

수용성 단백질에 대한 새우껍질 Chitosan의 흡착 특성

이근태⁺ · 박성민* · 최현미 · 최상현 · 문보인 · 김경태 · 송호수
부경대학교 식품공학과, *부경대학교 공동실험실습관

Adsorption Property of Shrimp Shell Chitosan to Water Soluble Proteins

Keun-Tai LEE⁺, Seong-Min PARK*, Hyeon-Mee CHOI, Sang-Hyun CHOI
Bo-In MOON, Kyung-Tae KIM and Ho-Su SONG

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

*Cooperative Laboratory Center of Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Chitosan has been used as an effective adsorbant for the treatment of wastewater from seafood processing. We investigated the effects of deacetylation degree (DD) and molecular weight (MW) of chitosan on protein adsorption ability and also the optimum conditions of chitosan treatment for protein adsorption in 3 kinds of protein (albumin, hemoglobin and albumin-myoglobin mixture) solutions. The higher deacetylation degree and the lower molecular weight chitosan, the higher adsorption for water soluble proteins was accomplished. The optimum pHs for adsorption of albumin, hemoglobin and albumin-myoglobin mixture (4:1, w/w) were 4.0, 7.0 and 4.0, respectively and the optimum time was 3~4 hrs for all proteins. Sodium chloride in the model system of protein solution was a preventing factor for protein adsorption ability of chitosan (DD=80%, MW=350 kDa).

Key words: Chitosan, Water soluble protein, Deacetylation degree, Molecular weight

서 론

새우, 게 등의 갑각류 껍질에서 추출한 chitin은 N-acetyl-D-glucosamine이 β→1,4 결합을 한 구조를 가지고 있으며, 지구상에서 cellulose 다음으로 풍부한 무독성 천연 고분자 화합물이다. 그러나 이러한 chitin은 물이나 알코올 등과 같은 일반용매에는 녹지 않는 특성을 가지고 있어 그 자체로는 이용 가능성이 매우 낮기 때문에 이를 강염기로 탈아세틸화시켜 유도체화 한 chitosan을 오늘날 의학, 생화학, 약학, 식품 및 화장품 공업 등에서 널리 이용하려는 연구가 진행되고 있다 (Knorr, 1984, 1986, 1991; No and Meyers, 1989). Chitosan에 대한 중요한 산업적 이용의 하나로서 산업폐수 처리 및 식품가공공장에서 발생하는 폐수 중의 영양성 물질을 회수하려는 노력이 이루어지고 있다. Chitosan은 용액 중에서 양의 전하를 띠고 있으므로 폐수처리 과정 중에 양이온 응집제로서 효과적인 작용을 할 수 있으며 이를 이용하여 식품가공공장에서 방출되는 폐수 중의 단백질 및 유기물질을 회수할 수 있다고 보고되고 있다 (Johnson, 1984; Knorr, 1991; Takashi, 1984).

수산식품가공산업에 있어서 수용성 단백질은 어육의 수세 시 수세액과 함께 제거되므로 중량의 손실, 영양가의 저하, 폐수처리 비용의 증가 등과 같은 부가 문제를 발생시켜 생산업체의 부담이 되고 있다. 목적하는 최종제품의 품질을 위하여 수용성 단백질의 제거가 필요한 경우도 있으나 이 경우에도 폐수처리의 문제는 여전히 남게 된다. 현재 수산가공공장의 효과적인 폐수처리를 위하여 주로 활성오니법이 사용되고 있는데 설비 및 운전비용이 많이 드는 부담이 있다. 만일 chitosan을 이용하여 폐수처리의 1차 또는

2차 단계에서 폐수 중에 함유되어 있는 수용성 단백질을 효과적으로 응집 제거할 수 있다면 폐수처리 시설의 부하를 상당히 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라 회수된 단백질의 재활용도 가능하게 되어 일석이조의 효과를 거둘 수 있을 것으로 예상된다. 더욱이 chitosan의 단백질 응집기능을 개선하여 그 효율을 더욱 높인다면 저비용으로 고효율을 얻을 수 있는 고무적인 결과를 도출할 수 있을 것이라 생각된다.

본 연구에서는 수산식품가공공장에서 발생하는 폐수 중에 많이 존재할 수 있는 어육 혈액이나 어육 중의 수용성 단백질을 제거하기 위해 chitosan을 이용할 경우 chitosan의 탈아세틸화도와 분자량에 따른 수용성 단백질의 흡착 효과의 변화 및 각종 흡착 조건에 따른 chitosan의 수용성 단백질에 대한 흡착능에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

Chitosan의 원료는 수산가공공장에서 가공 후 버려지는 새우 껍질을 수집하여 수세한 후, 50°C에서 열풍건조하고, 20 mesh 정도로 분쇄한 후 플라스틱 용기에 넣어 상온에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 또한 실험에 사용한 수용성단백질 (bovine albumin, bovine hemoglobin, myoglobin)은 Sigma사 (U.S.A.)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

(1) Chitin 및 chitosan의 제조

Chitin을 제조하기 위해 분쇄한 새우껍질에 2N HCl 용액 (원

⁺Corresponding author: ktleee@pknu.ac.kr

료 각각의 10배, w/v)을 서서히 가하면서 탄산가스가 발생하지 않을 때까지 유리막대로 잘 저어준 후 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 교반이 끝난 다음 수세액이 중성에 이를 때까지 충분히 수세한 후 1 N NaOH 용액 (시료의 10배, w/v)을 가하여 heating mantle (E107, Misung Scientific Co.)을 이용하여 100°C에서 3시간 동안 교반, 가열한 후 충분히 수세한 다음 50°C에서 열풍건조하여 chitin을 제조하였다. 그리고 chitosan은 앞의 방법으로 제조한 chitin에 40% (w/v) NaOH 용액 (시료 chitin의 15배, w/v)을 가하여 일정 시간 동안 가열하여 탈아세틸화한 다음 중성이 될 때까지 수세하고 50°C에서 건조하여 제조하였다.

(2) Chitosan의 분자량 조절

제조된 chitosan을 0.1 M acetate - 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.0) 용액에 1% (w/v) 용해시킨 뒤 20, 40 및 60분간 초음파 (Sonic Dismembrator 550 (Fisher Scientific), pulse intensity; 25%, temperature; 25°C) 처리하여 저분자화시켜 분자량을 조절하였다. 저분자화된 chitosan 용액에 0.1 M NaOH를 첨가하여 생성된 백색 침전물을 여과하여 증류수로 수세한 뒤 동결건조 (vacuum freezer dryer, SFDSM12, Samwon freezing engineering Co.) 시킨 뒤 분쇄하였다.

(3) Chitosan의 탈아세틸화도 측정

Sannan et al. (1978)의 방법에 따라 시료 2 mg과 KBr 100 mg을 완전히 혼합한 후 10분 동안 마쇄하고, KBr cell을 만들어 IR spectrum을 측정하여 2,878 cm⁻¹과 1,550 cm⁻¹에서의 흡광도의 비 (A₁₅₅₀/A₂₈₇₈)를 구한 다음 Sannan et al. (1978)이 구한 검량선을 이용하여 탈아세틸화도를 계산하였다.

(4) 고유점도 (intrinsic viscosity)와 분자량 측정

Chitosan의 고유점도를 구하기 위하여 Ubbelohde형 모세관 점도계를 사용하였다. 즉 0.1 M acetic acid - 0.02 M NaCl 용액을 용매로 하여 0.01%, 0.03%, 0.05%, 0.08%, 0.1% chitosan 용액을 조제한 후, 각 chitosan 용액의 상대점도 (relative viscosity)를 측정하고 이로부터 아래의 식을 이용하여 비점도 (specific viscosity)와 환원점도 (reduced viscosity)를 구하였다.

$$\text{Relative viscosity } (\eta_{rel}) = \eta/\eta_s$$

$$\text{Specific viscosity } (\eta_{sp}) = (\eta - \eta_s)/\eta_s = \eta_{rel} - 1$$

$$\text{Reduced viscosity } (\eta_{rel}) = (\eta - \eta_s)/C \cdot \eta_s = \eta_{sp}/C$$

$$\text{Intrinsic viscosity } ([\eta]) = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{sp}/C) = (\eta_{rel})_{c \rightarrow 0}$$

η_s : 용매의 점도, η : 용액의 점도, C: 용액의 농도

그리고 환원점도로부터 Huggins식에 따라 고유점도 (intrinsic viscosity)를 구하였다.

$$\eta_{sp}/C = [\eta] + k'[\eta]^2c$$

여기서, k'는 Huggins 상수이며, c는 용질의 중량농도 (g/dL)이다.

분자량은 고유점도와 분자량의 관계를 나타낸 Mark-Houwink 식을 이용하여 구하였다. 이 때 상수인 K와 a는 Roberts et al.

(1988)이 0.1 M acetic acid - 0.02 M NaCl 용액에 chitosan을 녹여서 구한 값을 이용하였다.

$$[\eta] = K \times Mw^a$$

여기서, $[\eta]$ 는 고유점도, K는 3.04×10^{-5} , Mw는 분자량, a는 1.26이다.

(5) Chitosan의 수용성단백질 흡착능 측정

수용성 단백질 흡착능 실험에는 albumin, hemoglobin, myoglobin 단독 및 혼합 용액을 사용하였다. 이들 단백질을 0.5% (w/v)의 농도로 제조하여 삼각플라스크에 20 mL를 넣은 다음, 0.1 M, 1.0 M HCl 또는 0.1 M, 1.0 M NaOH를 이용하여 pH를 4~8 범위로 조정하여 chitosan을 일정량 (50, 100, 200, 300 mg) 첨가하였으며 교반기를 이용하여 일정 시간 교반하여 침전시킨 후에 상층액을 여과하였다. 여액의 단백질의 농도는 Lowry법 (Lowry et al., 1951)에 따라 750 nm에서 흡광도를 측정하고 검량선을 이용하여 구한 다음 chitosan에 흡착된 수용성단백질의 흡착율은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{흡착율 (\%)} = \frac{\text{초기 단백질량} - \text{흡착 후 단백질량}}{\text{초기 단백질량}} \times 100$$

결과 및 고찰

1. Chitosan의 조건에 따른 단백질 흡착 효과

(1) Chitosan의 탈아세틸화도

Chitosan의 탈아세틸화도가 수용성 단백질 흡착에 미치는 영향을 알아보기 위해서 탈아세틸화도 (deacetylation degree, DD)가 60%, 70%, 80%인 chitosan 100 mg을 0.5% albumin, hemoglobin, albumin-myoglobin 용액에 첨가한 뒤 1시간 교반한 후의 단백질 흡착율의 변화를 Fig. 1에 나타내었다.

Albumin 용액에서 DD-60, DD-70, DD-80 chitosan의 흡착율은 각각 11.9%, 31.1%, 63.1%로 탈아세틸화도가 높아질수록 chitosan의 흡착율이 높게 나타났으며, DD-80 chitosan의 흡착율은 DD-60 chitosan에 비하여 5배 가량 높았다. Hemoglobin 용액이 경우 7.0%, 9.0%, 11.1%로 탈아세틸도의 증가에 따라 흡착율이 높아지기는 하지만 현저하게 큰 차이는 보이지 않았다. 이는 hemoglobin이 철을 둘러싼 porphyrin 환 구조에 단백질이 결합된 형태를 하고 있기 때문인 것으로 추정된다. 그리고 albumin-myoglobin 혼합 용액에서 DD-60, DD-70, DD-80 chitosan의 흡착율은 각각 6.3%, 16.8%, 41.7%로 탈아세틸화도가 높을수록 chitosan의 흡착율이 높게 나타났으며, DD-80 chitosan의 흡착율은 DD-60 chitosan에 비하여 7배 가량 높았다. Domard et al. (1989)은 폐수 중에 존재하고 있는 kaolinite에 대한 chitosan의 흡착능에 있어서도 탈아세틸화도가 높은 것이 흡착능이 높다고 보고하고 있으며 이는 본 연구결과를 뒷받침하고 있다. 따라서 chitosan의 탈아세틸화도가 높아질수록 단백질 흡착율이 높아지는 것으로 보아 chitosan의 amine기 (NH₃⁺)가 단백질과의 흡착에 크게 관여하고 있다고 볼 수 있다.

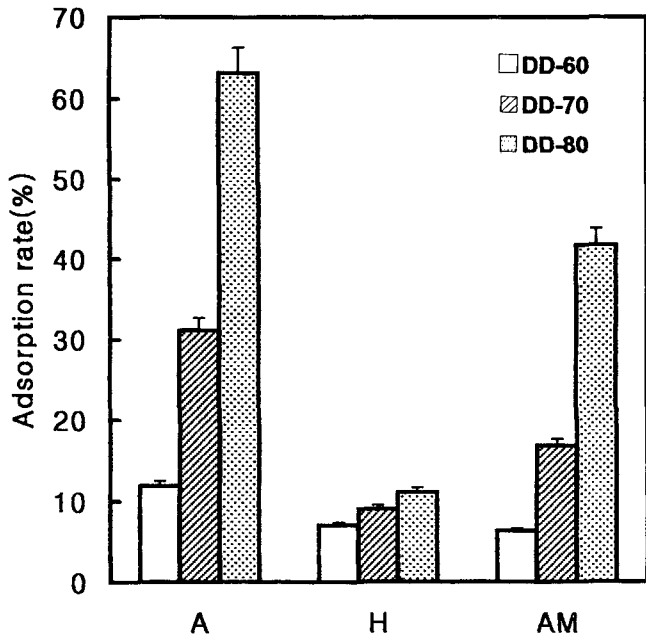


Fig. 1. Effect of deacetylation degree (%) on the adsorption rate of water soluble 0.5% (w/v) proteins by chitosan. Chitosan content: 100 mg chitosan/ 20 mL protein soln. Reaction time: 1 hr
 A: Albumin
 H: Hemoglobin
 AM: Albumin-Myoglobin

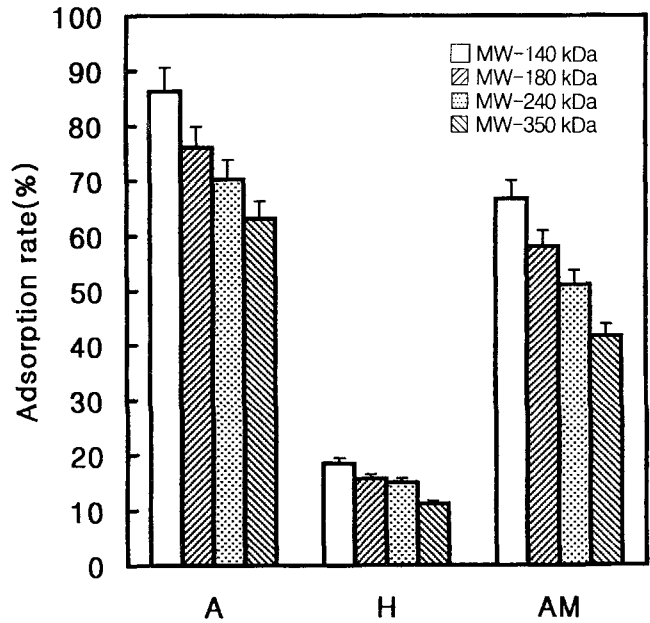


Fig. 2. Effect of molecular weight on the adsorption rate of water soluble 0.5% (w/v) proteins by chitosan. Chitosan content: 100 mg chitosan/ 20 mL protein soln. Reaction time: 1 hr
 A: Albumin
 H: Hemoglobin
 AM: Albumin-Myoglobin

(2) Chitosan의 분자량

Chitosan의 분자량이 수용성 단백질 흡착에 미치는 영향을 알아보기 위해서 DD-80 chitosan을 0.1 M acetic acid-0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.0)에 1% 농도로 녹인 후 25°C에서 20분, 40분, 60분 초음파 처리시켰을 때 분자량의 변화는 350 kDa에서 20분, 40분, 60분 후에 각각 240 kDa, 180 kDa, 140 kDa으로 감소하였다. 이렇게 조제된 저분자 chitosan 100 mg을 0.5%, albumin, hemoglobin, albumin-myoglobin 용액에 첨가한 뒤 1시간 교반한 후의 단백질 흡착율의 변화를 Fig. 2에 나타내었다.

Albumin 용액에서는 chitosan의 분자량이 350 kDa일 때 63.1%, 240 kDa일 때에는 70.3%, 180 kDa일 때에는 76.0%, 140 kDa일 때에는 86.3%로 chitosan의 분자량이 낮을수록 흡착율은 높게 나타났다. Hemoglobin 용액의 경우 chitosan의 분자량이 350 kDa일 때 11.1%, 240 kDa일 때에는 15.0%, 180 kDa일 때에는 15.7%, 140 kDa일 때에는 18.5%로 chitosan의 분자량이 낮을수록 흡착율은 높게 나타났지만 albumin 만큼 현저한 차이는 보이지 않았다. Albumin과 myoglobin을 4:1로 혼합한 경우에 0.5% 혼합단백질 용액에서는 chitosan의 분자량이 350 kDa일 때 41.7%, 240 kDa일 때에는 51.1%, 180 kDa일 때에는 58.0%, 140 kDa일 때에는 66.7%로 chitosan의 분자량이 낮을수록 흡착율은 높게 나타났다. 이는 chitosan이 초음파에 의해서 불균일하게 절단되기는 하지만 그에 따른 amine기 (NH₃⁺)의 노출이 많아짐으로써 수용성 단백질과의 흡착이 커지는 것으로 추정되며 이와 같은 경향은 chitosan에

대한 중금속 흡착에서도 유사하게 나타나고 있다.

2. 수용성단백질과 chitosan의 흡착에 미치는 인자

(1) pH

단백질 용액의 pH 변화에 따른 chitosan의 흡착효과를 알아보기 위하여 0.5% albumin, hemoglobin, albumin-myoglobin 혼합 용액 20 mL에 pH를 4~8로 변화시켜 탈아세틸화도가 80%인 chitosan (MW=350 kDa)을 100 mg 첨가시켰을 때의 흡착율의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. Albumin은 pH 4에서 63.1%로 가장 높은 흡착율을 나타내었으며 pH가 증가함에 따라 단백질 흡착율은 낮아졌으나 pH 7에서 다소 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 albumin의 등전점 (pI=4.8) 부근에서 chitosan과의 흡착이 잘 일어남을 보여주고 있으며 pH 7에서도 약간의 흡착이 일어남을 볼 수 있다. Hemoglobin은 pH 7에서 11.1%로 가장 높은 흡착율을 나타내었고 albumin에 비해서는 흡착율이 떨어졌으며 hemoglobin의 등전점 (pI=6.8) 부근에서 흡착이 잘 일어남을 알 수 있다. Albumin과 myoglobin을 4:1로 혼합시킨 경우에는 pH 4에서 41.7%로 가장 높게 나타났으며 pH가 증가함에 따라 감소하였으나 pH 7에서는 약간 증가하였다. 따라서 chitosan과 수용성 단백질의 흡착은 chitosan의 amine기 (NH₃⁺)와 등전점 부근의 pH에서 단백질의 carboxyl기 (COO⁻)와의 이온결합력이 가장 최대로 나타나는 것으로 추정된다.

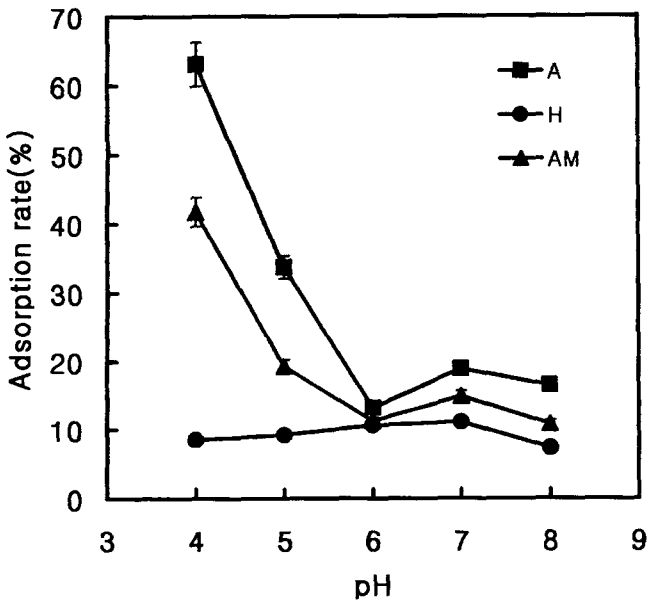


Fig. 3. Effect of pH on the adsorption rate of water soluble 0.5% (w/v) proteins by chitosan. Chitosan content: 100 mg chitosan/ 20 mL protein soln. Reaction time: 1 hr
A: Albumin
H: Hemoglobin
AM: Albumin-Myoglobin

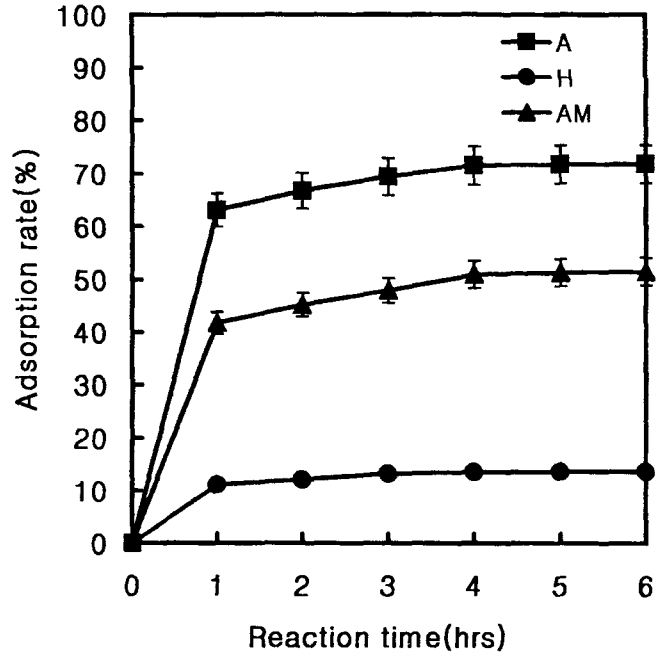


Fig. 4. Effect of reaction time on the adsorption rate of water soluble 0.5% (w/v) proteins by chitosan. Chitosan content: 100 mg chitosan/ 20 mL protein soln. Reaction time: 1 hr
A: Albumin
H: Hemoglobin
AM: Albumin-Myoglobin

(2) 반응시간

반응시간에 따른 수용성 단백질 흡착율의 변화를 알아보기 위해서 0.5% albumin, hemoglobin 및 albumin-myoglobin 혼합 단백질 (혼합비=4:1, w/w) 용액 20 mL에 탈아세틸화도가 80%인 chitosan (MW=350 kDa)을 100 mg 첨가시킨 뒤 각각의 단백질 흡착반응 최적 pH에서 반응시간에 따른 흡착율의 변화를 Fig. 4에 나타내었다.

Albumin에 1시간 반응시 DD-80 chitosan의 흡착율은 63.1%이었으며, 4시간까지 반응시 71.5%로 증가하였으며, 그 이상 반응시켜도 흡착율의 증가는 거의 나타나지 않았다. Hemoglobin에서는 1시간 반응시 흡착율은 11.1%, 3시간 반응시켰을 때 13.2%까지 증가했으나 그 이상의 반응은 흡착율에 거의 영향을 미치지 않았다. 0.5% albumin-myoglobin에 1시간 반응시 흡착율은 41.7%이었으며, 4시간까지 반응시 50.9%까지 증가하였으며, 그 이상 반응시에는 흡착율의 변화는 거의 나타나지 않았다. Jun et al. (1994)은 두부제조공장에서 발생하는 폐수 처리에 있어서 pH 5.8에서 chitosan을 30 mg/L로 첨가하여 침전시간을 30분으로 했을 때 탁도가 94% 감소하며, 3시간까지 침전시켜도 탁도상의 변화는 거의 없다고 보고하고 있다.

(3) 염농도

어육 수세시에는 수세 용액에 염이 존재할 수 있으므로, 염의 농도가 수용성 단백질의 흡착에 미치는 영향을 알아보기 위하여 NaCl이 0.1 M, 0.5 M, 1.0 M 농도로 첨가된 0.5% albumin, hemo-

globin, albumin-myoglobin (혼합비=4:1, w/w) 용액 20 mL에 탈아세틸화도가 80%인 chitosan (MW=350 kDa)을 100 mg 첨가시킨 뒤 각각의 단백질 흡착반응 최적 pH에서 1시간 반응시켰을 때 염농도에 따른 단백질 흡착율 변화를 Fig. 5에 나타내었다.

Albumin의 경우, 염이 존재하지 않을 때 chitosan에 대한 albumin, hemoglobin, albumin-myoglobin (혼합비=4:1, w/w)의 흡착율은 63.1%, 11.1%, 41.7%이었으며 염농도가 0.1 M일 때의 흡착율은 각각 20.5%, 7.9%, 18.0%, 염농도가 0.5, 1.0 M로 높아짐에 따라 흡착율은 각각 15.9%에서 6.0%, 5.1%에서 2.5%, 5.6%에서 3.6%로 염농도가 증가함에 따라 chitosan에 대한 수용성 단백질의 흡착율은 낮게 나타났다. 이와 같이 염농도의 증가로 인한 이온강도의 증가는 수용액에서 NaCl의 해리에 의해서 chitosan의 amine기 (NH₃⁺)와 단백질의 carboxyl기 (COO⁻)의 반응을 저해하여 수용성 단백질 흡착능을 떨어뜨린다고 추정할 수 있다.

요 약

Chitosan의 탈아세틸화도와 분자량 등을 달리하여 chitosan의 제조조건에 따른 수용성 단백질에 대한 흡착율 및 흡착에 영향을 미치는 인자에 대해 검토하였다. Chitosan의 탈아세틸화 조건을 60%, 70%, 80%로 달리하여 albumin, hemoglobin, albumin-myoglobin 혼합용액에 적용했을 때 chitosan의 탈아세틸화도가 높을

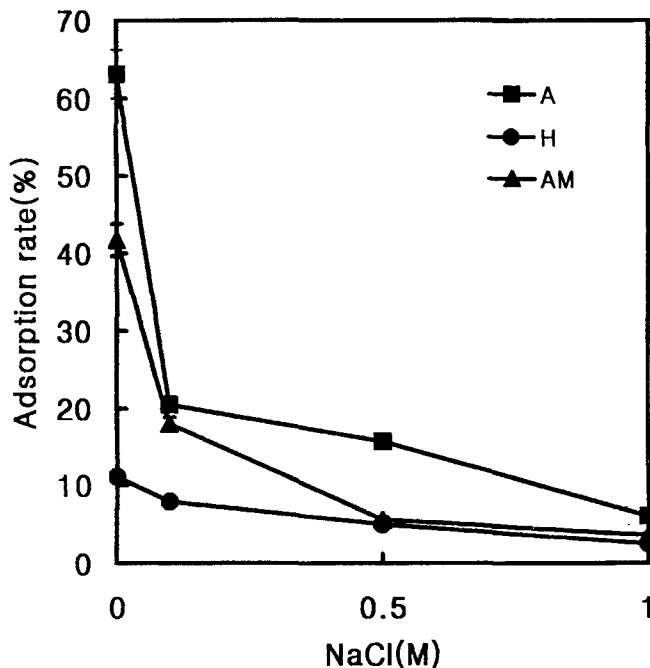


Fig. 5. Effect of NaCl concentration on the adsorption rate of water soluble 0.5% (w/v) proteins by chitosan. Chitosan content: 100 mg chitosan/ 20 mL protein soln. Reaction time: 1 hr

A: Albumin
H: Hemoglobin
AM: Albumin-Myoglobin

수용성 chitosan과 수용성 단백질 사이의 흡착율은 높게 나타났다. 초음파 처리에 의하여 chitosan의 분자량을 변화시켰을 때 chitosan의 분자량이 작을수록 chitosan과 수용성 단백질 사이의 흡착율은 높게 나타났다. pH 변화에 따른 chitosan과 수용성 단백질의 흡착율은 albumin 및 albumin-myoglobin 혼합용액에서는 pH 4에서, hemoglobin 용액에서는 pH 7에서 흡착율이 높게 나타났다. Chitosan과 수용성단백질과의 흡착에서 반응시간은 albumin 및 albumin-myoglobin 혼합용액에서는 4시간, hemoglobin 용액에서는 3시간까지 흡착율이 증가하였고, 그 이상의 시간을 반응시켜도 흡착율의 증가는 거의 나타나지 않았다. 수용성 단백질 용액에

NaCl 농도를 0.1에서 1.0 M로 증가시켜 첨가했을 때 염의 농도가 높을수록 chitosan과 수용성 단백질 사이의 흡착이 잘 일어나지 않았다.

참 고 문 헌

- Domard, A., M. Rinaudo and C. Terrassin. 1989. Adsorption of chitosan and a quaternized derivative on kaolinite. *J. Applied Polymer Sci.*, 38, 1799~1806.
- Jun, H.K., J.S. Kim, H.K. No and S. Meyers. 1994. Chitosan as a coagulant for recovery of proteinaceous solids from tofu wastewater. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1834~1838.
- Johnson, R.A. and S.M. Gallanger. 1984. Use of coagulants to treat seafood processing wastewaters. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 56, 970~976.
- Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food-A challenge for food research and development. *Food Tech.*, 38, 85~90.
- Knorr, D. 1986. Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.*, 47, 593~595.
- Knorr, D. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Tech.*, 45, 114~122.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275.
- No, H.K. and S.P. Meyers. 1989. Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing streams. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 580~583.
- Roberts, G.A.F. and K.E. Taylor. 1988. The preparation and characterisation of chitin beads for use in chromatography chitin and chitosan. *Proceedings of the 1st international conference on chitin and chitosan*, pp. 577~588.
- Sannan, T., K. Kurita, K. Ogura and Y. Iwakura. 1978. Studies on chitin: 7. I.R. spectroscopic determination of degree of deacetylation. *Polymer*, 19, 458~459.
- Takashi, A., N. Havakawa and T. Suzuki. 1984. Chitosan application in wastewater sludge treatment. *Proceedings of the 2nd international conference on chitin and chitosan*, pp. 210~212.

2001년 4월 17일 접수

2001년 9월 7일 수리