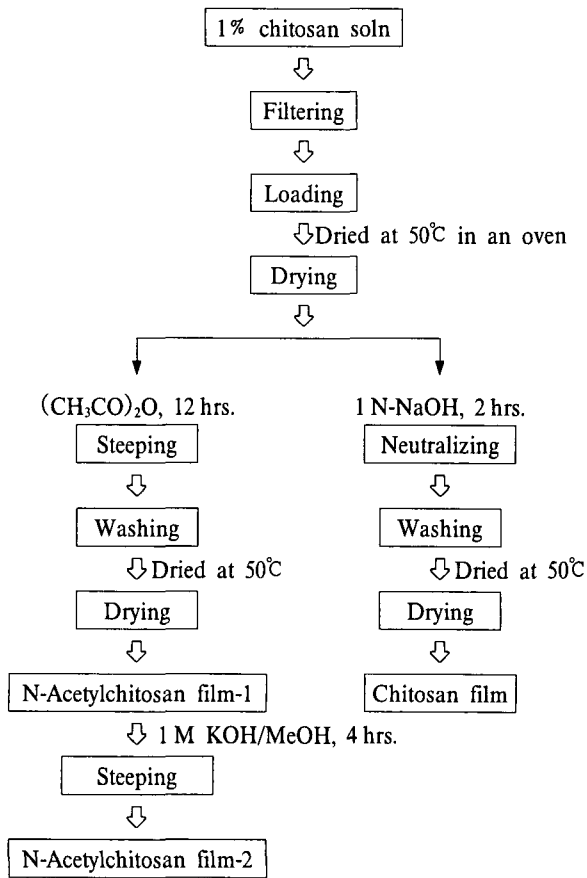


Fig. 1. Preparation of N-acetylchitosan and chitosan film.

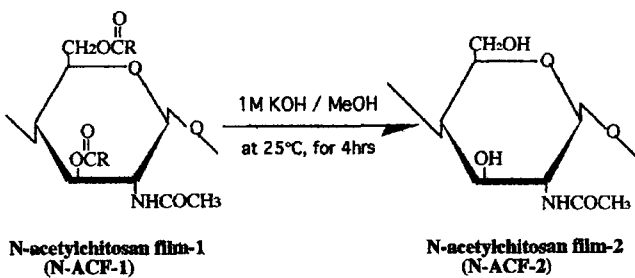


Fig. 2. Reaction mechanism to remove the ester carbonyl group from N-acetylchitosan film (N-ACF-1)

속전압 6 Kv에서 ×10 K로 측정하여 관찰하였다.

5. 인장강도 및 신장율 측정

KS A (Korean Standard Association) 1512방법에 따라 Instron Universal Testing Instrument (Model 1011)를 이용하여 load range (10 kg), cross head speed (20 mm/min), grip distance (60 mm)와 같은 조건으로 5번씩 측정하였다. 각 필름의 시험편은 너비 10 ± 0.1 mm, 길이 110 mm로 절단하여 아래의 식으로부터 인장강도와 신장율을 구하였다.

$$\text{인장강도 (kg/cm}^2\text{)} = \frac{\text{절단할때까지의 최대하중 (kg)}}{\text{시험편의 두께 (cm)} \times \text{시험편의 폭 (cm)}}$$

$$\text{신장율 (\%)} = \frac{\text{절단할때의 표점간 거리 (mm)} - \text{표점간 거리 (mm)}}{\text{표점간 거리 (mm)}} \times 100$$

6. 수분 및 산소투과도 측정

수분 투과도는 KS A 1013에 준하여 측정하였다. 컵에 필름을 봉하고 컵 내에 건조 염화칼슘을 넣고 온도 25 ± 1°C, 습도 90 ± 2 %의 항온, 항습조에 넣고 24시간 후의 컵 무게를 측정하고 무게 증가와 시간의 관계에서 직선적 증가를 나타낼 때 그 기울기에서 투습도를 다음 식으로부터 구하였다.

$$\text{수분투과도 (g/m}^2 \cdot \text{day)} = \frac{\text{24시간 후의 시험체의 무게 (g)} - \text{처음 실험체의 무게 (g)}}{\text{컵의 투습면적 (m}^2\text{)}}$$

산소투과도는 한국공업규격 KS M 3052-95의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 시험편에 산소를 투과시키기 위한 투과 셀, 투과된 산소를 검지하는 산소 검지기, 검지된 출력전압과 산소 투과도를 대응시키기 위한 부하 저항기, 촉매관, 유량계, 기록계 등으로 구성된 시험장치를 이용하여 22 ± 2°C에서 측정하여 다음 식으로 산소 투과도를 산출하였다.

$$O_2GTR = \frac{(E_c - E_o) \times Q}{(A \times R)}$$

O₂GTR: 산소투과도 {cm³/m² · 24 h · atm}

E_c: 측정 전압 (V)

E_o: 베이스라인 전압 (V)

Q: 교정 상수

A: 투과 면적 (cm²)

R: 부하 저항치 (Ω)

7. 흡수능 측정

두께 0.02 mm 필름의 흡수능은 10 mm × 10 mm 되게 자른 다음 Khor et al. (1997)의 방법으로 탈이온수가 들어있는 페트리디쉬에 담갔다가 10분 간격으로 꺼내어 여과지로 물을 제거한 후 micrometer로 필름의 두께를 측정하여 원래의 두께로부터 늘어난 필름의 두께를 계산하여 %로 나타냈다.

결과 및 고찰

1. Film 제조중 무수초산 처리 시간에 따른 ester carbonyl 형성의 변화

아세틸화된 chitosan 분말은 용해할 수 있는 용매가 다양하지 않으므로 분말로부터 film을 제조하지 않고 chitosan으로부터 film을 만드는 과정 중에 아세틸화하여 N-acetylchitosan film-1 (N-ACF-1)을 만들 때 실온에서 무수초산으로 12시간 정도 반응시켜 film을 만든 경우 무수초산 처리시간에 따른 ester carbonyl 형성의 변화를 I.R. spectrum으로 조사한 것이다 (Fig. 3). 시간이

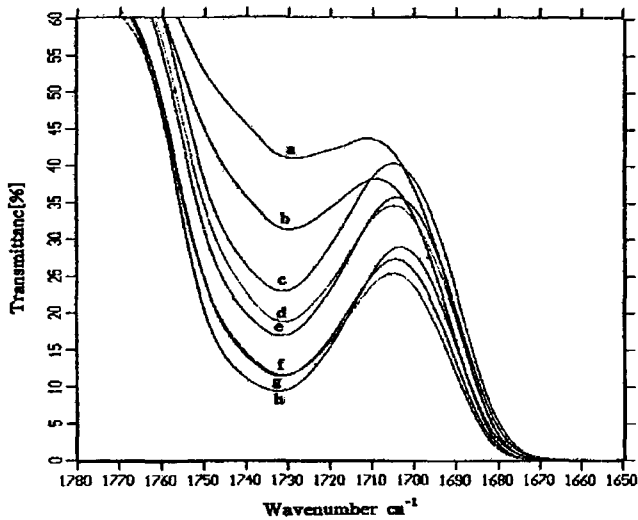


Fig. 3. Changes in transmittance of ester carbonyl bend in N-acetylchitosan film as a function of reaction time with acetic anhydrides at room temperature.
 a: 0.5 hr b: 1 hr c: 3 hrs d: 5 hrs
 e: 7 hrs f: 9 hrs g: 13 hrs h: 11 hrs

경과함에 따라 $1,732\text{ cm}^{-1}$ 에서 투과도가 감소하였으며 12시간 정도까지 acetyl화가 일어남을 알 수 있었다. 반응 시간을 짧게 한 경우 film이 약해 찢어지는 현상이 있었으며 또한, 본 실험에서 chitosan의 반응성을 증가시키기 위하여 반응 매개체로서 메탄올을 사용하였는데 이는 Moore et al. (1978)이 chitosan을 N-acetylation 하기 위하여 메탄올/무수초산을 용매로 사용하였을 경우 실온에서 N-acetylation이 완전히 일어나는데 12시간 이하가 된다고 보고한 것과 같은 결과를 얻었다.

2. Film의 표면 특성

Chitosan 및 N-acetylchitosan film을 전자현미경으로 10,000배 확대하여 표면을 관찰한 결과 (Fig. 4), chitosan film (CHF)은 균일한 조직을 이루고 있었으나 N-acetylchitosan film-1 (N-ACF-1)은 불규칙한 조직을 보였는데 이것은 chitosan 용액을 무수초산으로 처리하는 과정에서 일어나는 N- 또는 약간의 O-acetylation에 의한 것으로 생각된다. N-ACF-1을 1 M KOH/MeOH로 처리한 N-acetylchitosan film-2 (N-ACF-2)은 O-acetylation에 의해 생성된 ester carbonyl group이 제거됨에 따라 규칙적인 chitin의 조직을 나타내었다. 그러나 acetylation에 의해 chitosan 보다 분자가 크게 되면서 다소 거친 조직을 형성하는 것으로 나타났다.

3. Film의 인장강도 및 신장율

물리적 변형, 강성 등의 성질을 측정하기 위해 두께가 다른 각 필름의 인장강도를 측정된 결과 (Table 1), 인장강도는 3개의 film 모두 두께가 0.02 mm에서 0.05 mm로 증가함에 따라 감소하였으며, chitosan film은 두께가 0.02 mm인 경우 $1,240\text{ kg/cm}^2$ 로 3개의 film중 인장강도가 가장 컸다. 한편 N-acetylchitosan film-1을 KOH/MeOH로 4시간 처리한 필름의 인장강도가 가장 낮았다.

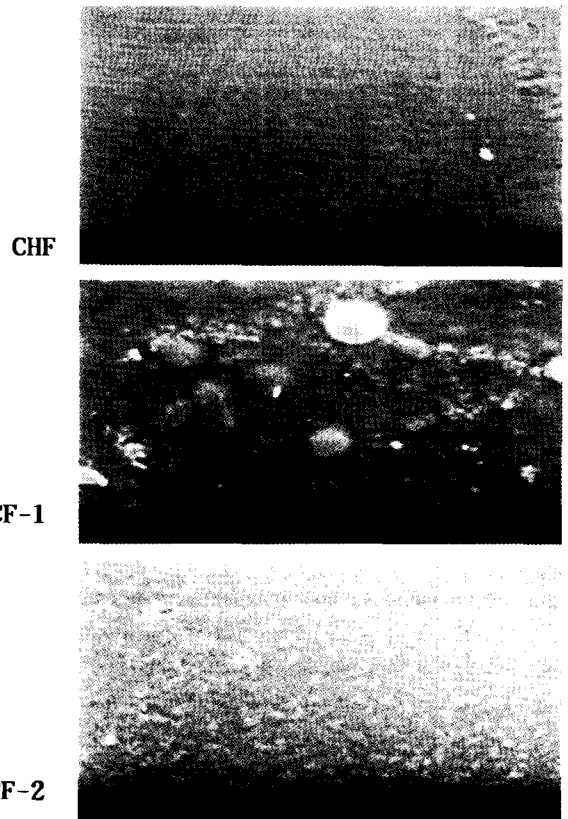


Fig. 4. Scanning electron micrographs of films.
 CHF (chitosan film)
 N-ACF-1 (N-acetylchitosan film-1)
 N-ACF-2 (The film was treated with methanolic KOH to remove the ester carbonyl groups from N-ACF-1)

Table 1. Tensile strength of chitosan and N-acetylchitosan films according to differences of thickness

Thickness (mm)	Tensile strength (kg/cm ²)		
	CHF ^a	N-ACF-1 ^b	N-ACF-2 ^c
0.02	1,240	782	682
0.03	1,147	739	647
0.04	1,073	686	616
0.05	1,007	649	583

a; chitosan film
 b; N-acetylchitosan film-1
 c; the film was treated with methanolic KOH to remove the ester carbonyl groups from N-ACF-1

또한 필름의 두께 변화에 따른 신장율을 측정된 결과 (Table 2), 신장율 역시 인장강도와 마찬가지로 두께가 0.02 mm에서 0.05 mm로 증가함에 따라 감소하였으며, chitosan film은 두께가 0.02 mm인 경우 58.25%로 3개의 film중 가장 신장율이 컸다. 그리고 N-acetylchitosan film-1을 KOH/MeOH로 4시간 처리한 경우 신장율이 가장 낮은 것은 결정성의 증가 즉, α-chitin의 구조를 가지

계 됨으로 인한 결과라 생각된다.

4. Film의 수분 및 산소 투과도

투습도 (Table 3)는 KS A 1013 방법에 준하여 측정된 결과 필름의 두께가 클수록 낮았으며, N-acetylchitosan film이 539 g/m² · 24 hrs로 가장 높았고 chitosan film은 372 g/m² · 24 hrs로 가장 낮았다. 이것은 각 필름의 분자배열이 chitosan film은 아주 조밀하게 배열 되어 있고 N-acetylchitosan film은 느슨하게 배열되어 있기 때문이라 생각된다.

Table 2. Elongation degree of chitosan and N-acetylchitosan film according to differences in thickness

Thickness (mm)	Elongation (%)		
	CHF ^a	N-ACF-1 ^b	N-ACF-2 ^c
0.02	58.25	22.25	17.25
0.03	56.20	17.25	14.25
0.04	54.00	11.50	9.25
0.05	52.75	7.25	5.75

a; chitosan film

b; N-acetylchitosan film-1

c; the film was treated with methanolic KOH to remove the ester carbonyl group from N-ACF-1

Table 3. Water permeability of chitosan and N-acetylchitosan films according to differences of thickness

Thickness (mm)	Water permeability (g/m ² · 24 hrs)		
	CHF ^a	N-ACF-1 ^b	N-ACF-2 ^c
0.02	372	539	528
0.04	331	516	497

a; chitosan film

b; N-acetylchitosan film-1

c; the film was treated with methanolic KOH to remove the ester carbonyl group from N-ACF-1

Cho et al. (1992)은 chitosan film이 다른 cellophane, PVC, PE film보다 투습도가 더 높았다고 하였으며, Ahn (1989)은 chitosan film의 투습도를 이용하여 고등어, 전갱이 등의 염건품을 제조할 때 chitosan film으로 포장하여 건조함으로써 건조 및 저장 중의 품질변화를 감소시키는 효과가 있었다고 보고한 바 있다.

또한 필름의 산소투과도는 한국공업규격 KS M 3052-95의 방법으로 22 ± 2°C에서 측정하였다. Table 4에서 두께가 0.02 mm인 chitosan film은 11.4 cm³/m² · 24 hrs · atm로 N-ACF-1이 20,000, N-ACF-2가 110인 것에 비하면 산소가 거의 투과되지 않았다. 또한 이러한 투습도와 산소투과도를 이용하여 각각의 식품에 맞는 필름을 선택하여 신선한 야채의 보존기간을 연장 한다든지 또는 지방 산화방지용 식품 포장재료, 술이나 음료를 정제하는데 사용되는 투석막 등으로도 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

5. 필름의 흡수능

Fig. 5와 Fig. 6는 두께가 0.02, 0.04 mm인 필름의 흡수능을 나타낸 것이다. 앞의 수분 투과도와 마찬가지로 두께가 0.02 mm인

Table 4. Oxygen permeability of chitosan and N-acetylchitosan films

Thickness (mm)	O ₂ permeability (cm ³ /m ² · 24 hrs · atm)		
	CHF ^a	N-ACF-1 ^b	N-ACF-2 ^c
0.02	11.4	20,000	110

a; chitosan film

b; N-acetylchitosan film-1

c; the film was treated with methanolic KOH to remove the ester carbonyl group from N-ACF-1

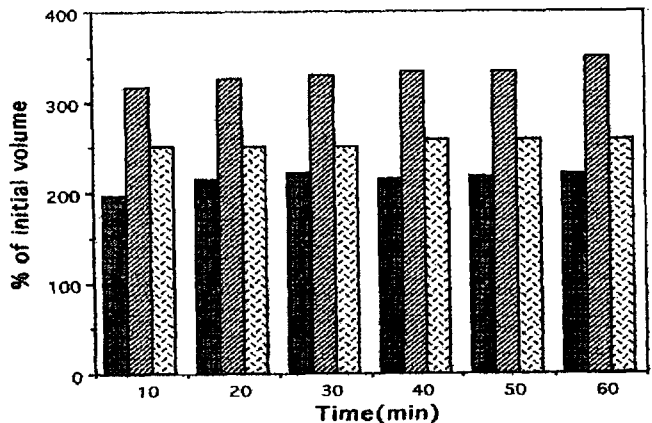


Fig. 5. Water uptake of chitosan film and N-acetyl chitosan films as a function of immersion time in deionized water at room temperature.

Film thickness; 0.02 mm

■ CHF; chitosan film

▨ N-ACF-1; N-acetylchitosan film-1

▩ N-ACF-2; The film is treated with methanolic KOH to remove the ester groups from N-ACF-1

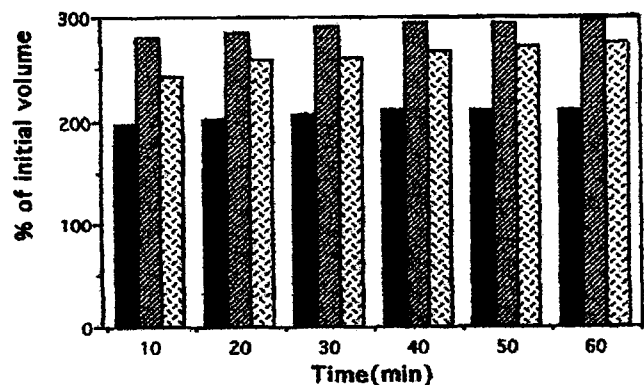


Fig. 6. Water uptake of chitosan film and N-acetyl chitosan films as a function of immersion time in deionized water at room temperature.

Film thickness; 0.04 mm

■ CHF; chitosan film

▨ N-ACF-1; N-acetylchitosan film-1

▩ N-ACF-2; The film is treated with methanolic KOH to remove the ester groups from N-ACF-1

N-acetylchitosan film-1은 350%의 수분을 흡수하여 3개의 필름 중 가장 높았으며 초기 10분 정도 경과되었을 때 나타난 320% 정도의 흡수율은 시간이 경과하여도 일정한 수준으로 유지되었다. Chitosan film은 약 220% 정도로 가장 적게 나타났는데 이것은 N-acetylchitosan film이 chitosan film 보다 이완된 구조를 이루고 있기 때문인 것으로 생각된다. 즉 인접한 사슬이 약하게 되어 수분 침투 가능성이 상대적으로 증가하기 때문이라 생각된다. 두께가 0.04 mm인 N-acetylchitosan film-1은 약 300% 정도의 수분흡수를 보여 필름의 두께가 얇은 것이 더 많은 흡수율을 나타냈다.

요 약

β -chitin으로 되어 있는 오징어 연골로부터 간헐적으로 chitosan을 만든 다음 Chitosan 및 acetylchitosan 필름을 제조하여 생물 기능성 소재로서의 필름의 특성에 대하여 검토한 결과 N-ACF-1을 만들 때 사용되는 무수초산과의 반응시간은 12시간 정도가 적당하였으며 이 때 I.R. spectrum상에 $1,732\text{ cm}^{-1}$ 에서 bend가 나타났으며 이 ester carbonyl group은 1 M KOH/MeOH로 실온에서 4시간 정도 침지시켰을 때 bend가 사라졌다. 두께가 0.02 mm인 chitosan film의 인장강도가 $1,240\text{ kg/cm}^2$, 신장율 58.25%로 가장 컸으며 N-ACF-1이 투습도 $539\text{ m}^2 \cdot 24\text{ hr}$, 산소투과도 $20,000\text{ cm}^3/\text{m}^2 \cdot 24\text{ hrs} \cdot \text{atm}$ 로 3개의 필름 중 가장 높았다. 필름의 흡수능은 두께가 0.02 mm인 N-acetylchitosan film이 60 min에서 350% 정도 흡수하였다. 두께가 0.04 mm N-ACF-1은 60 min에서 약 300% 흡수하여 두께가 얇은 것이 더 높은 흡수능을 나타냈다.

감사의 글

본 연구는 교육부에서 지원한 해양식량자원개발 특성화사업단 연구원 지원금에 의해 수행된 연구과제 결과이며 연구비를 지원해 준 교육부에 심심한 사의를 표합니다.

참 고 문 헌

- Ahn, C.B. 1989. Preparation and utilization of chitosan from crustacean shells. Ph.D. Thesis, National Fisheries Univ. of Pusan, Korea, pp. 1~94 (in Korean).
- Cho, J.S., J.J. Han and C.H. Lee. 1992. Physical properties of chitosan film made from crab shell. Korean. J. Food Sci. Technol., 24(6), 574~580.
- Hirano, S. and Y. Ohe. 1975. A facile N-acylation of chitosan with carboxylic anhydrides in acidic solutions. Car. Res., 41, C1~C2.
- Hirano, S., R. Yamaguchi, N. Fukui and M. Iwata. 1991b. Biological gels: The gelation of chitosan and chitin. Biotech. Polymer., 181~188.
- Hirano, S., Y. Ohe and H. Ono. 1976. Selective N-acylation of chitosan. Car. Res., 47, 315~320.
- Ikeda, H., S. Yamamura, K. Takatama and T. Nagai. 1996. Physicochemical properties of chitosan film prepared on a metal plate loaded with electric charge. Chem. Pharm. Bull., 44(7), 1372~1375.
- Jin, X., P.S. McCarthy and R.A. Gross. 1996. Chitosan film acylation and effects on biodegradability. Macromol., 29, 3436~3440.
- Kandaswamy, C.K. 1978. Chemical differences in the α - and β -chitins and their significance in the quality of the by-products of chitin. Proceedings of the First International Conference on Chitin and Chitosan, 517~524.
- Khor, E., A.C.A. Wan, C.F. Tee and G.W. Hastings. 1997. Reversible water-swallowable chitin gel. John Wiley & Sons, Inc. pp. 2049~2053.
- Kienzle-Sterzer, C.A., D. Rodriguez-Sanchez and C. Rha. 1982b. Mechanical properties of chitosan film; Effect of solvent acid. Mackromol. Chem., 183, 1353~1359.
- Kim, S.M., S.M. Park, H.M. Choi and K.T. Lee. 1997. Rheological properties of chitosan manufactured from the pens of domestic (*Todarodes pacificus*) and foreign (*Ommastrephes bartrami*) squid. J. Kor. Fish. Soc. 30(5), 859~867.
- Kim, S.S., S.H. Kim and Y.M. Lee. 1996. Preparation, characterization and properties of β -chitin and N-acetylated β -chitin. J. Polymer Sci.: Part B: Polymer Physics., 34, 2367~2374.
- Kim, U.B., S.S. Im, J.H. Kim and S.M. Hundson. 1990. Properties of chitosan acetate film and fibers. J. Kor. Fiber Society. 27(9), 709~716.
- Kurita, K., S. Ishii, K. Tomita, S.I. Nishimura and K. Shimoda. 1994. Reactivity characteristics of squid β -chitin as compared with those of shrimp chitin: high potentials of squid chitin as a starting material for facile chemical modifications. J. Polymer Sci.: Part A: Polymer Chem., 32, 1027~1032.
- Moore, G.K. and G.A.F. Roberts 1978. Studies on the acetylation of chitosan. Proceedings of the First International Conference on Chitin and Chitosan, 421~429.
- Tokura, S., Nishi, N. and Noguchi, J. 1979. Studies on chitin. III. Preparation of chitin fibers. Polymer J., 11(10), 781~786.
- 공업진흥청. 1981. 방습포장재료의 투습도 시험 방법 (KS A 1013), 한국공업표준협회
- 공업진흥청. 1990. 플라스틱 필름 및 시트의 기체 투과도 시험 방법 (KS M 3052), 한국공업표준협회
- 공업진흥청. 1991. 식품포장용 플라스틱 필름 (KS A 1512), 한국공업표준협회

2000년 5월 19일 접수

2000년 7월 25일 수리