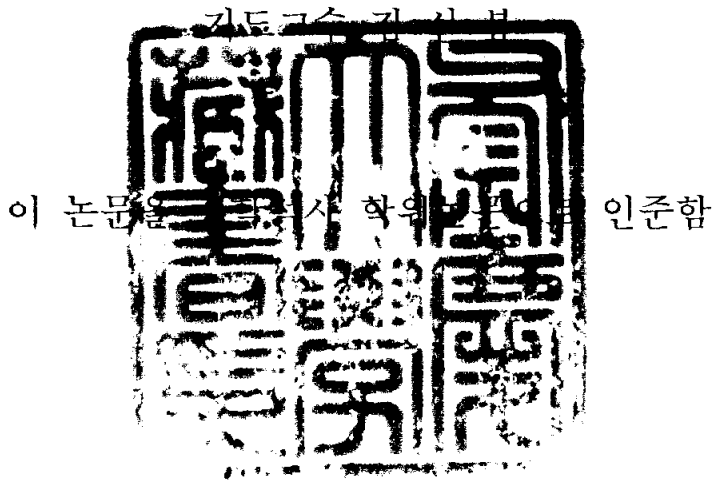


공학석사 학위논문

홍어연골로부터 콘드로이틴 황산의 분리 및 정제



2004년 2월

부경대학교 대학원

식 품 공 학 과

최 주 현

최주현의 공학석사 학위논문을 인준함

2003년 12월

주 심 이학박사 장 동 석



위 원 농학박사 김 선 봉



위 원 농학박사 양 지 영



목 차

Abstract	3
서론	6
재료 및 방법	9
1. 실험재료	9
1.1. 재료	9
1.2. 시약	9
2. 실험방법	9
2.1. 일반성분	9
2.2. Autoclave에 의한 전처리	10
2.3. 알칼리에 의한 전처리	10
2.4. 콘드로이틴 황산의 제조	10
2.5. 반응표면분석	10
2.6. 통계처리	12
2.7. Brix 값의 측정	14
2.8. 휘발성염기질소 (VBN)의 측정	14
2.9. 콘드로이틴 황산의 전기영동	14
2.10. 콘드로이틴 황산의 정량	15
2.11. 유기용매 분별침전	16
2.12. Ion exchange chromatography	16
2.13. Membrane filtration	16
2.14. FT-IR 분석	17

2.15. NMR 분석	17
결과 및 고찰	18
1. 홍어연골의 일반성분	18
2. 전처리 방법에 따른 탈취 효과	18
3. 반응표면분석을 이용한 탈취 최적화	21
4. 콘드로이틴 황산의 정제	30
요약	50
참고문헌	53
감사의 글	63

Isolation and Purification of Chondroitin Sulfate from Skate Cartilage

Joo-Hyun Choi

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

Abstract

Chondroitin sulfate has a various biological functions against arthritis, osteoporosis, gerontopia and skin-aging. It also plays biological biomineralization roles in templates, nerve system and human growth. This study was conducted to produce a functional food containing chondroitin sulfate from skate cartilage (*Raja rhina*), which is by-product during skate processing in plants. At first, skate cartilage was deodorized by different methods such as autoclave, water or alkali treatments, and hydrolyzed by Alcalase. Effect of deodorization methods on yields of solid content and chondroitin sulfate was investigated, and the chondroitin sulfate from Alcalase hydrolysate of skate cartilage was simply isolated by isopropyl alcohol, purified by ion-exchange chromatography and then identified by FT-IR and NMR.

Raw skate cartilage proximately consisted of 80.5% moisture, 10.1% protein, 0.8% lipid, 7.6% crude ash, 1% carbohydrate and 0.6% chondroitin sulfate. Alcalase hydrolysate from skate cartilage

proximately consisted of 4.1% moisture, 56.6% protein, 1.1% lipid 8.5% crude ash, 29.7% carbohydrate and 30% chondroitin sulfate. After enzyme hydrolysis, ammonia odor occurred strongly (i.e. VBN : 620 mg/100g) compared to raw sample (VBN : 240 mg/100g).

The Alcalase of skate cartilage had a bad ammonia odor, which deteriorated product quality. It is, therefore, necessary to deodorize to improve final product quality during pre-processing. Deodorization methods included the autoclave, water and alkali treatments. Autoclave treatment was not effect to remove ammonia odor. VBN values indicated that no big difference between before and after autoclave treatment (599 mg/100g and 664 mg/100g, respectively). Also, water treatment was not effect to remove ammonia odor. VBN value after water treatment were similar to that before water treatment (618 mg/100g to 642 mg/100g). Deodorization was increased when NaOH was treated in samples. The conditions of alkali treatment, such as NaOH concentration, treatment time and volume, were optimized by response surface methodology (RSM). The optimal conditions of alkali treatment by RSM for skate cartilage were 0.12 M, 7.8 hr and 3.6 volume. VBN value predicted by RSM was 6.5 mg/100g, which was closed to experimental data, 15 mg/100g. After deoderization using by NaOH, extraction of chondroitin sulfate from skate cartilage was conducted by enzymatic hydrolysis using Alcalase. Alcalase (2%, v/w) was added to the deodorized skate cartilage solution in 3 times volume of distilled water and enzymatic hydrolysis was carried out for each hour at $55 \pm 1^\circ\text{C}$.

Isolation and purification of chondroitin sulfate from Alcalase

hydrolysate were conducted by alcohol precipitation and DEAE-sephacel anion-exchange chromatography. Chondroitin sulfates precipitation increased at 40% isopropyl alcohol with maximum chondroitin sulfate contents (45.9%), while chondroitin sulfate precipitation was lower (2.6%) at 50% isopropyl alcohol with high chondroitin sulfate content (42.5%). After chondroitin sulfate precipitation in Alcalase hydrolysate using with 40% isopropyl alcohol DEAE-sephacel anion-exchange chromatography was conducted to purify further, followed by ultra filtration (molecular weight cut-off 3,000) to remove salt and other contaminants. Chondroitin sulfate content of the chromatography-purified fraction was 68%.

Characteristics of the chondroitin sulfate were investigated by cellulose acetate membrane electrophoresis, FT-IR and ^1H and ^{13}C NMRs. The purified chondroitin sulfate from skate cartilage was identified to chondroitin sulfate C by comparing spectrums of standard with FT-IR and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMRs.

서 론

콘드로이틴 황산 (chondroitin sulfate)은 N-acetyl galactosamine과 glucuronic acid의 이당체 단위가 반복적으로 되풀이되는 구조를 가지는 glycosaminoglycan이다 (Mucci 등, 2000). 이들은 황산기가 결합되어있는 위치에 따라서 A, B, C, D, E 등으로 나뉘어지며 (Sugahara 등 1996), 동물의 연골, 피부, 세포벽 등과 같은 결합조직에 단백질과 결합한 proteoglycan의 형태로 존재하고 있다 (John 등, 1995).

콘드로이틴 황산은 결합조직의 보호, 각막보호, 피부노화 지연, 항괴사, 항종양 등의 다양한 생리활성 기능들이 있어서 의약품, 화장품을 비롯한 기능성 식품으로서 이용되고 있다 (Koga, 1989; Nakagawa, 1993; Park and Kim, 1998; Naito, 1998). 특히 무엇보다 glucosamine과 더불어 최근 관절염 치료제로서 가장 많은 연구보고와 관심을 끌고 있다 (Hungerford 등, 2003; Anderson, 2003; Burmeister, 2000).

이러한 콘드로이틴 황산은 상어연골로부터 추출하여 많이 이용되고 있으며 (Waard 등, 1992), 해삼 (전 등, 1998), 유령멍게 (구 등, 1999), 갑각류 (Ehrlich 등, 1981), 그리고 오징어 (Falshaw 등, 2000)와 같은 많은 해산 동물들을 이용한 추출방법과 연구들이 진행되어 왔다. 또한 소의 기관이나 연골로부터의 추출 (Nakagawa, 1993; Abe, 1999)과 돼지 (Katsura 등, 1969), 닭 배아의 뇌 (Kitagawa, 1997)에서의 연구도 이루어졌다. 그러나, 육상동물의 경우에 있어서는 O-157, 광우병, 구제역과 같은 최근 문제점으로 인해서 원료로서의 가치가 떨어지고 해산동물을 이용한 원료의 비중이 높아지고 있다 (FDA reports, 1997). 특히 상어연골의 경우에 있어서는 다양한 기능성을 가진 콘드로이틴 황산은 원료로서 각광을 받아 많은 연구가 이루어지고 있다 (Naito, 1998; Waard 등, 1992).

상어와 같은 판새류에 속하는 홍어 또한 연골의 골격을 가지는 어류

로서 홍어목 가오리과에 속하고 우리나라의 연해, 일본 근해와 동지나 해에 많이 분포하였으나 지금은 어획량이 매우 줄었고 수입에 의존하고 있다 (국립수산진흥원, 1994).

홍어는 예로부터 우리나라 고유의 먹거리 방법으로 유명한 홍탁이 있으며 이는 삭혀서 먹는 풍습인데 (수협중앙회, 1997), 이때 매우 자극적인 냄새가 발생하게 된다. 이는 상어류와 같은 판새류에서의 특징인 요소 (urea)와 TMAO가 다량으로 함유되어있어 숙성되면서 요소는 urease에 의해서 암모니아로 TMAO는 환원효소에 의해서 TMA로 되면서 자극적인 냄새와 특쓰는 맛과 지느러미와 육의 독특한 식감은 collagen과 proteoglycan에 의해 만들어진 것이며 (Mizuta 등, 2003; Bailey 등, 1989; Haard 등, 2000; Hatton 등, 1999; Kanoh 등 1985; Konosu 등, 1974; Smith 등, 1999; Watabe 등, 1983), 숙성되는 과정에서 성분변화 연구에서 VBN, 암모니아와 TMA는 증가하고 TMAO는 감소하였다 (박, 2003). 이러한 홍탁은 가공업체들에 의해서 가공되면서 부산물로서 연골과 껍질이 생산되어 폐기되고 있다. 따라서 이러한 부산물인 홍어연골로부터 콘드로이틴 황산을 효소가수분해에 의해 제조하는 방법 (이, 2002)이 연구되었으며, 홍어연골로부터 콘드로이틴 황산의 분리에는 그 특유의 냄새로 인해서 제조에 많은 문제점이 있다.

또한, 제조되어진 가수분해물은 콘드로이틴 황산과 단백질이 주성분이므로 류코나당·단백질 식품으로 분류되어지고 있다 (식품의약품안전청, 2000). 따라서 가수분해물로부터 단백질을 분리하고 불순물들을 제거함으로서 보다 고순도의 콘드로이틴 황산을 제조하는 방법을 연구하는 것이 필요하다.

가수분해물로부터 순도 높은 콘드로이틴 황산을 제조하기 위한 방법들 중에서는 유기용매를 이용하여 침전 (Volpi, 1996)하여 고분자물질을 침전시키고 저분자의 불순물들을 제거하게 되었으며, 또한 많은 연구들에서는 다양한 소재들로부터 콘드로이틴 황산의 음이온성을 이용한 크

로마토그래피를 이용한 분리법에 관한 연구가 이루어져왔는데, Falshaw 등 (2000)은 오징어의 표피와 연골로부터 이온교환과 크기분배 크로마토그래피를 통한 콘드로이틴 황산의 분리를 시도하였고, Vieira 등 (1991)은 DEAE-cellulose 칼럼 크로마토그래피를 통해 해삼으로부터 콘드로이틴 황산을 분리하였으며, 그 외에도 다양한 연구가 되어져왔다 (Kariya 등, 1990; Pfeiler, 1993; Takeuchi 등, 1997; Takeuchi 등, 1998).

한편 식품공업에서 제품의 개발이나 공정화에 있어 최적화에 있어 중요한 연구방법으로 반응표면분석이 있다 (이 등, 2000). 이는 생명공학 기술에서 다양한 변수 요인들이 관련되어 결정되는 조건에 매우 효과적으로 최적화해주는 수학적, 통계학적인 기술로서 (Silva, 2001) 식품공업에서도 다양한 재료들이 조합되어서 최적의 조건을 알아보는 좋은 자료로서 이용되고 있다 (Thakur 등, 2000).

따라서, 본 연구에서는 홍어연골을 이용하여 콘드로이틴 황산을 제조하는 공정에 있어서 불쾌취를 제거하기 위한 방법들을 모색하고 효율적인 처리방법 중의 하나인 알칼리 처리에 있어서 반응표면분석을 이용하여 가장 적합한 지점의 설정에 관한 연구와 홍어연골을 효소가수분해해서 만들어진 가수분해물의 콘드로이틴 황산을 고순도 제품으로 정제하기 위해 유기용제를 이용하여 침전시키고, 이를 다시 크로마토그래피를 통해 분리하여 그 특성을 해석하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1.1. 재료

실험에 사용된 홍어는 미국산 수입홍어 longnose skate (*Raja rhina*)로 전라남도에서 위치한 홍어 가공업체인 (주)영산포식품으로부터 동결 상태로 제공받았으며, 연골의 주위 잔육 및 헤파물 제거를 위해 홍어연골을 열수에서 짧은 시간 정치해서 열변성된 잔육을 냉수에서 수작업을 통해서 제거하였다. 수세된 홍어연골은 물기를 제거하고 chopper를 통해 잘게 분쇄한 후 200 g씩 플라스틱 샘플병에 담아 밀봉하고 $-20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 냉동고에 저장하면서 실험에 사용하였다.

1.2. 시약

실험에 사용되어진 표준품 chondroitin sulfate C는 Sigma에서, Alcalase는 Novo Nordisk 사에서, NMR 등 분석시약은 각 시약회사의 HPLC급 및 NMR 급으로 준비하였으며, 기타 시약은 특급으로 준비되었다.

2. 실험방법

2.1. 일반성분

일반성분의 측정은 수분의 경우 105°C 에서 상압가열건조법으로 항량점까지 무게를 측정하였으며, 조지방은 ether를 이용한 Soxhlet법으로 시행했다. 조단백질은 Kjeldahl법으로 측정하였고, 회분은 550°C 에서 건식회화법으로 항량점까지 측정하였으며, 탄수화물은 나머지 일반성분 값을 100%에서 제외한 값으로 나타내었다.

2.2. Autoclave에 의한 전처리

콘드로이틴 황산 제조 공정에서 효소분해하기 전 단계인 전처리로서 준비된 홍어연골 재료를 100 g씩 삼각플라스크에 넣고 autoclave에서 115℃로 가압증기를 시간별로 쏘인 후에 각 재료를 콘드로이틴 황산 제조공정에 따라서 제조하여 비교 실험하였다.

2.3. 알칼리에 의한 전처리

알칼리 전처리는 진탕배양기에서 실온인 18℃로 동일하게 설정하고 200 rpm에서 NaOH를 농도별, 시간별, 투입양 별로 비교 실험하였다. 전처리 마친 샘플은 중화를 위해서 흐르는 물에 수세하였다. 샘플의 소실과 효율적인 중화 수세를 위하여 가는 망을 이용하였다. 중화 후 샘플은 알칼리 전의 원료 중량비로 효소를 첨가하여 다시 콘드로이틴 황산 제조공정에 따라 제조하여 실험 비교하였다.

2.4. 콘드로이틴 황산의 제조

홍어연골로부터 콘드로이틴 황산이 포함된 뮤코다당·단백질을 추출하는 효소가수분해 제조공정은 Fig. 1에서와 같이 준비된 재료를 삼각플라스크에 넣고 증류수를 3배 (v/w) 넣고, 분해효소인 Alcalase를 2% (v/w) 넣어서 3 시간동안 진탕배양기에서 200 rpm으로 추출하였다. 그 후 효소 실활을 했으며, 1,400 g에서 30분간 원심분리하고 규조토를 이용하여 여과하여 맑은 가수분해물을 얻었다. 이를 다시 회전식진공농축기를 이용하여 농축하고 60℃에서 열풍건조하여 콘드로이틴 황산 함유 가수분해물 샘플을 준비하였다.

2.5. 반응표면분석

여러 가지 변수의 상호작용에 의한 최적화에 효율적인 통계분석법인

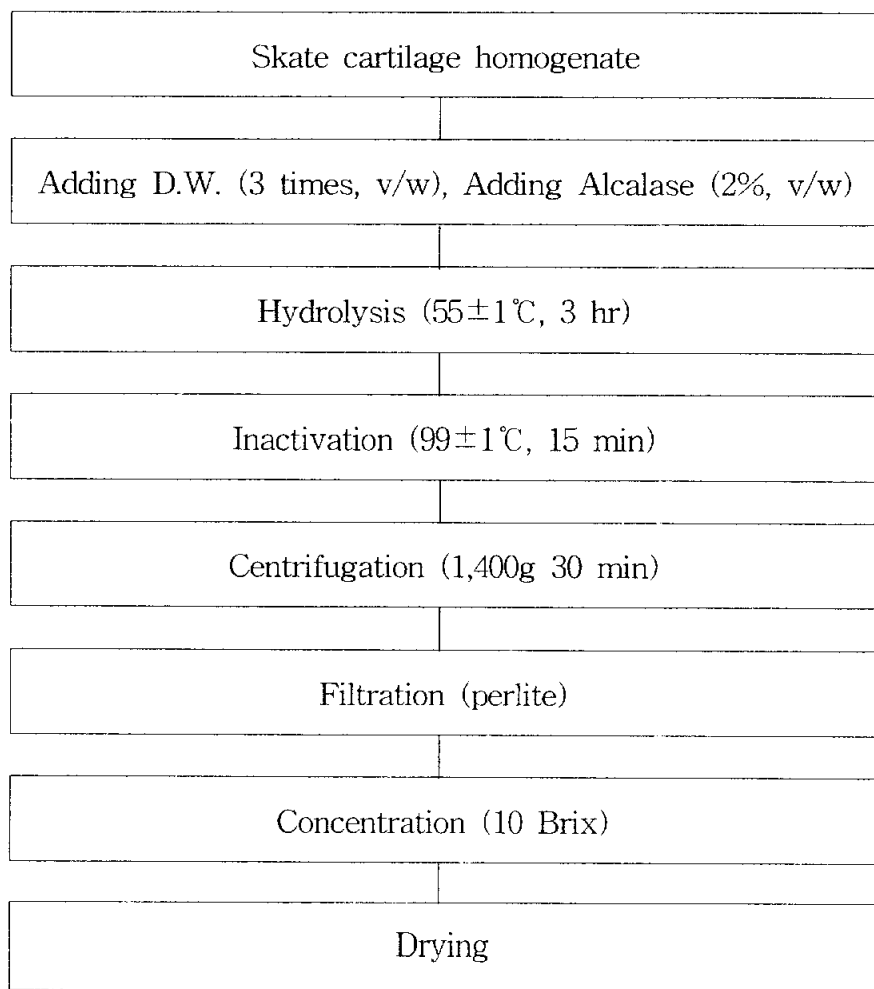


Fig. 1. Manufacturing process of mucopolysaccharide-protein product from skate cartilage.

반응표면분석은 중심합성계획법 (central composite design, Box 등, 1951)에 의해서 실시하였으며, 변수로서 NaOH의 농도 (M, X_1), 시간 (hr, X_2) 그리고 투입량 (times, X_3)을 설정하여 range와 level은 5개의 단계로 설정하였으며 (Table 1) 아래 식 (1)에 의해 coded 값과 uncoded 값을 설정하였다.

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (1)$$

즉, X_i 는 code화 된 변수이며, x_i 는 code화되지 않은 실지 변수 (uncoded variable)값이 된다. ΔX_i 는 실지 변수 값의 간격이 되며 X_0 는 중심점이 되는 실지 변수 값이 된다. 결과는 VBN (mg/100g, Y)으로 나타내어 통계처리 되었다. 중심합성계획 실험 모델은 2^3 요인 실험 점에 여섯개의 축점 ($\alpha=2$)과 넷의 중심점으로 이루어져 실험되었다 (박, 1995).

실험에 의한 결과값은 SAS 프로그램 (Version 8.01, SAS Institute Inc., USA)의 RSREG 처리에 의해 예측되는 최적지점을 찾기위한 2차 방정식 모델을 찾아낸다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (2)$$

식 (2)는 결과값에 의해 나타나는 회귀선 방정식의 기본 모형이며, b 값들은 각 항의 계수들이다. 적합한 모델의 선정은 SAS 프로그램에서 RSQUARE 처리에 의해 AIC (akaike information criteria, Akaike, 1973)와 C_p 가 가장 작은 값일 때의 변수로 선정되어 최적 모델이 된다.

2.6. 통계처리

Table 1. Experimental range and levels of the independent process variables

Independent variables	Symbol		Range and levels				
	Coded	Uncoded	-2	-1	0	1	2
NaOH concentration(M)	X_1^a	x_1	0.04	0.07	0.10	0.13	0.16
Treatment time(hr)	X_2	x_2	1	3	5	7	9
NaOH volume(v/w)	X_3	x_3	1	2	3	4	5

^awhere: $X_1=(x_1-0.1)/0.03$; $X_2=(x_2-5)/2$; $X_3=(x_3-3)/1$

Student's *t*-test에 의해 회귀분석계수의 통계적 유의성을 검증하였으며, Fischer's test에 의해 2차 모델 방정식이 결정되었다. SAS 프로그램에 의해 구해진 회귀선 식은 3차원 그래프 프로그램 Maple 프로그램 (Maple 7, Waterloo Maple Inc., Canada)에 의해서 그래프화 하였다. 또한 데이터들의 유의차 검증은 one way ANOVA test하여 F value를 알아보고 신뢰도를 검증하였으며, SAS 프로그램에서 Duncan's range test를 통하여 95%의 신뢰구간에서 검증했으며, 도표들은 Sigmaplot 프로그램 (Sigmaplot 6.0, SPSS Inc., USA)에 의해 도식화하였다.

2.7. Brix 값의 측정

홍어연골의 효소가수분해물들을 농축함에 있어서 같은 조건의 농축정도를 알기 위해서 간편하게 이용할 수 있는 굴절계측정기 (Hand Refractometer, ATAGO N-1E, Japan)를 이용하여 Brix 값으로서 측정하였으며 이를 수분 정량한 데이터와 비교하여 농축된 정도를 설정하여 실험하였다.

2.8. 휘발성염기질소 (VBN) 측정

휘발성염기질소 (volatile basic nitrogen: VBN)은 conway unit을 이용하는 미량확산법 (Conway, 1950; 한국식품영양과학회편, 2000)에 의해서 측정하였다. 즉, 건조된 샘플을 약 0.4 g 취하여 증류수 50 mL을 가하여 녹여 침출시킨 후 TCA (trichloroacetic acid) 20% 용액을 10 mL 가하여 10분간 정치시켜 수용성 단백질을 침전시킨 후 여과하여 100 mL로 정용하여 검액으로 사용하였다. Conway unit 내실에 boric acid 1 mL를 외실에는 K_2CO_3 포화용액과 검액을 넣고 37°C에서 80분간 정치후에 0.01 N H_2SO_4 로서 적정하여 나타내었다.

2.9. 콘드로이틴 황산의 전기영동

콘드로이틴 황산의 정성분석으로서 셀룰로오스 아세테이트 막을 이용한 전기영동을 실시하였다. 이는 식품공전의 chondroitin sulfate 확인시험법에 의거하여 실시하였다 (식품의약품안전청, 2000). 즉, 5 cm의 셀룰로오스 아세테이트막의 한쪽 끝에서 1 cm의 위치에 0.5 cm 폭 간격으로 표준용액과 검액을 1 μ l씩 점적하고 한쪽 끝에서 1 cm 스포트점의 정도를 음극치로 하여 영동용매의 증기로 포화한 영동조 내에서 40 V 40분간 전기영동 하였다. 전기영동된 셀룰로오스 아세테이트 막을 꺼내어 염색제에 5분간 담근 후 세척액인 1% 초산액으로 1회 씻고 증류수로 2회 씻은 후 말려서 표준물질과 검액의 동일한 위치에 적자색의 밴드를 확인하였다.

2.10. 콘드로이틴 황산의 정량

제조된 콘드로이틴 황산의 함량의 조사는 식품공전 chondroitin sulfate 함량 시험분석법에 의거하여 정량하였다 (식품의약품안전청, 2000). 즉, 검체를 수분이 흡습되지 않도록 신속하게 0.3 g을 정밀히 계량한 후 증류수를 가해 100 mL로 정용하였으며, 이 액 4 mL를 정확히 취급하여 증류수를 가해 20 mL로 정용하고 정량분석용 여과지 (5중C)를 사용하여 여과한 것을 액으로 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 $99\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 열탕에서 15 min 반응시키고 냉수로서 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.

$$\text{콘드로이틴 황산의 함량} = \text{글루쿠론산}(\%) \times 2.593$$

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

여기서, 2.5930은 콘드로이틴 황산의 분자량 / 글루쿠론산의 분자량이며, 1.1023은 글루쿠론산의 분자량 / δ -글루쿠로락톤의 분자량에 의해 나타낸 계수이다.

2.11. 유기용매 분별침전

20 Brix로 농축된 가수분해물을 건조하지 않고 isopropyl alcohol에 분별 침전시켰다. 가수분해물의 부피를 포함한 알코올의 농도를 40%에서부터 80%까지 각각 침전하였으며, 40%에서 침전되지 않은 상등액을 다시 50%되게 침전하는 방법으로 순차적으로 침전시켰으며, 80%에서 침전되지 않은 상등액도 최종샘플에 추가하였다. 이렇게 준비된 샘플은 증류수를 첨가하여 회전식농축기에서 알코올을 휘발시키고 농축한 후 건조하였으며, 침전시키기 전의 가수분해물의 건물 당 무게에 비한 각 농도침전물의 건조물의 무게비로서 수율을 표시하였다.

2.12. Ion exchange chromatography

알코올 분별 침전된 가수분해물의 샘플에서 단백질을 제거하기 위하여 이온교환 크로마토그래피를 이용하였다. 2.9 cm×50 cm의 칼럼에 DEAE-Sephacel 음이온 교환수지를 충전하여 pH 7.0의 20 mM phosphate buffer로서 2 M NaCl의 용액을 만들어서 0 M에서 2 M까지 gradient로 시간당 33 mL의 유속으로 용매를 흘려서 분리하였다. 분획물들은 spectrophotometer (Shimadzu Co. model No. UV-160A)로 280 nm에서 단백질의 변화를 관찰하였으며, chondroitin sulfate 정량 분석 시 사용되는 황산발색법을 이용하여 530 nm에서 콘드로이틴 황산의 변화를 관찰하였다. 또한 콘드로이틴 황산이 포함된 fraction tube의 분획물들을 모아서 회전식진공농축기로 농축하였다.

2.13. Membrane filtration

농축된 샘플의 탈염을 위해서 DIAFLO[®] Ultrafiltration membranes (Amicon, USA)의 YM3 (MW 3,000)막을 이용하였다. 이는 이온교환 크로마토그래피 분획물에서의 NaCl의 제거뿐만 아니라 저분자의 다른 불순물도 제거할 수 있다. 이렇게 탈염한 샘플은 다시 0.45 μm 의 실린지 필터를 통과시켜 여과한 후에 겔 크로마토그래피를 위한 샘플로 준비하였다.

2.14. FT-IR 분석

Ion-exchange chromatography를 통하여 정제된 샘플은 FT-IR 분석되었으며, Spectrum GX (Perkin Elmer, USA)를 이용하였다. 표준품 콘드로이틴 황산과의 각 샘플을 비교 동정하였다.

2.15. NMR 분석

FT-NMR Spectrometer는 JNM ECP-400 (JEOL, Japan)을 통해 Ion exchange chromatography 한 샘플과 sigma사의 표준품 콘드로이틴 황산 C 와 비교하여 ^1H -NMR은 400MHz에서, ^{13}C -NMR은 100MHz에서 분석하여 동정하였다.

결과 및 고찰

1. 홍어연골의 일반성분

동결 홍어연골의 일반성분은 Table 2에 나타낸 바와 같이, 수분 80.5%, 조단백질 10.1%, 조지방 0.8%, 조회분 7.6%, 총탄수화물은 1.0%로 나타났으며, 연골자체의 VBN은 254 mg/100g 이었고, 연골 자체의 콘드로이틴 황산의 함량은 약 0.6%로 거의 나타나지 않았다. 효소가수분해에 의해서 제조된 가수분해물의 일반성분은 수분 4.1%, 조단백질 56.6%, 조지방 1.1%, 조회분 8.5%, 총탄수화물 29.7%로 나타났으며, 휘발성염기질소는 620 mg/100g으로 치솟았으며, 콘드로이틴 황산의 함량도 약 30%로 높아졌다. 총탄수화물은 나머지 일반성분을 100에서 뺀 값으로 나타내었으며, 이 값의 변화는 단백질에 결합되어있는 형태로 존재하는 콘드로이틴 황산 (John 등, 1995)이 단백질의 분해로 분리되어 증가하는 것으로 사료된다.

2. 전처리 방법에 따른 탈취 효과

탈취 홍어연골 콘드로이틴 황산을 제조를 위하여 전처리 조건으로 Autoclave에서 시간별로 처리한 후에 콘드로이틴 황산을 공정대로 제조하여 휘발성염기질소 (VBN)를 측정하여 가수분해물의 냄새에 영향을 주는 암모니아류의 질소성분을 측정한 결과 599 mg/100g에서 664 mg/100g의 범위에서 변화하는 평균값을 보이며 유의적인 수준의 변화는 없는 것으로 나타나서 시간별로 autoclave에 의한 냄새 감소 효과는 없는 것으로 나타났다 (Fig 2). 또한 콘드로이틴 황산의 함량도 평균값

Table 2. Proximate composition of raw skate cartilage and hydrolysate

Component	Cartilage	
	Raw	Hydrolysate
Moisture (%)	80.5±0.8	4.1±0.9
Crude protein (%)	10.1±0.4	56.6±0.6
Crude lipid (%)	0.8±0.1	1.1±0.2
Crude ash (%)	7.6±0.4	8.5±0.5
Total carbohydrate ^a (%)	1.0±1.7	29.7±2.2
Chondroitin sulfate (%)	0.6±0.3	30.0±1.0
VBN (mg/100g)	254±11	620±17

^a 100 - (moisture + crude protein + crude lipid + crude ash)

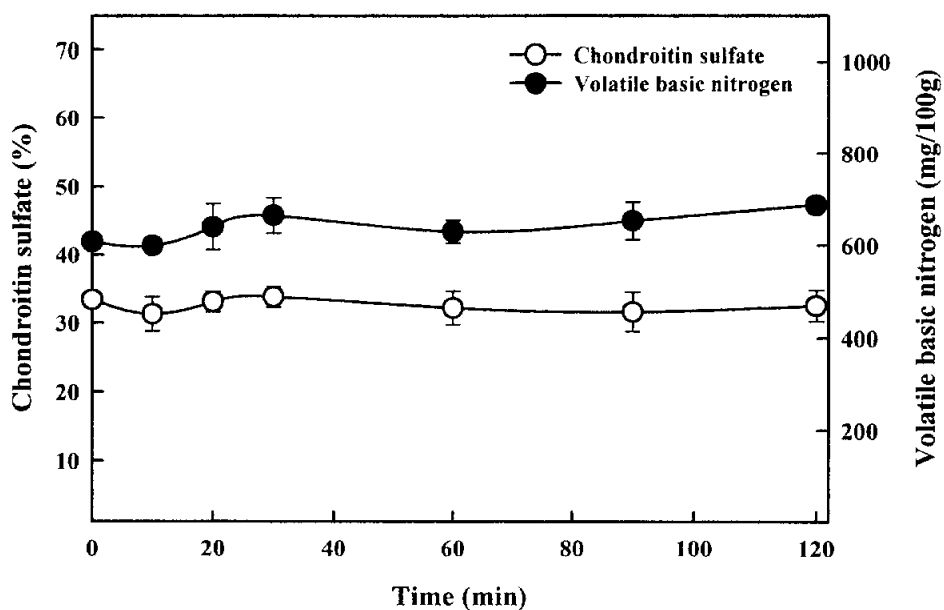


Fig. 2. Changes in VBN and chondroitin sulfate content of skate cartilage as affected by pretreatment with autoclave for different time.

Pretreatment with autoclave was done at 115°C.

들이 30.3%에서 32.8%까지였으며 표준편차 범위에서 변하는 유의성의 차이가 없는 값이었다. VBN의 경우 열풍건조를 하지 않은 농축액은 1200 mg/100g 수준이었으나, 건조 후에는 600 mg/100g대로 거의 절반이 줄어들었다. 이는 건조 과정에서 휘발성 질소가 제거되는 이유이다.

물을 이용한 전처리는 중량대비 3배의 증류수를 가하였다. Fig. 3에서는 이러한 결과를 보여주는데, 물로서 전처리한 경우에 있어서도 냄새 제거에는 효과적이지 못하였다. 1시간에서 7시간까지 2시간 간격으로 처리하였을 때, 618 mg/100g에서 642 mg/100g까지로 유의적 차이가 없는 것으로 VBN결과는 나타났으며, 콘드로이틴 황산의 함량에 있어서도 29.9%에서 31.2%까지로 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

알칼리 전처리를 해 본 결과 NaOH를 0.5 M의 농도로 원료중량대비 3배 (v/w) 투입하여 5시간 처리한 결과 VBN이 170 mg/100g으로 낮아지는 결과를 나타내었으며, 다른 전처리와 비교하여 효과가 있는 것으로 나타났다 (Table 3). 따라서 NaOH를 이용한 알칼리 전처리가 효율적인 VBN의 감소로 냄새가 제거될 것으로 보고, 보다 세밀한 NaOH 처리 조건을 알아보하고자 농도, 처리시간 및 처리량을 반응표면분석 하였다.

3. 반응표면분석을 이용한 탈취 최적화

중심합성계획법에 의해서 실험된 결과 데이터는 Table 4와 같으며, 이 값에 의한 회귀분석 데이터는 Table 5과 같이 나왔으며, ANOVA table은 Table 6와 같다. 또한 반응표면분석된 값에 의해 만들어진 회귀선은 식 (3)과 같이 나타나는데, akaike information criteria (AIC)이 가장 낮은 값에서의 최적합성의 변수에서는 X_2^2 와 X_1X_2 가 각각 0.6036과 0.4560의 t value에 의한 확률로서 결과값에 미치는 영향이 작으므로 제거되었다 (Table 5).

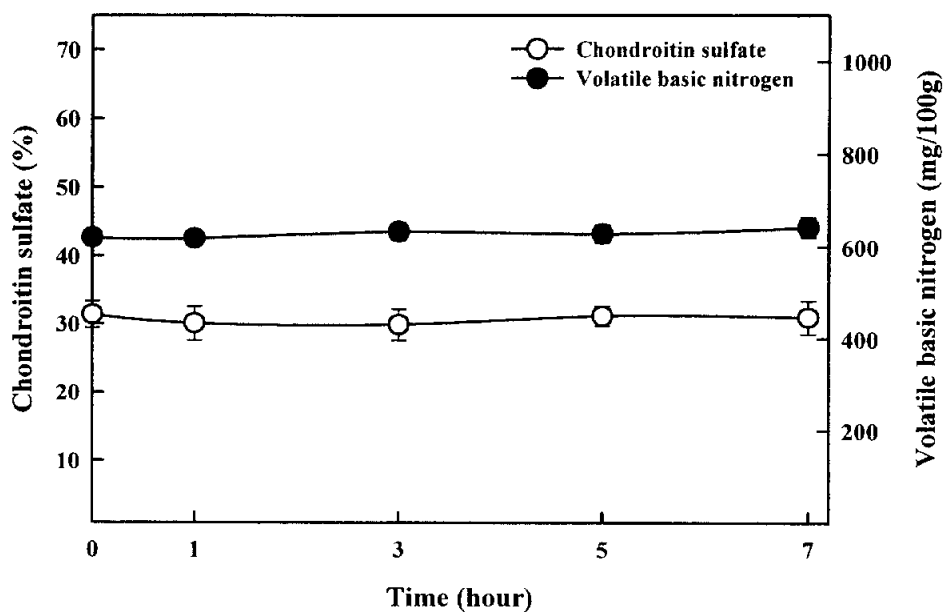


Fig. 3. Change in VBN and chondroitin sulfate contents of skate cartilage as affected by pretreatment with distilled water for different time.

Pretreatment was conducted at an ambient temperature in shaking incubator (200 rpm).

Table 3. Effect of pretreatment on VBN content of skate cartilage hydrolysates

Pretreatment	Volatile basic nitrogen (mg/100g)
Control	620 ± 17
Autoclave ^a	636 ± 25
Water ^b	630 ± 10
Alkaline ^c	170 ± 11

^a Autoclave pretreatment was done at 115°C.

^b Water pretreatment was conducted with distilled water 3 times

^c Alkaline pretreatment was conducted with 0.5M NaOH, 3 times at 5 hr

Table 4. Experimental design and results according to the central composite design arrangement and responses

Runs	Variables			Responses		
	X ₁	X ₂	X ₃	VBN (mg/100g)		
1	-1	-1	-1	126.5	131.0	135.9
2	-1	-1	+1	63.1	59.1	68.8
3	-1	+1	-1	118.5	114.2	122.8
4	-1	+1	+1	55.2	50.5	48.2
5	+1	-1	-1	92.7	91.5	90.1
6	+1	-1	+1	35.9	35.1	34.7
7	+1	+1	-1	53.9	55.2	56.5
8	+1	+1	+1	33.9	32.8	32.2
9	-2	0	0	191.4	198.7	196.1
10	+2	0	0	32.7	32.0	31.3
11	0	-2	0	43.4	40.2	48.2
12	0	+2	0	34.6	32.5	31.8
13	0	0	-2	217.5	210.1	203.4
14	0	0	+2	34.3	33.2	31.2
15	0	0	0	28.1	27.3	32.1
16	0	0	0	35.0	34.8	32.7
17	0	0	0	33.1	30.5	33.4
18	0	0	0	29.4	29.5	32.5

Table 5. Analysis of variance (ANOVA) for the model regression representing VBN^a

	DF	SS	MS	F-value	P
Model	9	157243	17471	69.94	0.0001
Linear	3	104438		139.35	0.0001
Quadratic	3	51112		68.20	0.0001
Crossproduct	3	1693.634583		2.26	0.0947
Error	44	10992	249.82254		
Total	53	168235			

^aR²=0.9347; SS, Sum of Squares; DF, Degrees of Freedom; MS, Mean square

Table 6. Results of the regression analysis using the central composite design

Term	Volatile basic nitrogen (mg/100g)			
	Coefficient	Standard errors	<i>t</i> value	<i>P</i>
intercept	30.494444	± 4.408020	6.92	0.0001
X ₁	-29.785417	± 2.281367	-13.06	0.0001
X ₂	-5.339583	± 2.281367	-2.34	0.0239
X ₃	-35.497917	± 2.281367	-15.56	0.0001
X ₁ ²	20.281944	± 1.953646	10.38	0.0001
X ₂ ²	1.469444	± 1.953646	0.75	0.4560
X ₃ ²	22.261111	± 1.953646	11.39	0.0001
X ₁ X ₂	-1.687500	± 3.226340	-0.52	0.6036
X ₁ X ₃	7.029167	± 3.226340	2.18	0.0348
X ₂ X ₃	4.279167	± 3.226340	1.33	0.1916

$$Y = 30.494444 - 29.785417X_1 - 5.339583X_2 - 35.497917X_3 + 20.281944X_1^2 + 22.261111X_3^2 - 7.029167X_1X_3 + 4.279167X_2X_3 \quad (3)$$

또한 분석 결과 나타난 최적화 지점의 각 변수 값은 $X_1=0.697635$, $X_2=1.414916$, $X_3=0.551173$ 이었다. 따라서 식 (1)에 의해서 uncoded 값으로 변환하면, x_1 인 NaOH의 농도는 0.12M 이며, x_2 인 처리시간은 7.8 시간, x_3 의 투입량은 3.6배에서 최적화되며, 이 때의 추측 VBN 값은 6.5mg/100g으로 나타났다.

세가지 조건을 모두 3차원 그래프화 해서 알아볼 수 없으므로, 이들의 한 요인씩 고정하여 그 변화 경향을 알아보았다. 먼저 $X_1=0.697635$ 일 때, 처리시간과 투입량의 상관관계에 관한 회귀선 식은 아래 (4)식과 같다. 그리고 이때의 경향을 나타낸 그래프는 Fig. 4에서와 같이 최적의 NaOH의 농도인 0.12M로 처리했을 때는, 시간이 증가함에 따라 VBN은 줄어드는 경향으로 나타나며, 투입량은 3배량의 근처로 증가할수록 감소하는 것으로 설명된다.

$$Y_1 = 19.586207 - 5.339583X_2 - 30.594124X_3 + 22.261111X_3^2 + 4.279167X_2X_3 \quad (4)$$

또한, $X_2=1.414916$ 일 때는 농도와 투입량 변화의 회귀선은 식 (5)와 같으며, Fig. 5에 보이듯이 알칼리 전처리의 반응표면분석의 최적점 경향이 가장 잘 나타난다. 0.12M과 3.6배의 투입량에서 최소의 VBN이 나타나는 최소의 최적점이 나타나는 형태를 보이고 있다.

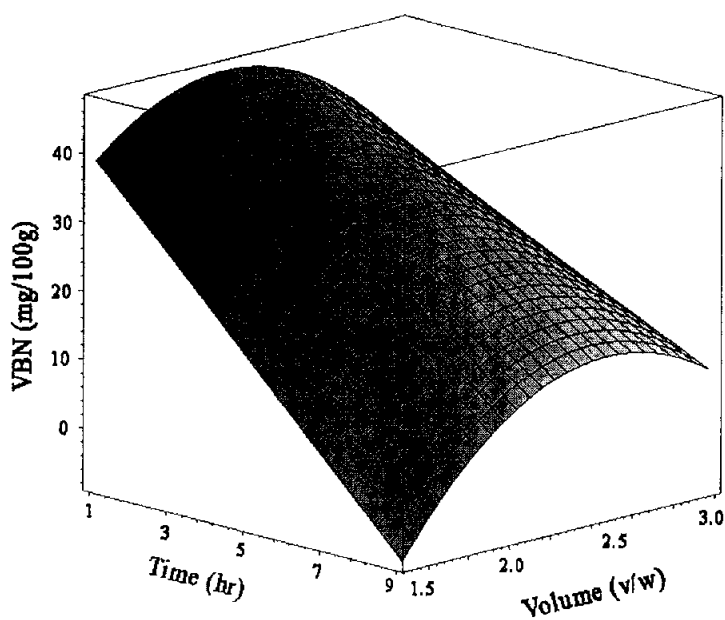


Fig 4. Response surface plots for optimization of VBN contents of skate cartilage hydrolysate ; Effects of NaOH time and volume.

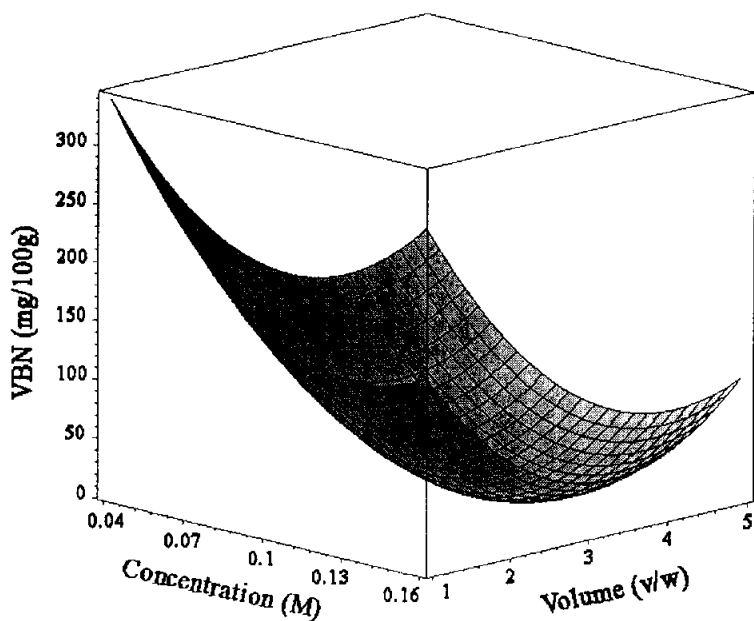


Fig 5. Response surface plots for optimization of VBN contents of skate cartilage hydrolysate ; Effects of NaOH concentration and volume.

$$Y = 22.939383 - 29.785417X_1 - 29.443255X_3 + 20.281944X_1^2 + 22.261111X_3^2 \quad (5)$$

마지막으로 투입량의 최적점을 고정시키는 $X_3=0.551173$ 일 때의 회귀선은 (6) 식과 같으며, 그 경향은 Fig. 6에서 알 수 있다. 즉, 농도는 최적점인 0.12M 가까이에서 최소가 형성되고, 시간에 따라서는 증가할수록 낮은 경향을 보이고 있다.

$$Y = 10.928951 - 33.659704X_1 - 7.698144X_2 + 20.281944X_1^2 \quad (6)$$

최종적으로 최적화 된 조건으로 실시 실험을 하여 탈취 콘드로이틴 황산 가수분해물을 제조하여 검토해본 결과, 15 ± 8 mg/100g으로 VBN이 나타나서, 반응표면분석에 의한 예측값에 근접하는 것으로 나타났다.

반응표면분석에 의해 최적화되어 만들어진 콘드로이틴 황산 가수분해물의 확인을 위해, 셀룰로오스 아세테이트 막을 이용한 전기영동 결과 Fig. 7과 같이 표준품과 비교하여 적자색의 밴드의 이동도가 같아서 콘드로이틴 황산임이 확인되었으며, 황산 적정법을 이용한 정량분석에서 $16 \pm 1\%$ 의 콘드로이틴 황산 함량을 가진 것으로 나타났다.

4. 콘드로이틴 황산의 정제

홍어연골로부터 효소 가수분해의 방법으로 콘드로이틴 황산을 제조하였다 (Fig. 1). 제조된 가수분해물의 일반성분은 Table 7와 같이 56.6%의 조단백질과 일반성분을 뺀 나머지 성분이 총탄수화물로 29.7%로 나타났다. 이는 콘드로이틴 황산 함량 측정에서 약 30%가 나타나는 것과

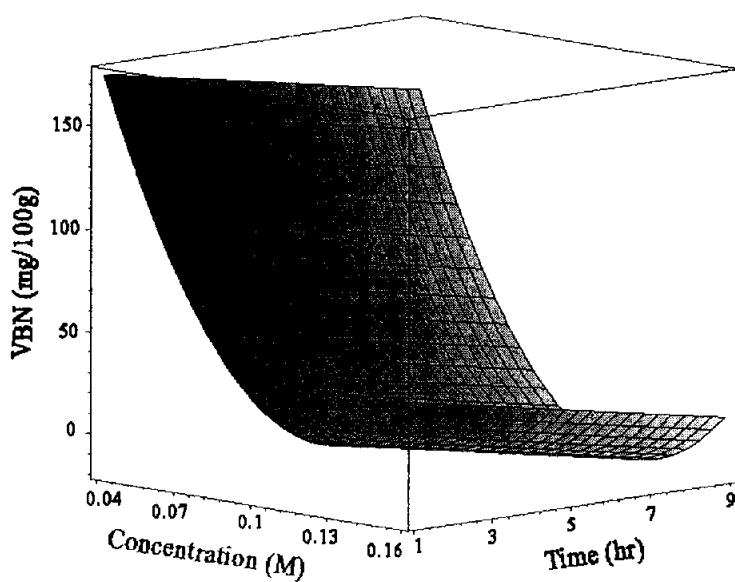


Fig 6. Response surface plots for optimization of VBN contents of skate cartilage hydrolysate ; Effects of NaOH concentration and time.

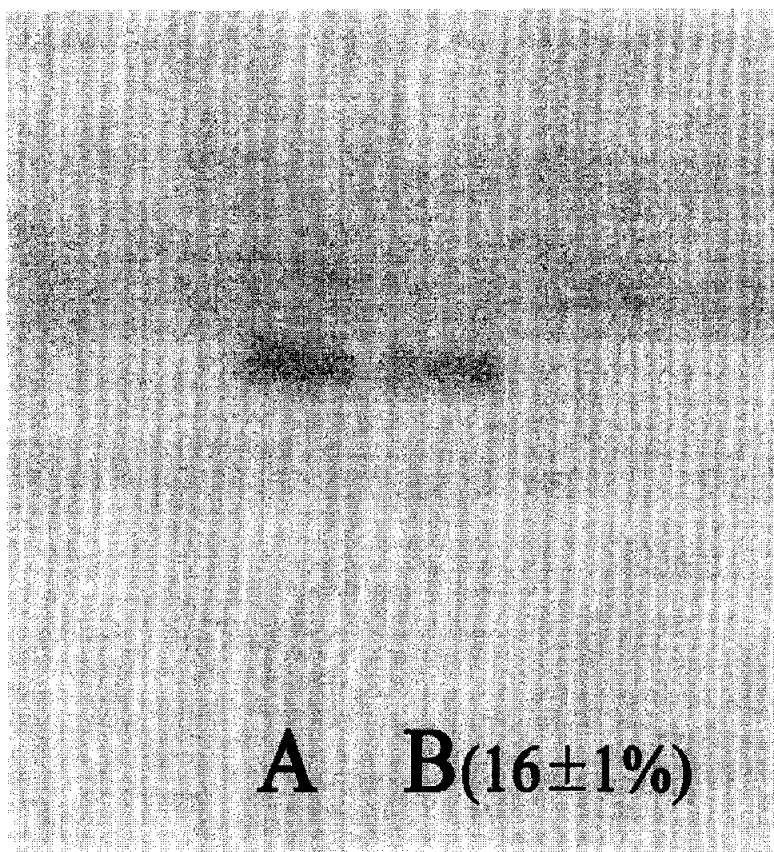


Fig 7. Cellulose acetate membrane electrophoretic patterns of chondroitin sulfate.

A : authentic chondroitin sulfate C, B : means alkali pretreatment hydrolysate.

일치하여 나머지 탄수화물 성분은 콘드로이틴 황산임을 알 수 있었다.

분별침전을 위한 가수분해물은 알칼리 전처리 한 샘플과 전처리를 하지 않은 샘플을 병행해서 그 차이를 알아보았다.

제조된 가수분해물 콘드로이틴 황산을 고순도 제품으로의 정제를 위해서는 단백질이 포함되어 있는 뮤코다당·단백질의 가수분해물을 유기용매로서 고분자 물질을 침전시켜서 저분자물질을 제거해 내는 방법을 사용하였다 (이, 2002; Park, 2000).

알칼리 전처리를 한 20Brix의 가수분해물을 순차적인 isopropyl alcohol에 침전시킨 결과 콘드로이틴 황산 함량과 그 수율을 Fig. 8에 나타내었다. isopropyl alcohol을 순차적으로 10%의 단위로서 가해서 가수분해물과의 최종 농도 30%까지는 침전이 일어나지 않았으며, 40%에서부터 침전이 생겼다. 40%에서 건조물의 무게비로 수율 54.2%의 많은 침전이 일어났으며, 50%에서부터 차례로 0.9%, 3.6%, 11.6%, 8.0%가 침전되었으며, 80%까지 침전되지 않은 상층액의 건조물은 20.0%의 수율이 나타났다. 또한, 콘드로이틴 황산의 함량은 40% 농도에서 44%의 함량으로 높게 나타났다. 그 후 차례로 7.3%, 2.2%, 0.9%로 함량테스트 결과 나타났지만, 정성분석의 결과 50% 이상의 농도에서의 침전물에서는 표준품과 비교하여 뚜렷한 밴드가 형성되지 않았다 (Fig. 9).

전처리를 하지 않은 가수분해물 또한 20Brix로 농축한 다음 isopropyl alcohol을 가하여 농도별로 침전시켰다. 알칼리 전처리와 마찬가지로 40% 이전의 농도에서는 침전이 일어나지 않았으며, Fig. 10에서와 같이 건조물의 무게로 나타낸 수율은 65.7%로 40%의 농도에서 가장 높았다. 또한 50%에서부터는 차례로 2.6%, 1.4%, 7.2%, 4.9%가 80%까지의 각각 침전 수율로서 나타났으며, 침전되지 않은 상층액의 건조물은 수율이 16.9%로 나타났다. 각 농도별 침전물의 콘드로이틴 황산의 함량 테스트에서는 40%에서 45.9%의 함량이 나타났으며, 50%는 42.5%의 함량이 나타났다. 60%와 70%에서도 3.7%와 1.2%의 함량이 나타났

Table 7. Proximate composition of precipitates of 40% isopropyl alcohol from skate cartilage hydrolysates

Component	Fractional precipitation by 40% isopropyl alcohol	
	Before	After
Moisture (%)	4.1±0.9	4.8±0.6
Crude protein (%)	56.6±0.6	40.7±0.5
Crude lipid (%)	1.1±0.2	0.7±0.3
Crude ash (%)	8.5±0.5	8.2±0.2
Carbohydrate ^a (%)	29.7±2.2	45.6±1.6
Chondroitin sulfate (%)	30±1	45±1

^a 100 - (moisture + crude protein + crude lipid + crude ash)

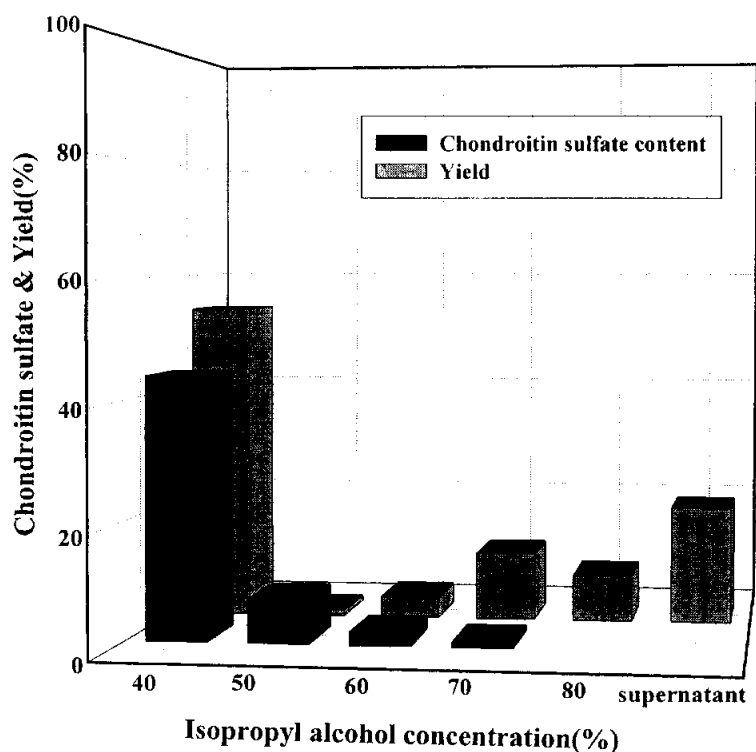


Fig. 8. Changes in chondroitin sulfate contents of skate cartilage hydrolysate as affected by different concentration of isopropyl alcohol before and after 0.1M NaOH pretreatment.

Alkaline (0.1M NaOH) pretreatment was conducted for 5 hours at an ambient temperature. Skate cartilage was hydrolyzed by 2% Alcalase at 55°C for 4 hours. Precipitate and supernatant were dried by hot-air (60°C).

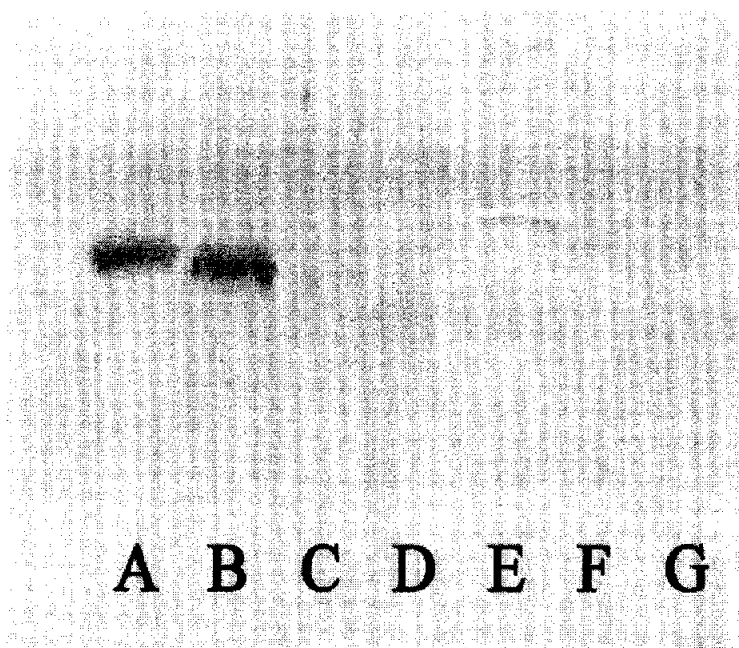


Fig. 9. Cellulose acetate membrane electrophoresis of skate cartilage fractions by isopropyl alcohol precipitation after NaOH pretreatment.

A: Authentic chondroitin sulfate C, B: alcohol 40% precipitate, C: 50% precipitate, D: 60% precipitate, E: 70% precipitate, F: 80% precipitate, G: residue

으나, cellulose acetate membrane을 이용한 정성분석결과 밴드 경향이 매우 약하거나 나타나지 않아서 콘드로이틴 황산이 함유된 것으로 보이는 힘들었다. 이러한 isopropyl alcohol의 농도별 침전물의 함량과 정성분석의 결과는 고분자에서 저분자로 침전되는 농도별 특징을 보여주었으며, 콘드로이틴 황산의 경우 고분자 물질이므로 그 경향이 뚜렷이 나타났다. 한편, 50% isopropyl alcohol의 농도에서의 침전물은 매우 적은 양이므로 침전물을 이용한 고순도 콘드로이틴 황산을 제조하는 방법에서는 40%의 isopropyl alcohol의 농도가 효율적인 것으로 나타났다. 또한, 알칼리 전처리와 처리하지 않은 것의 비교에서는 알칼리 전처리로 인한 전체 가수분해물의 수율이 전처리 하지 않은 것에 비하여 많이 감소하므로, 고순도 콘드로이틴 황산의 제조를 위한 선단계로서는 전처리를 하지 않는 것이 나은 것으로 나타났다.

알콜침전을 통하여 저분자 물질들을 배제한 첫 번째 정제물인 분획물의 건조물을 정제 두 번째 단계로서 DEAE-Sephacel ion-exchange chromatography를 실시하였다. 음이온 교환수지를 이용한 크로마토그래피에 의한 분리법은 콘드로이틴 황산의 음이온 성을 이용하여 효과적으로 콘드로이틴 황산을 분리해 낼 수 있다 (Falshaw 등, 2000; Vieira 등, 1991).

알콜침전 분획물을 인산완충액 (pH 7.0)에 녹여서 로딩하였으며, 이는 1.5M까지의 NaCl의 농도로 농도 구배의 방법에 의해서 분리되었다. 크로마토그래피의 결과는 Fig. 9에 나타내었다. 분획물은 6 mL의 튜브에 최종 145번까지 분획되었으며, 각각의 분획물은 먼저 단백질의 분리 정도를 알아보기 위하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 황산 적정법에 의한 함량테스트와 같은 방법으로 발색시켜 530 nm에서 흡광도를 측정하여 콘드로이틴 황산의 정도를 알아보았다. 그 결과, 30번에서 50번의 분획물 단계에서 단백질에 반응하는 280 nm 파장의 흡광도가 나타났으며, 이후 약 100번에서 130번에 이르는 분획물들에서 콘드로이

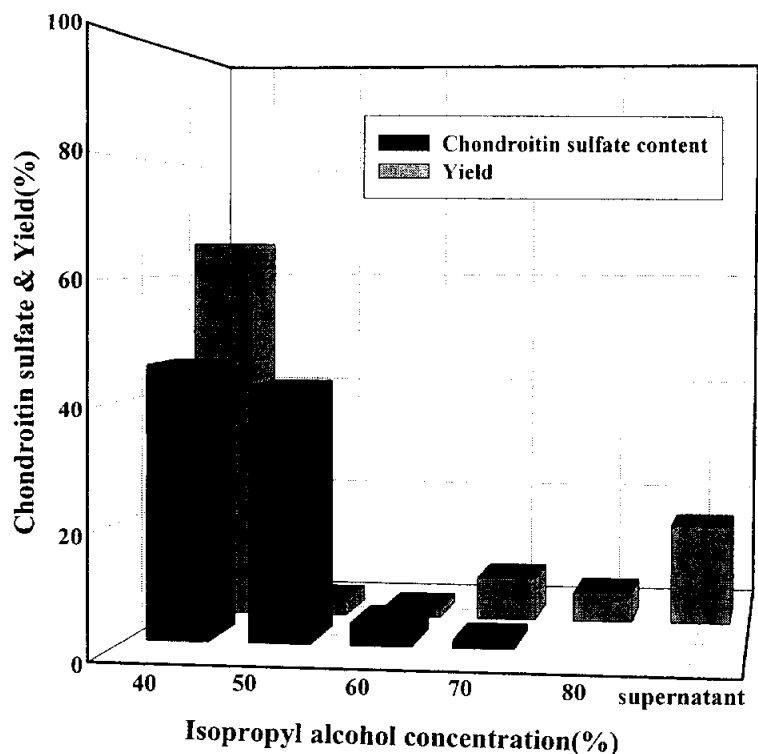


Fig. 10. Changes in chondroitin sulfate content and yield of skate cartilage hydrolysates as affected by different concentration of isopropyl alcohol before and after 0.1M NaOH pretreatment.

Alkaline (0.1M NaOH) pretreatment was conducted for 5 hours at ambient temperature. Skate cartilage was hydrolyzed by 2% Alcalase at 55°C for 4 hours. Precipitate and supernatant were dried by hot-air (60°C).

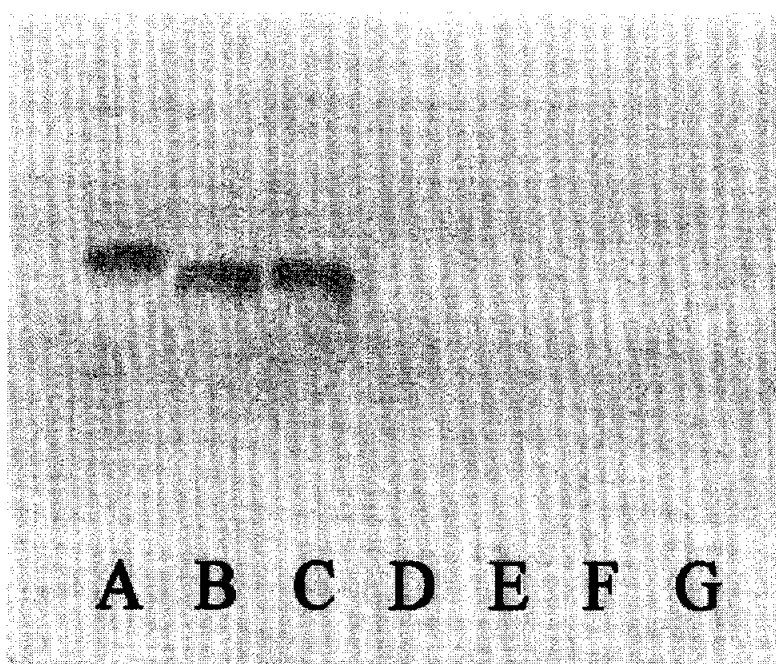


Fig. 11. Cellulose acetate membrane electrophoresis of skate cartilage fractions by isopropyl alcohol precipitation.

A: Chondroitin sulfate C, B: alcohol 40% precipitate, C: alcohol 50% precipitate, D: alcohol 60% precipitate, E: alcohol 70% precipitate, F: alcohol 80% precipitate, G: residue.

틴 황산에 반응하는 발색법에 의한 흡광도가 매우 높게 나타나서 음이온 교환수지에 의한 크로마토그래피의 방법으로 효과적으로 분리되는 것을 알 수 있었다.

이렇게 수집된 분획물들을 보다 정확한 콘드로이틴 황산의 정성분석을 위하여 cellulose acetate membrane 전기영동법에 의하여 영동한 결과 Fig. 10에서와 같이 105번 분획물에서 125번의 분획물까지에서 정확한 표준품과 같은 밴드의 경향이 나타나서 수집된 분획물들이 콘드로이틴 황산임을 알 수 있었다.

이러한 이온교환 크로마토그래피를 수회이상 하여 수집된 분획물들을 모아서 농축하고, 이를 한외여과 (MW 3,000)로 탈염한 후 동결건조하여 최종 분석 샘플로 이용하였다.

막분리에 사용되는 모듈의 형태는 크게 평판형 (Plate & Frame), 관형 (Tubular), 나권형 (Spiral Wound) 그리고 중공사형 (Hollow Fiber)으로 나뉘어지며, 본 실험에서는 적은양을 효율적으로 실험할 수 있는, 평판형 (Plate & Frame)으로 이루어진 한외여과막을 이용하였다. 한외여과막은 특성에 따라 PM, XM 그리고 YM으로 분류되며, 본실험에서는 친수성 특성을 가지는 YM 막 중에서 분자량 3,000의 범위인 YM3를 이용하였다 (Yoon et al., 1995).

이온교환 후 분획물의 동결건조물은 Sigma 사의 표준품 콘드로이틴 황산 C와 기기분석 비교하였다. FT-IR, ^1H -NMR 그리고 ^{13}C -NMR으로서 그 분자구조적 차이를 알아보았으며, 이들 방법은 분리·정제된 화합물들의 구조적인 동정과 특성 규명에 많이 쓰이는 방법이며, 콘드로이틴 황산에서도 많은 이용이 있다 (Servaty et al., 1998; Mucci et al., 2000; Huckerby et al., 2001).

정제된 분획물과 표준품 콘드로이틴 황산 C와의 FT-IR 분석 비교 결과는 Fig. 13에 나타내었다. Wavenumber (cm^{-1}) 값이 표준품의 경우에 있어서는 412.8, 582.4, 1065.6, 1259.7, 1414.4 그리고 1657.0에서 나타

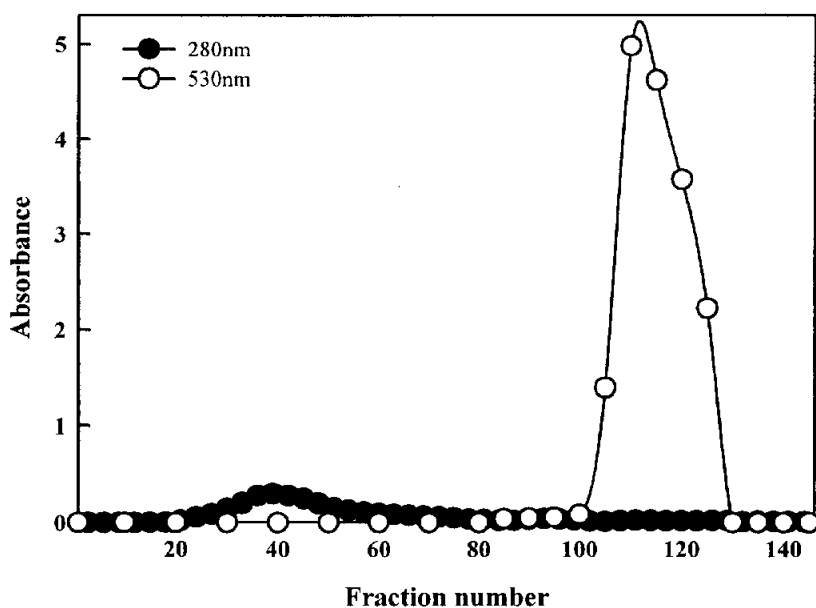


Fig. 9. DEAE-Sephacel chromatograms of isopropyl alcohol precipitates from skate cartilage.

The crude extract from skate cartilage was transferred to a DEAE-Sephacel ion exchange column (2.9×50.0 cm) equilibrated with 20 mM phosphate buffer (pH 7.0). Elution was carried out isogratic with the buffer and gradient from 0.0~1.5 M NaCl in the same buffer. The flow rate was 33.0 mL/hr and 6.0 mL fractions were collected.

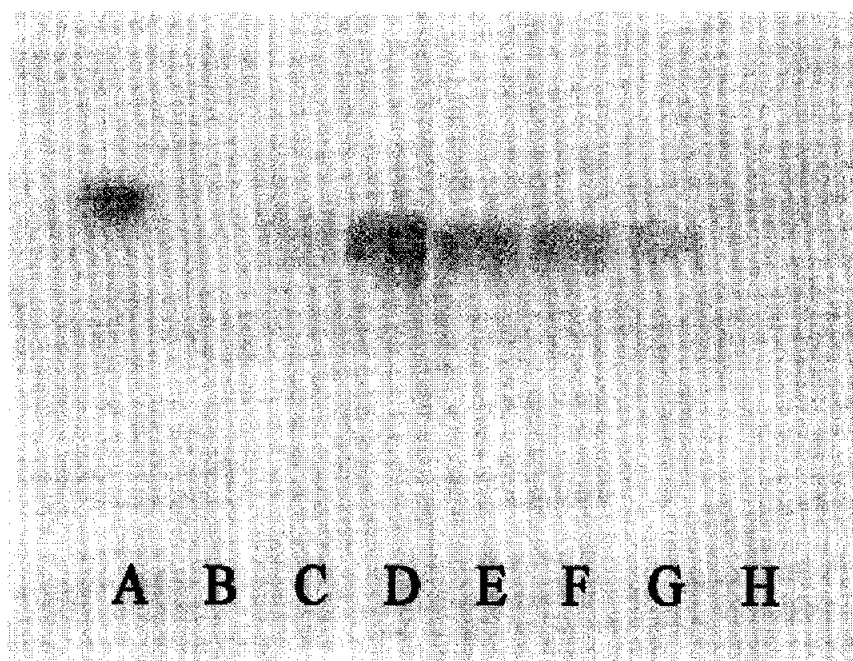


Fig. 10. Cellulose acetate membrane electrophoresis of fractions from DEAE-Sephacel chromatography of isopropyl alcohol precipitates from skate cartilage.

A : Authentic chondroitin sulfate C, B : fraction No. 100, C : fraction No. 105, D : fraction No. 110, E : fraction No. 115, F : fraction No. 120, G : fraction No. 125, H : fraction No. 130.

났으며, 이온교환 정제물은 414.1, 584.7, 1071.1, 1263.1, 1417.4 그리고 1631.7로 매우 유사한 영역에서 과장대가 나타났으며, 전체적인 그 경향도 매우 유사한 것으로 나타났다.

또한, ^1H -NMR을 이용하여 정제물과 표준품을 비교한 NMR signals는 문헌과 비교하여 구조를 확인하였다 (Mucci, 2000). 그 결과 Fig. 14와 같이 표준품 콘드로이틴 황산 C에서 관측된 proton signal은 2구간으로 나뉠 수 있으며 먼저, 1.9~2.0 ppm에서 관측된 signal은 acetamide methyl signal임을 동정할 수 있으며, 나머지 모든 signals는 3~5 ppm에서 관측되었다. 이 데이터를 보다 자세히 범위를 좁혀서 확인할 경우 Fig. 15와 같이 나타난다. 표준품 콘드로이틴 황산 C의 경우는 1.93, 1.95 ppm에서 시작하여 3.28, 3.50, 3.66~3.73, 3.92, 4.14, 4.47 그리고 4.70 ppm의 proton signal이 나타났으며, 이온교환 크로마토그래피로 정제된 샘플에서는 1.95, 1.97 ppm을 시작으로 3.30, 3.53, 3.63, 3.76, 3.95, 4.11, 4.16, 4.45 그리고 4.70 ppm의 proton signal이 나타나서, 표준품과 거의 같은 signal을 가지는 것으로 나타났다.

콘드로이틴 황산의 ^{13}C -NMR의 결과에 있어서의 각 탄소의 chemical shift는 잘 알려져 있으며 (Mucci, 2000) 정제물과 표준품과의 비교는 Fig. 16에 나타내었으며, 이를 NMR signals를 문헌과 참고 비교하여 구조를 확인하였다 (Mucci, 2000). 그 결과, 표준품 콘드로이틴 황산 C에서 관측된 signal은 3구간으로 나뉠 수 있으며 먼저, 22.8 ppm에서 관측된 signal은 acetamide methyl carbon임을 동정할 수 있으며, 174.5와 175.3 ppm에서 관측된 signal은 carbonyl임을 동정하였고 나머지 모든 signals는 50~110 ppm에서 관측되었다. 이온교환 정제물 또한 22.8 ppm에서 acetamide methyl carbon signal을 동정할 수 있었으며, 174.5와 175.2 ppm로 유사하여 carbonyl signal이 관측되었다. 콘드로이틴 황산은 22.8, 51.1, 67.8, 72.6, 74.0, 76.6, 80.1, 81.4, 101.5, 104.4, 174.5 그리고 175.2 ppm으로 나타났으며, 이온교환 크로마토그래피의 분획 정

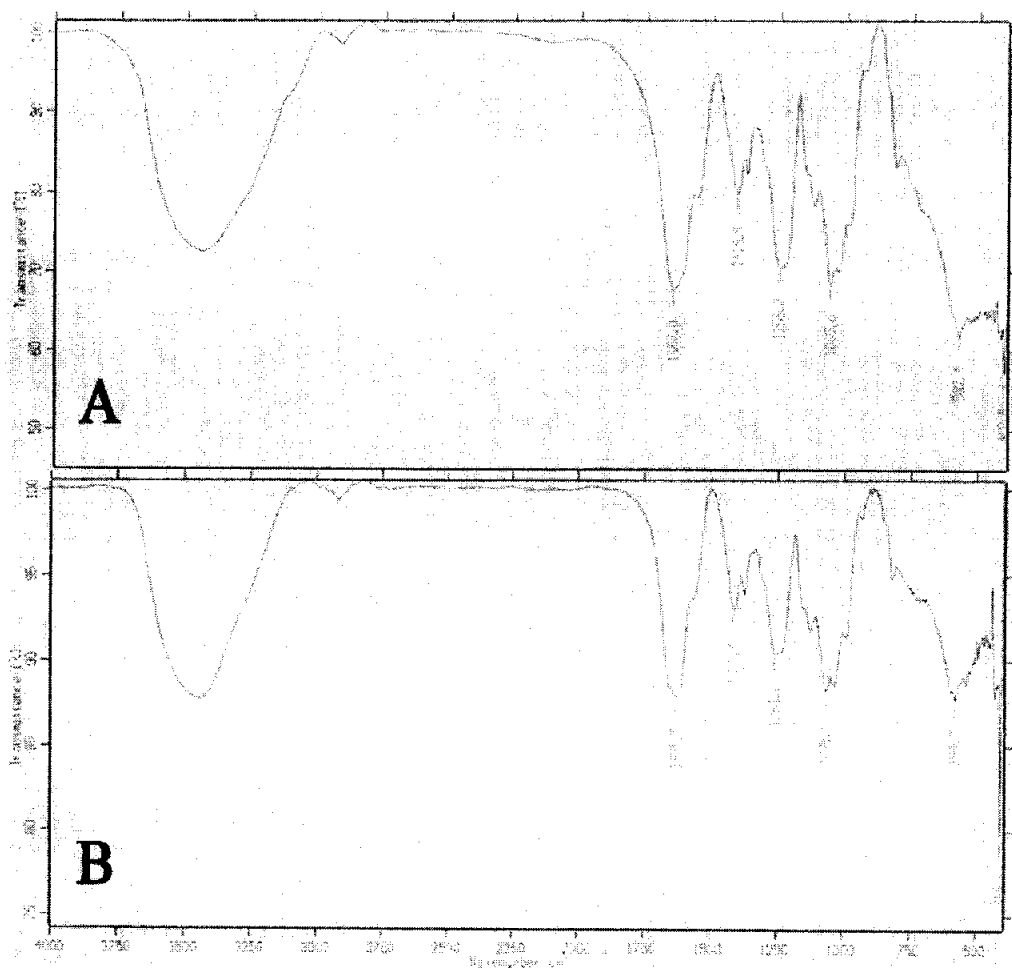


Fig. 13. FT-IR spectra of chondroitin sulfate purified from skate cartilage by ion-exchange chromatography.

A : Authentic chondroitin sulfate C,

B : Purified chondroitin sulfate.

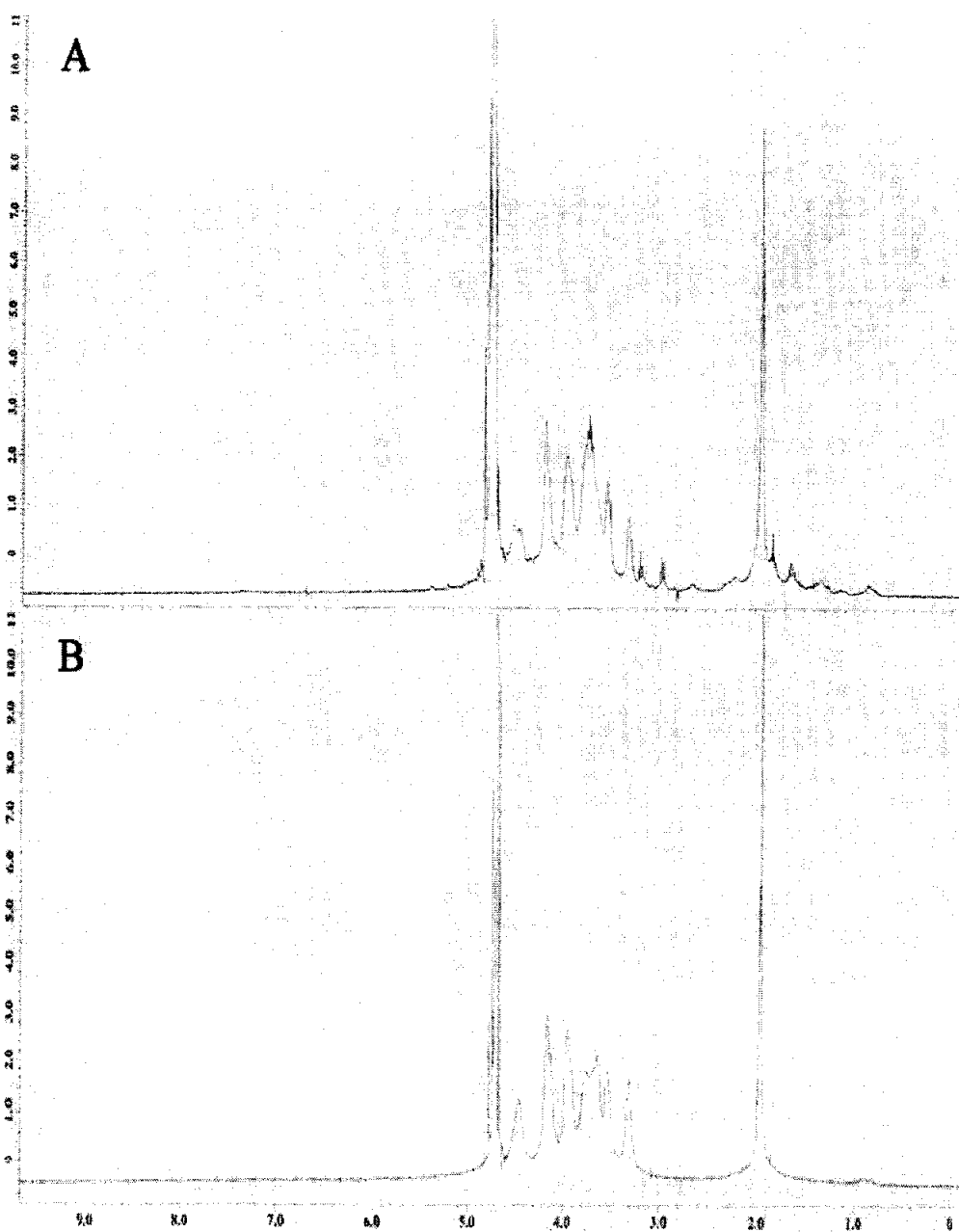


Fig. 14. ^1H -NMR spectra of purified chondroitin sulfate from skate cartilage by ion-exchange chromatogram.

A : Authentic chondroitin sulfate C,

B : Purified chondroitin sulfate.

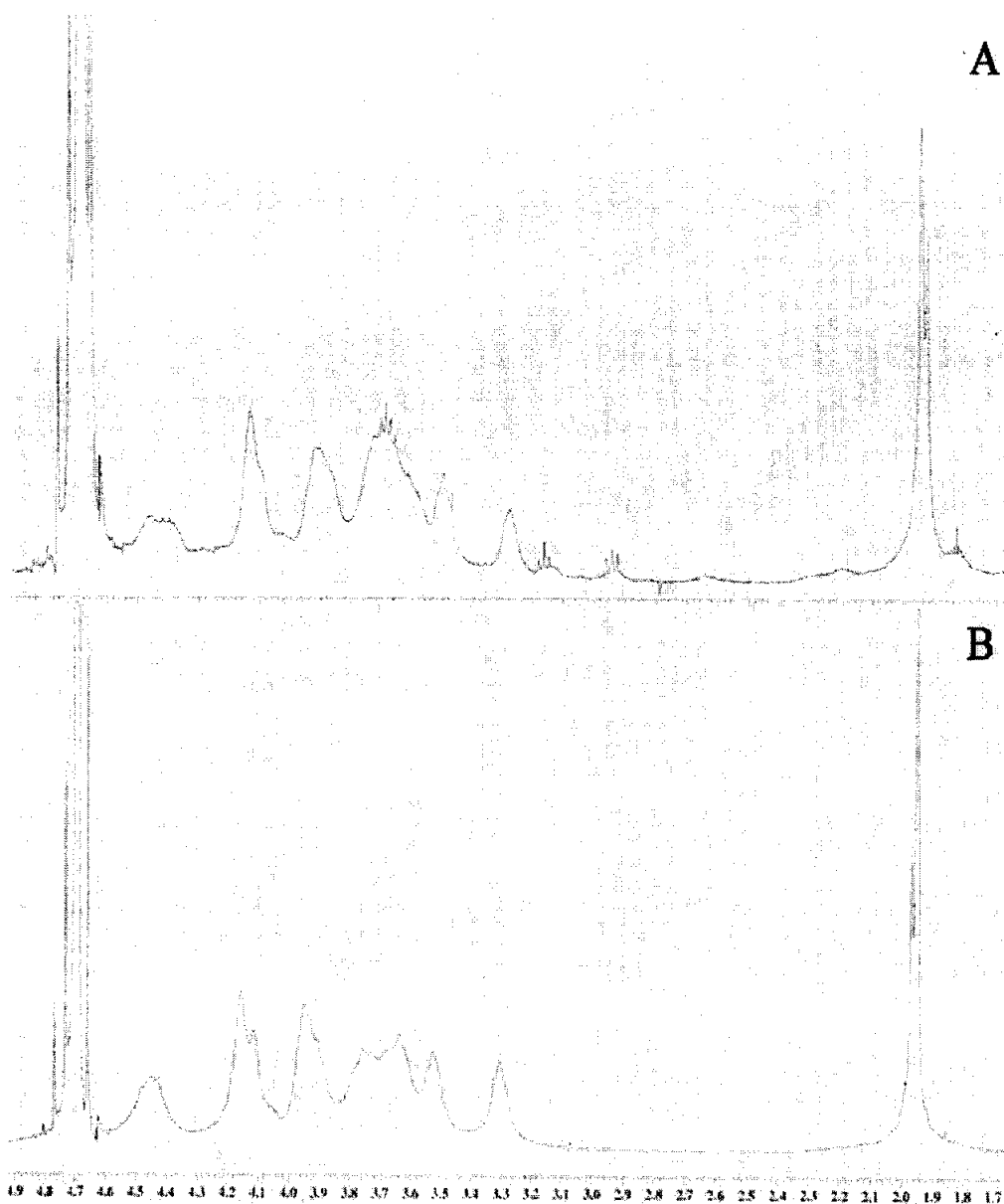


Fig. 15. ^1H -NMR spectra (1.7-4.9 ppm) of purified chondroitin sulfate from skate cartilage by ion-exchange chromatogram.

A : Authentic chondroitin sulfate C,

B : Purified chondroitin sulfate.

제물의 경우는 22.8, 51.1, 67.8, 72.7, 74.1, 76.6, 80.3, 81.5, 101.8, 104.5, 174.5 그리고 175.3으로 거의 유사한 경향으로 표준품과 매우 유사한 구조를 가지는 것으로 나타났다.

최종적으로 정제된 콘드로이틴 황산의 함량은 표준품이 73%이며, 이온교환 크로마토그래피에 의한 정제물은 68%로서 매우 근접하며 높은 함량을 가진 것으로 나타났다 (Table 8).

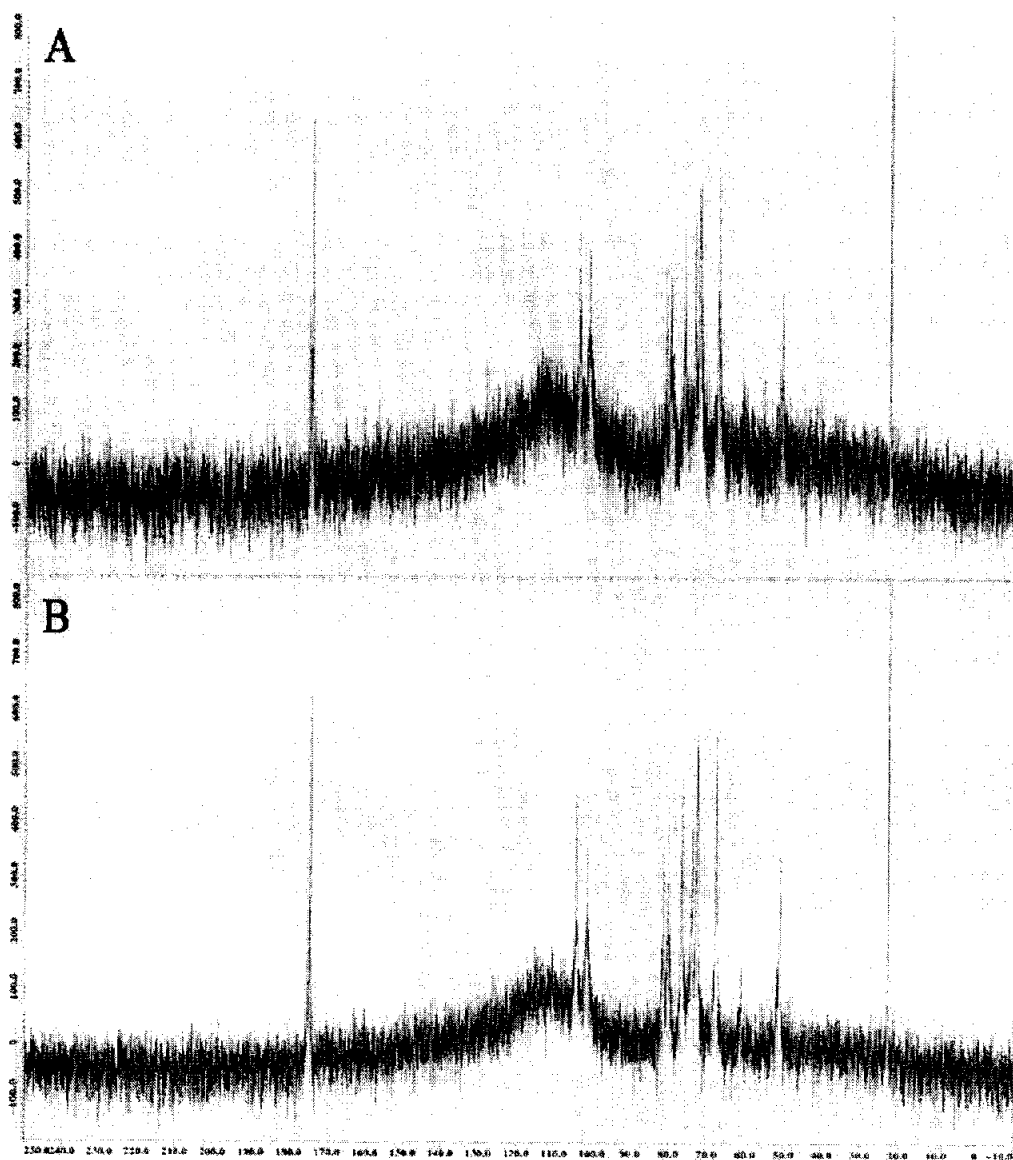


Fig. 16. ^{13}C -NMR spectra of purified chondroitin sulfate from skate cartilage by ion-exchange chromatogram.

A : Authentic chondroitin sulfate C,

B : Purified chondroitin sulfate.

Table 8. Comparisons of authentic chondroitin sulfate C with chondroitin sulfate purified from isopropyl alcohol precipitation and ion-exchange chromatography

Item	Chondroitin sulfate content (%)
Authentic chondroitin sulfate C	73 ± 1
Isopropyl alcohol precipitates	45 ± 1
Fractions from ion-exchange chromatography	68 ± 1

요 약

홍어연골을 이용하여 기능성물질인 콘드로이틴 황산을 제조하기 위하여 효소가수분해를 통하여 연골로부터 콘드로이틴 황산을 유리할 때 발생하는 불쾌취 제거를 반응표면분석법을 이용하여 최적화함과 아울러 가수분해물에서 콘드로이틴 황산을 유기용매 분별침전, 이온교환 크로마토그래피, 한외여과를 통하여 정제하여 FT-IR, NMR 등으로 그 정제 정도를 알아보았다.

1. 동결 홍어연골의 일반성분은 수분 80.5%, 조단백질 10.1%, 조지방 0.8%, 조회분 7.6%, 총탄수화물은 1.0%로 나타났으며, 연골자체의 VBN은 254 mg/100g 이었고, 콘드로이틴 황산의 함량은 0.6%로 나타났다. 효소가수분해에 의해서 제조된 가수분해물의 일반성분은 수분 4.1%, 조단백질 56.6%, 조지방 1.1%, 조회분 8.5%, 총탄수화물 29.7%로 나타났으며, 휘발성염기질소는 620 mg/100g이고, 30%의 콘드로이틴 황산 함량이 나타났다.

2. 탈취 홍어연골 콘드로이틴 황산을 제조를 위하여 전처리 조건으로 autoclave에서 시간별로 처리한 후에 콘드로이틴 황산을 공정대로 제조하여 휘발성염기질소를 측정하여 가수분해물의 냄새에 영향을 주는 암모니아류의 질소성분을 측정한 결과 VBN값이 599 mg/100g에서 664 mg/100g로 유의적 차가 없어서 시간별로 autoclave한 효과는 없는 것으로 나타났다.

3. 탈취 콘드로이틴 황산의 제조 전처리 조건으로서 물처리를 시간별로 한 후 휘발성염기질소를 측정한 결과 VBN 값은 618 mg/100g에서 642 mg/100g으로 유의적인 차가 없어서 물을 전처리하여

제조한 결과 탈취의 효과는 없었다.

4. NaOH를 이용한 알칼리 전처리에서는 유의적인 효과가 있었으며, 반응표면분석을 통하여 농도, 시간, 그리고 투입량을 최적화 한 분석에서 시간은 유의적인 영향을 크게 미치지 않았으며, 농도와 투입량에 의해서 제조된 VBN은 영향을 받는 것으로 나타났으며, 반응표면 분석 결과에서는 0.12M의 NaOH를 3.6배 첨가하여 7.8시간 동안 처리하는 것이 가장 VBN이 낮게 나타나는 것으로 분석되었다. 이때의 통계적 VBN은 6.5 mg/100g 이었으며, 실지 같은 조건에서의 실험결과는 15 mg/100g으로 매우 근접하는 결과가 나타났다.

5. 제조되는 콘드로이틴 황산의 고순도 제품으로의 정제를 위한 이소프로필 알콜 침전 농도별 반응에서 알칼리 전처리의 경우는 40% 농도에서 54.2%의 수율을 나타내었으며, 50%에서부터는 차례로 0.9%, 3.6%, 11.6%, 8.0%가 침전되었으며, 80%까지 침전되지 않은 상층액의 건조물은 20.0%의 수율이 나타났다. 또한 콘드로이틴 황산의 함량은 44%로 농도 40%에서 높고 그 이후는 차례로 7.3%, 2.2%, 0.9% 이었으나 전기영동 결과 밴드가 거의 나타나지 않았다.

6. 전처리 없이 제조된 가수분해물은 알콜 40%에서부터 침전이 일어났으며, 수율이 65.7%로 40%의 농도에서 많은 침전이 일어났다. 또한 50%에서부터는 차례로 2.6%, 1.4%, 7.2%, 4.9%, 최종 상층액은 16.9%이었다. 콘드로이틴 황산의 함량은 40%에서 45.9%의 함량이 나타났다, 50%는 42.5%의 함량이 나타났다. 60%와 70%에서도 3.7%와 1.2%의 함량이 나타났으나, 전기영동 결과의 밴드가 거의 나타나지 않았다.

7. 뮤코다당·단백질의 형태로서 이루어져있는 가수분해물에서의 콘드로이틴황산의 정제 두 번째 단계로서 이온교환 크로마토그래피를 실시하였는데, 효과적으로 단백질부분인 양이온이 떨어졌다. 이를 다시 한외여과를 통하여 탈염하였다. 이 분획 샘플의 콘드로이틴 황산의 함량은 $68\pm1\%$ 로 나타나서, 표준품 콘드로이틴 황산 C의 같은 방법의 함량 $73\pm1\%$ 에 근접하는 것으로 나타났다.

8. FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ 그리고 $^{13}\text{C-NMR}$ 로서 정제 콘드로이틴 황산을 분석한 결과, 표준품 콘드로이틴 황산 C와 같았다.

참고문헌

- Abe, M. 1999. The characteristics and effects of chondroitin from bovine bone (in Japanese). New Food Industry, 41, 1-3.
- Abu, K. and N. Seno. 1993. The basis of carbohydrate chemistry. Kodansha, 142-177.
- Anderson, M.A. 2003. Glucosamine and Chondroitin Sulfate in the Prevention and Management of Osteoarthritis. The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian, 24, 9A, 24-27.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed.: Association of Official Analytical Chemists: Washington, D.C.
- Baek, H.H. and K.R. Cadwallader. 1999. Optimization of the enzymeatic hydrolysis of crab processing by-products using FlavourzymeTM. Food Sci. Biotechnol., 8, 43-46.
- Bailey, A. J. and Light, N. D. (1989). Connective tissue in meat and meat products, England: Elsevier Science Publishers Ltd.
- Bjornsson, T.D., P.V. Nash and R. Schaten. 1982. The anticoagulant effect of chondroitin-4-sulfate. Thromb. Res., 27, 15-21.
- Burmeister, A. 2000. The Use of Glucosamine Sulfate and

- Chondroitin Sulfate in the Treatment of Osteoarthritis. Physician assistant : the official journal of the American Academy of Physician Assistants, 24(11), 46-55.
- Cha, Y.J., E.J. Kim and H.H. Baek. 1995. Processing of pen shell by-product hydrolysate using response surface methodology. Korean J. Food Sci. Technol., 27(6), 958-963.
- Choi, D.W., M.J. Kim, H.S. Kim, S.H. Chang, G.S. Jung, K.Y. Shin and S.Y. Chang. 2003. A size-exclusion HPLC method for the determination of sodium chondroitin sulfate in pharmaceutical preparations. J. Pharm. Biomed. Anal., 31, 1229-1236.
- Conway, E.J. 1950. Microdiffusion Analysis and Volumetric Error. Crosby Lockwood and Son Ltd., London, England.
- Dodgson, K.S. and R.G. Price. 1962. A note on the determination of the ester sulfate content of sulfated polysaccharides. Biochem. J., 84, 106-110.
- Ehrlich, J., B. Patel and S.S. Stivala. 1981. Comparative studies of mucopolysaccharides from marine animals. II. *Illex Illecebrosus* (Lesueur) and various crustaceans. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 52, 95-101.
- Falshaw, R., U. Hubl, D. Ofman, G.C. Slim, A.M. Tariq, D.K. Watt and S.C. Yorke. 2000. Comparison of the glycosaminoglycans

- isolated from the skin and head cartilage of Gould' s arrow squid (*Nototodarus gouldi*). Carbohydrate Polymers, 41, 357-364.
- Fernaude, E.I., S.M. Nieto and P. Bovoenta. 1994. Differential effects of glycosaminoglycans on neurite outgrowth from hippocampal and thalamic neurons. J. Cell Sci., 107, 1437-1448.
- Fontenele, J.B., G.S. Viana, J. Xavier-filho and J.W. De-Alencar. 1996. Anti-inflammatory and analgesic activity of a water-soluble fraction from shark cartilage. Braz. J. Med. Biol. Res., 29, 643-646.
- Gu, Y.S., S.H. Lee, D.C. Park, J.H. Park, I.S. Kim, C.I. Ji and S.B. Kim. 1999. Liquefaction methods for production of sulfated mucopolysaccharides from *Ciona intestinalis*. Food Sci. Biotechnol., 8, 338-340.
- Guerard, F., L. Dufosse, D. De La Broise and A. Binet. 2001. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, 11, 1051-1059.
- Haard, N. F. and Simpson, B. K. (2000). Seafood enzymes. In C. G. Sotelo, & H. Rehbein (Eds.), TMAO-degrading enzymes. New York: Marcel Dekker, 167-190
- Hata, R. and T. Nagai. 1972. Rapid and micromethod of separation of acidic glycosaminoglycans by two-dimensional electrophoresis.

Anal. Biochem., 45, 462-468.

Hatton, A.D. and Gibb, S.W. (1999). A technique for the determination of trimethylamine-N-oxide in natural waters and biological media. Anal. Chem., 71, 4886-4891

Huckerby, T.N., R.M. Lauder, G.M. Brown, I.A. Nieduszynski, K. Anderson, J. Boocock, P.L. Sandall and S.D. Weeks. 2001. Characterization of oligosaccharides from the chondroitin sulfates ¹H-NMR and ¹³C-NMR studies of reduced disaccharides and tetrasaccharides. Eur. J. Biochem., 268, 1181-1189.

Hungerfor, D.S. and L.C. Jones. 2003. Glucosamine and Chondroitin Sulfate Are Effective in the Management of Osteoarthritis. J. Arthroplasty., 18(3), 5-9.

Kanoh, S., Watabe, S., Takewa, T. and Hashimoto, K. (1985). Urea-resistibility of myofibrillar proteins from the requiem shark *Triakis scyllia*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 51, 1713-1716.

Kariya, Y., S. Watabe, K. Hashimoto and K. Yoshida. 1990. Occurrence of chondroitin sulfate E in glycosaminoglycan isolated from the body wall of sea cucumber, *Strichopus japhonicus*. J. Biol. Chem., 265, 5081-5085.

Katsura, N. and E.A. Davidson. 1969. Studies on the metabolism of the chondroitin 4-sulfate-protein complex of porcine articular cartilage. Biochem. Biophys. Acta., General subjects, 184(3)

503-508.

Kitagawa, H., K. Tsutsumi, Y. Tone and K. Sugahara. 1997. Developmental Regulation of the sulfation profile of chondroitin sulfate chains in the chicken embryo brain. *J. Biol. Chem.*, 272, 31377-31381.

Koga, T. 1989. About S.C.P. as a functional food material (food grade chondroitin). *New Food Industry*, 31, 4-7.

Konosu, S., Watanabe, K. and Shimizu, T. (1974). Distribution of nitrogenous constituents in the muscle extracts of eight species of fish. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 40, 909-915

Korean pharmaceutical codex, second edition. 1998, KFDA, 1040-1042.

Lee, A. and R. Langer. 1983. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science*, 221, 1185-1187.

Mac-Rae, S.M., H.F. Edelhauser, R.A. Hyndiuk, E.M. Burd and R.O. Schultz. 1983. The effects of sodium hyaluronate, chondroitin sulfate and methylcellulose on the corneal endothelium and intraocular pressure. *Am. J. Ophth.*, 95, 332-341.

Michelacci, Y.M. and C.P. Dietrich. 1976. Structure of chondroitin sulfates. Analysis of the products formed from chondroitin sulfates A and C by the action of the chondroitinases C and AC from *Flavobacterium heparinum*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 451, 436-

- Mizuta, S., J.H. Hwang and R. Yoshinaka. 2003. Molecular species of collagen in pectoral fin cartilage of skate. *Food Chemistry*, 80, 1-7.
- Montecalvo, J.Jr., S.M. Constantinides and C.S.T. Yang. 1984. Optimization of processing parameters of the preparation of flounder frame protein product. *J. Food Sci.*, 49, 172-176.
- Mourao, P.A., S.P. Mariani and S.G.P. Mauro. 1996. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. *J. Biol. Chem.*, 271, 23973-23984.
- Mucci, A., L. Schenetti and N. Volpi. 2000. ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance identification and characterization of components of chondroitin sulfates of various origin. *Carbohydrate Polymers*, 41, 37-45.
- Naito, Y. 1998. The fantastic functional effect of shark cartilage approved by world scientists. *Inter. Pol. Holi. Med. Ins.*, in Japanese.
- Nakagawa, H. 1993. Development of efficient method for preparation of new chondroitin sulfate, 1992 Abstract of the results of research for the development of effective utilization of functional sea food. 181-191.

- Nakazawa, K. and K. Murata. 1979. Comparative study of the effects of chondroitin sulfate isomers on artherosclerotic subjects. *ZFA.*, 34, 153-159.
- Nishino, T. and T. Nagumo. 1991. The anticoagulant activity of fucan sulfate from the brown seaweed, *Ecklonia kurome*. *Carbohydrate Res.*, 314, 193-201.
- Park, D.C. 2000. Purification and Application of Chondroitin Sulfate from Sea cucumber(*Stichopus japonicus*) and Shark(*Isurus oxyrinchus*) cartilage. Pukyong National University, Thesis of PhD.
- Park, D.C. and S.B. Kim. 1998. The functional activity of chondroitin sulfate and the effective utilization of sea food. *Fisheries Res.*, 12, 30-39.
- Pfeiler, E. 1993. Characterization and distribution of undersulfated chondroitin sulfate and chondroitin in leptocephalous larvae of elopomorph fishes. *Fish Physiol. And Biochem.*, 12, 143-148.
- Servaty, R., J. Schiller, H. Binder, B. Kohlstrunk and K. Arnold. 1998. IR and NMR studies on the action of hypochlorous acid on chondroitin sulfate and taurine. *Bioorganic Chem.*, 26, 33-43.
- Silva, Carla J.S.M. and Inês C. Roberto 2001. Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using response

- surface methodology. *Process Biochem.*, 36, 1119-1124.
- Smith, C.P. and Wright, P.A. (1999). Molecular characterization of an elasmobranch urea transporter. *Am. J. Phys.*, 45, 622-626
- Smith, R.L. and D.J. Schurman. 1983. Comparison of cartilage destruction between infectious and adjuvant arthritis. *J. Orthop. Res.*, 1, 136-143.
- Sugahara, K., S. Nandanaka, K. Takeda and T. Koiima. 1996. Structural analysis of unsaturated hexasaccharides isolated from shark cartilage chondroitin sulfate D that are substrates for the exolytic action of chondroitin ABC lyase. *European Biochem.*, 239, 13530-13536.
- Takeuchi, T., Safni and T. Miwa. 1997. Ion chromatography of anions on stationary phases modified with chondroitin sulfate. *J. Chromatography A.*, 789, 201-206.
- Takeuchi, T., Safni, T. Miwa, Y. Hashimoto and H. Moriyama. 1998. Ion chromatography on anion exchangers modified with mucopolysaccharides. *J. Chromatography A.*, 804, 79-86.
- Tanaka, K. 1978. Physicochemical properties of chondroitin sulfate. I. Ion binding and secondary structure. *J. Biochem. Tokyo.*, 83, 647-653.
- Tannenbaum, S.R., M. Ahern and R.P. Bates. 1970. Solubilization of

- fish protein concentrate. Food Technol., 24(5), 604-611.
- Thakur, S. and D.C. Saxena. 2000. Formulation of extruded snack food (Gum based cereal-pulase blend): Optimization of ingredients levels using response surface methodology. Lebensm. Wiss. U. Technol., 33, 354-361.
- Vieira, R.P., B. Mulloy and P.A.S. Mourao. 1991. Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. J. Biol. Chem., 266, 13530-13536.
- Volpi, N. 1996. Purification of heparin, dermatan sulfate and chondroitin sulfate from mixtures by sequential precipitation with various organic solvents. J. Chromatography B., *Biomedical Applications*. 685, 27-34.
- Von-der-Mark, K. and G. Conrad. 1979. Cartilage cell differentiation review. Clin. Orthop. Mar., 139, 185-205.
- Waard, D.P., J.F. Vliegenthart, A. Harada and K. Sugahara. 1992. Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. II. Seven compounds containing 2 or 3 sulfated residues. J. Biol. Chem., 267, 6036-6043.
- Watabe, S., Y. Ochiai, S. Kanoh and K. Hashimoto. 1983. Proximate and protein compositions of requiem shark muscle. Bull. Japan.

Soc. Sci. Fish., 49, 265-268

김혜경, 박주영, 김우정. 1988. 알칼리 처리가 멸치 추출액의 품질에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 20(3), 441~446.

수협중앙회. 1997. 우리바다: 한국의 전통식품(홍탁). 수협중앙회, 2. 35, 52~57.

식품의약품안전청. 2000. 식품공전. 식품의약품안전청, 334~336.

박성현. 1995. 현대실험계획법. 민영사, 521~565.

박윤정. 2003. 홍어, *Raja nasuta* 숙성중의 성분변화. 부경대학교 산업대학원. 학위논문.

이주향. 2002. 홍어연골로부터 chondroitin sulfate의 제조. 부경대학교 대학원. 학위논문.

전경수. 1997. 수산동물을 이용한 콘드로이틴황산 소재의 제조. 부경대학교 대학원. 학위논문.

한국식품영양과학회 편. 2000. 식품영양실험핸드북, 식품편. 도서출판 효일. 786~788.

감사의 글

부족한 논문이 완성되기까지 도움을 주신 분들께 지면으로나마 감사함의 인사를 올립니다.

먼저 부족한 저를 이 자리에 있기까지 이끌어 주시고 조언해주신 김선봉 교수님께 깊은 감사의 인사를 올립니다. 또한 부족한 논문을 정성껏 다듬어 주신 장동석 교수님, 양지영 교수님, 이양봉 교수님께 진심으로 감사의 인사를 올립니다. 그리고 많은 지도 편달로 가르쳐 주신 박희열 교수님, 이근태 교수님, 조영제 교수님, 안동현 교수님, 박미연 선생님께도 깊이 감사드립니다.

항상 따뜻하게 가르쳐주신 지청일 선배님과 머나먼 타국에서도 이메일로 논문수정을 도와주신 구연숙 선배님께 진심으로 감사의 말씀 올립니다. 오랜 기간 동안 동거동락하며 실험과 연구를 도와준 후배 연자, 익상, 탁석, 인우, 광현, 오성, 연주, 선경, 영경, 희진, 수현, 혜영, 재웅, 현진, 자선 많은 후배님들 그리고 복무 중에도 바쁜 실험을 도와줘 감동을 주었던 태완, 항상 부탁을 고맙게도 도와주는 정은 후배님과 떠넘기듯 짐을 주고 나와 미안한 진옥 후배님과 바쁜 와중에도 도움주려고 노력하는 현덕 후배님이 없었더라면 마무리를 못하였을 것으로 생각합니다. 무엇보다 가끔 전화로 질문해도 열심히 도와주던 주함 선배님 그리고, 논문의 연구를 도와준 동기 승목이에게 감사의 말을 전하며, 직장과 학업을 멋지게 해내며 바쁜 와중에도 후배들 신경 써주시는 성구 선배님께 감사드리고, 졸업하고도 부족한 동기를 걱정해주고 도와준 상원, 영수에게 무엇보다 감사의 말 전합니다. 또한, 시료를 제공해주시고 많은 조언을 해주신 영산포식품의 강건희 사장님께도 감사합니다. 격려로서 배려해 주신 영훈 선배님, 형수 선배님, 영무 선배님, 승극 선배님, 승재 선배님, 덕천 선배님, 기현 선배님, 경민 선배님, 기석 선배님, 순형 선배님, 상철 선배님, 윤정 선배님, 미숙 선배님, 이성, 영

준, 상범 외 많은 보장실 졸업생 선·후배님들께도 감사드립니다.

또한, 지나간 힘든 여정을 함께 하며 도와준 의철, 형섭 동기와 잘 따라주고 많은 격려를 아껴주지 않은 찬웅, 민수, 해진, 성준, 진한, 성진, 미경, 해경, 보미, 호진 등 많은 대학원 후배님들께 감사와 격려의 말을 전합니다. 그대들이 있어 즐거웠습니다. 또한 따뜻하게 관심으로 도와주신 길보 선배님, 호수 선배님, 미영 선배님, 선경 선배님 그리고 이신조 군과 상희 후배님에게도 깊은 감사드립니다.

긴 시간동안 걱정과 관심으로 배려해준 경동 선배님, 정호 선배님, 규원, 윤석, 진아, 그리고 한성, 병목, 형수, 순유, 형준, 봉수, 재진, 효태, 정호 친구들에게도 감사합니다.

항상 사랑으로 관심 가져주며 신경 써 준 매형과 누나, 중훈이형과 형수님, 대학원 생활동안 주말이면 행복을 가져다준 다건, 효정 조카들, 무엇보다 저를 이 세상에 있게 해 주시고 사랑과 희생의 관심으로 저를 보살펴주시는 최고의 후원자이신 아버지, 어머니께 부족한 이 논문을 바칩니다. 다시 한번 감사의 마음을 올립니다.