

게 껍질로부터 Chitin의 분리 및 특성 규명

김 성 배 · *박 태 경
경상대학교 공과대학 화학공학과
*삼성석유화학주식회사 기술연구소

Isolation and Characterization of Chitin from Crab Shell

Sung Bae Kim and *Tae Kyung Park

Department of Chemical Engineering, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea
*R & D Dept., Samsung Petrochemical Co., Ltd

ABSTRACT

Chitin was isolated from crab shell wastes and characterized for its chemical and physical properties. White powdered chitin was obtained through demineralization, deproteinization and decoloration process. The contents of inorganics was less than 0.5%, whereas protein and lipid were almost removed. The results of IR spectroscopic analysis for the isolated chitin showed similar characteristics with that of Sigma product. Degree of deacetylation of purified chitin was significantly higher than Sigma product and viscosity average molecular weights was $2.3 \times 10^5 \sim 3.2 \times 10^5$. SEM analysis showed that the obtained chitin had the fibril shaped morphology.

서 론

지구상에서 cellulose 다음으로 풍부한 다당류인 chitin은 게, 새우, 바다 가재 등과 같은 갑각류의 껍질, 오징어의 pen부분, 곤충류의 외피 그리고 일부 곰팡이의 균사에서 발견되는 유기물질이다. 분자구조는 cellulose와 유사하며 cellulose를 구성하는 monomer인 glucose의 2번째 OH기가 $-NHCOCH_3$ 로 치환된 N-acetyl-D-glucosamine으로 구성되어 있고, monomer 사이 결합은 cellulose와 같은 β -1,4 결합으로 된 선형고분자 물질로 알려져 있다.

이 고분자 물질의 중합도는 적어도 1,000 이상이며 기질의 출처나 추출방법에 따라 상당한 차이를 나타낸다. 현재 chitin의 주요 출처로서는 갑각류의 껍질인데 dry basis로 15~20% chitin, 24~25% 단백질 그리고 40~50%의 탄산칼슘으로 구성되어

있다. (1) 이들 껍질은 수산물 가공공장에서 버려지는 산업폐기물이며 이들로부터 얻어질 수 있는 chitin의 양은 전세계적으로 1.2×10^5 ton/year인 것으로 추산된다. (2) Chitin은 농업, 폐수처리, 식품공업, 화장품, 의약품, 섬유공업 등 여러 분야에서 이용되고 있다. (1) 그러나 자연계에 존재하는 chitin은 cellulose와 같이 결정성을 나타내는 구조를 갖고 있어 화학약품에 매우 안정하며 물에도 거의 팽윤되지 않기 때문에 가공이 어려워 chitin 자체보다는 chitin 유도체로 바꾸어 여러 용도로 사용되고 있다. 전세계적으로 이미 40여 회사에서 chitin 또는 chitin 유도체를 생산하고 있어 앞으로 많은 새로운 응용분야가 개발될 것으로 예상된다. 갑각류의 껍질로부터 chitin의 분리공정은 잘 알려져 있으나(3~8), chitin이 단백질 및 탄산칼슘과 강하게 결합되어 있고, 원료의 종류와 출처에 따라 chitin의 함량이 상

당히 다르므로 적당한 분리방법을 개발할 필요성이 있다. Chitin의 분리방법에는 여러 가지 방법이 있으나, 산업적인 대량 생산공정에서는 산과 알칼리로 chitin을 분리하는 방법이 가장 경제적인 것으로 알려져 있다. (5) 그러나 이 방법은 chitin 분리시 강산과 강알칼리하에서 장시간 처리하면 polymer chain의 분해(degradation)가 일어나 chitin의 분자량 감소가 생길 수 있으므로 사용목적에 따라 분리공정을 달리할 필요가 있다. 본 실험에서는 우리나라 연안에서 흔히 잡히는 꽃게(*Protunus trituberculatus*)의 껍질로부터 chitin의 분리공정을 확립하였고, 또한 그 특성을 규명하였다.

재료 및 실험방법

재료 및 Chitin 분리

꽃게(*Protunus trituberculatus*)의 등껍질 부분을 선별하여 물로 깨끗이 세척한 후, 실온에서 말려 분쇄하여 12mesh체를 통과하고 35mesh체에 걸린 것을 실험재료로 사용하였다. Chitin의 분리공정을 크게 세단계(즉, 무기물 제거단계, 단백질 제거단계 그리고 표백단계)로 나누어 수행하였다.

무기물 제거단계에서는 3~6%(w/v)의 염산용액을 처리하고자 하는 시료 무게의 10배에 해당하는 부피의 양, 즉 solid/liquid=1/10(w/v)을 플라스크에 넣어 실온에서 30~90분 동안 처리하였다. 무기물이 제거되고 남은 물질은 증류수로 중성이 될 때까지 세척한 후 여과하여 65°C에서 건조시킨 후 무게를 재었다. 단백질 제거단계에서는 무기물 제거단계에서 얻은 잔재물 무게의 10배에 해당하는 부피의 3%(w/v) NaOH용액(solid/liquid=1/10(w/v))을 넣어 두 가지 반응조건, 즉 100°C와 초음파(50KHz)조사하에 65°C에서 2시간 동안 처리하였다. 단백질 제거 후 잔재물의 처리는 무기물 제거단계에서와 같다. 표백단계에서는 단백질 제거단계에서 얻은 잔재물 무게의 10배에 해당하는 부피의 5% H₂O₂를 넣어 밤새도록 두었다.

분석방법

수분, 지방질 그리고 무기물은 일반적인 방법(9), 그리고 질소는 CHN analyzer(Leco CHN800)를 사용해 측정하였다. 사용한 시료 중의 chitin 함량은 Shimahara와 Takiguchi(5)의 방법에 의해 결정했고, 탈아세틸화도(degree of deacetylation)는 Sannan 등(10)이 제안한 IR(Hitachi 270-50) 분석방

법에 의해 다음의 (1)식으로 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{Degree of deacetylation}(\%) \\ = 98.03 - 34.68(A_{1550}/A_{2878}) \end{aligned} \quad (1)$$

Chitin의 점도 평균 분자량은 Mark-Houwink식으로부터 구할 수 있으며, Terbojevich 등(11)은 5% LiCl/N, N-dimethylacetamide용액을 chitin의 용매로 사용하여 다음의 (2)식을 제안하였다.

$$[\eta] = 2.4 \times 10^{-3} Mv^{0.69} \quad (2)$$

여기서 $[\eta]$ 는 고유점도, Mv 는 점도평균 분자량을 나타내며 점도는 25°C에서 Cannon-Fenske형 모세관점도계(Kimax No. 100)를 사용하여 측정하였다. 그리고 고유점도는 다음의 (3)과 (4)식으로 표현되는 Huggins와 Kraemer의 방법에 의하여 농도 0으로 외삽하여 구하였다(12).

$$\text{Huggins: } \frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k[\eta]^2 c \quad (3)$$

$$\text{Kraemer: } \frac{\ln \eta_r}{c} = [\eta] - k'[\eta]^2 c \quad (4)$$

여기서 η_{sp} 는 비점도, η_r 은 상대점도, c 는 농도, k 와 k' 는 상수로서 온도와 용매에 따라 변한다. Chitin의 미세표면 구조는 SEM(JEOL JSM-6400)을 사용해 5000배 확대시켜 관찰하였다.

결과 및 고찰

꽃게 껍질의 화학적 조성

꽃게 껍질의 일반적인 조성은 껍질을 수거하여 처리하는 방법에 따라 상당한 차이를 나타낼 수 있으나 본 실험에서는 주로 게의 등껍질을 선별하여 깨끗이 씻어 이물질을 제거한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 상대적으로 ash 함량이 높았고, 단백질 함량은 낮게 나타났다.

Table 1. Chemical composition of crab shell.

Composition	Content(%)
Ash	57.9
Chitin	17.1
Moisture	12.9
Protein	10.3
Lipid	0.3
Others	1.5
Total	100.0

Chitin 분리공정

꽃게의 껍질은 Table 1에서 보는 바와 같이 chitin 이의 탄산칼슘 등의 무기염류, 단백질, 지방질, 색소 등 미량의 기타물질로 구성되어 있다. 지방질 및 색소 등은 유기용매로 처리하여 제거할 수도 있지만, 무기염과 단백질 제거단계에서 지방질은 거의 제거되고 색소도 일부 제거되므로 통상 표백만으로 백색의 분말을 얻을 수 있다. 무기물 제거에는 묽은 염산 또는 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)를, 단백질 제거에는 NaOH 또는 단백질 분해 효소를 사용하여 제거할 수 있지만 가격이 싼 묽은 염산과 NaOH를 사용하는 공정을 사용하면 거의 완전하게 무기물과 단백질을 제거할 수 있기 때문에 산업적으로 많이 이용되고 있다. 그러나 이 방법은 운전조건이 가혹하기 때문에 분리된 chitin의 중합도가 낮아지고 acetyl기가 떨어지는 등 어느 정도 변성을 일으킨다(13). 무기물 제거를 위하여 solid/liquid를 1:10(w/v)로 하여 실온에서 반응시켰다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 반응시간을 90분으로 고정하고 산의 농도를 변화시킨 결과 산의 농도가 높을수록 무기물 제거율은 증가하였고 5% (w/v) 염산용액을 사용했을 때 무기물은 99% 이상 제거되었다. 이 양은 게 껍질에 혼합된 무기물을 모두 탄산칼

슘이라 생각할 때 양론적으로 필요한 4.8%보다 약간 높은 염산농도이다. 5% 염산용액을 사용했을 때 반응시간은 90분 정도 필요함을 알 수 있었다(Fig. 2). 단백질 제거에는 기존의 연구결과를 근거로 3% (w/v) NaOH 용액을 사용하였고 여러 조건에서 제거율을 측정하여 Fig. 3에 나타내었다.

순수한 chitin의 이론적인 질소함량이 6.86%이므로 질소함량을 측정하여 상대적으로 단백질 제거 정도를 비교하였다. 65°C에서 초음파를 사용한 것과 100°C에서 가열만 한 것을 2시간 동안 반응시킨 것의 질소함량을 측정한 결과 각각 6.88과 6.85%로 이론치에 가까운 값을 나타내어 거의 모든 단백질이 제거 되었음을 알 수 있었다. Fig. 4에는 초음파를 사용하여 반응시간에 따라 질소함량을 측정한 결과를 나타내었는데, 거의 모든 단백질을 제거하기 위해서는 100분 이상의 시간이 필요함을 알 수 있었다. 단백질 제거 후 얻어진 시료는 옅은 분홍색의 빛깔을 띠고 있었는데, 탈색을 하기 위하여 S/L=1/10(w/v)에서 5% H₂O₂를 사용하여 밤새도록 방치하였다. 최종적으로 도출한 flow chart는 Fig. 5와 같다. Fig. 5에 제시된 방법으로 chitin을 분리 정제한 결과 무기물 함량은 0.5% 이내이고, 질소함량은 순수 chitin의 이론적인 값 6.86%에 가까워 거의 모든 단백질이 제거되었음을 알 수 있었다. 지방질은

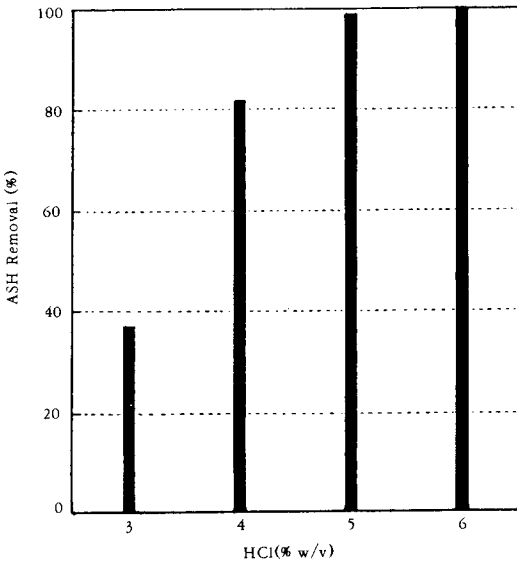


Fig 1. Effect of acid concentrations on reduction of ash content.
[Reaction time=90min, S/L=1:10(w/v), room temp]

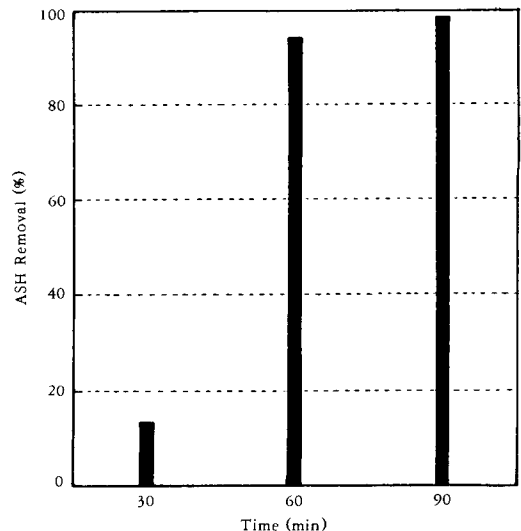


Fig 2. Effect of reaction times on reduction of ash content.
[5% HCl, S/L=1:10(w/v), room temp.]

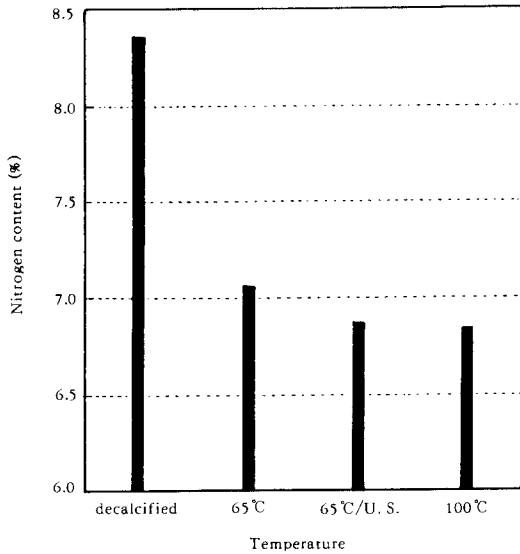


Fig 3. Effect of temperatures on reduction of nitrogen content in the decalcified shell
 [3%(w/v) NaOH, reaction time=2hr, S/L =1:10(w/v)]

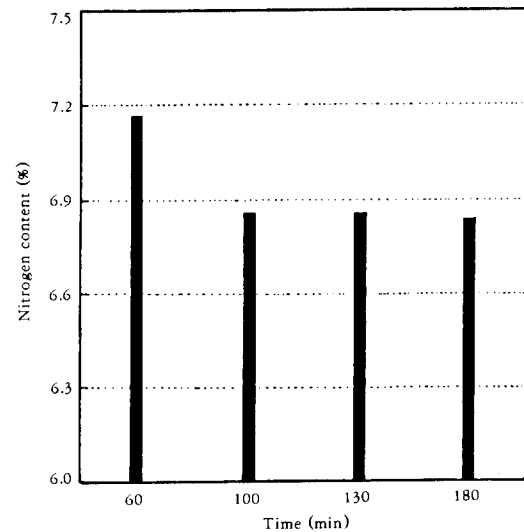


Fig 4. Effect of reaction times on reduction of nitrogen in the decalcified shell under ultrasonic irradiation
 [3%(w/v) NaOH, S/L=1:10(w/v), 65°C]

측정불가하였고, 남아 있는 색소는 methanol이나 acetone을 사용하여 reflux시켜 제거할 수도 있지만

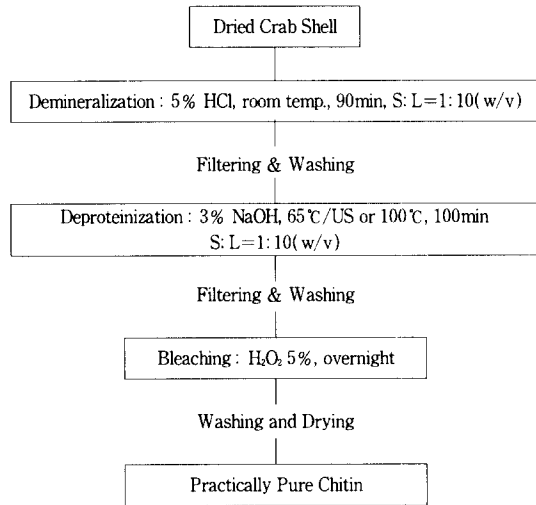


Fig 5. Flow diagram for isolation of chitin from crab shell.

통상 표백처리만 하고 있다. 본 실험에서도 실온에서 실온에서 표백처리한 결과 약간 미색을 띠는 백색분말을 얻을 수 있었다.

Chitin 특성 규명

IR 특성 및 탈아세틸화도의 측정

Chitin의 아세틸화도(degree of acetylation)는 chitin의 화학적인 특성을 나타내는 중요한 수치이다. Chitin은 결정성 구조로 용해성이 낮고 입체적인 장애가 크기 때문에 아세틸화도를 정량적으로 결정하는 것은 매우 어렵다(13). 아세틸화도는 화학 및 효소방법에 의한 적정, NMR, IR, UV, GC, MASS 등 여러 방법으로 측정할 수 있으나(15, 17), 그중에서 IR 방법이 빠르고 간편하여 가장 많이 사용하고 있다. Fig. 6에는 Sigma제품 chitin(C3641)을 표준시료로 하여 65°C에서 초음파와 100°C로 처리한 chitin의 spectrum을 비교하여 나타내었다. 세 spectrum 모두 매우 비슷한 모양을 보이고 있는데 chitin의 특성 band인 1626cm⁻¹(C=O stretching에 의한 amide I vibration)과 1150cm⁻¹(NH bending에 의한 amide II vibration)에서 강한 흡수 peak를 보여주고 있다(14). 기질의 출처에 따라 band의 위치나 spectrum의 모양이 조금씩 차이가 있으나 3447(OH stretching), 2878(CH stretching), 1310cm⁻¹(amide III vibration) 부근에서 강한 peak를 나타내었다.

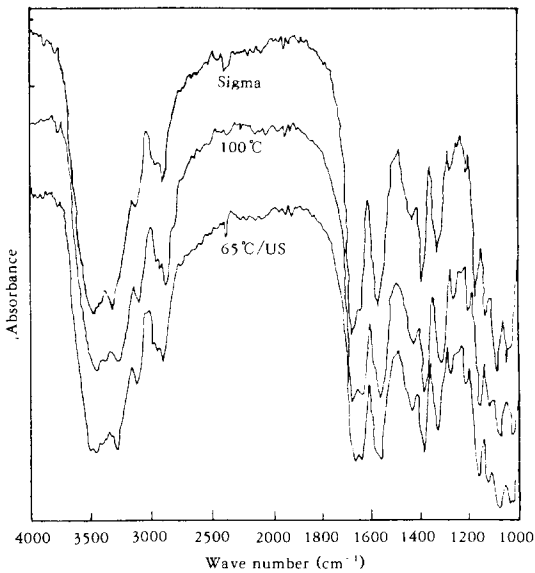


Fig 6. IR spectra of Sigma chitin and chitin samples obtained from this study.

Sannan 등(10)은 아세틸화도가 1550cm^{-1} 에서 amide band 와 2878cm^{-1} 에서 CH band의 transmission비에 의존한다고 보고하였다. (1)식을 사용하여 탈아세틸화도를 계산한 결과 Sigma 제품은 9.8%, 100°C 에서 처리한 chitin은 14.5% 그리고 65°C 에서 초음파 처리한 chitin은 16%였다.

평균 분자량 측정 및 미세표면 구조

고분자 화합물의 평균 분자량 측정법에는 말단기법, 점도법, 광산란법, 초원심 분리법, 및 GPC법 등 여러 방법이 있으나 그중에서 chitin 분자량의 측정에는 가장 간단한 방법인 점도법이 많이 사용되고 있다. 그러나 점도법을 사용하기 위해서는 chitin 자체를 분해시키지 않고 용해시킬 수 있는 용매를 사용해야 하고, 또 고유점도로부터 분자량을 계산하는 Mark-Houwink 상수를 알고 있어야 한다. 본 실험에서는 5% LiCl/N,N-Dimethylacetamide 용액을 chitin 용매로 사용하여 Fig. 7에서와 같이 (3)과 (4)식을 사용하여 고유점도 $[\eta]$ 를 구하면 65°C 에서 초음파 처리한 chitin은 $15.2\text{d}\ell/\text{g}$ 이었고 100°C 로 처리한 chitin은 $12.0\text{d}\ell/\text{g}$ 이었다. Terbojevich가 제

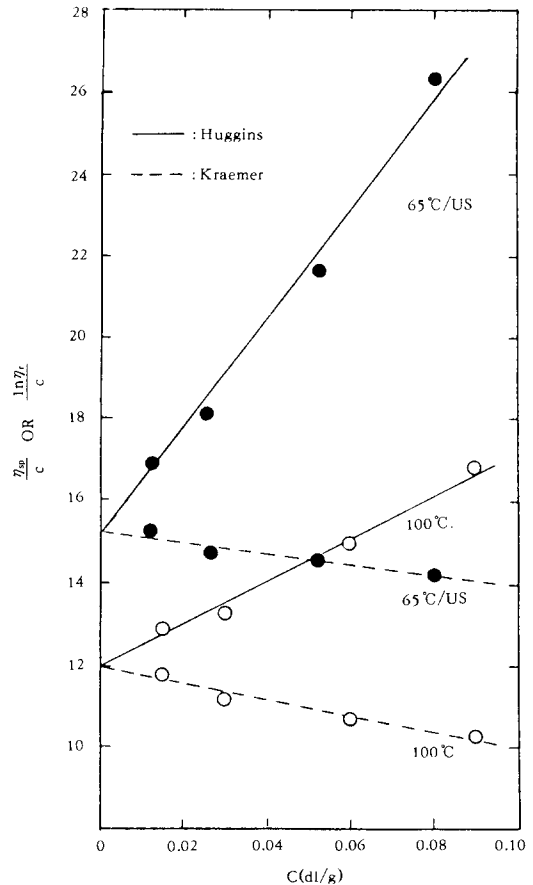


Fig 7. Intrinsic viscosity of chitin samples treated by two different deproteinization process (●: $65^\circ\text{C}/\text{ultrasonic}$, ○: 100°C).

안한 (2)식을 이용하여 분자량을 계산한 결과 약 3.2×10^5 ($65^\circ\text{C}/\text{초음파}$)과 2.3×10^5 (100°C)을 얻었다. 같은 무기물 제거공정을 사용하더라도 단백질 제거공정의 차이에 따라 평균 분자량의 차이가 나타났다. Chitin의 평균 분자량은 사용된 원료와 처리공정에 따라 상당히 다르게 나타날 수 있는데 대략 $1.2 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^6$ 정도 범위로 알려져 있다(16). Chitin의 미세표면 구조는 SEM(Scanning Electron Microscope)을 사용하여 관찰하였는데, Fig. 8과 같이 분리 정제된 chitin은 fibril 형태로 되어 있음을 보여주고 있다.



Fig 8. SEM microphotograph($\times 5000$) of chitin obtained from this study.

감 사

본 연구는 울촌장학재단의 연구비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

요 약

최근 산업적으로 다양한 용도로 응용되고 있는 chitin을 게 껍질로부터 분리하였고 그 특성을 규명하였다. Chitin의 분리는 무기물 제거, 단백질 제거 및 탈색단계를 거쳐 이루어졌으며, 얻어진 chitin은 무기물 함량이 0.5% 이내였고, 단백질과 지방질이 거의 제거된 백색분말이었다. IR 분석결과 Sigma제품과 거의 같은 특성을 나타내었고, 단백질 제거 조건에 따라 chitin의 주요 특성치인 탈아세틸화도와 평균 분자량이 다르게 나타났다.

탈아세틸화도는 Sigma 제품보다 상당히 높았고, 점도평균 분자량은 $2.3 \times 10^5 \sim 3.0 \times 10^5$ 범위였다. SEM 분석결과 얻어진 chitin은 fibril 형태를 갖고 있음을 확인하였다.

참고문헌

1. N. K. Mathur and C. K. Narang(1990), *J. Chem. Educ.*, **67**(11), 938.
2. D. Knorr(1991), *Food Tech.*, January, 114.
3. R. H. Hackman(1954), *Aust. J. Biol. Sci.*, **7**, 168.
4. Q. P. Peniston and E. L. Johnson(1970), U. S. Patent 3,533,940.
5. K. Shimahara and T. Takiguchi(1988), *Methods Enzymol.*, **161**, 417.
6. H. K. No, S. P. Meyers and K. S. Lee(1989), *J. Agr. Food Chem.*, **37**(3), 575.
7. R. A. A. Muzzarelli(1977), *Chitin*, 89, Pergamon Press.
8. R. Yang, J. Hyon and Y. Whang(1992), *Korean J. Food Sci. Technol.*, **24**(1), 14.
9. 정동효, 장현기, 김명찬, 박상희 (1973), 최신식품 분석법, 삼중당.
10. T. Sannan, K. Kurita, K. Ogura and Y. Iwakura(1978), *Polymer*, **19**, 458.
11. M. Terbojevich, C. Carrado and A. Cosani (1988), *Carbohydrate Research.*, **180**, 73.
12. J. F. Rabek, *Experimental Methods in Polymer Chemistry*(1980), John Wiley & Sons, 127.
13. Chitin, Chitosan 實驗 Manual (1991), *Chitin, Chitosan 研究會編*, 技報堂出版.
14. R. A. A. Muzzarelli(1972), *Natural Chelating Polymers*, 120, Pergamon Press.
15. R. A. A. Muzzarelli(1972), *The Polysaccharide*(Ed., G. Aspinall), 429, AP.
16. M. Terbojevich, A. Cosani and C. Carraro (1988), *Chitin and Chitosan*(Ed., G. Skjak-Braek et al.), 407.
17. D. H. Davies and E. R. Hayes (188), *Methods Enzymol.*, **161**, 442.