

토하젓의 숙성과정중 Chitin Oligosaccharides 생성

박원기 · 박영희[†] · 김희경* · 박복희**

동신대학교 식품생물공학과

*부경대학교 식품공학과

**목포대학교 식품영양학과

Formation of Chitin Oligosaccharides during Fermentation of Toha-jeot(Salt-fermented Toha Shrimp)

Won-Ki Park, Young-Hee Park[†], Hee-Kyung Kim* and Bock-Hee Park**

Dept. of Food and Biotechnology, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

**Dept. of Food and Nutrition, Mokpo National University, Muan 534-729, Korea

Abstract

Toha-jeot(salt-fermented Toha shrimp) is a traditional fermented food in Korea. Toha-jeot is fermented for 90 days at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ with 20%(w/w) salt per live Toha shrimp. We expect that the high polymer chitin of Toha shell will be hydrolyzed by chitinase during the fermentation of Toha-jeot and that the low molecular weight of chitin oligosaccharides will be produced. We experimented 7 samples which were taken at the interval of 15 days during the total 90 days of fermentation. We also measured molecular weight of Toha-chitin, viscosity and molecular weight distribution of chitin during fermentation of Toha-jeot. The decrease of viscosity and average molecular weight of chitin were observed as fermentation proceeds. Chitin oligosaccharide with 10^3 molecular weight was low until 60 days fermentation. However, chitin oligosaccharide with 10^3 molecular weight was high after 75 days fermentation. And chitin oligosaccharide with 10^2 molecular weight were observed after fermenting Toha for 75 days and 90 days, but chitin oligosaccharide with 10^2 molecular weight did not appear up to 60 days of fermentation.

Key words: Toha-jeot, chitin oligosaccharides

서 론

토하젓(土蝦젓: salt-fermented Toha shrimp)은 세계적으로 유일한 전남의 전통 발효 식품으로 원래는 전남지방의 청정한 하천이나 오염되지 않는 논 도랑에서 서식하는 민물 새우 중 새뱅이(토하: *Caridina denticulata denticulata* De HAAN)(1)를 주 원료로 한 것같다.

토하젓은 주 원료인 토하를 살아 있는 생토하의 껍질(갑각)이 붙어 있는 채로 소금에 절여서 제조하여왔다. 이 토하 껍질에는 상처의 치유성, 항종양 활성 등의 기능성 물질인 chitin이 약 10% 포함되어 있음을 박 등(2)이 보고하였다. 또한 chitin은 chitinase(EC 3.2.1.14.) 등(3,4)에 의해서 가수분해되어 생리적 활성이 있고 천

연에는 존재하지 않는 chitin oligosaccharides가 생성됨이 알려져 있다(5-8). 이런 점에서 토하 껍질을 구성하는 토하 chitin이 토하젓의 숙성과정 중의 발효에 의해 저분자량의 chitin oligosaccharides 생성이 예상된다. 본 연구에서는 토하젓 숙성과정의 기간별로 토하 chitin 분자량의 감소율과 점도 변화 그리고 chitin 분자량 분포를 통하여 저분자량의 chitin oligosaccharides의 생성을 확인하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료처리

본 실험에 사용한 토하젓은 1995년 1월 3일 전남

[†]To whom all correspondence should be addressed

나주시 소재 자연 양식장에서 채집한 토하에 식염(천일염, 전남 무안군 제조) 20%를 첨가하여 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 90일 동안 숙성시켰다. 숙성과정 중 15일, 30일, 45일, 60일, 75일 그리고 90일의 시료를 채취하였고, 대조군은 김(9)의 방법에 따라 토하 채취 후 즉시 95% ethanol로 고정 처리하여 사용하였다.

Chitin 추출 방법

시료로부터 chitin을 추출하기 위해서 Hackman법(10)을 변형하였는데 본 실험과정 중 염산 처리에 의한 무기질의 제거, 수산화나트륨 처리에 의한 단백질의 제거 등에 있어서 토하 chitin 고유 분자량의 감소를 방지하기 위하여 염산 처리시에는 $-20 \sim -30^\circ\text{C}$ 에서, 수산화나트륨 처리시에는 N_2 gas를 환류하여 고유 분자량을 보존토록 하였다.

토하 chitin의 점도 측정

토하젓의 숙성과정 기간별 토하 chitin의 분자량별 감소를 확인하기 위해서 점도계(Brookfield viscometer LVDV II⁺, USA)로 chitin의 점도를 측정하였다. 이 측정 조건으로 5%(w/w) lithium chloride-*N,N*-dimethylacetamide(LiCl-DMAc) 용액을 조제한 후, Terbojevich 등의 방법(11)에 따라 chitin을 0.05~0.5% 농도로 조절하여 완전히 용해시켰다.

토하 chitin 분자량 분포 검증 조건

Hasegawa 등(12)의 방법에 의해 gel permeation chromatography(GPC)(JASCO Model LC-900, JASCO Co., Japan) 분석 시스템으로 분자량을 검증하였으며, 이의 검증을 위한 분석조건은 pump, Pu-980; autosampler, AS-950; column oven, CO-965; detector, RI-930이며 표준물질은 pulluran(P-80 Shodex Co., Japan)을 사용하였고 측정조건으로 styrene divinyl benzene copolymer를 충전한 SEC(size-exclusion chromatography) column을 사용하였으며 유속은 0.26ml/min, 시료 주입량은 20 μ l, column 온도는 40°C 로 유지하였다.

결과 및 고찰

토하젓 숙성과정중 토하 chitin의 점도 변화

토하젓 숙성과정 중 chitin의 점도 변화는 Table 1에 나타냈다. 숙성과정에 따른 점도 변화는 대조군에 비교하여 15일 경과시 32.97%, 30일 경과시 22.83%, 45일 경과시 14.38%, 65일 경과시 8.70%, 75일 경과시 1.03%, 90일 경과시 0.32%로 점도의 저하가 뚜렷함을 관찰할 수 있었다.

토하젓 숙성과정중 토하 chitin 분자량 및 분포도

토하젓 숙성과정 중 토하 chitin의 평균 분자량과 토하 chitin 분자량의 분포도를 얻기 위하여 GPC분석을 통해 숙성기간별로 얻은 GPC chromatogram을 Fig. 1에 나타냈으며 토하 chitin의 평균 분자량은 Table 2에 나타내었다. 대조군인 토하 chitin의 평균 분자량은 6.29×10^6 이었고 15일 경과시는 대조군에 비하여 평균 분자량은 차이가 없었으나 30일 경과시의 평균 분자량은 5.93×10^6 으로 대조군과 비교하면 94.28%로 저하되는 경향을 나타냈으며 75일 경과시의 평균 분자량은 7.53×10^4 으로 대조군과 비교하면 1.20%로 감소되었으며, 90일 경과시의 평균 분자량은 5.53×10^4 으로 대조군과 비교하면 0.88%로 감소 경향이 나타났는데, 이와 같은 감소 경향은 토하젓의 숙성과정 중에 미생물(13) 및 chitinase(EC 3.2.1.14.)(14,15) 등의 가수분해에 의한 것으로 생각된다. 따라서 토하젓의 숙성과정 중 GPC분석에 의한 분자량의 감소 현상과 점도의 감소 결과를 통하여 확인된 분자량의 저하는 chitin oligosaccharides가 생성되었기 때문인 것으로 생각된다.

숙성기간별로 감소되는 토하 chitin 분자량 분포도를 Fig. 2에 나타내었다. 대조군인 토하 chitin 분자량의 분포는 10^6 이 가장 많았고, 숙성 15일과 숙성 30일의 분자량 분포는 유사하였다. 숙성 45일 이후부터는 10^9 의 고분자가 저분자화되는 경향을 나타냈다. 숙성 60일의 분자량 분포는 10^7 에서부터 10^3 으로 나타났고 숙성 75일과 숙성 90일에는 10^6 에서 10^2 의 분포를 보여주

Table 1. Changes in viscosity during fermentation of Toha-chitin at 20% NaCl concentration

		Fermentation time(days)						
		0 ¹⁾	15	30	45	60	75	90
Viscosity	(cps)	552.00	182.00	126.00	79.40	48.00	5.70	1.78
	(%) ²⁾	100.00	32.97	22.83	14.38	8.70	1.03	0.32

¹⁾Fixed with 95% ethanol after sampling Toha; control

²⁾Percentage of viscosity to control

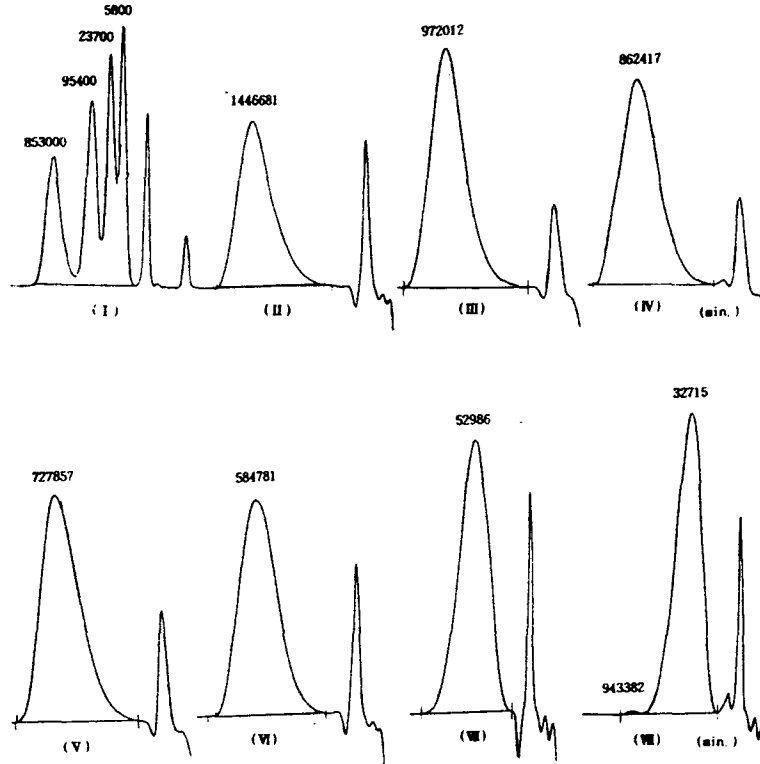


Fig. 1. GPC chromatogram of molecular weight of chitin during the fermentation of Toha at 20% NaCl concentration. (I) standard: P-85.3, P-9.54, P-2.37, P-0.58 (II) control: fixed with 95% ethanol after sampling Toha (III)-(VIII): Fermentation time(days); 15, 30, 45, 60, 75 and 90

Table 2. Changes of the average molecular weight of chitin during fermentation of Toha at 20% NaCl concentration

	Fermentation time(days)						
	0 ¹⁾	15	30	45	60	75	90
<i>Mw</i> ²⁾	6.29 × 10 ⁶ (100.00%) ⁵⁾	6.28 × 10 ⁶ (100.00%)	5.93 × 10 ⁶ (94.28%)	3.04 × 10 ⁶ (48.33%)	1.54 × 10 ⁶ (24.48%)	7.53 × 10 ⁴ (1.20%)	5.53 × 10 ⁴ (0.88%)
<i>Mn</i> ³⁾	5.48 × 10 ⁵	4.75 × 10 ⁵	3.78 × 10 ⁵	3.00 × 10 ⁵	2.85 × 10 ⁵	2.35 × 10 ⁴	1.98 × 10 ⁴
<i>d</i> ⁴⁾ = <i>Mw</i> / <i>Mn</i>	11.48	13.24	15.69	10.13	5.40	3.21	2.80

¹⁾Fixed with 95% ethanol after sampling Toha; control, ²⁾Weight average molecular weight ³⁾Number average molecular weight, ⁴⁾Degree of dispersion, ⁵⁾percentage of molecular weight to control

었다. Chitin oligosaccharide에 해당되는 10³의 분자량은 숙성 60일까지는 매우 적게 나타났으나 숙성 75일에 6.85%, 숙성 90일에 8.91%의 많은 양이 생성되었고 10²의 분자량은 숙성 75일 이후부터 생성되기 시작하였다. 숙성기간이 75일에 이르러 10⁹, 10⁸ 및 10⁷이 나타나지 않고 10²의 chitin oligosaccharides의 분포비율이 숙성 75일의 0.07%에서 숙성 90일의 0.01%로 감소되

었는데 이에 대해서는 수용성인 chitin oligosaccharides의 유실여부를 확인 검토해야 할 것으로 본다. 따라서 토하젯의 숙성과정별 chitin 분자량 분포도의 결과로부터 숙성기간이 길어짐에 따라 고분자량인 chitin이 가수분해되어 10³의 저분자량인 chitin oligosaccharides와 항종양활성 등의 기능성 물질(5-8)인 10²의 chitin oligosaccharides가 생성됨을 확인하였다.

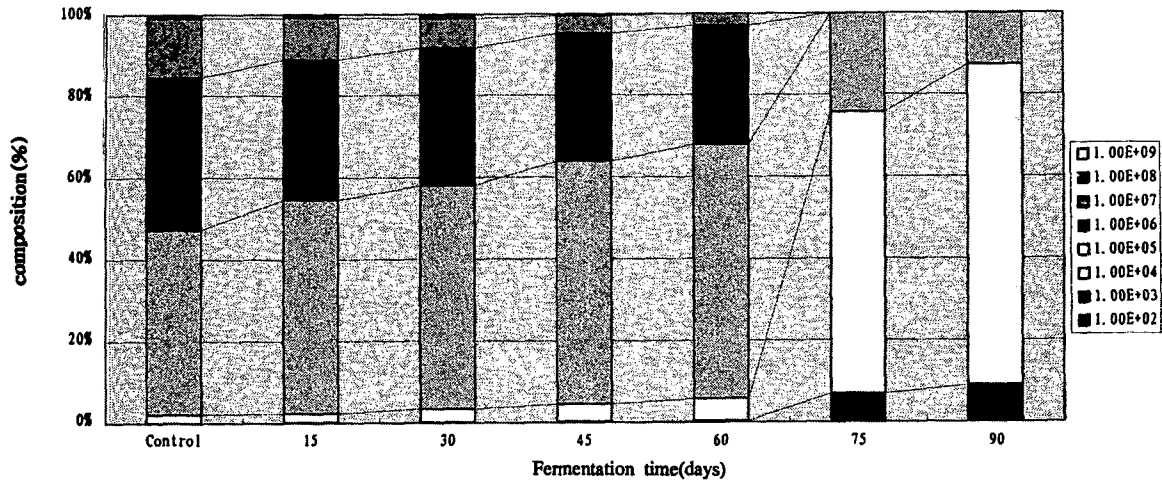


Fig. 2. Changes in molecular weight distribution of chitin during fermentation of Toha at 20% NaCl concentration.

요 약

우리나라 전남의 전통 발효식품인 토하젓(salt-fermented Toha shrimp)은 주 원료인 토하(*Toha* : *Caridina denticulata denticulata* DE HAAN)를 살아 있는 생토하의 껍질(갑각)이 붙어 있는 채로 소금에 절여서 제조하였다. 토하 껍질을 구성하는 토하 chitin이 토하젓의 숙성과정 중 발효에 의해 저분자량의 chitin oligosaccharides 생성이 예상되므로 본 연구에서는 토하젓 숙성과정의 기간별로 토하 chitin 분자량의 감소와 점도 변화 그리고 chitin 분자량 분포를 측정하였다. 토하젓 숙성과정 중 chitin의 점도와 평균 분자량은 숙성기간이 길어짐에 따라 뚜렷히 감소하였다. 10^3 의 저분자량인 chitin oligosaccharide는 숙성 60일까지는 거의 나타나지 않았으나 숙성 75일 이후부터 6.85% 이상의 많은 양을 보였으며 10^2 의 분자량은 숙성 75일 이후부터 생성되기 시작하였다. 이 결과로부터 토하젓의 숙성과정 중 10^7 이상 고분자량인 chitin이 가수분해됨에 따라 10^2 과 10^3 의 chitin oligosaccharides가 생성됨이 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산부에서 시행한 「농림 수산 특정 연구사업」의 일환으로 「토하젓의 식품기능 우수성 및 식품 안전성 구명 시험」의 일부로, 이 연구에 지원해주신 농림수산부에 사의를 표합니다.

문 헌

1. 김훈수 : 한국동식물도감, 제 19권 동물편(새우류). 문

- 교부, 서울, p.167(1977)
2. 박원기, 김희경, 김광윤, 범희승, 김지열 : 토하(土蝦)로부터 추출·제조한 chitin, chitosan의 특징. 한국영양식량학회지, **23**, 353(1994)
3. 古賀 大三 : キチン分解酵素. 繊維と工業, **46**, 581(1990)
4. Usui, T., Matsui, H. and Isobe, K. : Enzymic synthesis of useful chito-oligosaccharides utilizing transglycosylation by chitinolytic enzyme in a buffer containing ammonium sulfate. *Carbohydr. Res.*, **203**, 65(1990)
5. Ohtakara, A. and Mitsutomi, M. : Enzymatic preparation of oligosaccharides from chitin and chitosan. Japanese Soc. for Chitin · Chitosan, Tokyo, p.29(1994)
6. Suzuki, S., Watanabe, T., Mikami, T., Matsumoto, T. and Suzuki, M. : Advances in chitin and chitosan. Elsevier Applied Science, London and New York, p.96(1992)
7. Roby, D., Gabelle, A. and Toppan, A. : Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **143**, 885(1987)
8. 内田泰 : キチン・キトサン 응용, キチン・キトサン研究会編. 技報堂出版, p.189(1988)
9. 김훈수 : 한국동식물도감, 제 19권 동물편(새우류). 문교부, 서울, p.96(1977)
10. Hackman, R. H. : Studies on chitin I. Enzymic degradation of chitin and chitin esters. *Aust. J. Biol. Sci.*, **7**, 168(1954)
11. Terbojevich, M., Carraro, C. and Cosani, A. : Solution studies of the chitin-lithium chloride-*N,N*-dimethylacetamide system. *Carbohydr. Res.*, **180**, 73(1988)
12. Hasegawa, M., Isogai, A. and Onabe, F. : Size-exclusion chromatography of cellulose and chitin using lithium chloride-*N,N*-dimethylacetamide as mobile phase. *J. of Chromatography.*, **635**, 334(1993)
13. Watanabe, T., Kobori, K. and Yamata, T. : Domain structures and functions of bacterial chitinases. In "Chitin enzymology" Muzzarelli, R. A. A.(ed.), Eur. Chitin Soc., Lyon and Ancona, p.329(1993)

14. Muzzarelli, R. A. A. : Advances in *N*-acetyl- β -D-glucosaminidases. In "*Chitin enzymology*" Muzzarelli, R. A. A.(ed.), Eur. Chitin Soc., Lyon and Ancona, p.357 (1993)
15. Greenwood, D. R., Taylor, R. K., Huang, C. M., Broadwell, A. H. and Kelly, W. J. : The chitinase of *Janthinoba cterium lividum*. In "*Chitin enzymology*" Muzzarelli, R. A. A.(ed.), Eur. Chitin Soc., Lyon and Ancona, p.337 (1993)

(1996년 4월 2일 접수)