



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시, 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리, 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지, 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

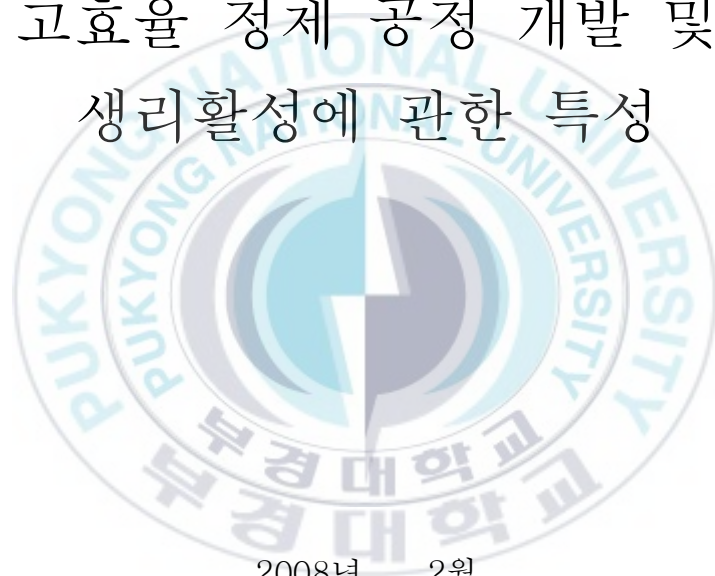
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 박 사 학 위 논 문

패각에 존재하는 콘키올린의
고효율 정제 공정 개발 및
생리활성에 관한 특성



2008년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

생물공학과

탁 건 태

공 학 박 사 학 위 논 문

패각에 존재하는 콘키올린의
고효율 정제 공정 개발 및 생리활성에 관한 특성

지도교수 김 중 균

이 논문을 공학박사 학위논문으로 제출함.

2008년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

생물공학과

탁 건 태

탁건태의 공학박사 학위논문을 인준함.

2008년 2월 26일



주	심	공학박사	공	인	수	인
위	원	이학박사	홍	용	기	인
위	원	이학박사	남	수	완	인
위	원	이학박사	이	건		인
위	원	공학박사	김	중	균	인

목 차

목 차	i
영문 요약	v
표 목 차	vii
그림 목차	viii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	9
1. 저가치 수산물의 나노 및 효소가공처리 공정기술과 산업적 응용제품 개발	9
가. 초미세 및 나노입자분말의 제조 및 입도분석	9
(1) 나노분말의 제조	9
나. 나노 및 초미세 가공분말의 성분분석과 물리화학적 특성 검토	12
(1) 표면장력 측정	12
(2) pH에 대한 표면장력 변화	12
(3) 계면장력 측정.....	12
(4) 유화활성 및 유화안정성.....	12
(5) 온도 및 열 안정성.....	13
다. Conchiolin의 효소 가수분해에 의한 기능성 펩티드 제조.....	13
(1) 펩티드 제조.....	13
(가) 산, 효소 가수분해 및 정제.....	13
(나) TLC (Thin layer chromatography) 분석.....	15

(2) 정제된 펩티드 생리활성 측정.....	15
(가) 항염증 활성 측정 (COX inhibition assay).....	15
(나) 미백 활성 측정 (In vitro tyrosinase inhibition assay).....	16
2. 나노 및 효소 분해물의 생리 활성과 기능성 검증을 통한 한방 소재화 연구	
.....	17
가. 가공원료 추출물 생리활성 분석.....	17
(1) 가공원료 추출물 추출 및 정량분석.....	17
(가) 가공원료 추출물 추출.....	17
(나) 가공원료 추출물 단백질 정량분석.....	18
(다) 가공원료 추출물 당 정량분석.....	20
(2) 가공원료추출물의 생리활성 분석.....	20
(가) 항염증 활성 측정.....	20
(나) 항산화 활성 측정.....	20
(다) 미백 활성 측정.....	21
(라) TLC (Thin layer chromatography) 분석.....	21
(마) SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis).....	22
나. 정제된 분획물의 생리활성 연구 및 생화학적·물리화학적 특성 검토	
.....	23
(1) Conchiolin 정제	23
(2) Conchiolin 정제를 위한 Prep-LC 조건	25
(3) 정제된 분획물의 생리활성 분석	27
(가) 항염증 활성 측정	27
(나) 항산화 활성 측정	27
(다) 미백 활성 측정	27
(라) TLC 분석	27
(마) SDS-PAGE	28

3. 개발된 한방소재를 이용한 임상연구 및 안정성 연구	28
가. 전 임상 동물실험	28
(1) 가공원료추출물의 세포 독성 및 항염 활성 측정	28
(가) 세포배양	28
(나) 세포 생존율 측정	28
(다) NO 생성량 측정	29
(라) Immunoblot analysis	29
(마) Cytokine과 PGE2 측정	30
(2) Rat에서 가공원료추출물의 독성 측정	30
(가) 체중 측정 및 간, 신장의 무게 측정	30
(나) GOT, GPT, LDH 및 BUN 측정	30
III. 결과 및 고찰	32
1. 저가치 수산물의 나노 및 효소가공처리 공정기술과 산업적 응용제품 개발	32
가. 초미세 및 나노입자분말의 제조 및 입도분석	32
(1) 나노분말의 입도분석	32
나. 나노 및 초미세가공분말의 성분분석과 물리화학적 특성 검토	32
(1) 표면장력 측정	32
(2) pH에 대한 표면장력의 변화	33
(3) 계면장력 측정	37
(4) 유화활성 및 유화안정성	37
(5) 온도 및 열 안정성	39
2. 나노 및 효소분해물의 생리활성과 기능성 검증을 통한 한방 소재화 연구	42

가. 가공원료 추출물의 생리활성 분석	42
(1) 가공원료 추출물의 정량 비교분석	42
(2) 가공원료 추출물의 생리활성 비교분석	49
나. 정제된 분획물의 생리활성 연구	63
(1) 항염증 활성 측정	63
(2) 항산화 활성 측정	71
(3) 미백 활성 측정	71
(4) TLC 분석	77
(5) SDS-PAGE	81
3. 개발된 한방소재를 이용한 임상연구 및 안정성 연구	83
가. 전임상 동물실험	83
(1) 가공원료추출물의 세포 독성 및 항염 활성 측정	83
(2) Rat에서 가공원료추출물의 독성측정	88
IV. 결론	94
국문요약	107
참고문헌	108
감사의 글	111

Development of the high efficient purification process for conchiolin from mollusk shells and its characterization of biological activity

Keon Tae Tak

Department of Biotechnology and Bioengineering,
The Graduate School, Pukyong National University

Abstract

The biological activities of molluscan shells were studied by the high efficient purification process.

Molluscan shells were pulverized minutely down below $30\mu\text{m}$ and manufactured to the nano-scale powder below 100nm. The surface tension and interfacial tension of mussel powders were 62.3mN/m and 30.1mN/m, respectively. The optimal pH for surface tension was 5.0 and optimal emulsifying stability was -0.01 Kd.

Enzyme hydrolyzed compounds are manufactured from hyperfine powders, which were extracted from pacific oyster, short-necked clam, ark shell, surf clam, blue mussel and egg cockle and their cyclooxygenase inhibition activities were 82.9%, 36.9%, 48.8%, 64.3%, 57.8% and 96.9%, respectively. However, the DPPH radical scavenging activity and tyrosinase inhibition activity appeared to be insignificant.

The main molecular size of conchiolin protein extracted from six species of molluscan shells was 37 kDa, and those of other 2~3 bands

were identified to be in a range of 15 kDa – 75 kDa. Conchiolin was verified to be lipopolysaccharide by thin layer chromatography.

The toxicity of conchiolin extracted from molluscan shells did not appear in pre-clinic raw cell experiments.

The production and expression of NO, IL-6 and TNF- α in raw 264.7 cell were inhibited 50% from anti-inflammation effect of conchiolin.

There was no effect of crude conchiolin extracted from molluscan shells on the body weight of rat. There was also no effect of the crude conchiolin on GOT, GPT, LDH and BUN of rat.



표 목차 (List of Table)

Table 1. Pharmaceutical activities of mollusk shells in Korean medicine.....	3
Table 2. Comparison with protein and sugar concentration of partial purified conchiolins by Sephadex G-100 from various mollusk shells.....	24
Table 3. Prep-LC conditions for conchiolin purification.....	25
Table 4. Comparison with protein and sugar concentration of extracted soluble conchiolin using various buffers from Pacific oyster.....	44
Table 5. Comparison to yield of the soluble crude conchiolins from various mollusk shells using urea and citrate buffer.....	47
Table 6. Comparison to yield of sugars from various mollusk shells using urea and citrate buffer.....	48
Table 7. The activity of COX-2 inhibition with purified conchiolins from various mollusk shells.....	51
Table 8. Comparison of DPPH radical scavenging activity by 8M Urea and 0.1 M citrate buffer extraction from Pacific oyster.....	57
Table 9. Inhibitory effects of purified conchiolins extracted from various mollusk shells on cyclooxygenase activity at various protein concentrations.....	68
Table 10. DPPH radical scavenging activity of the soluble partial purified conchiolin extracted from various mollusk shells.....	72
Table 11. Effect of the soluble partial purified conchiolins from various mollusk shells on tyrosinase inhibition activity.....	76

그림 목차 (List of Figures)

Fig. 1. Schematic diagram of manufacture process of nano particle from mollusk shell powder.	10
Fig. 2. Photograph of nano particle manufactured from pacific oyster.....	11
Fig. 3. Schematic diagram for crude conchiolin from various mollusk shells by acidic or enzymatic hydrolysis.	14
Fig. 4. Extraction methods for crude soluble conchiolin using urea and citric acid buffer from various mollusk shells.	19
Fig. 5. Schematic diagram for the purification of crude conchiolin by Sephadex G-100 and Prep-LC.	26
Fig. 6. Photograph of scanning electron microscope (SEM) of nano scaled powder of pacific oyster.....	34
Fig. 7. Surface tensions of powders manufactured from various mollusk shells.....	35
Fig. 8. Effect of pH on the surface tension of hard-shelled mussel solution.....	36
Fig. 9. Interfacial tensions of powders manufactured from six species shelles.....	38
Fig. 10. Emulsifying stabilities of powders manufactured from various mollusk shell.....	40
Fig. 11. Comparison of emulsifying activity for heat treatment samples.....	41
Fig. 12. Conchiolin extraction by various buffers from Pacific oyster....	45
Fig. 13. Diagram of ROS production.....	55

Fig. 14. Comparison of DPPH radical scavenging activity by 8M Urea extraction and 0.1M citrate buffer extraction from Pacific oyster.....	58
Fig. 15. Analysis by SDS-PAGE of the 8M Urea extraction and 0.1M citrate buffer extraction from various mollusk shells.	62
Fig. 16. Mechanism of chemotherapeutic agents on arachidonic acid pathways.....	66
Fig. 17. Inhibitory rates of Cox-1 and Cox-2 by various soluble partial purified conchiolins.....	67
Fig. 18. DPPH radical scavenging activity of the soluble partial purified conchiolin from various mollusk shells.	73
Fig. 19. Effect of the soluble partial purified conchiolins extracted from various mollusk shells on tyrosinase inhibition activity.....	75
Fig. 20. TLC analyses of five different conchiolins extracted from shells.....	79
Fig. 21. TLC analyses of five different conchiolins extracted from shells...	80
Fig. 22. Analysis by SDS-PAGE of the soluble partial purified conchiolins from various shells	82
Fig. 23. Effects of crude conchiolin extracted from Blue mussel on NO production and inflammatory mediator production in LPS stimulated Raw264.7 cells.....	84
Fig. 24. Effects of crude conchiolin extracted from pacific oyster on NO production and inflammatory mediator production in LPS stimulated Raw264.7 cells.....	85
Fig. 25. Effects of crude conchiolin extracted from Surf clam on NO production and inflammatory mediator production in LPS stimulated Raw264.7 cells.....	86

Fig. 26. Effect of crude conchiolin extracted from Blue mussel, Pacific oyster, and Surf clam on the induction of iNOS and COX-2 by LPS.....	87
Fig. 27. Changes of body weights in male SD rat after administration of crude conchiolin extracted from Surf clam, Pacific oyster, Short-necked clam, Egg cockle, Blue mussel shell, and Ark shell.....	89
Fig. 28. Changes of liver and kidney weights in male SD rat after administration of crude conchiolin extracted from Pacific oyster, Surf clam, Short-necked clam, Egg cockle, Blue mussel, and Ark shell.....	90
Fig. 29. Changes of liver/body and kidney/body weights in male SD rat after administration of crude conchiolin extracted from Pacific oyster, Surf clam, Short-necked clam, Egg cockle, Blue mussel, and Ark shell.....	91
Fig. 30. Effects of crude conchiolin extracted from Pacific oyster, Surf clam, Short-necked clam, Egg cockle, Blue mussel, and Ark shell. Treated Groups on the blood chemistry.....	93

I. 서론

국내 연안에서 양식되고 있는 패류 및 기타 수산동물의 전체 생산량을 살펴보면 패류가 2004년 기준 약 304,889톤, 기타 수산동물(미더덕, 우렁챙이 등)이 9,176톤으로 금액으로 환산하면, 1,990억과 1,013억원이다. 그중 가장 많이 생산되고 있는 품종을 살펴보면 패류의 경우 굴 239,270톤, 바지락 27,570톤, 홍합 20,409톤, 고막류 10,849톤, 피조개 3,134톤, 전복 1,260톤, 가리비 173톤, 백합류 127톤 등의 순으로 생산되었으며, 기타 수산동물의 경우 우렁챙이 6,349톤, 미더덕 2,590톤, 기타 237톤으로 생산되었다. 또한 패류의 연간 생산량의 변화를 살펴보면 1985년에 357,009톤이던 것이 1995년 311,963톤, 2004년엔 304,889톤으로 매년 감소하고 있는 실정이다. 이러한 요인으로서는 천해 양식 조건이 해양오염과 양식장 주변에 각종 생물폐기물들의 유입 등으로 인하여 양식 환경이 나빠지고 있기 때문인 것으로 추정된다. 현재 패류와 기타 수산동물에 있어서 가장 대표적으로 많이 생산되고 있는 것이 굴, 바지락, 홍합, 고막, 피조개, 전복, 멍게, 미더덕 등이며, 이들의 경우 껍질이 제거되지 않은 생물 상태로 유통도 되기도 하지만, 대부분 가공공장에서 1차로 껍질을 제거한 후 대형마트나, 시장에 유통되고 있다. 그러나 가공 공장에서부터 미처리 상태에 놓여 있는 패각이나 각종 수산 동물의 껍질은 그 양이 매년 증가하고 있고, 공장 주위 및 양식장 부근 노지에는 이러한 폐기물로 넘쳐나고 있는 실정이다.

굴의 경우를 예로 들면, 전체 패각 중 약 10%만이 각종 연구과제 성과물로 실용화 되어 사료, 비료, 수 처리 흡착제로 이용되고 있지만 약 90%가까이는 여전히 폐기물 상태로 방치되어 어장의 오염과, 자연경관을 훼손과 악취 등으로 보건 위생상의 문제를 야기 시키고 있다. 실제 양식어장을 보유하고 있는 어민의 말을 빌려보면 이 문제에 대해 심각하다 못해 포기하는 모습을 보고 이용성의 확대 측면에서라

도 다양한 분야의 사람들이 폭넓은 연구를 수행함으로써 그 이용성을 확대 시켜나
가야 할 것으로 사료된다.

한약처방에는 패각 관한 처방이 13가지(전복, 고막, 담치, 진주모, 유리조개, 굴,
가막(재첩) 조개, 대왕 조개, 백합, 바지락, 동죽, 칼조개, 맛조개)가 청열해독과
위, 장, 간, 폐, 결막, 피부 농창 치료 등에 사용되고 있고(동의 약용동물학, 의성
당), 그 외에도 고동을 비롯하여 해삼, 멍게, 게, 미더덕, 대하, 불가사리 등 약
30여 가지가 사용 중에 있다. 이들은 대부분 건조된 상태로 이용되거나 불에 구
워서 사용하고 있는데 이러한 수침법제법을 전통적인 방법에서 현대화된 방법으
로 가공처리 한다면 그 수요가 적극적으로 늘어 날것으로 예상된다.

현재 한의학에서 이용되고 있는 대표적인 종류와 약성을 보면 전복껍질은 간
과 풍사를 진정시켜주며, 뼈골통, 지혈, 어지럼증, 위산과다, 불면치료 등에 사용
되며, 꼬막은 혈액에 활력을 주어 어혈을 풀고 위산을 억제하고 체중을 내려준다.
진주모의 경우 간과 풍사를 가라앉히고, 경기를 멎게 하고 지혈작용 등을 하며,
굴은 폐결핵에 의한 패열, 임파선 결핵, 봉루대하 등을 치료하며, 바지락은 청열
해독과 피부를 윤택하게 하고 창(피부염)을 치료하는 효과가 있다(표 1).

나노입자라는 용어는 1990년대 들어서면서 물질 제조 및 전자공학분야에
서 각광을 받기 시작하여 지금은 의학, 약학, 환경 및 에너지, 바이오기술,
농업 등에서 다양하게 연구가 진행되고 있는 첨단 기술 분야이다. 나노 입
자로 가공된 물질은 1nm-100nm 정도의 크기를 가지며, 전기광학적, 자기적
및 광전 특성을 지니는 것으로 보고되고 있으며, 불연속적인 전자에너지
밀도를 가진 원자(분자 포함)와 연속적인 에너지를 가지는 덩어리 물질의
성질과는 다른 성질을 가지게 된다. 따라서 유기물이나 무기물의 경우 나
노 입자로 가공하게 되면 기존에 발견할 수 없었던 다른 성질의 집합체로
전환이 가능하게 되어 또 다른 기능성을 가지게 된다.

Table 1. Pharmaceutical activities of mollusk shells in Korean medicine

구분	구성성분	약리작용
전복껍질	탄산칼슘, 각각질(Conchiolin, $C_{30}H_{45}O_{11}N_8$), 담즙산	간을평안하게하고 양기를 가라앉힌다. 풍을가라앉히고 진정시킨다. 눈을 맑게한다.
뱀고둥류	탄산칼슘, 인산칼슘, Arginine, Aspartic acid, Glutamic acid, Glycine, Alanine	고혈압, 머리어지름증, 두통치료 고혈압, 만성 간염 치료
소라뚜껑	여러종류의 교단백물질 함유, 소량의 칼슘과 알루미늄규산염도 함유	청습열, 거담화, 止下痢(설사병), 고혈압, 두통, 심복만통, 이질, 임질, 치질 및 음 등을 치료
피뿔고둥	주로 탄산칼슘을 함유	화염소적, 진간식품, 화기청신효능, 위통, 임파선 결핵, 근육경련 등을 치료
뿔소라고둥	β , β -dimethylacrylcholine과 prophylenecacylcholine을 함유	청열해독, 연건산결(딱딱한 것은 풀어주고 흠어진 것은 결합시켜준다) 효능, 임파선 결핵을 치료한다.
(새)꼬막	껍질을사용한다. 탄산칼슘, 인산칼슘을 함유	혈액에 활력을 주어 어혈을 풀어준다. 산을마르게하여 통증을 그치게 한다. 담을 사라지게하고 흠어진 것을 다시 결합시킨다. 위통, 위산과다, 체증을 내려준다. 동상치료
진주	각단백질(keratin)로 glycine, alanine, leucine, phenylalanine, serine, valine, methionine, cystine, arginine, histidine, tyrosine, aspartic acid, glutamic acid, threonine 등	신경을 편안하게하고 진정시킨다. 열을맑게하여 눈을 밝게한다, 생기를 돋우며, 해독과 통증을 그치게 한다. 열병으로 인한 경기
진주모	주로 탄산칼슘 함유	간을 평안하게하고 풍을 잡 제우며, 음을 더하고 양을 가라앉힌다. 경기를 가라앉혀 피를 멎게한다
굴(모려)	탄산칼슘 80-95%함유,인산칼슘, 황산칼슘, 산화철 및 Al, Mg, Si 등과 유기물을 1.8% 함유. 칼슘염은 모세혈관을 치밀하게하여 혈관의 삼투성을 저하시키며, 위에서 위산과 작용하여 가용성 칼슘을 형성한다. 칼슘이온은 흡수되어 전해질의 평형조절작용을 하며 근육의 흥분을 억제한다.	자음잠양(滋陰潛陽), 진경안신(鎮驚安神), 삼정염한(澀精斂汗), 연건화담(軟堅化痰) 효능. 허로번열(虛癆煩熱):폐결핵에 의한 폐열, 유정(遺精), 도한(盜汗), 임파선 결핵, 봉루대하 등을 치료한다.
바지락 (합자)	패각: 탄산칼슘, 인산칼슘,탄산마그네슘, 각각질(각단백질, Conchiolin)을 함유.	청열해독, 생기림창 효능이 있다.

UCLA의 연구진에 의해 Physical Review Letter(2005년 1월28일 발간)에 보고된 내용을 살펴보면, 특정 유전자가 발현되는 세포에서만 단백질의 기능을 작동시킬 있는 것으로 보고되었으며, 이것은 적은양의 약물로도 질병의 발병 부위에만 작용하기 때문에 지능형 약물전달 시스템의 개발이 가능한 것으로 나타났다. 이것은 나노입자로 가공하면서 기계적 장력변화에 의해 단백질 구조 형태에 변화를 줌으로서 새로운 단백질 바인딩 형태가 결정되기 때문에 가능하다.

패각 내에는 약 5% Conchiolin이 존재하며, 패각의 종류에 따라서 구성 아미노산이나 결합구조 및 함량의 차이가 나는 것으로 알려져 있다. 이것을 초미세분말 형태로 가공(30 μ m)하여 단백질 가수분해 효소로 펩티드 형태로 분해하게 되면 신기능성 펩티드를 얻어낼 수 있다.

나노입자와 초미세분말 가공기술, 용매추출 및 화학반응에 의한 추출물들을 이용하여 각종 생리활성과 기능성을 평가함으로써 최적의 연구 성과물을 기대할 수 있고 저비용 고효율의 가공방법을 개발하여 생산 가격대별 가공기술의 접목을 용이하게 할 수 있다. 각종 패류 및 수산동물껍질을 이용하여 초미세분말화가 가능하게 되면, 처방의 활용성이 강화되게 되어 새로운 한약처방의 개발이 가능하고, 아토피를 비롯한 각종 피부외용제로의 사용이 가능하다.

패각은 고기능성 식품소재로서 활용이 가능하며, 소아의 성장 관련 및 비만 다이어트 제품 제조에 활용이 가능하고, 색조화장품 소재는 물론 아토피성 피부질환용 로션제제, 미백화장품 첨가제 및 소양증, 항염증, 항균 등에 대한 의약품 소재로서 사용이 가능하다.

현재 화장품소재로 이용되고 있는 백반, 활석 등 광물성 소재를 기능성이 검증된 초 미세분말 소재로 대체할 가능성이 있고, 약 10%대에 머물고 있는 저이용성 수산 부산물의 이용성을 확대함으로써 폐기물처리비용을 절

약할 수 있다.

국외의 해양생산 저이용성 폐각에 관한 산업적 개발기술로서 일본의 경우 아오모리산 가리비의 폐각 원료를 이용한 연구를 진행하여 무좀 치료 약으로 판매 중에 있으며, 하치노헤 공업대와 공동 연구를 실시, 폐각을 원료로 한 항균벽재와 항균냄새제거제 등을 상품화하였다.

이외 폐각의 고부가가치를 위한 고기능성 의약품 및 식품첨가제 개발을 위한 연구를 수행하고 있다. 또한 미국에서도 폐각의 나노입자 가공기술을 이용한 다양한 생리활성에 대해 연구 중이며, 대체의학의 한 분야로 한 방에서 사용하고 있는 폐각에 대한 효능 검증에 대한 연구가 진행 중이며, 굴폐각의 경우 다양한 칼슘 흡수제 및 화장품 원료로 이미 개발되어 상품화 되어 사용 중에 있지만 기능성 첨가물 및 치료용 의약품 소재로서의 기능을 가진 제품개발은 미흡한 실정이다.

현재 국내의 해양생산 저이용성 폐각에 관한 연구는 생리활성 검증과 분포 및 성분 관련 연구는 활발히 진행 중 이지만, 실험실 차원에서 생리활성 검증에 관한 연구가 일부 진행되었을 뿐, 경영자의 인식부족과 대량생산 기술개발력 부족 등으로 실용화 제품개발이 미흡한 실정이다. 현재 실용화 기술이 개발된 분야는 비료와 bioceramics이지만, 비료관리법이나 폐기물관리법으로 인해 폐각을 비료로 활용하지 못하게 되었을 뿐만 아니라 운송 및 재활용을 위한 pilot plant 제작 원가가 상승되면서 산업적 효용가치가 급격히 하락하고 있는 실정이다. 이러한 문제로 인해 폐각의 이용성이 떨어지게 되며 환경문제는 날로 더해가고 있다.

한의학에서는 최근 한약소재로 이용 중인 전복과 굴, 바지락 폐각을 이용하여 아토피 치료용 외용제 개발에 일부 성공을 거두고 있다. 폐각은 대부분 찬 성질을 지니고 있어 청열해독 작용이 강하며, 간과 위장, 폐, 피부종창 치료에 탁월한 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 폐각이

갖는 딱딱한 특성 때문에 이용에 어려움이 많았고 분쇄를 할 경우에도 입도가 커서 탕약을 다릴 때나 피부외용제로 사용할 경우 그 약성이 완전히 빠져나오지 않거나 거칠어 사용상에 많은 애로가 있었으며, 계절별, 지역별로 채취 후 패각의 가공이나 보존 상태 등의 차이로 인해 약효를 기대하기 힘든 문제를 앓고 있었다.

이러한 문제를 해결하기 위해 패각을 가공하여 피부외용제로 이용가능성을 확인하기 위해 패각을 수세과정을 거쳐 직접 자연건조하여 초미세 분말(입도 30 μ m)로 가공 한 후 이것을 재료로 하여 미네랄성 아토피 소양증 치료제를 개발 현재 150여 곳의 한의원에서 사용 중에 있다. 연구결과 패각의 미네랄은 수렴작용을 강하게 하는 것으로 사료되지만, 아직 더욱 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

현재까지 국내 연구초점은 사료나 비료에 집중 되었지만, 실용화 할 경우 제품의 가격 우위를 점할 수 없고 중국 등 으로부터 저가품이 수입될 경우 적자가 발생하는 등 경영상의 많은 문제점을 안고 있다.

따라서, 본 연구에서는 도용할 수 없는 보다 확실한 기술적 우위를 확보하고 첨단 기법을 동원하여 고부가가치산업으로 발전시켜 나간다면, 폐기물로만 인식 되었던 패각이 한방산업의 제형변화와 활성화에 많은 공헌을 할 것으로 예상된다.

저이용성 수산부산물의 경우 90%가량이 현재 방치되고 있고 자원으로 활용할 경우 오히려 폐기물 수거비용을 받고 회수하여 사용할 수 있기 때문에 폐기물 재활용차원에서 고부가가치가 창출될 것으로 생각된다. 또한 예비실험을 통하여 굴 패각과 오징어뼈, 전복 등의 패각으로 초미세 가공(입자 사이즈 30 μ m)분을 만들어 한약 추출물과 혼합하여 아토피성 피부질환치료제와 각종 염증치료 보조제로 사용, 임상실험을 통하여 그 가치 및 효용성에 대하여 이미 확인한바 가 있고, 패각에 존재하는 미네랄과 단백질

질 그 외 유기물질 등 각각에 대해서보다 종합적인 검토와 연구가 진행된다면 한의학적 약물기전 이해에 많은 도움이 될 것으로 보인다. 또한 패각에 존재하는 미네랄 중에는 셀레늄을 함유한 것도 있어 나노입자 가공때 나타나는 미네랄의 특징을 이해함으로써 약리적 기능을 이해하는데 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 따라서 나노입자 가공을 통한 각종 약리 작용과 흡착성 입자를 이용 DDS제재로의 이용가능성, 펩티드 분해 효소를 이용한 conchiolin peptide 개발에 관한 연구는 앞으로 저 이용 기능성 수산부산물의 단순 재활용 측면이 아닌 치료용 한약 소재분야에 있어 새로운 영역으로 자리 매김할 수 있는 계기를 마련 할 수 있을 것으로 사료된다. 아울러 나노 입자 가공 기술력과 가공 후 예상되어지는 각종 약리 기능들은 향후 해양생물공학분야에 새로운 지표를 마련할 뿐만 아니라 한의학적 치료기준과 제형 변화에 대한 가능성을 새롭게 제시하게 될 것이며, 고 한약의 약물 전달 메카니즘의 규명과 해석을 통한 세계화에도 많은 기여를 할 것으로 사료된다.

이미 국내외적으로 저 이용성 수산 부산물에 대한 재활용 연구는 사료, 비료, 수 처리 흡착제, 식품, 화장품 분야 등에서 다양하게 연구가 진행되어 왔으나 일부의 경우를 제외하고 실용화 및 고부가가치를 위한 세밀하고 구체적인 연구와 현장 적응성에 대한 평가 미흡 등으로 이용에 대한 가능성만 제시하였을 뿐 실용화에 있어서 실제 응용제품 개발은 경쟁 제품과의 경쟁에서 가격이나 순도, 소재의 형태 등에서 많은 애로가 있었다. 그러나 초미세분말과 나노 입자 가공기술을 통해 패각에서 추출된 conchiolin을 흡수가 용이한 저분자의 peptide로 전환함으로써 임상기준과 처방해설 및 검증이 가능할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 패각 및 수산부산물 껍질의 나노 입자(1-100 nm) 및 초미세 가공(30 μ m)분말을 제조하여 가공분말에 대한 특성과 생리활성을 조

사한 후, 나노 분말의 기능성 검증을 통한 DDS제제와 아토피성피부질환 치료제 등과 같은 응용제품 개발하여 경제성을 검토하고자 한다.

또한, 패각 내 존재하는 단백질의 효소가수분해에 의한 기능성 peptide를 분리.정제하여 단백질 분해 효소 저해제의 활성 및 생리활성 확인하고, 기능성 분획물의 *in vitro* 및 *in vivo* 임상실험(간, 위, 장, 폐, 신장 등)과 한약 치료처방 및 제형개발하고자 한다.



II. 재료 및 방법

1. 저가치 수산물의 나노 및 효소가공처리 공정기술과 산업적 응용제품 개발

가. 초미세 및 나노입자분말의 제조 및 입도분석

(1) 나노분말의 제조

나노분말의 가공처리를 위하여 본 연구에서는 습식 나노공정가공법을 플랜트급으로 개발하기 전에, 실험실 규모에서 분말제조공정을 재차 확인하였으며, 450 nm 이하 및 200 nm이하의 분체 입도를 가지는 나노분말을 제조하였다(Fig. 2). 본 연구에서 수행한 나노 분말제조공정 검증 방법은 Fig. 1과 같다. 초미세 폐각분말(particle size=30 μ m)을 증류수에 넣고 저어준 후, rod homogenizer를 이용하여 20,000 rpm 으로 분쇄하고 pore size 0.45 μ m filter로 filtering하였다. 그 여액을 다시 pore size 0.2 μ m filter로 filtering한 다음 rotary evaporator로 수분을 증발시키고 자체 응집된 분말을 제거하기 위하여 3500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻어진 상층액을 pore size 0.2 μ m filter로 filtering하여 나노분말을 회수하였다. 액상의 나노분말은 동결 건조하여 분말상태로 만들어 입도분석을 위한 시료로 사용하였다.

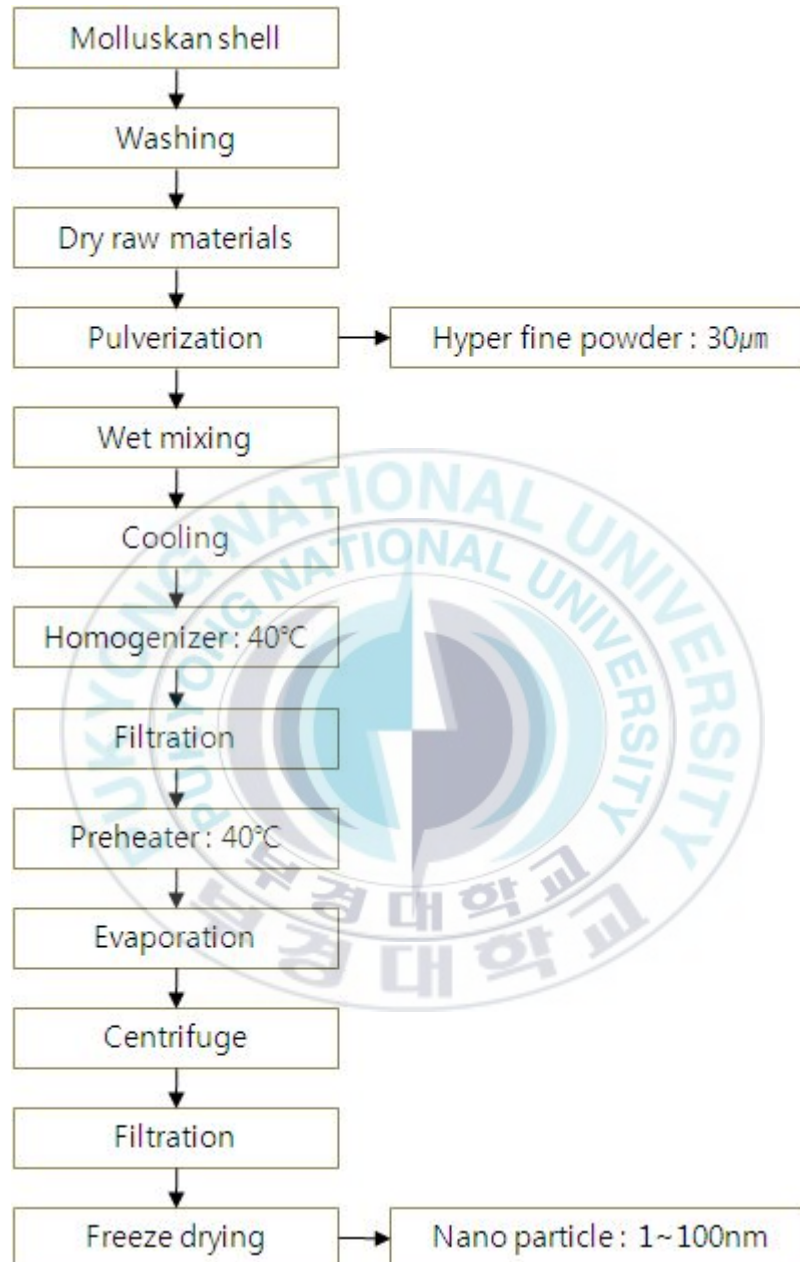


Fig. 1. Schematic diagram of manufacture process of nano particle from mollusk shell powder.

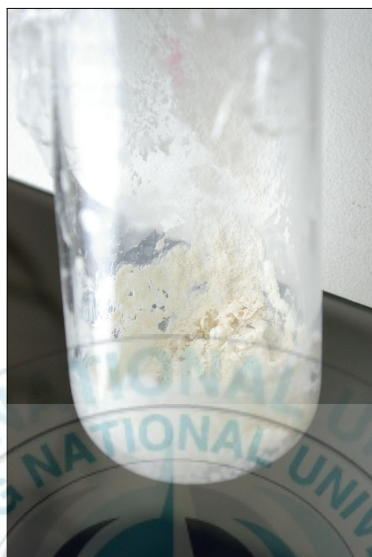


Fig. 2. Photograph of nano particle manufacture from pacific oyster.

나. 나노 및 초미세가공분말의 성분분석과 물리화학적 특성 검토

(1) 표면장력 측정

표면장력계(TD-1, Lauda, German)로서 표면장력을 측정한다. 시료는 나노분말을 사용하였으며, 농도는 2%(w/v)의 시료를 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)를 녹인 후 측정하였다.

(2) pH에 대한 표면장력 변화

2%(w/v)분말을 3종류의 buffer (pH 3.0-6.0, 50 mM citrate, sodium citrate buffer ; pH 6.0-8.0, 100 mM phosphate buffer ; pH 9.0-10.0, 50 mM boric acid- NaOH buffer)에 녹인 후 이들 시료 5% (v/v)를 해당 pH별 완충용액에 넣고 표면장력계 (TD-1, Lauda, German)를 사용하여 pH별 표면장력의 변화를 측정하였다.

(3) 계면장력 측정

20mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 2% (w/v)의 분말을 녹여서 준비한 후 동일한 buffer 9.5 ml에 준비한 시료 0.5 ml를 넣고, 5% (v/v) olive oil을 넣고 1분간 강하게 vortex 시킨 후 10분간 정치시켜 계면장력을 측정하였으며, 대조군으로 Tween 80을 50 μ l을 넣고 결과를 비교하였다. 계면장력의 측정은 표면장력계 (TD-1, Lauda Co. Germany)를 사용하였다.

(4) 유화활성 및 유화안정성

분말을 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 각각 2% (w/v)씩 넣고 Rosenberg E. 등 (1979)의 방법을 응용하여 유화활성도를 측정하였다. 사용된 기질로는 olive oil을 사용하였으며, 유화안정성은 유화활성도 측정법과 동일한 방법으로 실험을 행한 후 10분, 30분 간격으로 620nm에서 흡광도를 측정하여 변화된 값의 기울기로부터 Kd 값을 산

출하였다.

$$Kd = (\log X_2 - \log X_1) / 10$$

(X₁ : 진탕 후 10분 정치시킨 후의 흡광도 값)

(X₂ : 매 30분 간격마다 측정한 흡광도 값)

(5) 온도 및 열 안정성

20mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 분말 2%를 녹여 액상시료를 만든 후 온도 및 열안정성을 측정하였다. 실온 (25℃)에서 측정한 유화활성도 값과 100℃에서 10분간 열처리한 시료의 유화활성도 값을 비교하였다.

다. Conchiolin의 효소 가수분해에 의한 기능성 펩티드 제조

(1) 펩티드 제조

(가) 산, 효소 가수분해 및 정제

패각류의 가공분말 (A)을 6.5 M acetic acid와 1:10 (W:V)비율로 37℃에서 12시간 동안 탈석회시켰다. 15분간 10℃에서 7000rpm으로 원심 분리 하여 모아진 침전물 (B)을 회수한 후, 침전물에 남아있는 여분의 acetic acid를 증류수로 제거하였다. 증류수로 세척 된 침전물을 동결 건조 하여 powder (crude conchiolin, C) 상태로 만들었다. 동결 건조 된 crude conchiolin powder 0.3g를 추출 용액 (0.1 M citrate buffer pH6.0, D) 15ml (1:60, W:V)에 bead를 넣고, 37℃에서 200rpm으로 교반하면서 단백질을 추출하였다. 추출된 상등액은 dialysis tube에서 1차 증류수로 3회 탈염 시킨 뒤 overnight 투석하고, 부유물은 원심분리를 통하여 제거하여 conchiolin(E)을 제조하였다.

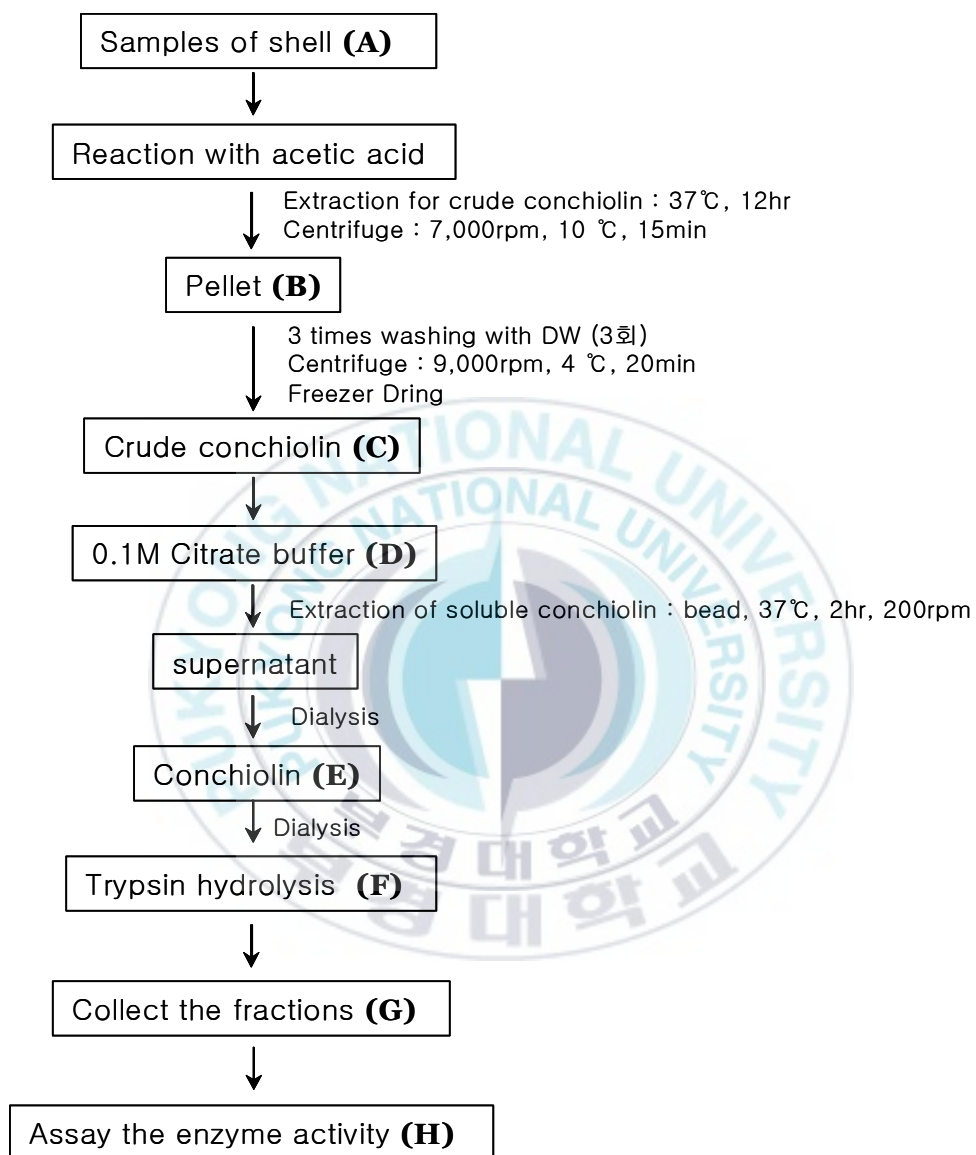


Fig. 3. Schematic diagram for crude conchiolin from various mollusk shells by acidic or enzymatic hydrolysis.

Conchiolin의 가수분해는 trypsin을 이용하여 가수분해를 하였다(F). 가수 분해가 끝난 뒤 중화 과정을 거친 후, 원심분리를 통하여 부유물을 제거한 다음, 생리활성이 있는 분획물을 분석하기 위해 COX-1과 COX-2의 저해활성을 측정(H)한 후, COX-1과 COX-2의 저해 활성이 확인된 분획물을 LC/MS (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, I)를 이용하여 분석하였다(Fig. 4).

(나) TLC (Thin layer chromatography) 분석

유기물의 구성성분을 TLC (Thin layer chromatography)분석으로 확인하였다. TLC 분석 방법은 가. 저가치 수산부산물 1) 나노 및 효소가공처리 공정기술과 산업적 응용 제품개발 2) 나노 및 초미세가공분말의 성분분석과 물리화학적 특성검토, TLC (Thin layer chromatography)분석 방법과 동일한 조건을 사용하였다.

(2) 정제된 펩티드 생리활성 측정

(가) 항염증 활성 측정 (Cyclooxygenase, COX inhibition assay)

COX-1과 COX-2의 저해활성을 측정하였다. 실험방법은 다음과 같다: 96 well plate의 2 well 에 10 μ l heme, 10 μ l assay buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.0) 그리고 10 μ l solvent (inhibitor를 녹였던 용매)를 첨가하였다. Background well에는 2 well 에 10 μ l heme, 10 μ l assay buffer 그리고 10 μ l의 solvent를 첨가하였고, 100% initial activity 측정을 위해 2 well 에 10 μ l heme, 10 μ l 효소 (COX-1 혹은 COX-2) 그리고 10 μ l의 solvent를 첨가하였다. sample (inhibitor)의 COX 저해활성측정을 위해 2 well에 10 μ l heme, 10 μ l 효소 (COX-1 혹은 COX-2) 그리고 10 μ l의 sample을 첨가하였다. Standard inhibitor

로는 Indomethacin을 dimethyl sulfoxide 에 녹여 처리하였고, Sample 은 100mM Tris-HCl (pH 8.0)에 녹여 농도별로 처리하였다. 모든 well에 200 μ l의 assay buffer를 첨가하고 5분간 실온에서 반응시켰다. Luminometer (LmaxII 384, Molecular devices, USA)에 부착되어 있는 2개의 dispenser를 이용하여 하나의 dispenser로 모든 well에 10 μ l 의 chemiluminescent substrate를 첨가하고, 즉시 다른 하나의 dispenser를 이용하여 50 μ l 의 arachidonic acid를 첨가한 후 Relative Luminescent Units (RLU)를 Luminometer로 측정하였다.

(나) 미백 활성 측정 (In vitro tyrosinase inhibition assay)

멜라닌 합성과정의 속도 결정 단계를 촉매하는 tyrosinase의 활성 저해율을 측정하여 미백 성분의 효과를 평가하였다. 100mM 인산염완충액 (pH 6.5) 147 μ l에 test sample 13 μ l과 13 μ l의 mushroom tyrosinase(2000 Unit/ml), substrate(tyrosine) 27 μ l을 첨가하여 최종 반응액이 200 μ l이 되도록 96-well microplate에 넣었다. 이 반응액을 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 배양한 후, microplate reader (Bio-Tek, USA)에서 490 nm의 파장으로 dopachrome의 생성량을 측정한다.

Tyrosinase 저해활성 %는 다음의 방정식으로 구한다.

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \{(A_{\text{samp.}} - A_{\text{ctrl.}})/A_{\text{std.}}\} \times 100$$

$A_{\text{samp.}}$: sample를 넣었을 때의 흡광도 값

$A_{\text{ctrl.}}$: sample만 첨가하고 효소를 넣지 않았을 때의 흡광도값
(sample color control)

$A_{\text{std.}}$: sample없이 효소만 넣었을 때의 흡광도 값

2. 나노 및 효소 분해물의 생리 활성과 기능성 검증을 통한 한방 소재화 연구

가. 가공원료 추출물의 생리활성 분석

(1) 가공원료 추출물(Crude conchiolin)의 추출 및 정량분석

(가) 가공원료 추출물(Crude conchiolin)의 추출

패각류(굴, 진주담치, 바지락, 피조개 동죽 및 새조개)의 초미세 가공 분말을 이용하여 crude conchiolin을 추출한 후 생리활성측정에 사용하였다. 활성 단백질을 추출하기 위해 urea 추출법을 사용하여 불용성 단백질을 추출법은 투석 한 후에도 추출물에 urea가 100% 제거가 되지 않고 미량 잔존하면서 추출된 단백질에 변성을 일으키는 문제가 발생하여 crude conchiolin으로부터 당과 불순물의 추출을 최소화하면서 활성 단백질만을 추출할 수 있는 최적 추출조건을 찾기 위해 7가지 buffer를 선정하여 단백질과 당추출을 비교 분석하였다. 추출 용액은 H₂O와 8M urea(pH8.5)을 control 추출 용액으로 하여 0.1M Citrate buffer(pH6.0), 0.2M Sodium phosphate buffer(pH6.0), 0.1M KH₂PO₄, NaOH buffer(pH6.0), 0.2M Sodium phosphate buffer(pH8.0), 0.2M Sodium phosphate buffer(pH8.0), 0.1M Glycine buffer(pH 8.5), 0.1M Trizma buffer(pH8.5)와 0.1M Glycylglycine(pH8.5) 용액을 사용하였으며, 이들 buffer로부터 추출된 단백질과 당의 농도를 비교하였다. 0.01g의 crude conchiolin과 1ml 추출 용액에 bead를 넣고 vortexing한 뒤 15,000rpm으로 15분간 원심 분리하여 얻어진 상층액의 단백질과 당의 함량을 측정하고, 그 결과에 따라 최적 추출용액으로

선정하여 실험하였다. 단백질 측정은 lowry 방법을 사용하여 BSA 표준검정곡선에 따라 그 양을 산정하였고, 당 측정은 phenol-sulfuric acid법에 따라 glucose 표준검정곡선에 의해 그 양을 나타내었다.

Crude conchiolin으로부터 단백질을 추출하기 위해 패각 가공분말(A)을 6.5 M acetic acid와 1:10(W:V) 비율로 37℃에서 12시간동안 탈석회화 시켰다. 15분간 10℃에서 7000rpm로 원심 분리하여 모아진 침전물(crude conchiolin, B)을 회수한 후, 침전물에 남아있는 여분의 acetic acid를 증류수로 제거하였다. 증류수로 세척된 침전물(crude conchiolin)은 동결 건조하여 powder(crude conchiolin, C) 상태로 만들어 생리활성 측정을 위한 시료로 사용하였다. 동결 건조된 침전물(crude conchiolin, C)로부터 활성 단백질을 추출하기 위해 urea 추출법과 citrate buffer 추출법을 사용하여 그 결과를 비교하였다. Crude conchiolin(C) 0.3g와 추출 용액(8M urea pH6.0 D, 0.1M citrate buffer pH8.5, E) 15ml(1:60, W:V)에 bead를 넣고, 37℃에서 200rpm으로 2시간동안 교반하면서 단백질을 추출하였다. 추출된 상등액은 dialysis tube에서 1차 증류수로 3회 탈염 시킨 뒤 overnight 투석하고, 부유물은 원심분리를 통하여 제거하여 실험을 위한 시료로 사용하였다(Fig. 4).

(나) 가공원료 추출물(Crude conchiolin)의 단백질 정량분석

Lowry의 방법을 사용하여 단백질을 정량하였다. 시료 40 μ l와 1% CuSO₄ · 5H₂O, 2% K · Na-tartrate, 2% Na₂CO₃ in 0.1N NaOH의 시약을 1:1:100으로 조제한 lowry complex solution 200 μ l와 10분간 반응시킨 뒤, 2N Folin-ciocalteu's phenol reagent와 증류수를 1:1로 조제한 Folin reagent를 20 μ l 넣고 실온에서 30분간 반응 시킨다.

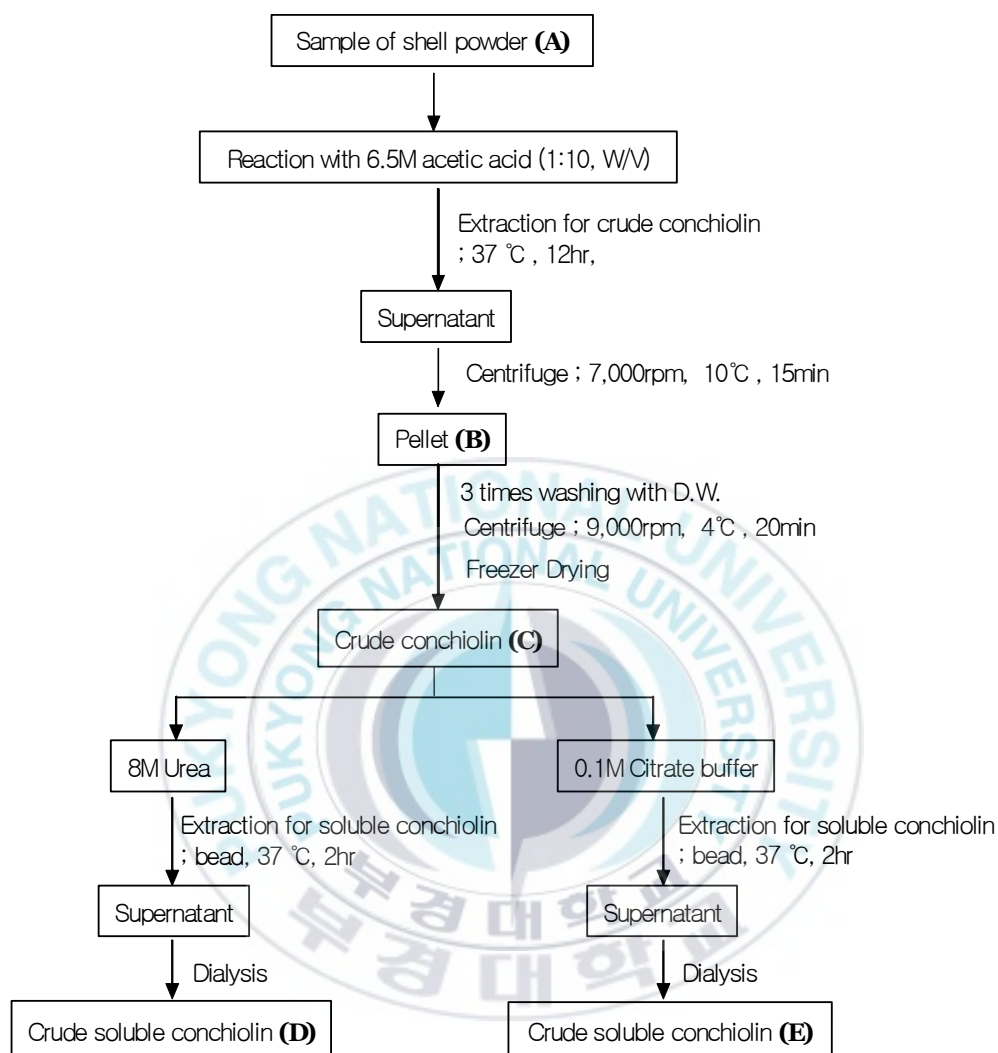


Fig. 4. Extraction methods for crude soluble conchiolin using urea and citric acid buffer from various mollusk shells.

Blank 값은 8M urea와 0.1M citrate buffer로 하여 흡광도 750 nm에서 측정한 뒤 bovine serum albumin으로 작성된 표준검정곡선에 의하여 단백질을 정량 분석하였다.

(다) 가공원료 추출물(Crude conchiolin)의 당 정량분석

당 정량분석에는 phenol-sulfuric acid 법을 사용하였다. 시료 60 μ l, 5% phenol 30 μ l, H₂SO₄ 150 μ l를 섞은 후 실온에서 30분간 반응시켰다. Blank 값은 8M urea와 0.1M citrate buffer로 하여 흡광도 490 nm에서 측정한 뒤 glucose로 작성된 표준검정곡선에 의하여 당을 정량 분석하였다.

(2) 가공원료 추출물(Crude conchiolin)의 생리활성 분석

(가) 항염증 활성 측정 (Cyclooxygenase, COX inhibition assay)

COX-1과 COX-2의 저해활성을 측정하였다. 실험방법은 가. 저가치 수산부산물의 나노 및 효소가공처리 공정기술과 산업적 응용제품개발의 (1) Conchiolin의 효소가수분해에 의한 기능성 펩티드 제조, cyclooxygenase (COX) 저해활성측정과 동일하게 측정하였다.

(나) 항산화 활성 측정 (DPPH radical scavenging assay)

DPPH radical 제거 효과는 추출물의 DPPH에 대한 전자공여효과로 시료의 환원력을 측정하는 방법에 의하여 측정하였다. 시료 용액 100 μ l(control:99.5% ethanol)에 0.2mM DPPH (in 99.5% ethanol)용액을 100 μ l을 가하고, vortex mixer로 10초간 진탕한 후 37℃에서 30분 동안 반응 시킨 후 Microplate Reader(Bio-Tek, USA)를 이용하여 517

nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조군으로는 시료 대신 Methanol
를 100 μ l 첨가하여 반응시켰고, 양성대조군으로는 L-ascorbic acid,
caffeic acid를 사용하여 같은 방법으로 측정하였다. 각 시료의 항산화
작용은 대조군에 비하여 감소된 흡광도로부터 radical 제거율을 계산
하였다.

(다) 미백 활성 측정 (In vitro tyrosinase inhibition assay)

멜라닌 합성과정의 속도 결정 단계를 촉매하는 tyrosinase의 활성 저
해율을 측정하여 미백 성분의 효과를 평가하였다. 100mM 인산염완충
액(pH 6.5) 147 μ l에 시료 13 μ l와 13 μ l의 mushroom tyrosinase 수용액
(2000 Unit/ml), substrate(tyrosine) 27 μ l을 첨가하여 최종 반응액이
200 μ l가 되도록 96-well microplate에 넣는다. 이 반응액을 37℃에서
15분간 배양한 후, Microplate reader (Bio-Tek, USA)에서 490 nm의
파장으로 dopachrome의 생성량을 측정하였다.
Tyrosinase 저해활성 %는 다음의 방정식으로 구하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - \{(A_{\text{samp.}} - A_{\text{ctrl.}}) / A_{\text{std.}}\} \times 100$$

$A_{\text{samp.}}$: sample를 넣었을 때의 흡광도 값

$A_{\text{ctrl.}}$: sample만 첨가하고 효소를 넣지 않았을 때의 흡광도 값

$A_{\text{std.}}$: sample없이 mushroom tyrosinase만 넣었을 때의 흡광도 값

(라) TLC (Thin layer chromatography) 분석

유기물의 구성성분은 TLC (Thin layer chromatography)로 분석하였
다. TLC 분석에는 silica gel 60 F₂₅₄ glass plate(Merck Co., German)

를 사용하고 전개용매는 BAW(n-butanol : acetic acid : water = 2 : 1 : 1, v/v)를 사용하였으며, 검출시약은 단백질을 2% ninhydrine, 당 분석을 위해 0.2% α -naphtoresorcinol을 사용하였다.

(마) SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

단백질 확인을 위한 SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) 실험 후, 단백질 염색 (silver staining)을 통하여 가공 원료 추출물의 단백질을 확인하였다. 가공원료 추출물(crude conchiolin) 15 μ g을 sample buffer(60mM Tris-HCl, pH6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 함께 20분간 끓인 후 15% SDS-polyacrylamide gel에 loading하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 후 단백질 염색을 위해 silver staining과 coomassie staining을 수행하였다. silver staining을 위해 SDS-polyacrylamide gel을 고정액에서 1시간 고정하였다. 50% Ethanol에서 20분간 반응시킨 후 0.02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액에서 5분간 반응시킨다. 증류수로 세척 후 AgNO_3 용액에서 30분간 반응시켰다. 증류수로 SDS-polyacrylamide gel을 가볍게 씻어 주고 developer 용액(0.4% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 6% Na_2CO_3)에서 단백질 밴드가 확인될 때까지 반응시켰다. 단백질 밴드가 확인되면 정지액(5% acetic acid)으로 developer 반응을 정지시켰다. Coomassie staining을 위해 SDS-polyacrylamide gel을 coomassie blue R-250 시약에서 1시간동안 반응시킨 후 destaining solution(10% methanol, 10% acetic acid)을 교체해 주면서 SDS-polyacrylamide gel의 단백질 밴드가 보일 때까지 destaining 하였다.

나. 정제된 분획물의 생리활성연구 및 생화학적·물리화학적 특성 검토

(1) Conchiolin 정제

6.5M acetic acid와 반응하여 탈석회화 된 crude conchiolin(A)에 8M urea를 1:60(W/V) 비율로 가열 추출하였다. 원심분리를 통해 얻어진 상층액(B)은 투석막을 이용해 증류수로 urea를 제거하고, 투석 후 부유물을 제거한 상층액은 동결 건조(C)하였다. 동결 건조된 conchiolin(C)을 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)로 용해시켜 그 부유물을 0.20 μ m syringe filter로 제거하고, 0.1M phosphate buffer 전개용매를 이용하여 Sephadex G-100으로 충전된 open column을 통과시켜 단백질(D, Table 2)을 분리시켰다. 5ml씩 분취된 7~14개의 분획 중 단백질 함량이 높고 당의 함량이 낮은 분획을 선택(Pacific oyster fraction-3, 4, 5, Short necked clam-3, 4, 5, Ark shell-3, 4, Surf clam-2, Blue mussel-2, 3, 4, 5)하여 prep-LC(Preparative Liquid Chromatography) 정제를 위한 시료(F)로 사용하였다. Prep-LC를 이용해 정제된 분획(G)은 감압 농축하여 생리활성 분석을 위한 시료로 사용하였다(Fig. 5).

Table 2. Comparison of protein and sugar concentration of partial purified conchiolins among various mollusk shell

Pacific oyster

fraction number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
protein con($\mu\text{g/ml}$)	0	9	684	778	442	208	92	68	51	39	34	273	24	24
sugar con ($\mu\text{g/ml}$)	441	441	431	436	244	104	24	21	23	13	16	16	17	12

Short necked clam

fraction number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
protein con ($\mu\text{g/ml}$)	14	652	742	453	350	224	147	98	75	52	30	14
sugar con ($\mu\text{g/ml}$)	465	1131	83	0	0	81	33	12	3	5	0	0

Ark shell

fraction number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
protein con ($\mu\text{g/ml}$)	0	435	1705	1496	840	383	144	79	34	24	10	6	0	1
sugar con ($\mu\text{g/ml}$)	1949	2085	1214	841	402	203	0	3	7	39	16	15	3	2

Surf clam

fraction number	1	2	3	4	5	6	7
protein con ($\mu\text{g/ml}$)	59	258	124	120	93	0	0
sugar con ($\mu\text{g/ml}$)	1023	662	191	123	43	54	0

Blue mussel

fraction number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
protein con ($\mu\text{g/ml}$)	0	1939	2690	2342	1673	1051	468	67	101	56	55	20	19	22
sugar con ($\mu\text{g/ml}$)	335	384	318	167	128	43	24	0	0	0	0	0	0	0

(2) Conchiolin 정제를 위한 Prep-LC (Preparative Liquid chromatography) 조건

Table 3. Prep-LC (Preparative Liquid Chromatography) conditions for conchiolin purification

Instrument	JAI Recycling Preparative LC (JAI-prep 9104)
Column	JAI GEL-GS310 Prep-column (20Φ × 500mm) Hydrophilic column(GFC, Partition Adsorption)
Eluent	acetonitrile : DW = 8 : 2
Flow rate	8 ml/min
Injection volume	3 ml
Detection Wavelength	280 nm

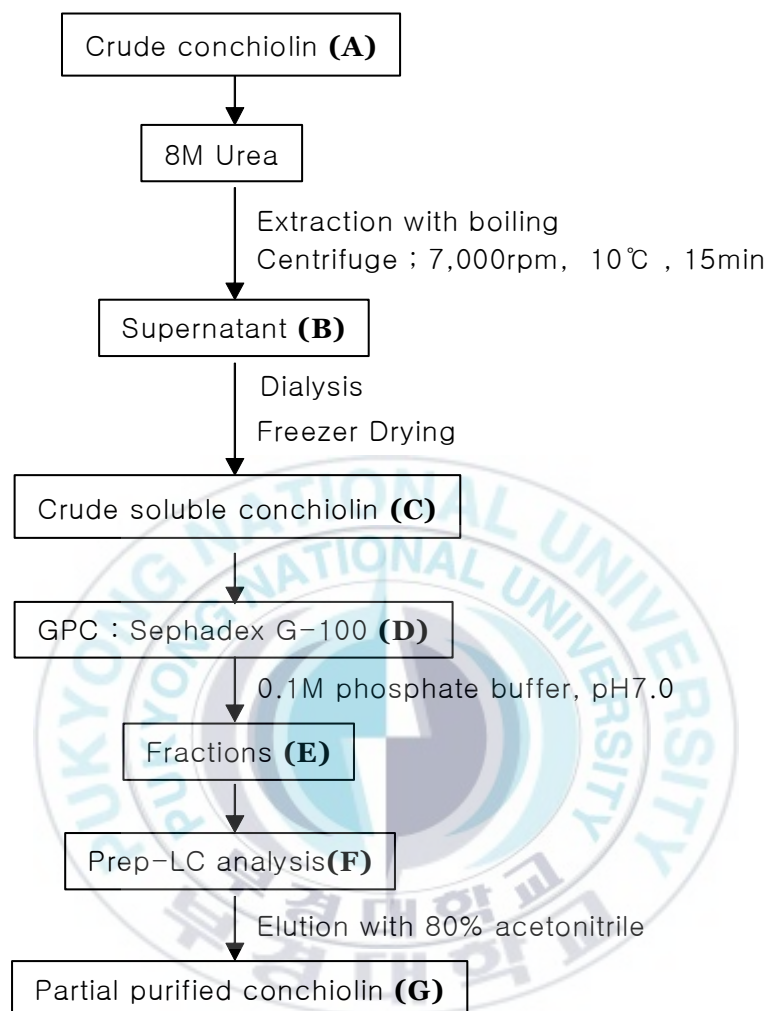


Fig. 5. Schematic diagram for the purification of crude conchiolin by Sephadex G-100 and Prep-LC.

GPC : gel permeation chromatography , Prep-LC : preparative liquid chromatography.

(3) 정제된 분획물의 생리활성 분석

(가) 항염증 활성 측정 (Cyclooxygenase, COX inhibition assay)

COX-1과 COX-2의 저해활성을 측정하였다. 실험방법은 가. 저가치 수산부산물의 나노 및 효소가공처리 공정 기술과 산업적 응용제품개발 3) conchiolin의 효소가수분해에 의한 기능성 펩티드 제조, cyclooxygenase (COX) 저해활성측정과 동일하게 측정하였다.

(나) 항산화 활성 측정 (DPPH radical scavenging assay)

DPPH radical 제거 효과는 추출물의 DPPH에 대한 전자공여효과로 시료의 환원력을 측정하는 방법에 의하여 측정하였다. 실험방법은 나. 나노 및 효소분해물의 생리활성과 기능성 검증을 통한 한방소재화 연구 1)가공원료 추출물의 생리활성 분석, 항산화 활성 측정과 동일하게 측정하였다.

(다) 미백 활성 측정 (in vitro tyrosinase inhibition assay)

멜라닌 합성과정의 속도결정단계를 촉매하는 tyrosinase의 활성 저해율을 측정하여 미백 성분의 효과를 평가하였다. 실험방법은 나. 나노 및 효소분해물의 생리활성과 기능성 검증을 통한 한방소재화 연구 1)가공원료 추출물의 생리활성 분석, 미백 활성 측정과 동일하게 측정하였다.

(라) TLC(Thin layer chromatography) 분석

유기물의 구성성분을 TLC (Thin layer chromatography)분석으로 확인하였다. TLC 분석 방법은 가. 저가치 수산부산물의 나노 및 효소가공처리 공정기술과 산업적 응용 제품개발 2) 나노 및 초미세가공분말의 성분분석과 물리화학적 특성검토, TLC (Thin layer

chromatography)분석 방법과 동일한 조건을 사용하였다.

(마) SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

단백질 확인을 위한 SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) 실험은 나. 나노 및 효소분해물의 생리활성과 기능성 검증을 통한 한방소재화 연구 1)가공원료 추출물의 생리활성 분석, SDS-PAGE 실험방법과 동일한 조건을 사용하였다.

3. 개발된 한방소재를 이용한 임상연구 및 안정성 연구

가. 전 임상 동물실험

(1)Raw 264.7 cell에서 가공원료 추출물(Crude conchiolin)의 세포 독성 및 항염 활성을 측정하였다.

(가) 세포배양

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells는 한국 세포주연구재단에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells는 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

(나) 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cells을 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주한 다음 가

공원료 추출물(Crude conchiolin)을 농도별로 처리한 다음, 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 0.1 - 3.0 mg/ml의 농도로가공원료 추출물(Crude conchiolin)을 처리하고 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다. 배양 후 생존세포에 MTT (0.5 mg/ml)를 4시간 처리한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals를 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다. [i.e. viability (% control) = 100× (absorbance of treated sample)/(absorbance of control)].

(다) NO 생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 100 µl와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α-naphthylamide in H₂O) 100 µl를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다. NO₂⁻의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

(라) Immunoblot analysis

20mM Tris Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137mM sodium chloride, 10% glycerol, 2mM EDTA, 1mM sodium orthovanadate, 25mM b-glycerophosphate, 2mM sodium pyrophosphate, 1mM phenylmethylsulfonylfluoride과 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를

사용하여 cell을 lysis시켰다. Cell lysates를 $10,000\times g$ 로 10분간 원심분리하여 debris를 제거하였다. iNOS와 COX-2의 발현은 antimouse iNOS, COX-2 antibodies를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석하였다. 2차 antibody는 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse와 anti-goat antibody를 사용하였다. iNOS와 COX-2 protein의 band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 manufacturer's instruction에 따라 발색하였다.

(마) Cytokine과 PGE2 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6-well plate에 cells ($1\times 10^6/\text{ml}$)를 분주하고 가공원료 추출물(Crude conchiolin)을 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS를 처리하였다. LPS 처리 후 6-12시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정 전까지 -70°C 에서 보관하였다. TNF- α , IL-6와 PGE2는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

(2) Rat에서 가공원료 추출물(crude conchiolin)의 독성 측정

(가) 체중 측정 및 간, 신장의 무게 측정

실험동물(rat)의 체중은 가공원료 추출물(crude conchiolin) 투여 후 1~14일에 체중을 측정하여 기록하였다. 측정된 data는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다.

(나) 간 손상 지표인, GOT (Glutamic oxaloacetic transaminase), GPT (Glutamic pyruvic transaminase), LDH (Lactate dehydrogenase) 및

신장 손상 지표인, BUN (Blood urea nitrogen)을 측정하였다. 단회투여 독성실험으로 실험 군 당 5 마리의 rat 사용하였으며, 가공원료 추출물(Crude conchiolin)을 2g/kg로 처치하고 14일 후 실험동물의 혈액을 채취하였다. Plasma에서의 GOT (Glutamic oxaloacetic transaminase), GPT (Glutamic pyruvic transaminase), LDH (Lactate dehydrogenase) 및 BUN (Blood urea nitrogen)의 함량은 자동혈액분석기를 사용하여 분석하였다. (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 저가치 수산물의 나노 및 효소가공처리 공정기술과 산업적 응용제품 개발

가. 초미세 및 나노입자분말의 제조 및 입도분석

(1) 나노분말의 입도분석 (SEM, Scanning Electron Microscope)

제조된 나노분말을 이용하여 표면장력 측정, pH에 대한 표면장력의 변화, 계면장력 측정, 유화활성, 유화안정성, 온도 및 열 안정성에 대한 결과를 측정하였고 그 결과들은 일반분말, 초미세분말 및 나노분말에 대한 결과들과 비교분석하였다. 또한 제조된 나노분말의 정확한 입도 분석 및 그 제조된 분말 입자의 전자현미경 결과들을 분석하였다.(Fig. 6)

나. 나노 및 초미세가공분말의 성분분석과 물리화학적 특성 검토

(1) 표면장력 측정

사용된 시료들은 일반분말(>250 μm), 초미세분말(5-30 μm) 및 나노분말(<200 nm)을 사용하였으며, 그 농도는 2%(w/v)의 시료를 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 녹인 후 실험에 사용하였다. 실험 대조군으로 일반적으로 널리 사용되고 있는 Tween 80을 사용하였으며 농도는 50 μl /Buffer 10ml에 넣고 vortex 해서 교반한 후 측정 하였다. 그 결과 Tween 80의 표면장력은 42.3mN/m로 측정 되었으며 실험 내 사용된 6종류의 패

각에 대한 일반분말($>250\mu\text{m}$)과 초미세 분말 ($5-30\mu\text{m}$), 그리고 나노 분말 ($<200\text{ nm}$)에 대한 표면장력의 결과 buffer의 표면장력 72.3 mN/m 에 비해 일반분말의 경우 굴 71.6 mN/m , 새조개 71.3 mN/m , 동죽 71.9 mN/m 로 표면장력의 활성능력이 거의 없는 것으로 확인 되었다. 그러나 초미세 분말에서 나노 분말로 분체 입도가 작아질수록 표면장력의 활성 능력이 좋아지는 것은 측정결과 확인 할 수 있었지만 Tween 80과 같은 유화제로서의 기능을 갖는 것으로 해석하기는 힘들며, 분체입도가 작아지면서 물분자간의 결합력을 방해하여 나타나는 현상으로 사료된다. 그 중 가장 표면 장력 저해능이 우수한 것은 혼합으로 나노 분체의 경우 62.3 mN/m 의 표면장력 저해능을 가지는 것으로 확인 되었다.

(2) pH에 대한 표면장력의 변화

2%(w/v)분말을 3종류의 buffer (pH3.0-6.0, 50mM citrate, sodium citrate buffer ; pH 6.0-8.0, 100mM phosphate buffer ; pH 9.0-10.0, 50mM boric acid- NaOH buffer)에 녹인 후 이들 시료 5%(v/v)를 해당 pH별 완충용액에 넣고 표면장력계(TD-1, Lauda, German)를 사용하여 pH 별 표면장력의 변화를 측정하였다. 본 실험에 사용된 시료는 표면장력 활성이 좋은 혼합의 나노분말을 사용하였으며, pH 변화에 따른 표면장력의 변화를 분석한 결과 pH 5.0에서 62mN/m 로 표면장력의 저하능이 가장 우수하여 최적는 pH 5.0임을 확인하였다. 또한 pH 3.0이하에서는 표면장력 저하능이 급격히 떨어지는 것으로 보아 나노 입자의 물에 대한 용해성이 떨어지는 것으로 확인할 수 있고 pH 6-9까지는 비교적 안정적으로 표면장력이 유지되는 것으로 확인되었다.

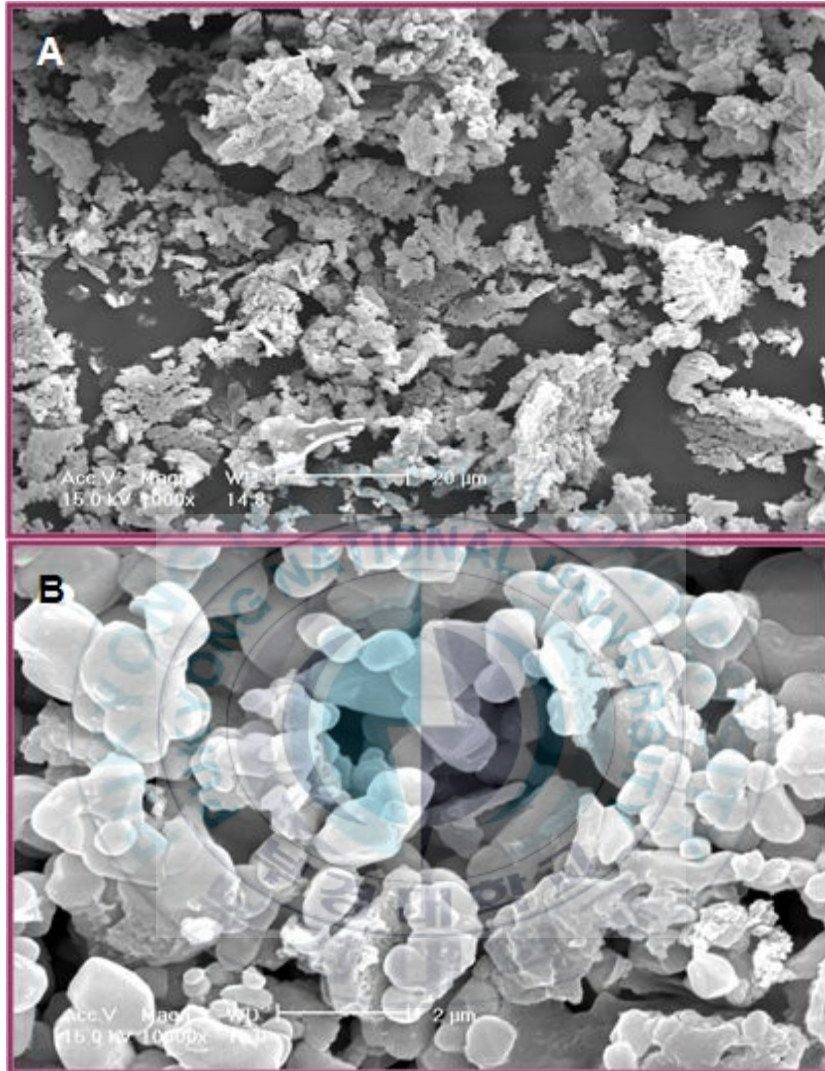


Fig. 6. Photograph of scanning electron microscope(SEM) of nano scaled powder of Pacific oyster. (A : x 1,000 magnified, B : x 10,000 magnified)

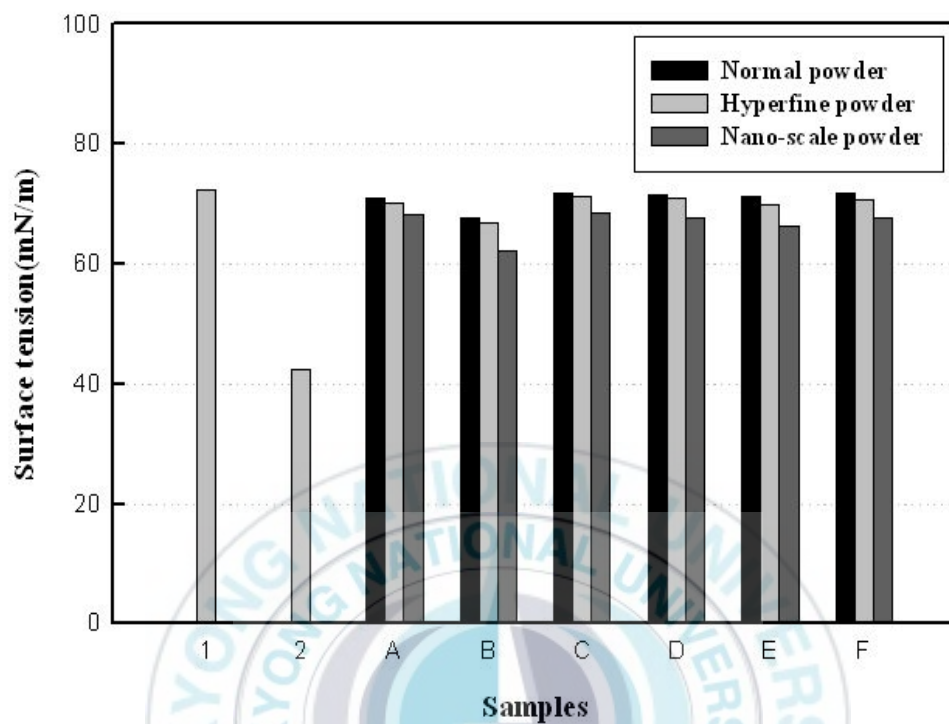


Fig. 7. Surface tensions of powders manufactured from various mollusk shells: Control (1), Tween 80 (2), Pacific oyster (A), Hard-shelled mussel (B), Little neck clam (C), Ark shell (D), Egg cockle (E), and Surf clam (F).

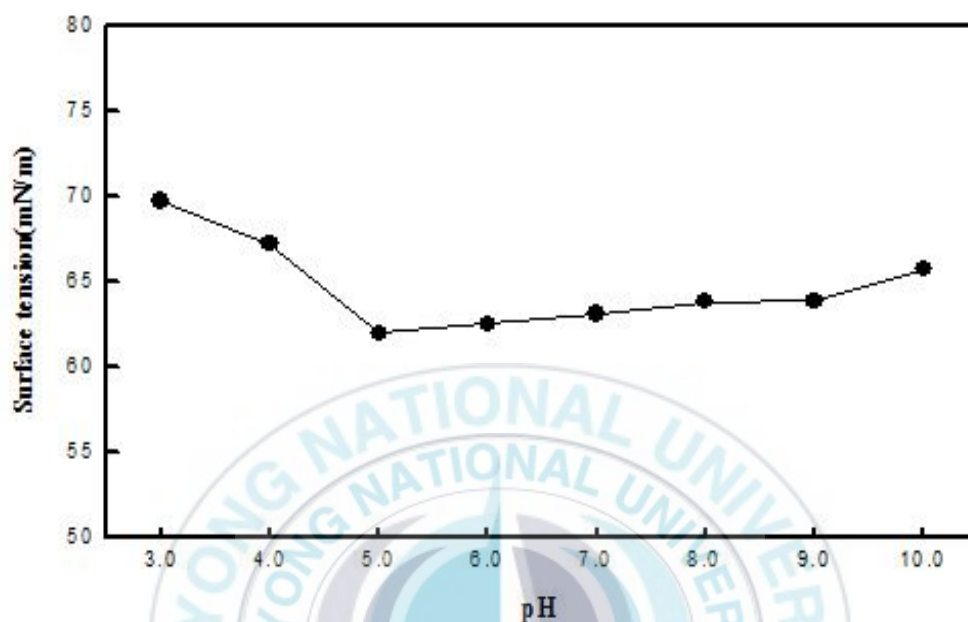


Fig. 8. Effect of pH on the surface tension of hard-shelled mussel solution. Three different buffers were used in a different range of pH. pH 3-6: 50 mM citrate sodium citrate buffer, pH 6-8: 100mM phosphate buffer, pH 8-10: 50mM Boric acid NaOH buffer.

(3) 계면장력 측정

20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 2%(w/v)의 분말을 녹여서 준비한 후 동일한 buffer 9.5ml에 준비한 시료 0.5ml를 넣고, 5%(v/v) olive oil을 넣고 1분간 강하게 vortex 시킨 후 10분간 정치시켜 계면장력을 측정하였으며, 대조군으로 Tween 80을 50 μ l를 넣고 그 결과를 비교하였다. 본 실험에 사용된 시료는 6종류의 일반 분말, 초미세 분말과 나노 분말을 사용하였으며, 대조군으로 사용된 20mM Tris-HCl(pH 7.0) buffer는 42mN/m, Tween 80 12mN/m 으로 측정 되었으며, 6개 시료 중 가장 표면장력 저하능이 우수한 혼합 나노 분말 시료의 경우 30.1mN/m로 측정되었다. 이것은 앞서 설명한 표면장력과 유사한 결과로 일반분말 보다는 나노 분말로 갈수록 계면 장력의 활성이 높아짐을 알 수 있었다. 결과는 오일과 물에 대한 시료의 반응성(용해도 포함)을 측정하기 위한 결과로 유화제에 비해 활성이 많이 낮음을 알 수 있다.

(4) 유화활성 및 유화안정성

(가) 유화 활성

분말을 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 각각 2% (w/v)씩 넣고 Rosenberg E. 등(1979)의 방법을 응용하여 유화활성도를 측정하였다. 사용된 기질로는 olive oil을 사용하였으며, 유화안정성은 유화활성도 측정법과 동일한 방법으로 실험을 행한 후 10분, 30분 간격으로 620 nm에서 흡광도를 측정하여 변화된 값의 기울기로부터 Kd 값을 산출하였다.

$$Kd = (\log X_2 - \log X_1) / 10$$

(X₁ : 진탕 후 10분 정치시킨 후의 흡광도 값,

X₂ : 매 30분 간격마다 측정한 흡광도 값)

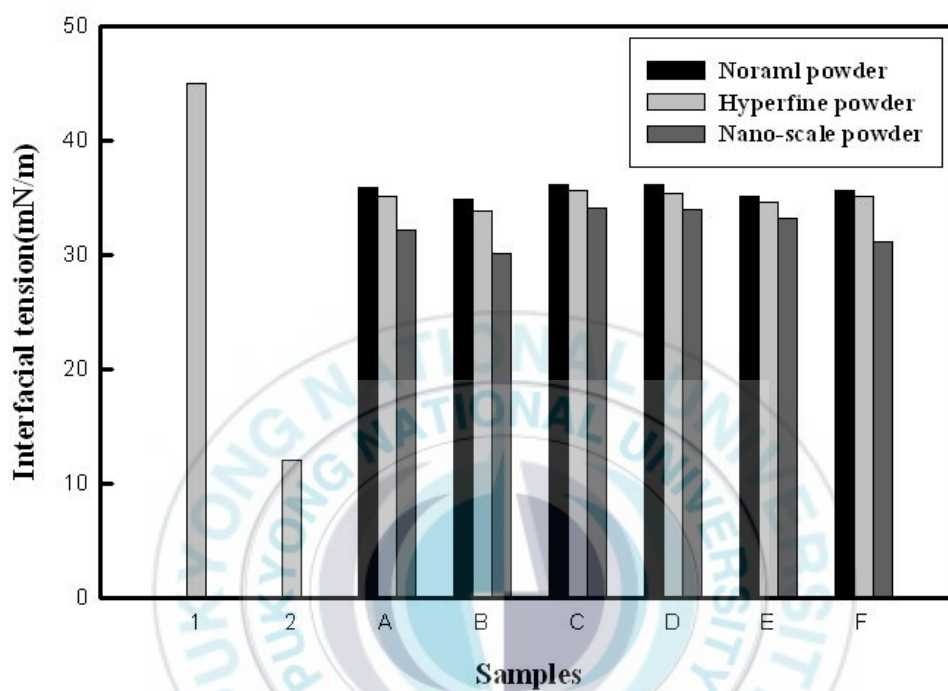


Fig. 9. Interfacial tensions of powders manufactured from six species shelles. 1: Control, 2: Tween 80, A: Pacific oyster, B: Hard-shelled mussel, C: Little neck clam, D: Ark shell, E: Egg cockle, and F: Surf clam.

6 종류의 시료에 대한 가공 방법별 (일반, 초미세, 나노) 유화활성도를 측정하고 대조구로 사용된 20mM Tris-HCl(pH 7.0) buffer, Tween 20, Tween 60, Tween 80의 유화 활성도는 각각 0.49, 0.865, 2.016, 1.9740의 흡광도를 나타냈으며, 시료의 경우 control군인 buffer와 비교해서 활성도 차가 0.04-0.4 사이에 있기 때문에 유화 활성이 아주 낮은 것으로 분석되었다.

(나) 유화 안정성

유화 활성을 유지하는 정도를 판단하는 유화 안정성 실험은 kd값이 (-) 값으로 낮아질수록 안정성이 떨어진다는 것을 이용하여 유화 활성을 주어진 방법에 의해 실험하고 10분간 정치시켜 흡광도를 측정하고 30분후 재차 흡광도를 측정하여 그 값의 변화를 분석하여 유화안정성을 확인한다. 실험결과, 대조구로 사용된 Tween 60(kd=-0.000129), Tween 80(kd=-0.00022)은 유화 안정성이 아주 우수하였으나 Tween 20(kd=-0.0124)은 Tween 60과 80에 비해 안정성이 매우 떨어졌다. 시료의 경우 buffer(kd=-0.0303)에 비해 유화 안정도는 우수하나 Tween 계열의 유화제와는 비교대상이 될 수 없는 것으로 확인되었다.

(5) 온도 및 열 안정성

20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 분말 2%를 녹여 액상시료를 만든 후 온도 및 열안정성을 측정하였다. 실온(25℃)에서 측정한 유화 활성도 값과 100℃에서 10분간 열처리한 시료의 유화활성도 값을 비교하였다. 본 실험에 사용된 시료는 6종류의 초미세 분말을 사용하였으며, 실온과 100℃에서 가열 처리한 시료를 이용하여 유화활성을 측정한 결과 유화활성도 변화에는 큰 차이가 없는 것으로 확인되어 패 각류 분말에 대한 열 안정성은 우수한 것으로 확인하였다.

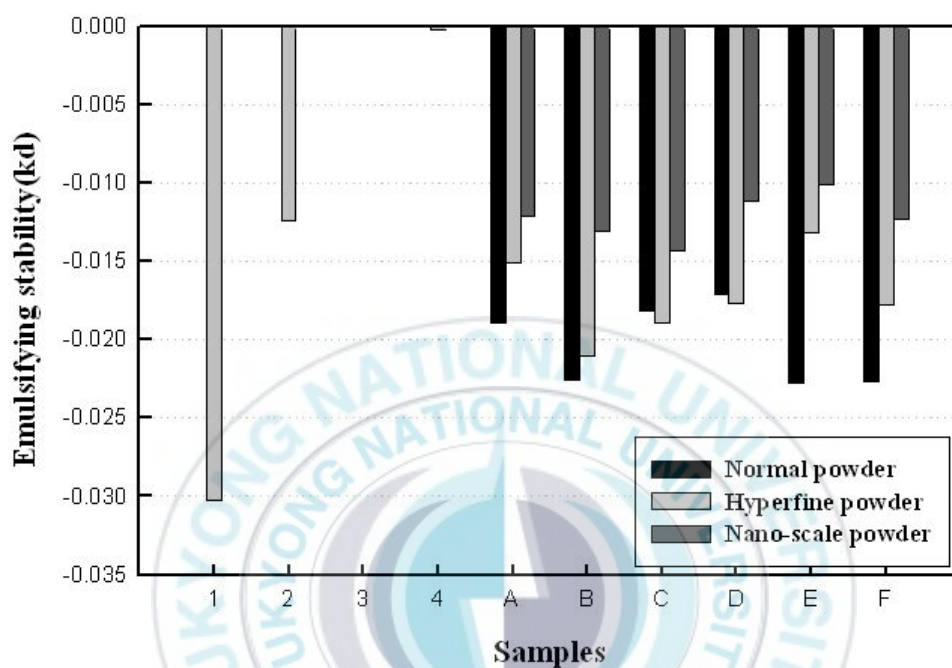


Fig. 10. Emulsifying stabilities of powders manufactured from various mollusk shells. 1: Control, 2: Tween 80, A: Pacific oyster, B: Hard-shelled mussel, C: Little neck clam, D: Ark shell, E: Egg cockle, and F: Surf clam.

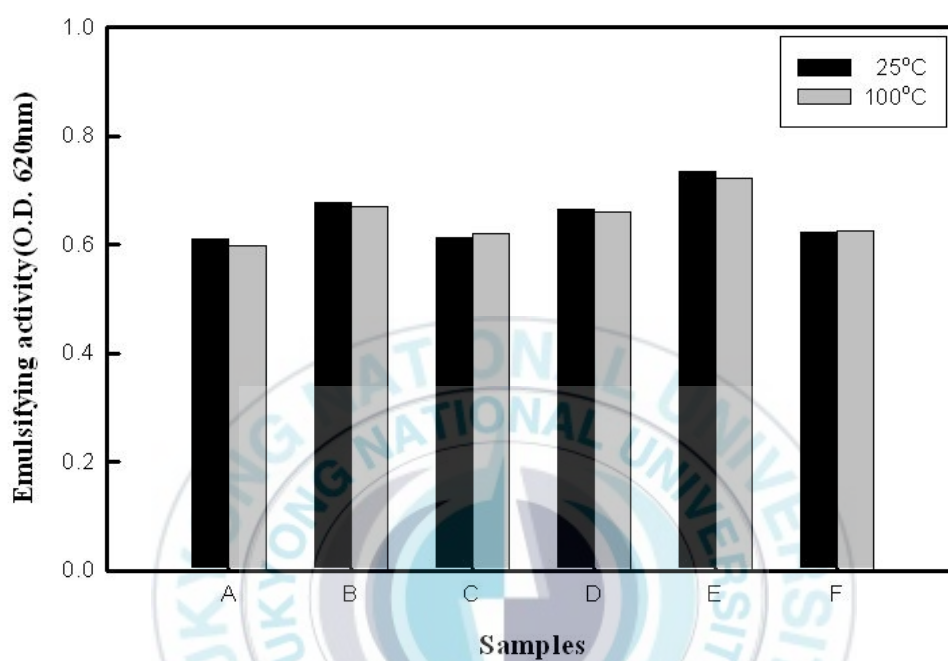


Fig. 11. Comparison of emulsifying activity for heat treatment samples.
A: Pacific oyster, B: Hard-shelled mussel, C: Little neck clam,
D: Ark shell, E: Egg cockle, and F: Surf clam.

2. 나노 및 효소분해물의 생리활성과 기능성 검증을 통한 한방 소재화 연구

가. 가공원료 추출물의 생리활성 분석

(1) 가공원료 추출물의 정량 비교분석

패각(굴, 바지락, 피조개, 동죽, 진주담치) 분말로부터 acetic acid로 탈석회화 과정을 거쳐 생성된 crude conchiolin의 활성 단백질을 추출하기 위해 기존에 불용성 단백질 추출에 널리 사용되어왔던 urea를 이용하여 추출하였다. urea를 이용하여 추출한 결과 투석 후에도 urea의 100% 제거가 어려웠으며 제거되지 않은 urea의 영향으로 단백질의 변성으로 인한 생리활성 측정에 문제가 있었다. 또한 많은 양의 당추출의 문제가 있었다. 따라서 Crude conchiolin으로부터 당추출을 최소화 시키면서 단백질의 변성을 일으키지 않는 추출 조건을 찾기 위해 대표적인 패각, 굴을 사용하여 7가지 buffer를 선정하여 단백질과 당추출을 비교 분석하였다(Table 4). 기존방법에 따라 8M urea(pH8.5)로 conchiolin을 추출 했을 때 $96.92\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 단백질이 추출되었고, 동일 조건에서 7가지 buffer를 사용해 추출하였을 때 0.1M citrate buffer(pH6.0)와 0.2M sodium phosphate buffer(pH8.0)에서 $84.04\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 $69.62\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 단백질량이 가장 높게 측정되었다. 0.2M Sodium phosphate buffer(pH6.0)추출 시 단백질과 당의 추출 비율이 65.87 : 1로 불순물의 추출을 최소화 하는 데는 이상적이나 단백질 추출량이 $57.88\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 기존 추출량의 60%에 미치지 못해 단백질 수득률이 낮았다. 반면 0.1M Citrate buffer(pH6.0)를 이용하여 추출 했을 때 단백질 양에 대비하여 당의 비율은 8.83 : 1(proteins : sugars)로 낮게 측정되었고, 단백질 추출량은 기존 urea 추출의 85%이상으로 불순물을 최소화하면서 단백질 추출을 최대화하기 위한 용액으로 효과적이었다.

citrate(Citric acid · sodium citrate)는 식품첨가물로 사용되는 물질로 차후 제품화하는데에도 이상적이므로 본 연구에서는 crude conchiolin으로부터 활성 단백질을 추출하기 위한 최적 조건으로 0.1M citrate buffer(pH6.0)를 선정하였다.



Table 4. Comparison of protein and sugar concentration of extracted soluble conchiolins among various buffers used for extraction from pacific oyster

Buffers	Protein con. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Sugar con. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Ratio (Protein : Sugar)
H ₂ O	12.88	0.00	12.88 : 0
8M urea, pH8.5	96.92	14.72	6.58 : 1
0.1M Citrate buffer, pH6.0	84.04	9.52	8.83 : 1
0.2M Sodium phosphate buffer, pH6.0	57.88	0.88	65.87 : 1
0.1M KH ₂ PO ₄ , NaOH buffer, pH6.0	37.50	1.48	25.26 : 1
0.2M Sodium phosphate buffer, pH8.0	69.62	4.01	17.36 : 1
0.1M Glycine buffer, pH 8.5	30.77	2.70	11.41 : 1
0.1M Trizma buffer, pH8.5	50.38	6.23	8.08 : 1
0.1M Glycylglycine, pH8.5	45.96	8.05	5.71 : 1

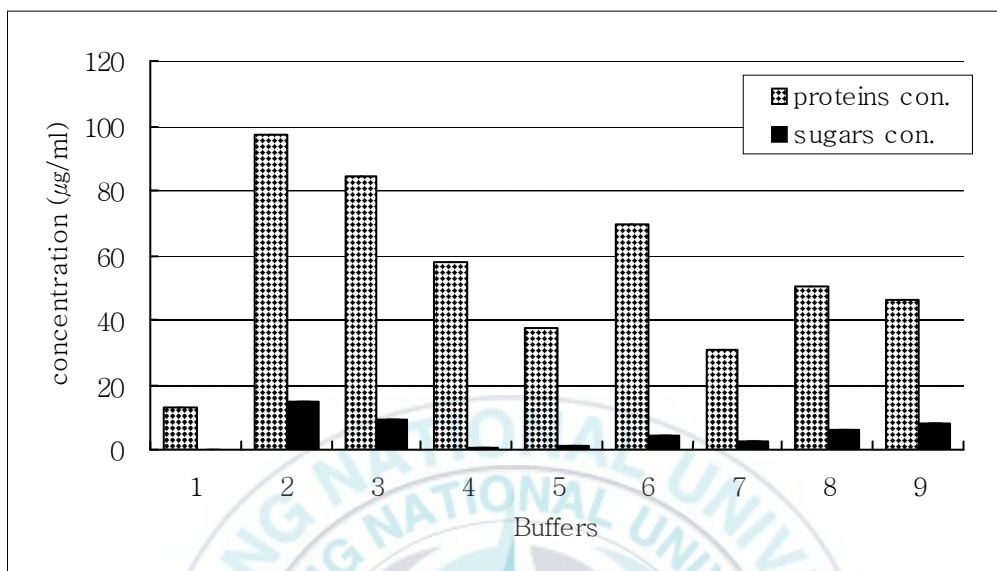


Fig. 12. Conchiolin extraction from pacific oyster by various buffers.

1: H₂O, 2: 8 M urea, pH8.5, 3: 0.1 M Citrate buffer, pH6.0, 4: 0.2 M Sodium phosphate buffer, pH6.0, 5: 0.1 M KH₂PO₄, NaOH buffer, pH6.0, 6: 0.2 M Sodium phosphate buffer, pH8.0, 7: 0.1 M Glycine buffer, pH 8.5, 8: 0.1 M Trizma buffer, pH8.5, and 9: 0.1 M Glycylglycine, pH 8.5.

(가) 단백질, 당 정량분석

패각 분말로부터 6.5M acetic acid로 탈석회화 과정을 거쳐 생성된 crude conchiolin으로부터 활성 단백질을 추출하기 위해 기존에 불용성 단백질 추출에 사용되어왔던 urea 추출과 본 연구에서 최적 조건으로 선정한 citrate buffer 두 가지 추출용매를 사용하여 추출 단백질과 당의 수득률을 비교·분석하였다. 6종(굴, 바지락, 피조개, 동죽, 진주담치, 새조개)의 crude conchiolin powder에 8M urea(pH8.5)와 0.1M citrate buffer(pH6.0)를 사용하여 bead를 첨가한 뒤 37℃에서 2시간 동안 동일 조건으로 반응시키고, 그 상층액의 단백질(Table 5, Fig. 13) 농도와 당(Table 6)의 농도를 측정하였다.

추출물의 단백질 농도 측정결과 citrate buffer를 이용하여 추출한 바지락, 진주담치, 새조개는 urea를 이용하여 추출된 단백질의 농도보다 높았지만, 피조개의 경우 citrate buffer를 이용한 추출보다 urea를 이용하여 추출하였을 때 단백질 농도가 2배 정도 높게 측정되었다. 동죽의 경우 urea와 citrate buffer를 이용한 추출물에서 단백질 농도가 유사하게 측정되었다(Table 6). 두 가지 추출용매를 사용하여 추출된 당의 농도를 비교한 결과 진주담치를 제외한 5가지 패각의 crude conchiolin에서 citrate buffer를 이용하여 추출했을 경우 urea 추출물에 비해 당의 농도가 최대 20배 정도 낮게 측정되었다.

따라서 패각으로부터 활성 단백질을 추출하기 위해 citrate buffer 추출법을 사용하여 실험결과 urea 추출법 보다 단백질 수득률이 증가하였고, 당의 수득률 또한 낮았기 때문에 활성 단백질을 추출하는데 citrate buffer 추출법이 적합한 buffer라고 생각되어 진다.

Table 5. Comparison of the soluble crude conchiolins among various mollusk shells.

Extraction Buffer	8 M urea		0.1 M citrate buffer	
Mollusk shells	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Yield (%)	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Yield (%)
Pacific oyster	152.00	0.61	132.00	0.66
Short necked clam	61.23	0.24	198.54	0.99
Ark shell	68.73	0.27	22.19	0.11
Surf clam	80.08	0.28	56.62	0.28
Blue mussel	22.19	0.09	34.50	0.17
Egg cockle	94.12	0.38	115.27	0.58

* Crude conchiolins extracted for 2 hr using urea and citrate buffer, respectively.

Table 6. Comparison of sugar concentration and yield among various mollusk shells.

Extraction Buffer	8 M urea		0.1 M citrate buffer	
Mollusk shells	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Yield (%)	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Yield (%)
Pacific oyster	157.6	0.63	23.5	0.12
Short necked clam	7.2	0.03	0.0	0.00
Ark shell	16.7	0.07	2.3	0.01
Surf clam	23.2	0.09	0.0	0.00
Blue mussel	13.2	0.05	10.8	0.05
Egg cockle	33.1	0.13	2.2	0.01

* The sugars extracted for 24 hr using urea and citrate buffer, respectively.

(2) 가공원료 추출물의 생리활성 비교분석

(가) 항염증 활성 측정(Cyclooxygenase, COX inhibition assay)

기존의 8M Urea에 의해 추출된 conchiolin의 경우, 정제 과정에서 당을 포함한 불순물을 상당량 함유하고 있어서 prep LC column 이용 시 분리가 용이하지 않았으며, 그 수득을 또한 낮았다. 따라서 Crude conchiolin으로부터 불순물은 최소화 하면서 최대의 단백질만을 추출할 수 있는 8M Urea 대체 buffer인, citrate buffer를 이용하여 추출된 가공원료 추출물(crude conchiolin)의 생리활성을 비교 분석하였다.

본 연구에서는 8M Urea 추출 conchiolin이 갖았던 COX-2 inhibition activity는 0.1M citrate buffer 추출시 어떠한 활성을 갖는지 확인하기 위하여 6 패각류의 crude conchiolin을 8M Urea와 0.1M citrate buffer로 2시간 추출 후 투석과정을 거쳐 conchiolin의 항염 효능을 평가하였다(Table 7). Table 7은 용해된 conchiolin (단백질 농도 : 10 ug/ml)에 의하여 유발되는 COX-2의 저해율을 비교·평가한 결과들이다.

Table 7에 의하면, 8M Urea와 0.1M citrate buffer로 용해된 각 패각류의 conchiolin의 단백질 농도가 10ug/ml일 때 유발되는 COX-2 저해율 비교 시, 5가지 패각류(굴, 바지락, 동죽, 진주담치 및 새조개)에서 0.1M citrate buffer를 사용하여 추출된 conchiolin이 8M Urea를 사용하여 추출된 conchiolin 보다 COX-2 저해율이 높음을 확인할 수 있었다. 굴의 경우, 8M Urea를 사용하여 추출된 conchiolin의 COX-2 저해율은 69.2%이나, 0.1M citrate buffer로 추출된 conchiolin의 경우 82.9%로 항염 효과가 높고, 진주담치의 경우에도, 8M Urea 사용 시 15.2%, 0.1M citrate buffer 사용시 57.9%로 약 3-4배 항염 효과가 높

이 평가되었다. 반면, 5가지 패각류와는 달리, 피조개에서는 8M Urea를 사용하여 추출된 conchiolin이 0.1M citrate buffer 사용 추출시 보다 COX-2 저해율이 높았으나, 그 저해율이 각각 62.2%(8M Urea로 추출된 conchiolin)와 48.8%(0.1M citrate buffer로 추출된 conchiolin)로 그 차이가 크지 않음을 알 수 있다.

이러한 데이터는 0.1M citrate buffer를 이용하여 용해된 conchiolin이 기존의 8M Urea를 사용시 용해된 conchiolin과 비교 시, 항염 효과가 동일하거나 우수할 뿐만 아니라, 정제 과정 중 문제가 되었던 당을 상당 부분 제거함으로써 앞으로 항염 효능을 지닌 고순도 conchiolin 생산 제조 가능성을 높일 것으로 사료된다.



Table 7. The activity of COX-2 inhibition by purified conchiolins from various mollusk shells

Source of conchiolin	8 M Urea(%)	0.1 M citrate buffer(%)
Pacific oyster	69.2±5.8	82.9±1.5
Short necked clam	17.2±3.7	36.9±17.3
Ark shell	62.2±1.6	48.8±11.4
Surf clam	1.0±1.1	64.3±2.5
Blue mussel	15.2±3.5	57.8±0.1
Egg cockle	80.6±18.7	96.9±0.1

(나) 항산화 활성 측정 (DPPH radical scavenging assay)

생명체가 산소를 이용한 대사를 할 때 산소분자의 대부분은 세포내의 미토콘드리아에서 respiratory chains를 거치면서 물(H_2O)로 환원되지만 일부의 산소분자들은 부분 환원되는 과정에서 중간대사물(intermediates)을 생성하는데 이들을 reactive oxygen species (ROS)라고 하며 superoxide($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) 등이 여기에 속한다. ROS는 화학 반응성이 강하기 때문에 저농도에서는 세포내 신호전달 물질(signaling molecule) 역할을 하지만 고농도에서는 지질, 단백질, 핵산 등 기존 분자 구조를 변형시켜서 세포의 손상(oxidative injury)을 일으킬 수 있다. 그러므로 산소를 이용하는 모든 생명체는 진화 과정에서 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxide (GPX) 등의 효소나 혹은 vitamin과 같은 물질을 통해서 이들을 소거(scavenge)하여 세포를 보호하고자 하는 기전(antioxidant reserve)을 가지게 되었다. 그러나 ROS의 생성이 과도하거나 또는 antioxidant reserve가 비정상적으로 줄어들면 양자의 균형이 무너지는데 이러한 상태를 oxidative stress라 하며 oxidative injury로 인해 생체조직의 구조와 기능에 이상을 초래할 수 있다. Redox state는 흔히 환원 glutathione과 산화 glutathione의 비(GSH/GSSG)로서 표현되는데 이는 세포내 oxidative stress를 나타내는 예민한 지표이다. 활성 산소들은 혼자서 존재하거나 활동하는 일이 없다. 이들은 전형적으로 연쇄반응의 산물이며 하나의 활성산소가 다른 활성산소를 생성시킨다. ‘superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$)’이라고 불리우는 것은 호흡에 의하여 들이마신 산소가 영양분을 태워서 에너지를 만들 때 발생하는 것이다. Superoxide radical은 세포내의 미토콘드리아에서 끊임없이 발생하는데

체내에서 장시간 머물러 있다. 이는 부대전자를 가진 free radical이며 체내에 가장 많이 존재한다. Superoxide radical이 한 개의 전자를 받아서 'hydrogen peroxide(H_2O_2)'가 된다. Hydrogen peroxide 자체는 그만큼 활성이 높지 않지만 체내에 있는 철이온과 같은 금속이온과 반응하면 즉시 활성력이 강한 'singlet oxygen(O_2)'이나 'hydroxyl radical($OH^\cdot$)'로 변한다. Hydroxyl radical은 강한 산화력을 가진 활성 산소이다. 활성산소의 그룹은 아니지만 활성산소로 말미암아 동일한 독성을 가지는 것이 'lipid peroxide'이다. 이것은 불포화지방산이 활성산소에 의해서 산화된 것으로서 다른 불포화지방산을 산화시켜 차례로 lipid peroxide를 증대하여 간다. 또 다른 free radical은 'nitric oxide(NO)'로 지질과 반응하여 lipid peroxide을 만든다.(Fig. 13).

이들 활성산소는 세포구성 성분들에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴 작용을 함으로써 지질을 산화시키고 단백질도 변성을 초래하여 세포막이 파괴되고, DNA도 손상을 입혀 백내장, 당뇨병, 간염, 신장염, 아토피성피부염, 관절염, 위염, 기미, 주근깨, 주름, 백내장, 파킨슨씨병, 알츠하이머형 치매 등 난치병의 90% 이상을 일으킨다. 또한 정상세포의 유전자의 고리를 절단하여 최초의 단일한 암세포를 만드는 발암과정에도 깊게 관여하고 있다. 따라서 최근 암, 당뇨, 뇌질환, 심혈관질환 등 모든 성인병의 원인을 oxidants와 antioxidants의 밸런스의 파괴에 의한 결과로 해석하는 시각이 대두되고 있으며, 이들 질병의 치료 및 예방을 위한 목적으로 항산화 물질에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 항산화 물질의 역할은 크게 금속 이온의 착염화 기능, enzyme 활성과 enzyme 유사활성 물질에 의한 free radical 포집력으로 radical 반응을 종결시켜 이들 활성산소에 의한 지방질 산화 및 DNA의 손상을 억제시킴으로써 동맥경화, 심장병예방, 노화 억제 등의 다양한

효과가 있는 것으로 알려져 있다. 오래 전부터 항산화제로는 효소계열과 비효소계열의 천연 항산화물질들이 많이 사용되어져 왔으나, 가장 실용화 된 것 중의 하나인 tocopherol은 항산화 효과가 비교적 낮은 편이고, BHT(butylated hydroxytoluene), BHA(butylated hydroxyanisole), PG(propyl gallate), TBHQ(tertiary butylhydroquinone)와 같은 합성 항산화제의 경우 일정 수준 이상 섭취 시 여러 질병을 유발하는 것으로 알려져 안전성의 문제가 제기 되면서 규제를 강화하고 있다. 또한 사람들은 건강에 대한 욕구의 증대로 인공합성품의 사용을 제한하려는 추세에 있어 안전성의 확보와 각종 질병의 예방 및 치료와 밀접한 관계를 갖고 있는 천연물을 이용한 천연 항산화제 개발이 필요한 실정이다.

항산화 활성 (antioxidant activity)이란 어떠한 성분이나 화합물 혹은 단일물질 등이 산화분해 (oxidative degradation)를 억제하는 능력을 말하며 항산화 활성을 측정하는 방법에는 많은 여러 가지 방법이 존재하나, 본 연구에서 선택하고 실험한 DPPH법은 가장 오래된 간접적인 항산화활성 측정법으로 1950년대에 처음으로 고안되었다.



이 방법은 원래 천연에 있는 수소공여체 (H-donor)를 측정하기 위해 고안되었으나 이후 페놀성 물질이나 식품의 free radical 소견활성을 측정하는데 사용되었다. DPPH법은 안정한 자유라디칼인 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)이 수소공여체(H-donor)와 반응하는 능력을 원리로 하여 측정하는 것으로 DPPH는 가시선 영역에서 매우 강한 흡수를 보여주기 때문에 UV-Vis spectrophotometer로 쉽게 측정할 수 있으므로 항산화 활성측정에 널리 이용되고 있다.

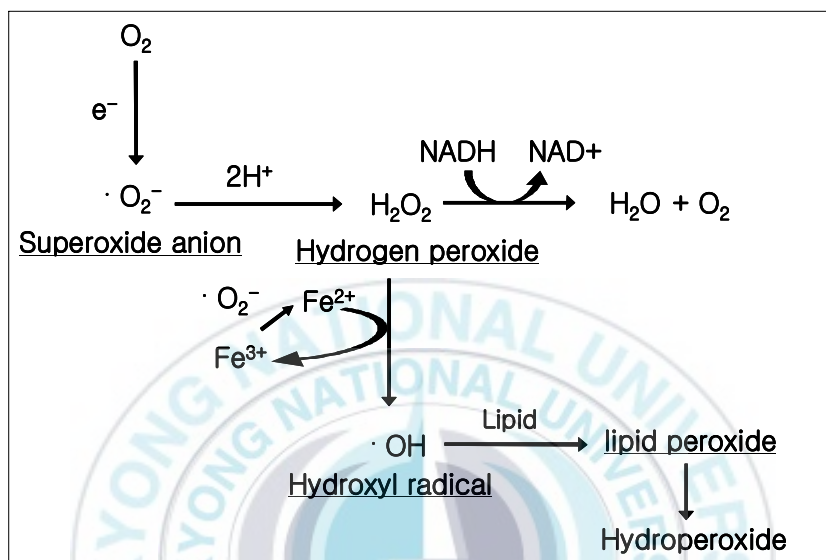


Fig. 13. Diagram of ROS production.

본 연구에서는 urea 추출법을 이용하여 패각으로부터 추출된 활성 단백질 추출물과, urea의 잔존과 가열 추출에 의한 과량의 불순물 추출이 문제가 되어 최적 추출조건으로 확립한 citrate buffer 추출법을 이용하여 추출된 활성단백질 추출물과의 항산화 활성을 비교하기 위해 추출물의 DPPH에 대한 전자공여효과로 시료의 환원력을 측정하는 방법에 따라 DPPH radical 제거 효과를 측정하였다. 굴의 crude conchiolin으로부터 추출 용매를 달리하여 추출된 conchiolin 0.5mg/ml에서 DPPH radical 형성 억제 활성을 측정한 결과는 Table 8., Fig. 16과 같다. 추출 용매로 사용한 0.1M citrate buffer(pH6.0)와 8M urea(pH8.5)에서 추출된 conchiolin의 free radical 소거활성은 19.58%(±11.21)과 27.99%(±5.26)로 오차범위내에서 활성이 유사함을 확인 할 수 있었다. 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid와 caffeic acid는 현재 항산화 물질로 사용되고 있는 정제된 물질로 80%이상의 우수한 활성을 나타내었다(Table 9, Fig. 14). 따라서 굴의 crude conchiolin으로부터 추출된 단백질의 항산화 활성이 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid와 caffeic acid에 비해서는 다소 미약하였으나, 기존에 사용된 urea 추출법과 새롭게 확립한 citrate buffer 추출법에 의해 추출된 단백질간의 DPPH에 대한 전자공여효과가 유사함에 따라 연구 진행에 많은 간섭을 일으키는 urea를 이용한 가열추출을 하지 않아도 citrate buffer 추출법을 사용하여 본 연구에서 찾고자하는 활성 단백질을 추출할 수 있을 것이다.

Table 8. Comparison of DPPH radical scavenging activity by 8M Urea and 0.1M citrate buffer extraction of crude conchiolins extracted against control

Concentration (mg/ml)	0.5 M			
	Ascorbic acid	Caffeic acid	Citrate buffer extract	Urea extract
Inhibition rate (%)	87.70±0.70	84.13±0.42	19.58±11.21	27.99±5.26

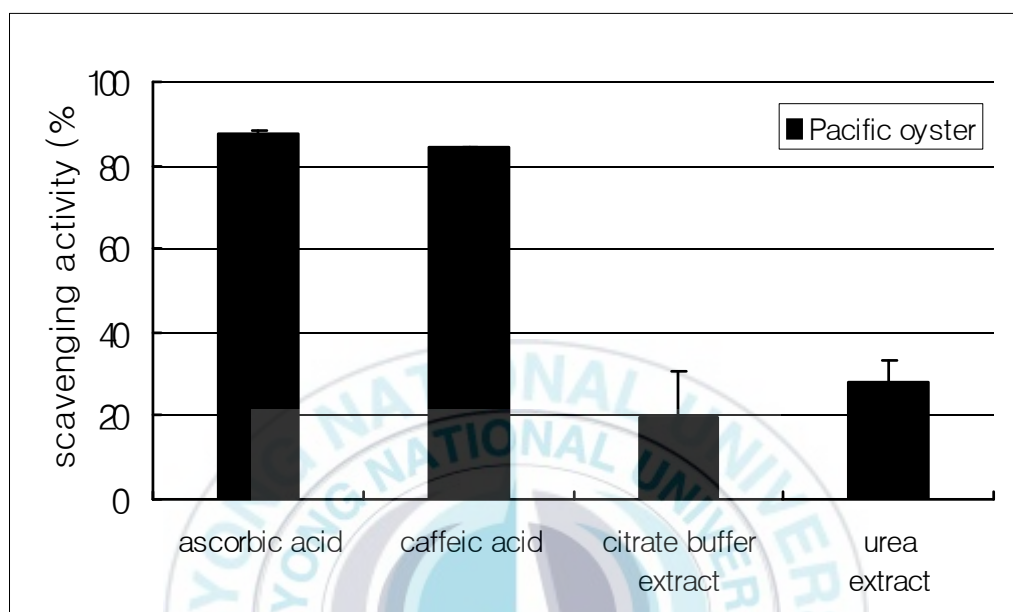


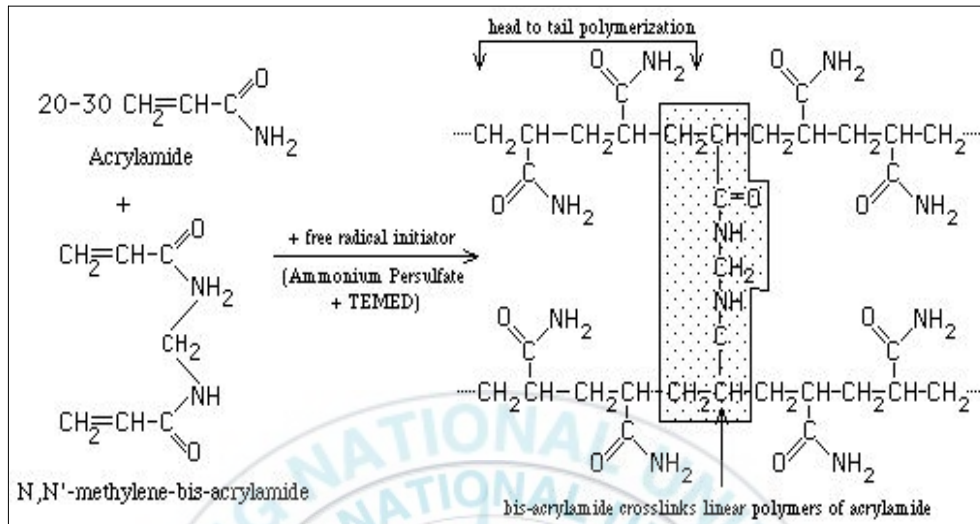
Fig. 14. Comparison of DPPH radical scavenging activities of crude conchiolins extracted by 8 M Urea extraction and 0.1 M citrate buffer extraction against control.

(다) SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 실험을 수행하였다. 단백질을 분리하기 위한 전기영동에 있어서 가장 광범위하게 쓰이고 있는 SDS-전기영동법(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)은 acrylamide와 N,N'-methylene bisacrylamide의 농도 및 비율에 의해 gel내 미세통로의 크기를 조절할 수 있어 다양한 크기의 생체 분자들을 분리할 수 있을 뿐만 아니라 높은 정밀도와 고분해능으로 인해 오래 전부터 단백질, 핵산 등의 분리에 널리 사용되어 왔다. Polyacrylamide gel은 acrylamide 측쇄 기능기가 N,N'-methylene bisacrylamide와 같은 2개의 기능기를 가지는 화합물에 의해 비가역적으로 중합되어 형성된 polymer(아래그림 참조)이다. 가교제로는 N,N'-methylene bisacrylamide를 많이 사용되고 있으며, 또는 N,N'-bisacrylylcystamine(BAC), N,N'-diallyltartardiamine(DATD), Ethylene diacrylate(EDIA) 등도 특수한 목적으로 polyacrylamide의 비율이 증가할수록 감소하여 약 1:20 정도에서 가장 작게 된다. 대부분의 polyacrylamide gel은 1:29의 물 비율로 제조하며 사용하고 있으며 이 비에서 분자량이 3% 정도의 차이가 있는 polypeptide를 분리할 수 있다. Acrylamide의 중합은 ammonium persulfate (APS) 또는 riboflavin의 첨가에 의해 개시된다. APS를 사용하는 경우에는 촉매제로 N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)를 사용하며 TEMED는 persulfate로부터 자유라디칼의 생성을 촉매함으로써 중합을 개시한다.

Riboflavin은 광조사 (photoactivation)에 의해 자유라디칼을 생성하여 acrylamide의 중합을 개시한다. Polyacrylamide의 중합이 해리된 자유라디칼에 의해 시작되므로 gel용액 내의 산소는 중합반응을 방해하게 되는데 gel용액을 사전에 degassing 해주는 이유이다. 전기영동용 완충용액(running buffer)에 포함된 glycine은 의가약산으로서 음전하와 양

전하를 동시에 띌 수 있다.



이와 같은 zwitter이온의 성질을 이용하면 gel내의 pH조건에 따라 glycine의 net charge와 이로 인한 전기영동속도를 조절할 수 있다. 전기영동을 시작하면 leading 이온인 Cl^- 이온과 단백질, glycine이온이 모두 양극을 향해 출발하게 된다. Glycine은 stacking gel의 낮은 pH 조건에서는 거의 중성을 띠므로 국부적인 전류의 감소현상이 유발된다. 따라서 낮은 pH 조건에서도 이동도가 빠른 Cl^- 이온과 이동도가 느린 glycine 이온 사이에 매우 높은 전위차가 형성되는데 이러한 전위차에 의해 glycine이온이 Cl^- 이온을 빠르게 뒤따르게 된다. 이때 상대적인 이동속도는 glycine < 단백질 < Cl^- 이 되며 따라서 단백질은 Cl^- 과 glycine 이온사이에 축적되어 이동하게 된다. Cl^- 과 glycine 이온의 간격은 수 mm로서 많은 용적의 시료에 있던 단백질도 running gel에 들어가기 전에 이사이에 축적되어 해상도를 높이는 효과를 나타내게 된다. Stacking gel은 large-pore gel이므로 단백질의 molecular sieving현상은 나타나지 않는다(gel내의 미세통로 크기에 따라 단백질이 분리되는 현상). 이동 중인 이온들이 running gel에 이르게 되면 running gel의

높은 pH는 glycine이온을 음전하로 강하게 대전시켜 glycine의 이동속도가 단백질보다 빠르게 되며 단백질은 gel내에서 molecular sieving 현상에 의해 분리된다. 본 연구에서는 urea 추출에 의한 추출물과 citrate buffer 추출물의 conchiolin 단백질을 비교하기 위해 SDS-PAGE를 이용하여 실험하였다. 6종류의 패각(굴, 바지락, 피조개, 동죽, 진주담치, 새조개)의 crude conchiolin에서 urea와 citrate buffer를 이용하여 추출된 conchiolin의 단백질을 확인한 결과 citrate buffer를 이용하여 2시간, 24시간 추출 했을 때 6종류의 패각 모두에서 약 37 kDa의 단백질을 확인하였다. 또한 약 75kDa~15kDa 사이에 여러 개의 단백질 밴드를 확인하였다. urea를 이용하여 2시간 추출 했을 때 6종류의 패각 모두에서 citrate buffer 추출했을때와 마찬가지로 약 37 kDa의 단백질을 확인하였다. 또한 약 75kDa~15kDa 사이에 여러 개의 단백질 밴드를 확인하였다. 24시간 추출 했을 때 6종류의 패각에서 약 75kDa~15kDa 사이에 2-3개의 단백질 밴드를 확인하였다. Citrate buffer를 이용하여 추출된 conchiolin의 단백질은 단백질 밴드가 깨끗하게 염색이 된 반면, urea를 이용하여 추출된 conchiolin의 단백질은 전체적으로 끌림이 나타났다. urea를 이용하여 추출한 실험결과 urea는 투석 후에도 100% 제거가 되지 않고 남아 있어 SDS-PAGE 실험을 할 때 끌림 현상이 나타나는 원인이 된다(Fig. 15). 기존에 사용된 urea 추출법과 새롭게 확립한 citrate buffer 추출법에 의해 추출된 conchiolin 단백질의 패턴은 비슷하였으나 urea를 이용한 추출법은 urea의 제거가 완벽하게 이루어지지 않아 새로운 추출법인 citrate buffer를 이용하여 활성 단백질을 추출하여야 한다.

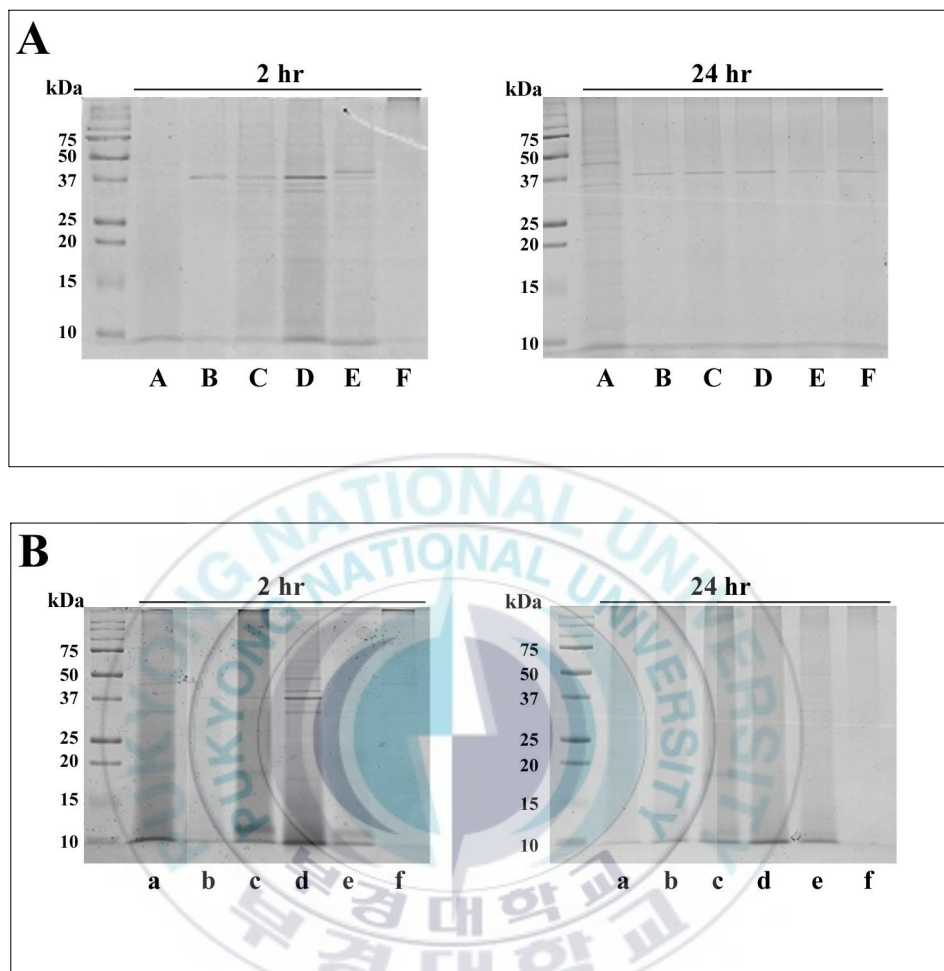


Fig. 15. Analysis by SDS-PAGE using the 8M urea extraction (A) and 0.1 M citrate buffer extraction (B) was stained with coomassie R-250. a: Pacific oyster, b: Short necked clam, c: Ark shell, d: Surf clam, e: Blue mussel, and f: Egg cockle.

나. 정제된 분획물의 생리활성 연구

(1) 항염증 활성 측정(Cyclooxygenase, COX inhibition assay)

염증은 세균 감염이나 물리적, 화학적 자극 또는 허혈, 항원 · 항체 반응, 열 등의 다양한 자극이 생체의 세포나 조직의 변화를 일으킬 때 그 손상에 대해 수복, 재생하여 장기를 보호하는 생체의 자기 방어 과정이다. 이런 생체의 자기 방어의 불균형에 의한 염증의 5대 증상으로 발열(heat), 발적(redness), 동통(pain), 부종(swelling) 및 기능 장애(loss of function)를 들 수 있으며 면역반응, 백혈구 증가와 같은 전신 증상도 나타난다.

염증에 관여하는 chemical mediator로는 5-hydroxytryptamine (5-HT), kinins, histamine, prostaglandins (PGs), leukotrienes (LTs), platelet-activating factor (PAF), cytokines 등이 있고, 이들이 자극시 활성화되어 상호 작용을 통해 염증 반응을 유발한다.

한편, 세포가 자극되거나 손상을 받으면 세포막에 존재하는 phospholipids로부터 phospholipase A₂(PLA₂)에 의해 arachidonic acid (AA)가 생성되어 주요한 mediator system이 진행된다. arachidonic acid는 cyclooxygenase(COX)와 lipoxygenase (LOX)의 작용 하에 몇 가지 경로로 대사되는데 그 중 하나는 COX에 의한 것으로 혈관 수축, 혈소판 응집 작용이 있는 thromboxane, 혈관 확장, 혈관 투과성 항진 및 동통 유발 작용이 있는 prostaglandin (PGs)이 생성된다. COX는 arachidonic acid를 prostaglandin으로 변환시키는 효소로서 정상조직의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 COX-1과 염증과정에서 일시적으로 발현이 증가하는 유도성 효소인 COX-2의 두 가지 isoform으로 존재한다.

과거에 개발된 NSAIDS들은, 예를 들면 indomethacin, 2가지 COX

의 활성을 비특이적으로 억제하기 때문에 체내 COX-1 의존적인 항상성을 파괴하여 위장관 출현, 신기능 장애 등의 부작용을 유발, 그 사용에 있어서 한계에 부딪치게 된다. 따라서 이러한 부작용을 줄여 안전하고도 효율적인 NSAIDs를 개발하기 위한 전략으로 나온 분자 표적 약물이 COX-2 선택적 억제제이다(Fig. 16).

그러나 COX-2 효소는 염증을 유발하는 물질인 Prostaglandin E₂가 생성되게 하는 효소인 반면, 혈전을 예방하고 혈관을 확장하는 물질인 Prostacyclin (Prostaglandin I₂)의 생성도 촉진하는 효소이다. 따라서 COX-2를 억제하면 염증은 억제되지만 혈전이 조장되고 혈압이 오를 수 있다. 특히 심장병이나 혈관에 병태가 있는 자는 더욱 악화된다. 반면, COX-1 효소는 염증인자가 퍼지지 않도록 혈액을 응고시키고 피가 잘 통하지 않게 하고 혈관을 수축시키는 물질을 만들어 내는 효소이면서 동시에 위점막이 파괴되지 않도록 점막 보호 물질을 만들어내는 효소다. 염증이 발생하면 COX-1도 작동하는 것이 생리적 방어 반응인데, COX-2 선택적 억제제는 COX-2를 주로 억제하고 COX-1은 활동하도록 남겨 놓는 것은 비생리적 상태다. 따라서 혈전을 예방하는 Prostaglandin I₂ 생성은 억제해 버리고 COX-1의 기능인 혈전을 조장하는 Thromboxan A₂의 생성을 내버려 두기 때문에 COX-2 선택적 억제제는 위점막 상해는 다소 보호할 수 있을지도 모르지만, 필요 없이 혈액이 응고되어 피가 통하지 않게 되고 혈관이 수축하여 혈압이 오르고, 순환기병이 있는 자는 심장순환계가 악화되기 쉽다. 따라서 COX-1도 억제하고 COX-2도 억제하는 기존의 소염진통제들을 복용하는 것이 위점막은 상할 수도 있지만 혈전 예방 작용은 유지될 수 있다. 6종류의 패각분말 (굴, 진주담치, 바지락, 피조개, 동죽 및 새조개)로부터 추출한 conchiolin을 사용하여 conchiolin의 항염 효능 평가시, 각 패각

류의 용해된 conchiolin의 단백질 농도가 0.01 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 증가됨에 따라 유발되는 COX-1과 COX-2의 저해율이 증가하였다. 이에 다음 연구 단계로 항염 활성을 갖는 물질을 분리, 정제하고자 sephadex G-100 전처리 과정을 거쳐 prep LC를 이용하여 부분 정제를 실시하였다. 따라서 본 연구에서는 5종류의 패각분말(굴, 진주담치, 바지락, 피조개 및 동죽)로부터 추출한 conchiolin을 prep LC를 이용하여 부분 정제하고, 그 fraction의 염증 억제 효능을 평가하였다 (Fig. 17. 과 Table 9). Fig 17.와 Table 9은 정제된 분획물(단백질 농도별 : 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 의하여 유발되는 COX-1과 COX-2의 저해율을 비교 평가한 결과들이다. 양성 대조 약물로는 비 스테로이드계의 항염증제인 indomethacin을 사용하였다. Cayman chemical company에서 Johnson 등(1995)의 논문을 기준으로 하여 만든 kit로 측정한 indomethacin의 IC50은 ovine COX-1 과 COX-2에 있어서 각각 0.1 과 6 μM 이었다. 본 연구에 있어서 양성 대조약물인 indomethacin에 대한 측정치는 COX-1에 대해서 0.15 μM 의 농도에서 58.4%, 0.1 μM 의 농도에서 46.0%, 0.05 μM 의 농도에서 36.7%의 저해율을 나타내었고, COX-2에 대해서는 18 μM 의 농도에서 69.7%, 6 μM 의 농도에서 49.0%, 2 μM 의 농도에서 34.3%의 저해율을 나타내었다. 이와 같은 결과는 Johnson 등(1995)이 보고한 indomethacin의 IC50 값이 COX-1 과 COX-2에 있어서 각각 0.1 μM 과 6 μM 이었다는 결과와 일치하는 것으로 확인되었다.

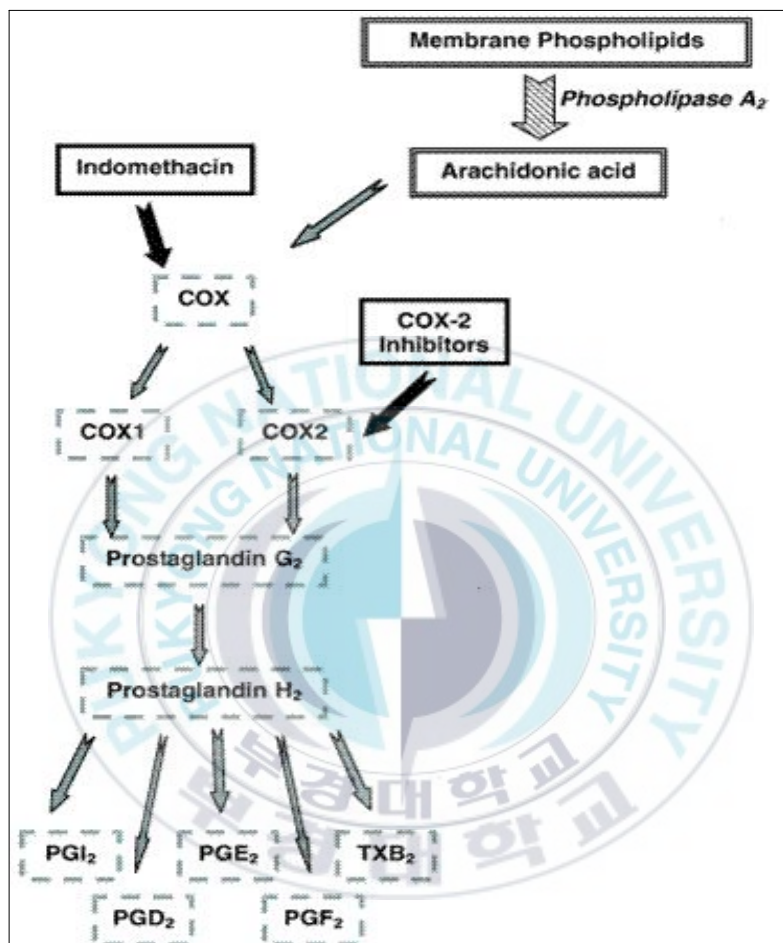


Fig. 16. Mechanism of chemotherapeutic agents on arachidonic acid pathways. (COX: Cyclooxygenase, PG: Prostaglandin)

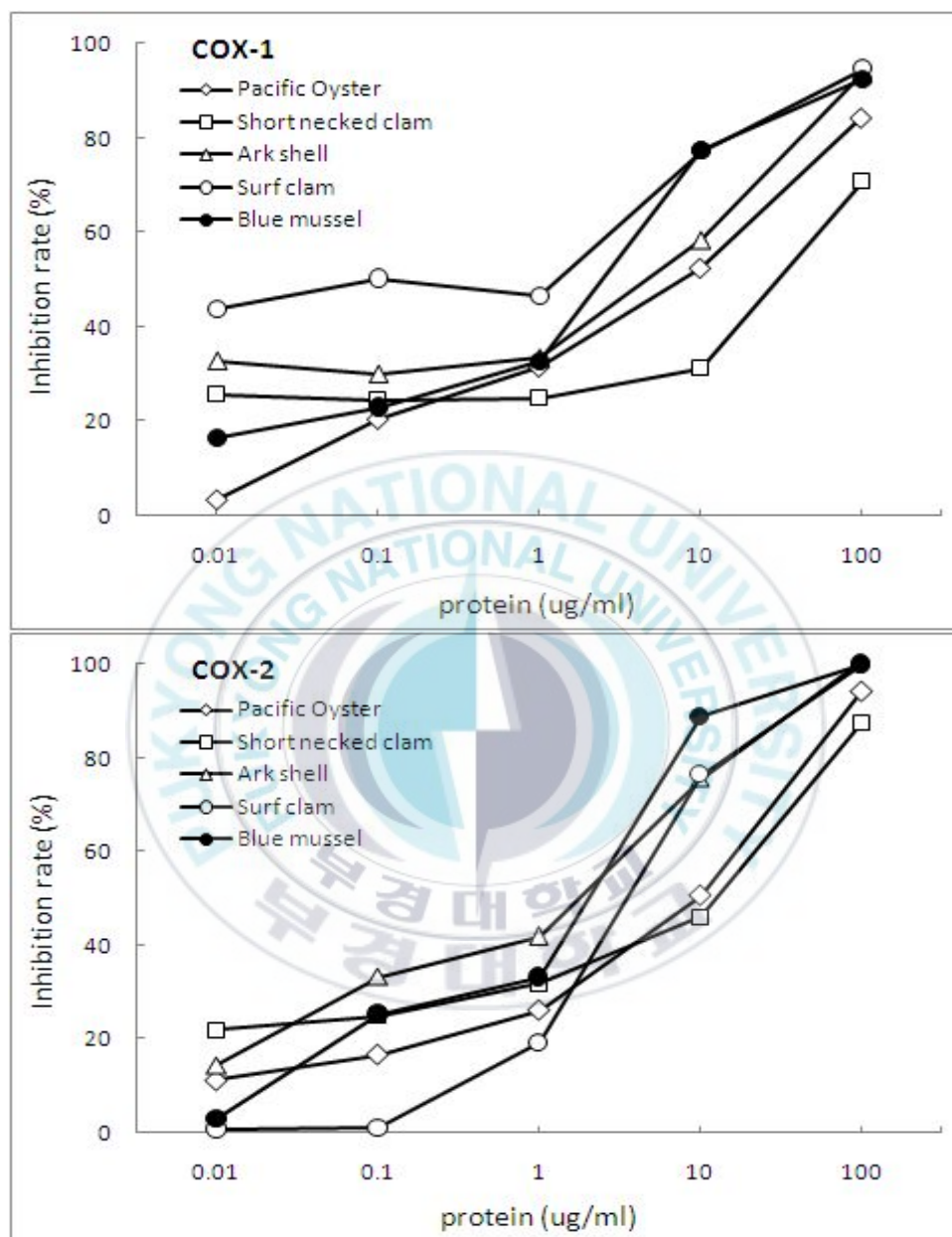


Fig. 17. Inhibitory rates of Cox-1 and Cox-2 by various soluble partial purified conchiolins. All experimental data were in mean $\pm$ SD of duplicate determinations.

Table 9. Inhibitory effects of purified conchiolins from various mollusk shells on cyclooxygenase activity. (COX-1 and COX-2) at various protein concentrations

(Unit: %)

Protein concentration (ug/ml)		Pacific oyster	Short necked clam	Ark shell	Surf clam	Blue mussel
0.01	COX-1	3.3±3.6	25.8±4.9	32.9±5.3	43.9±2.8	16.4±0.4
	COX-2	11.2±2.1	22±3.1	14.5±6.3	0.7±2.6	3.0±1.9
0.1	COX-1	20.4±9.8	24.5±5.7	30.1±1.6	50.4±2.7	22.9±4.9
	COX-2	16.6±2.5	24.9±5.8	33.3±5.5	1.0±0.7	25.3±4.5
1	COX-1	31.5±2.3	24.9±3.4	33.5±2.7	46.7±1.4	32.5±0.7
	COX-2	26.0±2.4	31.9±0.2	41.9±5.5	19.1±0.7	33.2±0.5
10	COX-1	52.5±4.3	31.1±0.2	58.4±0.3	77.3±1.3	77.3±0.0
	COX-2	50.7±1.4	46.1±1.8	75.6±1.8	76.4±2.3	88.8±0.1
100	COX-1	84.4±0.2	70.9±1.6	93.6±0.7	94.6±0.0	92.4±0.0
	COX-2	94.3±0.6	87.7±0.0	100.9±0.0	99.8±0.3	100.0±0.2

¹⁾ All experimental data were mean±SD of duplicate determinations.

Fig 17. 과 Table 9에 의하면, 각 패각류의 정제된 분획물의 단백질 농도가 0.01 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 증가됨에 따라 유발되는 COX-1 과 COX-2 의 저해율이 증가하였다. 이러한 결과는 Ibuprofen이나 Diclofenac 및 Naproxen 같은 모든 기존 소염 진통제가 COX-1도 억제하지만 COX-2도 억제하는과 동일한 현상을 나타냈으며, 굴의 경우 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 84.4%의 COX-1 저해율을 나타내었으며 94.3%의 COX-2 저해율을 나타내었다. 이러한 데이터는 COX-1 효소를 억제시킴으로 비록 위 점막 보호물질의 생산을 차단하지만 혈전 예방 작용은 유지되는 것이고, COX-2 효소를 억제시킴으로 염증을 유발하는 물질인 prostaglandin E2의 생성을 억제하여 염증을 억제시키는 것이다. 또한 COX-1과 COX-2의 경우 단백질농도가 1 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 IC_{50} 이 설정되었다. 이 결과는 crude conchiolin의 COX 저해율과 비교 시, 동일한 경향성을 나타내는 데이터이다. 또한 IC_{50} 역시 동일하게 설정되었다. 이는 단백질량으로 비교한 데이터로서, 정제된 분획물이기 때문에 패각류의 raw material로 따져 생각해 본다면, 같은 양의 raw material 비교 시 crude conchiolin의 COX 저해율 보다 정제된 분획물이 훨씬 높은 저해율을 갖을 것으로 사료된다.

최근에 개발되기 시작한 소염진통제들이 COX-2 만을 선택적으로 저해하여 위장장해나 출혈의 부작용을 줄이는 방향으로 초점이 맞추어지고 있으나 심장을 비롯한 순환기계에 부작용을 초래한다는 보고가 많아서 아스피린 발명 이후 가장 획기적인 소염진통제라 평가 받기도 했던 미국의 머크(Merck) 제약회사의 바이옥스 (성분명 : Rofecoxib)가 전 세계적인 취하 및 자진회수를 발표했다(약 2만 7000여 명이 바이옥스 복용으로 심장질환을 일으켜 사망한 것으로 추정했다.). 따라서 COX-2도 억제하지만 COX-1도 억제하여, 위점막은 상할 수도 있지만

혈전 예방 작용은 유지되는 과거의 소염진통제 개발이 심각한 부작용을 낳지 않을 것으로 사료된다. 이에 본 연구기관은 지금까지의 연구 결과들을 근간으로 하여 천연물인 패각류에서 유래하는 conchiolin을 재료로 지금의 정제 과정보다 더 고순도 분리 정제에 성공한다면 위장장애나 출혈의 부작용이 적은 천연 소염 진통제를 개발이 가능하리라 사료된다.



(2) 항산화 활성 측정 (DPPH radical scavenging assay)

패각으로부터 활성 단백질을 추출하여 항산화 활성을 측정함으로써 효능을 규명하고, 간단한 방법으로 활성측정이 용이한 점을 이용하여 정제과정 중 활성성분 분리를 위한 지표로 삼고자 본 실험을 진행하였다. 5종의 패각 crude conchiolin으로부터 urea 가열 추출법에 의해 추출된 conchiolin을 정제하기 위하여 shephadex G-100을 이용하여 당과 불순물을 전처리하였다. 전처리된 시료는 prep-LC를 이용하여 정제하여 정제된 단백질에 대한 항산화 활성을 측정하였다. 0.5mg/ml에서 DPPH radical 형성 억제 활성을 측정한 결과는 Table 10, Fig. 18과 같다.

Pacific oyster의 경우 0.5mg/ml에서 free radical제거 활성이 35.12%로 5종의 패각 보다 높게 측정 되었으며, blue mussel과 ark shell은 0.5mg/ml 동일 농도에서 25.43%, 24.21%로 유사한 활성이 측정되었다. Short necked clam의 경우 0.20%로 항산화 활성이 가장 미약하였다. 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid와 caffeic acid는 80%이상의 우수한 활성을 나타내었다. 하지만 이들 물질은 현재 항산화제로 생체 안, 밖에서 항산화 효과가 우수하다고 알려진 물질로 순수 정제되지 않은 본 시료와 동일 농도에서 절대치로 활성을 비교할 수는 없으며, 각 패각의 항산화 활성을 비교하는 상대값으로 적용되어야 할 것이다.

(3) 미백 활성 측정 (*In vitro* tyrosinase inhibition assay)

초미세 분말로부터 정제된 정제물의 미백활성을 측정하기 위해 식약청에서 고시한 ‘기능성화장품의 유효성 평가를 위한 가이드라인’ in vitro tyrosinase inhibition assay를 수행하였다. Urea를 통하여 추출된 crude conchiolin의 미백활성은 굴, 바지락, 피조개, 진주담치 및 새조개에서 10-20% 정도의 활성밖에 없었고 동족에서는 5% 미만의 활성을 나타냈다.

Table 10. DPPH radical scavenging activity of the soluble partial purified conchiolin from various mollusk shells.

Conc. (mg/ml)	0.5						
M o l l u s k shells	Ascorbic acid	Caffeic acid	Pacific oyster	Short neked clam	Ark shell	Surf clam	Blue mussel
Inhibition rate (%)	87.70	84.13	35.12	0.20	24.21	14.78	25.43

* DPPH radical scavenging activity measured by the DPPH decolorization assay, compared with ascorbic acid and caffeic acid.

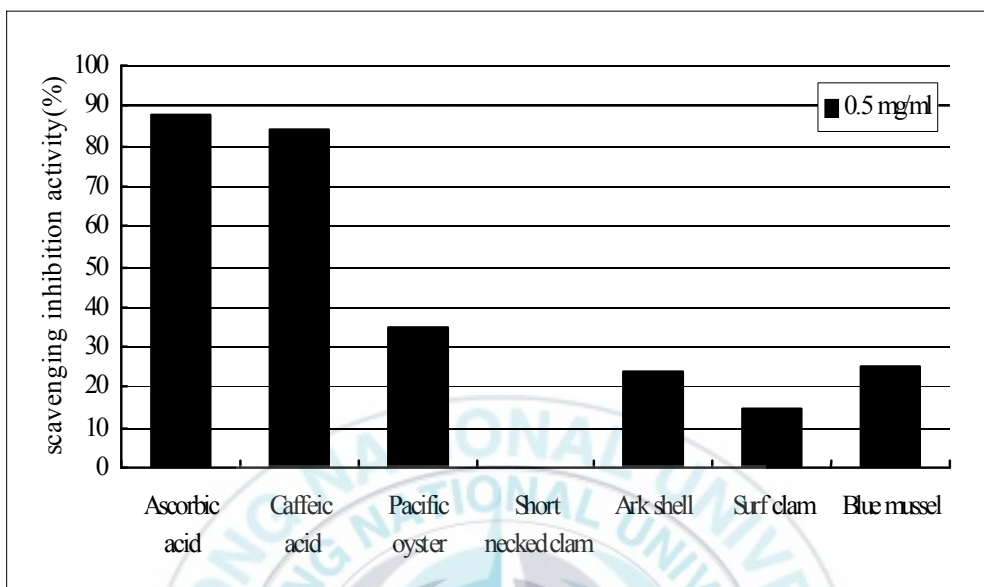


Fig. 18. DPPH radical scavenging activity of the soluble partial purified conchiolin from various mollusk shells. DPPH radical scavenging activity measured by the DPPH decolorization assay, compared with ascorbic acid and caffeic acid.

따라서 crude conchiolin을 Sephadex G-100과 prep-LC를 이용 하여 분리, 정제를 한 후 in vitro tyrosinase inhibition assay를 통한 미백실험을 수행하였다.

Tyrosinase는 인체 내의 melanin 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도 결정 단계에 관여하는 효소로서 이 효소의 활성을 억제함으로써 melanin 색소의 형성을 막아 피부의 색소 침착을 막을 수 있다. 그러므로 tyrosinase의 활성 저해능을 측정하여 생리활성 물질의 미백효과를 평가할 수 있다. 각 패각류(굴, 피조개, 진주담치, 바지락 및 동죽)에서 정제된 분획물의 tyrosinase 활성 저해능을 측정한 결과는 Fig. 16과 같다. 각 패각류에서 정제된 분획물 170ug/ml의 단백질 농도에서 tyrosinase 저해 활성 측정 결과 굴에서는 7.9%, 바지락에서는 5.56%, 피조개에서는 12.96%, 동죽에서는 5.1% 및 진주담치에서는 4.1% 저해되었다. 양성대조군으로 측정한 Arbutin의 경우 170ug/ml의 농도에서 86.7% 저해되었다(Fig. 21, Table 11). 본 연구에서 사용된 Arbutin(Fig. 16)은 식약청 미백 기능성 원료로 공식 승인된, 월굴나무(Bearberry)에서 추출한 천연 식물 성분으로 멜라닌 색소의 생성을 도와주는 tyrosinase에 직접 작용해 멜라닌 생성을 시작단계에서부터 억제한다.

본 연구에서 정제된 conchiolin은 prep-LC를 이용하여 분리, 정제된 분획물로 단일 물질로 정제된 분획물이 아니라 여러 분획물이 섞여 있는 상태로 98%의 순도를 지닌 양성대조군인 Arbutin(sigma, A4256)의 tyrosinase 저해 활성과의 비교는 어려울 수 있다. prep-LC를 이용하여 분리, 정제된 분획물은 arbutin 대비하여 tyrosinase 저해 활성이 낮지만 98% 정제하여 tyrosinase 저해 활성을 측정하면 미백효과는 있을 수 있다.

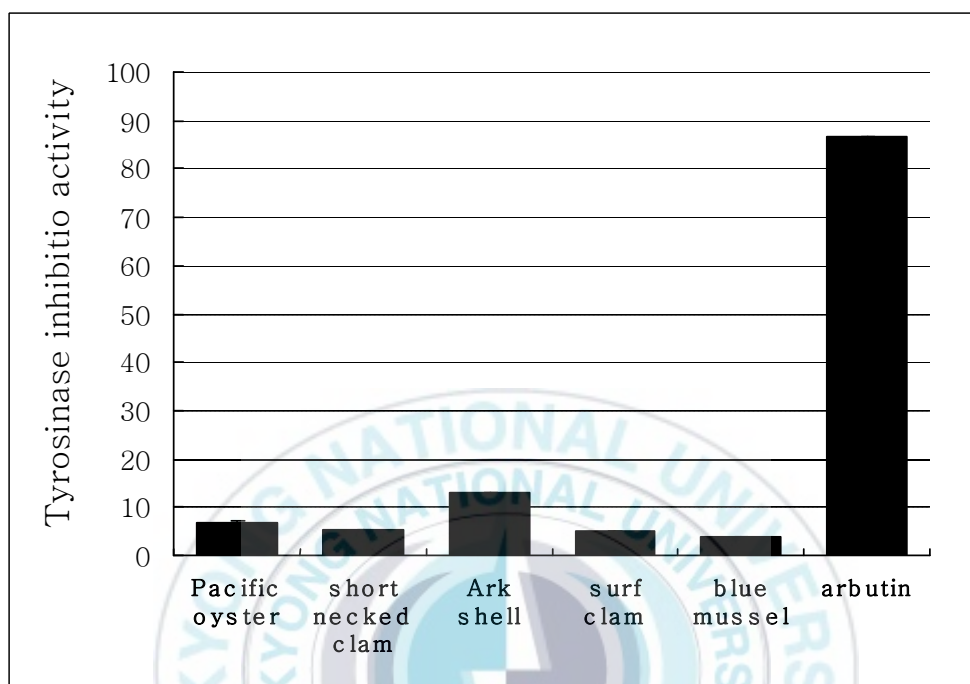


Fig. 19. Effect of the soluble partial purified conchiolins extracted from various mollusk shells on tyrosinase inhibition activity. L-Tyrosine oxidation by tyrosinase was spectrophotometrically determined, respectively.

Table 11. Effect of the soluble partial purified conchiolin extracted from various mollusk shells on tyrosinase inhibition activity.

Mollusk shells	Activity of Tyrosinase inhibition
Pacific oyster	7.90±0.043
Short necked clam1	5.56±0.087
Ark shell	12.96±0.160
Surf clam	5.01±0.220
Blue mussel	4.10±0.050
Arbutin	86.70±0.087

* L-Tyrosine oxidation by tyrosinase was spectrophotometrically determined. The used concentration of conchiolin was 170 ug/ml.

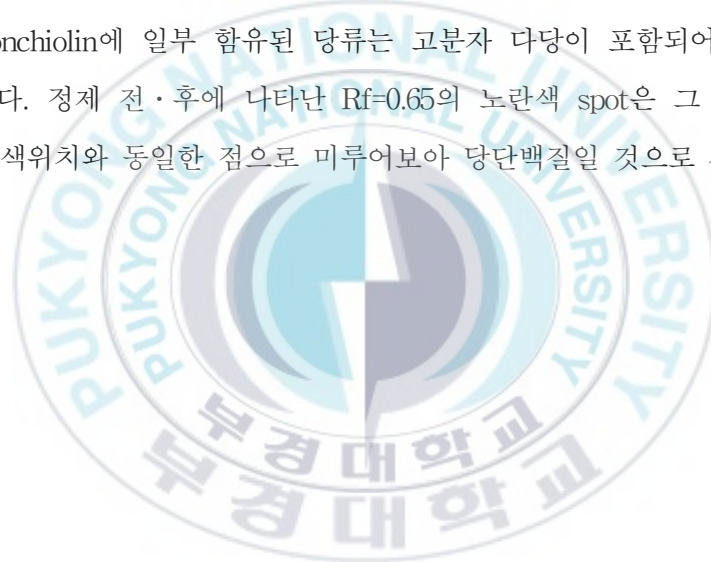
(4) TLC(Thin layer chromatography) 분석

5종의 패각 crude conchiolin으로부터 urea 가열 추출법에 의해 추출된 conchiolin을 정제하기 위하여 shephadex G-100을 이용하여 당과 불순물을 전처리하였다. 전처리된 시료는 prep-LC를 이용하여 정제하여, 정제 전 시료와 정제된 단백질에 대한 유기물의 구성성분을 TLC (Thin layer chromatography)를 사용하여 비교·분석하였다. Silica gel glass plate에 시료를 10 μ l 점적하여 전개 후 TLC판을 건조하고, 2% ninhydrin spray로 분무하여 TLC판에 적신 후 hotplate에서 가열 반응을 시켜 spot의 색을 확인 하였다. 발색 측정된 결과는 Fig. 20과 같다. 정제 전 conchiolin 시료의 발색을 확인 결과 5종의 패각 conchiolin 모두에서 Rf=0.66, 0.61, 0.49, 0.39, 0.5개의 proteins spot이 확인되었다. 이들 물질로 prep-LC를 사용하여 분리한 시료의 경우 Rf=0.61 spot이 동시에 확인 되었으며, Ark shell 정제 시료에서는 Rf=0.66 spot이 함께 발색되었다. 표준물질로 사용된 BSA(Rf=0.0)과 glycine(Rf=0.36)의 경우 ninhydrin 반응 시 핑크색, 짙은 오렌지색이 나타났고, 5종류에서 동시에 나타난 spot 경우 핑크색의 spot 주변에 노란색의 테두리가 형성됨을 알 수 있다. Ninhydrin의 경우 α -아미노산, 펩티드 및 단백질들과 100 $^{\circ}$ C에서 반응하여 자주색 또는 붉은 자주색의 착색물질을 만든다. 착색물질의 색은 아미노산에 따라 다른데 프롤린과 하이드록시프롤린의 경우 황색의 착색물질을 만든다. 따라서 5종의 패각 추출 conchiolin에는 여러 아미노산과 단백질이 포함되어있으며 prep-LC로 정제된 시료의 경우 황색을 띄는 spot이 주를 이루었으므로 프롤린 또는 하이드록시프롤린으로 구성 된 단백질일 것으로 사료된다.

당분석을 위하여 단백질 분석과 동결한 전개용매를 사용하여 건조 후 TLC판을 전개하였으며 전개 후 TLC판을 건조하고 발색반응을 측정하였다. 발색을 위하여 먼저 A solution (20% v/v H₂SO₄/EtOH)에 TLC판을 dipping 하여 건조시키고, B solution (0.2% α -naphtholresorcinol/EtOH)을 spray하여 hotplate

로 가열 건조 한 후 발색을 관찰하였다.

Glucose를 점적하여 표준 발색 물질을 하였으며, 그 결과는 Fig. 21과 같다. Glucose의 경우 $R_f=0.55$ 에서 청색 발색을 하였으며, 패각 conchiolin 시료의 경우 $R_f=0.66$ 에서 노란빛을 띄었고, $R_f=0.43$, 0.0 에서 청색 spot이 확인되었다. Prep-LC 정제된 시료의 경우 $R_f=0.65$ 에서 노란 색 spot이 나타났다. Naphtolresorcinol 시약은 알도오스, 케토오스, 요산, 디옥시당, 글리코사이드, 올리고당 확인 시 사용되며, 알도오스는 파랑 또는 보라색 발색을 나타내고 케토오스는 분홍 또는 붉은 색, 요산은 푸른색 점으로 나타난다. 따라서 청색이 나타난 패각 conchiolin에 일부 함유된 당류는 고분자 다당이 포함되어있을 것으로 추정되어진다. 정제 전·후에 나타난 $R_f=0.65$ 의 노란색 spot은 그 발색 위치가 proteins 발색위치와 동일한 점으로 미루어보아 당단백질일 것으로 사료된다.



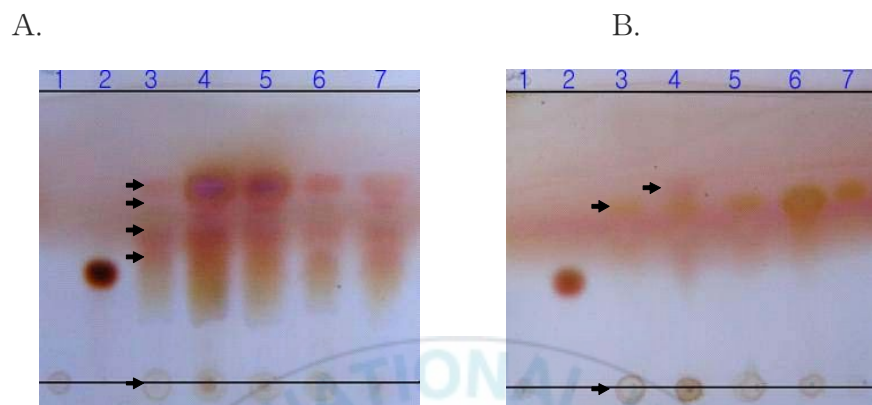


Fig. 20. TLC analyses of five different conchiolins extracted from shells. Spots were detected with the ninhydrin reagent.

A: Conchiolin, B: Soluble partial purified conchiolin.

Lane 1: BSA, Lane 2: Glycine, Lane 3: Pacific oyster, Lane 4 : Ark shell, Lane 5: Short necked clam, Lane 6: Blue mussel, and Lane 7: Surf clam.

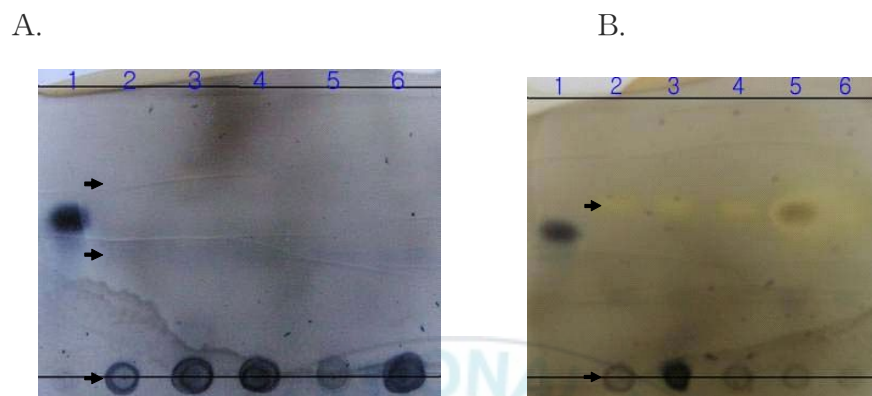


Fig. 21. TLC analyses of five different conchiolins extracted from shells. Spots were detected with the α -naphtoresorcinol.

A: Conchiolin, B: Soluble partial purified conchiolin

Lane 1: Glucose, Lane 2: Pacific oyster, Lane 3: Ark shell, Lane 4: Short necked clam, Lane 5: Blue mussel, and Lane 6: Surf clam.

(5) SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

초미세 분말로부터 정제된 정제물의 단백질을 확인하기 위해 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 실험을 수행하였다. 5종의 패각 crude conchiolin으로부터 추출된 conchiolin을 shephadex G-100을 이용하여 당과 불순물을 전 처리하였다. 전 처리된 시료는 prep-LC를 이용하여 정제하였고 정제된 분획물의 단백질 확인을 위해 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 실험 후 silver staining을 수행하여 단백질을 확인하였다(Fig. 24). 각 패각류에서 정제된 분획물 15 μ g을 loading한 다음 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 실험결과 굴과 피조개, 동죽, 진주담치는 10KDa보다 작은 크기의 3개의 protein band를 확인하였다. 바지락은 2개의 protein band만 확인되었다. conchiolin 단백질은 20-60KDa크기의 단백질로 알려져 있으나 본 실험 결과에서는 10KDa 미만의 단백질을 확인하였다. 처음 crude conchiolin에서 추출시 사용했던 urea는 강력한 detergent로 단백질을 변성시키는 역할을 한다. 20-60KDa의 conchiolin 단백질이 본 실험에서 10KDa 미만에서 확인이 되었고 또한 여러 개(2-3)로 확인되었다. Urea로 인한 단백질 변성으로 인한 conchiolin의 subunit이 나타낸 것으로 생각되어지며 2-3개의 subunit을 합치면 기존에 알려진 크기인 약 20-30KDa 단백질로 확인이 될 거라 생각되어진다.

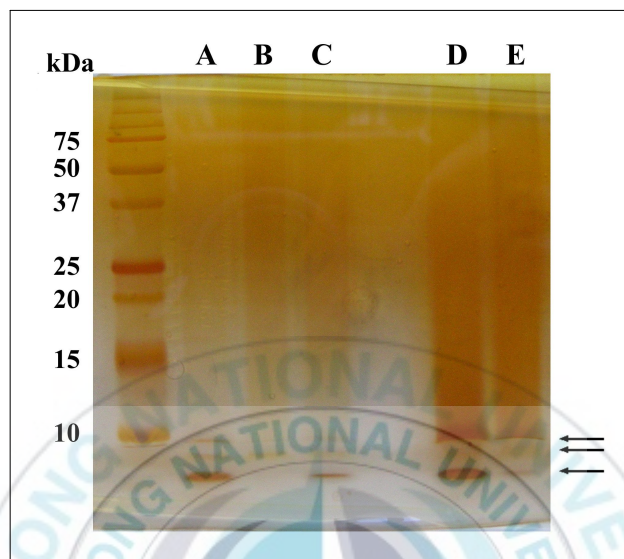


Fig. 22. Analysis by SDS-PAGE of the soluble partial purified conchiolins from various shells. They were purified with prep-LC, resolved by SDS-PAGE and then stained with silver nitrate. A: Pacific oyster, B: Short necked clam, C: Ark shell, D: Surf clam, and E: Blue mussel.

3. 개발된 한방소재를 이용한 임상연구 및 안정성 연구

가. 전임상 동물실험

(1) Raw 264.7 cell에서 가공원료 추출물(crude conchiolin)의 세포 독성 및 항염 활성 측정

Raw 264.7 cell에서 가공원료 추출물(crude conchiolin)의 NO 생성억제 정도를 관찰하기 위하여 진주담치, 굴, 동죽의 가공원료 추출물(crude conchiolin)을 0.1mg/ml과 0.3mg/ml로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS에 의해 증가된 NO 생성량은 진주담치, 굴, 동죽을 전처리 했을 때 NO의 생성을 억제하였다. 또한 진주담치와 굴은 염증매개인자인, IL-6, TNF- α , PGE2를 농도 의존적으로 억제하였다. 그러나 동죽은 IL-6, TNF- α , PGE2의 염증매개물질의 억제에는 유의한 결과를 나타내지 않았다. 일반적으로 COX-2의 감소는 PGE2의 감소를 유도하지만, 동죽에서는 어떠한 이유로 IL-6, TNF- α , PGE2의 염증매개인자를 억제하지 못하는 지는 전사인자 및 COX-2의 활성 등을 중심으로 좀 더 깊은 연구가 필요할 것으로 사료 된다(Fig 23-25).

단백질 발현량을 측정할 수 있는 immunoblot analysis 실험결과 LPS에 의해 증가된 iNOS와 COX-2는 가공원료 추출물(crude conchiolin)에 의해 발현량이 감소하는 것으로 나타났다(Fig 26). 이는 폐각에서 추출한 추출물(crude conchiolin)이 강한 항염활성을 나타내는 것을 의미한다.

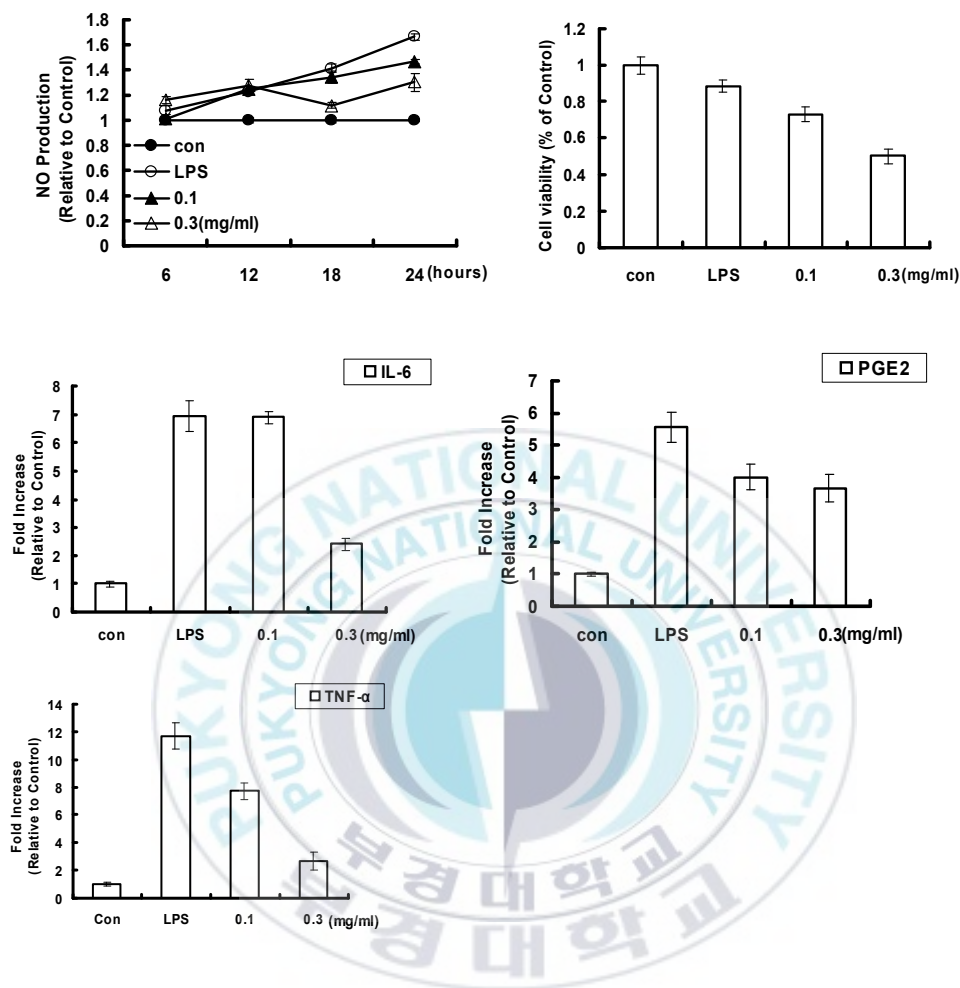


Fig. 23. Effects of crude conchiolin extracted from Blue mussel on NO production and inflammatory mediator production in LPS stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with various concentrations of blue mussel dissolved in EMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1 μ g/ml), and the cells were further incubated for 6–24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the Experimental procedures. Data represent the mean $\pm$ S.D. with eight separate experiments.

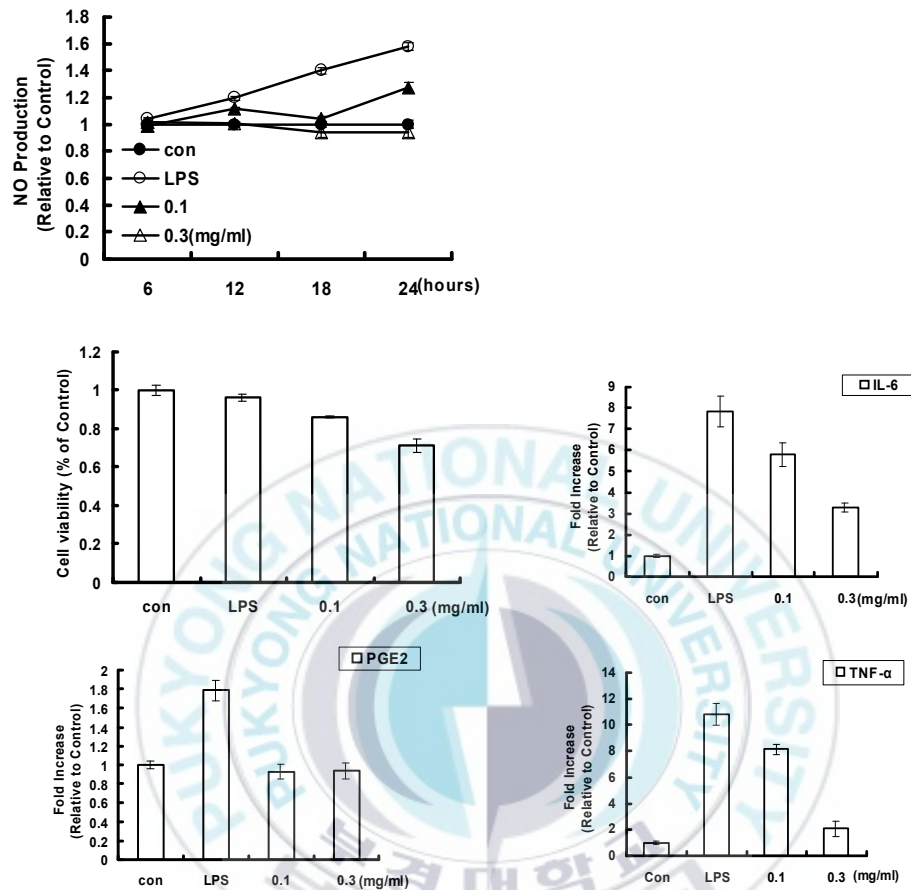


Fig. 24. Effects of crude conchiolin extracted from Pacific oyster on NO production and inflammatory mediator production in LPS stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with various concentrations of Pacific oyster dissolved in EMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1 μ g/ml), and the cells were further incubated for 6-24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the Experimental procedures. Data represent the mean $\pm$ S.D. with eight separate experiments.

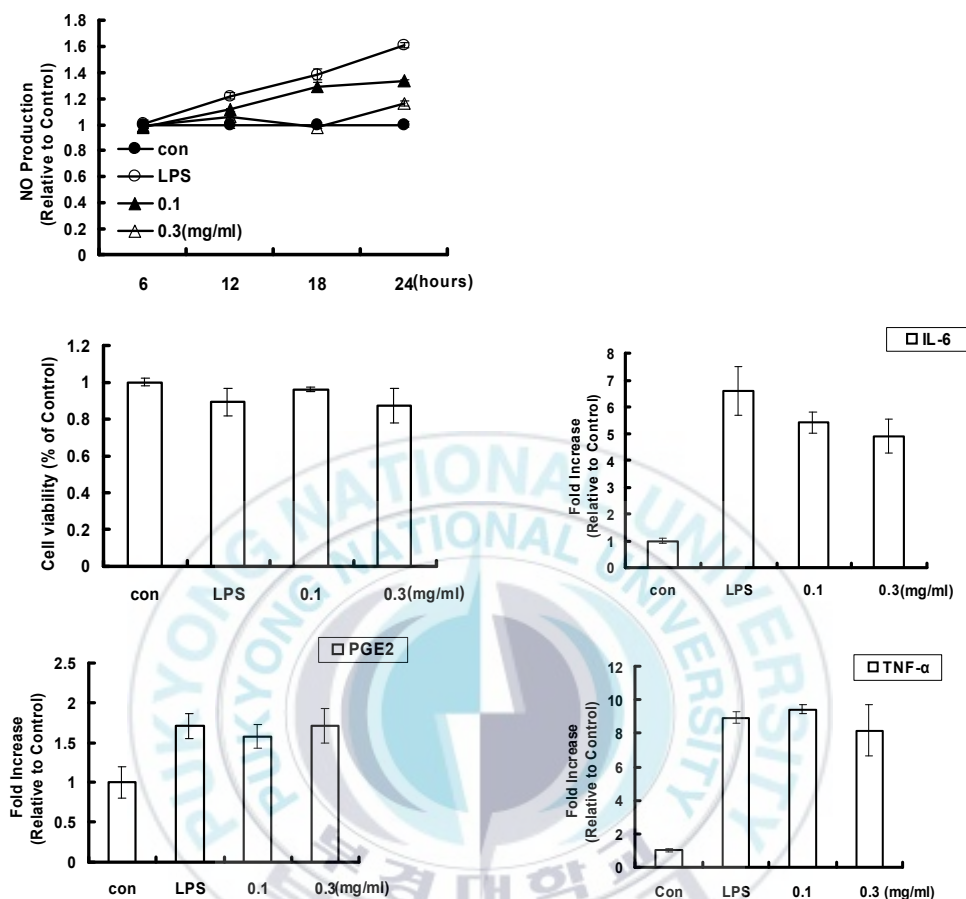


Fig. 25. Effects of crude conchiolin extracted from Surf clam on NO production and inflammatory mediator production in LPS stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with various concentrations of Surf clam dissolved in EMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1 μ g/ml), and the cells were further incubated for 6–24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the Experimental procedures. Data represent the mean $\pm$ S.D. with eight separate experiments.

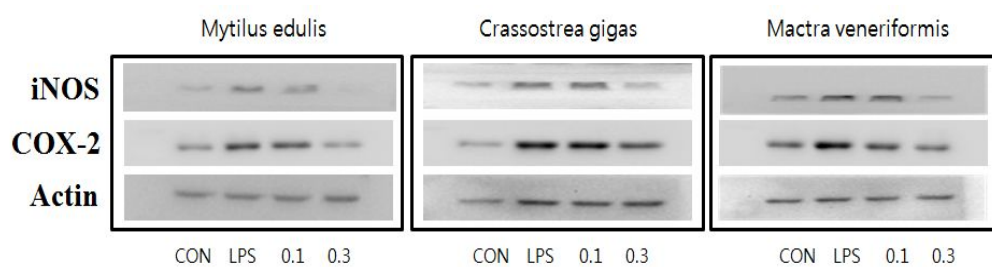


Fig. 26. Effect of crude conchiolin extracted from Blue mussel, Pacific oyster, and Surf clam on the induction of iNOS and COX-2 by LPS. The level of iNOS and COX-2 protein were monitored for 18h after treatment of cells with LPS (1 μ g/ml) with or without shells extract pretreatment (i.e. 1h before LPS).

(2) Rat에서 가공원료 추출물(crude conchiolin)의 독성측정

(가) 체중측정 및 간, 신장의 무게측정

6종류 패각의 가공원료 추출물(crude conchiolin)에의 독성실험을 하기 위해 rat을 실험동물로 사용하였다. 가공원료 추출물(crude conchiolin)을 실험동물에 투여 후 1~14일에 체중을 측정하여 기록하였다. Rat 동물 실험 결과 가공원료 추출물(crude conchiolin)에 의한 이상적인 체중변화는 관찰되지 않았으며(Fig. 27), 간, 신장의 무게 및 체중 당 간, 신장의 무게 역시 유의한 결과는 관찰되지 않았다(Fig. 28, 29). 이는 가공원료 추출물(crude conchiolin)이 간, 신장 및 체중에 부진증을 초래하지 않는다는것을 의미한다.

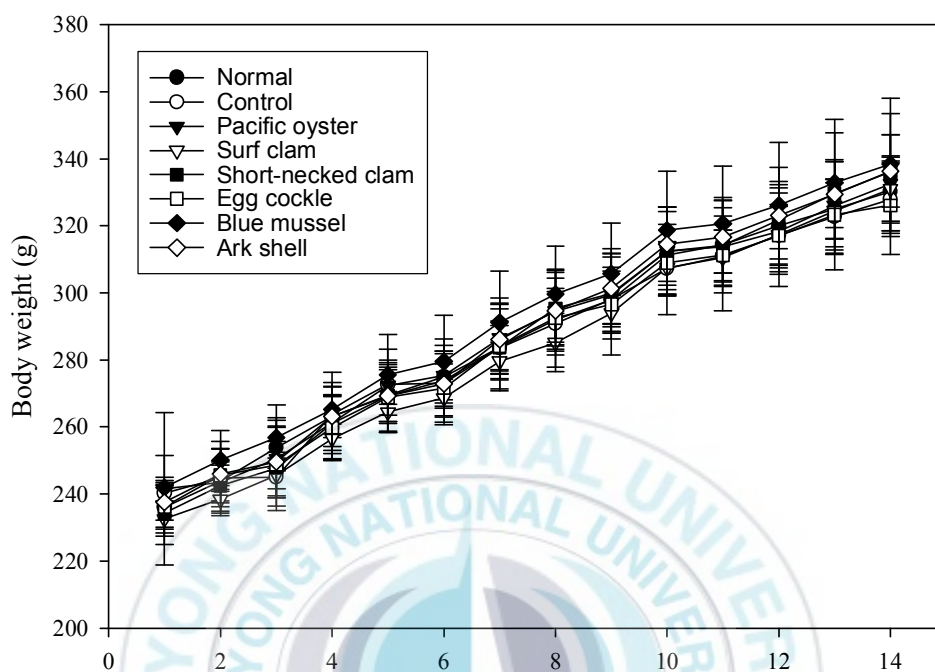


Fig. 27. Changes of body weights in male SD rat after administration of crude conchiolin extracted from Surf clam, Pacific oyster, Short-necked clam, Egg cockle, Blue mussel shell, and Ark shell.

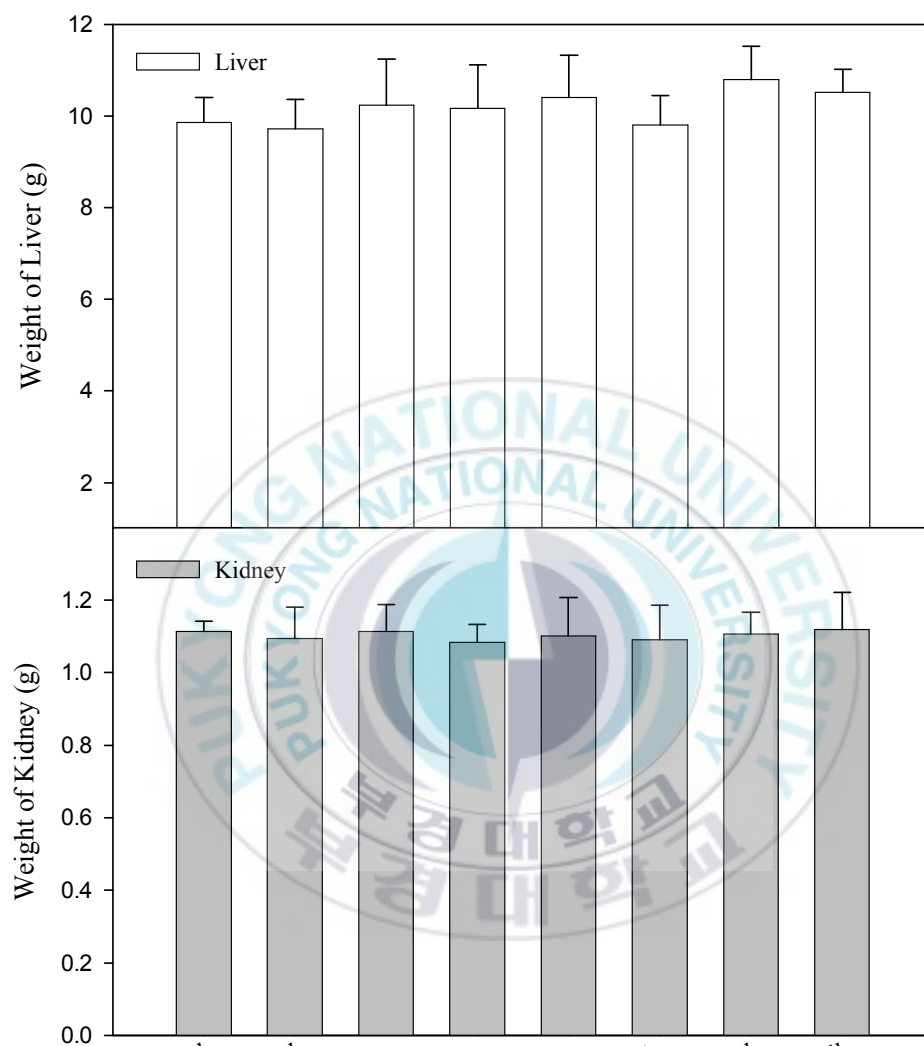


Fig. 28. Changes of liver and kidney weights in male SD rat after administration of crude conchiolin extracted from Pacific oyster, Surf clam, Short-necked clam, Egg cockle, Blue mussel, and Ark shell.

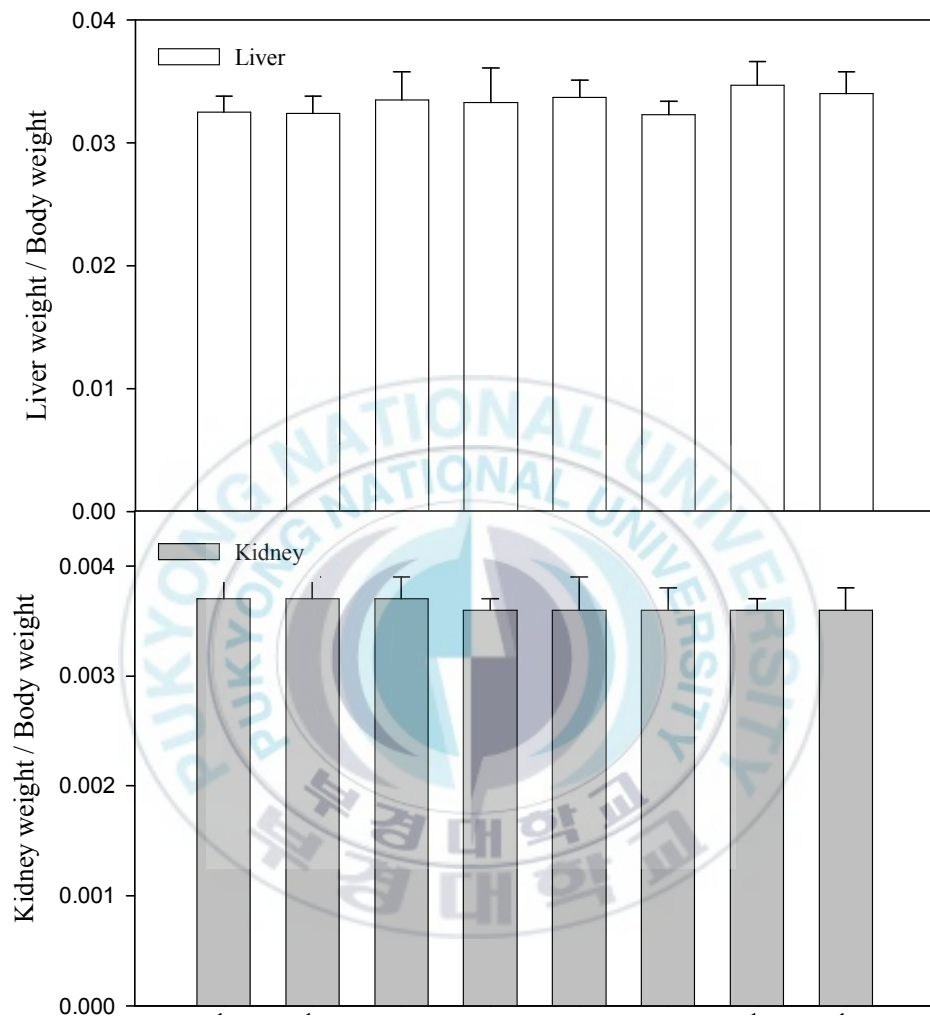


Fig. 29. Changes of liver/body and kidney/body weights in male SD rat after administration of crude conchiolin extracted from Pacific oyster, Surf clam, Short-necked clam, Egg cockle, Blue mussel, and Ark shell.

(나) GOT (Glutamic oxaloacetic transaminase), GPT (Glutamic pyruvic transaminase), LDH (Lactate dehydrogenase) 및 BUN (Blood urea nitrogen) 측정

가공원료 추출물(crude conchiolin)의 간손상과 신장 손상을 실험하기 위해 rat에 투여 후 14일 후에 간손상의 지표인 GOT, GPT 및 LDH와 신장손상의 지표가 될 수 있는 BUN를 측정하였다(Fig. 30).

가공원료 추출물(crude conchiolin)의 투여는 간손상의 지표인 GOT, GPT 및 LDH의 수준을 유의하게 변화시키지 않았으며, 또한 신장손상의 지표가 될 수 있는 BUN에 있어서도 유의한 변화를 유도하지 않았다. 이 결과는 가공원료 추출물(crude conchiolin)이 간, 신장의 손상에 영향을 초래하지 않는다는 것을 의미한다.

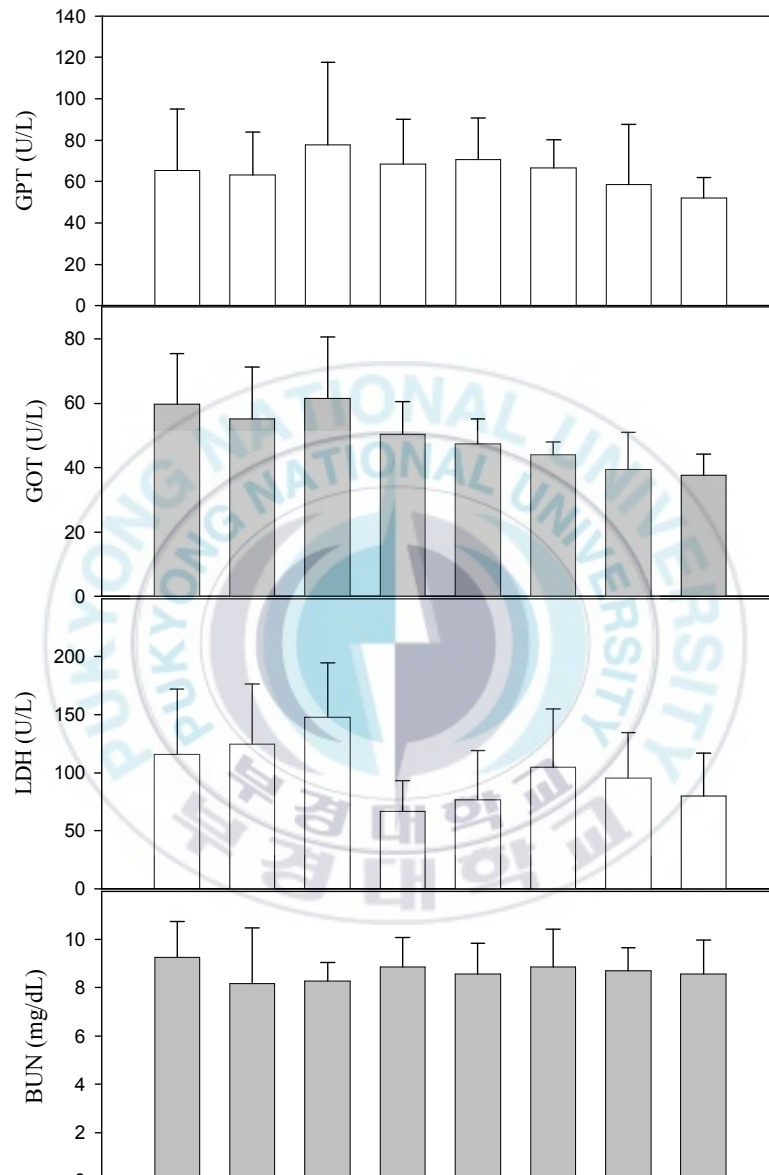


Fig. 30. Effects of crude conchiolin extracted from Pacific oyster, Surf clam, Short-necked clam, Egg cockle, Blue mussel, and Ark shell treated Groups on the blood chemistry.

IV. 결론

나노 및 초미세가공분말의 성분분석과 물리화학적 특성 검토

제조된 나노분말을 이용하여 표면장력 측정, pH에 대한 표면장력의 변화, 계면장력 측정, 유화활성, 유화안정성, 온도 및 열 안정성에 대한 결과를 측정하였고 그 결과들은 일반분말, 초미세분말 및 나노분말에 대한 결과들과 비교분석하였다.

실험 대조군으로 일반적으로 널리 사용되고 있는 Tween 80의 표면장력은 42.3mN/m로 측정 되었으며 실험 내 사용된 6종류의 패각에 대한 일반분말(>250 μ m)과 초미세 분말 (5-30 μ m), 그리고 나노 분말 (<200 nm)에 대한 표면장력의 결과 buffer의 표면장력 72.3 mN/m에 비해 일반분말의 경우 굴 71.6 mN/m, 새조개 71.3mN/m, 동죽 71.9mN/m로 표면장력의 활성능력이 거의 없는 것으로 확인 되었으며, Tween 80과 같은 유화제로서의 기능을 갖는 것으로 해석하기는 힘들며, 분체입도가 작아지면서 물분자 간의 결합력을 방해하여 나타나는 현상으로 사료된다. 그 중 가장 표면 장력 저해능이 우수한 것은 홍합으로 나노 분체의 경우 62.3 mM/m의 표면 장력 저해능을 가지는 것으로 확인 되었다.

2%(w/v)분말을 3종류의 buffer (pH3.0-6.0, 50mM citrate, sodium citrate buffer ; pH 6.0-8.0, 100mM phosphate buffer ; pH 9.0-10.0, 50mM boric acid- NaOH buffer)에 녹인 후 이들 시료 5%(v/v)를 해당 pH별 완충용액에 넣고 표면장력계(TD-1, Lauda, German)를 사용하여 pH 별 표면장력의 변화를 측정하였다. 본 실험에 사용된 시료는 표면장력 활성이 좋은 홍합의 나노분말을 사용하였으며, pH 변화에 따른 표면장력의 변

화를 분석한 결과 pH 5.0에서 62mN/m로 표면장력의 저하능이 가장 우수하여 최적은 pH 5.0임을 확인하였다. 또한 pH 3.0이하에서는 표면장력 저하능이 급격히 떨어지는 것으로 보아 나노 입자의 물에 대한 용해성이 떨어지는 것으로 확인할 수 있고 pH 6-9까지는 비교적 안정적으로 표면장력이 유지되는 것으로 확인되었다.

20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 2%(w/v)의 분말을 녹여서 준비한 후 동일한 buffer 9.5ml에 준비한 시료 0.5ml를 넣고, 5%(v/v) olive oil을 넣고 1분간 강하게 vortex 시킨 후 10분간 정치시켜 계면장력을 측정하였으며, 대조군으로 Tween 80을 50 μ l를 넣고 그 결과를 비교하였다. 본 실험에 사용된 시료는 6종류의 일반 분말, 초미세 분말과 나노 분말을 사용하였으며, 대조군으로 사용된 20mM Tris-HCl(pH 7.0) buffer는 42mN/m, Tween 80 12mN/m 으로 측정 되었으며, 6개 시료 중 가장 표면장력 저하능이 우수한 홍합 나노 분말 시료의 경우 30.1mN/m로 측정되었다. 이것은 앞서 설명한 표면장력과 유사한 결과로 일반분말 보다는 나노 분말로 갈수록 계면 장력의 활성이 높아짐을 알 수 있었다. 결과는 오일과 물에 대한 시료의 반응성(용해도 포함)을 측정하기 위한 결과로 유화제에 비해 활성이 많이 낮음을 알 수 있다.

분말을 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 각각 2% (w/v)씩 넣고 Rosenberg E. 등(1979)의 방법을 응용하여 유화활성도를 측정하였다. 사용된 기질로는 olive oil을 사용하였으며, 유화안정성은 유화활성도 측정법과 동일한 방법으로 실험을 행한 후 10분, 30분 간격으로 620 nm에서 흡광도를 측정하여 변화된 값의 기울기로부터 Kd 값을 산출하였다. 6 종류의 시료에 대한 가공 방법별 (일반, 초미세, 나노) 유화활성도를 측정한 것과 대조구로 사용된 20mM Tris-HCl(pH 7.0) buffer, Tween 20, Tween 60, Tween 80의 유화 활성도는 각각 0.49, 0.865, 2.016, 1.9740의 흡광도를 나

타냈으며, 시료의 경우 control군인 buffer와 비교해서 활성화도가 0.04-0.4 사이에 있기 때문에 유화 활성이 아주 낮은 것으로 분석되었다.

유화 활성을 유지하는 정도를 판단하는 유화 안정성 실험은 kd값이 (-) 값으로 낮아질수록 안정성이 떨어진다는 것을 이용하여 주어진 방법에 의해 실험하고 10분간 정치시켜 흡광도를 측정하고 30분후 재차 흡광도를 측정하여 그 값의 변화를 분석하여 유화안정성을 확인한다. 실험결과, 대조구로 사용된 Tween 60(kd=-0.000129), Tween 80(kd=-0.00022)은 유화 안정성이 아주 우수하였으나 Tween 20(kd=-0.0124)은 Tween 60과 80에 비해 안정성이 매우 떨어졌다. 시료의 경우 buffer(kd=-0.0303)에 비해 유화 안정도는 우수하나 Tween 계열의 유화제와는 비교대상이 될 수 없는 것으로 확인되었다.

20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 분말 2%를 녹여 액상시료를 만든 후 온도 및 열안정성을 측정하였다. 실온(25℃)에서 측정한 유화활성도와 100℃에서 10분간 열처리한 시료의 유화활성도를 비교하였다. 본 실험에 사용된 시료는 6종류의 초미세 분말을 사용하였으며, 실온과 100℃에서 가열 처리한 시료를 이용하여 유화활성을 측정한 결과 유화활성도 변화에는 큰 차이가 없는 것으로 확인되어 패각류 분말에 대한 열 안정성은 우수한 것으로 확인하였다.

나노 및 효소분해물의 생리활성과 기능성 검증

패각(굴, 바지락, 피조개, 동죽, 진주담치) 분말로부터 acetic acid로 탈석회화 과정을 거쳐 생성된 crude conchiolin의 활성 단백질을 추출하기 위해 기존에 불용성 단백질 추출에 널리 사용되어왔던 urea를 이용하여 추출하였다. urea를 이용하여 추출한 결과 투석 후에도 urea의 100% 제거가 어려웠으며 제거되지 않은 urea의 영향으로 단백질의 변성으로 인한 생리

활성 측정에 문제가 있었다. 또한 많은 양의 당추출의 문제가 있었다. 따라서 crude conchiolin으로부터 당추출을 최소화 시키면서 단백질의 변성을 일으키지 않는 추출 조건을 찾기 위해 대표적인 패각, 굴을 사용하여 7가지 buffer를 선정하여 단백질과 당추출을 비교 분석하였다. 기존방법에 따라 8M urea(pH8.5)로 conchiolin을 추출 했을 때 $96.92\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 단백질이 추출되었고, 동일 조건에서 7가지 buffer를 사용해 추출하였을 때 0.1M citrate buffer(pH6.0)와 0.2M sodium phosphate buffer(pH8.0)에서 $84.04\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 $69.62\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 단백질량이 가장 높게 측정되었다. 0.2M Sodium phosphate buffer(pH6.0)추출 시 단백질과 당의 추출 비율이 65.87 : 1로 불순물의 추출을 최소화 하는 데는 이상적이나 단백질 추출량이 $57.88\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 기존 추출량의 60%에 미치지 못해 단백질 수득률이 낮았다. 반면 0.1M Citrate buffer(pH6.0)를 이용하여 추출 했을 때 단백질 양에 대비하여 당의 비율은 8.83 : 1(proteins : sugars)로 낮게 측정되었고, 단백질 추출량은 기존 urea 추출의 85%이상으로 불순물을 최소화하면서 단백질 추출을 최대화하기 위한 용액으로 효과적이었다. citrate(Citric acid · sodium citrate)는 식품첨가물로 사용되는 물질로 차후 제품화하는데에도 이상적이므로 본 연구에서는 crude conchiolin으로부터 활성 단백질을 추출하기 위한 최적 조건으로 0.1M citrate buffer(pH6.0)를 선정하였다.

패각 분말로부터 6.5M acetic acid로 탈석회화 과정을 거쳐 생성된 crude conchiolin으로부터 활성 단백질을 추출하기 위해 기존에 불용성 단백질 추출에 사용되어왔던 urea 추출과 본 연구에서 최적 조건으로 선정한 citrate buffer 두 가지 추출용매를 사용하여 추출 단백질과 당의 수득률을 비교 · 분석하였다. 6종(굴, 바지락, 피조개, 동죽, 진주담치, 새조개)의 crude conchiolin powder에 8M urea(pH8.5)와 0.1M citrate buffer(pH6.0)를 사용하여 bead를 첨가한 뒤 37℃에서 2시간 동안 동일조건으로 반응시

키고, 그 상층액의 단백질 농도와 당 농도를 측정하였다. 추출물의 단백질 농도 측정결과 citrate buffer를 이용하여 추출한 바지락, 진주담치, 새조개는 urea를 이용하여 추출된 단백질의 농도보다 높았지만, 피조개의 경우 citrate buffer를 이용한 추출보다 urea를 이용하여 추출하였을 때 단백질 농도가 2배 정도 높게 측정되었다. 동족의 경우 urea와 citrate buffer를 이용한 추출물에서 단백질 농도가 유사하게 측정되었다. 두 가지 추출용매를 사용하여 추출된 당의 농도를 비교한 결과 진주담치를 제외한 5가지 패각의 crude conchiolin에서 citrate buffer를 이용하여 추출했을 경우 urea 추출물에 비해 당의 농도가 최대 20배 정도 낮게 측정되었다.

따라서 패각으로부터 활성 단백질을 추출하기 위해 citrate buffer 추출법을 사용하여 실험결과 urea 추출법 보다 단백질 수득률이 증가하였고, 당의 수득률 또한 낮았기 때문에 활성 단백질을 추출하는데 citrate buffer 추출법이 적합한 buffer라고 생각되어 진다.

가공원료 추출물의 생리활성 비교분석

기존의 8M Urea에 의해 추출된 conchiolin의 경우, 정제 과정에서 당을 포함한 불순물을 상당량 함유하고 있어서 prep LC column 이용 시 분리가 용이하지 않았으며, 그 수득률 또한 낮았다. 따라서 crude conchiolin으로부터 불순물은 최소화 하면서 최대의 단백질만을 추출할 수 있는 8M Urea 대체 buffer인, citrate buffer를 이용하여 추출된 가공원료 추출물(crude conchiolin)의 생리활성을 비교 분석하였다.

본 연구에서는 8M Urea 추출 conchiolin이 갖았던 COX-2 inhibition activity는 0.1M citrate buffer 추출시 어떠한 활성을 갖는지 확인하기 위하여 6 패각류의 crude conchiolin을 8M Urea와 0.1M citrate buffer로 2시간 추출 후 투석과정을 거쳐 conchiolin의 항염 효능을 평가하였다. 8M

Urea와 0.1M citrate buffer로 용해된 각 패각류의 conchiolin의 단백질 농도가 10ug/ml일 때 유발되는 COX-2 저해율 비교 시, 5가지 패각류(굴, 바지락, 동죽, 진주담치 및 새조개)에서 0.1M citrate buffer를 사용하여 추출된 conchiolin이 8M Urea를 사용하여 추출된 conchiolin 보다 COX-2 저해율이 높음을 확인할 수 있었다. 굴의 경우, 8M Urea를 사용하여 추출된 conchiolin의 COX-2 저해율은 69.2%이나, 0.1M citrate buffer로 추출된 conchiolin의 경우 82.9%로 항염 효과가 높고, 진주담치의 경우에도, 8M Urea 사용 시 15.2%, 0.1M citrate buffer 사용시 57.9%로 약 3-4배 항염 효과가 높이 평가되었다. 반면, 5가지 패각류와는 달리, 피조개에서는 8M Urea를 사용하여 추출된 conchiolin이 0.1M citrate buffer 사용 추출시 보다 COX-2 저해율이 높았으나, 그 저해율이 각각 62.2% (8M Urea로 추출된 conchiolin)와 48.8% (0.1M citrate buffer로 추출된 conchiolin)로 그 차이가 크지 않음을 알 수 있다.

이러한 데이터는 0.1M citrate buffer를 이용하여 용해된 conchiolin이 기존의 8M Urea를 사용시 용해된 conchiolin과 비교 시, 항염 효과가 동일하거나 우수할 뿐만 아니라, 정제 과정 중 문제가 되었던 당을 상당 부분 제거함으로써 앞으로 항염 효능을 지닌 고순도 conchiolin 생산 제조 가능성을 높일 것으로 사료된다.

Urea 추출법을 이용하여 패각으로부터 추출된 활성 단백질 추출물과, urea의 잔존과 가열 추출에 의한 과량의 불순물 추출이 문제가 되어 최적 추출조건으로 확립한 citrate buffer 추출법을 이용하여 추출된 활성단백질 추출물과의 항산화 활성을 비교하기 위해 추출물의 DPPH에 대한 전자공여효과로 시료의 환원력을 측정하는 방법에 따라 DPPH radical 제거 효과를 측정하였다. 추출 용매로 사용한 0.1M citrate buffer(pH6.0)와 8M urea(pH8.5)에서 추출된 conchiolin의 free radical 소거활성은

19.58%(±11.21)과 27.99%(±5.26)로 오차범위내에서 활성이 유사함을 확인할 수 있었다. 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid와 caffeic acid는 현재 항산화 물질로 사용되고 있는 정제된 물질로 80%이상의 우수한 활성을 나타내었다. 따라서 굴의 crude conchiolin으로부터 추출된 단백질의 항산화 활성이 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid와 caffeic acid에 비해서는 다소 미약하였으나, 기존에 사용된 urea 추출법과 새롭게 확립한 citrate buffer 추출법에 의해 추출된 단백질간의 DPPH에 대한 전자공여효과가 유사함에 따라 연구 진행에 많은 간섭을 일으키는 urea를 이용한 가열추출을 하지 않아도 citrate buffer 추출법을 사용하여 본 연구에서 찾고자하는 활성 단백질을 추출할 수 있을 것이다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 실험을 수행하였다. 본 연구에서는 urea 추출에 의한 추출물과 citrate buffer 추출물의 conchiolin 단백질을 비교하기 위해 SDS-PAGE를 이용하여 실험하였다. 6종류의 패각(굴, 바지락, 피조개, 동죽, 진주담치, 새조개)의 crude conchiolin에서 urea와 citrate buffer를 이용하여 추출된 conchiolin의 단백질을 확인한 결과 citrate buffer를 이용하여 2시간, 24시간 추출 했을 때 6종류의 패각 모두에서 약 37 kDa의 단백질을 확인하였다. 또한 약 75kDa~15kDa 사이에 여러 개의 단백질 밴드를 확인하였다. Urea를 이용하여 2시간 추출 했을 때 6종류의 패각 모두에서 citrate buffer 추출했을때와 마찬가지로 약 37 kDa의 단백질을 확인하였다. 또한 약 75kDa~15kDa 사이에 여러 개의 단백질 밴드를 확인하였다. 24시간 추출 했을 때 6종류의 패각에서 약 75kDa~15kDa 사이에 2-3개의 단백질 밴드를 확인하였다. Citrate buffer를 이용하여 추출된 conchiolin의 단백질은 단백질 밴드가 깨끗하게 염색이 된 반면, urea를 이용하여 추출된 conchiolin의 단백질은 전제적으로 끌림이 나타났다. urea를 이용하여 추출한 실험결과 urea는 투석 후에도 100%

제거가 되지 않고 남아 있어 SDS-PAGE 실험을 할 때 끌림 현상이 나타나는 원인이 된다. 기존에 사용된 urea 추출법과 새롭게 확립한 citrate buffer 추출법에 의해 추출된 conchiolin 단백질의 패턴은 비슷하였으나 urea를 이용한 추출법은 urea의 제거가 완벽하게 이루어 지지 않아 새로운 추출법인 citrate buffer를 이용하여 활성 단백질을 추출하여야 한다.

6종류의 패각분말 (굴, 진주담치, 바지락, 피조개, 동죽 및 새조개)로부터 추출한 conchiolin을 사용하여 conchiolin의 항염 효능 평가시, 각 패각류의 용해된 conchiolin의 단백질 농도가 0.01 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 증가됨에 따라 유발되는 COX-1과 COX-2의 저해율이 증가하였다. 이에 다음 연구 단계로 항염 활성을 갖는 물질을 분리, 정제하고자 sephadex G-100 전처리 과정을 거쳐 prep LC를 이용하여 부분 정제를 실시하였다. 따라서 본 연구에서는 5종류의 패각분말 (굴, 진주담치, 바지락, 피조개 및 동죽)로부터 추출한 conchiolin을 prep LC를 이용하여 부분 정제하고, 그 fraction의 염증 억제 효능을 평가하였다. 정제된 분획물(단백질 농도별 : 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 의하여 유발되는 COX-1과 COX-2의 저해율을 비교 평가하였고, 양성 대조 약물로는 비 스테로이드계의 항염증제인 indomethacin을 사용하였다. Cayman chemical company에서 Johnson 등(1995)의 논문을 기준으로 하여 만든 kit로 측정한 indomethacin의 IC₅₀은 ovine COX-1 과 COX-2에 있어서 각각 0.1 과 6 μM 이었다. 본 연구에 있어서 양성 대조 약물인 indomethacin에 대한 측정치는 COX-1에 대해서 0.15 μM 의 농도에서 58.4%, 0.1 μM 의 농도에서 46.0%, 0.05 μM 의 농도에서 36.7%의 저해율을 나타내었고, COX-2에 대해서는 18 μM 의 농도에서 69.7%, 6 μM 의 농도에서 49.0%, 2 μM 의 농도에서 34.3%의 저해율을 나타내었다. 이와 같은 결과는 Johnson 등(1995)이 보고한 indomethacin의 IC₅₀ 값이 COX-1 과 COX-2에 있어서 각각 0.1 μM 과 6 μM 이었다는 결과와 일치하는 것으로 확인되

었다.

각 패각류의 정제된 분획물의 단백질 농도가 0.01 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 증가됨에 따라 유발되는 COX-1 과 COX-2 의 저해율이 증가하였다. 이러한 결과는 Ibuprofen이나 Diclofenac 및 Naproxen 같은 모든 기존 소염 진통제가 COX-1도 억제하지만 COX-2도 억제하는과 동일한 현상을 나타냈으며, 굴의 경우 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 84.4%의 COX-1 저해율을 나타내었으며 94.3%의 COX-2 저해율을 나타내었다. 이러한 데이터는 COX-1 효소를 억제시킴으로 비록 위 점막 보호물질의 생산을 차단하지만 혈전 예방 작용은 유지되는 것이고, COX-2 효소를 억제시킴으로 염증을 유발하는 물질인 prostaglandin E2의 생성을 억제하여 염증을 억제시키는 것이다. 또한 COX-1과 COX-2의 경우 단백질농도가 1 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 IC50이 설정되었다. 이 결과는 crude conchiolin의 COX 저해율과 비교 시, 동일한 경향성을 나타내는 데이터이다. 또한 IC50 역시 동일하게 설정되었다. 이는 단백질량으로 비교한 데이터로서, 정제된 분획물이기 때문에 패각류의 raw material로 따져 생각해 본다면, 같은 양의 raw material 비교 시 crude conchiolin의 COX 저해율 보다 정제된 분획물이 훨씬 높은 저해율을 갖을 것으로 사료된다. 따라서 COX-2도 억제하지만 COX-1도 억제하여, 위점막은 상할 수도 있지만 혈전 예방 작용은 유지되는 과거의 소염진통제 개발이 심각한 부작용을 낳지 않을 것으로 사료된다. 이에 본 연구 결과들을 근간으로 하여 천연물인 패각류에서 유래하는 conchiolin을 재료로 지금의 정제 과정보다 더 고순도 분리 정제에 성공한다면 위장장애나 출혈의 부작용이 적은 천연 소염 진통제를 개발이 가능하리라 사료된다.

패각으로부터 활성 단백질을 추출하여 항산화 활성을 측정함으로써 효능을 규명하고, 간단한 방법으로 활성측정이 용이한 점을 이용하여 정제과정 중 활성성분 분리를 위한 지표로 삼고자 본 실험을 진행하였다. 5종의 패각

crude conchiolin으로부터 urea 가열 추출법에 의해 추출된 conchiolin을 정제하기 위하여 shephadex G-100을 이용하여 당과 불순물을 전처리하였다. 전처리된 시료는 prep-LC를 이용하여 정제하여 정제된 단백질에 대한 항산화 활성을 측정하였다.

굴의 경우 0.5mg/ml에서 free radical제거 활성이 35.12%로 5종의 패각보다 높게 측정되었으며, blue mussel과 ark shell은 0.5mg/ml 동일 농도에서 25.43%, 24.21%로 유사한 활성이 측정되었다. Short necked clam의 경우 0.20%로 항산화 활성이 가장 미약하였다. 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid와 caffeic acid는 80%이상의 우수한 활성을 나타내었다. 하지만 이들 물질은 현재 항산화제로 생체 안, 밖에서 항산화 효과가 우수하다고 알려진 물질로 순수 정제되지 않은 본 시료와 동일 농도에서 절대치로 활성을 비교할 수는 없으며, 각 패각의 항산화 활성을 비교하는 상대값으로 적용되어야 할 것이다.

초미세 분말로부터 정제된 정제물의 미백활성을 측정하기 위해 식약청에서 고시한 '기능성화장품의 유효성 평가를 위한 가이드라인에 따라 in vitro tyrosinase inhibition assay를 수행하였다. Urea를 통하여 추출된 crude conchiolin의 미백활성은 굴, 바지락, 피조개, 진주담치 및 새조개에서 10-20% 정도의 활성밖에 없었고 동죽에서는 5% 미만의 활성을 나타냈다. 따라서 crude conchiolin을 Sephadex G-100과 prep-LC를 이용하여 분리, 정제를 한 후 in vitro tyrosinase inhibition assay를 통한 미백실험을 수행하였다. 각 패각류에서 정제된 분획물 170ug/ml의 단백질 농도에서 tyrosinase 저해 활성 측정 결과 굴에서는 7.9%, 바지락에서는 5.56%, 피조개에서는 12.96%, 동죽에서는 5.1% 및 진주담치에서는 4.1% 저해되었다. 양성대조군으로 측정한 Arbutin의 경우 170ug/ml의 농도에서 86.7% 저해되었다. 5종의 패각 crude conchiolin으로부터 urea 가열 추출법에 의해 추출

된 conchiolin을 정제하기 위하여 shephadex G-100을 이용하여 당과 불순물을 전처리하였다. 전처리 된 시료는 prep-LC를 이용하여 정제하여, 정제 전 시료와 정제된 단백질에 대한 유기물의 구성성분을 TLC를 사용하여 비교·분석하였다. Silica gel glass plate에 시료를 $10\mu\text{l}$ 점적하여 전개 후 TLC판을 건조하고, 2% ninhydrin spray로 분무하여 TLC판에 적신 후 hotplate에서 가열 반응을 시켜 spot의 색을 확인 하였다. 정제 전 conchiolin 시료의 발색을 확인한 결과 5종의 패각 conchiolin 모두에서 $R_f=0.66, 0.61, 0.49, 0.39, 0$ 5개의 proteins spot이 확인되었다. 이들 물질로 prep-LC를 사용하여 분리한 시료의 경우 $R_f=0.61$ spot이 동시에 확인 되었으며, Ark shell 정제 시료에서는 $R_f=0.66$ spot이 함께 발색되었다. 표준물질로 사용된 BSA($R_f=0.0$)과 glycine($R_f=0.36$)의 경우 ninhydrin 반응 시 핑크색, 짙은 오렌지색이 나타났고, 5종류에서 동시에 나타난 spot 경우 핑크색의 spot 주변에 노란색의 테두리가 형성됨을 알 수 있다. Ninhydrin의 경우 α -아미노산, 펩티드 및 단백질들과 100°C 에서 반응하여 자주색 또는 붉은 자주색의 착색물질을 만든다. 착색물질의 색은 아미노산에 따라 다른데 프롤린과 하이드록시프롤린의 경우 황색의 착색물질을 만든다. 따라서 5종의 패각 추출 conchiolin에는 여러 아미노산과 단백질이 포함되어있으며 prep-LC로 정제 된 시료의 경우 황색을 띄는 spot이 주를 이루었으므로 프롤린 또는 하이드록시프롤린으로 구성 된 단백질일 것으로 사료된다.

당분석을 위하여 단백질 분석과 동결한 전개용매를 사용하여 건조 후 TLC판을 전개하였으며 전개 후 TLC판을 건조하고 발색반응을 측정하였다. 발색을 위하여 먼저 A solution (20% v/v $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{EtOH}$)에 TLC판을 dipping 하여 건조시키고, B solution (0.2% α -naphtholresorcinol/ EtOH)을 spray하여 hotplate로 가열 건조 한 후 발색을 관찰하였다. Glucose의 경우 $R_f=0.55$ 에서 청색 발색을 하였으며, 패각 conchiolin 시료의 경우 $R_f=0.66$ 에서 노란빛을 띄었고, $R_f=0.43, 0.0$ 에서 청색 spot이 확인되었다. Prep-LC 정제된 시료의 경우

Rf=0.65에서 노란 색 spot이 나타났다. Naphtolresorcinol 시약은 알도오스, 케토 오스, 요산, 디옥시당, 글리코사이드, 올리고당 확인 시 사용되며, 알도오스는 파랑 또는 보라색 발색을 나타내고 케토오스는 분홍 또는 붉은 색, 요산은 푸른색 점으로 나타난다. 따라서 청색이 나타난 패각 conchiolin에 일부 함유된 당류는 고분자 다당이 포함되어있을 것으로 추정되어진다. 정제 전·후에 나타난 Rf=0.65의 노란색 spot은 그 발색 위치가 proteins 발색위치와 동일한 점으로 미루어보아 당단백질일 것으로 사료된다.

초미세 분말로부터 정제된 정제물의 단백질을 확인하기 위해 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 실험을 수행하였다. 각 패각류에서 정제된 분획물 15 μ g을 loading한 다음 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 실험결과 굴과 피조개, 동죽, 진주담치는 10KDa보다 작은 크기의 3개의 protein band를 확인하였다. 바지락은 2개의 protein band만 확인되었다. Conchiolin 단백질은 20-60KDa크기의 단백질로 알려져 있으나 본 실험 결과에서는 10KDa 미만의 단백질을 확인하였다. 처음 crude conchiolin에서 추출시 사용했던 Urea는 강력한 detergent로 단백질을 변성시키는 역할을 한다. 20-60KDa의 conchiolin단백질이 본 실험에서 10KDa 미만에서 확인이 되었고 또한 여러 개(2-3)로 확인되었다. Urea로 인한 단백질 변성으로 인한 conchiolin의 subunit이 나타낸 것으로 생각되어지며 2-3개의 subunit을 합치면 기존에 알려진 크기인 약 20-30KDa 단백질로 확인이 될 거라 생각되어진다.

개발된 한방소재를 이용한 임상연구 및 안정성 연구

Raw 264.7 cell에서 가공원료 추출물(Crude conchiolin)의 NO 생성억제 정도를 관찰하기 위하여 진주담치, 굴, 동죽의 가공원료 추출물(Crude conchiolin)를 0.1mg/ml과 0.3mg/ml로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을

측정하였다. LPS에 의해 증가된 NO 생성량은 진주담치, 굴, 동죽을 전처리 했을 때 NO의 생성을 억제하였다. 또한 진주담치와 굴은 염증매개인자인, IL-6, TNF-alpha, PGE2를 농도 의존적으로 억제하였다. 그러나 동죽은 IL-6, TNF-alpha, PGE2의 염증매개물질의 억제에는 유의한 결과를 나타내지 않았다. 일반적으로 COX-2의 감소는 PGE2의 감소를 유도하지만, 동죽에서는 어떠한 이유로 IL-6, TNF-alpha, PGE2의 염증매개인자를 억제하지 못하는 지는 전사인자 및 COX-2의 활성 등을 중심으로 좀 더 깊은 연구가 필요할 것으로 사료 된다.

단백질 발현량을 측정할 수 있는 immunoblot analysis 실험결과 LPS에 의해 증가된 iNOS와 COX-2는 가공원료 추출물(Crude conchiolin)에 의해 발현량이 감소하는 것으로 나타났다.

6종류 패각의 가공원료 추출물(crude conchiolin)에의 독성실험을 하기 위해 rat을 실험동물로 사용하였다. 가공원료 추출물을 실험동물에 투여 후 1~14일에 체중을 측정하여 기록하였다. 동물 실험 결과 가공원료 추출물에 의한 이상적인 체중변화는 관찰되지 않았으며, 간, 신장의 무게 및 체중당 간, 신장의 무게 역시 유의한 결과는 관찰되지 않았다. 이는 가공원료 추출물이 간, 신장 및 체중에 부전증을 초래하지 않는다는 것을 의미한다.

가공원료 추출물의 투여는 간손상의 지표인 GOT, GPT 및 LDH의 수준을 유의하게 변화시키지 않았으며, 또한 신장손상의 지표가 될 수 있는 BUN에 있어서도 유의한 변화를 유도하지 않았다. 이 결과는 가공원료 추출물이 간, 신장의 손상에 영향을 초래하지 않는다는 것을 의미한다.

국문 요약

한약 처방에서 청열해독과 위, 장, 간, 폐, 결막, 피부 농창 치료 등에 사용되고 있는 패각을 고효율 정제 공정에 의하여 가공처리 하여 그 생리활성에 대한 연구를 수행하였다.

패각을 30 μ m 이하로 초미세 분쇄한 후 100 nm 이하까지 나노분말을 제조하였으며, 이에 대한 표면장력, pH에 대한 표면장력 변화, 계면장력 측정, HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) value, 유화활성 및 유화안정성, 온도 및 열 안정성 등과 같은 물성에 대한 실험을 수행하였다.

초미세 분쇄된 패각 분말에 펩티드 분해효소를 이용하여 효소가수 분해물을 제조하였으며, 이에 대한 생리활성과 성분을 분석한 결과 정제 분획물은 항염증 활성을 나타내었고 항산화 활성과 미백효과는 미약하게 나타났다.

SDS-PAGE 실험결과 2-3개의 단백질 밴드를 확인하였고, TLC 분석을 통한 단백질 발색과 당 발색 실험 결과 정제 분획물의 당단백질을 확인하였다.

전임상 동물실험은 raw cell에서 conchiolin 추출물의 세포 독성을 측정한 결과 진주담치에서는 독성을 나타냈지만 굴과 동족에서는 독성을 나타내지 않았다.

콘키올린 추출물의 항염증관련 실험결과 LPS에 의한 증가된 NO, IL-6 및 TNF- α 생성양과 발현양이 콘키올린 추출물에 의해 50% 정도 저해되었다.

Conchiolin 추출물의 랫드 동물 실험 결과 체중의 변화는 없었으며, conchiolin 추출물의 간손상(GOT, GPT, LDH 수치)과 신장손상(BUN 수치)을 측정한 결과 간과 신장독성은 나타내지 않았다.

참고문헌

- Aruoma, O.I., 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and chemical Toxicology* 62 : 671-683.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radicals. *Nature* 181 : 1199-2000.
- Bombardier, C., 2002. An evidence-based evaluation of the gastrointestinal safety of coxibs. *The American Journal of Cardiology* 89 : 3D-9D.
- Dale, M.M., and Foreman, J.C., 1989. Introduction to the immunology and pathology of host defense mechanism & the neutrophil leucocyte. *Textbook of Immunopharmacology*. 1-18, 37-55.
- Dawson, W. and Willoughby, D.A., 1985. Inflammation mechanism and mediator. *Nonsteroidal antiinflammatory drugs of therapeutics*. 77-109.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28 : 350-356.
- Flattery, M.P., Hylton Gravatt, L.A., 2005. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *Progress in Cardiovascular Nursing*, 20 : 123-125.
- Gao, I., Igarashi, K., & NuKina, M., 2000. Three new phenylethanoid glycosides from *Caryopteris incana* and their antioxidative activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 48 : 1075-1078.

- Johnson, J.L., Wimsatt, J., Buckel, S.D., Dyer, R.D. and Maddipati, K.R., 1995. Purification and characterization of prostaglandin H synthase-2 from sheep placental cotyledons, *Arch. Biochem. Biophys.* 324 : 26-34.
- Kortz, F., Schiele, T.M., Klauss, V., Sohn, H.Y., 2005. Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction. *Journal of Vascular Research* 42 : 312-324.
- Laurent B., Maria J. S., Frederic M., Christian M., Evelyne L. M. G., 2001. Soluble proteins of the nacre of the giant oyster *Pinctada maxima* and of the abalone *Haliotis tuberculata*: extraction and partial analysis of nacre proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 128 : 389-400.
- Linton, M.F., Fazio, S., 2004. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Current Opinion in Pharmacology* 4: 116-123.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*. 193 : 265-275.
- Madavi, D.L., & Salunkhe, D.K., 1995. Toxicological aspects of food antioxidant. *Food antioxidants*, New York: Marcel Dekker, 267.
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hause, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., Isakson, P., 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91 : 12013-12017.
- Vane, J. and Botting, R. 1987. Inflammation and the mechanism of action of antiinflammatory drugs. *FASEB. J.* 1 : 89-96.

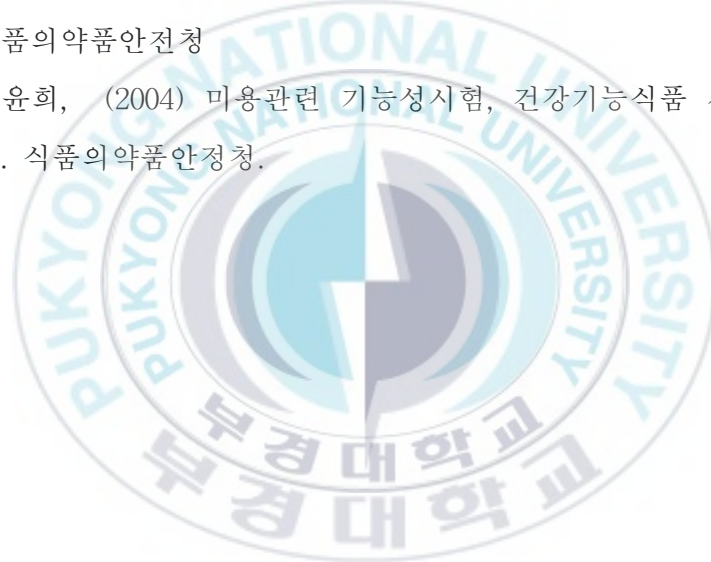
Virador, V.M., Kobayashi, N., Matsunaga, J. and Hearing, V.J., 1999. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. *Analytical Biochemistry*, 270 : 207-219.

고성권, 이충렬, 이학성, 김현, 백구현, 토쿠오카 키요시, 정성현, 종대황.
(2003) 스틸벤 유도체의 cyclooxygenase 저해작용. *생약학회지* 34 : 25-27

대한병리학회 대구 · 경북 지부학회.(2000) 간추린 병리학. 서울 : 정문각.
식품의약품안전청(2003). 기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인.

식품의약품안전청

정진호, 조윤희, (2004) 미용관련 기능성시험, 건강기능식품 시험법 가이드. 식품의약품안전청.



감사의 글

박사 수료한지 10여 년이 지난 후 논문을 쓰게끔 지도해 주신 김중균 교수님께 진심으로 감사 말씀을 드립니다. 또한 바쁘신 중에도 부족한 논문을 정성껏 다듬어 주신 홍용기 교수님, 공인수 교수님, 남수완 교수님과 이건 박사님께 깊은 감사 말씀을 드립니다.

논문이 작성될 수 있도록 배려해 주신 (주)나비네트웍스 박기태 회장과 한의생명의과학연구소 김학주 박사님, 김봉조 박사님, 이철원 박사님, 오수진 박사, 설순우 님, 박은경 님, 금은주 님과 이민아 님께도 감사드립니다.

많은 깨우침을 주신 유주현 박사님과, 믿음으로 후원해 주신 코바이오텍(주) 류대환 사장님께도 감사드립니다.

어려움과 즐거움을 함께 나누는 아내 수란에게 고마움을 전하며, 아들 호영이와 도현이도 지금처럼 나를 배려하고 밝은 모습으로 자랐으면 합니다. 가장 든든한 후원자인 형님께 감사드리며, 생각하면 그립고 사랑한다는 말 한마디 못한 부모님 영전에 이 논문을 바칩니다.