



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년11월30일
 (11) 등록번호 10-1206855
 (24) 등록일자 2012년11월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/056 (2006.01) *A23L 1/27* (2006.01)
C08B 37/08 (2006.01) *C12P 19/04* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2009-0135168
 (22) 출원일자 2009년12월31일
 심사청구일자 2009년12월31일
 (65) 공개번호 10-2011-0078376
 (43) 공개일자 2011년07월07일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR100578501B1
 KR100578502B1
 KR1020010091847A

(73) 특허권자
박응렬
 부산광역시 동래구 석사로 38 (사직동)
동의대학교 산학협력단
 부산광역시 부산진구 가야대로 657-7 (가야동)
 (72) 발명자
박응렬
 부산광역시 동래구 석사로 38 (사직동)
허만규
 부산광역시 연제구 거제천로 233, 102동 1801호
 (거제동, 거제동월드메르디앙아파트)
조철민
 부산광역시 남구 문현동 골든벨뷰빌 614호
 (74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 2 항

심사관 : 장낙용

(54) 발명의 명칭 키틴 및 키토산의 수득방법

(57) 요약

본 발명은 키틴의 수득 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 (a) 갑각류 껍질을 분쇄하는 단계; (b) 상기 분쇄된 갑각류 껍질에 함유된 아스타잔틴을 주성으로 추출하는 탈색단계; (c) 상기 (b)에서 탈색된 갑각류 껍질을 젖산이 담긴 추출탱크에 투입하고 끓여서 회분을 추출 및 분리하는 탈회 단계; (d) 상기 탈회 단계를 거친 갑각류 껍질을 탄산칼륨(K_2CO_3)이 담긴 추출 탱크에 투입하고 끓여서 단백질을 추출 및 분리시켜 키틴을 수득하는 탈단백단계를 포함하는 키틴의 수득방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 키틴의 수득방법에서 수득된 키틴을 증류수로 씻어 중화시킨 후 발효 탱크에 투입하고, 미생물을 상기 발효 탱크 내에서 접종시켜 탈 아세틸화하여 키토산을 수득하는 키토산의 수득방법에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 갑각류 껍질을 세척, 건조, 및 분쇄하는 단계;
- (b) 상기 (a)단계에서 분쇄된 갑각류 껍질에 함유된 아스타잔틴을 주성으로 추출하는 탈색단계;
- (c) 상기 (b)단계에서 탈색된 갑각류 껍질을 1.5 내지 3배 용량의 1.5N 내지 2.5N 젓산이 담긴 추출탱크에 투입하고 12 내지 24시간 동안 끓여서 액체 상태로 만든 다음 상온으로 냉각시켜 고체(회분)를 형성한 후 생성된 고체를 분리하여 탈색된 갑각류 껍질을 탈회하는 단계; 및
- (d) 상기 탈회 단계를 거친 갑각류 껍질을 1.5 내지 3배 용량의 1N 내지 1.5N의 탄산칼륨(K₂CO₃)이 담긴 추출탱크에 투입하고 18 내지 36시간 동안 끓여서 액체 상태로 만든 다음 상온으로 냉각시켜 고체(단백질)를 형성한 후 생성된 고체를 분리하여 제거하고 키틴을 수득하는 탈 단백질 단계를 포함하는, 키틴의 수득 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,
상기 갑각류는 게, 가재 또는 새우인 것을 특징으로 하는 키틴의 수득 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 친환경적이면서 간단하고 편리하며, 부산물 자원을 활용할 수 있는 키틴 및 키토산의 수득방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 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. 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 신소재라 사료된다.

[0003] 종래에는 갑각류의 껍질에서 이들을 강산(염산)과 강염기(가성소다 용액)를 사용하여 비교적 싼 비용으로도 생산이 가능하였지만, 환경에 영향을 끼치는 화학물질인 염산이나 가성소다 등으로 처리하는 시설 자체와 이를 중화하여 염을 제거할 때 필연적인 흡습이 발생하는 문제가 있다. 이제는 환경에 지장을 초래하지 않는 공

정(기법)을 적용해야만 하는 단계라 사료되는데 비용문제 등으로 현재 친환경적인 대체공법이 널리 적용되지 못하고 있으며 기존 방법의 적용을 벗어나지 못하고 있다.

[0004] 이를 반영하는 것으로는 강구 농업협동조합 달산 지점 홈페이지(09-0822)에 수록된 내용을 보면 아직도 강산과 강염기를 사용하고 있다는 것을 알 수 있다. 그리고 홍계(껍질)에 함유된 적색 색소 아스타잔틴의 이용은 전혀 고려대상이 아닌 것으로 차아염소산소다 등의 탈색제로 산화시켜 탈색하여 키틴을 제조하는 것으로 기술되고 있으며, 또 강산으로 탈회하여 이를 어떤 방법으로 중화를 한다는 것이 기술되지 않고 있으며, 염이나 강염기인 가성소다를 사용하는 것 역시 중화 혹은 탈염을 한다는 것이 기술되지 않고 있는 것으로 보아 환경오염을 야기 한다고 간주된다. 특히, 강알칼리(가성소다 40-50% 수용액)를 적용하는 탈 아세틸 공정에서 오염은 상당한 문제가 되나 이에 대하여 효소처리 혹은 미생물에 의한 처리를 언급하고 있지만, 고농도 가성소다(NaOH) 처리방법이 일반적이라고 기술하고 있는 것으로 보아 친환경적인 처리 방법의 적용은 되지 않고 있는 것이 확실시된다.

[0005] 따라서, 보다 환경 친화적이며 강산이나 강염기 처리와 이에 대등하며 간단하고 편의한 공정이 개발되어야 하며, 가능하다면 게 껍질로부터 처리단계별에 따라 획득될 수 있는 적색색소인 동시에 항산화제인 아스타잔틴과 인체에 필요한 칼슘을 위시한 광물질, 그리고 껍질을 구성하고 있는 단백질 등을 각기 분리 획득하여 자원으로 활용 수익을 높이는 기법이 요구된다. 동시에 키틴 및 키토산 역시 목적하는바 품질의 것이 획득되는 공정이 필요하다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 게, 가재 또는 새우와 같은 갑각류 껍질로부터 키틴 및 키토산을 제조(생산)하는데 강산 및 강염기를 사용하는 종래의 기법은 환경오염을 초래할 뿐만 아니라 추출되는 물질 중 키틴 및 키토산을 제외한 부산물들을 활용할 방도가 극히 어려워 활용이 전무한 것으로 관측된다. 따라서 유기산 및 식용에 사용될 수 있는 알칼리와 미생물 등을 사용 추출되는 물질을 활용할 수 있도록 함으로서 환경오염을 줄이고 자원으로 활용케 하여 부차적인 수익을 창출하고, 보다 양질의 키틴 및 키토산을 수득할 수 있으며, 동시에 부산물을 이용하여 식품 및 여러 가지 공산품 생산의 자원으로 활용할 수 있는 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

[0007] 본 발명의 한 양태는 키틴의 수득 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 (a) 갑각류 껍질을 세척, 건조 및 분쇄하는 단계; (b) 상기 (a)에서 분쇄된 갑각류 껍질에 함유된 아스타잔틴을 주정으로 추출하는 탈색단계; (c) 상기 (b)에서 탈색된 갑각류 껍질을 젖산이 담긴 추출탱크에 투입하고 끓여서 회분을 추출 및 분리하는 탈회 단계; (d) 상기 탈회 단계를 거친 갑각류 껍질을 탄산칼륨(K₂CO₃)이 담긴 추출 탱크에 투입하고 끓여서 단백질을 추출 및 분리시켜 키틴을 수득하는 탈 단백질 단계를 포함하는 키틴의 수득방법에 관한 것이다.

[0008]

[0009] 상기 (a) 단계는 갑각류 껍질을 추출탱크에 넣고 식수를 내용물이 잠기게 투입한 다음 교반기를 회전시키고, 보일러를 가열, 내용물을 끓여서 소독을 하고, 불순물 제거한 다음, 건조기에 넣고 건조한 후, 100 메시로 분쇄하여, 다음 작업에 효율성을 높이는 준비단계가 된다. 상기 갑각류는 특별히 제한되는 것은 아니나, 홍게, 대게와 같은 게, 가재 또는 새우 등의 껍질을 주 대상으로 한다.

[0010] 상기 (b) 탈색단계에서는 갑각류 껍질에 함유된 항산화제 아스타잔틴(적색 색소)을 우선 주정(80% 내지 85%, 바람직하게는 85%)으로 2회 반복 3내지 4시간, 바람직하게는 3 시간씩 추출 및 분리하여 상기 갑각류 껍질을 탈색한다. 상기 탈색 작업에 사용한 주정은 낮은 진공으로 증발 제거 재활용할 수 있고, 색소 아스타잔틴은 농축하고, 필요에 따라 건조분말을 제조, 적색소 혹은 항산화제로 이용한다.

[0011]

[0012] 상기 (c)의 탈회 단계에서는 상기 (b) 단계에서 탈색된 갑각류 껍질을 1.5 내지 3배 용량, 바람직하게는 2 배 용량의 1.5N 내지 2.5N, 바람직하게는 2 N의 젖산이 담긴 추출탱크에 투입하고 이를 12 내지 24시간(18 시간이 최적) 끓여서 회분을 추출 및 분리하여 상기 탈색된 갑각류 껍질을 탈회시킨다. 상기 추출 및 분리된 회분은 농축하여 젖산 칼슘을 제조할 수 있어, 이를 자원으로 이용할 수 있다.

[0013]

[0014] 상기 (d)의 탈 단백질단계에서는 상기 (c) 단계에서 탈회된 갑각류 껍질을 1.5 내지 3배, 바람직하게는 2배 용량의 1N 내지 1.5N, 바람직하게는 1N 의 탄산칼륨(K₂CO₃)이 담긴 추출탱크에 투입하고, 이를 18 내지 36 시간(30시간이 최적) 끓여서 단백질 등을 추출 및 분리하여 키틴을 수득한다. 상기 추출 및 분리된 단백질은 농축한 후, 상기 (c) 단계에서 획득한 젖산칼슘으로 중화하여 칼슘 및 단백질원으로 홍게 및 새우 스펀지케이크(Crab & Shrimp Sponge Cake) 혹은 게맛살 및 새우 맛살 제조에 이용케 하거나, 식초로 중화하여 단백질원으로 이용할 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 양태는 키토산의 수득 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 상기 (a) 내지 (d) 단계를 포함하는 키틴의 수득방법에서 수득된 키틴을 증류수로 씻어 중화시킨 후 발효 탱크에 투입하고, 미생물을 상기 발효 탱크 내에서 접종시켜 탈 아세틸화하여 키토산을 수득하는 것을 특징으로 하며, 더욱 더 구체적으로는 상기 (a) 내지 (d) 단계를 포함하는 키틴의 수득방법에서 수득된 키틴을 증류수로 씻어 중화시켜 발효 탱크에 투입하고, 다음에 수록된 미생물 배양 및 탈 아세틸 배지를 조제 멸균처리하고, 냉각하여 하기 실시예 1에 나타난 방법으로 입수된 미생물(이하, '종균 1A '라 한다)을 접종 상온(25℃)에서 4 내지 6일간, 바람직하게는 6일간 발효하여 탈 아세틸화하여 키토산을 수득한다.

[0016] 미생물 배양 및 키틴을 탈 아세틸하기 위한 액체배지 구성은 다음과 같다.

- [0017] 1) 효모추출물(Yeast extract) 10.0g
- [0018] 2) 인산암모늄(Ammonium phosphate) 3.0g
- [0019] 3) 황산마그네슘(Magnesium sulfate) 2.5g
- [0020] 4) 분말 키틴(Chitin) 5.0g
- [0021] 5) 식수 1,000ml

효 과

[0022] 본 발명에 의하면, 게, 가재 또는 새우와 같은 갑각류 껍질로부터 아스타잔틴(적색소)을 주정(85%)으로 추출, 농축하여 황산화제인 아스타잔틴을 획득, 건강기능성 식품 및 식용 색소로 활용케 함으로 새로운 수익을 창출할 수 있게 된다. 이 적색 색소는 국수 제조에 혼합하게 되면 황색의 국수가 제조되고, 고농도로는 게맛살 혹은 새우 맛살에 색소로도 이용이 가능하다.

[0023] 또한, 게, 가재 또는 새우와 같은 갑각류 껍질을 젖산으로 처리하여 탈회하고 이를 젖산칼슘으로 전환함으로써 이를 칼슘공급원으로 활용케 할 수 있다. 즉 칼슘이 보강된 국수 혹은 건강기능 식품의 원료로 사용이 가능함으로 부수적인 수익원이 될 수 있다.

[0024] 또한, 탈색 및 탈회된 갑각류 껍질을 탄산칼륨으로 처리하여 단백질을 분리 제거하고, 키틴을 생성하며 부수적으로 획득되는 단백질을 중화시켜 홍게 및 새우 스펀지케이크(Crab & Shrimp Sponge Cake)와 게맛살 제조에 난백대치로 이용이 가능하여 새로운 수익을 창출할 수도 있다.

[0025] 또한, 미생물을 배양하여 탈 아세틸화함으로 강염기(가성소다 40~50%)를 사용하여 탈 아세틸화 하는 작

업으로 야기되는 환경오염을 없애고, 부수적으로 미생물이 생성하는 물질, 예를 들면 단세포 단백질 등은 신물질로 연구, 개발, 그 용도를 찾으면 식품 혹은 사료용으로 활용이 가능하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

1. 준비단계

홍게 및 새우 껍질을 수집, 자원으로 활용하게 하는 수집시설 혹은 게 혹은 새우 가공 시설로부터 이를 획득하여 이에 함유된 성분을 추출하여 식품으로 사용하기에는 다소 문제점이 있을 수 있기 때문에, 일단 이를 추출탱크에 투입하고 식수를 껍질이 잠기게 넣고 가열하여 끓여(100℃)서 오물을 씻어 제거하고, 미생물의 수를 줄인 다음 건조기에 넣어 60℃에서 열풍건조 후 분쇄(100메쉬)하여 함유하고 있는 내용물을 추출하기 용이하게 준비한다.

2. 아스타잔틴(적색소) 추출 단계 - 탈색 단계

분쇄된 분말 30kg을 추출탱크(용량 500리터의 경우)에 넣고 주정(85%)을 2배 용량 투입, 휘저음 하면서 아스타잔틴을 상온에서 3시간씩 2회 반복 추출, 농축탱크(400리터의 경우)로 이송하고 농축탱크에서 이를 40℃에서 저압(진공) 하에서 주정을 전부 증발시켜 제거하고 계속 농축하여 아스타잔틴(항산화제)으로 국수 제조시 혼합하여 황색 항산화국수를 제조하거나, 적색소로 이용할 수 있는 농도로 조절, 건조하여 게맛살 혹은 새우맛살 제품화에 활용케 한다.

3. 탈회 단계

탈색된 홍게 혹은 새우 껍질 30kg을 2배 용량의 2N 젯산이 담긴 추출탱크에 투입하고 휘저음 하면서 18시간 끓여서 회분을 추출, 분리, 농축하여 젯산칼슘을 제조한다. 상기 젯산칼슘은 최초에는 액체 상태이지만 상온에서 서서히 응집하여 고체가 되므로, 초기 액체 상태일 때 깨끗한 유리병(2L)에 분할 충전하면 필요할 때 끓는 물에 넣어 녹여서 액체 상태로 전환하여 편리하게 이용이 가능하다.

탈회된 홍게 혹은 새우 껍질은 증류수 혹은 역삼투압(R/O)통과한 물로 씻어 중화시켜서 사용한다. 탈회로 그 중량이 감소하여 2 ~ 3회 실시한 것을 통합하여 한번 탈 단백질 작업에 투입이 가능하여 효율을 높일 수 있다.

4. 탈 단백질 단계 - 키틴의 수득

탈색 및 탈회 된 홍게 혹은 새우 껍질을 모아서 (3회분이 최적) 추출탱크에 넣고 1N 탄산칼륨을 2배 용량 투입한 다음 휘저음 하면서 가열, 끓여서(100℃) 단백질 추출하는데, 소요되는 시간은 분말의 크기, 용매의 농도 및 양, 교반기의 회전 속도 등에 따라 차이가 있지만 통상 30시간 정도 추출하면 대부분의 단백질은 추출된다.

상기 추출된 단백질에 함유된 수분함량을 줄이기 위하여 50 ~ 60℃에서 진공 농축하고 필요에 따라 젯산칼슘과 반응시켜 중화시키면서 발생하는 거품을 이용하여 단백을 대치한 스펀지케이크 제조에 사용이 가능하고, 유기산, 예를 들면 식초 등으로 중화시키고 주정(90%)을 동량(혹은 2배) 투여하여 단백질을 침전 분리 콜라겐으로 활용케 할 수 있다.

상기 공정을 거친 홍게 혹은 새우 껍질은 키틴으로 탄생하는데 이를 증류수 혹은 역삼투압(R/O) 통과한 물로 중화될 때까지 세척한다. 이를 건조하여 키틴으로 공급, 활용케 하거나, 다음 탈 아세틸작업에 투입하게 된다.

5. 탈 아세틸화 단계 - 키토산의 수득

[0038]

키틴을 키토산으로 만들기 위하여 고 농도(40 ~ 50%) 알칼리 용액을 사용하는 종래의 방법은 환경오염으로 인해 환영을 받지 못하고 있다. 그런 관계로 키틴을 주로 하는 배지에 미생물(종균 1A)을 배양하여 탈 아세틸화 작업을 전단계 하는 것이 이 제5단계의 작업으로 먼저 전향에서 명시한 액체 배지를 100ml, 200ml 및 1,000ml 그리고 발효기의 용량에 알맞은 (약 300리터, 500리터 추출기일 경우) 액체 배지를 준비하여 멸균처리하고 냉각하여, 첫 번째로 제일 적은 100ml 배지(500ml 플라스크)에 보존하고 있는 균주 튜브로부터 멸균한 백금 이를 이용하여 접종한다.

[0040]

상기 플라스크를 흔들 배양기에 올려 상온(25℃)에서 24시간 배양하면 탁도가 상당히 상승하여 미생물이 증식하게 되는데, 이를 한 백금이 200ml 배지가 든 플라스크에 접종 배양하고, 동시에 준비된 페트리디쉬(Plate)에 접종 배양미생물의 순수 여부를 확인한다. 다음 단계에서는 접종량을 늘려서 마지막은 1.000ml 배양액에 접종 배양하고 이를 전부 발효조에 투입하여 배양을 촉진하게 된다. 멸균된 공기가 충분히 공급되도록 밸브가 열린 상태에서 휘저음 하면서 배양과 동시에 탈 아세틸화 작업을 수행한다. 이렇게 미생물의 배양과 동시에 탈 아세틸화 작업은 5 내지 6일 이면 50 - 75%의 탈 아세틸화가 이루어지는 것으로 관측되었다. 더욱 충분한 탈 아세틸화를 위한 작업이 요구될 때는 발효를 계속하거나, 아니면 멸균된 배지 영양분을 새로이 추가하고 발효탱크에 있는 키틴 및 키토산은 계속 사용하여 탈 아세틸화를 계속하면 원하는 탈 아세틸화를 달성할 수 있게 된다.

[0041]

탈 아세틸화 작업 진행을 점검하기 위하여 하루 한번 씩 샘플 10ml를 수집 15분간 12,000g 원심 분리하여 상등액을 제거하고 침전한 미생물과 키틴 및 키토산이 든 튜브에 0.1N 가성소다용액 10ml에 넣고 잘 혼합하고, 15분간 열처리(오토클레이브)한 다음 이를 다시 15분간 12,000g 원심 분리하여 상등액(알칼리용액에 녹는 세포질 등)을 제거하고 침전한 키틴, 키토산 및 미생물 중합체 등을 함유한 튜브에 0.2% 초산 용액 10ml를 넣고 하루 밤 동안 키토산이 용해되도록 흔들 배양기에 올려서 흔들어서 키토산을 완전히 녹인다. 이를 다시 15분간 12,000g 원심 분리하여 키토산이 녹아있을 상등액을 취하고 여기에 1N가성소다 용액을 방울방울 떨어뜨려서 중화시켜 현탁액이 형성되는 것으로 키토산의 생성이 확인된다. 키토산의 생성이 증가한 것은 정치하여 두면 흰색 침전물이 생성된다. 이로서 키토산이 생성됨을 확인하게 되는데 더욱 정확히 확인하기 위하여 대조군으로 동일한 배지 조성물로 준비하되 키틴을 넣지 않은 배양액 100ml를 250ml 플라스크에 넣고 멸균 처리하고 식혀서 미생물을 접종 배양하고, 샘플 채취할 때 키틴이 함유된 배양조와 같은 비율의 키틴을 투여하여 상기한 같은 조건으로 처리하여 비교하면 키토산 생성 여부를 더욱 정확히 확인할 수 있다.

[0042]

배양탱크의 탈 아세틸화 작업이 75% 이상 진행을 확인하면 연속원심분리기를 사용하여 원심 분리하여 배양액을 침전물(미생물, 키틴, 및 키토산)과 분리한다. 침전물을 상기한 키토산 확인 절차와 같이 0.1N 가성소다 용액을 침전물이 잠기게 넣고(2배 용량이 최적) 휘저음 하면서 15분간 열처리(121℃)하여 키틴 및 키토산을 제외한 유시물을 녹여서 냉각한 다음, 다시 원심 분리하여 상등액을 제거한다. 그리고, 획득된 침전물 키틴 및 키토산에 식초 혹은 5% 초산용액을 침전물 2배 용량 넣고 24시간 휘저음 하면서 키토산을 녹이고 다시 원심 분리하여 침전한 키틴을 분리 제거하고 녹은 키토산을 알칼리용액으로 중화 응집시켜 수집한다. 그리고, 원심 분리된 배양액은 멸균처리 후 농축하여 분무 건조 혹은 열판 건조기로 건조하여 단세포 단백질로 활용하게 한다.

[0043]

이하, 본 발명을 실시 예를 통하여 상세히 설명하도록 한다. 하기 실시 예는 본 발명을 설명하기 위한 일 예에 지나지 않으며, 이에 의하여 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0044]

<실시예>

[0045]

실시예 1- 미생물 종균 A의 입수방법

[0046]

키틴이 함유된 배지에 한천을 1.5%(15g/1000ml) 넣어 멸균 처리하여 고체배지 페트리디쉬를 준비하고 새우젓갈(액젓)을 10배 및 100배 희석하여 각기 0.1ml를 접시에 도포 접종하여 잘 도말한 다음 배양기에 넣어 25℃에서 2일간 배양 잘 자라는 균주 5종을 선발하고 이를 다른 페트리디쉬에 스트리킹하여 예비 실험을 실시하

여 키틴을 탈 아세틸화 할 수 있는 종균A를 선발하였다.

[0047] **실시예 2**

[0048] 500ml 삼각 플라스크에 20g 홍게 껍질 분말(80메쉬)과 200ml 주정(85%)을 넣고 흔들 배양기에 올려서 3 시간 동안 흔들어서(shaking) 홍게 색소를 2회 반복 추출하여 이를 합하여 진공회전 농축기로 40℃에서 감압 농축하여 250g의 밀가루 반죽과 혼합한 결과 황색(카로티노이드 색)을 나타내었으며, 이를 함유한 국수를 제조, 시식한 결과 게 맛이 나는 면발로 평가되어 국수제조에 이용될 수 있음을 확인하였다.

[0049] **실시예 3**

[0050] 2리터 원형 플라스크에 탈색된 홍게 껍질 50g와 2N 젯산 1,500ml를 넣고 전기가열기(Heating mantle)에 올려 가열, 끓여서 게 껍질에 함유된 탄산칼슘을 위시한 회분을 18시간 추출하여 1,000ml를 획득하고 이를 회전 진공 농축기로 농축 500ml로 하여 상온에서 하루밤 방치한 결과 백색 고체의 조 젯산칼슘으로 나타났다.

[0051] 탈회된 게 껍질을 역삼투압(R/O) 정수기로 정수된 물 3리터로 4회 씻어서 pH가 중성으로 된 것을 건조 오븐에 넣어 60℃에서 24시간 건조 후 무게가 13.25g(26.5%)로 게 껍질은 73%정도가 회분임을 알 수 있었다.

[0052] **실시예 4**

[0053] 2리터 원형 플라스크에 탈색 및 탈회된 게 껍질 13.25g(실시 예 3에서 획득된 것)와 1N탄산칼슘 1,500ml를 투입하고 전기가열기로 가열 끓여서 게 껍질에 함유된 단백질을 30시간 추출하여 제거하고 역삼투압(R/O) 정수기로 정수된 물 2~3 리터로 4회 세척, 중화하여 건조한 결과 12.24g가 획득되었다. 따라서 게 껍질에 약 2%(1.0/50X100=2%)의 단백질이 함유된 것으로 나타났다.

[0054] 본 실시예 4 에서 획득된 탄산칼슘 추출액을 회전 감압 농축기로 농축하여 500ml를 획득하고, 그 일부 20ml를 조 젯산칼슘 20g와 반응시켜 거품을 형성시키고 난백이 포함되지 않은 스펀지케이크 믹스(밀가루 200g 함유)에 넣어 잘 혼합한 후 베이킹한 결과 게 맛나는 스펀지케이크가 만들어졌다. 산과 염기 반응으로 생성되는 수소 가스가 게 껍질에 있는 단백질 콜라겐에 의하여 포집되어 케란 흰자 단백질 역할을 대행하는 것으로 해석 되었다.

[0055] **실시예 5**

[0056] 키틴을 탈 아세틸하여 키토산으로 전환하는 작업을 미생물 (선발된 종균 1A)을 활용하여 실시하기 위하여 하기 [표 1]에 나타난 바와 같은 배지를 준비하였다.

[0057] [표 1] 키틴을 탈 아세틸화 하는 데 사용되는 미생물 배지의 구성

[0058] 효모추출물(Yeast extract)	10g
인산암모늄(Ammonium phosphate)	3.0g
황산마그네슘(Magnesium sulfate)	2.5g
분말 키틴(Chitin)	5.0g
식수	1,000ml

[0059] 상기 배양액을 삼각 플라스크 500ml에 100ml씩 4개(1개에는 키틴을 넣지 않고 발효가 진행된 후에 대조 구로 사용) 및 200ml씩 3개(1개에는 키틴을 넣지 않고 발효가 진행된 후에 대조구로 사용)에 나누어 넣고 121℃에서 15분간 멸균 처리한 다음 냉각하여, 첫 번째로 100ml가 담긴 두 개의 500ml 플라스크 배지에 보존하고 있는 균주 튜브로부터 멸균한 백금 이를 사용 종균을 각기 접종하였다(한번에 2번의 실험). 이 플라스크를 흔들 배양기에 올려 상온(25℃에서 24시간 배양하여 탁도가 상당히 눈에 뜨일 정도로 보이고 상당히 자라서 이를 한

백금이씩 200ml 배지가 든 플라스크에 각기 접종 배양하고, 동시에 준비된 접시 (Plate)에 접종 [배양미생물의 순수 여부를 확인하기 위해] 하고 배양기에 놓아 25℃에서 배양하여 검사한 결과 각기 순수 증균임을 확인하였다.

[0060] 2일간 배양한 플라스크의 미생물 200ml 배양액 중에서 각기 10ml씩 취하고, 또 이때 키틴이 함유되지 않고 배양된 플라스크에 키틴을 넣고 잘 혼합한 다음 10ml를 취하여 튜브 도합 4개를 15분간 12,000g 원심 분리하여 상등액을 제거하고 침전한 침전물(세포, 키틴 및 키토산)이 함유된 튜브에 0.1N 가성소다액을 10ml씩 넣고 잘 혼합한 다음 멸균처리(autoclave) 하였다. 키틴 및 키토산을 제외한 유기물을 용해시키고, 냉각된 다음 같은 조건하에 원심 분리하여 침전된 키틴 및 키토산이 포함되지 않은 상등액을 잘 제거하였다. 각 튜브에 10ml의 0.2% 초산액을 넣고 생성된 키토산을 1일간 진탕 용해하였다. 이렇게 처리된 튜브 4개를 다시 상기한 조건으로 원심 분리한 후 키토산이 함유되어있을 상등액을 각기 새로운 4개의 튜브에 옮겨 넣고 1N 가성소다액으로 중화시켜서 탁도를 관찰할 결과 키토산이 처음부터 함유된 배지에 증균이 배양된 튜브에서 현 탁도가 현저하게 나타났으며 1일 후 침전(응집)된 백색 중합체는 키토산임이 확인되었다. 이는 튜브를 상기한 바와 같은 조건에서 원심 분리하여 침전물을 0.2% 초산액에 녹임으로써 재확인이 가능하였다.

[0061] 이상에 설명한 바와 같이, 본 발명이 속하는 기술분야의 사업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 본 발명의 범위는 상기의 상세한 설명보다는 후술할 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.