



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0172324
(43) 공개일자 2023년12월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 21/06 (2006.01) C08B 37/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12P 21/06 (2013.01)

C08B 37/003 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0073053

(22) 출원일자 2022년06월15일

심사청구일자 2022년06월15일

(71) 출원인

대한민국(농촌진흥청장)

전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

황재삼

전라북도 완주군 이서면 농생명로 166

김인우

전라북도 완주군 이서면 농생명로 166

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순용

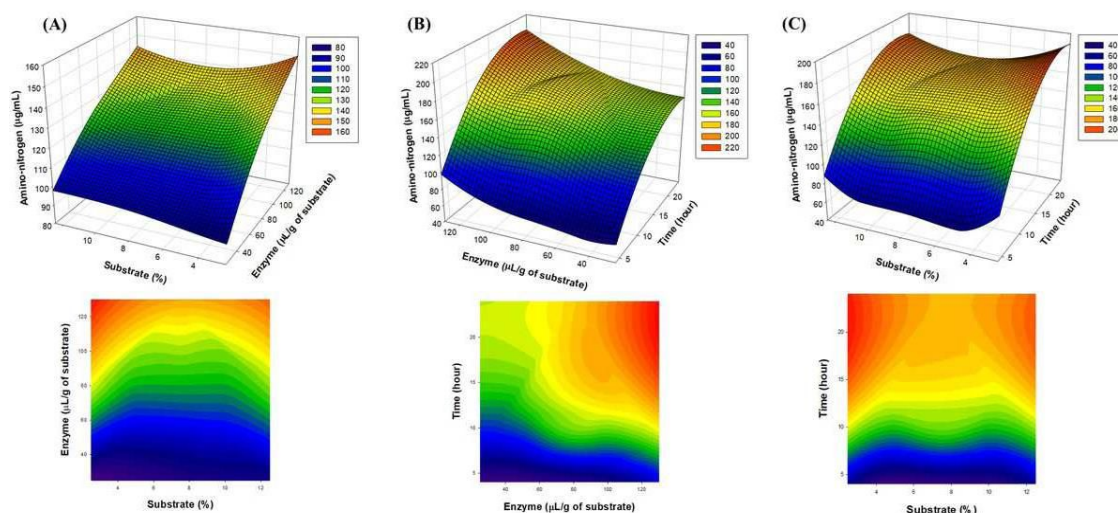
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 갈색거저리로부터 키틴 및 키토산을 제조하는 방법

(57) 요약

본 발명은 단백질 분해효소를 이용하여 갈색거저리로부터 키틴 및 키토산을 제조할 수 있는 방법에 관한 것으로, 본 발명은 더 나아가 고품질의 키틴 및 키토산을 효율적으로 제조하기 위한 최적화된 조건을 도출한 바, 본 발명의 조건에 따라 제조한 키틴 및 키토산은 상업적으로 사용되는 키틴 및 키토산과 유사한 작용기, 열적 안정성 및 조단백질 함량을 보인 바, 본 발명의 제조 방법을 통해 다양한 용도로 유용하게 활용할 수 있는 고품질의 키틴 및 키토산을 제공할 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Y 304/00 (2013.01)

(72) 발명자

최라영

전라북도 완주군 이서면 농생명로 166

한성희

서울특별시 성북구 고려대로 73 의과대학 본관 6층
660호

서형주

서울특별시 성북구 안암로 145 하나과학관 B동 56
8호

김현경

서울특별시 성북구 안암로 145 하나과학관 B동 57
0호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395074223

과제번호 PJ015912022022

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 농업정책지원기술개발

연구과제명 갈색거저리 및 쌍별귀뚜라미를 활용한 대체 단백질 소재의 물리 화학적 특성 및 기
능성 구명(2공동)

기 여 율 1/1

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2021.01.01 ~ 2025.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (제 1단계) 갈색거저리와 완충 용액을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계;
- (제 2단계) 상기 혼합물에 단백질 분해 효소를 처리한 후, 반응시키는 단계;
- (제 3단계) 상기 단백질 분해 효소를 불활성화시키는 단계; 및
- (제 4단계) 상기 단백질 분해 효소가 불활성화된 혼합물로부터 키틴(Chitin)을 수득하는 단계; 를 포함하는, 갈색거저리 유래 키틴 제조 방법.

청구항 2

- 제 1항에 있어서,
- 상기 갈색거저리는 갈색거저리 유충인 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 3

- 제 1항에 있어서,
- 상기 제 1단계에서 갈색거저리는 완충 용액에 대하여 7 내지 9 %(w/v)로 포함되는 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 4

- 제 1항에 있어서,
- 상기 단백질 분해 효소는 알칼라아제(Alcalase)인 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 5

- 제 1항에 있어서,
- 상기 제 2단계에서 단백질 분해 효소는 50 내지 100 $\mu\text{L/g}$ 로 처리되는 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 6

- 제 1항에 있어서,
- 상기 제 2단계의 상기 반응은 40 내지 60 $^{\circ}\text{C}$ 로 12 내지 36시간 수행하는 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 7

- 제 1항에 있어서,

상기 제 2단계의 상기 반응은 100 내지 200 rpm으로 수행하는 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 8

- (제 1단계) 갈색거저리와 완충 용액을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계;
- (제 2단계) 상기 혼합물에 단백질 분해 효소를 처리한 후, 반응시키는 단계;
- (제 3단계) 상기 단백질 분해 효소를 불활성화시키는 단계;
- (제 4단계) 상기 단백질 분해 효소가 불활성화된 혼합물로부터 키틴(Chitin)을 수득하는 단계;
- (제 5단계) 상기 키틴을 탈아세틸화시켜 키토산(Chitosan)을 수득하는 단계;
- (제 6단계) 상기 탈아세틸화된 키토산을 중성화시키는 단계; 및
- (제 7단계) 상기 중성화된 키토산을 수득하는 단계;를 포함하는, 갈색거저리 유래 키토산 제조 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,
상기 제 5단계의 탈아세틸화는 키틴에 수산화나트륨 수용액을 처리하여 수행하는 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,
상기 수산화나트륨 수용액은 키틴에 대하여 1 : 5 내지 20 %(w/v)로 처리하는 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 11

제 8항에 있어서,
상기 제 5단계의 탈아세틸화는 60 내지 120℃로 4 내지 12시간 수행하는 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 12

- (제 1단계) 7.5 %(w/v)의 갈색거저리 유충과 완충 용액을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계;
- (제 2단계) 상기 혼합물에 80 μ L/g의 알칼라아제를 처리한 후, 50℃, 130rpm으로 24시간동안 반응시키는 단계;
- (제 3단계) 상기 단백질 분해 효소를 불활성화시키는 단계; 및
- (제 4단계) 상기 단백질 분해 효소가 불활성화된 혼합물로부터 키틴을 수득하는 단계;를 포함하는, 갈색거저리 유래 키틴 제조 방법.

청구항 13

- (제 1단계) 7.5 %(w/v)의 갈색거저리 유충과 완충 용액을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계;
- (제 2단계) 상기 혼합물에 80 μ L/g의 알칼라아제를 처리한 후, 50℃, 130rpm으로 24시간동안 반응시키는 단계;
- (제 3단계) 상기 단백질 분해 효소를 불활성화시키는 단계;

(제 4단계) 상기 단백질을 분해 효소가 불활성화된 혼합물로부터 키틴을 수득하는 단계;

(제 5단계) 상기 키틴에 대하여 수산화나트륨 수용액을 1 : 10 w/v(%)로 처리한 후 90℃로 9시간동안 탈아세틸화시켜 키토산(Chitosan)을 수득하는 단계;

(제 6단계) 상기 탈아세틸화된 키토산을 중성화시키는 단계; 및

(제 7단계) 상기 중성화된 키토산을 수득하는 단계;를 포함하는, 갈색거저리 유래 키토산 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고품질의 키틴 및 키토산을 수득할 수 있는, 갈색거저리로부터 키틴 및 키토산을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 키틴은 게, 가재 또는 새우 등의 갑각류 및 균류나 조류 등의 고등 식물 세포벽에 존재하는 천연 고분자 물질로 셀룰로오스 다음으로 풍부한 자원이다. 키토산은 키틴을 탈 아세틸화하여 제조되는 물질로 탈 아세틸의 정도에 따라 물에 잘 용해되지 않으나 저농도의 산성 용액에 용해되는 특성을 보이는 물질로 알려지고 있다.

[0004] 키틴과 키토산은 무독성, 환경친화성 및 생체 적합성이 우수하여 여러 의료용 분야에 많이 활용되고 있고, 최근에는 농산물 생산에 친환경 물질로 병충해 예방과 항생물질로서의 사용뿐만 아니라 성장 촉진 및 증산 등의 이유로 농업분야에 새로운 총아로 부각되고 있다. 이에 힘입어 식품 및 약품 분야에서도 그 활용도가 크게 넓어지고 있다. 또한 친환경 필름(film)을 위시하여 새로운 공산품에도 그리고 중합체 단백질 혹은 중금속 등과 결합 침전하여 오염을 줄이는 등의 다각적인 방면에 활용이 넓어지고 있는 물질로 향후 수요가 폭발적으로 증대되는 신소재다.

[0005] 종래에는 강산을 사용하여 갑각류의 껍질에서 키틴을 제조함으로써 비교적 저렴한 비용으로 생산하였다. 키틴의 제조방법에 관한 선행특허로는, 등록특허 제0118747호 "키틴과 키토산의 수용성 유도체를 제조하는 방법"에서 산과 알칼리 수용액을 반복 처리함으로써 키틴을 얻는 방법을 개시한 바 있고, 등록특허 제0141083호 "미세키틴의 제조방법"에서는 염산을 가하고, 과산화수소 존재 하에 초음파를 조사함으로써 미세 키틴을 얻는 방법을 개시한 바 있으며, 등록특허 제0122542호 "생체 임상의학용 키틴 및 키토산 제조방법"에서는 -10~10℃에서 10~25 시간 및 10~20℃에서 2~8시간 동안 염산 처리한 후 수세, 여과, 용매 처리 및 건조하고, 이어서 NaOH 수용액으로 처리하여 게 갑각으로부터 키틴을 얻는 방법을 개시한 바 있다.

[0006] 이렇듯 종래에는 게나 새우 등의 갑각류로부터 키틴을 제조시 탈회공정상에서 염산(HCl)을 주로 사용하였으며 그 외 질산(HNO₃), 황산(H₂SO₄), 초산(CH₃COOH), 개미산(HCOOH) 등도 사용하였다. 키틴의 제조공정에서 사용되는 이러한 무기산 또는 유기산의 이용은 생산 비용을 저감해준다는 장점이 있지만 염산이나 가성소다 등으로 처리하는 시설이 필요하며, 이를 중화하여 염을 제거할 때 필연적인 흡습이 발생하는 문제가 있다.

[0007] 때문에 환경오염이 없으면서도 효율성을 높인 키틴 및 키토산의 제조 방법이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 키틴 및 키토산을 친환경적인 방법으로 제조하기 위하여 연구하던 중, 갈색거저리에 대한 최적의 단백질 분해효소 및 최적의 조건을 도출하고, 이를 통해 수득한 키틴 및 키토산의 품질을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 갈색거저리 유래 키틴 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 갈색거저리 유래 키토산 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (제 1단계) 갈색거저리와 완충 용액을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; (제 2단계) 상기 혼합물에 단백질 분해 효소를 처리한 후, 반응시키는 단계; (제 3단계) 상기 단백질 분해 효소를 불활성화시키는 단계; 및 (제 4단계) 상기 단백질 분해 효소가 불활성화된 혼합물로부터 키틴(Chitin)을 수득하는 단계;를 포함하는, 갈색거저리 유래 키틴 제조 방법을 제공한다.

[0014] 더불어 본 발명은 (제 1단계) 7.5 % (w/v)의 갈색거저리 유충과 완충 용액을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; (제 2단계) 상기 혼합물에 80 μ L/g의 알칼라아제를 처리한 후, 50℃, 130 rpm으로 24시간동안 반응시키는 단계; (제 3단계) 상기 단백질 분해 효소를 불활성화시키는 단계; 및 (제 4단계) 상기 단백질 분해 효소가 불활성화된 혼합물로부터 키틴을 수득하는 단계;를 포함하는, 갈색거저리 유래 키틴 제조 방법을 제공한다.

[0015] 또한 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (제 1단계) 갈색거저리와 완충 용액을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; (제 2단계) 상기 혼합물에 단백질 분해 효소를 처리한 후, 반응시키는 단계; (제 3단계) 상기 단백질 분해 효소를 불활성화시키는 단계; (제 4단계) 상기 단백질 분해 효소가 불활성화된 혼합물로부터 키틴(Chitin)을 수득하는 단계; (제 5단계) 상기 키틴을 탈아세틸화시켜 키토산(Chitosan)을 수득하는 단계; (제 6단계) 상기 탈아세틸화된 키토산을 중성화시키는 단계; 및 (제 7단계) 상기 중성화된 키토산을 수득하는 단계;를 포함하는, 갈색거저리 유래 키토산 제조 방법을 제공한다.

[0016] 더불어 본 발명은 (제 1단계) 7.5 % (w/v)의 갈색거저리 유충과 완충 용액을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; (제 2단계) 상기 혼합물에 80 μ L/g의 알칼라아제를 처리한 후, 50℃, 130 rpm으로 24시간동안 반응시키는 단계; (제 3단계) 상기 단백질 분해 효소를 불활성화시키는 단계; (제 4단계) 상기 단백질 분해 효소가 불활성화된 혼합물로부터 키틴을 수득하는 단계; (제 5단계) 상기 키틴에 대하여 수산화나트륨 수용액을 1 : 10 w/v(%)로 처리한 후 90℃로 9시간동안 탈아세틸화시켜 키토산(Chitosan)을 수득하는 단계; (제 6단계) 상기 탈아세틸화된 키토산을 중성화시키는 단계; 및 (제 7단계) 상기 중성화된 키토산을 수득하는 단계;를 포함하는, 갈색거저리 유래 키토산 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 갈색거저리로부터 키틴 및 키토산을 제조하기 위하여 최적의 단백질 분해효소 및 조건을 도출한 것으로, 단백질 분해효소인 알칼라아제(Alcalase) 및 최적 조건을 통해 갈색거저리 유충으로부터 제조한 키틴 및 키토산의 경우, 상업적으로 이용되는 키틴 및 키토산과 유사한 작용기, 열적 안정성 및 조단백질 함량을 보인 바, 본 발명에 따른 효소 및 최적 조건을 활용한 갈색거저리 유래 키틴 및/또는 키토산 제조 방법은 고품질의 키틴 및 키토산을 효율적으로 생산할 수 있는 방법이다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 가수분해시 시간에 따른 제단백질율(Degree of deproteinization, DP)의 변화를 확인한 결과로, 도 1(A)는 갈색거저리 유충에 대한 결과이고, 도 1(B)는 갈색거저리 탈각(ecdysis)에 대한 결과이다.

도 2는 반응 최적 조건에 대한 RSM(Response surface methodology) 분석의 3D 그래프로, 도 2(A)는 기질(substrate)(%), 효소(기질의 μ L/g) 및 아미노질산(amino-nitrogen)(μ g/mL)에 대한 결과이고, 도 2(B)는 효소(기질의 μ L/g), 시간(hour) 및 아미노질산(μ g/mL)에 대한 결과이며, 도 2(C)는 기질(%), 시간(hour) 및 아미노질산(μ g/mL)에 대한 결과이다.

도 3은 FT-IR(Fourier transform infrared spectroscopy) 스펙트럼(spectra)을 나타낸 결과로, 도 3(A)는 상업용 키틴 및 키토산의 스펙트럼을 나타내며, 도 3(B)는 갈색거저리 유충 유래 키틴 및 키토산의 스펙트럼을 나타낸다. 상기 도 3에 있어서, 1600-1680 cm^{-1} 영역의 스펙트럼은 C=O 결합 스트레치를 의미한다.

도 4는 DSC(Differential scanning calorimetry) 커브(curve) 결과로, 도 4(A)는 상업적 키틴에 대한

결과이고, 도 4(B)는 갈색거저리 유충 유래 키틴에 대한 결과이다.

도 5는 DSC 커브 결과로, 도 5(A)는 상업적 키틴산에 대한 결과이고, 도 5(B)는 갈색거저리 유충 유래 키틴산에 대한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0022] 본 발명은 갈색거저리로부터 친환경적인 방법으로 고품질의 키틴 및/또는 키틴산을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0023] 따라서 본 발명은 (제 1단계) 갈색거저리와 완충 용액을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; (제 2단계) 상기 혼합물에 단백질을 분해 효소를 처리한 후, 반응시키는 단계; (제 3단계) 상기 단백질 분해 효소를 불활성화시키는 단계; 및 (제 4단계) 상기 단백질 분해 효소가 불활성화된 혼합물로부터 키틴(Chitin)을 수득하는 단계; 를 포함하는, 갈색거저리 유래 키틴 제조 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 갈색거저리는 흑적색의 몸길이 14~15mm의 딱정벌레목 거저리과(mealworm beetle)에 속하는 곤충을 의미한다. 상기 갈색거저리는 2014년 한시적 식품원료로 허용되었으며, 환자 영양식 등 다양한 시제품과 요리 레시피가 개발되고 있는 중이다. 벨기에에서도 2013년 식품원료로 등재되었다. 더불어 사육동물의 사료로서도 사용되고 있다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 갈색거저리는 갈색거저리 알, 갈색거저리 유충, 갈색거저리 번데기, 갈색거저리 성체 및 탈각으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다. 바람직하게는 갈색거저리 유충 또는 탈각일 수 있으며, 보다 바람직하게는 갈색거저리 유충일 수 있다.
- [0026] 더불어 상기 갈색거저리는 갈색거저리 자체를 그대로 사용할 수 있고, 이를 공지의 방법을 통해 분말화하여 사용할 수 있다.
- [0027] 한편, 본 발명의 제조 방법은 RSM(Response surface methodology) 분석을 통하여 최적의 기질 농도, 효소 농도 및 반응시간 조건을 도출한 것을 특징으로 한다.
- [0028] 따라서 상기 1단계에 있어서, 갈색거저리는 완충 용액에 대하여 7 내지 9 %(w/v)로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 7 내지 8 %(w/v)로 포함될 수 있고, 보다 바람직하게는 7.5 %(w/v)로 포함될 수 있다.
- [0029] 더불어 상기 단백질 분해 효소는 알칼라아제(Alcalase)인 것을 특징으로 한다.
- [0030] 또한 본 발명에 있어서, 상기 완충 용액은 pH의 변화를 억제할 수 있는 것으로 공지된 용액이라면 어떤 것이든 사용할 수 있으며, 그 예로 인산 완충액(phosphate buffer), 식용 초산의 희석액 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서는 인산 완충액(phosphate buffer)을 사용하였다.
- [0031] 본 발명의 일실시예에 따르면, 갈색거저리 유충을 상기 알칼라아제로 가수분해한 경우, 아미노질소 농도 및 제 단백질율이 가장 높음을 확인하였다.
- [0032] 따라서 본 발명의 제조 방법에 있어서, 갈색거저리 유충을 사용하며, 단백질 분해 효소로 알칼라아제를 사용하는 것이 가장 바람직하다.
- [0033] 더불어 상기 단백질 분해 효소는 50 내지 100 μ L/g로 처리될 수 있으며, 바람직하게는 60 내지 90 μ L/g로 처리될 수 있고, 보다 바람직하게는 80 μ L/g로 처리될 수 있다.
- [0034] 상기 2 단계에 있어서, 상기 반응은 40 내지 60 $^{\circ}$ C로 12 내지 36시간 수행될 수 있다. 바람직하게는 45 내지 55 $^{\circ}$ C로 12 내지 24시간 수행될 수 있으며, 보다 바람직하게는 50 $^{\circ}$ C로 24시간 수행될 수 있다.
- [0035] 더불어 상기 2 단계에 있어서, 상기 반응은 100 내지 200 rpm으로 수행될 수 있다. 바람직하게는 100 내지 150 rpm으로 수행될 수 있으며, 보다 바람직하게는 130 rpm으로 수행될 수 있다.
- [0036] 또한 본 발명은 (제 1단계) 갈색거저리와 완충 용액을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; (제 2단계) 상기 혼합물에 단백질을 분해 효소를 처리한 후, 반응시키는 단계; (제 3단계) 상기 단백질 분해 효소를 불활성화시키는 단계; (제 4단계) 상기 단백질 분해 효소가 불활성화된 혼합물로부터 키틴(Chitin)을 수득하는 단계; (제 5단계) 상기 키틴을 탈아세틸화시켜 키틴산(Chitosan)을 수득하는 단계; (제 6단계) 상기 탈아세틸화된 키틴산을 중성화시키는 단계; 및 (제 7단계) 상기 중성화된 키틴산을 수득하는 단계;를 포함하는, 갈색거저리 유래 키틴산 제조 방법을 제공한다.

- [0037] 키틴에 알칼리 용액을 가하고 열을 가하면, 키틴을 구성하는 모노머인 N-아세틸-D-글루코사민의 아세틸기가 떨어져 나가 D-글루코사민이 된다.
- [0038] 이와 같이, 키틴에 알칼리 등을 사용하여 탈아세틸화하여, N-아세틸-D-글루코사민에서 아세틸기가 떨어져 나가 생성된 D-글루코사민의 비율이 70% 이상일 때 이것을 키토산(Chitosan)이라고 한다(대한민국 식품의약품안전청, 식품첨가물공정).
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 제 5단계의 탈아세틸화는 갈색거저리 유래 키틴에 수산화나트륨 수용액을 처리하여 수행할 수 있다. 상기 수산화나트륨 수용액은 이에 제한되는 것은 아니나 40% 수산화나트륨 수용액일 수 있다.
- [0040] 상기 수산화나트륨 수용액은 키틴에 대하여 1 : 5 내지 20 %(w/v)로 처리할 수 있으며, 바람직하게는 1 : 5 내지 10 %(w/v)로 처리할 수 있고, 보다 바람직하게는 1 : 10 %(w/v)로 처리할 수 있다.
- [0041] 더불어 상기 제 5단계의 탈아세틸화는 60 내지 120℃로 4 내지 12시간 수행할 수 있으며, 바람직하게는 70 내지 100℃로 6 내지 10시간 수행할 수 있고, 보다 바람직하게는 90℃로 8시간 수행할 수 있다.
- [0042] 따라서 본 발명은 도출된 최적 조건을 반영한 갈색거저리 유래 키틴 제조 방법을 제공할 수 있다.
- [0043] 즉, 본 발명은 (제 1단계) 7.5 %(w/v)의 갈색거저리 유충과 완충 용액을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; (제 2단계) 상기 혼합물에 80 μ L/g의 알칼리아제를 처리한 후, 50℃, 130 rpm으로 24시간동안 반응시키는 단계; (제 3단계) 상기 단백질 분해 효소를 불활성화시키는 단계; 및 (제 4단계) 상기 단백질 분해 효소가 불활성화된 혼합물로부터 키틴을 수득하는 단계;를 포함하는, 갈색거저리 유래 키틴 제조 방법을 제공한다.
- [0044] 더불어 본 발명은 도출된 최적 조건을 반영한 갈색거저리 유래 키틴 및 키토산으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 제조 방법을 제공할 수 있다.
- [0045] 즉, 본 발명은 (제 1단계) 7.5 %(w/v)의 갈색거저리 유충과 완충 용액을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; (제 2단계) 상기 혼합물에 80 μ L/g의 알칼리아제를 처리한 후, 50℃, 130 rpm으로 24시간동안 반응시키는 단계; (제 3단계) 상기 단백질 분해 효소를 불활성화시키는 단계; (제 4단계) 상기 단백질 분해 효소가 불활성화된 혼합물로부터 키틴을 수득하는 단계; (제 5단계) 상기 키틴에 대하여 수산화나트륨 수용액을 1 : 10 w/v(%)로 처리한 후 90℃로 9시간동안 탈아세틸화시켜 키토산(Chitosan)을 수득하는 단계; (제 6단계) 상기 탈아세틸화된 키토산을 중성화시키는 단계; 및 (제 7단계) 상기 중성화된 키토산을 수득하는 단계;를 포함하는, 갈색거저리 유래 키토산 제조 방법을 제공한다.
- [0046] 본 발명에 따라 갈색거저리 유충 유래 제조된 키틴 및/또는 키토산은 상업적으로 이용되는 키틴 및/키토산과 유사한 작용기, 열적 안정성 및 조단백질 함량을 보이는 바, 우수한 품질을 보유하고 있음을 확인하였다.
- [0047] 따라서 본 발명의 갈색거저리 유충 유래 키틴 및/또는 키토산의 제조 방법은 친환경적으로 고품질의 키틴 및/또는 키토산을 효율적으로 생산할 수 있다.
- [0049] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다.
- [0051] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.
- [0053] **실험예 1. 갈색거저리 및 효소 준비**
- [0054] **1-1. 갈색거저리 준비**
- [0055] (주) 흥농(전라북도 소재)에서 갈색거저리 유충 및 탈각을 제공받았다. 이를 각각 동결건조한 후 100 μ m로 분말화하여 실험에 사용하였다.
- [0057] **1-2. 효소 준비**
- [0058] 본 발명의 키틴 및 키토산 제조에 있어서, 5 종의 효소 중 최적의 효소를 탐색하였다. 이에 사용한 단백질 분해

효소 종류와 제조사가 제공한 이의 반응최적의 온도 및 pH를 표 1에 나타내었다. 하기 표 1에 있어서, Alcalase® 2.4L FG, Protamex® 및 Flavourzyme은 Novozyme(Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)에서 구입하였고, Multifect PR 7L 및 Collupulin MG는 (주)비전바이오켄(Vision Bio Cam, Gyeonggi-do, Republic of Korea)에서 구입하였다.

표 1

효소	주요 기능 (Main function)	반응 조건	
		최적 온도(℃)	최적 pH
Alcalase	엑소펩티다아제(Exo-Peptidase)	50	7.8
Multifect PR 7L	엔도펩티다아제(Endo-Peptidase), Exo-Peptidase	50 - 70	6.5 - 7.5
Protamex	엔도-프로테아제(Endo-Protease)	35 - 60	5.5 - 7.5
Flavourzyme	박테리아 프로테아제 (Bacterial protease)	50	5.0 - 7.0
Collupulin	플랜트 프로테아제 (Plant protease)	50 - 70	5.0 - 7.5

실험예 2. 갈색거저리 유래 키틴 및 키토산 제조

갈색거저리 유충 또는 탈각 유래의 키틴 및 키토산은 다음과 같이 제조하였다. 완충 용액(Phosphate buffer(pH 7.5))에 갈색거저리 유충 또는 탈각 분말을 혼합하여 5%(w/v) 혼합물을 제조한 후, 상기 표 1의 효소를 실험하고자 하는 농도에 맞춰 각각 첨가하였다. 그 후 표 1에 기재된 각 효소의 최적온도하에 130 rpm으로 반응시켰다. 효소 반응이 끝난 후 95℃로 15분간 유지하여 효소를 불활성화시킨 후, 4,000 rpm, 4℃로 20분간 원심분리하여 침전물(키틴)을 분리하였다. 수거한 키틴 분말을 40% NaOH 용액(1 : 10 %(w/v))과 혼합하고 90℃에서 8시간동안 탈아세틸화시킨 후, 중성(pH 7.0)이 될 때까지 증류수로 세척하였다. 이를 여과(Whatman filter paper No.1)하고 60℃로 밤새 건조하여 키토산 분말을 수득하였다.

실험예 3. 분석 방법

3-1. 제단백질율(Degree of deproteinization, DP) 측정

상기 실험예 2에 있어서, 키틴을 분리한 후 수득한 상층액을 이용하여 제단백질율(DP%)을 측정하였다. 이는 하기 수학적 식 1을 통해 산출하였다.

[수학적 식 1]

$$DP (\%) = [(L_t - L_0) / (L_{max} - L_0)] \times 100$$

상기 수학적 식 1에 있어서, L₀는 시료 자체의 α-아미노질소(α-amino-nitrogen)의 양을 나타내며, L_{max}는 단백질을 가수분해(시료에 6 N HCl를 100℃로 24시간동안 처리한 후 이의 α-아미노질소량을 측정한 값) 후의 α-아미노질소 양을 나타내고, 상기 L_t는 시간에 따른 α-아미노질소의 양을 나타낸다.

3-2. 반응표면분석법(Response surface methodology, RSM)

RSM은 특정 값을 종속변수 Y, 인자들을 독립변수(X₁, X₂ 등)로 보고 회귀방정식으로 독립변수들의 상호작용이 반응(특정 값)에 주는 영향을 수학적 또는 통계적으로 분석하여 최적화된 조건을 얻기 위해 고안된 방법이다. 본 발명에 있어서, 최적의 가수분해 조건을 결정하기 위하여 기질 농도(5, 7.5, 10, 12.5%), 효소 첨가 비율(25, 50, 80, 100 μL/g) 및 반응시간(6, 8, 12, 24 시간)의 3개의 독립변수를 설정하고, 무작위로 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 총 38회 수행하였다. 이때 종속변수는 아미노질소 농도(시료의 mg/g)로 정하였다.

3-3. FT-IR (Fourier Transform infrared spectroscopy) 측정

[0075] 갈색거저리 유충 유래 키틴, 상업적 키토산(Sigma, c9752, 3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA), 키토산(효소적 가수분해, 화학적 가수분해)(Sigma, c3646, 3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA)의 FT-IR 스펙트럼은 PerkinElmer® Spectrum™100(Waltham, MA, USA)을 이용하여 측정하였으며, UATR 기술을 사용하여 파장(wave length) 4000-380 cm^{-1} 에서 측정하였다. 각 시료 약 1 mg을 UATR 크리스탈(Crystal (Diamond)) 표면에 올리고 UATR 액세서리를 이용하여 압력이 80에 도달할 때까지 압력을 가한 후, FT-IR 스펙트럼을 측정하였다. 시료 측정 전 공기 중의 이산화탄소, 수분 등을 측정하여 백 그라운드(back ground)로 사용하였다. 측정 스펙트럼 1600-1680 cm^{-1} 파장에서 C=O 결합 피크(bond peak) 값을 비교하였으며, 1550-1650 cm^{-1} 파장에서 N-H, C=O 결합(NHCOCH₃에서의) 피크 값을 비교하였다.

[0077] 3-4. 시차주사열량분석기(Differential Scanning Calorimeter, DSC) 측정

[0078] 갈색거저리 유충 유래 키틴, 상업적 키토산(Sigma, c9752, 3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA), 키토산(효소적 가수분해, 화학적 가수분해)(Sigma, c3646, 3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA)의 DSC는 DSC Q20(TA Instruments, New Castle, USA)을 이용하여 측정하였다. T-ZERO 밀폐된 알루미늄 팬(Hermetic Aluminum pan)과 T-ZERO 밀폐된 알루미늄 리드(Hermetic Aluminum lid)를 사용하였으며, 상기 팬은 알루미늄 팬에 시료 3 mg을 넣은 후, T-ZERO 밀폐된 상부 다이(Hermetic upper die)와 T-ZERO 밀폐된 하부 다이(Hermetic lower die)로 밀폐하였다. 질소의 유속은 50 mL/min 이었고, 측정 온도는 25℃에서 10℃/min의 승온 속도로 계속해서 온도 400℃까지 상승시키며 시료의 열흐름을 측정하였다. 블랭크(Blank)는 시료가 들어있지 않은 상태에서 표준 용기의 온도 변화에 따른 열흐름을 측정한 값이다. 측정된 열흐름에서 각 시료의 발열성 피크(exothermic peak) (T_s , T_{max} , T_e) 및 에너지(ΔH), 흡열성 피크(endothermic peak) (T_s , T_{max} , T_e) 및 에너지(ΔH)를 비교하였다.

[0080] 3-5. 조단백질(Crude protein) 정량

[0081] 갈색거저리 유충 원물, 갈색거저리 유충 유래 키틴 또는 키토산의 단백질 절대량을 측정하기 위하여, 각 시료 및 상업적 키틴, 키토산(Sigma Aldrich에서 구입)의 조단백질 함량을 측정하였다. 이때 공지된 방법인 Kjeldahl 질소 정량법을 이용하여 측정하였다.

[0083] 실시예 1. 최적의 단백질 가수분해효소 선별

[0084] 갈색거저리 유충 또는 탈각을 표 1의 5 종의 효소(2% 처리)를 이용하여 상기 실험예 2와 같이 가수분해하였으며, 효소별로 반응시간에 따른 아미노질소를 측정해 하기 표 2 내지 표 4 및 도 1에 나타내었다. 효소 가수분해된 갈색거저리 유충의 아미노질소 농도(시료의 mg/g)는 표 2에 나타내었고, 효소 가수분해된 갈색거저리 탈각의 아미노질소 농도(시료의 mg/g)는 표 3에 나타내었다. 더불어 갈색거저리 유충의 제단백질율(%)은 표 4에 나타내었고, 갈색거저리 탈각의 제단백질율(%)은 표 5에 나타내었다. 실험기간 동안의 제단백질율의 변화는 도 1에 나타내었으며, 갈색거저리 유충의 결과는 도 1(A)에 나타내었고, 갈색거저리 탈각의 결과는 도 1(B)에 나타내었다.

표 2

시간 (h)	Alcalase	Multifect PR 7L	Protamex	Flavourzyme	Collupulin
0	24.49 ± 0.45	16.62 ± 0.16	22.57 ± 0.38	18.11 ± 0.36	26.34 ± 0.93
0.5	49.40 ± 0.69 ***	18.02 ± 0.41	29.74 ± 0.33 ***	23.84 ± 0.65 **	43.33 ± 0.95 ***
1	71.39 ± 3.30 ***	17.34 ± 0.50	36.15 ± 1.08 ***	25.73 ± 0.48 ***	51.37 ± 1.33 ***
2	96.83 ± 1.17 ***	17.90 ± 0.52	47.13 ± 1.13 ***	35.69 ± 0.84 ***	56.30 ± 0.99 ***
4	121.20 ± 1.02 ***	16.89 ± 0.27	54.94 ± 1.30 ***	49.75 ± 0.60 ***	105.06 ± 2.37 ***

8	151.22 ± 1.40 ***	24.95 ± 2.03 ***	97.09 ± 1.39 ***	68.06 ± 3.29 ***	148.88 ± 2.48 ***
12	179.32 ± 1.70 ***	22.83 ± 1.00 ***	113.20 ± 1.43 ***	81.76 ± 0.69 ***	126.35 ± 1.84 ***
24	229.42 ± 3.41 ***	56.56 ± 1.56 ***	137.47 ± 3.03 ***	123.09 ± 1.86 ***	180.98 ± 2.48 ***

[0087] 각 결과는 평균 ± 표준 편차(mean ± standard deviation(SD))로 표시하였으며, Tukey' s test에 따라 표시하였다. 상기에 있어서, **는 대조군(0h) 결과 대비 p<0.01의 값을 나타내고, ***는 대조군(0h) 결과 대비 p<0.001의 값을 나타낸다.

표 3

[0089]

시간 (h)	Alcalase	Multifect PR 7L	Protamex	Flavourzyme	Collupulin
0	18.49 ± 0.33	7.80 ± 0.27	9.96 ± 0.65	12.25 ± 0.55	12.43 ± 0.36
0.5	36.14 ± 0.62 ***	11.92 ± 0.27 ***	16.27 ± 0.59 **	16.77 ± 0.22 ***	19.69 ± 0.73 ***
1	45.48 ± 0.80 ***	14.55 ± 0.52 ***	17.28 ± 0.60 ***	21.49 ± 0.75 ***	23.72 ± 0.99 ***
2	57.60 ± 0.35 ***	16.51 ± 0.57 ***	25.06 ± 1.24 ***	24.99 ± 0.37 ***	29.90 ± 1.05 ***
4	71.98 ± 1.79 ***	19.15 ± 0.26 ***	36.90 ± 1.36 ***	33.45 ± 1.21 ***	37.73 ± 0.71 ***
8	118.59 ± 2.02 ***	25.87 ± 1.39 ***	40.23 ± 1.10 ***	38.45 ± 0.4 ***	45.93 ± 1.83 ***
12	127.12 ± 4.47 ***	22.78 ± 1.03 ***	53.45 ± 1.65 ***	57.35 ± 1.03 ***	47.43 ± 1.03 ***
24	105.91 ± 5.09 ***	42.22 ± 1.74 ***	54.50 ± 4.19 ***	61.63 ± 2.18 ***	52.25 ± 0.71 ***

[0090] 각 결과는 평균 ± 표준 편차(mean ± standard deviation(SD))로 표시하였으며, Tukey' s test에 따라 표시하였다. 상기에 있어서, **는 대조군(0h) 결과 대비 p<0.01의 값을 나타내고, ***는 대조군(0h) 결과 대비 p<0.001의 값을 나타낸다.

표 4

[0092]

시간 (h)	Alcalase	Multifect PR 7L	Protamex	Flavourzyme	Collupulin
0	1.62 ± 0.14	-0.74 ± 0.05	1.04 ± 0.11	-0.30 ± 0.11	2.17 ± 0.28
0.5	9.10 ± 0.21 ***	-0.32 ± 0.12	3.20 ± 0.10 ***	1.42 ± 0.19 **	7.28 ± 0.29 ***
1	15.70 ± 0.99 ***	-0.53 ± 0.15	5.12 ± 0.33 ***	1.99 ± 0.14 ***	9.69 ± 0.40 ***
2	23.34 ± 0.35 ***	-0.36 ± 0.16	8.42 ± 0.34 ***	4.98 ± 0.25 ***	11.17 ± 0.30 ***
4	30.66 ± 0.31 ***	-0.66 ± 0.08	10.76 ± 0.39 ***	9.20 ± 0.18 ***	25.82 ± 0.71 ***
8	39.68 ± 0.42 ***	1.76 ± 0.61 ***	23.42 ± 0.42 ***	14.70 ± 0.99 ***	38.97 ± 0.75 ***
12	48.12 ± 0.51 ***	1.12 ± 0.30 ***	28.26 ± 0.43 ***	18.82 ± 0.21 ***	32.21 ± 0.55 ***
24	63.16 ± 1.02 ***	11.25 ± 0.47 ***	35.55 ± 0.91 ***	31.23 ± 0.56 ***	48.62 ± 0.74 ***

[0093] 각 결과는 평균 ± 표준 편차(mean ± standard deviation(SD))로 표시하였으며, Tukey' s test에 따라 표시하였다. 상기에 있어서, **는 대조군(0h) 결과 대비 p<0.01의 값을 나타내고, ***는 대조군(0h) 결과 대비

p<0.001의 값을 나타낸다.

표 5

시간 (h)	Alcalase	Multifect PR 7L	Protamex	Flavourzyme	Collupulin
0	-0.18 ± 0.10	-3.39 ± 0.08	-2.74 ± 0.20	-2.06 ± 0.17	-2.00 ± 0.11
0.5	5.12 ± 0.19 ***	-2.15 ± 0.08 ***	-0.85 ± 0.18 **	-0.70 ± 0.07 ***	0.18 ± 0.22 ***
1	7.92 ± 0.24 ***	-1.37 ± 0.15 ***	-0.55 ± 0.18 ***	0.72 ± 0.22 ***	1.39 ± 0.30 ***
2	11.56 ± 0.11 ***	-0.78 ± 0.17 ***	1.79 ± 0.37 ***	1.77 ± 0.11 ***	3.24 ± 0.32 ***
4	15.88 ± 0.54 ***	0.01 ± 0.08 ***	5.34 ± 0.41 ***	4.31 ± 0.36 ***	5.59 ± 0.21 ***
8	29.88 ± 0.61 ***	2.03 ± 0.42 ***	6.35 ± 0.33 ***	5.81 ± 0.14 ***	8.06 ± 0.55 ***
12	32.44 ± 1.34 ***	1.11 ± 0.31 ***	10.32 ± 0.50 ***	11.49 ± 0.31 ***	8.51 ± 0.31 ***
24	26.07 ± 1.53 ***	6.94 ± 0.52 ***	10.63 ± 1.26 ***	12.77 ± 0.66 ***	9.96 ± 0.21 ***

각 결과는 평균 ± 표준 편차(mean ± standard deviation(SD))로 표시하였으며, Tukey' s test에 따라 표시하였다. 상기에 있어서, **는 대조군(0h) 결과 대비 p<0.01의 값을 나타내고, ***는 대조군(0h) 결과 대비 p<0.001의 값을 나타낸다.

상기 표 2 내지 표 4 및 도 1에 나타난 바와 같이, 갈색거저리 유충에서 24시간 기준 Alcalase를 이용한 실험군의 아미노질소 농도가 229.42(mg/g of sample)으로 가장 높았다(표 2). 갈색거저리 탈각에서는 24시간 기준 Alcalase를 이용한 실험군의 아미노질소 농도가 105.91(mg/g of sample)으로 가장 높았다(표 3). 더불어 갈색거저리 유충을 가수분해시켰을 때 제단백질율은 24시간 기준 Alcalase를 이용한 실험군에서 63.16%로 가장 높았으며(표 4 및 도 1(A) 참고), 갈색거저리 탈각에서는 Alcalase를 이용한 실험군에서 26.07%로 가장 높았다(표 5 및 도 1(B) 참고). 상기 측정 결과를 토대로, 최적의 시료와 단백질 가수분해 효소는 갈색거저리 유충과 Alcalase로 선정하였다.

실시예 2. 최적의 가수분해 조건 확립

RSM을 통해 40개의 반응 조건을 도출하였으며, 이를 반영해 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 가수분해하고, 각 반응조건에 따른 실험군의 종속변수인 아미노질소 농도(시료의 mg/g)를 측정하여 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

회	기질(Substrate) (%)	효소 (μL/g)	시간 (h)	아미노질소 (시료의mg/g)	회차	기질 (%)	효소 (μL/g)	시간 (h)	아미노질소 (시료의mg/g)
1	5	50	6	83.46 ± 0.33	21	7.5	25	8	97.14 ± 1.94
2	7.5	25	8	94.93 ± 4.35	22	12.5	80	8	130.52 ± 1.02
3	10	50	6	83.49 ± 0.06	23	7.5	80	8	129.01 ± 0.79
4	12.5	80	8	122.03 ± 0.94	24	7.5	80	4	67.89 ± 3.08
5	10	100	6	99.45 ± 3.48	25	7.5	80	8	120.45 ± 1.74
6	7.5	80	8	118.61 ± 0.63	26	5	100	6	94.96 ± 0.41
7	7.5	80	8	119.66 ± 1.60	27	10	100	6	99.25 ± 0.57
8	10	100	12	148.87 ± 3.34	28	7.5	130	8	136.45 ± 4.17
9	7.5	80	8	122.48 ± 1.77	29	5	50	12	130.30 ± 2.66
10	5	50	6	78.42 ± 0.78	30	2.5	80	8	127.57 ± 1.31
11	7.5	80	8	121.15 ± 3.01	31	10	100	12	155.39 ± 1.99
12	2.5	80	8	132.79 ± 1.38	32	7.5	80	8	119.53 ± 2.70
13	7.5	80	8	116.00 ± 2.08	33	7.5	130	8	139.70 ± 2.11
14	5	100	12	157.99 ± 0.92	34	10	50	12	132.45 ± 4.34
15	7.5	80	8	120.07 ± 0.20	35	10	50	12	131.45 ± 2.71
16	7.5	80	4	65.57 ± 1.74	36	5	100	6	94.92 ± 2.38

17	7.5	80	8	121.79 ± 3.02	37	7.5	80	8	125.42 ± 1.43
18	5	50	12	127.91 ± 1.14	38	5	100	12	159.73 ± 1.60
19	10	50	6	83.45 ± 5.49					
20	7.5	80	8	122.96 ± 2.51					

[0102] 또한 이는 $A + aX + bY + cZ + dX^2 + eY^2 + fZ^2 + gXY + hYZ + iXZ = -16.5038 - 0.8600X + 0.4812Y + 15.6862Z + 0.2247X^2 - 0.0014Y^2 - 0.4522Z^2 - 0.0178XY + 0.0339YZ - 0.1470XZ$ 의 회귀식을 따르는 것으로 확인되었다. 상기 회귀식은 갈색거저리 유충으로부터 키틴, 키토산을 추출하기 위한 최적 농도, 최적 효소 농도, 최적 반응시간을 통계적으로 도출하기 위한 식이다. 상기 회귀식에 있어, a는 기질의 상수, b는 효소의 상수, c는 반응시간의 상수, d는 기질농도제곱의 상수, e는 효소농도제곱의 상수, f는 반응시간제곱의 상수, g는 최적 기질농도와 효소 농도를 곱한 값의 상수, h는 최적 효소 농도와 반응시간을 곱한 값의 상수, I는 최적 기질농도와 반응시간을 곱한 값의 상수를 의미하며, X는 기질(갈색거저리 유충)(%), Y는 효소 (μL/g), Z는 시간 (h), R²는 95.7%을 나타낸다. 상기에 있어서, 회귀식의 각 상수들은 각 요인들의 최적 조건 도출을 위한 값들이다.

[0103] 따라서 상기와 같은 최적화 분석을 통해 기질 7.5%, 효소 80 μL/g, 반응시간 24 시간일 때, 종속변수인 아미노질소 농도가 시료에 있어, 163.17 mg/g로 예측되었다. 상기 조건을 반영하여 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 갈색거저리 유충을 가수분해한 결과 하기 표 7 및 도 2에 나타내었다. 그 결과, 아미노질소 농도가 시료에 있어 162.99 mg/g인 바, 상기 예측 값과 유사한 값을 나타내었다.

[0104] 따라서 상기의 기질(갈색거저리 유충) 7.5%, 효소 80 μL/g, 반응시간 24시간의 조건이 본 발명의 갈색거저리 유래 키틴과 키토산 제조에 있어 최적 조건임을 확인하였다.

표 7

	RSM 결과	실제 결과
기질(%)	7.5	7.5
효소 μL	80	80
반응시간(h)	24	24
아미노질소 (mg/g of sample)	163.17	162.99

[0107] 실시예 3. 작용기(functional group) 분석

[0108] 상기 실시예 2에서 확인한 최적 조건을 기반으로 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 수득한 갈색거저리 유충 유래 키토산과 상업적 키토산의 작용기를 FT-IR을 통해 분석하여 그 결과를 도 4에 나타내었다. 갈색거저리 유충 유래 키틴 및 키토산의 FT-IR 스펙트럼 분석 결과, 키틴 기능기를 나타내는 1600 - 1680 cm⁻¹에서 밀웜 키틴의 피크 값이 갈색거저리 유충 유래 키토산의 피크 값보다 두드러지게 나타났다(도 4(B) 참고). 이는 상업적 키틴 및 키토산의 스펙트럼 분석 결과와도 유사한 것을 확인하였다(도 4(A) 참고).

[0109] 상기와 같이 FT-IR 스펙트럼 파장과 흡수가 상업적 키틴 및 키토산과 비슷한 것을 확인한 바, 본 발명에 따른 최적조건으로 수득한 갈색거저리 유래 키틴 및 키토산 성분이 상업적 제품과 성분이 유사한 것으로 판단되었다.

[0111] 실시예 4. 물리학적, 열역학적 특성 분석

[0112] 상기 실시예 2에서 확인한 최적 조건을 기반으로 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 수득한 갈색거저리 유충 유래 키틴 및 키토산과 상업적 키틴 및 키토산의 물리적, 열역학적 특성을 분석하기 위해 DSC을 측정하였다. 이를 통해 측정된 각 시료의 발열(T₁, °C) 또는 흡열(T₂, °C) 피크의 온도와 엔탈피 값(ΔH, J/g)을 하기 표 8과 도 5 및 도 6에 나타내었다.

표 8

시료	발열(Exotherm) (℃)				흡열(Endotherm) (℃)			
	T _{s1} (℃)	T _{max1} (℃)	T _{e1} (℃)	ΔH ₁ (J/g)	T _{s2} (℃)	T _{max2} (℃)	T _{e2} (℃)	ΔH ₂ (J/g)
상업적 키틴	140.77	143.29	157.37	-116.6	-	-	-	-
갈색거저리 키틴	132.82	153.76	179.76	-91.08	-	-	-	-
상업적 키토산	140.77	143.65	165.68	-183.1	281.20	306.47	331.38	104.7
갈색거저리 키토산	141.13	147.63	197.81	-179.9	301.06	337.52	371.82	181.7

상기 표 8에 있어서, T_s는 시작온도(start temperature)이고, T_{max}는 최대 온도(maximum temperature)이며, T_e는 종료 온도(end temperature)이고, ΔH는 열에너지(thermal energy)이다.

상기 표 8, 도 5 및 도 6에 나타낸 바와 같이, 갈색거저리 유래 키틴의 경우 발열 반응에서 시작온도 132.82℃, 피크 온도 153.76℃, 종료 온도 179.76℃ 및 열에너지는 91.08(J/g)를 보였다. 상업적 키틴은 시작온도 140.77℃, 피크 온도 143.29℃, 종료 온도 157.37℃ 및 열에너지는 116.6(J/g)를 보였으며, 각 시료가 유사한 값을 보임을 확인하였다.

또한 갈색거저리 유래 키토산도 흡열 반응과 발열 반응에서의 각 측정값이 상업적 키토산과의 측정값과 유사함을 확인하였다.

따라서 본 발명의 최적조건을 통해 갈색거저리로부터 수득한 키틴 및 키토산은 상업적 키틴 및 키토산과 열적 안정성 및 열역학적 특성이 유사한 것으로 판단되었다.

실시예 5. 조단백질 정량

갈색거저리 유충 원물, 상기 실시예 2에서 확인한 최적 조건을 기반으로 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 수득한 갈색거저리 유충 유래 키틴 및 키토산의 조단백질을 정량하여 그 결과를 하기 표 9에 나타내었다.

표 9

시료	조단백질 (mg/g)	
	효소 가수분해	상업적 제품
갈색거저리 유충	389.77±21.01	-
갈색거저리 유충 유래 키틴	284.32±20.04	220.50±5.25
갈색거저리 유충 유래 키토산	174.90±15.15	139.10±4.55

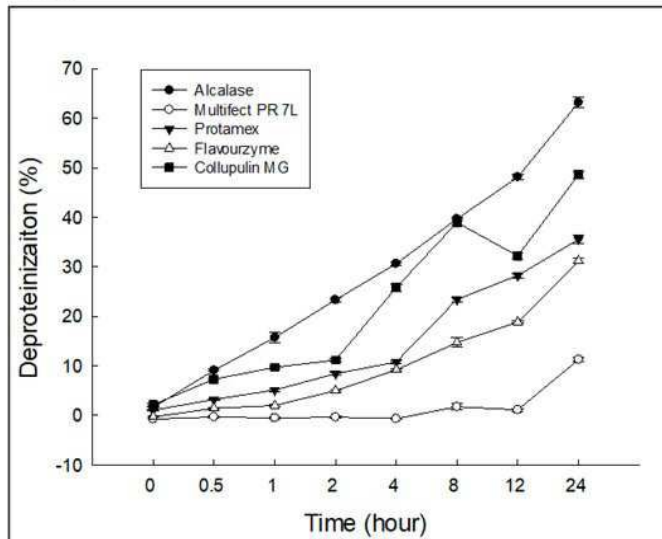
갈색거저리 유충 원물의 조단백질 함량은 38.9%, 갈색거저리 유충 유래 키틴의 조단백질 함량은 28.4%, 키토산의 함량은 17.4%으로 나타났으며, 밀웜 원물 대비 키틴의 조단백질 함량은 23.5% 감소되었다. 또한 시료의 조단백질 함량은 상업적 키틴의 조단백질 함량 22.0% 및 상업적 키토산의 조단백질 함량 13.9%과 유사한 결과를 보였다.

종합적으로 본 발명에 의해 도출된 최적의 효소인 Alcalase를 이용하여, 탐색된 최적 조건으로 가수분해하여 제조한 갈색거저리 유래 키틴 및 키토산은 상업적 키틴 및 키토산과 유사한 작용기, 열적 안정성 및 열안정성을 보이고, 유사한 정도의 조단백질 함량을 보이는 바, 본 발명에 따른 효소 및 최적 조건을 활용한 갈색거저리 유래 키틴 및/또는 키토산 제조 방법은 고품질의 키틴 및 키토산을 효율적으로 생산할 수 있는 방법이다.

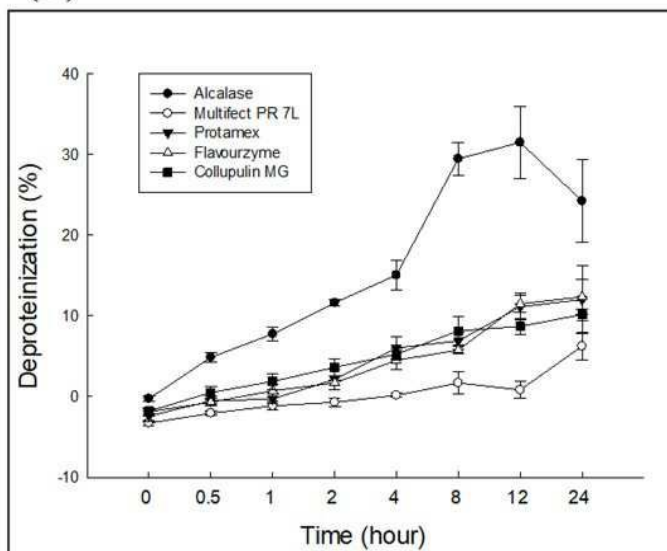
도면

도면1

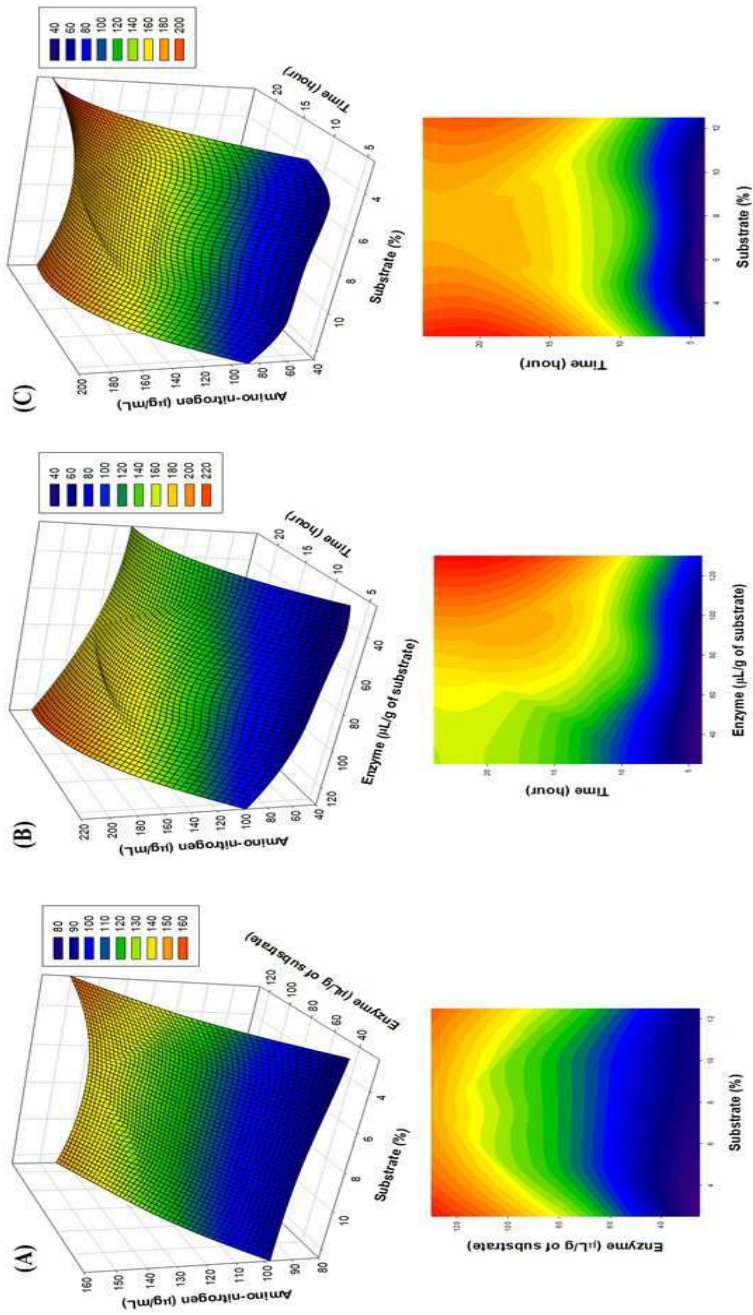
(A)



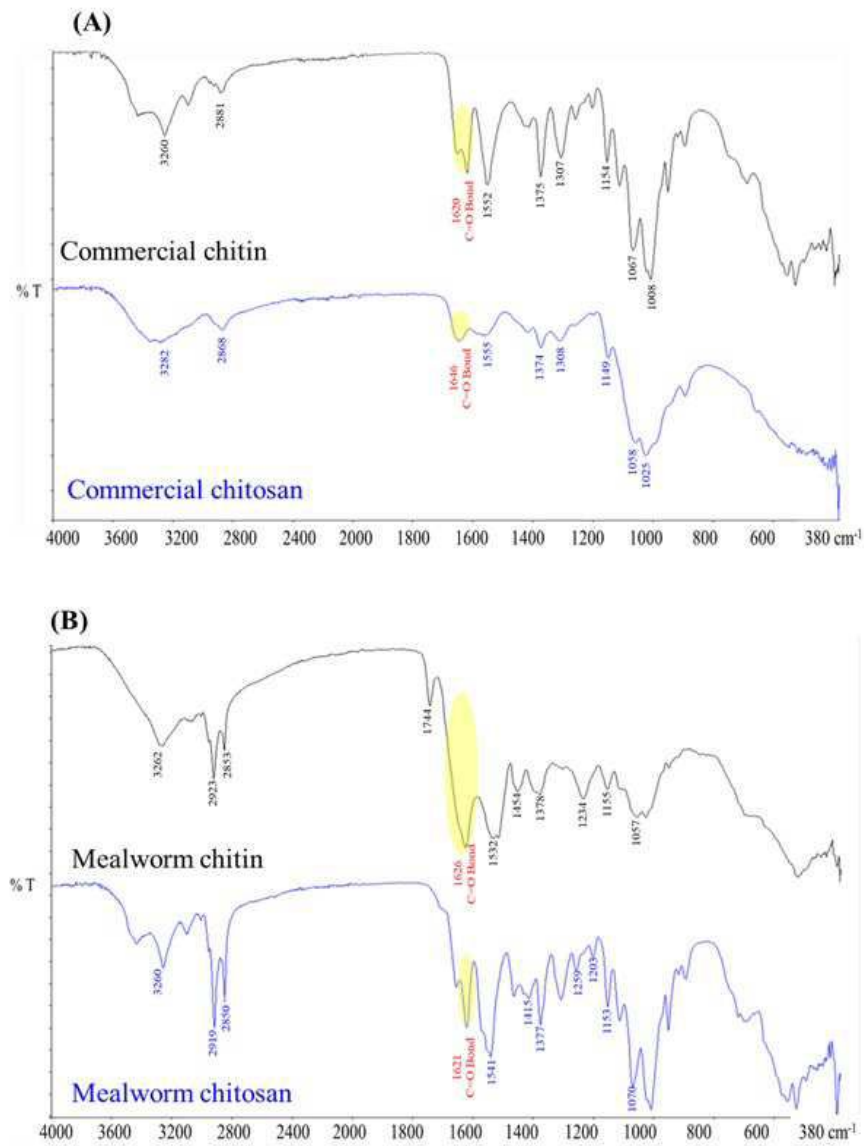
(B)



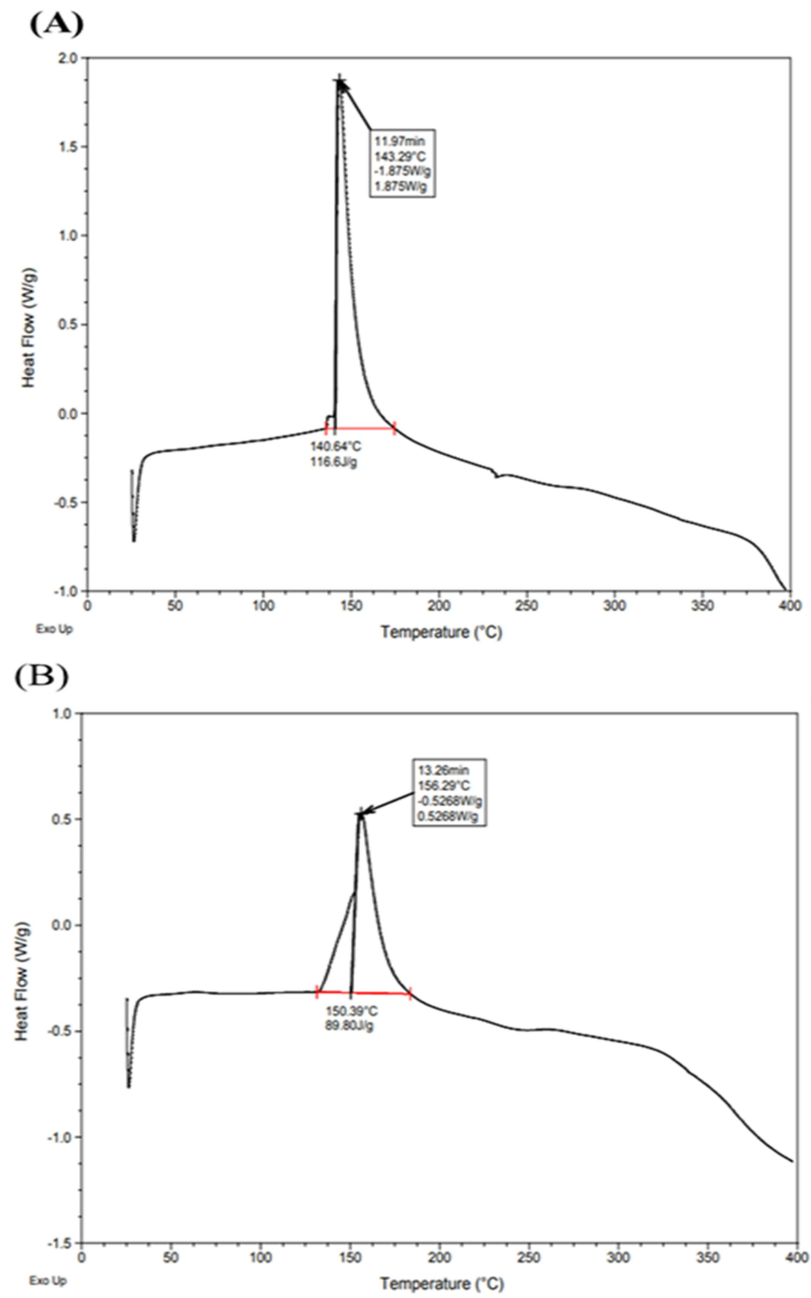
도면2



도면3

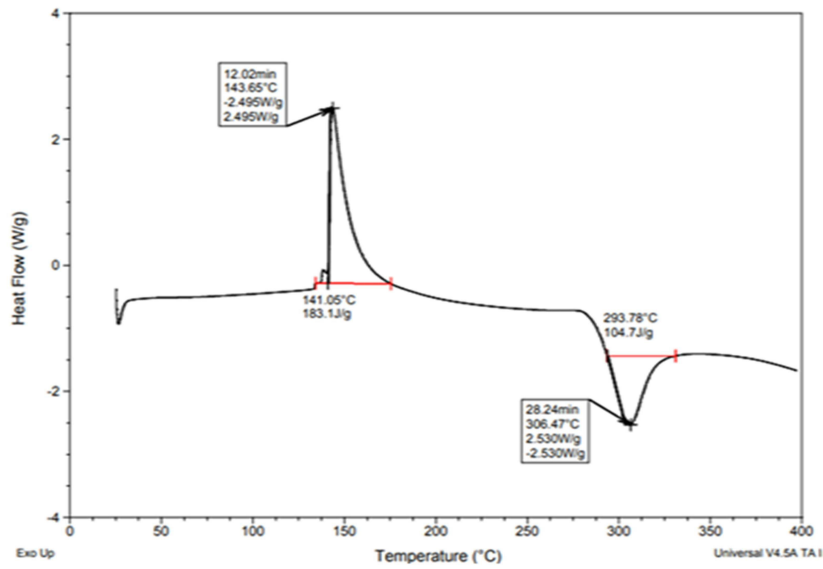


도면4



도면5

(A)



(B)

