

## 붉은대게 폐각으로부터 키토산의 제조 및 물리화학적 특성

김봉섭<sup>†</sup> · 박광식 · 주옥수\* · 서명교\*\* · 허종화\*\*\*

경상대학교 농어촌개발연구소  
\*진주산업대학교 식품공학과의  
\*\*동의공업대학 환경시스템공학과  
\*\*\*경상대학교 식품공학과

## Preparation and Physicochemical Properties of Chitosan from Red Crab Waste-Shell

Bong Seob Kim<sup>†</sup>, Kwang Sik Park, Ok Soo Joo\*, Myung Gyo Suh\*\* and Jong Wha Hur\*\*\*

*Inst. of Agric. & Fishery Develop., Gyeongsang National University*

*\*Dept. of Food Sci. & Technol., Chonju National University*

*\*\*Dept. of Environ. Systems Eng., Dongeui Institute of Technology*

*\*\*\*Dept. of Food Sci. & Technol., Gyeongsang National University*

(Received 1 January 2001 ; Accepted 15 February 2001)

### ABSTRACT

Chitosans were prepared from red crab chitin under various alkali treatment conditions(different alkali concentrations, reaction times and temperatures) and their physicochemical properties were investigated. The nitrogen content and deacetylation degree of red crab chitin were 6.15% and 22.17%, respectively. By the IR spectra, red crab and reference chitin showed the sharp bands at 1650  $\text{cm}^{-1}$  and 1550  $\text{cm}^{-1}$ , which are characteristic of chitin. The nitrogen contents of prepared chitosans ranged from 6.19~7.48%. The deacetylation degree was increased from 63~76% and 48~78% with increasing reaction time and temperature, whereas viscosity was decreased. The nitrogen content and yield of red crab chitosan prepared from chitin with 50% NaOH, 1:25(w/v) for 3.0 hr at 120 $\text{cm}^{-1}$  were 7.26% and 85.0%, respectively. And viscosity, deacetylation degree and molecular weight, 67.0 mPa·s, 75.0% and  $6.5 \times 10^5$  Dalton, respectively. From the IR spectra, the amide absorption bands of red crab and reference chitosan became very weak, similarly. And at solid state  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra, C=O(carbonyl carbon) signals absent, whereas  $\text{CH}_3$ (methyl carbon) was residues. Chemical shift of  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of red crab and reference chitosans were in good agreement with slight experimental deviation.

**Keywords :** Red crab shell, Chitin, Chitosan, Deacetylation, IR spectrum

### I. 서 론

지구상의 환경적인 문제로 인하여 그 중요성이 재인식되고 있는 천연 고분자는 자연계에 존재하는 동·식물, 미생물 등을 구성하는 물질로써, 최근들어 천연고분자 중에서도 종래 미이용 생물자원이었던 키토질의 이용에 많은 연구가 진행되고 있다.<sup>1)</sup>

키토산은 균류 및 동·식물계에 걸쳐서 광범위하게 존재하고 있으며, 균류와 식물계에 있어서 키토산은 주로

곰팡이, 효모 및 버섯 등에 함유되어 있고, 동물계에서는 게, 새우 등의 갑각류, krill의 피각, 곤충류의 갑피, 오징어의 골격 등 생물중에 존재하는 다당으로서 cellulose 다음으로 지구상에서 다량 존재하는 생체 고분자이다.<sup>2,3)</sup> 그러나 직접 키토산을 이용한 응용분야는 제한적인데, 그 이유는 키토산의 용해성 때문이다.<sup>4)</sup> 하지만 키토산을 탈아세틸화하여 얻은 키토산의 이용에 관한 연구와 응용이 활발하여 cellulose와 같은 기능성 다당으로써 다양한 용도로 개발되어 사용되고 있는데, 이는 키토산의 높은 amine 함량과 다가양이온 성질 때문인 것으로 보고되고 있다.<sup>5,6)</sup> 이와 같은 성질을 이용한 키토산은 식품가공 공장폐수의 응집제로써 많이 사용되고 있으며<sup>7,8)</sup> 음료수, 주스 및 술 등의 혼탁을 유발시키는

<sup>†</sup>Corresponding author : Institute of Agriculture and Fishery Development, Gyeongsang National University  
Tel: 055-751-5176, Fax: 055-743-4630  
E-mail: bms\_k@hanmail.net

탄닌과 단백질을 침전시키므로 맥주, 와인 및 과일주스 등의 청정제<sup>9)</sup>로도 사용되고 있을 뿐만아니라 흡수성, 계면활성, 흡착성, 겔형성능, 화장품의 보습제, 항콜레스테롤제, 항암제, 혈액응고 방지제, 항균제 및 생분해성 필름 등에 응용되고 있다.<sup>10,11)</sup> 그러나 이러한 다양한 가능성을 가진 키토산은 보통 정제 키토산을 강알칼리 용액중에서 가열처리 하여 탈아세틸화시켜 제조하지만, 그 제조방법에 따라서 키토산의 성질에 영향을 미친다. Kurita 등<sup>12)</sup>은 40% NaOH용액으로 3시간 알칼리 처리하였을 때, 탈아세틸화도가 95%인 키토산을 얻었으나, 진한 알칼리 가열처리에 의해 glucoside 결합도 부분적으로 절단되므로 생성 키토산의 분자량 저하를 초래한다고 보고하였다.

Wu 등<sup>13)</sup>은 키토산의 탈아세틸화 반응시간과 분자량과의 관계를 구명하였는데, 50% NaOH용액으로 100°C에서 0.5시간 가열하였을 때, 중량 평균 분자량이  $1,487 \pm 98 \times 10^3$  Dalton이었던 것이 3시간 처리시에는  $846 \pm 24 \times 10^3$  Dalton, 5시간 처리시  $667 \pm 26 \times 10^3$  Dalton으로 탈아세틸화 반응시간이 증가할수록 분자량이 감소한다고 보고하였다. 키토산 분자량은 또한 원료 키토산의 제조공정에서 HCl의 처리조건에도 영향을 받는데, Lusena 등<sup>14)</sup>은 5°C에서 HCl로 산처리하여 얻은 키토산으로부터 제조한 키토산의 고유점도는 21 dl/g인데 비하여, 실온에서 HCl 처리하여 얻은 키토산은 4 dl/g이었다고 보고한 바 있다.

그러나 Bough 등<sup>15)</sup>은 키토산의 분자량 감소는 탈아세틸화 반응을 질소기체하에서 행한다면 어느 정도 완화시킬 수 있다고 하였으며, Mima 등<sup>16)</sup>은 동일 농도의 NaOH용액을 사용할 경우, 저온에서 장시간 처리하는 방법이 단시간 처리하는 방법보다도 분자량이 높은 키토산을 얻을 수 있다고 보고하였다.

이와 같이 키토산으로부터 제조한 키토산은 제조공정상의 알칼리 처리조건에 따라서 성질이 달라지므로, 본 연구에서는 동일한 방법으로 원료 키토산을 제조한 다음, 알칼리 농도, 반응시간 및 반응온도를 각각 달리 하여 붉은대게 키토산을 제조하였으며, 이들의 물리화학적 특성을 비교 분석하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

실험에 사용한 붉은 대게 (*Chionoecetes japonicus*, red crab) 폐각은 통형 수산물 검사소로부터 제공받아 수세, 건조한 다음 100 mesh 이상으로 분쇄하였으며, Bough 등<sup>15)</sup>과 No 등<sup>17)</sup>의 방법인 탈회공정과 탈단백공

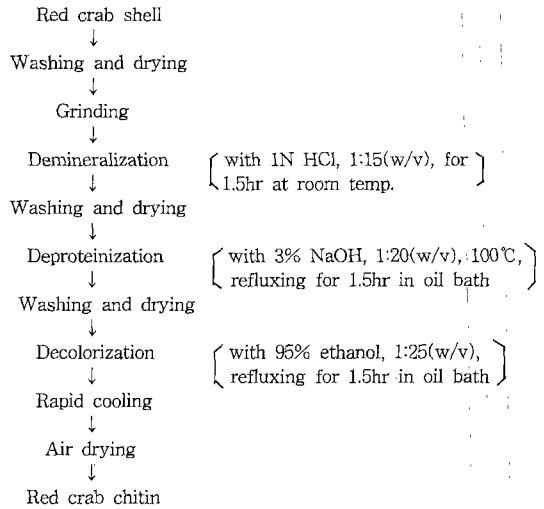


Fig. 1. Preparation procedure for extraction of chitin from red crab wasteshell.

Table 1. Parameters studied to establish optimal conditions for extraction of chitosan from red crab chitin

Samples	Conditions			
	Time (hr)	Temperature (°C)	Alkali concentration (%)	Alkali ratios(w/v)
RCS <sup>1)</sup> 1	1.0	110	20	1:25
RCS 2	1.0	110	30	1:25
RCS 3	1.0	110	50	1:25
RCS 4	0.5	120	50	1:25
RCS 5	1.0	120	50	1:25
RCS 6	2.0	120	50	1:25
RCS 7	3.0	120	50	1:25
RCS 8	5.0	120	50	1:25
RCS 9	3.0	80	50	1:25
RCS 10	3.0	100	50	1:25
RCS 11	3.0	110	50	1:25
RCS 12	3.0	120	50	1:25
RCS 13	3.0	130	50	1:25

<sup>1)</sup>Red crab chitosan.

정 및 탈색소공정을 거쳐 키토산을 제조하여(Fig. 1) 키토산 제조원료로 사용하였다. 먼저 탈회공정은 붉은대게 껍질분말을 실온에서 1N HCl(1:15, w/v)을 1.5시간 처리하였고, 탈단백공정은 기름욕조상에서 100°C의 3% NaOH(1:20, w/v)을 1.5시간 처리하였으며, 탈색소공정은 기름욕조상에서 95% ethanol(1:25, w/v)을 1.5시간 처리하여 수행하였다. 그리고 표준용 키토산 및 키토산은 미국 Sigma사의 제품을 사용하였다.

## 2. 붉은대게 껍질 키토산의 제조

붉은대게 키틴 원료를 환류장치가 부착된 1l 삼구 플라스크에 20~50%의 알칼리 용액을 1:25(w/v)의 비율로 각각 가한 다음, 기름 욕조상에서 알칼리 반응시간 0.5~5.0시간, 알칼리 반응온도 80~130°C로 처리조건을 달리하여 탈아세틸화시켰다. 이를 흐르는 물에서 급냉하여 수세 및 중화한 다음, 건조기(50~60°C)에서 하룻밤 건조시켜 각각의 키토산을 제조하였다. 본 실험에 사용된 알칼리 처리조건은 Table 1과 같으며, 알칼리 농도는 20%(RCS1), 30%(RCS2) 그리고 50%(RCS3), 반응 시간은 0.5시간(RCS4), 1.0시간(RCS5), 2.0시간(RCS6), 3.0시간(RCS7) 그리고 5.0시간(RCS8), 반응온도는 80°C(RCS9), 100°C(RCS10), 110°C(RCS11), 120°C(RCS12), 그리고 130°C(RCS13)로 나타났다.

## 3. 분석 및 측정법

### (1) 일반성분

붉은대게 껍질 및 키틴, 키토산의 수분, 질소, 조단백질, 조지방 및 조회분 함량은 AOAC(Association of Official Analytical Chemists)방법<sup>18)</sup>에 의하여 구하였다.

### (2) 탈아세틸화도

Sannan 등<sup>19)</sup>의 방법에 준하여 IR 스펙트럼의 1550 cm<sup>-1</sup>에서의 흡광도와 2878 cm<sup>-1</sup>에서의 흡광도의 비(A1550/A2878)를 구한 다음, 다음의 식에 의하여 탈아세틸화도(DDA, degree of deacetylation)를 계산하였다.

$$DDA(\%) = -34.68 \times \frac{A_{1550}}{A_{2878}} + 98.03$$

### (3) 고유점도 및 분자량

키토산 분말을 0.2 M acetate-0.1 M NaCl-4 M urea 용액에 용해시켜 Cannon Fenske Capillary Viscometer (size 75, 미국, Cannon Co.)를 사용하여 30°C에서 상대점도  $\eta_{rel} = \eta/\eta_0$ , 비점도  $\eta_{sp} = (\eta - \eta_0)/\eta_0$ , 환원점도  $\eta_{red} = \eta_{sp}/C$ 를 구한 다음, 고유점도  $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp}/C$  =  $\lim_{c \rightarrow 0} 1/C(\eta_{rel})$ 를 구하였다.

분자량은 Howink의 점도식,

$$\log M_w = 1/\alpha(\log [\eta] - \log K)$$

을 이용하여 구하였다. 여기서,  $[\eta]$ 는 고유점도, K는 정수,  $M_w$ 은 분자량,  $\alpha$ 는 정수이다. K,  $\alpha$ 의 정수는 각각  $8.93 \times 10^4$ , 0.71인 Lee의 정수를 사용하였다.<sup>20)</sup>

### (4) IR 스펙트럼

키틴 및 키토산의 화학구조식을 분석하는 방법 중의 하나인 IR 스펙트럼은 키틴, 키토산 분말( $\geq 200$  mesh)

과 KBr을 고풍 섞어 분쇄, 혼합하여 disc를 만든 후, Bruker IFS 66 FT-IR(독일)로 4000 cm<sup>-1</sup>~400 cm<sup>-1</sup>의 범위에서 측정하였다.

### (5) 고체용 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼

키토산의 NMR 스펙트럼은 분말( $\geq 200$  mesh) 상태에서 <sup>13</sup>C-CP/ MAS법을 응용한 고체용 <sup>13</sup>C-NMR 분광광도계 Bruker MSL 200(독일)를 사용하여 측정하였으며, 화학적 이동(chemical shift)은 glycine의 중심탄소를 0 ppm으로 하여 이 측정값에 42 ppm정도를 더하여 TMS(tetramethyl silane)값을 구하였다.

### (6) 아미노산 분석

아미노산 분석용 시료를 충분히 건조한 뒤, 분쇄하여 50 mg을 cap tube에 넣고 6 N HCl 2 ml를 가한 다음, 혼합액을 잘 섞은 후, 110°C의 heating bloc에서 24시간 가수분해하였다. 이렇게 분해한 액을 막여과기(membrane filter)로 여과하여 끓는 수욕조상에서 CI가스가 완전히 제거될때까지 반복하여 증류수를 가하며, 건조시켰다. 여기에 sodium citrate buffer(pH 2.2) 2 ml를 가하여 완전히 용해시킨 다음, 다시 막여과기로 여과하여 아미노산 자동분석기 Pharmacia Biochrom 20(영국)를 이용하여 분석하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 폐각 및 키틴의 성분과 구조분석

붉은대게 껍질과 Fig. 1의 공정으로 추출한 키틴의 성분을 비교분석한 결과는 Table 2와 같다. 붉은대게 껍질의 수분, 회분 및 지방 함량은 각각 5.78%, 43.76% 및 0.50%였으며, 조단백질 함량은 21.75%이었다. 그리고 붉은대게 키틴의 경우는 회분 0.48%과 지방 0.35%이었고, 질소 함량은 6.15%로 Shahidi 등<sup>21)</sup>이 게나 새우 껍질로부터 제조한 키틴의 질소 함량 6.42%

Table 2. Analytical values of red crab shell and chitin

Compositions	Red crab	
	Shell	Chitin
Moisture (%)	5.78	5.53
Crude ash (%)	43.76	0.48
Crude fat (%)	0.50	0.35
Crude protein (%)	21.75	- <sup>2)</sup>
Nitrogen (%)	-	6.15
Yield (%)	-	20.10
DDA <sup>1)</sup> (%)	-	22.17
Amino acid (mg/g)	119.6	8.76

<sup>1)</sup>Degree of deacetylation, calculated from Sannan's equation and I.R. spectrum;  $-34.68 \times A_{1550}/A_{2878} + 98.03$ .

<sup>2)</sup>Not detectable.

와 6.21%와는 큰 차이를 보이지 않았다.

또한 붉은대게 껍질로부터 제조한 키토산의 수율은 20.10%로서 이는 Hirano 등<sup>6)</sup>이 보고한 갑각류 키토산의 수율 20~25%와 일치하였다. 그리고 붉은대게 키토산의 탈아세틸화도는 22.17%이었는데, 이는 붉은대게를 식용으로 사용하기 위해 육질을 분리할 때의 가공상 혹은 껍질의 보관, 유통과정 중의 부분적인 탈아세틸화와 키토산 제조시의 알칼리 처리에 의한 추가적인 탈아세틸화가 진행되어서 다소 높게 나타난 것으로 생각되었다. 그리고 붉은대게 껍질의 총 구성 아미노산 함량은 119.6 mg/g인데 반하여 키토산의 경우는 8.76 mg/g으로서 알칼리 처리에 의하여 약 90% 이상 제거되었다.

제조한 키토산의 화학 구조분석을 위하여 IR 스펙트럼

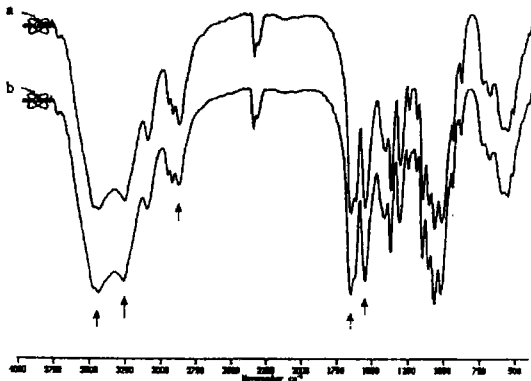


Fig. 2. Infrared spectra of red crab (a) and reference (b) chitins.

을 Fig. 2에 나타내었다. 붉은대게 및 표준용 키토산의 IR 스펙트럼을 비교하였을 때, 거의 유사하게 3450 cm<sup>-1</sup>와 3240 cm<sup>-1</sup>에서 O-H와 N-H의 신축진동, 2900 cm<sup>-1</sup> 근처의 C-H 신축진동, 그리고 1650 cm<sup>-1</sup>와 1550 cm<sup>-1</sup> 근처의 amide I(C=O)과 amide II(N-H) 흡수밴드가 강하게 나타났다. 이는 Feofilova 등<sup>22)</sup>이 보고한 3263 cm<sup>-1</sup>, 1655 cm<sup>-1</sup>, 1620 cm<sup>-1</sup>와 1551 cm<sup>-1</sup> 근처에서 키토산의 흡수밴드가 공통적으로 나타난다고 한 것과 일치함을 알 수 있었다.

### 2. 키토산의 특성

알칼리 처리조건에 따른 키토산의 물리화학적 특성은 Table 3과 같다. 대체적으로 질소함량은 알칼리 농도가 20~50%로 증가할수록 6.19~6.72%로 증가하였으며, 또한 반응시간과 반응온도가 증가할수록 각각 6.78~7.48%와 6.64~7.44%로 증가하였다. Mather 등<sup>23)</sup>에 의하면, 상업적 제품의 질소함량은 키토산이 6~7%, 키토산이 7.0~9.5%라고 보고한 바 있는데, 본 실험에서 알칼리 처리조건에 따른 키토산의 경우 6.19~7.40%의 범위로서 대체로 이와 일치하였으나, 알칼리 농도 20%와 30%, 반응온도 80°C의 조건에서 제조한 키토산의 질소 함량은 7.0% 이하로서 키토산의 질소함량 이론치를 나타내었다.

또한 제조 조건에 따른 키토산의 잔존 회분 함량은 0.12~0.48%로서 큰 차이는 없었으며, 용해도는 알칼리 농도 20%와 30%, 반응온도 80°C에서 제조한 키토산은 초산에 용해되지 않았고 그 외의 제조 키토산은 약

Table 3. Physicochemical properties of chitosans prepared from red crab chitin by different alkali treatment conditions

Sample <sup>1)</sup>	Ash (%)	Nitrogen (%)	Solubility (%)	D.D.A <sup>2)</sup> (%)	Viscosity <sup>3)</sup> (mPas)
RCS 1	0.48	6.19	- <sup>4)</sup>	34	-
RCS 2	0.45	6.30	-	36	-
RCS 3	0.20	6.72	85	66	10
RCS 4	0.37	6.78	85	63	11
RCS 5	0.32	7.05	85	63	12
RCS 6	0.21	7.10	93	72	83
RCS 7	0.15	7.26	97	75	67
RCS 8	0.13	7.48	97	76	65
RCS 9	0.46	6.64	-	48	-
RCS 10	0.31	7.04	95	70	101
RCS 11	0.18	7.13	97	73	90
RCS 12	0.15	7.26	97	75	67
RCS 13	0.12	7.44	97	78	22

<sup>1)</sup>See in the Table 1.

<sup>2)</sup>Degree of deacetylation calculated from Sannan's equation and I.R. spectrum, ;  $-34.68 \times A_{1550}/A_{2878} + 98.03$ .

<sup>3)</sup>Determined by Haake rotovisco viscometer at 30°C.

<sup>4)</sup>Not detectable.

85% 이상이었다.

#### (1) 알칼리 농도의 영향

NaOH 용액의 농도 20%와 30%에서 제조한 키토산의 탈아세틸화도는 각각 34%와 36%로 거의 탈아세틸화가 일어나지 않은 키토산의 특성을 그대로 유지하였으며, 초산에도 거의 녹지 않았다. 그러나 50% NaOH 용액의 농도에서 얻은 키토산의 탈아세틸화도는 66%로서 20%와 30% NaOH 농도에 비하여 약 2배 정도로 증가하였으며, 초산에 대한 용해도는 약 85% 정도였다. 또한 점도는  $10 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 로서 다소 낮게 나타났다. Kurita 등<sup>12)</sup>의 보고에 의하면, 탈아세틸화도는 키토산 제조시 사용하는 알칼리 용액의 농도에 의존한다고 하였는데, 본 연구 결과에서도 이와 일치하는 결과를 얻었다.

#### (2) 반응시간의 영향

0.5시간과 1.0시간 동안 처리하였을 때, 탈아세틸화도는 동일하게 63%로서 다소 낮게 나타났으며, 점도는 각각  $11.0 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 와  $12.0 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 로 거의 점성을 나타내지 않았는데, 이는 낮은 탈아세틸화도에 기인하는 것으로 생각되었다. 그리고 알칼리 처리시간 2.0시간에서 탈아세틸화도는 72%, 점도는  $83 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 였으며, 3.0시간과 5.0시간 처리하였을 때, 탈아세틸화도는 각각 75%와 76%로 증가하였고, 점도는  $67 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 와  $65 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 로 감소하였다. Bough 등<sup>15)</sup>과 Mima 등<sup>16)</sup>에 의하면, 키토산의 탈아세틸화도는 알칼리 처리시간이 길어질수록 증가한다고 하였으며, 이로 인한 분자사슬(molecular chain)의 감소를 초래하여 점도가 떨어진다는 보고와 일치하는 경향이었다.

#### (3) 반응온도의 영향

반응온도  $80^\circ\text{C}$ 에서 제조한 키토산의 탈아세틸화도는 48%로써 거의 키토산의 성질을 가지고 있어 초산에 거의 녹지 않았으며, 알칼리 용액의 온도를  $100^\circ\text{C}$ 에서  $130^\circ\text{C}$ 로 점점 올렸을 때, 키토산의 탈아세틸화도는 70%에서 78%로 증가하였으며, Table 3에서 보는 바와 같이 초산에 의한 용해도는 95% 이상이었으며, 점도는  $101 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 에서  $22 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 로 감소하였다.

이상의 결과로 미루어 볼 때, 키토산의 탈아세틸화도는 알칼리 농도, 알칼리 처리시간과 처리온도가 증가할수록 증가하였고, 분자사슬의 감소를 초래하므로 점도는 감소하였다.

### 3. IR 스펙트럼분석

Fig. 3~5는 알칼리 처리조건을 달리하였을 때, IR 스펙트럼상의 흡수밴드를 비교한 것이다. 20%와 30%의 알칼리 농도에서 제조된 키토산의 경우 O-H 신축진동, C-H 신축진동, N-H 신축진동 및 amide I,

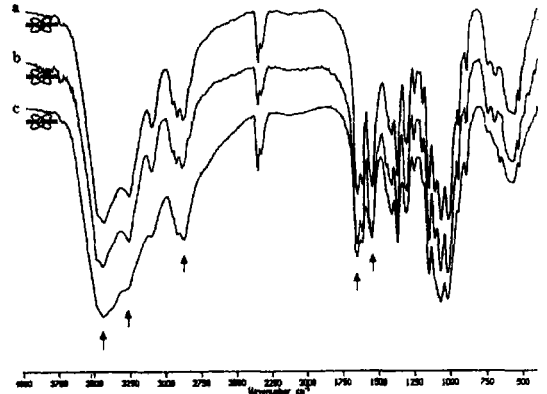


Fig. 3. Infrared spectra of chitosans prepared from red crab chitin with different alkali concentrations for 1.0 hr at  $110^\circ\text{C}$ ; a. 20% NaOH sol, b. 30% NaOH sol, c. 50% NaOH sol.

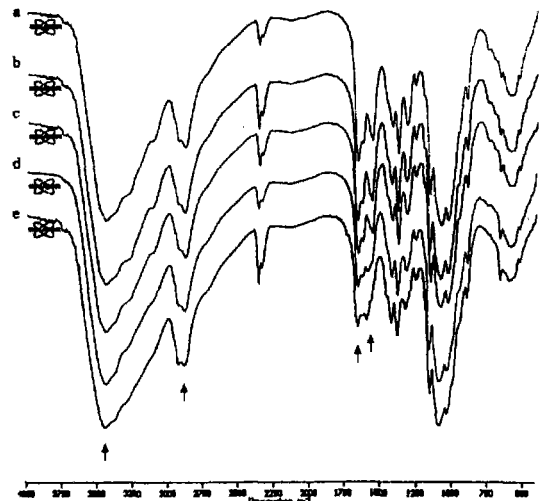


Fig. 4. Infrared spectra of chitosans prepared from red crab chitin with 50% NaOH sol. for different reaction times at  $120^\circ\text{C}$ ; a. 0.5 hr, b. 1.0 hr, c. 2.0 hr, d. 3.0 hr, e. 5.0 hr

amide II의 흡수밴드가 뚜렷하게 나타났으며, 특히 amide I, II 흡수밴드가 강한 peak를 보여 거의 탈아세틸화가 일어나지 않았음을 알 수 있었다(Fig. 3a,b).

그러나 50%의 알칼리 농도에서 제조한 키토산의 경우 amide I과 amide II 흡수밴드의 peak가 감소하여 탈아세틸화가 진행되었음을 확인할 수 있었다. 이는 Roberts 등<sup>24)</sup>과 Sannan 등<sup>19)</sup>이 탈아세틸화 반응에 거의 영향을 받지 않는 C-H 신축진동과 O-H 신축진동에 비하여 amide I과 amide II 밴드는 탈아세틸화가 진행될수록 흡수 peak가 감소한다는 보고와 일치하였다.

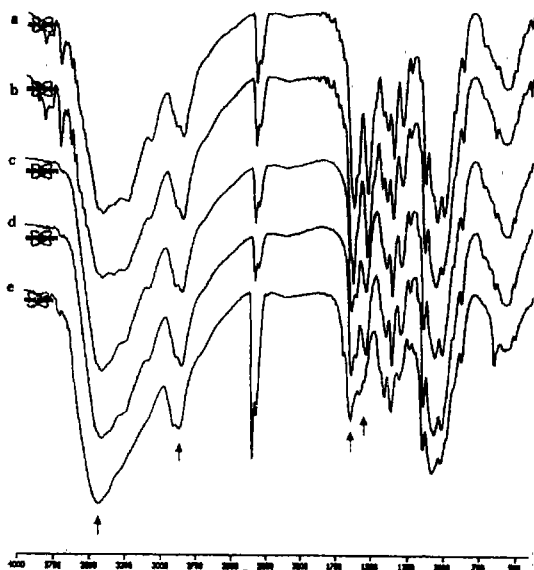


Fig. 5. Infrared spectra of chitosans prepared from red crab chitin with 50% NaOH sol. for 3.0 hr at different reaction temperatures; a. 80°C, b. 100°C, c. 110°C, d. 120°C, e. 130°C.

Fig. 4에서, 알칼리 처리시간이 길어질수록 amide 밴드의 흡수 peak가 감소하였는데, 이는 1.0시간 이내의 짧은 알칼리 처리시간에 비하여 탈아세틸화가 더 일어났음을 의미하는 것이다.

또한 반응 온도를 달리하였을 때, Fig. 5와 같이 80°C의 반응 온도에서 제조된 키토산의 IR 스펙트럼 (Fig. 5a)은 amide I밴드와 amide II밴드의 흡수 peak가 강하게 나타나 거의 탈아세틸화가 일어나지 않았음을 확인할 수 있었으며, 100°C에서 130°C로 반응온도가 점점 증가할수록 amide 밴드의 흡수 peak는 감소하였으므로 탈아세틸화도가 높은 키토산을 얻을 수 있었다.

4. 키토산의 물리화학적 특성

키틴분말에 50% NaOH 용액을 1:25(w/v)의 비율로 넣어 120°C의 기름 욕조상에서 3.0시간 탈아세틸 처리하여 얻은 키토산의 물리화학적 특성은 Table 4와 같이 나타났다.

붉은대게 키토산의 회분 및 질소함량은 각각 0.15%와 7.26%였으며, 수율은 85.0%로서 Hirano 등<sup>6)</sup>이 키틴으로부터 얻은 키토산의 수율 70~80%보다는 높은 경향이였다. Furda<sup>25)</sup>에 의하면, 키토산은 약 75%가 탈아세틸화되고 약 25%가 아세틸화 상태로 존재하며, 키틴으로부터 키토산 제조 방법들과 키틴 원료들에 따라

Table 4. Physicochemical properties of red crab chitosan prepared from red crab chitin with 50% NaOH sol. for 3.0 hr at 120°C (Dry weight basis)

Properties	Parameters
Moisture (%)	5.53
Ash (%)	0.15
Fat (%)	0.45
Nitrogen (%)	7.26
Yield (%)	85.00
Viscosity <sup>1)</sup> (mPas)	67.00
Solubility <sup>2)</sup> (%)	97.00
DDA <sup>3)</sup> (%)	75.00
M.W. <sup>4)</sup> (Daltons)	6.5 × 10 <sup>5</sup>

<sup>1)</sup>Measured for 2%(in 1% acetic acid) solution at 25°C

<sup>2)</sup>(w<sub>1</sub> - w<sub>2</sub>/w<sub>1</sub>) × 100, w<sub>1</sub>; before acetic acid treatment, weight(g)  
w<sub>2</sub>; after acetic acid treatment, weight(g)

<sup>3)</sup>Degree of deacetylation

<sup>4)</sup>Molecular weight

서 그 값이 매우 다양하나 대부분의 키토산은 탈아세틸화가 75%이상이라고 하였는데, 본 실험에서 제조한 붉은대게 키토산의 탈아세틸화도 75.7%와 대체로 일치하였다.

또한 점도는 65.0 mPa · s로서 Filar 등<sup>26)</sup>이 보고한 저점도 키토산(25~70 mPa · s)이었으며, 초산에 의한 용해도는 붉은대게 키토산의 경우 약 97%로 나타났다. 그리고 분자량은 6.5 × 10<sup>5</sup> Dalton으로서 Muzzarelli<sup>4)</sup>가 보고한 키토산의 분자량 1~5 × 10<sup>5</sup> Dalton보다는 다소 높은 경향이였으나, Kobayashi 등<sup>27)</sup>이 보고한 게 껍질 키토산의 분자량 7.0 × 10<sup>5</sup>~1.8 × 10<sup>6</sup> Dalton보다는 다소 낮았다.

5. 키토산의 구조분석

붉은 대게 및 표준용 키토산의 구조를 비교분석하기

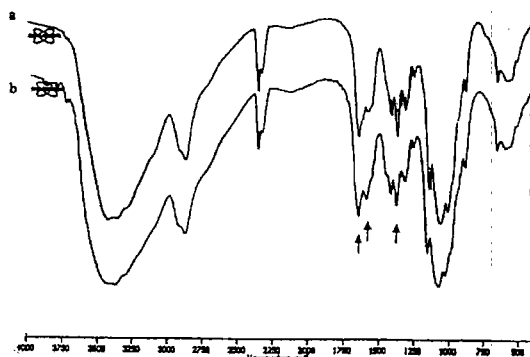


Fig. 6. Infrared spectra of red crab (a) and reference (b) chitosans.

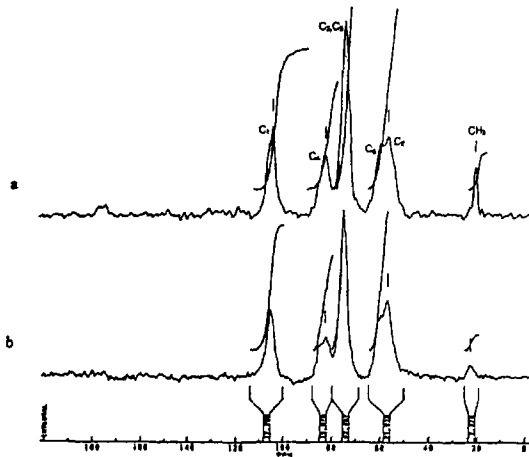


Fig. 7. Solid state  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of red crab (a) and reference (b) chitosans.

위하여 IR 및  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 6, 7과 같다.

Fig. 6의 IR 스펙트럼에서 표준용 키토산의 흡수밴드와 붉은대게 키토산의 흡수 밴드가 잘 일치하였다. 그리고 Sannan 등<sup>19)</sup>이 보고한  $1655\text{ cm}^{-1}$ 의 amide I,  $1550\text{ cm}^{-1}$ 의 amide II,  $1310\text{ cm}^{-1}$ 의 amide III의 흡수 밴드가 키토산에 비하여 키토산의 경우 훨씬 약하게 인식된다고 한 것과 일치하였는데, 이는 키토산의 제조 공정중의 강한 알칼리처리에 의한 탈아세틸화에 기인한 것으로 생각되었다.

그리고 Fig. 7은 붉은대게 및 표준용 키토산의  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼을 나타낸 것으로 스펙트럼상의  $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ 가 잘 분리되었음을 알 수 있었다. 또한 키토산으로부터 탈아세틸화 반응에 의해 제조된 붉은대게 키토산의 메

틸탄소( $\text{CH}_3$ )는 표준용 키토산에 비하여 약간 더 존재하고 있는 것으로 보아 상대적으로 탈아세틸화가 덜 진행되었음을 알 수 있으며, 카르보닐 탄소( $\text{C}=\text{O}$ )는 거의 나타나지 않았다. 그리고 화학적 이동은  $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ 까지 단일 peak가 나타나 표준용 키토산과 오차범위내에서 잘 일치하였다(Table 5).

## IV. 결 론

붉은대게 폐각으로부터 제조한 키토산에 알칼리 처리조건을 달리하여 키토산을 제조하였으며, 이들의 물리화학적 특성과 구조를 비교분석하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 붉은대게 껍질키토산의 질소함량은 6.15%, 수율 및 탈아세틸화도는 각각 20.10% 및 22.17%로 나타났으며, 알칼리 처리조건을 달리하여 제조한 키토산의 질소함량은 6.19~7.48%, 탈아세틸화도는 34~78%로써 알칼리 농도, 반응시간 및 반응온도가 증가할수록 증가하였으나, 점도는 감소하는 경향을 나타내었다.

2. 20%와 30%의 알칼리 농도로 처리하였을 때, IR 스펙트럼상의  $1550\text{ cm}^{-1}$ 과  $1655\text{ cm}^{-1}$ 의 amide 밴드의 흡수 peak가 강하였으나, 50%의 농도에서는 흡수 peak가 크게 감소하였으며, 반응시간이 0.5~5.0시간, 반응온도가  $80\sim 130^\circ\text{C}$ 로 증가할수록 amide 밴드의 흡수 peak가 점점 감소하여 탈아세틸화가 많이 진행되었음을 확인할 수 있었다.

3. 키토산 제조의 최적 반응조건은 붉은대게 키토산 50% NaOH용액(1:25, w/v)으로  $120\text{ cm}^{-1}$ 에서 3.0시간 탈아세틸화하는 것이었으며, 이렇게 제조된 키토산의 수분함량은 5.53%, 회분과 조지방 함량은 각각 0.15% 및 0.45%이었으며, 질소함량은 7.26%, 수율은 85.0%이었고 점도는  $67.0\text{ mPa}\cdot\text{s}$ , 탈아세틸화도 및 분자량은 각각 75.0% 및  $6.5\times 10^5$  Dalton이었다.

4. 붉은대게 키토산의 IR 스펙트럼은 표준용 키토산의 스펙트럼과 잘 일치하였고 고체용  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼에서도  $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ 이 대체로 잘 분리되었음을 확인할 수 있었다. 또한 저 자기장의 카르보닐 탄소는 나타나지 않았으며, 고 자기장의 메틸탄소는 다소 존재하였지만, 고체용  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼의 화학적 이동은 오차 범위 내에서 잘 일치 하였다.

## 참고문헌

- 1) 平野茂博 : 食品用素材としてキチン, キトサン研究の現状と將來性, フードケミカル, 25-28, 1986.

Table 5. Comparison of  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shifts of red crab and reference chitosans in solid state

$^{13}\text{C}$ chemical shift	Chitosans	
	Red crab <sup>1)</sup>	Reference
C=O	-	-
$\text{C}_1$	103.35	105.35
$\text{C}_2$	58.56	58.86
$\text{C}_3$	74.38	75.10
$\text{C}_4$	82.10	82.82
$\text{C}_5$	74.38	75.10
$\text{C}_6$	59.93	61.80
$\text{CH}_3$	21.53	23.01

<sup>1)</sup>Chitosan prepared from red crab chitin with 50% NaOH sol. for 3.0 hr at  $120^\circ\text{C}$ .

- 2) Muzzarelli, R.R.A.: Chitin : Encyclopedia of Polymer Science and Engineering Vol 3 : Cellular Materials to Composites, *John Wiley & Sons*, 430-441, 1985.
- 3) Allan, G. G., Fox, J. R. and Kong, N.: A critical evaluation of the potential sources of chitin and chitosan, In "Proc. 1st Int. Conf. chitin /chitosan", (Muzzarelli, R. A. A., Pariser, E. R. editors), *MIT Sea Grant Program. Massachusetts*, 64-78, 1978.
- 4) Rutherford, F. A. and Austin, P. R.: Chitin solvents, complexes and properties, *U. of Delaware Sea Grant Publ. No. DEL-SG-13-78*, 1978.
- 5) Rane, K. D., and Hoover, D. G.: An evaluation of alkali and acid treatments for chitosan extraction from fungi, *Process Biochemistry*, **28**, 115-118, 1993.
- 6) Hirano, S., Sato, N., Yoshida, S. and Kitagawa, S.: Chemical modification of chitin and chitosan, and their novel applications, In "Industrial polysaccharides : Genetic engineering, structure/property relations and application, Ed. by Yalpani, M. Elsevier Science Publishers, 163-176, 1987.
- 7) Bough, W. A., Salter, W. L., Wu, A.C.M. and Perkins, B. E.: Influence of Manufacturing Variables on the Characteristics and Effectiveness of Chitosan Products, II. Coagulation of Activated Sludge Suspensions, *Biotechnol. Bioeng*, **20**, 1945-1955, 1978.
- 8) Knorr, D.: Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management, *Food Technol. January*, 114-120, 1991.
- 9) Soto-Peralta, N. V., Muller, H. and Knorr, D.: Effect of chitosan treatments on the clarity and color of apple juice, *J. Food Science*, **54**(2), 495-496, 1989.
- 10) Knorr, D.: Functional properties of chitin and chitosan, *J. Food Sci.*, **47**(2), 593-595, 1982.
- 11) Sandford, P. A.: Chitosan : Commercial uses and potential applications, In *Processings of the 4th International Conference on Chitin/Chitosan*(Skjak- Braek, G., Anthonsen, T., and Sandford, P. editors), *Elsevier Applied Science. London*, 51-69, 1988.
- 12) Kurita, K., Sannan, T. and Iwakura, Y.: Studies on chitin, 4. Evidence for formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero and homogeneous hydrolyses, *Macromol. Chem.*, **178**, 3197-3202, 1977.
- 13) Wu, A. C. M. and Bough, W. A.: A study of variables in the chitosan manufacturing process in relation to molecular-weight distribution, chemical characteristics and waste-treatment effectiveness, In "Proc. 1st int. conf. chitin/chitosan", (Muzzarelli, R. A. A. and Pariser, E. R. editors) *MIT Sea Grant Program MITSG 78-7. Massachusetts*, 88-104, 1978.
- 14) Lusena, C. V. and Rose, R. C.: Preparation and viscosity of chitosan, *J. Fish Res. Board Can.*, **10**, 521-528, 1953.
- 15) Bough, W. A., Salter, W. L., Wu, A. C. M. and Perkins, B. E.: Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products, I. Chemical composition, viscosity, and molecular-weight distribution of chitosan products, *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1931-1943, 1978.
- 16) Mima, S., Miya, M., Iwamoto, R. and Yoshikawa.: Highly deacetylated chitin and its properties, In "Proceeding of the 2nd international conference on chitin and chitosan(Hirano, S. and Tokura, S. editors)", Sapporo, Japan, 21-25, 1982.
- 17) No, H. K. and Meyers, S. P.: Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from sea-food processing streams, *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 580-593, 1989.
- 18) A. O. A. C.: Official methods of analysis. 15th eds. Washington, DC., 1990.
- 19) Sannan, T., Kurita, K., Ogura, K. and Iwakura, Y.: Studies on the chitin, 7. Infrared spectroscopic determination of degree of deacetylation, *Polymer*, **19**, 458-459, 1978.
- 20) Lee, V. F. P.: Solution and shear properties of chitin and chitosan, Ph. D. Thesis, University of Washington, 14-44, 1978.
- 21) Shahidi, F. and Synowieck, J.: Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab(*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards, **39**(8), 1527-1532, 1991.
- 22) Feofilova, E. P., Tereshina, V. M., Ivanova, N. I., Genei, Y. V. and Gopenngauz, F. L. : Physicochemical properties of the chitin of crabs and certain microscopic fungi, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, **16**, 377-385, 1980.
- 23) Mather, N. K. and Narang, C. K. : Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals, *J. Chem. Edu.*, **67**(11), 938-946, 1990.
- 24) Roberts, G. A. F. and Moore, G. G. : Determination of degree of N-acetylation of chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2**, 115-116, 1980.
- 25) Furda, I. : Nonabsorbable lipid binder, United States Patent #4,223,023, 1980.
- 26) Filar, L. J. and Wirick, M. G. : Bulk and solution properties of chitosan. In "Proceedings of the 1st international conference on chitin/chitosan", (Muzzarelli, R. A. A. and Pariser, E. R. editors), *MIT Sea Grant Program, Cambridge, MA.*, 169-178, 1978.
- 27) Kobayashi, T., Takkiguchi, Y., Shimahara, K. and Sannan, T. : Distribution of chitosan in *Absidia* strains and some properties of the chitosan isolated, *Nippon Nogeikaku Kaishi*, **62**(10), 1463-1469, 1988.