

최 종
연구보고서

달걀로부터 골성장 촉진인자의 분리 및
기능성 식품첨가물 생산기술 개발

The Development of Functional Food Additive
for Promoting Bone Growth derived from Egg

달걀로부터 골다공증 골질량 개선 미량소재의
실용화

Materialization of bone mass improvement component
for osteoporosis from egg

달걀로부터 장골성장 촉진 미량소재의 실용화

Materialization of longitudinal bone growth promoting
component from egg

한서대학교

(세명대학교, (주) 두산)

농 립 부

최 종 보 고 서

2004년도 농림기술개발사업에 의하여 완료된 달걀로부터 골성장 촉진인자의 분리 및 기능성식품첨가물 생산기술개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

3. 연구결과 활용계획서 1부

4. 자체평가 의견서 1부

2006. 5. 24

주관연구기관 : 한 서 대 학 교

총괄연구책임자 : 김 혜 경 (인)

주관연구기관장 : 한서대학교 산학협력단장

농림부장관 귀하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “달걀로부터 골성장 촉진인자의 분리 및 기능성식품첨가물 생산기술개발” 과제 (세부과제 “달걀로부터 골다공증 골질량개선 미량소재의 실용화, 달걀로부터 장골 성장촉진 미량소재의 실용화”) 의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 3월 일

주관연구기관명 : 한서대학교

총괄연구책임자 : 김혜경

세부연구책임자 : 김혜경

세부연구책임자 : 임강현

연 구 원 : 정연욱

연 구 원 : 김나리

연 구 원 : 김윤정

연 구 원 : 김명규

연 구 원 : 김선아

연 구 원 : 김란숙

연 구 원 : 이세나

연 구 원 : 모충정

연 구 원 : 조상우

연 구 원 : 임대석

연 구 원 : 이동윤

요 약 문

I. 제 목

달걀로부터 골성장 촉진인자의 분리 및 기능성식품첨가물 생산기술개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 경제 성장에 따른 생활수준의 향상과 영양 개선, 유년기 생활환경의 개선 및 생활습관의 합리화 등의 요인에 의해 소아의 평균 신장이 점차 증가되고 있고, 또한 사회적으로도 큰 신장이 선호되고 있는 추세이다. 이에 따라 신장이 작은 소아들의 열등감은 상대적으로 가중되고 있어 성장 촉진을 위한 기능성 식품이나 건강보조제 등의 수요가 급증하고 있다. 그러나 이들 제품은 대부분이 한약 성분이나 호르몬제들이 들어있는 제품으로 장기간 섭취 시에 그의 안정성에 대한 검증이 없는 것이 대부분이다. 따라서 기능성이 검증된 안전한 식품소재로부터의 골성장촉진물질 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

또한 근래 사회의 고령화에 수반한 골다공증의 증가나 젊은 층의 골질량 증가 등 각종 골질환의 증가가 사회 문제로 대두되고 있다. 골다공증은 주로 폐경 후의 여성에서, 여성 호르몬의 감소의 영향으로부터 골 형성과 골 파괴가 균형이 깨지고 일어나는 질환으로서 주목받고 있고, 남성도 또한 노령화에 수반하여 골 질량의 감소가 보고되었다. 또한 최근 20년 동안의 연구에 의하면 초, 중학생의 골질량이 2배 이상 증가하였다고 하는 보고가 있다. 따라서, 골다공증을 예방하기 위해서 어려서부터 골밀도를 높이고, 뼈의 건강을 유지하는 것은 성별이나 연령과 무관하게 사회적인 주목을 받고 있다.

달걀은 영양학적으로 가장 우수한 식품으로 오랫동안 국민건강에 기여해 왔으며, 최근에는 단순히 식품의 재료로써만이 아니라 많은 유용물질의 보고(寶庫)로써도 주목받고 있다. 달걀은 3주만에 이루어지는 병아리의 발생, 분화, 성장에 필요한 모든 영양소와 조절물질을 가지고 있으며 골 성장의 소재와, 그 촉진 성분을 포함한 생체를 형성하는데 필요한 모든 재료를 함유하는 바이오(bio) 캡슐(capsule)이다. 그러나 달걀은 알레르기를 많이 일으키는 식품으로 알려져 있고, 최근의 보고에 의하면 3세 이하에서 알레르기 발생빈도가 가장

높고 달걀이 식품중에서 가장 알레르기를 많이 일으킨다고 보고되었다. 따라서 본 연구는 알레르기를 유발하지 않는 난황을 여러 분획으로 나누어 꿀갈이 성장과 꿀다공증에 관련된 분획을 분리하여 난황단백질 및 난황 peptide를 분리 정제하는 기술을 확립하고, 이에 대한 기능성평가를 *in vivo* 실험을 통해 검증하여, 최종적으로는 allergy free 꿀 증식 촉진 기능성 식품 신소재 개발을 목적으로 하였다. 본 연구결과로 개발된 꿀성장 촉진 난황단백질 및 난황 peptide는 특히 콜레스테롤과 알레르기 유발물질을 제거한 식품첨가물로, 성인뿐 아니라 알레르기를 염려하는 유아 및 어린이용 제품에도 즉시 활용이 가능할 것으로 생각된다.

본 연구의 특별한 독창성은 꿀 성장을 측정하기 위하여 도입된 새로운 방법으로, 꿀 성장 측정을 직접 관찰할 수 있는 형광 line을 형성하는 tetracycline을 사용하여 1-2 주일내에 유의성 있는 성장정도를 측정할 수 있는 방법을 도입하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 달걀로부터 꿀다공증 개선 및 꿀 성장촉진 유효 분획을 분리하고 이의 효능을 *in vitro*, *in vivo* 실험방법을 통해 검증하고, 이를 이용한 의약, 식품의약, 기능성식품의 중간원료로 소재화 하는데 연구개발의 최종목표를 두었다. 연구목표의 성공적 수행을 위해 2개의 세부과제로 연구과제를 구성하였으며 본 사업을 통하여 수행한 주요 연구개발의 내용 및 범위는 다음과 같다.

(1) 달걀로부터 꿀다공증 꿀질량 개선 미량소재의 실용화를 목적으로 달걀의 분획별 분리 및 정제, *in vitro* assay계를 이용한 골아세포 증식과 석회화 촉진인자 및 파골세포의 증식과 활성화 억제인자의 탐색, 꿀다공증 동물모델에 대한 기능성 평가 및 기전연구, 유효성분을 함유한 가공법 및 대량 조제술 개발을 연구개발 내용 및 범위로 하였다.

(2) 달걀로부터 *in vivo* assay 실험을 통한 장꿀 성장 촉진인자의 탐색 및 성장기 장꿀 성장촉진평가 모델에 대한 기능성 평가 및 기전연구를 연구개발 내용 및 범위로 하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

달걀로부터 골성장 촉진인자의 분리 및 기능성식품첨가물 생산기술개발을 최종 목적으로 수행한 연구개발 결과를 요약하면 다음과 같다.

○ 달걀 분획별 분리 및 정제

- 1차년도 연구개발 목표는 “달걀의 분획분리”와 “지방, 콜레스테롤 제거”의 2가지이고 이를 성공적으로 수행하였다. 그러나 생산단가가 너무 높아 실용화를 위해 단백질 분해효소인 protease를 이용한 대량생산공정을 추가로 확립하였다. 2차년도에는 protease를 이용하여 대량생산공정에서 생산된 시료를 본펩(Bonepep)으로 명명하고 이에 대한 효능비교평가를 수행하였다.

- 달걀의 분획분리

: 수용성 난황단백질 분리 및 공정의 pilot-scale-up

탈지된 난황단백질을 수용화 공정을 통하여 불용성 단백질과 수용성 난황단백질로 분획하였고, 골성장 실험결과 수용성 난황단백질 분획이 가장 큰 효과를 나타내어서 수용성 난황단백질분획을 상업화를 위한 공장도 scale로 pilot scale-up 하였다

- 지방, 콜레스테롤 제거

: 난황 중 탈지기술을 개발, 탈지 난황 성분 중에서 유효성분 비파괴조건을 몇가지 용매를 사용하여 공장도 scale-up을 성공적으로 완료하였다. 자세한 과정은 5. 연구수행 내용 및 결과에 나타내었다.

- protease에 의한 수용성 난황단백 peptide 분리 (Bonepep)

: 수용성 난황단백질의 대량생산 공정에 의한 단가는 100만원/kg으로 상업화하기에는 너무 높았다. 따라서 다른 방법을 모색하던 중 protease를 사용하여 peptide로 분해하여 단가를 낮추었다. 이 제품은 “본펩”으로 명명하고 수용성 난황단백질과 같은 실험을 반복하여 본펩의 효능을 검증하였다.

○ 골아세포 증식 및 석회화 연구 (SCI 논문 투고 1편)

- 공장도 생산공정을 통해 생산된 시료(YSP와 본펩)에 대한 골아세포 증식 및 석회화 촉진활성을 연구한 결과 높은 생리활성을 측정할 수 있었다. 골대사에는 파골세포에 대한 생리활성도 중요하게 작용하므로 파골세포에 대한 연구방법을 추가로 확립하여 수행하였다.

- 골아세포 증식촉진활성평가

- : 골세포 증식촉진 활성을 알아보기 위하여 조골세포에서 측정된 결과, 수용성 난황단백질(YSP)과 본펩 모두 농도(YSP: 0~5000 ug/ml, Bonpep: 0~100 ug/ml)에 비례하여 조골세포 증식이 높아지는 결과를 나타내었다. 특히 본펩의 경우 YSP보다 낮은 농도에서 효과를 나타내었다.
- 골아세포 석회화촉진 활성평가
 - : 뼈의 석회화 촉진 활성을 알아보기 위하여 조골세포에서 칼슘 침착율을 측정된 결과, 수용성 난황단백질 (YSP) 농도(0~5000 ug/ml)에 비례하여 조골세포에 칼슘 침착이 일어나 골세포에 유용한 효과를 나타내었다.
- 골형성 지표의 생화학적 분석 - alkaline phosphatase (ALP)에 미치는 영향
 - : 골생성 지표로서, 조골세포에서 형성되어 배지로 유리되는 ALP 농도를 측정된 결과 ALP 활성이 증가하였다.
- 골형성 유전자 발현측정 연골세포 증식률측정
 - : 연골관련 콜라겐 형성능을 Masson Trichrome 염색법을 이용하여 측정된 결과 YSP와 본펩 모두 유의하게 증가하는 결과를 얻었다.
- 파골세포 분화 및 증식억제 효능 평가
 - : TRAP assay를 이용하여 파골세포 분화 및 증식을 측정된 결과, YSP와 본펩 모두 분화유도를 억제시켜서 뼈의 파괴를 억제함을 알 수 있었다.

○ 골다공증 동물모델에서의 골형성 촉진 효과

- 골다공증 모델 확립
 - : 흰쥐의 난소를 적출한 후 3개월 간 본펩을 투여한 후 골다공증 억제효과를 측정하였다. 난소 적출 후 체중증가가 정상군에 비하여 유의적으로 증가하여 난소적출 수술로 인한 골다공증 모델 확립을 간접적으로 암시하였다.
- 골형성 측정
 - : 골다공증 유발 흰쥐의 골형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 pQCT를 이용하여 골밀도, 치밀골두께 등을 측정된 결과 본펩 투여는 유의적으로 골형성 지표들을 향상시켰다.
- 골강도 측정
 - : 골다공증 유발에 의한 골강도의 영향은 유의적 차이를 보이지 않았으

나 약간의 감소용 나타내었고, 본펩의 투여는 큰 영향을 보이지 않았다.

- 혈액중 골형성 지표

: 혈액내 alkaline phosphatase, 부갑상선 호르몬, Gla형 osteocalcin 등은 본펩에 의한 유의적 변화를 나타내지 않았다.

- 혈액 중 골흡수 지표

: Glu형 osteocalcin은 본펩에 의한 유의적 변화를 나타내지 않았다.

○ 성장기 흰쥐에서의 장골성장 (협동과제) - 공장도 scale up된 YSP 시료의 효능을 실험실단계 시료와 비교 평가한 결과, 효능의 변화 없이 공장도 scale up을 하였다는 것을 생체실험에서 검증할 수 있었다. 또한 본펩에 대한 실험도 하여 본펩의 효능을 검증하였다.

- 골길이 성장 촉진력 평가

: 두산에서 공장도 스케일로 생산한 DS1, DS2, DS3 시료를 YSP시료와 비교하여 측정된 결과 각각 통계학적으로 차이를 관찰할 수 없었다. 따라서 두산에서 공장도 스케일업 공정은 효능을 파괴하지 않는 공정으로 확인 검증되었다. 또한 Bonpep의 효능도 입증하였다.

- 성장판 (growth plate)대사율측정

: DS1, DS2, DS3 3개 시료 각각 저용량 및 고용량 (50 and 100 mg/kg) 투여군에서 YSP투여군과 동등한 효능을 보여 통계학적으로 차이를 관찰할 수 없었다. Bonpep도 성장판의 증식과 길이를 증가시켰다.

- 골형성 유전자 발현측정

(IGF-1, BMP-2)

: 검사시료 모두에서 BMP-2 발현을 증가시키는 양상을 나타내었다.

- BrdU assay

: 검사시료 모두에서 면역염색된 연골세포의 수가 증가하였음을 관찰할 수 있었다.

○ 본펩의 안전성

본펩의 안전성을 검증하기 위하여 정상 흰쥐에 본펩 (0.4%)을 3개월간 투여 후 정상식이군과 비교하였다.

- 정상식이군에 비하여 본펩 투여는 성장촉진 효과, 성장판 대사율 증진, 및 BMP-2 발현 증가를 나타내었으나, 혈액중의 성장호르몬, 부갑상선 호르몬,

osteocalcin등은 영향이 없었다.

- 3개월 간의 본펩 투여 후 부검을 실시한 결과 육안 소견상 이상은 없었으며, 간독성 지표인 혈액 중 GOT, GPT 수치도 정상군과 차이가 없었다.

○ 본 연구개발 결과의 활용에 대한 건의사항

본 연구 결과 효과가 있는 성분인 달걀의 펩타이드 성분은 “본펩”으로 명명되었으며, 참여기업인 두산(주)과 협의하여 어린이 대상의 유제품 첨가소재로 라이센싱을 노력중이며 일본에서 ‘샤토레제“ 식품회사와 본펩함유 (50mg/80mL) ” 하구쿠미 요구르트“ 제품을 출시하기로 합의됨. 또한 본펩함유 (20mg/1알) 캔디 제품도 시제품생산을 마친 단계이며, 국내에서도 유통체와 타진중에 있다.

SUMMARY

I. Contents and scope of the project

The aim of the present study was to materialize physiologically bio-active ingredients for bone formation from egg yolk. The whole project was consisted of 2 sub-projects organized by different bone formation, osteoporosis and longitudinal bone growth. The contents and scope of each project were as follows:

Sub-project 1 : To materialize bio-active ingredient from egg yolk for inhibiting osteoporosis, preosteoblastic MC3T3-E1 cell line and osteoclastic cells isolated from mice bone marrow, and osteoporosis-induced animal model were used for *in vitro* and *in vivo* assay system, respectively. Separation of egg yolk fraction, egg yolk peptide isolation, efficacy confirmation, and safety verification procedures were conducted.

Sub-project 2 : To materialize bio-active ingredient promoting longitudinal bone growth, Sprague-Dawley rats were used for *in vivo* assay system. Efficacy confirmation from yolk soluble protein and yolk peptide were conducted, and safety verification procedures were performed.

II. Results and Application of the project

Egg yolk was fractioned for water soluble and insoluble protein, and the efficacy was determined from separated fraction. To reduce the producer price, yolk peptide was isolated and the efficacy was confirmed for bone formation. The price reduced to 20% and the efficacy was almost identical as for the yolk protein. We named this peptide as "Bone Pep". The summary of the results and application of present study are as follows:

Sub-project 1 : The water soluble egg yolk protein and yolk peptide promoted bone formation exhibiting osteoblastic cell proliferation, osteoblastic cell calcification, collagen production, while it inhibited osteoclastic cell differentiation and proliferation. In addition, "Bone Pep" was effective in bone formation in osteoporosis animal model induced by ovariectomy in sprague-Dawley rat. 12week old female rats were ovariectomized or sham operated, and bonepep was supplemented 0.1% for 3 month. Bonepep treatment increased bone density, bone thickness. However, bone strength and blood markers of bone formation were not affected by bonepep supplementation.

Sub-project 2 : The water soluble egg yolk protein and yolk peptide promoted longitudinal bone growth, growth plate proliferation. Moreover, BMP-2 protein expression, which is related to bone growth, and growth plate cell proliferation was increased. To Examine the safety of bonepep, bonepep was supplemented for 3 month (0.4%) to normal Sprague-Dawley rays. Bonepep treatment prompted bone growth and BMP-2 expression without significant effect on blood growth hormone, parathyroid hormone or osteocalcin concentration. In addition, blood GOT and GPT concentrations were normal, and there were no significant abnormal signs by eye observation.

CONTENTS

Summary (Korean)	2
Summary (English)	8
Contents (English)	10
Contents (Korean)	12
Part 1. The Outline for Research and Development	14
Chapter 1. The Purpose and Limit for Research and Development	14
Chapter 2. The Need of Research and Development	14
Part 2. The Present Condition of Technical Development	15
Part 3. Results and Research Development	17
Chapter 1. The Method and Experimental Approach	17
Chapter 2. Results of Research Development	20
1. Results of Research Development for 1st year	20
A. The aim of the Research Development for 1st year	20
B. The results of the Research Development for 1st year	20
2. Results of Research Development for 2nd year	36
A. The aim of the Research Development for 2nd year	36
B. The results of the Research Development for 2nd year	36
Chapter 3. The Outcome of Research Development	59
Part 4. Achievements of Purpose and Rest of Relative Field	61
Chapter 1. Purpose of Research Development and Achievement	61
1. The aim and contents of Research Development	61

A. The aim and contents of the Research Development	61
B. The aim and contents of the annual Research Development	61
2. Achievements of Research Development Purpose	62
A. Achievements and aim of the Research for 1st year	62
B. Achievements and aim of the Research for 2nd year	65
3. The Rest of Relative Field	69
A. Technical view	69
B. Economical and Industrial view	69
Part 5. Results of Research and Development and Applicative Plan	71
Part 6. Collection of Foreign Informations	72
Part 7. References	73
APPENDIX I. Publications and Patent	74

목 차

요약문 (한글)	2
요약문 (영어)	8
목 차 (영어)	10
목 차 (한글)	12
제1장 연구개발과제의 개요	14
제1절 연구개발과제의 목적과 범위	14
제2절 연구개발의 필요성	14
제2장 국내외 기술개발 현황	15
제3장 연구개발수행 내용 및 결과	17
제1절 연구개발 방법 및 설계	17
제2절 연구개발 수행 결과	20
1. 1차년도 연구개발 수행결과	20
가. 1차년도 연구개발 목표	20
나. 1차년도 연구개발 결과	20
2. 2차년도 연구개발 수행결과	36
가. 2차년도 연구개발 목표와 내용	36
나. 2차년도 연구개발 결과	36
제3절 연구개발 성과	59
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	61
제1절 연구개발 목표 및 달성도	61
1. 연구개발의 목표 및 내용	61
가. 연구개발 목표와 내용	61
나. 연차별 연구개발 목표와 내용	61
2. 연구개발목표 달성도	62
가. 1차년도 연구개발 목표 및 달성도	62
나. 2차년도 연구개발 목표 및 달성도	65

3. 관련분야에의 기여도	69
가. 기술적 측면	69
나. 경제 · 산업적 측면	69
제5장 연구개발결과의 활용계획	71
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	72
제7장 참고문헌	73
부록	74
학회 발표 및 특허 출원	74

제 1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발과제의 목적과 범위

달걀은 영양학적으로 가장 우수한 식품으로 오랫동안 국민건강에 기여해 왔으며, 최근에는 단순히 식품의 재료로써만이 아니라 많은 유용물질의 보고(寶庫)로써도 주목받고 있다. 달걀은 3주만에 이루어지는 병아리의 발생, 분화, 성장에 필요한 모든 영양소와 조절물질을 가지고 있으며 골 성장의 소재와, 그 촉진 성분을 포함한 생체를 형성하는데 필요한 모든 재료를 함유하는 바이오(bio) 캡슐(capsule)이다. 달걀에 함유된 유효성분 함량은 우유로부터의 유효 단백질 성분이 0.005% 라는 보고와 비교한다면 수십 배인 함량이며, 또한 그것이 발현되는 기구가 들어 있어 생물학적, 생화학적 연구의 재료로써도 중요하다. 따라서 본 연구는 달걀로부터 골다공증 개선 및 골 성장촉진 유효 분획 혹은 성분을 분리하고 이의 효능을 in vitro, in vivo 실험방법을 통해 검증하고, 이를 이용한 의약, 식품의약, 기능성식품의 중간원료로 소재화 하는데 연구개발의 최종목표를 두고 있다.

본 연구의 특별한 독창성은 골 성장을 측정하기 위하여 도입된 새로운 방법이다. 현재까지 진행되어온 골성장을 측정한 많은 선행 연구들은 동물에게 시료를 장기간 투입한 후 tibia나 femur등의 길이를 측정하여 성장정도를 규명하여 정확도가 떨어지고 장기간의 실험기간을 요하였다. 본 연구에서는 골 성장 측정을 직접 관찰할 수 있는 형광 line을 형성하는 형광표식인자를 사용하여 1-2 주일내에 유의성 있는 성장정도를 측정할 수 있는 방법을 도입하였다.

제2절 연구개발의 필요성

최근 경제 성장에 따른 생활수준의 향상과 영양 개선, 유년기 생활환경의 개선 및 생활습관의 합리화 등의 요인에 의해 소아의 평균 신장이 점차 증가되고 있고, 또한 사회적으로도 큰 신장이 선호되고 있는 추세이다. 이에 따라 신장이 작은 소아들의 열등감은 상대적으로 가중되고 있어 성장 촉진을 위한 기능성 식품이나 건강보조제 등의 수요가 급증하고 있다. 그러나 이들 제품은 대부분이 한약 성분이나 호르몬제들이 들어있는 제품으로 장기간 섭취 시에 그의 안정성에 대한 검증이 없는 것이 대부분이다. 따라서 기능성이 검증된 안전한 식품소재로부터의 골성장 촉진물질 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

또한 근래 사회의 고령화에 수반한 골다공증의 증가나 젊은 층의 골질량 증가 등 각종 골질환의 증가가 사회 문제로 대두되고 있다. 골다공증은, 주로 폐경 후의 여성에서, 여성 호르몬의 감소의 영향으로부터 골 형성과 골 파괴가 균형이 깨지고 일어나는 질환으로서 주목받고 있다. 남성도 또한 노령화에 수반하여 골질량의 감소가 보여지고, 또한 최근 20년 동안의 연구에 의하면 초, 중학생의 골질량이 2배 이상 증가하였다고 하는 보고가 있다. 골다공증 환자는 미국에서는 45세 이상 인구중 2,000 ~ 2,500만명이 골다공증에 이환되어 있다고 하며, 일본은 골다공증 환자가 100만명 이상으로 추정되고 있고, 고령화의 진행에 의하여 2010년에는 160만명에 달할 것으로 추정 발표했음. 우리나라의 경우에 정확한 통계는 없으나, 2002년 현재 약 300 만명의 골다공증 환자가 있고, 이중 10-15만명 정도는 골절을 일으키는 것으로 추정되며, 또한 평균수명의 증가를 감안할 때 골다공증의 발생빈도가 앞으로 더욱 높아질 것으로 예상된다.

또한 2012년 기준으로 ‘골다공증개선소재’ 시장규모는 약 25억불, ‘성장호르몬촉진소재’로서 뼈 성장관련 시장규모는 약10억불로 예측하고 있고, 현재 골다공증 세계 시장만으로 15조원의 시장이 존재하고 있다.

현재 특수영양식품으로 영양보충용 (칼슘보충식품)으로 시판되는 오스테온의 경우 소비자 가격으로 1kg에 125만원 선인것에 반하여, 난황으로 부터 제조할 경우, 가격 경쟁력은 더욱 높을 것으로 사료된다.

따라서, 본 연구결과로 개발되는 골 성장 기능성 난단백 소재는 유단백 또는 육류의 단백질 공급을 대체할 수 있으며, 특히 콜레스테롤과 알러지유발물질을 제거한 고기능성 골성장 식품첨가물로 성인뿐 아니라 알러지를 염려하는 유아 및 어린이용 제품에도 즉시 활용이 가능한, 개인 및 가정적인 측면에서는 물론 사회 및 국가적인 측면에서도 절실히 요구되는 연구개발 분야라 할 수 있다.

제2장 국내외 기술개발 현황

현재까지 국내외에서 수행된 선행연구들은 골다공증이나 골대사에 대한 연구로서 성장호르몬이나 phytoestrogen 등에 대한 연구들이 대부분이며, 최근 본 연구자 및 연구원에 의하여 로바스타틴 약물과 한약재 구척이 흰쥐의 골 길이 성장에 미치는 효과가 보고되었을 뿐, 식품소재에 의한 골 성장에 대한 in vivo 실험 연구는 거의 없다. 그러나 위에 열거한 약물, 호르몬, phytoestrogen 및 한

약제 등은 안전성이 문제가 된다. 특히 일상 식품인 달걀 유래 성분에서 *in vitro*, *in vivo* 실험 등을 통한 골 대사 및 골 성장 효능 물질이 밝혀진 연구는 아직 없다. 기존의 골다공증 등 골질환을 예방 또는 치료하는 방법으로는, 식이 요법에 의한 칼슘 보급, 가벼운 운동, 일광욕, 약물 치료등이 행해지고 있다. 식이 요법에 의한 칼슘 보급에는 탄산 칼슘, 인산 칼슘 등의 칼슘염이나, 소 뼈가루, 알껍질, 어골분 등의 천연 칼슘제가 사용되고 있지만. 용해성이나 흡수성에서 문제가 있다. 치료 의약품의 경우에도 비스포스포네이트나 칼시토닌 제제 등이 사용되고 있어 골다공증 치료에는 유효하다고 알려져 있으나, 이러한 물질은 의약품이고, 복용에 특별한 주의가 필요하며, 귀울음, 두통, 식욕부진 등 부작용의 위험도 크고, 지속적인 식품 소재로서 사용 가능한 것은 아니다. 최근 phytoestrogen의 골다공증 개선에 대한 연구가 조금씩 되고 있으나 다량 섭취 시 부작용이 우려되어 현재 의견이 분분한 상황이다.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구개발 방법 및 설계

1. 시료 제조

- ① 달걀전체(전란) 및 난황, 난백으로 나누어 동결건조
- ② 난황분말 500g에 에탄올 2.5L를 가하고, 혼합기(blender)로 30분간 교반한 후 고형물을 회수하는 조작을 3회 반복하여 탈지를 한다. 얻어진 고형물에 37°C의 온수 3L을 가하고, 온도를 유지하면서 교반한 후, 8000 rpm에서 30분 원심 분리하여 상층액 및 침전물을 동결 건조하여 난황 수용성 및 비수용성 물질로 분획한다.

2. 달걀에 포함된 골 성장 촉진 성분의 평가법의 확립

- ① 배양 세포계에 있어서 골아세포 증식 촉진 활성과 석회화 촉진 활성 측정법 (in vitro)의 검토
- ② 동물 실험에 의한 경골 성장단의 골 신장 촉진 효과 시험과, 연골 세포 증식 효과 시험을 이용한 시료중의 골 성장 촉진 성분의 평가법 (in vivo)
- ③ 골다공증 모델에 대한 골질량 감소 보호효과 평가법

3. 골 성장 촉진 활성 계란 소재의 활성 성분의 분획과 그 식품의 응용

- ① 유정란 및 무정란 전란 분말에 의한 골 성장 촉진 활성의 평가
- ② 골 성장 촉진 활성이 높은 계란 유래 소재에 관하여 알코올 탈지, 용매 분획, 한외 여과 HPLC 등으로 정제를 행하고, 골 성장 촉진 활성 성분의 분류를 목표로 한다.
- ③ 상기의 결과 얻어진 골 성장 촉진 활성이 높은 난 유래 소재에 관하여, 활성 성분의 열, pH 및 산화에 대한 안정성을 검토
- ④ 식품 소재로서 유효 성분을 다량 함유한 가공법과 그 대량 조제법을 검토
- ⑤ 시제품을 이용한 인체 임상실험에 의한 골 성장 촉진 활성 평가

4. 골아세포의 증식 촉진 활성

- ① 인간골아세포의 InM1.2 세포에 석회화 촉진제와 시료를 첨가하면서 배양

② 20 일후에 골아세포 수를 측정

5. 석회화 촉진 활성 실험

- ① 배양 세포를 이용하고, 시료를 첨가하면서 배양
- ② 21 일 후에 세척한 세포를 5% 과염소산액에 15분 침지
- ③ hydroxy apatite를 추출
- ④ 칼슘정량하여 대조군과 비교

6. In vivo 동물실험 (성장촉진실험)

- ① Sprague-Dawley rat에게 시료 섭취 기간(1 주간) 중 3 일째와 5 일째에 형광 물질로서 테트라사이클린 (tetracycline)를 투여
- ② 경골을 적출
- ③ 성장단의 절편을 형광 현미경 관찰
- ④ 시료 섭취 기간내의 2 일간 골 신장 정도를 두색의 형광 밴드 (band)로부터 측정
- ⑤ BrdU(50mg/kg)를 복강내 2 시간 후에 경골을 채취 성장판의 연골 세포에서의 BrdU의 염색을 항 BrdU 항체를 이용한 면역 염색법에 의하여 측정

7. In vivo 동물실험 (골다공증에 미치는 영향실험)

- ① 좌골신경절단법으로 유발된 생쥐 골다공증 모델 확립
- ② 경골을 적출 - 중량변화 측정
- ③ 경골 강도 밀도 등 평가
- ④ 경골조직의 변화측정
- ⑤ 혈중 생화학적 지표측정

8. In vivo 독성실험

- 실험동물(ICR mouse, male)을 사용하여 조시료를 1회 혹은 장기반복투여한 후 급성과 아급성 독성을 검사함.

9. 제품의 연차별 가공화공정

1차년도

- i) 난 단백질 중 유효분획 대량 분리 정제기술 확립
 - 난황 중, 지질성분 탈지 기술개발
 - 탈지 난황성분 중, 유효성분 비파괴 조건 확립

- 상업화를 위한 대량 성분 분리 제조 공정 확립
 - 청징화, 여과
 - 결정화
 - 투석
 - 크로마토그래피 (젤, 이온교환, 치환, radial 등)
 - 건조 (동결건조, 분무건조, 등)
- ii) 공정의 pilot scale-up test
 - 상기 조건 중 최적화 공정을 scale-up 하여 확인

2차년도

- i) 기능 성분의 저장안정성 (pH, 열, 산화) 자료 확보
- ii) 기능 성분의 제형화를 위한 실험
 - 건강기능식품으로의 제형화 실험
 - 캡슐화, 타블렛화
 - 일반식품으로의 제형화 실험
 - 수용화, 분말화
- iii) 난 단백질의 제품화 응용자료 확보를 위한 기술 확립
 - 유효성분의 수용화 기술 개발
 - 음료용 제품을 위한 기술
 - 유효성분의 열안정성 및 유통안정성 기술 개발
 - 기능유지를 위한 가공적성 범위 기초자료 확보
- iv) 시제품의 생산
 - 최적화된 제품과 제형으로 시제품의 생산 및 평가

10. 가공식품 첨가물 소재 가공공정

- i) 유효분획 혹은 성분의 확인
- ii) 유효분획 혹은 성분의 농축 및 순도의 고도화
- iii) 유효분획의 중규모 생산 및 가공 적성 자료 도출
 - 열, pH, 산화안정성
 - 수용화, 수용액 점성, 유동현상 등 가공 적성 시험
 - 식품규격에 적합한 기준 확립
- iv) 고상 식품, 액상 식품, 건강 식품에 적용 가능한 조건 개발
 - 상기 자료를 기반으로한 시제품 제작 / 평가 / 개선

11. 추출후 부산물의 활용 및 공업적 실용화

- i) 추출후 부산물 중 레시틴 성분함량 측정
- ii) 부산물로부터 성분추출공정 확립
- iii) 제품원료 성분의 최적 추출조건을 기초로 pilot plant scale의 추출 공정을 확립

제2절 연구개발 수행 결과

1. 1차년도 연구개발 수행결과

가. 1차년도 연구개발 목표

- 본 연구는 달걀로부터 골다공증 개선 및 골 성장촉진 유효 분획 혹은 성분을 분리하고 이의 효능을 in vitro, in vivo 실험방법을 통해 검증하고, 이를 이용한 의약, 식품의약, 기능성식품의 중간원료로 소재화 하는데 연구개발의 최종목표를 두고 있다.
- 연구 1년차의 주요 연구개발목표는 유효효능이 있는 분획을 탐색하고 이의 대량분리 정제기술을 확립하는데 있다.

나. 1차년도 연구개발 결과

- 1) 달걀 분획별 분리 및 정제 (참여기업, 제 1세부, 제2 세부)

i) 난 단백질 중 유효분획 대량 분리 정제기술 확립

- 난황 중, 지질성분 탈지 기술개발

난황은 계란 하나 무게의 약 32%를 차지하는데, 50% 정도가 물이며, 단백질이 17%, 지질이 31%, 그리고 기타 탄수화물과 당질 그리고 미네랄 성분이 약 2% 정도를 차지하고 있다. 그리고 31%의 지질 중에는 약 30%에 해당하는 레시친 성분이 존재한다. 이들 레시친은 천연유화제로서 물과 기름의 유화를 도와주는 성분으로 수용성 단백질의 추출에 유화작용을 일으켜 분리를 어렵게 하므로 수용성 단백질 분획을 얻기 위해서는 미리 제거해야 할 필요가 있다. 지질을 추출하여 제거하는 공정은 오래 전부터 알려진 Folch washing법을 이용하면 중성지질 및 극성지질까지도 완전히 제거할 수 있으나 이는 인체에 유해한 것으로 알려진 클로로포름과 메탄올을 사용하기 때문에 식품의 제조를 위하여서는 적합하지 않다. 그러나, 원료에 함유된 지질의 이론적 수율 및 성분을 측정하기에 적합한 방법이라고 생각하였으므로 이를 이용한 지질의 제거 실험을 수행하였다. 난황으로부터 추출한 지질의 함량은 약 $5.0 \pm 0.8\text{g}$ 으로 31%이었으며, 이중 중성지질이 60%, 인지질이 30%, 콜레스테롤이 5%, 그리고 기타 5% 순서로 나타났다. 지질을 추출하는 또 다른 방법으로 비교적 온화한 용매조건으로는 헥산과 이소프로판올을 사용하는 방법이 알려져 있으며, 이를 이용한 난황지질의 추출 시에는 추출한 지질의 함량이 약 $4.7 \pm 0.6\text{g}$ 으로 Folch washing에 의한 추출에 비교하여 약 94%의 수율로 제거될 수 있었다. 그러나 헥산의 경우 지질의 추출, 정제공정에 일반적으로 허용되는 유기용매이지만, 이소프로판올의 경우 그 안정성이 확보되지 않아 식품의 제조에 제한이 있으므로 또 다른 방법을 사용하였다. 식용유지의 가공에 사용 가능한 헥산과 식품 제조에 사용 가능한 주정을 이용하여 난황으로부터 지질을 제거하고자 하였다. 이 경우 추출된 지질의 함량은 $4.0 \pm 0.5\text{g}$ 정도로 Folch washing에 의한 방법에 비하여 약 80% 수율로 지질이 제거되었다. 이 조건은 난황으로부터 지질의 제거 및 제거된 지질과 잔존하는 단백질이 식품첨가물로 사용이 가능하며, 충분한 양의 지질이 제거되어 수용성 단백질의 회수를 위한 전처리 공정으로도 적합하다고 할 수 있다. 따라서, 난황으로부터 지질을 제거하고 수용성 단백질의 추출을 위한 공정으로 헥산과 주정을 이용한 방법을 채택기로 하였다.

- 탈지 난황성분 중, 유효성분 비파괴 조건 확립

산업적으로 대량의 난황을 처리하기 위해서는 계란으로부터 직접 껍질을 깨고, 난백을 분리하여 추출을 수행할 경우, 부산물의 생성이 많고 난황에 존재하는 50%의 물을 제거해야 하는 등, 전처리 부분이 많이 존재하게 된다. 따라서 이들 전처리 공정 중에, 신선한 난황에 존재하는 유효성분의 파괴가 수반되는지 또는 그렇지 않은지에 대한 검증이 필요하며, 이를 위하여 산업적으로 대량의 건조 난황분말을 얻을 수 있는 분무건조 조건에서 얻은 원료를 이용하여 유효성분의 역가를 측정하였다. 우선 가장 신선한 성분의 수용성 난황단백질을 추출하기 위하여 신선한 계란의 난황을 동결건조하여 헥산과 주정으로 탈지한 후, 이의 수용성 성분을 추출하여 시료를 제조하였다 (실험실적 방법). 그리고 신선한 계란의 난황을 분무건조하여 건조한 난황분말을 동일한 방법으로 추출하여 시료를 제조하였다. 분무건조는 식품공업에 매우 널리 사용되는 단위공정으로 수용성 성분의 건조에 이용된다. 이 방법은 동결건조에 비하여 비교적 높은 온도에서 건조 (80~170℃)되지만 건조 시간이 짧으므로 열안정성이 있는 성분의 경우 경제적인 방법으로 제안되는 공정이다 (대량생산이 가능한 방법). 이들 2가지 방법으로 제조된 원료를 이용하여 골성장 시험을 수행한 결과 효능이 비슷하여 대량생산에 의한 방법도 안정성을 유지하는 것으로 나타났다.

- 상업화를 위한 대량 성분 분리 제조 공정 확립

상기 실험을 통하여 분무 건조된 난황분말에도 유효성분의 파괴가 없이 안전하게 유지된다는 것을 알 수 있었으므로, 이 후 실험은 대량 분무건조를 이용하여 제조된 난황분말을 원료로 하여 수행하였다. 건조된 난황분말을 헥산과 주정을 이용하여 탈지한 다음, 감압 열풍건조를 통하여 잔류용매를 제거하였다. 이 때, 잔존하는 용매가 다음 공정에 미치는 영향을 알아보기 위하여 잔류용매 농도에 따른 추출시의 회수율을 비교하여 보았다. 잔류용매를 완전히 제거하는 것은 안전성의 확보를 위하여 매우 중요한 일이나, 초기에 이를 완전히 제거하기 위하여 과도한 열처리를 수반할 경우 활성성분의 파괴가 우려되며, 본 공정 이후에도 추출 농축의 공정이 수반되어 잔존 용매의 추가 제거가 이루어 질 수 있으므로, 본 단위공정에서의 잔류용매의 완전제거를 목표로 할 필요는 없게 된다. 따라서 지질의 추출을 수행한 후 건조조건을 달리하여 잔존하는 헥산과 주정의 양에 변화를 준 다음, 유용성분의 추출을 수행하였다. 그 결과 잔존하는 헥산과 주정이 10%에 이르기까지 추출되는 수용성 단백질의 수율에는 큰 변화가 없었다. 헥산과

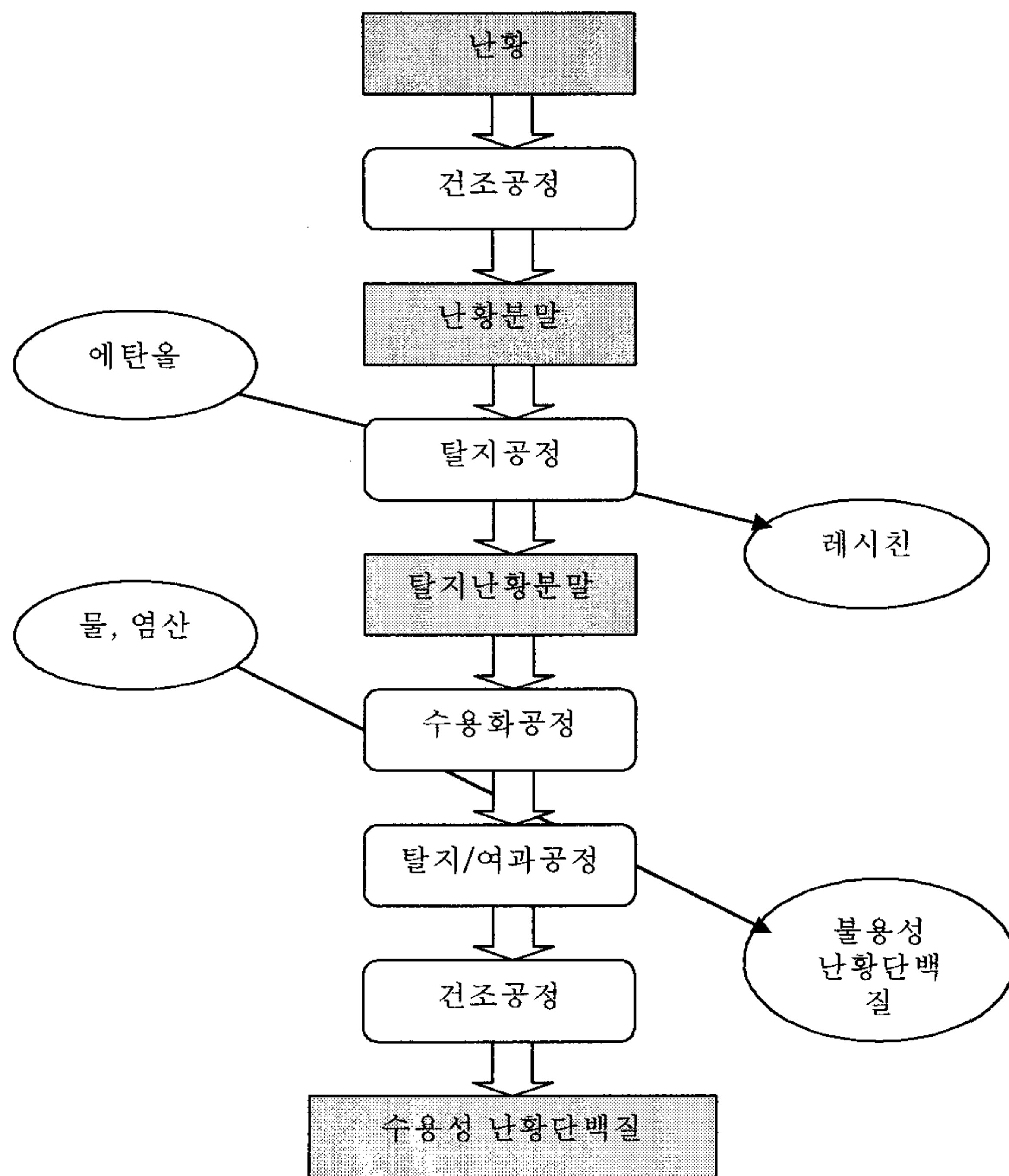
주정을 이용하여 탈지를 수행한 경우, 약 20%의 기름이 단백질 성분에 잔류하게되며, 이는 수용성 단백질의 추출 시, 제품에 혼입되어 수용액의 청정도를 떨어뜨리게 된다. 이의 제거를 위하여 원심분리, 여과, 상분리, 여과 보조제의 사용 등 몇 가지 단위공정을 적용하였다. 원심분리의 경우, 기름과 물, 그리고 불용성 단백질의 분리가 3,000G, 30분 정도에서 손쉽게 일어나 간단하게 제거할 수가 있었다. 그러나 대량 생산의 경우, 원심분리에 의한 고형분과 수용성 성분의 분리는 손쉽게 이룰 수 있으나, 액-액 분리인 수용성 성분과 유용성 성분의 분리는 여의치가 않게 된다. 그러므로 이의 제거를 위하여 여과보조제를 탐색하였으며, 상업적으로 구할 수 있는 diatomous earth 계통의 여과보조제의 경우 잔존하여 유리되는 난황지질의 흡착제거에 용이하게 적용할 수 있음을 알게 되었다. 상분리, 여과 공정의 경우 비교적 적은 에너지의 사용으로 원하는 바를 성취할 수는 있으나, 운전시간의 장기화, 계면의 명확한 분리, 그리고 충분치 못한 지질의 제거 등의 이유로 대량생산공정에는 적용하기 어려운 면이 있는 것으로 사료된다. 추출된 수용성 단백질의 건조는 동결건조, 분무건조 및 감압건조를 수행하였으며, 이 중 동결건조가 유용성분의 활성을 보존 시키는 데는 가장 좋을 것이지만 에너지 비용과 장기간 시간이 소요된다는 단점이 있다. 따라서 분무건조와 감압건조 또는 이의 조합공정을 고려하여 최종 목적제품의 건조를 수행하였다. 1차 년도를 통하여 개발된 제품의 수율은 7%로 탈지난황분말을 수용액으로 추출할 경우, 약 2% 농도의 용액을 얻게 되며, 이를 직접 분무 건조할 경우 농도가 너무 낮아 수분을 제거하는데 소비되는 에너지 비용이 과다하여 경제성이 없어진다. 따라서 이를 유용성분의 파괴 없이 농축하기 위하여 감압건조를 수행하였다. 가열온도를 80℃로 하여 진공건조하므로써 제품의 품온은 50~60℃를 유지하게 하므로써 유용성분의 열변성을 방지하였다. 또한 약 2%의 농도를 20~25%의 농도로 1차 농축한 후, 완전건조를 위하여 분무건조를 사용하므로써 수분 2%이하의 고운 분말제품이 가능하게 되었다.

공정의 pilot scale-up test

상기 난 단백질 중 유효분획 대량 분리 정제기술을 확립하기 위한 조건을 실험실 수준에서 개발하고 이를 최적화하여 경제적인 대량생산 가능 공정을 개발하였으며, 이는 그림 1에 나타난 바와 같다. 이를 scale-up을 통하여 대량생산 가능한지를 알아보기 위하여, 초기 20 L 규모의 소형추출기와 50

L의 중형추출기, 그리고 2,000 L의 대형추출기를 이용하여 수차례 수행하였다. 이의 농축 및 여과에 수반되는 농축기와 여과기는 5L 연속 감압농축기, 실험실용 분무건조기와 Dead-end filter를 이용하였다. Scale-up은 아래 표와 같이 수율 면에서 비교적 일정하게 얻어지는 안정적인 공정이 개발되었음을 알 수 있었다.

수용성 난황단백질 제조 방법



Scale-up에 따른 난황 수용성 단백질의 수율 (%)

	수율 (%)	농도 (% wt/vol.)	청징도
실험실 scale	7.1 ± 1.2	1.7 ± 0.5	양호
소형추출기 (20L)	7.3 ± 0.8	1.8 ± 0.3	양호
중형추출기 (50L)	7.4 ± 1.5	1.8 ± 0.6	양호
대형추출기 (2MT)	6.9 ± 1.2	1.6 ± 0.6	양호

◆ 추출 후, 부산물의 활용 및 공업적 실용화

i) 추출 후 부산물 중 레시친 성분함량 측정

- 난황으로부터 추출한 지질의 함량은 약 5.0 ± 0.8g 으로 31%이었으며, 이중 중성지질이 60%, 인지질이 30%, 콜레스테롤이 5%, 그리고 기타 5% 순서로 나타났다.

- 이 중, 레시친 (인지질)의 조성은 포스파티딜코린 75%, 포스파티딜에탄올아민 17%, 스피고미엘린 3%, 포스파티딜이노시톨 1%, 기타 미확인 물질 4% 정도로 나타났다.

ii) 부산물로부터 성분추출공정 확립

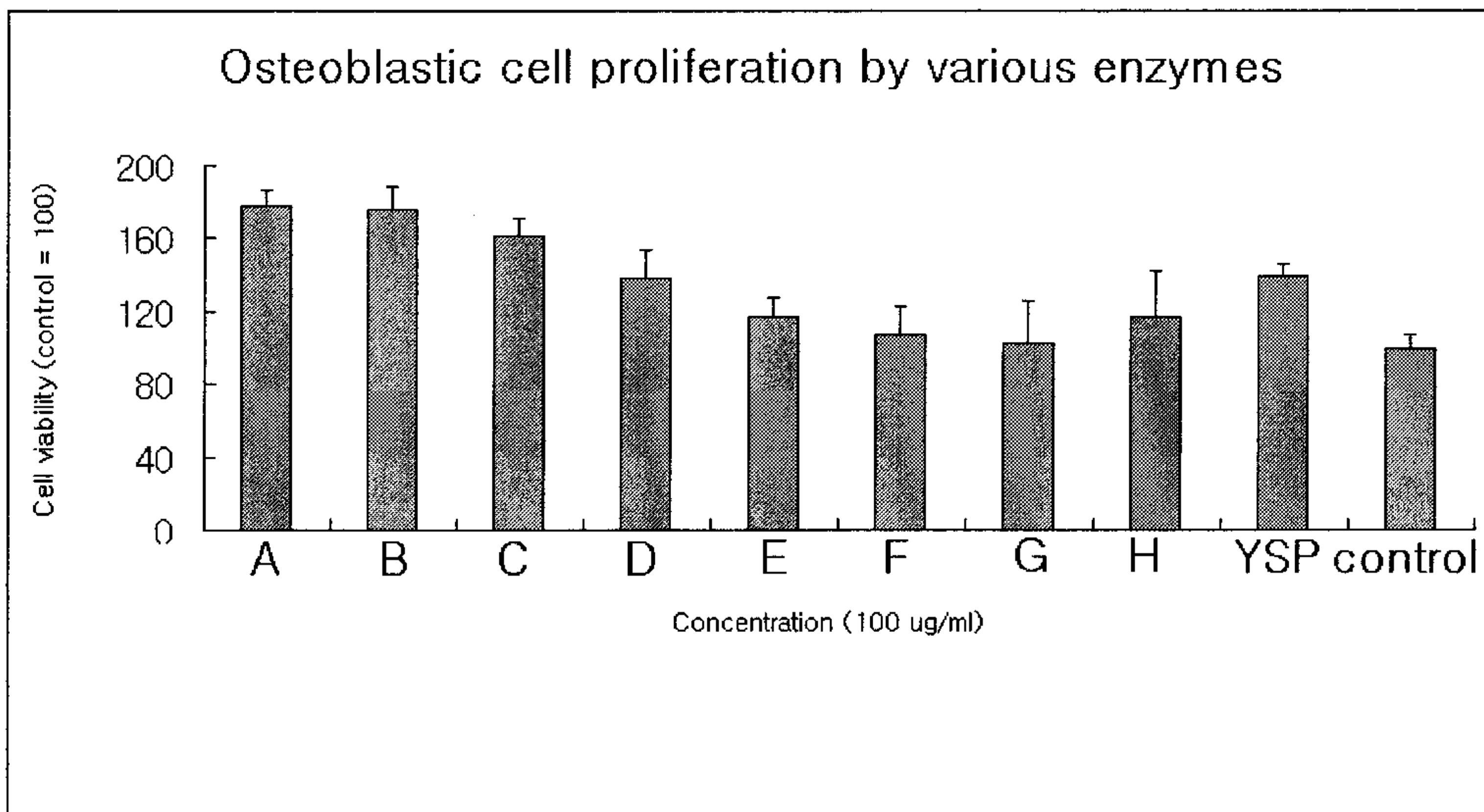
- 추출한 지질은 인지질의 함량이 30% 정도로 식품첨가물공정에서 나타난 레시친의 규격인 아세톤불용물함량 60%에 미달하므로 인지질의 함량을 2배 가량 높여줄 필요성이 있다.

- 인지질의 함량을 높이기 위하여 인지질은 아세톤에 녹지않고 침전하는 반면, 중성지질과 스테롤류는 아세톤에 녹는 성질을 이용하여, 추출된 지질을 농축한 후, 다량의 아세톤을 첨가하므로써 인지질의 함량을 높일 수 있었다. 그러나 이 경우, 대부분의 중성지질이 아세톤에 용해되어 제거되므로 식품첨가물공전에 기재된 아세톤불용물함량 60%를 훨씬 상회하는 순도의 제품 (95%)을 얻을 수 있었다. 이 경우 레시친의 용도는 천연유화제로 의약품의 유액제제의 제조에 사용될 수 있다.

- 아세톤 처리로 레시친의 농도를 올려 식품첨가물규격에 적합한 레시친을 제조할 수는 있었으나, 이 공정은 레시친의 순도면에서는 바람직하지만, 레시친의 물성, 경제성 등의 면에서는 바람직한 조건이 될 수 없다. 따라서 점조성 액상의 레시친 제품을 만들기 위하여 추출된 지질을 농축한 후, 에탄올에 다시 녹여 온도에 따른 중성지질과 인지질의 용해도 차이를 이용하여 농축하였다. 40℃에서 에탄올 용액으로 정치할 경우, 일부의 중성지질이 분리되어 하층부를 형성하는데, 이 중성지질을 제거하므로써 60%의 아세톤불용물을 가지는 에탄올 용액층을 얻을 수 있었다. 그러나, 아세톤불용물의 함량은 60% 수준으로 식품첨가물공전의 레시친 규격에 적합하지만, 대두 레시친과는 달리, 그 형상이 점조성 액상이지않고 플라스틱형의 반고상 형태의 제품이 만들어 졌다.

◆ protease에 의한 수용성 난황단백 peptide 분리

수용성 난황단백질의 대량생산 공정에 의한 단가는 100만원/kg 으로 상업화하기에는 너무 높았다. 따라서 다른 방법을 모색하던 중 protease를 사용하여 peptide로 분해하여 단가를 낮추었고, 여러 가지 protease를 사용하여 수용성 난황단백질분획과 효능을 비교하였다. 그 결과 수용성 난황단백질분획(YSP)보다 더 큰 효과를 나타내고 수율은 향상되는 protease를 찾아내었고 단가는 20만원/kg 까지 낮출 수 있었다. 여러 protease에 의한 골아세포의 증식에 미치는 효능 및 각 protease에 의한 수율은 아래에 나타내었다.



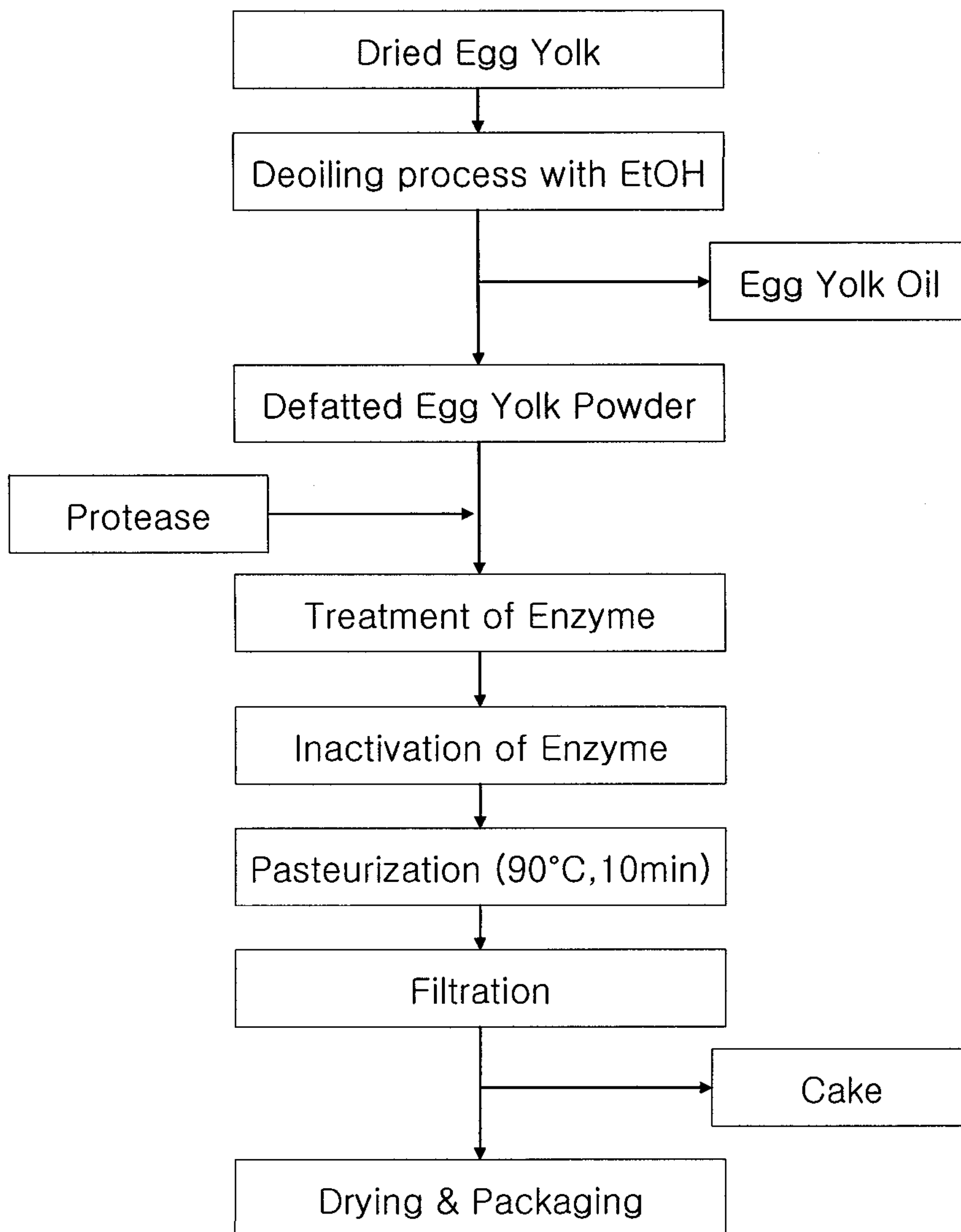
각 protease에 의한 수율비교

protease	가격(천원/kg)	수율 (%)
A	1,200	38.4
B	600	17.0
C	1,000	23.6
D	950	19.7
E	1,600	26.1
F	1,500	24.2
G	3,500	34.5
H	1,500	10.9

가격과 수율을 고려하여 protease를 결정하여 대량 생산공정을 확립함

- 난황단백 peptide 생산공정은 다음과 같다.

Bone-pep Production Process



2) 제 1 세부과제 : 달걀로부터 골다공증 골질량개선 미량소재의 실용화 (한서대학교, 김혜경)

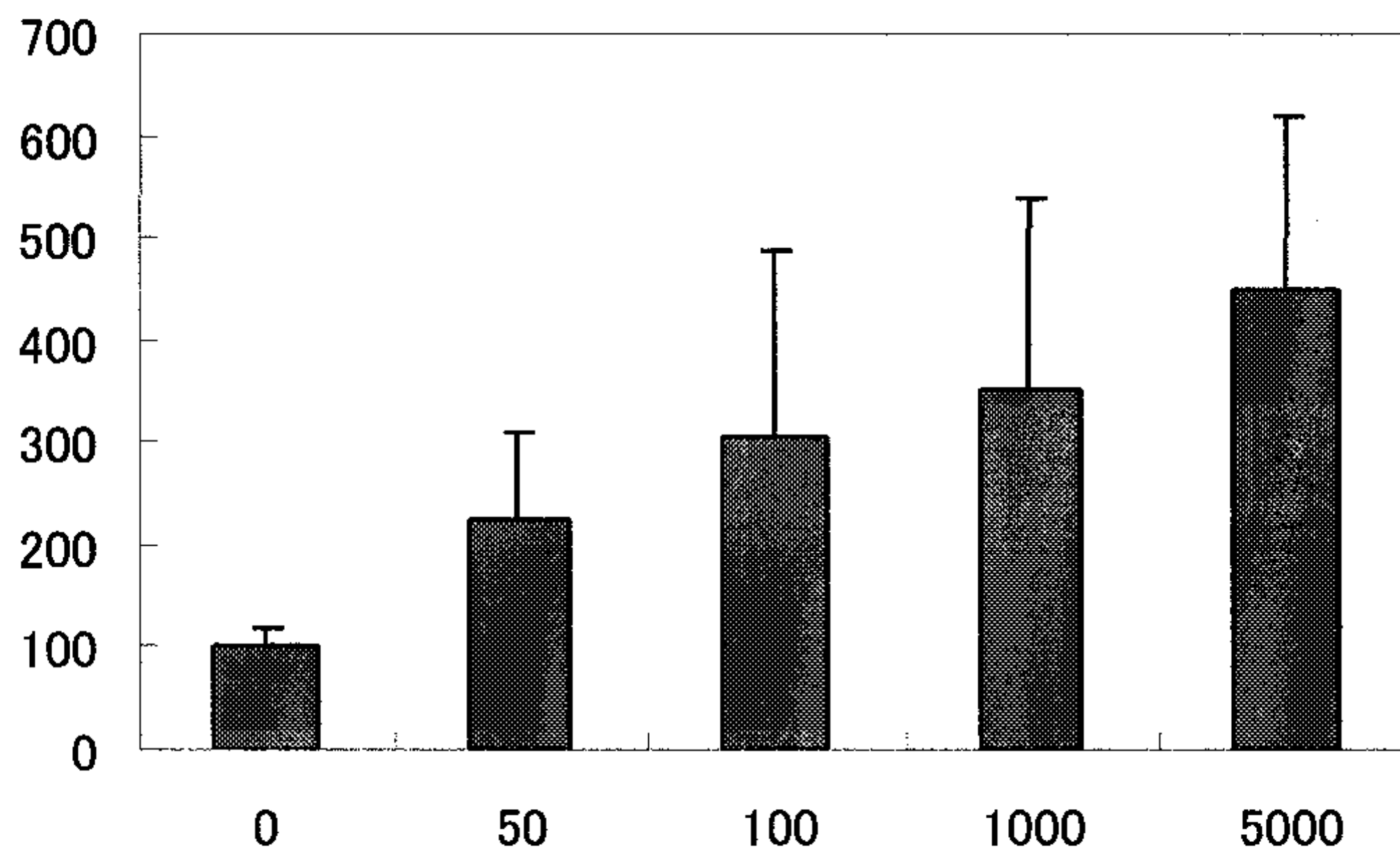
- 난황으로부터 수용성 난황단백질 분리 및 대량 제조공정 확립 위에 서술하였음
- 난황단백 peptide 분리 및 대량 제조공정 확립 위에 서술하였음
- 수용성 난황단백질에 의한 골 성장 촉진 효능 평가 (in vitro 조골세포 활성 증진/파골세포 활성 억제 효능)

• 조골세포의 증식촉진 활성

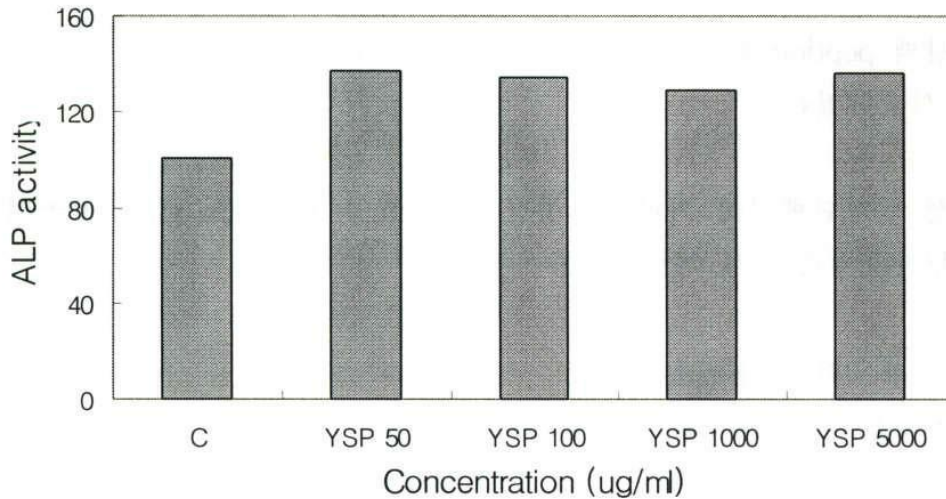
골세포 증식촉진 활성을 알아보기 위하여 조골세포에서 측정된 결과, 수용성 난황단백질 (YSP) 농도(0~5000 ug/ml)에 비례하여 조골세포 증식이 높아지는 결과를 나타내었다.

• 칼슘 침착을 통한 골 생성률 측정

뼈의 석회화 촉진 활성을 알아보기 위하여 조골세포에서 칼슘 침착율을 측정된 결과, 수용성 난황단백질 (YSP) 농도(0~5000 ug/ml)에 비례하여 조골세포에 칼슘 침착이 일어나 골세포에 유용한 효과를 나타내었다.



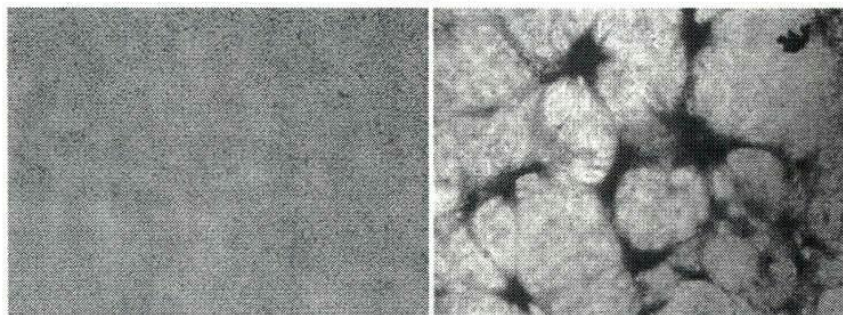
- 조골세포에서 alkaline phosphatase (ALP)에 미치는 영향
골생성 지표로서, 조골세포에서 형성되어 배지로 유리되는 ALP 농도를 측정하였다.



- 조골세포의 콜라겐 형성

Masson Trichrome 염색법을 이용하여 콜라겐 형성정도를 측정한 결과 다음과 같이 콜라겐 형성이 증가됨을 알수 있었다.

30일 후



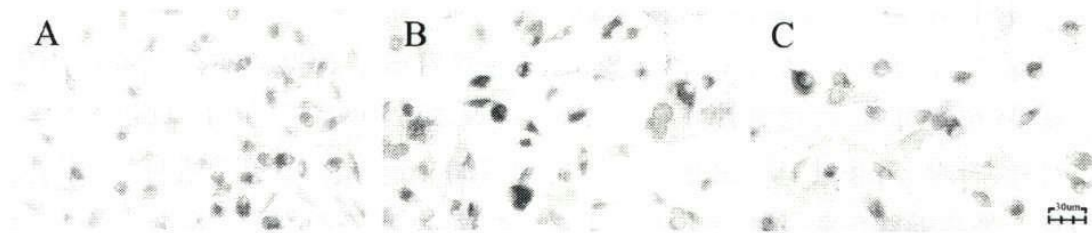
Control

BONEPEP 처리

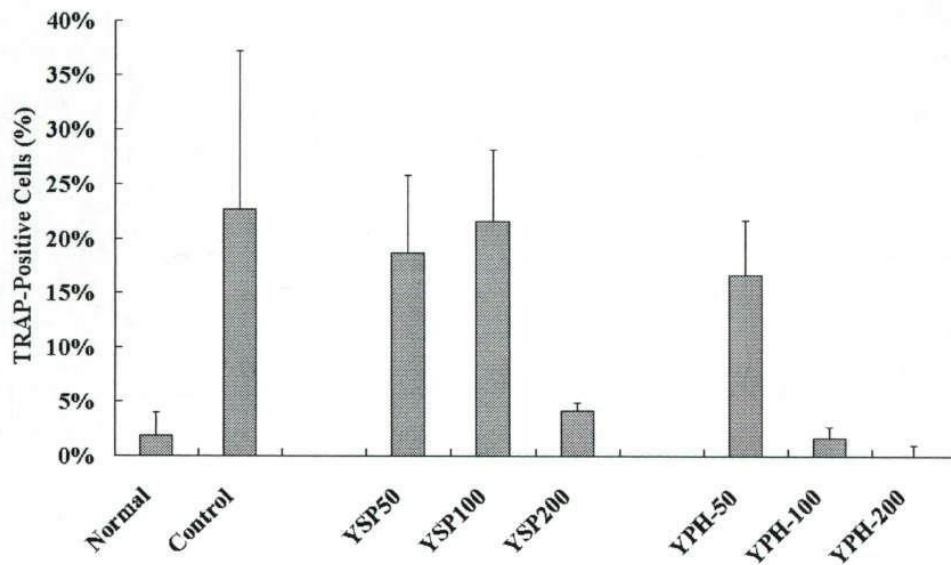
- 파골세포 분화 및 증식억제 효능 평가

TRAP assay를 이용하여 파골세포 분화 및 증식을 측정한 결과, 아래와 같이 정상군(A)에 비해 대조군(B)에서 진하게 염색된 파골세포를 관찰할 수 있었고, 여기에 시료를 투여한 결과 처치군(C)과 같이 분화유도가

억제되었음을 알 수 있었다. 이를 도표로 나타낸 결과, 수용성 난황단백질 (YSP, 200ug/ml) 및 난황 펩타이드 (YPH, 100ug/ml) 처치군에서 각각 감소되었음을 알 수 있었으며, 난황 펩타이드가 수용성 난황단백질에 비하여 더 낮은 농도에서 효과를 나타내어 펩타이드가 더 좋은 효과를 나타내었다.



<TRAP-staining 사진 : A-Normal, B-Control, C-YSP 200 ug/ml treated group.>



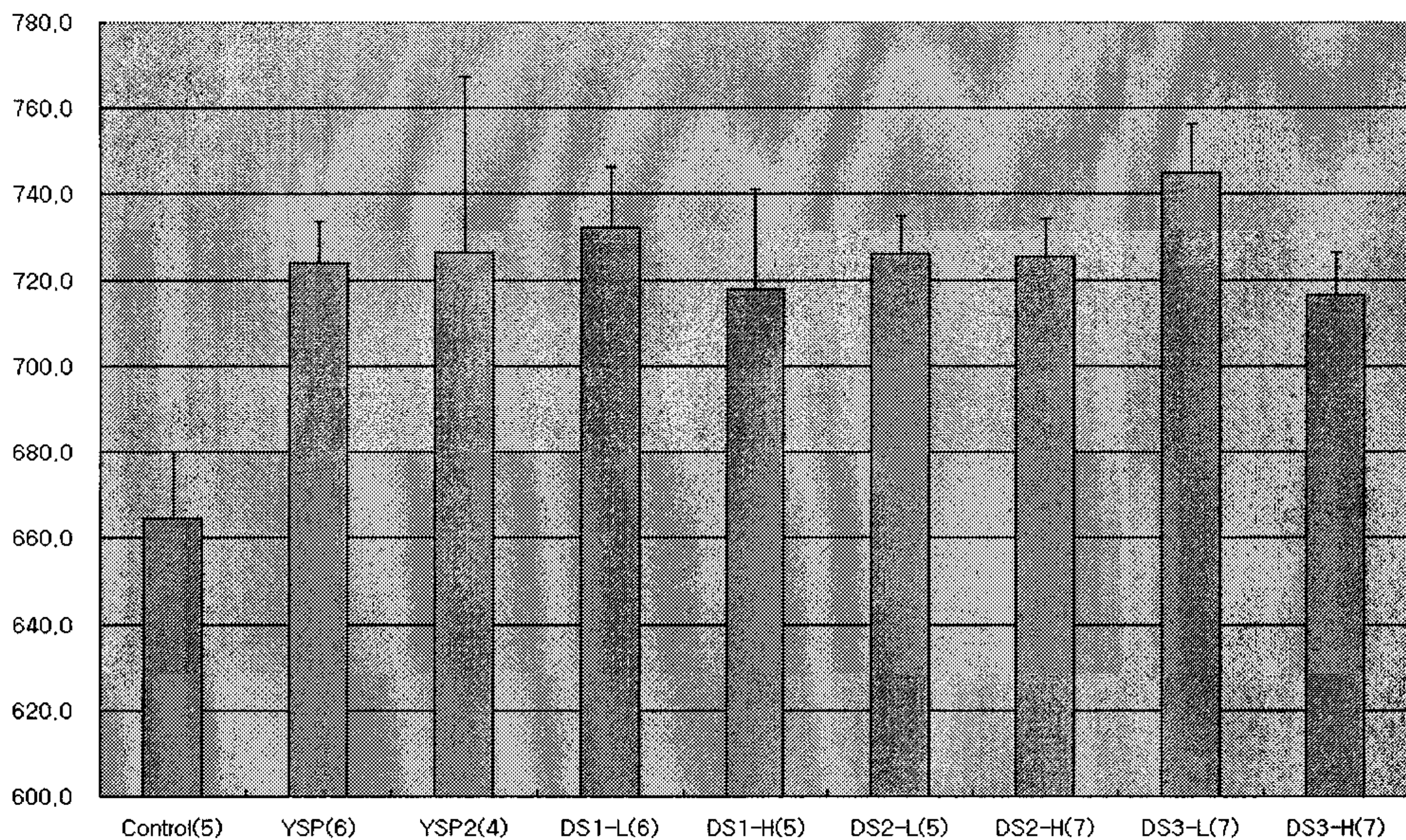
<TRAP-positive 세포의 발생빈도 그래프>

3) 제 2 세부과제 : 달걀로부터 장골 성장촉진 미량소재의 실용화 (세명대학교, 임강현)

- 공장도 scale up 시료의 골길이 성장 촉진 효능평가

: 시료의 장골 길이성장을 측정하기 위해 성장단 절편을 형광현미경으로 관찰하여 골길이성장률을 측정하였다.

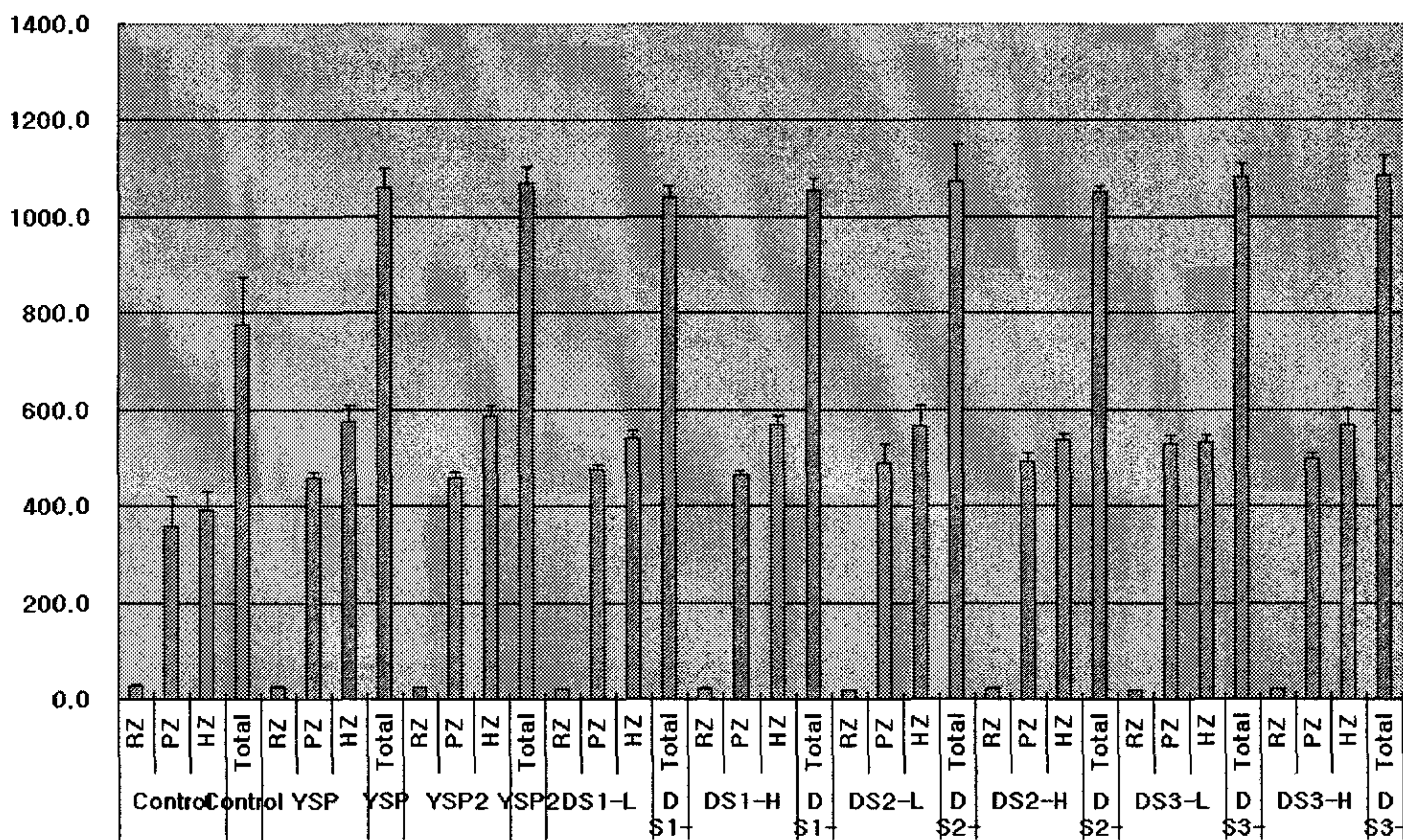
: 시료는 두산에서 공장도 스케일로 생산한 DS1, DS2, DS3 시료를 YSP시료와 비교하여 측정하였다. 그 결과 아래그림과 같이 DS1, DS2, DS3 3개 시료 각각 저용량 및 고용량 (50 and 100 mg/kg) 투여군에서 YSP투여군과 통계학적으로 차이를 관찰할 수 없었다. 따라서 두산에서 공장도 스케일업 공정은 효능을 파괴하지 않는 공정으로 확인 검증되었다.



<골길이성장 촉진효능 그래프>

- 공장도 scale up 시료의 성장판 (growth plate)대사율 측정

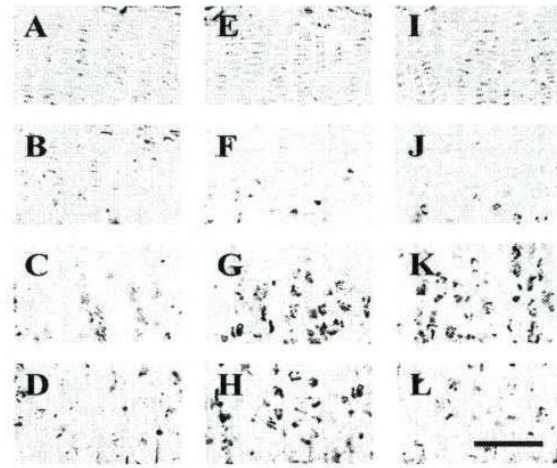
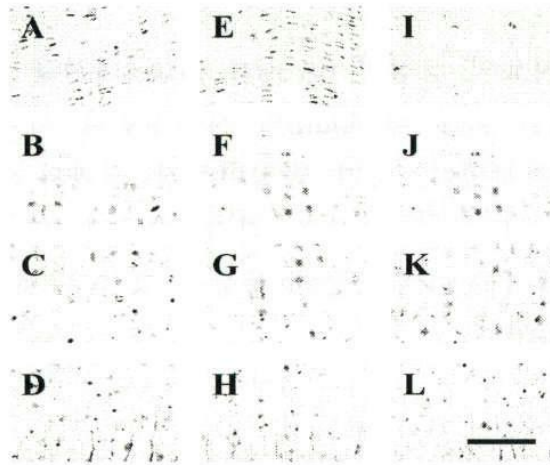
: 성장판 검체채취를 위해 매 40um의 시상절편을 제작한 후 염색하여 성장판의 두께를 측정하였다. 상기 골길이성장 결과와 유사하게 아래 그림과 같이 DS1, DS2, DS3 3개 시료 각각 저용량 및 고용량 (50 and 100 mg/kg) 투여군에서 YSP투여군과 동등한 효능을 보여 통계학적으로 차이를 관찰할 수 없었다.



<성장판대사에 미치는 영향 그래프>

- 공장도 scale up 시료의 골형성 유전자 발현측정

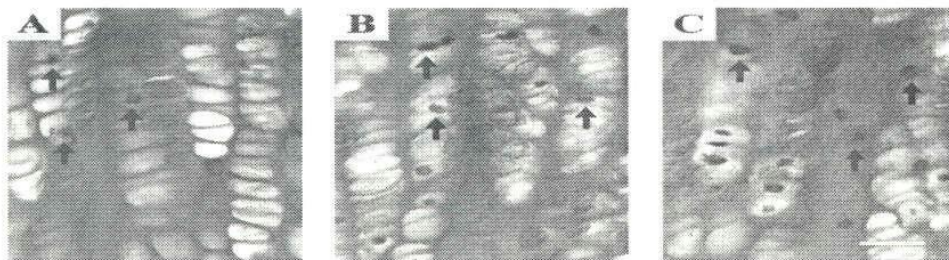
: 골성장 및 형성에 관여한다고 알려져 있는 IGF-1, 및 BMP-2의 발현을 면역화학염색방법을 이용하여 측정하였다. 그 결과 검사시료 모두에서 BMP-2 발현을 증가시키는 양상을 나타내었다.



<성장판 연골세포 IGF-I 및 BMP-2 발현사진>

- BrdU assay

: 항 BrdU항체를 이용하여 면역염색을 수행하여 증식한 연골세포를 관찰한 결과 검사시료 모두에서 면역염색된 연골세포의 수가 증가하였음을 관찰할 수 있었다.



<성장판 연골세포 BrdU staining photograph>

실험계획

- : 공장도 scale up 시료의 골성장촉진 효능을 확인한 결과 효능의 변화 없이 성공적으로 공장생산단계에 진입하였다고 인정되었다. 그러나 상업적인 측면에서 공장생산 단가가 너무 높은 관계로 다른 대량생산 공정을 모색한 결과 여러 가지 프로테아제 공정에 의한 생산방법이 가능성을 보였다. 따라서 프로테아제 공정방법으로 생산된 난황펩타이드 시료에 대한 동물실험연구를 2차년도에 수행하였다.

2. 2차년도 연구개발 수행결과

가. 2차년도 연구개발 목표와 내용

- 본 연구는 달걀로부터 골다공증 개선 및 골 성장촉진 유효 분획 혹은 성분을 분리하고 이의 효능을 in vitro, in vivo 실험방법을 통해 검증하고, 이를 이용한 의약, 식품의약, 기능성식품의 중간원료로 소재화 하는데 연구개발의 최종목표를 두고 있다.
- 본 연구의 2차년도 연구개발목표는 식품소재의 대량생산공정을 확립하고 이를 통해 생산된 소재에 대한 기능성 효과를 판단하는데 있다.

나. 2차년도 연구개발 결과

1) 가공화공정 개발 (참여기업, 제 1세부, 제2 세부)

i) 효소의 가수분해를 이용한 대량 생산공정의 개발

난황단백 peptide (이하, 본펩)의 대량 생산을 위한 공정을 개발하였다. 난황으로부터 lipid 성분을 분리하여 생산한 후 부산물로서 얻게 되는 탈지난황분말의 생산공정과 이 탈지난황분말을 기질로 하는 단백질분해효소인 프로테아제 (protease)의 선정은 지난 1차년도 보고서에 기술한 바와 같이 진행하였다. 특히, 프로테아제의 선정에 있어서는 생산 수율이 높으면서 가격이 싸고, 식품산업적으로 적용이 타당하면서 유효성분의 파괴를 유도하지 아니하는 점을 중점적으로 고려하여 선별하였다.

전체적인 본펩의 생산공정은 탈지난황분말을 시작물질로 하여 효소반응, 효소실활, 여분의 유지성분 제거, 불용성 단백질 성분의 제거, 유효성분의 여과 및 분리, 제품살균, 건조공정, 그리고 포장공정으로 이루어져 있다. 각 세부 공정에 대하여 자세히 설명하기로 하

겠다.

- 효소반응공정

식용으로 사용가능 한 물을 반응하고자 하는 탈지난황박의 5배수로 준비해둔다. 반응탱크는 교반기를 탑재하며, 스팀을 이용하여 온도를 올릴 수 있는 설비가 되어 있어야 한다. 탈지난황분말을 투입하기 전에 물이 들어있는 반응탱크는 미리 온도가 55 ℃부근으로 승온시켜진 상태이어야 하며, 여기에 정량의 탈지난황박을 교반과 함께 투입하여 준다. 이때, 교반기를 충분한 속도로 교반시켜 주어야 하며 탈지난황박을 일정한 속도로 투입시켜 준다. 최종적으로 탈지난황박이 온수에서 균질하게 잘 혼합이 된 것을 확인하여야 한다. 균일하게 섞인 용액의 온도가 55 ℃, pH 7.0인 것을 확인한 후, 효소를 투입시킨다. 효소의 양은 반응하고자 하는 탈지난황분말의 5% w/w의 양으로 맞추어 준다. 효소를 투입한 시간으로부터 3시간 동안 반응을 지속시킨다. 반응이 되는 동안에는 온도와 교반기의 속도가 일정하게 유지되도록 유의하여야 한다.

- 효소실활공정

효소를 투입한 후, 3시간이 경과되면 반응탱크에 스팀을 공급하여 온도를 90 ℃까지 승온시킨다. 90 ℃에서 5 ~10 분 정도 반응액을 유지시키며 효소의 실활을 유도하게 된다. 이렇게 함으로써 원하지 않는 효소의 비 특이적 분해를 방지할 수 있게 된다.

- 분리/여과 공정

반응이 종료된 반응액을 데칸터와 필터프레스를 이용하여 분리/여과 공정을 진행시킨다. 먼저, 반응액을 데칸터로 투입시키며 불용성 단백질성분을 일차 분리 시킨다. 이때, 분리되어 나오는 불용성 물질은 적절한 방법을 이용하여 폐기 처리한다. 데칸터 작업이 종료된 후의 용액은 아직 청징도가 높지 않은 제품이기에 때문에 필터 프레스를 이용한 추가적인 여과 공정을 진행하여야 한다. 필터 프레스를 이용할 때에는 필터 에이드 (Filter Aid)로서 규조토를 첨가하여 준다. 첨가된 규조토는 전량 필터 프레스에서 여과됨으로 제품에 섞이지는 않는다. 필터 프레스는 2회 반복하여 실시하는데, 계속적으로 여과 이후의 제품의 청징

도를 확인하여야 한다.

- 살균 공정

여과가 모두 종료된 반응액을 살균탱크로 이동시킨다. 살균탱크 역시 교반기를 탑재하여 천천히 교반을 진행시켜 주면서 살균을 진행하였다. 살균의 조건은 스팀을 이용하여 반응액을 95℃ 정도로 30분간 유지시켜 주는 것이다. 살균이 종료된 반응액 역시 청징한 상태를 유지하는지를 최종적으로 확인하여야 한다.

- 건조 공정

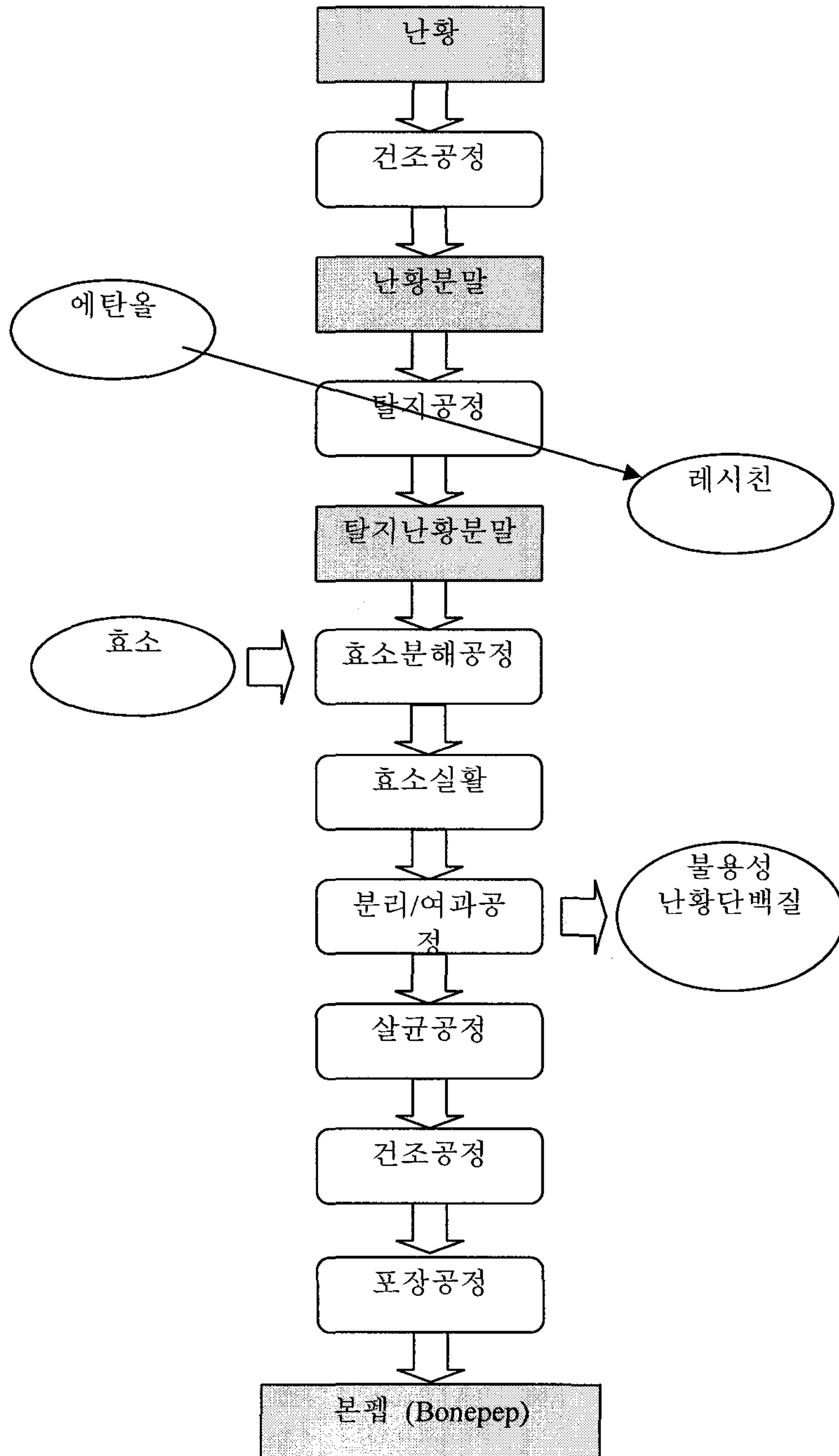
살균이 종료된 반응액은 분무건조기 (Spray Dryer)를 이용하여 건조, 분말화 공정을 거치게 된다. 일반적으로, 살균이 종료된 본웹의 액상 용액은 6~7 brix 정도의 농도를 가지게 된다. 이 액의 농도조건에 맞추어 분무건조기의 온도와 처리 시간을 결정하게 된다.

- 포장공정

분무건조기로부터 나오는 본웹의 완제품은 5 kg 단위씩 Polyethylene Film에 1차 적으로 포장을 한 뒤, 2차로 종이 포장을 한다. 흡습성이 강한 제품이므로 공기에 노출되지 않도록 포장을 잘 하여야 한다.

이렇듯, 산업적으로 최적화하여 경제적인 본웹의 대량생산이 가능한 공정을 개발하였으며, 이는 그림 1에 나타낸 바와 같다.

그림 1. 수용성 본펩의 제조 방법



2. 제품의 사업화 진행 상황

i) 본웹 제품의 법적 등록 현황

(주) 두산 R&D 센터는 본웹 (Bonepep[®])을 한국식품의약품안전청에 “일반식품”내의 “기타 알 가공품”으로 품목제조신고를 마쳤다. 제품의 규격 또한 표 1과 같이 안전한 식품의 규격을 맞추고 생산을 진행하고 있다.

표 1. 본웹 제품의 규격

Test Item	Specification
Appearance	Light - yellow powder with unique flavor
Protein	≥ 60%
Lipid	≤ 1%
Heavy Metals	≤ 10 ppm
Arsenic	≤ 1.5 ppm
Total aerobic	≤ 3,000 CFU/g
<i>Coliforms, Salmonella</i>	negative

ii) 본웹 제품의 생산물량

(주) 두산 R&D 센터는 현재 연간 약 140 ton 정도의 탈지난황박을 자체 수급할 수 있으며, 이를 이용하여 본웹 제품을 만드는 공정을 개발하였다. 종래의 단순 부산물이었던 탈지난황박이 고부가가치의 제품으로 전환되는 것이다. 현재 대량 생산에서는 약 20%정도의 수율로서 본웹의 생산이 진행이 되기 때문에 (주) 두산 R&D 센터에서는 현재 연간 20~24 ton 규모의 본웹 제품을 생산 할 수 있는 능력을 가지고 있다.

iii) 본웹 제품의 사업화 진행 상황

본웹 제품은 물에 매우 잘 녹으며 여타의 침전물이 확인 되지 않는 것을 그 특징으로 하며, 성장기 아동 및 청소년의 골 성장 및

중년기 이후의 골다공증 예방 차원의 개념으로 현재 마케팅을 진행하고 있다. 일차적으로 국내의 유명 유업체에 제품을 소개하는 프로모션을 진행하여, 우유제품, 요쿠르트 제품, 그 외 기타 유가공 제품에 소재로서 본웹 제품을 적극 홍보 중에 있다. 또한, 여타의 식품가공회사와의 미팅을 통하여 긍정적인 반응을 얻어가고 있는 중이다. 이 외에도, 국내뿐만 아니라, 중국, 일본을 포함하는 아시아 시장과 유럽시장으로의 진출도 현재 진행되고 있다.

iv) 본웹 제품의 매출 현황

본웹 제품은 현재까지 700 kg 이상 생산이 완료 되었다. 이들 대부분은 일본의 (주) Pharma Foods International이라는 회사에 전량 판매가 되었다. 이 회사를 기점으로 하여 현재 일본의 요쿠르트 업체와 사탕제조 업체, 건강기능식품 업체에 각각 납품이 결정되었으며, 매 년 꾸준한 매출 증가가 기대되고 있는 실정이다. 또한, 현재 “키 성장” 등에 관심이 매우 높으며, 시장 자체가 매우 큰 중국 시장을 보다 더 적극적으로 개척하고자 노력하고 있다.

2) 제 1 세부과제 : 달걀로부터 골다공증 골질량개선 미량소재의 실용화 (한서대학교, 김혜경)

○ 골다공증 동물모델에서 골 대사를 측정하여 시제품의 생체효능을 평가하는 것이 제1세부과제의 2차년도 연구과제의 핵심이다. 이를 위하여 아래 3가지 종류의 실험을 수행하였다.

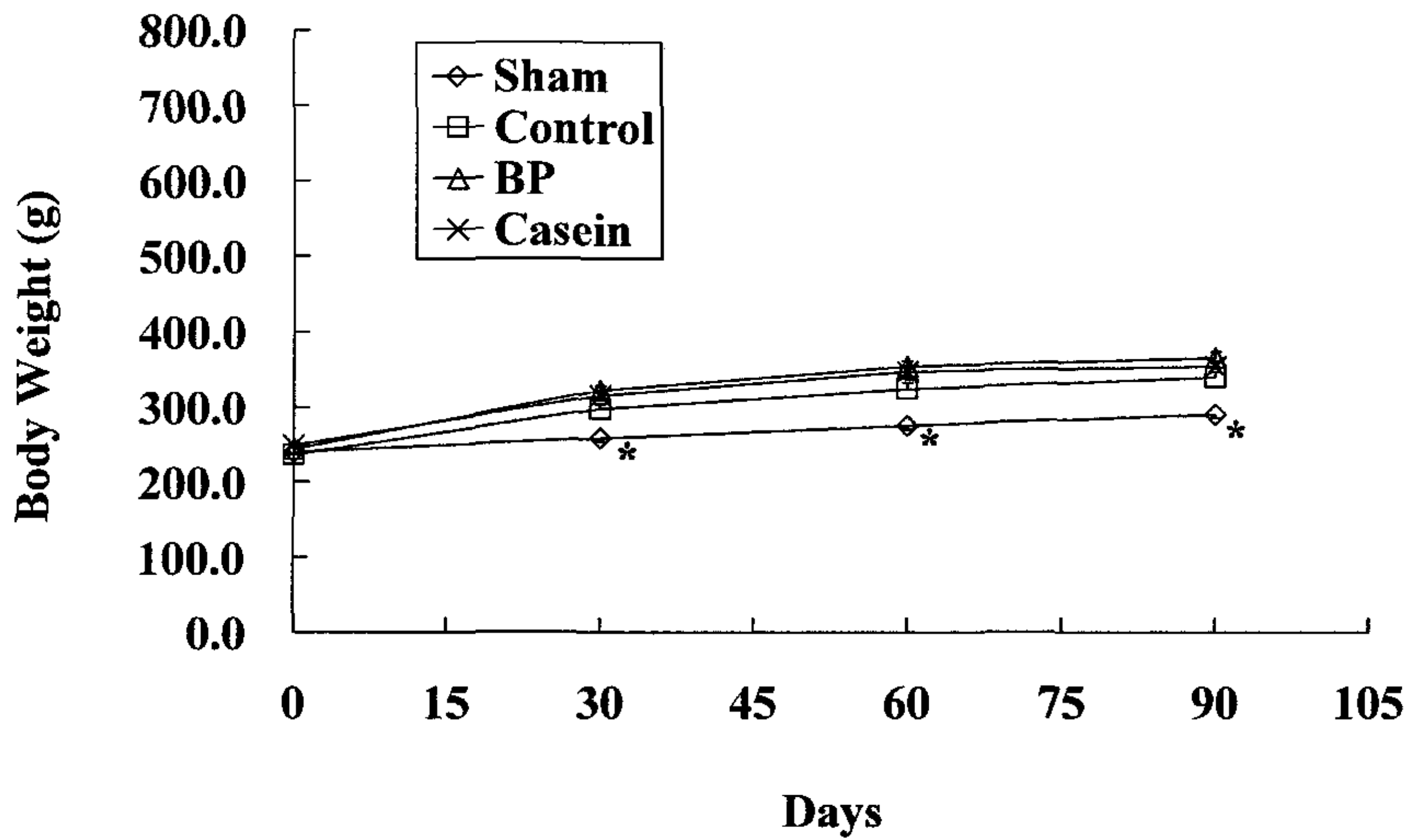
- 골밀도, 골량측정

· 골다공증 모델확립 및 시료투여

골다공증 동물모델에 대한 본웹의 활성을 알아보기 위하여 흰쥐의 난소를 적출한 후 3개월간 본웹(BP)을 투여하여 난소를 적출한 후 일반사료만 섭취시킨 군(Control)과 본웹과 동량의 우유단백 투여군(Casein) 그리고 난소적출을 시행하지 않고 가짜수술만 시행한 군(Sham)의 4개군으로 나누어 실험을 수행하였다.

· 골다공증 모델 체중변화

골다공증 동물모델의 체중변화를 측정한 결과 난소를 적출하지 않은 Sham군은 체중변화를 거의 보이지 않았으나, 난소 적출한 나머지 3개군 모두 유의한 체중의 증가를 나타내었다(그림 2). 본 결과는 난소적출이 각 동물에 동등하게 시행되었다는 것을 암시하는 결과이다. 난소적출로 인한 체중증가가 모든 동물에서 공통으로 확인되었다

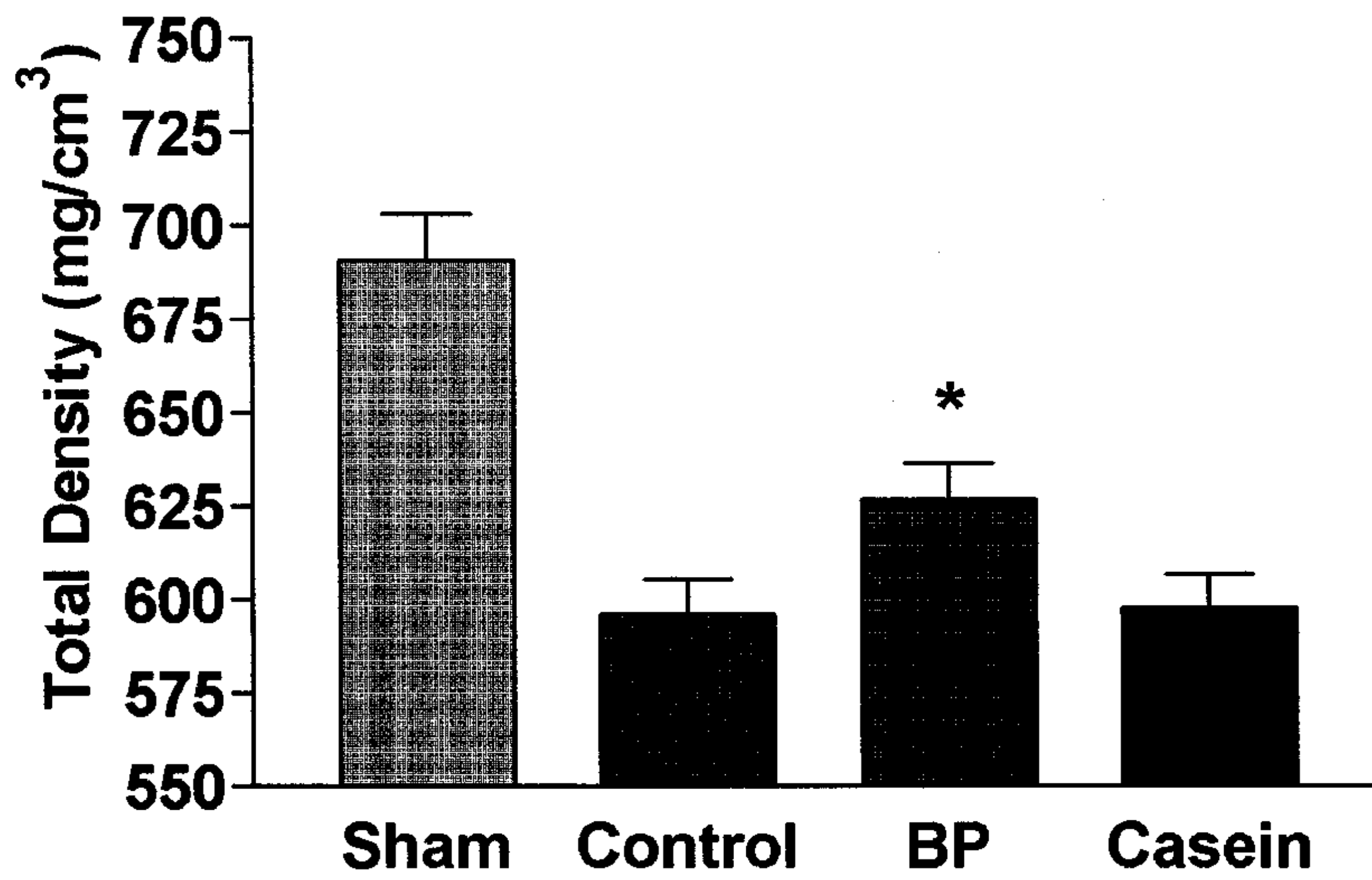


<그림 2> 골다공증 동물모델의 체중변화 그래프.

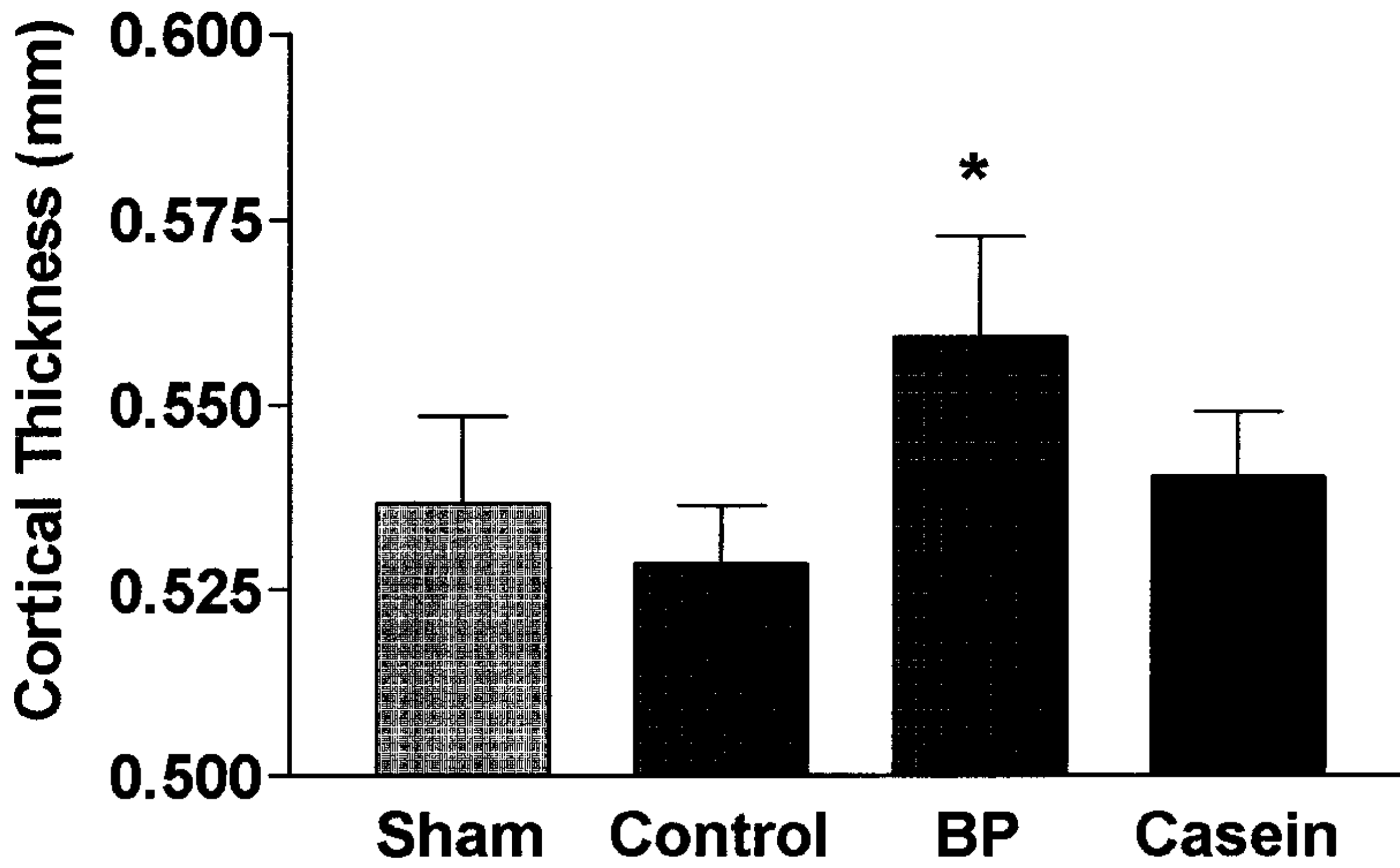
· 골밀도 변화

골다공증 동물모델의 골밀도를 pQCT를 이용하여 측정한 결과 난소를 적출하지 않은 Sham군에 비하여 난소적출한 Control군은 골밀도가 급격하게 떨어졌음을 알수 있었다. 여기에 본펩을 투여한 BP군은 통계적으로 유의하게 골밀도저하를 막았음을 확인할 수 있었다(그림 3). Casein군은 유의한 효과를 나타내지 않았다.

또한 골을 형성하고 있는 부분 중 바깥쪽 부분인 치밀골(Cortical part)의 두께를 측정한 결과 난소적출한 Control군에 비해 본펩을 투여한 BP군에서 통계적으로 유의한 치밀골 두께증가를 확인할 수 있었다(그림 4). Casein군은 역시 유의한 효과를 나타내지 않았다.



<그림 3> 골다공증 동물모델의 골밀도 측정결과 그래프.

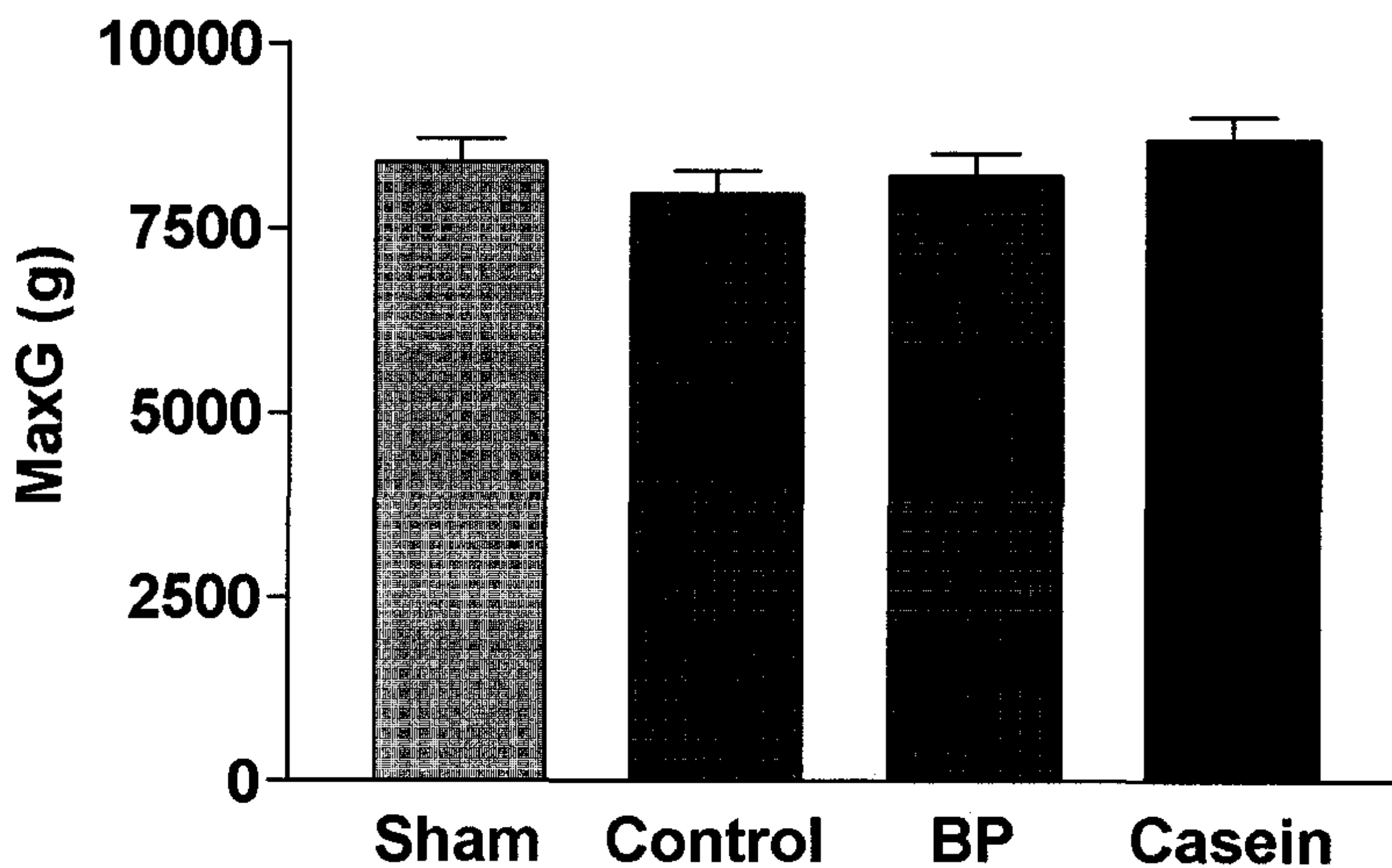


<그림 4> 골다공증 동물모델의 골밀도 중 치밀골두께 측정결과.

· 골강도 시험결과

골다공증 동물모델의 골강도를 레오미터를 이용하여 측정한 결과 난소

를 적출하지 않은 Sham군에 비하여 난소적출한 Control군의 골강도가 약간 떨어지는 결과를 얻을 수 있었고, 여기에 본펩을 투여한 BP군은 골강도저하를 방어하는 경향을 나타내었으나 모든 군에서 통계적인 유의성은 확인할 수 없었다(그림 5).



<그림 5> 골다공증 동물모델의 골절에 대한 저항력측정 결과그래프.

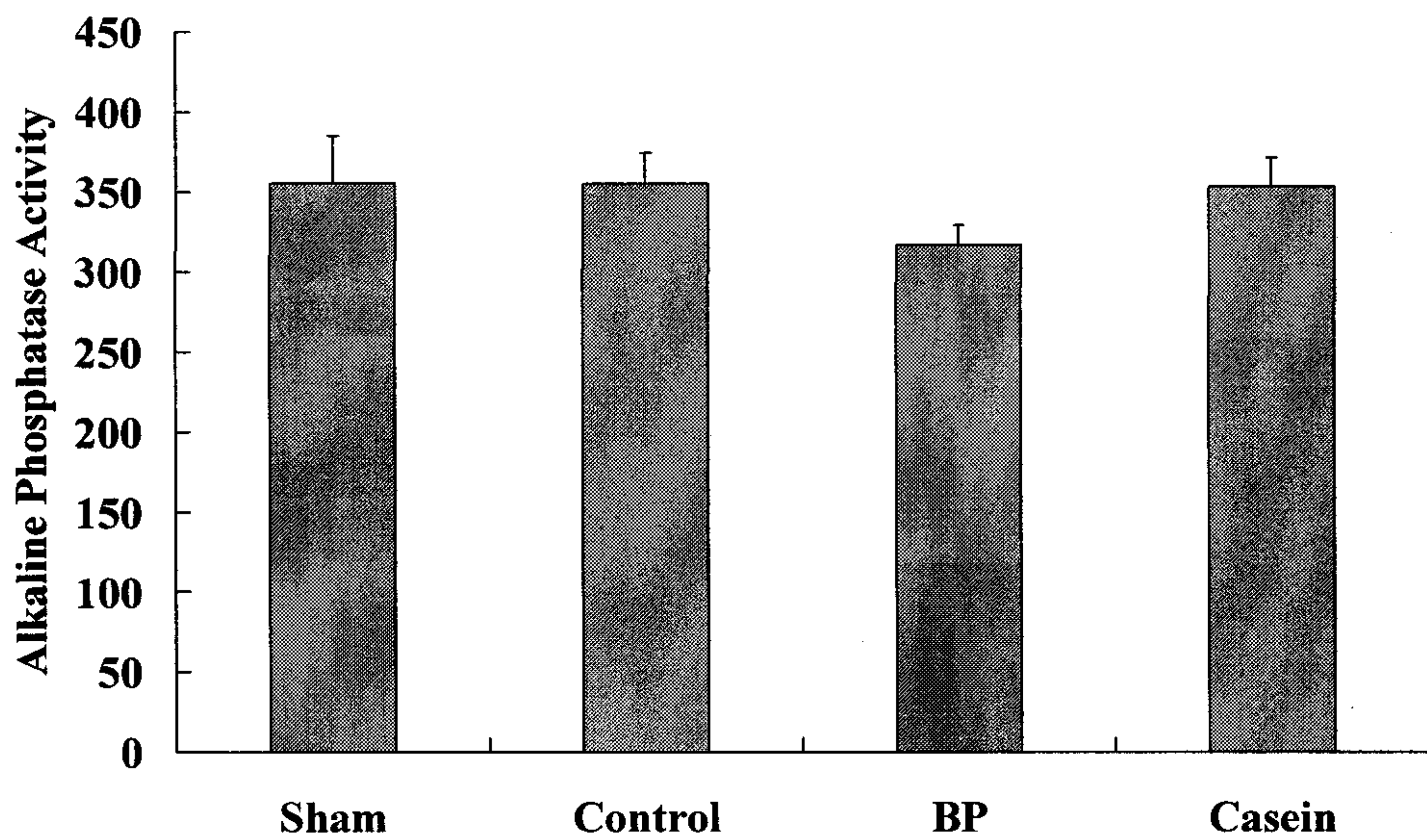
- 골형성 유전자 및 지표의 생화학적 분석

· 골형성 유전자 및 지표

골다공증 동물모델에 대한 본펩의 활성을 알아보기 위한 유전자 및 지표는 alkaline phosphatase, 부갑상선호르몬, Gla형 osteocalcin을 선정하여 측정에 사용하였다.

· Alkaline phosphatase 활성변화

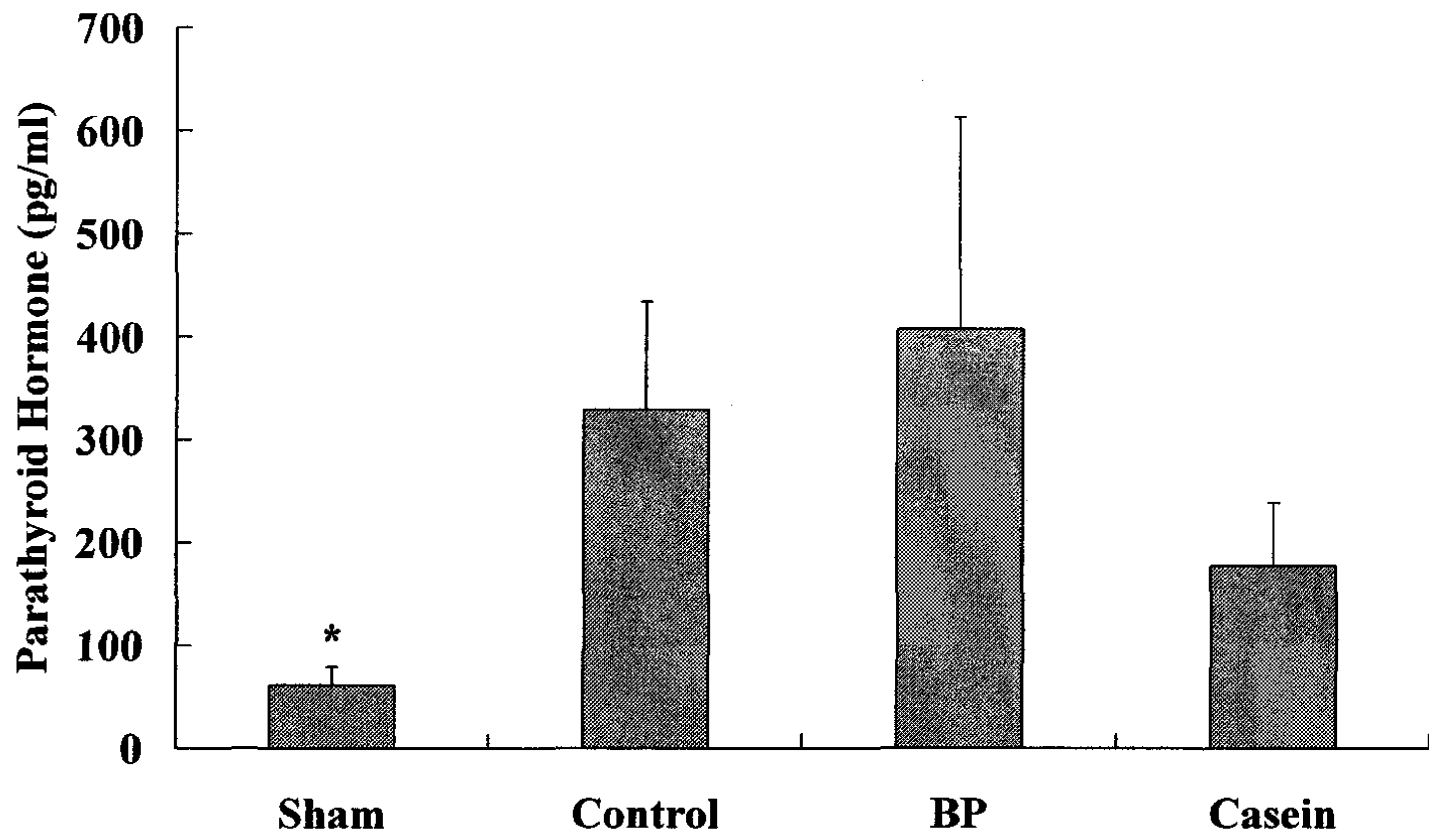
그림 6과 같이 alkaline phosphatase활성을 측정한 결과 모든 군에서 유의한 변화를 관찰할 수 없었다. 이는 장기간의 실험모델의 특성상 유의한 변화를 관찰하기 어려운 것으로 생각된다.



<그림 6> 골다공증 동물모델의 혈액 중 alkaline phosphatase 활성결과그래프.

· 부갑상선 호르몬

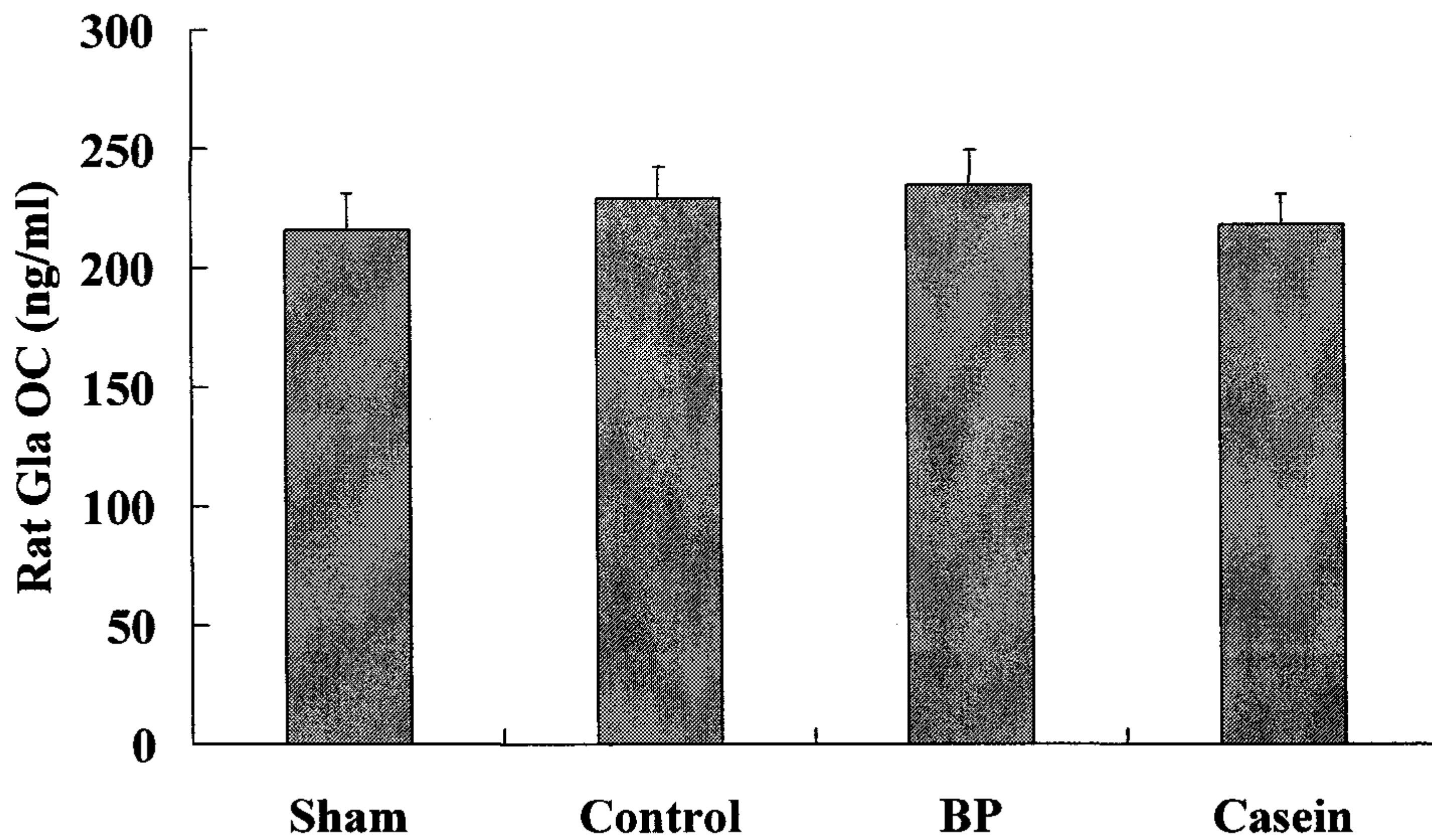
그림 7과 같이 부갑상선호르몬을 측정한 결과 Sham군에 비해 난소를 적출한 Control군에서 통계적으로 유의한 증가를 관찰할 수 있었고, 이는 BP군, Casein군 모두에서도 공통적인 현상으로 나타났다. 특히 BP 투여군에서 유의하지는 않으나 가장 많은 증가를 나타내었다.



<그림 7> 골다공증 동물모델의 혈액 중 부갑상선호르몬 측정 결과그래프.

· Gla형 osteocalcin 활성변화

그림 8과 같이 Gla형 osteocalcin 활성을 측정한 결과 모든 군에서 유의한 변화를 관찰할 수 없었다. 그러나 BP 투여군에서 통계적으로 유의하지는 않으나 가장 많은 증가를 관찰할 수 있었다.



<그림 8> 골다공증 동물모델의 혈액 중 Gla형 osteocalcin 측정 결과그래프.

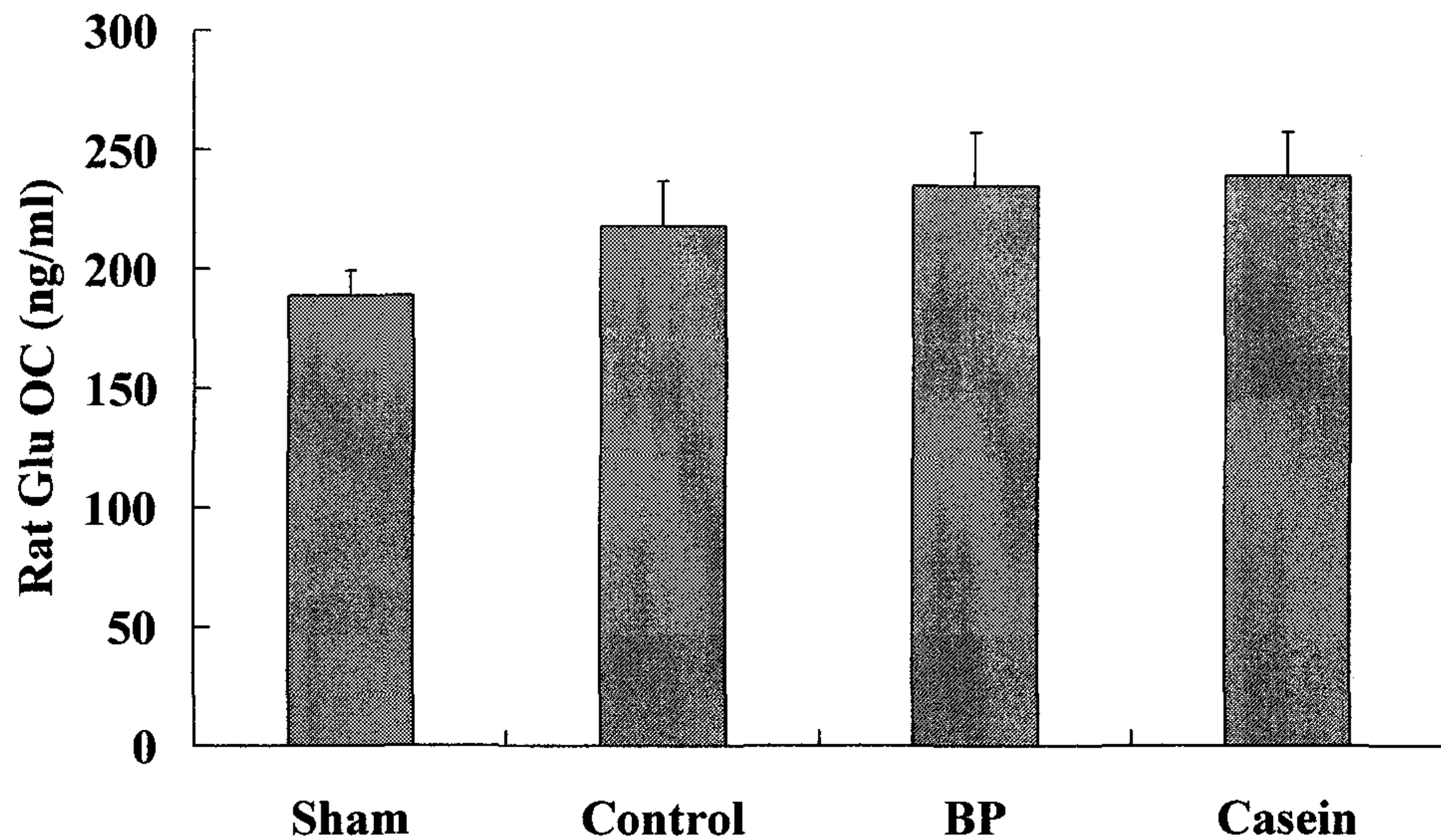
- 골흡수 지표의 생화학적 분석

· 골흡수 지표

골다공증 동물모델에 대한 본웹의 활성을 알아보기 위한 골흡수 지표는 Glu형 osteocalcin을 선정하여 측정에 사용하였다.

· Glu형 osteocalcin 활성변화

그림 9와 같이 Glu형 osteocalcin 활성을 측정한 결과 모든 군에서 유의한 변화를 관찰할 수 없었다. 그러나 Control, BP, Casein 군에서 통계적으로 유의하지는 않으나 증가하는 경향을 관찰할 수 있었다.



<그림 9> 골다공증 동물모델의 혈액 중 Glu형 osteocalcin 측정 결과그래프.

○ 이상과 같이 본웹의 골다공증 동물모델에 대한 활성을 측정한 결과, 본웹은 골다공증 동물모델의 골밀도 증가에 유의한 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 이는 향후 시제품의 유효성 확립자료로 활용이 가능할 것으로 생각된다.

3) 제 2 세부과제 : 달걀로부터 장골 성장촉진 미량소재의 실용화 (세명대학교, 임강현)

○ 본 연구과제의 시제품에 대한 성장기 흰쥐에서의 장골성장 생체효능 평가가 제2세부과제의 2차년도 연구과제의 핵심이다. 이를 위하여 아래 4가지 종류의 실험을 수행하였다.

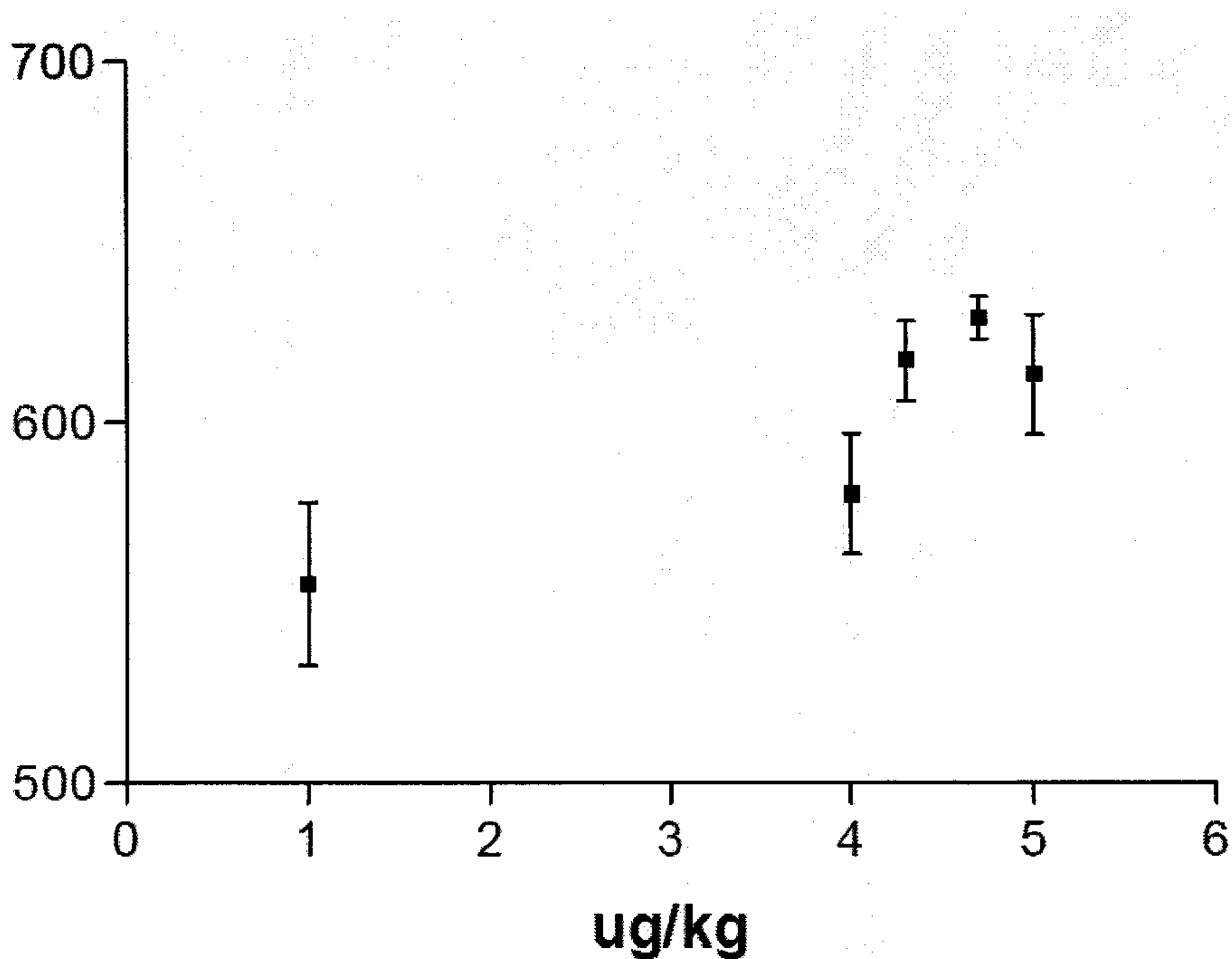
- 골길이 성장 측정
- 시료투여

장골성장 동물모델에 대한 본웹의 활성을 알아보기 위하여 성장기 흰쥐

에게 본펩(BP)을 투여하여 본펩의 효능을 평가하였다.

· ED50 측정

본펩의 생체효율을 측정하고자 nonlinear regression analysis를 수행하여 ED50을 측정한 결과 9.6 mg/kg로 측정되었다(그림 10).



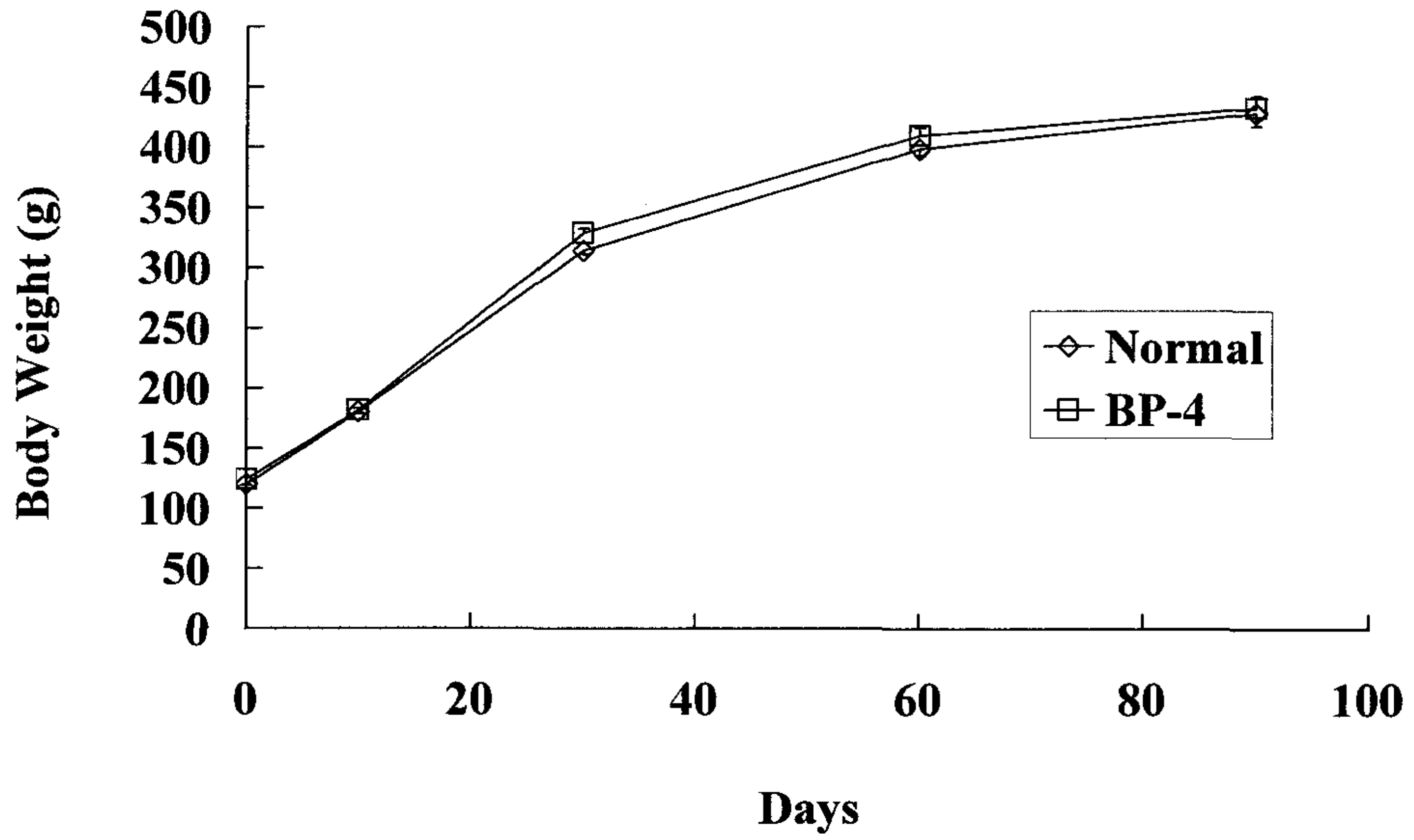
<그림 10> 본펩의 성장촉진 효능 ED50측정 결과그래프.

· 장기간 투여 후 체중변화 및 성장효능평가

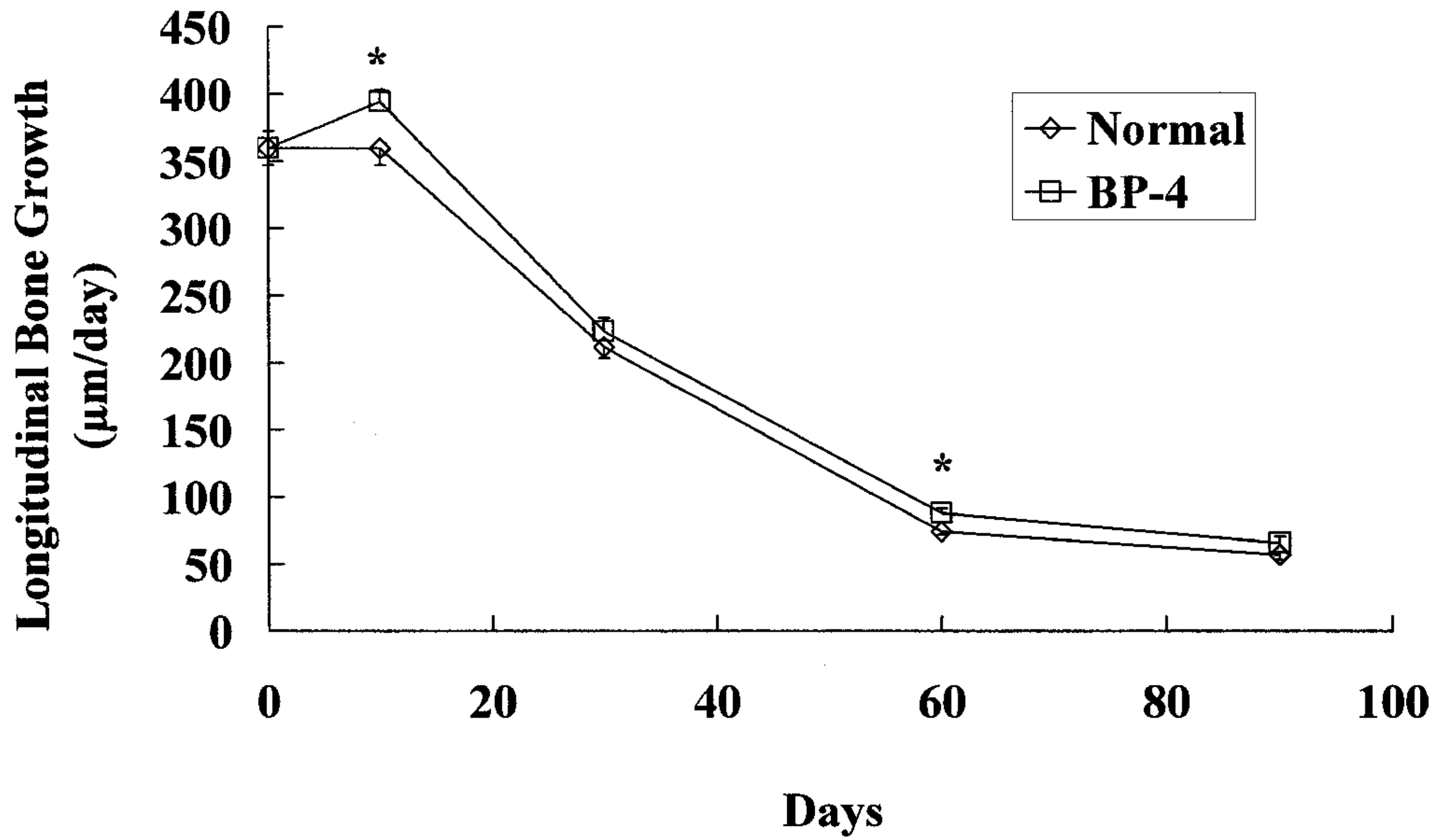
본펩의 장기간 투여 후 효능을 평가하기 위해 3개월간 투여하였다. 체중을 측정한 결과 그림 11과 같이 정상식이 투여군과 별다른 차이를 관찰할 수 없었다.

그러나 성장촉진 효능은 그림 12에서 나타나있듯이 본펩 투여군에서 거의 전체 측정 기간동안 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 성장촉진

효능을 관찰할 수 있었다.



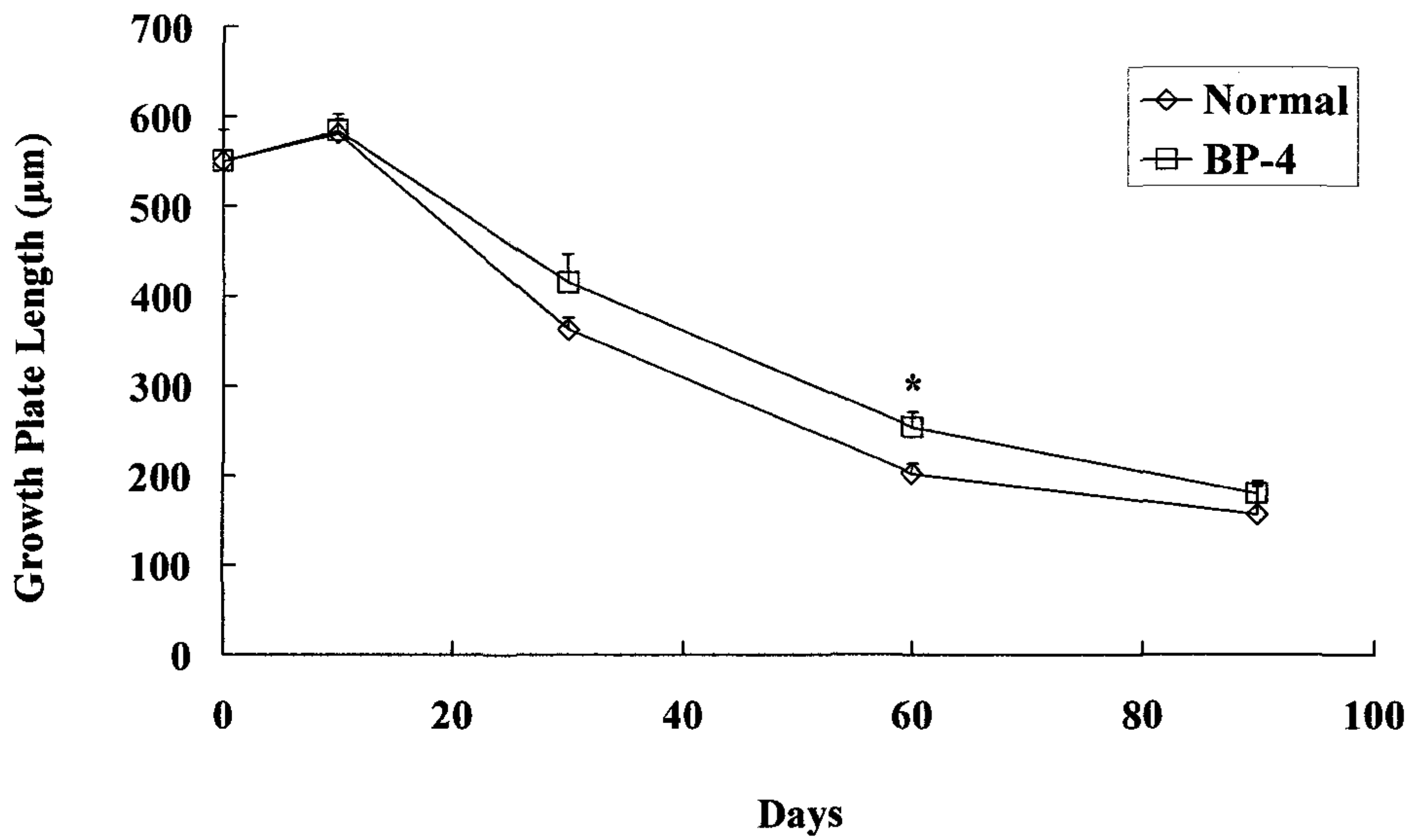
<그림 11> 본웹 투여에 따른 체중변화 그래프.



<그림 12> 본펩 투여에 따른 성장촉진 결과 그래프.

- 성장판 (growth plate)대사율 측정

본펩의 장기간 투여후 효능을 평가하기 위해 3개월간 투여하였다. 성장판 대사율을 측정한 결과 그림 13과 같이 본펩투여군에서 대조군에 비하여 유의한 성장판 대사율증진 효능이 있음을 관찰할 수 있었다

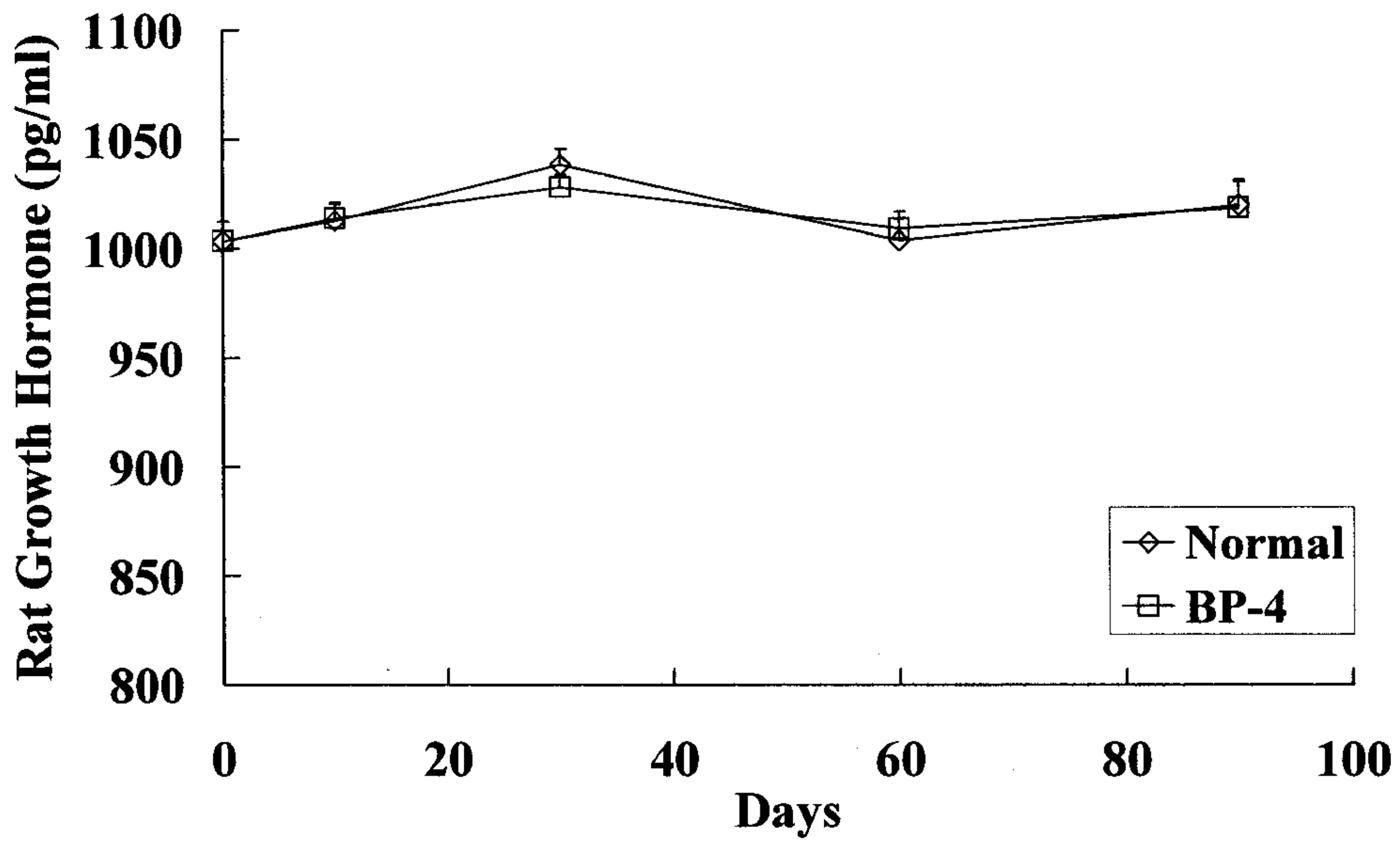


<그림 13> 본펩 투여에 따른 성장판 대사율 결과 그래프.

- 성장호르몬 및 골형성 유전자 발현측정

· 본펩 투여후 성장호르몬의 변화

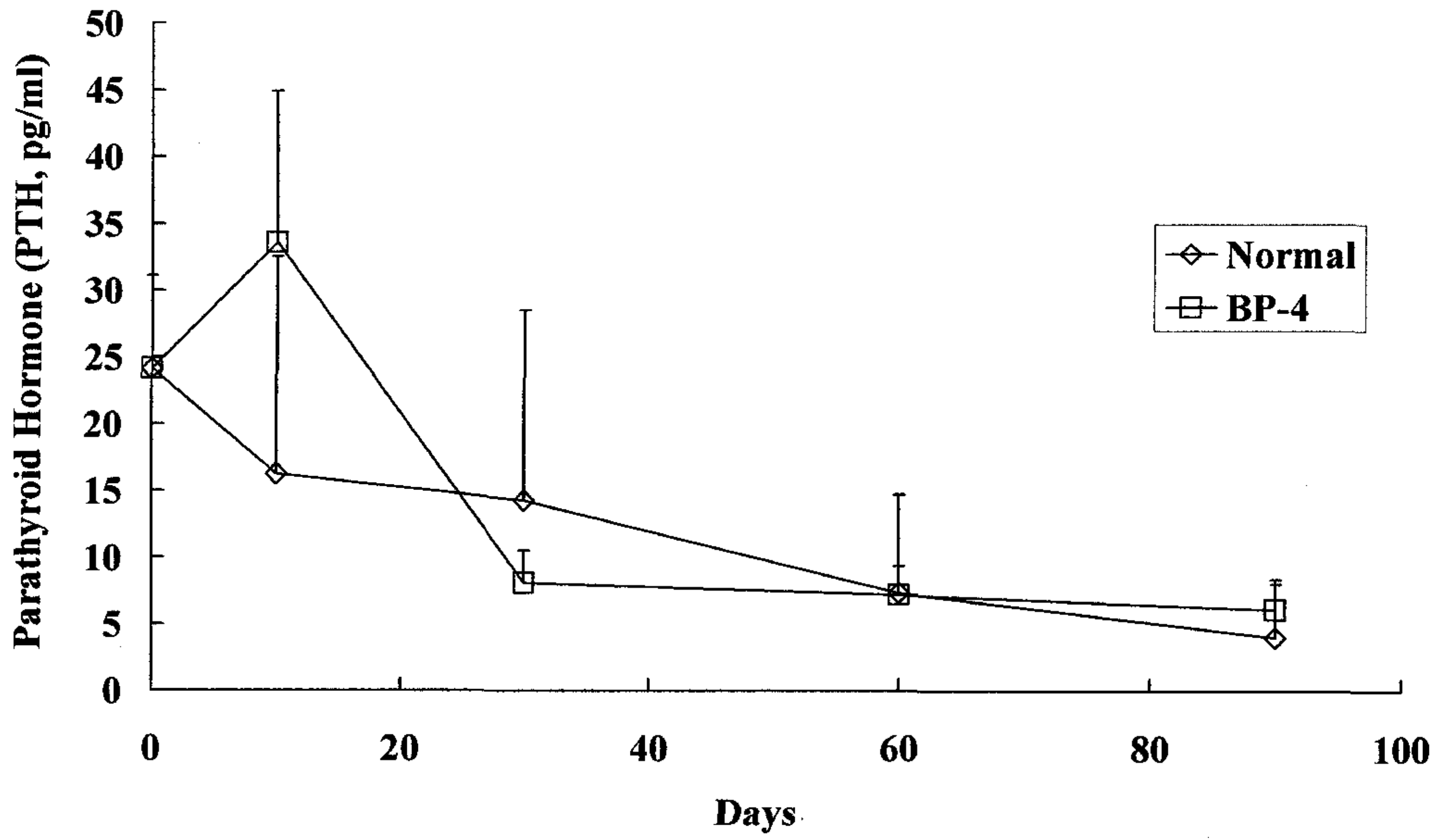
본펩 투여후 성장호르몬의 변화를 측정한 결과 그림 14와 같이 정상식이투여군과 별다른 차이를 관찰할 수 없었다.



<그림 14> 본펩 투여에 따른 성장호르몬 결과 그래프.

· 본펩 투여후 부갑상선호르몬의 변화

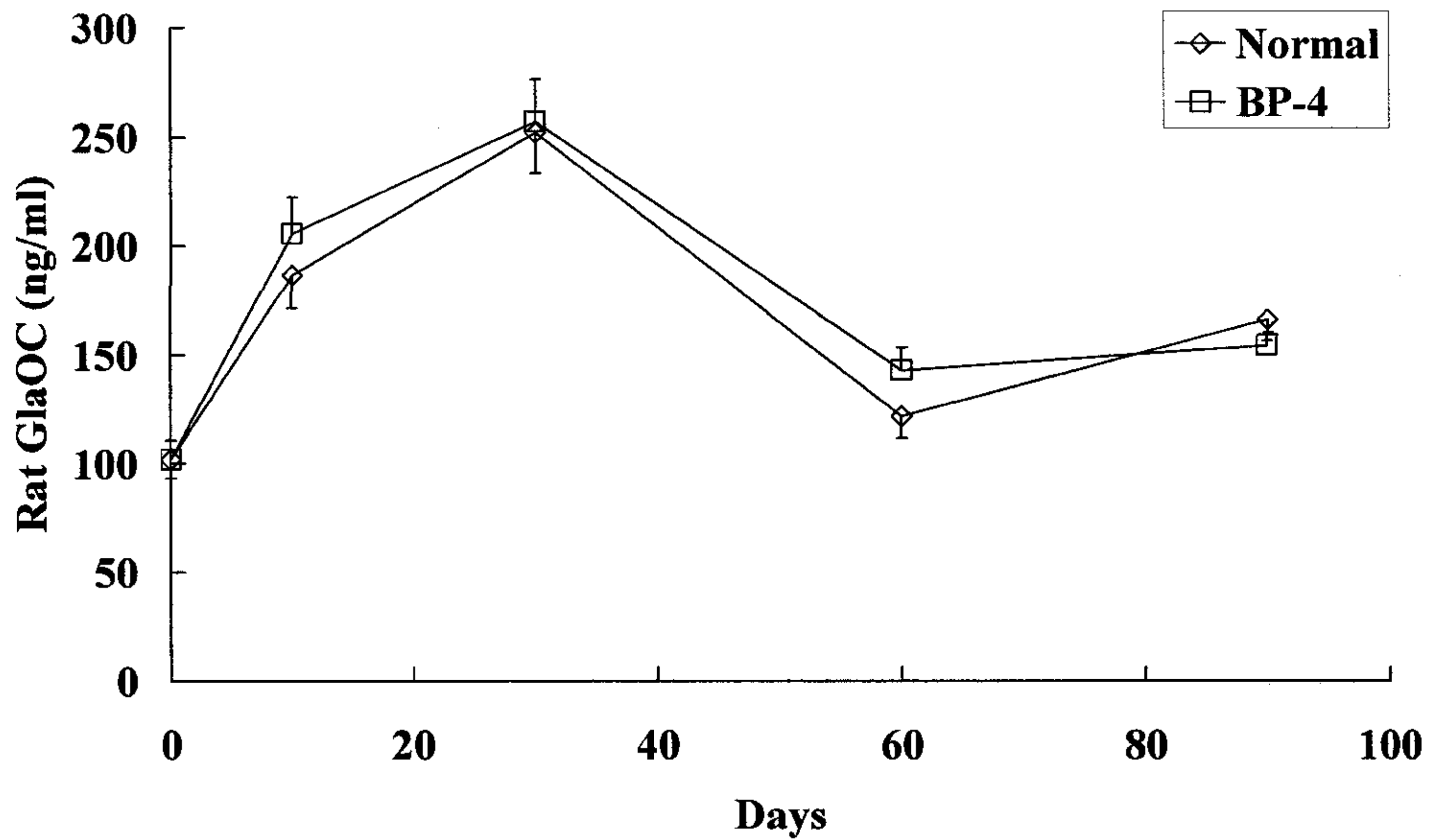
본펩 투여후 부갑상선호르몬의 변화를 측정한 결과 그림 15와 같이 정상식이투여군과 별다른 차이를 관찰할 수 없었다. 10일째 결과에서 약간 증가하는 경향을 보였다.



<그림 15> 본펩 투여에 따른 부갑상선호르몬 결과 그래프.

· 본펩 투여후 Gla형 osteocalcin호르몬의 변화

본펩 투여후 Gla형 osteocalcin 호르몬의 변화를 측정한 결과 그림 16 과 같이 정상식이투여군과 별다른 차이를 관찰할 수 없었으나 약간 증가하는 경향을 나타내었다.

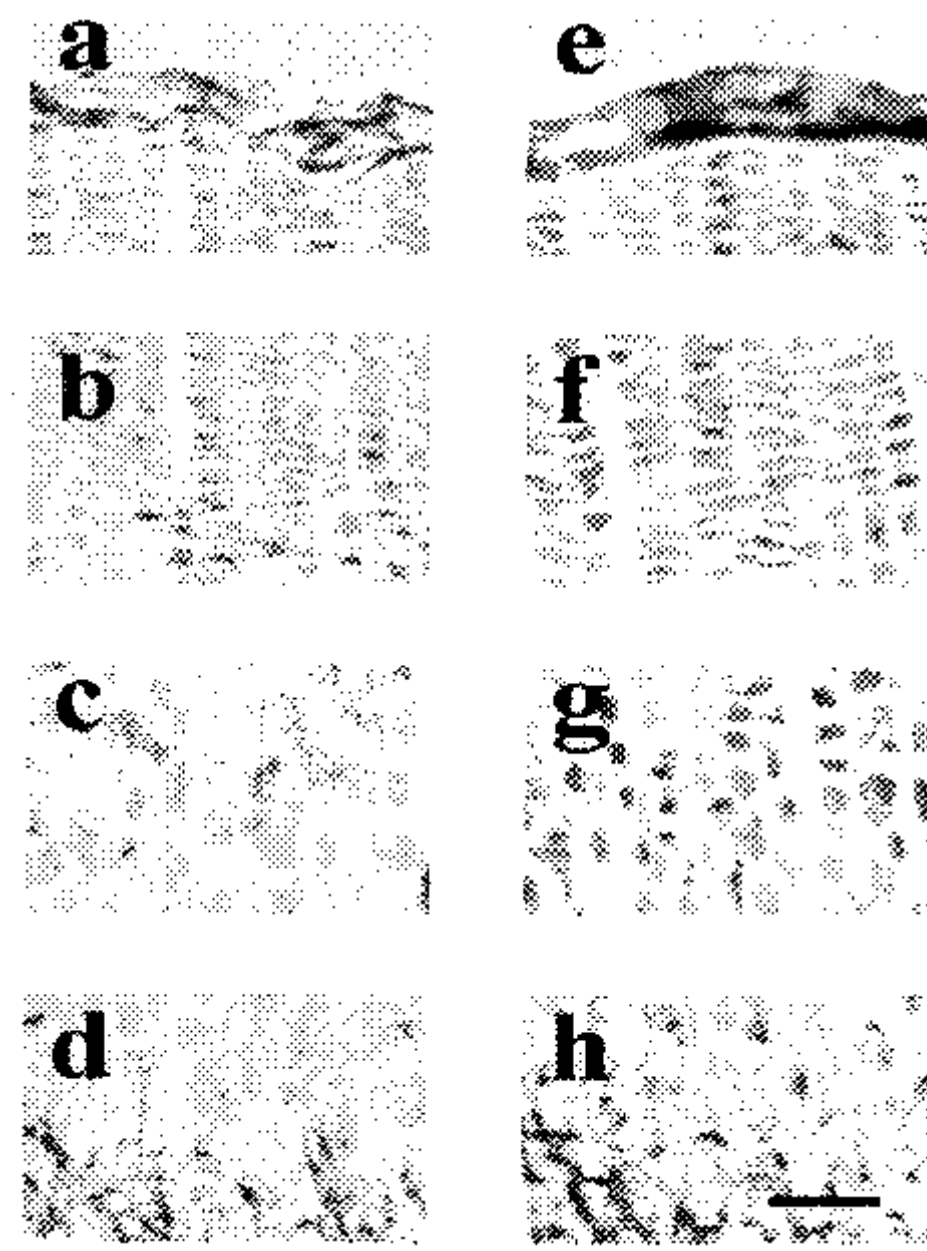


<그림 16> 본웹 투여에 따른 Gla형 osteocalcin 결과 그래프.

- BrdU assay, BMP-2 등 단백질 발현관찰

· 본웹 투여후 BMP-2 단백질 발현관찰

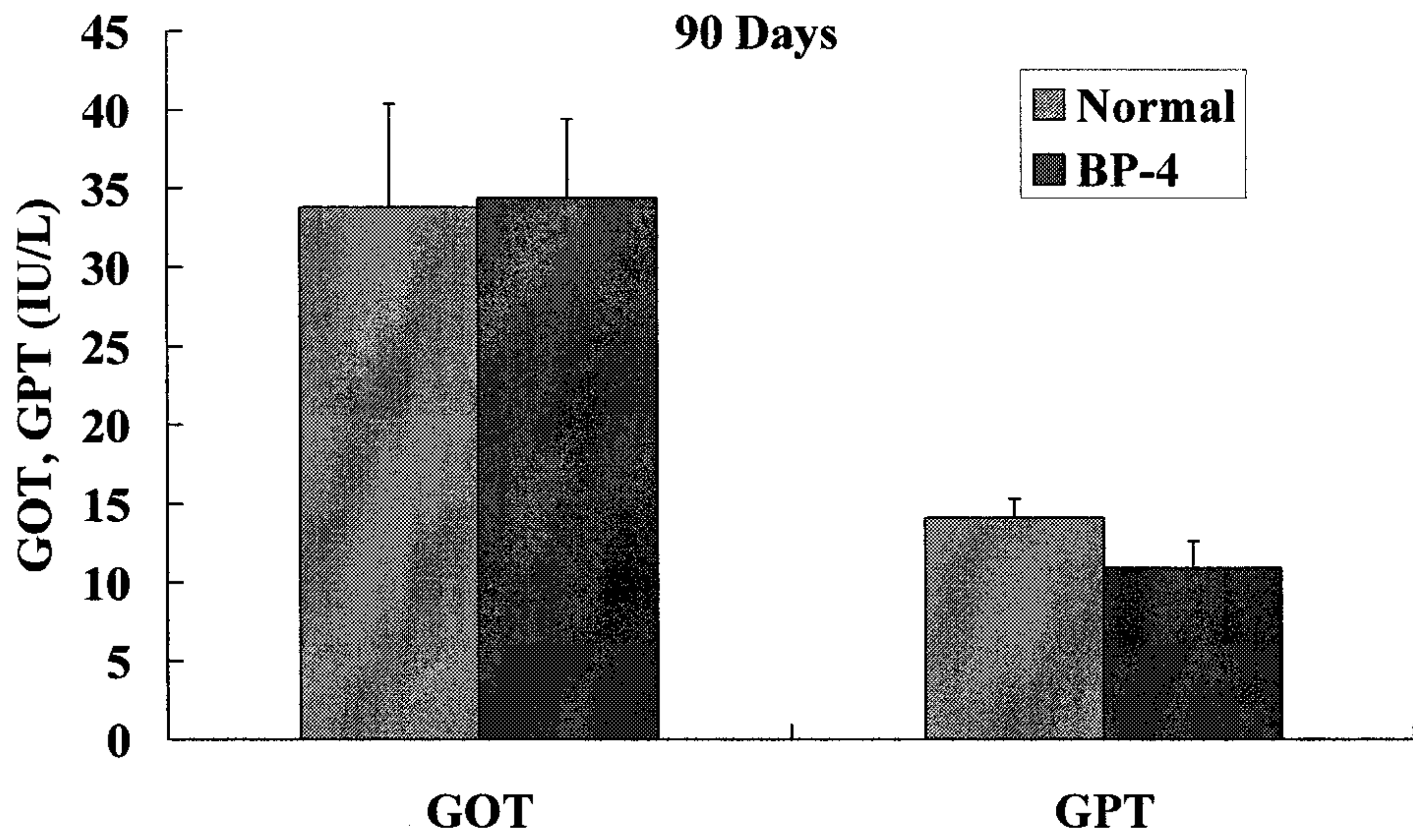
본웹 투여후 BMP-2 단백질 발현을 관찰한 결과 그림 17과 같이 정상 식이투여군에 비하여 BMP-2 발현이 증가되어 있음을 관찰할 수 있었다. BrdU 면역염색은 전술한 바와 같이 역시 증가하는 경향을 나타내었다.



<그림 17> 본웹 투여에 따른 BMP-2 단백질발현.

본웹 투여후 안전성

본웹을 3개월간 투여한 후 독성유무를 관찰하기 위해 부검을 시행하였다. 육안소견상 이상이 발견되지 않았다. 그리고 혈액내 GOT, GPT 수치를 측정된 결과 그림 18과 같이 본웹투여군과 대조군사이의 차이는 전혀 나타나지 않았음을 확인할 수 있었다.



<그림 18> 본웹 투여에 따른 GOT, GPT 결과 그래프.

제3절 연구개발 성과

- 특허출원 1건

: 출원번호 - 10-2005-0023023, “난황유래 골강화 조성물 분리“.

- 연구논문발표 6건

: 2004 Annual Meeting and International Symposium - The Current Prospects of Functional and Mdicinal Food, "Effects of Egg-Yolk Proteins on the Longitudinal Bone Growth of Adolescent Male Rats", Kang-Hyun Leem, Myung-Gyou Kim, Mujo Kim and Hye Kyung Kim. Nov. 17-19, 2004, Jeju.

: BBA(일본농예화학회, 2005.03.28.-2004.03.30.) - 2005.03.29. 卵黃由來 peptide가 骨成長에 미치는 影響. 삿포로시산업진흥센터, 삿포로(札幌), 일본.

: 제5회 충북 BT 연구회 심포지엄 구두발표 - 2004년 11월 5일(금) 오후 3시 Effects of Egg Yolk Proteins on the Longitudinal Bone Growth of Adolescent Male Rats. 세명대학교 창업보육센터 311호, 제천, 충북.

: 충남테크노 구두발표 - ????, ????, 충남. <-- 채워주세요. 김혜경교수님.

: BBA(일본농예화학회, 2006.03.26.-2006.03.28.) - 2006.03.26. 17:36. 성장기흰쥐에게 난황유래 peptide의 골성장촉진효과. 京都女子大學, 교토(京都), 일본.

: BBA(일본농예화학회, 2006.03.26.-2006.03.28.) - 2006.03.26. 17:48. 난황유래 peptide의 조골세포와 파골세포의 분화와 증식에 미치는 영향. 京都女子大學, 교토(京都), 일본.

: 그 외 현재 국제학술지에 submit 중임 (1건).

- 석박사인재양성 1건

: 김명규 석사학위 - 2005년 8월.

- 방송보도내용 1건

2005.04.26 SBS다큐멘터리-“60그램의 진실, 계란”에 보도.

대량생산공정확립. 1건

연간 약 140톤 정도의 원료를 자체수급하여 현재 연간 20-24 톤 규모의 제품생산공정을 확립하였음.

식약청 품목제조신고. 1건

본펩(Bonepep)을 한국식품의약품안전청에 “일반식품”내의 “기타 알가공품”으로 품목제조신고 완료.

생산 및 수출실적. 1건

현재까지 0.7톤 생산완료되었음. 대부분 일본에 수출완료.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발 목표 및 달성도

1. 연구개발의 목표 및 내용

가. 연구개발 목표와 내용

- 최종목표 : 달걀로부터 골성장 촉진인자의 분리 및 기능성식품첨가물 생산 기술개발
 - 제1세부 : 달걀로부터 골다공증 골질량개선 미량소재의 실용화
 - 제2세부(협동) : 달걀로부터 장골 성장촉진 미량소재의 실용화

나. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 달걀 분획별 분리 및 정제 ○ 골아세포 증식 및 석회화 촉진인자의 탐색 (in vitro) ○ 장골 성장 촉진인자의 탐색 (in vivo) 	<ul style="list-style-type: none"> ※ 달걀의 유효성분 분획 분리 <ul style="list-style-type: none"> - 무정란, 유정란의 비교 - 달걀의 분획분리 - 지방, 콜레스테롤 제거 ※ 골아세포 증식 및 석회화 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 골아세포 증식촉진활성평가 - 골아세포 석회화촉진활성평가 - 골형성 지표의 생화학적 분석 - 골형성 유전자 발현측정연골세포 증식률측정 ※ 성장기 흰쥐에서의 장골성장 <ul style="list-style-type: none"> - 골길이 성장 촉진력 평가 - 성장판 (growth plate) 대사율측정 - 골형성 유전자 발현측정 (IGF-1, BMP-2) - BrdU assay

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 골다공증 모델에 대한 기능성 평가 및 기전연구 ○ 성장기 장골 성장촉진평가 모델에 대한 기능성 평가 및 기전연구 ○ 유효성분을 함유한 가공법 및 대량 조제술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ※ 골다공증 동물모델에서 골 대사 <ul style="list-style-type: none"> - 골밀도, 골량측정 - 골형성 유전자 및 지표의 생화학적 분석 - 골흡수 지표의 생화학적 분석 ※ 성장기 흰쥐에서의 장골성장 <ul style="list-style-type: none"> - 골길이 성장 측정 - 성장판 (growth plate)대사율측정 - 성장호르몬 및 골형성 유전자 발현 측정 - BrdU assay, BMP-2 등 단백질 발현관찰 ※ 고기능성 시제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 식품첨가물 소재개발 - 콜레스테롤 및 유분제거 - 알러지 유발 단백 제거 - 식품소재 안전성평가

2. 연구개발목표 달성도

가. 1차년도 연구개발 목표 및 달성도

본 연구개발과제의 최종 목표달성을 위해 당해연도에 수행한 연구개발 내용은 전술의 제3장 연구개발수행 내용 및 결과와 같으며 주요연구개발 목표의 1차년도 달성도는 아래와 같다.

○ 달걀 분획별 분리 및 정제 - 1차년도 연구개발 목표는 “달걀의 분획분리”와 “지방, 콜레스테롤 제거” 의 2가지이고 이를 성공적으로 수행하였다. 그러나 생산단가가 너무 높아 실용화를 위해 프로테아제를 이용한 대량생산공정을 하반기에 추가로 확립하였다. 2차년도 연구에서는 대량생산공정에서 생산된 시료에 대한 효능비

교평가를 수행할 계획이다.

- 지방, 콜레스테롤 제거

: 난황 중 탈지기술을 개발, 탈지 난황 성분 중에서 유효성분 비파괴조건을 몇가지 용매를 사용하여 공장도 스케일업을 성공적으로 완료하였다. 자세한 과정은 5. 연구수행 내용 및 결과에 나타내었다.

- 달걀의 분획분리

: 수용성 난황단백질로 분리 및 공정의 pilot-scale-up
탈지된 난황단백질을 수용화 공정을 통하여 불용성 단백질과 수용성 난황단백질로 분획하였고, 골성장 실험결과 수용성 난황단백질 분획이 가장 큰 효과를 나타내어서 수용성 난황단백질분획을 상업화를 위한 공장도 scale로 pilot scale-up 하였다

- protease에 의한 수용성 난황단백 peptide 분리

: 수용성 난황단백질의 대량생산 공정에 의한 단가는 100만원/kg으로 상업화하기에는 너무 높았다. 따라서 다른 방법을 모색하던 중 protease를 사용하여 peptide로 분해하여 단가를 낮추었다.

○ 골아세포 증식 및 석회화 연구 - 공장도 생산공정을 통해 생산된 시료에 대한 골아세포 증식 및 석회화 촉진활성을 연구한 결과 높은 생리활성을 측정할 수 있었다. 골대사에는 파골세포에 대한 생리활성도 중요하여 연구방법을 추가로 확립하여 수행하였다.

- 골아세포 증식촉진활성평가

: 골세포 증식촉진 활성을 알아보기 위하여 조골세포에서 측정한 결과, 수용성 난황단백질 (YSP) 농도(0~5000 ug/ml)에 비례하여 조골세포 증식이 높아지는 결과를 나타내었다.

- 골아세포 석회화촉진활성평가

: 뼈의 석회화 촉진 활성을 알아보기 위하여 조골세포에서 칼슘 침착을 측정한 결과, 수용성 난황단백질 (YSP) 농도(0~5000 ug/ml)에 비

레하여 조골세포에 칼슘 침착이 일어나 골세포에 유용한 효과를 나타내었다.

- 골형성 지표의 생화학적 분석 - alkaline phosphatase (ALP)에 미치는 영향
: 골생성 지표로서, 조골세포에서 형성되어 배지로 유리되는 ALP 농도를 측정된 결과 ALP 활성이 증가하였다.
- 골형성 유전자 발현측정 연골세포 증식률측정
: 연골관련 콜라겐 형성능을 Masson Trichrome 염색법을 이용하여 측정된 결과 유의하게 증가하는 결과를 얻었다.
- 파골세포 분화 및 증식억제 효능 평가
: TRAP assay를 이용하여 파골세포 분화 및 증식을 측정된 결과, 분화 유도가 억제되었음을 알 수 있었다.

○ 성장기 흰쥐에서의 장골성장 - 공장도 scale up 시료의 효능을 실험실단계 시료와 비교 평가한 결과, 효능의 변화 없이 공장도 scale up을 하였다는 것을 생체실험에서 검증할 수 있었다.

- 골길이 성장 촉진력 평가
: 두산에서 공장도 스케일로 생산한 DS1, DS2, DS3 시료를 YSP시료와 비교하여 측정된 결과 각각 통계학적으로 차이를 관찰할 수 없었다. 따라서 두산에서 공장도 스케일업 공정은 효능을 파괴하지 않는 공정으로 확인 검증되었다.
- 성장판 (growth plate)대사율측정
: DS1, DS2, DS3 3개 시료 각각 저용량 및 고용량 (50 and 100 mg/kg) 투여군에서 YSP투여군과 동등한 효능을 보여 통계학적으로 차이를 관찰할 수 없었다.
- 골형성 유전자 발현측정

(IGF-1, BMP-2)

: 검사시료 모두에서 BMP-2 발현을 증가시키는 양상을 나타내었다.

- BrdU assay

: 검사시료 모두에서 면역염색된 연골세포의 수가 증가하였음을 관찰할 수 있었다.

나. 2차년도 연구개발 목표 및 달성도

본 연구개발과제의 최종 목표달성을 위해 당해연도에 수행한 연구개발 내용은 전술의 제3장 연구개발수행 내용 및 결과와 같으며 주요연구개발 목표의 2차년도 달성도는 아래와 같다.

○ 가공법 및 대량 조제술 개발 - 1차년도 하반기에 실용화를 위해 프로테아제를 이용한 대량생산공정을 하반기에 추가로 확립하였다. 2차년도 연구에서는 대량생산공정을 확립하고 이로부터 생산된 시료에 대한 판매를 위한 준비를 수행하였다.

- 식품첨가물 소재개발

: 본웹(소재명)을 전항(제2절)에서 기술한 바와 같이 개발하여 한국식품의약품안전청에 “일반식품” 내의 “기타 알 가공품”으로 품목제조신고를 마쳤음.

- 콜레스테롤 및 유분제거

: 난황 중 탈지기술을 개발하였고, 이를 가공하는 과정에서 콜레스테롤 및 유분 제거를 성공적으로 완료하였다. 자세한 과정은 제2절 연구수행 내용 및 결과에 나타내었다.

- 알러지 유발 단백 제거

: 수용성 난황단백질에는 알러지를 유발할 수 있는 단백질이 존재하는

것이 사실이다. 이를 개선하기 위하여 protease를 사용하여 항원으로 작용가능성이 극히 낮은 크기의 peptide로 분해하여 알러지 유발 가능성을 낮추었다.

- 식품소재 안전성 평가

: 본 소재는 식품에서 생산되어 안전성 평가항목이 필수요건은 아니나 본 과제에서는 대량생산 공정에 의해 생산된 후보소재를 1세부 및 2세부의 동물실험에서 과량 및 3개월간 투여 등의 간이안전성 평가를 수행하였다. 이 결과에서 이상반응이 관찰되지 않았다.

○ 골다공증 모델을 이용한 연구 - 골다공증 동물모델에서 골 대사를 측정하여 시제품의 생체효능을 평가하는 것이 제1세부과제의 2차년도 연구과제의 핵심이다. 이를 위하여 아래 3가지 종류의 실험을 수행하였다.

- 골밀도, 골량측정

: 골다공증 동물모델의 골밀도를 pQCT를 이용하여 측정한 결과 난소를 적출하지 않은 Sham군에 비하여 난소적출한 Control군은 골밀도가 급격하게 떨어졌음을 알 수 있었다. 여기에 본펩을 투여한 BP군은 통계적으로 유의하게 골밀도저하를 막았음을 확인할 수 있었다. 또한 골을 형성하고 있는 부분 중 바깥쪽 부분인 치밀골(Cortical part)의 두께를 측정한 결과 난소적출한 Control군에 비해 본펩을 투여한 BP군에서 통계적으로 유의한 치밀골 두께증가를 확인할 수 있었다.

- 골형성 유전자 및 지표의 생화학적 분석

: alkaline phosphatase, 부갑상선호르몬, Gla형 osteocalcin을 선정하여 측정에 사용하였고, 모두에서 통계적인 유의성은 관찰할 수 없었으나 본펩투여군에서 증가하는 경향을 나타내었다.

- 골흡수 지표의 생화학적 분석

: 골다공증 동물모델에 대한 본펩의 활성을 알아보기 위한 골흡수 지표는 Glu형 osteocalcin을 선정하여 측정에 사용한 결과 모든 군에서 유의한 변화를 관찰할 수 없었다.

○ 이상과 같이 본펩의 골다공증 동물모델에 대한 활성을 측정한 결과, 본펩은 골다공증 동물모델의 골밀도 증가에 유의한 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 이는 향후 시제품의 유효성 확립자료로 활용이 가능할 것으로 생각된다.

○ 성장기 흰쥐에서의 장골성장 - 공장에서 생산한 본펩 시제품의 효능을 평가한 결과, 유효한 효능이 관찰되었고, 이의 장기간 투여에 의한 독성은 관찰할 수 없었다.

- 골길이 성장 측정

: 장골성장 동물모델에 대한 본펩의 활성을 알아보기 위하여 성장기 흰쥐에게 본펩(BP)을 투여하여 본펩의 효능과 본펩의 생체효율을 측정하고자 nonlinear regression analysis를 수행하여 ED50을 측정한 결과 9.6 mg/kg로 측정되었다.

: 본펩의 장기간 투여후 효능을 평가하기 위해 3개월간 투여하였다. 성장촉진 효능은 본펩투여군에서 거의 전체 측정기간동안 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 성장촉진 효능을 관찰할 수 있었다.

- 성장판 (growth plate)대사율측정

: 본펩의 장기간 투여후 효능을 평가하기 위해 3개월간 투여하였다. 성장판 대사율을 측정한 결과 본펩투여군에서 대조군에 비하여 유의한 성장판 대사율증진효능이 있음을 관찰할 수 있었다

- 성장호르몬 및 골형성 유전자 발현측정

· 본펩 투여후 성장호르몬의 변화

: 본펩 투여후 성장호르몬의 변화를 측정한 결과 정상식이투여군과 별다른 차이를 관찰할 수 없었다.

· 본펩 투여후 부갑상선호르몬 등의 변화

: 본펩 투여후 부갑상선호르몬 및 Gla형 osteocalcin 호르몬의 변화를 측정한 결과 정상식이투여군과 별다른 차이를 관찰할 수 없었으나 약간 증가하는 경향을 나타내었다.

- BrdU assay, BMP-2 등 단백질 발현관찰

: 본 펩 투여후 BMP-2 단백질 발현을 관찰한 결과 정상식이투여군에 비하여 BMP-2 발현이 증가되어 있음을 관찰할 수 있었다. BrdU 면역도 역시 증가하는 경향을 나타내었다.

본 펩 투여후 안전성 검증

: 본 펩을 3개월간 투여한 후 독성유무를 관찰하기 위해 부검을 시행하였다. 육안소견상 이상이 발견되지 않았다. 그리고 혈액내 GOT, GPT 수치를 측정한 결과 본 펩투여군과 대조군사이의 차이는 전혀 나타나지 않았음을 확인할 수 있었다.

3. 관련분야에의 기여도

가. 기술적 측면

○ 본 연구결과는 일상적으로 매일 안전하게 섭취할 수 있고 가장 값이 싼 식품에서 분리되었으므로 안전성, 경제성면에서 우수하고 또한 탈지 분획을 사용하였으므로 콜레스테롤이나 지질 등의 문제도 해결 될 수 있어 학문적 기초연구로서의 가치와, 성장과 장년층의 골다공증예방에 대한 과학적인 근거자료를 제공할 수 있었음.

○ 달걀은 단세포로부터 생물체로 형성되는데 필요한 모든 물질을 가진 Bio Capsule임. 완전식품인 달걀 소비는 역사적으로 오래되었으나, 현재 콜레스테롤 등의 문제로 기피되고 있어 농촌경제에 곤란을 끼치고 있음.

○ 새로운 가공기술과 달걀의 특성을 향상시키면 식품으로써 뿐만 아니라 기능성식품, 의약품 또는 생화학적 소재로써의 활용이 가능함. 따라서 본 연구에서는 골성장 촉진이라는 특성을 제고시키고, 콜레스테롤 등 문제를 해결한 새로운 기능성 식품소재를 개발하고자 하였고 이를 성공적으로 수행하였음.

나. 경제 · 산업적 측면

○ 해당 기술의 개발은 성공하였고, 이를 바탕으로 향후 임상시

협 등이 수행되어 고기능성 건강기능식품을 개발한다면 현재 폭발적으로 증가하고 있는 국제 건강식품시장에 건강기능성 식품 수출전략 후보물질을 수출할 수 있을 것임.

- 계란원료의 수요가 증가하고, 계란의 우수한 골성장 촉진 기능이 홍보됨으로써 일반인들의 계란소비도 촉진하는 등 농가 소득 증대에 획기적인 공헌을 할 것으로 기대됨.
- 이미 산업화되어 많이 생산되고 있는 난황 레시틴 (lecithin) 추출 후에 얻을 수 있으므로 폐기 자원의 이용이 될 수 있다.
 - 해당 기술의 개발로 발생하는 지방질의 활용은 다음과 같이 다양하게 해소되므로써 생물자원의 전체적 이용이 가능함.(난황은 50%의 물과 25%의 단백질 및 25%의 지방질로 구성되어 있음.)
 - 천연 레시틴 성분으로 식품유화제로의 응용이 가능 (예: 마요네즈, 아이스크림, 제과, 제빵 등)
 - 천연 레시틴 성분 중, DHA, ARA와 같은 필수 지방산 공급원으로서 이용 가능 (예: 유아식, 경장영양식 등)
 - 천연 레시틴 성분으로 지방유액의 유화제로서 의약품에 이용 가능 (예: 지방유액, 인공 혈액 등)
- 건강 유지에 관심이 높아지고 있는 현시점에서, 고령화가 진행되고 노화에 수반한 골다공증의 발생이 사회 문제로 되어 있는 현재 상태로서는, 성인기의 정상적인 골성장은 국내뿐만 아니라 해외에서도 관심을 가지고 있으므로 큰 시장성을 갖고 있음. 골성장 촉진 기능성 식품들이 등장하여 계란관련 업계 산업 활성화와 양계, 계란 가공 사업 및 식품산업의 분야에 있어, 새로운 고용 창출이 될 것으로 기대함.

제5장 연구개발결과의 활용계획

- 달걀은 원래 우수한 영양성을 구비한 식품임. 계란 유래의 식품 소재는 일반식품, 음료, 스낵, 기능성 supplement 등에 폭넓게 이용 할 수 있을뿐 아니라, 의약품의 원료 및 중간 재료로써도 이용 가능함. 본 연구결과로 개발된 골성장 기능성 식품소재는 객관적이고 과학적인 기능성효능 근거자료를 확보한 우수한 기능성 식품소재라 할 수 있음.
- 이의 임상시험 평가를 추후 수행한다면 이를 이용하여 건강 기능성식품으로 등재신청을 고려할 수 있고 이를 통해 고기능성 건강식품을 개발할 수 있고 이를 활용할 수 있음.
- 그 외에도 계란재료의 수요증가로 인해 국내 농촌경제의 수입확대에 도움을 줄 수 있음. 이를 잘 활용한다면 생산 및 유통, 식품산업 및 물류산업 등 산업계 전반에 경기상승에 주요한 역할을 할 수 있을 것이라 기대함.

제6장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술 정보

○ 특이사항 없음.

제7장 참고문헌

손대열, 윤광로, 이상열. 국내 주요 알레르기 원인식품에 대한조사. 한국식품과학회지. 34:5, 885-888, 2002

Fernie K, Smits J, Bortolotti G. Developmental toxicity of in ovo exposure to polychlorinated biphenyls: I. Immediate and subsequent effects on first-generation nestling American kestrels (*Falco sparverius*). *Environ Toxicol Chem* 2003;22:554-560

Hasse B, Ehrenberg H, Marxen JC, Becker W, Epple M. Calcium carbonate modifications in the mineralized shell of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Chemistry* 2000;16:3679-3685

Hogan PS, Mishra A, Brandt EB, Foster PS and Rothenberg ME. a critical role of eotaxin in experimental oral antigen-induced eosinophilic gastrointestinal allergy. *PNAS* 97:12, 6681-6686, 2000

Poulsen LK, Hansen TK, Norgaard A, Vestergaard H, Stahl Skov P, Bindslev-Jensen C. Allergens from fish and egg. *Allergy*. 2001;56 Suppl 67:39-42.

Ruiz J, Lunam CA. Ultrastructural analysis of the eggshell: contribution of the individual calcified layers and the cuticle to hatchability and egg viability in broiler breeders. *Br J Poultry Sci* 2000;41:584-592

Thamsborg SM, Hauge EM. Osteopenia and reduced serum alkaline phosphatase activity in grazing lambs naturally infected with gastrointestinal nematodes. *J Comp Pathol*. 2001;125:192-203

부록 1

학회발표 및 특허

2004 Annual Meeting
and International Symposium

"The Current Prospects of Functional and Medicinal Food"

November 17~19, 2004

Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju Island, Korea

Sponsored by

Korea Research Foundation

Korea Science and Engineering Foundation

The Korean Federation of Science of Science and Technology Societies

NONGSHIM Co., Ltd.

WORLD WAY Co., Ltd.

Korea Nokjup Association

Korea Saengshik Association

ASA USA

Jeju City

KFN

**The Korean Society of
Food Science and Nutrition**

Jeju-do, Cheju Natl Univ

Korea Food & Drug Administration

for hatching. Based on the above concept, we examined the effect of egg-yolk proteins (YP) on the longitudinal bone growth in rat. Yolk water-soluble protein (YSP) and yolk water-insoluble protein (YIP) were fractionated from YP according to the water-solubility. Milk protein(casen) was used as a control. The proliferation ratio of chondrocytes was calculated from 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation during DNA synthesis, and the longitudinal bone formation rate was estimated by labelling with fluorescent marker, which binds to newly formed bone. The bone formation rate in the tibia was increased by all yolk-protein administrations. The effects were most potent in YSP. The bone morphogenetic protein-2 immunostaining, which is known to ameliorate the growth plate metabolism, was also increased by YSP administration. These results suggest that egg-yolk protein, especially soluble protein, might promote longitudinal bone growth during the developmental period. Although egg proteins have the superb quality, they were avoided because of the potential allergens and cholesterol. From the above results, potential allergen-free and lipid-free egg-yolk proteins could provide the beneficial nutritional-component for the growth delayed children as well as domestic livestock.

P10-88

Conjugated Linoleic Acid Reduction of Mammary Tumor Cell Growth by Suppression of 5-hydroxyeicosatetraenoic acid

Jung-Hyun Kim, Neil E. Hubbard, Vincent Ziboh¹ and Kent L. Erickson¹. Dept. of Cell Biology and Human Anatomy & ¹Dermatology, University of California, Davis, CA 95616, USA

Conjugated linoleic acid (CLA) is a dietary fatty acid that has been shown to reduce primary tumor growth and metastasis in breast, prostate and colon cancer in animals. However, the mechanism of its action has not been clarified. Moreover, the role of dietary CLA in reducing human tumorigenesis has not been reported. The goal of this study was to determine whether CLA altered mouse mammary tumor cell growth and whether specific metabolites of the lipoxygenase pathway were involved in CLA action. One isomer, *t*10, *c*12-CLA, and a lipoxygenase inhibitor but not another isomer, *c*9, *t*11-CLA, or linoleic acid (LA) reduced mouse mammary tumor cell viability and growth by inducing apoptosis and reducing cell proliferation. *t*10, *c*12-CLA reduced the production of the 5-lipoxygenase metabolite, 5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE). That effect was not seen with *c*9, *t*11-CLA or LA. Adding 5-HETE back to tumor cells reduced the *t*10, *c*12-CLA effect on both apoptosis and cell proliferation. These data suggest that *t*10, *c*12-CLA reduction of tumor cell growth may involve the suppression of the 5-lipoxygenase metabolite, 5-HETE, with subsequent effects on apoptosis and cell proliferation. Low concentrations of dietary CLA in humans appear to be

safe. Dietary CLA may be effective as an adjuvant for reduction of breast tumorigenesis. However, appropriate clinical trials are needed before conclusions can be made about use in human therapy.

P10-89

금앵자 추출물이 난소를 절제 한 흰쥐의 골격대사에 미치는 영향

이효주^{*}, 이지원, 박정현¹, 임효권, 황보미향, 김현정¹, 이인선¹. 계명대학교 식품가공학과, ¹계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구소

대부분의 40대 중반을 넘어선 여성에게서는 호르몬의 기능이 점차 감퇴됨에 따라 여러 신체적 변화와 정신적 변화가 수반된 갱년기 장애가 나타난다. 이는 난소의 estrogen 호르몬 분비의 감소로 인한 것으로 밝혀져 있으며, 폐경기 이후에는 거의 생산이 되지 않는다. 이러한 폐경으로 인한 estrogen 호르몬의 감소는 심혈관 질환 뿐 아니라 장기적인 호르몬의 부족은 골질량과 뼈의 무기질 함량이 감소되어 골다공증에 심각한 원인이 되는 것으로도 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 천연의 소재 및 약재의 screening을 통해, 그 중 금앵자 methanol 추출물이 cell growth와 ALP activity에 효과적인 것을 확인하였으며, 이를 토대로 난소 절제 흰쥐에 금앵자 methanol 추출물을 식이 하게 한 뒤, 난소절제 쥐에서의 혈 중 지질 함량과 골 중의 collagen 함량 및 골 대사 등을 검토하였다. 혈 중 total-cholesterol, triglyceride에서는 sham군 보다 난소절제 후 금앵자 methanol 추출물을 투여한 군에서 약간 감소하는 경향을 보였으며, HDL-cholesterol 에서는 시료 투여군에서 그 수치가 유의적으로 높게 나타남 볼 수 있었다. 난소 절제 후 금앵자 methanol 추출물 투여군에서 collagen 합성도와 골밀도 측정을 통해서 확인한 결과, 시료 농도 50mg/kg bw/day에서 collagen 함량과 골밀도가 대조군 및 positive control 보다 유의적으로 높음을 확인할 수 있었다.

P10-90

Casein 가수분해물의 항균활성 탐색과 그 응용

이혜진^{*}, 강윤정, 이상덕, 오만진. 충남대학교 식품공학과

본 연구는 casein을 기질로 *Asp. oryzae* protease를 비롯한 몇종의 protease를 작용시켜 저분자 peptide를 제조하여 실용적이면서도 인체에 무해한 항균제를 개발하고 그에 따른 응용 실험을 한 결과는 다음과 같다. casein에 5종의 단백질 가수분해 효소를 작용시켜 생성된 가수 분해물을 측정하고, 항균활성이 가장 높게 나타난 *Asperillus oryzae* protease 가수 분해물을 이용하여 연구하였다. *Asperillus oryzae* protease 로 작용시켜 얻은 가수 분해물을 30,000, 10,000, 3,000 membrane filter 로 cut-off하여 한외여과 하였다. 각 분획물의 항균 활성 측정 결과 3,000이하의 분획물의 활성이 가장 높게 나타났다. *Asperillus oryzae* protease로 작용시킨 casein의 분자량 3,000이하 범위 가수분해물의 최소저해농도 (MIC)는 1.0~1.5 mg/ml 이었으며 그람 양성균과 음성균 모두의 증식을 억제하는 경향을 보였다. 또한 가수 분해물을 121℃, 10분간 열처리하였을 때에도 그 항균 활성을 유지하는 것으로 보았을 때 이는 열에 대단히 안정함을 알 수 있었다. 항균 활성이 가장 높은 분획 3,000이하

lements in many countries. The acetone extract of the microwave treated grape seeds was partitioned between 60% aq. EtOH and hexane(1:3). The aq. EtOH extract was further chromatographed onto a Diaion HP-20 column and then fractionated successively with ionic water-EtOH mixture, as increase of EtOH concentration. The 60% aq. EtOH extract was evaporated to yield a high quality of grape seed powder which contains 1-5% several monomeric catechins and procyanidins of the weight of grape seed. The method developed allowed the reuse of the recovered solvents and the chromatographic columns.

P10-84

Anti-obesity Effect of Black Tea Water Extract in High-fat Diet Fed Rats

Jeon JR¹ and Kim JY². ¹Department of Food and Nutrition, ²College of medicine, Yeungnam University

This study was designed to investigate anti-obesity effect of black tea water extract (BTE) through *in vivo* and *in vitro* studies. We attempted to examine effect of BTE on pancreatic lipase and α -amylase inhibitory activities, and on differentiation of 3T3-L1 cell through *in vitro* study. BTE inhibited both pancreatic lipase and α -amylase activities dose dependently. And BTE in 3T3-L1 preadipocyte decreased differentiation at a concentration of 250ug/ml and blocked accumulation of lipid. Thirty six Sprague-Dawley rats were divided 4 groups, i.e. normal (N), high fat diet (HFD), BTE supplemented diet (HFD+BTE), and Orlistat (Xenical) supplemented diet (HFD+XEN) groups. Supplementation of BTE or Orlistat to HFD decreased body weight gain and visceral fat mass but did not effect on food intake when compared with HFD group. There were no significant differences in body weight gain and visceral fat mass between HFD+BTE and HFD+XEN. BTE-supplemented rats had more fecal excretions compared with HFD group. BTE significantly decreased plasma total cholesterol, triglyceride and glucose levels compared with HFD rats.

P10-85

Polymannuronate가 분변 및 DMH로 처리한 쥐의 대장종양 발생에 미치는 영향

김인혜¹, 조인선, 황혜정, 신명교¹, 남택정. 부경대학교 식품생명과학부, ¹(주)케이비피

알긴산과 같은 식이섬유는 점성으로 인한 보수력이 커 만족감을 지속시키고 열량 섭취량을 감소시켜 체중감소를 가져온다. 그리고 지질과 콜레스테롤 및 담즙산 흡수 억제를 촉진시키거나 영양소의 흡수 저해, 분변을 통한 담즙산 배설량을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한 소장의 콜레스테롤 및 다른 영양소의 흡수를 저해하여 혈장과 간의 콜레스테롤 농도를 유의적으로 낮추어 식이섬유가 동맥경화, 비만, 체중 감소에 효과를 가질 뿐만 아니라 성인병과 비만, 노화 등의 예방 및 치료 효과도 알려져 있다. 본 연구는 알긴산을 부분 가수분해하여

제조한 polymannuronate를 흰쥐에 급이시켜 혈청과 간의 총콜레스테롤 변화가 분변에 어떠한 영향을 주는 지 살펴보았다. 그 결과, polymannuronate는 체내에서 담즙산 및 총콜레스테롤과 결합하여 분변으로 배출되어 분변량이 증가하였으며 흰쥐의 혈청 및 간조직 중의 총콜레스테롤 함량을 감소시켜 지질 개선의 효과를 보였다. 또 흰쥐에 발암원인 DMH를 주사한 후 식이에 polymannuronate를 첨가하여 10주 사육하여 종양 발생을 및 마리당 종양 발생수를 살펴보았다. 그 결과, 소장 중의 종양발생수가 polymannuronate 식이에 의해 감소하였고, 발암원 처리에 의해 종양의 크기 또한 감소시켜 종양의 성장을 억제함을 확인할 수 있었다.

P10-86

Anti-diabetic Effect of Electrolyzed Reduced Water in Streptozotocin-induced or Genetically Diabetic Mice

Mija Kim¹, Youn Jung Kim², Yoon Kyung Uhm³ and Hye Kyung Kim³. ¹Graduate School of Obesity Science Dongduk University, ²Dept. of Dental Hygiene, and ³Dept. of Food & Biotechnology Hanseo University

There is increasing evidence that complications related to diabetes are associated with oxidative stress induced by the generation of ROS. The ideal scavenger for reactive oxygen is reactive hydrogen. Reactive hydrogen can be produced in reduced water near the cathode during electrolysis of water. In this regard, ERW with ROS scavenging activity may have a potential effect on diabetic mellitus. Therefore, we examined the possible anti-diabetic effect of ERW, using streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice as a model system of type-1 diabetes and genetically diabetic db/db mice as a type-2 diabetic model. Consumption of ERW for 4 wks significantly decreased the serum glucose, and increased serum insulin level in type-2 diabetic db/db mice without any effect in control mice. However, intraperitoneal glucose tolerance (IPGT) was not significantly improved in db/db mice. In STZ-induced type-1 diabetic mice, serum glucose concentrations were decreased without any effect on serum insulin concentrations. IPGT was improved in STZ-diabetic mice. These results suggest that ERW consumption, as a ROS scavenger therapy, may be beneficial for correcting the hyperglycemia and preventing diabetic complications. Furthermore, anti-diabetic effect of ERW is more potent in type-2 diabetic mice.

P10-87

Effects of Egg-Yolk Proteins on the Longitudinal Bone Growth of Adolescent Male Rats

Kang-Hyun Leem¹, Myung-Gyou Kim¹, Mujo Kim² and Hye Kyung Kim³. ¹College of Oriental Medicine, Semyung University, ²Pharma Foods International Co., Kyoto, Japan, ³Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

Hen egg is considered to be a nutritional store for a new life and to contain all the substances which are necessary

- 2J16p17 乳塩基性タンパク質 (MBP) 中の骨吸収抑制成分の分離同定
○森田 如一、松山 博昭、小野 愛子、上辻 大輔、芹澤 篤、川上 浩 (雪印乳業・技研)

【目的】我々は、乳塩基性タンパク質 (MBP) が破骨細胞による骨吸収を抑制することを明らかにし、MBPに含まれるシスタチンが骨吸収抑制成分の一つであることを報告してきた¹⁾。本研究では、破骨細胞による骨吸収抑制成分 (ピットアッセイ) を用いて、MBPから新規な骨吸収抑制成分の単離同定を試みた。
【方法と結果】牛乳から陽イオン交換樹脂を用いて分離精製したMBPを、ゲル濾過クロマトグラフィーおよびMonoSカラムクロマトグラフィーでさらに分離し、骨吸収抑制活性を指標に目的タンパク質を精製した。骨吸収抑制活性は、ウサギ全骨細胞を象牙片上で培養した際にみられるピットの形成率で調べた。ペプチドシーケンサーで活性成分のN-末端アミノ酸配列を調べたところ、分子量15Kダルトンのウシアンジオジェニンが骨吸収抑制成分として同定された。精製アンジオジェニンは破骨細胞による骨吸収を抑制したことから、MBP中の骨吸収抑制成分の一つがアンジオジェニンであることが明らかとなった。

1) Biosci. Biotechnol. Biochem., 66, 2531-2536, 2002

- 2J16p18 成長期ラットにおける乳塩基性タンパク質 (MBP) の骨基質形成促進効果
○松山 博昭、森田 如一、小野 愛子、上辻 大輔、芹澤 篤、川上 浩 (雪印乳業・技研)

【目的】乳塩基性タンパク質 (MBP) は、その骨強化作用が動物実験で骨破断力、骨破断エネルギー、骨塩量および骨密度などを指標に確認され、骨密度を高める食品素材として特定保健用食品においても実用化されてきた。本研究では、骨の重要な構成成分の一つである骨基質に及ぼすMBPの影響を成長期ラットで調べ、骨強化作用のメカニズムをさらに検討した。

【方法・結果】F344系雌ラット (3週齢) にMBP添加食および非添加食を2週間摂取させた後、大腿骨を抽出してDEXA法で骨塩量を測定した。その結果、MBP添加食群は非添加食群に比べ、有意に骨塩量が増加していた。この大腿骨を剖断・洗浄した後、塩酸水溶液中に浸漬しながら電気脱灰し、その後凍結乾燥して乾燥重量を測定した。その結果、MBP添加食群の大腿骨の骨基質重量は、非添加食群に比べて有意に増加していた。このことから成長期におけるMBPの摂取は、骨塩量の増加だけでなく、丈夫でしなやかな骨の形成に重要な骨基質についても増加させることが明らかとなった。

- 2J16p19 成長期ラットにおける卵黄由来ペプチド (ボンベップ) の骨成長促進効果
○趙 賢貞、池 受映、林 康鉉¹⁾、崔 惠美²⁾、金 惠京³⁾、金 武祚 (ファーマフーズ、¹⁾韓国・世明大・韓医学、²⁾韓国・韓瑞大・食品生物工学)

【目的】我々は、卵黄由来ペプチドが骨成長促進活性のある事を明らかにしてきた。今回、我々はボンベップを長期間及び高濃度摂取した場合の骨成長促進に及ぼす効果を調べた。併せてその安全性についても検討した。

【方法】ボンベップをラットに投与した場合の骨成長促進活性は、ラットの頸骨の成長を測定する方法を用いた。すなわち、ラットにtetracyclineを10mg/kg投与 (i.p.) し、所定期間後、抽出した脛骨切片の成長線を蛍光顕微鏡下で観察することで評価した。本法で10日間ボンベップを投与した場合のED50を計算した。また、ボンベップを高濃度で3か月間投与した場合の効果と安全性についても検討した。

【結果】ボンベップのED50は非線形回帰分析によって9.6mg/kgと計算された。ボンベップを3か月間高濃度投与した場合にも、骨成長活性が認められた。この際の飼育ラットの健全性をパラメーターから確認した。

- 2J16p20 卵黄由来ペプチド (ボンベップ) の骨芽細胞と破骨細胞の分化及び増殖に及ぼす影響
○池 受映、趙 賢貞、金 惠京¹⁾、林 康鉉²⁾、崔 惠美³⁾、金 武祚 (ファーマフーズ、¹⁾韓国・韓瑞大・食品生物工学、²⁾韓国・世明大・韓医学)

【目的】鶏卵中の卵黄ペプチド (ボンベップ) の作用メカニズムを明らかにするため、卵黄ペプチドによる骨芽細胞の分化及び増殖に及ぼす影響と、破骨細胞の形成抑制作用について調べた。

【方法と結果】卵黄ペプチドを添加した骨芽細胞の分化及び増殖をMTT法によって検討した。その結果、卵黄ペプチドの濃度に依存して細胞増殖活性が高まることが認められた。また、卵黄ペプチドがNOとサイトカイン産生に及ぼす影響についても検討した。マウスの骨髄を単離し、破骨細胞まで培養された骨髄細胞の分化及び増殖をTRAP-Staining法にて測定した。その結果、卵黄ペプチドが添加された破骨細胞群は対象群に比べ破骨細胞の分化及び増殖程度が低かった。以上一連の結果は、卵黄ペプチドが骨芽細胞の分化及び増殖を促進するだけでなく破骨細胞の分化及び増殖を抑えること示し、成長期の子供だけでなく高齢者の骨のバランスも維持させる新しい食品素材となる可能性を示唆する。

- 2J16p21 ローヤルゼリーのニュートリゲノミクス：骨形成促進作用
○成田 幸夫、野村 城司¹⁾、伊納 義和、太田 象三、鈴木 荒木 陽子、岡田 晋治²⁾、松本 一朗³⁾、磯濱 洋一郎⁴⁾、阿部 宮田 健⁵⁾、三島 敏 (アピ研、¹⁾熊大院医薬、²⁾東大院農生科)

【目的】ミツバチの分泌物であるローヤルゼリー (RJ) は、様々な機能性広く健康食品素材として利用されている。本研究ではRJが弱いエストロゲン作用を有する点¹⁾に注目し、RJの骨粗鬆症への予防効果について検討した。
【方法】RJ凍結乾燥粉末を粉末飼料に混合し、これを2ヶ月間マウスに摂取・解剖後、脛骨の骨灰分重量を測定した。また大腿骨RNAを用いてマイグレーション因子の発現変化を確認した。さらに*in vitro*において骨芽細胞様細胞MC3T3-E1にRJを添加した際の影響を調べた。

【結果及び考察】RJ混餌摂取群において骨灰分重量が有意に増加し、プロテオゲン遺伝子の発現上昇がみられた。またMC3T3細胞試験において、RJ添加細胞増殖、コラーゲン産生量の増加が確認された。以上の結果から、RJは重要な基質であるコラーゲンを増やし、骨形成を促進して、骨灰分重量を増ると考えられた。

1) Mishima et al. (2005) J. Ethnopharmacol., 101, 215-220.

- 2J17a01 *Solanum lycopersicum* への *S. pennellii*-由来遺伝子移入 (IL1-4) は C9-化合物を生成する
○松井 健二、BEN-OLEIL, Gadi¹⁾、ZAMIR, Dani¹⁾、石井 美穂²⁾ (大・農・生物機能、¹⁾Hebrew University of Jerusalem)

トマト (*Solanum lycopersicon*) は何れも何れも交配を経て栽培化された作物が、南米の原種には見出される多くの有用な遺伝形質を排除してきた。戻つこうした形質をトマトに導入する目的で、原種のひとつ *S. pennellii* の移入系統 (Introgression Line; IL) が系統的に作成されてきた。我々はトマト栽培品種が本来持たない C9-化合物生成能を有する系統 IL1-4 を見出し、IL1-4 果汁の揮発性化合物を固相マイクロ抽出/GC-MS法により解析した。 (*E*)-2-hexenal などの C6-化合物と共に (*E*)-2,6-nonadienal などの C9-化合物は大量に見出した。またこの果汁中に脂肪酸 9-ヒドロペルオキシドリアーゼの活性が見出された。通常のトマトには本酵素活性がないためこの活性は IL1-4 由来と推定された。そこで本酵素遺伝子の PCR クローニングを試みた結果、キュウリ 9HPL に相同性の高い遺伝子のクローニングがされた。現在本遺伝子の機能的解析を進めている。

- 2J17a02 高コレステロール食ラットの血清脂質濃度に及ぼすメチルキサンチン誘導体の影響
○松本 義徳、服部 一夫¹⁾、早野 啓子²⁾、古村 有加³⁾、堀内 有希⁴⁾、宇田川 陽秀⁵⁾、滝田 聖親⁶⁾ (川崎医福大・臨床栄養、¹⁾東農大科・栄養)

【目的】高脂質食ラットでは、メチルキサンチン誘導体 (MXD) の体脂肪蓄積効果が認められている。しかし、高コレステロール食ラットでは、MXDの血清脂質濃度への影響は明らかにされていない。そこで本研究では、高コレステロールラットの血清脂質濃度に及ぼすMXDの影響について検討した。
【方法】実験群は、SD系4週齢雄性ラットを用いた。飼料は、ラード10%の高コレステロール食とした。試験群は、MXDとしてキサンチン (XA)、カフェイン (CF)、テオフィリン (TF) およびテオプロミン (TP) のいずれかを0.025%添加した群とMXDを添加して対照群 (CO群) の計5群とした。各試験飼料を12週間投与し、血清と肝臓の脂質濃度を測定した。
【結果】血清中の総コレステロール (TC) 濃度は、CO群に比べXA群とTP群で有意に高値を示した。トリグリセライド (TG) 濃度は、CO群に比べXA群とCF群で有意に高値を認めた。肝臓のTC濃度は、CO群に比べてTP群とTB群で有意に低値を示し、TG濃度は、CO群に比べてXA群で有意に高値を示した。

- 2J17a03 苦瓜サポニン画分の血糖低下作用
○坂本 達昭、服部 一夫、高宮 珠代、滝田 聖親 (東農大科・栄養)

【目的】苦瓜は、抗糖尿病作用を有することが確認されているが、そのメカニズムおよび関与成分は明らかではない。苦瓜は、多彩な生理活性機能を持つサボテン科の植物であることから、本研究では苦瓜サポニン画分の血糖低下作用について検討した。
【方法】最初に、乾燥苦瓜をメタノール処理し抽出物を得た。同抽出物をエーテルで脱脂した後、ブタノールで処理して苦瓜サポニン画分を得た。苦瓜サポニン画分は、二糖類分解酵素と降リパーゼ阻害活性測定に供した。同時に、同画分の血糖値上昇ならびに脂質吸収に及ぼす影響を検討するために、ラットを用いて糖質負荷試験と脂質負荷試験を行なった。
【結果および考察】苦瓜サポニン画分は、二糖類分解酵素および降リパーゼ阻害活性を示した。ラットを用いた糖質負荷試験では、血糖値の上昇抑制が認められた。また脂質負荷試験では、血清中性脂肪値の上昇を抑えることが確認された。このことから苦瓜中の血糖低下作用を有する成分は、苦瓜サポニン画分に集約されており、その作用機序は降リパーゼ阻害活性に基づいていることが示唆された。また、同画分は脂肪の吸収阻害作用も認められた。

부록 2

식품관련교수 모임 총회 및 워크숍

2022. 1. 23

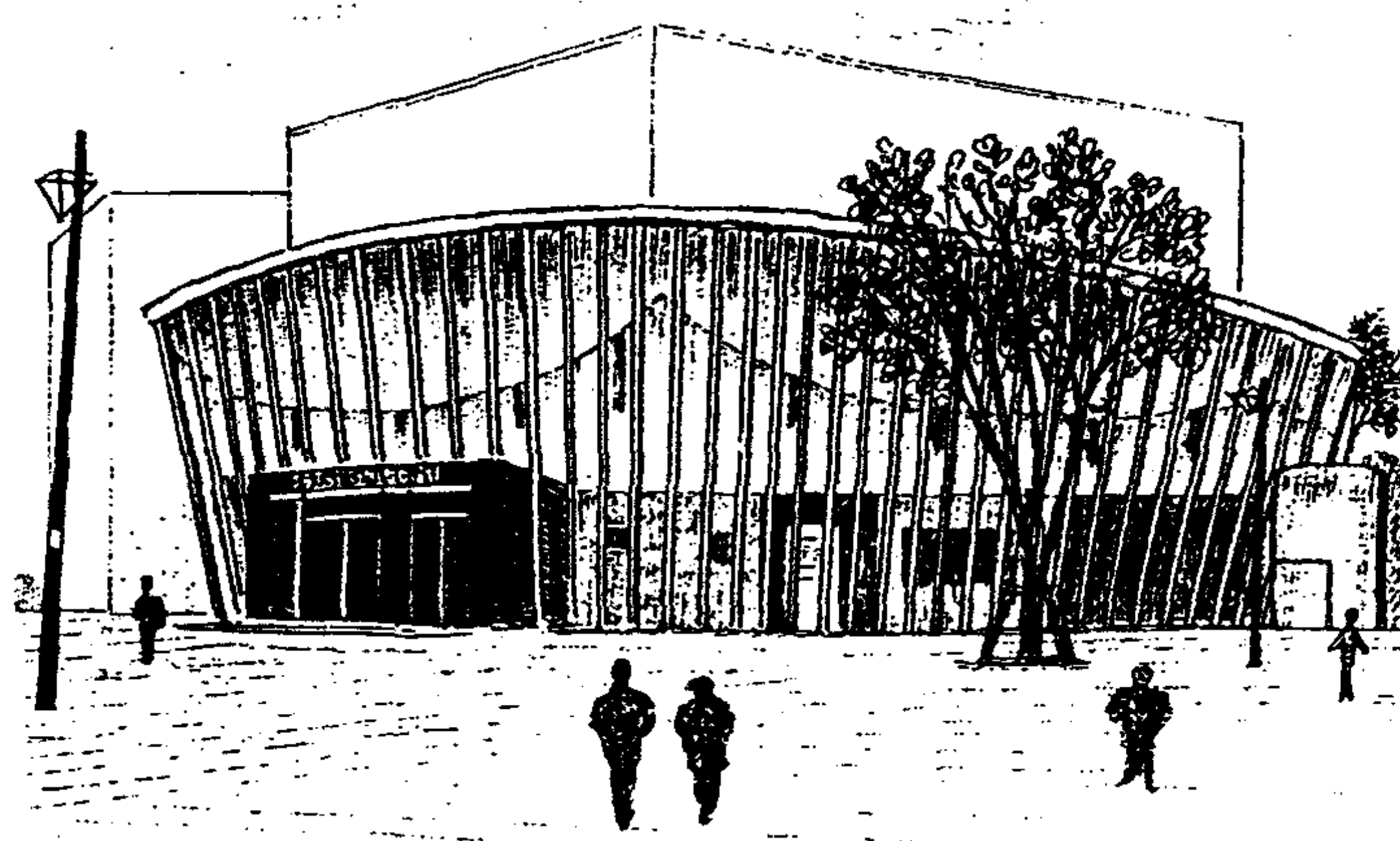
식품관련전공교수 모임 총회 및 워크숍	549
1 주제 충남농업테크노파크 운영방안	551
· 노태홍 단장 (충남농업테크노파크 RIS사업단)	
2 강연(1) 벤처기업 성공요인 및 사례분석	571
· 김동신 소장 (솔로몬기업전략연구소)	
3 강연(II) 우리 농산물로부터 얻은 신규 리그난의 뇌보호 효과	585
· 김미리 교수 (충남대학교)	
4 강연(III) 식품생명공학기술을 이용한 농식품산업의 접근	609
· 성장근 교수 (충남대학교)	
5 강연(IV) 달걀의 골성장 촉진효과	621
· 김해경 교수 (한서대학교)	
6 주제 농기업 1:1 기술컨설팅	639
· 오만진 교수 (충남대학교)	
7 식품관련 전공교수 모임 운영위원회 발자취 및 주소현황	651



충남농업테크노파크 RIS사업단

大会講演要旨集

■2004年度(平成16年度)大会[広島]■



広島大学サタケメモリアルホール

大会関連記事	巻頭
座長一覧	とじこみ
一般講演要旨	1
創立80周年記念事業・外国人特別講演要旨	311
学会賞等受賞講演要旨	315
シンポジウム要旨	357
ランチョンセミナー要旨	489
人名索引	(1)
キーワード索引	(59)

.....



社団法人日本農芸化学会

Japan Society for Bioscience,
Biotechnology, and Agrochemistry
<http://www.isbba.or.jp/>

3A15p14 金線蓮の持久力増強作用に関する研究
○池内 真弓, 山口 宏二, 西村 富生¹, 矢澤 一良 (東京海洋大院,
¹赤塚植物園)

【目的】金線蓮はラン科の植物であり、南西諸島南部と台湾に自生しており、台湾では、全草を薬用で使用され、糖尿病、肝疾患、腎疾患、肺病などに効果があると言われている。この金線蓮抽出物を用い、持久力増強作用について検討した。
【方法】 ddYマウス4週齢雄を3群に群別 (controlおよび金線蓮抽出物500mg/kg、1000mg/kg投与) し、4週間の投与を行い、持久力を判定する目的で、強制遊泳実験を行った。遊泳運動は週1回の間隔で行い、体重の10%の重りを負荷し、頸部が5秒間完全に水中に水没するまでの時間を測定し、遊泳時間を持久時間として判定を行った。
【結果】金線蓮1000mg/kg投与群においては、投与後1週目よりcontrol群に比し有意に遊泳時間の延長が認められた。また、金線蓮投与群では、乳酸値の上昇が有意に抑制されていた。金線蓮には、遊泳運動による乳酸生産率の減少もしくは、乳酸緩衝率の増加の効果を有する可能性のある事が示唆された。

3A15p15 Diffructose anhydride III (DFAIII) のヒトにおける長期摂取試験
○鎌谷 幸子, 富田 智子, 塩見 卓也, 重松 典宏, 原 博¹, 李 善長², 林 基元³ (ファンケル中研,¹北大院・農・応生科,²敬明大
学校,³建国大)

【目的】 DFA IIIは、ヒトにおいて1日あたり1-3gの摂取でカルシウム吸収促進作用を示すことが明らかにされている。本研究ではDFA IIIの日常的な継続摂取が骨密度、血中・尿中パラメータに及ぼす影響について検討した。
【方法】 試験はダブルブラインド・オープン法で実施した。健康な韓国女子大生24名を2群に分け、Ca100mg及びエリスリトール1gを混合したもの (コントロール群)、またはCa100mg及びDFA III 1gを混合したもの (DFA III群) をそれぞれ毎食後に1日3回摂取させ、これを3ヶ月間継続させた。両群ともにCa源として炭酸Caを用いた。摂取開始前と摂取後1ヶ月毎に、身長、体重、血液及び尿検査を行い、大腿骨及び腰椎の骨密度をDXA法にて測定した。
【結果】 摂取後3ヶ月間における腰椎全体部の骨密度を、摂取開始前値に対する変化率で評価した場合、DFA III群では増加し、コントロール群と比較して有意に高かった。また、尿中デオキシピリジノリン量でも、DFA III群で負の変化率を示した。一方、3ヶ月の試験期間中において、一般的な血中及び尿中パラメータの変動や、その他の有害事象は認められなかった。

3A15p16 Effects of egg-yolk proteins on the longitudinal bone growth in rat
○Kang Hyun LEEM, Myung Gyou KIM, Hye Kyung KIM¹, Yasuyuki OI², Mujo KIM³ (Semyung Univ. Korean Med.,¹Hanseo Univ. Food and Biotech.,²Pharma Foods Int. Co.)

Hen egg is a nutritional store for a new life. Since it contains all substances that necessary for hatching. Accordingly, we examined the effect of egg-yolk proteins on the longitudinal bone growth in Splague-Dawley rat. <METHODS> Egg samples tested were obtained from pharmafoods international. Milk casein was used as a control. The proliferating ratio of chondrocytes was calculated by BrdU, and the longitudinal bone formation rate was estimated. <RESULTS> The proliferating ratio was markedly increased and the bone formation rate in the tibia was significantly increased (p< 0.05) by egg protein administration. The effects were most potent in water-soluble egg-yolk protein fraction. In conclusion, egg-yolk proteins promoted longitudinal bone growth and could be used as beneficial nutritional-component for the bone growth.

3A15p17 高血圧自然発症ラットの骨量およびイソフラボン代謝に対するフラクトオリゴ糖の影響
○上原 万里子, 太田 真帆¹, 石見 佳子², ADLERCREHTZ, Herman³, 金沢 和樹⁴, 増山 隼子, 鈴木 和春 (東横大応生科・栄養,¹明治製菓(株)ヘルス・バイオ研,²国立健康栄養研・食品表示分析,³ヘルシンキ大・医,⁴神戸大院自科・生命科)

【目的】我々は、卵巣摘出骨粗鬆モデルマウス、胃切除骨形成不全ラット等の骨疾患モデル動物の骨量減少に対するイソフラボン (ISO) およびフラクトオリゴ糖 (FOS) の併用摂取効果について報告してきたが、今回は、高血圧自然発症 (SHR) ラットを用いて同様に検討を行った。
【方法】 SHR雄ラットを対照群 (C)、0.4%ISO粗抽出物単独摂取群 (I)、5%FOS単独摂取群 (F)、ISO-FOS併用摂取群 (IF) の計2群に分け、4週間の飼育観察を行った。
【結果および結論】 DXA法による大腿骨の骨密度 (BMD) は、対照群に対しISOまたはFOS単独で高値を示し、更にISO-FOS併用摂取により、相加効果が認められた。また、解剖前12時間絶食後の血中Genistein, Daidzein, Equol, O-DNA濃度はいずれもFOS併用摂取により高値となった。この際、特にEquolの顕著な増加がみられたため、IF群の骨量増加は、エストロゲン様作用の強いEquolの作用を反映している可能性が示唆された。

3A15p18 鶏卵由来骨成長促進成分
○大井 康之, 川崎 善仁¹, 神原 敏光², キム ヘエギョン³, リム ヒョン⁴, 金 武祥 (ファーマフーズ研究所,¹丸善製菓株式会社,²韓国韓瑞大・食品生物工学,³韓国世明大・薬医学)

【目的】卵は37℃で温めるとヒヨコになる。すなわち、鶏卵は骨を形成する素料とその成長を促進する成分を含んだバイオカプセルである。この点に着目して、前者は鶏卵中に含まれる骨成長促進成分の探索を行った。
【方法】鶏卵を分離し、得られた各画分について、骨芽細胞様細胞であるMC3T3-G1細胞を用いて骨成長促進効果を評価した。10%FBSを含む α -MEM培養液で培養したのち、細胞濃度を 2.5×10^4 細胞/mLに調整して96穴プレートに100 μ Lずつ播種した。24時間後、分化促進剤である β -グリセロリン酸塩と試料を含む培養液に置換し、さらに2日間培養を行った。添加した各々の鶏卵由来画分が有する骨芽細胞増殖促進活性は、MTT法によって評価した。また、細胞を過塩素酸にさらして抽出したヒドロキシアパタイト量から石灰化促進能を評価した。
【結果】得られた鶏卵由来成分のうち、卵黄水溶性画分はコントロール群に比べて有意に骨芽細胞の成長を促進した。

3A15p19 サトウキビ抽出物のラットへの血圧と糖吸収に及ぼす影響
○井上 文英, 上田 智之¹ (廣大・医・生化,²廣大・医・動物)

【目的】サトウキビの収穫時に処分されている穂の部位について、どのような生理機能成分が含まれるか、サトウキビ穂の抽出物を調製して、ラットに投与した際の血圧と血糖値にどのような影響があるかを検討した。
【方法】サトウキビ穂にエタノールを加えて抽出し、フィルターで濾過したものをロータリーエバポレーターで濃縮してサトウキビ穂のエタノール抽出物とした。この抽出物を、GKラット (II型糖尿病NIDDMを呈する非肥満型モデル動物) に経口投与してグルコース負荷試験を実施した。一方、自然発症高血圧ラット (SHR) にサトウキビ穂に沸騰蒸留水を加えて加熱抽出しフィルターで濾過後凍結乾燥したものを蒸留水で溶解してSHRラットに自由摂取させた。
【結果と考察】アルコール抽出物を投与した動物群は対照群と比べて血糖値の上昇を有意に抑えた。アルコール抽出物には血糖値を抑える効果があることが認められた。一方、熱水抽出物を投与した群は対照群と比べて血圧の上昇は抑えられた。以上のことから、サトウキビ穂の各種抽出物中には生理的に有効な成分が含まれることが示唆された。

3A15p20 サトウキビ抽出物のHelicobacter 属菌に対する作用
○上田 智之, 井上 文英¹ (廣大・医・動物施設,²廣大・医・生化学)

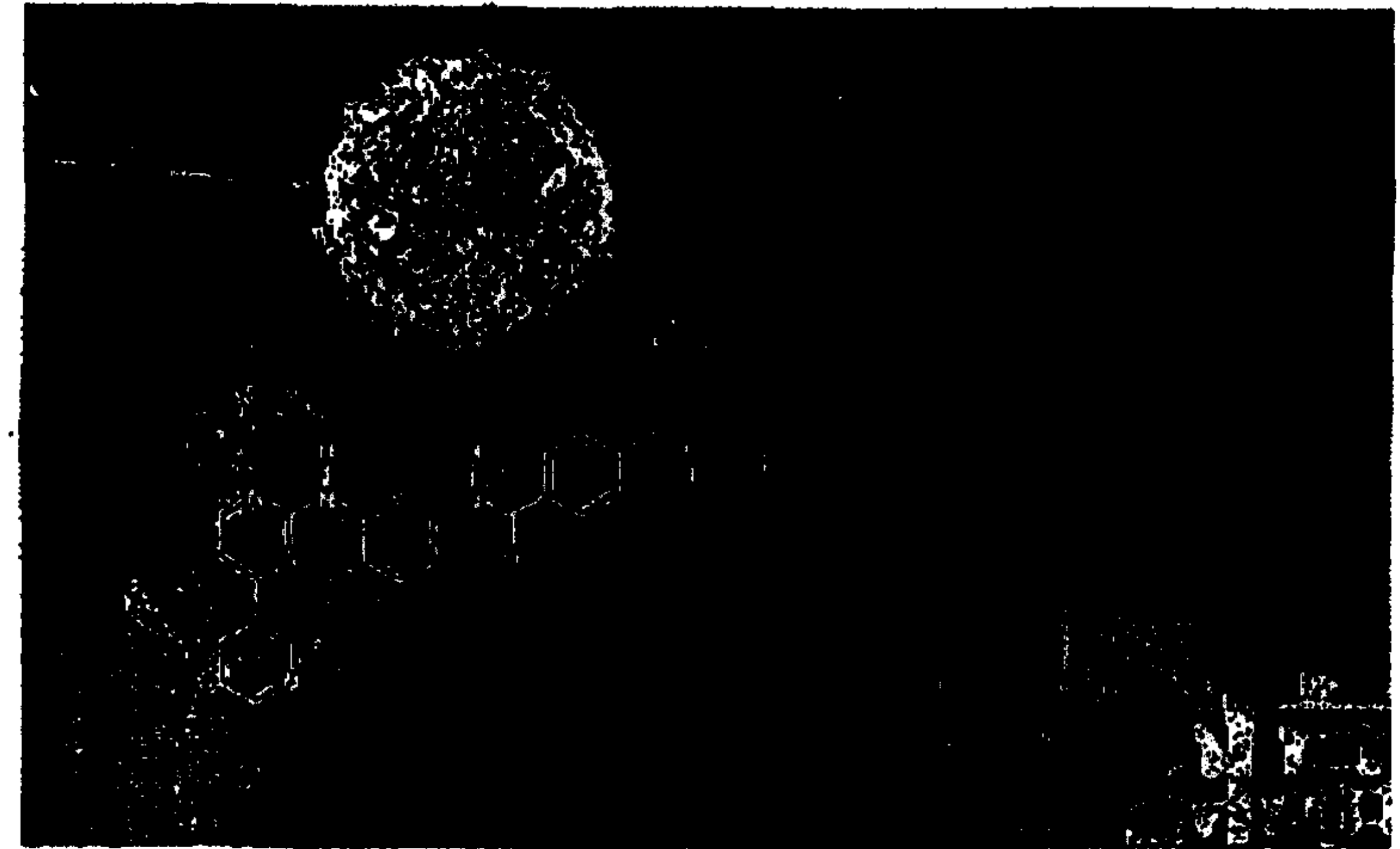
【目的】ヒトを宿主にする*Helicobacter pylori*はヒトの胃潰瘍や胃癌発症の引き金になっていることが報告されている。現在ではヒト以外の動物を宿主とする*Helicobacter*属菌 (以下H属菌) も知られている。ここでは、*H. pylori*を含めた数種のH属菌に対するサトウキビ抽出物の作用を検討した。
【方法と結果】サトウキビ抽出物は井上、上田の報告のように、サトウキビ穂を沸騰蒸留水、各濃度のエタノール溶液で抽出後、フィルターで濾過してロータリーエバポレーターで濃縮したものをを用いた。H属菌として*H. pylori*、ネコの*H. felis*、ラットの*H. moridarum*、そしてフェレットの*H. mustelae*の4種を用いた。H属菌の培養時にサトウキビ抽出物の希釈系列を作り、それを各H属菌を選択培地に蒔いた後、系列の溶液を直径5ミリ濾紙のディスクに吸着させて培地上に配置して、ディスク周りの菌の成長状態を観察しその効果を評価した。サトウキビ抽出物中のポリフェノール含量をカテキンに換算したものを実験の指標とし、対照にはカテキン等を用いて比較検討した。その結果、サトウキビ抽出物中にはH属菌に対して増殖を抑制する成分が含まれることが示唆された。

3A15p21 甘茶のショ糖吸収阻害活性と脂肪細胞に対する影響
○坪井 誠, 高橋 達治, 松浦 信康¹, 小島 弘之, 大塚 光晴, 川崎 祐治, 長谷川 順一 (一丸ファルコス,¹富山生物工学研究センター)

【目的】食品添加物の甘味料である甘茶エキスは、日本薬局方薬品である甘茶 (*Glydrangea macrophylla* Ser. Var. *thunbergii* Makino.) から得られた抽出物である。この甘茶エキスに新たな活性を見いだした。甘茶エキスのダイエット効果に対する新しい知見を紹介する。
【方法・結果】 α -グルコシダーゼ (EC3.2.1.20) に甘茶エキスを添加し、基質シュクロースを添加しインキュベートした。マウス前駆脂肪細胞 (3T3-L1) は10%FCS-ダルベッコ変法イーグルMEM培地を用いて、37℃、5%CO₂条件下で培養した。インシュリン添加により細胞を分化させ、[I-14C]-sodium acetateの取り込み量を測定することで分化誘導量を求めた所、甘茶エキスに脂肪細胞への分化抑制作用が見られた。甘茶の主要甘味成分であるPhyllodulcinに α -グルコシダーゼに対する阻害活性が認められ、人に対してシュクロースを50g摂取させ、血糖値を測定した結果、血糖値の上昇の遅れも見られた。糖尿病患者や肥満症の甘味料として甘茶を用いることの有効性を一部証明できたものと思われる。



“제 5회 충북 BT 연구회 심포지엄”



충주대학교

문의 : 충주대학교 식품생명공학과
전화 : (043) 841-5246, 5241
이메일 : bio@chungju.ac.kr

장 소 : 세명대학교 창업보육센터 311호
입 시 : 2004년 11월 5일 (금요일) 15:00
주 최 : 충북BT 연구회 (지역특산생물자원연구회)
후 원 : 충북테크노파크 (충북전략산업기획단)
세명대학교 산학협력단

초대의 말씀

충북테크노파크(충북전략산업기획단)의 후원 하에 다음과 같이 제5회 충북BT연구회(지역특산생물자원 연구회) 심포지엄을 세명대학교에서 개최하고자 합니다.

관심 있는 많은 충북지역 연구자들의 참석을 바라며 충북의 BT분야 발전을 위하여 활발한 의견제시를 부탁드립니다.

2004년 10월 28일

충북 BT연구회 (지역특산생물자원연구회)
충주대학교 식품생명공학과 정 경 환

행사 일정

- ▶ 15:00~15:10 연구회 회장 인사
- ▶ 15:10~15:20
충북BT연구회와 전략산업기획단의 역할
손승모 선임연구원 (충북테크노파크)
- ▶ 15:20~16:00
Pain Modulation by Neuro-immune (glial) Interactions
오 석 배 교수 (서울대학교 치과대학)
- ▶ 16:00~16:10 질의
- ▶ 16:10~16:50
천연한방치료제의 세계시장 진출 전략
- 건선치료제의 성공사례 -
정 성 욱 대표이사 (주식회사 인큐비아)
- ▶ 16:50~17:00 질의
- ▶ 17:00~17:10 coffee break
- ▶ 17:10~17:50
Effects of Egg Yolk Proteins on the Longitudinal Bone Growth of Adolescent Male Rats
임 강 현 교수 (세명대학교 한의학과)
- ▶ 17:50~18:00 질의
- ▶ 연구회 회장 인사