

# 근적외선 분광분석법을 이용한 Chitin 및 Chitosan의 탈단백 및 탈아세틸화도 측정

송호수<sup>†</sup>, 이근태 · 박성민\*, 강옥주\*\*, 정효숙\*\*  
부경대학교 식품생명공학부, \*부경대학교 공동실험실습관, \*\*경남대학교 생명과학부

## Measurement of Deproteinization and Deacetylation of Chitin and Chitosan by Near Infrared Spectroscopy

Ho-Su SONG<sup>†</sup>, Keun-Tai LEE, Seong-Min PARK\*, Ok-Ju KANG\*\* and Hyo-Sook CHEONG\*\*  
*Division of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*  
*\*Cooperative Laboratory Center of Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*  
*\*\*Division of Life science of Kyungnam University, Masan 631-701, Korea*

NIR spectroscopic analysis was used for the measurement of deproteinization and deacetylation to apply the merits of NIR spectroscopic analysis to the quality management in the process of chitin and chitosan production. In measuring squid pen and red snow crab shell, which are raw materials of chitin and chitosan by NIR, there were typical peaks in 1200 nm, 1510 nm, 2050 nm and 2180 nm. Squid pen had somewhat higher peak than red snow crab shell. In producing chitin, amount of protein was decreased. Measuring it by NIR, reduction of protein caused by deproteinization was identified in producing chitin. Chitosan is a derivative material made from chitin by processing the deacetylation. During this processing, acetyl groups were removed and amide bonds were appeared. From NIR spectra, peaks at 1530 nm and 2030 nm indicated amide II peak of chitosan, and these peaks were used for identifying the differences of structure between chitin and chitosan. The error in measurement of nonidentified sample was below 1% and the error in the standard curve was below 0.006. These errors were very low and the accuracy of NIR was considered to be superior to the existing methods.

key words: Near infrared spectra, Chitin, Chitosan, Deproteinization, Deacetylation

### 서 론

근적외선을 이용한 식품분석 방법은 식품의 비파괴 평가법의 한가지이며 식품의 비파괴 평가법에 대하여 Dull (1978)은 “식품의 품질 측정이 끝난 후에도 대상을 식품으로 제공할 수 있는 평가법” 이라고 정의하고 있다. 식품의 비파괴 분석법은 시료의 외부로부터 가해지는 에너지와 방출되는 에너지의 차이를 이용하여 시료의 이화학적 특성에 관계되는 정보를 얻는 방법으로 사용되는 에너지의 종류에 따라 광학적인 방법, 방사선적 방법, 역학적 방법 및 전자기학적 방법 등이 있다. 전자기학적인 방법중의 하나인 근적외선 (Near-Infrared) 분광분석법은 식품의 구성 성분을 분석하는 비파괴 측정법 중에서 가장 발전된 방법이라 할 수 있다. 이 방법은 식품 구성성분의 분자 구조내에 가지고 있는 C-H, N-H, O-H 등의 관능기가 0.8  $\mu\text{m}$ -2.5  $\mu\text{m}$ 의 파장 영역에서 가지는 진동 에너지를 이용하는 측정 방법으로 대상을 파괴하지 않고 측정하는 비파괴 측정법이다 (Lanza, 1983). 이러한 근적외선 (NIR)을 이용한 분석법은 육제품의 수분, 단백질, 지방 등의 분석에 많이 이용되어지고 있는데 이것은 각 성분의 관능기가 근적외선 영

역에서 각기 다른 흡수과장대를 나타내기 때문이다. 수산 가공폐기물인 게, 새우 등 갑각류의 껍질 및 오징어연골에 많이 함유되어 있는 키틴 및 키토산은 천연에서 cellulose 다음으로 많이 생산되는 생물자원으로서 그 가치를 인정받고 있으며, 이의 효율적 이용에 관한 연구가 꾸준히 진행되고 있다. 키틴 및 키토산의 순도 및 탈아세틸화도는 키토산의 기능특성에 가장 중요한 인자로서 순도가 높을수록 수율이 높아지며 탈아세틸화도가 높을수록 일반적으로 응집성이 높다고 알려져 있다 (Baik, 1995). 이러한 키틴 및 키토산의 이용을 위해서는 제조 후의 순도, 각종 물성이 정확하게 분석되어지는 것이 중요하며, 이를 자료로 하여 이용분야를 결정할 수 있을 것으로 생각된다. 기존의 키틴 및 키토산의 순도 및 탈아세틸화도 측정법에 사용된 화학적 분석법은 시료의 전처리부터 최종 결과를 도출하기 까지 상당한 시간이 소요되며, 숙련된 분석자가 아닐 경우 결과의 재현성도 낮은 단점들을 지니고 있다.

본 연구에서는 키틴 및 키토산의 산업적 이용을 위한 자료 획득과 관련된 연구 중 키틴 및 키토산의 화학적 구조 비교, 키토산의 탈아세틸화도 측정등의 연구에 근적외선 분광분석법을 적용하였으며, 그 가능성 또는 새로운 분석 기법의 개발을 위한 자료를 얻고자 오징어 연골 및 게갑각

<sup>†</sup>Corresponding author:

으로부터 키틴 및 키토산을 제조하여 근적외선 분광분석법으로 각종 실험을 행하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

##### 1. 오징어 연골

강원도 강릉 지역의 수산 가공 공장에서 폐기되는 오징어 (*Ommastrephes bartrami*) 연골을 수집하여 이물질 제거하고 수세한 후 40°C에서 12시간 열풍건조시켜 50 mesh 정도로 분쇄한 다음 chitin 제조용 시료로 사용하였다.

##### 2. 게갑각

Chitin 및 chitosan의 원료는 경북 영덕 지역의 수산 가공 공장에서 가공 후 폐기물로 버려지는 붉은 대게 (*Chinonocetes japonicus*)의 갑각을 수거하여 이것을 수세한 후 50°C에서 열풍건조하고, 20 mesh 정도로 분쇄한 후 플라스틱 용기에 넣어 냉장고 (5°C)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 실험방법

##### 1. 오징어 연골 chitin의 제조

50 mesh 정도로 분쇄한 오징어 연골에 1N NaOH 용액 (시료중량의 15배)을 가하고 실온에서 3시간 교반하여 탈단백한 다음 이를 증류수로 중성이 될 때까지 수세한 후 40°C에서 열풍건조하여 실험용 chitin을 제조하였다.

##### 2. 오징어 연골 chitosan의 제조

Chitin 100 g에 40% NaOH 용액 1.6 L를 가하고 110-115°C에서 3시간 탈아세틸화한 다음 증류수로 수세한 후 열풍건조하여 chitosan을 제조하였다.

##### 3. 게갑각 chitin의 제조

게갑각에 붙어있는 오물을 제거하고, 수세한 후 열풍건조기로 수분을 제거한 후 20 mesh 정도로 분쇄하였다. 분쇄한 원료갑각에 2N HCl 용액을 원료갑각 중량의 10배 가하여 상온에서 3시간 동안 교반하면서 회분을 제거하고 수세 후 1N NaOH 용액을 100°C에서 3시간 반응시켜 단백질을 제거한 후 수세한 액의 pH가 중성이 될 때까지 수회 수세한 다음 50°C에서 열풍건조하여 chitin을 조제하였다.

##### 4. 게갑각 chitosan의 제조

Chitin을 20 mesh 정도로 분쇄한 후 분쇄한 chitin에 47% NaOH를 사용하여 130°C에서 가열시간에 따른 영향을 알아보기 위해 가열시간을 1시간, 2시간, 3시간으로 달리 한 후 중성이 될 때까지 수세하여 50°C에서 건조하여 잘게 분쇄하여 실험에 사용하였다.

##### 5. 일반성분의 분석

AOAC (1990)에 따라 수분은 상압가열건조법으로, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법으로 측정하였다. 그리고 회분은 건식회화법에 따라 측정하였다.

#### 6. Chitin 및 chitosan의 IR spectrum 측정 및 탈아세틸화도 측정

기존의 chitin 및 chitosan의 탈아세틸화도 측정방법으로는 chitin 및 chitosan을 200 mesh로 분쇄한 후 KBr 분말 (200 mesh) 100 mg을 정평하여 standard pellet으로 만들고 이 KBr 분말 100 mg에 각각의 시료분말 2 mg을 취하여 vibration mill에서 10분간 완전히 혼합한 후 시료 pellet을 만들어 FT-IR (Spectrum GX, Perkin Elmer, USA)로 4,000  $\text{cm}^{-1}$  - 500  $\text{cm}^{-1}$  영역에서 측정하였다. 탈아세틸화도의 계산 방법은 Sannan 등 (1978)의 방법에 따라 IR spectrum을 측정하여 2,878  $\text{cm}^{-1}$ 과 1,550  $\text{cm}^{-1}$ 에서의 흡광도비 (A1550/A2878)를 구한 다음 검량선을 이용하여 탈아세틸화도를 계산하였다 (Fig. 1).

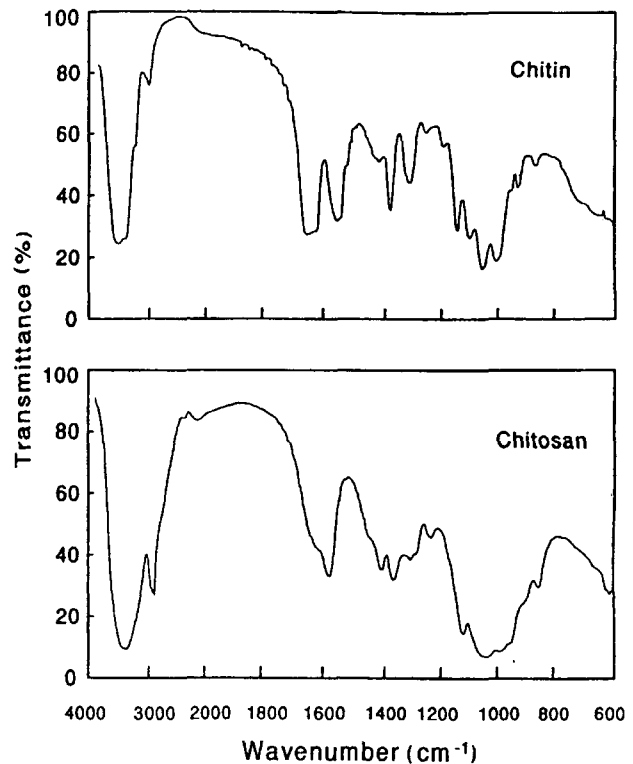


Fig. 1. Typical infrared spectra of chitin and chitosan.

#### 7. Chitin 및 chitosan의 근적외선 분광분석

Chitin의 탈단백 확인 및 chitosan의 탈아세틸화도 측정을 위하여 시료를 powder 형태로 분쇄한 후 근적외선 분광분석용 Standard sample cup에 담아서 퓨리에변환근적외선 분광분석기 (Spectrum GX, Perkin Elmer, USA)를 사용하였다. 각 시료의 스펙트럼은 1100-2400 nm 영역의 파장영역에서 absorbance mode로 매 2 nm 간격으로 총 64회 시료를 scan하여 측정하였다.

#### 8. 근적외선 분광분석의 통계적 처리

NIR 데이터 (estimated value)와 실험실 데이터 (actual value)간의 통계적 분석은 근적외선 분광분석용 소프트웨어인 PCR PLUS (Perkin Elmer, USA)를 사용하였으며 통계 처리를 위해 검량식 작성용 시료군과 검증용 시료군으로 나누어서 실험하여 통계처리하였다.

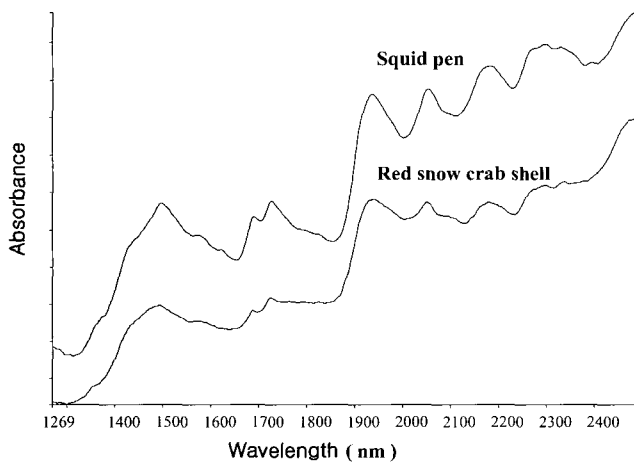
**결과 및 고찰**

**오징어 연골과 게갑각의 근적외선 분광분석**

Chitin의 원료가 되는 게 갑각과 오징어 연골 그리고 chitin의 일반성분 분석결과 Table 1에 나타내었다. 오징어 연골과 게 갑각을 분말 형태로 분쇄한 다음 근적외선 분광분석기로 1100 nm-2500 nm의 측정범위에서 매 2 nm 간격으로 64회 scan하여 근적외선 스펙트럼을 측정 한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 결과와 같이 1500 nm, 2180 nm 영역에서 게 갑각보다 오징어 연골의 peak가 높게 나타났다. 이들 peak의 파장 영역은 단백질 중의 N-H 결합에 의한 흡수 파장대로서 오징어 연골의 경우 게 갑각보다 단백질 함량이 높아 해당 peak가 크게 나타난 것으로 생각된다. Robertson et al. (1989)에 의하면 1200 nm, 1510 nm, 2050 nm, 2180 nm의 근적외선 대역에서 전형적인 단백질 peak가 나타난다고 보고되어 있다.

**Table 1.** Proximate compositions of dried red snow crab shell, squid pen and their crab (Dry basis,%)

Components	Raw material		Chitin	
	Red snow crab shell	Squid pen	Red snow crab shell	Squid pen
Yield	100	100	22.3	36.1
Moisture	9.4	5.6	8.1	3.7
Nitrogen	8.3	12.1	6.76	8.1
Crude ash	46.2	0.8	0.3	0.4

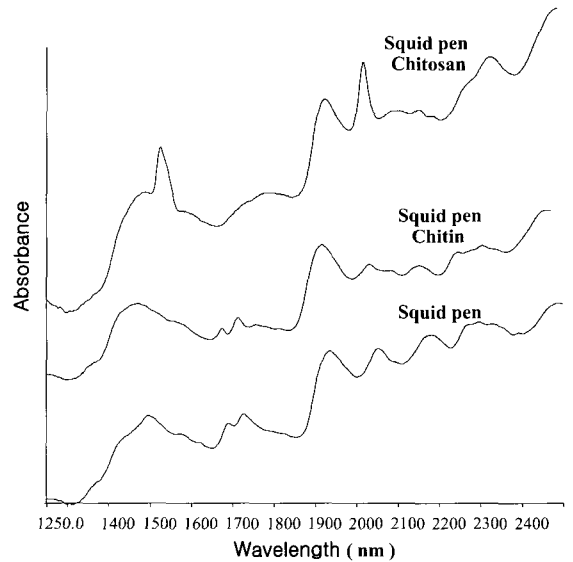


**Fig. 2.** Near-infrared spectra of red snow crab shell and squid pen.

**Chitin 및 chitosan의 근적외선 분광분석**

**1. 오징어 연골, 오징어 연골 chitin 및 chitosan의 비교**

오징어 연골과 오징어 연골로부터 제조한 chitin의 근적외선 스펙트럼은 Fig. 3에 나타내었다. 오징어 연골과 오징어 연골 chitin의 스펙트럼을 살펴보면 1500 nm와 2180 nm 부근에서의 흡광도 차이가 나타남을 알 수 있었다. 이들 두 영역은 단백질 중의 N-H기에 의한 흡수 peak로서 오징어 연골의 peak가 오징어 연골 chitin에 비해 높은 흡광도를 나타내고 있다. 일반적으로 chitin의 제조시 탈단백 과정에 의해 원료보다 chitin의 단백질 함량이 감소하게 되는데 오징어 연골과 오징어 연골 chitin의 경우에도 탈단백 과정을 거침으로써 오징어 연골 chitin에는 단백질의 N-H기에 의한 peak가 나타나지 않게 되는 것이라 생각된다.



**Fig. 3.** Near-infrared spectra of squid pen and its chitin and chitosan

반면 1930 nm 영역에서는 오징어 연골 chitin의 peak가 오징어 연골보다 높게 나타나고 있는데 이 영역은 O-H기의 흡수 파장대로서 탈단백 과정을 거치면서 chitin 사슬의 O-H기가 오징어 연골에서 보다 많이 노출되어 오징어 연골에 비해 오징어 연골 chitin에서 높게 나타나는 것으로 생각된다.

결과적으로 근적외선 분광분석을 통해 오징어 연골 chitin 제조시 탈단백 과정에 따른 단백질의 제거를 확인할 수 있는 것으로 판단되었다.

오징어 연골을 이용하여 제조한 chitin과 chitosan의 근적외선 spectrum의 결과를 살펴보면 chitosan의 스펙트럼에서 1530 nm와 2030 nm 영역에서 amide기에 의한 흡수 peak가 나타남을 확인할 수 있었다.

Chitin 및 chitosan의 근적외선 스펙트럼을 2차 미분하여 Fig. 4에 나타내었다. 근적외선 분광분석에 있어서 스펙트

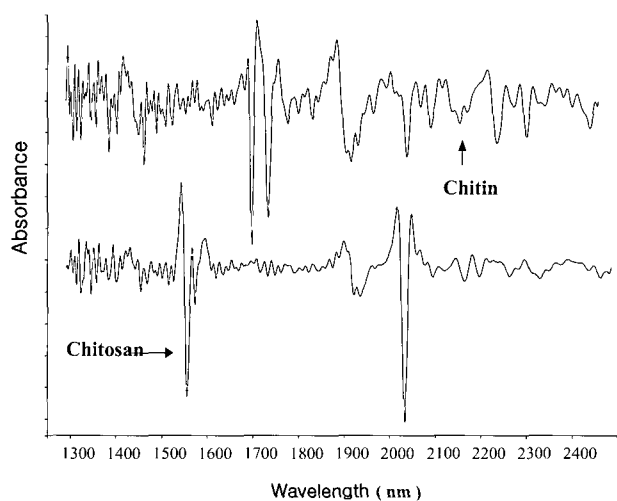


Fig. 4. Second derivative near-infrared spectra of squid pen chitin and chitosan.

럼의 미분은 스펙트럼 상에서의 peak의 변화를 좀더 강조해서 나타내는 특성을 가지고 있다. 2차 미분한 스펙트럼을 통해 chitin 및 chitosan의 peak를 살펴보면 1530 nm와 2030 nm 영역에서의 amide 흡수 peak가 좀더 명확하게 나타나고 있음을 알 수 있다.

### 2. 계감각 chitin 및 chitosan의 측정

Chitosan은 chitin에서 탈아세틸화 과정을 거쳐서 제조하게 되며 탈아세틸화 과정중 chitin에서 아세틸기가 제거됨으로 인해 amide기가 노출되게 된다. 그러므로 chitin과 chitosan의 화학적 구조가 달라지고 그 특성도 달라지게 된다. 이러한 chitin 및 chitosan의 화학적 구조 차이를 근적외선 분광분석법으로 확인할 수 있는지 여부를 알아보기 위해 계 감각 chitin과 chitosan을 Fig. 5와 같이 근적외선 분광분석법으로 측정된 결과, chitosan의 경우 chitin의 스펙트럼에 비해 상대적으로 특이적인 peak가 두 영역에서 나타나고 있는데 1530 nm와 2030 nm 영역의 peak가 그것이다. 이는 amide II의 주요 흡수 영역으로 chitosan에서는 NH<sub>2</sub>에 의한 peak로 보여진다. Chitin의 경우 amide기에 의한 peak가 거의 나타나지 않는데 이를 통해 chitosan 제조시 탈아세틸화 과정을 거침으로써 발생하는 chitin과 chitosan의 화학적 구조 차이를 근적외선 스펙트럼으로도 확인할 수 있음을 알 수 있었다.

원료에 따른 chitosan의 근적외선 스펙트럼 차이를 알아보기 위해 오징어 연골을 이용하여 제조한 chitosan (Fig. 3)과 계 감각을 이용하여 제조한 chitosan (Fig. 4)의 근적외선 spectrum을 측정된 결과 두 chitosan의 스펙트럼은 동일한 형태를 나타내고 있으며 공통적으로 1530 nm와 2030 nm 영역에서 amide기에 의한 흡수 peak가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 근적외선 분광분석법을 이용

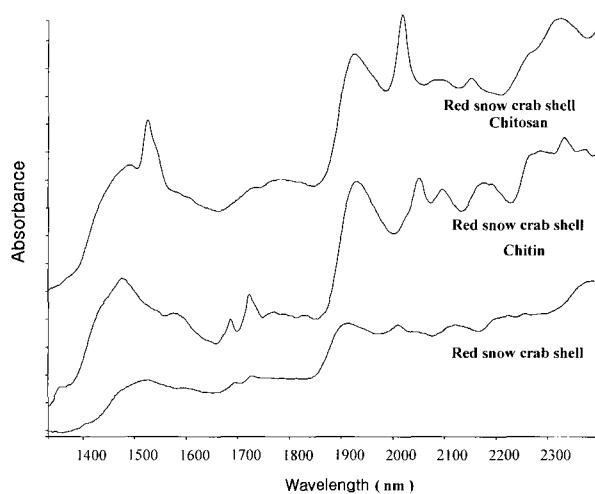


Fig. 5. Near-infrared spectra of red snow crab shell and its chitin and chitosan

한 chitosan 원료의 판별은 어려울 것으로 보여지며, 근적외선 분광분석법을 이용한 chitosan의 분석시 1530 nm와 2030 nm에서 나타나는 amide기의 흡수 peak가 중요할 것으로 여겨진다.

### 3. 근적외선 분광분석법에 의한 chitosan의 탈아세틸화도 측정

Chitosan의 새로운 탈아세틸화도 측정방법으로서 근적외선 분광분석법의 이용을 검토하기 위하여 본 연구에서는 chitosan의 근적외선 스펙트럼 (Fig. 6)을 측정된 후 1530 nm 영역의 amide peak 면적과 1930 nm 영역의 O-H peak 면적간의 비로부터 chitosan의 탈아세틸화도를 계산하였다.

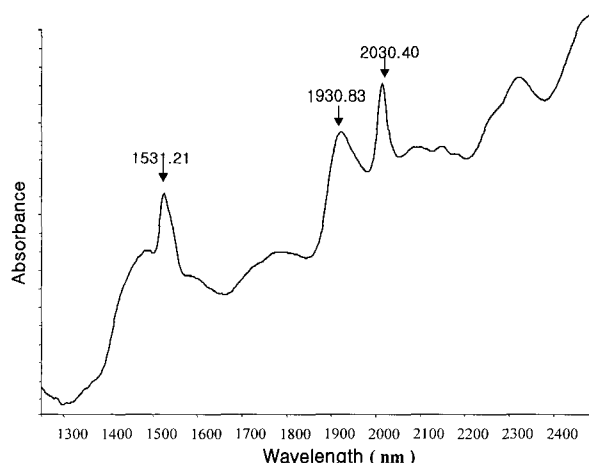


Fig. 6. Near-infrared spectra of typical chitosan.

Fig. 7은 계감각을 처리시간을 달리하여 탈아세틸화 시킨후 제조한 키토산의 근적외선 스펙트럼으로서 가열처리 시간이 증가할수록 스펙트럼상의 amide기 흡수 peak도 증가하는 경향을 나타내었다. 이 시료를 기존의 IR을 이용한

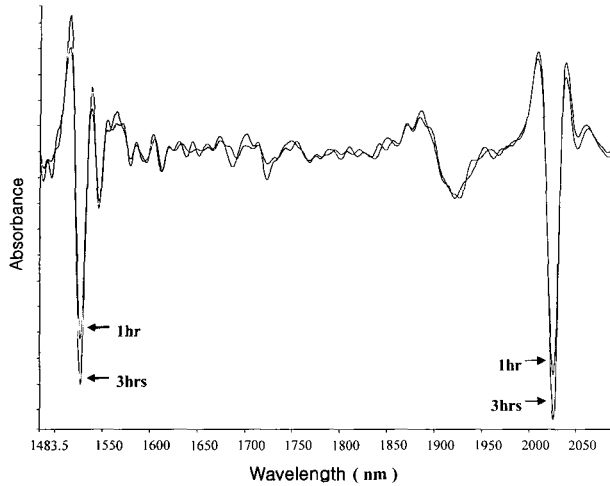


Fig. 7. Second derivative near-infrared spectra of chitosans prepared from red snow crab shell chitin by 47% sodium hydroxide solution as different incubation times at 130°C.

chitosan 탈아세틸화도 측정방법인 Sannan (1978)의 방법으로 측정된 탈아세틸화도는 1시간 가열처리한 경우 70%, 2시간 가열처리한 경우 85% 그리고 3시간 가열처리한 경우 92%로 나타나 가열처리시간이 길어질수록 탈아세틸화도도 증가하는 경향을 나타내었다. 각각 다른 탈아세틸화도를 가진 chitosan의 근적외선 스펙트럼을 2차 미분한 결과에서는 2030 nm 영역의 amide peak가 가열시간이 1시간에서 3시간으로 증가함에 따라 증가하고 있음이 뚜렷하게 나타났다. 그리고 탈아세틸화도 증가에 따른 amide기 peak 면적 변화를 측정된 결과 탈아세틸화도가 70%일 때 amide기 peak의 면적증가는 0.3567-0.3896, 85%일 때 0.4289-0.4454, 92%일 때 0.4672-0.4782로써 탈아세틸화도가 높아질수록 상대적으로 peak의 면적도 일정하게 증가함을 나타내었다. 이를 통해 근적외선 스펙트럼상에서 탈아세틸화도가 다른 chitosan의 경우 탈아세틸화도가 높아질수록 amide기에 의한 peak 면적이 정량적으로 증가함을 알 수 있었으며, 이러한 결과를 이용하여 chitosan의 탈아세틸화도를 근적외선 분광분석법으로 측정할 수 있을 것으로 판단되었다. 기존의 IR을 이용한 탈아세틸화도 측정방법으로 측정된 chitosan의 탈아세틸화도와 근적외선 분광분석법으로 구한 탈아세틸화도의 상관관계를 나타낸 결과는 Fig. 8에 나타내었다. 두 방법간의 상관성을 알아본 결과 다중상관계수 (multiple correlation coefficient, R)가 0.9952로 매우 높게 나타났으며 이때 검량식 상에서의 예측표준오차 (standard error of prediction: SEP)는 1.204 로써 매우 낮은 오차를 나타내었으며 실행표준오차 (standard error of estimate: SEE)는 1.022로써 매우 낮게 나타났다.

탈아세틸화도가 다른 chitosan의 근적외선 스펙트럼에서 amide peak의 흡광도비를 이용한 탈아세틸화도 측정을 위

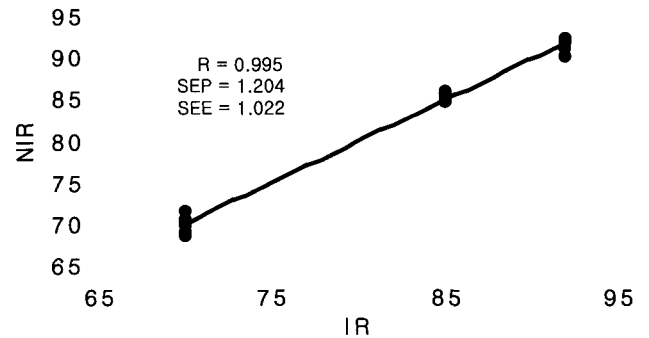


Fig. 8. Relationship of the degree of deacetylation values of chitosan prepared from red snow crab shell chitin measured by NIR and IR method.

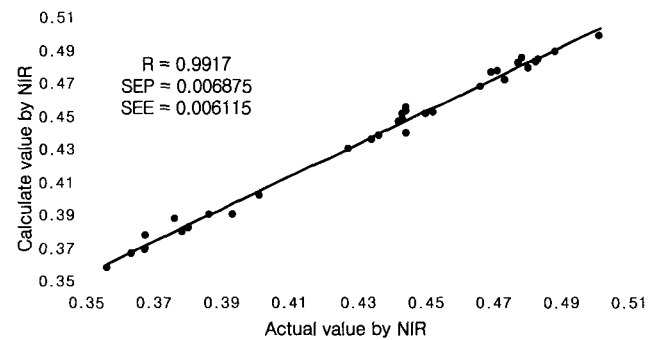


Fig. 9. Relationship between calculated degree of deacetylation and actual degree of deacetylation of chitosan by NIR.

Table 2. Degree of deacetylation valued of chitosan by IR and NIR spectra

IR	NIR	Difference	NIR spectrum area
70	69.29	0.71	0.3660
	69.96	0.04	0.3753
	70.17	-0.17	0.3794
	67.97	2.03	0.3567
	69.36	0.64	0.3607
	69.91	0.09	0.3896
	70.78	-0.78	0.3896
85	84.35	0.65	0.4289
	87.20	-2.20	0.4454
	85.04	-0.40	0.4369
	85.29	-0.29	0.4387
	86.09	-1.09	0.4387
92	91.68	0.32	0.4760
	90.93	1.17	0.4754
	90.86	1.14	0.4782
	91.37	0.63	0.4709
	91.06	0.94	0.4672

한 검량식에서 상관계수 R은 0.9917로써 높은 상관성을 나타내고 있으며 이때의 예측표준오차 (SEP)는 0.0069, 실행표준오차 (SEE)는 0.0061로써 매우 낮은 오차를 보이고 있다 (Fig. 9). 이를 통해 근적외선 분광분석법을 이용한

chitosan의 탈아세틸화도 측정법이 기존의 탈아세틸화도 측정법에 비해 상대적으로 그 측정 오차가 낮음을 알 수 있었으며, 근적외선 분광분석법을 이용한 탈아세틸화도 측정에 있어서 흡광도비를 이용한 탈아세틸화도 측정법이 상대적으로 더 정확한 결과를 얻을 수 있는 것으로 보여진다. 위에서 구한 검량식으로부터 미지 chitosan의 탈아세틸화도를 측정된 결과는 Table 2에 나타내었다. 미지시료를 측정된 결과 오차율이 2% 이하로 매우 정확한 측정결과를 나타내었다.

이상과 같은 결과를 살펴볼 때 근적외선 분광분석법을 이용한 chitosan의 탈아세틸화도 측정방법은 기존의 IR을 이용한 탈아세틸화도 측정방법에 비해 결과의 정확성이 높고, 측정방법도 매우 간단하므로 앞으로 유용하게 이용될 수 있는 분석방법이라 여겨진다.

### 감사의 글

본연구는 경남대학교 생명과학부 연구비의 지원에 의하여 수행된 연구과제의 일부로서 지원에 감사드립니다.

### 참고 문헌

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, 17, 868, 931, 932.
- Baik, U.D. 1995. Preparation and rheological properties of chitin and chitosan 1. Effect of preparation condition on the degree of deacetylation and the molecular weight of chitosan J. Kor. Fish Soc. 28, 392-396.
- Domszy, J.G. and G.A.F. Roberts. 1985. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. Makromol. Chem., 186, 1671-1677.
- Dull, G.G. 1978. Nondestructive quality evaluation of agricultural products. J. Food Prot., 4, 50-58.
- Hirano, S., Y. Ohe and H. Ono. 1976. Selective N-acylation of chitosan. Car. Res., 47, 315-320.
- Kim, S.K. and E.H. Lee. 1997. Food industrial applications of chitin and chitosan. Kor. J. Chitin and chitosan, 2(4), 43-59.
- Kurita, K., S. Chikaoka, M. Kamiya and Y. Koyama 1988. Studies on chitin 14. N-acetylation behavior of chitosan with acetyl chloride and acetic anhydride in a highly swelled state. Bull. Chem. Soc. Jap., 61, 927-930.
- Kurita, K., S. Ishii, K. Tomita, S.I. Nishimura and K. Shimoda. 1994. Reactivity characteristics of squid  $\beta$ -chitin as compared with those of shrimp chitin : High potentials of squid chitin as a starting material for facile chemical modifications. J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem., 32, 1027-1032.
- Lanza, E. 1983. Determination of moisture, protein, fat and calories in raw pork and beef by near infrared spectroscopy. J. Food Sci., 48, 471-474.
- Norris, K.H. and I. Ben-Gera. 1968. Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meat products. J. Food Sci., 33, 64-67.
- 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.

2003년 1월 20일 접수

2003년 4월 19일 수리