공학석사 학위논문

홍어연골로부터 chondroitin sulfate의 제조

지도교수 김 선 봉

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

부경대학교 대학원

식 품 공 학 과

이 주 항

이주항의 공학석사 학위논문을 인준함

2001년 12월 일

주 심 이학박사 장 동 석

위 원 공학박사 이 근 태

위 원 농학박사 김 선 봉

목 차

Abstract 3

서론 6

실험재료 및 방법 9

1. 실험재료 9

1.1. 재료 9

1.2. 시약 9

1.3. 효소가수분해물의 제조 9

1.4. 알칼리 전처리에 따른 시료의 제조 10

1.5. 유기용매 분별침전물의 제조 10

2. 실험방법 11

2.1. 일반성분 및 휘발성염기질소의 측정 11

2.2. 무기성분의 정량 11

2.3. 가수분해도의 측정 11

2.4. Brix 값의 측정 12

2.5. Chondroitin sulfate의 정량 12

2.6. Cellulose acetate membrane electrophoresis 13

2.7. Ion exchange chromatography에 의한 chondroitin sulfate의 분리 13

2.8. Membrane filtration에 의한 chondroitin sulfate의 분리 14

2.9. FT-IR 분석 14

2.10. NMR 분석 14

결과 및 고찰 17

1. 홍어연골중의 일반성분 및 무기성분 17
2. 단백질 분해효소의 종류에 따른 홍어연골의 가수분해도의 변화 20
3. Alcalase에 의한 홍어연골의 최적 가수분해 조건의 설정 ... 22
4. 홍어의 불쾌취 제거를 위한 알칼리 전처리의 영향 23
5. 홍어연골 효소가수분해물의 성분 특성 29
6. 홍어연골 효소가수분해물로부터 chondroitin sulfate의 분리 및 정제 33

요약 54

참고문헌 57

Production of Chondroitin Sulfate from Skate Cartilage

Joo-Hang Lee

Department of Food Science and Technology, Graduate School, Pukyong National University

Abstract

Chondroitin sulfate is added to foods and cosmetic products for its biological functions against arthritis, osteoporosis, gerontopia and skin-aging. It also plays biological roles in biomineralization templates, nerve system and human growth.

The most effective liquefaction condition of chondroitin sulfate from skate cartilages(*Okamejei kenojei*) was studied to develop a functional ingredient. Enzymatic extraction method was applied by using various proteases. Compared with various proteases, Alcalase treatment was most effective by higher degree of hydrolysis of chondroitin sulfates and lower economical cost. In the case of skate cartilage, 2.0 % Alcalase treatment(dry basis) gave the degree of hydrolysis of 61.6 % and chondroitin sulfate content of

21.3 %, when hydrolyzed at 55±1 ℃ and pH 8.0 for 1hr. Hydrolysates of skate cartilages were filtered by centrifuge, concentrated under vacuum, dried and ground to a fine power for preparation of crude chondroitin sulfates. The purified chondroitin sulfate from skate cartilage was separated by fractional precipitation with isopropyl alcohol, DEAE-sephacel ion-exchange chromatography and ultrafiltration.

Precipitation of skate cartilage hydrolysate by 40.0 % isopropyl alcohol had higher yield of 20.0 % and chondroitin sulfate content of 69.0 % than those by other isopropyl alcohol concentrations. The optimum condition of isopropyl alcohol treatment was 10 Brix concentration of skate cartilage hydrolysates and 40.0 % concentration of isopropyl alcohol. One fraction was obtained from the isopropyl alcohol precipitate using by DEAE-sephacel ion-exchange chromatography. Chondroitin sulfate content of the fraction was 78.0 %.

Treatment conditions in a batch type ultrafiltration unit using YM100 (molecular weight cut-off, MWCO=100,000), YM50 (molecular weight cut-off, MWCO=50,000), YM30 (molecular weight cut-off, MWCO=30,000), YM10 (molecular weight cut-off, MWCO=10,000) membranes were transmembrane pressure of 1.0 kgf/cm^2, temperature of 23±1℃, and pH 6.5～7.5. The contents of chondroitin sulfate from skate cartilage hydrolysates in YM50～YM100, above YM100 membrane unit were higher than those in the others. The contents of chondroitin sulfate from skate cartilage hydrolysates in the YM50～YM100, above YM100 retentate were shown to be 81.3 % and 82.2 % based on dry matter, respectively.

Chondroitin sulfate C of standard reagent and three purified chondroitin sulfates by precipitation of isopropyl alcohol, DEAE-sephacel ion-exchange chromatography and ultrafiltration from skate cartilage were compared by using a variety of ^{1}H and ^{13}C NMRs. The ^{1}H and ^{13}C NMR spectra of the chondroitin sulfate purified by ultrafiltration from skate cartilage were similar to those of chondroitin sulfate C.

서 론

Chondroitin sulfate는 체내에 폭 넓게 존재하는 mucopolysaccharide의 일종으로 N-acetyl galactosamine과 glucuronic acid의 이당체 단위가 반복적으로 되풀이되는 구조를 가지며 황산기의 결합유무와 그 결합위치에 따라 A, C, D, E, K로 분류되어진다(Mucci et al., 2000 ; Sugahara et al., 1996)(Fig. 1.). Chondroitin sulfate는 동물조직 중 연골, 피부, 세포벽 등의 결합조직에 다량 분포되어져 있으며 단백질과 결합하여 proteoglycan의 형태로 존재한다(Scott et al., 1995). 관절의 연골은 20 %의 콜라겐과 6 %의 proteoglycan으로 구성되어져 있으며(Meyer, 1990), proteoglycan은 core protein에 keratan sulfate와 chondroitin sulfate가 결합하여 존재한다(Naji, 2000).

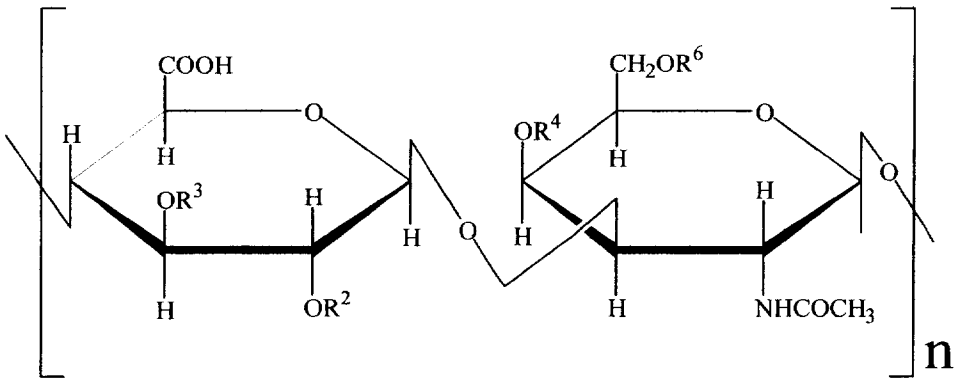
Chondroitin sulfate는 연령이 증가함에 따라 감소하여 노화로 나타나는 결합조직의 탄성손실에 관여할 뿐만 아니라, 부족 시에는 생체조직 세포의 손상을 초래하게 되는 것으로 알려져 있다(Bayliss, 1999). 또한, chondroitin sulfate는 collagen 생합성능에 관여하고 있고 뼈 단백질의 성숙을 조절하고 있으며 노화의 촉진을 억제하는 것으로 보고되어져 있으며(Ha, 1999), 악성종양의 전이에 필수적인 요소인 신생혈관 생성을 억제하므로 종양의 전이·증식을 억제한다고 한다(Kim, 1995; Moon, 1998). 특히, chondroitin sulfate는 퇴행성관절염의 치료와 예방에 탁월한 효능을 가지고 있을 뿐만 아니라 낮은 독성(LD_{50}=9,800 g/kg)을 보이고 있어 현재, 의약분야에서 퇴행성관절염의 치료에 이용되고 있다(Omata, 2000).

Chondroitin sulfate의 공급 원료로서 육상포유동물 즉, 소 연골 유래의

chondroitin sulfate가 그 대부분을 차지하고 있었으나 최근 들어 광우병, 구제역, 대장균 O-157등의 오염 등으로 인한 위생적 안전성이 사회적으로 대두되어 상어 연골 유래의 chondroitin sulfate가 이를 대체하고 있다(FDA reports, 1997). 수산동물 중 상어와 같은 판새목에 속하는 연골어류로는 홍어가 대표적이며, 현존하는 연골어류는 크게 은상어나 갈은상어 등 30여종으로 구성된 전두아강(Holocephali; chimaeroids)과 상어류, 가오리류 및 홍어류 등 약 850~1,000종으로 구성되는 판새아강(Elasmobranchii; sharklike fishes)으로 나눌 수 있는데 이 중 홍어류는 약 280종이 보고되어 현존하는 가오리류 종 수의 반 이상을 차지하여 연골어류에서 가장 방대한 분류 군으로 속한다(Jeong, 2000).

홍어는 예로부터 우리나라를 비롯한 동양 권에서 상식(常食)해 오고 있는 식품으로 국내에서는 전라도를 중심으로 하여 발효식품이나 단순 가공에 의한 소비가 이루어지고 있다. 홍어와 같은 연골어류는 다른 어류보다 질소화합물인 요소, 암모니아, TMA 등을 많이 함유하고 있어 특유의 어취를 가진다(Cha et al., 1985; Park et al., 1968). 현재, 국내 홍어 가공업체에서는 가공부산물인 연골의 처리방안을 위해 사료로의 활용을 검토해보았으나 이러한 연골어류 특유의 어취로 인한 그 이용에 어려움이 많아 그 대부분이 폐기 처리되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 홍어가공업체에서 발생되는 가공부산물인 연골을 이용하여 고부가가치 기능성 chondroitin sulfate 성분을 추출·분리하여 식품소재 및 제품으로의 유효이용방안을 모색하기 위하여 단백질 분해효소를 이용한 홍어연골의 최적가수분해조건을 설정함과 아울러 홍어연골 효소가수분해물로부터 chondroitin sulfate를 효율적으로 분리·정제하는 방법에 관하여 연구하였다.



Chondroitins	R^2	R^3	R^4	R^6
Chondroitin	H	H	H	H
Chondroitin sulfate A	H	H	SO_3H	H
Chondroitin sulfate C	H	H	H	SO_3H
Chondroitin sulfate D	SO_3H	H	H	SO_3H
Chondroitin sulfate E	H	H	SO_3H	SO_3H
Chondroitin sulfate K	H	SO_3H	H	H

Fig. 1. Structural formula of chondroitin sulfate.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

1.1. 재료

본 실험에서 사용한 홍어(*Okamejei kenojei*)연골은 전라남도에 위치한 홍어 가공업체인 (주)영산포식품으로부터 냉동 상태로 제공받았으며 연골주위에 결착 되어있는 잔육 및 협잡물을 제거하기 위해 홍어연골을 97±1 ℃ 이상의 열수에 1 min 정도 정치시킨 후 열 변성 되어진 잔육을 냉수에서 수작업으로 제거한 뒤 수세, 배수하였다. 전처리 되어진 홍어연골은 chopper를 통해 분쇄한 후, 200 g씩 플라스틱 병에 밀봉하여 -20±1 ℃에 저장한 뒤 실험에 사용하였다.

1.2. 시약

본 실험에 사용되어진 chondroitin sulfate C, D-glucuronic acid lactone 그리고 Papain(EC 3.4.22.2)은 sigma사의 것을 구입하였고, Protamex복합효소는 고려식료주식회사에서 구입하였으며, Neutrase, Flavourzyme 그리고 Alcalase는 Novo Nordisk사에서 구입하였다. 기타 시약은 실험용 특급을 사용하였다.

1.3. 효소가수분해물의 제조

뮤코다당 소재를 제조하기 위하여 먼저 일정량의 홍어연골을 50±1 ℃에서 열풍 건조한 다음 분쇄하여 분말상(60 mesh)으로 한 뒤, 효소가수분해를 실시하였다. 홍어연골분말 100 g에 각종 식품공업용 단백질 분해효소를 2.0 %(w/w)의 농도로 첨가하고 10배 량의 인산완충용액을 가

한 다음 각 효소의 최적 활성조건에서 가수분해하였다. 즉, Papain(25℃, pH 6.2), Neutrase, Protamex, Flavourzyme(50℃, pH 6.0) 및 Alcalase(55℃, pH 8.0)를 사용하여 가수분해를 실시하였다. 효소를 실활 시키기 위하여 99±1 ℃ 탕욕 중에서 15 min 방치한 다음 3,000 rpm에서 30 min 원심분리하고 분무 건조하여 홍어연골의 가수분해물(뮤코다당·단백질 소재)을 제조하였다.

1.4. 알칼리 전처리에 따른 시료의 제조

홍어는 연골어류 특유의 TMAO와 urea에서 유래하는 TMA와 암모니아 등의 휘발성 염기질소 함량이 높아 이의 효율적인 제거를 위해 원료의 전처리 단계로서 알칼리 처리를 실시하였고 전 추출과정을 Fig. 2에 나타내었다. 먼저, 생원료를 chopper로 분쇄한 다음 분쇄물 200 g당 3배량의 0.1 M NaOH용액을 가하고 4±1 ℃에서 24시간 동안 교반시켰다. 알칼리 처리이후 홍어연골은 pH가 중성영역에 달하도록 유수(流水)로서 충분히 수세하였고 이를 50±1 ℃에서 열풍 건조한 다음 분쇄하여 분말상(60 mesh)으로 제조하였다. 홍어연골분말에 Alcalase 최적 액화조건인 효소농도 2.0 %(w/w)와 인산완충용액의 가수량 3배(w/w), 배양시간 1시간으로 가수분해를 실시한 뒤 효소를 실활 시키기 위하여 99±1 ℃ 탕욕 중에서 15 min 방치한 다음 3,000 rpm에서 30 min 원심분리하고 분무건조하여 홍어연골의 가수분해물(뮤코다당·단백질 소재)을 제조하였다.

1.5. 유기용매 분별침전물의 제조

홍어연골 뮤코다당·단백질로부터 chondroitin sulfate를 분리하기 위해 isopropyl alcohol 분별침전을 하였다. 즉, 홍어연골 뮤코다당·단백질을

증류수에 20 Brix 농도로 용해시킨 후 isopropyl alcohol를 적당한 농도로 첨가하고 생성된 침전물을 원심분리(3,000 rpm, 30 min)하여 상층액과 분리함으로써 홍어연골 뮤코다당·단백질의 분별침전물을 제조하였다. 제조한 분별침전물과 홍어연골 뮤코다당·단백질의 무게에 따른 백분비를 구하여 분별침전물의 수율로 하였으며 모든 값은 건물당의 값으로 계산하였다.

2. 실험방법

2.1. 일반성분 및 휘발성염기질소의 측정

일반성분은 상법에 따라 측정하였다. 즉, 수분은 상압가열건조법, 조지방은 Soxhlet법, 조단백질은 Kjeldahl법, 회분은 건식회화법으로 측정하였고, 휘발성염기질소(Volatile Basic Nitrogen: VBN)는 conway unit를 사용하는 미량확산법(日本厚生性編, 1976)으로 측정하였다.

2.2. 무기성분의 정량

무기성분의 함량은 유도결합 플라스마 방출분광기(ICP Atomic Emission Spectrometer, Thermo Jallell Ash, ICP-IRIS)와 원자 흡광 광도계(Atomic Absorption Spectrophotometer)를 사용하여 정량 하였다.

2.3. 가수분해도의 측정

가수분해율은 효소가수분해 처리 후 3,000 rpm에서 30 min 원심 분리한 후 얻어진 상층액을 건조하여 질소함량을 Kjeldahl법으로 정량하여 가수분해도(degree of hydrolysis)를 구하였다.

$$\text{가수분해도} = \frac{\text{가수분해 후 상층액의 총질소}}{\text{시료중의 총질소}} \times 100$$

2.4. Brix 값의 측정

가수분해 여과액의 농축정도를 확인하기 위하여 당도계측기(Hand Refractometer, ATAGO N1, N2)를 사용하여 Brix 값을 측정하였다.

2.5. Chondroitin sulfate의 정량

식품공전(2000년 9월 개정판) 13-16 뮤코다당·단백식품 4)시험방법 (3) ①항의 chondroitin sulfate 함량 시험분석법에 의거하여 정량 하였다. 즉, 검체를 수분이 흡습되지 않도록 신속하게 0.3 g을 정밀히 계량한 후 증류수를 가해 100 ml로 정용 하였으며, 이 액 4 ml를 정확히 취하여 증류수를 가해 20 ml로 정용하고 정량분석용 여지(5종 C)를 사용하여 여과한 것을 검액으로 하였다. 별도 2개의 비색관에 붕산나트륨황산 5 ml씩을 정밀히 달아 취하여 얼음물로 충분히 냉각하였으며, 냉각되어진 각각의 비색관에 검액과 표준용액을 정확히 1 ml씩을 취해 시액 위에 주의하여 가한 뒤 즉시 혼화하고 냉각하여 99±1 ℃의 열탕에서 10 min 반응시킨 후, 즉시 얼음물로 냉각하였다. 냉각되어진 각각의 비색관에 카바졸시액 0.2 ml를 정확히 가하여 혼화하고 99±1 ℃의 열탕에서 15 min 반응시키고 냉수로써 실온까지 냉각하였다. 이들의 액에 대하여 물 1.0 ml를 사용하여 동일하게 조작한 것을 blank로 하여, 530 nm에서 흡광도를 분광광도계로 측정하고 다음 식에 따라 chondroitin sulfate의 함량을 구하였다.

콘드로이친 황산의 함량 = 글루코론산(%) × 2.593

$$= \frac{\frac{\text{검액의 흡광도}}{\text{표준용액의 흡광도}} \times \text{표준품}(g) \times 1.1023}{\text{시료의 양}(g) \times 4} \times 100 \times 2.593$$

여기서, 2.5930 : 콘드로이친 황산의 분자량 / 글루쿠론산의 분자량

1.1023 : 글루쿠론산의 분자량 / δ-글루쿠로노락톤의 분자량

2.6. Cellulose acetate membrane electrophoresis

식품공전(2000년 9월 개정판) 13-16 뮤코다당·단백식품 4)시험방법 (2)항의 chondroitin sulfate 확인시험(전기영동)법에 의거하여 분석하였다. 즉, 5 cm의 셀룰로오스 아세테이트막의 단(끝)에서 1 cm의 위치에 0.5 cm 폭 간격으로 검액 및 표준용액을 각각 1 ㎕씩을 점적하고 단(끝)에서 1 cm스포트점의 정도를 음극치로 하여 영동용매의 증기로 포화한 영동조 내에서 0.5 mA/cm 20 min 영동을 하였고, 영동을 끝낸 셀룰로오스 아세테이트막을 꺼내어 염색제에 5 min 담근 후 1 % 초산용액으로 1회 씻고 다음에 물로 2회 씻은 다음, 콘드로이친황산의 표준물질과 동일한 위치에 적자색의 밴드(띠)를 확인하였다.

2.7. Ion exchange chromatography에 의한 chondroitin sulfate의 분리

Chondroitin sulfate를 정제하기 위하여 chondroitin sulfate 함량이 높은 40 % isopropyl alcohol 침전 획분을 20 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 현탁시킨 다음 원심분리하여 상층액을 취하고, 같은 완충용액으로 미리 평형화한 DEAE-sephacel ion exchange column (3.0×30.0 cm)에 loading한 후 NaCl을 함유한 완충용액을 사용하여 농도구배법(0.0~1.5 M)으로 용출(유속, 30.0 ml/hr ; 6.0 ml/fraction)한 다음, 280 및 530 nm에서 흡광도

를 측정하여 crude chondroitin sulfate 획분을 제조하였다.

2.8. Membrane filtration에 의한 chondroitin sulfate의 분리

Chondroitin sulfate를 정제하기 위하여 membrane filtration(ultrafiltration, UF) 공정을 실시했으며 membrane filtration에 사용한 모듈은 중공사막(Hollow fiber modules)이였고 molecular weight cut-off(MWCO)를 달리하여 YM100 (MWCO=100,000), YM50 (MWCO=50,000), YM30 (MWCO=30,000), YM10 (MWCO=10,000)으로 분리하였다. 먼저, 홍어연골 뮤코다당·단백질을 2.0 Brix로 용해시킨 뒤 예비여과단계로써 정량분석용 여지 5종 A와 5종 C를 사용하여 여과하였고, 분리공정은 실온에서 실시함으로 미생물에 의한 변패를 방지하기 위해 121 ℃에서 15 min 살균처리를 하였다. 살균된 여과액을 실온까지 냉각시킨 뒤, YM100의 feed로 하였으며 각 단계의 feed는 전 단계의 permeate로 하였다. 각 단계의 retentate를 회수하여 농축·건조한 뒤, 분리 단계별 성분변화를 분석하였다.

2.9. FT-IR 분석

유기용매 분별침전물과 ion exchange chromatography 그리고 membrane filtration 분획물 각각 전기영동을 통해 동정한 결과, chondroitin sulfate가 확인되어졌다. 이러한 분획물을 FT-IR / Raman Spectrophotometer (Bruker IFS 66 / FRA 106, Germany)로 분석함으로써 분획물 중의 chondroitin sulfate를 동정하였다.

2.10. NMR 분석

300 MHz FT-NMR Spectrometer(Varian Unity Plus 300, USA)을 통해 유

기용매 분별침전물과 ion exchange chromatography 그리고 membrane filtration 분획물을 chondroitin sulfate 표준품과 비교하여 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR으로 동정하였다.

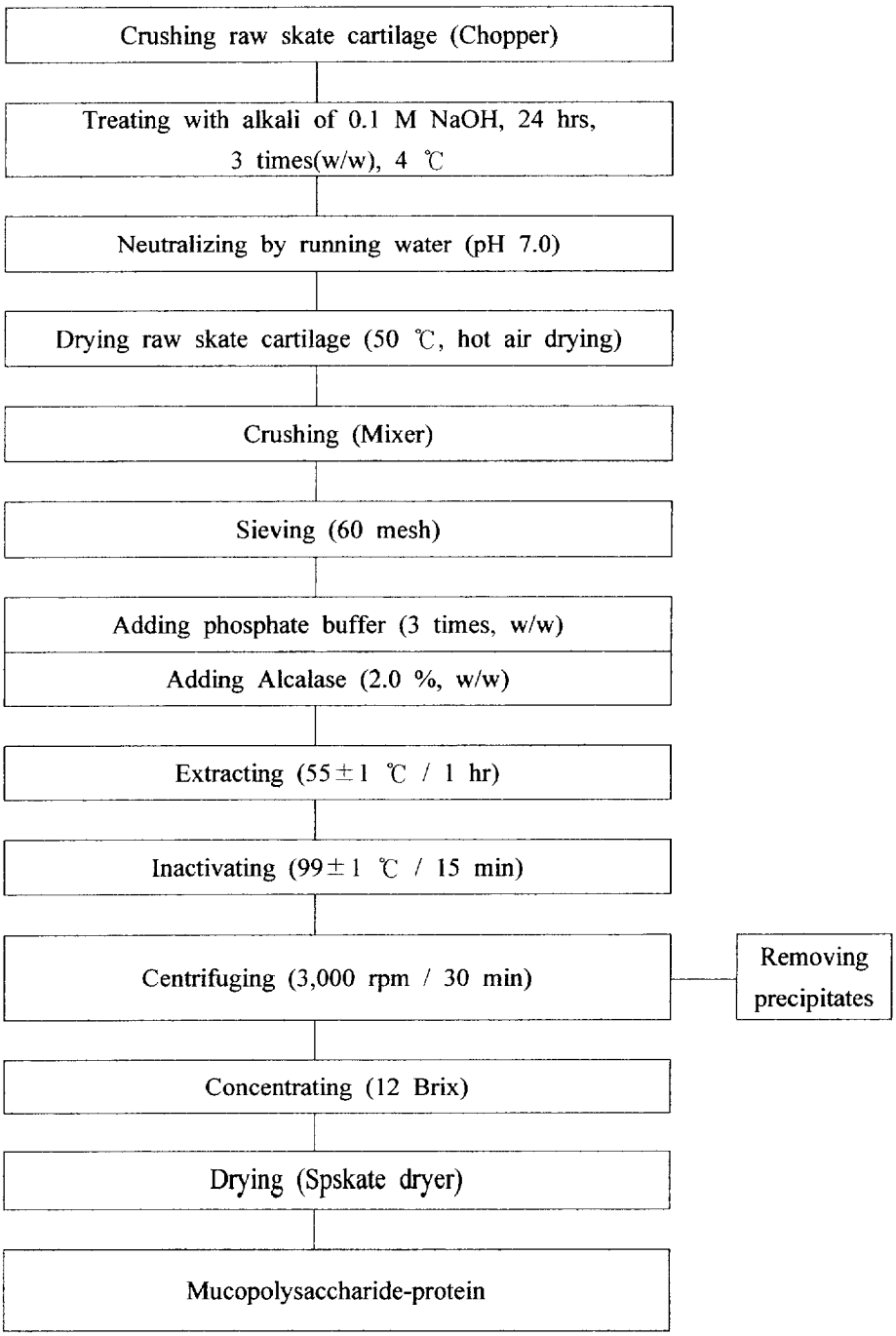


Fig. 2. Manufacturing process of mucopolysaccharide-protein product from skate cartilage.

결과 및 고찰

1. 홍어연골중의 일반성분 및 무기성분

본 실험에 사용한 홍어 연골의 일반성분 및 휘발성염기질소를 분석하여 Table 1에 나타내었다. 그 결과 건물당의 경우에서는 조단백질 성분이 43.6 %, 회분이 40.3 %로써 거의 대부분을 차지하였고 탄수화물은 9.9 %, 수분은 4.7 %였으며 조지방은 1.5 %의 낮은 함량을 보였다.

Chondroitin sulfate의 경우에서는 1.0 %로 낮은 수치를 나타내고 있으나 이는 단백질과 결합된 형태인 mucopolysaccharide-protein으로 존재하기 때문이며 chondroitin sulfate의 함량을 높이기 위해서는 이러한 단백질과의 결합상태를 끊어 유리상태로 만드는 것이 필수적이다(Huckerby et al., 1998).

휘발성 염기 질소의 경우 226.3 mg/100g으로 매우 높은 값을 보였는데 이는 상어나 가오리 같은 판새류에는 원래 다량의 요소나 TMAO를 함유하여 암모니아, TMA 및 DMA의 생성량이 많은 원료특이성에서 기인한 것이다(Cha et al., 1985).

한편, 무기성분은 홍어연골의 건조물과 가수분해이후의 잔사, 가수분해물 이상의 3종류로 분류하여 가수분해에 따른 성분변화를 Table 2에 나타내었다. 그 결과, 홍어연골의 건조물의 경우 Ca과 P이 각각 10.4 %와 7.2 %로 다른 무기성분보다 높게 검출되었고 가수분해이후의 잔사에서도 Ca과 P이 각각 30.7 %와 18.8 %로서 높은 함량을 나타났다. 홍어연골 가수분해물의 경우는 Ca과 P이 각각 1.63 %와 0.03 %였고 S과 Na의 함량이 각각 2.56 %와 1.78 %로 높은 함량을 나타내었다. 특히, 가수분해물의 무기성분에서 Ca과 P의 함량에 비해 S의 함량이 더 높은 값을

Table 1. Proximate composition of skate cartilage

Components	Raw	Dried[a]
Moisture (%)	77.9±1.4[b]	4.7±0.1
Crude protein (%)	10.8±0.2	43.6±0.2
Crude lipid (%)	1.3±0.1	1.5±0.3
Crude ash (%)	9.2±0.1	40.3±0.0
Tatal carbohydrate[c] (%)	0.9±0.2	9.9±0.2
Volatile basic nitrogen (mg/100g)	30.6±0.5	226.3±2.3
Chondroitin sulfate (%)	0.4±0.4	1.0±0.7

[a] Dried skate cartilage

[b] Mean ± S.D.

[c] 100 - (moisture + crude protein + crude lipid + crude ash)

Table 2. Metal contents of skate cartilage before and after Alcalase treatment

Metals	Content, ppm (Dry basis)		
	A	B	C
Ca*	10.4 (%)	30.7 (%)	1.6 (%)
P*	7.2 (%)	18.8 (%)	0.03 (%)
S*	1.9 (%)	0.7 (%)	2.6 (%)
Na*	1.3 (%)	0.4 (%)	1.8 (%)
K*	6601.4	39.0	2120.6
Fe*	74.1	33.3	73.9
Zn*	80.6	219.4	17.3
As*	35.7	N.D.	N.D.
Pb*	10.0	18.6	6.6
Sn*	1.7	N.D.	N.D.
Cu*	9.7	21.3	61.6
Hg**	0.02	0.7	0.02

* Analyzed by ICP Atomic Emission Spectrometer

** Analyzed by Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS)

A : Dried skate cartilage

B : Residues of hydrolysate by Alcalase skate cartilage

C : Supernatants of hydrolysate by Alcalase skate cartilage

나타내었는데 이는 chondroitin sulfate의 황산기로부터 기인하는 수치임을 알 수 있다.

2. 단백질 분해효소의 종류에 따른 홍어연골의 가수분해도의 변화

연골 중의 뮤코다당은 단백질과 결합된 상태로 존재한다. 그러므로, 뮤코다당 소재를 제조하기 위해서는 단백질의 효율적인 가수분해가 필요하므로 각종 단백질 분해효소를 이용하여 원료를 가수분해하고 가수분해물의 가수분해도와 chondroitin sulfate를 측정함으로써 효소가수분해에 적합한 최적 효소를 선정하고자 하였다.

홍어연골을 기질로 할 때 각종 단백질 분해 효소를 사용하여 가수분해 12시간, 효소농도 3.0 % 및 각 효소의 최적 pH에서 가수분해하고, 각 가수분해물의 가수분해도와 chondroitin sulfate 함량을 측정하여 Table. 3에 나타내었다. 그 결과, 각종 단백질 분해 효소의 단일사용과 각종 단백질분해효소 처리이후 순차적인 Flavourzyme 분해의 복합사용에서 chondroitin sulfate의 함량은 17.5~20.0 %으로 나타났다. 즉, 각종 단백질분해효소의 단일사용 및 복합사용으로 인한 chondroitin sulfate의 함량차이는 근소하였다. 가수분해도에 있어서는 63.1~80.0 %로 단백질분해효소에 따라 차이를 보이고 있으나 chondroitin sulfate의 함량과 시판되는 효소의 가격을 고려해 보았을 때 Alcalase는 1 kg당 $ 8.6로써 다른 효소에 비해 가장 저렴한 가격으로 판매되는 점과 시험한 여러 효소 중에서 chondroitin sulfate의 추출효과 및 추출공정, 경제성을 고려할 때 가장 적합한 것으로 나타났다.

Table 3. Degree of hydrolysis and chondroitin sulfate content of skate cartilage homogenates by proteases

Proteases[a]	Degree of hydrolysis(%)[b]	Chondroitin sulfate(%)
Flavourzyme	71.3±0.2	19.23±1.5
Alcalase	63.1±1.1	17.85±0.8
Alcalase + Flavourzyme	74.8±1.9	17.47±2.0
Neutrase	69.8±0.4	19.95±0.7
Neutrase + Flavourzyme	79.8±1.3	18.82±0.6
Papain	69.5±0.7	18.03±1.6
Papain + Flavourzyme	79.5±1.1	18.96±0.4
Protamex	66.9±1.9	17.81±1.1
Protamex + Flavourzyme	76.9±1.4	18.53±0.6

[a] Enzymes were treated at the optimum temperature and pH (alcalase; 55℃/pH 8.0, neutrase; 50℃/pH 6.0, papain; 25℃/pH 6.2, protamex; 50℃/pH 6.0, flavourzyme; 50℃/pH6.0).

[b] Dry basis(w/w, %), Mean± S.D.

3. Alcalase에 의한 홍어연골의 최적 가수분해 조건의 설정

홍어연골으로부터 Alcalase를 이용한 chondroitin sulfate 추출의 최적 액화조건을 결정하기 위해 Alcalase 농도, 가수분해시간 및 인산완충용액의 가수량이 가수분해에 미치는 영향을 알아보았다. Alcalase의 최적 가수분해 농도를 결정하기 위하여, Alcalase를 기질인 홍어연골 분쇄·건조분말에 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 6.0, 10.0 %의 농도로 가했을 때의 가수분해도와 chondroitin sulfate의 함량을 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과, 가수분해도의 경우 Alcalase를 0.1 % 첨가했을 때 가수분해도가 65.0 %로 약간 낮은 것을 제외하면 0.5 % 이상 10.0 %까지는 가수분해도가 68.0 % 내외로 균일하게 나타났다. 그러나, chondroitin sulfate의 함량은 첨가한 효소의 양과는 무관하게 17.0 %로 대체로 균일하게 나타났다. 따라서, Alcalase 첨가량은 홍어연골의 건물당 2.0 %정도 가해 주는 것이 적절하였다.

Alcalase에 의한 홍어연골 분쇄·건조분말의 가수분해시 효과적인 배양시간을 조사하기 위하여 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 hrs으로 반응시켜 Fig. 4에 나타내었다. 그 결과, 가수분해도는 0.5시간까지는 60.0 %였고 1시간 이후의 가수분해도는 70.0 % 내외로 일정하게 나타났으며 chondroitin sulfate의 함량은 17.0 %로 배양시간에 따라 거의 일정하게 나타났다. 따라서, 가수분해시간은 경제적인 면을 고려하였을 때 가수분해도에서 큰 차이가 없는 가수분해 1시간이 가장 적당할 것으로 판단되었다.

또한, Alcalase에 의한 홍어연골 분쇄·건조분말의 가수분해에서 홍어연골 분쇄·건조분말의 중량을 기준으로 인산완충용액의 가수량에 따른 가수분해도와 chondroitin sulfate의 함량을 측정하여 Fig. 5에 나타내었

다. 그 결과, 홍어연골 분쇄·건조분말의 중량당 물을 가하지 않은 시험구로부터 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25배량의 인산완충용액을 가하여 가수분해 한 후의 가수분해도와 chondroitin sulfate의 함량은 인산완충용액을 가하지 않았을 때부터 2배량, 즉 홍어연골 분쇄·건조분말의 중량비로서 2배량의 인산완충용액을 가했을 때까지는 분말에 비해 완충용액의 양이 부족하여 현탁액 상태로 되지 않아 가수분해가 불가능하였다. 3배량의 인산완충용액을 첨가했을 때는 가수분해도가 75.0 %였고 chondroitin sulfate는 21.0 %로 가장 높은 값을 나타내었고 4배량과 5배량에서의 가수분해도는 각각 74.0 %와 73.0 %였고, chondroitin sulfate의 함량은 각각 21.0 %와 20.0 %였다. 그리고, 10배 이상의 가수량에 있어서 가수분해도와 chondroitin sulfate의 함량은 점차 감소함을 나타내었다. 그러므로, 가수량에 따른 alcalase 가수분해에서는 최소 3배량의 인산완충용액을 가하여 분해하는 것이 가장 적당할 것으로 판단된다.

따라서, Alcalase를 이용한 홍어연골 분쇄·건조분말의 최적 액화조건을 검토한 결과 효소의 첨가량은 2.0 %(w/w), 인산완충용액의 가수량은 3배(w/w), 배양시간은 55±1 ℃에서 1시간동안 가수분해하는 것이 최적 액화조건으로 나타났다.

4. 홍어의 불쾌취 제거를 위한 알칼리 전처리의 영향

홍어연골로부터 휘발성 염기질소의 효율적인 제거를 위하여 NaOH의 최적 처리농도를 살펴보았다. 먼저, 홍어연골 분쇄·건조분말에 0.00, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 M의 농도로 가했을 때의 chondroitin sulfate와 휘발성 염기질소 및 황의 함량을 측정한 뒤, 알칼리 처리공정을 적용시키지 않은 기존의 chondroitin sulfate 추출공정을 통해 제조되어진 뮤코

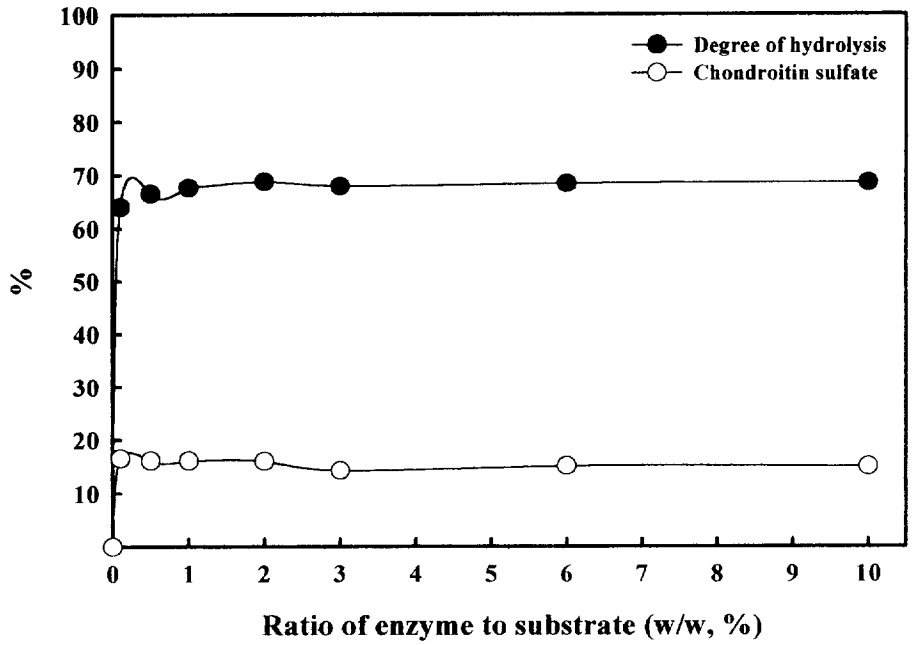


Fig. 3. Degree of hydrolysis and chondroitin sulfate of skate cartilage hydrolysates as affected by Alcalase concentration.

Dried skate cartilage was hydrolyzed by 2% Alcalase (dry basis) at 55℃ for 1hr.

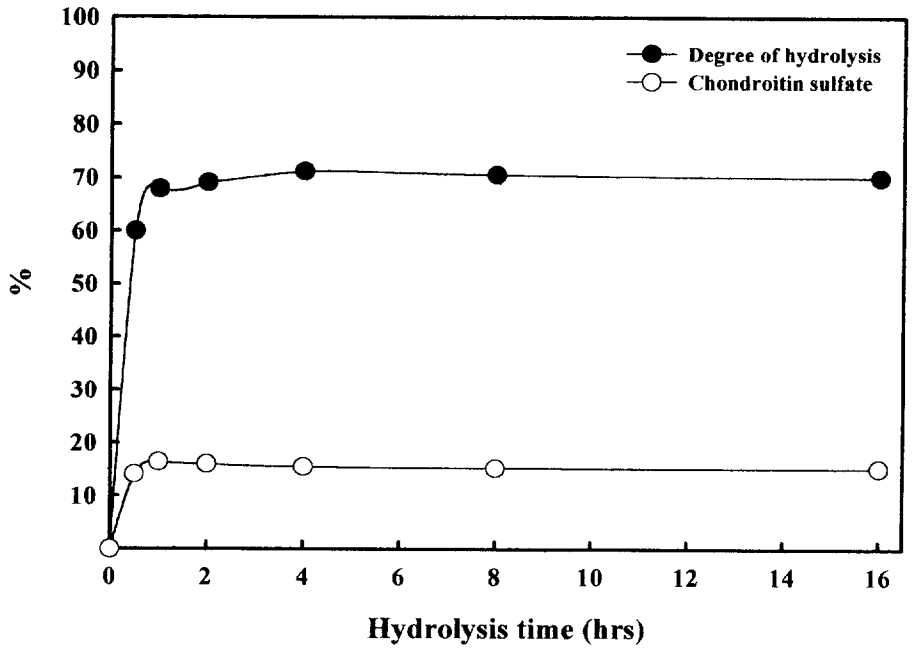


Fig. 4. Degree of hydrolysis and chondroitin sulfate of skate cartilage hydrolysates as affected by hydrolysis time.

Dried skate cartilage was hydrolyzed in 10 volumes(v/w) of phosphate buffer (pH 8.0) at 55℃ by 2% Alcalase.

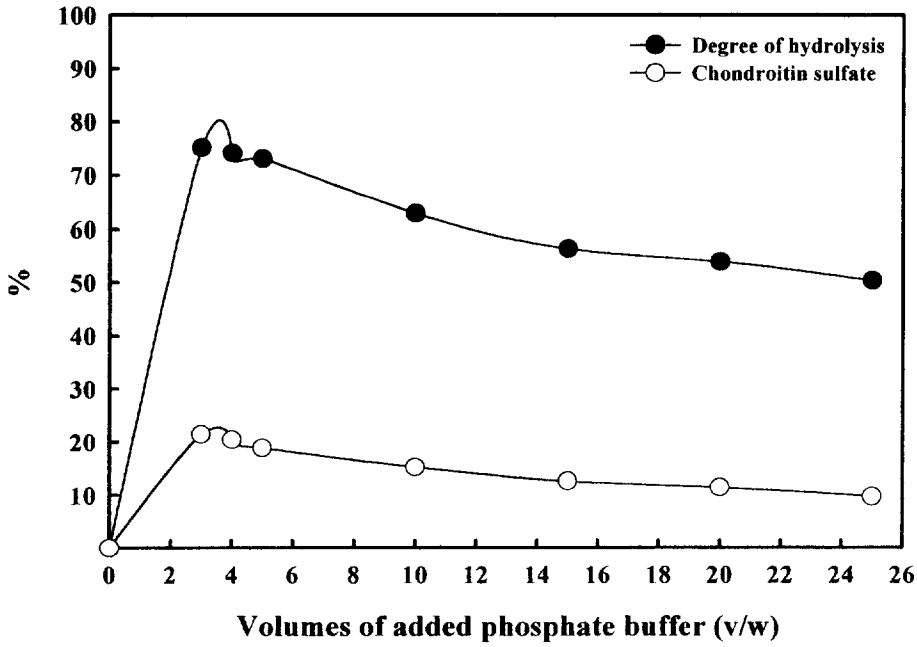


Fig. 5. Degree of hydrolysis and chondroitin sulfate of skate cartilage hydrolysates as affected by amount added phosphate buffer.

Dried skate cartilage was hydrolyzed by 2% Alcalase(dry basis) at 55℃ for 1hr.

다당·단백질과 비교하여 Fig. 6에 나타내었다. 그 결과, 0.00M NaOH의 경우, 휘발성 염기질소의 함량은 99.0 mg/100g으로 나타났고 이는 알칼리 전처리 단계에서 알칼리 용액이 아닌 물로써만 처리했을 때도 휘발성 염기질소의 함량이 기존의 추출공정에 비해 낮아짐을 알 수 있었다. 또한, 황의 함량은 98.0 mg/100ml로 나타났고 기존의 추출공정에 따른 황의 함량은 99.0 mg/100ml으로 나타내어 0.00 M NaOH의 처리조건에서 황 함량의 변화는 근소함을 알 수 있었다. Chondroitin sulfate의 함량은 30.0 %를 나타내어 기존의 추출공정에 따른 chondroitin sulfate의 함량인 21.0 % 보다 상승함을 알 수 있었다. 0.05 M NaOH로 처리한 경우, 휘발성 염기질소는 50.0 mg/100g으로 나타내어 기존의 추출공정과 0.00 M NaOH로 처리했을 때 보다 훨씬 낮아짐을 알 수 있다. Chondroitin sulfate와 황의 함량은 각각 29.0 %와 89.0 mg/100ml로 나타내어 0.00 M NaOH처리의 경우와 유사한 값을 나타내었다. 0.10 M NaOH이상의 농도로 처리한 경우, 휘발성 염기질소의 함량은 계속 감소됨을 나타내어 높은 탈취효과를 기대할 수 있으나 황 및 chondroitin sulfate의 함량이 큰 폭으로 감소되어 chondroitin sulfate의 추출공정에 부적절한 것으로 나타났다. 즉, 알칼리 용액의 농도가 높을수록 홍어연골 유래의 뮤코다당·단백질에서 황함량 및 chondroitin sulfate의 함량이 낮아졌으며 휘발성 염기질소 함량 또한 급격히 감소되는 것을 알 수 있었다. 따라서, 4 ℃의 냉장 조건에서 1일 동안 처리를 할 경우, 0.05 M NaOH 농도의 알칼리 처리 조건이 홍어연골 유래의 뮤코다당·단백질에 있어서 chondroitin suflate 함량 및 황산기의 큰 손실 없이 효과적으로 휘발성 염기질소를 제거할 수 있는 것으로 나타났다.

홍어연골로부터 휘발성 염기질소의 효율적인 제거를 위한 최적 처리

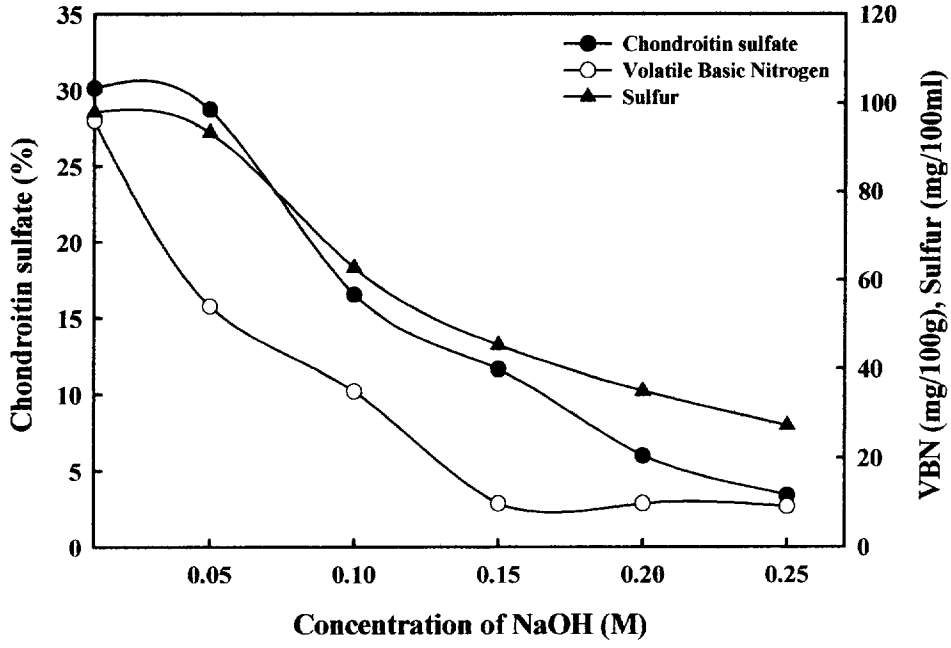


Fig. 6. Change of chondroitin sulfate, volatile basic nitrogen and sulfur contents of skate cartilage hydrolysates as affected by alkali concentration.

Skate cartilage was treated with sodium hydroxide for 1 day at 4 ℃, and hydrolyzed by 2.0 %(w/w) Alcalase at 55±1 ℃ for 1hr.

농도인 0.05 M NaOH용액의 처리 시간에 따른 chondroitin sulfate, 휘발성 염기질소 및 황 함량 변화를 측정한 뒤, 알칼리 처리공정을 적용시키지 않은 기존의 chondroitin sulfate 추출공정을 통해 제조되어진 뮤코다당·단백질과 비교하여 Fig. 7에 나타내었다. 그 결과, 휘발성 염기질소 함량은 15시간 처리시 85.0 mg/100g을 나타내어 15시간까지는 일정수준으로 감소함을 알 수 있었고, 20시간 처리했을 때 43.0 mg/100g으로 나타났으며 20시간 이상의 처리시간에서는 일정수준을 유지하였다. 황 함량은 처리시간에 관계없이 98.0 mg/100ml전후의 일정한 값을 나타내었다. 또한, chondroitin sulfate 함량 역시, 30.0 %전후의 일정한 값을 나타내었다. 따라서, 4℃의 냉장 조건에서 0.05 M NaOH 농도의 알칼리 처리를 할 경우, 20시간 알칼리 처리 조건이 홍어연골 유래의 뮤코다당·단백질에 있어서 적절한 것으로 나타났다.

알칼리 전처리 최적조건인 4 ℃에서 0.05 M NaOH와 20시간의 교반시간에서 처리한 홍어연골을 chondroitin sulfate의 추출공정에 적용하여 제조되어진 뮤코다당·단백식품으로부터 chondroitin sulfate의 존재를 확인하기 위하여 cellulose acetate 막 전기영동을 하여 Fig. 8에 나타내었다. 그 결과, 표준품인 chondroitin sulfate C와 알칼리 처리공정을 적용시키지 않은 기존의 chondroitin sulfate 추출공정을 통해 제조되어진 뮤코다당·단백질의 band 이동도는 동일하였고 알칼리 처리공정을 적용시킨 뮤코다당·단백질의 band 이동도는 표준품과 약간의 차이를 나타내었다.

5. 홍어연골 효소가수분해물의 성분 특성

홍어연골 분쇄·건조분말을 Alcalase 최적 액화 조건에서 가수분해한 뒤

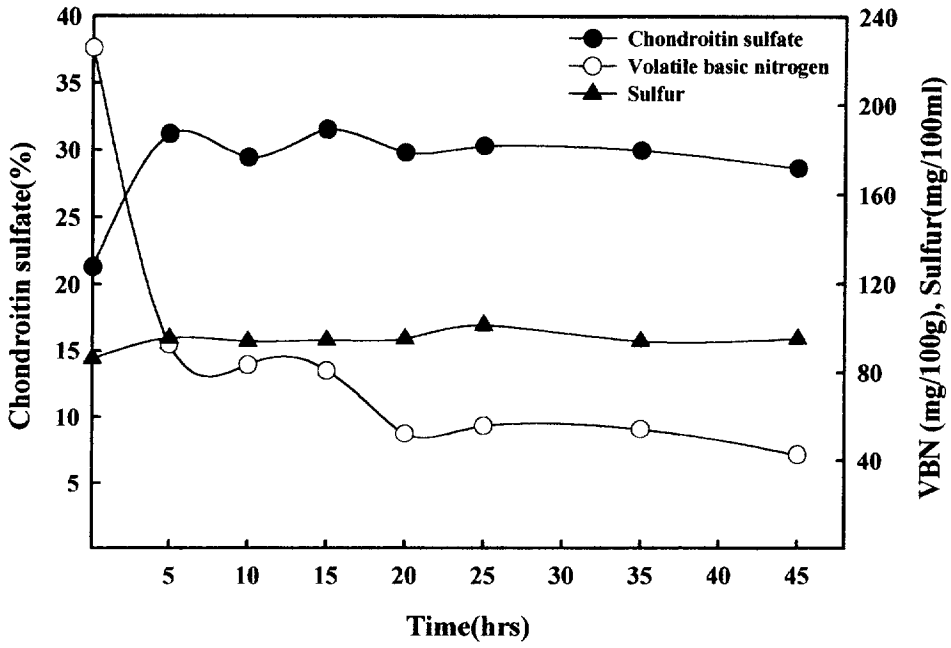


Fig. 7. Changes of chondroitin sulfate, volatile basic nitrogen and sulfur contents of skate cartilage hydrolysates as affected by alkali treatment.

Skate cartilage was treated with 0.05N sodium hydroxide at 4 ℃, and hydrolyzed by 2.0 %(w/w) Alcalase at 55±1 ℃ for 1 hr.

A B C

Fig. 8. Cellulose acetate membrane electrophoresis of skate cartilage hydrolysates after alkali pretreatment.

A : Authentic chondroitin sulfate C

B : Skate cartilage hydrolysates by Alcalase(pH 8.0, 55±1 ℃ and 1 hr)

C : Skate cartilage hydrolysates by Alcalase after alkali protreatment(0.05 N NaOH, 4 ℃ and 20 hrs)

3,000 rpm, 30 min 동안 원심분리하여 상층액을 농축·분무건조한 분말의 일반성분 및 휘발성 염기 질소와 chondroitin sulfate의 함량을 측정하여 가수분해 전과 가수분해 이후의 함량변화를 Table 4에 나타내었다. 그 결과, 수분은 5.5 %였고 조지방은 0.6 %으로써 가수분해 전후의 함량 차이는 근소하였으나 조단백질이 67.9 %, 탄수화물이 13.7 %로 증가하였고 회분이 12.4 %로써 감소하였다. 이는 chondroitin sulfate 추출공정에서 효소 가수분해 이후 불용잔사가 제거됨으로 회분 함량이 감소하는 것이며 상대적으로 조단백질과 탄수화물의 함량이 증가하는 것으로 여겨진다. 또한, 휘발성 염기 질소의 경우는 225.9 mg/100g이었고 이러한 값은 chondroitin sulfate 추출 공정 상에서 제거되지 않고 원시료의 휘발성 염기 질소 함량이 효소 가수분해 이후에도 유지됨을 알 수 있다. Chondroitin sulfate는 21.3 %로 증가하였는데 이는 홍어연골의 단백질과 결합되어져 있던 chondroitin sulfate가 단백질 분해 효소의 작용으로 인해서 유리상태로 분리되어진 것을 나타낸다.

현재 우리나라 식품공전상으로는 뮤코다당·단백식품류의 제품은 건강보조식품군에 속하는 것으로 Table 5에 나타낸 바와 같이 수분은 8.0 % 이하이고 chondroitin sulfate 정성시험에서 확인되어야 하며 뮤코다당·단백질 함량이 77.0 % 이상이어야 하며 chondroitin sulfate와 단백질의 함량비가 3이상 9미만의 범위에 들어야 하는 규격 기준을 만족하여야 한다. 따라서, chondroitin sulfate의 추출공정상에서 제조되어진 홍어연골 가수분해물로부터 chondroitin sulfate의 존재를 확인하기 위하여 cellulose acetate 막 전기영동을 하여 Fig. 9에 나타내었다. 그 결과, chondroitin sulfate C의 표준품과 이동도가 동일한 것으로 나타났다. 그리고, Table에서는 식품공전상의 뮤코다당·단백식품 성분규격을 나타내었고 이에

따른 홍어연골 가수분해물의 뮤코다당·단백식품으로써의 적합성을 검토하였다. 그 결과, 수분은 5.5 %, 단백질과 chondroitin sulfate의 비율은 3.19를 나타내었고 단백질과 chondroitin sulfate의 총 함량은 89.1 %였다. 따라서, 본 실험의 chondroitin sulfate 추출공정상에서 제조되어진 홍어연골 가수분해물은 식품공전상의 뮤코다당·단백식품으로써 적합한 것으로 나타났다.

6. 홍어연골 효소가수분해물로부터 chondroitin sulfate의 분리 및 정제

홍어연골 뮤코다당·단백질로부터 chondroitin sulfate를 다량 함유하는 정제 소재를 제조하기 위하여 침전제를 첨가하여 chondroitin sulfate 고함유 침전물을 제조하였다. 먼저, 홍어연골 뮤코다당·단백질을 20 Brix 농도로 용해한 뒤, 침전제로서 isopropyl alcohol를 사용하였으며 최종농도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 %로 달리하여 첨가한 후, 1시간 정도 방치하여 분별침전을 한 뒤 수율과 chondroitin sulfate, 휘발성 염기질소를 측정하여 Fig. 10에 나타내었다. 그 결과, isopropyl alcohol의 최종농도가 10 %와 20 %로 맞춘 경우, 침전물이 생성되지 않았으며 최종농도를 30 %로 하였을 때부터 침전물이 생성되었다. 각각의 isopropyl alcohol중 최종농도가 40 %로 첨가하였을 때가 수율이 30.0 %였고 이때의 chondroitin sulfate는 52.0 %로 가장 높은 값을 나타내었으며 휘발성 염기질소는 25.0 mg/100g로 매우 감소하였다. 첨가되어지는 isopropyl alcohol의 농도가 높아질수록 수율은 점차 증가함을 보이고 있으나 chondroitin sulfate는 최종농도 40 %의 isopropyl alcohol 함량보다 감소함을 나타내었고 휘발성 염기질소의 함량은 최종농도 40 %의 isopropyl

Table. 4. Proximate composition of mucopolysaccharide-protein extracted from skate cartilage by Alcalase treatment

Component	Mucopolysaccharide-protein[a]
Moisture (%)	5.5 ± 0.1[b]
Crude protein (%)	67.9 ± 0.1
Crude lipid (%)	0.6 ± 0.0
Crude ash (%)	12.4 ± 0.1
Tatal carbohydrate[c] (%)	13.7 ± 0.1
Volatile basic nitrogen (mg/100g)	225.9 ± 2.6
Chondroitin sulfate (%)	21.3 ± 0.1

[a] Hydrolysates treated by Alcalase from skate cartilage

[b] Mean ± S.D.

[c] 100 - (moisture + crude protein + crude lipid + crude ash)

Table 5. KFDA[a] regulation on the foods containing mucopolysaccharide-protein

Items	Regulation of K.F.D.A.	Product from skate cartilage
Moisture (%)	≦ 8.0	5.5 ± 0.1
Chondroitin sulfate	Positive	Positive
Ratio of chondroitin sulfate and protein	3.0 ~ 9.0	3.2
Total amount of protein and mucopolysaccharide (%)	≧ 77.0	89.2

[a] KFDA ; Korea Food & Drug Administration.

A B

Fig. 9. Cellulose acetate membrane electrophoresis of skate cartilage hydrolysates by Alcalase.

A : Authentic chondroitin sulfate C

B : Skate cartilage hydrolysates by Alcalase (pH 8.0, 55±1 ℃, 1 hr)

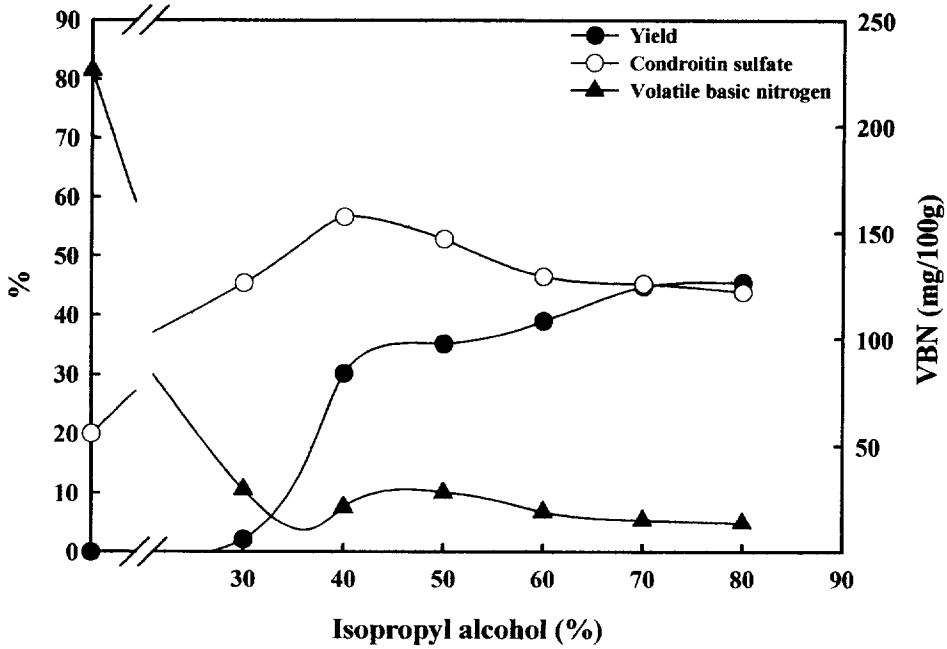


Fig. 10. Changes of yield, chondroitin sulfate and VBN contents of precipitates fractionated from skate cartilage hydrolysates as affected by isopropyl alcohol concentration.

alcohol 함량과 큰 변화없이 일정하게 유지하였다. 따라서, isopropyl alcohol 분별침전에 있어서 최적농도는 40 %임을 나타낸다. 유기용매 분별침전을 위해서는 먼저, 홍어연골 뮤코다당·단백질을 증류수에 용해시켜야 하는데 이 때의 chondroitin sulfate를 다량 함유할 수 있는 가용농도를 설정하기 위하여 5, 10, 15, 20, 30, 40 Brix로 달리한 뒤, 최종농도 40 %의 isopropyl alcohol를 첨가하여 분별침전을 하였고 수율과 chondroitin sulfate, 휘발성 염기질소를 측정하여 Fig. 11에 나타내었다. 그 결과, 홍어연골 뮤코다당·단백질을 5 Brix 용액으로 한 뒤, 침전제를 첨가하였을 때는 침전물이 형성되지 않았고, 10 Brix의 용액으로 하였을 때 수율은 20 %였고 이 때의 chondroitin sulfate는 69 %로 가장 높은 값을 나타내었으며 휘발성 염기질소는 25 mg/100g로 나타났다. 홍어연골 뮤코다당·단백질의 가용농도가 15 Brix일 때, 수율은 30 %로 높아졌으며 이 후 가용농도 Brix가 상승함에 따라 수율도 증가함을 나타내었고, chondroitin sulfate의 경우 63 %였고 가용농도 Brix가 상승함에 따라 chondroitin sulfate의 함량은 감소하여 홍어연골 뮤코다당·단백질의 가용농도 40 Brix일 때 39 %로 나타났다. 휘발성 염기질소는 25 mg/100g이였고 일정한 값을 나타내었다. 따라서, 고순도의 chondroitin sulfate 침전물을 얻기 위한 홍어연골 뮤코다당·단백질의 최적 Brix는 10 Brix로 나타났다.

유기용매 분별침전의 최적조건인 10 Brix 홍어연골 뮤코다당·단백질의 용액에 최종농도 40% isopropyl alcohol를 첨가하여 제조한 crude chondroitin sulfate를 cellulose acetate 막 전기영동을 하여 Fig. 12에 나타내었다. 그 결과, 표준품인 chondroitin sulfate C와 알칼리 전처리 공정을 적용시키지 않은 chondroitin sulfate 추출공정의 뮤코다당·단백질의

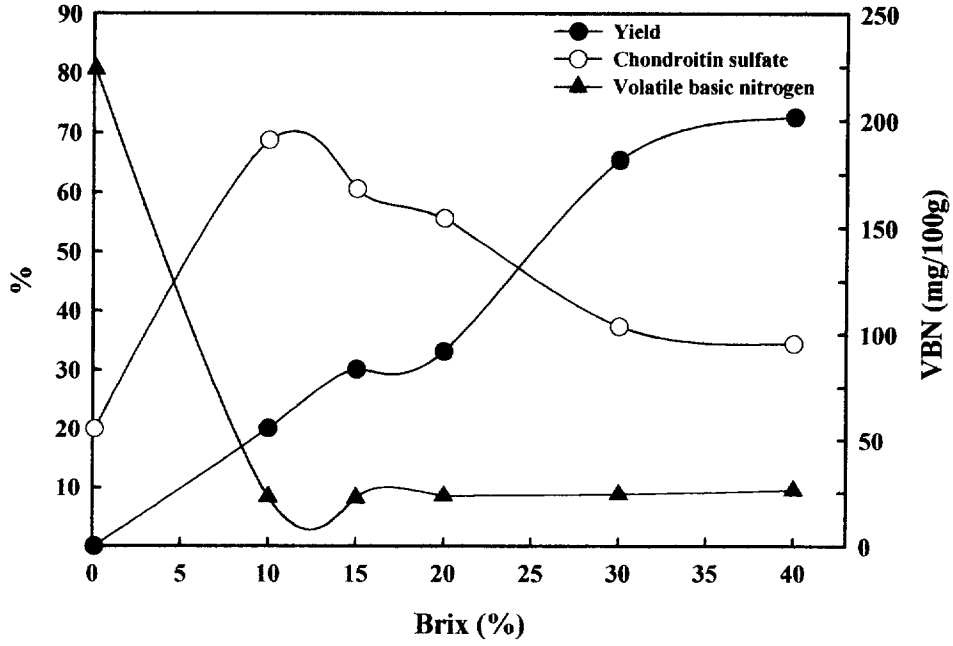


Fig. 11. Yield, chondroitin sulfate and VBN contents of 40% isopropyl alcohol precipitates from skate cartilage hydrolysate of different concentration as affected by concentration of soluble solids.

A B C D

Fig. 12. Cellulose acetate membrane electrophoresis of isopropyl alcohol precipitates from skate cartilage hydrolysate.

A : Authentic chondroitin sulfate C

B : Skate cartilage hydrolysates by Alcalase(pH 8.0, 55±1 ℃ and 1 hr)

C : Skate cartilage hydrolysates by Alcalase after alkali protreatment(0.05 N NaOH, 4 ℃ and 20 hrs)

D : 40 % isopropyl alcohol precipitate

band 이동도는 동일하였고, 알칼리 처리공정을 적용시킨 뮤코다당·단백질과 유기용매 분별침전물인 crude chondroitin sulfate의 band 이동도는 동일하였고 표준품과는 약간의 차이를 나타내었다.

홍어연골 뮤코다당·단백질로부터 유기용매 분별침전 최적 조건으로 처리한 분획물을 다시 DEAE-sephacel ion exchange chromatography로서 분획하였으며, 그 chromatogram을 Fig. 13에 나타내었다. 그 결과, Ⅰ과 Ⅱ의 2개 획분을 얻을 수 있었으며, 획분 Ⅰ은 20 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로만 용출함으로써 분획하였으며, 획분 Ⅱ는 인산완충액에 NaCl을 0.0～1.5 M까지 농도 구배로 용출시켜 분획하였다. 각 획분 중 530 nm에서 높은 흡광도를 나타내는 획분 Ⅱ만 모아서, membrane filtration (molecular weight cut-off 10,000)으로 탈염 및 농축한 다음 동결건조하여 홍어연골의 ion exchange chromatography에 의한 건조 획분을 제조하였다. 그 결과, 획분 Ⅱ의 chondroitin sulfate 함량은 78 %로 나타내었다. 또한, cellulose acetate 막 전기영동을 하여 Fig. 14에 나타내었다. 그 결과, 표준품인 chondroitin sulfate C와 획분 Ⅱ의 band 이동도가 동일하였다.

막분리에 사용되는 모듈의 형태는 크게 평판형(Plate & Frame), 관형(Tubular), 나권형(Spiral Wound) 그리고 중공사형(Hollow Fiber)으로 나누어지며, 본 실험에서는 단위 부피당 막면적이 큰 중공사형(Hollow Fiber)을 사용하였다. 또한, 한외여과막의 종류는 그 특성에 따라 PM, XM 그리고 YM으로 분류되어지는데, 본 실험에서는 유효분자량이 2,000～100,000이며 친수성막의 특성을 갖는 YM막을 사용하였다(Yoon et al., 1995). 홍어연골 뮤코다당·단백질로부터 molecular weight cut-off (MWCO)를 달리하여 YM100 (MWCO=100,000), YM50 (MWCO=50,000),

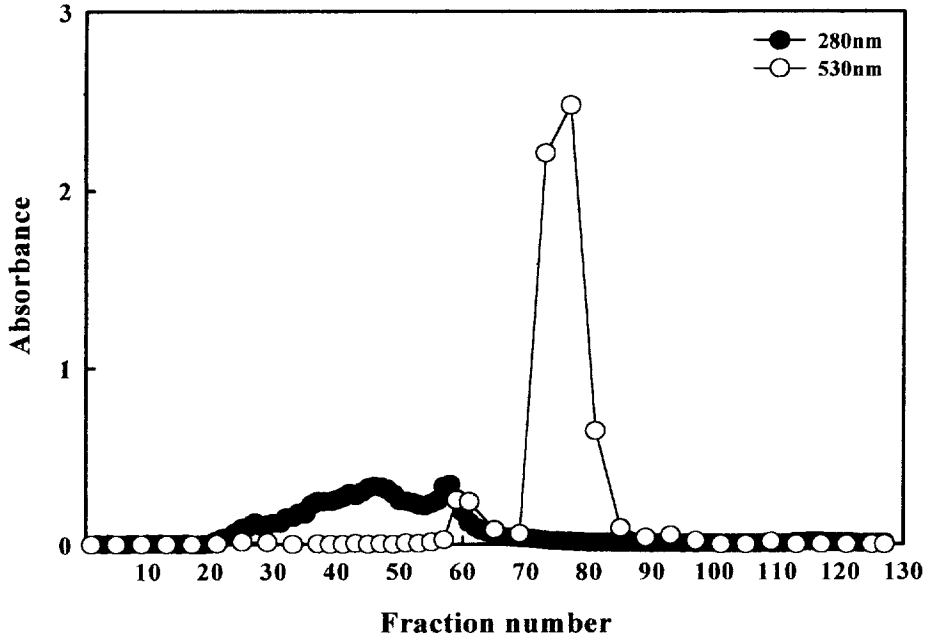


Fig. 13. DEAE-Sephacel chromatograms of isopropyl alcohol precipitate from skate cartilage hydrolysate.

The precipitate from skate cartilage was eluted on a DEAE-sephacel ion exchange column(2.9 × 30.0 cm) with 20mM phosphate buffer(pH 7.0) and gradient from 0.0~1.0 M NaCl same buffer. The flow rate was 30.0 ml/hr and 6.0 ml fractions were collected.

A B C D

Fig. 14. Cellulose acetate membrane electrophoresis of the fraction II isolated from DEAE-Sephacel column.

A : Authentic chondroitin sulfate C

B : Skate cartilage hydrolysate by Alcalase(pH 8.0, 55±1 ℃ and 1 hr)

C : Skate cartilage hydrolysate by Alcalase after alkali protreatment(0.05 N NaOH, 4 ℃ and 20 hrs)

D : Fraction II

YM30 (MWCO=30,000), YM10 (MWCO=10,000)으로 분리한 획분을 농축, 건조한 뒤 각각의 분리 단계별 성분의 변화를 측정하여 Fig. 15에 나타내었다. 그 결과, retentate 회수율의 경우 YM100이상과 YM10이하에서 각각 40.7 %와 35.7 %로 대부분을 차지하였고, YM50~YM100의 경우 12.8 %를 나타내어 홍어연골 뮤코다당·단백질은 YM50이상과 YM10이하로 구성되어져 있는 것으로 나타났다. 조단백질의 경우 MWCO의 크기가 낮은 분리단계일수록 함량이 높아짐을 나타내었고, chondroitin sulfate의 경우 조단백질의 결과와는 반대로 MWCO의 크기가 높은 분리단계일수록 함량이 높아짐을 알 수 있었다. Chondroitin sulfate의 함량이 높은 분리 단계는 YM100이상과 YM50~YM100으로 각각 48.6 %와 44.0 %를 나타내었다. 고순도의 chondroitin sulfate를 얻기 위한 적절한 분리 단계는 YM50이상인 것으로 나타났다. 조단백질의 경우는 YM100이상일 때 38.5 %를 나타내었고 MWCO의 크기가 낮은 분리단계일수록 점차적으로 상승하여 YM10이하일 때 61.8 %로 나타났다. 휘발성 염기질소의 경우, 각 분리단계별로 큰 변화없이 5~10 mg/100g으로 일정한 값을 나타내었다. 또한, 고순도의 chondroitin sulfate를 얻기 위해 홍어연골 뮤코다당·단백질의 유기용매분별침전물로써 molecular weight cut-off (MWCO)를 달리하여 YM100 (MWCO=100,000), YM50 (MWCO=50,000), YM30 (MWCO=30,000), YM10 (MWCO=10,000)으로 분리한 획분을 농축, 건조한 뒤 각각의 분리 단계별 성분의 변화를 측정하였다. 그 결과, retentate 회수율의 경우 YM100이상과 YM10이하에서 각각 42.3 %와 29.1 %으로, YM50~YM100의 경우 25.5 %를 나타내어 홍어연골 뮤코다당·단백질은 YM50이상과 YM10이하로 구성되어져 있는 것으로 나타났다. 조단백질의 경우 MWCO의 크기가 낮은 분리단계

일수록 함량이 높아짐을 나타내었고, chondroitin sulfate의 경우 조단백질의 결과와는 반대로 MWCO의 크기가 높은 분리단계일수록 함량이 높아짐을 알 수 있었다. 즉, 분리단계 YM100이상과 YM50~YM100에서 chondroitin sulfate의 함량은 각각 82.2 %와 81.3 %를 나타내었고 조단백질의 경우는 YM100이상일 때 27.1 %를 나타내었고 MWCO의 크기가 낮은 분리단계일수록 점차적으로 상승하여 YM10이하일 때 58.6 %로 나타났다. 휘발성 염기질소의 경우, 각 분리단계별로 큰 변화없이 5~10 mg/100g으로 일정한 값을 나타내었다. 따라서, membrane filtration에서 고순도 chondroitin sulfate를 얻기 위해서는 유기용매분별침전물로써 분리단계 YM50이상 인 것으로 나타났다. 각 분리단계의 분획물로써 cellulose acetate 막 전기영동을 하여 Fig. 16에 나타내었다. 그 결과, YM100이상과 YM50~100, YM30~50의 분획물과 표준시약 chondroitin sulfate C의 band 이동도가 동일하게 나타내어 chondroitin sulfate가 존재함이 확인되며 YM10~30, YM10이하의 분획물에서는 band가 확인되지 않아 chondroitin sulfate가 존재하지 않음을 알 수 있었다.

홍어연골로부터 정제방법을 달리하여 표준시약 chondroitin sulfate C와 함께 FT-IR분석을 하여 Fig. 17에 각각 나타내었다. 그 결과, 정제물과 표준시약 chondroitin sulfate C의 흡수파장대가 대체로 유사한 경향을 보였으며, 특히 membrane filtration를 통해 정제한 분획물이 표준시약 chondroitin sulfate C와 흡수파장이 매우 유사하였다.

유기용매분별침전과 ion exchange chromatography, membrane filtration법으로 각각 정제방법을 달리하였을 때 얻어진 3가지 chondroitin sulfate정제물과 표준시약 chondroitin sulfate C를 ^{1}H-NMR로서 동정하여 Fig. 18에 나타내었고, 각각의 정제물에서 관찰된 NMR signals는 문헌과 비교

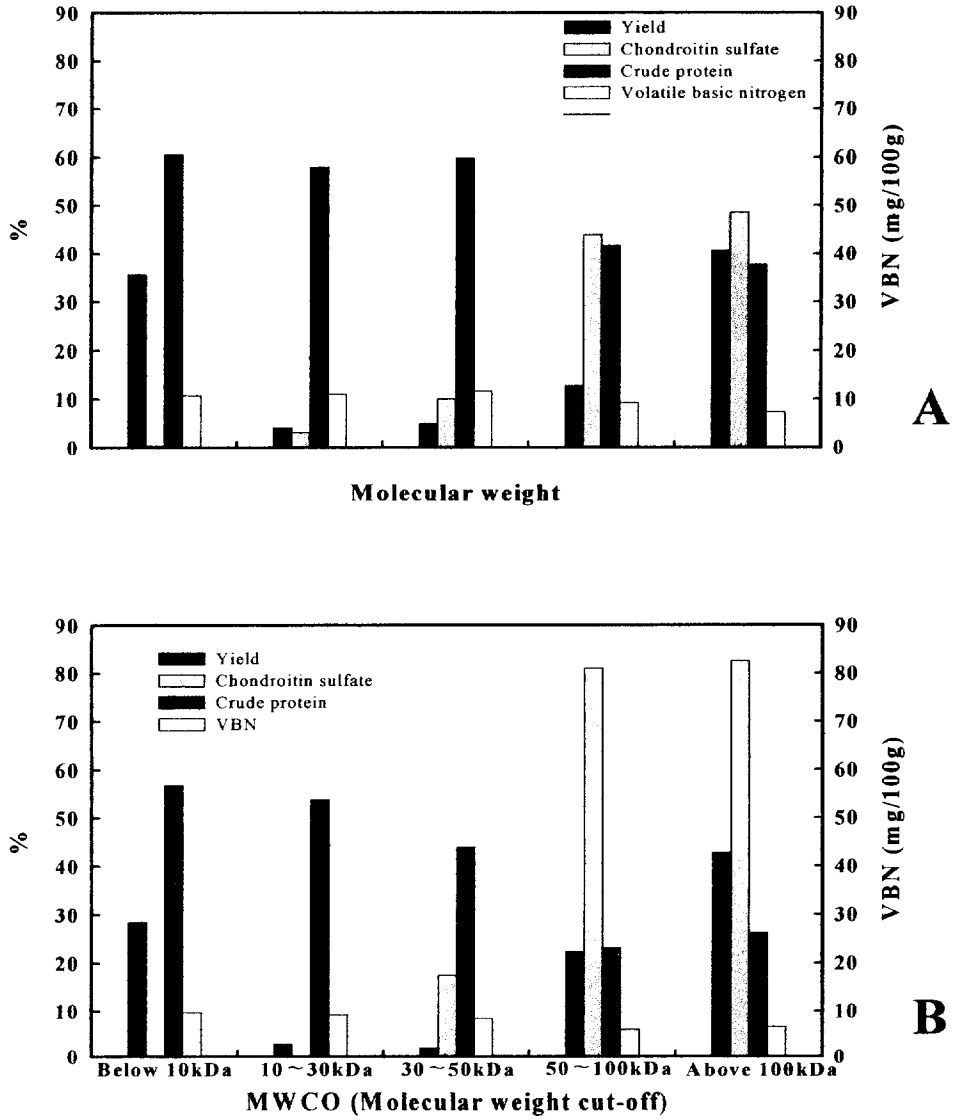


Fig. 15. Changes of yield, chondroitin sulfate, crude protein and VBN contents of skate cartilage hydrolysates as affected by molecular weight.

A : Skate cartilage hydrolysates by Alcalase.

B : Isopropyl alcohol precipitates of skate cartilage hydrolysates by Alcalase.

A B C D E F

Fig. 16. Cellulase acetate membrane electrophoresis of the fractions from isopropyl alcohol precipitates of skate cartilage hydrolysates by membrane filtration.

A : Authentic chondroitin sulfate C

B : Above MW(molecular weight) 100,000

C : Between MW 50,000 and MW 100,000

D : Between MW 30,000 and MW 50,000

E : Between MW 10,000 and MW 30,000

F : Below MW 10,000

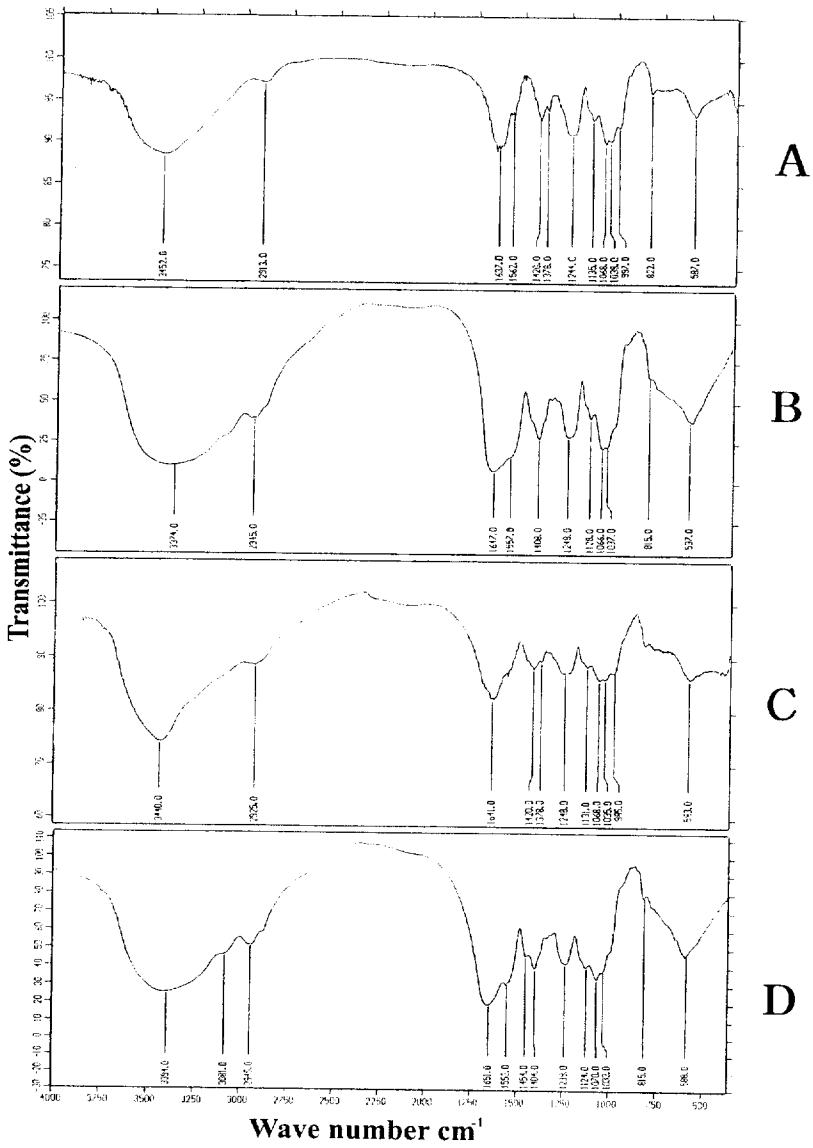


Fig. 18. FT-IR spectra of chondroitin sulfate purified from skate cartilage by isopropyl alcohol, ion-exchange chromatography and membrane seperation.

A : Authentic chondroitin sulfate C
B : Fractionated by isopropyl alcohol
C : Fractionated by membrane seperation
D : Fractionated by ion-exchange chromatography

하여 구조를 확인하였다(Mucci, 2000). 그 결과, 표준시약인 chondroitin sulfate C에서 관측된 proton signal은 2구간으로 나뉠 수 있으며 먼저, 2.0～2.1 ppm에서 관측된 signal은 acetamide methyl signal임을 동정 할 수 있으며, 나머지 모든 signals는 3～5 ppm에서 관측되었는데, 4.78 ppm에서 관측되는 signal은 N-acetyl-galactosamine 4-sulfate이며 4.2 ppm에서 관측되는 signal은 N-acetyl-galactosamine 6-sulfate임을 동정 할 수 있었다. 각각 정제방법을 달리하였을 때 얻어진 chondroitin sulfate 정제물에 있어서 관측된 signals의 경우, 공통적으로 2.0～2.1 ppm의 acetamide methyl signal과 4.78 ppm의 N-acetyl-galactosamine 4-sulfate, 4.20 ppm의 N-acetyl-galactosamine 6-sulfate 을 동정 할 수 있었으나 3～5 ppm에서 관측되는 signals에 있어서는 약간의 차이를 나타내고 있다. 이러한 차이를 비교해 볼 때, 표준시약 chondroitin sulfate C와 가장 유사한 signals이 관측되는 정제물은 membrane filtration에 의한 chondroitin sulfate 정제물로 나타났다. 따라서, 각각의 정제방법 중 membrane filtration에 의해 정제되어진 chondroitin sulfate 정제물이 표준시약 chondroitin sulfate C와 가장 유사한 signals를 나타내므로 가장 효과적인 정제방법임을 알 수 있었다.

Chondroitin sulfate의 ^{13}C-NMR에 있어서의 각 탄소의 chemical shift는 잘 알려져 있으므로(Mucci, 2000) 각각 정제방법을 달리하였을 때 얻어진 chondroitin sulfate 정제물과 표준시약 chondroitin sulfate C를 ^{13}C-NMR로서 동정하여 Fig. 19에 나타내었고, 각각의 정제물에서 관찰된 NMR signals는 문헌과 비교하여 구조를 확인하였다(Mucci, 2000). 그 결과, 표준시약인 chondroitin sulfate C에서 관측된 signal은 3구간으로 나뉠 수 있으며 먼저, 25 ppm에서 관측된 signal은 acetamide methyl carbon

임을 동정 할 수 있으며, 178 ppm에서 관측된 signal은 carbonyl임을 동정하였고 나머지 모든 signals는 50~110 ppm에서 관측되었다. 각각 정제방법을 달리하였을 때 얻어진 chondroitin sulfate 정제물에 있어서 관측된 signals의 경우, 공통적으로 25 ppm에서 acetamide methyl carbon signal을 동정 할 수 있었으며, 175 ppm에서 carbonyl signal이 관측되었다. 나머지 signals에 있어서는 각각의 정제물에 있어서 약간의 차이를 나타내고 있는데 이러한 차이를 비교해 볼 때, 표준시약 chondroitin sulfate C와 가장 유사한 signals이 관측되는 정제물은 membrane filtration에 의한 chondroitin sulfate 정제물로 나타났다. 따라서, 각각의 정제방법 중 membrane filtration에 의해 정제되어진 chondroitin sulfate 정제물이 표준시약 chondroitin sulfate C와 가장 유사한 signals를 나타내므로 가장 효과적인 정제방법임을 알 수 있었다.

^{1}H, ^{13}C-NMR 결과를 볼 때, 표준시약 chondroitin sulfate C와 가장 유사한 signals를 나타낸 membrane filtration 정제물의 chondroitin sulfate 함량과 현재 시판되고 있는 chondroitin sulfate 표준시약 그리고 상업제품의 chondroitin sulfate 함량을 비교해 보기 위해 Sigma Chemical사의 표준시약인 chondroitin sulfate C와 chondroitin sulfate A, 그리고 Sankyo pharma France사의 시판제품인 chondroitin sulfate marin 함량을 정량 분석하여 Table 6에 나타내었다. 그 결과, 표준시약 chondroitin sulfate C는 84.2 %, 표준시약 chondroitin sulfate A는 77.2 %, chondroitin sulfate marin은 75.9 %, membrane filtration 정제물은 81.7 %로 나타내어 membrane filtration 정제물은 표준시약, 상업제품과 함께 고함량의 chondroitin sulfate 존재를 확인 할 수 있었다.

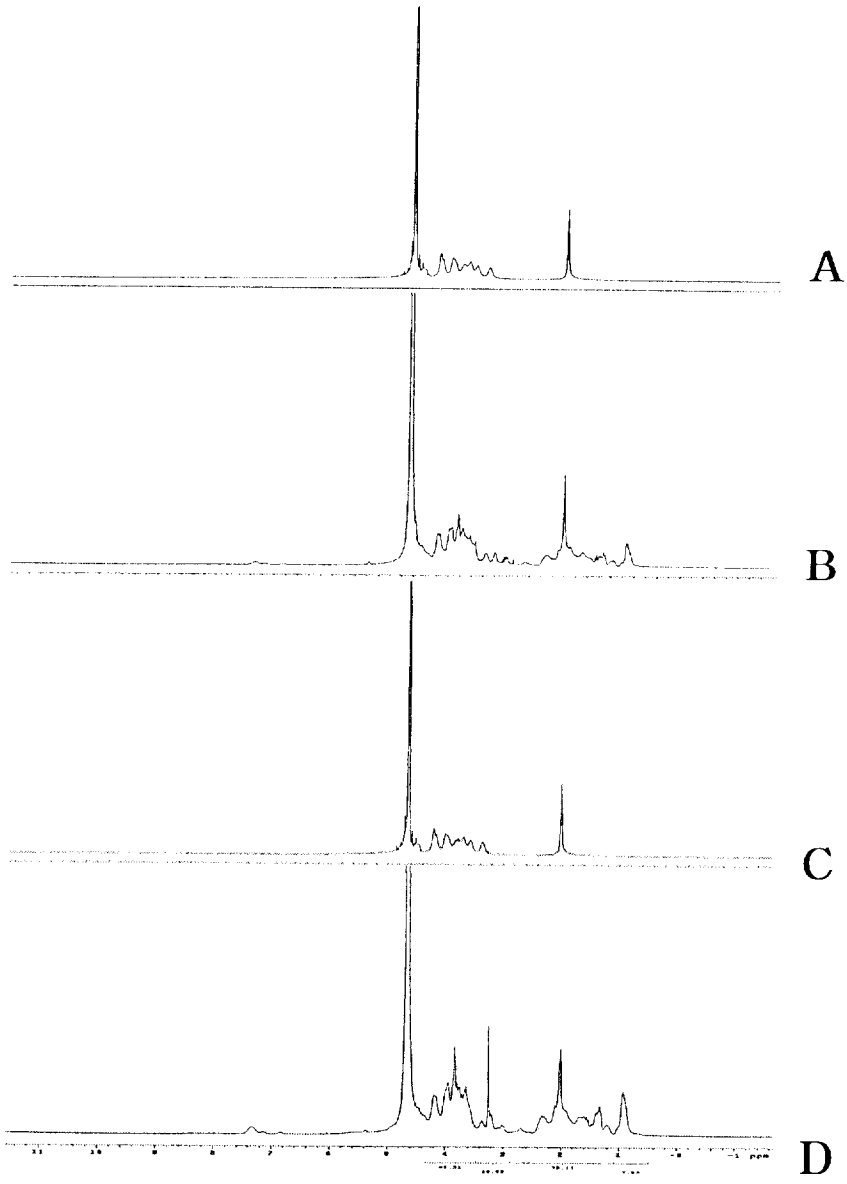


Fig. 18. ^{1}H-NMR spectra of purified chondroitin sulfate from skate cartilage by isopropyl alcohol, ion-exchange chromatogram and membrane seperation.

A : Authentic chondroitin sulfate C
B : Fractionated by isopropyl alcohol
C : Fractionated by membrane seperation
D : Fractionated by ion-exchange chromatography

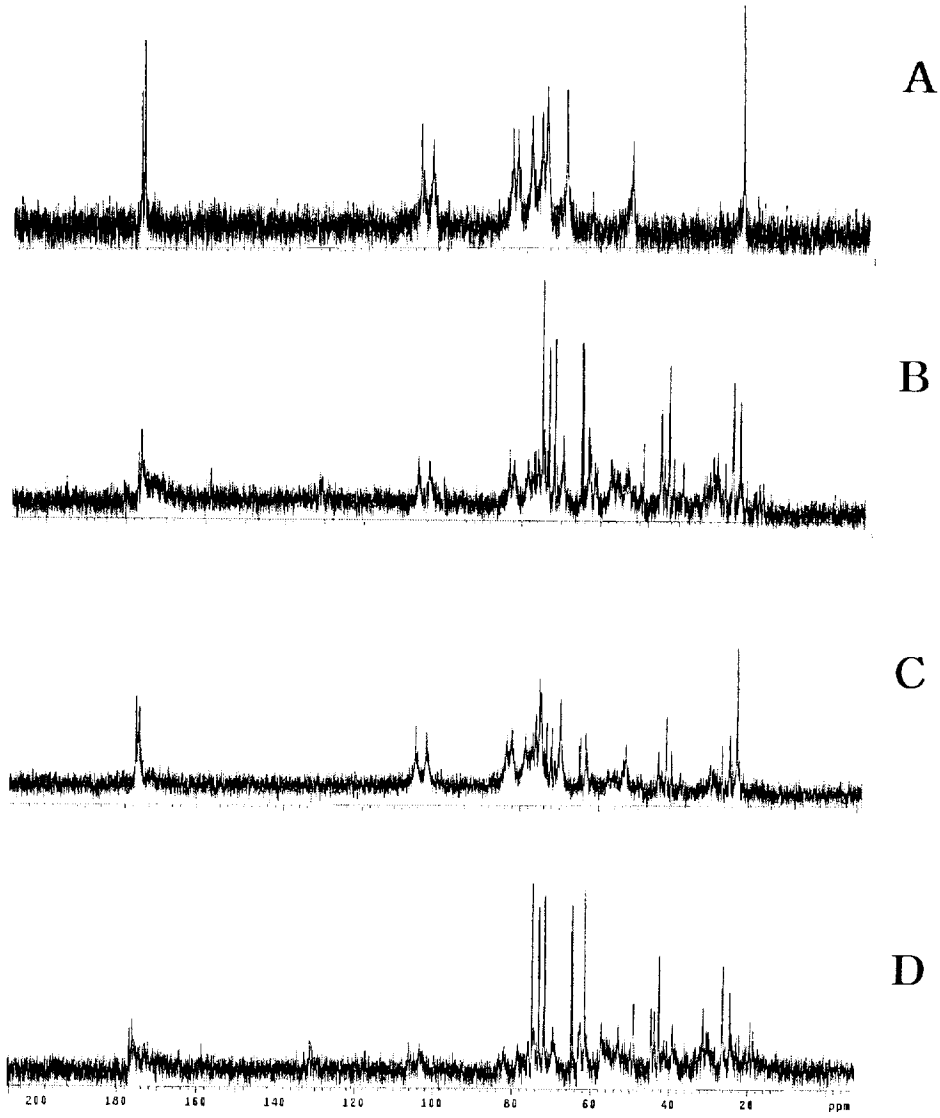


Fig. 19. ^{13}C-NMR spectra of the purified chondroitin sulfate from skate cartilage by isopropyl alcohol, ion-exchange chromatography and membrane seperation.

A : Authentic chondroitin sulfate C
B : Fractionated by isopropyl alcohol
C : Fractionated by membrane seperation
D : Fractionated by ion-exchange chromatography

Table. 6. Comparisons of authentic and purified chondroitin sulfates

Items	Chondroitin sulfate content (%)
Chondroitin sulfate C from shark cartilage (Sigma chemical CO.)	84.23
Chondroitin sulfate A from bovine trachea (Sigma chemical CO.)	77.15
Chondroitin sulfate marin sankyo pharma (France)	75.90
Chondroitin sulfate purified from skate cartilage	81.71

요 약

홍어 가공업체에서 가공부산물로서 대량 생산되는 홍어연골을 이용하여 고부가가치 기능성 소재인 chondroitin sulfate를 개발하기 위하여 최적효소가수분해조건을 설정하였고, 홍어 특유의 어취를 제거하기 위해 알칼리처리 조건을 검토함과 아울러, 유기용매분별침전과 ion exchange chromatography 그리고 membrane filtration법 및 기기분석을 통하여 chondroitin sulfate를 분리·정제·동정하였다.

1. 홍어연골을 대상으로 시판되는 단백질 분해효소의 액화능을 비교한 결과, Alcalase가 수율과 chondroitin sulfate 함량 및 경제성 등의 측면에서 가장 효과적인 것으로 나타났다. 홍어연골을 Alcalase로 가수분해하여 chondroitin sulfate 소재를 제조할 경우, 홍어연골 분쇄물의 건물당 2.0 %(w/w)의 Alcalase로 3배 양의 인산완충용액(pH 8.0)을 가한 후 55±1 ℃에서 1시간 동안 처리하는 것이 최적의 제조 조건으로 밝혀졌다.

2. 홍어연골로부터 chondroitin sulfate 추출공정에서 휘발성 염기질소의 효율적인 제거를 위해 알칼리 전처리 공정을 추가하였다. NaOH를 사용하여 탈취공정에 적용하였고 최적 처리조건은 4 ℃의 냉장 조건에서 0.05 M NaOH 농도로써 20시간으로 나타났으며, 이 때의 휘발성염기질소는 43 mg/100g, 황 함량은 98 mg/100ml, chondroitin sulfate는 30.0 %로 홍어연골 유래의 뮤코다당·단백질에 있어서 chondroitin suflate함량 및 황산기의 큰 손실 없이 효과적으로 휘발성 염기질소를 제거할 수

있는 것으로 나타났다.

3. 홍어연골을 Alcalase 최적조건에서 처리하여 제조되어진 소재의 chondroitin sulfate 함량은 21.3 %, 조단백질은 67.9 %, 수분은 5.5 %, 조지방은 0.6 %, 탄수화물이 13.7 %였고 회분이 12.4 %로 나타났으며 휘발성 염기질소는 225.94 mg/100g였다. 또한, 식품공전상의 뮤코다당·단백식품 규격과 비교해 보았을 때, cellulose acetate 막 전기영동의 정성분석에서 chondroitin sulfate C의 표준품과 이동도가 동일한 것으로 나타났고, 정량분석의 결과로는 수분의 함량이 5.5 %, 단백질과 chondroitin sulfate의 비율이 3.19, 단백질과 chondroitin sulfate의 총 함량은 89.1 %로 나타내어 식품공전상의 뮤코다당·단백식품으로서 활용 가능성이 있다는 것을 알수 있었다.

4. 홍어연골 뮤코다당·단백질로부터 chondroitin sulfate을 다량 함유하는 정제 소재를 제조하기 위하여 isopropyl alcohol 분별침전을 이용하여 chondroitin sulfate 고함유 침전물을 제조하였다. isopropyl alcohol의 분별침전시 최적조건은 10 Brix의 홍어연골 뮤코다당·단백질 용액과 최종농도로써 40 % isopropyl alcohol을 첨가였으며, 이 때의 수율이 20 %였고 chondroitin sulfate는 69 %로 가장 높은 값을 나타내었으며 휘발성 염기질소는 25 mg/100g로 나타났다.

5. 홍어연골 뮤코다당·단백질로부터 유기용매 분별침전 최적조건으로 처리한 분획물을 다시 DEAE-sephacel ion exchange chromatography로서 분획하여 Ⅰ, Ⅱ의 2개의 획분을 얻었으며, 획분 Ⅱ

의 chondroitin sulfate 함량은 78 %였다.

6. 홍어연골 뮤코다당·단백질의 유기용매 분별침전물로부터 molecular weight cut-off (MWCO)를 달리하여 YM100 (MWCO=100,000), YM50 (MWCO=50,000), YM30 (MWCO=30,000), YM10 (MWCO=10,000)으로 분리한 획분을 농축, 건조한 뒤 각각의 분리 단계별 성분의 변화를 측정하였다. 그 결과, 고순도의 chondroitin sulfate를 분리할 수 있는 단계는 YM50~100, YM100이상으로 나타났으며, 이 때의 retentate 회수율은 각각 25.5 %와 42.3 % 였고, chondroitin sulfate는 81.3 %와 82.2 %였다.

7. 유기용매분별침전물과 ion exchange chromatography, membrane filtration 정제법을 통해 제조되어진 각각의 chondroitin sulfate정제물을 표준시약 chondroitin sulfate C와 함께 FT-IR과 ^{1}H, ^{13}C-NMR로서 동정하였다. 그 결과, membrane filtration법에 의한 정제물이 표준시약 chondroitin sulfate C와 가장 유사한 signals가 관측되었다.

8. Membrane filtration정제물과 표준시약 chondroitin sulfate C, chondroitin sulfate A 그리고 상업제품인 chondroitin marin의 정량분석결과, 표준시약 chondroitin sulfate C는 84.2 %, 표준시약 chondroitin sulfate A는 77.2 %, chondroitin sulfate marin은 75.9 %, membrane filtration 정제물은 81.7 %로 나타내어 membrane filtration정제물은 표준시약, 상업제품과 함께 고함량의 chondroitin sulfate 존재를 확인 할 수 있었다.

참 고 문 헌

Bayliss, M.T., D. Osborne, S. Woodhouse, C. Davidson. 1999. Sulfation of chondroitin sulfate in human articular cartilage. *Biological chemistry,* 274(22), 15892-15900.

Cha, Y.J., C.B. Ahn, T.H. Lee, Y.H. Chung, E.H. Lee, S.K. Kim. 1985. Flavor components in sun-dried ray. *J. Korean Soc. Food Nutr.,* 14(4), 370-374.

Choi, Y.L., H.G. Nam, Y.H. Shin. 2000. Evaluation of pharmacological effect of soybean trypsin inhibitor-chondroitin sulfate conjugates. *J. Kor. Pharm. Sci.*, 30(3), 159-166.

Ha, B.J., M.H. Kim. 1999. Effect of chondroitin sulfate on collagen maturity and aging. *J. Fd Hyg. Safety*, 14(1), 45-54.

Huckerby, T.N., R.M. Lauder, I.A. Nieduszynski. 1998. Structure determination for octasaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin sulphate chains in the proteoglycan aggrecan from bovine articular cartilage. *Eur. J. Biochem.*, 258, 669-676.

Jeong, C.H.. 2000. Fauna and geographical distribution of batoid fishes(Pisces, Chondrichthyes) from Korea. *J. Korean Soc. Fish. Res.,* 3, 97-106.

Kim, Y.B., D.H. Shin, M.Y. Kim, T.S. Hwang. 1995. Effect of crude extract from shark cartilage on angiogenesis by malignant tumor implanted to the chorioallantoic membrane of chick embryo and ICR

mouse. *Journal of Korean Cancer,* 27, 653-670.

Kitagawa, H., Y. Tanaka, S. Yamada, N. Seno, S.M. Haslam, H.R. Morris, A. Dell, K. Sugahara. 1997. A novel pentasaccharide sequence GlcA(3-sulfate)(β 1-3)GalNAc(4-sulfate)(β 1-4)(Fuc α 1-3)GlcA(β 1-3)Gal NAc(4-sulfate) in the oligosacchrides isolated from king crab cartilage chondroitin sulfate K and its differential susceptibility to chondroitinases and hyaluronidase. *Biochemistry,* 36, 3998-4008.

Li, Z., W.S. Hou. D. Bromme. 2000. Collagenolytic activity of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resident chondroitin sulfates. *Biochemistry,* 39, 529-536.

Malsch, R., J. Harenberg. 1996. Purity of glycosaminoglycan-related compounds using capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 17, 401-405.

Maruyama, T., T. Toida, T. Imanari, G. Yu, R. Linhardt. 1998. Conformational changes and anticoagulant activity of chondroitin sulfate following its O-sulfonation. *Carbohydrate Research*, 306, 35-43.

Meyer, F.A., A. Maroudas, K. Kuettner. 1990. Methods in cartilage research. *Academic Press, London*, 222-227

Moon, J.H., H.S. Ryn, H.S. Yang, J.S. Suh. 1998. Antimutagenic and anticancer effects of glycoprotein and chondroitin sulfates from sea cucumber(*stichopus japonicus*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 27(2), 350-358.

Mucci, A., L. Schenetti, N. Volpi. 2000. ^{1}H and ^{13}C nuclear magnetic resonance identification and characterization of components of chondroitin sulfates of various origin. *Carbohydrate Polymers*, 41,