

마이크로파와 초음파가 키틴 추출시간에 미치는 영향

권기남 · †최희숙* · 차보숙**

농심 경영혁신팀, *안산공과대학 식품생명과학과, **수원여자전문대 식품영양과

Effects of Microwave and Ultrasonication on Chitin Extraction Time

Ki-Nam Kwon, †Hee-Sook Choi* and Bo-Sook Cha**

Dept. of PI Propulsion T/F Team, Nong Shim Co., Seoul 156-709, Korea

*Dept. of Food and Biotechnology, Ansan College of Technology, Ansan 425-867, Korea

**Dept. of Food and Nutrition, Suwon Women's College, Hwasung 445-895, Korea

Abstract

Effects of microwave and ultrasonication on chitin extraction time were investigated in this study. Chitin was extracted from ground crab shell by demineralization in 1.0 N HCl solution at 25°C with or without ultrasonication and deproteinization in 1.0 NaOH solution at 100°C without ultrasonication and at 70°C with ultrasonication. Microwave treatment was also used for deproteinization with 5 min heating and 5 min standing without microwave. The changes in color difference, the contents of ash, calcium and nitrogen were measured during demineralization and deproteinization. Ultrasonication of 4 hr in 1.0 N HCl solution for removal of calcium and 1.5 hr of microwave heating in 1.0 N NaOH for deproteinization corresponded to 6 hr in 0.1 N HCl and 2 hr in 1.0 N NaOH of heating at 100°C without those treatments, respectively. The data obtained showed that these treatments were effective reduction of chitin extraction time by 25~33% for chitin preparation. The chitin obtained from these ultrasonication and microwave treatments resulted 0.55% of ash, 0.25% of calcium, 2.47% of nitrogen and 20.64% of yield ratio. Those treatments selected were also reduced the darkness development time of the chitin solution during demineralization and deproteinization.

Key words: chitin, crab shell powder, ultrasonication, microwave.

서 론

키틴(chitin)은 갑각류, 곤충류, 균류의 세포벽에 함유되어 있으며, 키토산은 높은 온도에서 알칼리로 처리하면 키틴 내의 아세틸기가 떨어져 생성된다. 키틴과 키토산은 고분자 다당류로 귀중한 생물자원이며, 생체 및 공업 분야에서 응용 가치가 높은 물질로 평가되고 있다. 갑각류 껍질은 30~40%의 단백질과 30~50% 탄산칼슘, 20~30%의 키틴과 소량의 색소로 구성되어 있으며, 이들 물질을 순차적으로 제거하는 공정을 거쳐 키틴을 얻을 수 있다.

키틴과 키토산은 천연 식품 소재로 독성과 부작용이 없고

혈압 상승의 억제 효과¹⁾, 콜레스테롤 저하 효과^{2~4)}, 면역 활성화^{5,6)}, 항종양과 항암 효과^{7,8)} 등의 우수한 특성을 보이고 있어 생체기능성 식품으로 이용가치가 높으며, 식품 보존제, 효소 고정제, 유화제, 착색제 및 탈색제, 보습제, 사료, 중금속 제거 등 다양한 분야에 이용^{9~11)}되고 있다.

새우와 게 껍질로부터 키틴을 효율적으로 분리하기 위해 탈회분, 탈단백질 및 탈색소에 관련된 여러 가지 요소들이 검토된 바 있다. 이를 위해 이용된 방법으로는 염산처리에 의한 무기질 제거^{12,13)}, NaOH에 의한 단백질 제거^{12,14)}, 효소를 사용한 키틴의 제조 방법^{15,16)}과 EDTA를 사용한 방법¹⁷⁾이 제시된 바 있다.

† Corresponding author: Hee-Sook Choi, Dept. of Food and Biotechnology, Ansan College of Technology, 125, Choji-Dong, Danwon-Gu., Ansan city, Gyonggi-do 425-867, Korea. Tel: +82-31-490-6082, E-mail: heesook@act.ac.kr

이들 연구는 탈칼슘을 위해 염산과 같은 산을 1~2 N을 사용하였으며, 탈단백질을 위해 NaOH 0.5~5%를 70~100°C에서 가열하였다. 이러한 산과 염기의 사용은 중화를 할 경우 다량의 염이 발생할 뿐만 아니라 키틴의 추출장치에 강산과 강알칼리에 내성을 갖는 재료를 사용해야 하는 어려움이 있다. 뿐만 아니라 현재 사용하고 있는 키틴에 제조과정에서 단백질의 제거를 빠르게 하기 위해 높은 온도를 사용하고 있다. 따라서 사용하는 알칼리와 산의 농도를 줄이고 반응온도와 반응시간을 감소시킬 수 있다면 장치의 재료비와 위험도를 줄일 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 폐기되고 있는 대게 껍질에서 탈칼슘과 탈단백질을 위해 산과 알칼리의 반응시간을 감소시키기 위하여 초음파와 마이크로파 처리에 의한 추출방법을 처리하지 않은 것과 비교 검토하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 원료는 경북 울진군의 대게(*Chionoectes japonicus*) 껍질로 약 10~15 cm로 절단된 것을 공급받아 사용하였다. 공급받은 대게를 물로 세척하고 60°C 건조기에서 건조한 다음 분쇄기((주)신일가전)를 이용하여 10~20 mesh로 마쇄하여 만든 대게 분말을 0°C의 냉장고에서 보관하면서 시료로 사용하였다.

2. 방법

1) 키틴 제조

대게 분말에서의 키틴의 제조는 분말에 함유된 Ca 및 무기염을 제거하기 위해 마쇄한 대게껍질 10 g에 1.0 N HCl 150 ml를 첨가하여 대조구는 상온에서 방치하였고 처리구는 ultrasonicator(Bransonic ultrasonic cleaner 5210R-DTH, USA)를 이용하여 초음파 처리하였으며, 모두 0~12시간 처리하는 동안 20분에 한 번씩 교반하여 주었다. 한편, 대게에 함유된 단백질을 제거하기 위하여 대게껍질 10 g에 1.0 N NaOH 150 ml를 첨가하였고 한 처리구는 100°C water bath에서, 다른 처리구는 70°C에서 초음파 처리를 하였으며, 또 다른 처리구는 5분간 가열하고 5분간 쉬는 방법으로 microwave(Samsung RE-448RT, Korea)를 이용하여 가열하였다. 이 세 처리구 모두 처리시간은 0~180분이었으며, 처리시간별로 제조한 시료는 증류수로 세척한 뒤 여과시켜 60°C에서 건조하였다.

2) 일반성분 및 Ca 정량

대게 껍질의 일반 성분은 AOAC 법¹⁸⁾에 따라 회분 함량은

550°C 회화법으로 측정하였고, 수분함량은 105°C 상압가열건조법으로, 질소함량은 micro-Kjeldhal 방법으로 정량하였다. Ca은 과망간산칼륨 용량법¹⁹⁾을 이용하여 정량하였다.

3) 색 측정

키틴의 제조 과정에서 얻어진 분말의 색은 색차 색도계(Minolta Chroma meter CR-200, Japan)를 사용하여 Hunter L, a, b값을 측정하였고, 이때 사용한 표준백색판의 값은 L: 97.5, a: -0.21, b: +1.62였다.

결과 및 고찰

1. 탈회분과 탈칼슘화

1) 산처리 및 초음파에 의한 회분과 Ca 함량 변화

대게 분말에서 키틴을 분리하기 위하여 1.0 N HCl로 처리하였을 때 대조구와 초음파 처리구의 시간에 따른 회분 및 Ca 함량 변화는 Fig. 1, 2와 같다.

Fig. 1은 회분 함량 변화로 4시간 처리까지는 회분 함량이 급격히 감소하다가 그 이후는 큰 감소를 보이지 않았다. 대게 분말의 최초 회분 함량이 42.11%이었고 대조구의 경우 상온에서 1시간 처리하였을 때 3.76%로, 4시간 처리하였을 때 회분 함량이 0.81%로 약 98%가 제거되었다. 또한, 초음파 처리구는 1시간 처리하였을 때 3.2%, 4시간 처리가 0.64%로 대조구 4시간 처리보다 낮은 회분 함량을 보여 대부분의 회분이 거의 제거됨을 알 수 있었다.

그 결과, 회분 함량이 초음파 처리가 대조구에 비해 더 많이 감소되는 것을 알 수 있었다. 이는 갑각류 껍질에서 1.0 N HCl로 실온에서 30분 처리했을 때 회분 함량이 0.1% 정도로 거의 제거되었다는 결과²⁰⁾와 유사하였으며, 조 등¹²⁾은 2.0 N HCl로 3시간 처리했을 때 0.3%의 회분이 잔존하였다고 보고하여 효율적인 탈 회분을 위해 원료 내에 회분과 충분히 반응할 수 있는 적절한 양의 산이 공급되어야 함을 시사해주고 있다.

Fig. 2는 Ca의 함량 변화를 비교한 결과로 대게 분말의 최초 Ca의 함량이 8.49%이었던 것이 1시간 처리가 0.93%, 4시간 처리시 0.34%이었으며, 그 후는 큰 감소를 보이지 않았다. 초음파 처리구중 1시간 처리구가 0.79%, 4시간 처리시 0.26%로, 4시간까지는 두 처리구간에 탈 Ca의 효과는 초음파 처리구가 더 컸으며, 모두 HCl 처리시간이 길어질수록 대부분의 칼슘은 제거되는 효과가 크게 나타났다. 따라서 초음파 4시간 처리구의 회분 함량은 초음파 처리를 하지 않은 처리 6시간과 유사하게 나타나, 키틴 추출시간을 33%로 감소 효과가 있음을 보여주었다.

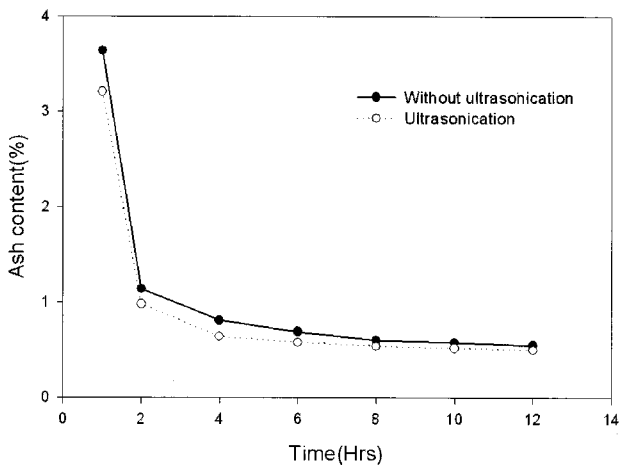


Fig. 1. Changes in ash contents of crab shell powder during demineralization with 1.0 N HCl at 25°C using with or without ultrasonication.

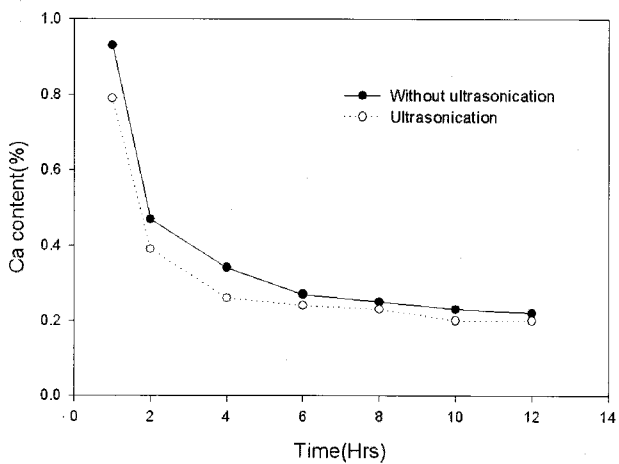


Fig. 2. Changes in Ca contents of crab shell powder during demineralization with 1.0 N HCl at 25°C using with or without ultrasonication.

2) 산처리 후의 색 변화

원료 대게 분말을 1.0 N HCl로 처리방법과 시간에 따라 탈 칼슘한 후 수세하여 여과시켜 건조시킨 대게 분말의 색의 변화는 Table 1과 같다. 최초 L, a, b값이 74.55, 11.51, 11.06이었던 것이 4시간 처리하였을 때 57.60, 17.36, 13.68로, 6시간 처리하였을 때 57.04, 18.17, 13.43로 밝기는 감소하였으며 a와 b값은 증가하였다. 초음파 4시간 처리하였을 때 56.85, 18.29, 14.25로, 6시간 처리는 56.70, 18.98, 14.21로 나타났다. 밝기를 나타내는 L값은 원료 대게 분말보다 감소하여 명도가 낮아졌으며, 적색을 나타내는 a값과 황색을 나타내는 b값은 증가한 것으로 나타났다. 회분과 Ca의 함량의 변화와 같이 대조구의 6시간 처리와 초음파 4시간 처리는 비슷한 색 변화를 보였다.

2. 알칼리 처리에 의한 단백질 변화

1) 알칼리 처리, 초음파와 마이크로파에 의한 Nitrogen의 변화

대게 분말의 단백질을 제거하기 위해 1.0 N NaOH로 처리하였고 water bath 100°C, 초음파, 마이크로파 처리방법과 시간에 따른 질소함량의 변화는 Fig. 3과 같다. 대게 분말의 질소함량은 3.98%이었던 것이 처리 초기에는 대조구와 처리구 모두 급격히 감소하지만 약 2시간 경과후부터는 대조구와 처리구 모두 단백질 제거 속도는 감소하는 것을 알 수 있었다.

질소 함량은 대조구로 100°C에서 90분 처리하였을 때 2.67%로, 150분 처리는 2.53%이었던 것이 초음파 90분 처리는 2.82%로, 150분 처리는 2.68%로 감소하였다. 마이크로파 90분 처리는 2.54%, 150분을 처리하였을 때 2.47%로 감소하는 것으로 나타났다. 마이크로파 90분 처리의 단백질 함량은 1.0 N NaOH 용액에서 120분 처리와 유사하였다. 마이크로파 처리는 키틴 추출시간의 25% 감소 효과가 있음을 보여주었다. 따라서 본 연구에서는 microwave로 90분 처리를 탈단백 처리 방법과 시간으로 정하였다.

Table 1. Changes in color of crab shell powder during demineralization in 1.0 N HCl using with or without ultrasonication

Color	Time(Hrs)							
	0	2	4	6	8	10	12	
Control	L	74.55±1.90 ^a	58.38±2.10 ^b	57.60±2.15 ^b	57.04±1.88 ^b	56.53±0.01 ^b	56.35±0.10 ^b	55.45±0.66 ^b
	a	11.51±2.03 ^b	17.25±0.88 ^a	17.36±0.74 ^a	18.17±1.25 ^a	18.70±1.10 ^a	19.12±1.35 ^a	19.22±1.20 ^a
	b	11.06±0.55 ^b	14.18±0.11 ^a	13.68±0.32 ^a	13.43±1.69 ^a	13.52±0.8 ^a	13.32±1.03 ^a	13.57±0.43 ^a
Ultra-sonication	L	74.55±0.83 ^a	57.20±1.63 ^b	56.85±1.41 ^b	56.70±1.03 ^b	56.32±0.63 ^b	55.52±1.21 ^b	55.41±1.11 ^b
	a	11.51±0.35 ^b	17.38±0.60 ^a	18.29±0.74 ^a	18.98±0.45 ^a	19.12±0.32 ^a	19.54±0.83 ^a	20.30±0.55 ^a
	b	11.06±1.41 ^b	13.35±1.27 ^a	14.25±1.00 ^a	14.21±1.03 ^a	14.36±1.39 ^a	14.79±1.18 ^a	14.52±1.24 ^a

^{a,b} Means with different superscripts in the row are significantly difference(p<0.05).

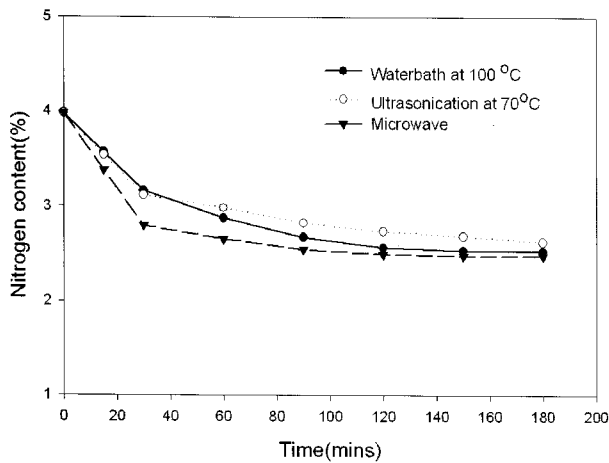


Fig. 3. Changes in nitrogen contents of crab shell powder during deproteinization with 1.0 N NaOH by three different methods.

2) 알칼리 처리 후 색 변화

또한, 원료 대게 분말을 1.0 N NaOH로 시간과 처리방법에 따른 대게 분말의 색 변화는 Table 2와 같다. 원료 대게 분말의 L, a, b값은 74.55, 11.51, 11.06이었던 것이 90분 처리하는

동안 L, a, b값은 77.57, 9.34, 13.30로, 150분 처리하였을 때 78.39, 8.96, 13.04로 L값은 증가하였으며 a값은 감소하였다. 초음파 역시 90분 처리는 L, a, b값은 77.88, 9.51, 14.53로, 150분 처리는 79.68, 9.10, 14.31로 L값은 증가하였으며, a값은 감소하였다. 마이크로파 90분 처리는 78.65, 9.18, 13.58로 150분 처리는 79.87, 8.71, 13.07의 변화를 보였다. 따라서 선정된 처리방법은 회분과 단백질이 제거되는 동안 키틴용액의 L값이 대조구에 비해 높아 더 밝은 것으로 나타났다.

3. 제조 조건 선정 및 일반성분의 변화

원료 대게 분말을 탈칼슘을 위해서는 1.0 N HCl로 4시간 초음파 처리와 탈단백질을 하기 위해서 마이크로파 90분 처리(U-M)로 제조한 키틴과 대게 분말의 일반성분을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 조희분, 수분, 조지방, nitrogen, Ca, 수율은 U-M 처리구가 대게 분말에 함유된 성분이 감소하였고 무기질과 칼슘의 감소가 유의적으로 감소하였다. U-M처리구로 칼슘의 대부분이 없어져 탈칼슘의 효과가 크게 나타났다. U-M 처리구는 약 6.41% 정도의 수분함량을 가지고 있었으며 약 20% 정도의 수율을 보였다.

위의 결과를 보면 김²¹⁾이 제조한 키틴의 일반성분과도 유

Table 2. Changes in color of crab shell powder during deproteinization in 1.0 N NaOH by different deproteinization methods

	Time (mins)	Color		
		L	a	b
Waterbath (100 °C)	0	74.55±2.52	11.51±0.12 ^a	11.06±0.49 ^d
	30	75.37±2.59	9.86±0.28 ^{bc}	9.86±0.28 ^e
	60	77.09±2.53	9.51±0.03 ^{de}	13.48±0.58 ^{bc}
	90	77.57±3.61	9.34±0.06 ^{def}	13.30±0.64 ^c
	120	77.93±1.71	9.23±0.21 ^{efg}	8.96±0.05 ^f
	150	78.39±2.03	8.96±0.05 ^{ghi}	8.96±0.05 ^f
Ultrasonication (70 °C)	0	74.55±2.20	11.51±0.18 ^a	11.06±0.44 ^d
	30	77.29±2.44	9.92±0.19 ^b	14.89±0.51 ^a
	60	78.34±2.16	9.60±0.22 ^{cd}	14.85±0.43 ^a
	90	78.86±2.59	9.51±0.16 ^{de}	14.53±0.62 ^a
	120	79.20±2.62	9.36±0.07 ^{def}	14.33±0.54 ^{ab}
	150	79.68±1.90	9.10±0.25 ^{fgh}	14.31±0.42 ^{ab}
Microwave	0	74.55±2.57	11.51±0.17 ^a	11.06±0.43 ^d
	30	75.41±7.55	9.38±0.14 ^{def}	15.04±0.45 ^a
	60	77.90±2.41	9.26±0.25 ^{efg}	14.59±0.51 ^a
	90	78.65±2.56	9.18±0.22 ^{fgh}	13.58±0.61 ^{bc}
	120	79.49±2.19	8.91±0.08 ^{hi}	13.14±0.44 ^c
	150	78.87±1.75	8.71±0.09 ⁱ	13.07±0.59 ^c

^{a-i} Means with different superscripts in the column are significantly difference($p < 0.05$).

Table 3. Analytical values of crab shell powder chitin prepared by difference of methods

Compositions	Shell powder	Chitin
		U-M
Moisture(%)	8.27±0.02	6.41±0.04
Nitrogen(%)	3.98±0.11	2.47±0.21
Crude fat(%)	0.54±0.03	0.24±0.05
Crude ash(%)	42.11±3.10	0.55±0.17
Ca(%)	10.87±2.60	0.25±0.03
Yield(%)	-	20.64

U-M: Demineralized in 1.0 N HCl for 4 hr at with ultrasonication and deproteinized in 1.0 N NaOH for 1.5 hr by microwave.

사하였으며, 백²²⁾의 실험에서 키틴 제조조건으로 설정한 2.0 N HCl로 180분 처리와 1.0 N NaOH로 100°C에서 3시간 처리한 키틴의 일반성분의 값과도 유사하였다. 또한 키틴의 일반성분을 분석한 김²³⁾은 회분 2.15%, 수분 4.96%로 본 실험의 0.55%, 6.41%와는 회분의 양은 많았으며 수분은 유사하였다.

결론

본 연구에서는 마이크로파와 초음파가 키틴 추출시간에 미치는 영향을 조사하였다. 키틴 제조는 대게 껍질에서 Ca를 제거하기 위해 25°C에서 1.0 N HCl 용액과 초음파 처리를 하였고, 단백질을 제거를 위해 1.0 N NaOH 용액에서 100°C에서 초음파 처리 없이, 70°C에서 초음파 처리하였다. 마이크로파 처리는 단백질제거를 위해 사용하였으며, 5분간 가열하고 5분간 쉬는 방법으로 하였다. 회분과 단백질을 제거하는 동안 색 변화, 회분, Ca 함량, 질소 함량의 변화를 조사하였다. 탈칼슘을 위해 1.0 N HCl 용액에서 4시간 초음파 처리와 탈단백을 위해 1.0 N NaOH 용액에서 1.5시간 microwave 처리는 각각 이들 처리없이 1.0 N HCl 용액에서 6시간, 1.0 N NaOH 용액에서 2시간 처리와 유사하였다. 이들 처리방법은 키틴 추출시간의 25~33% 감소 효과가 있음을 보여주었다. 초음파와 마이크로파에서 얻어진 키틴의 일반성분은 회분이 0.55%, Ca 함량이 0.25%, N 함량이 2.47%, 수율이 20.64%로 나타났다. 선정된 처리방법은 회분과 단백질이 제거되는 동안 키틴용액의 색이 더 밝게 나타났다.

참고문헌

1. Kato, H and Taguchi, T. Antihypertensive effect of chitin in rats and humans. *J. Tred. Med.* 11:198-201. 1994
2. Sugano, M, Fujikawa, T and Hiratsui, Y. Hypochole-

3. Ikedo, I, Sugano, M, Yoshida, K, Sasaki, E, Iwamoto, Y and Hatano, K. In Dietary Fiber in Health & Disease. pp.96-98. Eagan Press. New York, 1995
4. Sugano, M, Watanabe, S, Kishi, A, Izume, M and Ohtakara, A. Hypocholesterolemic action of chitosan with different viscosity in rats. *Lipids.* 23:187-191. 1988
5. Gallaher, DD and Hassel, CA. Dietary Fiber in Health & Disease. pp112-115 Eagan Press. New York, 1995
6. Eastwood, MA and Morris, ER. Physical properties of dietary fiber that influence physiological function. *Am. J. Clin. Nutr.* 55:436-442. 1992
7. Suzuki, K, Mikami, T, Okawa, Y, Tokoro, A and Suzuki, M. Antitumor effect of hexa-N-acetyl-chitohexase and chitohexase. *Carbohydr. Res.* 151:403-408. 1986
8. Tokoro, A, Tatewaki, K, Suzuki, T, Mikami, S and Suzuki, M. Growth inhibitory effect of hexa-N-acetyl chitohexase and chitohexase against Meth-A solid tumor. *Chemical Pharmaceutical Bulletin.* 36:784-789. 1988
9. Bough, WA. A polymer from seafood waste, for use treatment of food processing waste and activated sludge. *Process Biochem.* 11:13-16. 1976
10. Bough, WA. Recovery and nutritional evaluation of proteinaceous solids separated from whey by coagulation with chitosan. *J. Dairy Sci.* 59:1874-1880. 1976
11. No, HK and Meyers, SP. Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing streams. *J. Agric. Food Chem.* 37:580-583. 1989
12. Cho, JS, Han, JJ and Lee CH. Physical properties of chitosan film made from crab shell. *Korean J. Food Sci. Technol.* 24: 574-580. 1992
13. Austin, PR, Brine, CJ, Castle, JE and Zikakis, JP. Chitin: New facts of research. *Science.* 212:749-753. 1981
14. No, HK, Meyers, SP and Lee, KS. Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *J. Agric. Food Chem.* 37:575-579. 1989
15. Hackman, RH. Studies on chitin I. Enzyme degradation of chitin and chitin esters. *Aust. J. Biol. Sci.* 7:168-171. 1954
16. Shimahara, K, Takiguchi, Y. Methods in Enzymology. Academic Press. pp.417 New York. 1988
17. Foster, AB and Hackman RH. Chitin pergamon press. *Nature.* 40:180-183. 1957
18. AOAC. Official Methods of Analysis. 15th ed., pp.14. Asso-

- ciation of Official Analytical Chemists, Washington, DC. 1990
19. 식품공정. 식품의약품안전청, pp.273. 2000
20. No, HK and Lee, MY. Isolation of chitin from crab shell waste. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 24:105-113. 1995
21. Kim, BS. Studies on physicochemical properties of red crab shell chitosan and its applications. PhD. Thesis, Gyeongsang National Uni., Jinju. Korea. 1997
22. Baek, YD. A study on the rheological properties of chitosan solution MS. Thesis, Pusan National Uni., Pusan. Korea. 1995
23. Kim, YJ. Physicochemical and microbiological characteristics of chitosans prepared under different conditions and the effect of chitosan addition on the storage stability of mayonnaise. MS. Thesis, Sejong Uni., Seoul. Korea. 1997
-
- (2008년 11월 21일 접수; 2009년 1월 30일 채택)