

11-1543
000-002
098-01

한국 특용 가금자원을 이용한 기능성 소재 및 가공식품 개발 최종보고서

2018

농림축산식품부

고부가가치식품개발산업 R&D Report

발간등록번호

11-1543000-002098-01

한국 특용 가금자원을 이용한 기능성 소재 및 가공식품 개발

최종보고서

2018. 01. 11

주관연구기관 / 중부대학교

협동연구기관 / 대전대학교(한의대)

협동연구기관 / 대전대학교(식품영양)

참여 기업 / (주) 지산농원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “한국 특용 가금자원을 이용한 기능성 소재 및 가공식품 개발”(개발기간 : 2014.11.28 ~ 2017.11.27)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018.01.11.

주관연구기관명 : 중부대학교 산학협력단 (유 선균) (인)
1 협동연구기관명 : 대전대학교 산학협력단 (김 동희) (인)
2 협동연구기관명 : 대전대학교 산학협력단 (김 기남) (인)
참여기관명 : (주)농업회사법인 지산농원 (이 승숙) (인)

주관연구책임자 : 유 선균
1 협동연구책임자 : 김 동희
2 협동연구책임자 : 김 기남
참여기관책임자 : 이 승숙

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	314040	해 당 단 계 연구 기 간	3차년도	단 계 구 분	3차년도 / 3차년도
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치 식품개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	한국 특용 가금자원을 이용한 기능성 소재 및 가공식품 개발			
연구책임자	유 선균	해당단계 참 여 연구원 수	총: 26 명 내부: 20 명 외부: 6 명	해당단계 연구 개발 비	정부: 400,000 천원 민간: 10,000 천원 계: 410,000 천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 83명 내부: 20명 외부: 63명	총 연구개발비	정부: 1,200,000 천원 민간: 300,000 천원 계: 1,500,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	중부대학교 산학협력단		참여기업명: (주)농업회사법인 지산농원		
위탁연구	연구기관명:				
<ol style="list-style-type: none"> 1. 연산오계 부위별 육, 난, 부산물로부터 상업용 프로티아제를 이용하여 펩타이드 형태의 가수분해물 제조, 효소 최적반응 확립 (최적효소선정, pH, 온도, 효소량 등, 가수분해물의 물리화학적 특성분석 및 영양분석. 2. 가수분해물로부터 기능성 펩타이드 분리 공정 확립 (이온교환수지, 겔수지, RF-HPLC). MALDI-TOFF, LC/MS를 기능성 펩타이드 구조분석 통한 동정. 3. 기능성 펩타이드 운반체로서 리포솜 선택 및 캡슐화 공정 개발, 키토산 코팅 리포솜 제작 및 제작 리포솜의 simulation를 통한 위와 장내 거동 연구, 장기간 보관 및 온도에 따른 안정성 연구. 4. 기개발 원료 및 제품에 대하여 안전성 평가 및 노화질환(퇴행성관절염), 면역증진, 항산화 효능 등에 대한 효능을 객관적으로 검증. 단회 및 반복 독성 평가를 통해 폐사가 진행되지 않음을 확인하였으며, 혈액 및 장기에 대한 변화가 거의 진행되지 않아 안전성이 확보. 5. 면역증진에 대한 평가 중 면역세포 수를 측정된 결과, SHT 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군은 백혈구, 호산구, 호중구, 단핵구, 림프구 수를 유의성 있게 증가시켜 면역세포 증진에 대한 효능이 확인. 6. 항산화 효능에 대한 평가 중 항산화 효소의 유전자 발현량을 측정된 결과, GR 및 SOD 유전자 발현량을 측정된 결과, SHT와 KOG 실험군은 대조군에 비해 증가가 나타났으나 유의성이 확인되지는 않았으며, GPx, GST 유전자 발현량은 KOG 2000 mg/kg 실험군에서 Catalase 유전자 발현량은 SHT 2000, KOG 2000 mg/kg 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가가 확인. 7. 연산오계의 영양학적 우수성을 평가한 결과, 일반계육에 비해 결사슬 아미노산(BCAA)의 함량이 높고, 지방산 조성이 우수하였으며, 연산오계 육수의 경우 비타민 B2, 칼슘을 비롯한 무기질 함량이 높은 것으로 평가. 8. 환자식과 노인식으로 검은색을 강조하는 흑미오계죽과 흑임자오계죽을 각각 개발. 9. 유아식으로는 오계란야채죽과 어린이용 간식으로 오계란요거트비스코티를 가정간편식의 형태로 개발. 10. 오계펩타이드를 활용하여 오계펩타이드 한방음료와 오계경옥펩타이드 환을 개발. 11. 동물실험 결과 오계 펩타이드 한방음료와 오계경옥펩타이드 용액에서 혈중 지질 개선효과와 운동성 개선효과를 관찰. 			<p>보고서 면수</p>		

국문 요약문

	D-01
연구의 목적 및 내용	<p>1. 연구목적</p> <p>본 연구는 연산오계연산오계(연산 화학리의 오계)의 육질(장기 및 난황 포함), 뼈 및 흑질로부터 효소분해반응(초고압) 및 추출 공정을 이용하여 단백질, 펩타이드, 뼈, 흑질 등 기능성 소재 생산을 위한 원료 및 가공 공정을 표준화하고 항노화, 면역기능증진, 황산화 활성 등에 관한 영양학적 우수성, 약리 작용 및 생리기능성을 규명하고 기능성 소재를 이용하여 시장 분석 및 제품 연구개발 전략을 수립하여 소비자 니즈를 기반으로 한 고부가가치 맞춤형 HMR식, 기능성음료, 분말제품, 환자 영양식, 노인전문식, 유아식 등 가공식품의 개발.</p> <p>2. 연구내용</p> <p>가. 연산오계의 부위별 육, 난, 내장 및 부산물 으로부터 기능성 소재 생산 및 추출공정 확립</p> <p>나. 연산오계로부터 단백질 가수분해물 및 기능성 소재 의 분리 및 물리화학적 특성 규명.</p> <p>다. 연산오계로부터 기능성 소재의 생산체계 확보를 위한 제형화 공정개발.</p> <p>라. 오계의 약리 작용 탐색 및 기능성 소재를 이용한 생리 기능성 평가.</p> <p>마. 연산오계의 육질, 흑질, 및 뼈로부터 기능성 소재 생산및 추출공정으로부터 확립된 소재를 이용한 (in vivo 항산화 활성, 면역활성, 항노화(골다공증 치료효과</p> <p>바. 오계 흑질, 및 뼈로부터 기능성 소재 생산 및 추출공정으로부터 확립된 소재를 이용한 (in vivo 항산화 활성, 면역활성, 항노화(골다공증 치료효과).</p> <p>사. 연산오계와 오계란의 영양학적 유용성 평가 및 간편식 제품 개발</p> <p>아. 연산오계 및 오계란 저분자 펩타이드 및 오계 흑질 색소를 활용한 건강음료 개발</p> <p>자. 특용 가금자원인 연산오계 유래 저분자 펩타이드를 활용한 보충용 식품을 개발</p>
연구개발성과	<p>가.. 연산오계 부위별 육슬러리 제조 하여 상업용 프로티아제를 이용하여 펩타이드 형태의 가수분해물 제조, 효소 최적반응 확립 (최적효소선정, pH, 온도, 효소량 등), 가수분해물의 물리화학적 특성분석.</p> <p>나. 흑질 분리를 위한 multiful 효소 처리 공정 확립 (프로티아제), 흑질 분리를 위한 반응기제작, 추출 흑질의 형태 및 물리화학적 특성 확립, 연산오계 난 및 부산물 내장 부위별 상업용 프로티아제를 이용하여 펩타이드 형태의 가수분해물 제조, 효소 최적반응 확립 (최적효소선정, pH, 온도, 효소량 등), 가수분해물의 물리화학적 특성분석, 콜라겐 추출공정 확립.</p> <p>다. 효소별 생산 단백질 가수분해물의 항산화 특성 비교 및 구성 아미노산 등 영양 비교, 가수분해물로부터 기능성 펩타이드 분리 공정 확립 (이온교환수지, 겔 수지, RF-HPLC), MALDI-TOFF, LC/MS를 기능성 펩타이드 구조분석 통한 동정</p> <p>라. 효소별 생산 단백질 가수분해물의 항산화 특성 비교 및 구성 아미노산 등 영양 비교, 가수분해물로부터 기능성 펩타이드 분리 공정 확립 (이온교환수지, 겔 수지, RF-HPLC), MALDI-TOFF, LC/MS를 기능성 펩타이드 구조분석 통한 동정, 기능성 펩타이드 운반체로서 리포솜 선택 및 캡슐화 공정 개발, 키토산 코팅 리포솜 제작 및 제작 리포솜의 simulation를 통한 위와 장내 거동 연구, 장기간 보관 및 온도에 따른 안정성 연구.</p> <p>마. 가금자원의 추출방법 표준화, 특용 가금자원 증탕액과 함께 사용된 한약재 선별</p>

	<p>및 표준 제조 방법 확립, 단백질 분석을 통한 근섬유단백에서 특용 가금자원을 판별하기 위한 바이오마커 탐색,</p> <p>바. In vivo 모델에서 면역 세포, 면역 관련 장기 및 면역 활성 인자에 대한 효능 확인과 In vivo 모델에서 B임과구, 항산화 및 항노화 (골다공증) 활성 효능 확인, 한국 특용 가금자원의 근섬유 근단백질을 프로테오믹 방법으로 비교 분석을 위한 단백질 분해 및 정량.</p> <p>사. 단회 및 반복 독성 평가를 통한 장기의 변화 유무, 해부학 및 조직학적 등 안전성 확보, 관절 건강 및 노화 질환과 관련된 예방 및 개선 효능 결과 도출, 면역 세포 변화 및 항산화 효능, 유전자 발현에 대한 결과 도출.</p> <p>아.</p> <p>자.. 건강음료 시장 조사 및 소비자 요구도 조사, 연산오계 및 오계란 펩타이드 쌍화음료, 경옥음료, 흑색음료 레시피 개발, 오계펩타이드 건강음료의 운동성과 항산화능 평가. 건강음료의 관능평가 및 영양소 함량 평가, 건강음료 제조공정 확립 (위탁), 건강음료의 저장성 향상을 위한 최적 살균 기술 및 공정 확립 (위탁)</p> <p>차. 시장조사와 소비자 요구도 조사, 오계경옥펩타이드 환 개발 및 영양학적 우수성 평가, 오계펩타이드 한방음료의 in-vivo 흡수율과 항산화능 평가 및 관능평가, 영양소 함량 평가, 오계부산물을 활용한 조미육수 개발, 그리고 흑임자오계죽, 오계펩타이드 한방음료, 오계경옥펩타이드 환의 시제품 및 공정 개발(위탁).</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>가. 국내 외 연산오계로부터 기능성 소재를 확보를 통하여 산업화 및 상품화 활성화 기여 및 국내 토종 동물 자원 활용을 활성화 및 확대방안 제시.</p> <p>나. 연산오계의 단백질 가수분해물 기능성 규명을 통하여 항산화, 면역기능강화 및 항노화 제품 개발 토대 구축 및 지표 펩타이드 성분 구조 분석을 통하여 기능성 원료 생산을 위한 표준화 기반제시.</p> <p>다. 기능성 펩타이드 형태 소재의 안정적인 생체 이용율을 높이기 위한 제형기술확보를 통하여 연산오계 육의 건강 기능식품 제품화 기반 구축 제시.</p> <p>라. 연산오계는 지역적 특성이 강하여 지역특산물로써 이른 바 황금 알인 '캐쉬 치킨' 활성화 및 사업화 구축 및 나아가 특용 가금자원 기능성 소재를 이용한 특성화된 음식 개발을 통한 한식의 세계화 에 일조.</p> <p>마. 특용 가금자원 기능성 소재를 이용한 다양한 제품의 개발을 통해 천안 호두과자와 같은 지역의 브랜드화로 매출 신장.</p> <p>바. 사업화, 제품화, 상품화를 통하여 매출 증대를 통하여 지역민 고용 예정.</p> <p>사. 현장 견학, 가공시설, 판매장, 농가레스토랑 등 기반 조성을 통하여 지산농원에 농가의 6차 산업 시스템 구축.</p>				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>연산오계</p>	<p>생리기능성</p>	<p>건강기능식품</p>	<p>펩타이드</p>	<p>공정표준화</p>

<SUMMARY>

		D-02
Purpose& Contents	<p>1. Purpose of research The research of this study was to investigate the Ogae (black whole body chicken) meats, eggs, and by products to extract the valuable resources. Production process was optimized to produce the standard valued products such as functional foods. With these materials, we investigated to find antioxidant activity, immunomodulatory, anti-aging effects well as nutritional properties. We developed the products such as high valued HMR, functional beverages, powery products, nutritional foods for patients, Professional foods for aging generation, foods for children and etc.</p> <p>2. Research contents</p> <p>a. Process development of production of functional ingredients using Yonsan Ogae such as meats, eggs, viscera, and by-products.</p> <p>b. Physiological Characterization and separation of protein hydrolysates and other functional materials of Yonsan Ogae and functional ingredients.</p> <p>c. Development of formulation process to establish the effective system to produce functional foods.</p> <p>d. Functional and pharmaceutical function' assesment of Ogae ingredients. Through vitro and in vivo study, meats, eggs, melanins, and bones of Ogae was studied to improve antioxidant activity, immunomodulatory, and anti-aging.</p> <p>e. HMR development and nutritional assesment of Ogae meats and eggs.</p> <p>f. Development of healthy beverages using melanins and meats and eggs of Yonsan Ogae.</p> <p>g. Replacement foods development using functional peptides originated from Yonsan Ogae.</p>	
Results	<p>a. Optimization of protein hydrolysates of Yonsan Ogae' meats. The optimum pH, temperature, and enzyme contents was performed. The products was to investigate the physiological properties.</p> <p>b. Using multiple proteases, the melanin was extracted and purified. The special reactor was developed to extract effectively the melanins originated from Yonsa Ogae. Sequently, the characterization of melanins was investigated.</p> <p>c. Protein hydrolysates related to peptides produced from Yonsan Ogae was to investigate antioxidant activity, nutritional value, and functional function. Sequently, functional peptides was isolated and identified by ion-exchange chromatography, gel chromatography, RF-HPLC, MALDI-TOPF, LC/MS.</p> <p>d. Liposome as vehicle of protein hyrolysates was manufactured and investigated the characterization such as encapsulation efficiency and stability.</p> <p>e. Through simulation study, the stability was studied to how much effective remains after mouth fil.</p> <p>f. In vivo, immune cells, organs, and factors that the immune system is a host defense system comprising many biological structures and processes within an</p>	

	<p>organism that protects against disease. was studied using Yonsan Ogae ingredients.</p> <p>g. The effects of water extracts of <i>Gallus gallus</i> var. domesticus (Yeonsan ogolge, GD) on the activities of osteoblast differentiation and the restraint of osteoclast formation were investigated. The water extract of GD in the human osteoblast “MG-63” cell, was examined in relation to alkaline phosphatase (ALP) activity and alizarin red stains. In order to observe the effects of osteoclasts formation.</p> <p>h. Development of the HMR foods using Yonsan Ogae’ meat, eggs, viscera, and by-products was for patients, aging, and children. Products were noodles, meat soups, Ogae eggs, Ogae by-products, black Ogae meat porridge, Ogae meat vegetable porridge, Ogae eggs porridge, biscosti of Ogae.</p> <p>i. All the products such as HMR for children and patients, were developed by sensory tests and assesment of nutritional properties.</p> <p>j. Manufacture of healthy beverage through customers requirement was performed and related foods such as peptides ssahwatang, gyongok beverage, development of receipts.</p> <p>k. Assesment of antioxidant activity, sensory, nutritional contents, and storage were performed to improve the quality of goods.</p>				
<p>Expected Contribution</p>	<p>a. Vitalizations and application of industrialization and commercialization using traditional and domestic animals to retain national resources.</p> <p>b. To suggest the process standardization of functional ingredients to produce the functional protein hydrolysates related to antioxidant activity, immunomodulatory, and anti-aging originated from Yonsan Ogae.</p> <p>c. To open the possibility of commercialization to improve the bioavailability through effective formulation technology such as liposome to encapsulate development of functional peptides</p> <p>d. To open globalization of traditional local foods such as Yonsan Ogae through development of specialized foods.</p> <p>e. To employ the localized person through vitalizations of business and industrialization.</p> <p>f. Establishment of 6 th industrial system on site suh as opening of agricultural restaurant, shops, process facility and tourism.</p>				
<p>Keywords</p>	<p>Yonsan Ogae</p>	<p>physiological functionality</p>	<p>functional foods</p>	<p>peptides</p>	<p>process standardization</p>

(Contents)

1. Summary of research	9
2. Domestic and International Technology Development Status	14
3. Research methodology and results	30
4. Research Achievements, and Contributions to Industry	613
5. Application plan of results	618
6. Foreign Science and Technology Related to the Research	622
7. Safety Protocols of labs	632
8. Representative Achievement of Research and Development	634
9. Others	642
10. References	644

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요	9
2. 국내외 기술개발 현황	14
3. 연구수행 내용 및 결과	30
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	613
5. 연구결과의 활용계획 등	618
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	622
7. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	632
8. 연구개발과제의 대표적 연구실적	634
9. 기타사항	642
10. 참고문헌	644

1 장. 연구개발과제의 개요

1 절. 연구개발의 목적

1. 연구목적

연산오계(연산 화악리의 오계)의 육질(장기 및 난황 포함), 뼈 및 흑질로부터 효소분해반응(초고압) 및 추출 공정을 이용하여 단백질, 펩타이드, 뼈, 흑질등 기능성 소재 생산을 위한 원료 및 가공 공정을 표준화하고 항노화, 면역기능증진, 항산화 활성 등에 관한 영양학적 우수성, 약리 작용 및 생리기능성을 규명하고 기능성 소재를 이용하여 소비자 니즈를 기반으로 HMR식, 기능성음료, 분말제품, 환자 영양식, 노인전문식, 유아식등 가공식품의 개발

2. 연구목표

- 연산오계의 육질(장기 및 난황 포함)으로부터 초고압 액화기술을 이용한 효소반응을 통하여 생리활성 저분자 단백질 및 펩타이드 제조 기술
- 연산오계의 육질, 장기 및 뼈로부터 효소처리 등 가공 공정을 도입하여 흑질 추출물 제조 기술
- 연산오계로부터 뼈 성분 분리 및 가공 처리 기술 확보
- 제조 저분자 단백질 및 펩타이드 가수분해물로부터 기능성 활성 물질 분리 및 구조 동정
- 추출 흑질의 분획물 확보를 통하여 순수분리 및 구조 동정
- 분리된 뼈 성분의 분획물 확보 및 성분 분석.
- 기능성 및 지표성분을 기반으로 생리활성 저분자 단백질 및 펩타이드등 생산체계 확보를 위한 제조 공정 표준화 확보.
- 추출 흑질의 추출, 건조, 분말 및 가공공정에 이르는 생산체계 확보를 위한 표준화 공정 확보
- 기능성 뼈 성분의 가공처리 생산체계 확보를 위한 표준화 기술 확보.○ 연산오계의 육질(장기 및 난황 포함)으로부터 초고압 액화기술을 이용한 효소반응을 통하여 생산된 저분자 단백질 및 펩타이드를 이용 항노화, 면역기능증진, 항산화 활성 약리작용 및 생리기능성 평가 (in vitro 및 in vivo).
- 연산오계의 육질, 장기 및 뼈로부터 효소처리로 생산된 흑질 추출물의 항노화, 면역기능증진, 항산화 활성 약리작용 및 생리기능성 평가 (in vitro 및 in vivo).
- 연산오계의 뼈유래 항노화 약리 작용 및 생리기능성 평가 (in vitro 및 in vivo).
- 연산오계 유래 기능성 소재를 이용 일반 조리방법과의 경제성, 작업편리성, 안정성, 품질향상 등의 차이점 비교 검토
- 오골계 식재료 전처리 기술 확립 하고 제품표준화 위한 품질지표를 기반으로 HMR, 기능성음료, 분말제품, 환자 영양식, 노인 전문식, 및 유아식 개발
- 오골계 식재료의 영양학적 우수성 평가를 위한 분석 및 다양한 조리법에 의한 품질변화 및 관능특성 평가

- 개발 제품에 대한 살균기술 개발 및 오픈계 가공 부산물 활용 제품 개발 및 포장방법(vacuum, skin vacuum 및 CO2 를 이용한 MAP 등) 개발, 가공 식품의 살균처리 조건 확립 및 살균법에 따른 품질 및 관능특성, 미생물학적 안전성 등 비교
- 개발 제품의 시장 진입 전략수립을 바탕으로 제품 출시를 위한 계획 수립(품질 및 가격경쟁력 확보, OEM 생산 및 기술이전 등)

2절. 연구개발의 필요성 및 범위

1. 연구개발의 필요성

○농림수산축산부에서 2014년 신 식품정책을 발표하면서 우리나라 식품 정책의 새로운 목표 “국민 건강 및 행복을 위한 식품” 추진 계획을 발표의 주요 내용 중에 “농업인-식품기업-소비자가 모두 만족하는 ‘10-10 Project*’ 추진의 핵심은 10년 이내 가공식품의 수입산 원료 10%를 국내산으로 대체 하고 우리 식품산업의 글로벌 경쟁력 제고를 위한 품목별 가공 산업 활성화, 유아 및 실버식품 등 미래전략품목 육성, 국민의 외식서비스 수준을 향상시키기 위해 외식 서비스현장, 서비스 인증제를 도입하고, 한국판 ‘미슐랭가이드’를 추진

○세계적인 전통 음식 및 재료를 대상으로 보존과 상품화를 위하여 국제슬로푸드 생명다양성 재단은 2013년 현재 전 세계 76개국의 1,211개 품목이 슬로푸드 ‘맛의 방주’에 올라 있으며 우리나라에서는 올해 처음으로 연산오계를 비롯한 5개 품목이 인증을 받아 세계적인 음식품목으로 지정되어 새로운 가공기술 및 현대적 효능 검증이 시급한 실정임.



○ 연산오계는 전통적으로 항노화, 면역기능 증진, 항산화 활성화 등 다양한 건강 증진 및 개선에 관한 생리활성이 알려짐에도 불구하고 현대적인 기전이 잘 밝혀지지 않아서 건강기능 인정을 위한 체계적인 연구가 진행이 된다면 실용적인 상품화에 크게 기여를 할 것으로 봄.

○ 특히 연산오계의 육질 부분은 내장의 기능을 조절하고 화상 및 이명 출혈에 효과, 시력 회복 및 근력 강화, 태아 성장을 촉진, 눈의 결막염, 건성 피부를 치료된다고 보고되었고 동의보감에 따르면 “닭고기는 허한 것을 보하고 속을 따뜻하게 하며 안태의 효능이 있다”고 서술되

어 있으며, 황자계육과 오자계육, 오웅계육(검은 수탉의 고기), 백웅계육(흰 수탉의 고기), 단웅계육(붉은 수탉의 고기)등 닭의 종류에 따라 그 약효를 조금씩 다르게 서술하였고, 특히 오계의 경우 오자계 및 오웅계의 항목에서 고기뿐 아니라 닭의 피나 염통, 창자 등 여러 부위를 구분하여 사용하였으므로 고기의 도체수율, 품질, 유효성분이나 약리효과에 대해 실험적 자료가 국가 생물자원 보존 측면에서 필요함.

○ 특히 멜라닌은 대부분의 생명체에서 발견할 수 있는 자연색소 물질로, 동물의 피부, 털의 색을 결정하는 역할을 함. 최근 멜라닌은 항산화, 항염증, 항비만 효과가 있는 물질로 알려짐. 멜라닌은 다양한 종에서 활성산소를 줄이는 효과를 보였으며, 과산화수소제거효소를 보완하며, 염증을 억제하는 효과를 나타냈음(M.J. 2004; Avramidis et al. 1998).

○ 지방세포에서 생성되는 멜라닌은 비만과 관련된 질병으로부터 보호해줄 것이라는 연구결과가 발표되었으며, 지방세포내에서 멜라닌에 의한 항산화·항염증효과로 지방세포의 축적이 조절될 수 있다는 가설이 제기되고 있음(Manpreet et al. 2009; S.page et al. 2010).

○ 중국과 일본은 이미 식품 및 한의학 임상에서 오골계의 뼈를 이용하여 근골계를 비롯한 내분비계, 순환계의 질환의 임상적 활용을 위한 소재에 대해 다양한 기초 연구와 산업화가 이루어져 중국과 일본은 오계의 기능성 소재를 활용하여 다양한 음식과 건강기능식품 등의 제품 개발을 통한 오계의 상품화를 시도하고 있기 때문에 경쟁력 확보를 위해서 국내 개발이 시급한 실정임.

○ 연산오계의 육질(장기포함), 뼈 및 흑질의 기능성 성분들로부터 가공기술 또한 전통적인 증탕 및 요리 수준에 머물러 있기 때문에 초고압 등 신기술을 도입을 하여 연산오계의 기능성 성분의 추출, 분리 및 분말화에 이르는 원료 및 공정의 표준화가 수립하여 소비자들의 신뢰 확보 및 항 기능성 제품을 제공할 수 있기에 체계 구축이 시급함

○ 최근 단백질 및 기능성 펩타이드의 항산화 및 면역증진 효과에 탁월한 것으로 연구 발표가 되면서 많은 연구자들 및 산업체의 주목을 받고 있다. 그러나 오계의 대부분을 차지하는 장기, 난황 등 육질을 으로부터 단백질 및 기능성 펩타이드 제조하여 기능성 규명에 대한 연구는 전무한 실정임.

○ 국내에는 2013년 현재 건강기능식품 고시형 원료로 지정된 단백질 및 아미노산은 대두단백 및 테아닌으로 콜레스테롤 개선 및 스트레스에 의한 긴장완화로 각각 효능을 인정받았다.



2013년 현재 식약청 건강기능식품 인정 펩타이드와 효능

콩발효추출물 유단백 가수분해물	↔	스트레스완화
정어리펩타이드	↔	고혈압완화
카제인가수분해물	↔	고혈압완화
쥐눈이콩 펩타이드	↔	혈당조절
연어펩타이드	↔	고혈압완화

○ 현재까지 건강기능식품 개별 인정형 원료로 받은 단백질 가수분해물은 콩발효추출물, 유단백 가수분해물은 스트레스 완화로 받았고, 정어리 펩타이드는 2008년 지표물질인 바릴티로신(Val-Tyr)로 0.05% 수준으로 표준화되었고 고혈압 완화로 인정을 받았고, “피브로인 효소가수분해물”은 누에고치를 정련하고 효소가수분해하여 만들었고, 지표성분인 티로신(tyrosine), 알라닌(alanine)는 그 함량이 각각 0.7%, 0.8%가 되도록 표준화하였고, 기억력 개선으로 효능을 인정 받았고, 카제인 가수분해물은 “카제인가수분해물”은 우유 단백질을 열처리 한 후, pancreatic trypsin으로 효소분해하여 제조되며, 지표성분은 [Phe-Phe-Ala-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys] 12개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로 5~6% 함량으로 표준화되고 혈압 완화로 인정을 받았음.

○ “가쓰오부시 올리고 펩타이드”는 가쓰오부시를 분쇄하여 물을 첨가 후, 가열하여 thermolysin을 이용하여 효소분해하여 제조되며, 지표성분은 [Leu-Lys-Pro-Asn-Met] 5개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로 0.34% 함량으로 표준화되었음.

○ 최근 2013년에는 건강기능식품 개별 인정받은 콜라겐펩타이드는 CJ가 받았고 “피부 보습에 도움을 줄 수 있음”으로 생리 활성 기능 II로 받았고, 월드웨이(주)는 실크단백질 효소가수분해물로 인정을 받았으며, 기능성의 내용은 “혈당조절에 도움을 줄 수 있으나, 관련 인체적용시험이 미흡함 (생리활성기능 3등급)” 이다. 또한 태경농산에서는 쥐눈이콩 펩타이드 복합물로 기능성 내용 “혈당조절에 도움을 줄 수 있으나 관련 인체적용시험이 미흡함” 으로 인정을 받았다. (주) 대덕약업은 연어 펩타이드 로 “혈압이 높은 사람에게 도움을 줄 수 있음” 으로 받았고 (주) 삼오제약에서는 “해태올리고펩타이드(NORI-PEPTIDE)” 로 받았음.

○ 수산물로부터 분리한 단백질 가수분해물 및 펩타이드들의 항산화 기능에 대하여는 1995년 Shahi et al. 들의 연구결과가 최초 였다. 이후로 다양한 수산물에서 기능성 펩타이드들이 발표가 되어 왔지만 꽃게 펩타이드에 대한 연구결과는 거의 발표되지 않았고 사업화 예는 없었다.

프리 라디칼 타입	항산화제 (Electron Donor)
● Hydroxyl Radical	Vitamin C, Glutathione, Flavonoids, Lipoic Acid, Xanthone
● Superoxide Radical	Vitamin C, Glutathione, Flavonoids, SOD, Lipoic Acid, Xanthone
● Hydrogen Peroxide	Vitamin C, Glutathione, Beta-carotene, Vitamin E, CoQ 10, Flavonoids, Lipoic Acid, Xanthone
● Lipid Peroxides	Beta-carotene, Vitamin E, CoQ 10, Flavonoids, Glutathione Peroxidase, Lycopene, Xanthone
● Singlet Oxygen	Lycopene, Carotens, Lutein, Canthaxanthin, Lipoic Acid, Vitamin E, Glutathione, Xanthone



새로운 항산화제

펩타이드들의 탁월한 항산화 기능에 1995년에 Shahi. 가 최초 발표

Histidine, Proline, Metionine, Cysteine, Tyrosine, Tryptophan, Phenylalanine.

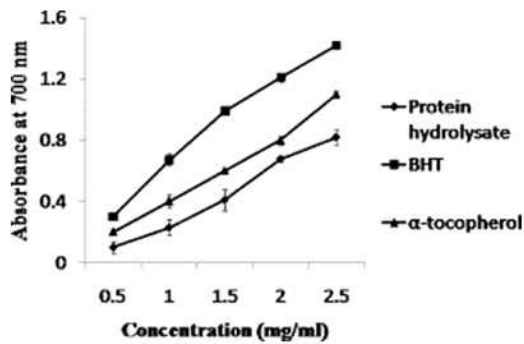
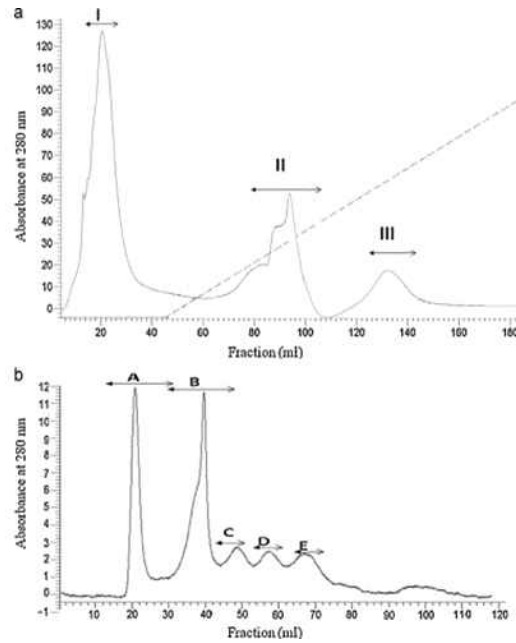


Fig. 2. Purification of the antioxidant peptide from horse mackerel viscera protein (a) Separation of antioxidant peptides by XK26 DEAE anion exchange chromatography. (b) Purification of fraction II using Sephadex G-25.



Peptides, Volume 32, Issue 7, July 2011, Pages 1496–1501

○ 펩타이드는 생체물질로 생체 내에서 고유한 기능을 그대로 유지하기 때문에 기능성이 매우 우수하고 생체 내에 유입되어서 활성을 보인 후 구성물질인 아미노산으로 분해되기 때문에 다량을 사용해도 비교적 안전하며 펩타이드는 그 특성상 펩신소화과정이 필요 없어서 위장에서의 체류시간이 적어 이를 이용한 식품에의 응용과 단백질을 영양소로 직접 이용하지 못하는 사람에게도 이용할 수 있음. 예로서 콜레스트롤 저하, 저 페닐알라닌, 피부세포증식, 저 알레르기, 특수영양식품 등에 원료로 사용되고 있음.

2. 연구개발의 범위

- 연산오계위 육질, 뼈, 흑질 및 난황으로부터 추출물 제조
- 연산오계위 육질, 뼈, 흑질유래 기능성분의 물리화학적 특성 규명
- 연산오계의 기능활성 물질 생산 표준화 및 기준규격 설정
- 연산오계의 기능성 소재 및 가공식품생산 체계 확보
- 단백질 및 펩타이드를 이용 항노화, 면역기능증진, 항산화 활성 약리작용 및 생리기능성 평가 (in vitro 및 in vivo).
- 흑질 추출물의 항노화, 면역기능증진, 항산화 활성 약리작용 및 생리기능성 평가 (in vitro 및 in vivo).
- 연산오계의 뼈유래 항노화 약리 작용 및 생리기능성 평가 (in vitro 및 in vivo).
- 연산오계와 오계란의 영양학적 유용성 평가 및 간편식 제품 개발
- 오계와 오계란 저분자 펩타이드 및 흑질색소를 이용한 건강음료 개발
- 오계 및 오계란 유효성분(펩타이드, 흑질)을 활용한 분말제품 개발

2 장. 국내외 기술개발 현황

1 절. 국내외 관련기술의 현황

○ 최근 국민들의 건강에 대한 관심이 급증함에 질병을 예방 개선 및 치유 가능한 식품 및 천연물 소재 개발에 대한 관심이 고조됨에 따라 이에 관련된 제품들의 연구개발이 활성화 되고 있고 우리나라에서는 건강기능식품 법을 제정하여 국가적으로 지원을 하고 있음.



○ 건강기능식품 규정에 따르면 기능성의 내용들이 면역기능증진, 항산화, 항노화등 24여가지 정도로 분류를 하고 있고 이에 관련된 제품의 시장 규모는 계속 증가를 하고 있음. 식품의약품 안전처 2014년 보도자료에 따르면 2014년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 총 생산액은 1조 4,820억원으로 2012년 1조 4,091억원에 비해 5% 증가하였고 경기 침체에도 불구하고 이러한 경향은 지속될 것으로 예상하고 있음.

구분	총 생산액 (억원)	총 생산량 (톤)	내수용		수출용	
			생산액(억원)	생산량(톤)	생산액(억원)*	생산량(톤)
'09년	9,598	19,885	9,184	19,293	415	592
'10년	10,671	25,361	10,211	24,994	460	367
'11년	13,682	40,258	13,126	39,611	556	647
'12년	14,091	34,599	13,507	33,735	584	864
'13년	14,820	31,446	14,066	30,490	754	956
증감률 ('13/'12, %)	5.2	△9.1	4.1	△9.6	29.1	10.6

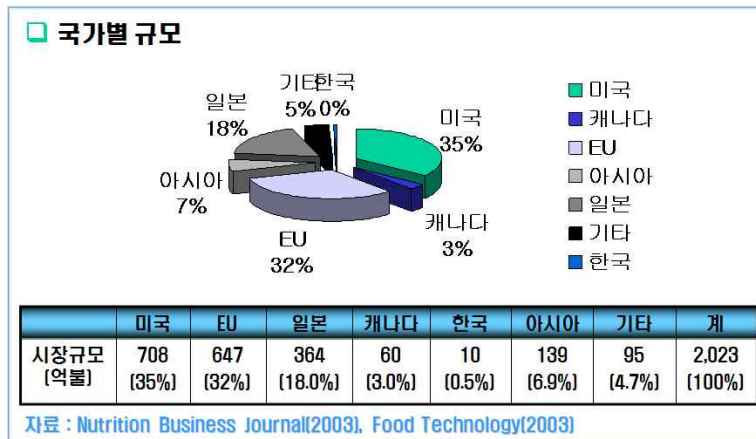
* 1\$ = 1,095원('13년), 출처: 2013년 12월 31일 기준: 식약처

○ 기능성 시장 점유율을 보면 면역기능 개선 관련 제품의 점유율이 25%로 가장 높았고, 혈행 개선(22%), 항산화(21%), 영양소 보충(7%), 장 건강 (5%) 제품 순이었다. 고령화에 따라서 발생

하는 질병 관련 제품들은 대부분 이 범주에 들어가기 때문에 항노화, 면역기능증진, 항산화 관련 제품 시장의 점유율은 60% 이상이라고 예측을 할 수 있음.

○ 관련제품들의 세계시장 규모를 본다면 35%로 미국이 선두에 있고 32% EU, 18%의 일본에 비해 우리나라는 약 0.5%로 경제적 규모가 작은 편이라 산업 경쟁력을 높이기 위해서는 국가적인 지원이 절대적으로 필요한 시점임.

■ 세계 건강기능식품 시장 현황



○ 건강기능식품 중에서 BCC 리서치의 전망에 의하면 항노화 산업의 글로벌 시장 규모는 2013년 항노화서비스 1,529억 달러, 항노화 제품 시장 규모 1,216억 달러로 2008년 이후 연평균 11.1%의 높은 성장을 보이고 있다. 또한 항노화 제품을 중심으로 한 2015년 글로벌 시장 규모는 약 2,919억 달러 규모에 달할 것으로 예상되고 있고 성장률의 측면에서 볼 때 가장 빠른 성장이 예상되는 지역은 아시아지역으로서 향후 항노화 산업의 글로벌 성장에서 그 중요성이 보다 높아질 것으로 보인다. 항노화 식품의 글로벌 시장 규모는 2006년의 1,150억 달러에서 2015년에는 2,500억 달러 규모로 연평균 성장률이 8.1%에 달할 것으로 전망.

〈표 1〉 항노화산업의 세계시장 규모

단위 : 십억달러

	2006	2007	2008	2013	2008~2013 증가율
서비스	71.1	79.0	87.9	152.9	11.7
제품	61.4	67.4	74.3	121.6	10.4
합계	132.5	146.5	162.2	274.5	11.1

자료 : BCC Research(2009), Anti-aging products and services.

○ 면역관련 제조 기술은 최근 기술적 진보로 표적 분자들이 발굴되고, 이에 대한 기능성소재들이 개발되면서 기존에 면역력이 떨어지거나, 지속적인 관리가 필요로 하는 그룹에 긍정적인 해결방안을 제안해 주고 있으며, 그 영역과 가능성은 더 확대되어가고 있음. 특히, 면역관련 질환이 점차 증가함에 따라 이에 대한 융복합적 기술 개발의 중요성과 관련 제품의 필요성은 매우 강조되고 있음.

○ 2011년에 생명산업 제품 중 연간 10억불 이상 매출을 보여 blockbuster drug이라고 불리는

5개 품목 중 4개가 면역치료 관련 제품임. 대부분 의약품이지만 인터루킨, 인터페론, TNF(중양 피사인자), 콜로리 자극인자, EPO 등 사이토카인을 이용한 만성염증 질환이나 면역질환에 대한 치료제는 현재 생물약품 중 가장 큰 비중을 차지하며 거대한 시장을 형성하고 있음.

○ 국내 면역증강제 시장은 연간 10-20% 상승세를 나타내며 2015년에는 2,500억원 규모의 시장으로 성장함. 사이토카인, 케모카인(chemokine) 및 치료용 항체를 포함하는 면역조절(증강) 단백질 국내 시장은 2012년 2,214억원, 2014년 2조 7,600억원 정도이고 건강기능식품 관련 면역증강 및 개선 관련 식품으로는 마늘, 바나나, 클로렐라, 프로폴리스, 인삼/홍삼, 알로에겔, 알곡시클리세롤등으로 알려져 있음.

○ 우리나라의 가금류의 시장은 오리, 재래닭, 육계 및 산란계가 추축을 이루고 있는데 우리나라 재래닭은 2000여년전 중국에서 유래된 것으로 추측되며, 1980년대부터 유전육종 연구가 시작되었고, 재래닭에 대한 육질 연구는 부분적으로 이루어져왔고, 한국축산과학원에서 개발한 우리맛 닭의 출시이후로 본격적으로 산업화가 진행되었음.

○ 닭은 우리나라의 대표적인 축산으로서, 다른 가축에 비하여 생산주기가 빠르고, 비교적 운반이 쉽기 때문에 산업화에 유리하여 양계산업은 대량화가 되어, 2011년에는 닭의 사육두수는 149,511,000마리로 매년 증가하고 있는 추세임. 하지만, 이러한 양계산업의 성장에 비하여, 한국 특용 가금의 비율은 미비한 실정임.

○ 우리나라 특용 가금 자원들 중에 연산오계는 예로부터 귀한 약재로 도경본초, 본초비요 등에도 그 효능이 언급되어 있으며, 지금까지 남아 있는 의안들 고전의서들에 포함된 진료기록 및 처방내역 포함)에는 오계가 다양한 약재들과 더불어 왕가의 질병을 다스리는데 이용되었음을 알 수 있으며, 질병에 따른 구체적 처방이 명시되어 있음.

○ 재래오골계의 원산지는 동남아시아 지방으로서, 인도, 중국, 한국, 일본 순으로 전래된 것으로 알려져 있다. 체형과 자세는 코친(Cochin)종과 닮아서 둥글고 몸매가 미끈하다. 체조직에 멜라닌색소가 침착되어 다리, 피부 및 골격이 흑색이므로 오골계(烏骨鷄)란 명칭이 붙은 것으로 기술. 특히, 우리나라의 연산 오골계는 1980년 4월 천연기념물 제 265호로 지정(문화공보부 고시 제 461호)되었음.

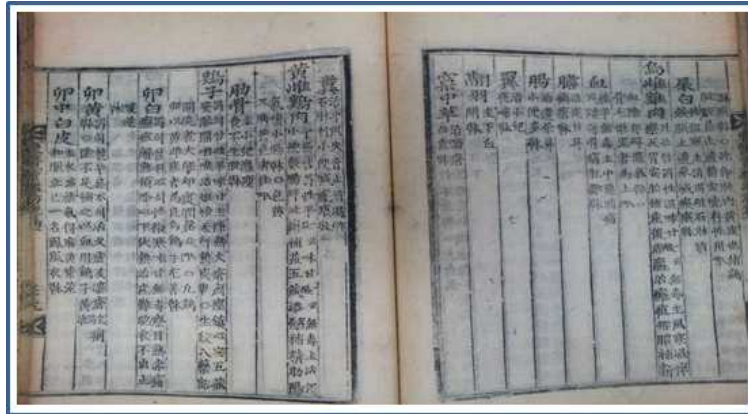


A. 재래종 오계

B. 중국, 일본, 동남아 오골계

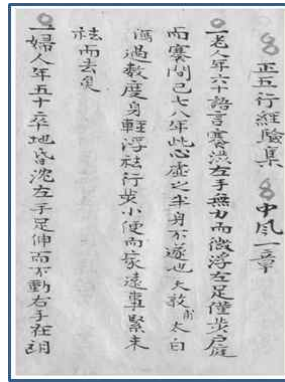
○ 우리나라 재래 오계의 경우 중국, 일본, 동남아 등의 오골계와 비교하여 생김새가 다를 뿐

만 아니라, 그 효능이 우수하다고 알려져 있으며, 천연기념물 제 265호 연산오계는 세계문화유산인 동의보감 탕약편 금수부에 오자계(烏雌鷄)로 기술되어 있고 부위별 효능이 기재되어 있음.



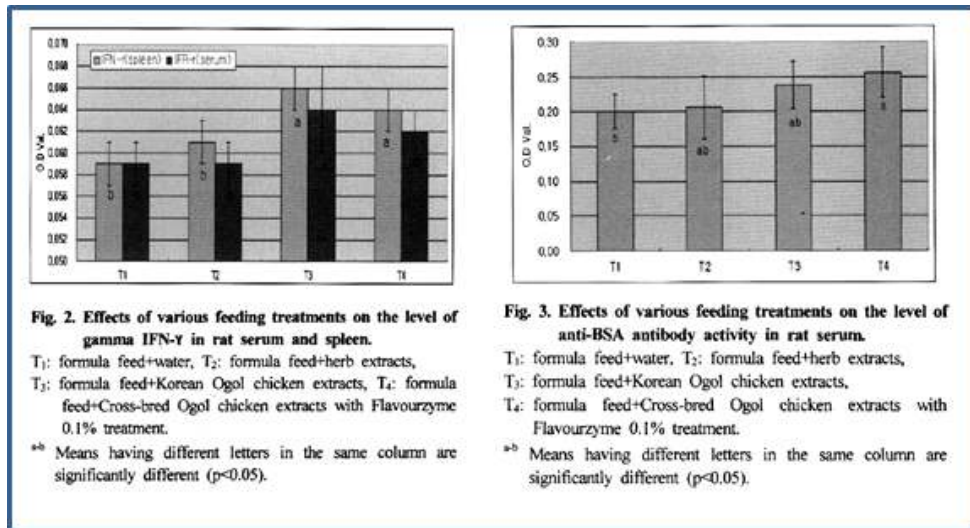
< 동의보감에 나타난 오계의 효능 >

- 특히 오계 중 계룡산 자락을 본산으로 하는 연산오계가 약성이 가장 좋다 하여 특산물을 일컫는 사자성어로 ‘연계노해(連鷄魯蟹, 연산의 오계와 노성의 참게)’라는 말이 생김.
- 한국 재래 연산오계에 대한 중국의 본초강목에 기술된 바에 따르면, 연산오계는 간과 신장과 혈이 잘못된 병, 허약체질, 기가 허해서 나타나는 복통, 냉 대하, 설사, 심신쇠약, 당뇨 및 중풍 치료에 효과가 있는 것으로 보고됨.
- 중국 의약서인 신농초본경에서 육질부분은 내장의 기능을 조절하고 화상 및 이명 출혈에 효과가 있는 것으로 기록됨. 간은 시력 회복 및 근력 강화, 태아 성장을 촉진, 담낭은 눈의 결막염, 건성 피부를 치료된다고 보고됨.
- 또한 신수본초에서는 오계가 부인병 치료에 효과적이라고 보고됨. 또한 본초 강목에서는 간과 신장 질환에 우수하며, 복통, 냉 대하, 당뇨, 심장을 편하게 하는 기능이 보고됨.
- 일본 의약서인 본초식감에는 부인병 및 남성과 여성의 특수한 질병에 효과가 있는 것으로 보고됨. 또한 독일에서는 오계의 흑색성분이 질병 예방 및 치료하여 의약적 효과의 핵심성분이라 보고됨.
- 그밖에도 오계는 귀한 약재로 『도경본초』, 『본초비요』 등에도 그 효능이 언급되어 있으며, 지금까지 남아 있는 의안들(고전의서들에 포함된 진료기록 및 처방내역 포함)에는 오계가 다양한 약재들과 더불어 왕가의 질병을 다스리는데 이용되었음을 알 수 있으며, 질병에 따른 구체적 처방이 명시되어 있음.



< 의안의 예 >

○ 이러한 오계의 과학적 효능 분석을 위한 최근 연구에서도 오계는 골수에서 적혈구의 생성을 촉진하여 빈혈과 출혈에 효과가 있고, 또한 면역계의 기능을 강화(채현석 등, 2004)하여 체조직의 노화를 둔화 시킨다는 것을 밝힘.



오계와 한약재를 이용한 면역 활성화 연구 결과

○ 기타 다른 국내연구보고에 의하면 연산오계는 미용효과, 혈액 정화, 뇌 혈전, 협심증, 고혈압, 간염, 신장병, 골절 등의 치료에 도움이 된다고 보고됨.

○ 또한 중국에서는 혈액을 보호하고 정액생성을 촉진, 당뇨, 소모성열, 만성설사, 이질 치료에 효과가 있는 것으로 보고됨.

○ 일본에서는 고혈압, 뇌출혈, 심장병, 신장염, 간장병, 당뇨에 매우 효과적인 것으로 보고됨.

○ 또한 오계 뿐만 아니라, 오계란의 난백에서 분리한 lysome의 항균활성 등 극히 일부에서만 생리적 활성화 결과를 발표하였음.



2. 연산오계를 이용한 기능성 소재 및 가공식품 개발 국내외 현황

○ 선진국들은 이미 전 세계에 분포하는 자원 생물에 대한 경제적 효용가치를 평가하고 보다 다양한 생물종의 확보에 주력하고 있으며, 다양한 생물종으로부터 신기능성 식품 및 의약품 소재를 생산하는 체계적인 개발 정책을 펼치고 있음.

○ 미국과 유럽에서는 오골계(주로 중국산 오골계)의 생리활성에 대한 효능 검증을 통해 천연물 신약개발에 연구를 활발히 진행하고 있으며, 새로운 항산화물질이 다량 함유된 “슈퍼푸드(superfood)”로 각광받고 있음(출처: <http://voices.yahoo.com/what-black-chicken-superfood-397387.html>).

< 웹사이트에서 본 미국과 유럽의 중국산 오골계에 대한 소개 >

○ 중국과 일본은 이미 식품 및 한의학 임상에서 오골계의 뼈를 이용하여 근골계를 비롯한 내분비계, 순환계의 질환의 임상적 활용을 위한 소재에 대해 다양한 기초 연구와 산업화가 이루어진 상태임.

○ 또한 중국과 일본은 오계의 기능성 소재를 활용하여 다양한 음식과 건강기능식품 등의 제품

개발을 통한 오계의 상품화를 시도하였음.



< 일본과 중국의 오골계 소재를 활용한 제품 >

- 전세계적으로 고부가가치 생물유전자원에 대한 세계적 관심이 고조되고 있으며, 강대국들은 자원전쟁의 시작을 대비하여 국가적 차원에서 생물 관리체계를 정비하고 있음.
- 한편, 중국의 농업 R&D 투자액은 2008년에 146억 위안(약 2.6조 원)에 달하며 최근 민간부문의 농업 R&D 투자가 지속적으로 증가하고 있음.
- 이러한 국내외 동향들을 볼 때, 오계를 활용한 건강기능식품의 개발은 농축산업과 식품산업의 동반성장을 도모할 수 있을 뿐만 아니라, 아직 초기 단계에 있는 오계 등과 같은 전통 신소재 개발을 통한 식품산업의 국제경쟁력을 제고하기 위해서도 반드시 필요함
- 질병치료 및 건강증진에 대한 오계의 다양한 효능에도 불구하고 사육이 까다롭고, 사육기간도 오래 걸리는 등 수익성 차원에서 경제적 가치가 낮아 국내에서는 사육농가가 제한적이며, 사육농가를 중심으로 백숙이나 한약재를 함께 넣고 만든 탕 정도로만 이용되고 있음.
- 또한, 오계의 경우 국내 천연물로 지정되었음에도 개인에 의해 소규모적이고 단편적인 민간 차원에서 보존되고 있음.
- 연산오계의 생리 활성의 규명 연구는 실험실 수준에서 시행되고 있으며 일부 소규모 민간 차원에서 생리적 활성 연구가 진행되고 있고, 식·의약품으로써의 기능성 소재화에 대한 제품 개발은 매우 미비한 실정임.
- 연산오계의 식·의약 소재 개발에 대한 연구가 지속적, 조직적, 효율적, 체계적으로 이루어지지 않아 산업화로 연계되지 못하고 있는 실정이며 이에 따른 기능성 물질의 소재화 및 산업화를 증진할 필요가 요구됨.
- 따라서 연산오계를 이용한 건강기능식품을 개발하고, 다차원적인 생리활성 연구를 통해 오계의 고부가가치화를 통한 수요를 창출하는 것이 시급한 실정임.
- 오계를 이용한 건강기능식품의 부가가치를 높이기 위해서는, 약용식물 혹은 한약재(韓藥材)와의 복합사용을 통해 건강기능식품산업 뿐만 아니라 전통 문화적 가치를 바탕으로 급성장하

는 한방산업의 ‘미래식품’으로서의 기술개발이 요구됨.

○ 이러한 차원에서 오랜 기간의 경험을 바탕으로 적용된 고문서들의 해석과 양·한방 측면에서의 과학적 분석을 통한 이론적 근거의 마련은 신소재 개발 및 제품화에 있어 위험성(risk)을 줄이고, 비용절감 효과를 기대할 수 있음.

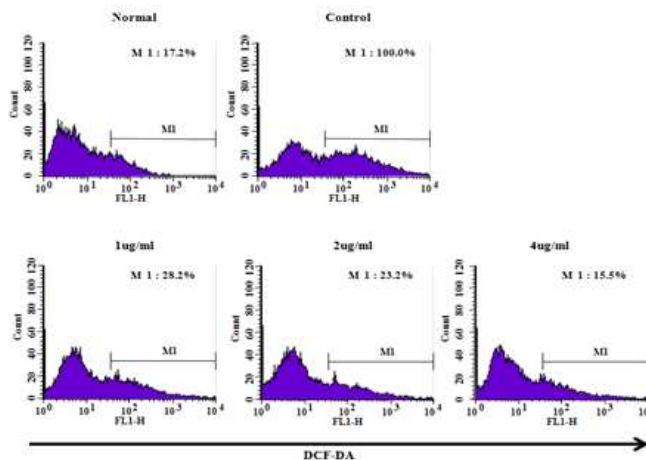
○ 본 연구팀은 연산오계 육질(장기 및 난황 포함), 빼 및 흑질로부터 약리, 생리활성 기능 및 영양학적으로 우수한 소재 추출 하여 항노화 면역증진, 항산화 활성 효능을 규명하고 소재의 생산 체계 구축을 공정 표준화를 확보하여 국민 건강을 증진시키는 식품 개발하여 국내 뿐 아니라 글로벌 시장에서도 경쟁력을 보유하는 건강기능식품으로 개발할 예정임.

○ 본연구팀은 연구의 성공을 위하여 기능성 물질 추출기술, 생리기능성 평가기술, 소재가공 및 제품제조 기술에 대한 탁월한 전문성을 지닌 기관으로 구성.

○ 주관기관인 중부대학교 식품생명과학과 유선균 교수연구실은 식품 및 천연물 분석기기들인 GC, LC, TLC, 분광광도기외 다수가 있어 발효 생성물의 빠른 분석이 가능함 하고, 천마 및 천연물 추출 및 농축을 위한 실험실 및 pilot plant 규모의 설비가 있어 회수 발효 생성물의 농축을 할수 있고, 건조를 위하여 동결 건조기등이 설치되어 있음. 효소 발효를 위하여 실험실내 5L 반응기가 설치되어있음 (아래그림참조).

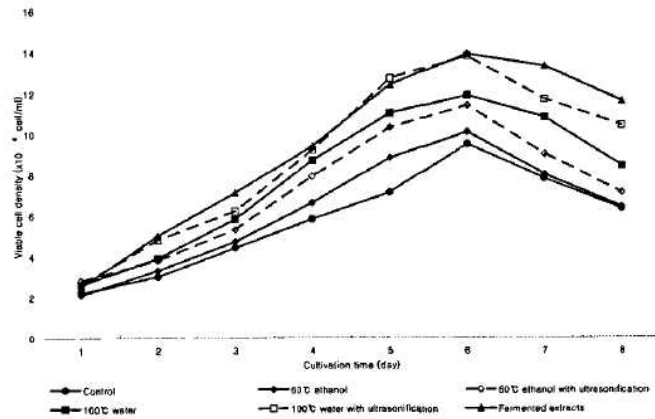
○ 중부대학교 산학협력단에는 식약청 인증 건강기능식품 분석센터가 2004년 6월에 설치되어 있고, 화장품 품질관리기관으로 2005년 7월 식약청으로부터 인증을 받은 건강기능식품 분석센터에는 GC, GC-MS, LC, LC-MS, FTIR, IR, ICP, Spectrophotometer, PCR, Microbial analysis 등 다수의 분석기기가 구비 되어있어 언제든지 공식적으로 인정이 되는 분석 결과를 빠르게 알 수 있어 과제 수행을 원활하게 수행할 수 있음.

○ 항산화 활성은 특용 가금자원의 추출방법 표준화 및 용매 분획물(에탄올, 물)의 확보하여 DPPH 라디칼 소거활성 측정, ABTS 라디칼 소거활성 측정 및 환원력 측정, Superoxide anion radical(O₂⁻) 생성 저해활성 측정, SOD 활성 측정과 세포내 활성 산소종(ROS)의 저해능을 측정.



○ 한국 특용 가금자원, 중국오골계, 육계와 특용 가금자원 증탕액 및 한국 특용 가금자원 한방

탕액의 면역 증진 효과에 대한 *in vitro* 검증을 통해 대식세포의 면역증진효과 연구(세포 생존율 시험 세포 유착반응, 탐식작용 확인, 세포 독성 물질 생성능 측정), 면역세포의 증식 효과 등을 측정한다 (그림)



- MALDI-TOF 와 LC/MS 통한 바이오마커 동정 및 NCBI database에서 단백질 확인
- 조직에서 단백질 추출: 조직을 homogenizer로 분쇄 후 sample buffer 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 1% DTT, 2% bio-lyte ampholytes (pH 3- 10), 0.01% bromphenol blue에 반응시킴
- 단백질 정량: Bradford 법을 사용하여 정량후 단백질 1 mg를 rehydration시킴
- 단백질 분리 : Isoelectric focusing (IEF)시킴 : Strip은 (pH 3-10 NL, 17cm IPG strips) 사용하여 PI값에 따라서 단백질을 1차 분리 후 2D-electrophoresis를 실시. 이때, 9~18% gradient polyacrylamide gel 사용하며 전기영동이 끝나면 staining과정을 실시함
- MALDI-TOF 등에 의한 분자량 측정: 발현 차이를 보이는 단백질을 spot cutter인 automatic robotics system를 이용하여 gel를 절단 후 trypsin digestion 처리 후 MALDI-TOF 등에 의한 분자량 측정함. 이때 미지 단백질은 Q-TOF를 측정함
- 단백질 확인 : MALDI-TOF에서 나온 monoisotopic peak data를 가지고 Swiss plot database 또는 NCBI database에서 단백질을 확인함

바이오마커 동정 및 NCBI database에서 단백질 확인

○ 제 3 협동은 식품 소재를 이용하여 고부가치 기능성 식품 제조를 위한 조리기술, 포장 기술, 살균기술등을 확보하고 있음.



2 절. 국내외 고령친화형 건강기능식품 제품화 현황

- 국가 통계포털 자료에 의하면 65세 이상 인구수는 2010년 약 542만 명에서 2015년 약 656만 명으로 증가하였음
- 이와 같은 통계자료는 앞으로 고령화 사회가 빠르게 진행되어 노인성 질환에 대한 문제가 더욱 심각해 질 것을 예상할 수 있음
- 대표적인 노인성 질환인 퇴행성관절염에 대한 진료인원과 총 진료비는 2011년 약 336만 명 - 9,468억 원에서 2015년 약 376만 명 - 11,632억 원으로 증가하였음
- 이로 인해 관절건강 도움 및 관절염 완화 보조제로서의 건강 기능 식품들의 개발과 출시가 국내외에서 지속되고 있으며 그 현황은 다음과 같음

대표물질	제품명	제조사	제조국가	특징
글루코사민	nutra 글루코사민플러스	CJ	대한민국	-연골구성성분인 글루코사민은 천연영양소임 -관절연골의 손상회복, 연골세포의 성장 촉진의 효능

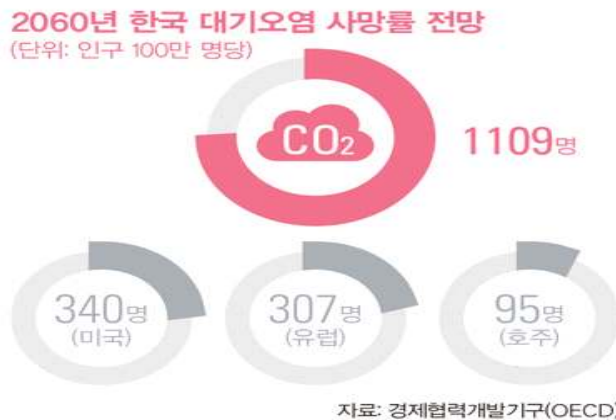
글루코사민	생생 글루 코사민	헬스원	대한민국	-글루코사민(75%), 상어연골추출물, 녹색홍합추출물, 해조칼슘 등을 다량 함유해 연골 및 관절관리가 필요한 중년층이상에게 효과적임 -특히 글루코사민뿐만 아니라 상어연골추출물 등의 물질이 적절하게 혼합되어 글루코사민 100% 제품보다 관절염 개선효과가 더 뛰어남
글루코사민 MX	이롬 글루 코사민 플러스	이롬	대한민국	-글루코사민 플러스는 복합적인 관절건강 관리를 위한 제품으로, 글루코사민의 연골 생성을 빠르게 촉진하는 효과가 있는 상어연골 성분과 관절에 영양을 공급하는 비타민과 미네랄을 배합, 글루코사민 MX가 낡고 닳은 관절과 연골의 생성에 가장 효과적으로 작용할 수 있게 도와줌
글루코사민 BDX-1	글루 코사민 트리플 정	대웅제약	대한민국	-글루코사민 트리플정은 특허가 등록된 신물질인 BDX-1을 사용해 진통·소염작용 및 연골 재생능력이 우수함
글루코사민 콘드로이친 MSM	트리 플렉스	GNC	미국	-관절건강을 위한 글루코사민과 콘드로이친 그리고 MSM이 함유되어 있음
글루코사민 MSM	쉬프 글루 코사민	Schiff	미국	-관절의 조직 연결을 도와주는 MSM과 관절을 튼튼하고 유연하게 도와주는 Glucosamine MSM
글루코사민 콘드로이친	Glucos a mine Chondr oi tin	Kirkla nd	미국	-관절건강을 위한 글루코사민과 콘드로이친이 함유되어 있음
글루코사민 콘드로이친 MSM 비타민C	Glucos a mine MIX	Solgar	미국	-관절 보조제로서 유명한 소염작용의 글루코사민과 연골재생에 도움을 주는 콘드로이친, MSM, 비타민 C (Ester-C)가 함유되어 있음
글루코사민 콘드로이친 비타민C 히알루론산 MSM	트로피칼 오아시스 액체형 관절보조 식품	Tropi cal Oasis	미국	-건강한 관절 건강을 위해 글루코사민, 콘드로이친, 비타민C, 히알루론산, msm이 특별 혼합된 제품으로 액체형은 타블렛 제품에 비해 체내에 빠르게 흡수됨.
MSM	MSM 1500	GNC	미국	-섬유조직의 접착제, 항산화제, 소화제, 면역강화, 류마티스성 관절염 완화.

- 이 밖에도 천연물을 소재는 홍삼, 프로폴리스 등이며, 동물성 소재를 활용한 예는 아직까지 진행된 바가 없어 연산 오메가 소재의 활용도를 높이고 관절 건강에 도움을 주는 건강기능식품의 원료 공급이라는 새로운 일거리 제공과 동시에 농가 소득을 증대시킬 수 있음
- 최근 산업화에 따른 오염물질 배출량의 증가, 미세먼지, 중국발 황사 등으로 인해 환경오염에 대한 문제가 사회적으로 이슈화되고 있음
- 인구 1만 명당 주요 환경성질환자 수는 2009년도에 급증하여 현재까지도 많은 환자가 존재함



<자료: 건강보험공단, 환경성질환자수(2016)>

- 특히, 경제협력개발기구(OECD) 자료에 따르면 대한민국은 2060년에 대기오염에 의한 사망률을 100만 명당 1109명으로 예상하여 미국(340명), 유럽(307명), 호주(95명) 등에 비해 심각한 수준임을 보고하였음



<자료: OECD, The Economic Consequences of Outdoor Air Pollution(2016)>

- 이처럼 환경오염이 점차 심각해짐에 따라 면역력 약화로 인한 알레르기 비염, 아토피 피부염, 천식, 암 및 자가면역질환 등과 같은 면역질환 유병률이 급격히 증가함
- 인체 만성질환 대다수가 면역과 직·간접적으로 밀접하게 연관되어 있으며, 신규 면역치료용

소재개발은 여러 분야의 치료제로 활용될 수 있음

- 면역력 증진에 대한 소재 개발은 대표적인 바이오 제약산업으로 핵심원천소재를 보유할 경우 산업 경쟁력 제고 및 새로운 산업군을 형성하여 선진 제약시장의 진출이 가능하며, 국내의 생명공학수준을 국제경쟁력 있는 분야로 견인할 수 있음
- 기존의 난치성 질환에 대한 제한된 약효, 약제 내성, 각종 부작용, 고가의 비용 등과 같은 단점을 극복할 수 있음
- 면역 증진뿐만이 아닌 항산화 효능이 가미된 제품은 단순한 건강기능성식품에서 탈피하여 암, 심혈관 질환 등 다양한 질환으로의 응용과 더불어 화장품과 같은 소재로도 개발할 수 있는 가능성 제시
- 최근 소라렌, 커큐민 등의 다양한 면역기능 조절과 항산화제에 대한 연구가 점차 진행되고 있는 시점에서 경쟁력 있는 소재가 될 수 있음
- 결과적으로 인체에 독성이 전혀 없는 고부가가치의 소재 개발은 일상생활에서 손쉽게 섭취할 수 있으므로 면역기능 강화 및 질환 예방, 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단됨
- 현재까지 기능성 생리활성(면역, 항산화, 항노화) 소재 관련 특허 중 한국특허가 약 46%, 미국특허가 약 45%로 나타나, 한국과 미국이 기능성 생리활성 소재 기술 개발 시장에서 중요성이 큰 국가로 분석됨
- 분야별 생산비중은 바이오의약(약 45%), 바이오식품(약 35%)가 대부분을 차지하고 있고 바이오화학, 바이오 환경, 바이오공정 순으로 생산 비중을 차지하고 있음
- 이처럼 기능성 생리활성 소재에 대한 연구는 진행되었으나, 한의학적 처방과 천연물을 복합적으로 활용하여 진행된 연구는 전 세계적으로 미비함
- 따라서 건강에 대한 관심이 고조되고 삶의 질 향상과 수명연장으로 인해 예방적 개념이 도입됨에 따라 치료형에서 예방형으로 변화하고 있는 사회적 트렌드에 입각한 제품으로 국민의 건강증진과 동시에 세계 시장에 대한 경쟁력 제고 및 상업화가 모두 가능함

3 절. 한국 특용 가금자원 소재를 활용한 가공식품 개발

1. 가금류 가공식품 소비 시장 및 기술개발 현황

- 우리나라 육류 소비량에서 닭이 차지하는 비중은 2위로 닭 1인당 연간 닭고기 소비량은 2006년 이후 꾸준히 증가하였고, 특히 2015년 12.8kg에서 2016년 13.8kg으로 급증하였다. (농림축산식품부 보도자료, 2017).
- 우리나라 육류 소비량에서 닭이 차지하는 비중은 2위로 닭 1인당 연간 닭고기 소비량은 2006년 이후 꾸준히 증가하였고, 특히 2015년 12.8kg에서 2016년 13.8kg으로 급증하였다. (농림축산식품부 보도자료, 2017).



국민 1인당 연간 닭고기 소비량

- 『2016년 가공식품 산업경쟁력조사』¹⁾에 따르면, 세계 시장의 가공식품 20대 업종별 시장점유율 변화 분석 결과 국내 가공류 가공 및 저장 처리업의 시장 점유율은 2006년 0.0%에 비해 2015년 0.2%로 상승하였다. 특히 전체 가공식품의 수출액이 8% 증가한데 비해 가공식품의 수출은 4백만불에서 2015년 36백만불로 26% 상승하였다.
- 특히, 세계시장에서 한국 가공식품의 현시 비교우위지수의 변화를 보면 가공류 가공 및 저장 처리업이 2006년 0.01에서 2015년 0.04로 상승폭이 가장 큰 분야로 꼽힘. 그럼에도 불구하고 수출특화지수는 여전히 2015년 -0.721로 수출경쟁력이 낮다고 할 수 있겠다.
- 국립축산과학원의 2014년 국내 닭고기 소비 실태 보고에 따르면, 닭고기의 소비는 지속적으로 증가하고 있는 추세이며, 질병 예방 및 치유가 가능한 식품과 천연물 소재 개발의 필요성이 대두되었다.
- 한국무역협회에 따르면, 2016년 한류 열풍으로 삼계탕의 중국 수출이 시작되어 총 61t의 삼계탕이 수출되었으나, 일본 시장의 감소세를 따라잡기에는 역부족이었으며, 2017 AI 문제나 외교문제로 인해 그마저도 실질적으로 시장이 막힌 상태라 할 수 있다.
- 이러한 문제는 중국에서 저가 경쟁에 초점이 맞추기 보다는 중·고소득층 시장을 타겟으로 경쟁력 있는 특화된 제품이 필요한 상황이라 할 수 있다.

1) 무역위원회 중소기업연구원, 2016년 가공식품산업 경쟁력조사, 2016.2



삼계탕 첫 수출 기념식



한강에서 중국 관광객의 삼계탕 행사

- 최근 닭고기 가공과 관련된 기술개발로, 수출용 RTC(ready to cook) 및 RTE (ready to eat) 형 닭고기가공제품과 냉장 닭고기 포장기술 개발 결과, 고품질 삼계탕 생산을 위한 육수 충전 온도 조건, 탈기방법, 레토르트 살균 조건, 삼계죽 포장 기술과 저장수명 기술 개발이 이루어졌다.
- 기타 고유자원품종을 이용한 레토르트 백숙 제형화 및 품질평가로 한협3호, 우리맛닭과 같은 토종닭과 백봉오골계의 삼계탕 제형화 및 품질 평가가 이루어짐 (2014년). 닭 부산물에서 젤라틴을 얻기 위한 조건이 개발되었고, 전통 식재료(강화약썩과 연잎)의 향산화 활성을 이용한 너비아니 제품 개발이 진행되었다.
- 닭고기수출연구사업단(2014)은 닭고기 가공식품의 수출전략 상품 개발로 고부가가치 계육 가공제품 개발과 아시아 시장을 위한 맞춤형 토종닭을 활용한 가공식품 개발 및 2차 산물의 조미 제품 개발 필요성을 제기한 바 있다.
- 닭고기를 이용한 가공식품 수출에 있어 밀집식, 공장식 닭 사육환경으로 인한 AI의 주기적 발생은 가장 큰 걸림돌로 작용하므로, 이에 대한 대책으로 재래 방식을 활용한 특화된 고유 소재인 오계를 활용한 고부가가치 제품의 개발에 대한 중요성이 부각되었다.

2. 육가공 건강기능식품의 해외 시장 동향

- 또한 마케팅 경쟁력 역시 브라질이나 중국에 비해 높은 것으로 나타났으나, 역시 미국, 네델란드, 프랑스, 독일, 영국에 비해 낮은 것으로 나타남. 경쟁력 저하 요인으로 원자재의 해외수입 비중이 건강기능식품과 육가공 식품의 경우 각각 25.5%와 14.9%으로 수입의존도가 높아 원자재 조달 시 애로사항이 많은 것으로 지적됨
- 해외 수출 비율이 높은 것으로 건강기능식품은 61.5%에 달하며, 가공식품 수출시 주요 수출 국가는 1위가 중국(32.9%)으로 나타남

3. 건강음료 소비 시장 및 기술개발 동향

- 기능성 음료는 건강음료, 혹은 건강보조음료라고도 하며, 여러 가지 생리활성 물질을 함유하는 생체조절기능을 나타냄으로써 일반적인 음료의 기능인 영양공급, 감각충족, 갈증해소 이외에 예방의학적으로 건강증진효과가 기대되는 음료라고 정의하며, 현재 건강기능식품과 달리 특별한 법적 규정이 없는 상태이다.
- 기능성 음료 중에서도 가장 빠른 시장의 성장률을 보이는 것은 소위 에너지드링크로 불리는 피로회복, 자양강장용 제품으로 2015년 2,000억원에서 2016년 3000억원으로 시장이 확대될 것으로 보고 있다.
- 최근 기능성 관련 음료에 대한 특허 출원을 살펴보면 생체방어, 특정 질병의 예방, 생체리듬의 조절, 노화억제 및 비만 억제 등을 위한 생약재 소재 발굴에 대한 특허가 주를 이루고 있으며, 생약재를 활용한 소재 발굴의 경우 다양한 생약재 복합에 의한 한 가지 이상의 효능을 기대하고 있다는 것이 생약재 소재 기능성 음료 특허의 특징이다.
- 웰빙 열풍으로 건강에 대한 관심이 높아지면서 한약재를 원료로 한 제품이 쏟아지고 있는 가운데 한국 대형마켓에서 판매되고 있는 한방음료 또한 갈수록 다양해지고 있다. 녹차홍삼 대추 매실 계피 석류 등이 함유된 한방음료에서 이제는 상황버섯 국화 머루 오미자 등까지 등장 한방음료 재료의 폭이 넓어지고 있다.
- 한방음료는 보통 쌍화탕 같은 드링크제가 대부분이었으나 최근에는 캔이나 1.5리터 플라스틱용기에 담긴 소프트 드링크 타입으로 출시되고 있다. 한방에서 처방된 약재 중에는 체내 흡수가 빠르며 중추신경을 자극하여 부신피질호르몬의 생성을 증가시킴으로서 에너지 대사를 촉진시켜 운동능력에 상당한 영향을 미치는 경우도 있다고 보고되었다.

4. 연구 결과가 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

- 본 과제의 연구 결과는 전통 소재인 오계를 활용하고, 대외경쟁력이 있는 한방 소재를 활용하여 관능성을 향상시키고, 영양학적 기능의 시너지 효과를 기대할 수 있으며, 이를 통해 고부가가치 제품을 개발했다는 점에서 비교 우위를 차지한다고 할 수 있겠다.
- 건강식품의 경우 대부분 식물성 식품을 주원료로 하는데 비해 오계의 경우 동물성 식품을 주 공급원으로 하는 소재의 개발이라는 점에서 차별성이 있다고 평가된다.

3 장. 연구수행 내용 및 결과

1 절. 연산오계 소재를 활용한 기능성 소재 및 가공식품 생산체계 확보 및 제품 연구개발

1. 연구개발 배경

가금류는 전 세계 육류 소비량의 약 30% 정도를 차지하고 있으며, 닭의 소비량은 매년 증가하고 있다. 가금류 중에서 닭은 가식부가 전체 무게의 55%에 지나지 않으며 내장, 머리, 발 등 불 가식 부분이 닭 무게의 45%가 되어, 대량의 부산물이 발생되고 있다. 특히 도계장이 대형화되면서 다량의 도계 부산물이 생산되고 부산물의 체계적인 이용이 이루어지지 못하고 있어 환경오염과 질병전파의 위험마저 따르고 있다. 따라서 닭의 부산물들을 이용하여 새로운 건강 기능 식품 및 의약품 원료를 생산하는 연구가 활발하게 진행이 되고 있다.

가금류 중에서 연산오계는 한국 재래종으로서 1980년 천연기념물 265호로 지정이 되었으며 다양한 생리활성을 지닌 것으로 알려져 왔다. 연산 오계 효능에 대한 근대적인 연구는 주로 증탕액을 제조하여 지질대사 개선, 조골세포 분화 및 파골세포 분화억제, 면역개선 등의 효능이 발표되었다. 그러나 연산오계 육 단백질로부터 유래된 펩타이드(단백질 가수분해물)에 대한 연구들을 미비한 실정이다.

최근 호르몬처럼 생리기능을 지닌 펩타이드들은 항산화, 고혈압 완화, 면역조절, 진통완화 및 항균작용이 있는 것으로 알려져 있어 기능성 식품 소재로 활용되어 오고 있다. 대부분의 기능성 펩타이드들은 닭 부산물, 가슴살, 날개, 난 및 피부 단백질을 상업용 프로티아제를 이용하여 생산하는 연구들이 발표되고 있다. 펩타이드 형태의 단백질 가수 분해물을 제조하는 방법 중에서 효소를 이용하여 제조하는 것이 기능성 및 안전성이 높다고 보고된 바가 있다. 최근 효소에 의한 단백질 가수분해는 고압(high hydrostatic pressure) 환경에서 활성이 향상된다고 한다. 고압처리는 우유 단백질에 펩신, 트립신 및 키모트립신과 같은 효소를 처리할 때 가수분해 속도를 증가 시켰고, 또한 고압 처리하여 생산된 육류 등 식품 소재들의 기능성이 활성화 되었다.

생리활성 펩타이드는 일반적으로 생리적 활성을 가지는 분자량이 작은 펩타이드로 정의 되는데 보통 3-20개의 아미노산으로 구성되어 있고 아미노산의 조성이나 서열에 따라 펩타이드의 활성이 다양하다. 특히 단백질에 비해 크기가 작은 생리 활성 펩타이드는 생체내로 쉽게 흡수 될 수 있으며, 다양한 기능적 특성을 갖는다. 생리활성 펩타이드의 효과로는 미네랄운송[1], 항고혈압, 항균활성 등이 있으며, 일부 생리활성 펩타이드는 다기능적인 특성을 가지고 있다고 보고되었다. 최근 저분자 펩타이드는 항산화 효과, 단백질 가교결합 형성 및 글리케이션 저해능, 자유라디칼과 금속이온 소거능이 매우 높은 것으로 보고되고 있으며, 이러한 기능성으로 인해 세포의 노화를 억제시킬 수 있는 물질로 여겨지고 있다[1, 2]. 기능성 저분자 펩타이드에 대한 연구에 있어서 주로 축육을 대상으로 하는 기능성 저분자 펩타이드 추출에 관한 연구가 이루어지고 있다. Gopalakrishnan 등에 의해서는 돼지골격근 추출물에 함유된 기능성 저분자 펩타이드에 대한 연구도 보고되었다. 또한 Cheong 에 의해서는 수산물에서도 히스티딘 계 저분자 펩타이드가 회유성 어류에 많이 함유되어 있으며, 특히 참치에 다량 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다. 히스티딘 계 저분자 펩타이드는 다른 항산화제와 달리 활성산소제거 뿐만 아니라 성인병 및 노화억제에 깊이 관련 하고 있는 것으로 보고되고 있다. 그러나 아직 가금류, 즉 오계를 이용한 기능성 펩타이드에

대한 연구는 미미한 실정이다.

오계는 동의보감에 오웅계육, 오자계육이라 하여 검은 닭의 고기는 성질이 약간 따뜻하고 맛은 달며 독이 없다. 가슴이 아픈 심통과 복통에 주로 쓰고 명치의 나쁜 기운을 없애고 풍습으로 경련이 일고 마비된 것을 치료한다. 허하고 여윈 것을 보하여 태를 튼튼하게 하고 골절과 심한 종기인 용저를 치료한다. 또 관절이 쭈시고 절이며 아픈 풍한습비에 주로 쓴다. 심한 위장병인 반위를 보하고, 산후에 허약해진 산모를 돕는 다양한 효능이 있음을 나타내고 있다.

오계는 한국 중부지방에서 예로부터 식용을 해온 사육조류다. 오계는 몸체, 깃털 및 뼈 등이 멜라닌 색소로 침착이 되어 있어 다른 조류와 구별이 된다. 오랫동안 오계는 일반 육계나 산란계와는 달리 건강을 증진 및 개선용 식품으로 사용이 되어 왔다. 오계육의 증탕액은 간장과 신장의 어혈을 제거하고 새로운 피를 생산을 촉진 시켜 체력을 향상시킨다.

이미 해외에서는 오글계의 생리활성에 대한 효능 검증을 통해 천연물 신약개발에 연구를 활발히 진행하고 있으며, 새로운 항산화물질이 다량 함유된 슈퍼푸드(superfood)로 각광받고 있어 다양한 음식과 건강기능식품 등의 제품개발을 통한 상품화가 시도되었다. 반면 연산오계는 단백질이 풍부한 식품으로 알려져, 허약자를 위한 건강식으로 주로 탕으로써 이용되어 지고 있으나, 사육의 어려움, 저수익성으로 인해 수요가 많지 않고 연산오계에 대한 다양한 연구가 이루어지지 않아 식·의약품으로써의 기능성 소재화에 대한 제품 개발은 매우 미비한 실정이다[7, 8].

단백질을 가수분해하는 방법으로는 산, 알칼리, 효소를 이용하는 등 여러 가지 방법이 있는데. 영양학적 측면에서 볼 때 효소로 가수분해하는 것이 산과 알칼리로 가수분해한 것보다 우수하고 좋은 질의 펩타이드를 얻을 수 있다. 최근 가공류의 단백질 원료 중에서 닭 가슴살, 닭 날개, 닭 가공 부산물, 닭 껍질, 난황 등으로부터 기능성 펩타이드를 생산 및 항산화 생리활성에 대한 연구가 보고되어 왔다. [15-21].

일반적으로 천연흑색소는 Eumelanin, Pheomelanin, Allomelanin의 3종으로 크게 나눌 수 있으며, 천연 흑색소는 유래에 따라 또한 식물원흑색소, 동물원흑색소, 미생물원흑색소로 나눌 수 있다. 그 중 Eumelanin, Pheomelanin은 주로 동물에 존재하고, Allomelanin은 주로 식물에 존재하는 것으로 오계흑색소는 Eumelanin에 속한다. 오계의 흑색소는 보호효과가 있어 자외선으로 인한 급만성질환을 피하게 하고, 자유라디칼을 제거하고 항산화기능을 갖추고 있어 암을 예방하고 노화방지 및 인체의 면역력을 향상 시켜준다. 오계의 흑색소는 단백질과 결합되어 있어 오계흑색소의 분리하는 방법으로 주로 염산을 사용하는 방법, 단백질분해효소를 사용하는 방법 및 복합단백질분해효소에 알칼리성 용액을 사용하여 단백질을 제거하는 방법 등이 주로 사용된다.

기능성 식품 및 약효식품(nutraceuticals)들에 대한 사업적인 관심은 전 세계시장에서 급속히 성장을 하고 있다. 이들 중에서 저 분자량의 단백질 가수분해물들은 뛰어난 건강기능성을 제공하는 것으로 알려지면서 새로운 물질의 개발이 지속되어 오고 있다. 작은 크기 때문에 단백질 가수분해물들은 면역기능을 유발하는 단백질에 비하여 사용가능성이 매우 높은 것으로 알려져 왔다. 단백질 가수분해물들은 영양적으로 단백질 근원 물질일 뿐만 아니라 항 당뇨, 항 고혈압, 항산화와 같은 생리활성을 제공하는 것으로 연구발표 되어 오고 있다. 그러나 불쾌한 쓴 맛의 발생 및 낮은 흡수력으로 인하여 발생하는 낮은 효력(potency)은 단백질 가수분해물들의 건강 기능식품 제조에 걸림돌이 되어 왔다.

따라서 생리활성 단백질 가수분해물들의 전달 체계는 물질 만큼 중요하다. 좋은 전달 체계란 독성과 부작용(side effect)을 최소화 하면서 생체이용률(bioavailability)의 증대 및 방출 조절(controlled release)를 해야 한다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 나노 및 초미세 크기의 소낭에 캡슐화(encapsulation), 투과 촉진제 및 효소억제제(enzyme inhibitor)들을 전달체계에 적용을 하여 왔다. 투과 촉진제 및 효소억제제(enzyme inhibitor)들은 위와 장에 존재하는 분해효소의 작용을 억제하거나 또는 세포막의 투과도를 증

가 시킬 것으로 보인다. 그러나 이러한 첨가제들의 장기간 사용은 소화 장애와 바람직하지 않은 단백질 가수분해물들의 축적 또는 흡수를 허용 할 것으로 보인다. 한편 나노 및 초미세 크기의 소낭에 캡슐화(encapsulation)는 작은 크기 및 넓은 표면적으로 단백질 가수분해물들의 생체 이용률을 증가시킬 것으로 기대한다.

리포솜과 Polyflex는 단백질 가수분해물의 조립식 전달체로 집중적으로 연구되어 왔다. 두 방법을 이용한 전달 체계들은 적절한 배합(formulation) 및 조제(preparation) 방법이 선택되어 진다면 무독성 및 생분해성 방법들이다. 특히 리포솜들은 단일 소낭 안에 소수성 및 친수성 물질을 운반 할 수 있다. 또한 식품 등급에 해당하는 원료로 생산할 수 있다. 이러한 물질로서 생산된 리포솜들은 극성 및 비극성 아미노산과 단백질 가수분해물들을 캡슐화 할 수 있다. 그러나 리포솜들은 제조과정 및 저장하는 동안 산화 될 수도 있고 소장에 존재하는 효소들과 환경적으로 산성인 위에서 분해가 될 수 있다. 이러한 문제들은 점착성(mucoadhesive), 생체 적합성(biocompatibility), 생분해성을 지닌 탄수화물인 키토산을 코팅에 의하여 문제를 해결 할 수 있다. 이러한 탄수화물과 지질의 코팅은 1) 쓴 맛의 소수성 단백질 가수분해물들의 불쾌한 향을 차단(masking)하고, 2) 효소분해 및 산성 환경에 의한 분해를 저지하는 방어벽을 구축하여 생리활성 단백질 가수분해물들의 장내 흡수를 촉진시키기 위한 것이다.

생리활성 펩타이드는 인체 내에서 생리학적 영향(physiological effect)을 주는 식품유래 원료로서 정의된다. 이들 대부분이 분자량 6,000 미만을 가진 2-20 아미노산 잔기를 가지고 있다. 대두, 곡류들, 어류, 난, 우유 및 육류들은 모체 단백질(parent protein)에는 온전하게 불활성 되어있는 생리활성 펩타이드들을 보유하고 있는 것으로 알려졌다. 그러나 인체 내 위내 소화 과정에서 효소 가수분해에 의하여 방출될 때 이러한 펩타이드들은 주목할 만한 건강 혜택을 준다.

리포솜은 지질 분자들이 수용액에 분산될 때 자발적으로 형성되는 지질 분자들의 회합체로서 내부의 수용성 공간이 지질 막으로 둘러싸인 액포이다. 리포솜의 평균직경은 직경 수십 nm에서 수십 μm 로 다양하게 존재할 수 있으며, 내부의 수용성 공간이나 지질막 안에 각각 수용성 물질이나 지용성 물질을 포집할 수 있다. 또한 생체막의 기본 구조와 유사하여 인체에 대한독성이 적을 뿐만 아니라, 제조가 용이하여 최근 화장품, 제약, 식품산업 등에서 인체에 부작용 없이 투여가 가능하거나, 물질의 효과적인 전달 등의 면에서 활용도가 높다. 리포솜이 의약, 화장품 및 여러 용도로 활용도가 높은 요인들은 바로 리포솜의 유형, 조성 및 물리적, 화학적 성질 등이 다수의 제어 가능한 변수 등에 의해 다양하게 조절이 가능하기 때문이다. 그러나 일반적으로 지질로 구성된 리포솜의 액포는 고분자 입자나 다른 기능성 입자에 비하여 물리적, 화학적 안정도가 낮고, pH, 전해질의 농도, 온도, 계면활성제 등에 의해 안정도가 급격히 감소하는 단점이 있다고 보고된다. 즉, 인지질이 가수분해 되거나 산화될 수 있고 포집된 약물의 분해도 일어날 수 있다. 또한, 리포솜의 응집, 침강, 융합 등의 현상으로 인하여 리포솜은 물리적으로 불안정해져 평균직경이 변화되기도 한다. 따라서 리포솜의 물리적, 화학적 안정성을 높이기 위한 연구는 꾸준히 진행되고 있다. 리포솜은 사용 목적 즉, 리포솜의 적용분야에 따라서 그 제조방법, 인지질의 종류, 성분, 조성 등이 달라진다. 경구용 리포솜의 안정성을 위하여 고분자로 코팅한 리포솜, 혈중에 주사제로 사용하는 음이온성 리포솜, 유지방구막에서 유래한 인지질과 대두에서 유래한 인지질로 합성한 서로 다른 리포솜의 물리적 안정성 비교, 대두에서 유래된 불포화 레시틴(phosphatidyl choline)을 이용하여 제조한 리포솜 등 외에도 서로 다른 조건으로 제조된 리포솜의 안정성에 관한 연구가 보고되고 있다.

리포솜을 위한 유화제로는 이미 알려진 바와 같이 피부자극이 적은 레시틴 계면활성제를 가장 많이 이용하고 있으며 대두, 땅콩, 옥수수, 난황 등과 같은 천연 물질로부터 추출 공정을 통하여 얻어지고 1847년 프랑스 화학자 Maurice Gobley 에 의하여 처음 발견되었는데 그는 계란 노른자를 뜻하는 그리스어인 "Lekithos"에서 어원을 얻어 난황에서 추출한 오렌지색의 천연물질을 레시틴(lecithin)이라 명명하였

다. 이것은 천연계면활성제로서 일반적으로 비이온성 계면활성제보다 유화력이 약하지만 안전성, 유효성이 우수하며 안전성에서는 생체막에 유사한 구조이기 때문에 일반 유화제에 비해 피 부에 대한 안전성이 아주 우수하다. 유효성에서는 수소 첨가 레시틴이 유화제로서의 기능의 외에도 레시틴 1분자가 물분자 15~25개를 가질 수 있는 분자 구조 즉 결합수 작용을 하여 보습기능을 높여줄 수 있다. 수소첨가 레시틴이 일반 유화제에 비해 표면 및 계면장력 등 물성이 뒤떨어져 있고 고가이기 때문에 일반 유화제와 같이 범용적으로 사용되지 않았다. 또한 유화 안정성도 좋지 않아 보조유화제로만 소량 사용해 왔다. 최근 기계공업의 발달로 첨단 유화 장치가 개발되고 레시틴 분자의 기하학적 구조를 응용하여 레시틴을 주유화제로 고압 호모게나이저를 이용하여 높은 압력에 의한 힘을 주면 운반체(vesicle) 또는 나노 에멀전을 만들 수 있다. 레시틴(Phosphatidyl choline, PC)은 화장품 분야에서는 특정의 인지질인 phosphatidyl ethanolamine (PE), phosphatidyl inositol (PI), phosphatidyl acid (PA) 등이 섞인 것을 가리키고 있다. 여러 레시틴이 나와 있지만 본 실험에서는 Lipoid 사의 Lipoid S 75-3N을 이용하고자 한다. 계면활성제는 수첨된 포화레시틴으로 좀 더 안정하며 상전이온도는 약 55°C로 PC의 함량은 약 75%이다.

이러한 배경에서 본 연구의 목적은 1) 항산화 및 항노화 특성을 보여주는 연산오계 유래 단백질 가수분해물을 제조하고, 2) 대두에서 추출한 인지질을 이용하여 최근에 개발된 heating method를 이용하여 리포솜을 제조, 3) 제조 리포솜을 이용하여 연산오계 유래 단백질 가수분해물을 캡슐화, 4) 캡슐화 된 리포솜들을 키토산으로 코팅 방법개발, 5) 제조 리포솜에서의 단백질 가수분해물의 방출 특성, 6) 장기간 보존시 안정성에 대한 연구를 수행하는 것이다.

2. 연구개발 방법

가. 연구개발을 위한 재료 및 시약

실험에 사용된 Folin ciocalteu's phenol(FCP) 시약과 Trichloroacetic acid(TCA)는 Sigma Company(Seoul, Korea)사로부터 구입을 하였다. 단백질 분해효소 bromelain 1200GDU(BM1200)는 대종상사(Seoul, Korea)로부터 구입을 하였다. BM1200효소는 pineapple로부터 얻어진 식물성 프로테아제이다. 효소의 역가를 측정하기 위한 표준 단백질은 카제인은 대정화금(Daejung Cem.& MET. CO., LTD, Daejeon, Korea)에서 구입을 하였다. 오계육은 깃털이 제거된 상태로 진공포장(vacuum packing)하여 냉동된 상태로 지산농원(Choongnam-do, Korea)으로부터 제공을 받았다. 제공된 오계육은 실험 전까지 -20°C 냉동 보관을 하였다.

본 실험에 사용된 Folin ciocalteu's phenol(FCP) 시약은 Sigma Company(Seoul, Korea)사로부터 구입을 하였다. Tri-chloro-acetic(TCA)산은 Sigma Company(Seoul, Korea)사로부터 구입을 하였다. 단백질 분해효소 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain와 protamex는 대종상사(Seoul, Korea)로부터 구입을 하였다. 실험에 사용된 오계란은 지산농원(Nonsan, Choongnam, Korea)에서 제공 하였다. 실험에 사용된 오계육은 지산농원(Nonsan, Choongnam, Korea)에서 제공되었다. 단백질 분해효소 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain와 protamex는 대종상사(Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 단백질 및 단백질 가수분해물 측정은 Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하였다. 리포솜 제조를 위한 레시틴은 (주)엘텍과마캡에서 구입하였다.

나. 오계로부터 부위별 육, 란 및 내장 효소 가수분해물 제조

(1) 오계 가슴, 다리, 날개육, 란 및 오계 내장 슬러리 제조

분리하여 냉동보관 한 가슴, 다리, 날개육, 란 및 오계 내장을 상온에서 해동하였다. 해동이 된 가슴, 다리, 날개육, 란 및 오계 내장을 용기에 담고 고기갈개(Kenwood, Seoul, Korea)를 이용하여 곱고루 다졌다. 다진 가슴육을 지퍼백에 넣고 샘플이름, 제조날짜를 기입을 한 후에 -20°C 냉동 보관을 하였다.

(2) 오계 가슴, 다리, 날개육, 란 및 오계 내장을 이용한 효소 가수분해물 제조

오계육 단백질 가수분해를 위하여 냉동된 상태로 보관된 다져진 오계육 5 g 을 phosphate 완충용액 50 ml에 넣어 Homogenizer를 이용해 오계육을 균질화 시켰다. 균질화 된 오계육액을 250 ml 삼각 플라스크에 옮겨 Enzyme BM1200을 첨가하고 배양기에 1시간 반응시켰다. 1시간 반응한 후 효소 가수분해 된 것을 1 ml 를 Tube에 옮긴 후 9 ml 의 Water을 더해 희석해 주었다. 희석용액 2.5 ml 를 취하여 다른 Tube에 옮겨, 0.3 M TCA (Trichloroacetic acid) 5 ml 넣고, 상온에 20분간 단백질 침전을 시킨 후 3000 RPM에서 10분 원심분리한 후 상등액만을 취한 것을 오계육 단백질 효소가수분해물이다.

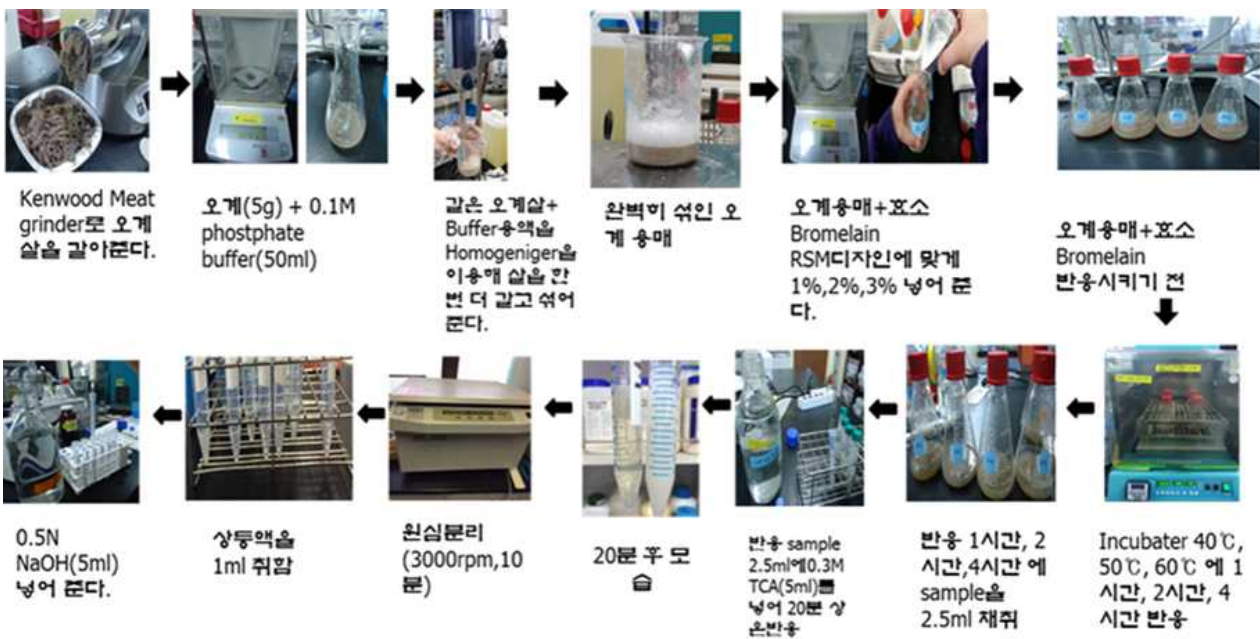


Fig 1. 오계 가슴, 다리, 날개육, 란 및 오계 내장을 이용한 효소 가수분해물 제조

(3) 오계 가슴, 다리, 날개육, 란 및 오계 내장을 이용한 고압액화 효소 가수분해물 제조

오계육 단백질 고압액화 효소가수분해를 위하여 냉동된 상태로 보관된 다져진 오계육 5 g 을 phosphate 완충용액 50 ml에 넣어 Homogenizer를 이용해 오계육을 균질화 시켰다. 균질화 된

오계육액을 진공파우치에 옮겨 Enzyme BM1200을 첨가하고 고압액화배양기에 반응시켰다. 반응한 후 고압액화 효소 가수분해 된 것을 1 ml 를 Tube에 옮긴 후 9 ml 의 Water을 더해 희석해 주었다. 희석용액 2.5 ml 를 취하여 다른 Tube에 옮겨, 0.3 M TCA (Trichloroacetic acid) 5 ml 넣고, 상온에 20분간 단백질 침전을 시킨 후 3000 RPM에서 10분 원심분리한 후 상등액만을 취한 것을 오계육 단백질 고압액화 효소가수분해물이다.

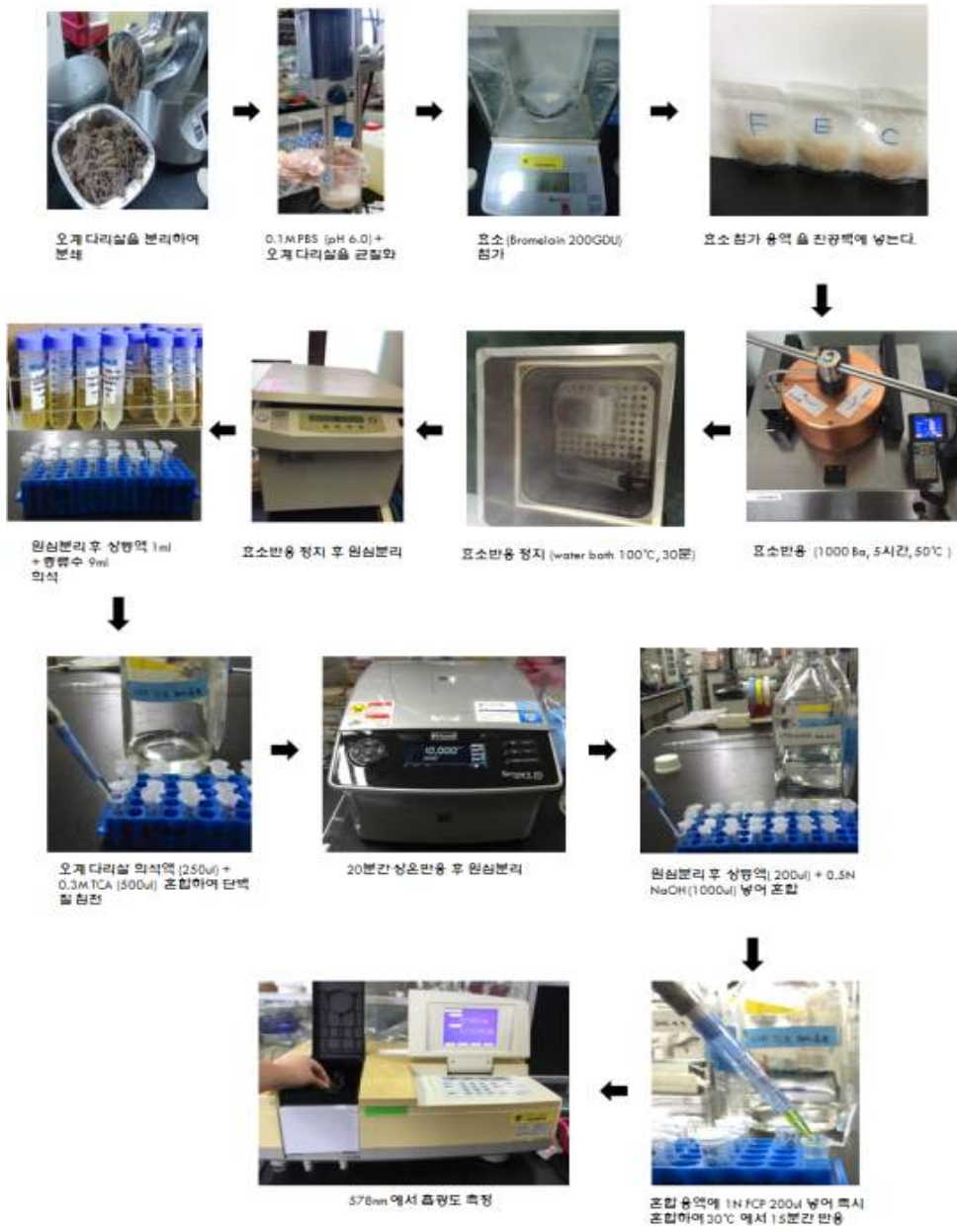


Fig 2. 오계 가슴, 다리, 날개육, 란 및 오계 내장을 이용한 고압액화 효소 가수분해물 제조

(4) TCA를 이용한 펩타이드 추출

효소 가수분해 된 가수분해물을 tube에 옮긴 후 10배의 물을 더해 희석해 주었다. 희석용액에 2배의 0.3 M TCA (Trichloroacetic acid)를 넣고, 상온에 20분간 단백질 침전을 시킨 후 3,000 RPM에서 10분 원심분리한 후 상등액만을 취한 것을 TCA를 이용한 오계육 펩타이드 추

출물이다.

다. 오계육, 내장 및 난 단백질로부터 단백질 가수분해물 최적 생산 (RSM)

오계육, 내장 및 난 단백질 가수분해 생산 최적 조건을 구하기 위하여 모든 실험 계획은 3개의 독립변수 즉, 효소반응온도, 반응 pH, 효소의 농도(%)를 각각 50°C, pH 6, 2%로 하는 center run을 5번 반복을 포함하여 총 17개의 처리 조합으로 구성을 하였다. Box-Benken design은 세 가지의 중요한 절차에 따라 진행이 되는데, 첫째는 계획된 실험 (designed experiment)에 따라 통계적으로 실험을 수행하고, 둘째는 수식 모델의 계수 (coefficients of model)를 구하고, 셋째는 모델의 적합성을 판정하는 것으로 진행이 된다. 본 실험에서의 반응 변수들은 TCA 용해 펩타이드양 과 단백질 가수분해율(DH, degree of hydrolysis)로 하였다. 통계적인 계산을 원활히 하기 위하여 독립 변수를 다음과 같이 표준화 (code)하여 사용을 하였다. 세 개의 변수들을 각각 X_1 (온도), X_2 (pH), X_3 (효소농도)로 하였다. 표준화의 값들은 다음과 같은 공식에 의하여 구 할 수 있고 그 값을 Z로 하였다.

$$Z = (X - X^0) / \Delta X \quad \text{--- (1)}$$

X^0 는 표준화 값의 중심 값이고 X 는 표준화 값이다. ΔX 는 1 단위만큼의 증가 또는 감소 하는 값의 크기이다. 실험결과에 대한 분석은 표면 반응 분석법으로 사용을 하였으며 최적 공정 조건을 나타내는 다중 회귀식은 다음과 같다.

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^k B_i X_i + \sum_{i=j=1}^k B_{ij} X_i X_j \quad \text{--- (2)}$$

여기서 Y는 predicted response 이고 본 실험처럼 3개의 변수가 있을 경우에는 k값이 3이 되고 궁극적으로 다음과 같은 식으로 표현된다.

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + B_{12} X_1 X_2 + B_{13} X_1 X_3 + B_{12} X_2 X_3 + B_{11} X_1^2 + B_{22} X_2^2 + B_{33} X_3^2 \quad \text{---- (3)}$$

실험 후에 확정 된 결과들의 통계분석은 Design Expert (Couresy: Stat-ease Inc., Statistics Made Easy, Minneapolis, USA)를 사용하였다. 독립변수들의 값의 선택은 예비 실험에서 얻은 결과로부터 선택을 하여 X1 (온도)는 40°C (-1), 50°C (0), 60°C (+1) 로 정하고, X2 (pH)는 5.0 (-1), 6.0 (0) 7.0 (+1) 로하고 X3 (효소의 양)는 1 (-1), 2 (0), 3 (+1)%로 하였다.(Table 5) 가슴육 펩타이드 생산은 50 ml PBS용매를 담고 있는 250 ml 삼각 플라스크를 이용하였는데, 각각 플라스크 용매에 대하여 효소 양을 넣어주었다.

Table 1. levels of independent variables in Box-Benken design

X_i	Independent variables	Level		
		-1	0	+1
X_1	Culture temperature (C°)	40	50	60
X_2	Culture pH	6	7	8
X_3	Enzyme (%)	1	2	3

라. 오계육 단백질 가수분해물의 분리 및 정제

(1) 한외여과를 이용하여 펩타이드 분리 및 정제

분획이 필요한 시료는 동결건조 시킨 가수분해물 분말을 이용하여 1000ppm의 용액으로 사용하거나, 가수분해물을 원심분리하여 상등액을 수거하여 한외여과기(Amicon TCF-10; Amicon Co., USA)를 이용하여 실온에서 300rpm으로 N₂ 가스를 180psi (1241 kPa)의 압력을 주어 여과하였다. 시료는 3 kDa의 여과지를 이용하여 각각 분획하였다. 여과하여 얻어진 시료는 동결건조하였다.

(2) 이온교환수지를 이용하여 펩타이드 분리 및 정제

Dowex® 1×2, 200수지를 column (2.5×100cm)에 평형화 시켰으며, 평형화 된 수지에 펩타이드 1g을 10ml의 3차 증류수 용해시킨 후 5ml을 주입하였다. 용출액은 3차 증류수 75 ml 후 0.1M NaCl, 0.5M NaCl 마지막으로 1M NaCl 용출액을 각각 75 ml 씩 순차적으로 사용하였다. 분획은 Teledyne ISCO사의 자동분획기(Retriever 500)를 사용하였으며, 용출액은 5ml/90sec 씩 분획하여 수집하였다. 각 분획의 흡광도를 280nm에서 측정하였다.

(3) 겔 여과에 의한 펩타이드 분리 및 정제

펩타이드 1g을 10ml의 3차 증류수 용해시킨 후 5ml을 평형화된 sephadex G-25, column (2.5×100cm)에 주입하였으며, 용출액을 5ml/90sec 씩 분획하여 수집하였다. 용출액은 3차 증류수를 사용하였으며, 각 분획의 흡광도를 280nm에서 측정하였다. 분획은 Teledyne ISCO사의 자동분획기(Retriever 500)를 사용하였으며, 90초 동안 5ml씩 분획물을 수득하였다.

마. 오계육으로부터 흑질 분리 및 추출

(1) 흑질을 분리하기 위한 반응조 설치

2000ml 반응조 2개를 실리콘호수로 연결하여 각각의 반응조에 교반기를 설치한 후 효소반응을 위해 50℃의 물을 순환하는 Termociculator를 설치하였고 질소가스 공급을 위해 질소탱크를 설치하여 멜라닌 추출 기계를 설치하였다(Fig 3).

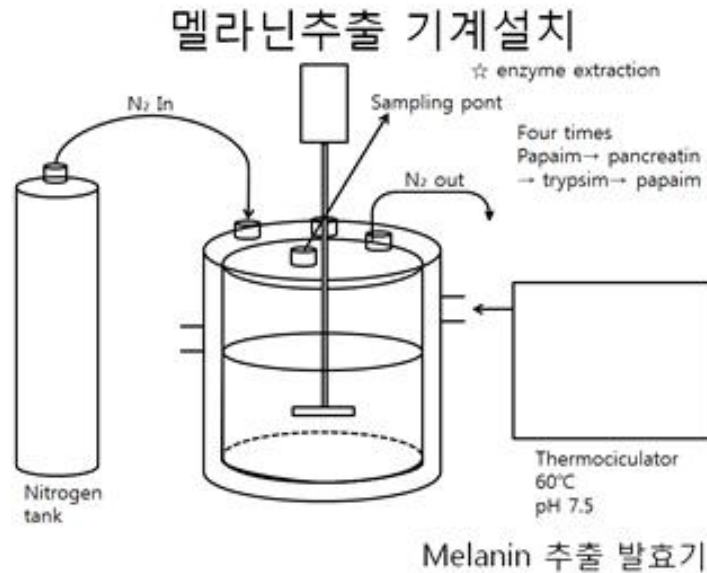


Fig 3. 멜라닌 추출 기계도

(2) 효소를 이용한 멜라닌 추출

(가) 1차 추출

1년산 오계를 부위별로 해체한 후 뼈와 살로 분리 하여 가슴육만을 이용해 Kenwood 기계로 잘게 갈아주었다. 갈아준 1년산 오계 가슴육 50g 과 0.1M Phosphate buffer (pH 7.5) 400ml 을 Homogenizer 로 균질화 시켜 설치된 반응조로 옮긴 후 효소 Papain T100을 4g (1%)을 넣고 질소가스 주입과 교반해 주며 50℃에서 20시간 반응시켰다. 20시간 반응을 시킨 후 원심분리(10000rpm, 20분) 한 후 침전물을 분리하여 무게를 측정하였다.

(나) 2차 추출

1차 추출에서 분리한 침전물에 0.1M Phosphate buffer (pH 7.5) 400ml을 넣어 반응조로 옮겨 효소 Flavourzyme을 4g (1%) 넣어 1차추출과 같은 방법으로 5시간 반응을 시킨 후 원심분리 (10000rpm, 20분) 하여 침전물을 분리해 무게를 측정하였다.

(다) 3차 추출

2차 추출에서 분리한 침전물에 0.1M Phosphate buffer (pH 7.5) 400ml을 넣어 반응조로 옮겨 효소 Bromelain 1% 첨가 후 1차추출과 같은 방법으로 8시간 반응 시킨 후 원심분리 (10000rpm, 20분)하여 상등액과 침전물 분리 후 무게를 측정하였다.

(라) 멜라닌 분리 및 건조

3차 추출까지 한 침전물에서 멜라닌 분리를 위해 증류수 200ml을 넣어 워싱 후 원심분리 (10000rpm, 20분)하였다. 원심분리 후 상등액은 버렸으며 워싱 과정을 2번 반복하였다. 워싱 후 원심분리까지 한 침전물 멜라닌을 분리하여 최종 무게를 측정하였으며 침전된 멜라닌에 메탄올을 넣어 40℃에서 열풍건조 시켰다.

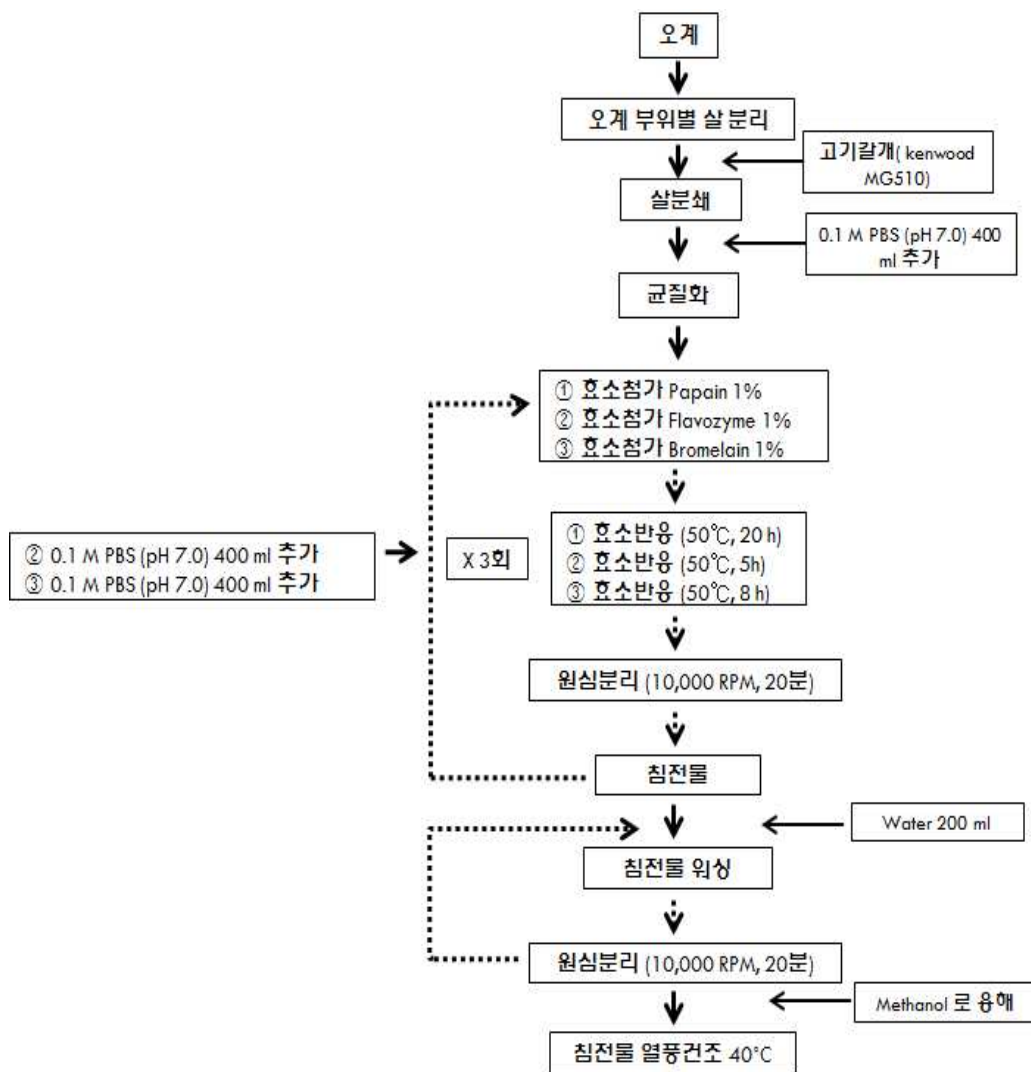


Fig.4. 오계 가슴육을 이용한 멜라닌 추출 공정.

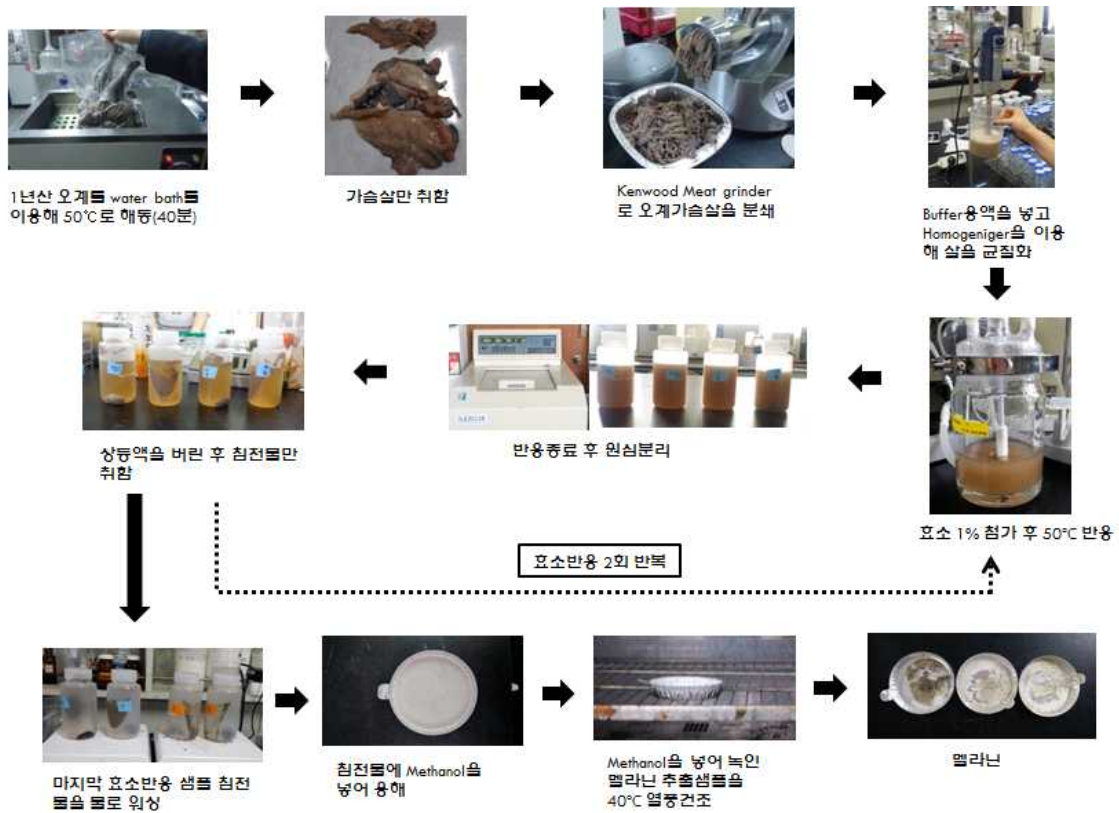


Fig.5. 오계가슴육을 이용한 멜라닌 추출 방법.

바. 오계 발을 이용하여 콜라겐 추출

(1) 오계 발 콜라겐 추출

수세한 냉동 오계 발(3년산)을 핏물과 불협잡물을 제거하기 위해서 정제수 1000ml에 넣어 실온에서 3시간동안 해동 및 수침하였다. 그 다음 5000ml 비커에 0.1M lactic acid (pH2.09)를 1000ml 채운 뒤 해동시킨 오계 발을 넣고 실온에서 24시간동안 산 침지 시켰다. 침지 된 오계 발을 수세한 다음 염을 제거하기 위해서 물 1000ml에 넣고 냉장고에서 24시간동안 보관하였다. 그 다음 1000ml 비커에 오계 발을 넣고 정제수 400ml에 오계 발이 잠길 수 있도록 한다. 그 다음 준비한 70°C water bath에 1000ml 비커를 넣고 3시간동안 열수추출 한다. 추출이 끝나면 여과지를 이용해서 기름과 불순물을 여과 시킨 후 냉장고에서 24시간 동안 보관한다. 같은 방법으로 4차까지 추출한다.

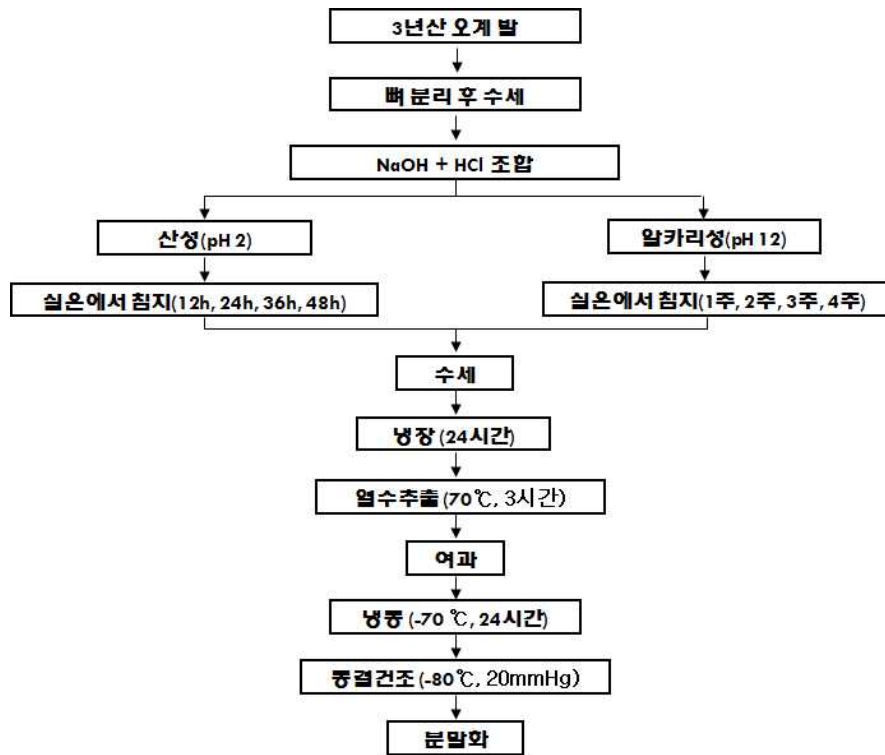


Fig.6. 오계발을 이용한 콜라겐 추출 공정방법.



Fig.7. 오계발을 이용하여 콜라겐 추출 방법

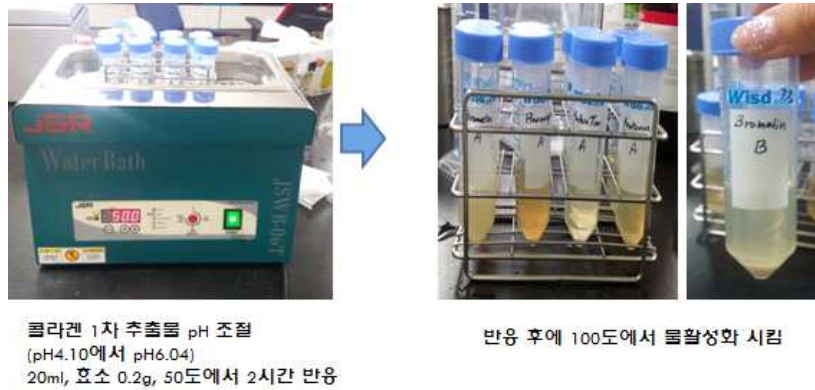


Fig.8. 오계 콜라겐추출물을 이용하여 효소 가수분해도 측정실험.

사. 오계육 펩타이드가 포접화 된 리포솜 제조

(1) 레시틴을 이용한 리포솜 제조

리포솜 제조는 Fig. 1. 에서 볼 수 있다. 0.01M PBS용액(pH 7.4) 20 ml에 75S-3 lipid를 3 g 넣고 상온에서 1시간 동안 교반하여 리포솜을 수화시킨 다음 70°C 예열해놓은 반응조에 질소가스를 계속 주입하면서 3 % mannitol 80 ml를 넣고 203 rpm으로 교반하여 1시간 동안 반응시킨다. 반응 후 제조된 리포솜을 시약병에 담아 명칭, 제조날짜, 용량, 제조 인을 표기하고 냉장보관 한다. 형성된 Liposome의 평균직경을 100~200 nm로 nano화 하기위해서 Microfluidizer 1500 psi, 2 cycle 조건으로 하여 Nano Liposome을 제조한다.

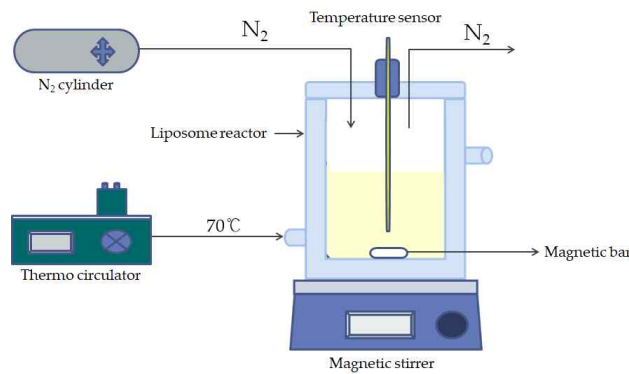


Fig 9. Schematic diagram

(2) 키토산 코팅 리포솜 제조

0.5 % 수용성 Chitosan Solution은 1 %(w/v) Acetic acid 100ml에 수용성 Chitosan을 0.5 g을 넣어 상온에서 밤새 용해시킨 다음 용해되지 않은 Chitosan은 0.45 um 필터를 이용하여 제거하여 시약병에 담아 명칭, 제조날짜, 용량, 제조 인을 표기하고 냉장보관 하였다. 15 ml 펠콘튜브에 제조된 Nano Liposome 1 ml에 0.025 %, 0.050 %, 0.075 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.6 % Chitosan Solution 1 ml를 각각 한 방울씩 떨어뜨리면서 적정시킨 다음 25°C 로 준비해두었던 Shaking incubator에서 1시간 동안 반응시킨 후 1 ml씩 에펜돌프 튜브에 넣고 10,000 rpm, 5분 동안 원심분리하여 상등액을 따로 보관한 다음

증류수 1 ml를 넣고 2회 세척하였다. 제조된 리포솜들은 냉장온도 5°C에 실험 전 까지 보존을 하였다. 제조된 리포솜들은 Fig. 10 순서대로 실험을 수행하였다.

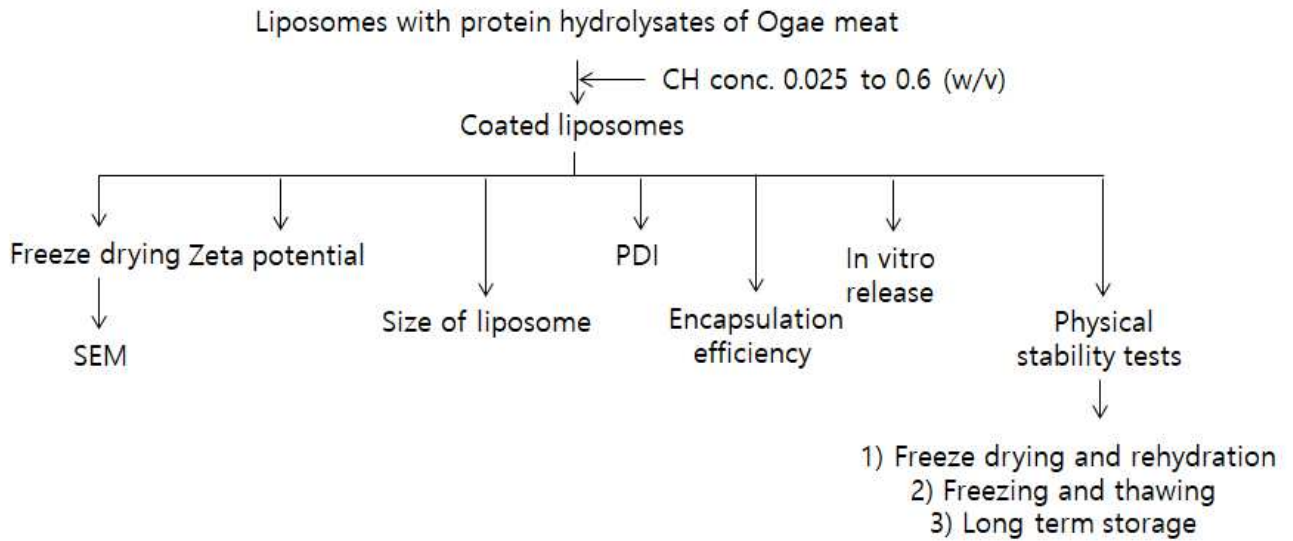


Fig 10. Analysis of Chitosan Coated Ogae egg protein hydrolysate liposomes.

아. 오계 단백질 가수분해물의 특성 분석

(1) 단백질 가수분해도 (degree of hydrolysis)

오계육의 단백질 가수분해물 1 ml 에 0.5 N NaOH 5 ml 혼합한 후, 1 N FCP (Folin-Ciocalteu's penol reagent) 1 ml 넣고 voltex를 이용하여 즉시 혼합시킨 후 배양기에 30°C온도로 15분 반응시켜 여과필터 해주었다. 필터 된 용액을 578 nm Absorbance를 측정한다. 프로테아제 가수분해 양은 L-Tyrosine 표준 곡선(Fig. 10)을 이용하여 측정하였고 표준곡선을 구하여 절편의 값은 다음과 같다(Fig.10). $Y=0.0078X + 0.0182$ 절편식을 이용하여 구한 후 가수분해양은 DH(%)의 값을 구하는 가수분해 정도를 이용해 계산하였다.

$$DH = \frac{D'_{at\ time\ t} - D_0}{D_{max} - D_0} \times 100$$

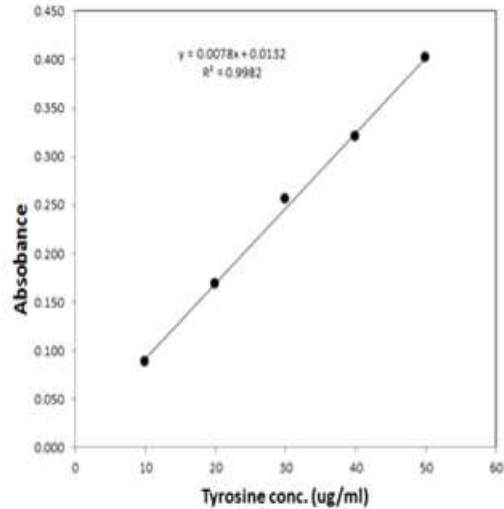


Fig. 11. Tyrosine standard curve. The absorbance was measured at 578 nm to different concentration of tyrosine.

(2) 단백질 가수분해물의 성분 분석

각 효소를 사용하여 가수분해하여 동결건조 한 샘플을 0.1% TFA에 용해 후 0.4um filtration 하였다. RF-HPLC(Jasco, co.) 를 사용하여 각각의 peptide를 분리한다. 이때 사용한 column은 protein & peptide C18 이며 사용한 solvent A는 0.1% TFA/H₂O, solvent B는 0.1% TFA/Acetonitrile를 1ml/min의 유속으로 흘러 재분획 하였다. Peptide성분 검출은 UV detector를 사용하여 220nm에서 실시하였다. Gradient는 0.1% TFA/H₂O 70%, 0.1% TFA/Acetonitrile 30%로 1분, 0.1% TFA/H₂O 55%, 0.1% TFA/Acetonitrile 45%로 30분, 0.1% TFA/H₂O 70%, 0.1% TFA/Acetonitrile 30%로 1분, 0.1% TFA/H₂O 70%, 0.1% TFA/Acetonitrile 30%로 9분으로 solvent의 차이를 주었다.

(3) 단백질 가수분해물의 분자량 측정

각 6개의 효소별로 반응하여 가수분해 한 샘플을 원심분리하고 상등액을 취한 후 동결하였다. 이를 동결건조기를 이용하여 분말화 된 샘플을 0.002g 취하여 0.1% TFA/H₂O 1ml에 용해하였다. 이 샘플은 0.2 μm membrane filter(Millipore Co.)을 이용하여 여과한 샘플을 사용하였다. 펩타이드 분자량 측정을 위해 matrix는 alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid 1 mg을 0.1 mL 70% acetonitrile, 0.1% formic acid에 용해 후 만들었다. 샘플의 농도는 50~100 ppm 정도로 준비하였으며, matrix시료와 시료를 1:1비율로 섞었다. MS plate위에 1 mL 정도 떨어뜨려 건조한 후 노란색을 띄는 샘플을 취해 질량분석기 (MALDI-TOF, Voyager DE-STR, Applied biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

(4) 단백질 가수분해물의 펩타이드 구조분석

단백질 가수 분해물을 RF-HPLC로 분리 정제한 시료 중에 가장 우수한 DPPH 소거능을 보이는 펩타이드들의 아미노산 서열과 분자량을 측정하였다. 펩타이드 분리를 위하여 Ultramate 3000 chromatography (Dionex UHPLC, Thermo Fisher Scientific Inc., Seoul, Korea)를 사용

하였다. 용출 용매는 deionized water (0.1% formic acid, A) 와 acetonitrile (0.1% formic acid, B)를 사용하였다. 용매의 gradient elution으로 B; 1%(0 min), B; 1%(3min), B; 50%(70 min), B; 97%(6min), B; 10%(6.1 min), B; 100% (80 min), B; 1% (81min) B; 1% (90min)으로 용출 시켰다. 유속은 300 ul/min 이고 시료 주입량은 3 ul 이었다. 아미노산 서열분석은 Q-TOF 5600 (Sciex, Seoul, Korea)를 이용하여 분석을 하였다. positive ion mode 방법으로 분석을 하였고 scan은 0.6초 간격으로, MS spectra는 m/z 100에서 m/z 1800의 범위에서 분석하였다. spray voltage는 10 kV, 온도는 500°C 이었다.

(5) 단백질 가수분해물의 아미노산 분석

동결건조 된 펩타이드 샘플을 1mg을 1ml에 녹인 후 membrane filter 0.2 µm(Millipore Co., MA, USA)로 여과하였다. 여과된 샘플은 아미노산 자동분석기(S433-H, Sykam GmbH, Eresing, Germany)로 아미노산량을 측정하였다. Column은 cation separation column(LCA K06/Na, 4.6 × 150 mm)로 정량 분석하였다. Column 온도는 57~74°C, 완충용액과 o-Phthalaldehyde(OPA) 시약의 flow rate는 각각 0.45 mL/min, 0.25 mL/min 였으며, 이때 완충용액의 pH 범위는 3.45~10.85이었고, 파장은 440 nm과 570 nm 이었다.

아. 오메 단백질 가수분해물의 항산화능 측정

① DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH의 측정 방법은 산소인 자유 라디칼이 생체 고분자들인 지질 단백질 등과 결합을 하여 피부의 노화 및 질병을 유발하는 물질로 밝혀진 이래로 항산화 물질의 라디칼 소거능력에 이용되고 있다[37]. DPPH 라디칼 소거활성은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다[38]. 항산화 특성을 평가하기 위해서 동결건조분말 가수 분해물을 DIW(deionized water)에 용해를 한 다음 10 kDa 한 외막을 이용하여 분리를 하였다. 추출된 시료를 일정한 농도로(10%) 증류수에 용해한 후 시료가 포함된 용액 2 mL와 DPPH-radical(0.2 mM) 용액 0.5 mL를 혼합 하였다. 혼합물은 30분간 실온에서 암실 보관한 후 517 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 대조구로는 ascorbic acid를 이용하였으며 시료와 동일한 조건으로 측정하였다. DPPH-radical scavenging activity는 아래의 식에 의해 값을 산출하였다.

$$\text{DPPH-radical scavenging activity}(\%) = [(B - A) / B] \times 100$$

A: 시료 첨가시의 흡광도

B: 시료 무 첨가시의 흡광도

② 하이드록시 라디칼 소거능 측정

Hydroxyl 라디칼에 대한 소거활성 측정은 Fan의 방법을 변형하여 측정하였다[39]. 항산화 특성을 평가하기 위해서 동결건조분말 가수 분해물을 DIW(deionized water)에 용해를 한 다음 10 kDa 한 외막을 이용하여 분리를 하였다. 표준물질 제조는 ascorbic acid 10 mg을 10 ml DIW(deionized water)에 혼합하였다. 대조구는 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 사용하고, 샘플은 10000ppm, 20000ppm 으로 준

비한다. 라디칼 반응은 300 ul 샘플용액, 300 ul 3 mM 1,10-phenanthroline, 300ul 3 mM FeSO₄, 300ul 0.01% hydrogen peroxid를 혼합한 후 37°C에서 1시간동안 진탕배양한 후 spectrophotometer를 사용하여 536nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydroxyl 라디칼 소거활성은 대조구에 대한 시료의 흡광도를 비교하여 아래와 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity(\%)} = \{[(\Delta A/\text{min})_b - (\Delta A/\text{min})_s] / (\Delta A/\text{min})_b\} \times 100.$$

b: 대조구, s: 샘플

$\Delta A/\text{min}$: 반응 후 흡광도 - 반응 전 흡광도

③ 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능

Superoxide에 대한 소화활성은 Yu의 방법을 변형하여 측정하였다[40]. 항산화 특성을 평가하기 위해서 동결건조분말 가수 분해물을 DIW(deionized water)에 용해를 한 다음 10 kDa 한 외막을 이용하여 분리를 하였다. 대조구는 50 mM Tris - HCl buffer(pH8.3)용액을 사용하였다. 반응은 Micro tube를 이용하여 제조된 500 μ l 50 mM Tris - HCl buffer(pH8.3)용액에 peptide 500ug을 넣고 혼합한 다음 400 μ l 1.5 mM pyrogallol 용액을 혼합한 후 실온에서 4분 동안 반응시킨 후 spectrophotometer를 사용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide에 대한 소화활성은 대조구에 대한 시료의 흡광도를 비교하여 아래와 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Superoxide scavenging activity(\%)} = \{[(\Delta A/\text{min})_b - (\Delta A/\text{min})_s] / (\Delta A/\text{min})_b\} \times 100.$$

b: 대조구, s: 샘플

$\Delta A/\text{min}$: 반응 후 흡광도 - 반응 전 흡광도

④ Fe²⁺ 킬레이션 능력

시료용액의 metal chelating effect는 Gulcin의 방법을 약간 변형하여 측정하였다[41]. 동결건조분말 가수 분해물을 DIW(deionized water)에 용해를 한 다음 10 kDa 한 외막을 이용하여 분리를 하였다. 추출된 시료는 일정 한 농도로(0-1%) 증류수에 용해하였고 test tube에 추출된 시료 500 μ L와 100 μ L FeCl₂(0.6 mM), 900 μ L methanol 을 넣고 혼합하였다. 5분 동안 상온에서 반응 시킨 후 100 μ L ferrozine(5 mM) 을 혼합물에 첨가하여 10분 동안 상온 에서 반응 시켰다. 562 nm에서 흡광도를 측정 하였고, 대조구로는 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)를 시료와 동일한 조건으로 측정하였다.

$$\text{Iron chelation activity(\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A: 시료 첨가시의 흡광도

B: 시료 무 첨가시의 흡광도

자. 오계 펩타이드 캡슐화 된 리포솜의 특성 분석

1) Scanning Electron Microscopy(SEM)

SEM 분석은 Model S-4700 SEM 기기를 사용하여 입자 모양 및 표면 형태를 특성화하였다. 샘플을 2 % osmium tetroxide로 슬라이드에 고정시키고 임계점 건조기 (Leica, Model CPD300, Germany)를 사용하여 에탄올로 임계점을 건조시켰다. 이렇게 고정 및 탈수 된 시료는 저압 진공 코팅기 (Leica, Model EM ACE200, Germany)에서 금으로 0.51A.s⁻¹의 증착 속도로 180 초 동안 코팅하였고, 0.2 Pa. 리포솜 샘플의 SEM 이미지는 15 kV의 가속 전압에서 측정하였다.

(2) 제타 전위 측정(zeta potential measurement)

제타전위는 리포솜과 유사한 콜로이드입자의 분산안정성의 척도로서 사용한다. 키토산 코팅 리포솜과 코팅하지 않은 리포솜 용액을 10,000 rpm x 10분 동안 원심분리한 후에 상등액을 제거하고 DIW로 두 번 세척을 하였다. 세척된 리포솜 용액을 측정 범위내의 농도까지 희석을 하였다. 세척하여 준비된 Sample 1 ml를 DIW 9 ml에 녹인 후 리포솜의 제타전위와 입자평균직경은 Zetasizer Nano Model ZS (Malvern Instruments, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. 모든 샘플들은 universal dip cells을 이용하여 25°C에서 3회 측정하였다.

(3) 리포솜 평균 직경 및 다분산 지수 측정(polydispersity index)

동적광산란법(Dynamic Light Scattering : DLS)은 콜로이드나 단백질 등 나노 사이즈 분자의 평균직경, 무게, 분포, 집합도 등을 분석하는 장비로서 본 실험에서는 키토산 코팅 리포솜 과 코팅하지 않은 리포솜 용액을 10,000 rpm x 10분 동안 원심분리한 후에 상등액을 제거하고 DIW로 두 번 세척을 하였다. 세척된 리포솜 용액을 측정 범위내의 농도까지 희석을 하였다. 세척하여 준비된 Sample 1 ml를 DIW 9 ml에 녹인 후 리포솜의 제타전위와 입자평균직경은 Zetasizer Nano Model ZS (Malvern Instruments, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. 모든 샘플들은 universal dip cells을 이용하여 25°C에서 3회 측정하였다.

(4) 리포솜의 오계란 OPH 캡슐화 효율(EE, encapsulation efficiency)

키토산 코팅 리포솜과 코팅하지 않은 리포솜의 오계란 OPH의 캡슐화 효율은 Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 BCA Protein Assay로 측정하였다. 키토산 코팅 리포솜과 코팅하지 않은 리포솜 용액을 10,000 rpm x 10분 동안 원심분리한 후 상등 액으로부터 알려진 농도 일부를 취하였다. 상등 액을 BCA 측정 범위내의 농도까지 희석을 하였다. 희석 된 상등액 0.1 ml를 준비된 BCA 시약과 20 : 1의 비율로 혼합하여 상온에서 2시간 동안 반응 후 샘플을 UV–visible spectrophotometer(Shimadzu, Model 8453)를 사용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 오계란 OPH로 캡슐화 되지 않은 리포솜에 대한 측정값을 대조구로 하였다. 오계란 OPH의 캡슐화 효율은 총 오계란 OPH에 대한 캡슐화 되지 않은 오계란 OPH의 비율로 결정되었다.

EE (%) = (the initial amount of OPH - the remained amount of OPH)/the initial of OPH x 100

(5) In Vitro 오계란 OPH 방출 실험

펩타이드를 캡슐화된 키토산 코팅 리포솜과 코팅하지 않은 리포솜들이 위 와 소장에서의 안정성과 보호 효과를 측정하기 위해서 아래와 같이 수행을 하였다. Gastric 용액 제조는 DIW 5 ml에 HCl 0.35 ml 를 넣고 pepsin 100 mg와 NaCl 100 mg을 넣은 다음 DIW를 이용하여 50 ml까지 mess up 하였다. 그 다음 진한 염산을 이용하여 pH 1.2으로 조정하였다. Intestinal 용액 제조는 DIW 10 ml에 monobasic potassium phosphate 340 mg을 넣고 0.2 M NaOH 3.85 ml와 pancreatin 500 mg 넣은 다음 DIW를 이용하여 50 ml까지 mess up 하였다. 그 다음 진한 수산화나트륨을 이용하여 pH 6.8으로 조정하였다.

키토산 코팅 리포솜과 코팅하지 않은 리포솜 용액 20 ul를 DIW 1 ml로 희석을 하여 에펜돌프 튜브에 옮기고 37°C 및 200 rpm 항온 진탕기에서 반응을 시켰다. 반응하는 동안 1 시간 마다 해당 샘플을 취하고 원심 분리 후에 상등액의 오계란 OPH양을 측정 하였다.

차. 오계 펩타이드 캡슐화 된 리포솜의 안정성 실험

(1) 동결 및 해동

리포솜을 동결 보존하는 동안 평균직경 및 응집 변화 등 안전성 실험을 하기 위하여 0.5 ml 키토산 코팅된 리포솜들과 코팅이 되지 않은 리포솜들을 2 ml 에펜돌프 튜브에 넣고 45 oC에서 추가로 동결방지제를 첨가하지 않고 동결 하였다. 일주일 간격으로 샘플들은 선택하여 상온에서 4 시간동안 해동을 한 후에 재분산(dispersion)된 리포솜들의 평균직경, PDI 및 캡슐화 효율(encapsulation efficiency)를 측정하였다.

(2) 동결 건조 및 복원(rehydration)

리포솜을 동결 건조 후에 보존 및 복원 하는 동안 평균직경 및 응집 변화 등 안전성 실험을 하기 위하여 0.5 ml 키토산 코팅된 리포솜들과 코팅이 되지 않은 리포솜들을 2 ml 에펜돌프 튜브에 넣고 45°C에서 추가로 동결방지제를 첨가하지 않고 24 hr 동결 하였다. 동결된 샘플들은 동결 건조기(Labconco, fishersci, Koera)를 이용하여 건조를 하였다. 동결건조 조건들은 -52°까지 온도를 내린 다음 진공을 켜서 진공도가 약 0.6 mbar가 되면 샘플을 넣고 동결 건조시켰다. 동결 건조된 샘플들은 증류수를 이용하여 수화시키고 볼텍스를 이용하여 잘 분산을 시켰다. 일주일 간격으로 샘플들은 선택하여 상온에서 4 hr 동안 해동한 후에 재분산(dispersion)된 리포솜들의 평균직경의 변화, PDI 및 캡슐화 효율(encapsulation efficiency)를 측정하였다.

(3) 저장 중 리포솜의 변화

키토산 코팅된 리포솜들과 코팅이 되지 않은 리포솜 1 ml를 에펜돌프 튜브에 넣고 냉장온도 5oC 와 상온 25°C에서 저장을 한 후에 일주일 간격으로 샘플들은 선택하여 분산(dispersion)된 리포솜들의 평균

직경의 변화, PDI 및 캡슐화 효율(encapsulation efficiency)를 측정하였다.

카. 통계

All experiments were carried out in triplicate. Results were expressed as means \pm standard deviation. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison tests were performed using the GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Differences were considered to be significant at $p < 0.05$ with Tukey test throughout this study.

3. 연구수행 결과

가. 부위별 효소가수분해 펩타이드 제조

(1) 오계 1년산 가슴육 효소가수분해 펩타이드 제조

(가) BM1200에 의한 오계가슴육의 펩타이드생산 최적화

BM1200에 효소를 이용하여 오계가슴육으로부터 효소가수분해하여 최적 조건요인들인 온도, pH, 효소양의 3개의 실험변수에 대하여 Box-Benken 디자인으로 실험을 설계하여 얻어진 실험 결과를 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Experimental data의 디자인 계획(온도, pH, Enzyme조건에 따른 가수분해도).

Sample	Temp.	pH	Enzyme	Degree of hydrolysis(%)	Yield(%)	Production speed(g/h-L)
1	-1	-1	0	18.20	21.377	1.069
2	1	-1	0	15.20	18.781	0.939
3	-1	1	0	26.70	30.098	1.505
4	1	1	0	12.50	15.503	0.775
5	-1	0	-1	25.60	28.440	1.422
6	1	0	-1	19.80	23.827	1.191
7	-1	0	1	35.60	41.318	2.066
8	1	0	1	23.40	28.205	1.410
9	0	-1	-1	18.20	21.742	1.087
10	0	1	-1	16.80	19.927	0.996
11	0	-1	1	26.80	31.432	1.572
12	0	1	1	28.40	33.680	1.684
13	0	0	0	33.50	37.625	1.881
14	0	0	0	34.60	39.373	1.969
15	0	0	0	36.34	43.659	2.183
16	0	0	0	31.40	34.226	1.711
17	0	0	0	37.14	40.483	2.024

Table 2의 실험결과를 이용한 효소가수분해 실험결과 최적 온도는 50℃, 최적 pH는 pH6, 효소의 양은 3% 넣었을 때 회귀식에 대한 분산분석의 결과는 반응표면분석법에 의해 수립된 모델의 적합성 여부를 알려준다. 표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대점으로 판명되어 예측 최대 효소가수분해는 Table 2에서 온도가 높을수록, pH가 낮을 수록, 효소양이 많이 사용될수록 영향을 받는 것으로 나타났다. 온도는 높을수록 점차 증가하지만 50℃ 이상 높아지면서 가수분해가 더욱 잘 된 것을 보여주었다. pH가 6부근에서 최고 가수분해정도를 보여주다가 pH가 낮아질수록 가수분해도가 낮아지는 것을 보여준다(Table 3).

Table 3. Analysis of variance(ANOVA) for fitted second-order polynomial model and lack of fit for 1년산 오계 가슴육

Source	DF	Sum of Squares
		DH ^a
Model	9	1009.44
Residual	7	30.37
Lack of Fit	3	9.45
Pure Error	4	20.93
Cor Total	16	1039.81

^a 1년산 오계 가슴육

Table 4. Estimated coefficient for the fitted second order polynomial representing the relationship between the response and process variables.

Factor	Coefficient DH
Intercept	34.60
Linear	
Temperature	-4.40
pH	0.75
Enzyme	4.23
quadratic	
Temperature	-6.45
pH	-10.00
Enzyme	-2.05
Interactions	
pH×Temperature	-2.80
pH×Enzyme	-1.60
Enzyme×Temperature	0.75

모델 결정계수(determination coefficient) R^2 값은 실험값 (observed value)와 예측값(predicted value)과 상호연관(correlation) 정도를 보여주는데 가수분해도 0.97 이다. 적합결여(lack of fit) 테스트 검정에서는 유의성이 나타나지 않아 본 실험에 사용한 모델이 매우 적절함을 알 수 있다.

가수분해 3가지 요인들에 대한 회귀식은 Table 10에 있다. 효소의 양은 1%보다 더 많은 3%의 양일 때 일정하게 계속 증가하는 것을 보여준다. 따라서 최대 오계가슴육의 펩타이드 양은 mg/g이고, 가수분해는 61.383%이었다.

따라서 종합적으로 보면 오계가슴육의 효소가수분해에 따른 펩타이드양에 가장 영향을 미치는 것은 효소의 양이고 다음에 온도 그리고 pH의 순으로 나타났다.

Table 5. Polynomial equations calculated by response surface program.

Response	Second order polynomial equations	R^2
1년산 오게가슴육 production	$Y = +34.60 - 4.40X_1 + 0.75X_2 + 4.23X_3 - 6.45X_1^2 - 10.00X_2^2 - 2.05X_3^2 - 2.80X_1X_2 - 1.60X_1X_3 + 0.75X_2X_3$	0.97

X_1 : Temperature(°C), X_2 : pH, X_3 : Enzyme(%)

(나) 온도와 pH에 따른 최적 생산조건

1년산 오게 가슴육을 이용하여 효소가수분해를 온도와 pH에 따른 최적 표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대 점으로 판명되어 예측 최대 펩타이드 생산은 온도에서 60°C 일 때, pH은 pH7.5로 반응 하였을 때 온도에서 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해도는 pH 6-8까지 가수분해도가 32.25~48.81% 까지 증가하다가 이후에는 감소하였다. 반면 온도에 의한 영향을 보면 40°C에서부터 60°C 범위에서는 60°C 부근에서 가수분해도의 65.08% 최고점을 보이는 것을 볼 수 있었다. Fig 12. 에서 보듯이 온도를 이용하여 단백질 가수분해도를 보면 온도와 pH 사이의 영향은 pH7.5일 때와 온도47°C 정도에서 가수분해도가 최적임을 보여 준다. 이때 가수분해도 33.25% 이었다. 종합적으로 보면 효소가수분해를 이용한 최적 조건으로 가장 영향을 미치는 것은 온도 그리고 pH의 순으로 나타났다.

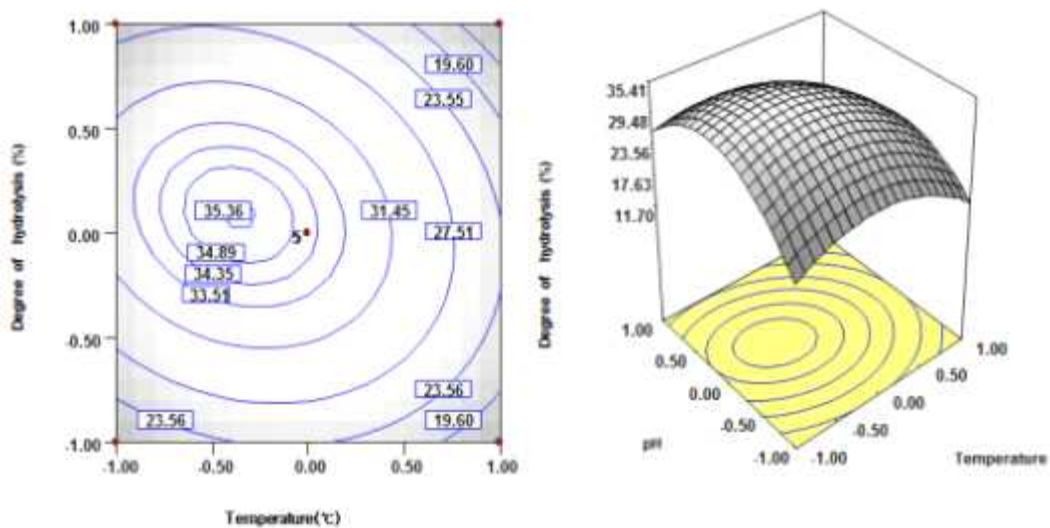


Fig 12. 1년산오게 가슴육 온도와 pH그래프

(다) 온도와 효소 양에 따른 최적 생산조건

1년산 오계 가슴육을 이용하여 효소가수분해를 온도와 효소 양에 따른 최적 표면 반응의 분석 결과 정상점(stationary point)이 최대 점으로 판명되어 예측 최대 펩타이드 생산은 온도에서 50℃ 일 때, 효소 양은 반응용매의 3%로 반응 하였을 때 효소 양에서 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해도%는 효소 양 1-3%까지 가수분해도가 17.95~41.50% 까지 계속 증가하였다. 반면 온도에 의한 영향을 보면 40℃에서부터 60℃범위를 봤을 때 60℃ 부근에서 가수분해도의 65.05% 최고점을 보이는 것을 볼 수 있었다. Fig 5 에서 보듯이 온도와 효소 양을 이용한 단백질 가수분해도를 보면 온도와 효소 양의 영향은 효소 양 3%일 때와 온도 47℃ 정도에서 가수분해도가 최적임을 보여준다. 이때 가수분해도 36.66% 이었다. 종합적으로 보면 효소가수분해를 이용한 최적 조건으로 가장 영향을 미치는 것은 온도 그리고 효소의 양 순으로 나타났다.

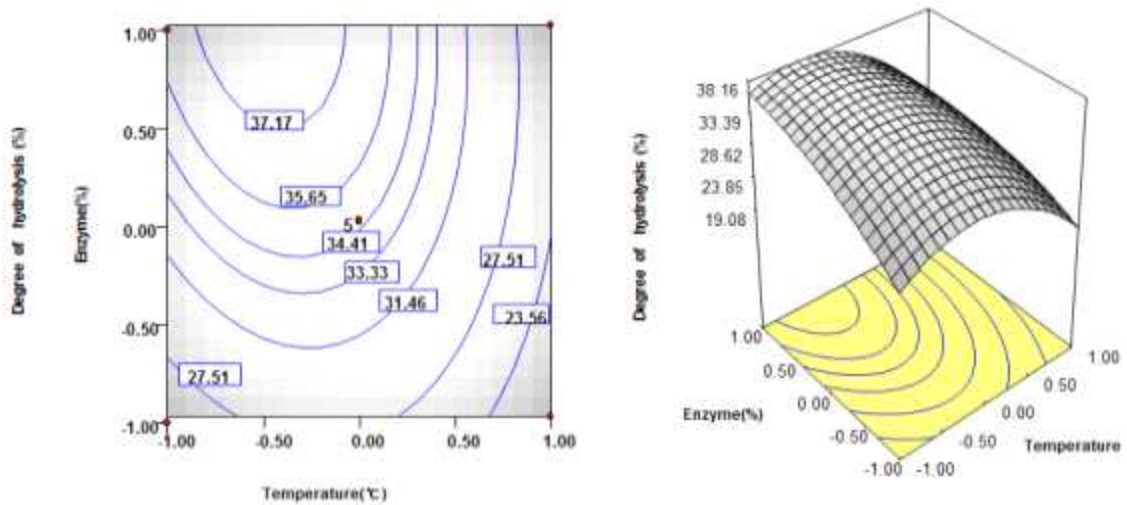


Fig 13. 1년산오계 가슴육 온도와 효소양 그래프

(라) pH와 효소 양에 따른 최적 생산조건

1년산 오계 가슴육을 이용하여 효소가수분해를 pH와 효소 양에 따른 최적 표면 반응의 분석 결과 정상점(stationary point)이 최대 점으로 판명되어 예측 최대 펩타이드 생산은 pH8일 때, 효소 양은 반응용매의 3%로 반응 하였을 때 효소 양에서 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해도%는 효소 양 1-3%까지 가수분해도가 18.07~48.20% 까지 계속 증가하였다. 반면 pH에 의한 영향을 보면 pH6에서부터 pH8범위에서는 pH7.5부근에서 가수분해도의 25.61% 최고점을 보이는 것을 볼 수 있었다. Fig 6 에서 보듯이 pH와 효소 양을 이용한 단백질 가수분해도를 보면 pH와 효소 양의 영향은 효소 양 3%일 때와 pH7.5 정도에서 가수분해도가 최적임을 보여준다. 이때 가수분해도 35.26% 이었다. 종합적으로 보면 효소가수분해를 이용한 최적 조건으로 가장 영향을 미치는 것은 효소 양 그리고 pH의 순으로 나타났다.

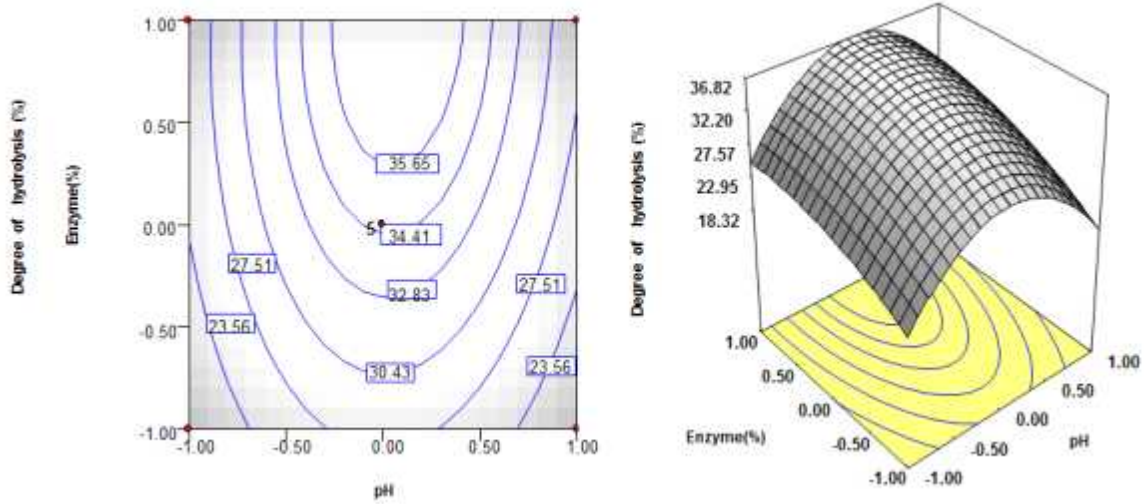


Fig 14. 1년산 오계 가슴육 pH와 효소 양 그래프

(마) 온도, 시간, 효소 양에 따른 최적조건

1년산 오계가슴육 효소가수분해결과 최고 효소가수분해는 61.383%로 종합적으로 효소가수분해에 가장 영향을 미치는 것은 Fig 7.에서 온도, 효소 양, pH의 순으로 나타났다.

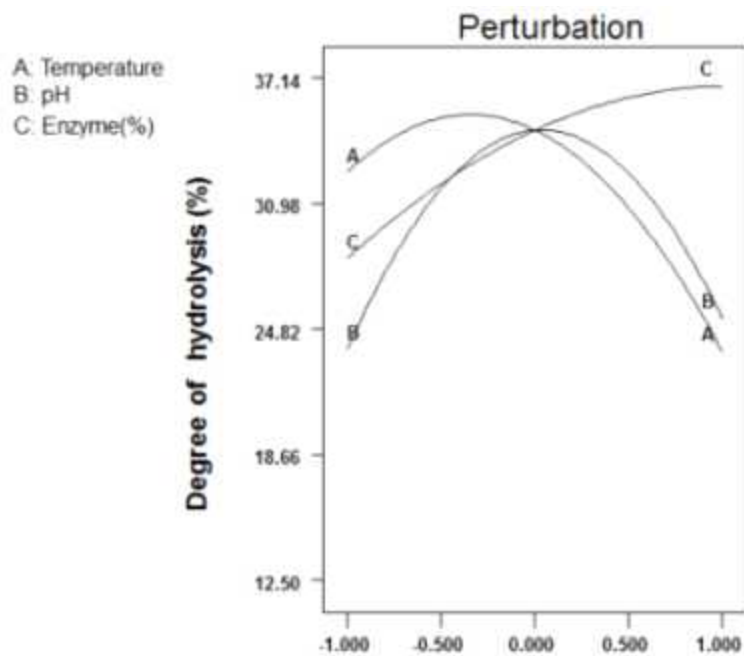


Fig 15. 1년산 오계가슴육 효소가수분해 최적조건 그래프.

(바) 오계가슴육의 효소가수분해 펩타이드 아미노산 결과

① 구성 아미노산

오계가슴육 효소가수분해물의 구성아미노산 조성은 Fig. 18과 같다. 구성아미노산의 함량은 54.304 mg/100g 이다. 그 중 Leucine 이 전체 구성아미노산의 17.9 %(5.428 mg/100g)으로 가장 많은 함량을 차지하고 있었다. 다음으로 Tryptopan(13.3%), Asparagine(10.9%), Lysine(9.9%), Methionine(9.2%) 등의 순서로 확인되었다.

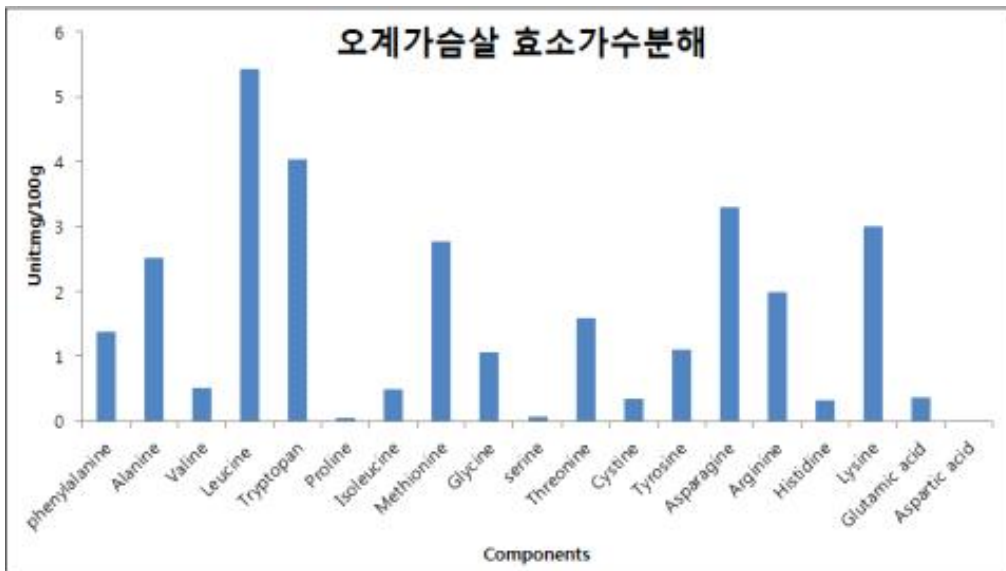


Fig 16. 오계가슴육 구성아미노산 분석그래프분석.

② 유리 아미노산

오계가슴육을 분리하여 효소가수분해 처리한 가수분해물의 유리 아미노산 함량은 다음과 같다 (Fig 17). 오계가슴육 효소가수분해물에서는 26 종류의 유리아미노산이 검출되었으며, 구성아미노산을 제외한 아미노산에서는 Carnosine(27.1%), β -aminoisobutyric acid(7.6%), Hydroxylysine(3.0%), γ -amino-n-butyric acid(2.6%) 등의 순으로 존재하였다.

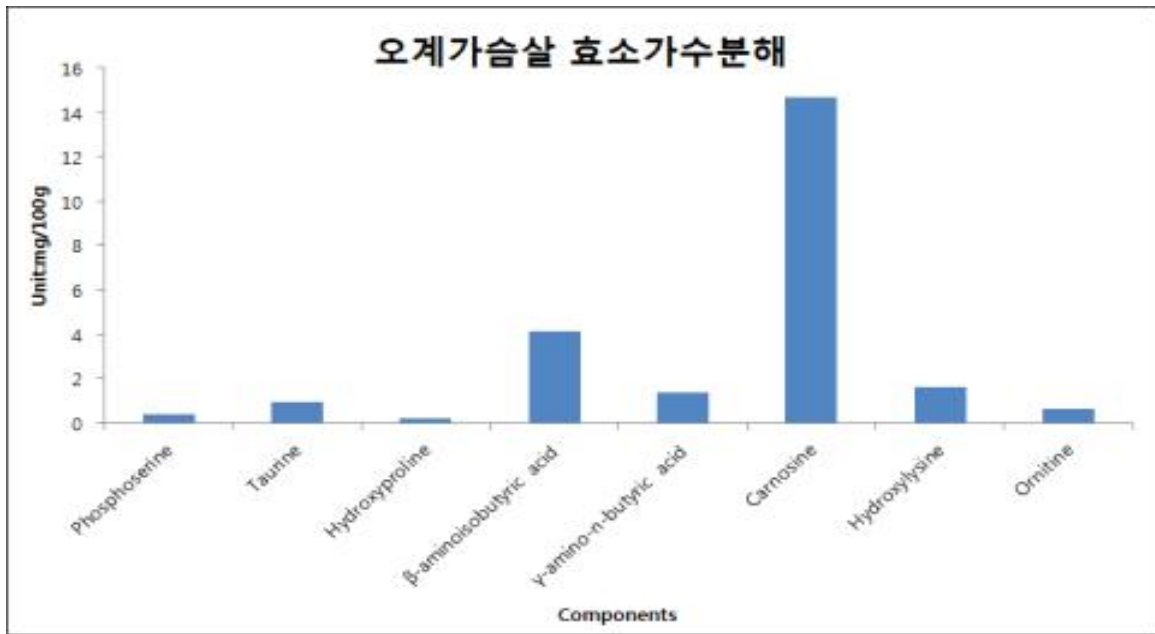


Fig 17. 오계가슴육 20개 아미노산 분석.

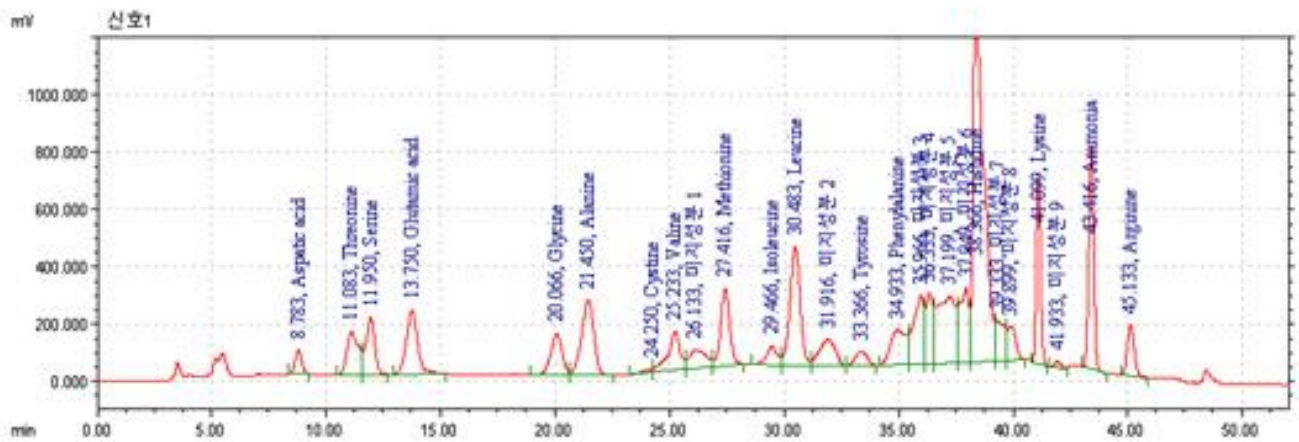


Fig 18. 오계가슴육 아미노산 분석 그래프.

(사) 오계 가슴육의 펩타이드 분자량 분포 결과

오계 가슴육을 단백질 가수분해 효소를 이용하여 분해한 생성물들의 분자량 분포 특성을 분석하고자 MALDI-TOP를 사용하였다. MALDI-TOF는, PMF(Peptide Mass Fingerprint) 분석법으로 특정 enzyme를 처리하여 잘라진 peptide fragment들의 mass 값을 측정하고 이를 사용하여 database search를 하여 동정한다. 그러므로 PMF방법은 Genomic sequence가 완료된 생물종이나 NCBI에 등재가 된 단백질을 동정하는데 주로 사용한다. 단백질의 모든 아미노산 평균 분자량은 138이지만, 가중 평균은 128이고 축합 중합에 의해 단백질은 각 단위체당 110의 평균

분자량을 갖게 된다. 이를 나타내는 단위는 dalton(달톤)으로 1 kD는 1000g/mol이다. 예를 들면 약 500개의 아미노산을 갖는 단백질의 평균적인 분자량은 55000D, 즉 55kD의 분자량을 갖는다.

본 연구에서 Fig 11은 오계가슴육 단백질 가수분해물의 펩타이드들의 분자량 분포에 대한 분석을 시행하였는데 MALDI-TOP의 그래프에서 x 축은 mass(m/z)를 나타내고 Y축은 이온화된 물질의 강도를 나타낸다. 불순물이 어느 정도 포함이 되어있지만 대부분의 펩타이드들은 m/z 500에서 1,400 이하 분자량 분포를 보여 주었다. 따라서 오계 가슴육 가수분해물 펩타이드들은 아미노산 염기 4에서 12개 정도의 분포를 보여 주었다. 그리고 대부분의 펩타이드들이 염기서열 10개 이하로 이루어져 있었다. 평균 분자량으로 환산을 한다면 다수를 차지하는 펩타이드의 분자량들은 아미노산 잔기가 5,6,8,10개로 이루어져 있었다.

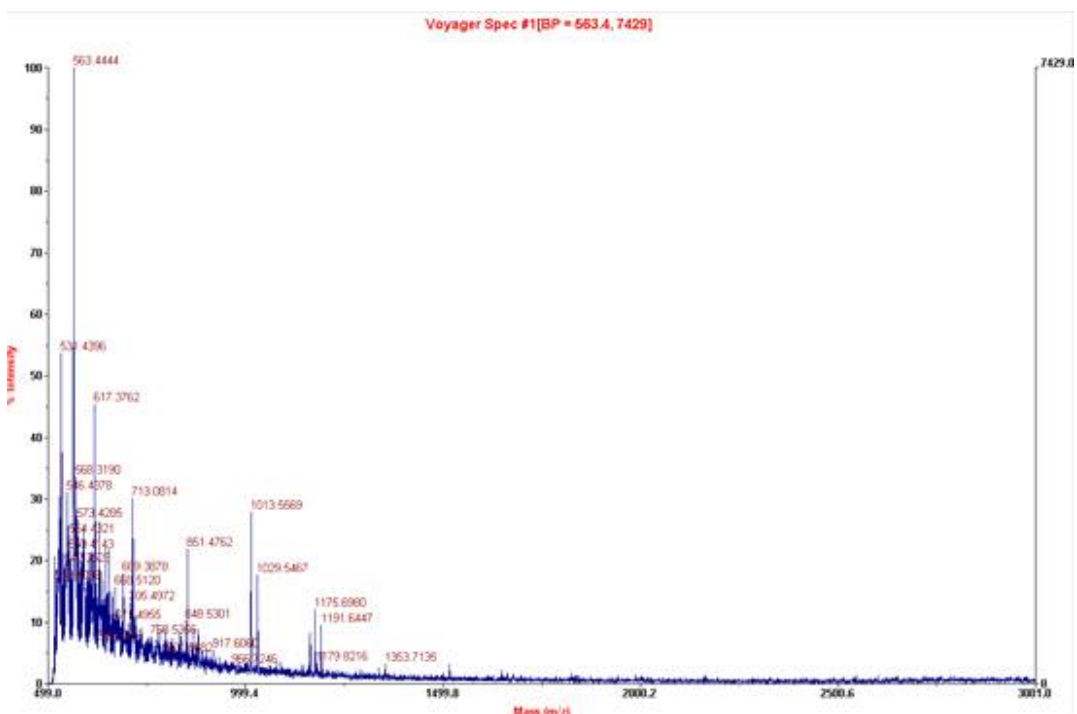


Fig 19. 1년산 오계가슴육 Maldi-TOF 분석.

(2) 오계 1년산 다리육 효소가수분해 펩타이드 제조

(가) 오계 다리육의 펩타이드 생산 최적화

BM1200에 효소를 이용하여 오계 다리육으로부터 효소 가수분해하여 최적 조건요인들인 온도, pH, 효소양의 3개의 실험변수에 대하여 Box-Benken 디자인으로 실험을 설계하여 얻어진 실험 결과를 Table 6에 나타내었다. 1년산 다리육 효소가수분해 펩타이드 생산의 효율성을 나타내는 중요한 요인인 효소가수분해도의 측정값을 나타낸다. 실험 결과 가수분해도는 14.50~32.50% 범위에서 측정되었다.

Table 6.의 실험결과를 이용한 효소가수분해 실험결과 최적 조건은 50°C(Temperature 0) , pH 8(pH, 1), 효소의 양(Enzyme, 1) 3% 넣었을 때 회귀식에 대한 분석 결과는 반응표면분석법에 의해 수립된 모델의 적합성 여부를 알려준다. 표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대점으로 판명되었다.

Table 6. Experimental data의 디자인 계획(온도, pH, enzyme조건에 따른 가수분해도)

Sample	Temp	pH	Enzyme	Degree of hydrolysis(%)	Yield(%)	Production speed(g/h-L)
1	-1	-1	0	14.80	16.145	0.807
2	1	-1	0	15.60	17.004	0.850
3	-1	1	0	22.63	24.682	1.234
4	1	1	0	18.50	20.181	1.009
5	-1	0	-1	16.80	18.312	0.916
6	1	0	-1	14.50	15.805	0.790
7	-1	0	1	25.60	27.926	1.396
8	1	0	1	26.80	29.224	1.461
9	0	-1	-1	15.40	16.789	0.839
10	0	1	-1	20.76	22.637	1.132
11	0	-1	1	28.90	31.526	1.576
12	0	1	1	31.54	34.406	1.720
13	0	0	0	31.38	34.218	1.711
14	0	0	0	29.80	32.527	1.626
15	0	0	0	28.90	31.520	1.576
16	0	0	0	32.50	35.425	1.771
17	0	0	0	30.50	33.245	1.662

예측 최대 효소가수분해는 효소의 농도가 높을수록, pH는 약 7.2 정도에서, 온도는 50°C 가 되었을 때 최적의 영향을 받는 것으로 나타났다. 이 중 효소의 농도가 높아질수록 가장 영향을 많이 받는다는 것이 95% 수준 이내에서 인정되었다(Table 7).

Table 7. Analysis of variance(ANOVA) for fitted second-order polynomial model and lack of fit for black body fowl(Ogae) legs

Source	DF	Sum of Squares
		DH ^a
Model	9	720.66
Residual	7	10.58
Lack of Fit	3	2.82
Pure Error	4	7.76
Cor Total	16	731.24

^a Coefficient of correlation (R^2) for black body fowl(Ogae) legs was 0.96

^b Significant at 5% level.

모델 결정계수(determination coefficient) R^2 값은 실험값 (observed value)와 예측값(predicted value)과 상호연관(correlation) 정도를 보여주는데 가수분해도 0.90 이므로 이 모델은 10% 범위에서 설명되지 않는다는 것을 보여준다. 적합결여(lack of fit) 테스트 검정에서는 유의성이 나타나지 않아 본 실험에 사용한 모델이 매우 적절함을 알 수 있다. Table 8에서는 모델의 회귀계수를 나타내는 것으로 가수분해도가 3가지 요인들에 대하여 크게 영향을 받는 것으로 나타났다. 이들에 대한 회귀식은 Table 9. 에 있다.

Table 8. Estimated coefficient for the filled second order polynomial representing the relationship between the response and process variables.

Factor	Coefficient
	DH
Intercept	30.62
Linear	
Temperature	-0.55
pH	2.34
Enzyme	5.67
quadratic	
Temperature	-7.98
pH	-4.76
Enzyme	-1.71
Interactions	
pH×Temperature	-1.23
pH×Enzyme	0.88
Enzyme×Temperature	-0.68

Table 9. Polynomial equations calculated by response surface program.

Response	Second order polynomial equations	R^2
오계 1년산 다리육 production	$Y=30.62-0.55X_1+2.34X_2+5.67X_3$ $-7.98X_1^2-4.76X_2^2-1.71X_3^2-1.23X_1X_2$ $+0.88X_1X_3-0.68X_2X_3$	0.962

X_1 : Temperature(°C), X_2 : pH, X_3 : Enzyme(%)

(나) 온도와 pH에 따른 최적 생산조건

오계 다리육을 이용한 효소가수분해도 pH 6~8 범위에서 서서히 증가하다가 pH 7.2 이후로 떨어지는 것을 확인하였으며, 온도 또한 40°C에서 서서히 증가하여 50°C 즉 0.00에서 최대점을 나타내었다. 이 두 변수의 정상점을 확인해보면 30.39% 이상으로 가수분해도가 높아지는 것을 확인하였으며, 가수분해도는 펩타이드 생산효율을 평가하는 지표가 된다. 펩타이드 생산에 있어서 두 변수 모두 비슷한 영향을 받는다는 것을 확인하였다(Fig. 20).

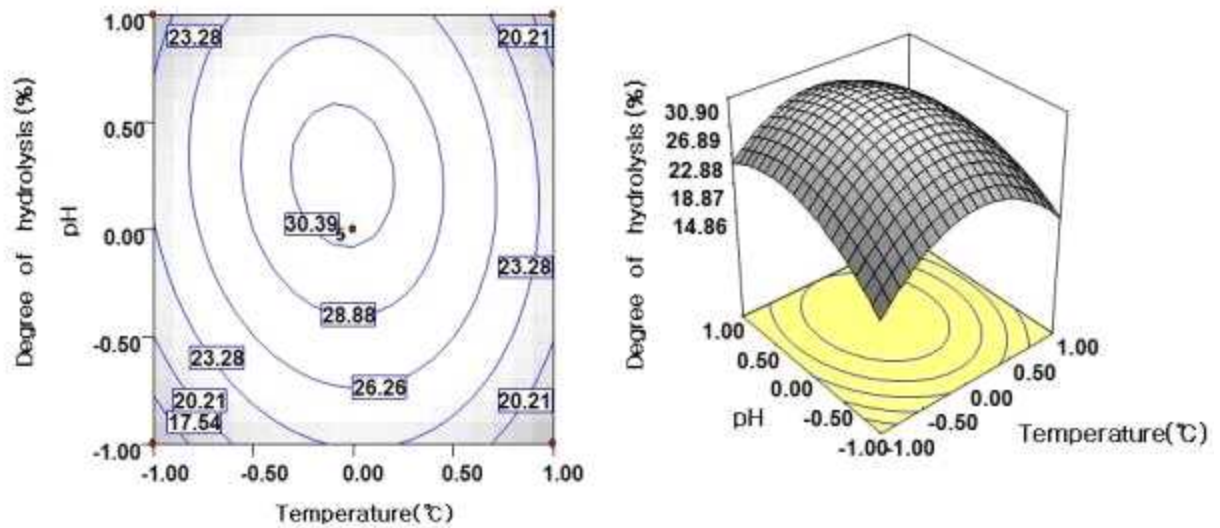


Fig 20. Contour 3D plots of response surface. Effect of pH and temperature on the production of black body fowl(Ogae) leg using commercial protease

(다) 효소와 pH에 따른 최적 생산조건

Fig 21 에서는 보는바와 같이 효소의 양의 변화에 따른 가수분해도 변화가 pH의 변화보다 민감한 것을 알 수 있다. 효소의 양의 범위를 1~3% 로 두고 점차 효소의 양을 올렸을 때(3%) 29.90%로 가수분해도가 높아졌으나 pH의 변화에서는 pH 6~7 까지 점차 증가하다가 pH7~8사 에서 낮아졌다. 그러므로 pH의 변화 보다는 효소의 양을 3%로 높였을 때 펩타이드의 생산량이 증가함을 알 수 있다.

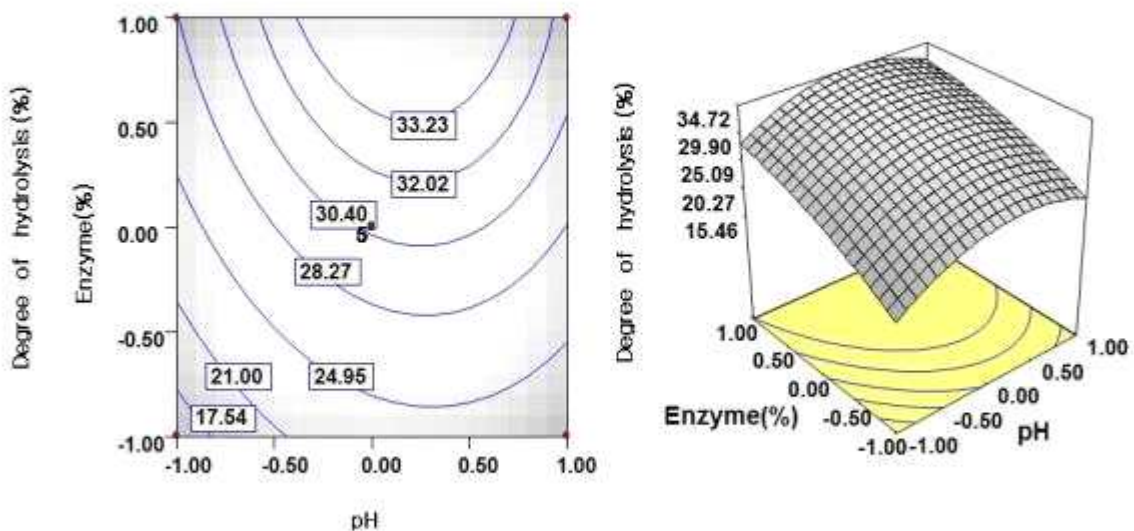


Fig 21. Contour 3D plots of response surface. enzyme concentration of pH on the production of black body fowl(Ogae) legs using commercial protease

(라) 효소와 온도에 따른 최적 생산조건

Fig 22.는 가수분해도에 대한 효소의 양과 온도의 영향에 대한 표면반응이다. 효소의 양에 대한 범위는 1~3%였으나 효소의 양 대비 큰 차이는 보이지 않았다. 온도 40℃에서부터 점차 증가하였으며, 50℃에서 34.58% 로 가수분해도가 높아졌다.

즉, 효소의 양은 2.5%, 온도는 50℃에서 최대점이었으며, 이때 펩타이드의 생산량이 가장 높게 증가함을 알 수 있었다.

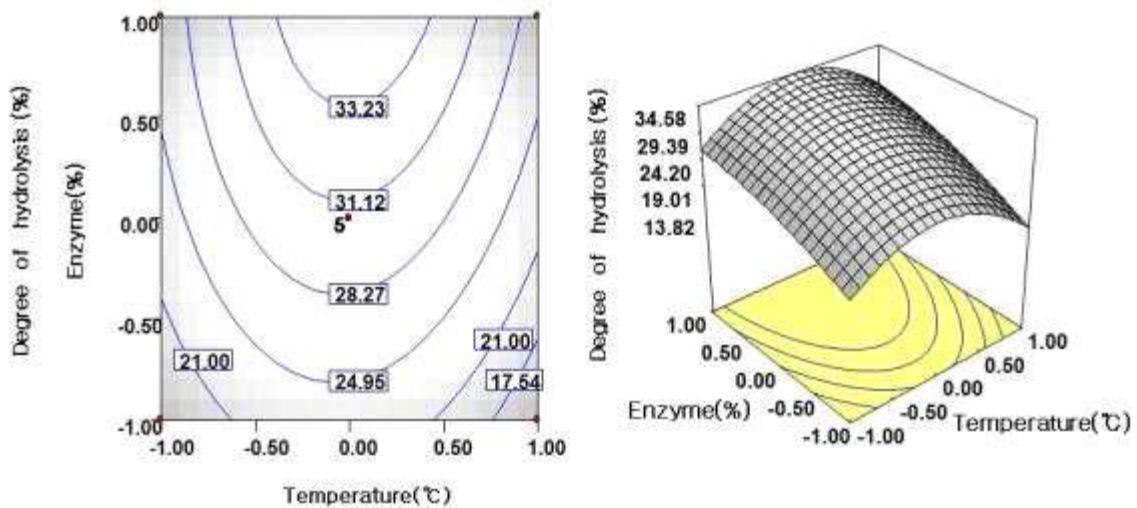


Fig 22. Contour 3D plots of response surface. enzyme concentration of temperature on the production of black body fowl(Ogae) legs using commercial protease

결과를 종합해보면(Fig. 23) 1년 산 오계 다리육의 효소가수분해에 따른 펩타이드 양에 가장 영향을 미치는 것은 효소의 양으로 확인되었으며, pH, 온도의 순으로 나타났다.

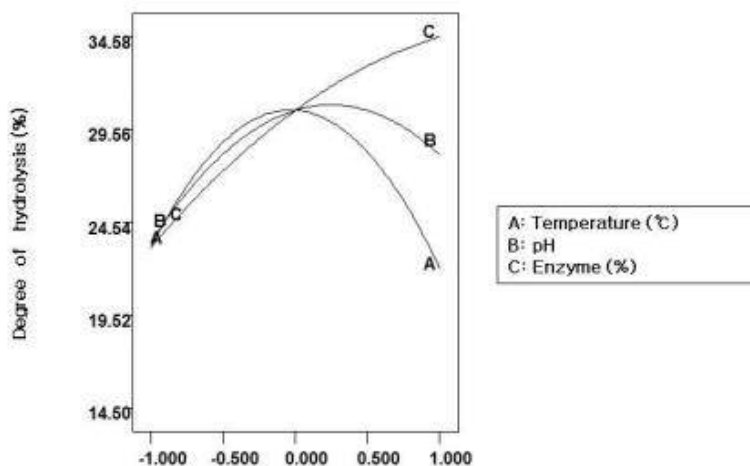


Fig 23. 다리육 효소 가수분해 펩타이드 최적조건

(마) 질량분석(MALDI-ToF)

오계 다리육을 단백질 가수분해 효소를 이용하여 분해한 생성물들의 분자량 분포 특성을 분석하고자 MALDI-TOP를 사용하였다. MALDI-TOF는, PMF(Peptide Mass Fingerprint) 분석법으로 특정 enzyme를 처리하여 잘라진 peptide fragment들의 mass 값을 측정하고 이를 사용하여 database search를 하여 동정한다. 그러므로 PMF방법은 Genomic sequence가 완료된 생물종이나 NCBI에 등재가 된 단백질을 동정하는데 주로 사용한다. 단백질의 모든 아미노산 평균 분자량은 138이지만, 가중 평균은 128이고 축합 중합에 의해 단백질은 각 단위체당 110의 평균 분자량을 갖게 된다. 이를 나타내는 단위는 dalton(달톤)으로 1 kD는 1000g/mol이다. 예를 들면 약 500개의 아미노산을 갖는 단백질의 평균적인 분자량은 55000D, 즉 55kD의 분자량을 갖는다.

본 연구에서 Fig 24은 오계다리육 단백질 가수분해물의 펩타이드들의 분자량 분포에 대한 분석을 시행하였는데 MALDI-TOP의 그래프에서 x 축은 mass(m/z)를 나타내고 Y축은 이온화된 물질의 강도를 나타낸다. 불순물이 어느 정도 포함이 되어있지만 대부분의 펩타이드 들은 m/z 500에서 1,400 이하 분자량 분포를 보여 주었다. 따라서 오계 가슴육 가수분해물 펩타이드 들은 아미노산 염기 4에서 12개 정도의 분포를 보여 주었다. 그리고 대부분의 펩타이드들이 염기서열 10개 이하로 이루어져 있었다. 평균 분자량으로 환산을 한다면 다수를 차지하는 펩타이드의 분자량들은 아미노산 잔기가 5,6,8,10개로 이루어져 있었다.

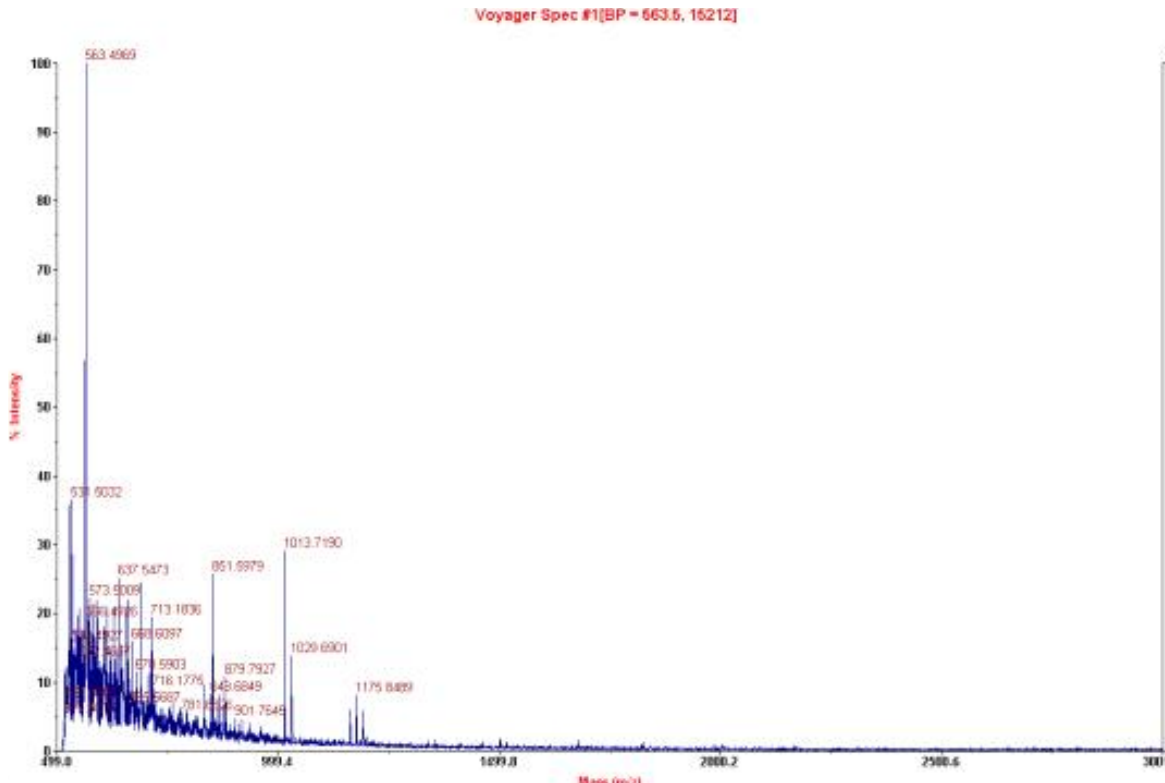


Fig 24. 오계 다리육 단백질 가수분해의 펩타이드 분포도(Maldi-TOF 분석)

(3) 1년산 오계 다리육 고압액화 효소가수분해

(가) 압력에 의한 오계 다리육의 고압액화 펩타이드 생산 최적화

BM1200에 효소를 이용하여 오계다리육으로부터 효소가수분해 하여 최적 조건요인들인 압력, 시간, 기질의 양의 실험변수에 대하여 Box-Benken 디자인으로 실험을 설계하여 얻어진 실험 결과 즉 가수분해도를 Table 18. 에 나타내었다. 실험결과 최적압력 1000bar, 최적 시간은 3시간, 최적 기질의 양은 3% 넣었을 때 회귀식에 대한 분산분석의 결과는 반응표면분석법에 의해 수립된 모델의 적합성 여부를 알려준다.

Table 10. Experimental data 의 디자인 계획(온도, pH, Enzyme조건에 따른 가수분해도)

Sample	Pressure	Time	Substrate	Degree of hydrolysis(%)	Yield(%)	Production speed(g/h-L)
1	-1	-1	0	16.70	21.844	7.281
2	1	-1	0	22.80	29.822	9.941
3	-1	1	0	18.90	24.721	1.648
4	1	1	0	28.90	37.801	2.520
5	-1	0	-1	23.10	15.107	1.679
6	1	0	-1	26.80	17.527	1.947
7	-1	0	1	19.80	38.848	4.316
8	1	0	1	34.10	66.904	7.434
9	0	-1	-1	19.80	12.949	4.316
10	0	1	-1	21.50	14.061	0.937
11	0	-1	1	19.80	38.848	12.949
12	0	1	1	28.90	56.702	3.780
13	0	0	0	33.14	43.347	4.816
14	0	0	0	31.20	40.810	4.534
15	0	0	0	33.67	44.040	4.893
16	0	0	0	33.29	43.543	4.838
17	0	0	0	28.50	37.278	4.142

Table 10. 의 실험결과를 이용한 회귀식에 대한 분산분석의 결과는 반응표면분석법에 의해 수립된 모델의 적합성 여부를 알려준다. Quadratic 회기 모델의 분석 결과가 Table 19에서 보여준다. 결과에 따르면 가수분해도는 압력과 시간과 기질에 영향을 받는다는 것이 95% 수준 이내에서 인정되었다. 모델 결정계수(determination coefficient) R^2 값은 실험값 (observed value) 와 예측값(predicted value)과 상호연관(correlation) 정도를 보여주는데 가수분해도 0.96 이므로 이 모델은 4% 범위에서 설명되지 않는다는 것을 보여준다. 적합결여(lack of fit) 테스트 검정에서는 유의성이 나타나지 않아 본 실험에 사용한 모델이 매우 적절함을 알 수 있다.

Table 11. Analysis of variance(ANOVA) for fitted second-order polynomial model and lack of fit for 1년산 오계 다리육 고압액화

Source	DF	Sum of Squares
		DH ^a
Model	9	549.03
Residual	7	21.31
Lack of Fit	3	2.68
Pure Error	4	18.63
Cor Total	16	570.34

^a 1년산 오계다리육 고압액화

Table 11에서는 모델의 회귀계수를 나타내는 것으로 가수분해도가 3가지 요인 즉 압력, 시간, 기질들에 대하여 크게 영향을 받는 것으로 나타났다. 이들에 대한 회귀식은 Table 12. 에 있다.

Table 12. Polynomial equations calculated by response surface program.

Response	Second oder polynomial equations	R ²
1년산 오계다리육 고압액화 production	$Y = + 31.96 + 4.26X_1 + 2.39X_2 + 1.43X_3 - 3.34X_1^2 - 6.79X_2^2 - 2.67X_3^2 + 0.98X_1X_2 + 2.65X_1X_3 + 1.85X_2X_3$	0.9626

X₁ : Pressure(Bar), X₂ : Time(h) X₃ : Substrate(g)

표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대점으로 판명되어 예측 최대 고압액화 효소가수분해는 압력이 높을수록, 반응시간이 많을수록, 기질양이 많이 사용될수록 영향을 받는 것으로 나타났다. 압력은 높을수록 점차 증가되면서 가수분해가 더욱 잘 된 것을 보여주었다. 시간은 3시간 반응 하였을 때 최고 고압액화 가수분해 정도를 보여주다가 시간이 더 지날수록 가수분해도가 낮아지는 것을 보여준다. 기질의 양은 10%보다 20%의 양일 때 일정하게 계속 증가하는 것을 보여주다가 30%의 양일 때 서서히 가수분해가 줄어드는 것을 볼 수 있다. 최대 고압액화를 이용한 오계다리육의 가수분해는 34.10%이었다. 종합적으로 보면 오계다리육의 고압액화 효소가수분해에 따른 펩타이드 양에 가장 영향을 미치는 것은 압력이고 다음에 기질양 그리고 반응시간 순으로 나타났다.

(나) 압력과 시간에 따른 최적 생산조건

1년산 오계 다리육 고압액화 효소가수분해하여 압력과 시간에 따른 최적 표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대 점으로 판명되어 예측 최대 펩타이드 생산은 압력에서 500Bar 일 때, 시간은 3시간 반응 하였을 때 압력에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 펩타이드의 측정은 1시간부터 4시간 근처까지 가수분해도가 20.52% 까지 증가하다가 이후에는 감소하기 시작하였다(Fig. 25)

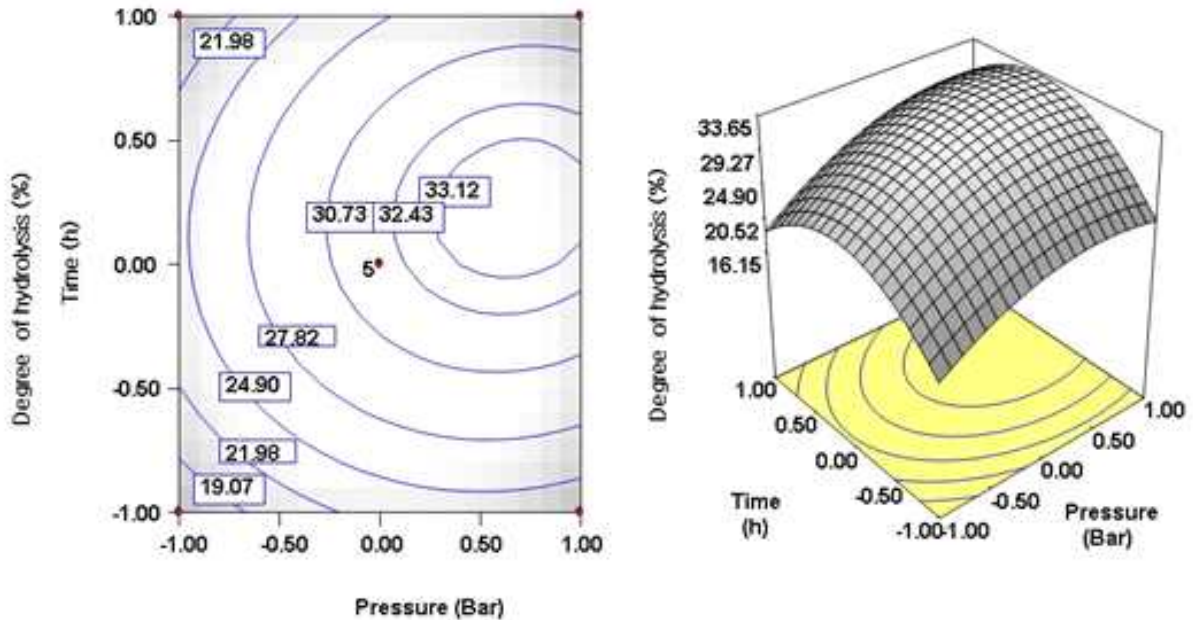


Fig 25. 1년산오계 다리육 고압액화 효소가수분해 압력과 시간 최적 그래프.

(다) 압력과 기질에 따른 최적 생산조건

1년산 오계 다리육 고압액화 효소가수분해하여 압력과 시간에 따른 최적 표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대 점으로 판명되어 예측 최대 펩타이드 생산은 압력에서 800Bar 일 때, 기질은 25%로 반응 하였을 때 압력에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 효소가수분해도의 측정은 오계다리육의 기질 양 20~25% 근처까지 가수분해도가 20.46% 로 최고 점의 가수분해도를 보여주었다(Fig 26).

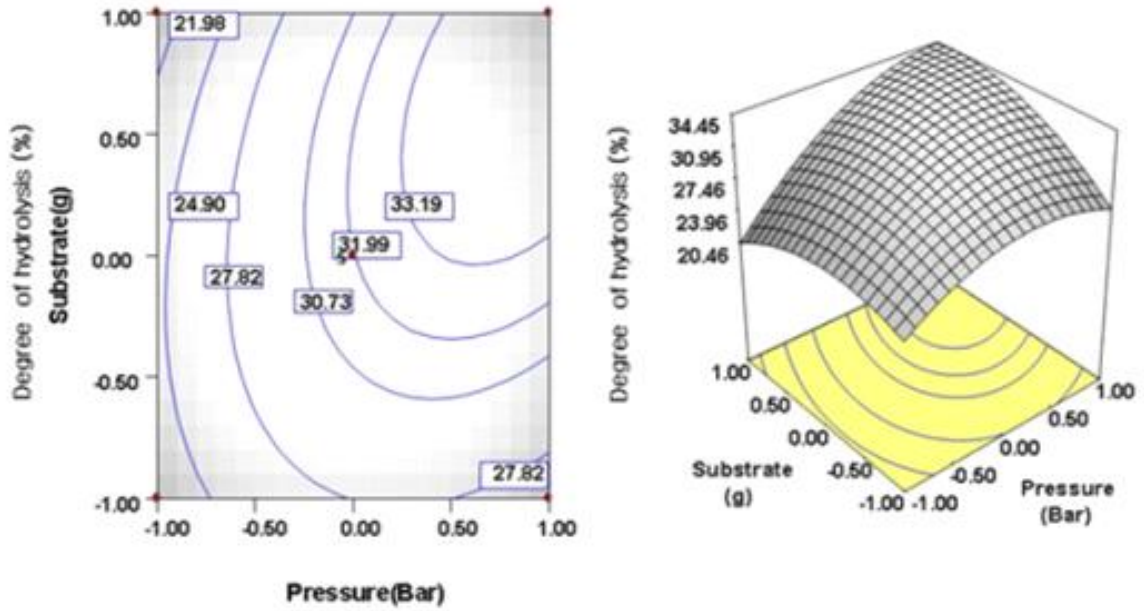


Fig 26. 1년산 오계 다리육 고압액화 효소가수분해 압력과 기질 최적 그래프.

(라) 시간과 기질에 따른 최적 생산조건

1년산 오계 다리육 고압액화 효소가수분해하여 시간과 기질에 따른 최적 표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대 점으로 판명되어 예측 최대 펩타이드 생산은 3시간 ~4시간 반응 하였을 때 기질 20%일 때 에 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 펩타이드의 측정은 2시간 부터 4시간 근처까지 가수분해도가 22.88% 까지 증가하다가 이후에는 감소하기 시작하였다. (Fig 27).

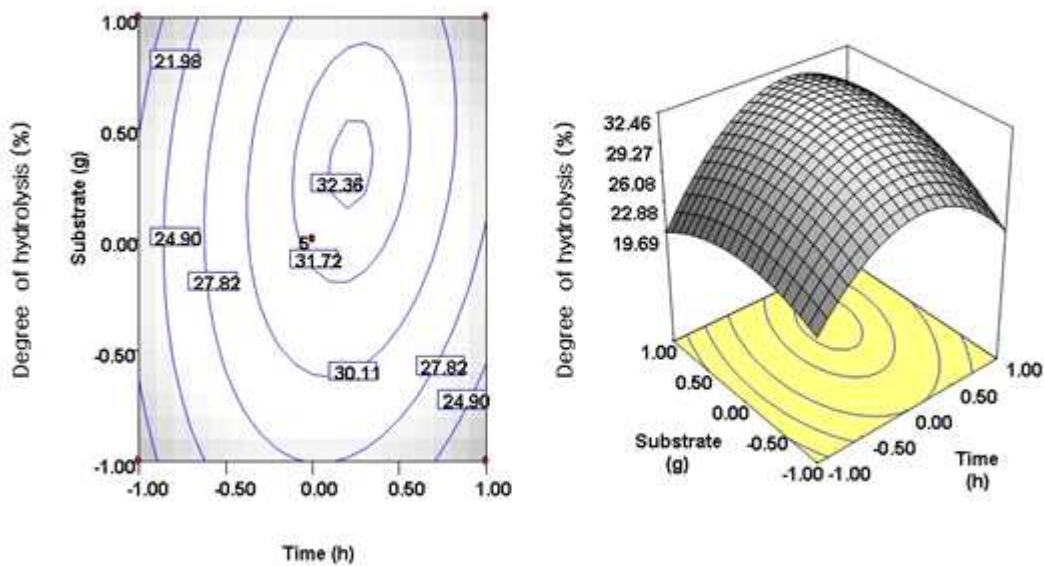


Fig 27. 1년산오계 다리육 고압액화 효소가수분해 시간과 기질 최적 그래프.

(마) 압력, 시간, 기질의 최적조건

1년산 오계다리육 고압액화 효소가수분해결과 최고 효소가수분해는 34.10%로 나타났으며, 종합적으로 고압액화 효소가수분해에 가장 영향을 미치는 것은 Fig 28.에서 압력, 시간, 기질의 순으로 나타났다.

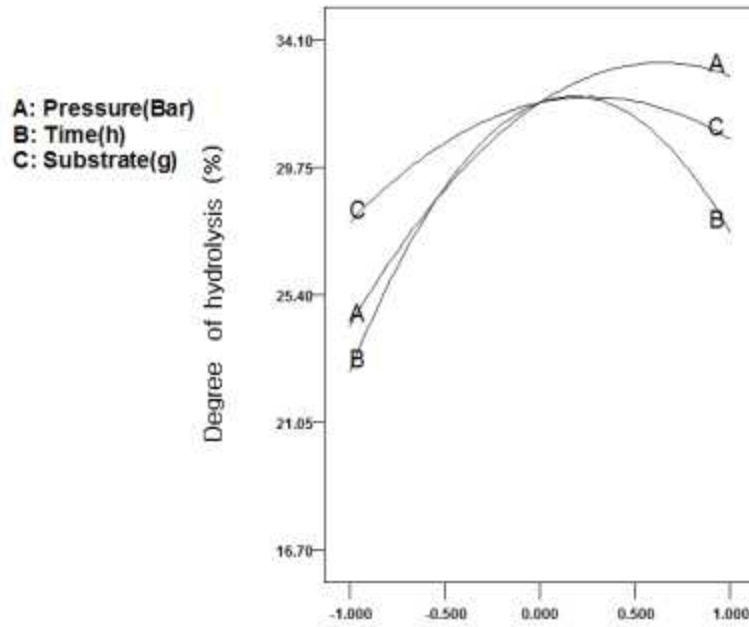


Fig 28. 1년산 오계다리육 고압액화 최적조건 그래프.

(바) 오계 다리육의 고압액화 펩타이드 아미노산 결과

① 구성 아미노산

오계다리육 고압액화 효소가수분해물의 구성아미노산 조성은 Fig. 29 와 같다. 구성아미노산의 함량은 301.6 mg/100g 이다. 그 중 Leucine이 전체 구성아미노산의 17.4%(52.542 mg/100g)으로 가장 많은 함량을 차지하고 있었다. 다음으로 Lysine (10.4%), Alanine (9.6%), Glutamic acid (7.3%), Methionine (6.1%), phenylalanine (6.0%) 등의 순서였다.

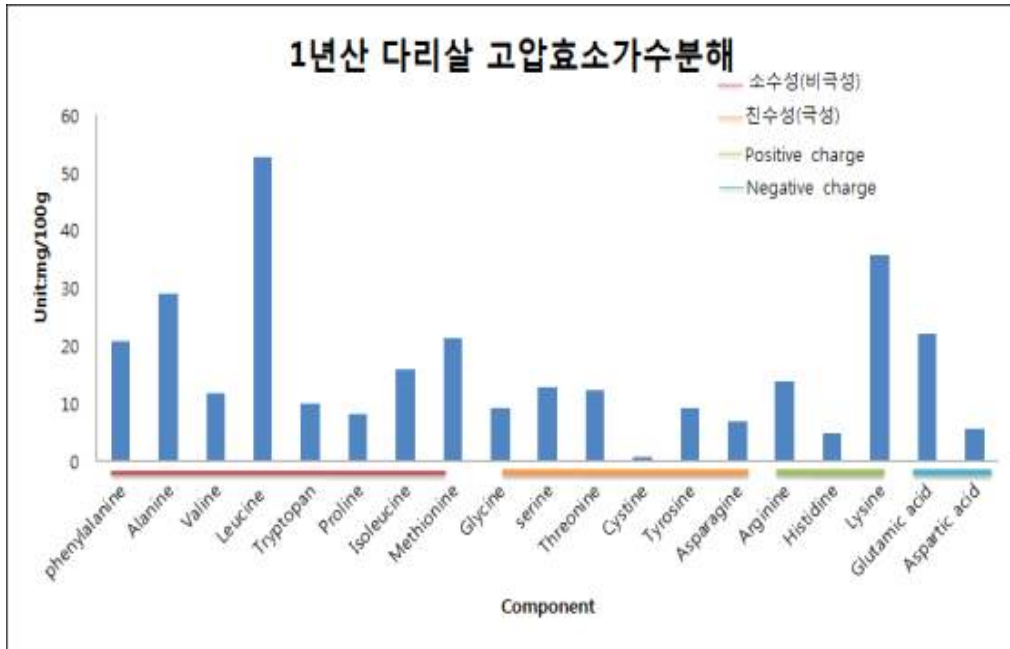


Fig 29. 1년산 오계다리육 고압액화 19개 아미노산 분석.

② 유리 아미노산

오계다리육을 분리하여 고압액화 효소가수분해 처리한 가수분해물의 유리 아미노산 함량은 다음과 같다(Fig 30). 오계다리육 고압액화 효소가수분해물에서는 32 종류의 유리아미노산이 검출되었으며, 구성아미노산을 제외한 아미노산에서는 Taurine(4.9%), Ornithine(1.8%), Anserine(1.6%), Hydroxylysine(1.4%) 등의 순으로 존재하였다. 유리 아미노산의 전체적 분포도는 Fig. 31에서 확인 가능하다.

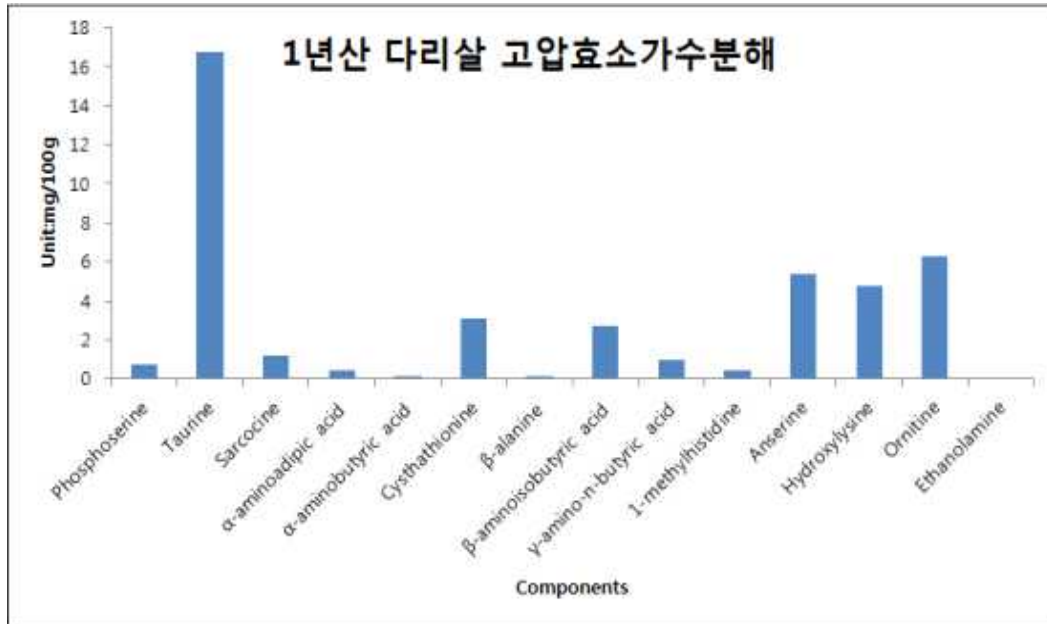


Fig 30. 1년산 오계다리육 고압액화 유리아미노산 분석(구성아미노산 제외).

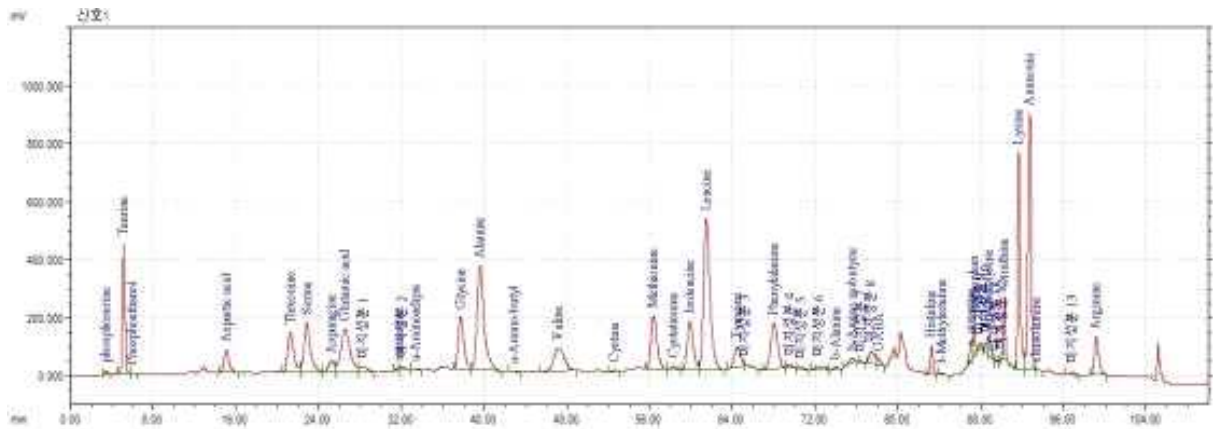


Fig 31. 1년산 오계다리육 고압액화 유리아미노산 분석 그래프.

(사) 오계 다리육의 고압액화 펩타이드 분자량 결과

오계 다리육을 단백질 가수분해 효소를 이용하여 고압액화분해한 생성물들의 분자량 분포 특성을 분석하고자 MALDI-TOP를 사용하였다. MALDI-TOF는 PMF(Peptide Mass Fingerprint) 분석법으로 특정 enzyme를 처리하여 잘라진 peptide fragment들의 mass 값을 측정하고 이를 사용하여 database search를 하여 동정한다. 그러므로 PMF방법은 Genomic sequence가 완료된 생물종이나 NCBI에 등재가 된 단백질을 동정하는데 주로 사용한다. 단백질의 모든 아미노산 평균 분자량은 138이지만, 가중 평균은 128이고 축합 중합에 의해 단백질은 각 단위체당 110의 평균 분자량을 갖게 된다. 이를 나타내는 단위는 dalton(달톤)으로 1 kD는 1000g/mol이다. 예를 들면 약 500개의 아미노산을 갖는 단백질의 평균적인 분자량은 55000D, 즉 55kD의 분자량을 갖는다.

본 연구에서 Fig 32은 오계 다리육 고압액화 단백질 가수분해물의 펩타이드들의 분자량 분포에 대한 분석을 시행하였는데 MALDI-TOF의 그래프에서 x 축은 mass(m/z)를 나타내고 Y축은 이온화 된 물질의 강도를 나타낸다. 불순물이 어느 정도 포함이 되어있지만 대부분의 펩타이드들은 m/z 500에서 1,400 이하 분자량 분포를 보여 주었다. 따라서 오계 다리육 가수분해물 펩타이드들은 아미노산 염기 4에서 12개 정도의 분포를 보여 주었다. 그리고 대부분의 펩타이드들이 염기서열 10개 이하로 이루어져 있었다. 평균 분자량으로 환산을 한다면 다수를 차지하는 펩타이드의 분자량들은 아미노산 잔기가 5,6,8,10개로 이루어져 있었다.

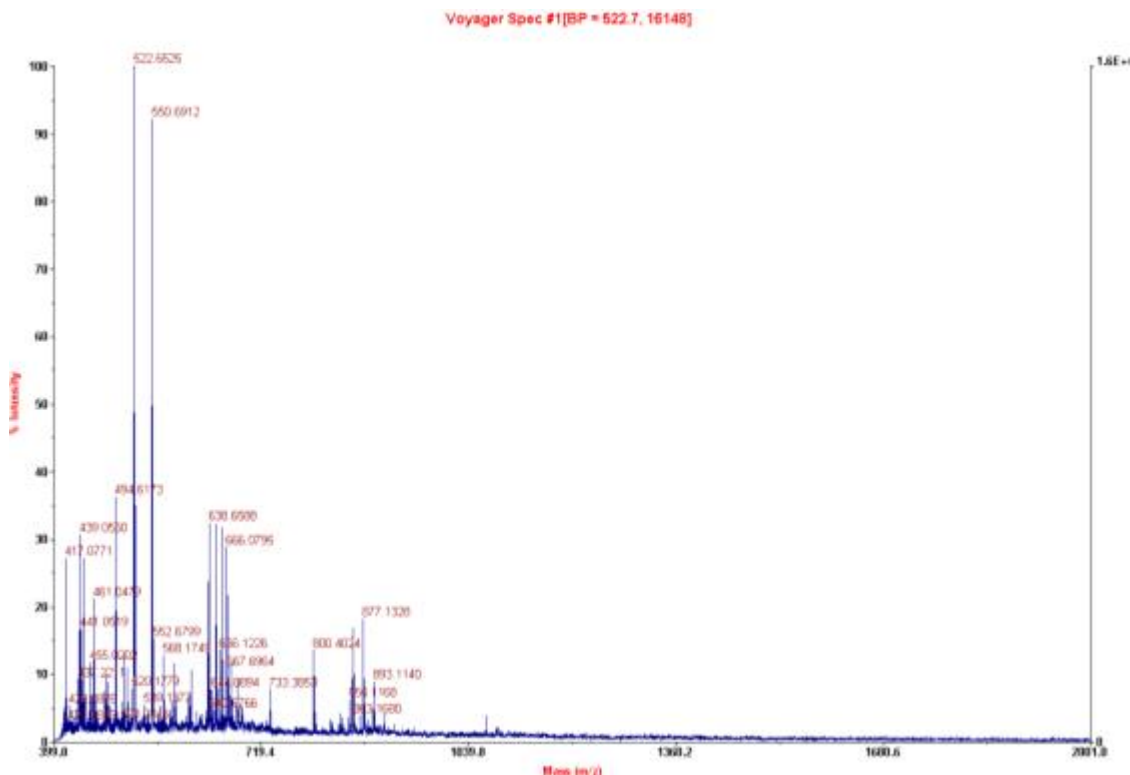


Fig 32. 1년산 오계다리육 고압액화 효소반응 Maldi-TOF분자량 분석 그래프.

(4) 오계 날개육 효소가수분해 펩타이드 제조

(가) BM1200에 의한 오계 날개육의 펩타이드생산 최적화

BM1200에 효소를 이용하여 오계날개육으로부터 효소가수분해 하여 최적 조건요인들인 온도, pH, 효소량의 3개의 실험변수에 대하여 Box-Benken 디자인으로 실험을 설계하여 얻어진 실험 결과를 Table 13에 나타내었다.

Table 13. Experimental data의 디자인 계획. 온도, pH, Enzyme조건에 따른 가수분해도

Sample	Temp.	pH	Enzyme	Degree of hydrolysis(%)	Yield(%)	Production speed(g/h-L)
1	-1	-1	0	49.313	53.987	2.699
2	1	-1	0	61.383	67.322	3.366
3	-1	1	0	44.273	48.606	2.430
4	1	1	0	55.758	60.995	3.050
5	-1	0	-1	25.172	27.487	1.374
6	1	0	-1	37.770	41.251	2.063
7	-1	0	1	36.012	39.363	1.968
8	1	0	1	68.180	74.881	3.744
9	0	-1	-1	25.348	27.679	1.384
10	0	1	-1	20.484	22.355	1.118
11	0	-1	1	48.727	53.197	2.660
12	0	1	1	34.547	37.792	1.890
13	0	0	0	31.090	33.956	1.698
14	0	0	0	30.152	33.425	1.671
15	0	0	0	41.930	45.941	2.297
16	0	0	0	35.121	38.282	1.914
17	0	0	0	34.985	38.134	1.907

Table 14의 실험결과를 이용한 효소가수분해 실험결과 최적 조건은 50°C, pH6, 효소의 양은 3% 넣었을 때 회귀식에 대한 분산분석의 결과는 반응표면분석법에 의해 수립된 모델의 적합성 여부를 알려준다.

Table 14. Analysis of variance(ANOVA) for fitted second-order polynomial model and lack of fit for 1년산 오계 날개육

Source	DF	Sum of Squares
		DH ^a
Model	9	2622.79
Residual	7	153.06
Lack of Fit	3	66.83
Pure Error	4	86.23
Cor Total	16	2775.85

^a 1년산 오계날개육

표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대점으로 판명되어 예측 최대 효소가수분해는 Table 15에서 온도가 높을수록, pH가 낮을수록, 효소양이 많이 사용될수록 영향을 받는 것으로 나타났다. 온도는 높을수록 점차 증가하지만 50℃ 이상 높아지면서 가수분해가 더욱 잘 된 것을 보여주었다. pH가 6부근에서 최고 가수분해정도를 보여주다가 pH가 낮아질수록 가수분해도가 낮아지는 것을 보여준다.

Table 15. Estimated coefficient for the fitted second order polynomial representing the relationship between the response and process variables.

Factor	Coefficient DH
Intercept	34.66
Linear	
Temperature	8.54
pH	-3.71
Enzyme	9.84
quadratic	
Temperature	13.77
pH	4.26
Enzyme	-6.64
Interactions	
pH×Temperature	-0.15
pH×Enzyme	4.89
Enzyme×Temperature	-2.33

모델 결정계수(determination coefficient) R^2 값은 실험값(observed value)과 예측값(predicted value) 그리고 상호연관(correlation) 정도를 보여주는데 가수분해도 0.94 이다. 적합결여(lack of fit) 테스트 검정에서는 유의성이 나타나지 않아 본 실험에 사용한 모델이 매우 적절함을 알 수 있다.

가수분해 3가지 요인들에 대한 회귀식은 Table 16에 있다. 효소의 양은 1%보다 더 많은 3%의 양일 때 일정하게 계속 증가하는 것을 보여준다. 따라서 최대 오게날개육의 펩타이드 양은 20.15 mg/g이고, 가수분해는 61.383%이었다.

따라서 종합적으로 보면 오게날개육의 효소가수분해에 따른 펩타이드 양에 가장 영향을 미치는 것은 효소양이고 다음에 온도 그리고 pH의 순으로 나타났다.

Table 16. Polynomial equations calculated by response surface program.

Response	Second order polynomial equations	R^2
1년산 오계날개육 production	$Y=34.66+ 8.54X_1-3.71X_2+ 9.84X_3$ $+ 13.77X_1^2+ 4.26X_2^2-6.64X_3^2-0.15X_1X_2$ $+ 4.89X_1X_3-2.33X_2X_3$	0.94

X_1 : Temperature(°C), X_2 : pH, X_3 : Enzyme(%)

(나) 온도와 pH에 따른 최적 생산조건

1년산 오계 날개육을 이용하여 효소가수분해를 온도와 pH에 따른 최적 표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대 점으로 판명되어 예측 최대 펩타이드 생산은 온도에서 60°C 일 때, pH은 pH7.5로 반응 하였을 때 온도에서 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해도는 pH 6-8까지 가수분해도가 32.25~48.81% 까지 증가하다가 이후에는 감소하였다. 반면 온도에 의한 영향을 보면 40°C에서부터 60°C범위에서는 60°C부근에서 가수분해도의 65.08% 최고 점을 보이는 것을 볼 수 있었다. Fig 33. 에서 보듯이 온도를 이용하여 단백질 가수분해도를 보면 온도와 pH 사이의 영향은 pH7.5일때와 온도47°C 정도에서 가수분해도가 최적임을 보여 준다. 이때 가수분해도 33.25% 이었다. 종합적으로 보면 효소가수분해를 이용한 최적 조건으로 가장 영향을 미치는 것은 온도 그리고 pH의 순으로 나타났다.

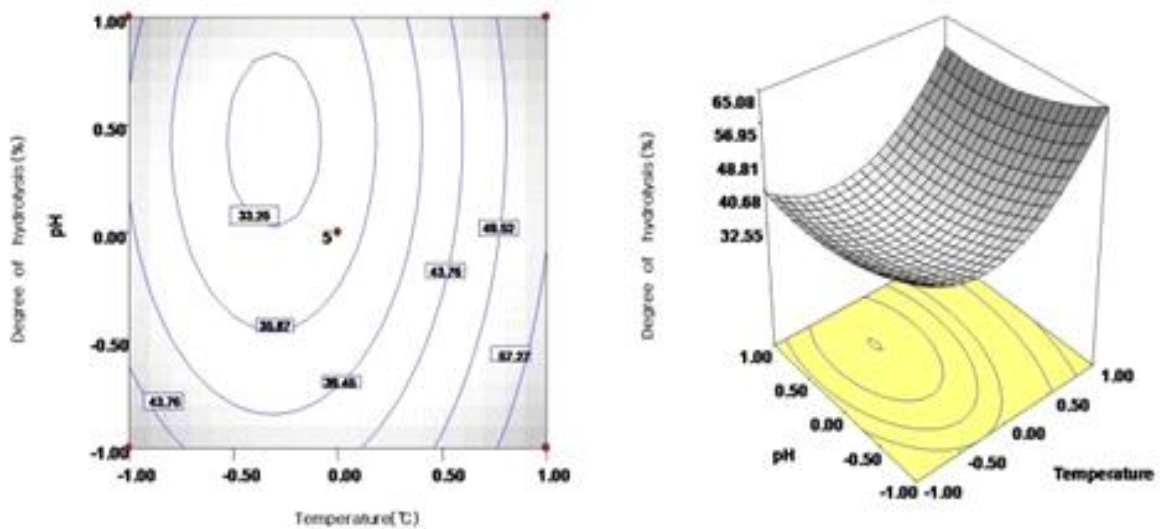


Fig 33. 1년산 오계날개육 온도와 pH그래프

(다) 온도와 효소 양에 따른 최적 생산조건

1년산 오계 날개육을 이용하여 효소가수분해를 온도와 효소 양에 따른 최적 표면 반응의 분석 결과 정상점(stationary point)이 최대 점으로 판명되어 예측 최대 펩타이드 생산은 온도에서 50℃ 일 때, 효소 양은 반응용매의 3%로 반응 하였을 때 효소 양에서 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해도%는 효소 양 1-3%까지 가수분해도가 17.95~41.50% 까지 계속 증가하였다. 반면 온도에 의한 영향을 보면 40℃에서부터 60℃범위에서는 60℃부근에서 가수분해도의 65.05% 최고점을 보이는 것을 볼 수 있었다. Fig 34에서 보듯이 온도와 효소 양을 이용한 단백질 가수분해도를 보면 온도와 효소 양의 영향은 효소 양 3%일 때와 온도47℃ 정도에서 가수분해도가 최적임을 보여준다. 이때 가수분해도 36.66% 이었다. 종합적으로 보면 효소가수분해를 이용한 최적 조건으로 가장 영향을 미치는 것은 온도 그리고 효소 양의 순으로 나타났다.

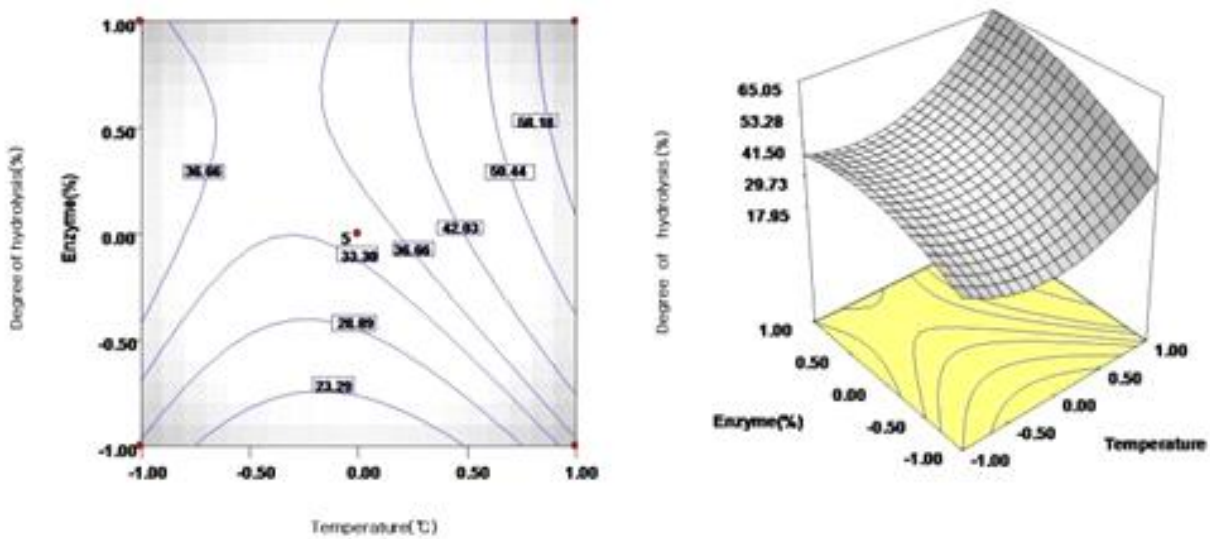


Fig 34. 1년산 오계 날개육 온도와 효소 양 그래프

(라) pH와 효소 양에 따른 최적 생산조건

1년산 오계 날개육을 이용하여 효소가수분해를 pH와 효소 양에 따른 최적 표면 반응의 분석 결과 정상점(stationary point)이 최대 점으로 판명되어 예측 최대 펩타이드 생산은 pH8일 때, 효소 양은 반응용매의 3%로 반응 하였을 때 효소 양에서 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해도%는 효소 양 1-3%까지 가수분해도가 18.07~48.20% 까지 계속 증가하였다. 반면 pH에 의한 영향을 보면 pH6에서부터 pH8범위에서는 pH7.5부근에서 가수분해도의 25.61% 최고점을 보이는 것을 볼 수 있었다. Fig 32. 에서 보듯이 pH와 효소 양을 이용한 단백질 가수분해도를 보면 pH와 효소 양의 영향은 효소 양 3%일 때와 pH7.5 정도에서 가수분해도가 최적임을 보여준다. 이때 가수분해도 35.26% 이었다. 종합적으로 보면 효소가수분해를 이용한 최적 조건으로 가장 영향을 미치는 것은 효소 양 그리고 pH의 순으로 나타났다.

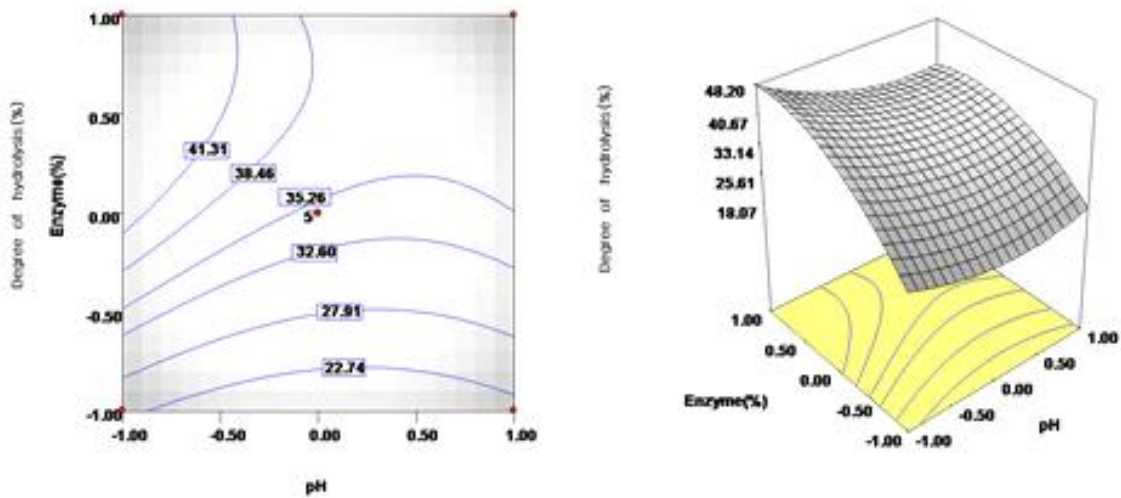


Fig 35. 1년산 오계 날개육 pH와 효소양 그래프

(마) 온도, 시간, 효소양때 따른 최적조건

1년산 오계 날개육 효소가수분해결과 최고 효소가수분해는 61.383%로 종합적으로 효소가수분해에 가장 영향을 미치는 것은 Fig 36에서 온도, 효소 양, pH의 순으로 나타났다.

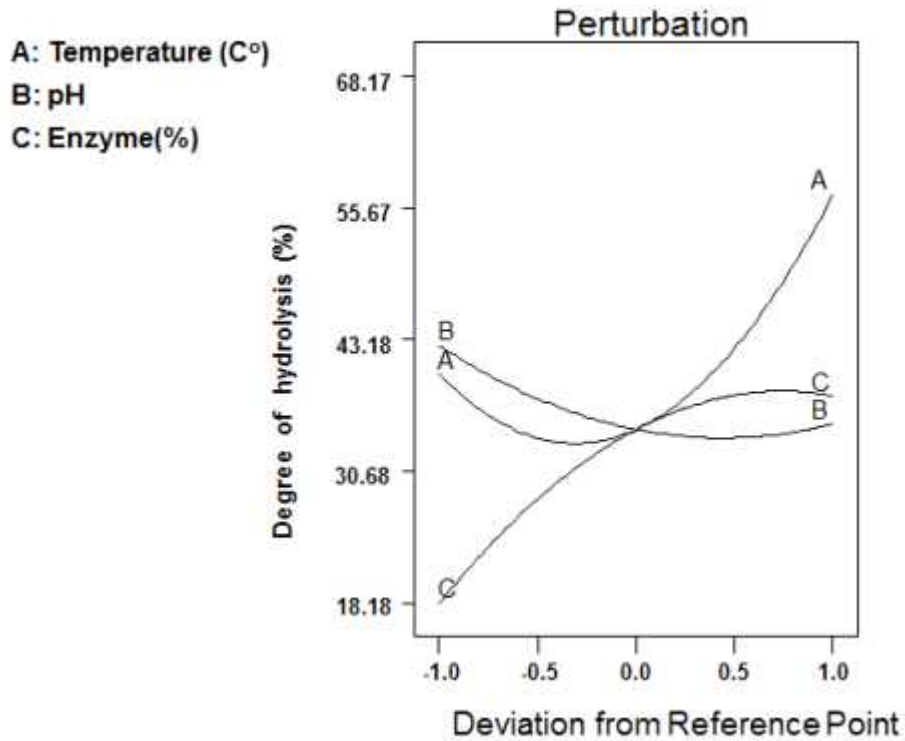


Fig 36. 1년산 오계 날개육 고압액화 최적조건 그래프.

(바) 오계 날개육의 펩타이드 분자량 분포 결과

오계 날개육을 단백질 가수분해 효소를 이용하여 분해한 생성물들의 분자량 분포 특성을 분석하고자 MALDI-TOF를 사용하였다. MALDI-TOF는, PMF(Peptide Mass Fingerprint) 분석법으로 특정 enzyme를 처리하여 잘라진 peptide fragment들의 mass 값을 측정하고 이를 사용하여 database search를 하여 동정한다. 그러므로 PMF방법은 Genomic sequence가 완료된 생물종이나 NCBI에 등재가 된 단백질을 동정하는데 주로 사용한다. 단백질의 모든 아미노산 평균 분자량은 138이지만, 가중 평균은 128이고 축합 중합에 의해 단백질은 각 단위체당 110의 평균 분자량을 갖게 된다. 이를 나타내는 단위는 dalton(달톤)으로 1 kD는 1000g/mol이다. 예를 들면 약 500개의 아미노산을 갖는 단백질의 평균적인 분자량은 55000D, 즉 55kD의 분자량을 갖는다.

본 연구에서 Fig 37은 오계 날개육 단백질 가수분해물의 펩타이드들의 분자량 분포에 대한 분석을 시행하였는데 MALDI-TOF의 그래프에서 x 축은 mass(m/z)를 나타내고 Y축은 이온화 된 물질의 강도를 나타낸다. 불순물이 어느 정도 포함이 되어있지만 대부분의 펩타이드 들은 m/z 500에서 1,400 이하 분자량 분포를 보여 주었다. 따라서 오계 날개육 가수분해물 펩타이드들은 아미노산 염기 4에서 12개 정도의 분포를 보여 주었다. 그리고 대부분의 펩타이드들이 염기서열 10개 이하로 이루어져 있었다. 평균 분자량으로 환산을 한다면 다수를 차지하는 펩타이드의 분자량들은 아미노산 잔기가 5,6,8,10개로 이루어져 있었다.

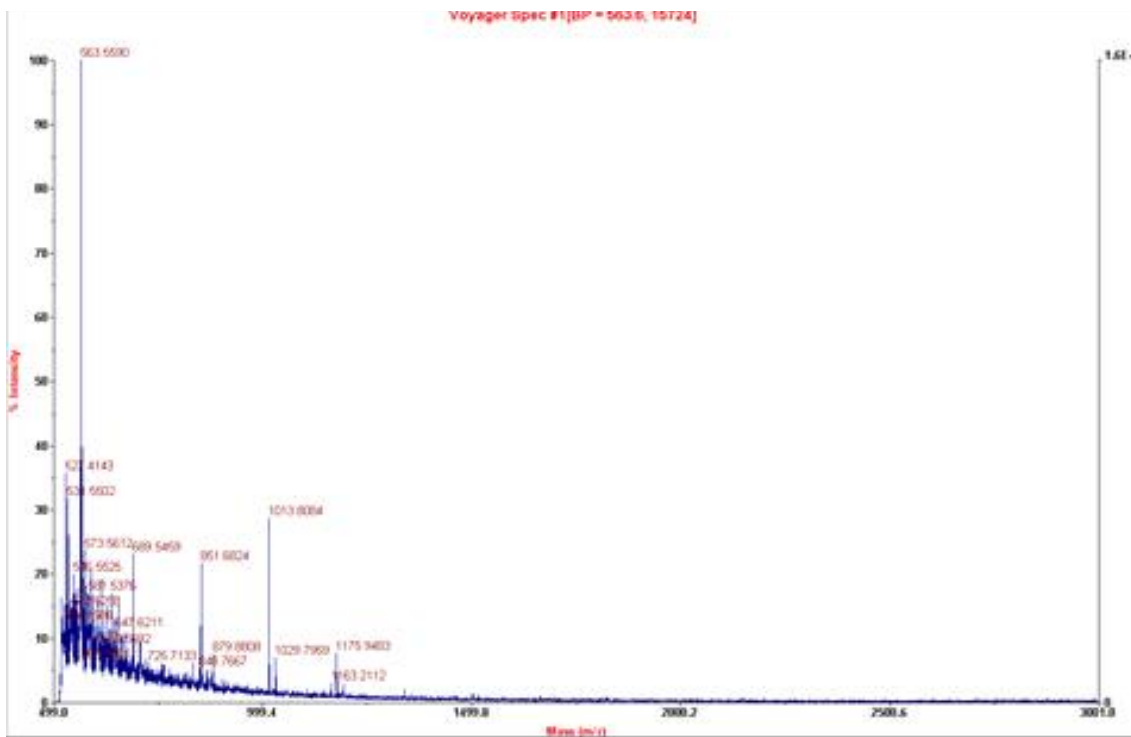


Fig 37. 1년산 오계 날개육 Maldi-TOF 분석.

(5) 오계란 흰자 효소가수분해 펩타이드 제조

(가) BM1200에 의한 오계 흰자의 펩타이드생산 최적화

Table 17은 BM1200에 효소를 이용하여 오계흰자로부터 효소가수분해하여 최적 조건요인들인 온도, pH, 효소양의 3개의 실험변수에 대하여 Box-Benken 디자인으로 실험을 설계하여 얻어진 실험결과를 나타내었다.

Table 17. Experimental data의 디자인 계획(온도, pH, Enzyme 조건에 따른 가수분해도)

Sample	Temp.	pH	Enzyme	Degree of hydrolysis(%)	Yield(%)	Production speed(g/h-L)
1	-1	-1	0	14.17	15.489	1.549
2	1	-1	0	27.08	29.594	2.959
3	-1	1	0	16.51	0.072	0.007
4	1	1	0	19.19	20.992	2.099
5	-1	0	-1	15.16	16.607	1.661
6	1	0	-1	14.18	15.487	1.549
7	-1	0	1	30.19	33.039	3.304
8	1	0	1	33.51	36.628	3.663
9	0	-1	-1	21.08	23.023	2.302
10	0	1	-1	13.71	14.965	1.496
11	0	-1	1	36.85	40.263	4.026
12	0	1	1	29.93	32.682	3.268
13	0	0	0	33.16	36.173	3.617
14	0	0	0	36.21	39.516	3.952
15	0	0	0	33.37	36.388	3.639
16	0	0	0	34.2	37.278	3.728
17	0	0	0	33.5	36.515	3.652

Table 18의 효소가수분해 실험결과 최적 온도는 50℃, 최적 pH는 pH6, 효소의 양은 3% 넣었을 때 회귀식에 대한 분산분석의 결과는 반응표면분석법에 의해 수립된 모델의 적합성 여부를 알려준다. 표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대점으로 판명되어 예측 최대 효소가수분해는 온도가 높을수록, pH가 낮을수록, 효소양이 많이 사용될수록 영향을 받는 것으로 나타났다. 온도는 높을수록 점차 증가하지만 50℃ 이상 높아지면서 가수분해가 더욱 잘 된 것을 보여주었다. pH가 6부근에서 최고 가수분해정도를 보여주다가 pH가 낮아질수록 가수분해도가 낮아지는 것을 보여준다. 효소의 양은 1%보다 더 많은 3%의 양일 때 일정하게 계속 증가하는 것을 보여준다.

Table 18. Analysis of variance(ANOVA) for fitted second-order polynomial model and lack of fit for Ogey egg whites 1 Year Old.

Source	DF	Sum of Squares
		DH ^a
Model	9	1211.97
Residual	7	38.51
Lack of Fit	3	32.25
Pure Error	4	6.26
Cor Total	16	1250.48

^a Ogey egg whites 1 Year Old.

최대 오계흰자의 펩타이드 양은 15.90 mg/g이고, 가수분해는 36.85%이었다. 종합적으로 보면 오계흰자의 효소가수분해에 따른 펩타이드 양에 가장 영향을 미치는 것은 효소양이고 다음에 온도 그리고 pH의 순으로 나타났다.

Table 19. Estimated coefficient for the fitted second order polynomial representing the relationship between the response and process variables.

Factor	Coefficient DH
Intercept	34.09
Linear	
Temperature	2.24
pH	-2.48
Enzyme	8.29
quadratic	
Temperature	-8.49
pH	-6.36
Enzyme	-2.34
Interactions	
pH×Temperature	-2.55
pH×Enzyme	1.07
Enzyme×Temperature	0.11

Table 20. Polynomial equations calculated by response surface program.

Response	Second order polynomial equations	R^2
오계란 흰자 production	$Y = +34.09 + 2.24X_1 - 2.48X_2 + 8.29X_3 - 8.49X_1^2 - 6.36X_2^2 - 2.34X_3^2 - 2.55X_1X_2 + 1.07X_1X_3 + 0.11X_2X_3$	0.9692

X_1 : Temperature(°C), X_2 : pH, X_3 : Enzyme(%)

(나) 온도와 pH에 따른 최적 생산조건

1년산 오계 흰자란을 이용하여 효소가수분해를 온도와 pH에 따른 최적 표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대 점으로 판명되어 예측 최대 펩타이드 생산은 온도에서 60°C 일 때, pH7.5로 반응 하였을 때 온도에서 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해도는 pH 6-8까지 가수분해도가 32.25~48.81% 까지 증가하다가 이후에는 감소하였다. 반면 온도에 의한 영향을 보면 40°C에서부터 60°C범위에서는 60°C부근에서 가수분해도의 65.08% 최고점을 보이는 것을 볼 수 있었다. Fig. 38에서 보듯이 온도를 이용하여 단백질 가수분해도를 보면 온도와 pH 사이의 영향은 pH7.5일 때와 온도47°C 정도에서 가수분해도가 최적임을 보여 준다. 이때 가수분해도 33.25% 이었다. 종합적으로 보면 효소가수분해를 이용한 최적 조건으로 가장 영향을 미치는 것은 온도 그리고 pH의 순으로 나타났다.

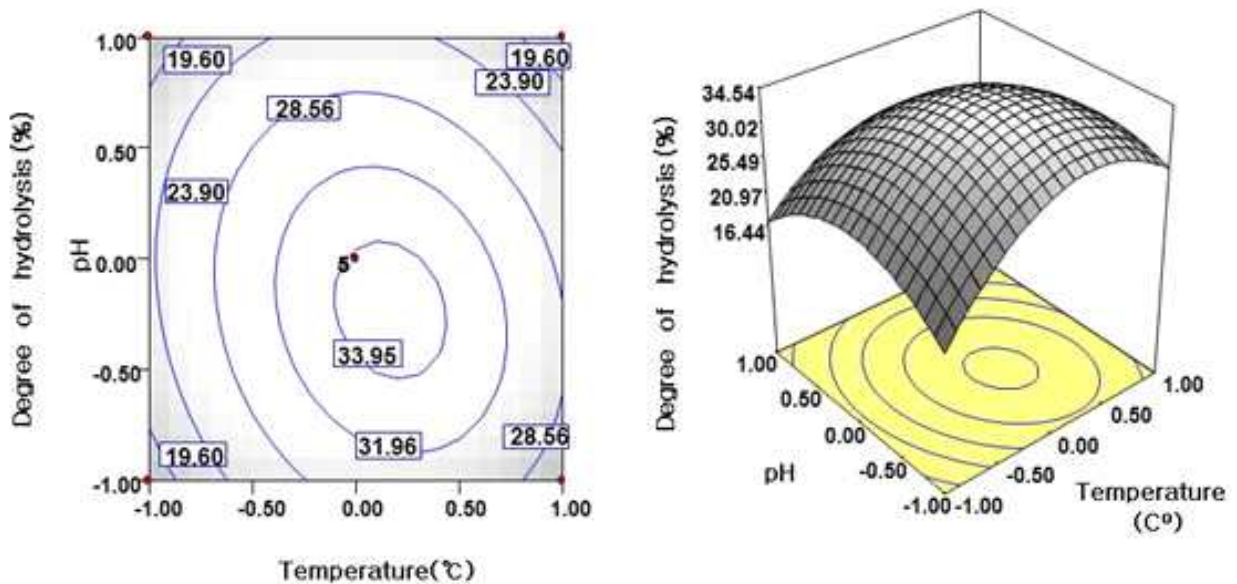


Fig 38. 1년산 오계 흰자 온도와 pH그래프

(다) 온도와 효소 양에 따른 최적 생산조건

1년산 오계 흰자란을 이용하여 효소가수분해를 온도와 효소 양에 따른 최적 표면 반응의 분석 결과 정상점(stationary point)이 최대 점으로 판명되어 예측 최대 펩타이드 생산은 온도에서 50℃ 일 때, 효소 양은 반응용매의 3%로 반응 하였을 때 효소 양에서 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해도%는 효소 양 1-3%까지 가수분해도가 17.95~41.50% 까지 계속 증가하였다. 반면 온도에 의한 영향을 보면 40℃에서부터 60℃범위에서는 60℃부근에서 가수분해도의 65.05% 최고점을 보이는 것을 볼 수 있었다. Fig 39에서 보듯이 온도와 효소 양을 이용한 단백질 가수분해도를 보면 온도와 효소 양의 영향은 효소 양 3%일 때와 온도 47℃ 정도에서 가수분해도가 최적임을 보여준다. 이때 가수분해도 36.66% 이었다. 종합적으로 보면 효소가수분해를 이용한 최적 조건으로 가장 영향을 미치는 것은 온도 그리고 효소 양의 순으로 나타났다.

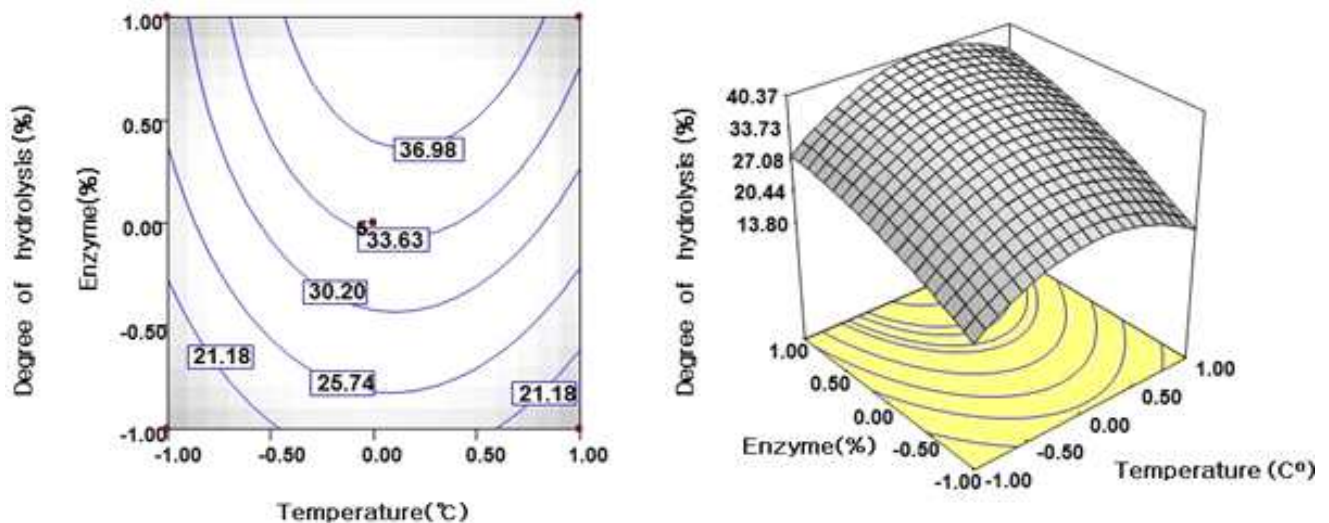


Fig 39. 1년산 오계 흰자 온도와 효소 양 그래프

(라) pH와 효소양에 따른 최적 생산조건

1년산 오계 흰자를 이용하여 효소가수분해를 pH와 효소 양에 따른 최적 표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대 점으로 판명되어 예측 최대 펩타이드 생산은 pH8일 때, 효소 양은 반응용매의 3%로 반응 하였을 때 효소 양에서 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해도%는 효소 양 1-3%까지 가수분해도가 18.07~48.20% 까지 계속 증가하였다. 반면 pH에 의한 영향을 보면 pH6에서부터 pH8범위에서는 pH7.5부근에서 가수분해도의 25.61% 최고점을 보이는 것을 볼 수 있었다. Fig 38 에서 보듯이 pH와 효소양을 이용한 단백질 가수분해도를 보면 pH와 효소 양의 영향은 효소 양 3%일 때와 pH7.5 정도에서 가수분해도가 최적임을 보여준다. 이때 가수분해도 35.26% 이었다. 종합적으로 보면 효소가수분해를 이용한 최적 조건으로 가장 영향을 미치는 것은 효소 양 그리고 pH의 순으로 나타났다.

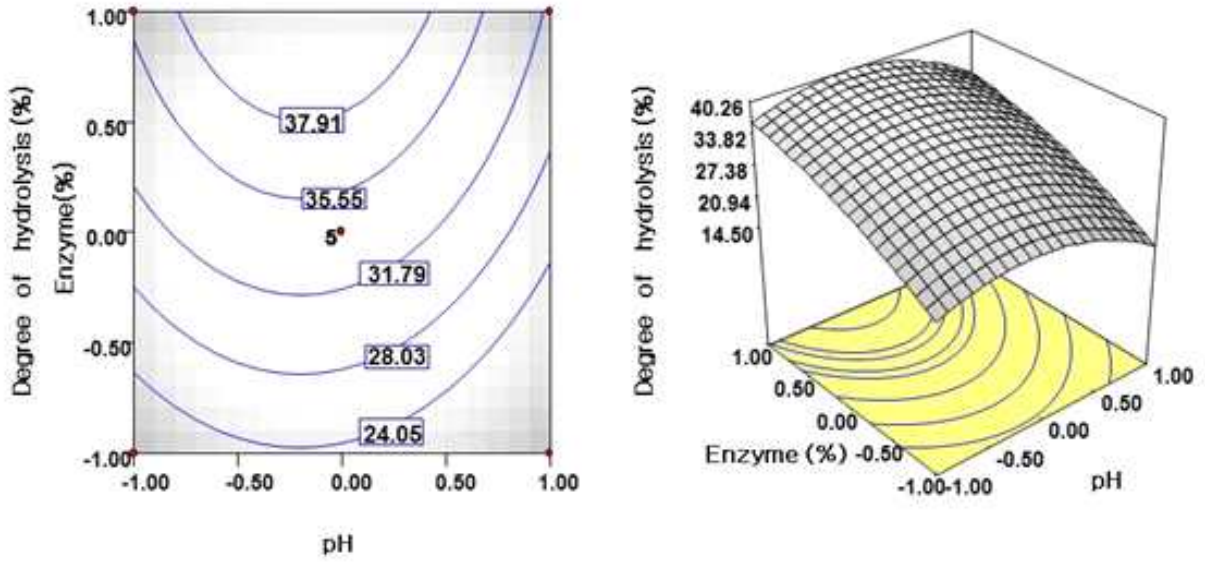


Fig 40. 1년산 오게 흰자 pH와 효소 양 그래프

(마) 온도, 시간, 효소 양에 따른 최적조건

오게 흰자란 효소가수분해결과 최고 효소가수분해는 33.95%로 종합적으로 효소가수분해에 가장 영향을 미치는 것은 Fig 41에서 효소 양, 온도, pH의 순으로 나타났다.

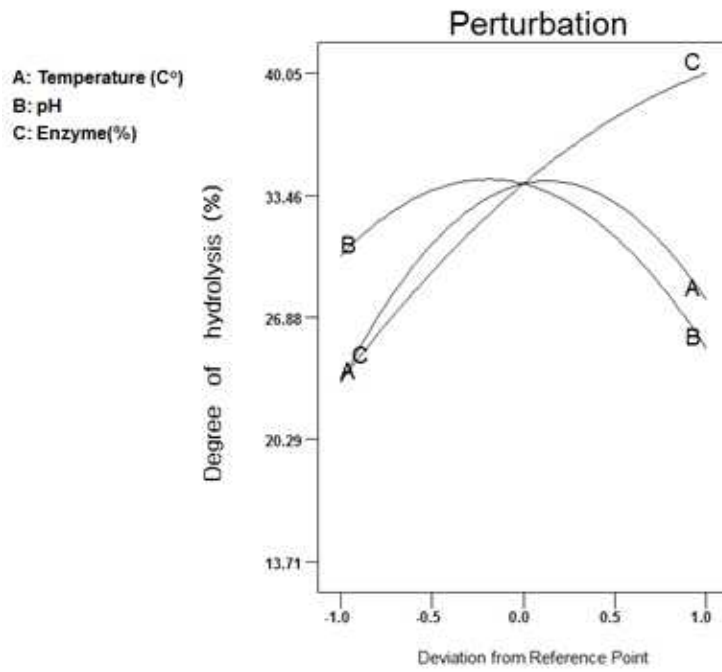


Fig 41. 오게 흰자란 가수분해도 온도, 시간, 효소양에 따른 그래프.

(바) 오계란 흰자의 고압액화 펩타이드 아미노산 결과

① 구성 아미노산

오계 흰자란 효소가수분해물의 구성아미노산 조성은 Fig. 42과 같다. 구성아미노산의 총 함량은 45.2mg/100g 이다. 그 중 Arginine이 전체 구성아미노산의 12.9%(5.828 mg/100g)으로 가장 많은 함량을 차지하고 있었다. 다음으로 Leucine(12.2%), Lysine(10.7%), Methionine(10.2%), Alanine(9.7%), serine(8.8%) 등의 순서였다.

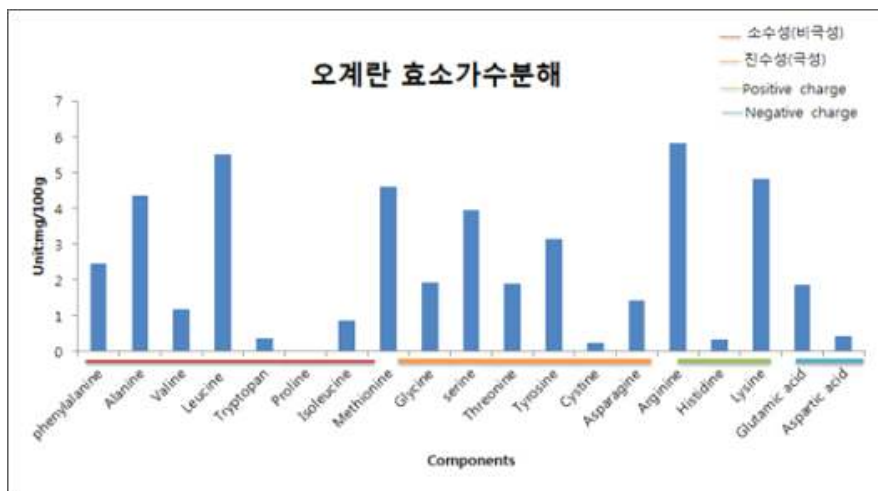


Fig 42. 오계 흰자란 19개 아미노산 분석.

② 유리 아미노산

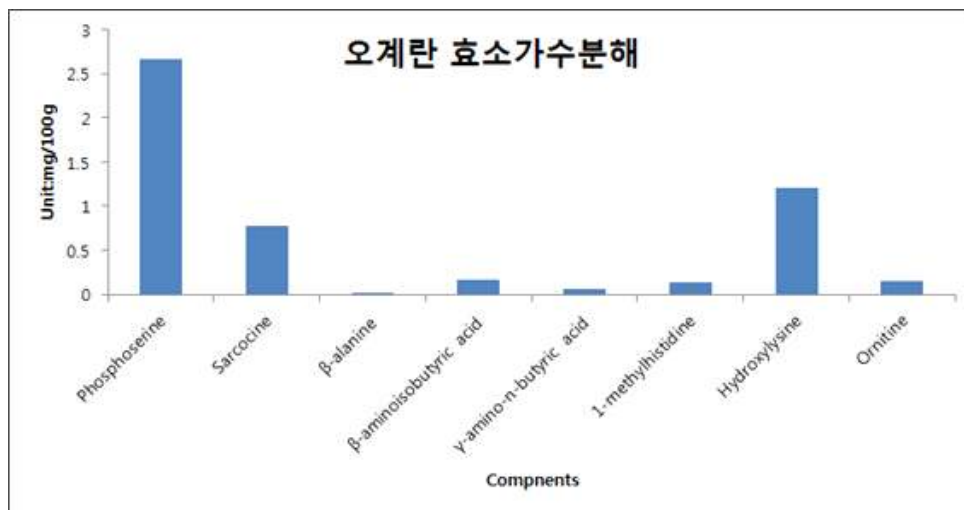


Fig 43. 오계 흰자란 유리아미노산 분석그래프분석.

오계 흰자란을 분리하여 효소가수분해 처리한 가수분해물의 유리 아미노산함량은 다음과 같다 (Fig. 43). 오계흰자 효소가수분해물에서는 26 종류의 유리아미노산이 검출되었으며, 구성아미노산을 제외한 아미노산에서는 Phosphoserine(5.3%), Hydroxylysine(2.4%), Sarcocine(1.5%) 등의 순으로 존재하였다. 유리아미노산의 전체 분포도는 Fig. 44에 나타내었다.

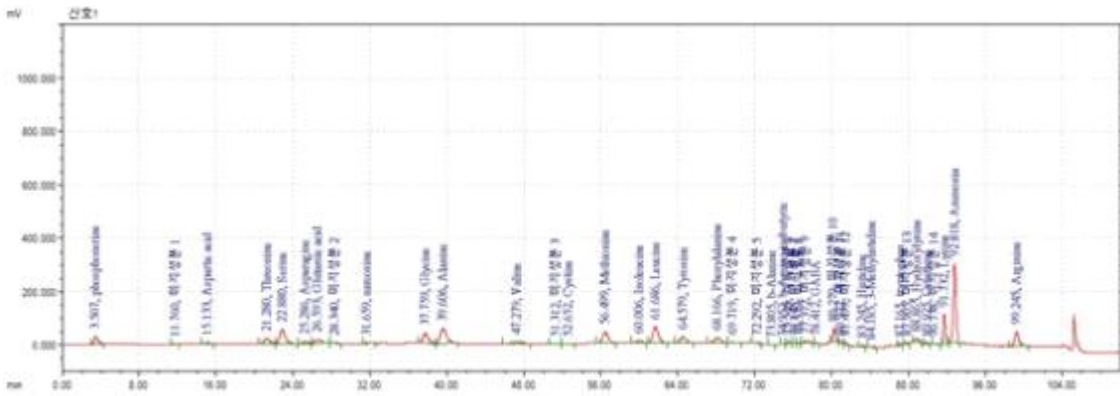


Fig 44. 오계흰자 유리아미노산 분석 그래프.

(사) 오계란 흰자 펩타이드 분자량 분포결과

오계란 흰자 단백질 가수분해 효소를 이용하여 분해한 생성물들의 분자량 분포 특성을 분석하고자 MALDI-TOP를 사용하였다. MALDI-TOF는, PMF(Peptide Mass Fingerprint) 분석법으로 특정 enzyme을 처리하여 잘라진 peptide fragment들의 mass 값을 측정하고 이를 사용하여 database search를 하여 동정한다. 그러므로, PMF방법은 Genomic sequence가 완료된 생물종이나 NCBI에 등재가 된 단백질을 동정하는데 주로 사용한다. 단백질의 모든 아미노산 평균 분자량은 138이지만, 가중 평균은 128이고 축합 중합에 의해 단백질은 각 단위체당 110의 평균 분자량을 갖게 된다. 이를 나타내는 단위는 dalton(달톤)으로 1 kD는 1000g/mol이다. 예를 들면 약 500개의 아미노산을 갖는 단백질의 평균적인 분자량은 55000D, 즉 55kD의 분자량을 갖는다.

본 연구에서 Fig 45은 오계란 흰자 단백질 가수분해물의 펩타이드들의 분자량 분포에 대한 분석을 시행하였는데 MALDI-TOP의 그래프에서 x 축은 mass(m/z)를 나타내고 Y축은 이온화된 물질의 강도를 나타낸다. 불순물이 어느 정도 포함이 되어있지만 대부분의 펩타이드 들은 m/z 500에서 1,400 이하 분자량 분포를 보여 주었다. 따라서 오계란 흰자 가수분해물 펩타이드들은 아미노산 염기 4에서 12개 정도의 분포를 보여 주었다. 그리고 대부분의 펩타이드들이 염기서열 10개 이하로 이루어져 있었다. 평균 분자량으로 환산을 한다면 다수를 차지하는 펩타이드의 분자량들은 아미노산 잔기가 5,6,8,10개로 이루어져 있었다.

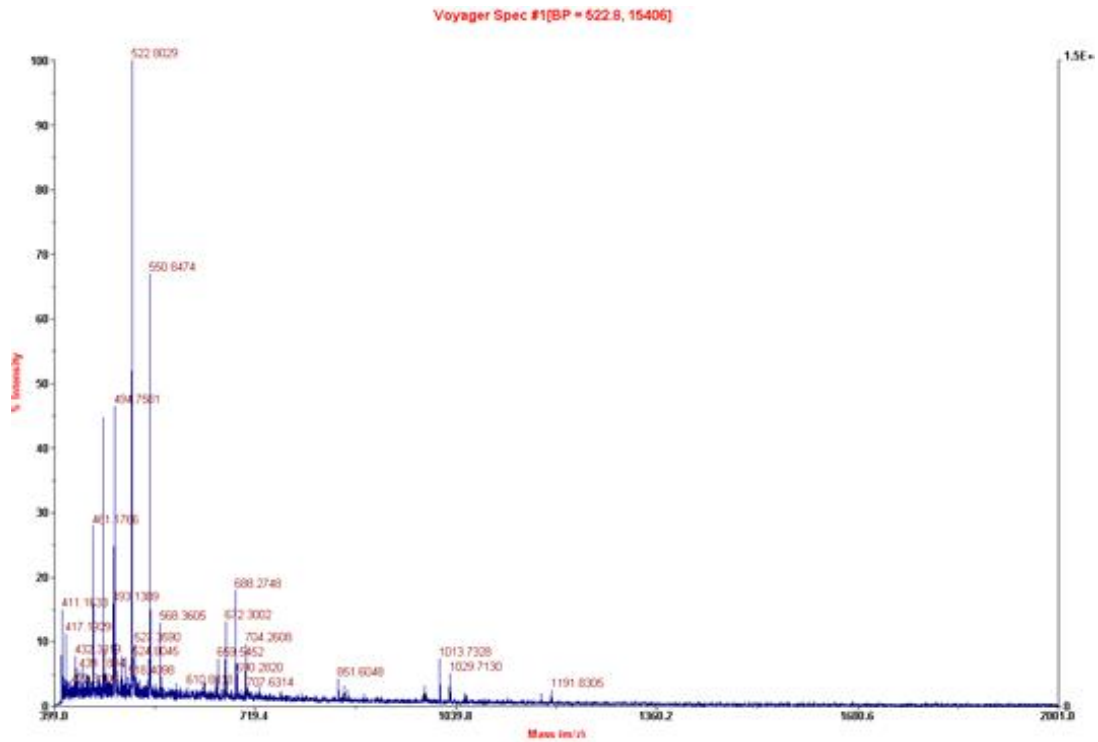


Fig 45. 1년산 오계흰자 Maldi-TOF 분석.

나. 오계 부산물인 내장을 이용한 펩타이드 제조

(1) 오계 내장 효소가수분해 펩타이드 제조

닭은 다른 식용 동물에 비하여 가식부분이 닭무계의 55 % 에 지나지 않으며, 불가식 부분이 닭무계의 45 %가 되어, 대량의 도계 부산물이 발생되고 있다.

이 부산물을 이용하기 위한 많은 연구가 수행되었다. 특히 가금류는 한국인의 기호에 맞아 가공되는 과정에서 뼈, 내장 등이 제거되는데 이를 사용 할 수 있게 새로운 형태의 공정을 개발하고 제조 시 비용 발생을 줄이기 위해 공정을 개발하기 위한 연구로 효소가수분해를 통해 펩타이드를 분리 하고자 하였으며, 원료로 사용하고자 특성을 규명하고자 하였다.

그 중 오계의 부산물 중 오계 내장을 사용하여 효소가수분해 펩타이드를 제조 시 최적반응조건(pH, 온도, 분해시간 등)을 확립하고 품질특성(일반성분, 기능성 및 아미노산 분석을 통한 분해율 및 수율 등) 및 품질지표를 선정하고자 분석실험을 하였다.

(가) 오계 부산물 중 내장을 이용한 효소가수분해 생산 최적화

BM1200에 효소를 이용하여 오계 내장으로부터 효소 가수분해하여 최적 조건요인들인 온도, pH, 효소의 양의 실험변수에 대하여 Box-Benken 디자인으로 실험을 설계하여 얻어진 실험결과 즉 가수분해도를 Table 21에 나타내었다. 실험 결과 가수분해도의 값은 15.07~94.38 범위에서 측정값이 얻어졌다.

Table 21. Experimental data 의 디자인 계획. temperature, pH, concentration of enzyme(%)에 따른 가수분해도

Sample	Temp.(°C)	pH	Enzyme(%)	Degree of hydrolysis(%)	Yield(%)	Production speed(g/h-L)
1	-1	-1	0	15.07	16.439	0.822
2	1	-1	0	70.61	76.965	3.848
3	-1	1	0	26.21	28.586	1.429
4	1	1	0	70.48	76.885	3.844
5	-1	0	-1	25.35	27.632	1.382
6	1	0	-1	46.48	50.663	2.533
7	-1	0	1	46.63	50.867	2.543
8	1	0	1	94.38	102.915	5.146
9	0	-1	-1	43.77	47.719	2.386
10	0	1	-1	56.39	61.490	3.074
11	0	-1	1	79.04	86.223	4.311
12	0	1	1	64.31	70.154	3.508
13	0	0	0	66.61	72.634	3.632
14	0	0	0	71.34	77.869	3.893
15	0	0	0	59.98	65.417	3.271
16	0	0	0	65.75	71.668	3.583
17	0	0	0	65.88	71.809	3.590

Table 21. 의 실험결과를 이용한 회귀식에 대한 분산분석의 결과는 반응표면분석법에 의해 수립된 모델의 적합성 여부를 알려준다. Quadratic 회기 모델의 분석 결과가 Table 22. 에서 보여준다. 결과에 따르면 가수분해도는 온도, pH 그리고 효소의 양에 영향을 받는다는 것이 95% 수준 이내에서 인정되었다.

Table 22. Analysis of variance(ANOVA) for fitted second-order polynomial model and lack of fit for black body fowl(Ogae) viscera

Source	DF	Sum of Squares
		DH ^a
Model	9	6576.25
Residual	7	290.62
Lack of Fit	3	225.41
Pure Error	4	65.20
Cor Total	16	6866.87

^a Coefficient of correlation (R^2) for black body fowl(Ogae) viscera was 0.96

^b Significant at 5% level.

모델 결정계수(determination coefficient) R^2 값은 실험값 (observed value)와 예측값(predicted value)과 상호연관(correlation) 정도를 보여주는데 가수분해도 0.90 이므로 이 모델은 10% 범

위에서 설명되지 않는다는 것을 보여준다. 적합결여(lack of fit) 테스트 검정에서는 유의성이 나타나지 않아 본 실험에 사용한 모델이 매우 적절함을 알 수 있다. Table 23에서는 모델의 회귀계수를 나타내는 것으로 가수분해도가 3가지 요인들에 대하여 크게 영향을 받는 것으로 나타났다. 이들에 대한 회귀식은 Table 24에 있다.

Table 23. Estimated coefficient for the filled second order polynomial representing the relationship between the response and process variables.

Factor	Coefficient DH
Intercept	65.91
Linear	
Temperature	21.09
pH	1.11
Enzyme	14.05
quadratic	
Temperature	-13.99
pH	-6.33
Enzyme	1.29
Interactions	
pH×Temperature	-2.82
pH×Enzyme	-6.84
Enzyme×Temperature	6.65

Table 24. Polynomial equations calculated by response surface program.

Response	Second order polynomial equations	R^2
오게내장 production	$Y=65.91+21.09X_1+1.11X_2+14.05X_3$ $-13.99X_1^2-6.33X_2^2+1.29X_3^2-2.82X_1X_2$ $+6.65X_1X_3-6.84X_2X_3$	0.90

X_1 : Temperature(°C), X_2 : pH, X_3 : Enzyme(%)

(나) 온도와 pH에 따른 최적 생산조건

오계 부산물 중 오계내장을 이용한 효소가수분해도는 pH보다 온도에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해도는 펩타이드 생산효율을 평가하는데 지표가 된다. pH는 pH 6~8 사이에서 크게 변화가 없었던 반면 온도의 경우 약 58℃ 정도에서 72.52%까지 가수분해도가 높아지는 것으로 확인되어 펩타이드 생산에 있어 온도의 영향을 크게 받는 것을 알 수 있다(Fig 46).

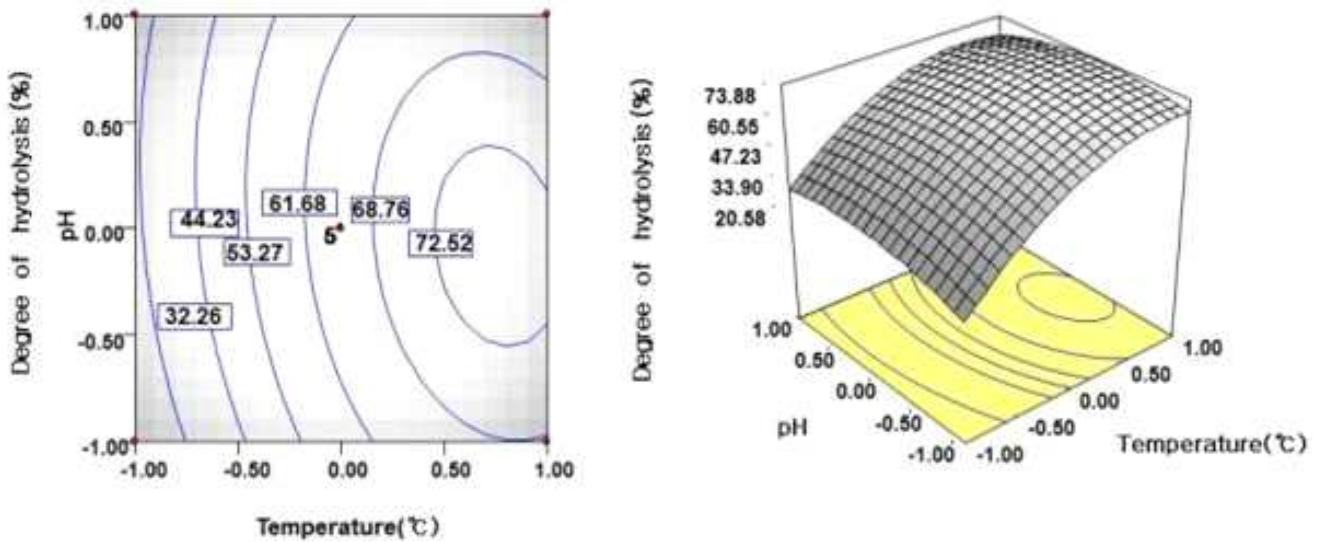


Fig 46. Contour 3D plots of response surface. Effect of pH and temperature on the production of black body fowl(Ogae) viscera using commercial protease

(다) 효소와 pH에 따른 최적 생산조건

Fig 47 에서는 보는바와 같이 효소의 양의 변화에 따른 가수분해도 변화가 pH의 변화보다 민감한 것을 알 수 있다. 효소의 양이 3%로 올렸을 때 78.82%로 가수분해도가 높아졌으나 pH의 변화에서는 그 값이 크게 변화되지 않았음을 확인하였다. 그러므로 pH의 변화 보다는 효소의 양이 3%로 높아졌을 때 펩타이드의 생산량이 증가함을 알 수 있다.

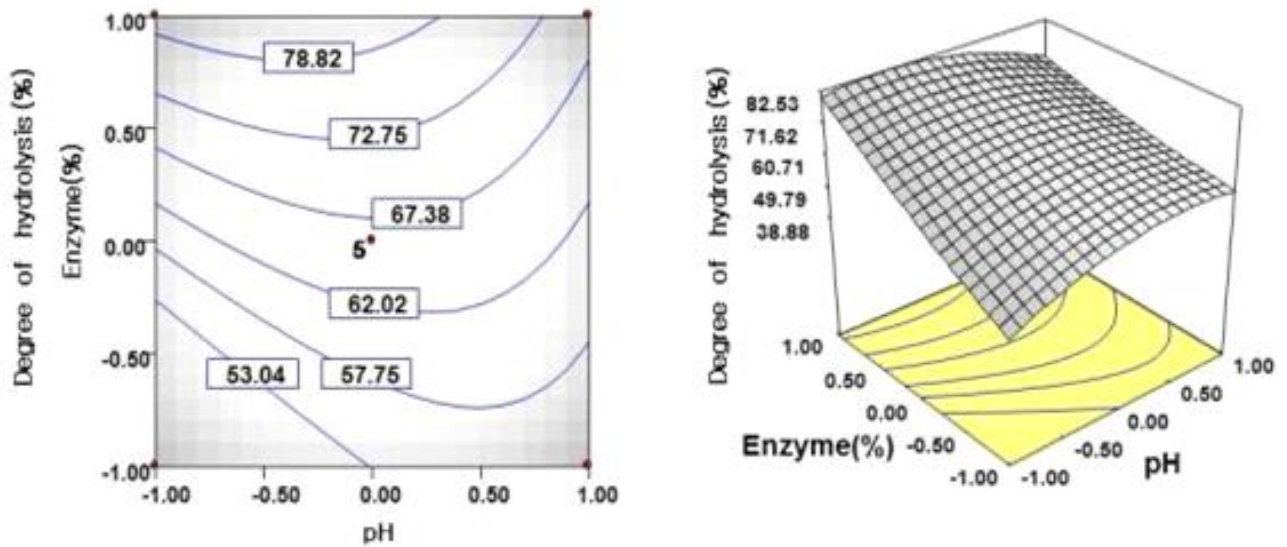


Fig 47. Contour 3D plots of response surface. enzyme concentration of pH on the production of black body fowl(Ogae) viscera using commercial protease

(라) 효소와 온도에 따른 최적 생산조건

Fig 48 는 가수분해도에 대한 효소의 양과 온도의 영향에 대한 표면반응이다. 효소의 값이 높아질수록 또 온도가 약 58℃로 높아질수록 가수분해도는 높아졌다. 효소는 약 3%가 되었을 때 그리고 온도는 약 58℃로 반응을 주었을 때 정상점이 나타났다. 이곳이 최대 펩타이드 양이 생산되는 것으로 보이며, 그 값은 약 78.82%로 나타났다.

결과를 종합해 보면 오계내장의 효소가수분해에 따른 펩타이드양에 가장 영향을 미치는 것은 온도이고, 효소의 양과 pH 순으로 나타났다(Fig 49)

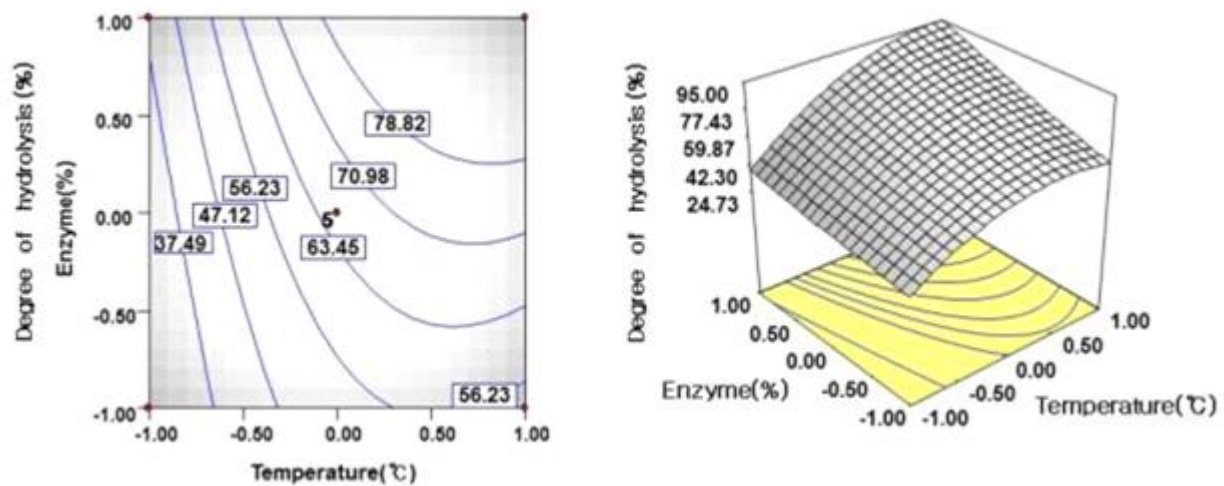


Fig 48. Contour 3D plots of response surface. enzyme concentration of temperature on the production of black body fowl(Ogae) viscera using commercial protease

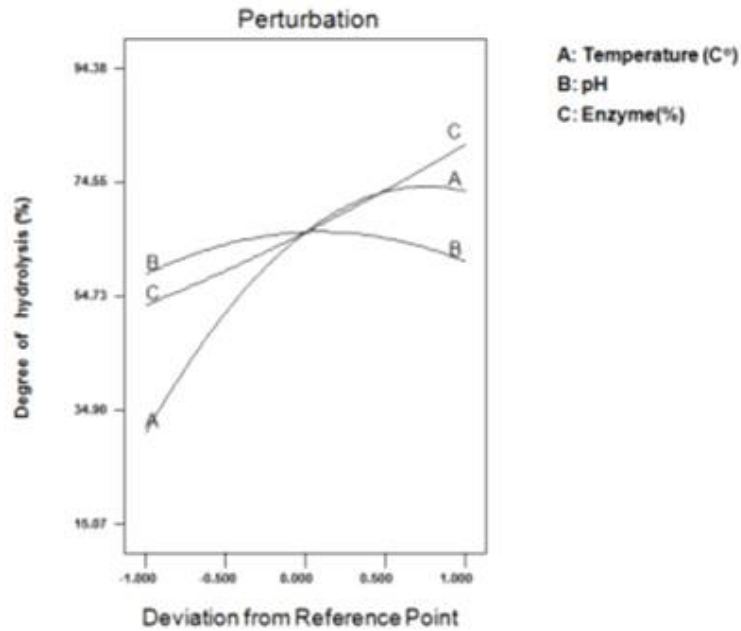


Fig 49. 내장 효소 가수분해 펩타이드 최적조건

(마) 아미노산 분석

① 구성 아미노산

오계 내장 효소가수분해물의 구성아미노산 조성은 Fig 50 와 같다. 구성아미노산의 함량은 148.381 mg/100g 이다. 그 중 Leucine이 전체 구성아미노산의 9.8%(15.163 mg/100g)으로 가장 많은 함량을 차지하고 있었다. 다음으로 Arginine(9.5%), Alanine(9.1%), Lysine(8.1%), Tyrosine(7.6%) 등의 순서였다

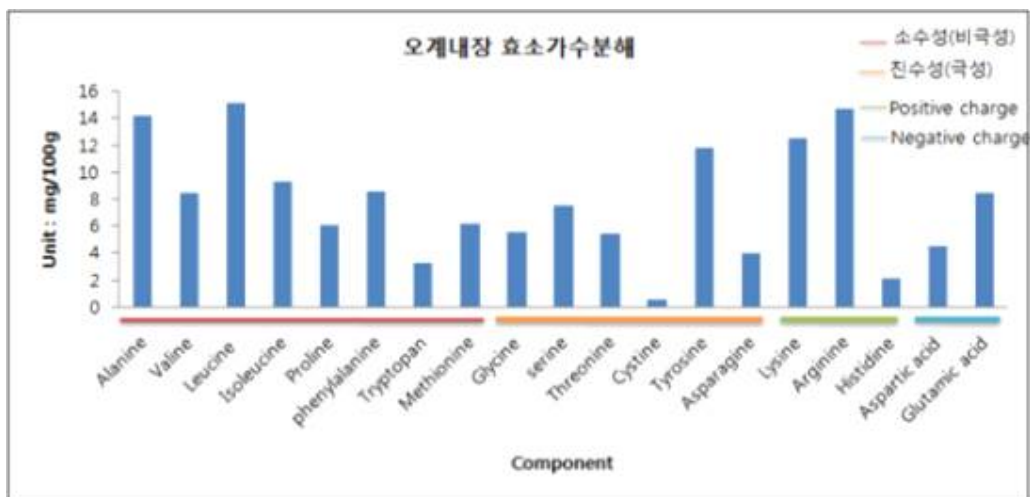


Fig 50. 오계 내장 효소가수분해물의 구성아미노산 19개종 분석.

② 유리 아미노산

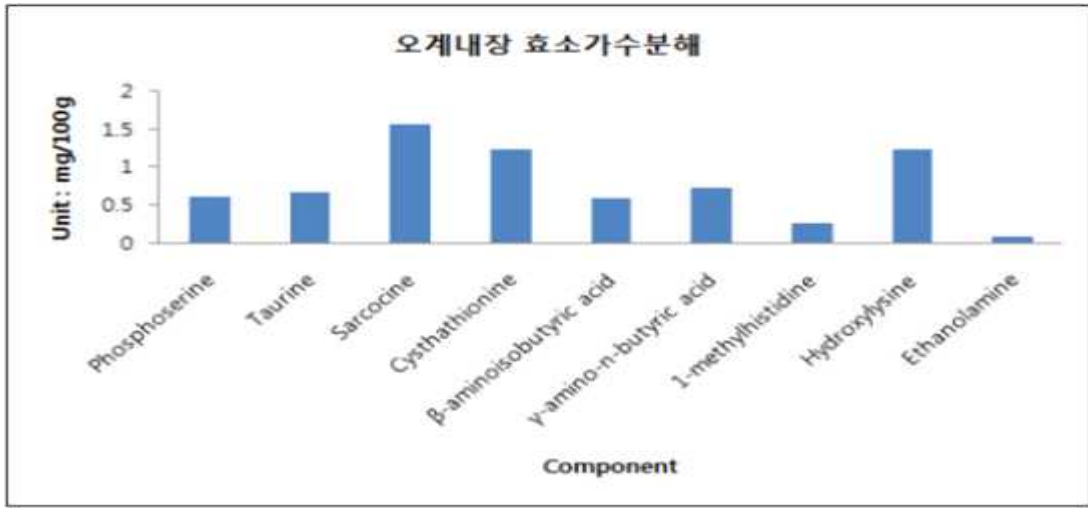


Fig 51. 오계내장 효소가수분해물의 유리아미노산(구성아미노산 제외)

오계내장을 분리하여 효소가수분해 처리한 가수분해물의 유리 아미노산 함량은 다음과 같다 (Fig 51). 오계내장 효소가수분해물에서는 29 종류의 유리아미노산이 검출되었으며, 구성아미노산을 제외한 아미노산에서는 Sarcocin(1.0%), Cystathionine(0.8%), Hydroxylysine(0.8%) 등의 순으로 존재하였다. 유리아미노산의 전체 분포도는 Fig. 52에 나타내었다.

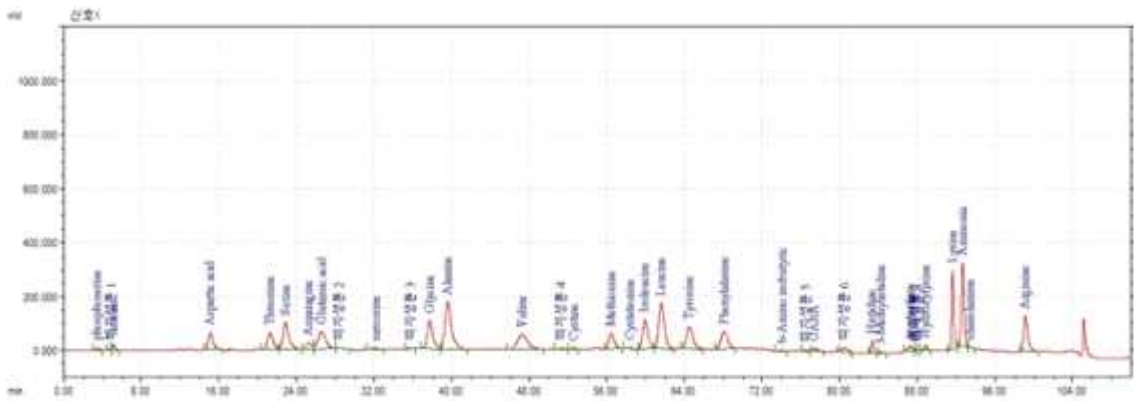


Fig 52 오계내장 효소가수분해물의 유리아미노산 분석 그래프.

(바) 효소가수분해 한 오계 내장의 펩타이드 분자량 결과 (Maldi TOF)

오계 부산물 내장을 단백질 가수분해 효소를 이용하여 분해한 생성물들의 분자량 분포 특성을 분석하고자 MALDI-TOP를 사용하였다. MALDI-TOF는, PMF(Peptide Mass Fingerprint) 분석법으로 특정 enzyme을 처리하여 잘라진 peptide fragment들의 mass 값을 측정하고 이를 사용하여 database search를 하여 동정한다. 그러므로, PMF방법은 Genomic sequence가 완료된 생물종이나 NCBI에 등재가 된 단백질을 동정하는데 주로 사용한다. 단백질의 모든 아미노산 평균 분자량은 138이지만, 가중 평균은 128이고 축합 중합에 의해 단백질은 각 단위체당 110의

평균 분자량을 갖게 된다. 이를 나타내는 단위는 dalton(달톤)으로 1 kD는 1000g/mol이다. 예를 들면 약 500개의 아미노산을 갖는 단백질의 평균적인 분자량은 55000D, 즉 55kD의 분자량을 갖는다.

본 연구에서 Fig 53은 오계내장 단백질 가수분해물의 펩타이드들의 분자량 분포에 대한 분석을 시행하였는데 MALDI-TOP의 그래프에서 x 축은 mass(m/z)를 나타내고 Y축은 이온화된 물질의 강도를 나타낸다. 불순물이 어느 정도 포함이 되어있지만 대부분의 펩타이드 들은 m/z 500에서 1,400 이하 분자량 분포를 보여 주었다. 따라서 오계 내장 가수분해물 펩타이드들은 아미노산 염기 4에서 12개 정도의 분포를 보여 주었다. 그리고 대부분의 펩타이드들이 염기서열 10개 이하로 이루어져 있었다. 평균 분자량으로 환산을 한다면 다수를 차지하는 펩타이드의 분자량들은 아미노산 잔기가 5,6,8,10개로 이루어져 있었다.

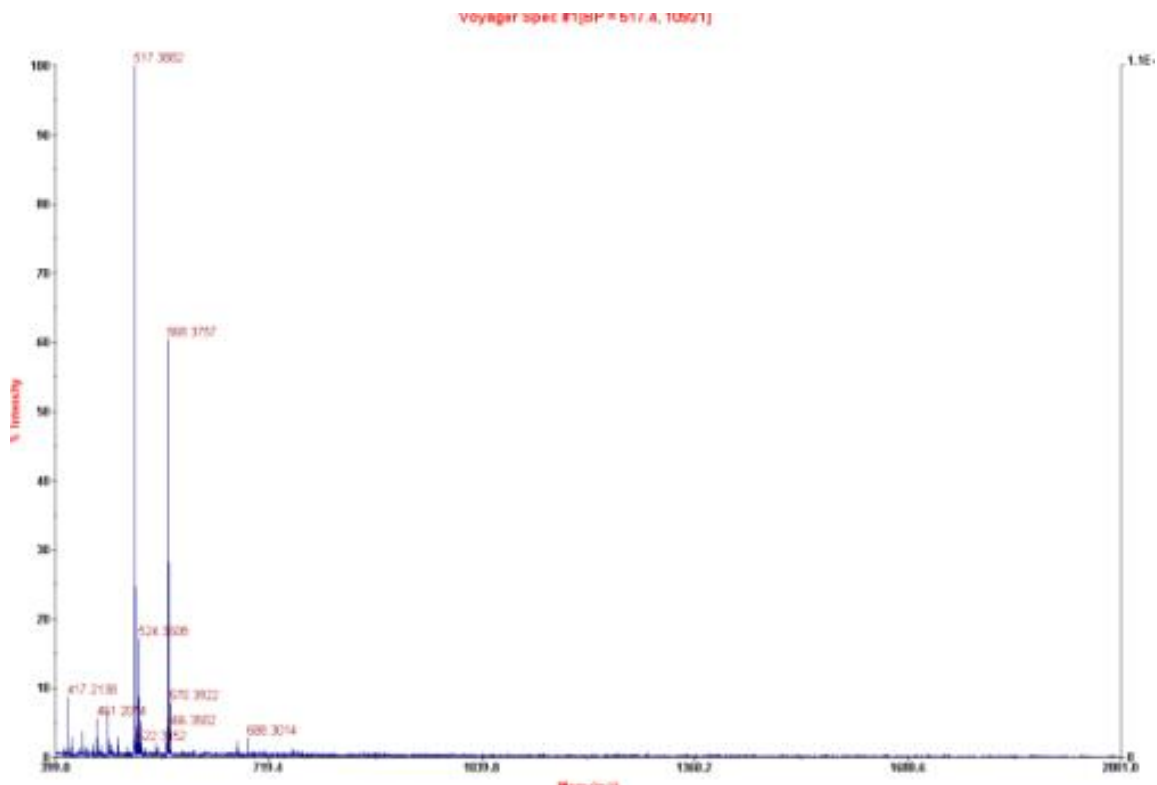


Fig 53. 오계부산물 내장 효소반응 Maldi-TOF분자량 분석 그래프.

(2) 오계 내장 고압액화 효소가수분해 펩타이드 제조

오계의 부산물 중 오계 내장을 사용하여 고압액화 효소가수분해 펩타이드를 제조 시 최적반응 조건(온도, 압력, 분해시간 등)을 확립하고 품질특성(일반성분, 기능성 및 아미노산 분석을 통한 분해율 및 수율 등) 및 품질지표를 선정하고자 분석실험을 하였다.

(가) 압력에 의한 오계 내장의 펩타이드 생산 최적화

BM1200에 효소를 이용하여 오계 내장으로부터 효소가수분해하여 최적 조건요인들인 압력, 시간, 기질의 양의 실험변수에 대하여 Box-Benken 디자인으로 실험을 설계하여 얻어진 실험결과 즉 가수분해도를 Table 41에 나타내었다. 실험 결과 가수분해도의 값은 32.46~66.28 범위에서 측정값이 얻어졌다.

Table 26. Experimental data의 디자인 계획(압력, 시간, 기질조건에 따른 가수분해도)

Sample	Pressure	Time	Substrate	Degree of hydrolysis(%)	Yield(%)	Production speed(g/h-L)
1	-1	-1	0	32.46	42.911	14.3
2	1	-1	0	44.32	58.550	19.5
3	-1	1	0	36.74	48.456	3.2
4	1	1	0	56.17	73.728	4.9
5	-1	0	-1	44.90	29.462	3.3
6	1	0	-1	52.09	34.373	3.8
7	-1	0	1	38.48	76.135	8.5
8	1	0	1	66.28	130.879	14.5
9	0	-1	-1	38.48	25.585	8.5
10	0	1	-1	41.79	27.650	1.8
11	0	-1	1	38.48	75.632	25.2
12	0	1	1	56.17	110.438	7.4
13	0	0	0	56.70	74.831	8.3
14	0	0	0	54.20	71.343	7.9
15	0	0	0	59.80	78.336	8.7
16	0	0	0	55.40	72.463	8.1
17	0	0	0	56.70	74.164	8.2

Table 27의 실험결과를 이용한 회귀식에 대한 분산분석의 결과는 반응표면분석법에 의해 수립된 모델의 적합성 여부를 알려준다. Quadratic 회기 모델의 분석 결과가 Table 28 에서 보여준다. 결과에 따르면 가수분해도는 압력과 시간과 기질에 영향을 받는다는 것이 95% 수준 이내에서 인정되었다.

Table 27. Analysis of variance(ANOVA) for fitted second-order polynomial model and lack of fit for 오계내장

Source	DF	Sum of Squares
		DH ^a
Model	9	1532.27 ^b
Residual	7	27.57
Lack of Fit	3	10.12
Pure Error	4	17.45
Cor Total	16	1559.84

^a Coefficient of correlation (R^2) for 고압액화 black body fowl(Ogae) viscera was 0.96

^b Significant at 5% level.

모델 결정계수(determination coefficient) R^2 값은 실험값 (observed value)와 예측값(predicted value)과 상호연관(correlation) 정도를 보여주는데 가수분해도 0.96 이므로 이 모델은 4% 범위에서 설명되지 않는다는 것을 보여준다. 적합결여(lack of fit) 테스트 검정에서는 유의성이 나타나지 않아 본 실험에 사용한 모델이 매우 적절함을 알 수 있다. Table 28에서는 모델의 회귀계수를 나타내는 것으로 가수분해도가 3가지 요인들에 대하여 크게 영향을 박는 것으로 나타났다. 이들에 대한 회귀식은 Table 29 에 있다.

Table 28. Estimated coefficient for the filled second order polynomial representing the relationship between the response and process variables.

Factor	Coefficient
	DH
Intercept	56.56
Linear	
Pressure	8.28
Time	4.64
기질	2.77
quadratic	
Pressure	-3.72
Time	-10.42
기질	-2.40
Interactions	
Time×Pressure	1.90
기질×Pressure	5.15
Time×기질	3.60

Table 29. Polynomial equations calculated by response surface program.

Response	Second order polynomial equations	R^2
고압액화 오계내장 production	$Y=56.56+ 8.28X_1+ 4.64X_2+ 2.77X_3$ $-3.72X_1^2-10.42X_2^2-2.40X_3^2+ 1.90X_1X_2$ $+ 5.15X_1X_3+ 3.60X_2X_3$	0.96

X_1 : Pressure(bar), X_2 : Time(h), X_3 : 기질(g)

(나) 압력과 시간에 따른 최적 생산조건

표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대점으로 판명되어 예측 최대 고압액화 효소가수분해는 시간보다 압력에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해도는 펩타이드 생산효율을 평가하는데 지표가 된다. 시간은 3~4시간 사이에 가수분해도가 54.46% 까지 증가하다가 그 이후 감소하는 것으로 나타났다. 반면 압력의 경우 약 900bar 정도에서 62.15%까지 가수분해도가 높아지는 것으로 확인되어 펩타이드 생산에 있어 압력에 더 큰 영향을 받는 것을 알 수 있다(Fig. 54)

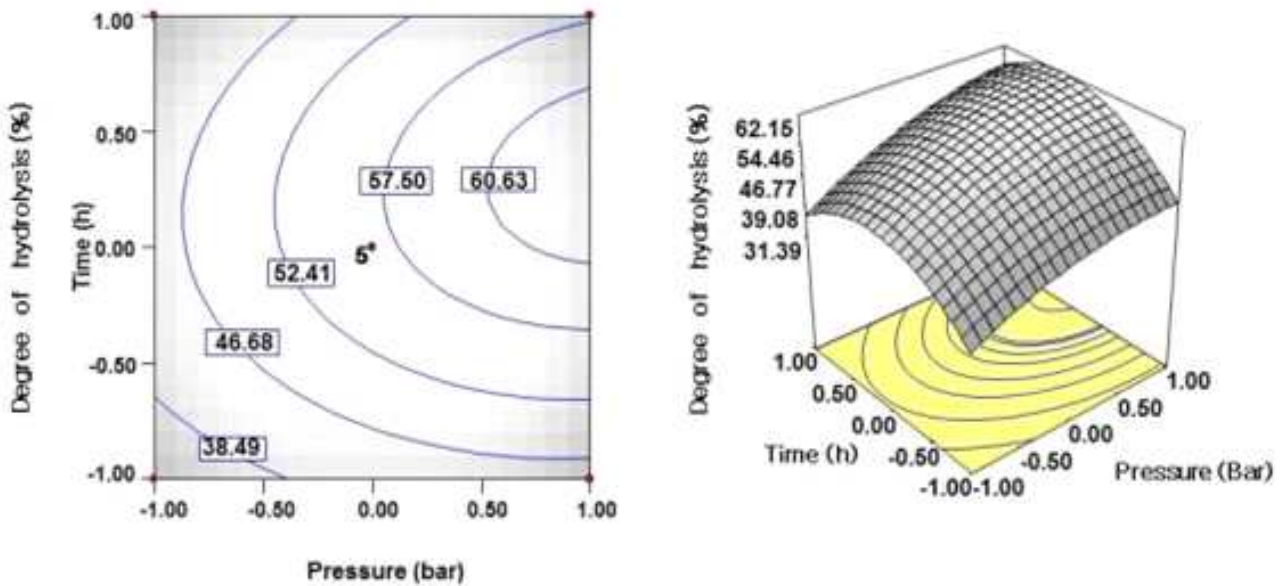


Fig 54. Contour 3D plots of response surface. Effect of pressure and time on the production of black body fowl(Ogae) viscera using commercial protease

(다) 압력과 기질에 따른 최적 생산조건

Fig 55 에서와 마찬가지로 기질의 양의 변화에 따른 가수분해도 변화 보다는 압력의 변화에 상당히 민감하였다. 기질의 양 20%, 압력 약 900bar 근처에서 정상점이 나타났는데, 이것이 가수분해도의 최대점이 되어 그 값은 약 61.59%로 압력이 높을 때 펩타이드의 생산량이 증가함을 알 수 있다.

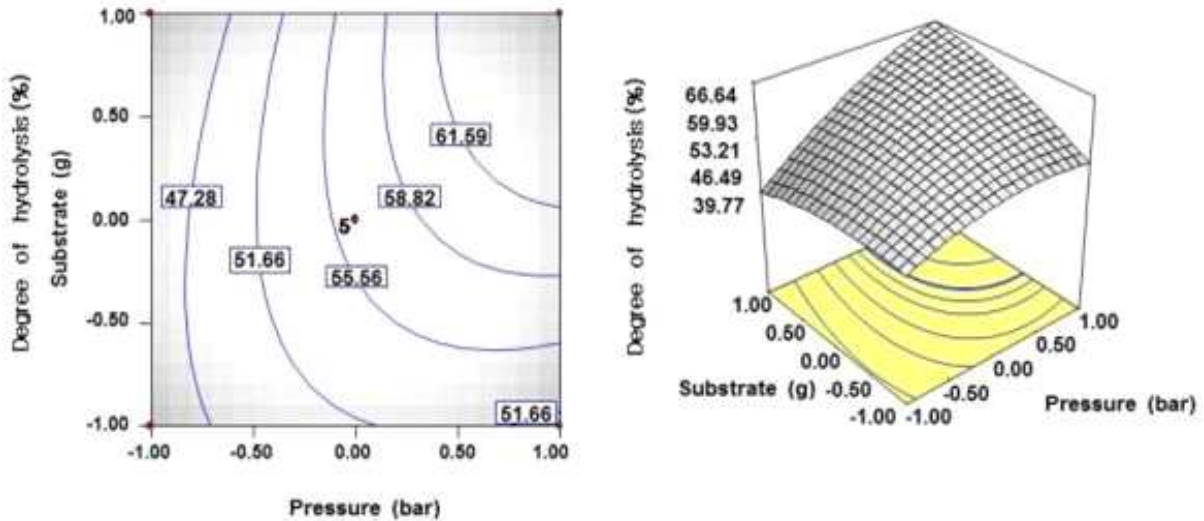


Fig 55. Contour 3D plots of response surface. Effect of pressure and substrate on the production of black body fowl(Ogae) viscera using commercial protease

(라) 시간과 기질에 따른 최적 생산조건

가수분해도에 대한 시간과 기질의 영향에 대한 표면반응이다. Fig. 56에서와 마찬가지로 오게 내장 고압액화 효소가수분해하여 시간과 기질에 따른 최적 표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대 점으로 판명되어 예측 최대 펩타이드 생산은 3시간 ~4시간 반응 하였을 때 기질 20%일 때 에 큰 영향을 받는 것으로 나타났다.

약 27% 정도의 기질의 양과 3~4시간 사이에서 반응을 주었을 때 정상점이 나타났다. 이곳이 최대 펩타이드 양이 생산되는 것으로 보이며, 그 값은 약 57.43%로 나타났다. 고압액화 효소가수분해를 이용한 최적조건은 기질의 양보단 시간에 따라서 영향을 미치는 것으로 보인다. 기질다음 시간에 따른 순으로 나타났다.

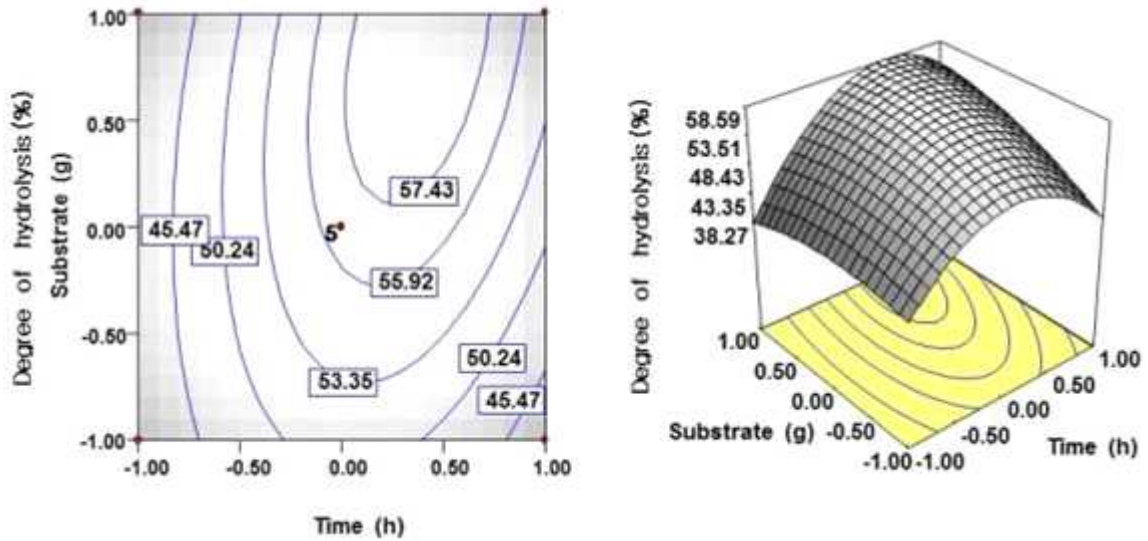


Fig. 56. Contour 3D plots of response surface. Effect of substrate and time on the production of black body fowl(Ogae) viscera using commercial protease

결과를 종합해 보면 표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대점으로 판명되어 고압액화 효소가수분해에 가장 영향을 미치는 것은 압력, 시간, 기질의 순으로 나타났다(Fig 57). 즉, 압력은 낮을수록, 반응시간을 연장할수록, 기질이 적을수록 가수분해도가 높았다.

(마) 압력, 시간, 기질의 최적조건

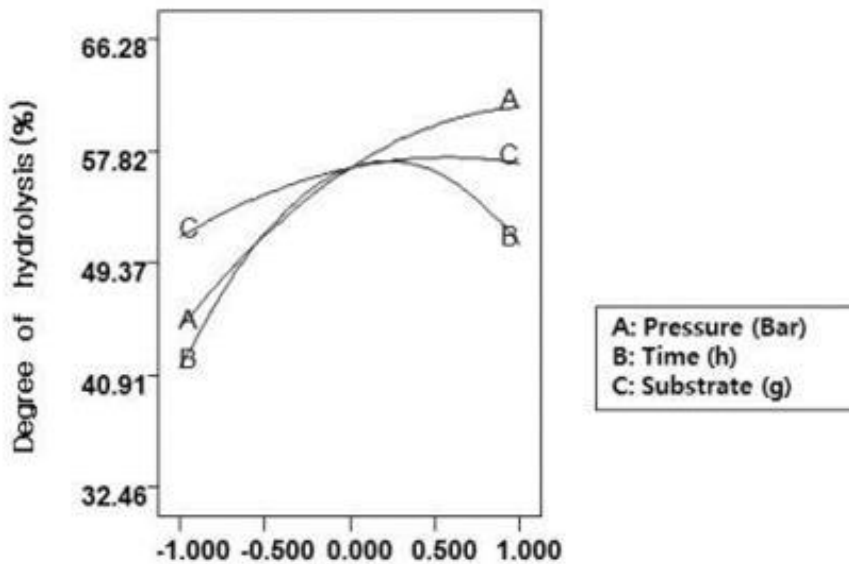


Fig 57. 오계내장 고압액화 가수분해 펩타이드 최적조건

(바) 아미노산 분석

① 구성아미노산

오계 부산물 내장의 효소가수분해 펩타이드의 구성 아미노산의 조성은 Fig 58과 같다. 구성아미노산의 함량은 347.253 mg/100g 이며, 이 중 Arginine이 전체 구성아미노산의 15.5%(52.602 mg/100g)로 가장 많은 함량을 차지하고 있었다. 다음으로 Lysine 12.68%, Leucine 10.58% 등의 순서였다(Fig 58).

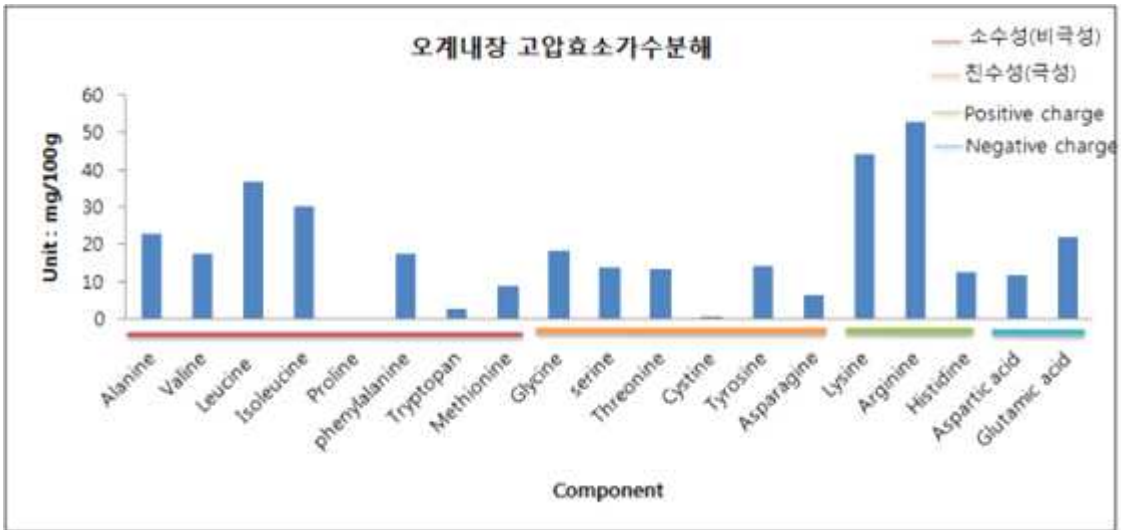


Fig 58. Total amino acid contents of precipitate of black body fowl(Ogae) viscera

② 유리 아미노산

분석결과 소수성 아미노산계열인 valine, methionine, isoleucine, phenylalanine 및 histidine 등은 쓴맛 성분으로 분석되지 않았으며, 다른 성분에 비해 ornitine가 높게 분석되었다(Fig 59)

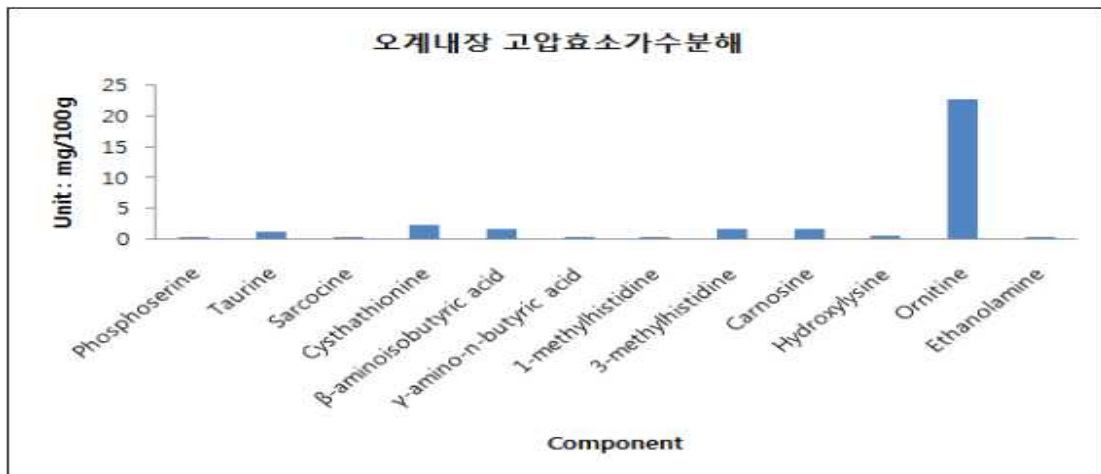


Fig 59. Free amino acid contents of precipitate of black body fowl(Ogae) viscera

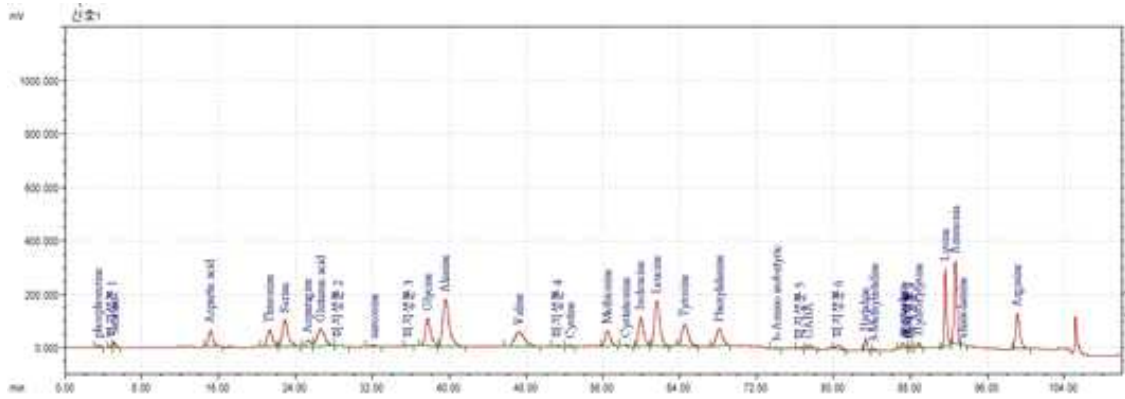


Fig 60. 오계내장 고압액화 효소가수분해물의 유리아미노산 분석 그래프.

③ 오계내장 효소가수분해물과 오계내장 고압효소가수분해물의 유리아미노산 비교

오계내장 효소가수분해물과 오계내장 고압효소가수분해물의 유리아미노산 비교 한 결과 기존 아미노산의 함량 변화는 크게 없었으나, 오계내장 효소가수분해물에서 총 28종의 유리아미노산이 검출되었으며, 오계 내장 고압효소가수분해물의 경우 총 30종의 유리 아미노산이 검출되었다. 오계 내장 효소가수분해 시료의 경우 Proline 아미노산이 3.9% 분석되었으나, 오계 내장 고압효소 가수분해 분석에서는 확인되지 않았다. 오계 내장 고압효소가수분해 시료의 경우 3-methylhistidine (0.4%), Carnosine (0.5%), Ornithine (6.0%) 3종류의 아미노산이 더 분석되어졌으며, 오계내장 효소가수분해는 아미노산 분석 함량이 155.262 mg/100g, 오계 내장 고압액화 효소가수분해는 381.843 mg/100g 으로 전체 함량이 두배 이상 증가하였음을 확인하였다(Table 30).

Table 30. 오계 내장 효소가수분해와 오계 내장 고압효소가수분해의 유리아미노산 비교

Free amino acid	오계내장 효소가수분해		오계내장 고압효소가수분해	
	mg/100g	%	mg/100g	%
Phosphoserine	0.598	(0.4)	0.494	(0.1)
Taurine	0.654	(0.4)	1.347	(0.4)
Aspartic acid	4.489	(2.9)	11.804	(3.1)
Threonine	5.407	(3.5)	13.271	(3.5)
serine	7.555	(4.9)	14.039	(3.7)
Asparagine	4.004	(2.6)	6.673	(1.7)
Glutamic acid	8.484	(5.5)	22.113	(5.8)
Sarcosine	1.544	(1.0)	0.367	(0.1)
Proline	6.031	(3.9)	-	-
Glycine	5.558	(3.6)	18.286	(4.8)
Alanine	14.176	(9.1)	22.955	(6.0)
Valine	8.434	(5.4)	17.382	(4.6)
Cystine	0.522	(0.3)	0.694	(0.2)
Methionine	6.203	(4.0)	9.142	(2.4)
Cystathionine	1.219	(0.8)	2.427	(0.6)
Isoleucine	9.339	(6.0)	30.136	(7.9)
Leucine	15.163	(9.8)	36.742	(9.6)
Tyrosine	11.823	(7.6)	14.275	(3.7)
phenylalanine	8.572	(5.5)	17.524	(4.6)
β -aminoisobutyric acid	0.587	(0.4)	1.68	(0.4)
γ -amino-n-butyric acid	0.721	(0.5)	0.531	(0.1)
Histidine	2.14	(1.4)	12.715	(3.3)
1-methylhistidine	0.252	(0.2)	0.386	(0.1)
3-methylhistidine	-	-	1.715	(0.4)
Carnosine	-	-	1.82	(0.5)
Tryptopan	3.219	(2.1)	2.864	(0.8)
Hydroxylysine	1.229	(0.8)	0.707	(0.2)
Ornithine	-	-	22.763	(6.0)
Lysine	12.554	(8.1)	44.036	(11.5)
Ethanolamine	0.077	(0.0)	0.355	(0.1)
Arginine	14.708	(9.5)	52.602	(13.8)
Total	155.262	(100)	381.843	(100)

(사) 고압액화 한 오계 내장의 펩타이드 분자량 결과 (Maldi TOF)

오계 부산물 내장을 단백질 가수분해 효소를 이용하여 고압액화 분해한 생성물들의 분자량 분포 특성을 분석하고자 MALDI-TOF를 사용하였다. MALDI-TOF는, PMF(Peptide Mass Fingerprint) 분석법으로 특정 enzyme를 처리하여 잘라진 peptide fragment들의 mass 값을 측정하고 이를 사용하여 database search를 하여 동정한다. 그러므로, PMF방법은 Genomic sequence가 완료된 생물종이나 NCBI에 등재가 된 단백질을 동정하는데 주로 사용한다. 단백질의 모든 아미노산 평균 분자량은 138이지만, 가중 평균은 128이고 축합 중합에 의해 단백질은 각 단위체당 110의 평균 분자량을 갖게 된다. 이를 나타내는 단위는 dalton(달톤)으로 1 kD는 1000g/mol이다. 예를 들면 약 500개의 아미노산을 갖는 단백질의 평균적인 분자량은 55000D, 즉 55kD의 분자량을 갖는다.

본 연구에서 Fig 61은 오계내장 단백질 가수분해물의 펩타이드들의 분자량 분포에 대한 분석을 시행하였는데 MALDI-TOF의 그래프에서 x 축은 mass(m/z)를 나타내고 Y축은 이온화된 물질의 강도를 나타낸다. 불순물이 어느 정도 포함이 되어있지만 대부분의 펩타이드 들은 m/z 500에서 1,400 이하 분자량 분포를 보여 주었다. 따라서 오계 내장 가수분해물 펩타이드들은 아미노산 염기 4에서 12개 정도의 분포를 보여 주었다. 그리고 대부분의 펩타이드들이 염기서열 10개 이하로 이루어져 있었다. 평균 분자량으로 환산을 한다면 다수를 차지하는 펩타이드의 분자량들은 아미노산 잔기가 5,6,8,10개로 이루어져 있었다.

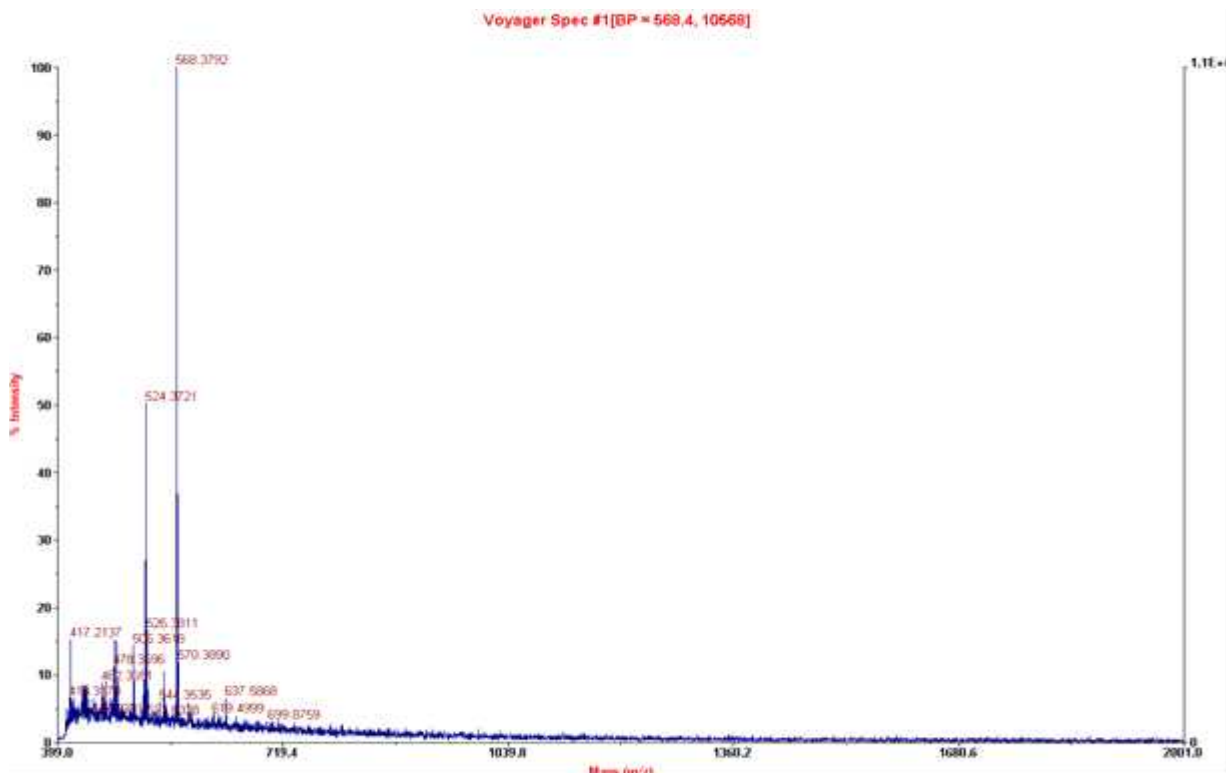


Fig 61. 오계부산물 내장 고압액화 효소반응 Maldi-TOF분자량 분석 그래프.

다. 단백질 분해효소를 이용한 오계 3년산 암컷(가슴, 다리, 날개육)과 3년산 수컷(가슴, 다리, 날개육)의 단백질 가수분해 최적공정 확인

오계의 3년산 암컷(가슴, 다리 날개육)과 3년산 수컷(가슴, 다리 날개육)의 최적조건에서 펩타이드 추출한 효소 가수분해율을 확인하였으며, 품질특성(일반성분, 기능성 및 아미노산 분석을 통한 분해율 및 수율 등)을 선정하고자 3년산 수컷 다리육을 사용하여 분석실험 하였다.

(1) 오계 3년산 암수 가슴, 다리, 날개육 으로부터 고압액화 및 효소 가수분해를 위한 효소 선정

단백질가수분해 효소 선택은 대중상사에서 판매하는 프로테아제효소를 구입하여 효소활성도를 측정을 하였다. 효소활성도의 측정은 카제인을 이용한 실험을 하였으며, 프로테아제 효소 7개 중 Bromelain 1200GDU 효소 활성도가 34.984%로 가장 높았다. 따라서 Bromelain 1200 GDU 효소를 사용하였다. 최종적으로 선정된 효소를 BM1200 이라고 잠정적으로 명명을 하였다.

(2) 압력 또는 효소에 의한 오계 년산 암컷, 수컷 가슴, 다리, 날개육의 펩타이드 생산 최적화
BM1200에 효소를 이용하여 오계 내장으로부터 효소가수분해하여 최적 조건요인들인 압력, 시간, 기질 또는 온도, pH, 효소의 양의 실험을 통해 부위별 가수분해 펩타이드 DH값을 확인 하였다(Table 30).

다리 가슴 날개를 부위별로 고압액화 효소가수분해 실험을 한 결과 암컷과 수컷의 펩타이드 DH값 비교 시 3년산 수컷 가슴육이 47.090 mg/g로 가장 가수분해도가 높게 확인 되었다. 하지만 전체적으로 각 부위 또는 암컷과 수컷의 차이가 크게 나타나지 않았음을 확인하였다.

Table 30. 고압액화를 이용한 3년산 암, 수(오계 3년산 수컷의 다리, 가슴, 날개, 암컷의 다리, 가슴, 날개) 부위별 가수분해 펩타이드 DH값

	압력 (Bar)	시간 (h)	기질 (g)	온도 (℃)	DH (%)	Yield (%)	Production speed (g/h-L)
3년산 수컷 다리육	1000	5	3	50	45.994	30.123	2.008
3년산 암컷 다리육	1000	5	3	50	44.783	24.103	1.607
3년산 수컷 가슴육	1000	5	3	50	47.090	17.558	1.171
3년산 수컷 날개육	1000	5	3	50	42.885	22.229	1.482
3년산 암컷 가슴육	1000	5	3	50	45.828	9.966	0.664
3년산 암컷 날개육	1000	5	3	50	39.352	14.959	0.997

다리 가슴 날개를 부위별로 효소가수분해 실험을 한 결과 암컷과 수컷의 펩타이드 DH값 비교 시 3년산 암컷 가슴육이 47.771 mg/g로 가장 가수분해도가 높고, 3년산 암컷 날개육이 44.720 mg/g로 대체적으로 높게 확인되었다. 하지만 그 외 부위와 암수의 차이는 크게 나타나지 않았음을 확인하였다.

Table 31.. 효소를 이용한 3년산 암, 수(오계 3년산 수컷의 다리, 가슴, 날개, 암컷의 다리, 가슴, 날개) 부위별 가수분해 펩타이드 DH값

	온도 (°C)	pH	효소 (g)	고기양 (g)	DH (%)	Yield(%) (%)	Production speed (g/h-L)
3년산 수컷 다리육	50	6.0	3.001	10.048	37.36	81.836	4.092
3년산 암컷 다리육	50	6.0	3.001	10.102	32.922	72.502	3.625
3년산 수컷 가슴육	50	6.0	3.002	10.006	37.936	82.750	4.138
3년산 수컷 날개육	50	6.0	3.001	10.021	35.193	76.882	3.844
3년산 암컷 가슴육	50	6.0	3.001	10.102	47.771	105.203	5.260
3년산 암컷 날개육	50	6.0	3.001	10.082	44.720	98.289	4.914

(3) 아미노산 분석

3년산 오계다리육 효소가수분해물과 3년산 오계다리육 고압효소가수분해물의 유리아미노산 비교 한 결과 기존 아미노산의 함량 변화는 크게 없었으나, 3년산 오계다리육 효소가수분해물에서는 총 26종의 유리아미노산이 검출되었으며, 3년산 오계다리육 고압효소가수분해물의 경우 총 30종의 유리 아미노산이 검출되었다. 3년산 오계다리육 고압효소가수분해 시료의 경우 α -aminoadipic acid(0.2%), Cystine(0.1%), β -aminoisobutyric acid(0.5%), Tryptopan(0.8%) 4종류의 아미노산이 더 분석되어졌으며, 3년산 오계다리육 효소가수분해는 아미노산 분석 함량이 168.131mg/100g, 3년산 오계다리육 고압액화 효소가수분해는 200.553 mg/100g 으로 전체 함량이 증가하였음을 확인하였다(Table 32).

Table 32. 3년산 다리육 효소가수분해와 3년산 다리육 고압효소가수분해 의 유리아미노산 비교

Free amino acid	3년산 다리육 효소가수분해		3년산 다리육 고압효소가수분해	
	(mg/100g)	%	(mg/100g)	%
Phosphoserine	0.634	(0.4)	0.436	(0.2)
Taurine	7.956	(4.7)	6.853	(3.4)
Aspartic acid	4.651	(2.8)	5.724	(2.9)
Hydroxyproline	-	-	-	-
Threonine	5.908	(3.5)	6.947	(3.5)
serine	7.064	(4.2)	7.502	(3.7)
Asparagine	3.636	(2.2)	3.91	(1.9)
Glutamic acid	14.272	(8.5)	14.202	(7.1)
Sarcosine	1.617	(1.0)	1.632	(0.8)
α -aminoadipic acid	-	-	0.373	(0.2)
Proline	1.576	(0.9)	3.378	(1.7)
Glycine	5.175	(3.1)	8.572	(4.3)
Alanine	13.778	(8.2)	15.43	(7.7)
Citrulline	-	-	-	-
α -aminobutyric acid	-	-	-	-
Valine	4.734	(2.8)	6.838	(3.4)
Cystine	-	-	0.293	(0.1)
Methionine	10.319	(6.1)	10.334	(5.2)
Cysthathionine	1.156	(0.7)	2.88	(1.4)
Isoleucine	5.612	(3.3)	8.75	(4.4)
Leucine	21.014	(12.5)	24.602	(12.3)
Tyrosine	7.726	(4.6)	8.604	(4.3)
phenylalanine	8.489	(5.0)	10.785	(5.4)
Homocystine	-	-	-	-
β -alanine	0.121	(0.1)	0.116	(0.1)
β -aminoisobutyric acid	-	-	1.092	(0.5)
γ -amino-n-butyrac acid	0.448	(0.3)	0.421	(0.2)
Histidine	1.951	(1.2)	2.541	(1.3)
1-methylhistidine	0.286	(0.2)	0.279	(0.1)
Tryptopan	-	-	1.682	(0.8)
Hydroxylysine	2.227	(1.3)	2.628	(1.3)
Ornithine	0.075	(0.0)	0.196	(0.1)
Lysine	20.088	(11.9)	23.571	(11.8)
Ethanolamine	-	-	-	-
Arginine	17.619	(10.5)	19.982	(10.0)
Total	168.131	(100)	200.553	(100)

(4) 고압액화 한 3년산 다리육 효소가수분해 펩타이드 분자량 결과 (Maldi TOF)

3년산 오계 육을 단백질 가수분해 효소를 이용하여 분해한 생성물들의 분자량 분포 특성을 분석하고자 MALDI-TOP를 사용하였다. MALDI-TOF는, PMF(Peptide Mass Fingerprint) 분석 방법으로 특정 enzyme을 처리하여 잘라진 peptide fragment들의 mass 값을 측정하고 이를 사용하여 database search를 하여 동정한다. 그러므로, PMF방법은 Genomic sequence가 완료된 생물종이나 NCBI에 등재가 된 단백질을 동정하는데 주로 사용한다. 단백질의 모든 아미노산 평균 분자량은 138이지만, 가중 평균은 128이고 축합 중합에 의해 단백질은 각 단위체당 110의 평균 분자량을 갖게 된다. 이를 나타내는 단위는 dalton(달톤)으로 1 kD는 1000g/mol이다. 예를 들면 약 500개의 아미노산을 갖는 단백질의 평균적인 분자량은 55000D, 즉 55kD의 분자량을 갖는다.

본 연구에서 Fig 62은 오계육 단백질 가수분해물의 펩타이드들의 분자량 분포에 대한 분석을 시행하였는데 MALDI-TOP의 그래프에서 x 축은 mass(m/z)를 나타내고 Y축은 이온화된 물질의 강도를 나타낸다. 불순물이 어느 정도 포함이 되어있지만 대부분의 펩타이드 들은 m/z 500에서 1,400 이하 분자량 분포를 보여 주었다. 따라서 오계육 가수분해물 펩타이드들은 아미노산 염기 4에서 12개 정도의 분포를 보여 주었다. 그리고 대부분의 펩타이드들이 염기서열 10개 이하로 이루어져 있었다. 평균 분자량으로 환산을 한다면 다수를 차지하는 펩타이드의 분자량들은 아미노산 잔기가 5,6,8,10개로 이루어져 있었다.

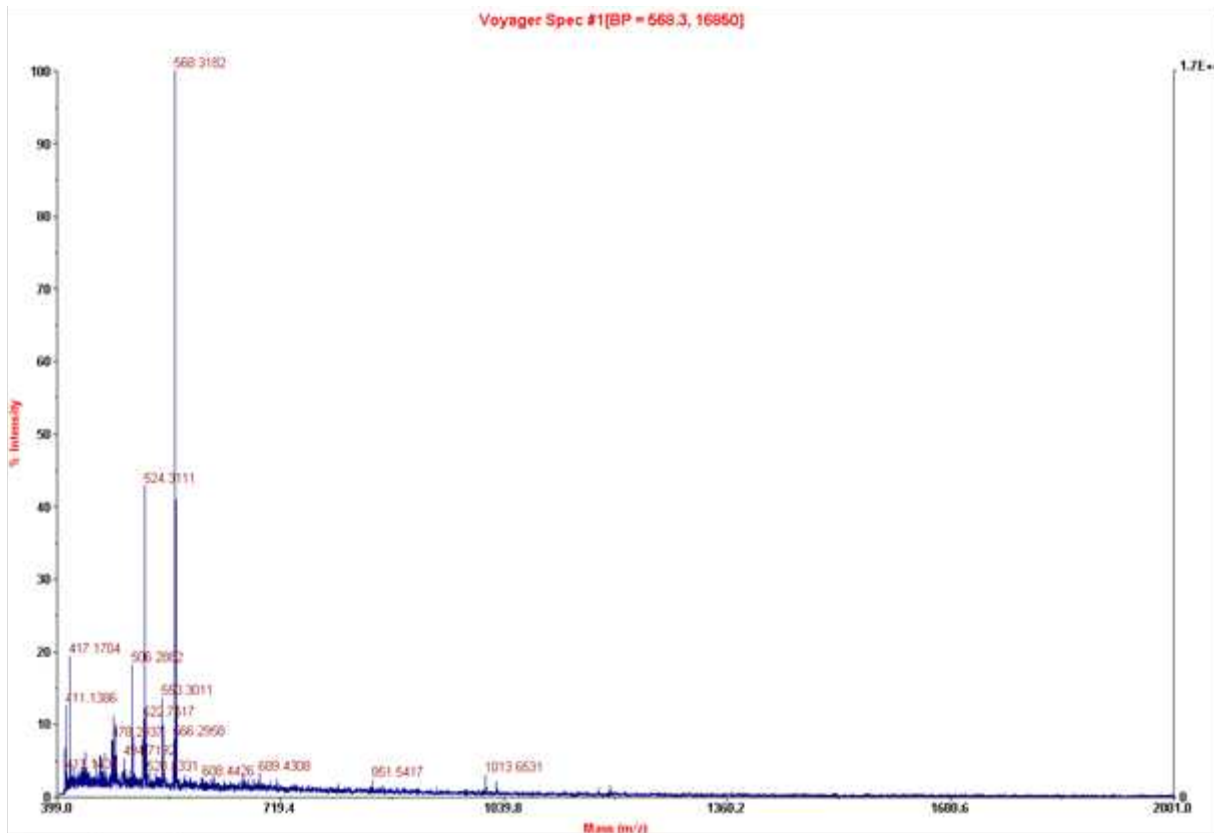


Fig 62. 3년 오계 다리육 효소가수분해 펩타이드 Maldi-TOF분자량 분석 그래프. 라. 가슴육을 이용한 멜라닌 추출

(1) 구성아미노산 분석결과

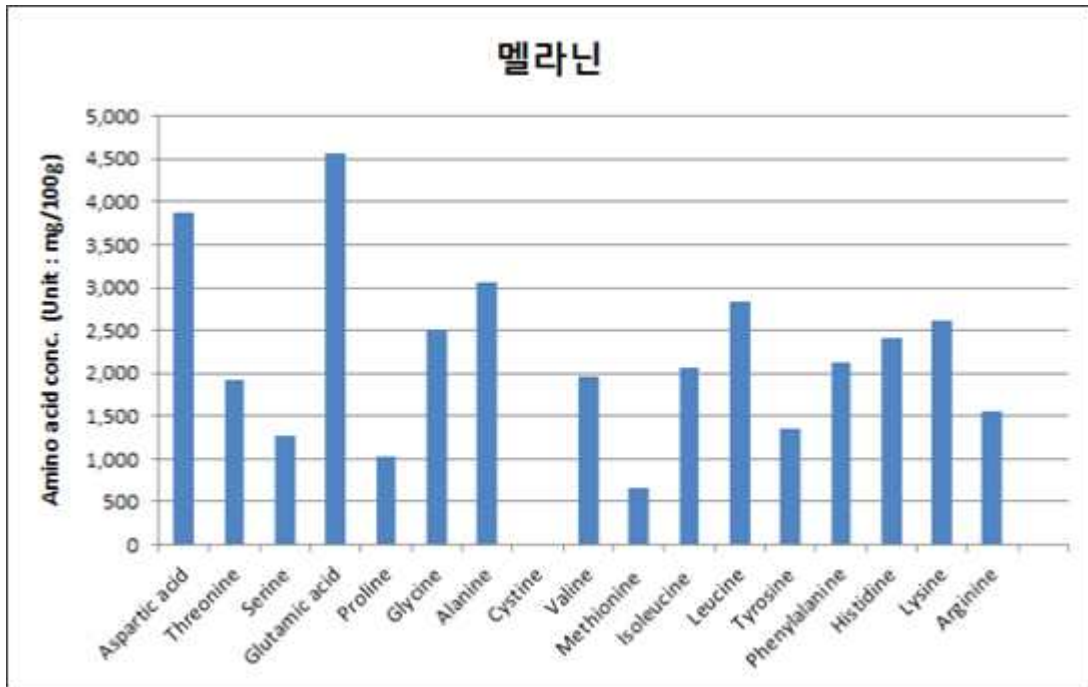


Fig 63. 오게가슴육을 이용한 멜라닌 추출물 구성아미노산 측정.

(2) 멜라닌 원소분석 결과

Table 33. 표준멜라닌과 오게가슴육 멜라닌 추출물의 원소측정.

(Unit : %)

Sample Name	Nitrogen	Carbon	Hydrogen	Sulphur	Oxygen
Melanin (Sigma)	6.434	49.914	3.106	0	20.399
오게멜라닌	7.074	43.908	7.254	0.375	22.009

(3) 멜라닌 SEM 분석 결과

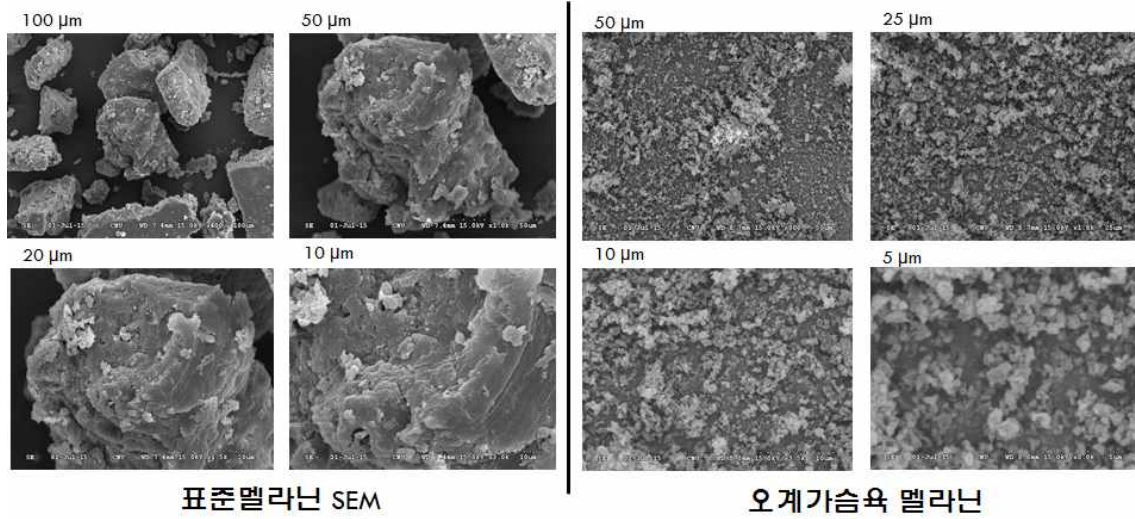


Fig.64. 표준멜라닌과 오계가슴육 멜라닌 추출 SEM분석

(4) FT-IR분석 결과

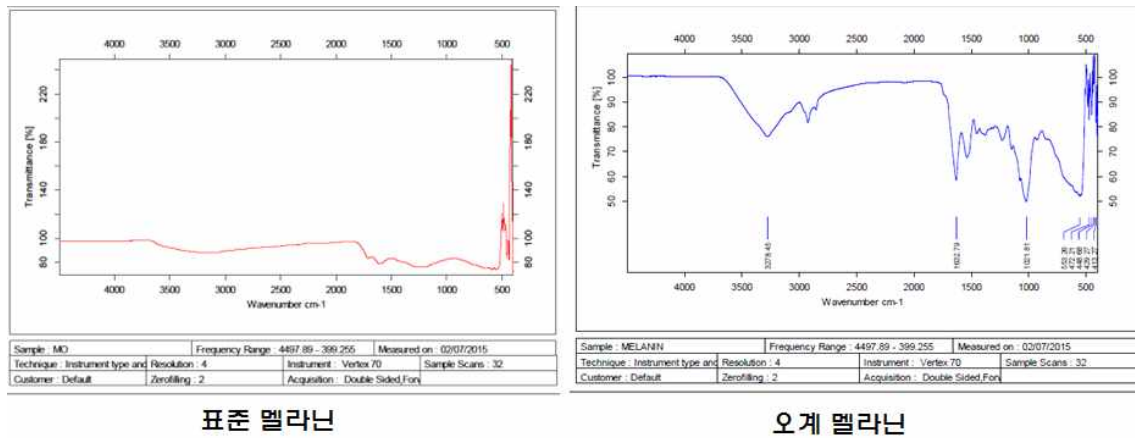


Fig.65. 표준멜라닌과 오계가슴육 멜라닌 추출 FT-IR분석

마. 오계발 및 뼈로부터 기능성 콜라겐 추출

(1) 콜라겐 효소활성도 결과

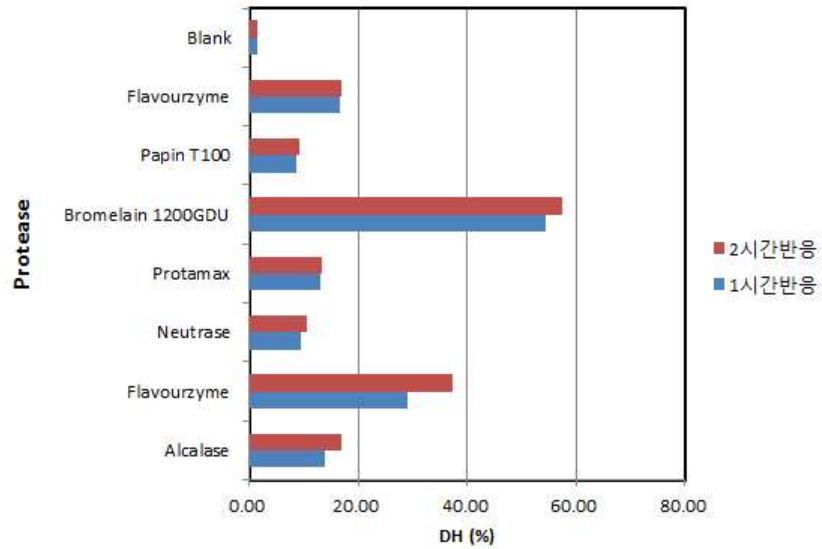


Fig.66. 오계 콜라겐추출물을 이용하여 효소활성도 가수분해 결과.

바. 연산오계 부위별 프로티아제를 이용한 펩타이드 생산 및 항산화 특성

(1) 연산 오계육 프로티아제를 이용한 펩타이드 생산 및 항산화 특성

(가) 연산 오계육 단백질 가수분해물 수율

6종의 효소를 각각 이용하여 가수분해물을 제조하고 가수분해를 위한 추출분말의 무게/오계육 무게×100으로 수율을 계산하였다(Table 34). 수율을 확인 한 결과 papain hydrolysate의 수율이 27.2%로 가장 높았으며, protamex hydrolysate의 수율은 17.9로 가장 적은 수율을 보였다 (Table 34).

Table 34. Yields of protein hydrolysates produced from Yeonsan Ogae meat using different commercial enzymes. Enzyme reaction was performed at optimal conditions supplied from company.

Hydrolysates	Yield of hydrolysate(%)
Alcalase hydrolysate	18.2
Bromelain hydrolysate	23.5
Flavourzyme hydrolysate	26.3
Neutrase hydrolysate	21.6
Papain hydrolysate	27.2
Protamex hydrolysate	17.9

(나) 오계육 단백질 가수분해물의 항산화 특성

오계육을 프로티아제 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex를 이용하여 단백질 가수분해물을 제조하였다. 효소 반응 최적 조건들은 효소 공급회사에서 제공한 조건으로 수행을 하였다. 효소 반응 후에 원심분리를 이용하여 가수분해물의 반응하지 않은 부분과 반응생성물을 분리하였다. 반응 생성물들은 동결건조기에서 분말화 하였다.

① 1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능

일반적으로 산화과정에서 항산화제는 프리라디칼과 반응을 하여 안정한 화합물을 생산하여 산화과정을 종결한다. 이러한 물질 중에서 DPPH는 메탄올 용매에서 안정한 라디칼을 유지하며 517 nm에서 최대흡광도를 나타내기 때문에 천연물(natural compounds)의 환원반응에 널리 사용이 되고 있다. 이러한 DPPH는 항산화제와 같은 프로톤공여(proton donating) 물질을 만나면 라디칼이 소거(scavenging)된다. 그리고 항산화제의 프로톤공여 능력에 따라 용액의 색이 퍼플에서 노란색으로 변한다. 따라서 DPPH는 펩타이드 및 천연 항산화 물질의 항산화력을 비교하는데 매우 유용한 분석 수단으로 사용이 되어왔다.

Fig. 67은 서로 다른 프로티아제 및 가수분해 조건에서 생산된 가수분해물의 DPPH 항산화 능력 분석 결과를 보여준다. 오계육 가수분해물들의 DPPH 항산화 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 이러한 이유는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 가수 분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 가수분해물들의 DPPH 항산화 능력은 약 12.5에서 80% 이상 분포를 보여 주었는데 bromelain, flavourzyme, papain, 및 protamex의 소거능은 비슷하였지만 alcalase 및 neutrase에 의한 가수분해물들은 비교적 낮았다. 연구 결과에 따르면 펩타이드들의 항산화 능력은 1) 구성아미노산 중에서 비극성 및 방향족 아미노산, 2) 분자량이 작을수록 항산화 능력이 높은 것으로 알려졌다. 이러한 연구 결과들은 사용 된 프로티아제 효소들에 따라 항산화능력이 서로 다른 이유를 설명할 수 있다.

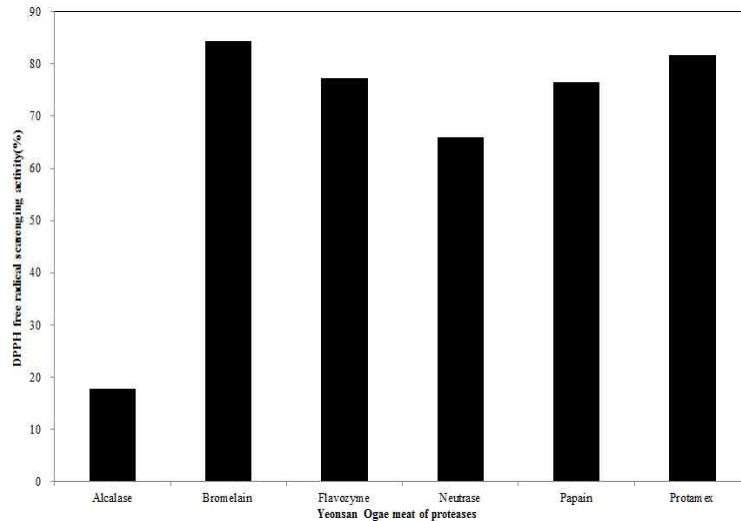


Fig. 67. The degree of DPPH radical scavenging activity of Yeonsan Ogae meat protein hydrolysates. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

② 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능

슈퍼옥사이드 라디칼 (superoxide radical)은 굉장히 유독한 라디칼 종(specie)이며 무수한 생체적 작용에서 생성된다. 그리고 직접적인 과산화지방질화 (lipid peroxidation)를 주도하진 못하지만 과산화수소나 하이드록실 라디칼과 같은 굉장히 반응성이 높은 물질의 전구물 (precursor)이다. 생세포는 천부적으로 효소 산화방지제의 생물학적 방어 기제를 갖춰 reactive oxygen species/reactive nitrogen species (ROS/NOS)를 무해한 분자들로 전환하는 원인이 된다. 그 기제들 중 하나로는 superoxide dismutase (SOD)를 통해 superoxide anion ($\cdot O_2^-$)를 O_2 와 H_2O_2 로 전환한다. 하지만, 생체의 능력으로 라디칼을 제거함은 지나치게 생산되는 프리 라디칼 (free radical)에 압도될 수 있다. Fig. 68는 서로 다른 프로티아제를 사용하여 생산된 오계육 단백질 가수분해물의 superanion 소거 항산화 능력 분석 결과를 보여준다. 오계육 가수분해물의 superanion 소거 항산화 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해물들의 superanion 소거 항산화 능력은 약 45.0에서 80.0% 이상 분포를 보여 주었는데 DPPH 소거 항산화 능력과는 달리 alcalase 및 bromelain에서 높았고 나머지에서는 비슷한 분포를 보여 주었다. 이러한 결과는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 가수분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 또한 가수분해물에 따라서 소거하는 라디칼의 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다.

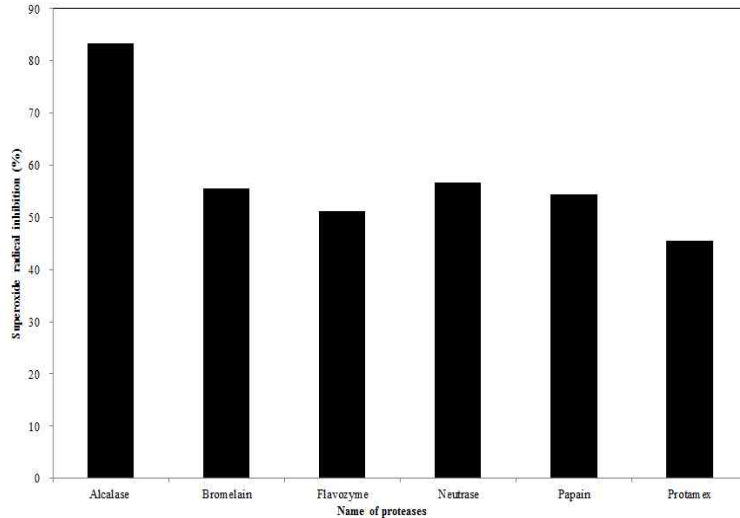


Fig. 68. The degree of superoxide radical scavenging activity of Yeonsan Ogae meat protein hydrolysates. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

③ 하이드록시 라디칼 소거능

하이드록실 라디칼은 H_2O_2 와 펜톤 반응에서의 Fe (II) 이나 Cu (II)와 같은 금속이온 사이의 작용에서 발생하는데, 굉장히 반응성이 높고, 수명이 짧으며 DNA, 단백질, 그리고 지질을 파괴적으로 수산화한다고 믿어지고 있다. 또한 하이드록실 라디칼은 방향족 화합물(aromatic compound)와 작용해 hydroxycyclohexadienyl radical을 생성할 수 있고 더 나아가서 산소와 작용해 peroxy radical을 생성하거나 phenoxyl radical로 분해된다. 그러므로 하이드록실 라디칼 제거는 이러한 라디칼에 의해 유발되는 산화스트레스로 인해 생기는 여러 가지 질병들을 방지하는데 필요하다. Fig. 69는 서로 다른 프로티아제를 사용하여 생산된 오계육 단백질 가수분해물의 하이드록시 라디칼 소거 항산화 능력 분석 결과를 차이점을 보여준다. 오계육 가수분해물들의 하이드록시 라디칼 소거 항산화 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해물들의 항산화 능력은 약 10.0에서 70.0% 이상 분포를 보여 주었는데 슈퍼옥사이드 라디칼 소거 항산화 능력과는 달리 alcalase에서 제일 낮았고 나머지 효소들에서는 약 40% 이상을 보여주어 DPPH 라디칼 소거능 경우와 비슷한 경향을 보여주었다. 이러한 결과는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 가수분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 연구 결과에 따르면 펩타이드들의 항산화 능력 분자량이 작을수록 높은 것으로 알려졌다. 또한 다른 연구자들의 연구결과에 따르면 하이드록실 라디칼 제거력은 증가는 펩티드 크기에 따라 저하되었고, 이것은 낮은 분자량을 가진 펩티드가 더 높은 분자량을 가진 펩티드보다 강한 하이드록실 라디칼 제거제로서 더 효과가 좋다고 보고하였다. 이것은 가수분해물 중에 하이드록실 라디칼 제거 펩타이드와 제거를 하지 않는 펩티드의 비례에 따라서 항산화력이 다르게 나타난다는 것과 일치할 한다.

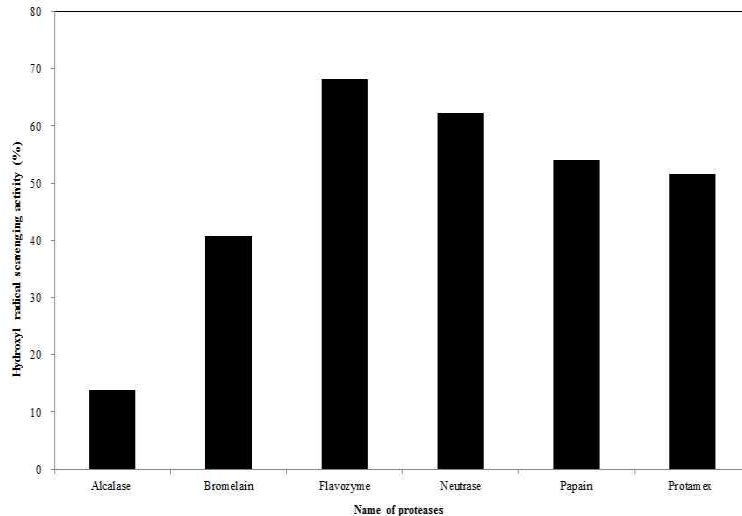


Fig. 69. The degree of hydroxy radical scavenging activity of Yeonsan Ogae meat protein hydrolysates. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

④ Fe²⁺ 킬레이션 능력

화합물의 금속 킬레이트력은 산화된 금속이온의 산화 환원 전위를 낮춤으로서 안정화시켜 화합물의 잠재적인 항산화 활동성에 대한 지시약으로서 쓰일 가능성이 높다(Girgih et al., 2010). 금속 이온을 킬레이트화 하는 가수 분해물들에 대한 능력을 Fig. 70에서 보여준다. 본 연구에서 가수 분해물들의 킬레이션 능력은 사용 효소들에 상관 없이 크게 차이점이 없었다. 가수 분해물들의 킬레이션 능력은 약 60% 이상에서 결정이 되었다. 이러한 결과는 효소에 따른 가수분해물의 DPPH, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능력이 다르게 나타 난 것과는 대조적이었다. 다른 연구 결과를 보면 금속 킬레이트 능력은 단백질의 종류, 효소 종류 그리고 효소 농도에 큰 영향을 받는 것으로 보고하고 있다. Alcalase 가수 분해 산물은 pepsin-pancreation 가수 분해 산물보다 금속 킬레이트력이 현저히 더 높았고, 이것은 각 효소에서 생성된 펩티드 종류가 다른 것 때문일 가능성도 있다. 가수 분해 산물의 금속 킬레이트력 또한 86.43%에서 93.09% 증가한 효소 농도에 따라 상승했고, 이것은 효소 단계가 증가함에 따라 더 많은 수의 펩티드가 작용(liberation)된 것임을 알 수 있다. 또한 금속 킬레이션 능력은 펩티드 크기가 증가할 때 감소했으며, 이 의미는 낮은 분자량의 펩티드가 금속 킬레이션에 더 큰 효과를 보인다고 제시한다.

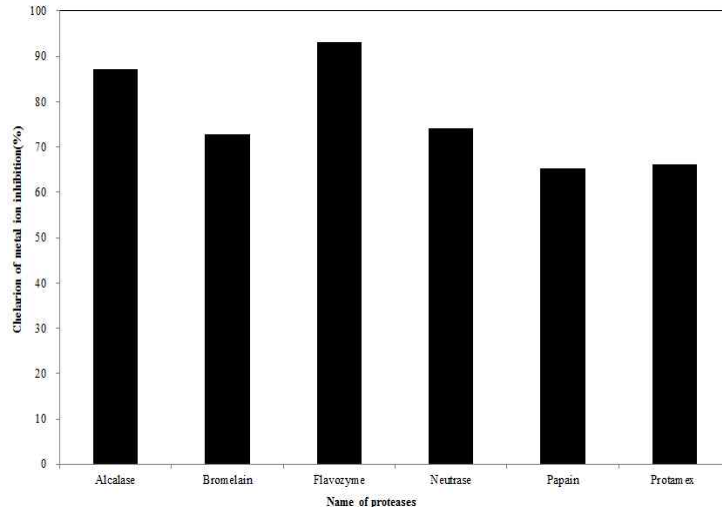


Fig. 70. The degree of chelation activity of Yeonsan Ogae meat protein hydrolysates. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

⑤ 가수 분해물의 항산화 저해농도

오계육 단백질 가수분해물들은 사용된 효소의 종류에 따라서 DPPH 소거능, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 금속 킬레이션 능력이 다르게 나타났다. DPPH 소거능 과 하이드록시 라디칼 소거능 소거능은 가수분해물에 대하여 능력은 다르지만 경향은 유사하였고, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능과 금속 킬레이션 능력에 차이는 있지만 유사한 경향을 보여주었다. 이러한 이유들은 사용 효소마다 생산한 가수 분해물의 분자량의 차이와 펩타이드 종류의 차이에 원인이 있다고 볼 수 있다. 가수 분해물들의 항산화 저해 능력을 비교하기 위해서 각각 가수 분해물에 대하여 IC₅₀ 평가하였다. 전체적으로 보면 항산화 저해능은 사용한 효소 및 항산화 저해 대상에 따라 크게 차이가 있었다(Table. 35).

Alcalase에 의하여 생산된 가수 분해물은 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 DPPH 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 DPPH 소거능 저해농도는 각각 1.2, 5.80, 12.40 및 44.7 mg/ml 이었다. bromelain에 의하여 생산된 가수 분해물은 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, DPPH 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 DPPH 소거능 저해농도는 각각 3.08, 6.8, 16.32 및 6.10 mg/ml 이었다. Flavourzyme에 의하여 생산된 가수 분해물은 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, DPPH 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 DPPH 소거능 저해농도는 각각 2.05, 8.20, 8.14 및 10.1 mg/ml 이었다. Neutrase에 의하여 생산된 가수 분해물은 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, DPPH 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 DPPH 소거능 저해농도는 각각 0.83, 7.20, 10.97 및 23.9

mg/ml 이었다. Papain에 의하여 생산된 가수 분해물은 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, DPPH 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 DPPH 소거능 저해농도는 각각 2.19, 11.2, 13.12 및 17.6 mg/ml 이었다. Protamex에 의하여 생산된 가수 분해물은 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, DPPH 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 DPPH 소거능 저해농도는 각각 2.63, 11.2, 13.12 및 17.6 mg/ml 이었다.

Table. 35. Inhibition concentration (IC₅₀) of antioxidant capacity of protein hydrolysate of Ogae meat.

Hydrolysates	Antioxidant activities			
	DPPH radical scavenging activity	Superoxide anion radical scavenging activity	Hydroxy radical scavenging activity	Fe ²⁺ chelating activity
				(mg/ml)
Alcalase hydrolysate	44.7	5.80	12.40	1.20
Bromelain hydrolysate	6.10	6.80	16.30	3.08
Flavourzyme hydrolysate	10.1	8.20	8.14	2.05
Neutrase hydrolysate	23.9	7.20	11.90	0.83
Papain hydrolysate	20.1	7.40	12.10	2.19
Protamex hydrolysate	17.6	11.2	13.10	2.63

(다) 연산 오계육 펩타이드 아미노산 분석

오계육 단백질 가수분해물들은 사용된 효소의 종류에 따라 아미노산의 분포가 다르게 나타났다. Alcalase, bromelain, flavourzyme 효소로 가수분해 된 아미노산의 분포를 Fig. 71.와 같다. A는 alcalase 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산의 분포, B는 bromelain 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산의 분포, C는 flavourzyme 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산 분포를 나타낸 것이다. A 그림에서는 alcalase 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 glutamic acid이 16%로서 가장 높은 함량이 나타났고, 필수아미노산 분포 중에서는 leucine이 10.83%로서 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. B 그림에서 보면 bromelain 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 lysine이 15.59%로서 가장 높은 함량이 나타났고, 필수아미노산 분포 중에서도 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. C 그림에서 보면 flavourzyme 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수 아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine,

phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 leucine이 11.61%로서 가장 많은 함량을 차지하였고, 필수아미노산 분포 중에서도 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. 또한 alcalase, bromelain, flavourzyme 효소의 아미노산 분포에서는 tryptophan이 발견되지 않았으며, 특히 bromelain 효소에서는 cysteine이 발견되지 않아서 가장 적은 종류의 아미노산 조성을 보여 주었다.

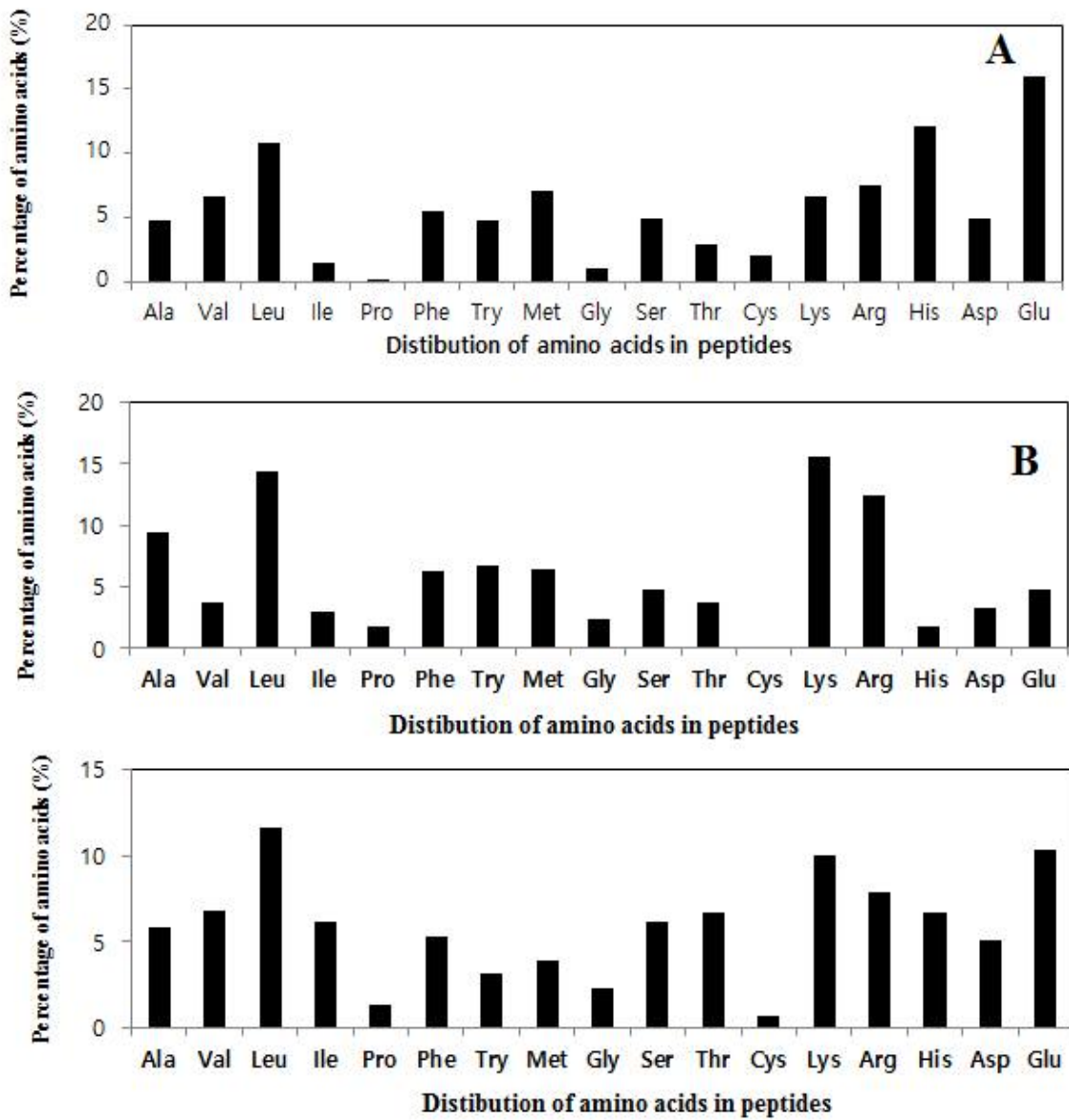


Fig. 71. Amino acid composition of protein hydrolysates of black body fowl(Yeonsan Ogae) meat. A, B, and C Fig. s show the distribution of amino acids of hydrolysates of alcalase, bromelain, and flavourzyme, respectively.

오계육 단백질 가수분해물들은 사용된 효소의 종류에 따라 아미노산의 분포가 다르게 나타났다. Neutrase, papain, protomex 효소로 가수분해 된 아미노산의 분포를 Fig. 72에서 확인할 수 있다. A는 neutrase 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산의 분포, B는 papain 효소를 이

용하여 가수분해 된 아미노산의 분포, C는 protomex 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산 분포를 나타낸 것이다. A 그림에서는 neutrase 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 histidine이 27.45%로서 가장 높은 함량이 나타났고, 필수아미노산 분포 중에서는 leucine이 17.56%로서 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. B 그림에서 보면 papain 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 lysine이 15.59%로서 가장 높은 함량이 나타났고, 필수아미노산 분포 중에서도 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. C 그림에서 보면 protamex 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 histidine이 27.08%로서 가장 많은 함량을 차지하였고, 필수아미노산 중에서는 leucine이 10.54%로서 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. 또한 neutrase, papain, protamex 효소의 아미노산 조성에서 tryptophan은 발견되지 않았으며, 총 아미노산 함량이 가장 높게 나타난 것은 flavourzyme 효소이고 이종의 43.73%가 필수 아미노산 함량인 것으로 나타났다.

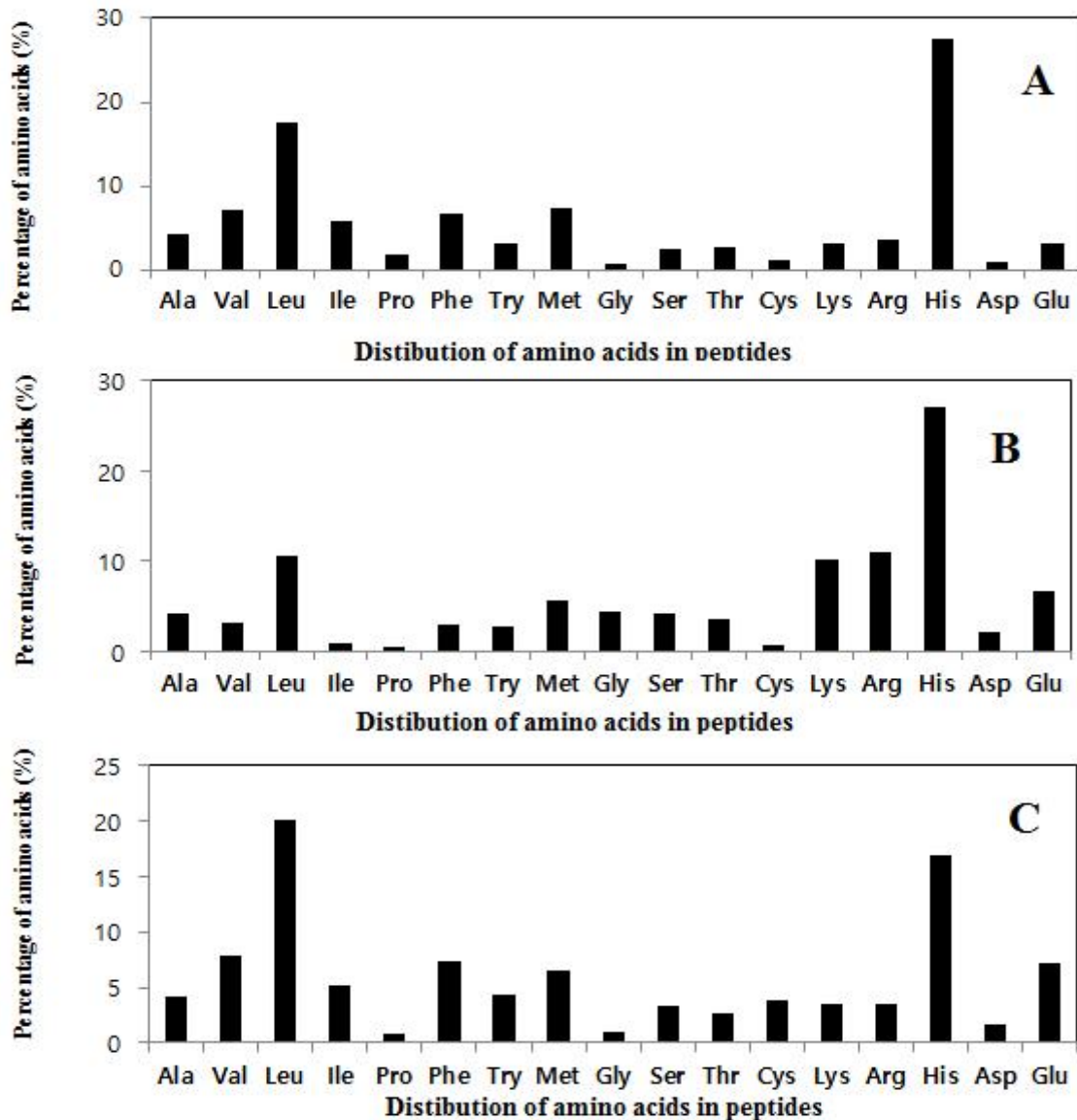


Fig. 72. Amino acid composition of protein hydrolysates of black body fowl(Yeonsan Ogae) mea. A, B, and C Fig. s show the distribution of amino acids of hydrolysate of neutrase, papain, and protamex respectively.

Alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex 효소로 가수분해 시킨 오계육 가수분해물의 구성 아미노산을 극성 아미노산, 비극성 아미노산, 양이온 아미노산, 음이온 아미노산으로 분류하여 Table. 36. 에 나타내었다. 극성 아미노산의 함량은 alcalase 효소로 가수분해 시켰을 때 serine이 가장 높은 함량을 보여주고, papain 효소로 가수분해 시켰을 때에는 glycine이 가장 높은 함량을 보여주며, bromelain, neutrase, protamex 효소로 가수분해 시켰을 때에는 tyrosine이 가장 높은 함량을 보여주었고, flavourzyme 효소로 가수분해 시켰을 때에는 threonine이 가장 높은 함량으로 보여 진다. 비극성 아미노산의 함량은 모든 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex 효소에서 가수분해 시켰을 때 leucine이 가장 높은 함량으로 보여 진다. 양이온 아미노산의 함량은 bromelain, flavourzyme 효소로 가수분해 시켰을 때 lysine이 가장 높은 함량으로 보여 지고, alcalase, neutrase, papain,

protamex 효소로 가수분해 시켰을 때는 histidine이 가장 높은 함량으로 보여 졌으며, 음이온 아미노산의 함량은 모든 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex 효소로 가수분해 시켰을 때에는 glutamic acid가 가장 높은 함량으로 보여 졌다.

Table. 36. Characteristics of amino acids of protein hydrolysates produced from black body fowl(Yeonsan Ogae) meat using various enzymes.

Amino acids	Alcalase	Bromeline	Flavourzyme	Neutrase	Papain	Protamex
	Comostion of percent of amino acids (%)					
Nonpolar side chains						
Proline	0.28	1.71	1.38	1.94	0.36	1.38
Alanine	4.79	9.49	5.89	4.22	4.18	5.89
Valine	6.69	3.64	6.77	7.24	3.15	6.77
Methionine	7.06	6.37	3.89	7.34	5.60	3.89
Isoleucine	1.58	2.97	6.20	5.89	0.90	6.20
Leucine	10.83	14.40	11.61	17.56	10.54	11.61
Phenylalanine	5.57	6.27	5.31	6.68	2.94	5.31
Polar side chains						
Threonine	2.91	3.70	6.69	2.78	3.57	6.69
Serine	4.93	4.73	6.16	2.47	4.19	6.16
Glycine	1.02	2.33	2.28	0.89	4.28	2.28
Cystine	2.13	N. D.	0.68	1.18	0.75	0.68
Tyrosine	4.77	6.74	3.19	3.14	2.73	3.19
Charged side chains						
Basic						
Histidine	12.18	1.71	6.69	27.45	27.08	6.69
Lysine	6.71	15.59	9.95	3.13	10.20	9.95
Arginine	7.59	12.35	7.89	3.73	10.98	7.89
Acids						
Aspartic acid	4.97	3.21	5.12	1.10	2.01	5.12
Glutamic acid	16.00	4.80	10.33	3.27	6.54	10.33
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

N. D. : Not detected

(라) RF-HPLC에 의한 분석

RF-HPLC 분석결과 standard 펩타이드는 1. GLy-Tyr, 2. Val-Tyr-Val, 3. Met enkephalin, 4. Leu enkephalin, 5. Angiotensin II 의 5가지 표준 샘플이다. 표준샘플의 각각의 분자량은 1. Gly-Tyr 238.2, 2. Val-Tyr-Val 379.5, 3. Met enkephalin acetate 573.7 4. Leu enkephalin 555.6, 5. Angiotensin II acetate 1046.2의 분자량을 가지고 있다. Fig. 73 의 각 A, B, C의 그래프는 효소별로 가수분해 된 그래프를 표준 peptide샘플과 비교함으로써 확인 하였다. A그래

프는 alcalase 효소로 가수분해한 것으로 alcalase 효소의 cleave는 glutamate, leucine, tyrosine, lysine, glutamine 이다. 그래프 B는 bromelain 효소로 가수분해 한 것이며 효소의 기질은 lysine, alanine, tyrosine, glycine이다. C 그래프는 flavourzyme 효소로 가수분해한 것으로 효소의 기질부위는 tryptophan, isoleucine, phenylalanine, throsine, leucine, valine, lysine, arginine, serine, threonine, alanine 이다. HPLC 분석에서 표준샘플과 비교 한 결과 모두 표준 펩타이드 분포 안에 들어간다. 그러나 각 효소마다 펩타이드 분포는 피크의 위치와 수치가 다르다. A는 크게 세 개로 볼 수 있으며, 왼쪽의 피크부터 분자량 66.7, 81.9, 247 mV의 분자량 값을 나타내었다. B는 그래프의 두 개의 피크의 분자량 값은 128.8, 82.3 mV의 분자량 값을 나타내었다. 그래프 C의 두개의 큰 피크를 볼 수 있으며 55.3, 65.4 mV 분자량 값을 볼 수 있다. 결과적으로 다른 효소마다 펩타이드의 생산이 다른 것으로 판명된다.

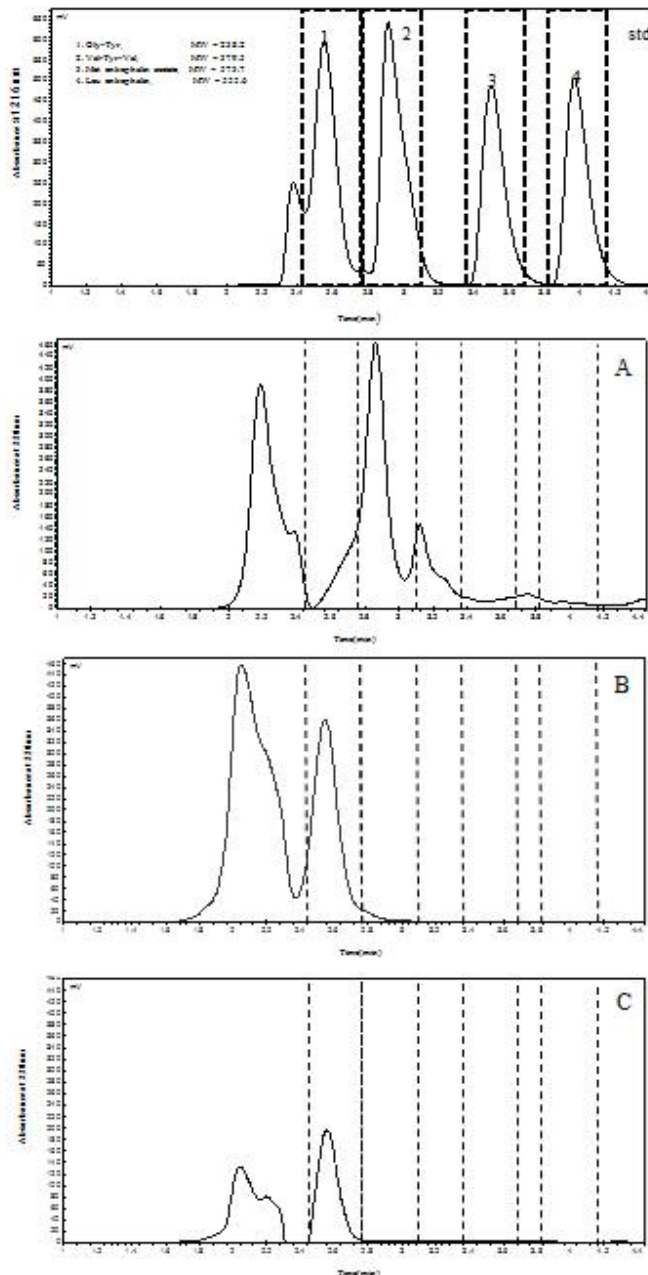


Fig. 73. RF-HPLC chromatograms of standard peptides, hydrolysate of Yeonsan Ogae meat using alcalase (A), hydrolysate of Yeonsan Ogae meat using bromelain (B), and

hydrolysate of Yeonsan Ogae meat using flavourzyme (C). Standard peptides 1, 2, 3, and 4 represent gly-tyr, val-tyr-val, met enkephalin, and leu enkephalin, respectively.

HPLC 분석결과 standard 펩타이드는 1. GLy-Tyr, 2. Val-Tyr-Val, 3. Met enkephalin, 4. Leu enkephalin, 5. Angiotensin II 의 5가지 표준 샘플이다. 표준샘플의 각각의 분자량은 1. Gly-Tyr 238.2, 2. Val-Tyr-Val 379.5, 3. Met enkephalin acetate 573.7, 4. Leu enkephalin 555.6, 5. Angiotensin II acetate 1046.2의 분자량을 가지고 있다. Fig. 74의 각 A, B, C의 그래프는 효소별로 가수분해된 그래프를 표준 peptide 샘플과 비교함으로써 확인 하였다. A 그래프는 neutrase 효소로 가수분해한 것으로 cleave는 phenylalanine, throsine, leucine, valine 이다. 그래프 B는 papain 효소로 가수분해 된 것이며 효소의 기질부위는 phenylalanine, throsine, leucine, valine, lysine, arginine 으로 분해가 된다. C 그래프는 protamex 효소로 가수분해한 것으로 tryptophan, isoleucine, proline, phenylalanine, thyrosine, leucine, valine 이다. HPLC 분석에서 표준샘플과 비교 한 결과 모두 표준 펩타이드 분포 안에 들어간다. 그러나 각 효소마다 펩타이드 분포는 피크의 위치와 수치가 다르다. A는 크게 두 개로 볼 수 있으며, 왼쪽의 피크부터 분자량 96.1, 41.8 mV의 분자량 값을 나타내었다. B는 그래프의 2개의 피크의 분자량 값은 83.3, 49.5 mV의 분자량 값을 나타내었다. 그래프 C의 2개의 큰 피크를 볼 수 있으며 13, 49.7 mV 분자량 값을 볼 수 있다. 결과 적으로 다른 효소마다 펩타이드의 생산이 다른 것으로 판명된다.

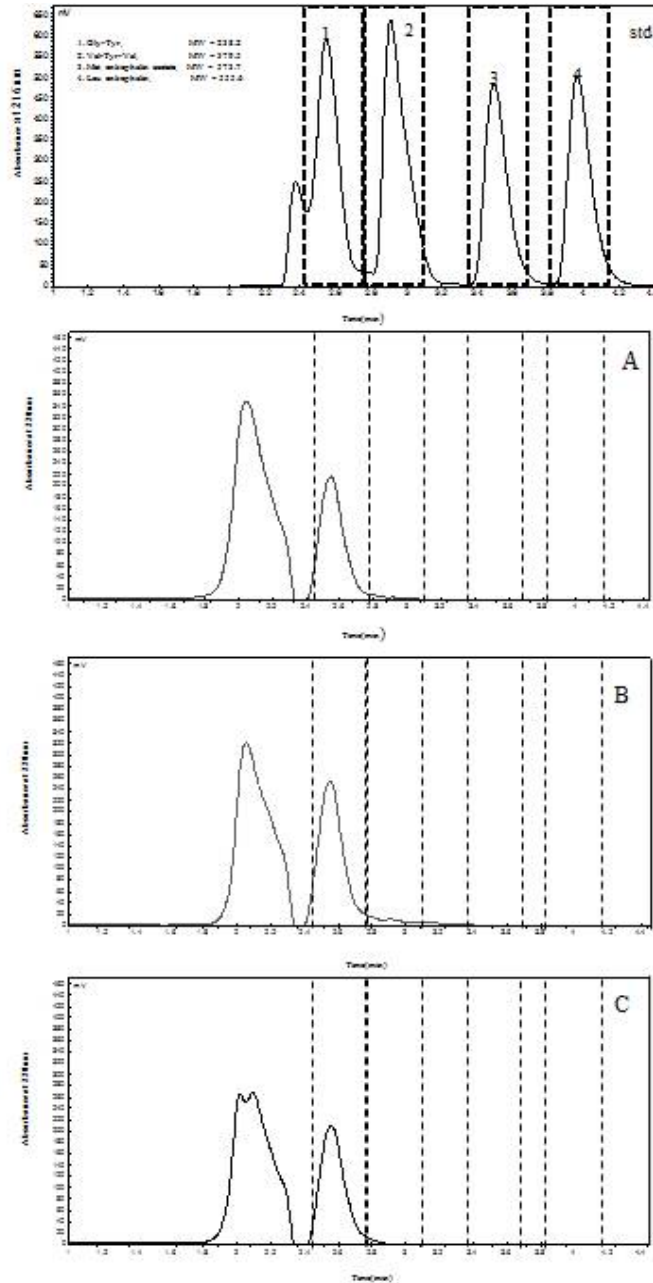


Fig. 74. RF-HPLC chromatograms of standard peptides, hydrolysate of Yeonsan Ogae meat using alcalase (A), hydrolysate of Yeonsan Ogae meat using bromelain (B), and hydrolysate of Yeonsan Ogae meat using flavozyme (C). Standard peptides 1, 2, 3, and 4 represent gly-tyr, val-tyr-val, met enkephalin, and leu enkephalin, respectively.

(마) MALDI-TOF에 의한 분석

Protease를 이용하여 가수분해 한 오계육 가수분해물의 분자량을 결정하기 위하여, MALDI-TOF-MS(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry) 분석을 수행하였다. 오계육 가수분해물 샘플 2 μ L을 광택 스틸 384 표적 판에 붙였다. 10mg/mL of α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) in 0.1% TFA 와 ACN을 1:1 로 mix 한 solution을 혼합하고 건조시켰다. 각 샘플은 flex Control 3.0 질량분석기(Bruker Daltonics, 독일)의 MALDI TOF MS를 이용하여 분석하였다. 100~4,000 m/z에서 양이온화 및

반사 모드에서 300 레이저 샷으로부터 데이터를 축적하여 획득하였다. Fig.75 에서 보는 바와 같이 오계육을 alcalase, bromelain, flavourzyme을 이용하여 가수분해한 가수분해물에 대한 분자량을 MALDI-TOF 질량 분석기를 이용하여 분석한 결과 alcalase를 이용하여 가수분해 한 경우 펩타이드의 분자량 범위는 약 590 ~ 3,220 Da 이었고, 같은 조건에서 bromelain 효소를 이용하여 처리한 경우 펩타이드의 분자량 범위는 약 870 ~ 2,790 Da 범위이었다. 또한 flavourzyme을 이용하여 가수분해한 펩타이드의 분자량의 범위는 1,240 ~ 3,390 Da 이었다. 이들 결과로부터 일반적인 육계의 분자량 범위에 비해 크게 감소한 것을 알 수 있다.

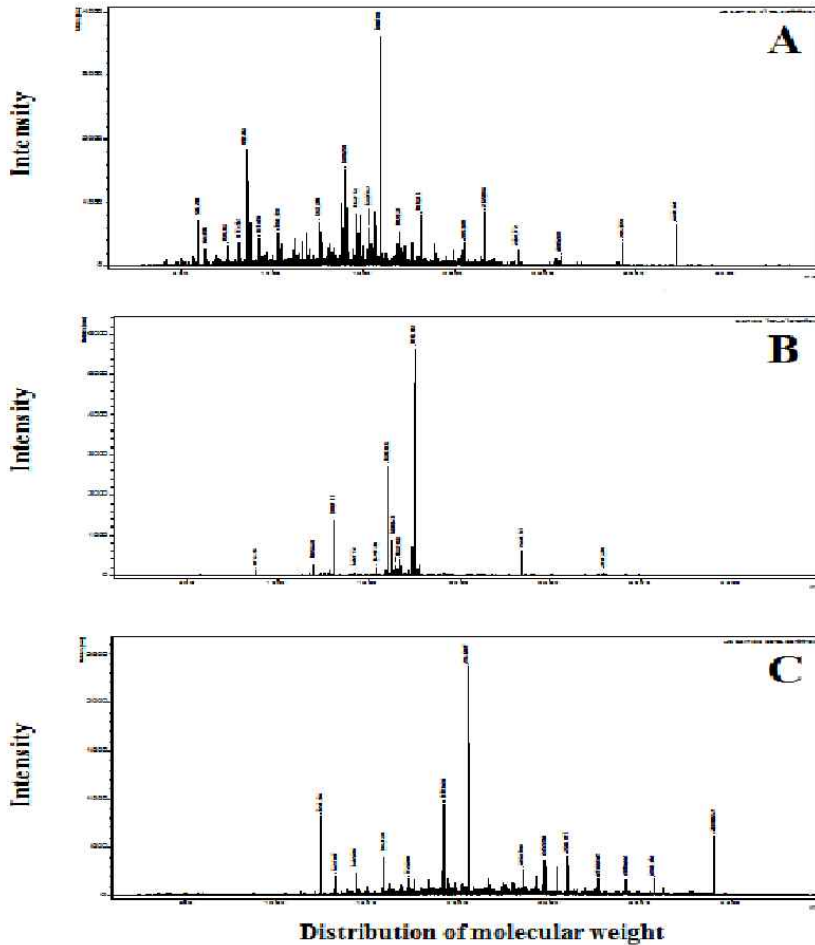


Fig. 75. The molecular weight distribution of protein hydrolysates of Yeonsan Ogae meat. A, B, and C chromatogram of MALDI-TOF represent peak intensity of peptides of hydrolysate using alcalase, bromelain, and flavourzyme, respectively. A, B, and C graph is distribution of molecular weight in peptides of hydrolysate using alcalase, bromelain, and flavourzyme, respectively.

오계육을 neutrase, papain, protamex 이용하여 가수분해한 가수분해물에 대한 분자량을 MALDI-TOF 질량 분석기를 이용하여 분석한 결과 Fig.76 에서 보는 바와 같이 neutrase를 이용하여 가수분해 한 경우 펩타이드의 분자량 범위는 약 580 - 2,720 Da 이었고, 같은 조건에서 papain 효소를 이용하여 처리한 경우 펩타이드의 분자량 범위는 약 430 - 1,980 Da 범위이었다. 또한 flavourzyme을 이용하여 가수분해한 펩타이드의 분자량의 범위는 560 - 3,050 Da 이었다. 이들 결과로부터 일반적인 육계의 분자량 범위에 비해 크게 감소한 것을 알 수 있었으며, 특히 papain 효소를 이용하여 가수분해 한 펩타이드의 경우 분자량의 범위가 매우 좁았으며, 분자량의 범위가 매우 크게 감소한 것을 확인하였다. 이 결과는 오계육으로부터 수득한 가수분해물이 인체 내로 신속하게 유입 될 수 있다는 것을 의미한다.

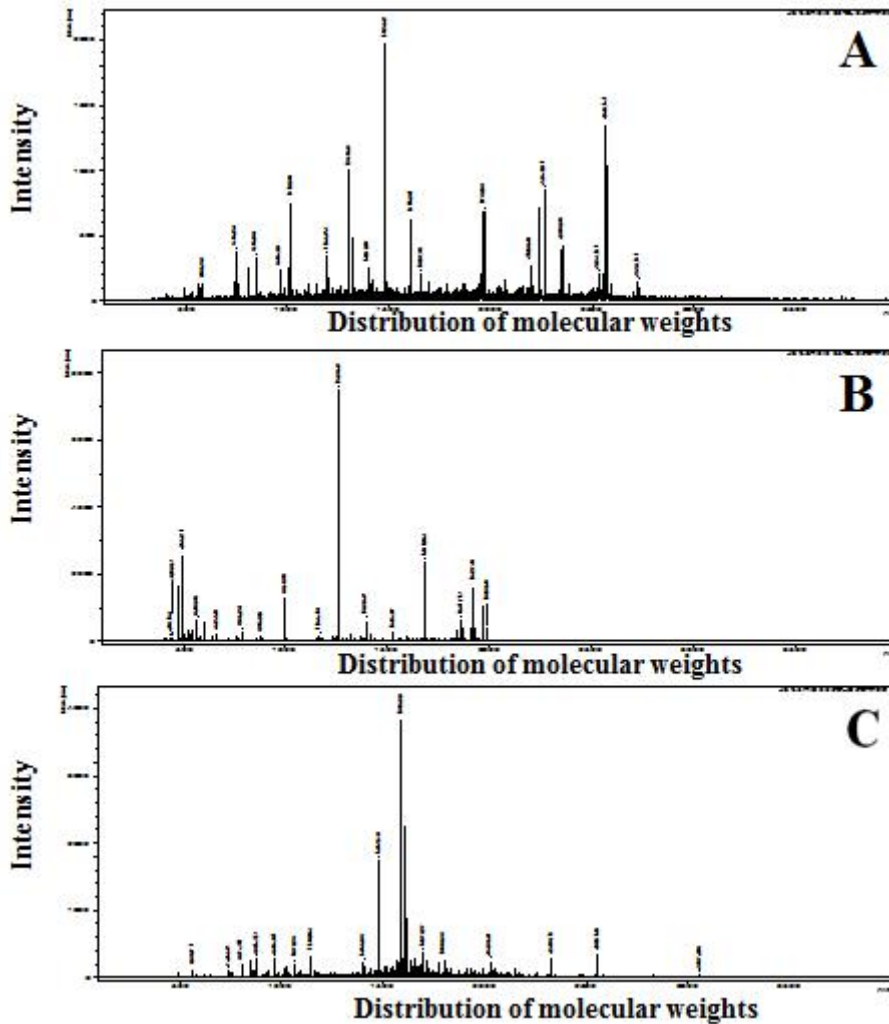


Fig. 76. The molecular weight distribution of protein hydrolysates of Yeonsan Ogae meat. A, B, and C chromatogram of MALDI-TOF represent peak intensity of peptides of hydrolysate using neutrase, papain, protamex, respectively. A, B, and C graph is distribution of amolecular weight in peptides of hydrolysate using neutrase, papain, and protamex.

분자량의 분포를 평균으로 확인 한 결과를 Fig. 77에 나타내었다. Flavonoid을 이용하여 가수분해 한 펩타이드 샘플의 경우 2,204 Da으로 가장 분자량의 크기가 크게 확인되었으며, protamex 효소를 이용하여 가수분해 한 펩타이드의 경우 1,508 Da 으로 가장 분자량의 크기가 작은 것을 확인하였다. Alcalase 효소를 이용하여 가수분해 한 펩타이드 샘플은 1,584 Da, bromelain은 1,650 Da 등으로 나타났다.

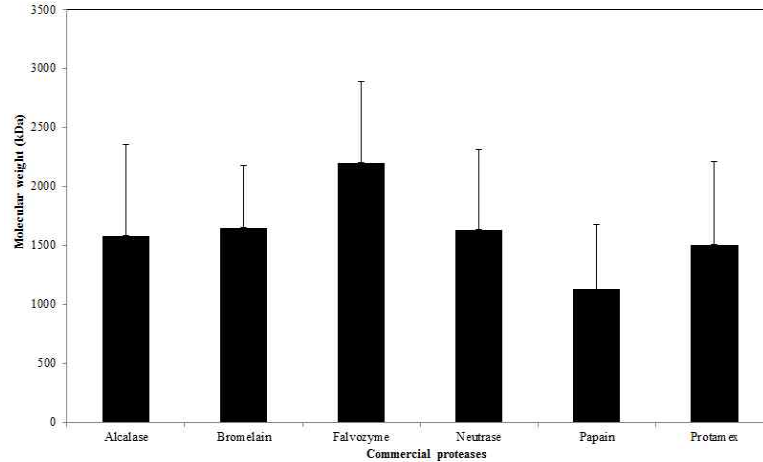


Fig. 77. The average molecular weight of hydrolysate Yeonsan Ogae meat produced by using commercial proteases such as alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain and protamex. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

다음 Fig 78의 그림은 6가지의 효소를 이용하여 오계육을 가수분해 한 샘플의 분포도를 각각 나타낸 그림이다. Bromelain을 이용하여 오계육을 가수분해한 경우 2,000 Da 미만의 분자량으로 분포되어 있었으며, chromatogram의 피크를 분석한 결과 11개의 피크를 확인하였다. 가장 많은 피크를 보여준 alcalase 효소의 펩타이드는 3,000 Da 미만의 분자량들로 골고루 분포 되어있으며, chromatogram의 피크를 분석한 결과 20개의 피크를 확인 할 수 있었다. Flavourzyme protamex, papain은 각각 14, 16, 16개의 피크로 비슷하게 분석되었으며, 분자량의 경우 3,398 Da, 3,057 Da, 1,958 Da 이하로 골고루 분포되어 있음을 확인하였다.

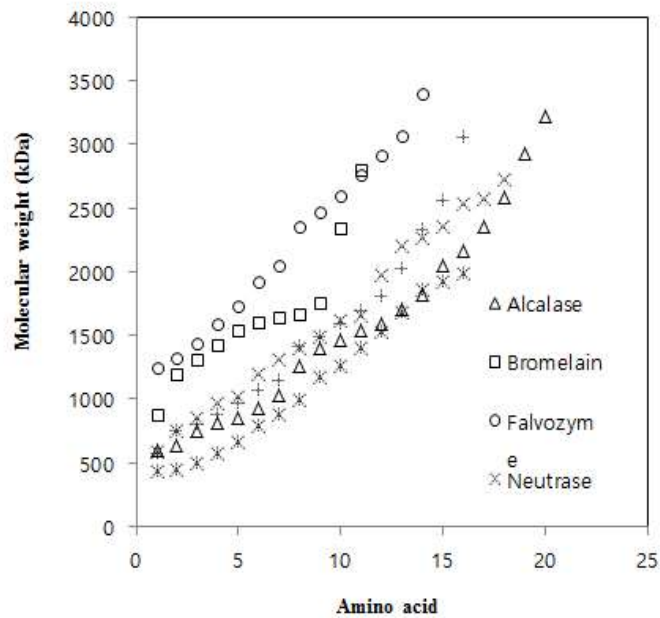


Fig. 78. The ranges of molecular weight of hydrolysate Yeonsan Ogae meat produced by using commercial proteases such as alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain and protamex. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

(2) 연산 오계 내장육 프로티아제를 이용한 펩타이드 생산 및 항산화 특성

(가) 연산오계 내장육 단백질 가수분해물 수율

6종의 효소를 각각 이용하여 가수분해물을 제조하고 가수분해를 위한 추출분말의 무게/오계 내장 무게×100으로 수율을 계산하였다(Table 37). 수율을 확인 한 결과 papain hydrolysate의 수율이 48.6%로 가장 높았으며, alcalase hydrolysate의 수율은 26.9로 가장 적은 수율을 보였다.

Table 37. Yield of protein hydrolysates of Yeonsan Ogae visceral.

Name of enzymes	Yield of hydrolysate (%)
Alcalase hydrolysate	26.9
Bromelain hydrolysate	32.4
Flavourzyme hydrolysate	38.2
Neutrased hydrolysate	43.5
Papain hydrolysate	48.6
Protamex hydrolysate	45.4

(나) 오계내장육 단백질 가수분해물의 항산화 특성

프로티아제 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex를 이용하여 오계내장의 단백질 가수분해물을 제조하였다. 효소 반응 최적 조건들은 효소 공급회사에서 제공한 조건으로 수행을 하였다. 효소 반응 후에 원심분리를 이용하여 가수분해물은 반응하지 않은 부분과 반응생성물을 분리하였다. 반응 생성물들은 동결 건조기를 이용하여 분말화 하였다.

① DPPH 라디칼 소거능

일반적으로 산화과정에서 항산화제는 프리라디칼과 반응을 하여 안정한 화합물을 생산하여 산화과정을 종결한다. 이러한 물질 중에서 DPPH는 메탄올 용매에서 안정한 라디칼을 유지하며 517 nm에서 최대흡광도를 나타내기 때문에 천연물(natural compounds)의 환원반응에 널리 사용이 되고 있다. 이러한 DPPH는 항산화제와 같은 프로톤공여(proton donating) 물질을 만나면 라디칼이 소거(scavenging)된다. 그리고 항산화제의 프로톤공여 능력에 따라 용액의 색이 퍼플에서 노란색으로 변한다. 따라서 DPPH는 펩타이드 및 천연 항산화 물질의 항산화력을 비교하는데 매우 유용한 분석 수단으로 사용이 되어 왔다.

Fig. 79은 서로 다른 프로티아제 및 가수분해 조건에서 생산 된 가수분해물의 DPPH 항산화 능력 분석 결과를 보여준다. 오계내장 가수분해물들의 DPPH 항산화 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 이러한 이유는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 가수 분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 가수 분해물들의 DPPH 항산화 능력은 bromelain, flavourzyme 및 protamex의 소거능은 60% 이상 나타내었으나, alcalase, papain 및 neutrase에 의한 가수 분해물들은 비교적 낮았다. 연구 결과에 따르면 펩타이드들의 항산화 능력은 1) 구성아미노산 중에서 비극성 및 방향족 아미노산, 2) 분자량이 작을수록 항산화 능력이 높은 것으로 알려져 있다.

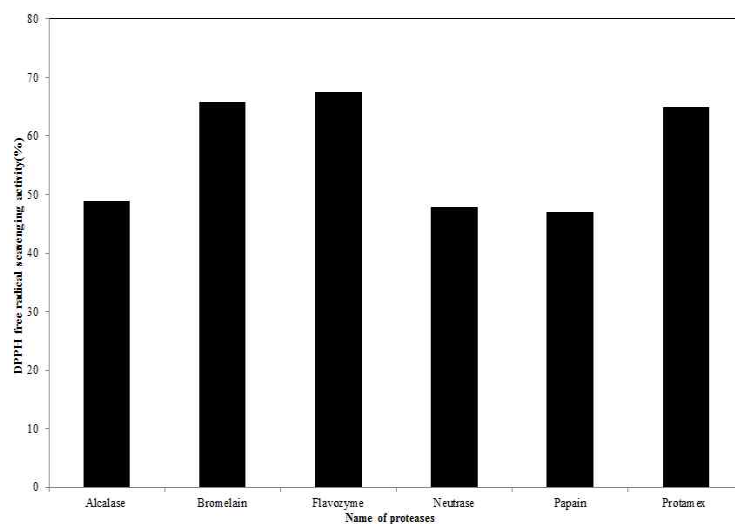


Fig. 79. The degree of DPPH radical scavenging activity of Yeonsan Ogae visceral protein hydrolysates. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

② 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능

슈퍼옥사이드 라디칼 (superoxide radical)은 굉장히 유독한 라디칼 종(specie)이며 무수한 생체적 작용에서 생성된다. 그리고 직접적인 과산화지방질화 (lipid peroxidation)를 주도하진 못하지만, 과산화수소나 하이드록실 라디칼과 같은 굉장히 반응성이 높은 물질의 전구물 (precursor)이다. 생세포는 천부적으로 효소 산화방지제의 생물학적 방어 기제를 갖춰 reactive oxygen species/reactive nitrogen species (ROS/NOS)를 무해한 분자들로 전환하는 원인이 된다. 그 기제들 중 하나로는 superoxide dismutase (SOD)를 통해 superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$)를 O_2 와 H_2O_2 로 전환한다. 하지만, 생체의 능력으로 라디칼을 제거함은 지나치게 생산되는 프리 라디칼 (free radical)에 압도될 수 있다. Fig. 80는 서로 다른 프로티아제를 사용하여 생산된 오계내장 단백질 가수분해물의 superanion 소거 항산화 능력 분석 결과를 보여준다. 오계내장 가수분해물들의 superanion 소거 항산화 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수 분해물들의 superanion 소거 항산화 능력은 약 15.0 ~ 40.0%의 분포를 나타내었으며 bromelain에서 가장 높은 40%의 항산화력을 나타냈으며 나머지는 비슷한 분포를 보여 주었다. 이러한 결과는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 가수 분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 보여 진다.

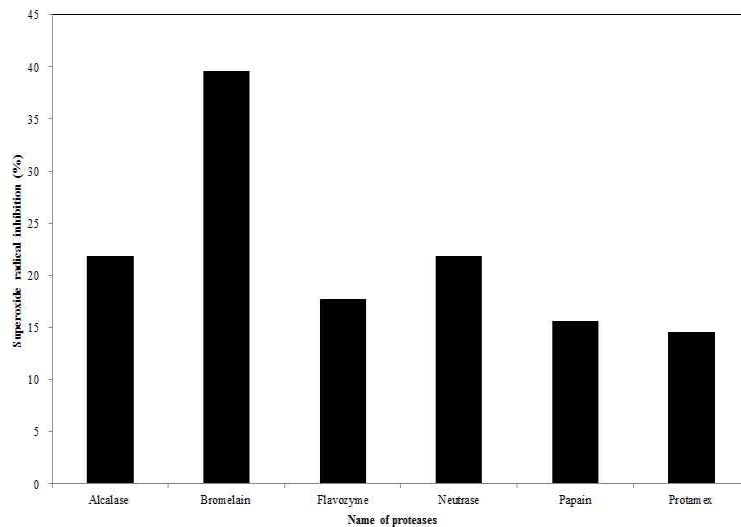


Fig. 80. The degree of superoxide radical scavenging activity of Yeonsan Ogae visceral protein hydrolysates. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

③ 하이드록시 라디칼 소거능

하이드록실 라디칼은 H_2O_2 와 펜톤 반응에서의 Fe (II) 이나 Cu (II)와 같은 금속이온 사이의 작용에서 발생하는데, 굉장히 반응성이 높고, 수명이 짧으며, DNA, 단백질, 그리고 지질을 파괴적으로 수산화한다고 믿어지고 있다. 또한 하이드록실 라디칼은 방향족 화합물(aromatic compound)와 작용해 hydroxycyclohexadienyl radical을 생성할 수 있고, 더 나아가서 산소와

작용해 peroxy radical을 생성하거나 phenoxy radical로 분해된다. 그러므로 하이드록실 라디칼 제거는 이러한 라디칼에 의해 유발되는 산화스트레스로 인해 생기는 여러 가지 질병들을 방지하는데 매우 중요하다. Fig. 81는 서로 다른 프로티아제를 사용하여 생산된 오계내장 단백질 가수분해물의 하이드록시 라디칼 소거 항산화 능력 분석 결과를 차이점을 보여준다. 오계내장 가수분해물들의 하이드록시 라디칼 소거 항산화 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수 분해물들의 항산화 능력은 약 4.0 ~ 50.0%의 분포를 보여 주었으며 flavourzyme에서 50%의 항산화 능력을 나타냈으나, 그 외 효소에서는 매우 낮은 15% 미만으로 나타내었다. 이러한 결과는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 가수 분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 연구 결과에 따르면 펩타이드들의 항산화 능력 분자량이 작을수록 높은 것으로 알려졌다. 또한 하이드록실 라디칼 제거력의 증가는 펩티드 크기에 따라 저하되었고, 이것은 낮은 분자량을 가진 펩티드가 더 높은 분자량을 가진 펩티드보다 강한 하이드록실 라디칼 제거제로서 더 효과가 좋다고 보고하였다. 이것은 가수 분해물 중 하이드록실 라디칼 제거 펩타이드와 제거를 하지 않는 펩티드의 비례에 따라서 항산화 능력이 다르게 나타난다는 것과 일치한다.

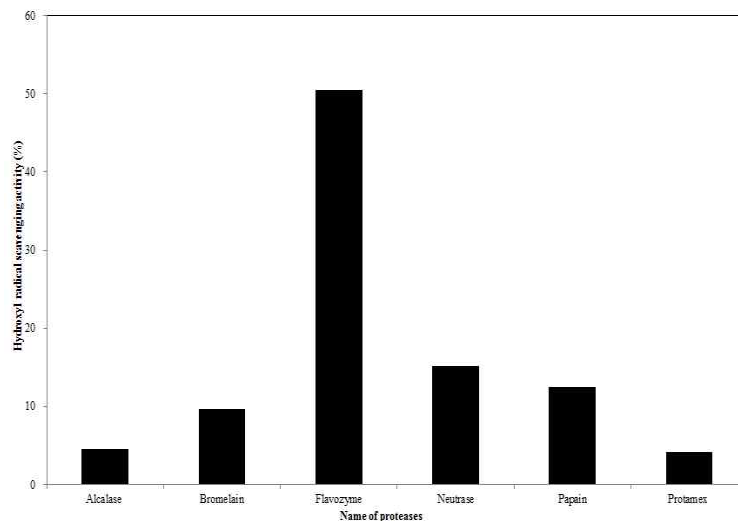


Fig. 81. The degree of hydroxy radical scavenging activity of Yeonsan Ogae viscera meat protein hydrolysates. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

④ Fe²⁺ 킬레이션 능력

체내에서 세포의 지질 및 단백질의 산화를 촉진하는 Fe²⁺의 chelating 효과를 확인하는 실험으로 금속 킬레이트 효과 측정은 ferrozine이 Fe²⁺와 반응하여 복합체를 형성하면 붉은 색을 띠게 되는데 이때 시료의 추출물 중에 킬레이트 효과를 가진 성분이 존재하면, Fe²⁺-ferrozine 복합체를 형성을 방해하여 발색이 저해되는 원리를 이용하였다. 이는 화합물의 금속 킬레이트력은 산화된 금속이온의 산화 환원 전위를 낮춤으로서 안정화시켜 화합물의 잠재적인 항산화 활동성에 대한 지시약으로서 쓰일 가능성이 높다(Girgih et al., 2010). 금속 이온을 킬레이트화

하는 가수 분해물들에 대한 능력을 Fig. 82에서 보여준다. 본 연구에서 가수 분해물들의 킬레이션 능력은 사용 효소들에 상과 없이 크게 차이점이 없었다. 가수 분해물들의 킬레이션 능력은 약 35~65% 에서 결정이 되었다. 이러한 결과는 효소에 따른 가수분해물의 DPPH, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능력이 다르게 나타 난 것과는 대조적이었다. 다른 연구 결과를 보면 금속 킬레이트력 능력은 단백질의 종류, 효소 종류 그리고 효소 농도에 큰 영향을 받는 것으로 보고하고 있다. Alcalase 가수 분해 산물은 pepsin-pancreation 가수 분해 산물보다 금속 킬레이트력이 현저히 더 높았고, 이것은 각 효소에서 생성된 펩티드 종류가 다른 것 때문일 가능성도 있다. 가수 분해 산물의 금속 킬레이트 능력 또한 65.32% 증가한 효소 농도에 따라 상승했고, 이것은 효소 단계가 증가함에 따라 더 많은 수의 펩티드가 작용 (liberation)된 것임을 확인할 수 있다. 또한 금속 킬레이션 능력은 펩티드 크기가 증가할 때 감소했으며, 이 의미는 낮은 분자량의 펩티드가 금속 킬레이트화에 더 큰 효과를 보인다고 제시한다.

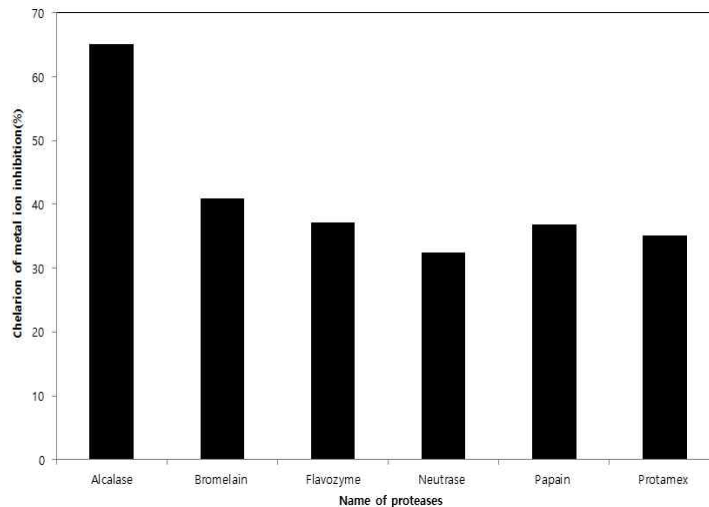


Fig. 82. The degree of chelation activity of Yeonsan Ogae visceral protein hydrolysates. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

⑤ 가수 분해물의 항산화 저해농도

오계내장 단백질 가수분해물들은 사용된 효소의 종류에 따라서 DPPH 소거능, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 금속 킬레이션 능력이 다르게 나타났다. DPPH 소거능과 하이드록시 라디칼 소거능은 가수분해물에 대하여 능력은 다르지만 경향은 유사하였고, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능과 금속 킬레이션 능력에 차이는 있지만 유사한 경향을 보여주었다. 이러한 이유들은 사용 효소마다 생산한 가수 분해물의 분자량의 차이와 펩타이드 종류의 차이에 원인이 있다고 볼 수 있다. 조금 더 가수 분해물들의 항산화 저해 능력을 비교하기 위해서 각각 가수 분해물에 대하여 IC₅₀ 평가하였다. 전체적으로 보면 항산화 저해능은 사용한 효소 및 항산화 저해 대상에 따라 크게 차이가 있었다(Table 38).

Alcalase에 의하여 생산된 가수 분해물은 금속 킬레이션 능력, DPPH 소거능, 하이드록시 라

디칼 소거능 및 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. 금속 킬레이션 능력, DPPH 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 농도는 각각 1.376, 3.64, 8.51 및 22.4 mg/ml 이었다. Bromelain에 의하여 생산된 가수 분해물은 DPPH 소거능, 금속 킬레이션 능력, 하이드록시 라디칼 소거능 및 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. DPPH 소거능, 금속 킬레이션 능력, 하이드록시 라디칼 소거능 및 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 저해농도는 각각 1.076, 5.24, 9.85 및 12.04 mg/ml 이었다. Flavourzyme에 의하여 생산된 가수 분해물은 DPPH 소거능, 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. DPPH 소거능, 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능 저해농도는 각각 1.05, 5.95, 12.4 및 13.67 mg/ml 이었다. Neutrase에 의하여 생산된 가수 분해물은 DPPH 소거능, 금속 킬레이션 능력, 하이드록시 라디칼 및 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. DPPH 소거능, 금속 킬레이션 능력, 하이드록시 라디칼 및 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 저해농도는 각각 4.09, 6.38, 17.41 및 22.4 mg/ml 이었다. Papain에 의하여 생산된 가수 분해물은 DPPH 소거능, 금속 킬레이션 능력, 하이드록시 라디칼 및 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. DPPH 소거능, 금속 킬레이션 능력, 하이드록시 라디칼 및 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 저해농도는 각각 3.81, 5.40, 12.71 및 29 mg/ml 이었다. Protamex에 의하여 생산된 가수 분해물은 DPPH 소거능, 금속 킬레이션 능력, 하이드록시 라디칼 및 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. DPPH 소거능, 금속 킬레이션 능력, 하이드록시 라디칼 및 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 저해농도는 각각 1, 5.42, 8.18 및 30.1 mg/ml 이었다. 오계 내장 펩타이드의 각 항산화력을 확인 한 결과 모두 DPPH 소거능, 금속 킬레이션 능력, 하이드록시 라디칼 및 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 확인하였다.

Table 38. Inhibition concentration (IC₅₀) of antioxidant capacity of protein hydrolysate of *Ogae visceral*.

Hydrolysates	Antioxidant activities			
	DPPH radical scavenging activity	Superoxide anion radical scavenging activity	Hydroxy radical scavenging activity	Fe ²⁺ chelating activity
Alcalase hydrolysate	3.64	22.4	8.51	1.379
Bromelain hydrolysate	1.076	12.4	9.85	5.24
Flavourzyme hydrolysate	1.504	12.4	13.67	5.951
Neutrase hydrolysate	4.09	22.4	17.41	6.384
Papain hydrolysate	3.812	29	12.71	5.409
Protamex hydrolysate	1	30.1	8.18	5.426

(다) 연산오계 내장육 펩타이드 아미노산 분석

오계 내장육 단백질 가수분해물들은 사용된 효소의 종류에 따라 아미노산의 분포가 다르게 나타났다. Alcalase, bromelain, flavourzyme 효소로 가수분해 된 아미노산의 분포를 Fig. 83.와 같다. A는 alcalase 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산의 분포, B는 bromelain 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산의 분포, C는 flavourzyme 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산 분포를 나타낸 것이다. A 그림에서는 alcalase 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 glutamic acid이 11.43%로서 가장 높은 함량이 나타났고, 필수아미노산 분포 중에서는 leucine이 9.93%로서 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. B 그림에서 보면 bromelain 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 leucine이 12.02%로서 가장 높은 함량이 나타났고, 필수아미노산 분포 중에서도 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. C 그림에서 보면 flavourzyme 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수 아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 leucine이 10.08%로서 가장 많은 함량을 차지하였고, 필수아미노산 분포 중에서도 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. 또한 alcalase, bromelain, flavourzyme 효소의 아미노산 분포에서는 tryptophan이 발견되지 않았으며, 특히 bromelain 효소에서는 cystine이 발견되지 않아서 가장 적은 종류의 아미노산 조성을 보여 주었다.

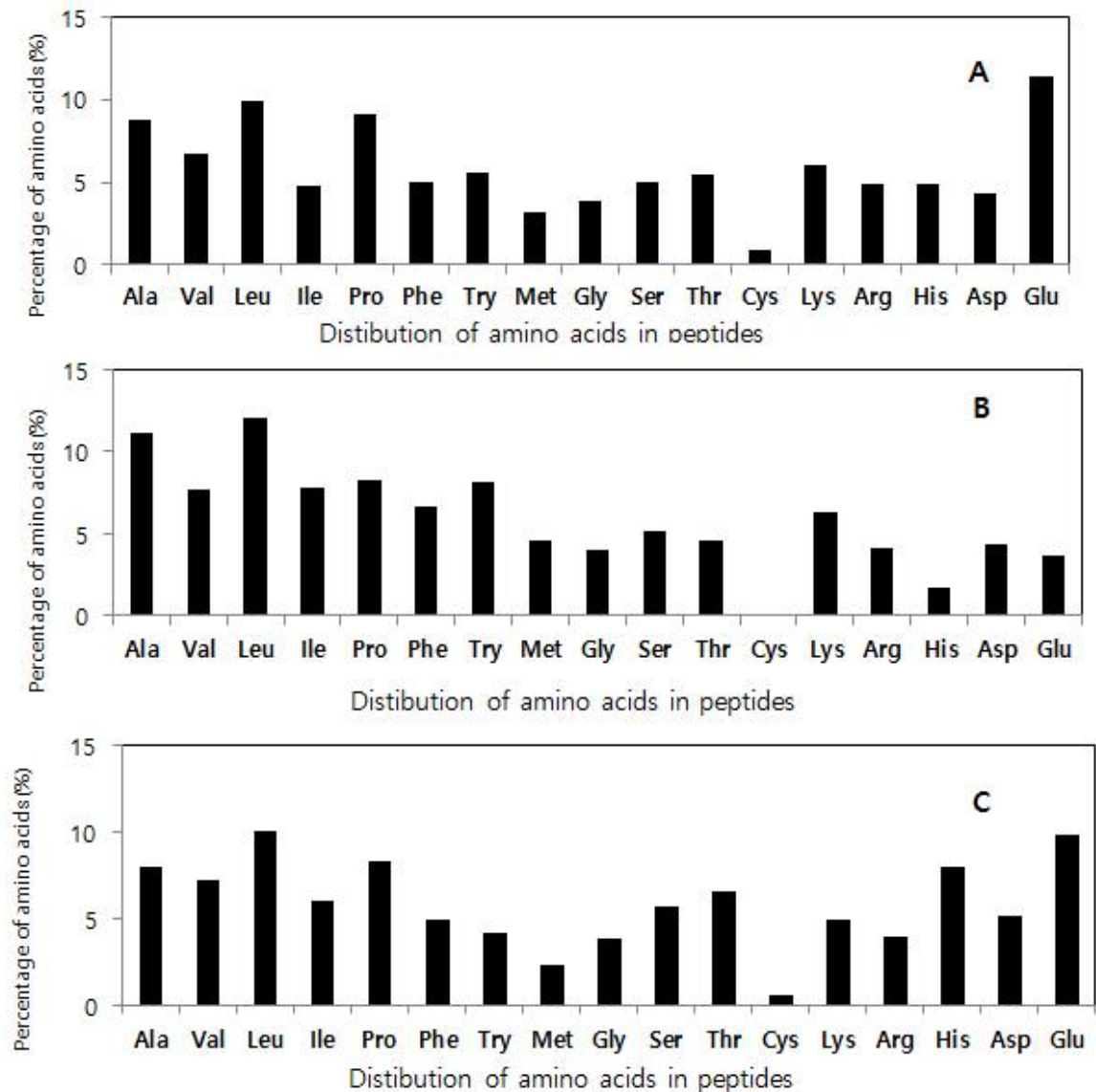


Fig. 83. Amino acid composition distribution of protein hydrolysates of black body fowl(Yeonsan Ogae) visceral. A, B and C graph is distribution of amino acids composition in peptides of hydrolysate using alcalase, bromelain, and flavourzyme, respectively.

오계 내장육 단백질 가수분해물들은 사용된 효소의 종류에 따라 아미노산의 분포가 다르게 나타났다. Neutrase, papain, protomex 효소로 가수분해 된 아미노산의 분포를 Fig. 84.와 같다. A는 neutrase 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산의 분포, B는 papain 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산의 분포, C는 protomex 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산 분포를 나타낸 것이다. A 그림에서는 neutrase 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 proline이 11.72%로서 가장 높은 함량이 나타났고, 필수아미노산 분포 중에서는 leucine이 11.11%로서 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. B 그림에서 보면 papain 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서

proline이 10.65%로서 가장 높은 함량이 나타났고, 필수아미노산 분포 중에서는 leucine이 10.58%도 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. C 그림에서 보면 protamex 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수 아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 proline이 12.08%로서 가장 많은 함량을 차지하였고, 필수아미노산 중에서는 leucine이 11.02%로서 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. 또한 neutrase, papain, protamex 효소의 아미노산 조성에서 tryptophan은 발견되지 않았으며, 총 아미노산 함량이 가장 높게 나타난 것은 flavourzyme 효소이고 이종의 35.64%가 필수 아미노산 함량인 것으로 나타났다.

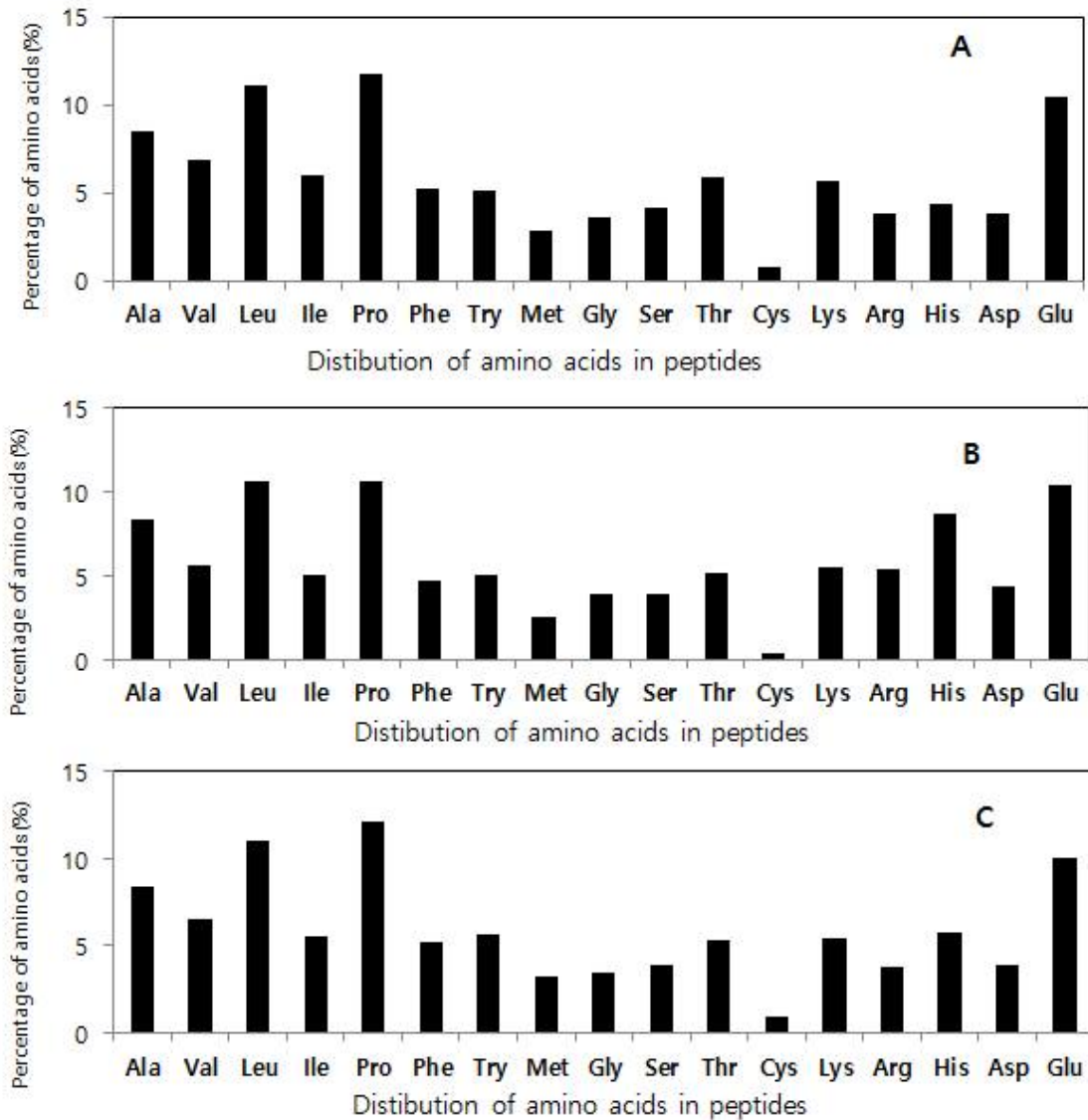


Fig. 84. Amino acid composition distribution of protein hydrolysates of black body fowl(Yeonsan Ogae) visceral. A, B, and C graph is distribution of amino acids composition in peptides of hydrolysate using neutrase, papain, and protamex, respectively.

Alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex 효소로 가수분해 시킨 오계 내장육 가수분해물의 구성 아미노산을 극성 아미노산, 비극성 아미노산, 양이온 아미노산, 음이온 아미노산으로 분류하여 Table 39 에 나타내었다. 극성 아미노산의 함량은 flavourzyme, neutrase, papain 효소로 가수분해 시켰을 때 threonine이 가장 높은 함량을 보여주고 alcalase, bromelain, protamex 효소로 가수분해 시켰을 때에는 tyrosine이 가장 높은 함량으로 보여 진다. 비극성 아미노산의 함량은 모든 alcalase, bromelain, flavourzyme 효소에서 가수분해 시켰을 때 leucine이 가장 높은 함량으로 보여 주고, neutrase, papain, protamex 효소에서는 proline이 가장 높은 함량으로 보여 진다. 양이온 아미노산의 함량은 alcalase, bromelain, neutrase 효소로 가수분해 시켰을 때 lysine이 가장 높은 함량으로 보여 지고, flavourzyme, papain, protamex 효소로 가수분해 시켰을 때는 histidine이 가장 높은 함량으로 보여 졌으며, 음이온 아미노산의 함량은 모든 bromelain 효소로 가수분해 시켰을 때에는 aspartic acid가 가장 높은 함량으로 보여 주고 alcalase, flavourzyn, neutrase, papain, protamex 효소에서는 glutamic acid이 가장 높은 함량으로 보여 진다.

Table 39. Amino acid composition distribution of protein hydrolysates using various enzymes of black body fowl(Yeonsan Ogae) visceral.

Amino acids	Alcalase	Bromeline	Flavourzyme	Neutrase	Papain	Protamex
Comostion of percent of amino acids (%)						
Nonpolar side chains						
Proline	9.13	8.27	8.39	11.72	10.65	12.08
Alanine	8.75	11.08	8.00	8.45	8.28	8.35
Valine	6.73	7.64	7.25	6.84	5.58	6.53
Methionine	3.17	4.59	2.29	2.88	2.54	3.27
Isoleucine	4.83	7.83	6.10	6.00	5.05	5.58
Leucine	9.93	12.02	10.08	11.11	10.58	11.02
Phenylalanine	5.03	6.59	4.95	5.24	4.67	5.21
Polar side chains						
Threonine	5.49	4.56	6.57	5.86	5.15	5.28
Serine	4.97	5.15	5.75	4.18	3.94	3.88
Glycine	3.92	4.01	3.81	3.58	3.94	3.41
Cystine	0.93	N. D.	0.61	0.79	0.36	0.98
Tyrosine	5.61	8.19	4.16	5.08	5.01	5.63
Charged side chains						
Basic						
Histidine	4.86	1.69	8.00	4.37	8.71	5.79
Lysine	6.00	6.27	4.97	5.73	5.49	5.39
Arginine	4.89	4.10	3.95	3.86	5.33	3.77
Acids						
Aspartic acid	4.32	4.40	5.20	3.86	4.37	3.86
Glutamic acid	11.43	3.62	9.90	10.45	10.35	9.98
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

N. D. : Not detected

(라) RF-HPLC에 의한 분석

HPLC 분석결과 Standard 펩타이드는 1. GLy-Tyr, 2. Val-Tyr-Val, 3. Met enkephalin, 4. Leu enkephalin, 5. Angiotensin II 의 5가지 표준 샘플이다. 표준샘플의 각각의 분자량은 1. Gly-Tyr 238.2, 2. Val-Tyr-Val 379.5, 3. Met enkephalin acetate 573.7, 4. Leu enkephalin 555.6, 5. Angiotensin II acetate 1046.2의 분자량을 가지고 있다. Fig. 85의 각 A, B, C의 그래프는 효소별로 가수분해 된 시료의 분석 그래프를 표준 peptide 샘플과 비교함으로써 확인 하였다. A 그래프는 alcalase 효소로 가수분해한 것으로 alcalase 효소의 cleave는 glutamate, leucine, tyrosine, lysine, glutamine 이다. 그래프 B는 bromelain 효소로 가수분해 한 것이며 효소의 기질은 lysine, alanine, tyrosine, glycine이다. C 그래프는 flavourzyme 효소로 가수분해한 것으로 효소의 기질부위는 tryptophan, isoleucine, phenylalanine, throsine, leucine, valine, lysine, arginine, serine, threonine, alanine 이다. HPLC 분석에서 표준샘플과 비교 한 결과 모두 표준 펩타이드 분포안에 들어간다. 그러나 각 효소마다 펩타이드 분포는 피크의 위치와 수치가 다르다. A는 크게 세 개로 볼 수 있으며, 왼쪽의 피크부터 분자량 36.4, 54.2 28.1 mV의 분자량 값을 나타내었다. B는 그래프의 세 개의 피크의 분자량 값은 41.4, 76.8, 36.8 mV의 분자량 값을 나타내었다. 그래프 C의 큰 피크 세 개 를 볼 수 있으며 42.7, 55.2, 32 mV 분자량 값을 볼 수 있다. 결과 적으로 다른 효소마다 펩타이드의 생산이 다른 것으로 판명된다.

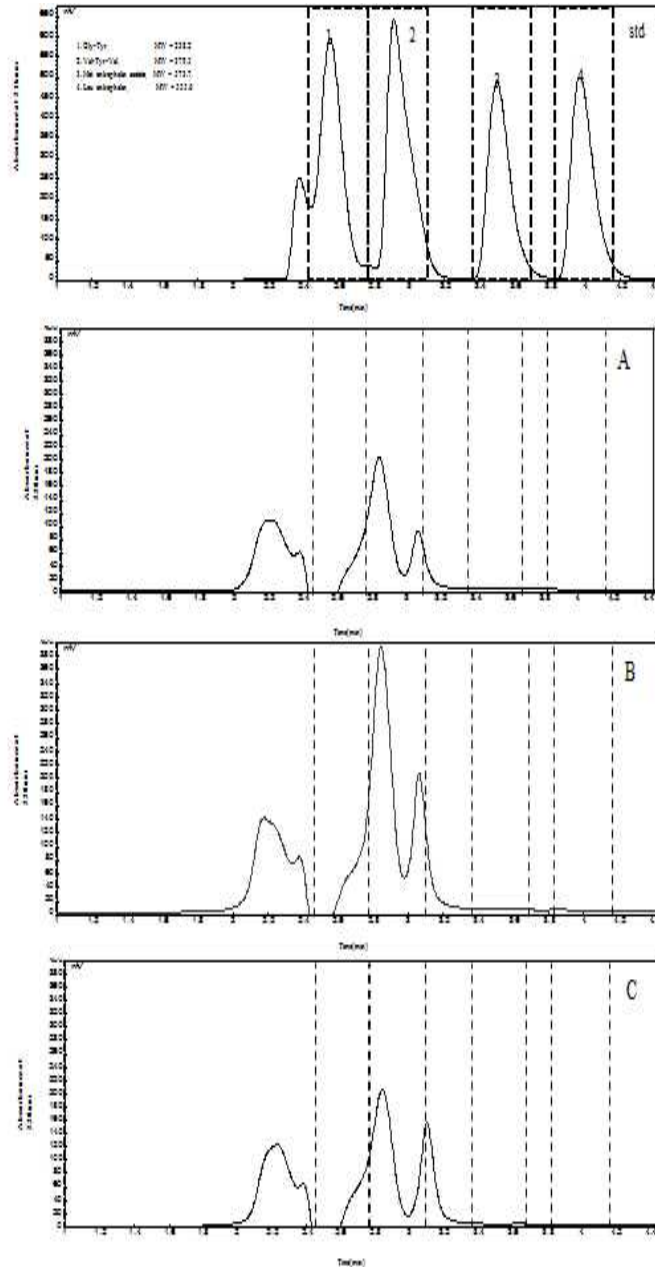


Fig. 85. HPLC chromatogram of peptides of hydrolysate using alcalase, bromelain, and flavourzyme, respectively. A : alcalase, B : bromelain, C : flavourzyme

HPLC 분석결과 standard 펩타이드는 1. Gly-Tyr, 2. Val-Tyr-Val, 3. Met-enkephalin, 4. Leu-enkephalin, 5. Angiotensin II 의 5가지 표준 샘플이다. 표준 샘플의 각각의 분자량은 1. Gly-Tyr 238.2, 2. Val-Tyr-Val 379.5, 3. Met-enkephalin acetate 573.7, 4. Leu-enkephalin 555.6, 5. Angiotensin II acetate 1046.2의 분자량을 가지고 있다. Fig. 86의 각 A, B, C의 그래프는 효소별로 가수분해된 시료의 분석 그래프를 표준 peptide 샘플과 비교함으로써 확인하였다. A 그래프는 neutrase 효소로 가수분해한 것으로 cleave site는 phenylalanine, throsine, leucine, valine 이다. 그래프 B는 papain 효소로 가수분해된 것이며 효소의 기질부위는 phenylalanine, throsine, leucine, valine, lysine, arginine 으로 분해가 된다. C 그래프는 protamex 효소로 가수분해한 것으로 tryptophan, isoleucine, proline, phenylalanine, throsine,

leucine, valine 이다. HPLC 분석에서 표준샘플과 비교 한 결과 모두 표준 펩타이드 분포 안에 들어간다. 그러나 각 효소마다 펩타이드 분포는 피크의 위치와 수치가 다르다. A는 크게 두 개로 볼 수 있으며, 왼쪽의 피크부터 분자량 8.6, 50.1 mV의 분자량 값을 나타내었다. B는 그래프의 2개의 피크의 분자량 값은 6.3, 47.7 mV의 분자량 값을 나타내었다. 그래프 C의 2개의 큰 피크를 볼 수 있으며 55.9, 46.7 mV 분자량 값을 볼 수 있다. 결과 적으로 다른 효소마다 펩타이드의 생산이 다른 것으로 판명된다.

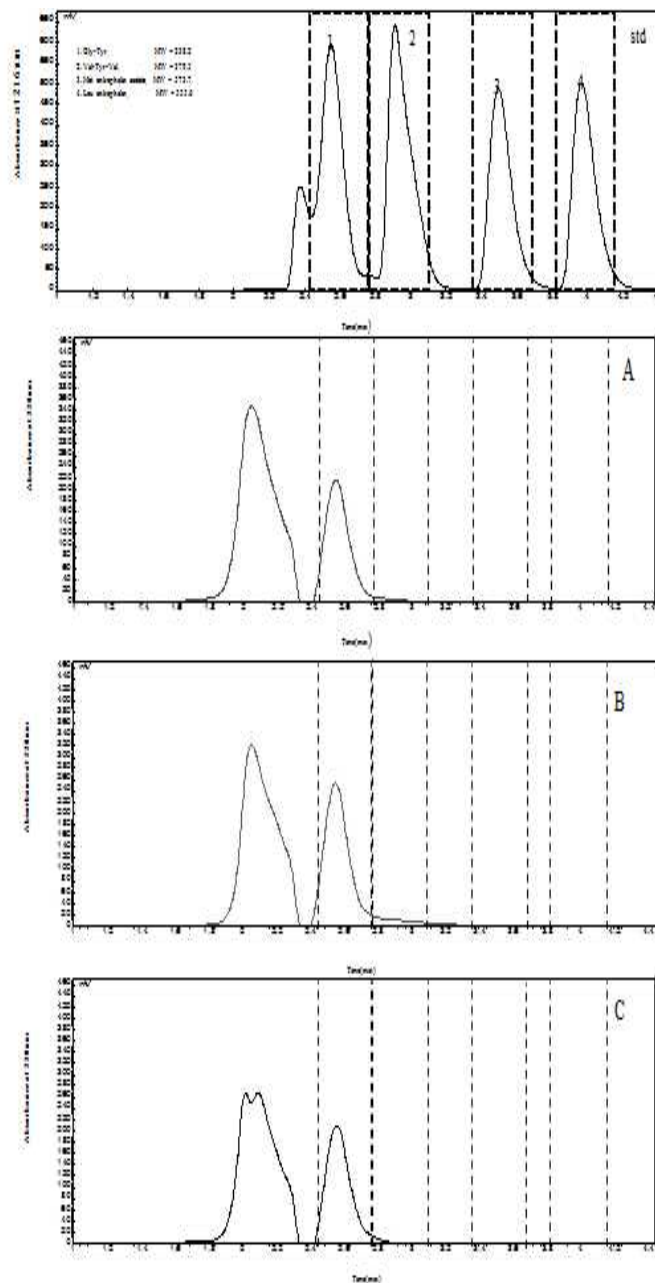


Fig. 86. HPLC chromatogram of peptides of hydrolysate using neutrase, papain and protamex, respectively. A :neutrase, B :papain, C :protamex

(마) MALDI-TOF에 의한 분석

오계 내장을 alcalase, bromelain, flavourzyme을 이용하여 가수분해한 가수분해물에 대한 분자량을 MALDI-TOF 질량 분석기를 이용하여 분석한 결과는 Fig 87에 나타난 그림과 같다. alcalase를 이용하여 가수분해 한 오계 내장의 펩타이드의 분자량 범위는 약 500 - 2,050 Da 이었고, 같은 조건에서 bromelain 효소를 이용하여 처리한 오계내장 펩타이드의 경우 분자량 범위는 약 410 - 2,990 Da 범위이었다. 또한 flavourzyme을 이용하여 가수분해한 펩타이드의 분자량의 범위는 500 - 3,110 Da 이었다. 이들 결과로부터 일반적인 닭의 분자량 범위에 비하여 크게 감소하였으며, 오계내장의 분자량과 비교 하였을 때 작은 분자량의 크기가 전체적으로 감소한 것을 확인하였으며, 이 결과는 오계의 내장으로 부터 수득한 가수분해물이 인체 내로 신속하게 유입 될 수 있다는 것을 의미한다.

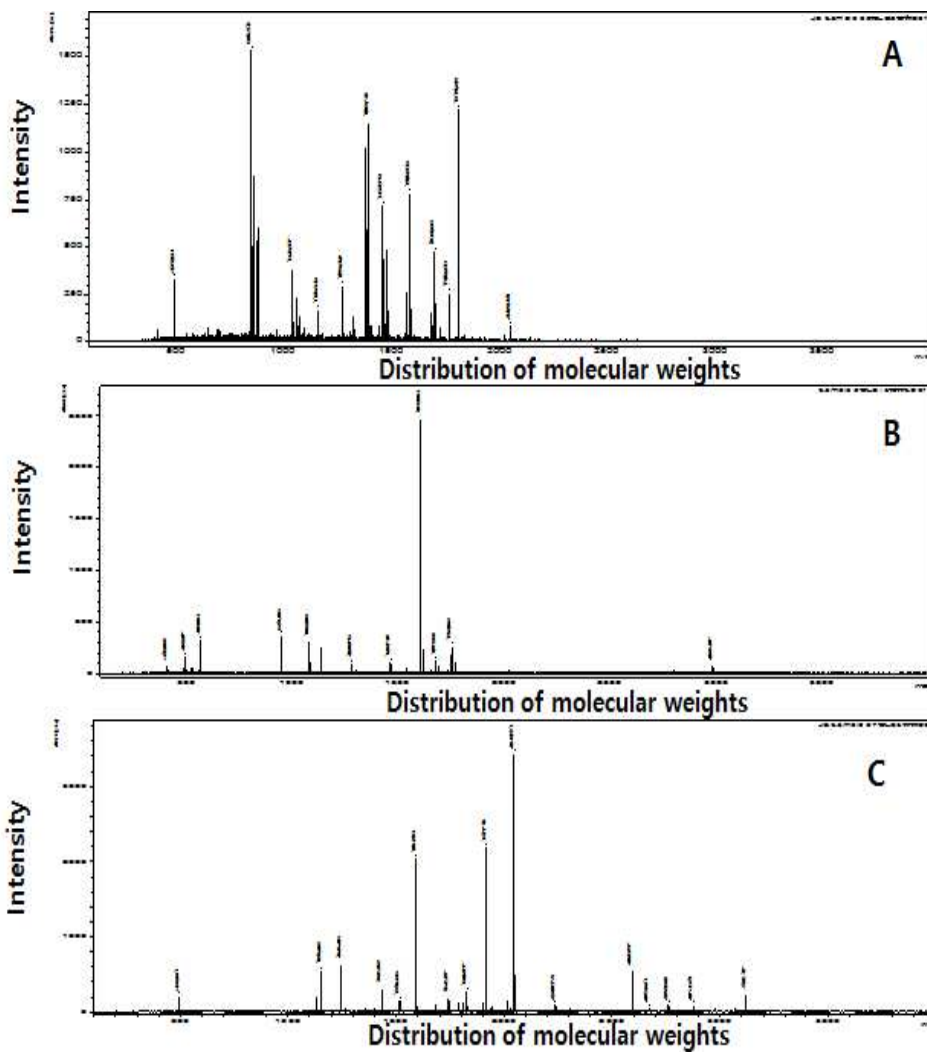


Fig. 87. The molecular weight distribution of protein hydrolysates of Yeonsan Ogae meat. A, B, and C chromatogram of MALDI-TOF represent peak intensity of peptides of hydrolysate using alcalase, bromelain, and flavourzyme, respectively. A, B, and C graph is distribution of molecular weight in peptides of hydrolysate using alcalase, bromelain, and flavourzyme, respectively.

오계 내장을 neutrase, papain, protamex 이용하여 가수분해한 가수분해물에 대한 분자량을 MALDI-TOF 질량 분석기를 이용하여 분석한 결과 Fig. 88 에서 보는 바와 같이 neutrase를 이용하여 가수분해 한 경우 펩타이드의 분자량 범위는 약 430 - 3,195 Da 이었고, 같은 조건에서 papain 효소를 이용하여 처리한 경우 펩타이드의 분자량 범위는 약 430 - 1,980 Da 범위이었다. 또한 Flavourzyme을 이용하여 가수분해한 펩타이드의 분자량의 범위는 560 - 3,050 Da 이었다. 이들 결과로부터 일반적인 육계의 분자량 범위에 비해 크게 감소한 것을 알 수 있었으며, 특히 papain 효소를 이용하여 가수분해 한 펩타이드의 경우 분자량의 범위가 매우 좁았으며, 분자량의 범위가 매우 크게 감소한 것을 확인하였다.

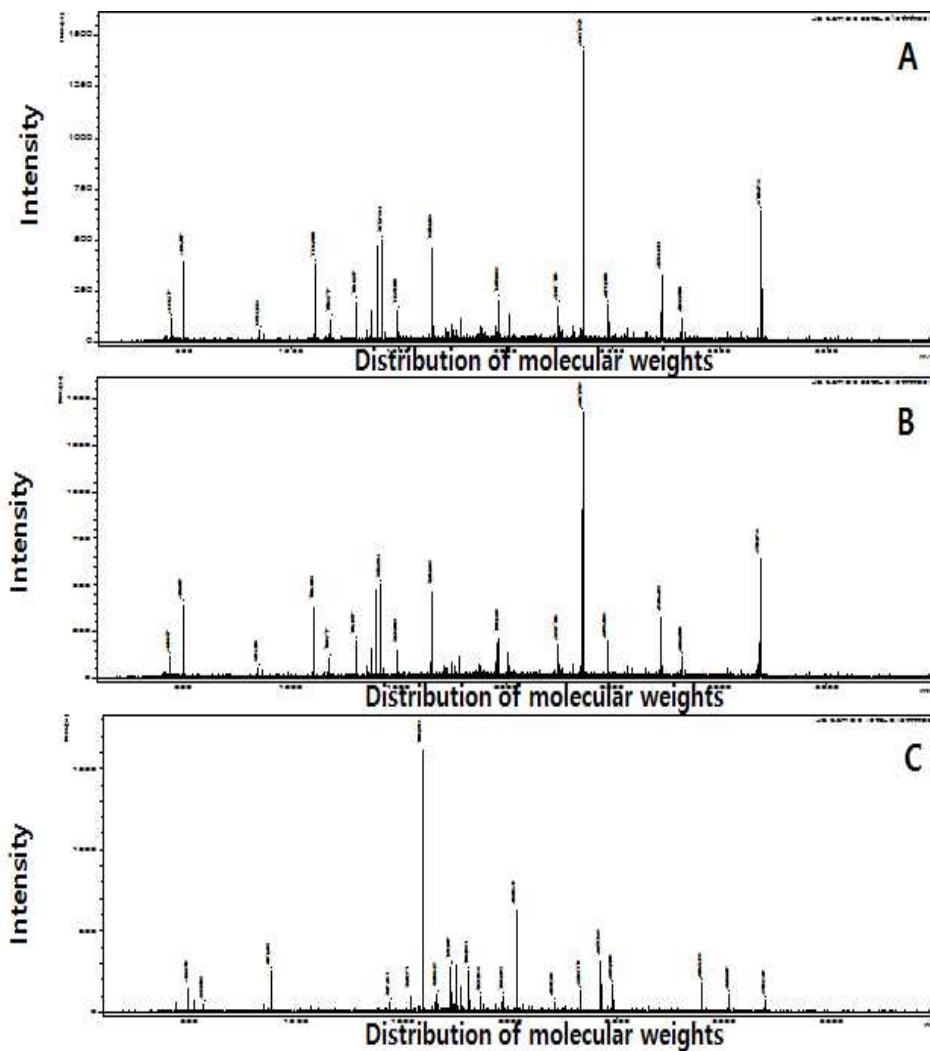


Fig. 88. The molecular weight distribution of protein hydrolysates of Yeonsan Ogae meat. A, B and C chromatogram of MALDI-TOF represent peak intensity of peptides of hydrolysate using neutrase, papain, protamex, respectively. A, B, and C graph is distribution of molecular weight in peptides of hydrolysate using neutrase, papain, and protamex.

분자량의 분포를 평균으로 확인 한 결과를 Fig. 89에 나타내었다. Flavourzyme을 이용하여 가수분해 한 펩타이드 샘플의 경우 1,952 Da으로 가장 분자량의 크기가 큰 것으로 확인되었으며, bromelain 효소를 이용하여 가수분해 한 펩타이드의 경우 1,298 Da 으로 가장 분자량의 크기가 작은 것을 확인하였다.

Alcalase 효소를 이용하여 가수분해 한 펩타이드 샘플은 1,386 Da, papain 효소를 이용한 가수분해물은 1,631 Da 등으로 나타났다.

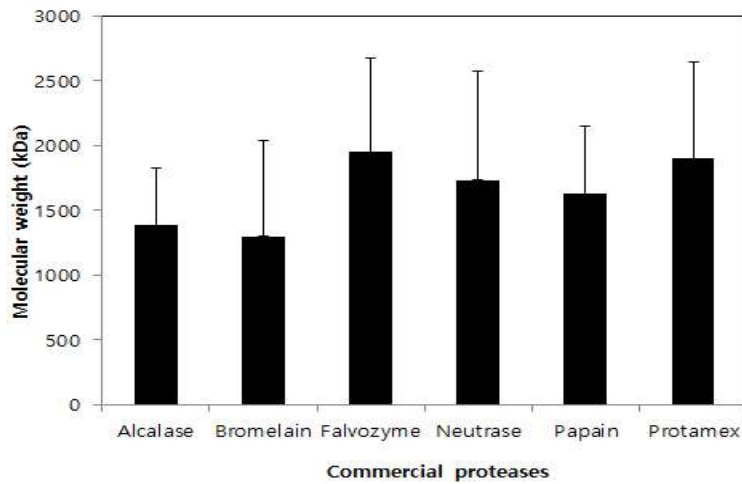


Fig. 89. The average molecular weight of hydrolysate Yeonsan Ogae viscera meat produced by using commercial proteases such as alcalase, bromelain, Flavourzyme, neutrase, papain, and protamex. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

다음 Fig. 90의 그림은 6가지의 효소를 이용하여 오계를 가수분해 한 샘플의 분포도를 각각 나타낸 그림이다. Alcalase를 이용하여 오계를 가수분해한 경우 2,055Da 미만의 분자량으로 분포되어 있었으며, chromatogram 의 피크를 분석한 결과 12개의 피크를 확인하였다. 가장 많은 피크를 보여준 protamex 효소의 펩타이드는 3,200Da 미만의 분자량들로 골고루 분포 되어있으며, chromatogram의 피크를 분석한 결과 19개의 피크를 확인 할 수 있었다. Bromelain, papain 은 11개의 피크로 비슷하게 분석되었으며, 분자량의 경우 3,000 Da, 2,500 Da 이하로 골고루 분포되어 있음을 확인하였다.

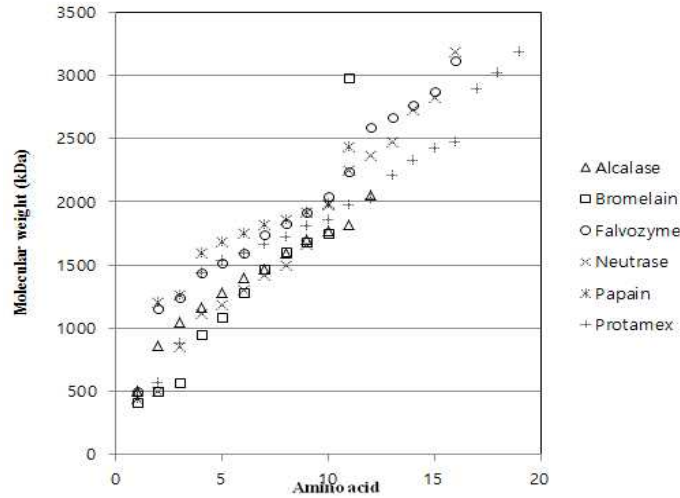


Fig. 90. The ranges of molecular weight of hydrolysate Yeonsan Ogae viscera meat produced by using commercial proteases such as alcalase, bromelain, Flavourzyme, neutrase, papain, and protamex. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

(3) 연산 오계란 프로티아제를 이용한 펩타이드 생산 및 항산화 특성

(가) 연산 오계란 단백질 가수분해물 수율

6종의 효소를 각각 이용하여 가수분해물을 제조하고 가수분해를 위한 추출분말의 무게/오계란 무게×100으로 수율을 계산하였다(Table 40). 수율을 확인 한 결과 protamex hydrolysate의 수율이 46.3%로 가장 높았으며, alcalase hydrolysate의 수율은 17.9로 가장 적은 수율을 보였다.

Table 40. Yield of protein hydrolysates of Yeonsan Ogae egg white.

Name of enzymes	Yield of hydrolysate(%)
Alcalase hydrolysate	19.5
Bromelain hydrolysate	29.7
Flavourzyme hydrolysate	39.4
Neutrase hydrolysate	35.4
Papain hydrolysate	45.7
Protamex hydrolysate	46.3

(나)오계란 단백질 가수분해물의 항산화 특성

오계란을 프로티아제 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex를 이용하여 단백질 가수 분해물을 제조하였다. 효소 반응 최적 조건들은 효소를 공급회사에서 제공한

조건으로 수행을 하였다. 효소 반응 후에 원심분리를 이용하여 가수 분해물들은 반응하지 않은 부분과 반응생성물을 분리하였다. 반응 생성물들은 동결 건조기에서 분말화 하였다. 가수 분해물들의 항산화 특성을 평가하기 위해서 분말 가수 분해물을 초순수 물에 용해를 한 다음 10 kDa 한 외막을 이용하여 분리를 하였다.

① 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능

일반적으로 산화과정에서 항산화제는 프리라디칼과 반응을 하여 안정한 화합물을 생산하여 산화과정을 종결한다. 이러한 물질 중에서 DPPH는 메탄올 용매에서 안정한 라디칼을 유지하며 517 nm에서 최대흡광도를 나타내기 때문에 천연물(natural compounds)의 환원반응에 널리 사용이 되고 있다. 이러한 DPPH는 항산화제와 같은 프로톤공여(proton donating) 물질을 만나면 라디칼이 소거(scavenging)된다. 그리고 항산화제의 프로톤공여 능력에 따라 용액의 색이 퍼플에서 노란색으로 변한다. 따라서 DPPH는 펩타이드 및 천연 항산화 물질의 항산화력을 비교하는데 매우 유용한 분석 수단으로 사용이 되어 왔다.

Fig. 91은 서로 다른 프로티아제 및 가수분해 조건에서 생산이 된 가수분해물의 DPPH 항산화 능력 분석 결과를 보여준다. 오계란 가수 분해물들의 DPPH 항산화 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 이러한 이유는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 가수 분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 가수 분해물들의 DPPH 항산화 능력은 약 25%에서 60% 사이의 분포를 보여 주었는데 alcalase, Flavourzyme, neutrase, 및 papain들의 소거능은 비슷하였지만 bromelain, 및 protamex 에 의한 가수 분해물들은 비교적 높았다. 연구 결과에 따르면 펩타이드들의 항산화 능력은 1) 구성아미노산 중에서 비극성 및 방향족 아미노산, 2) 분자량이 작을수록 항산화 능력이 높은 것으로 알려 졌다. 이러한 연구 결과들은 사용 된 프로티아제 효소들에 따라 항산화 능력이 왜 다른지 설명을 해준다.

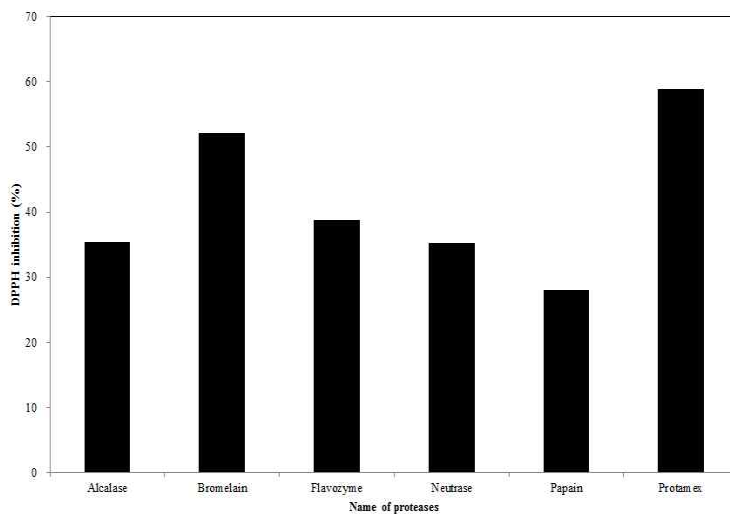


Fig. 91. The degree of DPPH radical scavenging activity of Yeonsan Ogae egg white protein hydrolysates. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

② 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능

슈퍼옥사이드 라디칼(superoxide radical)은 굉장히 유독한 라디칼 종(specie)이며 무수한 생체적 작용에서 생성된다. 그리고 직접적인 과산화지방질화(lipid peroxidation)를 주도하진 못하지만, 과산화수소나 하이드록실 라디칼과 같은 굉장히 반응성이 높은 물질의 전구물(precursor)이다. 생세포는 천부적으로 효소 산화방지제의 생물학적 방어 기제를 갖춰 reactive oxygen species/reactive nitrogen species (ROS/NOS)를 무해한 분자들로 전환하는 원인이 된다. 그 기체들 중 하나로는 superoxide dismutase (SOD)를 통해 superoxide anion ($\cdot O_2^-$)를 O_2 와 H_2O_2 로 전환한다. 하지만, 생체의 능력으로 라디칼을 제거함은 지나치게 생산되는 프리 라디칼(free radical)에 압도될 수 있다. Fig. 92는 서로 다른 프로티아제를 사용하여 생산이된 오계란 단백질 가수분해물의 superanion 소거 항산화 능력 분석 결과를 보여준다. 오계란 가수분해물들의 superanion 소거 항산화 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수 분해물들의 superanion 소거 항산화 능력은 약 20.0%에서 60.0% 사이의 분포를 보여 주었는데 Flavourzyme 및 bromelain에서 낮았고 나머지에서는 비슷한 분포를 보여 주었다. 이러한 결과는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 가수 분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 또한 가수 분해물에 따라서 소거하는 라디칼의 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다.

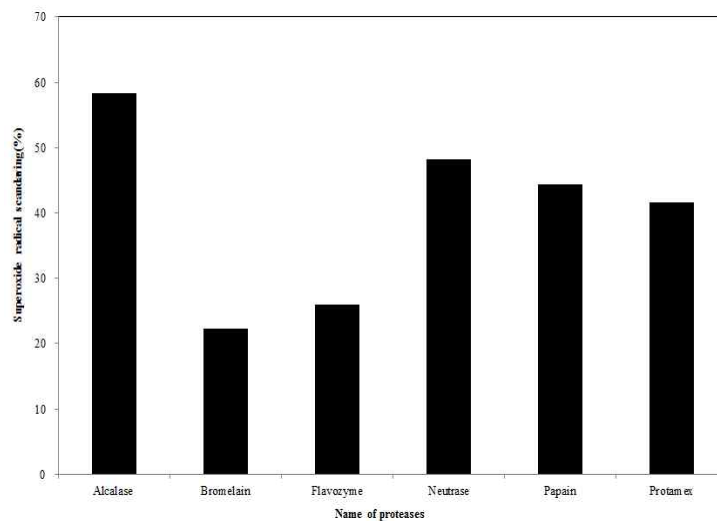


Fig. 92. The degree of superoxide radical scavenging activity of Yeonsan Ogae egg white protein hydrolysates. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

③ 하이드록시 라디칼 소거능

하이드록실 라디칼은 H_2O_2 와 펜톤 반응에서의 Fe (II) 이나 Cu (II)와 같은 금속이온 사이의 작용에서 발생하는데, 굉장히 반응성이 높고, 수명이 짧으며, DNA, 단백질, 그리고 지질을 파괴적으로 수산화 한다고 믿어지고 있다. 또한 하이드록실 라디칼은 방향족 화합물(aromatic

compound)와 작용해 hydroxycyclohexadienyl radical을 생성할 수 있고, 더 나아가서 산소와 작용해 peroxy radical을 생성하거나 phenoxy radical로 분해된다. 그러므로 하이드록실 라디칼 제거는 이러한 라디칼에 의해 유발되는 산화스트레스로 인해 생기는 여러 가지 질병들을 방지하는데 필요하다. Fig. 93는 서로 다른 프로티아제를 사용하여 생산된 오계란 단백질 가수분해물의 하이드록실 라디칼 소거 항산화 능력 분석 결과를 차이점을 보여준다. 오계란 가수분해물들의 하이드록실 라디칼 소거 항산화 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해물들의 항산화 능력은 약 20.0%에서 30.0% 사이의 분포를 보여 주었는데 alcalase에서 제일 높았고 neutrase에서는 제일 낮았다. 20% 이상을 보여주어 DPPH 라디칼 소거능과 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능의 경우와 비슷한 경향을 보여주었다. 이러한 결과는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 가수분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 연구 결과에 따르면 펩타이드들의 항산화 능력 분자량이 작을수록 높은 것으로 알려졌다. 또한 다른 연구자들의 연구결과에 따르면 하이드록실 라디칼 제거력은 증가는 펩티드 크기에 따라 저하되었고, 이것은 낮은 분자량을 가진 펩티드가 더 높은 분자량을 가진 펩티드보다 강한 하이드록실 라디칼 제거제로서 더 효과가 좋다고 보고하였다. 이것은 가수분해물 중에 하이드록실 라디칼 제거 펩타이드와 제거를 하지 않는 펩티드의 비례에 따라서 항산화력이 다르게 나타난다는 것과 일치한다.

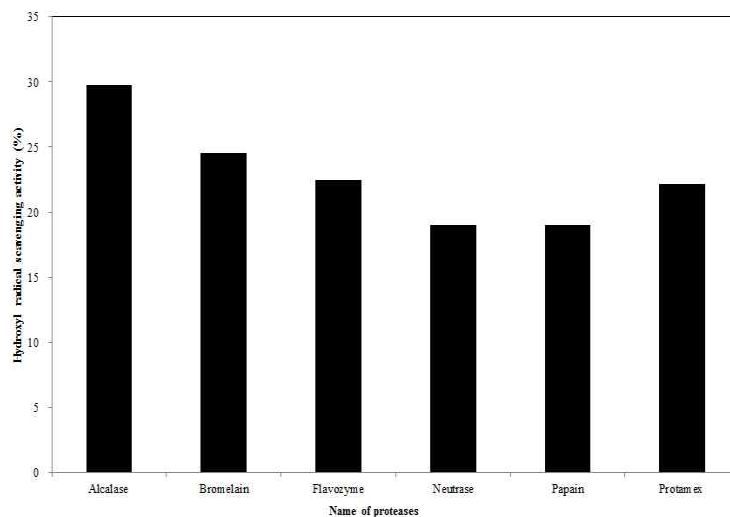


Fig. 93. The degree of hydroxy radical scavenging activity of Yeonsan Ogae edd white protein hydrolysates. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

④ Fe²⁺ 킬레이션 능력

화합물의 금속 킬레이트력은 산화된 금속이온의 산화 환원 전위를 낮춤으로서 안정화시켜 화합물의 잠재적인 항산화 활동성에 대한 지시약으로서 쓰일 가능성이 높다 (Girgih et al., 2010). 금속 이온을 킬레이트화 하는 가수분해물들에 대한 능력을 Fig. 94에서 보여준다.

본 연구에서 가수분해물들의 킬레이션 능력은 약 30.0%에서 70.0% 사이의 분포를 보여 주었는데 alcalase에서 제일 높았고 protamex에서는 제일 낮았다. 다른 연구 결과를 보면 금속

킬레이트력 능력은 단백질의 종류, 효소 종류 그리고 효소 농도에 큰 영향을 받는 것으로 보고하고 있다. Alcalase 가수 분해 산물은 pepsin-pancreation 가수 분해 산물보다 금속 킬레이트력이 현저히 더 높았고, 이것은 각 효소에서 생성된 펩티드 종류가 다른 것 때문일 가능성도 있다. 가수 분해 산물의 금속 킬레이트력 또한 86.43%에서 93.09% 증가한 효소 농도에 따라 상승했고, 이것은 효소 단계가 증가함에 따라 더 많은 수의 펩티드가 작용(liberation)된 것임을 알 수 있다. 또한 금속 킬레이션 능력은 펩티드 크기가 증가할 때 감소했으며, 이 의미는 낮은 분자량의 펩티드가 금속 킬레이트화에 더 큰 효과를 보인다고 제시한다.

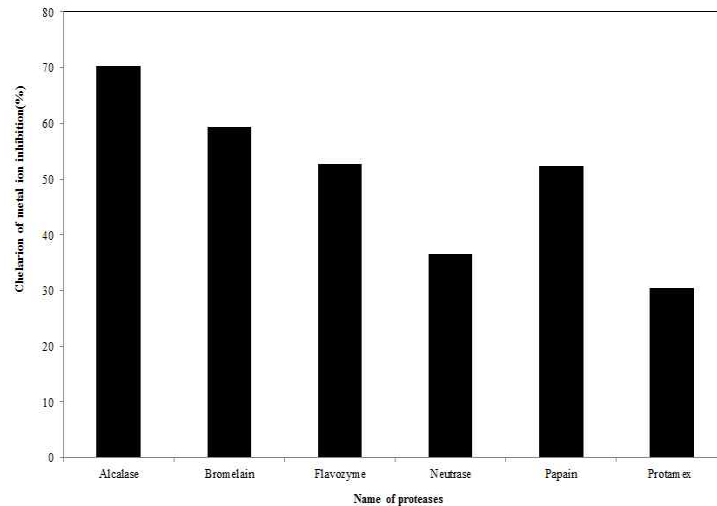


Fig. 94. The degree of chelation activity of Yeonsan Ogae egg white protein hydrolysates. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

⑤ 가수 분해물의 항산화 저해농도

오계란 단백질 가수분해물들은 사용된 효소의 종류에 따라서 DPPH 소거능, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 금속 킬레이션 능력이 다르게 나타났다. DPPH 소거능 과 하이드록시 라디칼 소거능 소거능은 가수분해물에 대하여 능력은 다르지만 경향을 유사하였고, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능과 금속 킬레이션 능력에 차이는 있지만 유사한 경향을 보여주었다. 이러한 이유들은 사용 효소마다 생산한 가수 분해물의 분자량의 차이와 펩타이드 종류의 차이에 원인이 있다고 볼 수 있다. 좀 더 가수 분해물들의 항산화 저해 능력을 비교하기 위해서 각각 가수 분해물에 대하여 IC₅₀ 평가하였다. 전체적으로 보면 항산화 저해능은 사용한 효소 및 항산화 저해 대상에 따라 크게 차이가 있었다 (Table 41).

Alcalase에 의하여 생산된 가수 분해물은 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능, 및 DPPH 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 DPPH 소거능 저해농도는 각각 1.24, 5.30, 19.72 및 44.88 mg/ml 이었다. Bromelain에 의하여 생산된 가수 분해물은 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, DPPH 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하

이드록시 라디칼 소거능, 및 DPPH 소거능 저해농도는 각각 3.99, 5.3, 19.72 및 4.88 mg/ml 이었다. Flavourzyme에 의하여 생산된 가수 분해물은 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, DPPH 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 DPPH 소거능 저해농도는 각각 1.25, 10.30, 22.11 및 3.40 mg/ml 이었다. Neutrase에 의하여 생산된 가수 분해물은 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, DPPH 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능, 및 DPPH 소거능 저해농도는 각각 6.36, 6.10, 19.08 및 3.64 mg/ml 이었다. Papain에 의하여 생산된 가수 분해물은 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, DPPH 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능, 및 DPPH 소거능 저해농도는 각각 4.58, 6.50, 14.37 및 3.82 mg/ml 이었다. Protamex에 의하여 생산된 가수 분해물은 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, DPPH 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었다. 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능, 및 DPPH 소거능 저해농도는 각각 17.56, 6.80, 14.54 및 1.93 mg/ml 이었다.

Table 41. Inhibition concentration (IC_{50}) of antioxidant capacity of protein hydrolysate of Ogae egg white.

Hydrolysates	Antioxidant activities			
	DPPH radical scavenging activity	Superoxide anion radical scavenging activity	Hydroxy radical scavenging activity	Fe ²⁺ chelating activity
	(mg/ml)			
Alcalase hydrolysate	4.88	5.3	19.72	1.24
Bromelain hydrolysate	2.46	12.4	24.76	3.99
Flavourzyme hydrolysate	3.40	10.3	22.11	1.25
Neutrase hydrolysate	3.64	6.1	19.08	6.36
Papain hydrolysate	3.82	6.5	14.37	4.58
Protamex hydrolysate	1.93	6.8	14.54	17.56

(다) 연산 오계란 펩타이드 아미노산 분석

오계란 단백질 가수분해물들은 사용된 효소의 종류에 따라 아미노산의 분포가 다르게 나타났다. Alcalase, bromelain, flavourzyme 효소로 가수분해 된 아미노산의 분포를 Fig. 95 와 같다. A는 alcalase 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산의 분포, B는 bromelain 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산의 분포, C는 flavourzyme 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산 분포를 나타낸 것이다. A 그림에서는 alcalase 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 histidine이 31.32%로서 가장 높은 함량이 나타났고, 필수아미노

산 분포 중에서는 valine이 9.33%로서 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. B 그림에서 보면 bromelain 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 cystine이 15.82%로서 가장 높은 함량이 나타났고, 필수아미노산 분포 중에서는 lysine이 9.60%로서 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. C 그림에서 보면 flavourzyme 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수 아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 leucine이 10.76%로서 가장 많은 함량을 차지하였고, 필수아미노산 분포 중에서도 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. 또한 alcalase, bromelain, flavourzyme 효소의 아미노산 분포에서는 tryptophan이 발견되지 않았으며, 특히 alcalase, bromelain 효소에서는 proline이 발견되지 않아서 가장 적은 종류의 아미노산 조성을 보여 주었다.

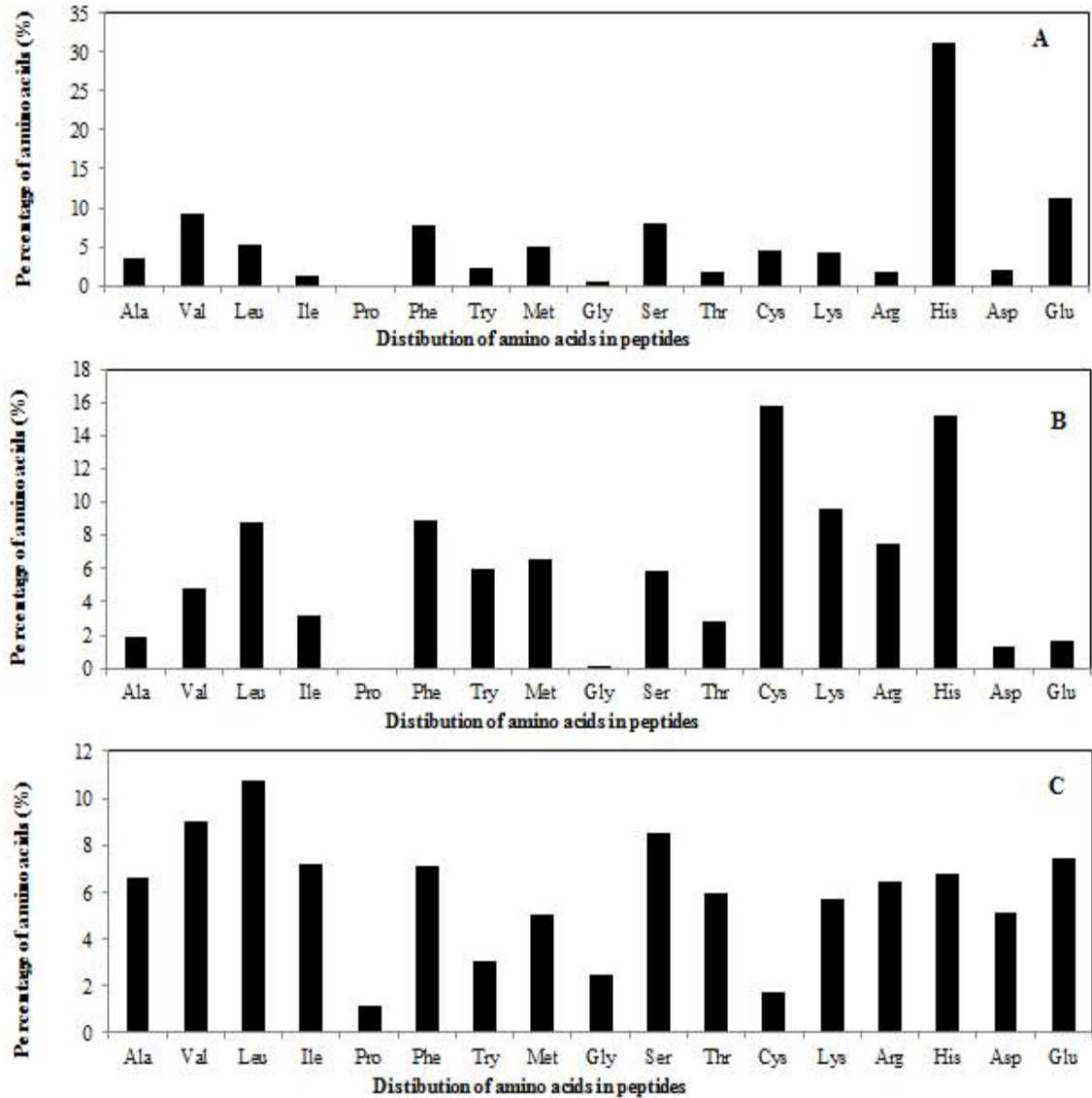


Fig. 95. Amino acid composition distribution of protein hydrolysates of black body fowl(Yeonsan Ogae) egg white. A, B, and C graph is distribution of amino acids composition in peptides of hydrolysate using alcalase, bromelain and flavourzyme, respectively.

오계란 단백질 가수분해물들은 사용된 효소의 종류에 따라 아미노산의 분포가 다르게 나타났다. Neutrase, papain, protomex 효소로 가수분해 된 아미노산의 분포를 Fig. 96.와 같다. A는 neutrase 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산의 분포, B는 papain 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산의 분포, C는 protomex 효소를 이용하여 가수분해 된 아미노산 분포를 나타낸 것이다. A 그림에서는 neutrase 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 histidine이 34.0%로서 가장 높은 함량이 나타났고, 필수아미노산 분포 중에서는 valine이 12.20%로서 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. B 그림에서 보면 papain 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수아미노산(valine, methionine,

isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 histidine이 40.32%로서 가장 높은 함량이 나타났고, 필수아미노산 분포 중에서는 leucine이 9.15%도 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. C 그림에서 보면 protomex 효소로 가수분해 하였을 때의 구성아미노산과 필수 아미노산(valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine)의 분포를 나타내었다. 구성아미노산 분포 중에서 histidine이 48.37%로서 가장 많은 함량을 차지하였고, 필수아미노산 중에서는 valine이 8.61%로서 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것으로 나타났다. 또한 neutrase, papain, protamex 효소의 아미노산 조성에서 tryptophan은 발견되지 않았으며, 총 아미노산 함량이 가장 높게 나타난 것은 flavourzyme 효소이고 이중의 43.73%가 필수 아미노산 함량인 것으로 나타났다.

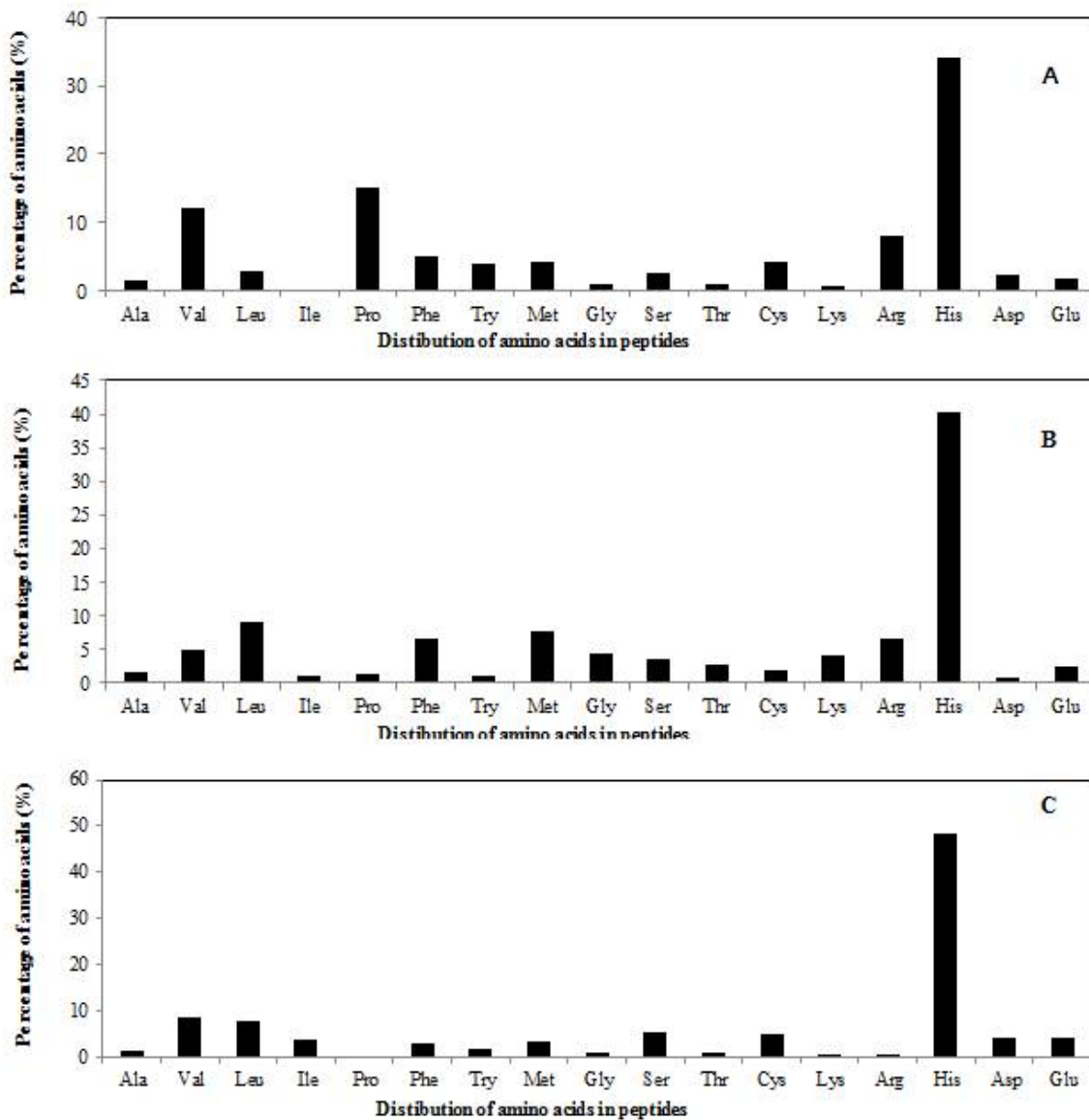


Fig. 96. Amino acid composition distribution of protein hydrolysates of black body fowl(Yeonsan Ogae) egg white. A, B, and C graph is distribution of amino acids composition in peptides of hydrolysate using neutrase, papain, and protamex, respectively.

Alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex 효소로 가수분해 시킨 오계란 가수분해물의 구성 아미노산을 극성 아미노산, 비극성 아미노산, 양이온 아미노산, 음이온 아미노산으로 분류하여 Table 12 에 나타내었다. 극성 아미노산의 함량은 alcalase, flavourzyme, protamex 효소로 가수분해 시켰을 때 serine이 가장 높은 함량을 보여주고, bromelain, neutrase 효소로 가수분해 시켰을 때에는 cystine이 가장 높은 함량으로 보여 진며, papain 효소로 가수분해 시켰을 때에는 glycine이 가장 높은 함량으로 보여 진다. 비극성 아미노산 함량은 모든 flavourzyme, papain 효소에서 가수분해 시켰을 때 leucine이 가장 높은 함량으로 보여 주고, alcalase, protamex 효소에서는 valine이 가장 높은 함량으로 보여 지며, bromelain 효소에서는 phenylalanine이 가장 높은 함량으로 보여 지고, neutrase 효소에서는 proline이 가장 높은 함량으로 보여 진다. 양이온 아미노산의 함량은 alcalase, bromelain, neutrase, flavourzyme, papain, protamex 효소로 가수분해 시켰을 때 모두 histidine이 가장 높은 함량으로 보여 졌으며, 음이온 아미노산의 함량은 neutrase 효소로 가수분해 시켰을 때에는 aspartic acid가 가장 높은 함량으로 보여 주고, alcalase, bromelain, flavourzyme, papain, protamex 효소에서는 glutamic acid이 가장 높은 함량으로 보여 진다.

Table 42. Amino acid composition distribution of protein hydrolysates using various enzymes of black body fowl(Yeonsan Ogae) egg white.

Amino acids	Alcalase	Bromelaine	Flavourzyme	Neutrase	Papain	Protamex
Comostion of percent of amino acids (%)						
Nonpolar side chains						
Proline	N.D.	N.D.	1.10	14.94	1.23	N.D.
Alanine	3.57	1.87	6.57	1.55	1.68	1.43
Valine	9.33	4.82	9.04	12.20	4.84	8.61
Methionine	4.94	6.53	5.00	4.29	7.60	3.35
Isoleucine	1.33	3.13	7.19	N.D.	1.17	3.92
Leucine	5.19	8.79	10.76	2.94	9.15	7.91
Phenylalanine	7.83	8.96	7.10	4.92	6.47	3.09
Polar side chains						
Threonine	1.88	2.78	5.93	0.92	2.72	0.85
Serine	7.98	5.90	8.54	2.64	3.48	5.44
Glycine	0.42	0.15	2.50	0.95	4.35	0.85
Cystine	4.42	15.82	1.70	4.16	1.96	4.94
Tyrosine	2.26	6.02	3.06	3.88	1.04	1.85
Charged side chains						
Basic						
Histidine	31.32	15.23	6.81	34.03	40.32	48.37
Lysine	4.29	9.60	5.69	0.62	3.99	0.44
Arginine	1.88	7.46	6.47	8.07	6.72	0.51
Acids						
Aspartic acid	2.05	1.31	5.08	2.17	0.94	4.22
Glutamic acid	11.29	1.64	7.46	1.69	2.33	4.23
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

N. D. : Not detected

(라) RF-HPLC에 의한 분석

HPLC 분석결과 Standard 펩타이드는 1. GLy-Tyr, 2. Val-Tyr-Val, 3. Met enkephalin, 4. Leu enkephalin, 5. Angiotensin II 의 5가지 표준 샘플이다. 표준샘플의 각각의 분자량은 1. Gly-Tyr 238.2, 2. Val-Tyr-Val 379.5, 3. Met enkephalin acetate 573.7, 4. Leu enkephalin 555.6, 5. Angiotensin II acetate 1046.2의 분자량을 가지고 있다. Fig. 97 의 각 A, B, C의 그래프는 효소별로 가수분해 된 그래프를 표준 peptide 샘플과 비교함으로써 확인 하였다. A 그래프는 alcalase 효소로 가수분해한 것으로 alcalase 효소의 cleave는 glutamate, leucine, tyrosine, lysine, glutamine 이다. 그래프 B는 bromelain 효소로 가수분해 한 것이며 효소의 기질은 lysine, alanine, tyrosine, glycine이다. C 그래프는 flavourzyme 효소로 가수분해한 것으로 효

소의 기질부위는 tryptophan, isoleucine, phenylalanine, throsine, leucine, valine, lysine, arginine, serine, threonine, alanine 이다. HPLC 분석에서 표준샘플과 비교 한 결과 모두 표준 펩타이드 분포 안에 들어간다. 그러나 각 효소마다 펩타이드 분포는 피크의 위치와 수치가 다르다. A는 크게 세 개로 볼 수 있으며, 왼쪽의 피크부터 분자량 27.7, 39.3, 19.1 mV의 분자량 값을 나타내었다. B는 그래프의 2개의 피크의 분자량 값은 80.9, 60 mV의 분자량 값을 나타내었다. 그래프 C의 세 개의 피크를 볼 수 있으며 34, 21.8, 128.8 mV 분자량 값을 볼 수 있다. 결과적으로 다른 효소마다 펩타이드의 생산이 다른 것으로 판명된다.

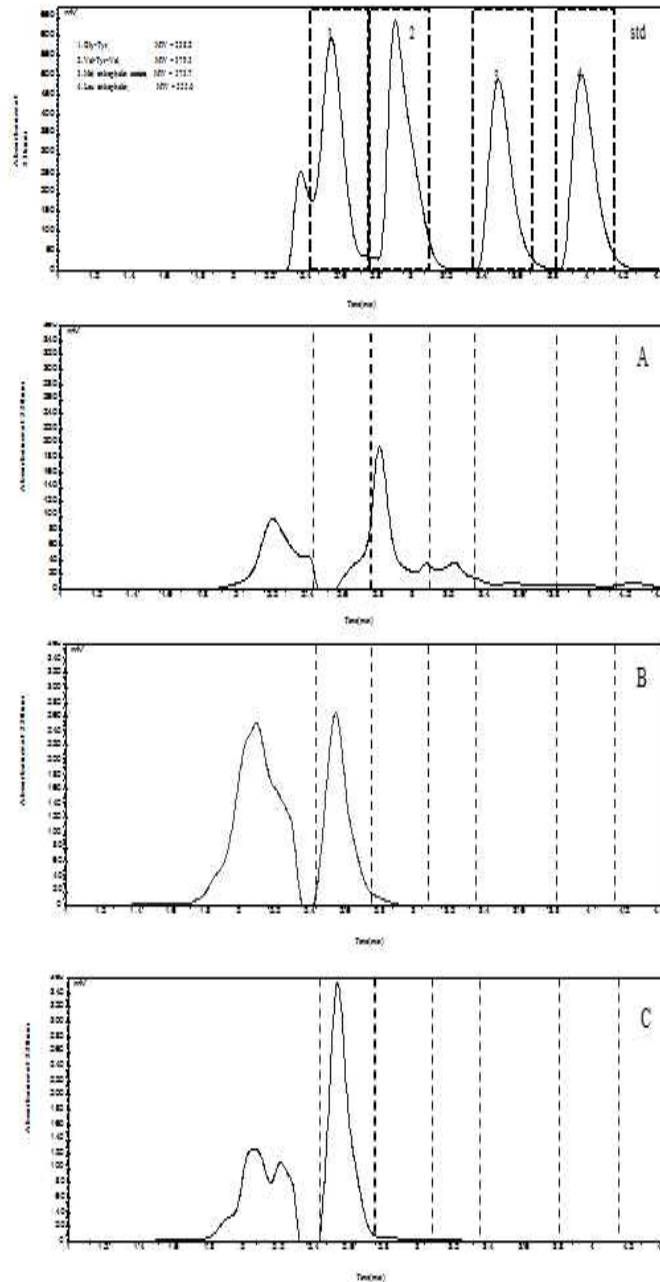


Fig. 97. HPLC chromatogram of peptides of hydrolysate using alcalase, bromelain, and flavourzyme, respectively. A : alcalase, B : bromelain, C : flavourzyme

HPLC 분석결과 standard 펩타이드는 1. Gly-Tyr, 2. Val-Tyr-Val, 3. Met enkephalin, 4. Leu enkephalin, 5. Angiotensin II 의 5가지 표준 샘플이다. 표준샘플의 각각의 분자량은 1. Gly-Tyr 238.2, 2. Val-Tyr-Val 379.5, 3. Met enkephalin acetate 573.7, 4. Leu enkephalin 555.6, 5. Angiotensin II acetate 1046.2의 분자량을 가지고 있다. Fig. 98 의 각 A, B, C의 그래프는 효소별로 가수분해된 그래프를 표준 peptide 샘플과 비교함으로써 확인 하였다. A 그래프는 neutrase 효소로 가수분해한 것으로 cleave는 phenylalanine, throsine, leucine, valine 이다. 그래프 B는 papain 효소로 가수분해 된 것이며 효소의 기질부위는 phenylalanine, throsine, leucine, valine, lysine, arginine 으로 분해가 된다. C 그래프는 protamex 효소로 가수분해한 것으로 tryptophan, isoleucine, proline, phenylalanine, throsine, leucine, 그리고 valine 이다. HPLC 분석에서 표준샘플과 비교 한 결과 모두 표준 펩타이드 분포 안에 들어간다. 그러나 각 효소마다 펩타이드 분포는 피크의 위치와 수치가 다르다. A는 크게 세 개로 볼 수 있으며, 왼쪽의 피크부터 분자량 100.3, 70.5, 12.8 mV의 분자량 값을 나타내었다. B는 그래프의 두 개의 피크의 분자량 값은 42.9, 70.8 mV의 분자량 값을 나타내었다. 그래프 C의 세 개의 큰 피크를 볼 수 있으며 24.3, 69.3, 12 mV 분자량 값을 볼 수 있다. 결과 적으로 다른 효소마다 펩타이드의 생산이 다른 것으로 판명된다.

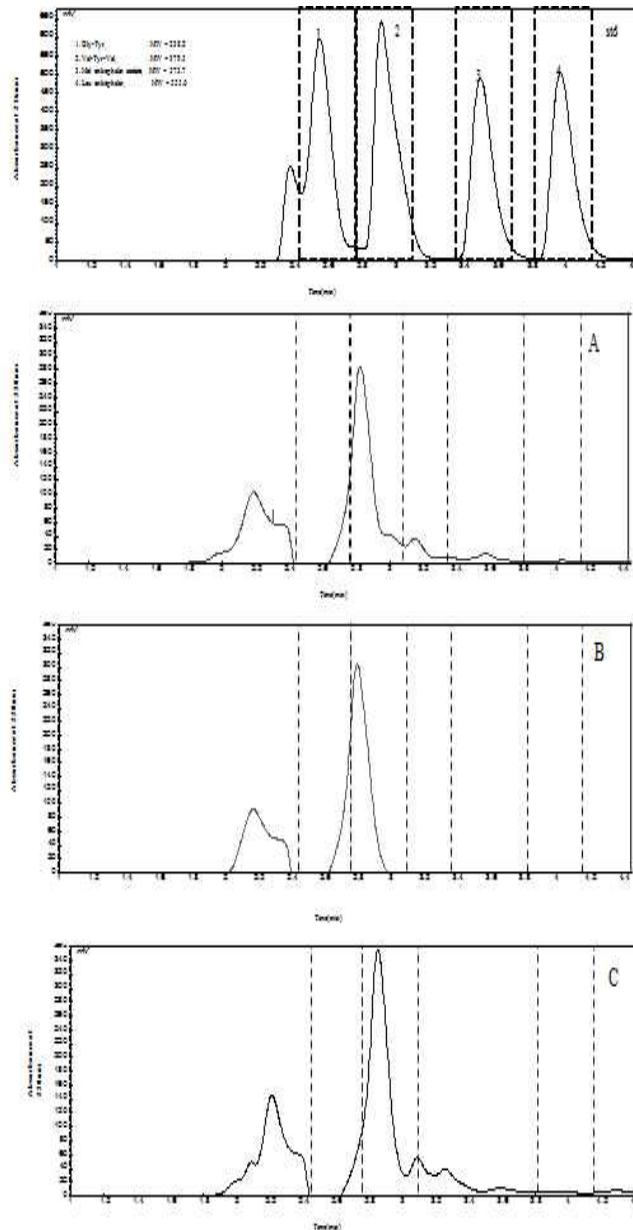


Fig. 98. HPLC chromatogram of peptides of hydrolysate using neutrase, papain and protamex, respectively. A : neutrase, B : papain, C : protamex

(마) MALDI-TOF에 의한 분석

Protease를 이용하여 가수분해 한 가수분해물의 분자량을 결정하기 위하여, MALDI-TOF-MS(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry) 분석을 수행하였다. 오계란 가수분해물 샘플 2 μ L을 광택 스틸 384 표적 판에 붙였다. 10mg/mL of α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) in 0.1% TFA 와 ACN을 1:1로 mix 한 solution을 혼합하고 건조시켰다. 각 샘플은 Flex Control 3.0 질량분석기 (Bruker Daltonics, 독일)의 MALDI TOF MS를 이용하여 분석하였다. 100 - 4,000 m/z에서 양이온화 및 반사 모드에서 300 레이저 샷으로부터 데이터를 축적하여 획득하였다.

오계란을 alcalase, bromelain, Flavourzyme을 이용하여 가수분해한 샘플에의 분자량을

MALDI-TOF 질량 분석기를 이용하여 분석한 결과 Fig. 99에 나타난 그림과 같다. alcalase를 이용하여 가수분해 한 오계 내장의 펩타이드의 분자량 범위는 약 420 - 2,050 Da 이었고, 같은 조건에서 bromelain 효소를 이용하여 처리한 오계내장 펩타이드의 경우 분자량 범위는 약 490 - 3,180 Da 범위이었다. 또한 Flavourzyme을 이용하여 가수분해한 펩타이드의 분자량의 범위는 440 - 3,430 Da 이었다. 이들 결과로부터 일반적인 닭의 분자량 범위에 비하여 크게 감소하였으며, 오계란의 분자량과 비교 하였을 때 작은 분자량의 크기가 전체적으로 감소한 것을 확인하였으며, 이 결과는 오계의 내장으로부터 수득한 가수분해물이 인체 내로 신속하게 유입 될 수 있다는 것을 의미한다.

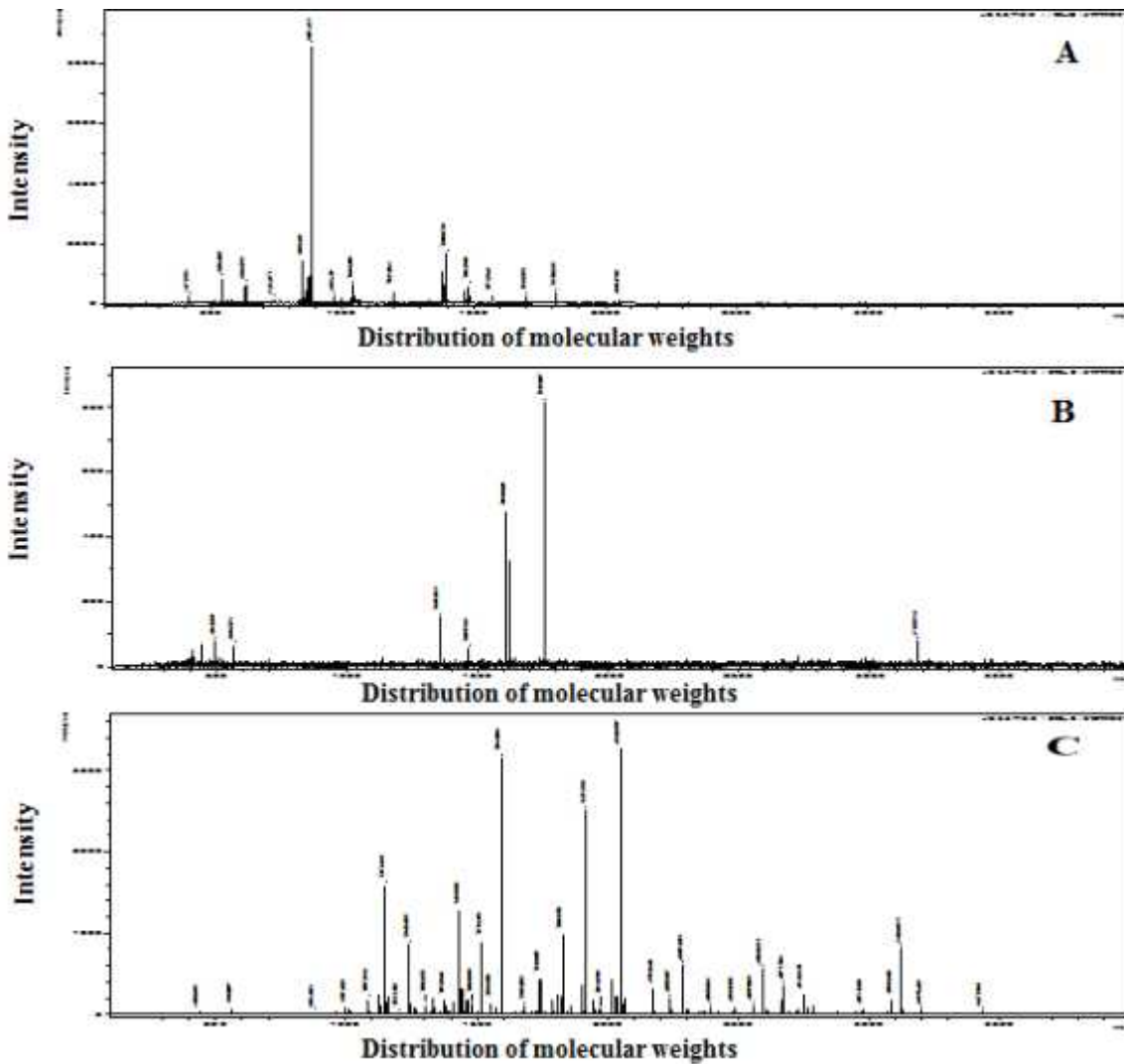


Fig. 99. The molecular weight distribution of protein hydrolysates of Yeosan Ogae egg white . A, B, and C chromatogram of MALDI-TOF represent peak intensity of peptides of hydrolysate using alcalase, bromelain, and Flavourzyme, respectively. A, B, and C graph is distribution of molecular weight in peptides of hydrolysate using alcalase, bromelain, and flavourzyme, respectively.

오계 내장을 neutrase, papain, protamex 이용하여 가수분해한 가수분해물에 대한 분자량을 MALDI-TOF 질량 분석기를 이용하여 분석한 결과 Fig. 100 에서 보는 바와 같이 neutrase를 이용하여 가수분해 한 경우 펩타이드의 분자량 범위는 약 480- 3,720 Da 이었고, 같은 조건에서 papain 효소를 이용하여 처리한 경우 펩타이드의 분자량 범위는 약 410 - 1,965 Da 범위이었다. 또한 Flavourzyme을 이용하여 가수분해한 펩타이드의 분자량의 범위는 430 - 2,050 Da 이었다. 이들 결과로부터 일반적인 닭의 분자량 범위에 비해 크게 감소한 것을 알 수 있었으며, 오계 내장과 비슷한 분자량의 범위를 보였다. 특히 papain 효소를 이용하여 가수분해 한 펩타이드의 경우 분자량의 범위가 매우 좁았으며, 분자량의 범위가 매우 크게 감소한 것을 확인하였다.

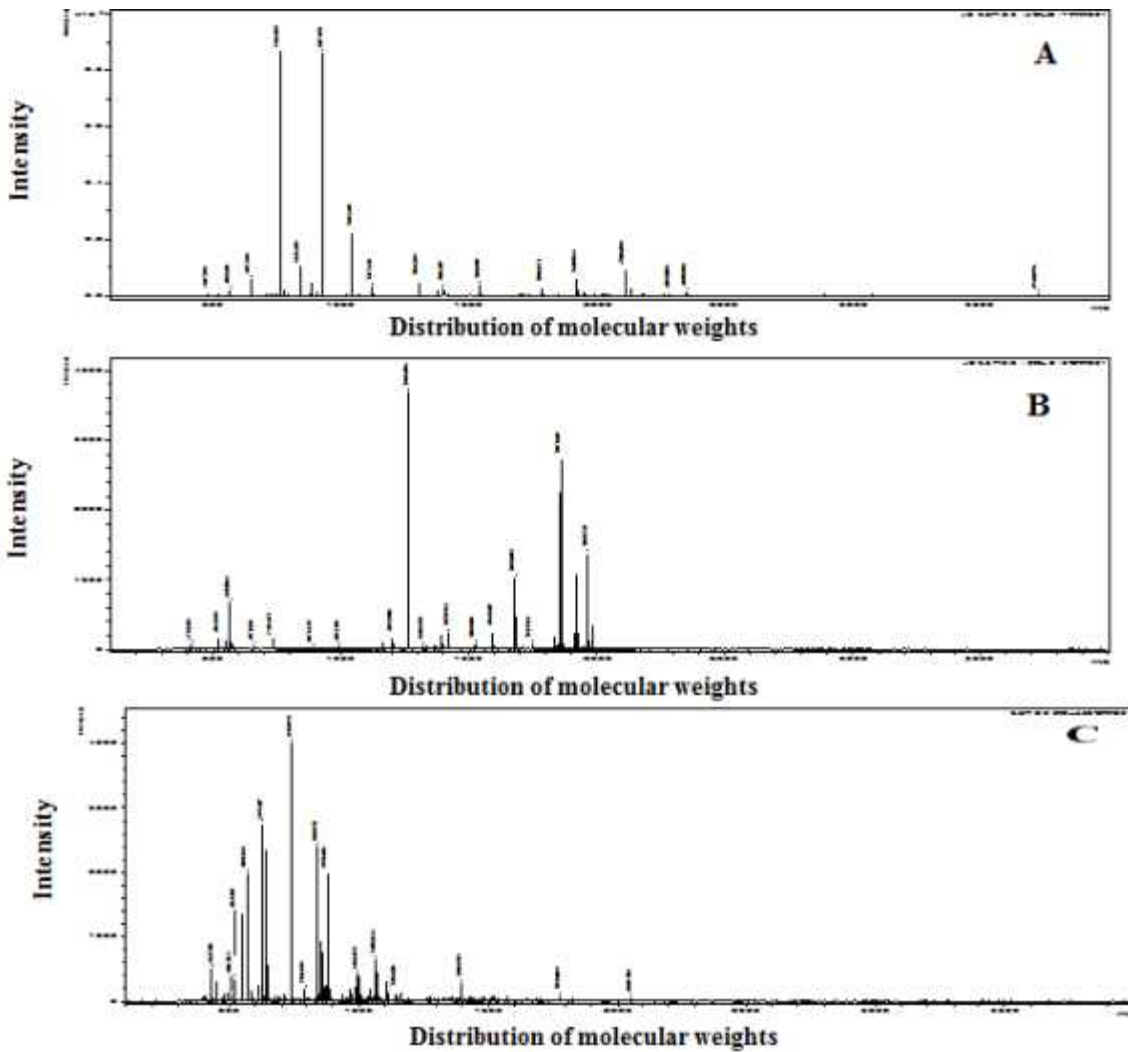


Fig. 100. The molecular weight distribution of protein hydrolysates of Yeosan Ogae egg white . A, B, and C chromatogram of MALDI-TOF represent peak intensity of peptides of hydrolysate using neutrase, papain, protamex, respectively. A, B, and C graph is distribution of amolecular weight in peptides of hydrolysate using neutrase, papain, and protamex.

분자량의 분포를 평균으로 확인 한 결과를 Fig. 101에 나타내었다.

Flavourzyme을 이용하여 가수분해 한 펩타이드 샘플의 경우 1,914 Da으로 가장 분자량의 크기가 크게 확인되었으며, protamex 효소를 이용하여 가수분해 한 펩타이드의 경우 958 Da 으로 가장 분자량의 크기가 작은 것을 확인하였다.

Alcalase 효소를 이용하여 가수분해 한 펩타이드 샘플은 1,155 Da, papain 효소를 이용한 가수분해물은 1,198 Da 등으로 나타났다.

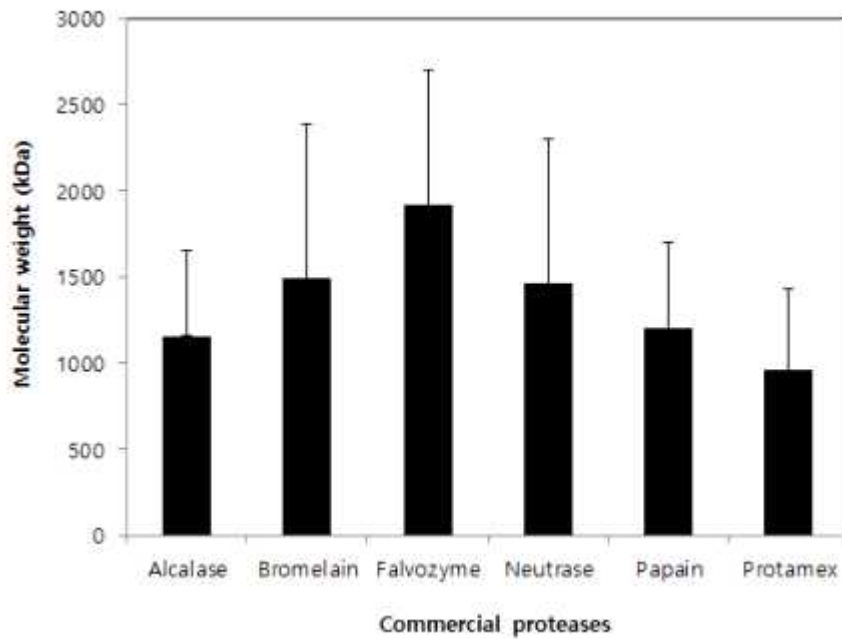


Fig. 101. The average molecular weight of hydrolysate Yeonsan Ogae egg white protein produced by using commercial proteases such as alcalase, bromelain, Flavourzyme, neutrase, papain and protamex. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

다음 Fig. 102 의 그림은 6가지의 효소를 이용하여 오계를 가수분해 한 샘플의 분포도를 각각 나타낸 그림이다. Papain 효소를 이용하여 오계란을 가수분해 한 가수분해물은 2,000 Da 미만의 분자량으로 분포되어있으며, chromatogram 결과 15개의 피크를 확인 할 수 있었다. 가장 많은 피크를 보여준 Flavourzyme의 경우 35개의 피크로 3500 Da 미만의 분자량을 보였으며, bromelain의 경우 3200 Da 미만의 분자량으로 chromatogram 결과 7개의 피크만이 분석되었다. Alcalase 효소를 이용한 가수분해물의 경우 15개의 피크를 분석하였으며, 2100 Da 미만의 분자량으로 분포되어있음을 확인하였다.

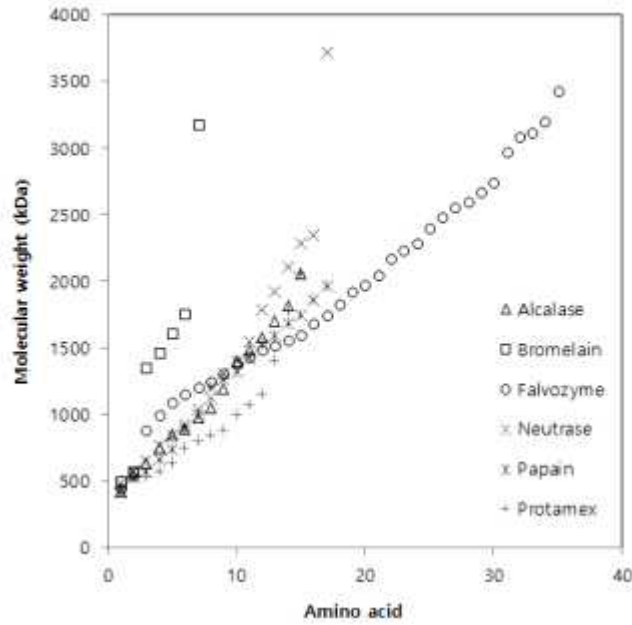


Fig. 102. The ranges of molecular weight of hydrolysate Yeonsan Ogae egg white protein produced by using commercial proteases such as alcalase, bromelain, Flavourzyme, neutrase, papain, and protamex. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration.

사. 연산오계 단백질 가수분해물 한외여과막을 이용한 fractionation 별 향산화 특성

(1) 연산오계육 단백질 가수분해물의 한외 여과막을 이용한 추출 및 분리 공정과 향산화 특성

(가) 연산 오계육 단백질 가수분해물 수율

Table 43. Yield of protein hydrolysates of Yeonsan Ogae meat.

Hydrolysates	Yield of hydrolysate(%)
Alcalase hydrolysate	28.2
Bromelain hydrolysate	43.5
Flavourzyme hydrolysate	46.3
Neutrase hydrolysate	51.6
Papain hydrolysate	57.2
Protamex hydrolysate	47.9
Bromelain	46.7

(나) 오계육 단백질 가수분해물의 향산화 특성

오계육 단백질 가수 분해물을 ultrafiltration를 이용하여 분리하였다. 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 100 kDa로 fractionation된 단백질 가수 분해물들은 동결 건조기에서 분말화 시킨 다음 향산화 특성을 알아보기 위해서 DPPH 라디칼 소거능, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디

칼 소거능, Fe²⁺ 킬레이션 능력을 분석하였다.

① 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능

일반적으로 산화과정에서 항산화제는 프리라디칼과 반응을 하여 안정한 화합물을 생산하여 산화과정을 종결한다. 이러한 물질 중에서 DPPH는 메탄올 용매에서 안정한 라디칼을 유지하며 517 nm에서 최대흡광도를 나타내기 때문에 천연물(natural compounds)의 환원반응에 널리 사용이 되고 있다. 이러한 DPPH는 항산화제와 같은 프로톤공여(proton donating) 물질을 만나면 라디칼이 소거(scavenging)된다. 그리고 항산화제의 프로톤공여 능력에 따라 용액의 색이 퍼플에서 노란색으로 변한다. 따라서 DPPH는 펩타이드 및 천연 항산화 물질의 항산화력을 비교하는데 매우 유용한 분석 수단으로 사용이 되어왔다.

Fig. 103 은 ultrafiltration를 이용하여 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 100 kDa로 fractionation된 단백질 가수분해물의 DPPH 항산화 능력 분석 결과를 보여준다. 단백질 가수 분해물들의 DPPH 항산화 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 이러한 이유는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 가수 분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 가수 분해물들의 DPPH 항산화 능력은 약 58%에서 85% 사이의 분포를 보여 주었는데 DPPH의 소거능은 1 kDa, 10 kDa, 5 kDa, 100 kDa 순으로 나타났으며, 가장 높은 활성을 보여준 것은 1 kDa로 fraction한 것이며 84.02%로 가장 높은 활성을 보여 준다. 연구 결과에 따르면 펩타이드들의 항산화 능력은 1) 구성아미노산 중에서 비극성 및 방향족 아미노산, 2) 분자량이 작을수록 항산화 능력이 높은 것으로 알려졌다. 이러한 연구 결과들은 사용된 ultrafiltration의 크기에 따라 항산화능력이 왜 다른지 설명을 해준다.

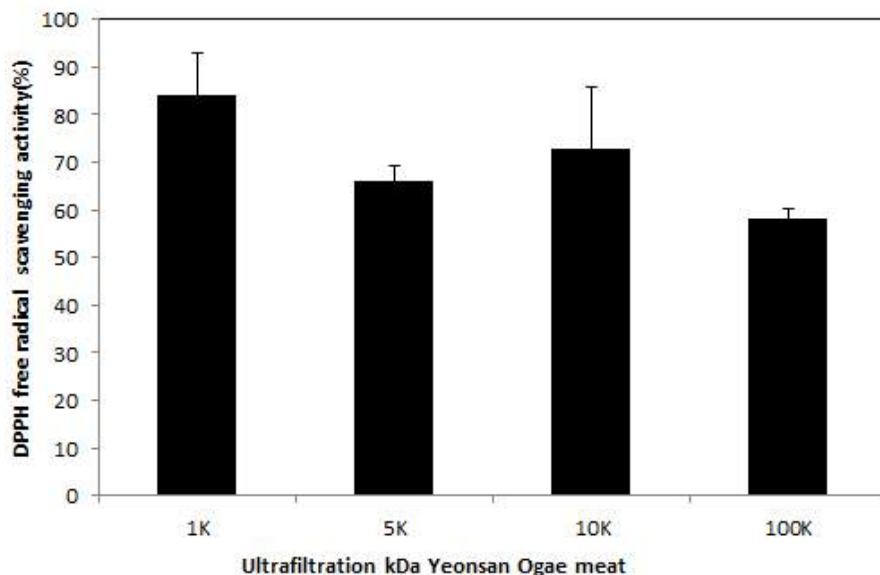


Fig. 103. The degree of DPPH radical scavenging activity of Yeonsan Ogae meat protein hydrolysates.

② 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능

슈퍼옥사이드 라디칼 (superoxide radical)은 굉장히 유독한 라디칼 종(specie)이며 무수한 생체적 작용에서 생성된다. 그리고 직접적인 과산화지방질화 (lipid peroxidation)를 주도하진 못하지만 과산화수소나 하이드록실 라디칼과 같은 굉장히 반응성이 높은 물질의 전구물(precursor)이다. 생세포는 천부적으로 효소 산화방지제의 생물학적 방어 기제를 갖춰 reactive oxygen species/reactive nitrogen species (ROS/NOS)를 무해한 분자들로 전환하는 원인이 된다. 그 기제들 중 하나로는 superoxide dismutase (SOD)를 통해 superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$)를 O_2 와 H_2O_2 로 전환한다. 하지만, 생체의 능력으로 라디칼을 제거함은 지나치게 생산되는 프리 라디칼 (free radical)에 압도될 수 있다. Fig. 104 는 ultrafiltration를 이용하여 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 100 kDa로 fractionation된 단백질 가수분해물의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 분석 결과를 보여준다. 단백질 가수 분해물들의 superanion 소거 항산화 능력은 약 48.0에서 60.0% 사이의 분포를 보여 주었는데 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능은 DPPH의 소거능은과 비슷하게 1 kDa, 10 kDa, 5 kDa, 100 kDa 순으로 나타났으며, 가장 높은 활성을 보여준 것은 1 kDa로 fraction 한 것이며, 59.65%로 가장 높은 활성을 보여 준다. 이러한 결과는 가수 분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 또한 가수 분해물에 따라서 소거하는 라디칼의 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다.

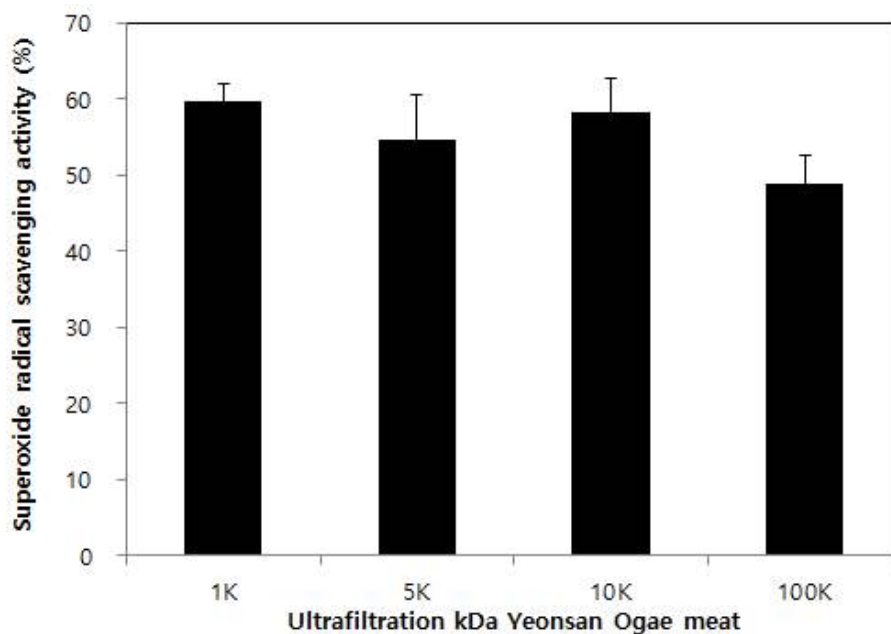


Fig. 104. The degree of superoxide radical scavenging activity of Yeosan Ogae meat protein hydrolysates.

③ 하이드록시 라디칼 소거능

하이드록실 라디칼은 H_2O_2 와 펜톤 반응에서의 Fe (II) 이나 Cu (II)와 같은 금속이온 사이의 작용에서 발생하는데, 굉장히 반응성이 높고, 수명이 짧으며 DNA, 단백질, 그리고 지질을 파괴적으로 수산화한다고 믿어지고 있다. 또한 하이드록실 라디칼은 방향족 화합물(aromatic compound)와 작용해 hydroxycyclohexadienyl radical을 생성할 수 있고 더 나아가서 산소와 작용해 peroxy radical을 생성하거나 phenoxyl radical로 분해된다. 그러므로 하이드록실 라디칼 제거는 이러한 라디칼에 의해 유발되는 산화스트레스로 인해 생기는 여러 가지 질병들을 방지하는데 필요하다. Fig. 105는 ultrafiltration를 이용하여 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 100 kDa로 fractionation된 단백질 가수분해물의 하이드록시 라디칼 소거능 분석 결과를 보여준다. 단백질 가수 분해물들의 하이드록시 라디칼 소거 항산화 능력은 약 12.17에서 26.8% 사이의 분포를 보여 주었는데 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능은 5 kDa, 10 kDa, 1 kDa, 100 kDa 순으로 나타났으며, 가장 높은 활성을 보여준 것은 5 kDa로 fraction한 것이며, 26.80%로 가장 높은 활성을 보여 준다. 연구 결과에 따르면 펩타이드들의 항산화 능력 분자량이 작을수록 높은 것으로 알려졌다. 또한 다른 연구자들의 연구결과에 따르면 하이드록실 라디칼 제거력은 증가하는 펩티드 크기에 따라 저하되었고, 이것은 낮은 분자량을 가진 펩티드가 더 높은 분자량을 가진 펩티드보다 강한 하이드록실 라디칼 제거제로서 더 효과가 좋다고 보고하였다. 이것은 단백질 가수분해물 중에 하이드록실 라디칼 제거 펩타이드와 제거를 하지 않는 펩티드의 비례에 따라서 항산화력이 다르게 나타난다는 것과 일치한다.

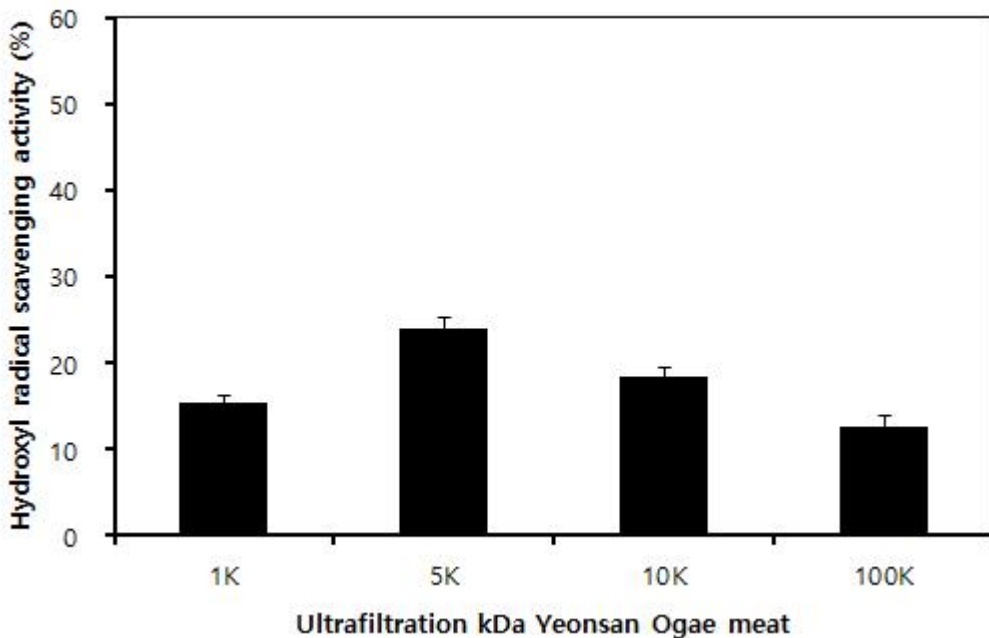


Fig. 105. The degree of hydroxy radical scavenging activity of Yeonsan Ogae meat protein hydrolysates.

④ Fe²⁺ 킬레이션 능력

화합물의 금속 킬레이트력은 산화된 금속이온의 산화 환원 전위를 낮춤으로서 안정화시켜 화합물의 잠재적인 항산화 활동성에 대한 지시약으로서 쓰일 가능성이 높다 (Girgih et al., 2010). Ultrafiltration를 이용하여 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 100 kDa로 fractionation된 단백질 가수분해물의 금속 이온을 킬레이트화하는 능력을 Fig. 107 에서 보여준다. 단백질 가수분해물들의 킬레이트화 하는 능력은 약 12%에서 26.56% 사이의 분포를 보여 주었는데 킬레이션 능력은 5 kDa, 1 kDa, 10 kDa, 100 kDa 순으로 나타났다. 가장 높은 활성을 보여준 것은 5 kDa로 fraction한 것으로 나타났으며, 26.50%로 가장 높은 활성을 보여 준다. 이것은 효소 단계가 증가함에 따라 더 많은 수의 펩티드가 작용(liberation)된 것임을 알 수 있다. 또한 금속 킬레이션 능력은 펩티드 크기가 증가할 때 감소했으며, 이 의미는 낮은 분자량의 펩티드가 금속 킬레이트화에 더 큰 효과를 보인다고 제시한다.

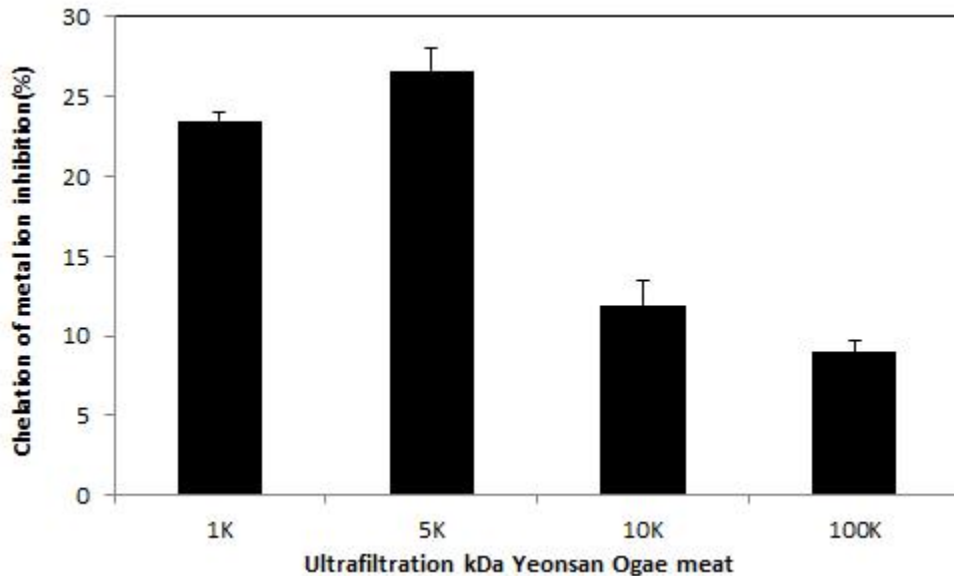


Fig. 107. The degree of chelation activity of Yeonsan Ogae meat protein hydrolysates.

(2) 연산오계 내장육 단백질 가수분해물의 한외 여과막을 이용한 추출 및 분리 공정과 항산화 특성

(가) 연산오계 내장육 단백질 가수분해물 수율

Table 44. Yield of protein hydrolysates of Yeosan Ogae egg white.

Name of enzymes	Yield of hydrolysate (%)
Alcalase	46.9
Bromelain	52.4
Flavourzyme	48.2
Neutrase	53.5
Papain	68.6
Protamex	65.4
Bromelain	67.0

(나) 오계내장육 단백질 가수분해물의 항산화 특성

① 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능

일반적으로 산화과정에서 항산화제는 프리라디칼과 반응을 하여 안정한 화합물을 생산하여 산화과정을 종결한다. 이러한 물질 중에서 DPPH는 메탄올 용매에서 안정한 라디칼을 유지하며 517 nm에서 최대흡광도를 나타내기 때문에 천연물(natural compounds)의 환원반응에 널리 사용이 되고 있다. 이러한 DPPH는 항산화제와 같은 프로톤공여(proton donating) 물질을 만나면 라디칼이 소거(scavenging)된다. 그리고 항산화제의 프로톤공여 능력에 따라 용액의 색이 퍼플에서 노란색으로 변한다. 따라서 DPPH는 펩타이드 및 천연 항산화 물질의 항산화력을 비교하는데 매우 유용한 분석 수단으로 사용이 되어왔다.

Fig. 108은 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 100 kDa ultrafilter로 fractionation된 단백질 가수분해물의 DPPH 항산화 능력 분석 결과를 보여준다. 단백질 가수 분해물들의 DPPH 항산화 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 이러한 이유는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 가수 분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 가수 분해물들의 DPPH 항산화 능력은 약 46.83%에서 75.71% 사이의 분포를 보여 주었는데 DPPH의 소거능은 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 100 kDa 순으로 나타났으며, 가장 높은 활성을 보여준 것은 1 kDa ultrafilter로 fraction한 것이며, 75.71%로 가장 높은 활성을 보여 준다. 연구 결과에 따르면 펩타이드들의 항산화 능력은 1) 구성아미노산 중에서 비극성 및 방향족 아미노산 2) 분자량이 작을수록 항산화 능력이 높은 것으로 알려 졌다. 이러한 연구 결과들은 사용된 ultrafiltration의 크기에 따라 항산화능력이 왜 다른지 설명을 해준다.

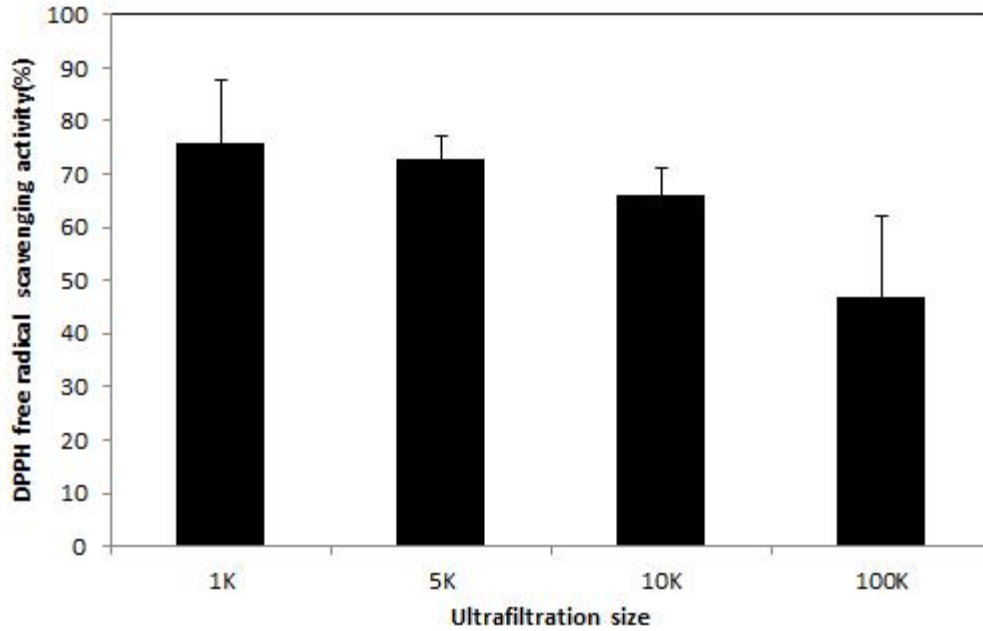


Fig. 108. The degree of DPPH radical scavenging activity of Yeosan Ogae visceral protein hydrolysates.

② 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능

슈퍼옥사이드 라디칼 (superoxide radical)은 굉장히 유독한 라디칼 종(specie)이며 무수한 생체적 작용에서 생성된다. 그리고 직접적인 과산화지방질화 (lipid peroxidation)를 주도하진 못하지만 과산화수소나 하이드록실 라디칼과 같은 굉장히 반응성이 높은 물질의 전구물(precursor)이다. 생세포는 천부적으로 효소 산화방지제의 생물학적 방어 기제를 갖춰 reactive oxygen species/reactive nitrogen species (ROS/NOS)를 무해한 분자들로 전환하는 원인이 된다. 그 기제들 중 하나로는 superoxide dismutase (SOD)를 통해 superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$)를 O_2 와 H_2O_2 로 전환한다. 하지만, 생체의 능력으로 라디칼을 제거함은 지나치게 생산되는 프리 라디칼 (free radical)에 압도될 수 있다. Fig. 109 는 ultrafiltration를 이용하여 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 100 kDa로 fractionation된 단백질 가수분해물의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 분석 결과를 보여준다. 단백질 가수 분해물들의 superanion 소거 항산화 능력은 약 50.88%에서 62.81% 사이의 분포를 보여 주었는데 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능은 1 kDa, 5 kDa, 100 kDa, 10 kDa 순으로 나타났으며, 가장 높은 활성을 보여준 것은 1 kDa ultrafilter로 fraction한 것이며, 62.81%로 가장 높은 활성을 보여 준다. 이러한 결과는 가수 분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 또한 가수 분해물에 따라서 소거하는 라디칼의 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다.

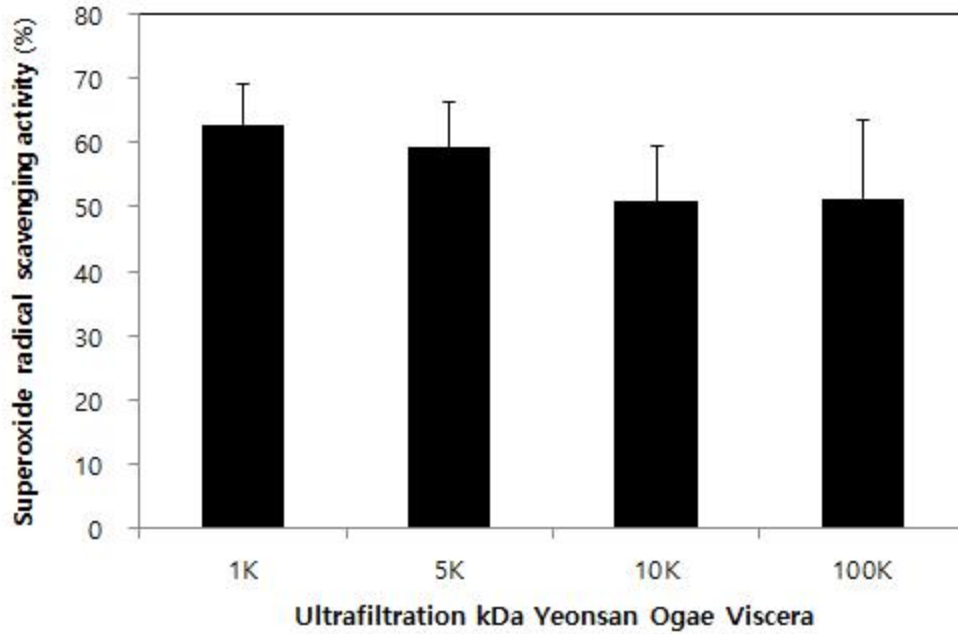


Fig. 109. The degree of superoxide radical scavenging activity of Yeonsan Ogae visceral protein hydrolysates.

③ 하이드록시 라디칼 소거능

하이드록실 라디칼은 H_2O_2 와 펜톤 반응에서의 Fe (II) 이나 Cu (II)와 같은 금속이온 사이의 작용에서 발생하는데, 굉장히 반응성이 높고, 수명이 짧으며 DNA, 단백질, 그리고 지질을 파괴적으로 산화한다고 믿어지고 있다. 또한 하이드록실 라디칼은 방향족 화합물(aromatic compound)와 작용해 hydroxycyclohexadienyl radical을 생성할 수 있고 더 나아가서 산소와 작용해 peroxy radical을 생성하거나 phenoxy radical로 분해된다. 그러므로 하이드록실 라디칼 제거는 이러한 라디칼에 의해 유발되는 산화스트레스로 인해 생기는 여러가지 질병들을 방지하는데 필요하다. Fig. 110 는 ultrafiltration를 이용하여 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 100 kDa로 fractionation된 단백질 가수분해물의 하이드록시 라디칼 소거능 분석 결과를 보여준다. 단백질 가수 분해물들의 하이드록시 라디칼 소거 항산화 능력은 약 13.35%에서 20.61% 사이의 분포를 보여 주었는데 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능은 5 kDa, 10 kDa ,100 kDa, 1 kDa 순으로 나타났으며, 가장 높은 활성을 보여준 것은 5 kDa ultrafilter로 fraction한 것이며, 20.61%로 가장 높은 활성을 보여 준다. 연구 결과에 따르면 펩타이드들의 항산화 능력 분자량이 작을수록 높은 것으로 알려졌다. 또한 다른 연구자들의 연구결과에 따르면 하이드록실 라디칼 제거력은 증가하는 펩티드 크기에 따라 저하되었고, 이것은 낮은 분자량을 가진 펩티드가 더 높은 분자량을 가진 펩티드보다 강한 하이드록실 라디칼 제거제로서 더 효과가 좋다고 보고하였다. 이것은 단백질 가수 분해물 중에 하이드록실 라디칼 제거 펩타이드와 제거를 하지 않는 펩티드의 비례에 따라서 항산화력이 다르게 나타난다는 것과 일치한다.

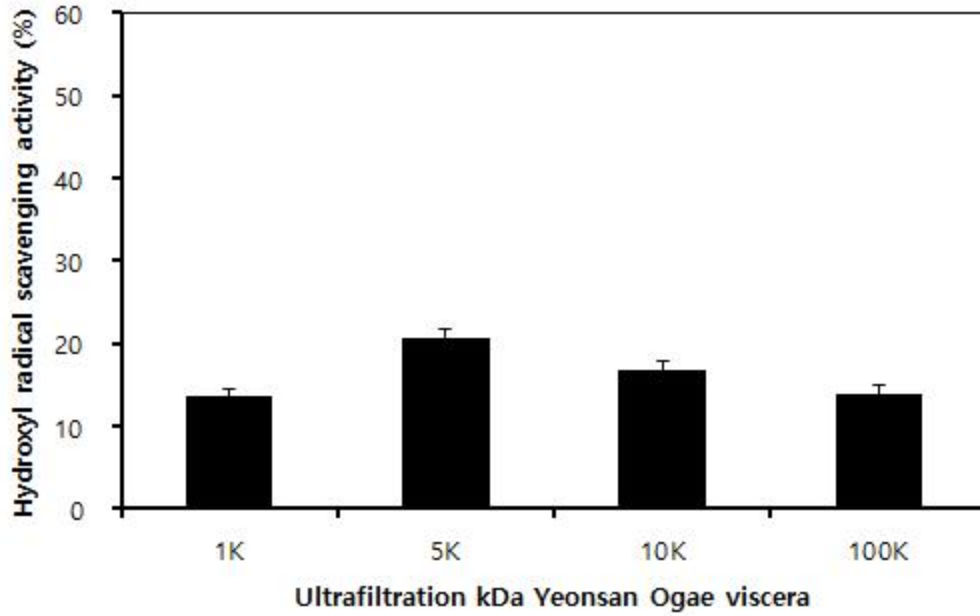


Fig. 110. The degree of hydroxy radical scavenging activity of Yeonsan Ogae visceral protein hydrolysates.

④ Fe²⁺ 킬레이션 능력

화합물의 금속 킬레이트력은 산화된 금속이온의 산화 환원 전위를 낮춤으로서 안정화시켜 화합물의 잠재적인 항산화 활동성에 대한 지시약으로서 쓰일 가능성이 높다 (Girgih et al., 2010). Ultrafiltration를 이용하여 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 100 kDa로 fractionation된 단백질 가수분해물의 금속 이온을 킬레이트화 하는 능력을 Fig. 111 에서 보여준다. 단백질 가수 분해물들의 킬레이트화 하는 능력은 약 28.17%에서 41.97% 사이의 분포를 보여 주었는데 킬레이션 능은 10 kDa, 100 kDa, 5 kDa, 1 kDa 순으로 나타났으며, 가장 높은 활성을 보여준 것은 10 kDa ultrafilter로 fraction한 것이며, 41.97%로 가장 높은 활성을 보여 준다. 이것은 효소 단계가 증가함에 따라 더 많은 수의 펩티드가 작용(liberation)된 것임을 알 수 있다. 또한 금속 킬레이션 능력은 펩티드 크기가 증가할 때 감소했으며 이 의미는 낮은 분자량의 펩타이드가 금속 킬레이션에 더 큰 효과를 보인다고 제시한다.

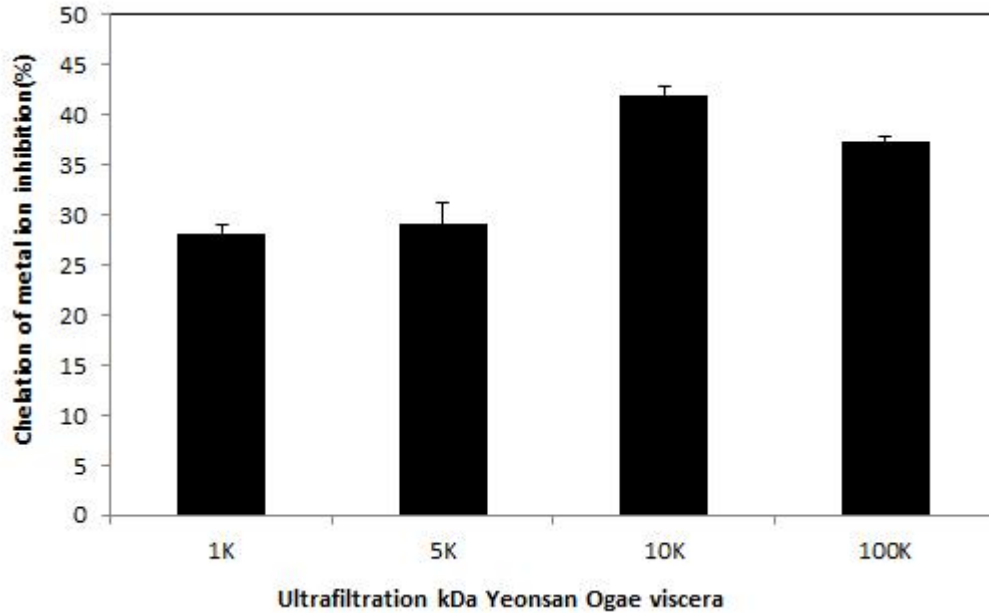


Fig. 111. The degree of chelation activity of Yeonsan Ogae visceral protein hydrolysates.

(3) 연산 오계란 단백질 가수분해물의 한외 여과막을 이용한 추출 및 분리 공정과 항산화 특성

(가) 연산 오계육 단백질 가수분해물 수율

Table 45. Yield of protein hydrolysates of Yeonsan Ogae egg white.

Name of enzymes	Yield of hydrolysate(%)
Alcalase	29.5
Bromelain Br1200	39.7
Flavourzyme	49.4
Neutralse 0.8L	45.4
Papain T100	55.7
Protamex	56.3
Bromelain 1200GDU	42.0

(나) 오계란 단백질 가수분해물의 항산화 특성

① 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능

일반적으로 산화과정에서 항산화제는 프리라디칼과 반응을 하여 안정한 화합물을 생산하여 산화과정을 종결한다. 이러한 물질 중에서 DPPH는 메탄올 용매에서 안정한 라디칼을 유지하며 517 nm에서 최대흡광도를 나타내기 때문에 천연물(natural compounds)의 환원반응에 널리 사용이 되고 있다. 이러한 DPPH는 항산화제와 같은 프로톤공여(proton donating) 물질을 만나

면 라디칼이 소거(scavenging)된다. 그리고 항산화제의 프로톤공여 능력에 따라 용액의 색이 퍼플에서 노란색으로 변한다. 따라서 DPPH는 펩타이드 및 천연 항산화 물질의 항산화력을 비교하는데 매우 유용한 분석 수단으로 사용이 되어왔다.

Fig. 112 은 ultrafiltration를 이용하여 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 100 kDa로 fractionation된 단백질 가수분해물의 DPPH 항산화 능력 분석 결과를 보여준다. 단백질 가수 분해물들의 DPPH 항산화 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 이러한 이유는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 가수 분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 가수 분해물들의 DPPH 항산화 능력은 약 46.86%에서 75.71% 사이의 분포를 보여 주었는데 DPPH의 소거능은 1 kDa, 10 kDa, 5 kDa, 100 kDa 순으로 나타났으며, 가장 높은 활성을 보여준 것은 1 kDa로 fraction한 것이며, 75.71%로 가장 높은 활성을 보여 준다. 연구 결과에 따르면 펩타이드들의 항산화 능력은 1) 구성아미노산 중에서 비극성 및 방향족 아미노산, 2) 분자량이 작을수록 항산화 능력이 높은 것으로 알려졌다. 이러한 연구 결과들은 사용된 ultrafiltration의 크기에 따라 항산화능력이 왜 다른지 설명을 해준다.

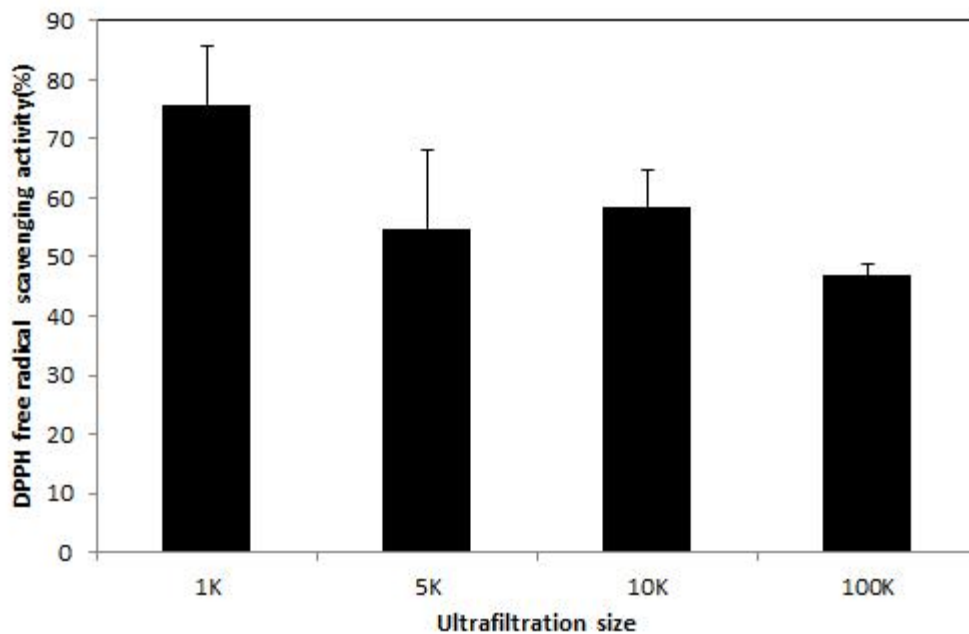


Fig 112. The degree of DPPH radical scavenging activity of Yeonsan Ogae egg white protein hydrolysates.

② 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능

슈퍼옥사이드 라디칼 (superoxide radical)은 굉장히 유독한 라디칼 종(specie)이며 무수한 생체적 작용에서 생성된다. 그리고 직접적인 과산화지방질화 (lipid peroxidation)를 주도하진 못하지만 과산화수소나 하이드록실 라디칼과 같은 굉장히 반응성이 높은 물질의 전구물(precursor)이다. 생세포는 천부적으로 효소 산화방지제의 생물학적 방어 기제를 갖춰 reactive oxygen

species/reactive nitrogen species (ROS/NOS)를 무해한 분자들로 전환하는 원인이 된다. 그 기체들 중 하나로는 superoxide dismutase (SOD)를 통해 superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$)를 O_2 와 H_2O_2 로 전환한다. 하지만, 생체의 능력으로 라디칼을 제거함은 지나치게 생산되는 프리 라디칼 (free radical)에 압도될 수 있다. Fig. 113는 ultrafiltration를 이용하여 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 100 kDa로 fractionation된 단백질 가수분해물의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 분석 결과를 보여준다. 단백질 가수 분해물들의 superanion 소거 항산화 능력은 약 10.53%에서 80.70% 사이의 분포를 보여 주었는데 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능은 DPPH의 소거능은과 비슷하게 5 kDa, 1 kDa, 10 kDa, 100 kDa 순으로 나타났으며, 가장 높은 활성을 보여준 것은 5 kDa로 fraction한 것이며, 80.70%로 가장 높은 활성을 보여 준다. 이러한 결과는 가수 분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 또한 가수 분해물에 따라서 소거하는 라디칼의 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다.

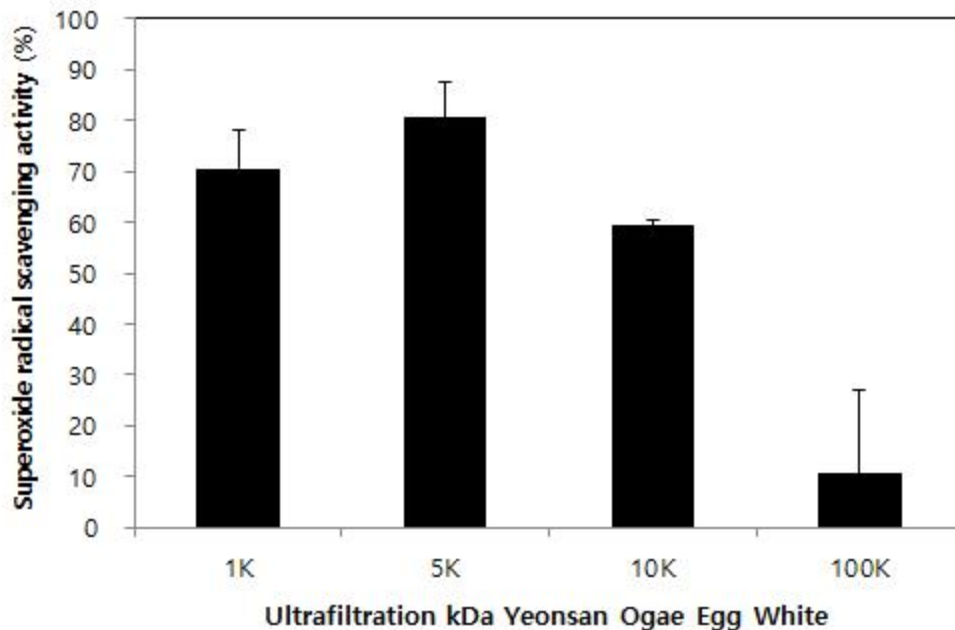


Fig. 113. The degree of superoxide radical scavenging activity of Yeonsan Ogae egg white protein hydrolysates.

③ 하이드록시 라디칼 소거능

하이드록실 라디칼은 H_2O_2 와 펜톤 반응에서의 Fe (II) 이나 Cu (II)와 같은 금속이온 사이의 작용에서 발생하는데, 굉장히 반응성이 높고, 수명이 짧으며 DNA, 단백질, 그리고 지질을 파괴적으로 수산화한다고 믿어지고 있다. 또한 하이드록실 라디칼은 방향족 화합물(aromatic compound)와 작용해 hydroxycyclohexadienyl radical을 생성할 수 있고 더 나아가서 산소와 작용해 peroxy radical을 생성하거나 phenoxyl radical로 분해된다. 그러므로 하이드록실 라디칼 제거는 이러한 라디칼에 의해 유발되는 산화스트레스로 인해 생기는 여러가지 질병들을 방

지하는데 필요하다. Fig. 114 는 ultrafiltration를 이용하여 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 100 kDa로 fractionation된 단백질 가수분해물의 하이드록시 라디칼 소거능 분석 결과를 보여준다. 단백질 가수 분해물들의 하이드록시 라디칼 소거 항산화 능력은 약 15.03%에서 29.388% 사이의 분포를 보여 주었는데 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능은 10 kDa, 10 kDa ,5 kDa, 1 kDa 순으로 나타났으며. 가장 높은 활성을 보여준 것은 100 kDa로 fraction한 것이며, 29.38%로 가장 높은 활성을 보여 준다. 연구 결과에 따르면 펩타이드들의 항산화 능력 분자량이 작을수록 높은 것으로 알려졌다. 또한 다른 연구자들의 연구결과에 따르면 하이드록실 라디칼 제거력은 증가하는 펩티드 크기에 따라 저하되었고, 이것은 낮은 분자량을 가진 펩티드가 더 높은 분자량을 가진 펩티드보다 강한 하이드록실 라디칼 제거제로서 더 효과가 좋다고 보고하였다. 이것은 단백질 가수 분해물 중에 하이드록실 라디칼 제거 펩타이드와 제거를 하지 않는 펩티드의 비례에 따라서 항산화력이 다르게 나타난다는 것과 일치한다.

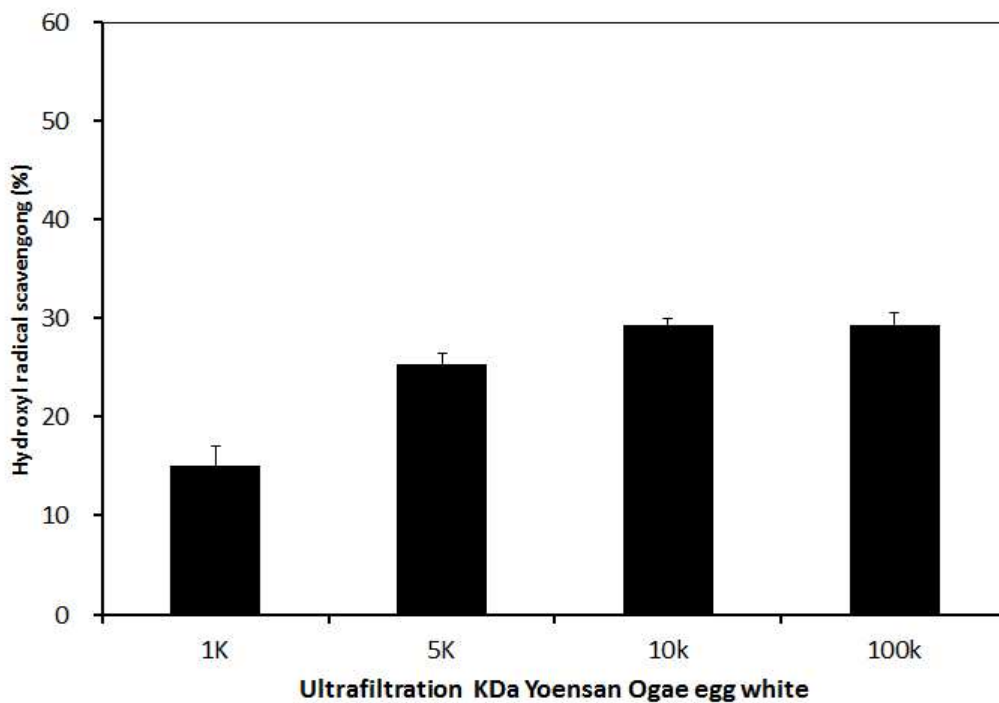


Fig. 114. The degree of hydroxy radical scavenging activity of Yeonsan Ogae egg white protein hydrolysates.

④ Fe²⁺ 킬레이션 능력

화합물의 금속 킬레이트력은 산화된 금속이온의 산화 환원 전위를 낮춤으로서 안정화시켜 화합물의 잠재적인 항산화 활동성에 대한 지시약으로서 쓰일 가능성이 높다 (Girgih et al., 2010). Ultrafiltration를 이용하여 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 100 kDa로 fractionation된 단백질 가수분해물의 금속 이온을 킬레이트화하는 능력을 Fig. 57에서 보여준다. 단백질 가수 분해물들

의 킬레이트화 하는 능력은 약 4.73%에서 78.45% 사이의 분포를 보여 주었는데 킬레이션 능은 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 100 kDa 순으로 나타났으며. 가장 높은 활성을 보여준 것은 1 kDa로 fraction한 것이며, 78.45%로 가장 높은 활성을 보여 준다. 이것은 효소 단계가 증가함에 따라 더 많은 수의 펩티드가 작용(liberation)된 것임을 알 수 있다. 또한 금속 킬레이션 능력은 펩티드 크기가 증가할 때 감소했으며, 이 의미는 낮은 분자량의 펩티드가 금속 킬레이션에 더 큰 효과를 보인다고 제시한다.

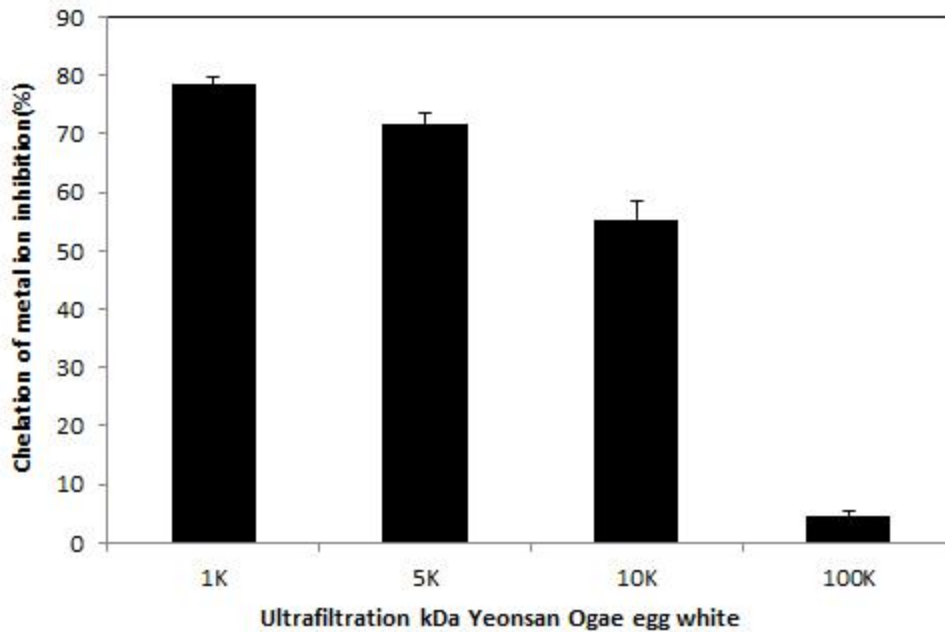


Fig. 115. The degree of chelation activity of Yeonsan Ogae egg white protein hydrolysates.

아. 연산오계 부위별 프로티아제를 이용한 펩타이드 특성 및 구조분석

(1) 연산오계 가슴육 가수분해 단백질에서 TCA에 의해 추출 한 펩타이드 정제 및 특성분석

(가) 1차 RF-HPLC에 의한 분석

오계 가슴육 단백질 가수분해물을 분리 정제를 하기 위해서 가수분해 후에 동결건조를 하여 보관을 하였다. 보관된 건조물을 10% 정제수로 용해를 한 다음 앞선 연구에서 대부분의 높은 항산화력을 보여주는 펩타이드 들이 대부분 적은 분자량을 보여 주었기 때문에 한외 여과막 10 kDa를 이용하여 분리를 하였다. 용해된 가수분해물을 분리 정제를 위해서 용액 250 mg/ml 를 RF-HPLC에 적용을 하여 분리를 수행하였다(Fig. 116). 총 80분 동안 분리하였으며, 1분 씩 80여개의 분획물을 얻었다. 분획물 전체를 동결건조를 하여 DPPH 소거 능력을 측정을 하였다. 높은 항산화력을 보여주는 분획물들은 fraction number 7, 8 에서 나타났다. 가장 높은 항산화력을 보여주는 분획물을 다음 정제를 위해서 모아서 동결건조를 하여 보관을 하였다.

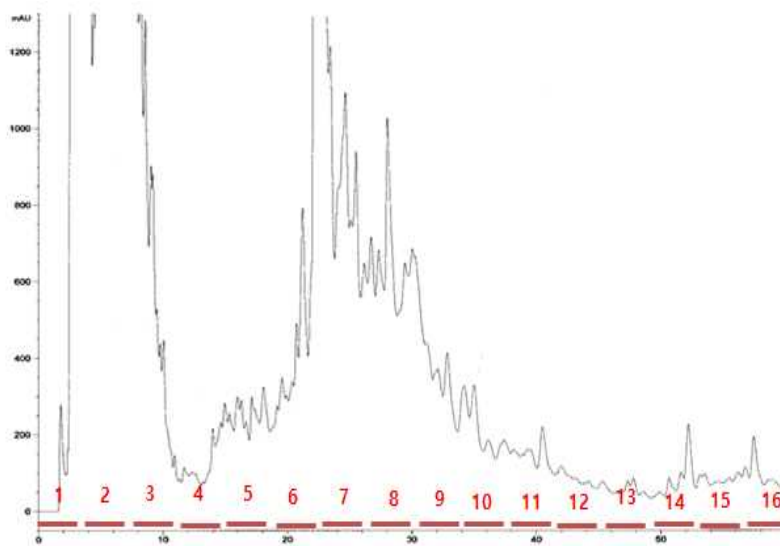


Fig. 116 Chromatography of fraction Ogae breast peptide was separated by semi-preparation RP-HPLC

(나) DPPH 항산화 측정

RP-HPLC를 이용하여 정제한 샘플 80개 샘플을 5개씩 모아 16개의 시료를 이용하여 항산화 실험을 진행하였다. 그 결과 Fig. 117와 같이 7번과 8번의 샘플이 가장 높은 항산화능을 보여주었으며, 이를 이용하여 다시 2차 purification 하였다.

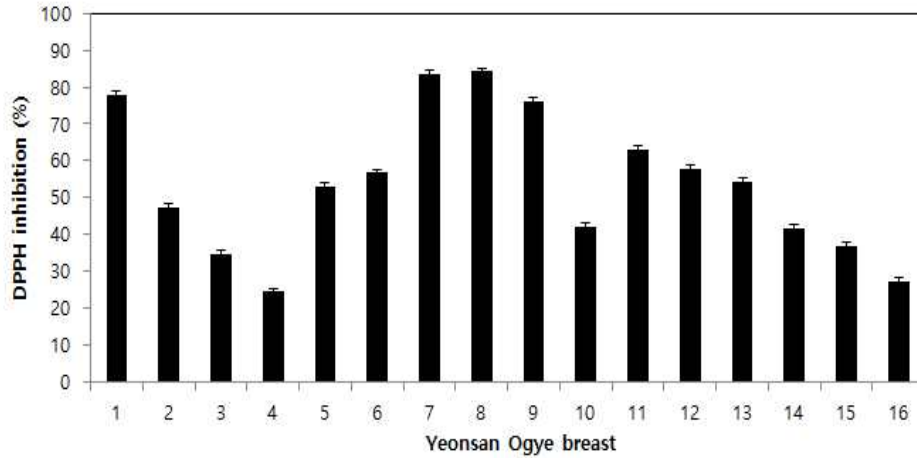


Fig. 117. The degree of DPPH radical scavenging activity of purified Ogae breast peptide by 1'st RP-HPLC

(다) 2차 RF-HPLC에 의한 분석

RF-HPLC에서 가장 높은 DPPH 소거능력을 보여주는 동결 건조 분획물을 RF-HPLC를 이용하여 좀더 정제를 수행 하였다. 분리 후에 총 20개의 분획물을 얻었다. 분획물을 각각 동결 건조 하여 DPPH 소거 능력을 측정을 하였다(Fig. 118). 높은 항산화력을 보여주는 분획물들은 fraction number 6, 7 에서 나타났다.

가장 높은 항산화력을 보여주는 분획물은 다음 정제를 위해서 모아서 동결건조를 하여 보관을 하였다.

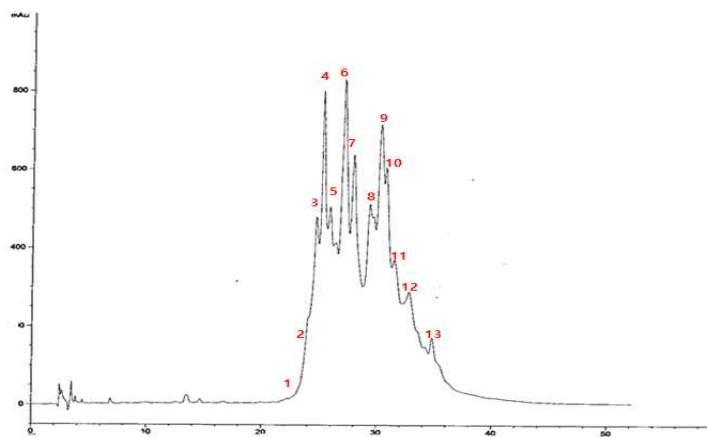


Fig. 118. Purification of antioxidant peptide using 2'nd RP-HPLC

(라) DPPH 항산화 측정

2차로 RP-HPLC를 이용한 정제과정을 거쳐 피크가 나타내는 분획별로 정제를 하고 수득한 분획물을 동결건조 후 DPPH 소거능력을 확인하였다. 그 결과 Fig. 119에서 보는바와 같이 5번 분획물부터 10번 분획물까지 항산화력이 높은 것을 확인하였다. 6번 분획물이 88.9%로 가장 높은 항산화력을 나타냈으며, 이 분획물을 이용하여 LC-MS에 의한 펩타이드 구조분석을 진행 하였다.

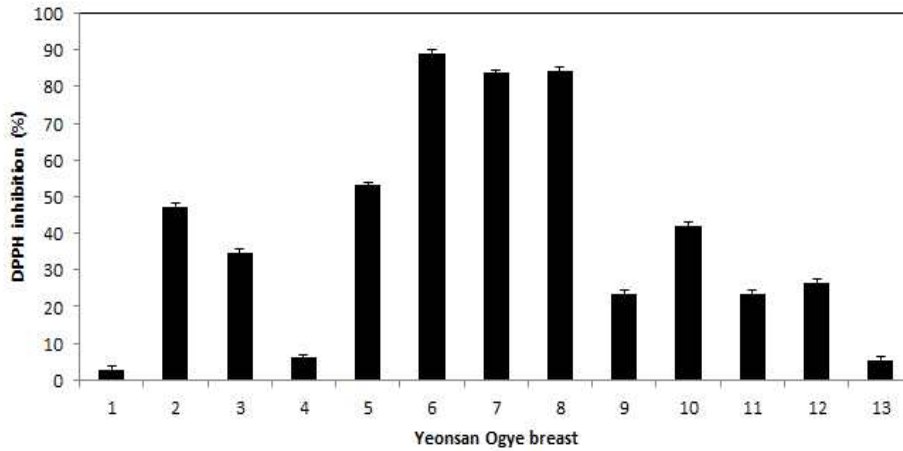


Fig. 119. The degree of DPPH radical scavenging activity of purified Ogae breast peptide by 2nd RP-HPLC

(마) LC-MS에 의한 펩타이드 구조분석

반복된 RF-HPLC에서 가장 높은 DPPH 소거능력을 보여주는 동결 건조 분획물을 LC-MS를 이용하여 아미노산의 구조 및 분자량을 측정하였다. Fig. 120 A는 RF-HPLC의 크로마토그램을 보여주고 B는 가장 높은 항산화력을 보여주는 피크의 아미노산 mass 크로마토그램을 보여준다. 연구결과 아미노산 서열은 VGPVGPPGPPGPPGPPGPPSGG를 나타냈다. 분자량은 1890.91 이었다. 이 서열은 Val-Gly-Pro-Val-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Ser-Gly-Gly 이다.

또 다른 항산화력을 보여준 피크의 미노산 mass 크로마토그램을 보여준다. 연구결과 아미노산 서열은 GEVGPVGPPGPPGPPGPPGPPSG를 나타냈다. 분자량은 2019.95 이었다. 이 서열은 Gly-Glu-Val-Gly-Pro-Val-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Ser-Gly 이다.

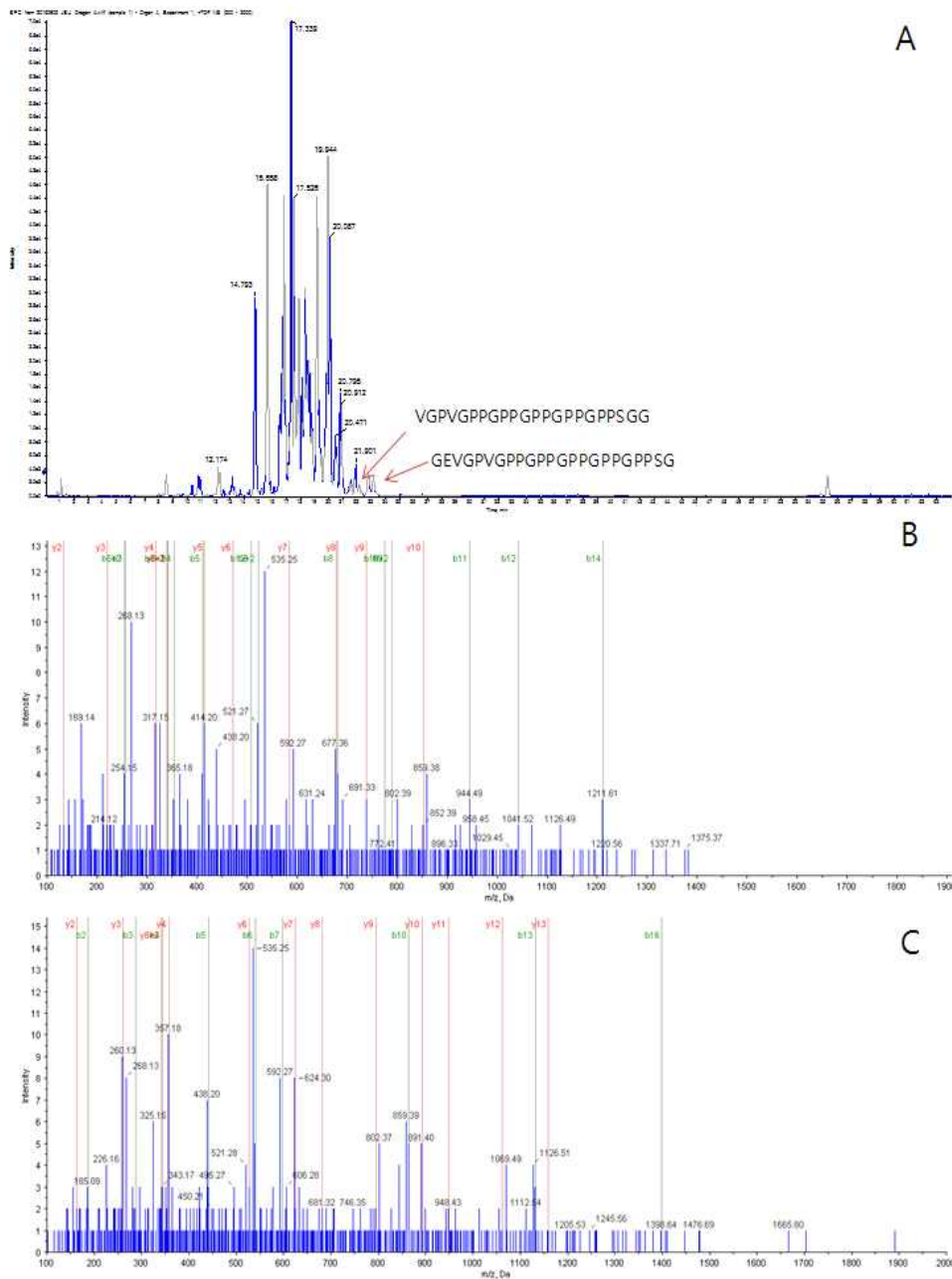


Fig. 120. Identification of molecular mass and amino acid sequences of the purified Ogae breast peptide

(2) 연산오계 내장육 가수분해 단백질에서 TCA에 의해 추출한 펩타이드 정제 및 특성분석

(가) 1차 RF-HPLC에 의한 분석

오계 부산물인 내장육 단백질 가수분해물을 분리 정제를 하기 위해서 가수분해 후에 동결 건조를 하여 보관을 하였다. 보관된 건조물을 10% 정제수로 용해를 한 다음 앞선 연구에서 대부분의 높은 항산화력을 보여주는 펩타이드들이 대부분 적은 분자량을 보여 주었기 때문에 한외 여과막 10 kDa를 이용하여 분리를 하였다. 용해된 가수분해물을 분리 정제를 위해서 용액 250 mg/ml를 RF-HPLC에 적용을 하여 분리를 수행하였다(Fig. 121). 총 80분 동안 분리하였으며, 1분 씩 80여개의 분획물을 얻었다. 분획물 전체를 동결건조를 하여 DPPH 소거 능력을 측정을 하였다. 높은 항산화력을 보여주는 분획물들은 fraction number 7, 8에서 나타났다. 가장 높은 항산화력을 보여주는 분획물을 다음 정제를 위해서 모아서 동결건조를 하여 보관을 하였다.

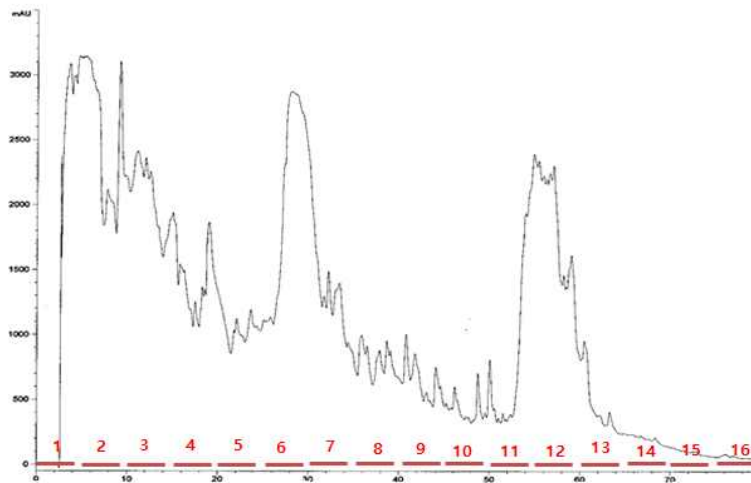


Fig. 121. Chromatography of fraction Ogae visceral peptide was separated by semi-preparation RP-HPLC

(나) DPPH 항산화 측정

RP-HPLC를 이용하여 정제한 샘플 80개 샘플을 5개씩 모아 16개의 시료를 이용하여 항산화 실험을 진행하였다. 그 결과 Fig. 59와 같이 7번과 8번의 샘플이 가장 높은 항산화능을 보여주었으며, 이를 이용하여 다시 2차 purification 하였다.

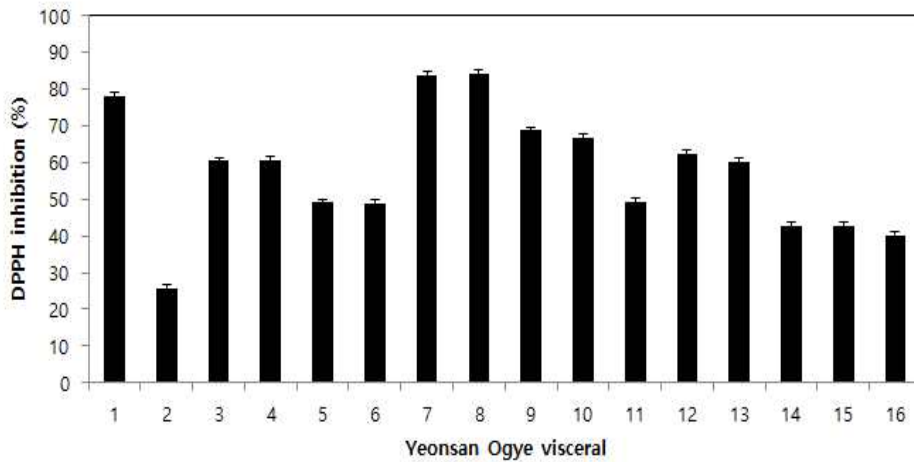


Fig. 122. The degree of DPPH radical scavenging activity of purified Ogae viscera peptide by RP-HPLC

(다) 2차 RF-HPLC에 의한 분석

RF-HPLC에서 가장 높은 DPPH 소거능력을 보여주는 동결 건조 분획물을 RF-HPLC를 이용하여 좀더 정제를 수행 하였다(Fig. 123). 분리 후에 총 80 여개의 분획물을 얻었다. 분획물 전체를 동결건조를 하여 DPPH 소거 능력을 측정을 하였다. 높은 항산화력을 보여주는 분획물 들은 fraction number 11에서 나타났다.

가장 높은 항산화력을 보여주는 분획물을 다음 정제를 위해서 모아서 동결건조를 하여 보관을 하였다.

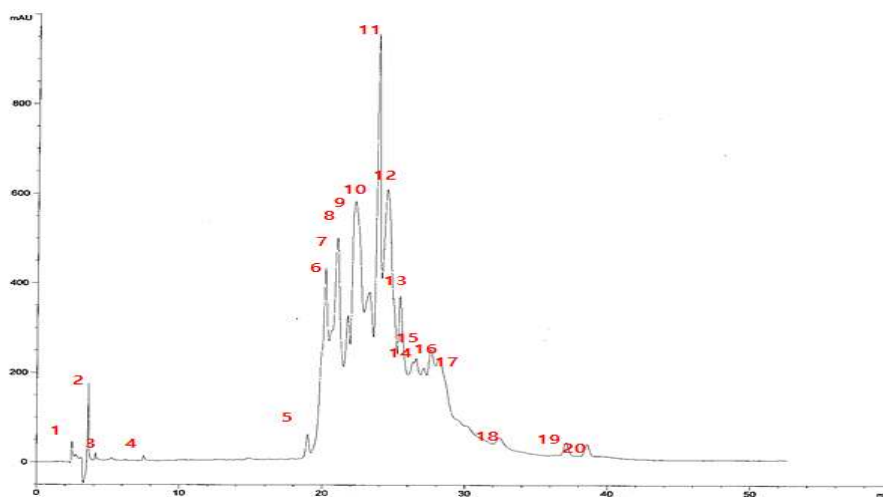


Fig. 123. Purification of antioxidant peptide using 2'nd RP-HPLC

(라) DPPH 항산화 측정

2차로 RP-HPLC를 이용한 정제과정을 거쳐 피크가 나타내는 분획별로 정제를 하고 수득한 분획물을 동결건조 후 DPPH 소거능력을 확인하였다. 그 결과 Fig. 124에서 보는바와 같이 6번 분획물부터 13번 분획물까지 항산화력이 높은 것을 확인하였으며, 그 중 가장 높은 항산화력을 나타낸 것은 8번 분획물로 84% 항산화력을 보여주었다. 이 분획물을 이용하여 LC-MS에 의한 펩타이드 구조분석을 진행하였다.

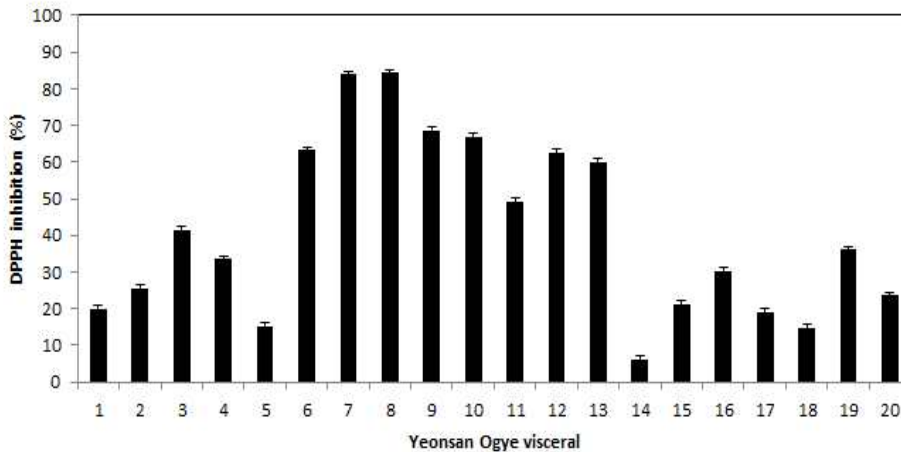


Fig. 124. The degree of DPPH radical scavenging activity of purified Ogae visceral peptide by 2nd RP-HPLC

(마) LC-MS에 의한 펩타이드 구조분석

반복된 RF-HPLC에서 가장 높은 DPPH 소거능력을 보여주는 동결 건조 분획물을 LC-MS를 이용하여 아미노산의 구조 및 분자량을 측정하였다. Fig. 125의 A는 RF-HPLC의 크로마토그램을 보여주고 B, C, D는 가장 높은 항산화력을 보여주는 피크의 아미노산 mass 크로마토그램을 보여준다. 연구결과 B 피크의 아미노산 서열은 AAGKDEAGAQQPPGPTGPAGERG를 확인하였다. 분자량은 2103.99 이었으며, 이 서열은 Ala-Ala-Gly-Lys-Gln-Glu-Ala-Gln-Pro-Pro-Gly-Pro-Thr-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Arg-Gly 이었다. 또 다른 항산화력을 보여주는 C피크의 아미노산 mass 크로마토그램을 확인한 결과 아미노산 서열은 APGPVGPAG로 나타났다. 분자량은 721.37 으며, 이 서열은 Ala-Pro-Gly-Pro-Val-Gly-Pro-Ala-Gly 이었다. 마지막 D 피크의 아미노산 mass 크로마토그램의 아미노산 서열은 SPGADGPIG를 나타났다. 분자량은 769.36 mV 이었다. 이 서열은 Ser-Pro-Gly-Ala-Asp-Gly-Pro-Ile-Gly 이었다.

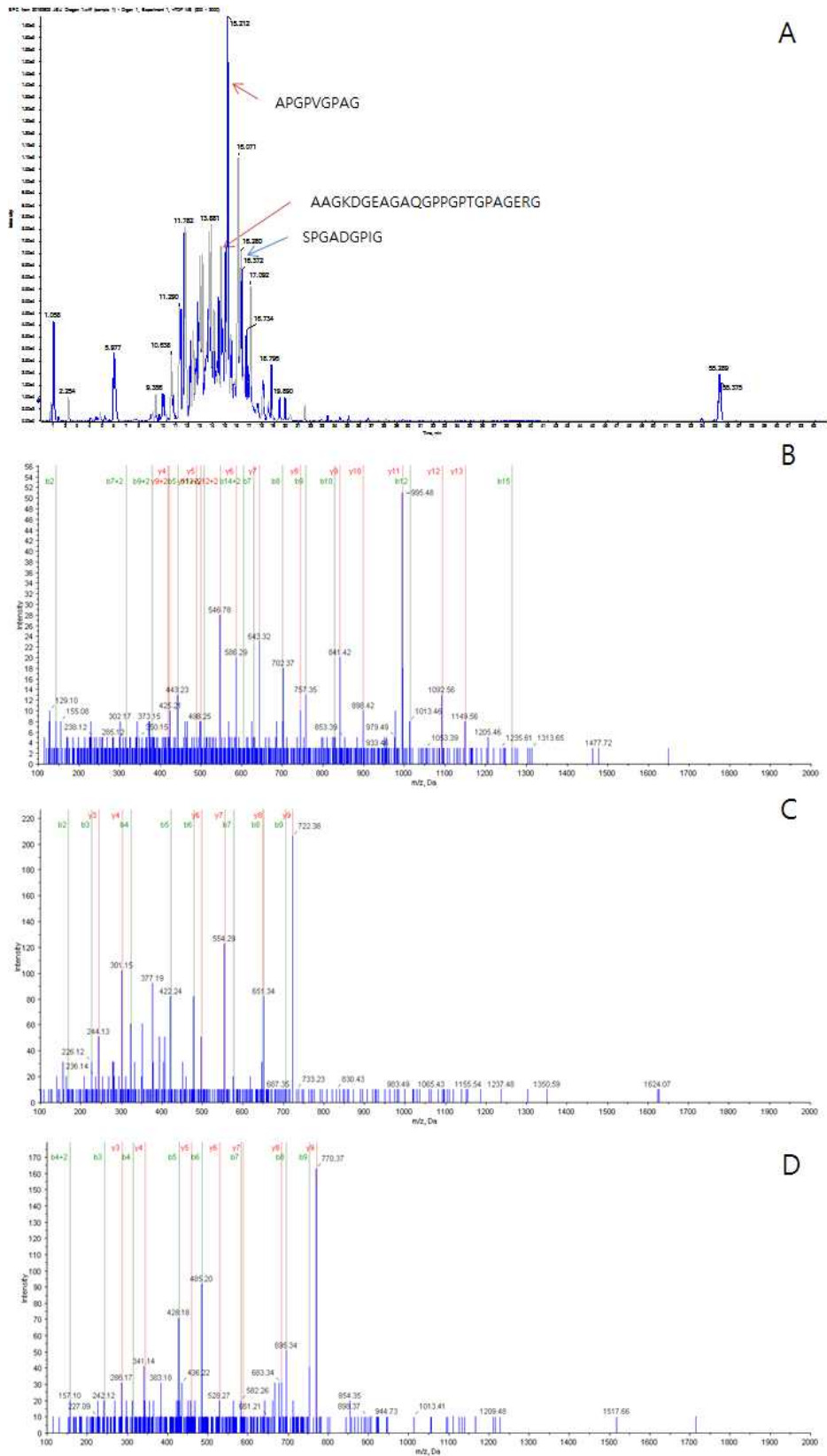


Fig. 125. Identification of molecular mass and amino acid sequences of the purified Ogae visceral peptide

(3) 연산오게 다리육 가수분해 단백질에서 TCA에 의해 추출한 펩타이드 정제 및 특성분석

(가) 1차 RF-HPLC에 의한 분석

오게 가슴육 단백질 가수분해물을 분리 정제를 하기 위해서 가수분해 후에 동결건조를 하여 보관을 하였다. 보관된 건조물을 10% 정제수로 용해를 한 다음 앞선 연구에서 대부분의 높은 항산화력을 보여주는 펩타이드 들이 대부분 적은 분자량을 보여 주었기 때문에 한외 여과막 10 kDa를 이용하여 분리를 하였다. 용해된 가수분해물을 분리 정제를 위해서 용액 250 mg/ml 를 RF-HPLC에 적용을 하여 분리를 수행하였다(Fig. 126). 총 80분 동안 분리하였으며, 1분 씩 80여개의 분획물을 얻었다. 분획물 전체를 동결건조를 하여 DPPH 소거 능력을 측정을 하였다. 높은 항산화력을 보여주는 분획물들은 fraction number 6, 8 에서 나타났다.

가장 높은 항산화력을 보여주는 분획물을 다음 정제를 위해서 모아서 동결건조를 하여 보관을 하였다.

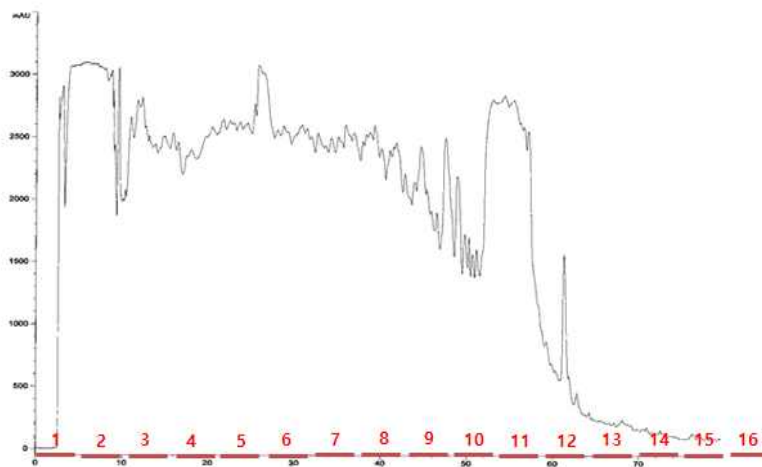


Fig. 126. Chromatography of fraction Ogae legs peptide was separated by semi-preparation RP-HPLC

(나) DPPH 항산화 측정

RP-HPLC를 이용하여 정제한 샘플 80개 샘플을 5개씩 모아 16개의 시료를 이용하여 항산화 실험을 진행하였다. 그 결과 Fig. 59와 같이 6번과 8번의 샘플이 가장 높은 항산화능을 보여주었으며, 이를 이용하여 다시 2차 purification 하였다

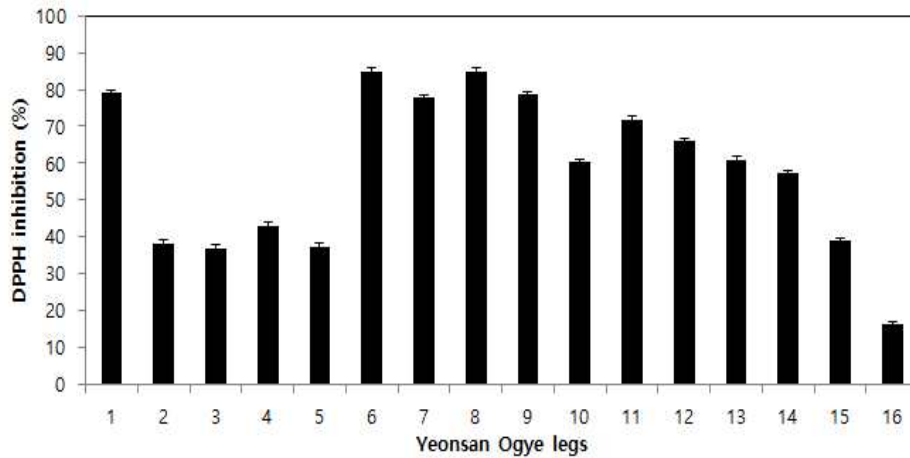


Fig. 127. The degree of DPPH radical scavenging activity of purified Ogae legs peptide by HPLC

(다) 2차 RF-HPLC에 의한 분석

RF-HPLC에서 가장 높은 DPPH 소거능력을 보여주는 동결 건조 분획물을 RF-HPLC를 이용하여 좀더 정제를 수행 하였다(Fig. 128). 분리 후에 총 80 여개의 분획물을 얻었다. 분획물 전체를 동결건조를 하여 DPPH 소거 능력을 측정을 하였다. 높은 항산화력을 보여주는 분획물 들은 fraction number 11, 12 에서 나타났다.

가장 높은 항산화력을 보여주는 분획물을 다음 정제를 위해서 모아서 동결건조를 하여 보관 을 하였다.

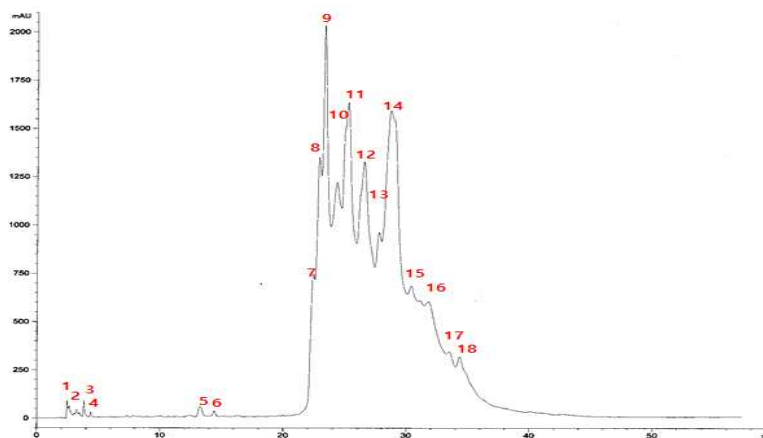


Fig. 128. Purification of antioxidant peptide using 2'nd RP-HPLC

(라) DPPH 항산화 측정

2차로 RP-HPLC를 이용한 정제과정을 거쳐 피크가 나타내는 분획별로 정제를 하고 수득한 분획물을 동결건조 후 DPPH 소거능력을 확인하였다. 그 결과 Fig. 129에서 보는바와 같이 6번

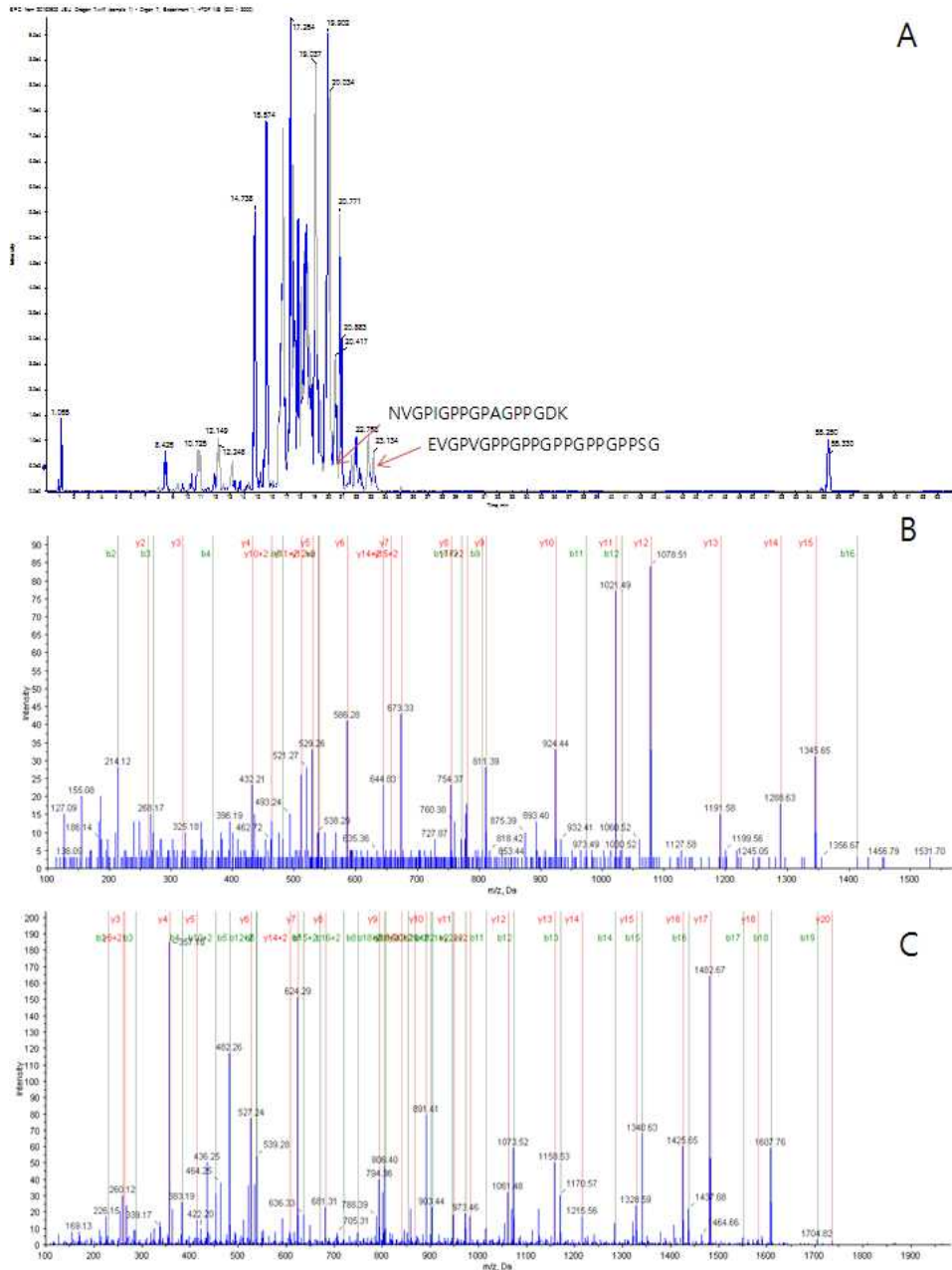


Fig. 130. Identification of molecular mass and amino acid sequences of the purified Ogae egg white peptide

자. 연산오계 부위별 펩타이드 분리 정제 및 특성 분석

(1) 연산 오계육 가수분해 단백질에서 한외여과막을 이용하여 추출한 펩타이드 정제 및 특성분석

(가) 이온교환수지를 이용한 오계육의 펩타이드 추출 및 분리

온교환 수지는 단백질 및 펩타이드를 분리하는 크로마토그램이다. 항산화 능을 보여주는 펩타이드를 분리하기 위해서 5 ml 를 함유하는 총 60개의 분획물의 단백질 양을 측정을 하여 같은 반응을 보이는 분획물을 8개로 나누어서 동결건조를 수행한 후에 대하여 DPPH 라디칼 소거능력을 비교하였다(Fig. 131). 분획물 중에서 튜브 D 의 항산화능이 $IC_{50} = 0.75 \text{ mg/ml}$ 가장 높았다. 분획물의 염을 제거하기 위해서 계속해서 겔 투과 크로마토그램을 수행 하였다.

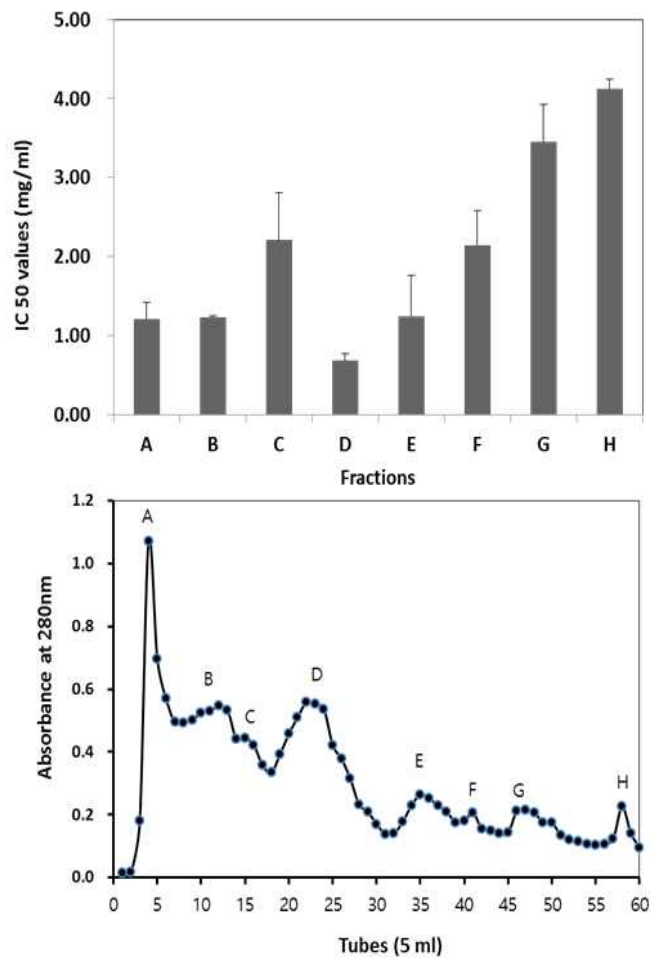


Fig. 131. Protein hydrolysate was Dowex 1×2, 200 mesh chromatography (a), and the IC_{50} value (mg/ml) of each fraction was measured by DPPH. (b). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

(나) 겔 투과 막을 이용한 오계육의 펩타이드 추출 및 분리

이온교환 수지를 이용한 펩타이드 정제 과정에서 가장 높은 DPPH 소거능력을 보여주는 분획물을 펩타이드 크기별로 분리를 하고 사용된 NaCl를 제거하기위해서 겔 투과막을 이용한 크로마토그램을 수행하였다. 가장 높은 항산화 능을 보여주는 펩타이드를 분리하기 위해서 5 ml 를 함유하는 총 60개의 분획물의 단백질 양을 측정을 하여 같은 반응을 보이는 분획물을 5개로 나누어서 동결건조를 수행한 후에 대하여 DPPH 라디칼 소거능력을 비교하였다(Fig. 132). 분획물 중에서 튜브 A의 항산화능이 $IC_{50} = 0.27$ mg/ml 가장 높았다. 이 분획물에 2차 정제를 하기 위해서 RP-HPLC를 수행하였다.

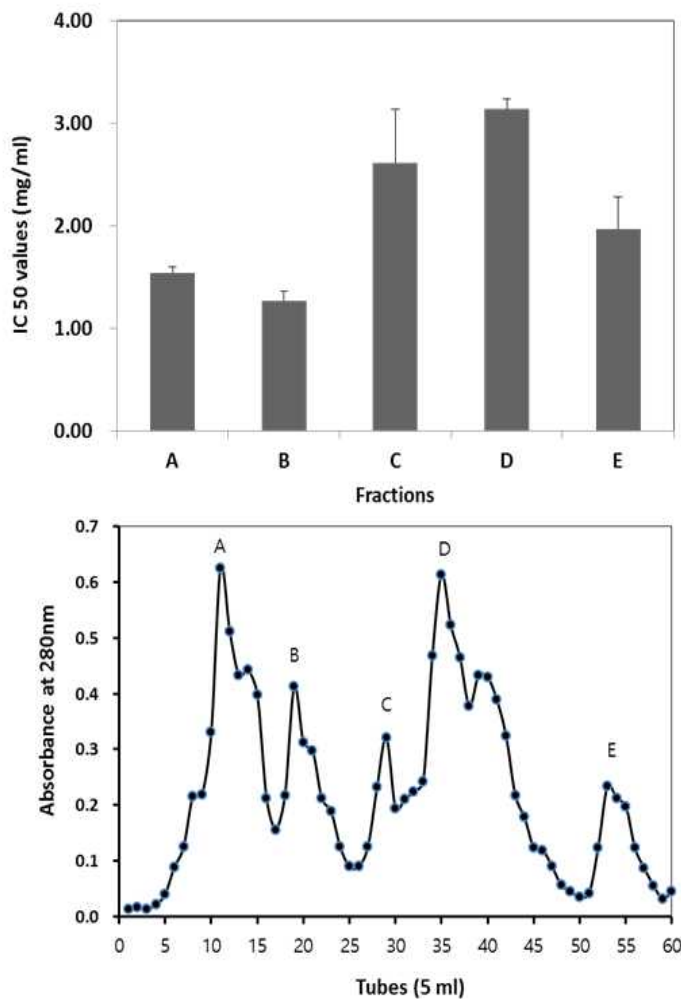


Fig. 132. Protein hydrolysate was sepandex C-25 gel chromatography (a), and the IC_{50} value (mg/ml) of each fraction was measured by DPPH. (b). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

(다) 단백질 가수분해물 RP-HPLC 의한 이용한 분리

겔 투과막을 이용하여 펩타이드 정제 과정에서 가장 높은 DPPH 소거능력을 보여주는 분획물을 정제하기 위해서 RF-HPLC를 이용하여 분획을 하였다. 피크 확인 결과 4개의 피크로 나타났으며, 4개의 분획물을 각각 수득하여 동결 후 건조를 수행하였다(Fig. 133).

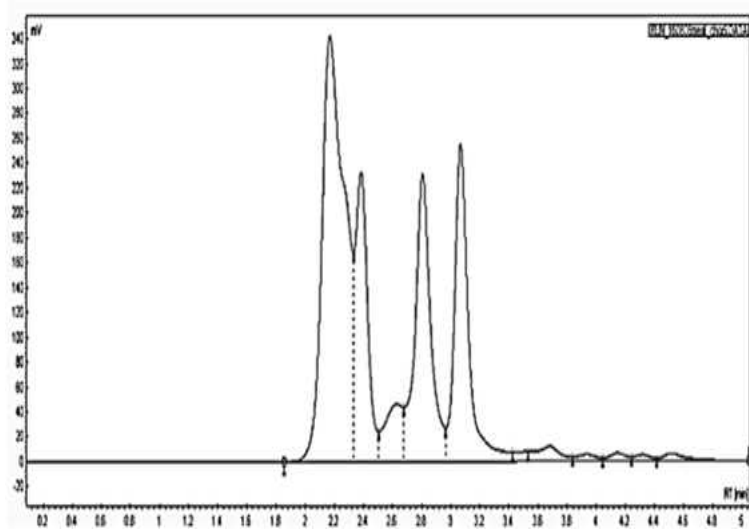


Fig. 133. HPLC chromatogram of peptides of Ogae egg white peptides.

(라) 단백질 가수분해물 MALDI-TOF에 의한 분석

정제된 오게 내장의 펩타이드에 대한 분자량을 MALDI-TOF 질량 분석기를 이용하여 분석한 결과는 Fig. 134 에 나타낸 그림과 같다. 오게 내장의 펩타이드 분자량 범의는 약 400 - 1,212 Da 범위로 확인되었으며, 제 1장의 오게 내장 가수분해물의 분자량을 비교한 결과 410 - 3,000 Da 범위에서 전체적으로 감소한 것을 확인하였다.

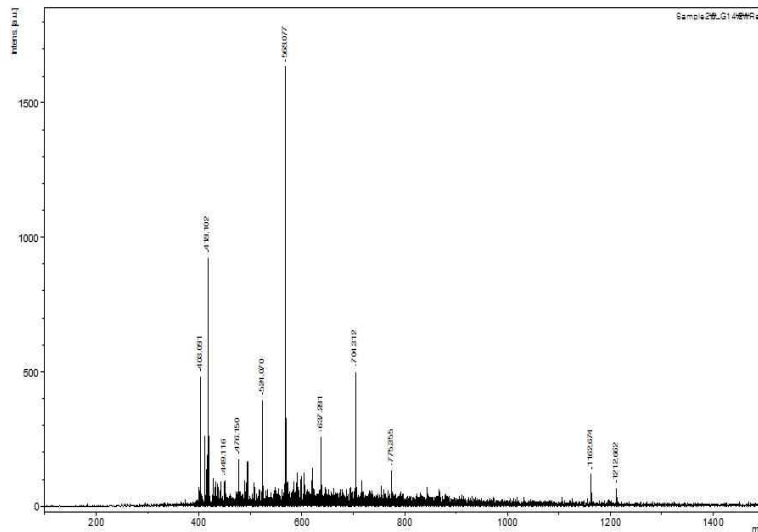


Fig. 134. MALDI-TOF chromatogram of Ogae breast peptide

(마) LC-MS에 의한 펩타이드 구조분석

반복된 RF-HPLC에서 가장 높은 DPPH 소거능력을 보여주는 동결 건조 분획물을 LC-MS 를 이용하여 아미노산의 구조 및 분자량을 측정하였다. Fig. 135 A는 RF-HPLC의 크로마토그램을 보여주고 B는 가장 높은 항산화력을 보여주는 피크의 아미노산 mass 크로마토그램을 보여준다. 연구결과 아미노산 서열은 APAPAPAP를 나타냈다. 분자량은 690.37 mV 이었다. 이

서열은 Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Pro 이었다.

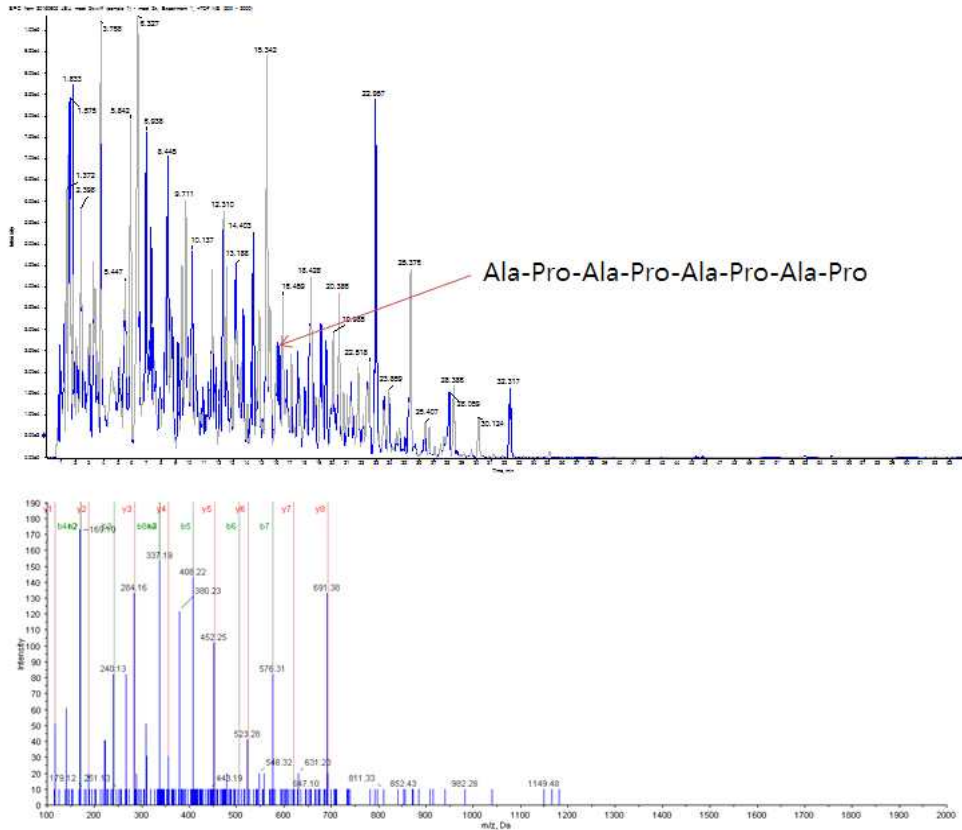


Fig. 135. Identification of molecular mass and amino acid sequences of the purified Ogae meat(3 kDa) peptide

(2) 연산오계 내장 가수분해 단백질에서 한외여과막을 이용하여 추출한 펩타이드 정제 및 특성분석

(가) 이온교환수지를 이용한 오계 내장의 펩타이드 추출 및 분리

이온교환 수지는 단백질 및 펩타이드를 분리하는 크로마토그램이다. 항산화 능을 보여주는 펩타이드를 분리하기 위해서 5 ml 를 함유하는 총 60개의 분획물의 단백질을 측정하여 같은 반응을 보이는 분획물을 8개로 나누어서 동결건조를 수행한 후에 대하여 DPPH 라디칼 소거능력을 비교하였다(Fig. 136). 분획물 중에서 튜브 E 의 항산화능이 $IC_{50} = 1.2 \text{ mg/ml}$ 가 가장 높았다. 분획물의 염을 제거하기 위해서 계속해서 겔 투과 크로마토그램을 수행 하였다.

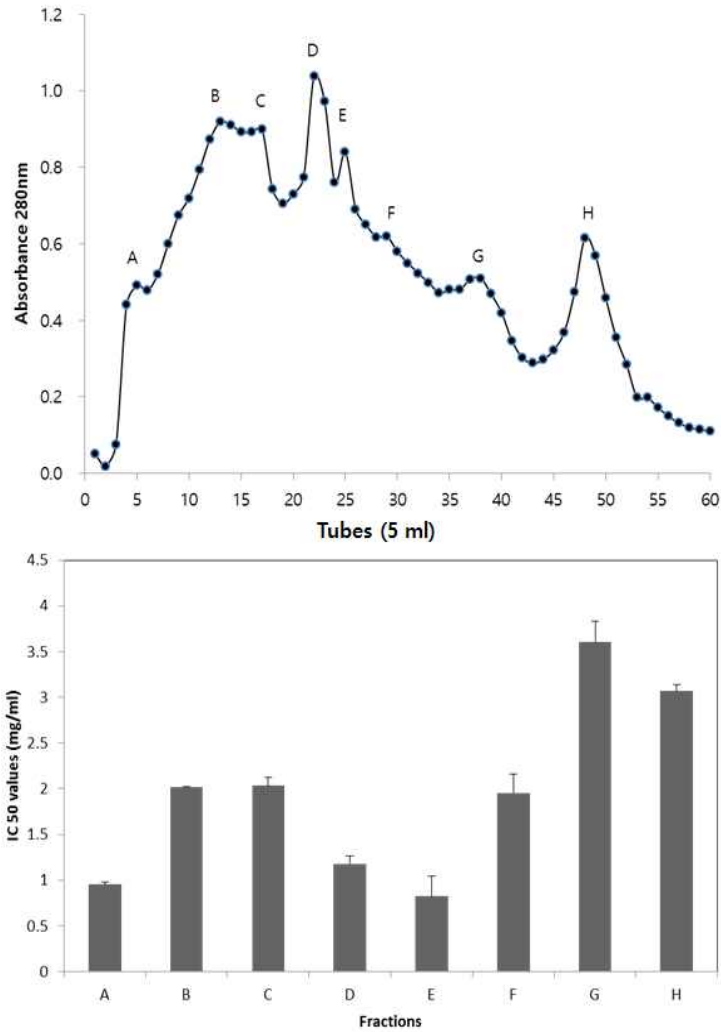


Fig. 136. Protein hydrolysate was Dowex 1×2, 200 mesh chromatography (a), and the IC50 value (mg/ml) of each fraction was measured by DPPH. (b). Different letters indicate significant differences ($P<0.05$)

(나) 겔 투과 막을 이용한 오계 내장의 펩타이드 추출 및 분리

이온교환 수지를 이용한 펩타이드 정제 과정에서 가장 높은 DPPH 소거능력을 보여주는 분획물을 펩타이드 크기별로 분리를 하고 사용된 NaCl를 제거하기 위해서 겔 투과막을 이용한 크로마토 그래프를 수행하였다. 가장 높은 항산화 능을 보여주는 펩타이드를 분리하기 위해서 5 ml 를 함유하는 총 60개의 분획물의 단백질을 측정하여 같은 반응을 보이는 분획물을 6 개로 나누어서 동결건조를 수행한 후에 대하여 DPPH 라디칼 소거능력을 비교하였다(Fig. 137). 분획물 중에서 튜브 D의 항산화능이 IC₅₀ = 0.65 mg/ml 가장 높았다. 이 분획물에 대하여 좀더 정제를 하기 위해서 RP-HPLC를 수행하였다.

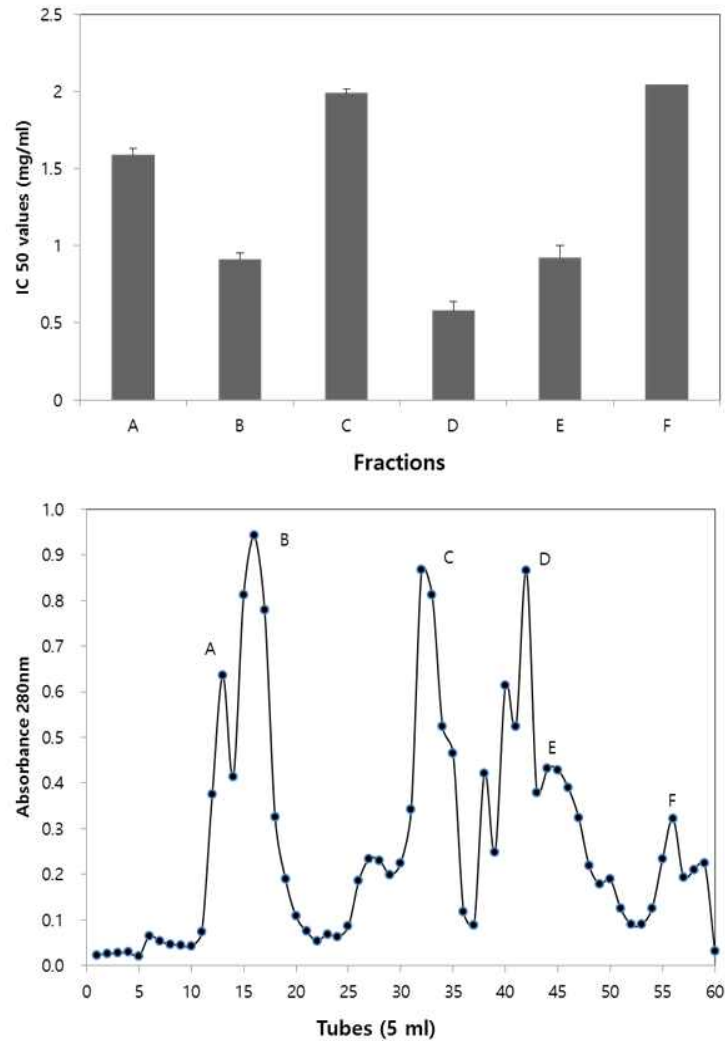


Fig. 137. Protein hydrolysate was sepandex C-25 gel chromatography (a), and the IC₅₀ value (mg/ml) of each fraction was measured by DPPH. (b). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

(다) 단백질 가수분해물 RP-HPLC 의한 이용한 분리

겔 투과막을 이용하여 펩타이드 정제 과정에서 가장 높은 DPPH 소거능력을 보여주는 분획물을 좀더 정제하기 위해서 RF-HPLC를 이용하여 분획을 하였다. 분획물 중에서 가장 높은 항산화 능을 보여주는 펩타이드를 분리하기 위해서 피크들에 해당하는 분획물을 동결 후 건조를 수행하였다(Fig. 138).

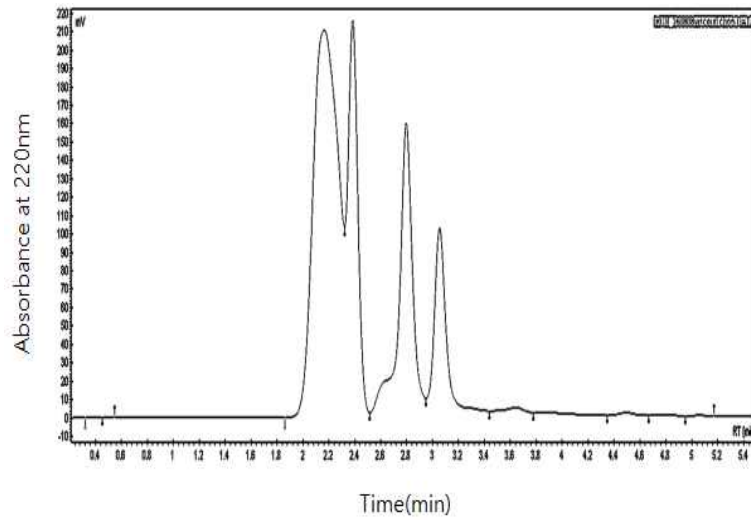


Fig. 138. HPLC chromatogram of peptides of Ogae egg white peptides.

(라) 단백질 가수분해물 MALDI-TOF에 의한 분석

정제된 오게 내장의 펩타이드에 대한 분자량을 MALDI-TOF 질량 분석기를 이용하여 분석한 결과는 Fig. 139 에 나타낸 그림과 같다. 오게 내장의 펩타이드 분자량 범위는 약 400-644 Da 범위로 확인되었으며, 제 1장의 오게 내장 가수분해물의 분자량을 비교한 결과 410-3,000 Da 범위에서 전체적으로 감소하였다.

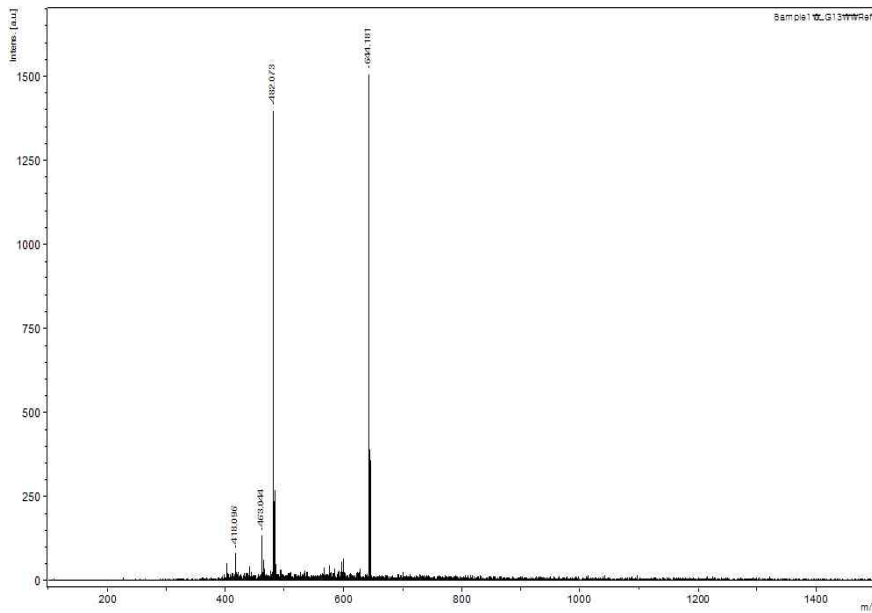


Fig. 139. MALDI-TOF chromatogram of Ogae viscera peptide

(마) LC-MS에 의한 펩타이드 구조분석

반복된 RF-HPLC에서 가장 높은 DPPH 소거능력을 보여주는 동결 건조 분획물을 LC-MS를 이용하여 아미노산의 구조 및 분자량을 측정하였다. Fig. 140 A는 RF-HPLC의 크로마토그램을 보여주고 B는 가장 높은 항산화력을 보여주는 피크의 아미노산 mass 크로마토그램을 보여준다. 연구결과 아미노산 서열은 GNVGPIGPPGPAGPPGDKG를 나타냈다. 분자량은 1630.75 mV이었다. 이 서열은 Gly-Asn-Val-Gly-Pro-Ile-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Asp-Lys-Gly 이었다.

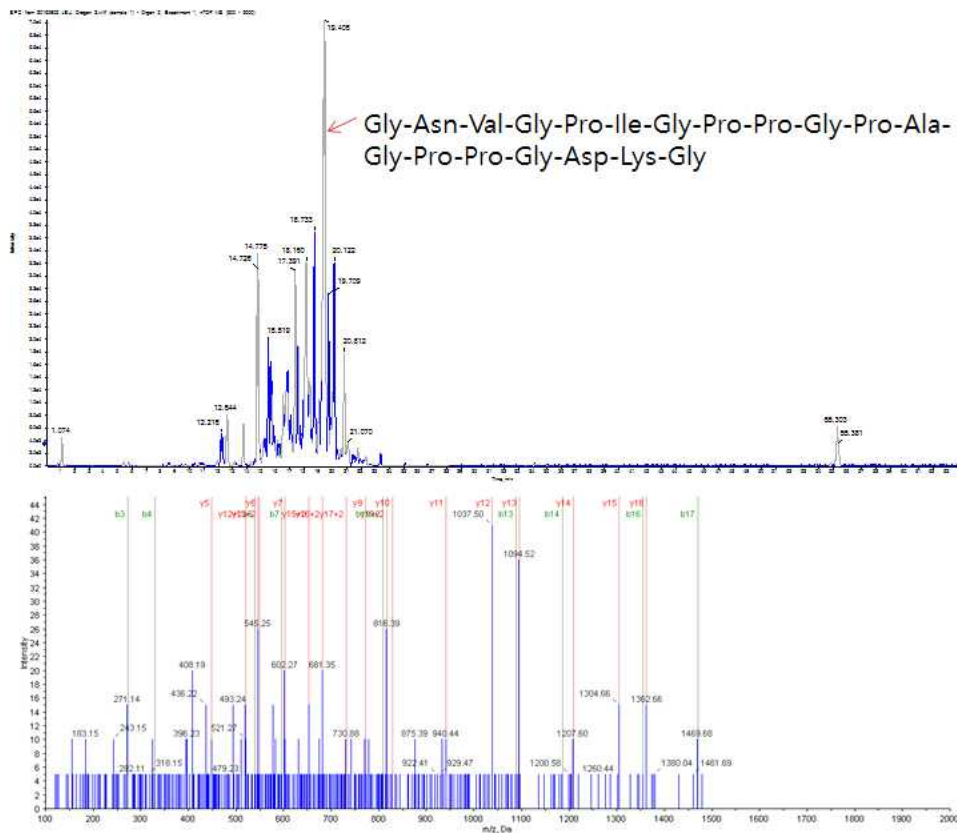


Fig. 140. Identification of molecular mass and amino acid sequences of the purified Ogae visceral (3 kDa) peptide

(3) 연산오계란 가수분해 단백질에서 한외여과막을 이용하여 추출한 펩타이드 정제 및 특성분석

(가) 이온교환수지를 이용한 오계란의 펩타이드 추출 및 분리

이온교환 수지는 단백질 및 펩타이드를 분리하는 크로마토그램이다. 항산화 능을 보여주는 펩타이드를 분리하기 위해서 5 ml 를 함유하는 총 60개의 분획물의 단백질양을 측정을 하여 같은 반응을 보이는 분획물을 8개로 나누어서 동결건조를 수행한 후에 대하여 DPPH 라디칼 소거능력을 비교하였다(Fig. 141). 분획물 중에서 튜브 E 의 항산화능이 $IC_{50} = 1.5 \text{ mg/ml}$ 가장 높았다. 분획물의 염을 제거하기 위해서 계속해서 겔 투과 크로마토그램을 수행 하였다.

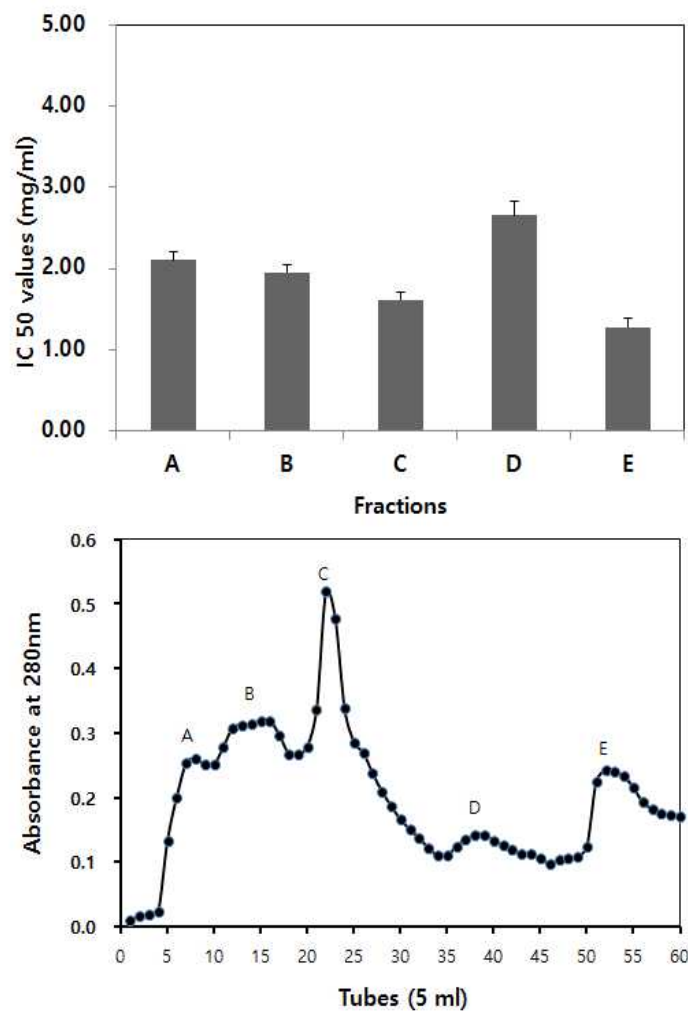


Fig. 141. Protein hydrolysate was Dowex 1×2, 200 mesh chromatography (a), and the IC_{50} value (mg/ml) of each fraction was measured by DPPH. (b). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

(나) 겔 투과 막을 이용한 오계란의 펩타이드 추출 및 분리

이온교환 수지를 이용한 펩타이드 정제 과정에서 가장 높은 DPPH 소거능력을 보여주는 분획물을 펩타이드 크기별로 분리를 하고 사용된 NaCl를 제거하기위해서 겔 투과막을 이용한 크로마토그램을 수행하였다. 가장 높은 항산화 능을 보여주는 펩타이드를 분리하기 위해서 5 ml를 함유하는 총 60개의 분획물의 단백질을 측정하여 같은 반응을 보이는 분획물을 6개로 나누어서 동결건조를 수행한 후에 대하여 DPPH 라디칼 소거능력을 비교하였다(Fig. 142). 분획물 중에서 튜브 D의 항산화능이 $IC_{50} = 0.96$ mg/ml 가장 높았다. 이 분획물에 대하여 좀더 정제를 하기 위해서 RP-HPLC를 수행하였다.

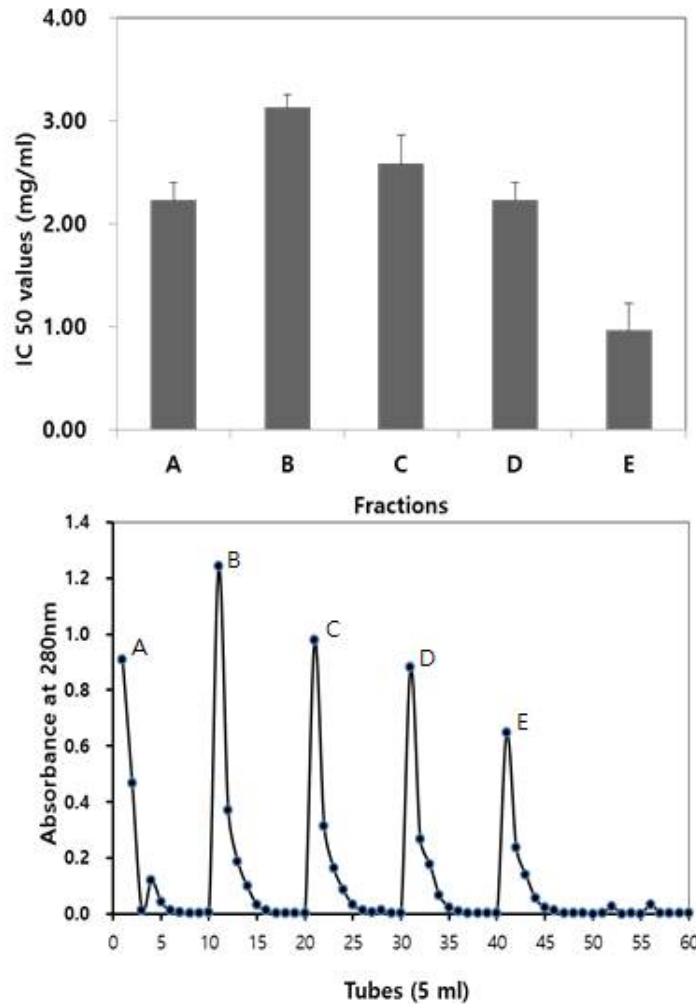


Fig. 142. egg white Protein hydrolysate was sepandex C-25 gel chromatography (a), and the IC_{50} value (mg/ml) of each fraction was measured by DPPH. (b). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

(다) 단백질 가수분해물 RP-HPLC 의한 이용한 분리

겔 투과막을 이용하여 펩타이드 정제 과정에서 가장 높은 DPPH 소거능력을 보여주는 분획물을 좀더 정제하기 위해서 RF-HPLC를 이용하여 분획을 하였다. 분획물 중에서 가장 높은

항산화 능을 보여주는 펩타이드를 분리하기 위해서 피크들에 해당하는 분획물 들을 동결 후 건조를 수행하였다(Fig. 143).

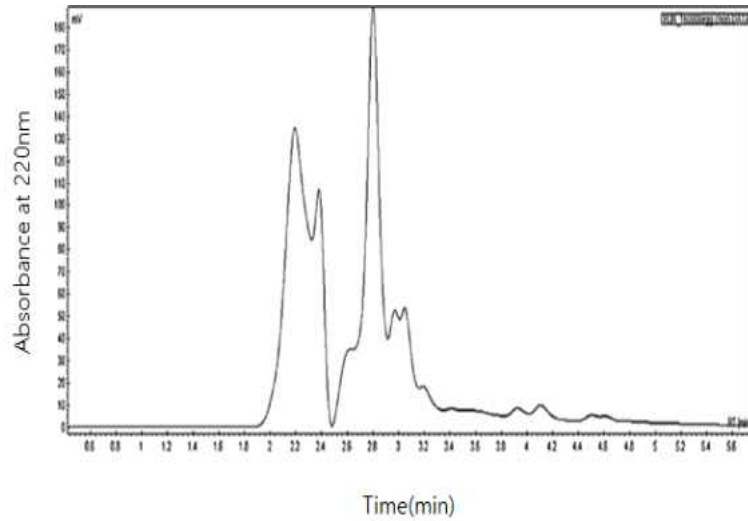


Fig. 143. HPLC chromatogram of peptides of Ogae egg white peptides.

(라) 단백질 가수분해물 MALDI-TOF에 의한 분석

정제된 오계란의 펩타이드에 대한 분자량을 MALDI-TOF 질량 분석기를 이용하여 분석한 결과는 Fig. 144. 에 나타낸 그림과 같다. 오계란의 펩타이드 분자량 범의는 약 400-1,200 Da 범위로 확인되었으며, 제 1장의 오계 내장 가수분해물의 분자량을 비교한 결과 410 - 3,000 Da 범위에서 전체적으로 감소한 것을 확인하였다.

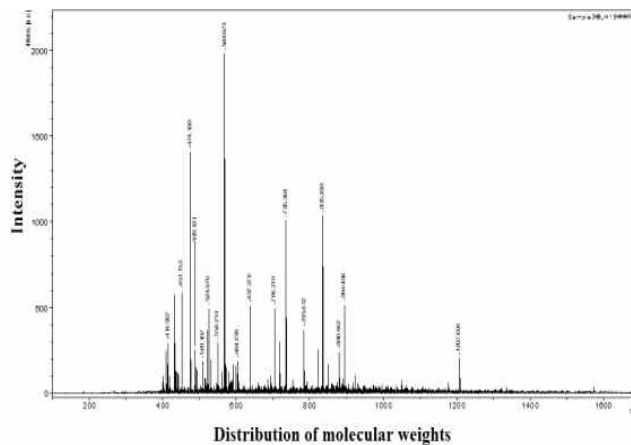


Fig. 144. MALDI-TOF chromatogram of Ogae egg white peptides.

5) LC-MS에 의한 펩타이드 구조분석

반복된 RF-HPLC에서 가장 높은 DPPH 소거능력을 보여주는 동결 건조 분획물을 LC-MS 를 이용하여 아미노산의 구조 및 분자량을 측정하였다. Fig. 145 A는 RF-HPLC의 크로마토그램을 보여주고 B는 가장 높은 항산화력을 보여주는 피크의 아미노산 mass 크로마토그램을 보

여준다. 연구결과 아미노산 서열은 TAAEAETEAEAETSNT를 나타냈다. 분자량은 1736.75 mV이었다. 이 서열은 Thr-Ala-Ala-Glu-Ala-Glu-Thr-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Thr-Ser-Asn-Leu-Thr 이었다.

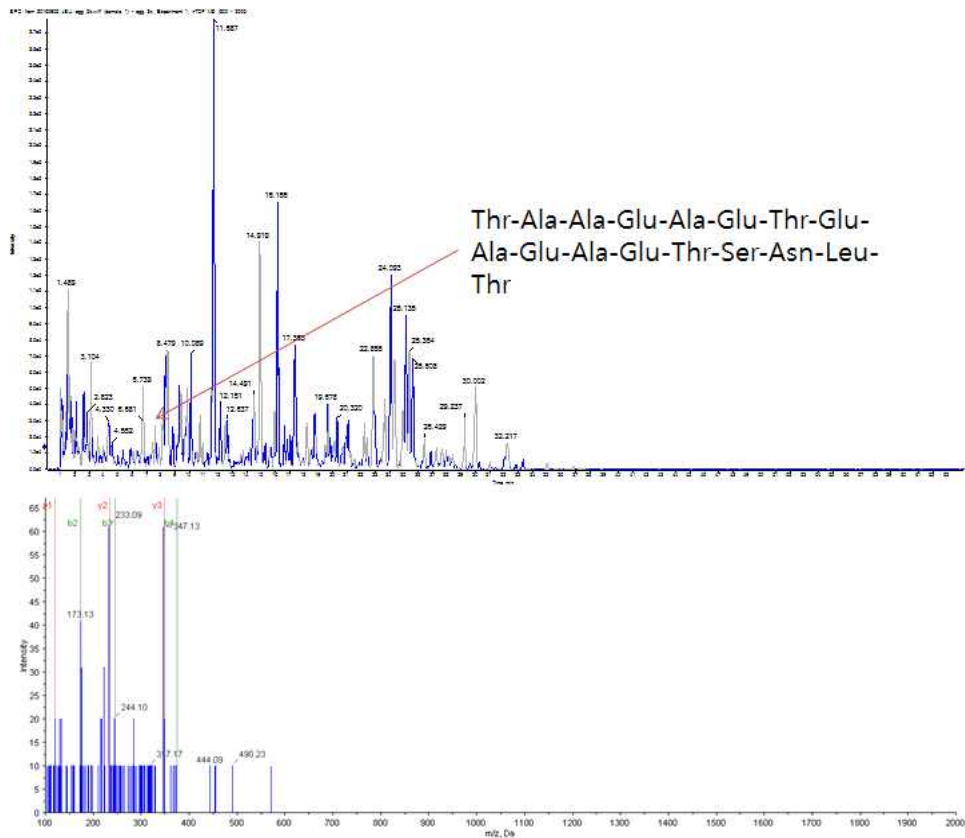


Fig. 145. Identification of molecular mass and amino acid sequences of the purified Ogae egg white (3 kDa) peptide by Q-TOF.

차. 단백질 가수분해물로부터 펩타이드 추출 및 분리

(1) 추출용매 메탄올 농도에 따른 분리

단백질 가수분해물로부터 펩타이드를 추출하기 위해서 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 0.3M TCA를 용매로하여 추출을 하였다. 이론 적인 펩타이드 양을 정하고 용매 농도에 따른 펩타이드 정제 정도를 수율로하여 표기를 하였다. Fig. 146은 메탄올을 용매로 하였을 때 수율을 보여준다. 농도에 따라서 평균 수율은 증가 하였지만 32-45%의 범위를 보여주었다.

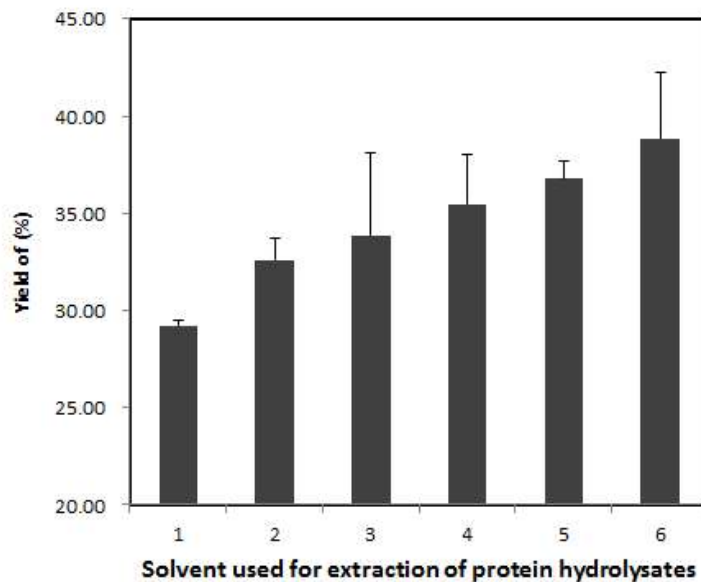


Fig. 146. Yield of peptide purification derived from Ogae meat. 1, 2, 3, 4, 5, and 6 represent water, 10, 20, 30, 40, and 50% methanol.

(2) 추출용매 에탄올 농도에 따른 분리

단백질 가수분해물로부터 펩타이드를 추출하기 위해서 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 0.3M TCA를 용매로하여 추출을 하였다. 이론 적인 펩타이드 양을 정하고 용매 농도에 따른 펩타이드 정제 정도를 수율로하여 표기를 하였다. Fig. 147는 에탄올을 용매로 하였을 때 수율을 보여준다. 농도에 따라서 평균 수율은 증가 하였지만 28-50%의 범위를 보여주었고 전 농도 영역에서 메탄올 보다 높았다.

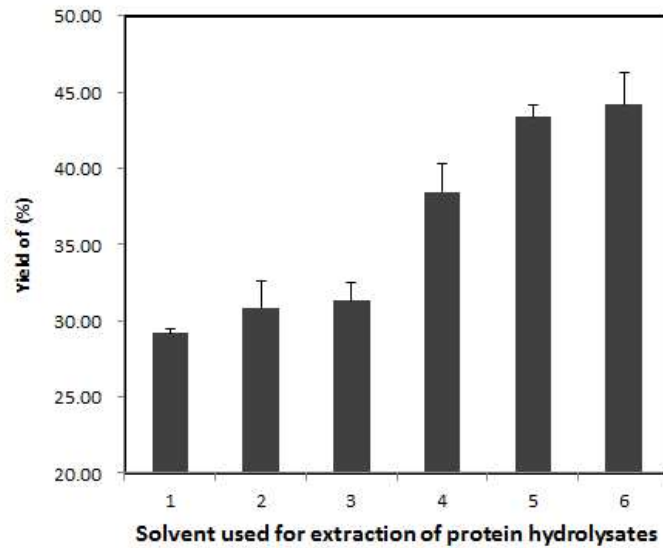


Fig. 147. Yield of peptide purification derived from Ogae meat. 1, 2, 3, 4, 5, and 6 represent water, 10, 20, 30, 40, and 50% ethanol.

(3) 추출용매 프로판올 농도에 따른 분리

단백질 가수분해물로부터 펩타이드를 추출하기 위해서 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 0.3M TCA를 용매로하여 추출을 하였다. 이론 적인 펩타이드 양을 정하고 용매 농도에 따른 펩타이드 정제 정도를 수율로하여 표기를 하였다. Fig. 147는 에탄올을 용매로 하였을 때 수율을 보여준다. 농도에 따라서 평균 수율은 증가 하였지만 35-65%의 범위를 보여주었고 전 농도 영역에서 메탄올보다 높았다.

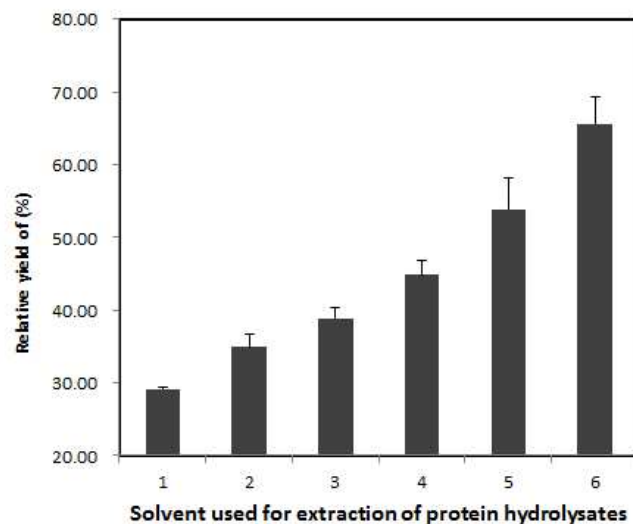


Fig. 148. Yield of peptide purification derived from Ogae meat. 1, 2, 3, 4, 5, and 6 represent water, 10, 20, 30, 40, and 50% propanol.

(4) 0.3 M TCA 용액과 메탄올 농도에 따른 분리

단백질 가수분해물로부터 펩타이드를 추출하기 위해서 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 0.3M TCA를 용매로하여 추출을 하였다. 이론 적인 펩타이드 양을 정하고 용매 농도에 따른 펩타이드 정제 정도를 수율로하여 표기를 하였다. Fig. 149는 에탄올을 용매로 하였을 때 수율을 보여준다. 농도에 따라서 평균 수율은 증가 하였지만 45-68%의 범위를 보여주었고 전 농도 영역에서 메탄올보다 높고 프로판올과 유사하였다.

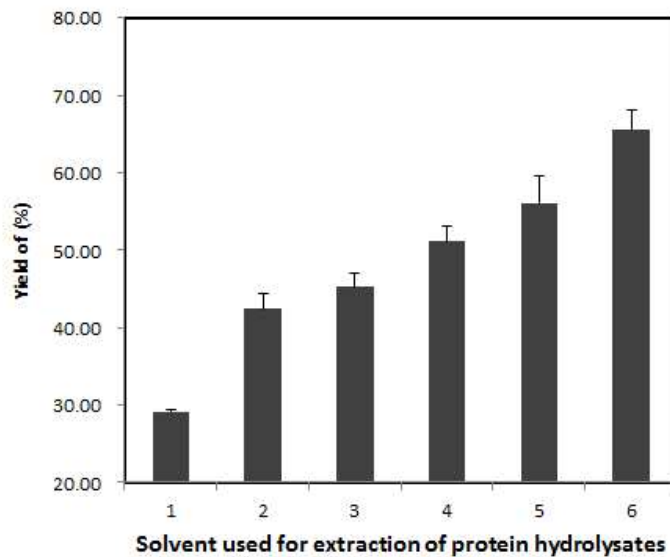


Fig. 149. Yield of peptide purification derived from Ogae meat. 1, 2, 3, 4, 5, and 6 represent water, 10, 20, 30, 40, and 50% 0.3M TCA solution.

(5) 0.3 M TCA 용액과 프로판올 농도에 따른 분리

실험에서 TCA 와 프로판올이 펩타이드 회수 및 정제 수율이 높았기 때문에 좀더 용매 비율을 높여서 실험을 수행하였다. 용매 비율 20-90% 범위에서 수행을 하였는데 용매가 증가하면서 정제수율은 점점 증가하는 경향을 보여 주었다. TCA 의 경우에는 꾸준히 증가하는 증가 하였지만 프로판올 경우에는 약 50% 이상에서는 정지기를 보여주었다.

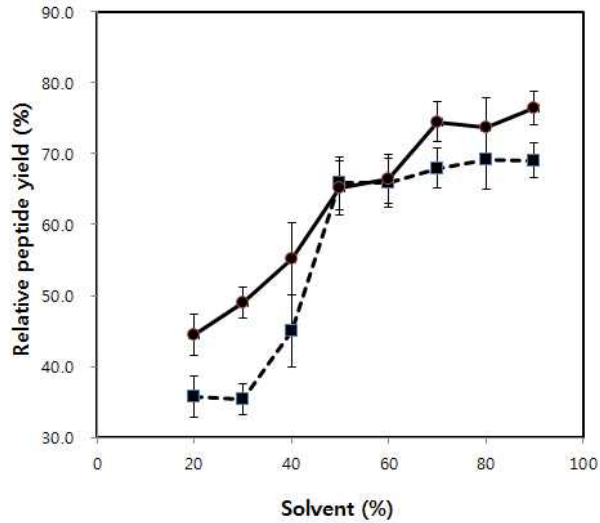


Fig. 150. Yield of peptide purification derived from Ogae meat at different solvent concentration. Circular and rectangular represent TCA solution and propanol, respectively.

(6) TCA 용액과 프로판올 온도에 따른 분리

실험에서 TCA 와 프로판올이 펩타이드 회수 및 정제 수율에 대하여 온도에 따라 실험을 수행하였다. 온도 15-55°C 범위에서 수행을 하였는데 온도가 증가하면서 정제수율은 점점 감소하는 경향을 보여 주었다. 이유는 용매 온도가 증가를 하면서 용매의 활성도가 증가를 하기 때문 인 것으로 보인다. 본 연구에서는 용매의 비용과 효율을 고려 해서 TCA 용매를 1 차 펩타이드 추출에 적용을 하였다.

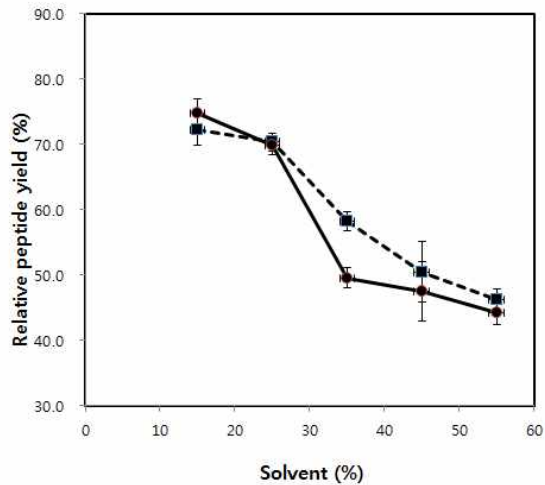


Fig. 151. Yield of peptide purification derived from Ogae meat at different temperature. Circular and rectangular represent TCA solution and propanol, respectively.

카. 오계발 및 뼈로부터 기능성 콜라겐 추출 및 항산화 측정

콜라겐은 동물의 결합조직의 주요 단백질이다. 콜라겐은 공업적으로 이용된 다른 단백질과 같이 그의 물리화학, 생화학적 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 결과 가용성 콜라겐 펩타이드 발견에 의하여 콜라겐의 연구가 급진전을 보였으며, 의약품, 건강기능식품 및 화장품 등의 개발에 있어 콜라겐은 중요한 소재가 되고 있다. 화상이나 상처에 의해 손상된 피부에 대한 치유 효과가 있는 것으로도 밝혀져 의료용 고분자 재료로서 사용되고 있다. 이처럼 콜라겐은 식품 및 의약품에서 뿐만 아니라 화장품, 섬유산업 등 넓은 분야에서 다양하게 이용된다. 그리고 현재 콜라겐 산업의 발전으로 인한 수요의 증가로 더욱 많은 콜라겐이 요구되고 있는 실정이며, 동물을 이용한 콜라겐이 지니고 있는 인체 전이 위험성을 배제한 수산물을 이용한 연구가 진행되고 있다.

(1) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능

Fig. 152은 산침지의 유무와 열수 침지 시 열의 전도성에 대해 항산화의 변화를 측정하였다. 그 결과 오계 콜라겐의 DPPH 항산화 능력은 추출 조건에 의해 영향을 받는 것으로 나타났다. 특히 산 침지 없이 autoclave에서 추출한 경우 23.4%로 가장 높은 항산화력을 나타냈다.

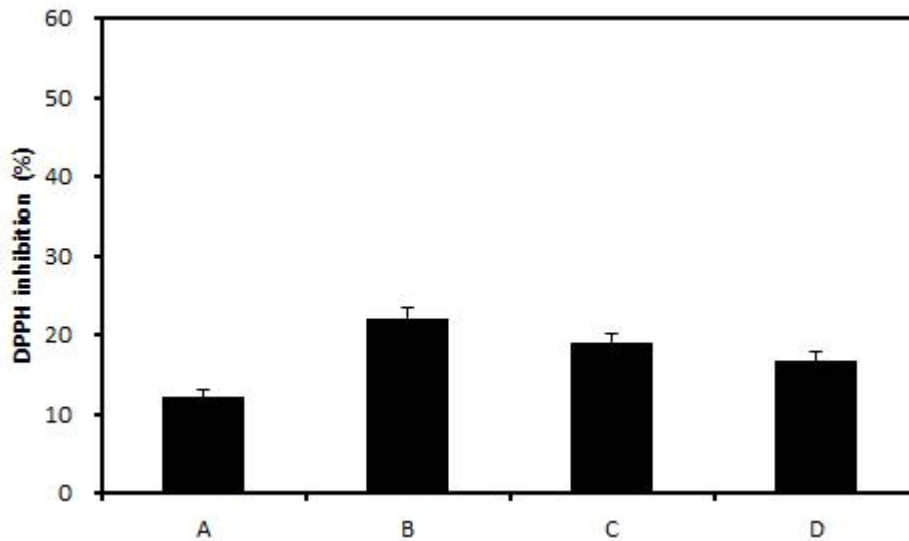


Fig. 152. The degree of DPPH radical scavenging activity of Yeonsan Ogae collagen. A:acid-steeping and autoclave. B: autoclave. C: acid-steeping and heat in boiling water D: heat in boiling water

(2) 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능

Fig. 153은 산침지의 유무와 열수 침지 시 열의 전도성에 대해 항산화의 변화를 슈퍼옥사이드 라디칼 (superoxide radical)을 통해 측정하였다. 그 결과 오계 콜라겐의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능력은 확인한 결과 58.3 ~ 67.8%로 DPPH에 비해 크게 차이가 없음을 확인하였다. 슈

퍼옥사이드 라디칼 소거능력은 D 즉, 산 침지 없이 증탕한 샘플이 가장 높은 항산화 활성을 나타냈다.

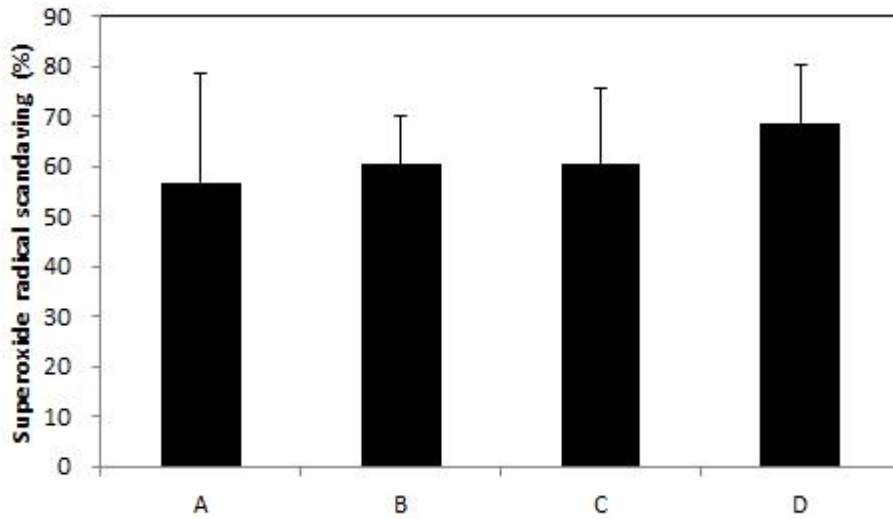


Fig. 153. The degree of superoxide radical scavenging activity of Yeonsan Ogae collagen. A: acid-steeping and autoclave. B: autoclave. C: acid-steeping and heat in boiling water D: heat in boiling water

(3) 하이드록시 라디칼 소거능

Fig. 154의 결과 9.8~23.6%의 분포를 보였으며 산침지를 하지 않은 B와 D 샘플에서 하이드록시 라디칼 소거능이 높은 것으로 확인되었으며, 산침지를 한 샘플의 경우 상대적으로 낮은 항산화력을 보였다. 가장 높은 항산화력을 보인 샘플은 D 즉, 산 침지 없이 증탕한 샘플로 확인되었다.

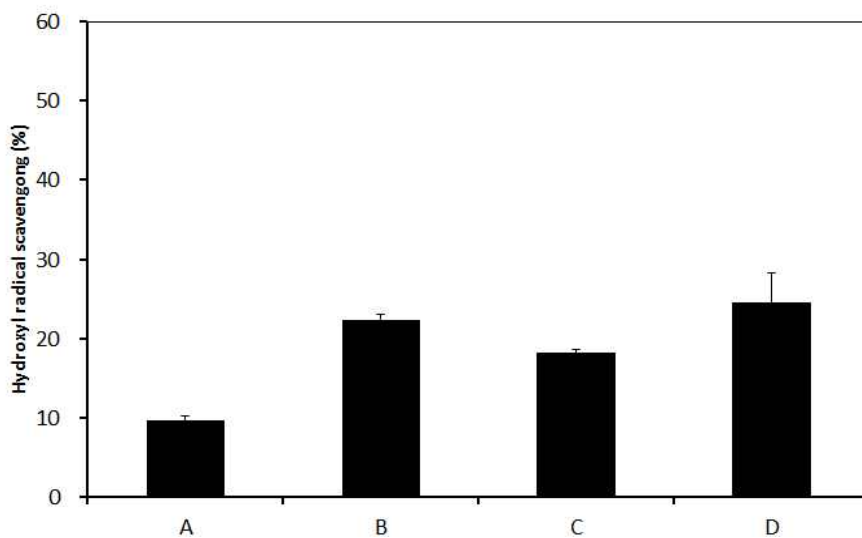


Fig. 154. The degree of hydroxy radical scavenging activity of Yeonsan Ogae collagen. A: acid-steeping and autoclave. B: autoclave. C: acid-steeping and heat in boiling water D: heat in boiling water

(4) Fe²⁺ 킬레이션 능력

금속 이온을 킬레이트화 하는 가수 분해물들에 대한 능력을 Fig. 155에서 보여주었다. 이 결과 또한 위의 항산화력을 확인한 것과 같이 D 즉, 산 침지 없이 증탕한 샘플이 64.2%로 가장 높은 항산화력을 갖고 있는것으로 확인되었다. 산침지와 autoclave를 한 샘플의 경우 가장 낮은 항산화력을 보였으며 39%였다.

위의 4가지 방법으로 항산화력을 확인한 결과 산 침지 없이 증탕한 샘플이 DPPH를 제외한 모든 항산화측정 방법에서 높은 항산화력을 보였다.

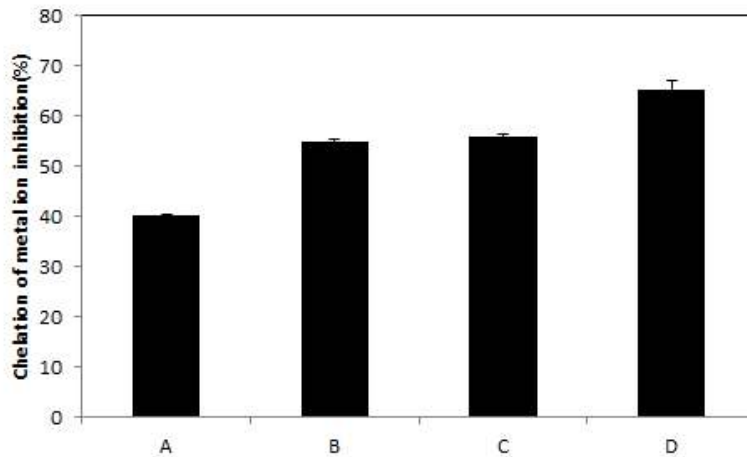


Fig. 155. The degree of chelation activity of Yeonsan Ogae collagen. A:acid-steeping and autoclave. B: autoclave. C: acid-steeping and heat in boiling water D: heat in boiling water 타. 연산오계의 기능성 소재의 생산체계 확보를 위한 공정의 표준화

(1) 연산오계 단백질 가수분해물 리포솜 캡슐화 효율 측정을 위한 정량 분석

본 연구에서 수행된 리포솜의 단백질 가수분해물의 캡슐화 효율 등을 BCA 방법을 사용하여 정량하였다. 검량 곡선법 또는 표준곡선은 정량 측정하는 연구에 적용하는 그래프의 형태이다. 농도 등 알려진 샘플들에 대한 측정값으로 결정된 그래프를 이용하여 미지(unknown)의 샘플의 정량을 그래프에 대한 내삽법(interpolation)으로 측정하는 방법이다. 따라서 알려진 샘플을 표준샘플이라고 하고 그래프를 표준고선이라고 한다. Fig. 156 는 표준 샘플 BSA 와 오계 단백질 가수분해물에 대한 표준곡이다. BSA 에 대한 선형 방정식은 $Y = 0.0014 X + 0.0284$ (Y; 흡광도 값, X; 농도) 이고 오계 단백질 가수분해물에 대한 선형 방정식은 $Y = 0.0012 X + 0.0032$ (Y; 흡광도 값, X; 농도) 이었다.

결정계수(coefficient of determination)는 추정된 선형 모형이 주어진 자료에 적합한 정도를 재는 척도이다. 반응 변수의 변동량 중에서 적용한 모형으로 설명가능한 부분의 비율을 가리킨다. 결정계수의 통상적인 기호는 R^2 이다. 결정계수의 값은 0에서 1사이 에 있으며, 종속변인과 독립변인 사이에 상관관계가 높을수록 1에 가까워진다. 즉, 결정계수가 0에 가까운 값을 가지는 회귀모형은 유용성이 낮은 반면, 결정계수의 값이 클수록 회귀모형의 유용성이 높다고 할 수 있다. 본 연구 결과에서 오계 단백질 가수분해물에 대한 선형 방정식의 결정 계수 $R^2 = 0.9998$ 이었다.

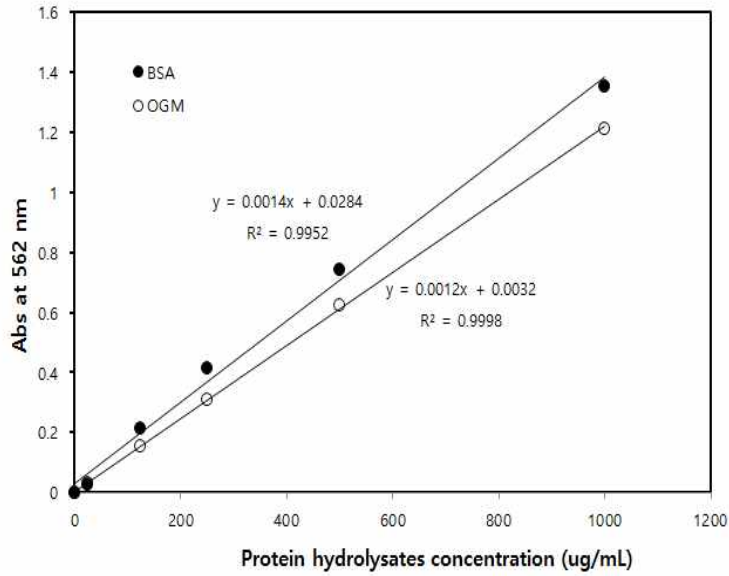


Fig 156. Standard curves of absorbance values against the amount of protein hydrolysates of ogae meat. Protein hydrolysates were produced by protease bromelain.

(2) 나노 리포솜의 특성

(가) 연산오계 단백질 가수분해물 키토산 코팅 리포솜 형태적 특성

① 나노 리포솜의 형태학 (SEM)

주사전자현미경(SEM, Scanning Electron Microscope)은 전자 현미경의 한 종류로, 집중적인 전자 빔으로 주사하여 표면의 상을 입체적으로 얻는 현미경이다. 전자들은 샘플의 원자들과 상호 반응하여 표본의 표면 지형과 구성에 대한 정보를 담고 있으며 검출 가능한 다양한 신호들을 생성한다. 본 연구에서는 나노 리포솜의 키토산 코팅 전 와 코팅 후의 형태를 SEM을 이용하여 관찰한 결과를 Fig. 157 에 나타내었다.

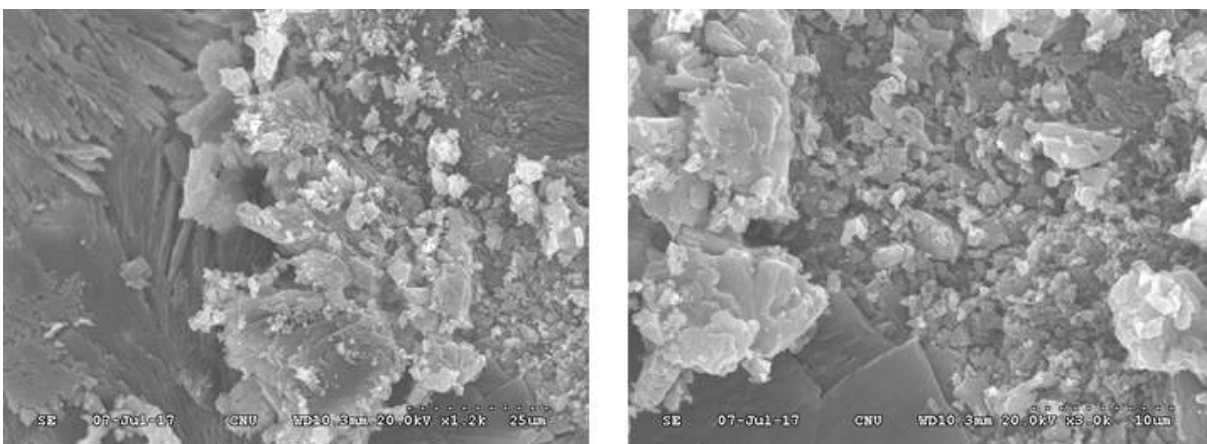


Fig 157. SEM images of chitosan uncoated and coated liposomes. (A) represents an uncoated liposome with 3% (w/v) OMPH (B) represents chitosan-coated MFGM liposome with 1% (w/v) OMPH.

② 나노 리포솜의 물리적 특성의 변화

고압 분산기를 이용하여 나노 리포솜 제조 후 리포솜 평균직경, 제타 전위, PDI 변화를 측정하였다. 제타 전위(Zeta potential)는 콜로이드 용액내의 전기공학적(electrokinetic) 전위이다. 용액에 분산되어 있는 입자는 그 표면극성기의 해리와 이온의 흡착에 의해 전기적으로 음 또는 양으로 대전하고 있다. 따라서 입자 주위에는 계면전하를 중화하기 위해 과잉으로 존재하는 반대부호를 가진 이온과 소량의 동일한 전하를 지닌 이온이 확산적으로 분포함으로 전기이중층(electric double layer)이 형성된다. 일반적으로 제타전위는 고정층과 확산층의 경계면에 가까운 미끄러운 면(slip plane)에서의 전위를 나타낸다. 그러나 콜로이드 입자의 표면전위를 직접적으로 측정한다는 것은 어려우므로 표면전위에 관한 정보는 주로 전기영동 실험에 의해 얻어진 제타전위 값으로 논의하는 것이 일반적이다. 미립자나 콜로이드의 경우 실험적으로 구해진 제타전위의 절대치가 증가하면 입자간의 반발력이 강해져 입자의 안정성은 높아지는 반면 제타전위가 0에 가까워지면 입자는 응집하기 쉬워진다. 따라서 제타전위는 콜로이드입자의 분산안정성의 척도로서 사용될 수 있다.

다분산 지수 (polydispersity index)는 분자량 분포의 넓이를 나타내는 기준이 되며, 수평균 분자량에 대한 무게평균 분자량의 비로 나타낸다. 최근 IUPAC에서는 분산(dispersity)를 다분산 지수(polydispersity index)로 용어를 대치하였고 단위는 *D*로 표기를하고 *D*-스트로크(D-stroke)라고 명명을 한다.

본 연구에서는 고압 분산기 처리하기 전과 후의 오계육 리포솜의 평균직경, 제타전위와 PDI 값의 분석결과는 Table. 46 에서 보여 진다. 고압 분산기 처리하기 전의 리포솜 평균직경은 969.6 nm, 제타 전위는 -39.2 mV, PDI 값은 0.252로 분석결과가 나타났고, 고압분산기 처리한 후의 리포솜 평균직경은 320.4 nm, 제타 전위는 -36.5 mV, PDI 값은 0.496으로 분석결과가 나타났다. 따라서 고압 분산기 처리한 후에 리포솜의 평균직경은 줄어들었고 제타 전위와 PDI 값은 큰 차이가 나타나지 않은 것으로 알 수 있었다. PDI 값이 분산처리 후에 증가한 이유는 비록 분산처리 하는 동안 리포솜의 직경이 다양해 진 것으로 볼 수가 있다. 따라서 균일한 나노 평균직경 리포솜 제조를 위하여 샘플의 농도를 줄이거나 분산 처리 조건들(압력, 시간)을 늘리면 증가할 것으로 본다.

Table 46. The change of size, zeta potential, and polydispersity index (PDI) of liposomes.

	Size	Zeta potential	Polydispersity index
	nm	mV	PDI
Before homogenization	969.6	-39.2	0.252
After homogenation	320.4	-36.5	0.496

③ 수소이온농도와 리포솜 양의 비율에 따른 응집 효과

제타전위란 액체에 부유하는 콜로이드 입자의 표면 전기적 특성으로서, 부유 물질끼리 또는

부유 물질과 필터 등의 표면에서의 전기적 인력과 반발력의 기준으로 사용된다. 즉, 액체 속에 부유하는 콜로이드 입자들의 표면 대전량 정도를 나타내는 지표로써 콜로이드의 안정도와 직접적인 관계가 있다. 제타전위의 절대값이 증가하면 액체상의 전기적 반발력이 크기 때문에 분산도가 증가하여 응집현상이 줄어들어 콜로이드가 안정하다고 평가한다. 미국 재료 시험학회의 기준에 따르면 물과 폐수에서 제타전위의 값은 -61 mV 보다 절대값이 클 때 매우 안정한 콜로이드를 가진다고 한다. 콜로이드는 -41 - -60 mV의 범위에서는 안정하고, -31 - -40 mV에서는 보통이며, -10 - -30 mV에서는 불안정하고, $+5$ - -5 mV의 제타전위에서는 강력한 응집이 일어나는 범위로 나타내어진다.

본 연구에서 제조 리포솜의 pH의 변화에 따른 응집 현상을 관찰하였다. Fig. 158 A에서는 pH 용액에 대하여 상대적으로 높은 농도의 같은 양의 리포솜을 투입한 결과 대부분 pH 7 에서는 응집 현상을 보여 주었다. 리포솜의 농도를 낮추면서 시행을 실험 결과는 Fig 158 B에서 보여준다. pH 7에서부터 수소이온 농도가 높아가면서 pH 5에서 응집을 보여 주었고 이하에서는 응집 현상이 현저히 줄었다. 리포솜의 농도를 현저히 낮춘 경우에는 응집 현상이 나타나지 않았다. 따라서 본 연구결과 제조 리포솜의 응집은 수소이온 농도에 따라서 다르게 나타났고 더 높은 수소 이온에서는 리포솜 표면의 음이온들이 수소이온으로 포화가 되어 다시 분산되는 것으로 보인다.

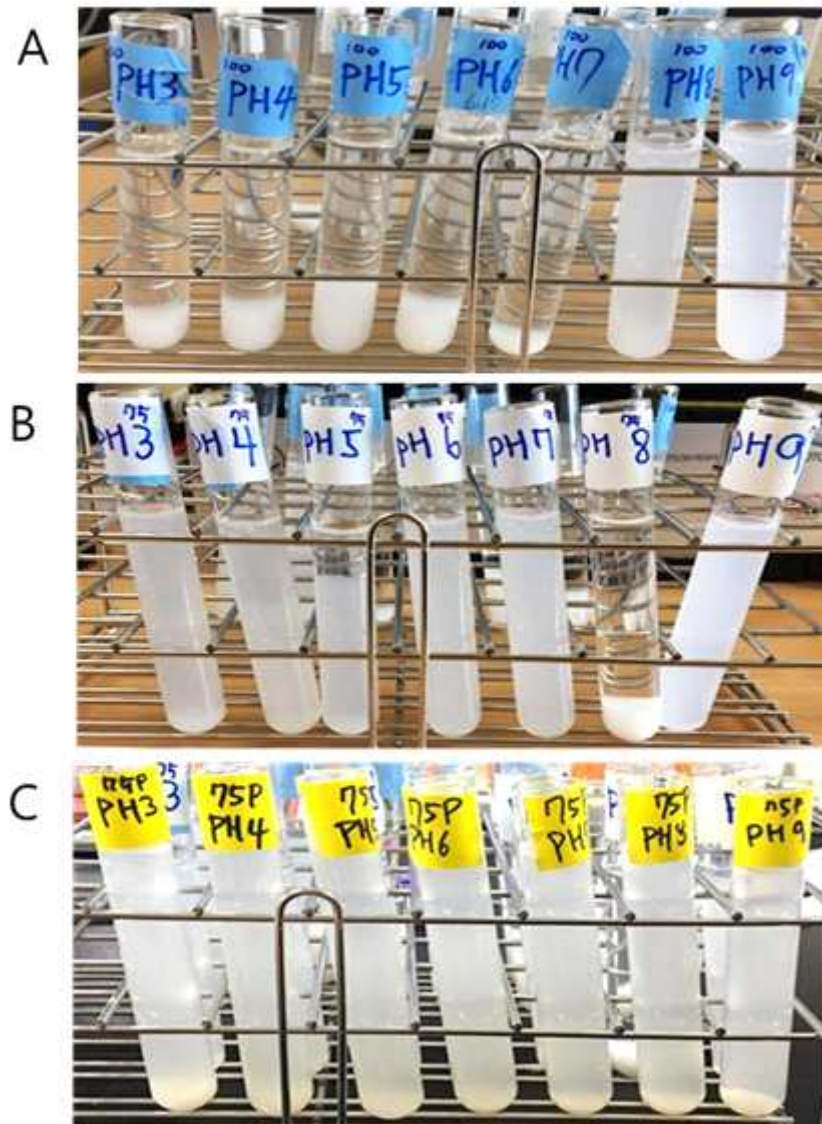


Fig 158. 수소이온농도와 리포솜 양의 비율에 따른 응집 효과

④ 키토산 코팅 전 후의 리포솜의 평균직경, 제타전위, 다분산 지수 변화.

키토산을 코팅하기 전과 후의 오계육 리포솜의 입자평균직경, 제타전위와 PDI 값의 분석결과는 Table. 47 에서 보여 진다. 키토산을 코팅하기 전의 리포솜의 평균직경은 320 nm, 제타전위는 -36.5 mV, PDI 값은 0.315로 분석결과가 나타났고, 키토산 코팅한 후의 리포솜의 평균직경은 2,154.2 nm, 제타전위는 42.4 mV, PDI값은 0.496으로 분석결과가 나타났다. 따라서 키토산 코팅 후에는 코팅하기 전보다 입자 평균직경이 증가하였고, 제타전위는 음전하에서 양전하로 변한 것으로 보여진다. 또한 PDI값의 경우에는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구 결과는 키토산 코팅 리포솜들은 충분히 코팅 표면이 양이온으로 덮히면서 안정화 하는 것으로 나타 났다.

Table 47. The change of size, zeta potential, and polydispersity index (PDI) of liposomes.

	Size	Zeta potential	Polydispersity index
	nm	mV	PDI
CH coated liposomes	2154.2	42.4	0.315
CH uncoated liposomes	320	-36.5	0.496

(2) 연산오계육 단백질 가수분해물을 함유한 키토산 코팅 리포솜 특성

(가) 키토산 코팅 농도에 따른 리포솜의 특성

① 키토산 코팅 농도에 따른 리포솜 평균직경의 변화

고압 분산기를 이용하여 나노 리포솜 제조 후 키토산으로 코팅 하였을 때 키토산 농도에 따른 리포솜 평균직경의 변화를 Fig. 159 에서 보여준다. 키토산은 양이온성 염기다당류의 일종으로 일반적으로 자연 상태의 감각류에서 얻어지는 키토인의 탈아세틸화 정도에 따라 분류된다. 키토산은 세포독성이 적고, 생체적합성이 우수하며, 몸에서 생분해되는 특성이 있어 약물 운반체로 많이 활용되고 있다. 키토산 코팅 농도에 따른 리포솜의 입자 평균직경은 키토산 함량이 0 %에서 0.05 %까지 급격히 증가하다가 그 이후 0.2 %까지 급격히 감소하는 결과를 보여주었고, 0.6 %까지는 거의 일정한 입자평균직경을 나타내었다.

키토산은 양이온을 가진 고분자로 리포솜들이 키토산으로 코팅이 되었을 때 코팅이 된 리포솜의 전기적 양상은 - mV에서 + mV로 전이 될 것이다. 키토산이 첨가되지 않았을 경우에 나노 리포솜의 평균직경은 평균 약 210 nm 에서 첨가를 함에 따라서 점차 증가를 하였다. 약 0.01 - 0.05 %의 농도의 키토산이 첨가되었을 때 2,345 - 7,689 nm 약 23 - 35배 정도로 증가를 하였다. 이러한 이유는 키토산 첨가에 따라서 리포솜 주위의 - 전위가 커지면서 절대 전위차 값의 감소의 원인으로 본다. 이 범위 이상의 키토산 농도에서는 리포솜 주위의 전위가 점차 + mV로 되면서 절대값 전위가 다시 커지면서 응집이 되었던 리포솜들이 다시 분산되었기 때문으로 보인다. 이때의 리포솜의 평균직경은 2,000 - 2,500 nm의 분포를 이루었다. 따라서 본 연구에서는 음이온 레시친으로 제조한 리포솜들을 양이온 키토산으로 코팅을 하였을 때 제타 전위의 절대 값이 변하고 응집이 일어나는 농도 영역을 벗어나 농도를 높였을 때는 다시 리포솜 표면이 충분히 키토산으로 코팅이 되면서 리포솜들의 평균 크기는 안정화를 보이는 것으로 나타났다.

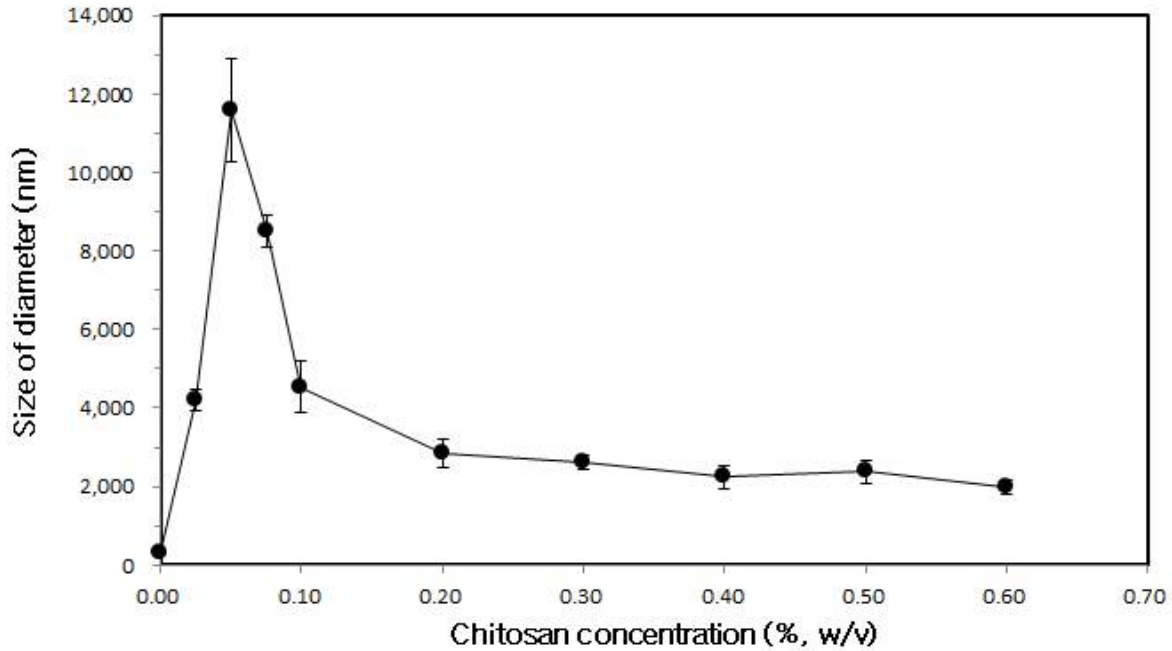


Fig 159. The influence of chitosan concentration on the average particle diameter of 3% (w/v) liposomes. All formulations were loaded with 10 mg/ml OMPH. * indicates the change in particle size was not significant ($p > 0.05$). Values are presented as mean \pm SD ($n = 3$).

② 키토산 코팅 농도에 따른 리포솜 다분산지수(polydispersity) 의 변화

다분자성은 고분자 화합물이 넓게 분포하는 성질이다. 리포솜을 생성할 때, 키토산을 코팅할 때, 이 때 리포솜의 평균직경은 똑같지 않을 것이다. PDI가 클수록 리포솜 입자평균직경의 분포가 넓은 것이고 입자평균직경이 모두 같으면 PDI =1 이다. 고분자 용액의 PDI 값은 GPC로 분석 하였을 때 M_w/M_n 이 1.0 이면 균일, 1.0 - 2.0 이면 보통, > 2.0이면 분자량의 분포가 다양하다고 설명한다. 하지만 DLS를 이용한 측정에서는 0.0 이면 균일, 0.1 - 0.4 보통, > 0.4 이면 다양하다고 설명을 한다.

키토산 농도에 따른 코팅 리포솜들의 PDI 값의 변화가 Table 48. 에 나와 있다. 코팅이 된 리포솜들의 PDI 값은 코팅 전보다 증가를 하였다. 코팅전의 PDI 값은 약 0.188 로 비교적 평균직경이 균일하였다. 코팅이 되면서 급격히 PDI 값이 증가를 하였는데 이는 제타 전위 절대치가 적어지면서 리포솜들의 응집이 일어난 것으로 보여 진다. 리포솜의 표면이 키토산으로 포화되면서 PDI 값은 안정화 되었고 약 0.2 - 0.3 의 범위로 비교적 균일한 분포를 보여주었다. 따라서 본 연구결과에 따르면 키토산 농도에 따라서 PDI 값의 변화가 일어나 농도가 증가함에 따라서 응집이 일어나고 응집 농도 이상에서는 다시 리포솜 입자들이 고른 분포를 이룬다고 볼 수 있었다. 이러한 결과는 리포솜 크기의 변화의 결과와 같은 경향을 보여 주었다.

Table 48. Effect of concentration of chitosan coating layers on polydispersity index (PDI) of liposomes.

Chitosan concentration	Polydispersity index
%	PDI
0.000	0.188
0.025	0.496
0.050	0.892
0.075	0.678
0.100	0.291
0.200	0.192
0.300	0.288
0.400	0.215
0.500	0.266
0.600	0.315

③ 키토산 코팅 농도에 따른 제타전위 변화

키토산 코팅 농도에 따른 오계육 리포솜의 제타전위에 대한 분석결과는 Fig. 160 에서 보여진다. 제타 전위(Zeta potential) 는 입자 사이의 반발력이나 인력의 크기에 대한 단위로, 콜로이드의 제타전위의 절대치가 증가하면 입자간의 반발력이 크고 입자의 안정성은 높아지는 반면 제타전위가 0에 가까워지면 콜로이드 입자간의 응집력이 커진다. 따라서 제타전위는 콜로이드입자의 분산안정성의 척도로서 사용될 수 있다. 키토산은 음전하를 띠는 기존의 대부분의 식물섬유 또는 식이섬유와 달리 용해상태에서 양전하를 띠는 특이한 구조를 가지고 있는 유일의 동물성식이 섬유이다.

키토산 코팅 농도에 따른 리포솜의 제타전위는 키토산 코팅함량이 0%에서 0.03%까지 음의 전기적 성질을 나타내었고, 반면에 0.03% 이후에는 양의 전기적 성질을 나타내었다. 또한 키토산 코팅함량이 0%에서 0.30%까지 급격히 증가하다가 그 이후부터 0.6%까지는 거의 일정한 제타전위를 나타내었다. 따라서 키토산 코팅 전의 제타전위는 - 36.5 mV 로 비교적 안정화된 콜로이드 형태의 리포솜을 형성하였다고 볼 수 있고, 키토산 함량 0.03%에서는 제타전위가 0의 값을 가지므로 콜로이드 입자간의 응집력이 커졌고, 그 이후 서서히 제타전위의 절대치가 증가하여 키토산 함량이 0.20% 이상에서는 제타전위가 + 30 mV 이상이 되므로 비교적 안정화된 콜로이드 형태라고 볼 수 있다.

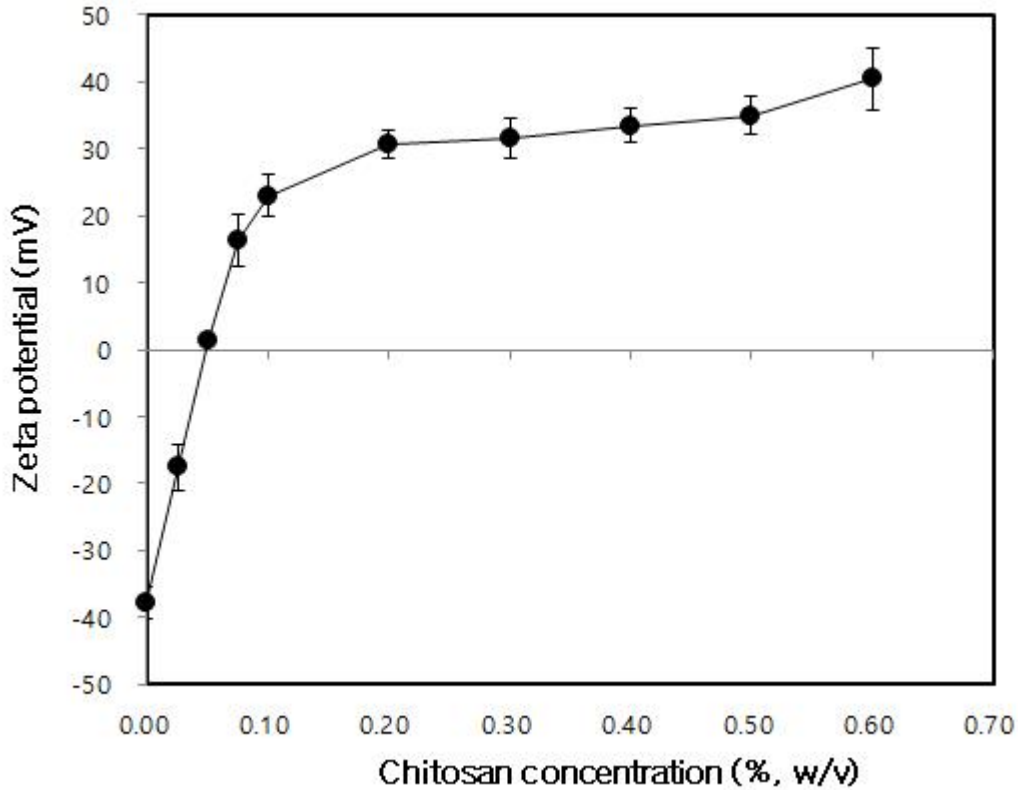


Fig 160. The influence of chitosan concentration on the average zeta potential of 3% (w/v) liposomes. Formulations were loaded with 10 mg/ml OMPH. Particles were suspended in distilled water, pH ~ 7.1. The square bracket and the * indicate the change in particle zeta potential was not significantly different among adjacent readings. Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

④ 키토산 코팅 농도에 따른 오계육 OMPH 캡슐화 효율(encapsulation efficiency) 변화

키토산 코팅 농도에 따른 오계육 OMPH 캡슐화 효율에 대한 분석결과는 Fig. 161 에서 보여진다. 키토산 코팅 농도에 따른 오계육 OMPH 캡슐화 효율은 키토산 코팅 농도가 0% 일 때 55.1% 였다가 키토산 코팅 농도가 0.025% 일 때 Encapsulation efficiencies이 27.8 %까지 급격히 감소한 다음 키토산 코팅 농도가 0.5% 까지 서서히 증가하는 결과를 보여주었다. 오계육 리포솜의 Encapsulation efficiencies 범위는 27.8% - 58.9% 로 최소값은 키토산 코팅 농도가 0.025% 일 때 27.8%이고, 최대값은 키토산 코팅의 농도가 0.5%일 때 58.9%로 나타났다. 키토산 농도에 따라 코팅이 된 나노 리포솜의 오계육 OMPH 캡슐화 효율은 코팅 전보다 증가한 이유는 펩타이드들 리포솜의 음전하 및 키토산의 양전하에 의하여 이동의 차단효과가 높아 졌기 때문으로 사료된다.

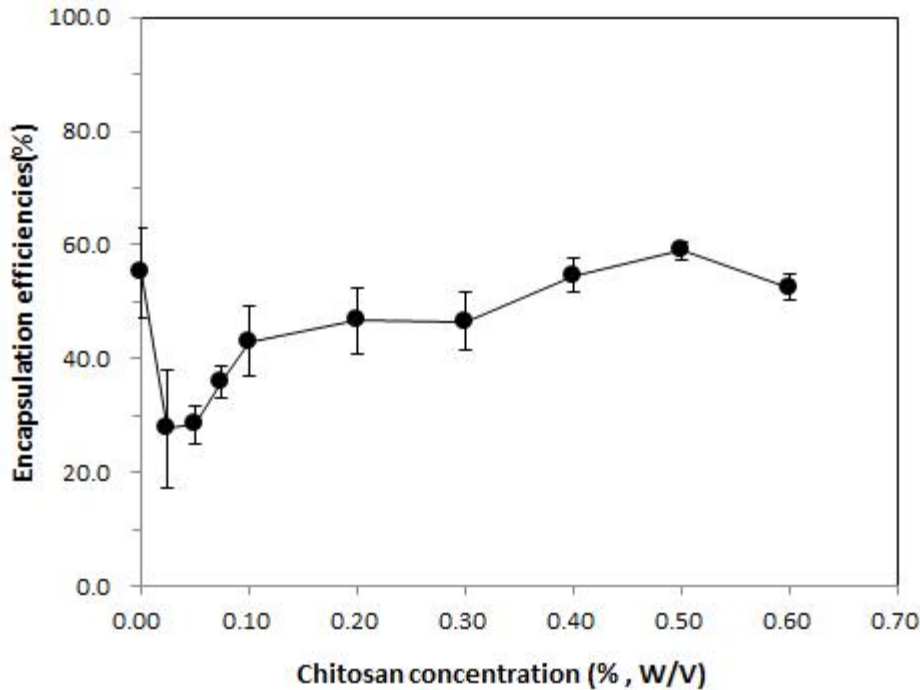


Fig 161. The influence of chitosan concentration on the encapsulation efficiency of 3% (w/v) liposomes. The square bracket and the * indicate the difference of encapsulation efficiencies was not significant among adjacent bracketed readings. Readings at lower CH levels were not included during ANOVA and Tukey's tests. Data are represented as the mean \pm SD (n = 3).

(나) 키토산 코팅 농도별 리포솜의 오계육 OMPH 방출량

① SGF와 SIF 환경에서 키토산 농도가 다른 리포솜으로부터 오계육 OMPH 방출량 비교

키토산 코팅 나노 리포솜을 이용하여 연산 오계육 펩타이드를 캡슐화하여 섭취를 하였을 때 소화 기관을 통과하면서 예측되어지는 손실 연산 오계육 펩타이드의 양을 측정하는 것이다. 모의 위장 환경에서의 방출 실험은 키토산으로 0%, 0.3%, 0.6% (w /v)로 코팅된 오계육 단백질 가수분해물을 함유한 리포솜으로 수행되었으며, 실험 시간은 표준 식사에 대한 위 배출 시간은 112 분이고, 소장에서의 평균 전이 시간은 약 2 - 4 시간이므로 방출 시험은 SGF(가상 위유동액, simulated gastric fluid) 에서 2 시간 동안 그리고 SIF(가상 내장 유동액, simulated intestinal fluid) 에서 4 시간 동안 진행되었다.

SGF에서 키토산 함량에 따른 오계육 OMPH 방출률에 대한 분석결과는 Fig. 162-A 에서 보여진다. 키토산 함량이 0.3%와 0.6% 리포솜 방출량의 결과는 유사하게 나타났으며, 키토산이 코팅 되지 않은 리포솜의 경우 코팅된 리포솜 보다 방출량이 높게 나타났다. 4 시간 때 오계육 OMPH의 방출량은 코팅되지 않은 리포솜의 경우 41.56 %에 가까웠지만, 0.3 % 및 0.6 % 키토산 코팅 함량을 갖는 리포솜의 오계육 OMPH 방출량은 약 23.0 % 및 23.15 % 로 비슷한 값을 나타내었다. SIF에서 키토산 함량에 따른 오계육 OMPH 방출률에 대한 분석결과는 Fig. 162-B 에서 보여진다. SIF의 오계육 OMPH 방출량은 SGF의 비해 높게 나타났으며, 이는 SIF

에서 오계육 리포솜은 SGF에서보다 안정적이지 못하다고 추측할 수 있다. 코팅 되지 않은 리포솜의 오계육 OMPH 방출량은 4시간까지 급격히 상승하여 95.6%에 이르렀고, 반면에 0.3 % 및 0.6 % 키토산 코팅 함량을 갖는 리포솜의 오계육 OMPH 방출량은 약 50.87 % 및 47.31 % 로 비슷한 값을 나타내었다. 키토산 코팅층은 SIF보다 SGF에서 더 큰 보호 효과를 나타낸다고 볼 수 있다.

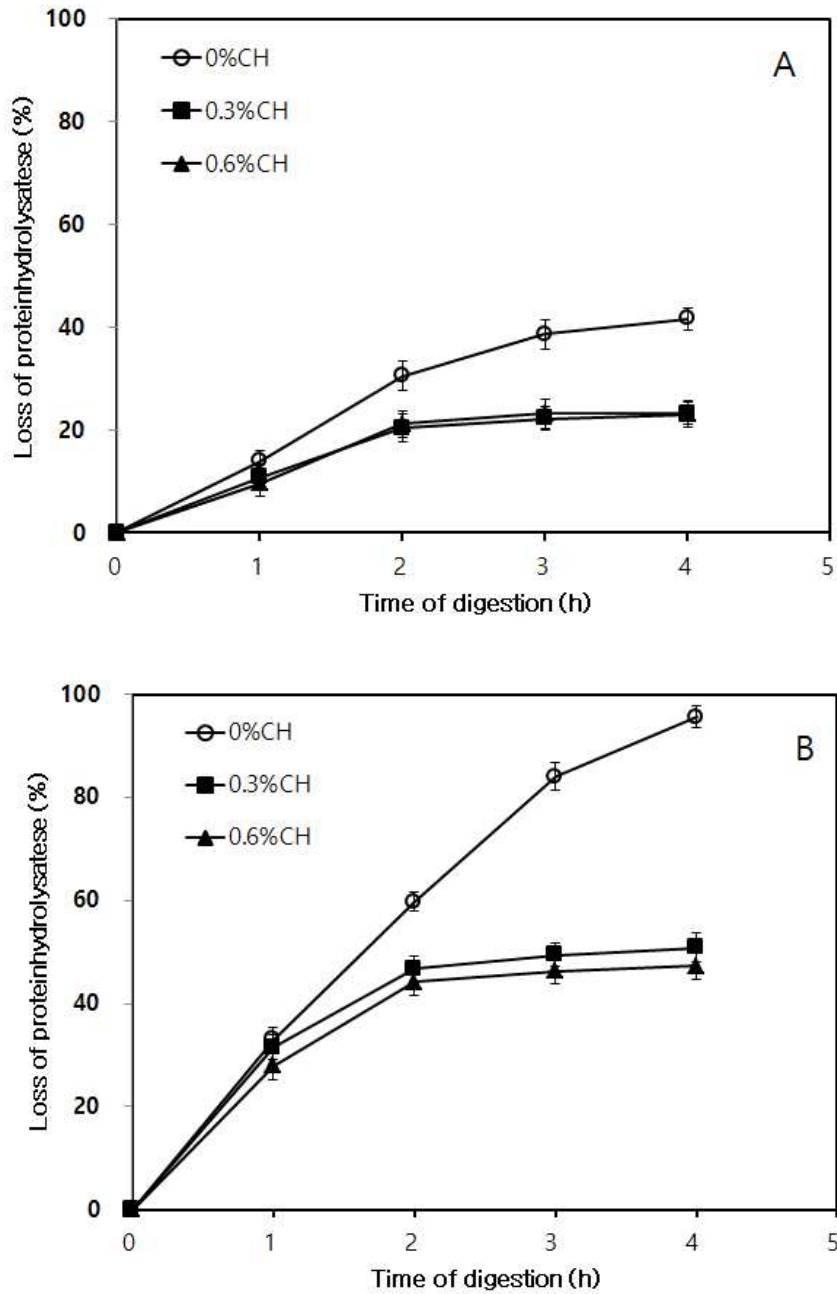
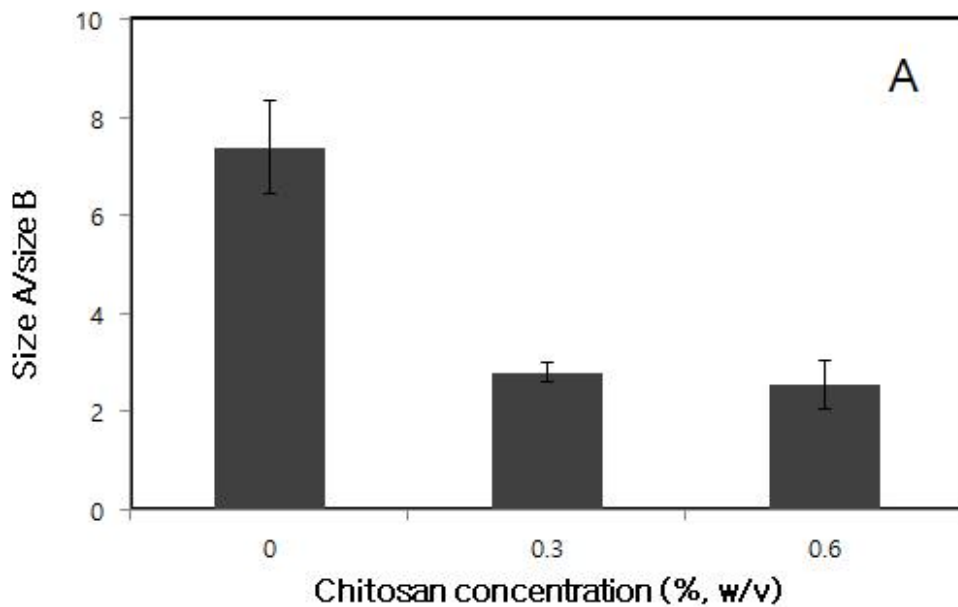


Fig 162. Release profile of 3% (w/v) liposomes with 0, 0.3, 0.6 and 1.0% (w/v) chitosan coatings in (A) simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2), and (B) simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8), 37°C. Values are presented as mean \pm SD (n=3).

(다) OMPH(Ogae meat protein hydrolysates) 함유 키토산 코팅 리포솜 안정성 연구

① 동결 전 후 키토산 코팅된 리포솜의 평균직경 및 오계육 OMPH 손실 변화

키토산 코팅없이 동결된 리포솜의 평균직경 변화가 가장 크게 나온 것을 Fig. 163-A 에서 보여진다. 또한 키토산 코팅없이 동결된 캡슐화 된 오계육 OMPH의 방출량이 77.16 % 로 Fig. 163-B에서 보여졌으며, 따라서 입자의 응집 현상을 예측할 수 있다. PDI 값이 증가함에 따라 응집 현상이 확인되며, 균질성의 감소한다. 동결하는 동안 안정성에 대한 키토산 코팅의 영향을 시험하기 위해 0.3 %와 0.6 % 키토산 농도로 실험을 수행하였다. 0.3 % 및 0.6 % 키토산으로 코팅 된 리포솜에 대해 캡슐화 된 오계육 펩타이드 가수분해물의 방출량은 45.46 % 및 25.66 %로 나타났으며, 따라서 높은 키토산 함량을 갖을수록 캡슐화 된 오계육 펩타이드 가수분해물의 방출량이 감소하였다. 0.3 % 및 0.6 % 키토산으로 코팅 된 리포솜 평균직경변화는 비슷하게 나타났으며 45.46 % 및 25.66 %로 나타났으며, 따라서 높은 키토산 함량을 갖을수록 캡슐화 된 오계육 펩타이드 가수분해물의 방출량이 감소하였다.



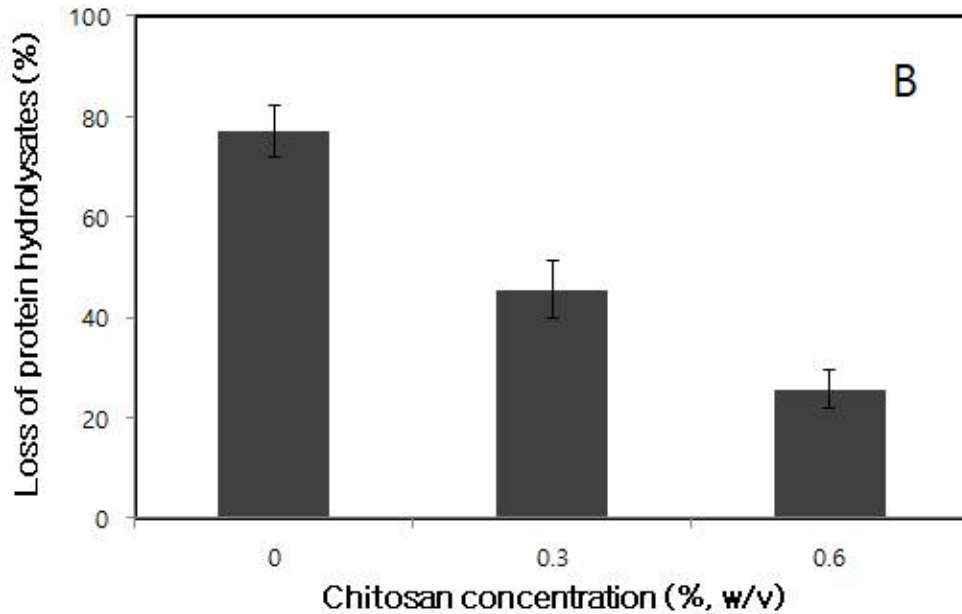


Fig 163. Relative particle size(A) and percent loss of encapsulated OMPH(B) after freezing and thawing for chitosan coated and uncoated 3% (w/v) liposomes. Relative particle size was determined as the ratio of freeze thawed particle size to original size. * indicate the change in particle zeta potential was not significantly different among adjacent readings. Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

② 동결 건조 전 후 키토산 코팅된 리포솜의 평균직경 및 오계육 OMPH 손실 변화

동결건조 전 후의 된 리포솜의 평균직경 변화는 Fig. 164-A 에서 보여진다.

키토산 코팅되지 않은 리포솜의 평균직경은 코팅 된 리포솜 보다 평균직경이 크게 나타났으며 이는 코팅된 리포솜은 코팅되지 않은 리포솜보다 많은 응집현상을 보여준다.

키토산 농도가 CH 농도가 0.3 % 및 0.6 % 일 때 리포솜의 평균직경의 변화는 서로 유의한 차이가 없었다. 또한 동결건조 전 후 캡슐화 된 오계육 펩타이드 가수분해물의 방출량은 Fig. 164-B 에서 보여진다. 키토산 코팅 되지 않은 리포솜에 대한 캡슐화 된 오계육 펩타이드 가수분해물 방출액이 가장 큰 결과 값을 나타내었고, 동결 건조 후 0.3 % 및 0.6 % 키토산으로 코팅 된 리포솜에 대해 캡슐화 된 오계육 펩타이드 가수분해물의 방출량은 20.9 % 및 25.6 %로 나타났다. 따라서 0.3 % 및 0.6 % 키토산으로 코팅 된 리포솜 평균직경변화는 비슷하게 나타났다. 전체적으로, 키토산 코팅 된 리포솜은 코팅되지 않은 리포솜보다 적은 응집을 나타냈고, 동결 전후의 변화와 달리 키토산 0.3 %의 농도에서보다 키토산 0.6 % 농도 일 때 더 우수한 안정성을 나타내지 않았다. 결과적으로 키토산함량 보다는 키토산으로 코팅 하기 전과 후의 변화에서 키토산을 코팅할 때에 동결건조 후 리포솜의 손상을 보호하는 것으로 예측할 수 있다.

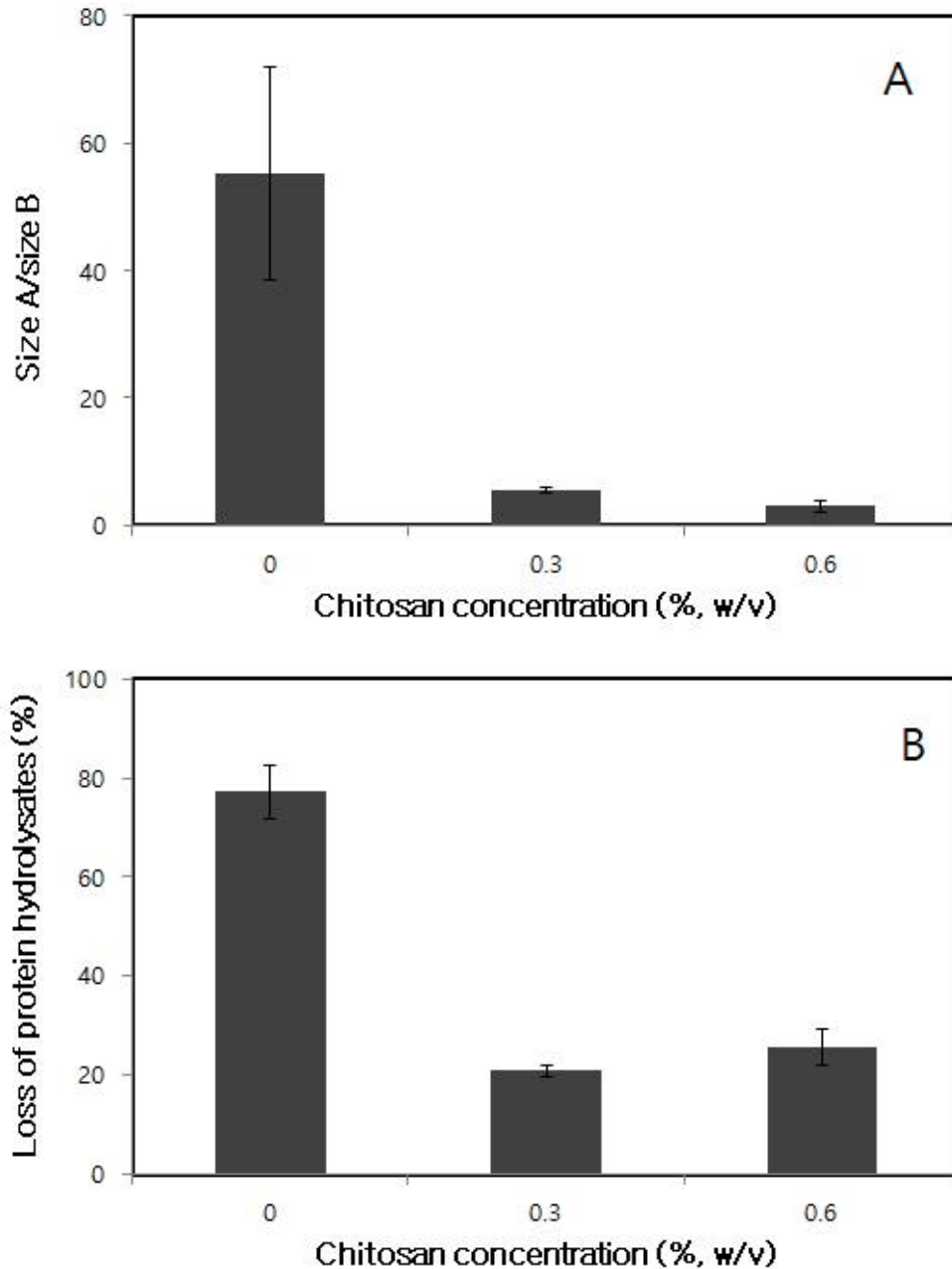


Fig 164. Relative particle size(A) and Percent loss of encapsulated OMPH(B) after freeze-drying and rehydration for chitosan coated and uncoated 3% (w/v) liposomes. Relative particle size is the ratio of freeze-thawed particle size to original size. * indicates significantly different means ($p < 0.05$). Data are depicted as the mean \pm SD ($n \geq 3$).

(라) 4°C 와 20°C 에서 키토산 코팅 리포솜의 장기 보존시 평균직경 및 PDI 변화

키토산 코팅 나노 리포솜의 안정성은 리포솜 안에 캡슐화 된 펩타이드의 양과 리포솜 평균직경의 변화에 의하여 결정된다. 보존하는 동안 리포솜들의 융합(fusion)은 캡슐화된 펩타이드의

손실의 가장 큰 요인으로 보인다. 위의 결과로부터 오계육 펩타이드의 전달 매체로서 리포솜의 제조 공정 및 제형화 개발에 키토산 코팅이 펩타이드의 손실을 완화시키는데 매우 효율적으로 판단이 된다. 또한 키토산 코팅 농도의 과도한 증가는 오히려 응집속도의 증가, 응집에 의한 리포솜 막의 붕괴 및 내부에 존재하는 펩타이드의 확산을 촉진시켜 펩타이드의 손실을 초래하는 것으로 나타났다. 키토산 코팅 나노 리포솜 과 코팅이 되지 않은 리포솜들의 장기간 보존시 최적 제형화된 리포솜의 평균직경과 펩타이드의 손실의 변화에 대하여 측정을 하였다. 일반적으로 보존에 사용하는 냉장온도인 5 °C 와 상온 온도인 25°C에서 수행을 하였다. 보존온도 5 °C에서 코팅이 되지 않은 리포솜의 평균직경은 Fig. 165-A에서 보여진다. 보존기간에 따라 완만하게 증가함을 보여 주었다. 코팅 리포솜들은 보존 전의 평균직경에 비하여 거의 차이가 없었다. 따라서 보존온도 5 °C에서는 리포솜의 키토산 코팅의 상관 없이 평균직경의 변화를 주는 응집 현상 및 표면 제타 전하의 보존하는 기간 동안 차이가 적었다고 볼 수 있다. 0.3% 및 0.6% 키토산 코팅 리포솜들의 경우에 PDI 값의 변화도 의미 있는 차이가 없는 것은 이와 같은 결과를 설명한다. 보존온도 25 °C에서 코팅이 되지 않은 리포솜의 평균직경은 Fig. 165-B에서 보여진다. 보존기간에 따라 위의 결과처럼 완만하게 증가함을 보여 주었지만 처음 평균직경보다 약 1.5배 정도 증가를 하였다. 리포솜의 다분산지수(PDI) 값 또한 완만하게 증가함을 Table. 49. 에서 볼 수 있다.. 이러한 현상은 저장기간 동안 리포솜의 응집 때문으로 보인다. 펩타이드의 손실은 4 주에 약 85% 이상이어서 많은 리포솜 막의 붕괴가 일어난 것으로 보인다. 코팅 리포솜들은 저장기간 동안 평균직경의 변화가 저온 저장에서보다 훨씬 크게 나타났다. 코팅 농도에 따라 차이가 있었지만 보존기간 일주일 후부터 급격히 평균직경이 증가를 하여 4 주 후에는 약 2,000 - 6,000 nm 이상으로 나타났다. 0.3% 및 0.6% 키토산 코팅 리포솜들의 경우에 코팅 양이 많은 경우에 응집 현상이 크게 나타났고 PDI 값은 보존 전보다 두 경우에 약간의 증가를 보여 주었는데 이러한 현상은 작은 평균직경의 리포솜들이 응집으로 응집된 리포솜들의 평균직경의 균질성(homogeneity)이 증가한 것으로 보인다.

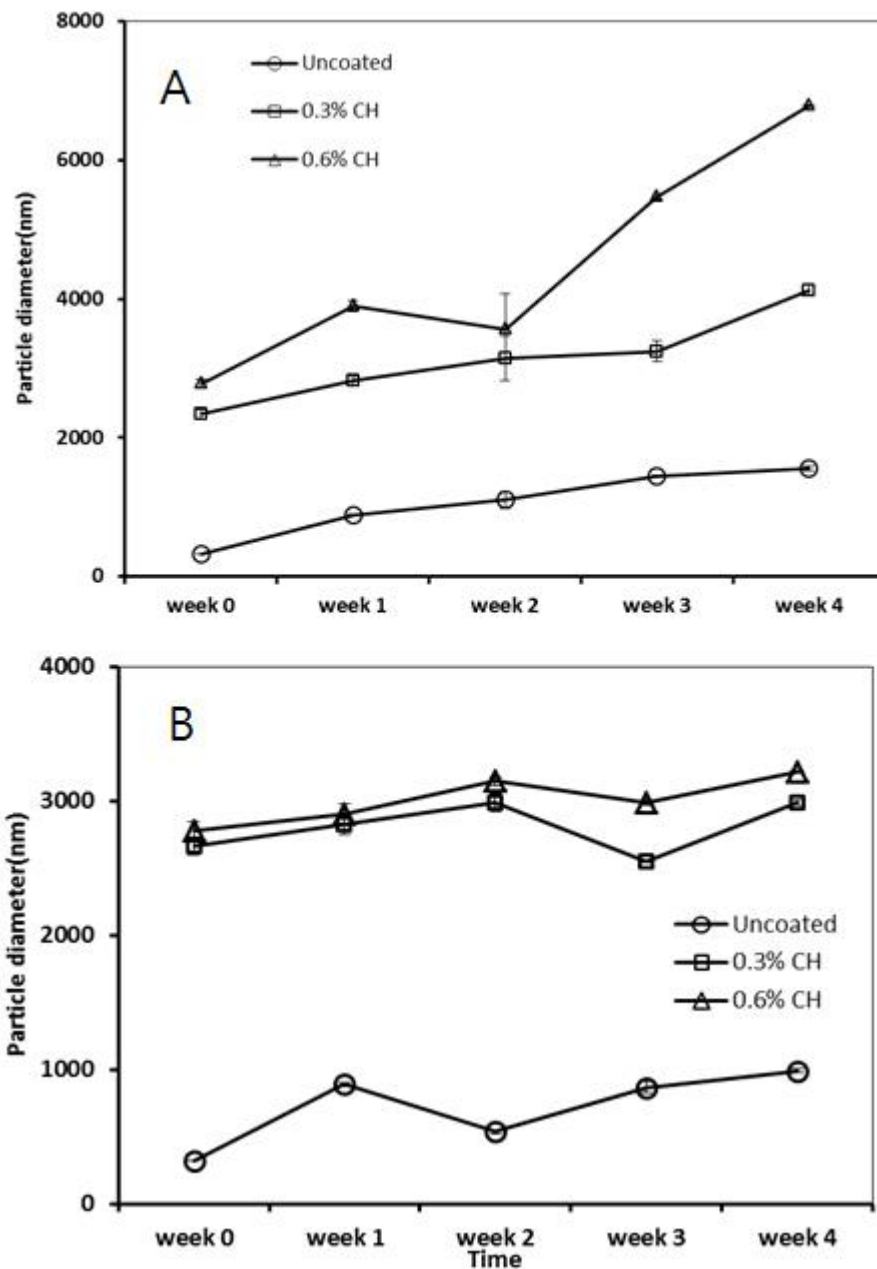


Fig 165. Comparison of Sizes of uncoated liposomes and 0.3 and 0.6% (W/V) chitosan coated liposomes stored at 25°C(A), 5°C(B). Data are depicted as the mean \pm SD (n \geq 3).

Table 49. Effect of concentration of chitosan coating layers on polydispersity index (PDI) of liposomes.

Chitosan coating concentration	Storage time	Storage temperature	
		4 °C	20 °C
w/v, %	week	PDI	PDI
0.0	0	0.312	0.342
	1	0.474	0.453
	2	0.593	0.502
	3	0.344	0.628
0.3	0	0.276	0.288
	1	0.289	0.217
	2	0.249	0.417
	3	0.393	0.450
0.6	0	0.298	0.315
	1	0.268	0.253
	2	0.286	0.468
	3	0.323	0.341

(3) 키토산 코팅 리포솜을 이용한 오계란 단백질 가수분해물 포접화 및 물리 화학적 특성 및 안정화 연구

(가) 키토산 코팅 농도에 따른 리포솜의 특성

① 키토산 코팅 농도에 따른 리포솜 평균직경의 변화

키토산은 양이온성 염기다당류의 일종으로 일반적으로 자연 상태의 갑각류에서 얻어지는 키토신의 탈아세틸화 정도에 따라 분류된다. 키토산은 세포독성이 적고, 생체적합성이 우수하며, 몸에서 생분해되는 특성이 있어 약물 운반체로 많이 활용되고 있다. 고압 분산기를 이용하여 나노 리포솜 제조 후 키토산으로 코팅 하였을 때 키토산 농도에 따른 리포솜 평균직경의 변화를 Fig. 5 에서 보여준다. 키토산 코팅 농도에 따른 리포솜의 입자 평균직경은 키토산 함량이 0

%에서 0.05 %까지 급격히 증가하다가 그 이후 0.1 %까지 급격히 감소하는 결과를 보여주었고, 0.6 %까지는 거의 일정한 입자평균직경을 나타내었다.

키토산은 양이온을 가진 고분자로 리포솜들이 키토산으로 코팅이 되었을 때 코팅이 된 리포솜의 전기적 양상은 - mV에서 + mV로 전이 될 것이다. 키토산이 첨가되지 않았을 경우에 나노 리포솜의 평균직경은 평균 약 321.3 nm 에서 첨가를 함에 따라서 점차 증가를 하였다. 약 0.01 - 0.05 %의 농도의 키토산이 첨가되었을 때 10,473 - 17,114 nm 약 32 - 53배 정도로 증가를 하였다. 이러한 이유는 키토산 첨가에 따라서 리포솜 주위의 - 전위가 커지면서 절대 전위차 값의 감소의 원인으로 본다. 이 범위 이상의 키토산 농도에서는 리포솜 주위의 전위가 점차 + mV로 되면서 절대값 전위가 다시 커지면서 응집이 되었던 리포솜들이 다시 분산되었기 때문이다. 이때의 리포솜의 평균직경은 2399 - 3699 nm의 분포를 이루었다.

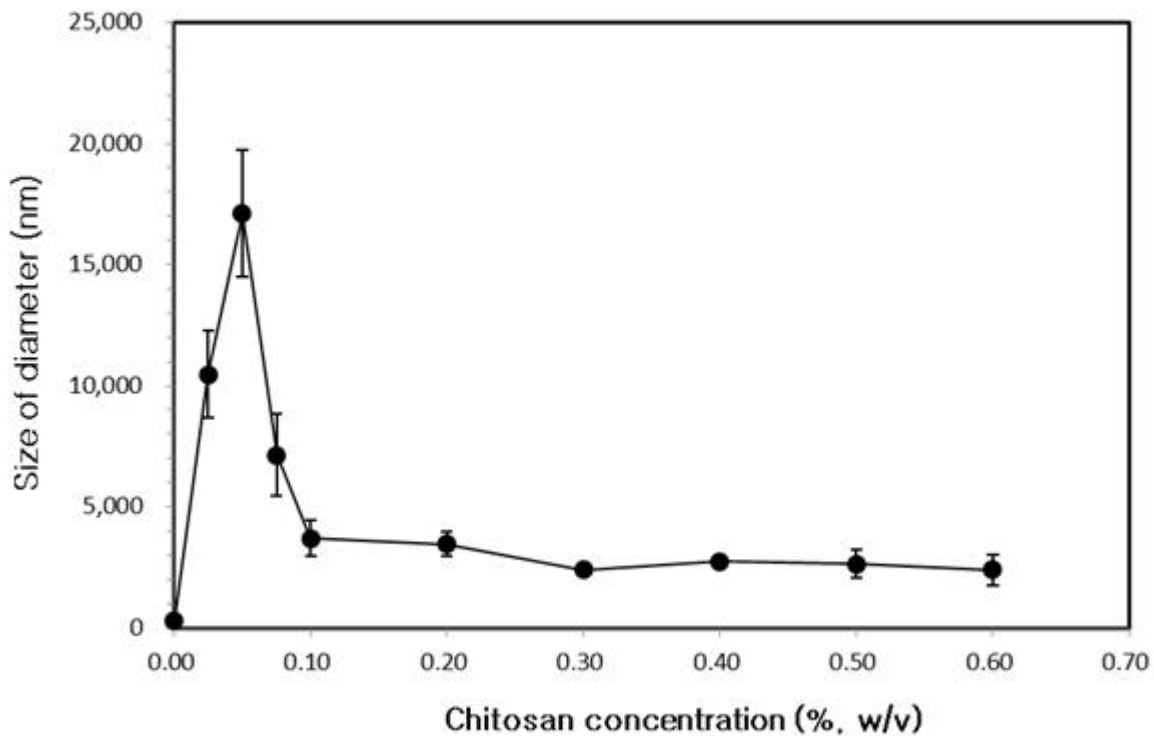


Fig 166. The influence of chitosan concentration on the average particle diameter of 3% (w/v) liposomes. All formulations were loaded with 10 mg/ml OMPH. * indicates the change in particle size was not significant ($p > 0.05$). Values are presented as mean \pm SD ($n = 3$).

② 키토산 코팅 농도에 따른 리포솜 다분산 지수의 변화

다분산 지수 (polydispersity index)는 분자량 분포의 넓이를 나타내는 기준이 되며, 수평균 분자량에 대한 무게평균 분자량의 비로 나타낸다. 최근 IUPAC에서는 분산(dispersity)를 다분산 지수(polydispersity index)로 용어를 대치하였고 단위는 D로 표기하고 D-스트로크 (D-stroke)라고 명명을 한다. 고분자 용액의 PDI 값을 GPC로 분석 하였을 때 M_w/M_n 이 1.0 이면 균일, 1.0 - 2.0 이면 보통, > 2.0 이면 분자량의 분포가 다양하다고 설명한다. 하지만 DLS

를 이용한 측정에서는 0.0 이면 균일, 0.1 - 0.4 보통, > 0.4 이면 다양하다고 설명을 한다.

키토산 농도에 따른 코팅 리포솜들의 PDI 값의 변화가 Table 50. 에 나와 있다. 코팅이 된 리포솜들의 PDI 값은 코팅 전보다 증가를 하였다. 코팅전의 PDI 값은 약 0.214 로 비교적 평균직경이 균일하였다. 코팅이 되면서 급격히 PDI 값이 증가를 하였는데 이는 제타 전위 절대치가 적어지면서 리포솜들의 응집이 일어 난 것으로 보여 진다. 리포솜의 표면이 키토산으로 포화되면서 PDI 값은 안정화 되었고 약 0.2 - 0.3 의 범위로 비교적 균일한 분포를 보여주었다.

Table 50. Effect of concentration of chitosan coating layers on polydispersity index (PDI) of liposomes.

Chitosan concentration	Polydispersity index
%	PDI
0.000	0.214
0.025	0.345
0.050	0.998
0.075	0.568
0.100	0.215
0.200	0.312
0.300	0.267
0.400	0.245
0.500	0.198
0.600	0.342

③ 키토산 코팅 농도에 따른 제타전위 변화

제타 전위(Zeta potential) 는 입자 사이의 반발력이나 인력의 크기에 대한 단위로, 콜로이드의 제타전위의 절대치가 증가하면 입자간의 반발력이 크고 입자의 안정성은 높아지는 반면 제타전위가 0에 가까워지면 콜로이드 입자간의 응집력이 커진다. 따라서 제타전위는 콜로이드 입자의 분산안정성의 척도로서 사용될 수 있다. 키토산은 음전하를 띠는 기존의 대부분의 식물섬유 또는 식이섬유와 달리 용해상태에서 양전하를 띠는 특이한 구조를 가지고 있는 유일한 동물성식이 섬유이다.

키토산 코팅 농도에 따른 오계란 리포솜의 제타전위에 대한 분석결과는 Fig. 167 에서 보여 진다. 키토산 코팅 농도에 따른 리포솜의 제타전위는 키토산 코팅함량이 0%에서 0.03%까지 음의 전기적 성질을 나타내었고, 반면에 0.03% 이후에는 양의 전기적 성질을 나타내었다. 또한 키토산 코팅함량이 0%에서 0.30%까지 급격히 증가하다가 그 이후부터 0.6%까지는 거의 일정한 제타전위를 나타내었다. 따라서 키토산 코팅 전의 제타전위는 - 41.1 mV 로 비교적 안정화된 콜로이드 형태의 리포솜을 형성하였다고 볼 수 있고, 키토산 함량 0.05%에서는 제타전위가 0의 값을 가지므로 콜로이드 입자간의 응집력이 커졌고, 그 이후 서서히 제타전위의 절대치

가 증가하여 키토산 함량이 0.30% 이상에서는 제타전위가 + 30 mV 이상이 되므로 비교적 안정화된 콜로이드 형태라고 볼 수 있다.

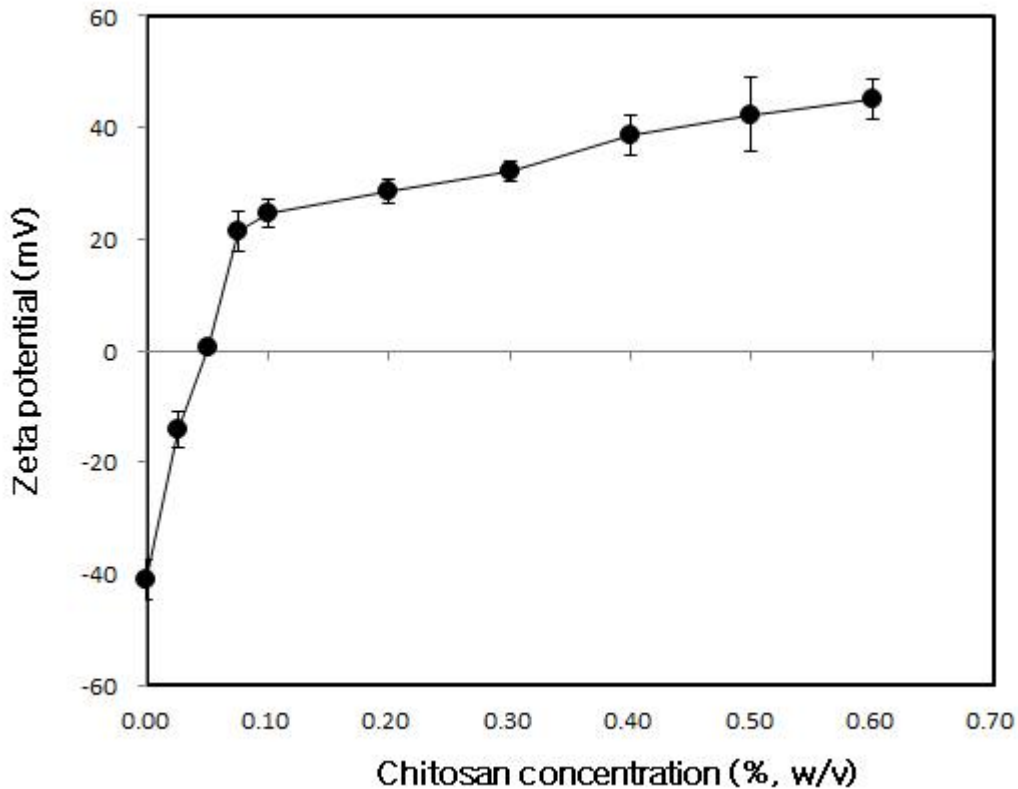


Fig 167. The influence of chitosan concentration on the average zeta potential of 3% (w/v) liposomes. Formulations were loaded with 10 mg/ml OMPH. Particles were suspended in distilled water, pH ~ 7.1. The square bracket and the * indicate the change in particle zeta potential was not significantly different among adjacent readings. Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

④ 키토산 코팅 농도에 따른 오계란 OMPH 캡슐화 효율(encapsulation efficiency) 변화

키토산 코팅 농도에 따른 오계란 OPH 캡슐화 효율에 대한 분석결과는 Fig. 168 에서 보여진다. 키토산 코팅 농도에 따른 오계란 OPH 캡슐화 효율은 키토산 코팅 농도가 0% 일 때 53.1% 였다가 키토산 코팅 농도가 0.05% 일 때 Encapsulation efficiencies이 11.7 %까지 급격히 감소한 다음 키토산 코팅 농도가 0.5% 까지 서서히 증가하는 결과를 보여주었다. 오계란 리포솜의 Encapsulation efficiencies 범위는 11.7% - 71.3% 로 최소값은 키토산 코팅 농도가 0.05% 일 때 11.7%이고, 최대값은 키토산 코팅의 농도가 0.3%일 때 71.3%로 나타났다. 키토산 농도에 따라 코팅이 된 나노 리포솜의 오계란 OPH 캡슐화 효율은 코팅 전보다 증가한 이유는 펩타이드들 리포솜의 음전하 및 키토산의 양전하에 의하여 이동의 차단효과가 높아 졌기 때문으로 사료된다.

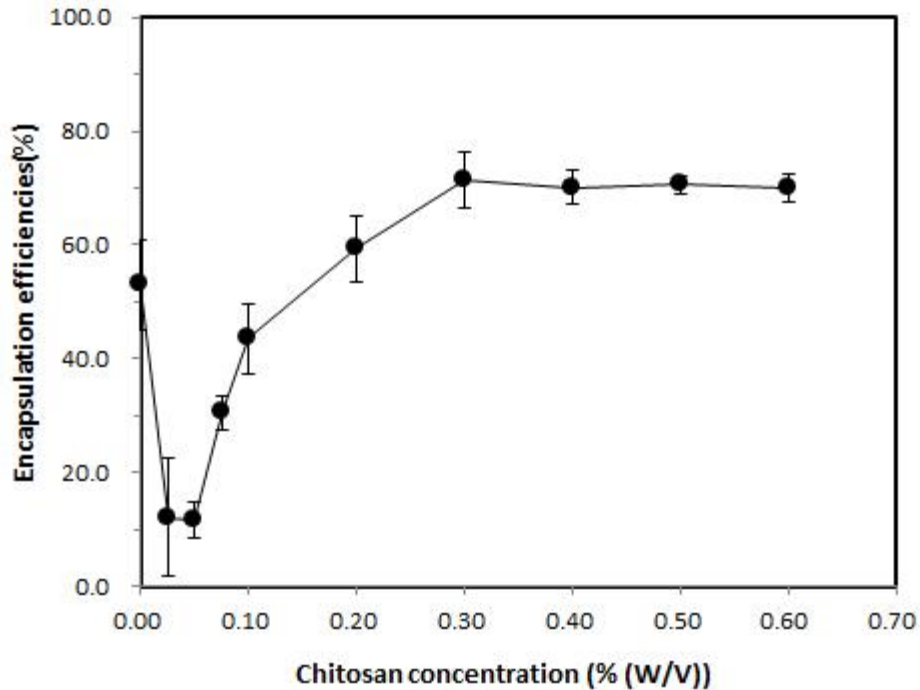


Fig 168. The influence of chitosan concentration on the encapsulation efficiency of 3% (w/v) liposomes. The square bracket and the * indicate the difference of encapsulation efficiencies was not significant among adjacent bracketed readings. Readings at lower CH levels were not included during ANOVA and Tukey's tests. Data are represented as the mean \pm SD (n = 3).

(나) 키토산 코팅 농도별 리포솜의 오계란 OPH 방출량

① SGF와 SIF 환경에서 키토산 농도가 다른 리포솜으로부터 오계란 OPH 방출량 비교

키토산 코팅 나노 리포솜을 이용하여 연산 오계란 펩타이드를 캡슐화하여 섭취를 하였을 때 소화 기관을 통과하면서 예측되어지는 손실 연산 오계란 펩타이드의 양을 측정하는 것이다. 모의 위장 환경에서의 방출 실험은 키토산으로 0%, 0.3%, 0.6% (w /v)로 코팅된 오계란 OPH 리포솜으로 수행되었으며, 실험 시간은 표준 식사에 대한 위 배출 시간은 ~ 112 분이고, 소장에서의 평균 전이 시간은 약 2-4 시간이므로 방출 시험은 simulated gastric fluid (SGF)에서 2 시간 동안 그리고 simulated intestinal fluid (SIF)에서 4 시간 동안 진행되었다. SGF에서 키토산 함량에 따른 오계란 OPH 방출률에 대한 분석결과는 Fig. 169-A 에서 보여진다. 키토산 함량이 0.3%와 0.6% 리포솜 방출량의 결과는 유사하게 나타났으며, 키토산이 코팅 되지 않은 리포솜의 경우 코팅된 리포솜 보다 방출량이 높게 나타났다. 4 시간 때 오계란 OPH의 방출량은 코팅되지 않은 리포솜의 경우 41.56 %에 가까웠지만, 0.3 % 및 0.6 % 키토산 코팅 함량을 갖는 리포솜의 오계란 OPH 방출량은 약 23.0 % 및 23.15 % 로 비슷한 값을 나타내었다. SIF에서 키토산 함량에 따른 오계란 OPH 방출률에 대한 분석결과는 Fig. 169-B 에서 보여진다. SIF의 오계란 OPH 방출량은 SGF의 비해 높게 나타났으며, 이는 SIF에서 오계란 리포솜은 SGF에서보다 안정적이지 못하다고 추측할 수 있다. 코팅 되지 않은 리포솜의 오계란 OPH 방출량은 4시간까지 급격히 상승하여 95.6%에 이르렀고, 반면에 0.3 % 및 0.6 % 키토산 코팅 함

량을 갖는 리포솜의 오계란 OPH 방출량은 약 50.87 % 및 47.31 % 로 비슷한 값을 나타내었다. 키토산 코팅층은 SIF보다 SGF에서 더 큰 보호 효과를 나타낸다고 볼 수 있다.

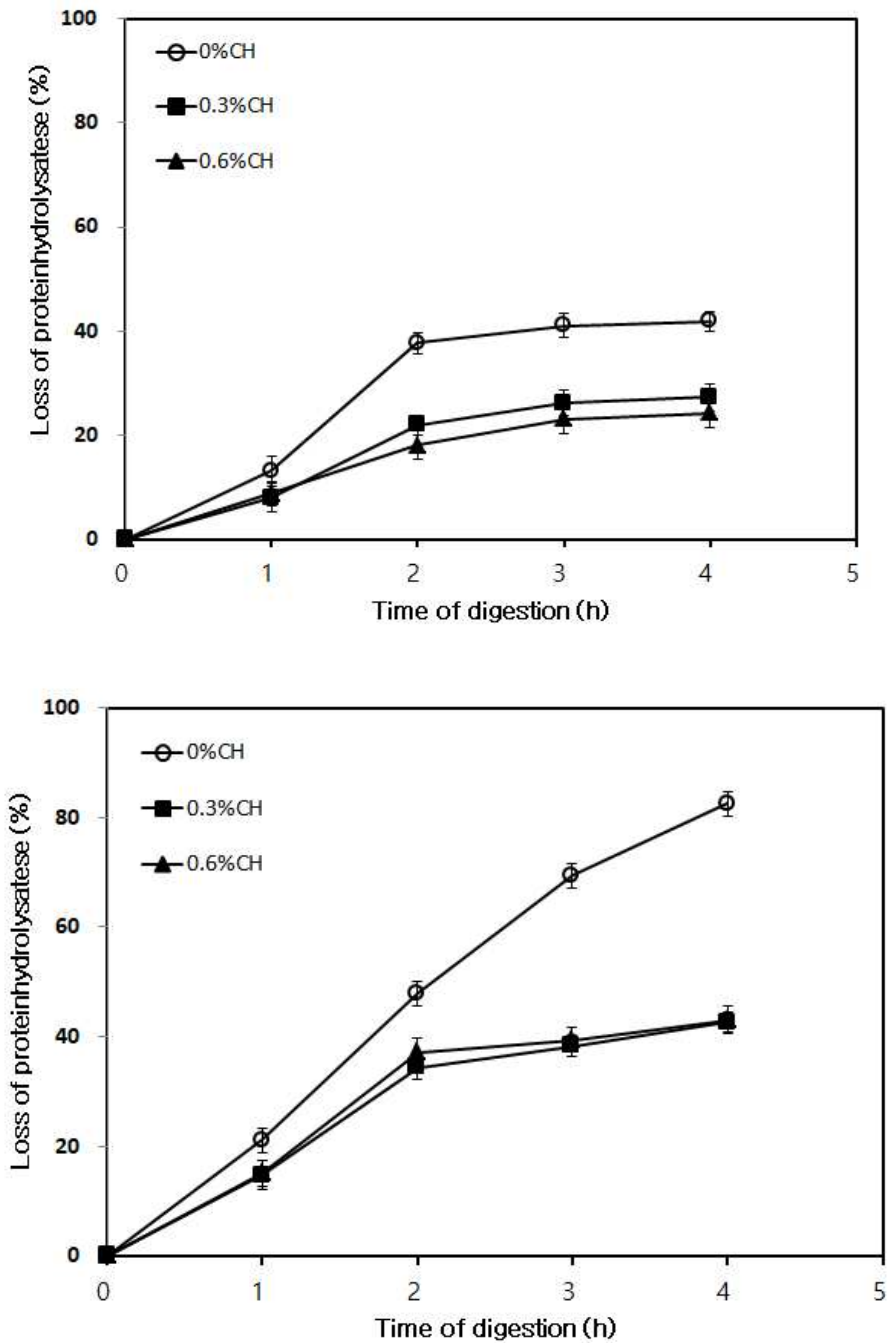


Fig 169. Release profile of 3% (w/v) liposomes with 0, 0.3, 0.6 and 1.0% (w/v) chitosan coatings in (A) simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2), and (B) simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8), 37°C. Values are presented as mean \pm SD (n=3).

(다) 키토산 코팅 리포솜 안정성 실험(키토산 0, 0.3, 0.6)

① 동결 전 후 키토산 코팅된 리포솜의 평균직경 및 오계란 OPH 손실 변화

키토산 코팅없이 동결된 리포솜의 평균직경 변화가 가장 크게 나온 것을 Fig. 170-A 에서 보여진다. 또한 키토산 코팅없이 동결된 캡슐화 된 오계란 OPH의 방출량이 79.3 % 로 Fig. 170-B에서 보여졌으며, 따라서 입자의 응집 현상을 예측할 수 있다. PDI 값이 증가함에 따라 응집 현상이 확인되며, 균질성의 감소한다. 동결하는 동안 안정성에 대한 키토산 코팅의 영향을 시험하기 위해 0.3 %와 0.6 % 키토산 농도로 실험을 수행하였다. 0.3 % 및 0.6 % 키토산 으로 코팅 된 리포솜에 대해 캡슐화 된 오계란 펩타이드 가수분해물의 방출량은 51.2 % 및 26.7 %로 나타났으며, 따라서 높은 키토산 함량을 갖을수록 캡슐화 된 오계란 펩타이드 가수분해물의 방출량이 감소하였다.

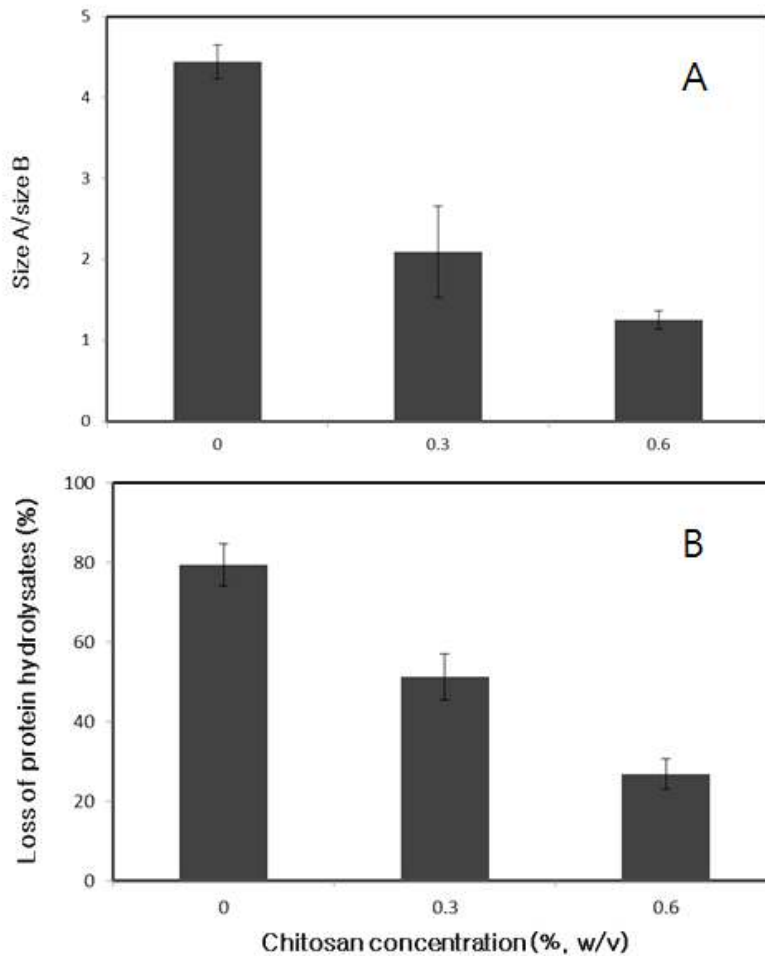


Fig 170. Relative particle size(A) and percent loss of encapsulated OPH(B) after freezing and thawing for chitosan coated and uncoated 3% (w/v) liposomes. Relative particle size was determined as the ratio of freeze thawed particle size to original size. * indicate the change in particle zeta potential was not significantly different among adjacent readings. Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

② 동결 건조 전 후 키토산 코팅된 리포솜의 평균직경 및 오계란 OPH 손실 변화

동결건조 전 후의 된 리포솜의 평균직경 변화는 Fig. 171-A 에서 보여진다.

키토산 코팅되지 않은 리포솜의 평균직경은 코팅 된 리포솜 보다 평균직경이 크게 나타났으며 이는 코팅된 리포솜은 코팅되지 않은 리포솜보다 많은 응집현상을 보여준다.

키토산 농도가 CH 농도가 0.3 % 및 0.6 % 일 때 리포솜의 평균직경의 변화는 서로 유의한 차이가 없었다. 또한 동결건조 전 후 캡슐화 된 오계란 펩타이드 가수분해물의 방출량은 Fig. 171-B 에서 보여진다. 키토산 코팅 되지 않은 리포솜에 대한 캡슐화 된 오계란 펩타이드 가수분해물 방출액이 가장 큰 결과 값은 81% 로 나타났고, 동결 건조 후 0.3 % 및 0.6 % 키토산 으로 코팅 된 리포솜에 대해 캡슐화 된 오계란 펩타이드 가수분해물의 방출량은 19.8 % 및 21.5 %로 나타났다. 따라서 0.3 % 및 0.6 % 키토산으로 코팅 된 리포솜 평균직경변화는 비슷하게 나타났다. 전체적으로, 키토산 코팅 된 리포솜은 코팅되지 않은 리포솜보다 적은 응집을 나타냈고, 동결 전후의 변화와 달리 키토산 0.3 %의 농도에서보다 키토산 0.6 % 농도 일 때 더 우수한 안정성을 나타내지 않았다. 결과적으로 키토산함량 보다는 키토산으로 코팅 하기 전과 후의 변화에서 키토산을 코팅할 때에 동결건조 후 리포솜의 손상을 보호하는 것으로 예측할 수 있다.

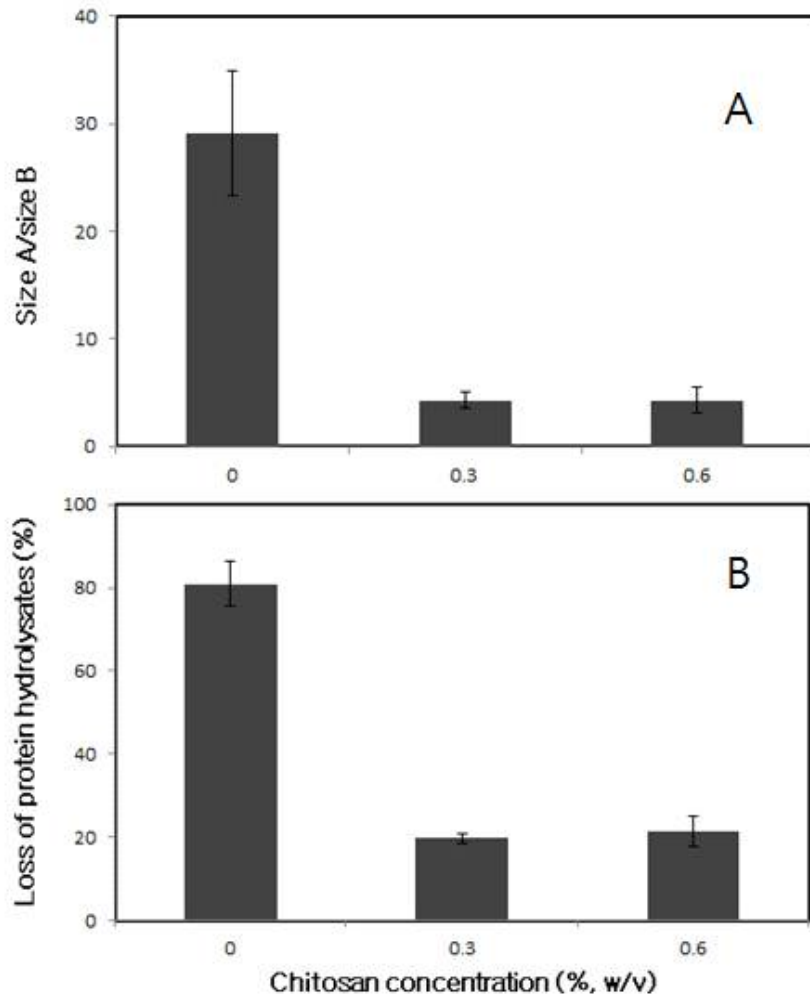


Fig 171. Relative particle size(A) and Percent loss of encapsulated OPH(B) after freeze-drying and rehydration for chitosan coated and uncoated 3% (w/v) liposomes. Relative particle size is the ratio of freeze-thawed particle size to original size. * indicates significantly different means ($p < 0.05$). Data are depicted as the mean \pm SD ($n \geq 3$).

(라) 4°C 와 20°C 에서 키토산 코팅 리포솜의 장기 보존시 평균직경 및 PDI 변화

키토산 코팅 나노 리포솜 과 코팅이 되지 않은 리포솜들의 장기간 보존시 최적 제형화된 리포솜의 평균직경과 펩타이드의 손실의 변화에 대하여 측정을 하였다. 일반적으로 보존에 사용하는 냉장온도인 5 °C 와 상온 온도인 25°C에서 수행을 하였다.

보존온도 5 °C에서 코팅이 되지 않은 리포솜의 평균직경은 Fig. 172-A에서 보여진다. 보존기간에 따라 390nm에서 1440nm로 완만하게 증가함을 보여 주었다. 코팅 리포솜들 또한 보존 전의 평균직경에 비하여 거의 차이가 없었다. 따라서 보존온도 5 °C에서는 리포솜의 키토산 코팅의 상관성이 없이 평균직경의 변화를 주는 응집 현상 및 표면 제타 전하의 보존하는 기간 동안 차이가 적었다고 볼 수 있다. 0.3% 및 0.6% 키토산 코팅 리포솜들의 경우에 PDI 값의 변화도 의미 있는 차이가 없는 것은 이와 같은 결과를 설명한다. 보존온도 25 °C에서 코팅이 되

지 않은 리포솜의 평균직경은 Fig. 172-B에서 보여진다.보존기간에 따라 위의 결과처럼 완만하게 증가함을 보여 주었지만 처음 평균직경보다 약 5배 정도 증가하였다. 리포솜의 다분산 지수(PDI) 값 또한 완만하게 증가함을 Table. 51. 에서 볼 수 있다. 이러한 현상은 저장기간 동안 리포솜의 응집 때문으로 보인다. 코팅 리포솜들은 저장기간 동안 평균직경의 변화가 저온 저장에서보다 훨씬 크게 나타났다. 코팅 농도에 따라 차이가 있었지만 보존기간 일주일 후부터 급격히 평균직경이 증가를 하여 4 주 후에는 약 1,415 - 5,678 nm 로 나타났다. 0.3% 및 0.6% 키토산 코팅 리포솜들의 경우에 코팅 양이 많은 경우에 응집 현상이 크게 나타났고 PDI 값은 보존 전보다 두 경우에 약간의 증가를 보여 주었는데 이러한 현상은 작은 평균직경의 리포솜들이 응집으로 응집된 리포솜들의 평균직경의 균질성(homogeneity)이 증가한 것으로 보인다. 키토산 코팅 나노 리포솜의 안정성은 리포솜 안에 캡슐화 된 펩타이드의 양과 리포솜 평균직경의 변화에 의하여 결정된다. 보존하는 동안 리포솜들의 융합(fusion)은 캡슐화된 펩타이드의 손실의 가장 큰 요인으로 보인다. 위의 결과로부터 오계란 펩타이드의 전달 매체로서 리포솜의 제조 공정 및 제형화 개발에 키토산 코팅이 펩타이드의 손실을 완화시키는데 매우 효율적으로 판단이 된다. 또한 키토산 코팅 농도의 과도한 증가는 오히려 응집속도의 증가, 응집에 의한 리포솜 막의 붕괴 및 내부에 존재하는 펩타이드의 확산을 촉진시켜 펩타이드의 손실을 초래하는 것으로 나타났다.

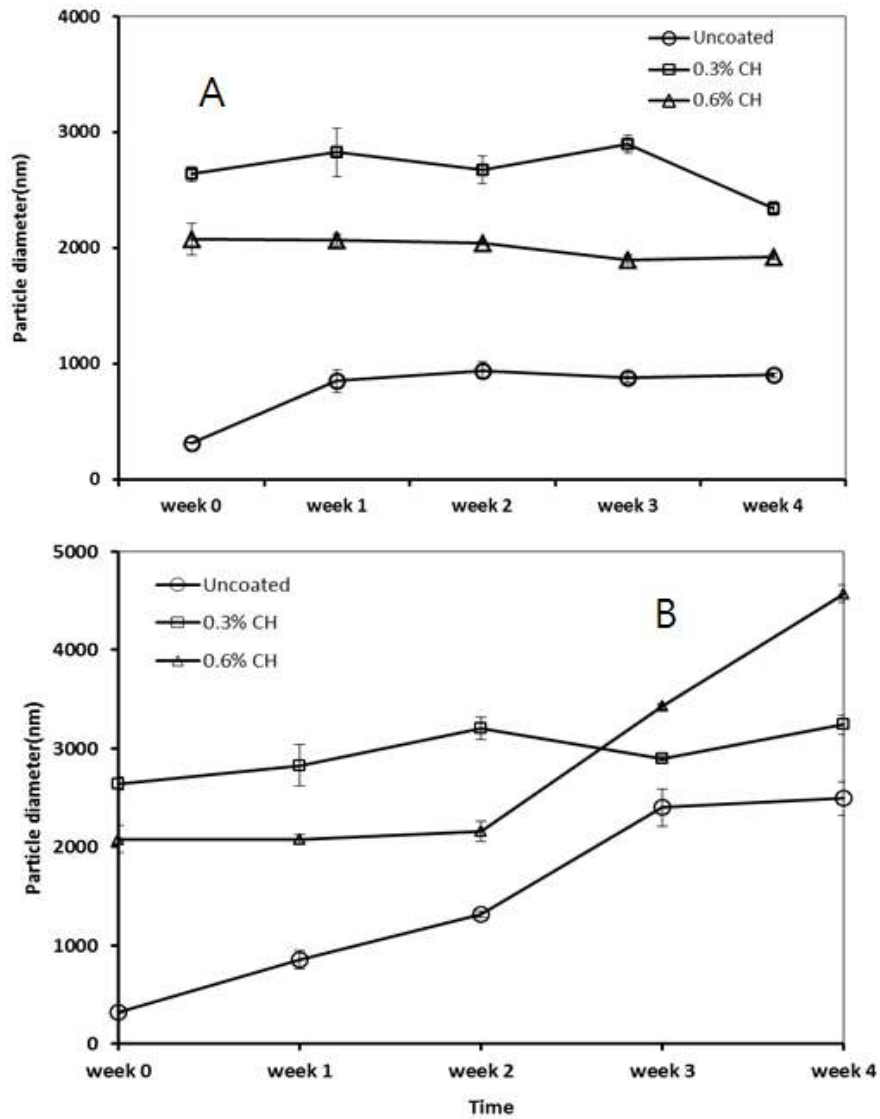


Fig 172. Comparison of Sizes of uncoated liposomes and 0.3 and 0.6% (W/V) chitosan coated liposomes stored at 25°C(A), 5°C(B). Data are depicted as the mean \pm SD (n \geq 3).

Table 51. Effect of concentration of chitosan coating layers on polydispersity index (PDI) of liposomes.

Chitosan coating concentration	Storage time	Storage temperature	
		4°C	20°C
w/v, %	week	PDI	PDI
0.0	0	0.212	0.234
	1	0.658	0.630
	2	0.683	0.576
	3	0.594	0.589
0.3	0	0.286	0.276
	1	0.304	0.195
	2	0.362	0.291
	3	0.390	0.421
0.6	0	0.399	0.312
	1	0.225	0.242
	2	0.377	0.286
	3	0.269	0.352

(4) 키토산 코팅 리포솜을 이용한 오계 내장 단백질 가수분해물 포집화 및 물리 화학적 특성 및 안정화 연구

(가) 키토산 코팅 농도에 따른 리포솜의 특성

① 키토산 코팅 농도에 따른 리포솜 평균직경의 변화

고압 분산기를 이용하여 나노 리포솜 제조 후 키토산으로 코팅 하였을 때 키토산 농도에 따른 리포솜 평균직경의 변화를 Fig. 5 에서 보여준다. 키토산 코팅 농도에 따른 리포솜의 입자 평균직경은 키토산 함량이 0 %에서 0.05 %까지 급격히 증가하다가 그 이후 0.1 %까지 급격히

감소하는 결과를 보여주었고, 0.6 %까지는 거의 2000 nm 정도로 일정한 입자평균직경을 나타내었다. 키토산은 양이온성 염기다당류의 일종으로 일반적으로 자연 상태의 갑각류에서 얻어지는 키토신의 탈아세틸화 정도에 따라 분류된다. 키토산은 세포독성이 적고, 생체적합성이 우수하며, 몸에서 생분해되는 특성이 있어 약물 운반체로 많이 활용되고 있다. 키토산은 양이온을 가진 고분자로 리포솜들이 키토산으로 코팅이 되었을 때 코팅이 된 리포솜의 전기적 양상은 - mV에서 + mV로 전이 될 것이다. 키토산이 첨가되지 않았을 경우에 나노 리포솜의 평균직경은 평균 약 400 nm 에서 첨가를 함에 따라 11614.7 nm로 점차 증가를 하였다. 약 0.01 - 0.05 %의 농도의 키토산이 첨가되었을 때 400 - 11.614.7 nm 약 29배 정도로 증가를 하였다. 이러한 이유는 키토산 첨가에 따라서 리포솜 주위의 - 전위가 커지면서 절대 전위차 값의 감소의 원인으로 본다. 이 범위 이상의 키토산 농도에서는 리포솜 주위의 전위가 점차 + mV로 되면서 절대값 전위가 다시 커지면서 응집이 되었던 리포솜들이 다시 분산되었기 때문이다. 이때의 리포솜의 평균직경은 275 - 784 nm의 분포를 이루었다.

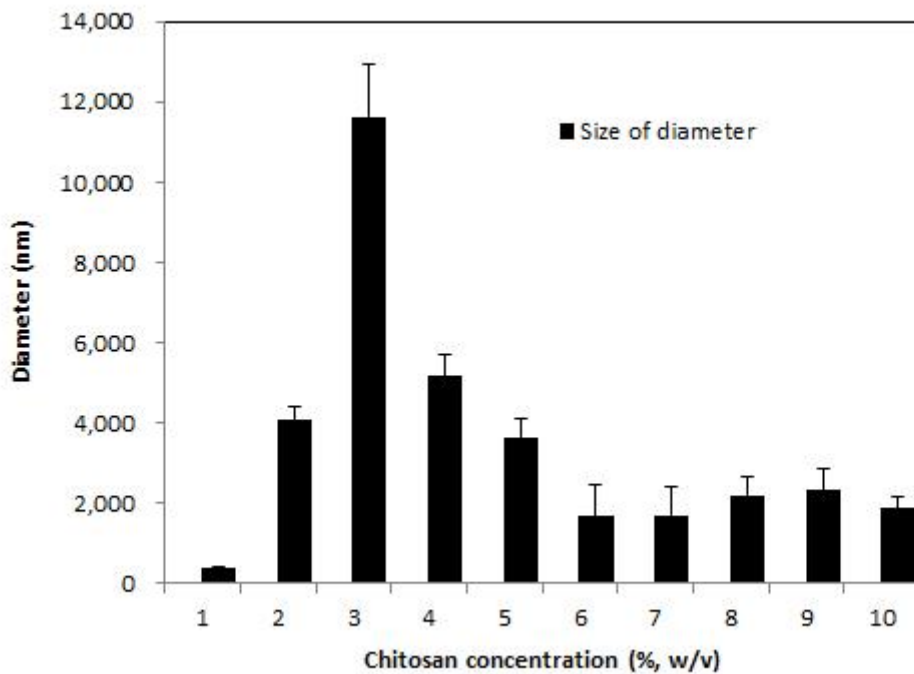


Fig 173. The influence of chitosan concentration on the average particle diameter of 3% (w/v) liposomes. All formulations were loaded with 10 mg/ml OPH. * indicates the change in particle size was not significant ($p > 0.05$). Values are presented as mean \pm SD ($n = 3$).

② 키토산 코팅 농도에 따른 리포솜 다분산 지수의 변화

키토산 농도에 따른 코팅 리포솜들의 PDI 값의 변화가 Table 52. 에 나와 있다. 코팅이 된 리포솜들의 PDI 값은 코팅 전보다 증가를 하였다. 코팅전의 PDI 값은 약 0.245 로 비교적 평균직경이 균일하였다. 코팅이 되면서 급격히 PDI 값이 증가를 하였는데 이는 제타 전위 절대치가 적어지면서 리포솜들의 응집이 일어난 것으로 보여 진다. 다분자성은 고분자 화합물이

넓게 분포하는 성질이다. 리포솜을 생성할 때, 키토산을 코팅할 때, 이 때 리포솜의 평균직경은 똑같지 않을 것이다. PDI가 클수록 리포솜 입자평균직경의 분포가 넓은 것이고 입자평균직경이 모두 같으면 PDI =1 이다. 고분자 용액의 PDI 값을 GPC로 분석 하였을 때 Mw/Mn 이 1.0 이면 균일, 1.0 - 2.0 이면 보통, > 2.0이면 분자량의 분포가 다양하다고 설명한다. 하지만 DLS 를 이용한 측정에서는 0.0 이면 균일, 0.1 - 0.4 보통, > 0.4 이면 다양하다고 설명을 한다. 따라서 리포솜의 표면이 키토산으로 포화되면서 PDI 값은 안정화 되었고 약 0.2 - 0.3 의 범위로 비교적 균일한 분포를 보여주었다.

Table 52. Effect of concentration of chitosan coating layers on polydispersity index (PDI) of liposomes.

Chitosan concentration	Polydispersity index
%	PDI
0.000	0.245
0.025	0.268
0.050	0.342
0.075	0.265
0.100	0.247
0.200	0.196
0.300	0.212
0.400	0.195
0.500	0.214
0.600	0.225

③ 키토산 코팅 농도에 따른 제타전위 변화

키토산 코팅 농도에 따른 오계 내장 리포솜의 제타전위에 대한 분석결과는 Fig. 174 에서 보여 진다. 키토산 코팅 농도에 따른 리포솜의 제타전위는 키토산 코팅함량이 0%에서 0.05% 까지 음의 전기적 성질을 나타내었고, 반면에 0.05% 이후에는 양의 전기적 성질을 나타내었다. 또한 키토산 코팅함량이 0%에서 0.05%까지 급격히 증가하다가 그 이후부터 0.6%까지는 거의 일정한 제타전위를 나타내었다. 제타 전위(Zeta potential) 는 입자 사이의 반발력이나 인력의 크기에 대한 단위로, 콜로이드의 제타전위의 절대치가 증가하면 입자간의 반발력이 크고 입자의 안정성은 높아지는 반면 제타전위가 0에 가까워지면 콜로이드 입자간의 응집력이 커진다. 제타전위는 콜로이드입자의 분산안정성의 척도로서 사용될 수 있다. 키토산은 음전하를 띠는 기존의 대부분의 식물섬유 또는 식이섬유와 달리 용해상태에서 양전하를 띠는 특이한 구조를 가지고 있는 유일한 동물성식이 섬유이다. 따라서 키토산 코팅 전의 제타전위는 - 37.6 mV 로 비교적 안정화된 콜로이드 형태의 리포솜을 형성하였다고 볼 수 있고, 키토산 함량 0.08%에서는 제타전위가 0의 값을 가지므로 콜로이드 입자간의 응집력이 커졌고, 그 이후 서서히 제타전위의 절대치가 증가하여 키토산 함량이 0.20% 이상에서는 제타전위가 + 30 mV 이상이 되므로 비교적 안정화된 콜로이드 형태라고 볼 수 있다.

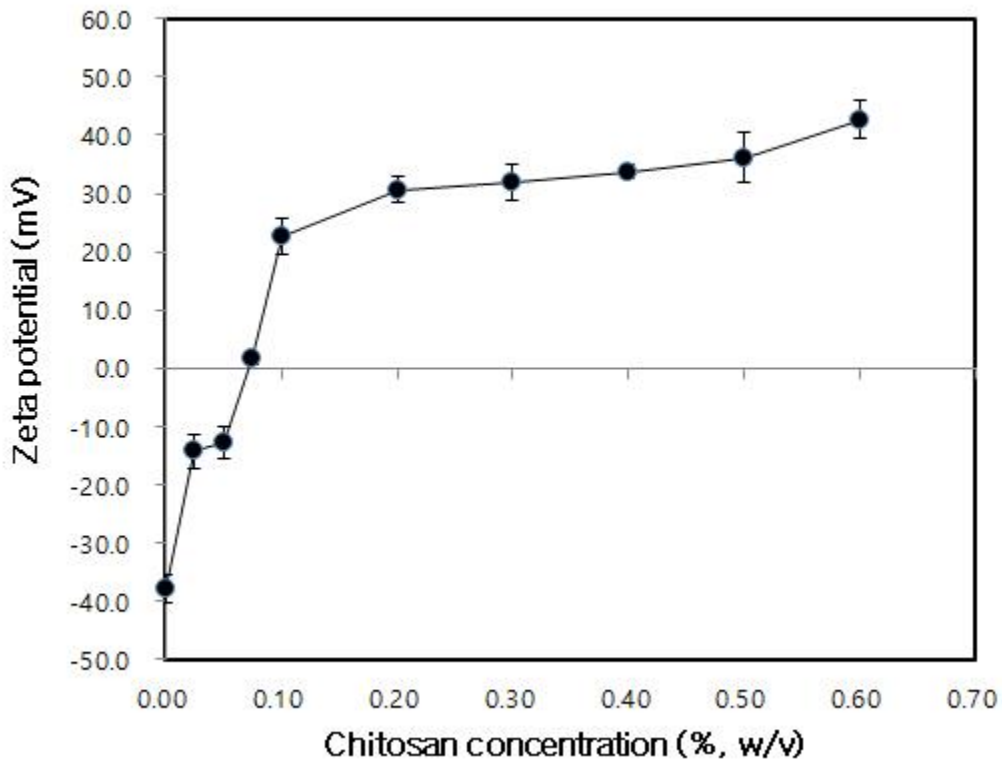


Fig 174. The influence of chitosan concentration on the average zeta potential of 3% (w/v) liposomes. Formulations were loaded with 10 mg/ml OPH. Particles were suspended in distilled water, pH ~ 7.1. The square bracket and the * indicate the change in particle zeta potential was not significantly different among adjacent readings. Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

④ 키토산 코팅 농도에 따른 오계 내장 OPH 캡슐화 효율(encapsulation efficiency) 변화

키토산 코팅 농도에 따른 오계 내장 OPH 캡슐화 효율에 대한 분석결과는 Fig. 175 에서 보여진다. 키토산 코팅 농도에 따른 오계 내장 OPH 캡슐화 효율은 키토산 코팅 농도가 0% 일 때 51.1% 였다가 키토산 코팅 농도가 0.025% 일 때 Encapsulation efficiencies이 27.8 %까지 급격히 감소한 다음 키토산 코팅 농도가 0.5% 까지 서서히 증가하는 결과를 보여주었다. 오계 내장 리포솜의 Encapsulation efficiencies 범위는 27.8% - 58.9% 로 최소값은 키토산 코팅 농도가 0.025% 일 때 24.8%이고, 최대값은 키토산 코팅의 농도가 0.5%일 때 54.1%로 나타났다. 키토산 농도에 따라 코팅이 된 나노 리포솜의 오계 내장 OPH 캡슐화 효율은 코팅 전보다 증가한 이유는 펩타이드들 리포솜의 음전하 및 키토산의 양전하에 의하여 이동의 차단효과가 높아졌기 때문으로 사료된다.

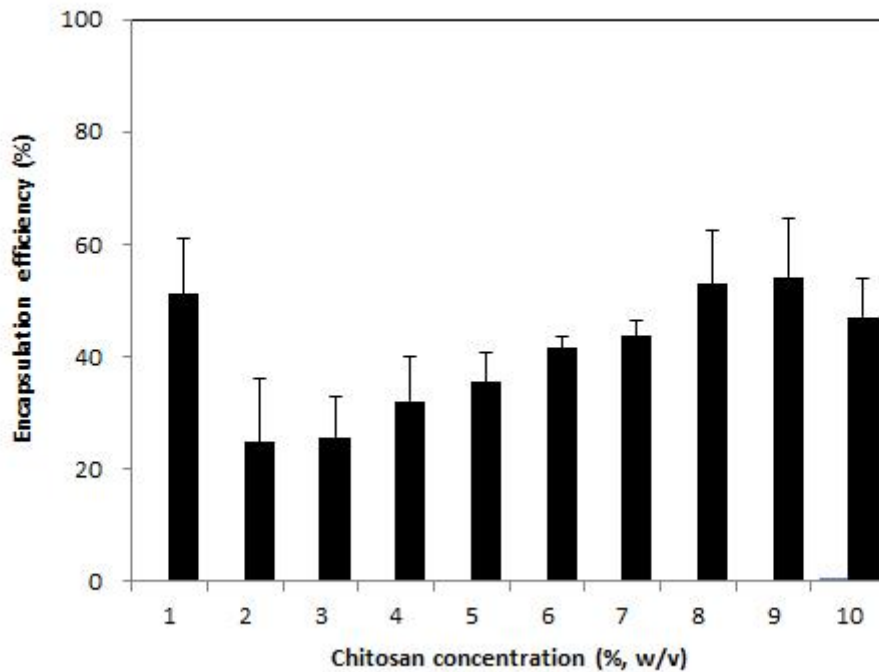


Fig 175. The influence of chitosan concentration on the encapsulation efficiency of 3% (w/v) liposomes. The square bracket and the * indicate the difference of encapsulation efficiencies was not significant among adjacent bracketed readings. Readings at lower CH levels were not included during ANOVA and Tukey's tests. Data are represented as the mean \pm SD (n = 3).

(나) 키토산 코팅 농도별 리포솜의 오계 내장 OPH 방출량

① SGF와 SIF 환경에서 키토산 농도가 다른 리포솜으로부터 오계 내장 OPH 방출량 비교

모의 위장 환경에서의 방출 실험은 키토산으로 0%, 0.3%, 0.6% (w/v)로 코팅된 오계 내장 OPH 리포솜으로 수행되었으며, 실험 시간은 표준 식사에 대한 위 배출 시간은 ~ 112 분이고, 소장에서의 평균 전이 시간은 약 2-4 시간이므로 방출 시험은 simulated gastric fluid (SGF) 에서 2 시간 동안 그리고 simulated intestinal fluid (SIF)에서 4 시간 동안 진행되었다. 키토산 코팅 나노 리포솜을 이용하여 연산 오계 내장 펩타이드를 캡슐화하여 섭취를 하였을 때 소화 기관을 통과하면서 예측되어지는 손실 연산 오계 내장 펩타이드의 양을 측정하는 것이다. SGF 에서 키토산 함량에 따른 오계 내장 OPH 방출률에 대한 분석결과는 Fig. 176-A 에서 보여진다. 키토산 함량이 0.3%와 0.6% 리포솜 방출량의 결과는 유사하게 나타났으며, 키토산이 코팅 되지 않은 리포솜의 경우 코팅된 리포솜 보다 방출량이 높게 나타났다. 4 시간 때 오계 내장 OPH의 방출량은 코팅되지 않은 리포솜의 경우 47.80 %에 가까웠지만, 0.3 % 및 0.6 % 키토산 코팅 함량을 갖는 리포솜의 오계 내장 OPH 방출량은 약 16.70 % 및 15.20 % 로 비슷한 값을 나타내었다. SIF에서 키토산 함량에 따른 오계 내장 OPH 방출률에 대한 분석결과는 Fig. 176-B 에서 보여진다. SIF의 오계 내장 OPH 방출량은 SGF의 비해 높게 나타났으며, 이는 SIF에서 오계 내장 리포솜은 SGF에서보다 안정적이지 못하다고 추측할 수 있다. 코팅 되지

많은 리포솜의 오계 내장 OPH 방출량은 4시간까지 급격히 상승하여 93.15 %에 이르렀고, 반면에 0.3 % 및 0.6 % 키토산 코팅 함량을 갖는 리포솜의 오계 내장 OPH 방출량은 약 38.9 % 및 38.8 % 로 비슷한 값을 나타내었다. 키토산 코팅층은 SIF보다 SGF에서 더 큰 보호 효과를 나타낸다고 볼 수 있다.

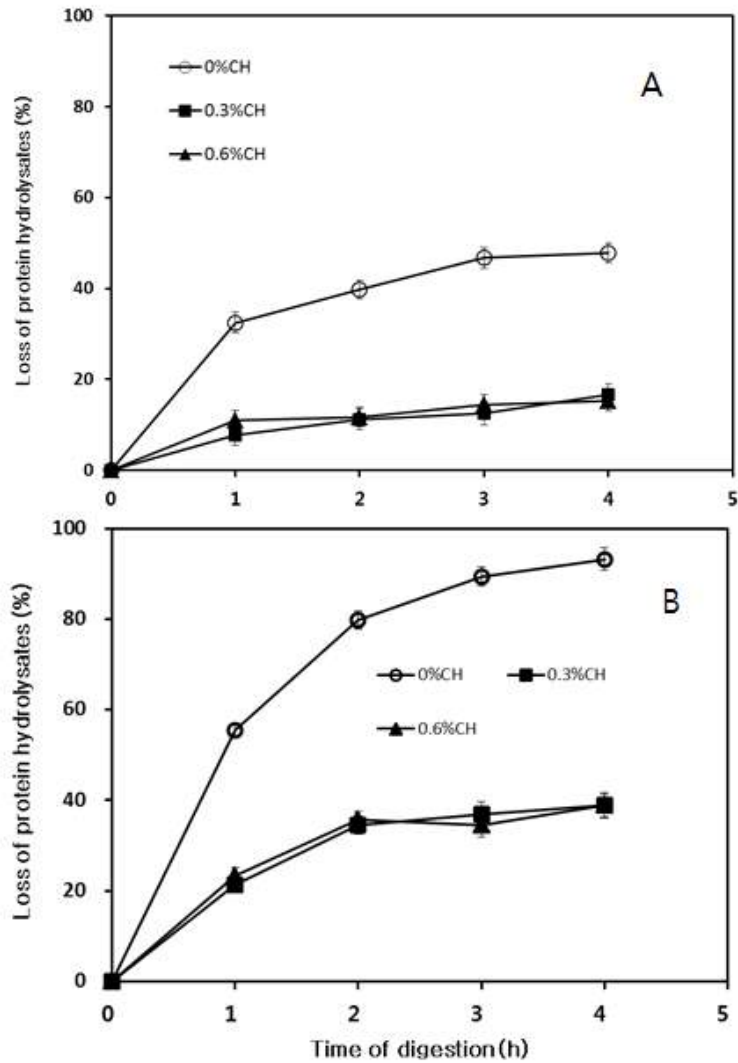


Fig 176. Release profile of 3% (w/v) liposomes with 0, 0.3, 0.6 and 1.0% (w/v) chitosan coatings in (A) simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2), and (B) simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8), 37°C. Values are presented as mean \pm SD (n=3).

(다) 키토산 코팅 리포솜 안정성 실험(키토산 0, 0.3, 0.6)

① 동결 전 후 키토산 코팅된 리포솜의 평균직경 및 오계 내장 OPH 손실 변화

키토산 코팅없이 동결된 리포솜의 평균직경 변화가 가장 크게 나온 것을 Fig. 177-A 에서 보여진다. 또한 키토산 코팅없이 동결된 캡슐화 된 오계 내장 OPH의 방출량이 75.0 % 로

Fig. 177-B에서 보여졌으며, 따라서 입자의 응집 현상을 예측할 수 있다. PDI 값이 증가함에 따라 응집 현상이 확인되며, 균질성의 감소한다. 동결하는 동안 안정성에 대한 키토산 코팅의 영향을 시험하기 위해 0.3 %와 0.6 % 키토산 농도로 실험을 수행하였다. 0.3 % 및 0.6 % 키토산으로 코팅 된 리포솜에 대해 캡슐화 된 오계 내장 펩타이드 가수분해물의 방출량은 21.50 % 및 20.9 %로 나타났으며, 따라서 높은 키토산 함량을 갖을수록 캡슐화 된 오계 내장 펩타이드 가수분해물의 방출량이 감소하였다.

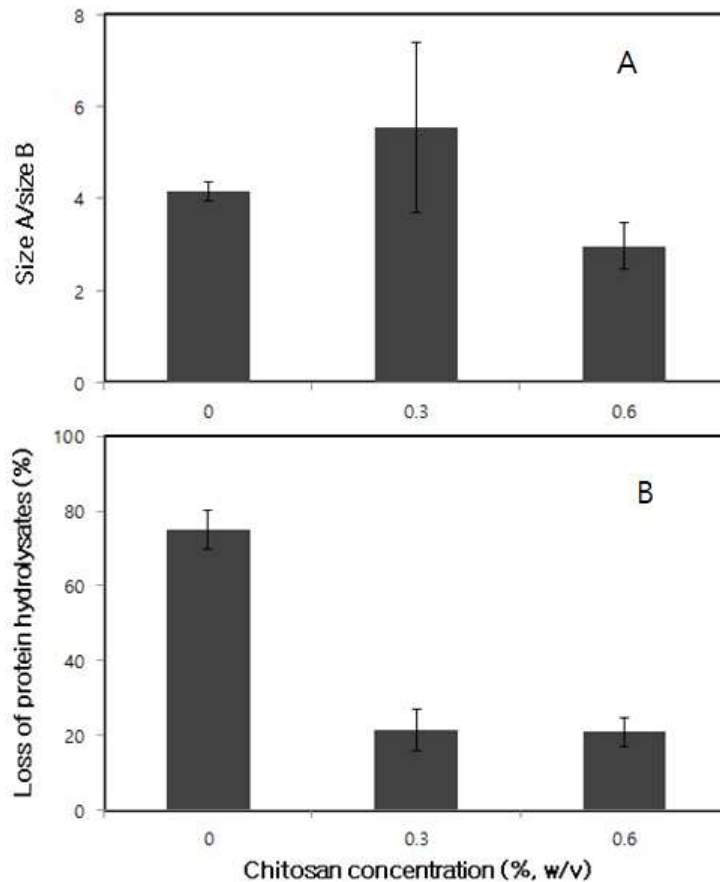


Fig 177. Relative particle size(A) and percent loss of encapsulated OPH(B) after freezing and thawing for chitosan coated and uncoated 3% (w/v) liposomes. Relative particle size was determined as the ratio of freeze thawed particle size to original size. * indicate the change in particle zeta potential was not significantly different among adjacent readings. Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

② 동결 건조 전 후 키토산 코팅된 리포솜의 평균직경 및 오계 내장 OPH 손실 변화

동결건조 전 후의 된 리포솜의 평균직경 변화는 Fig. 178-A 에서 보여진다. 키토산 코팅되지 않은 리포솜의 평균직경은 코팅 된 리포솜 보다 평균직경이 크게 나타났으며 이는 코팅된 리포솜은 코팅되지 않은 리포솜보다 많은 응집현상을 보여준다. 키토산 농도가 CH 농도가 0.3

% 및 0.6 % 일 때 리포솜의 평균직경의 변화는 서로 유의한 차이가 없었다. 또한 동결건조 전후 캡슐화 된 오게 내장 펩타이드 가수분해물의 방출량은 Fig. 178-B 에서 보여진다. 키토산 코팅 되지 않은 리포솜에 대한 캡슐화 된 오게 내장 펩타이드 가수분해물 방출액이 69.0%로 가장 큰 결과 값을 나타내었고, 동결 건조 후 0.3 % 및 0.6 % 키토산으로 코팅 된 리포솜에 대해 캡슐화 된 오게 내장 펩타이드 가수분해물의 방출량은 20.93 % 및 19.84 %로 나타났다. 따라서 0.3 % 및 0.6 % 키토산으로 코팅 된 리포솜 평균직경변화는 비슷하게 나타났다. 전체적으로, 키토산 코팅 된 리포솜은 코팅되지 않은 리포솜보다 적은 응집을 나타냈고, 동결 전후의 변화와 달리 키토산 0.3 %의 농도에서보다 키토산 0.6 % 농도 일 때 더 우수한 안정성을 나타내지 않았다. 결과적으로 키토산함량 보다는 키토산으로 코팅 하기 전과 후의 변화에서 키토산을 코팅할 때에 동결건조 후 리포솜의 손상을 보호하는 것으로 예측할 수 있다.

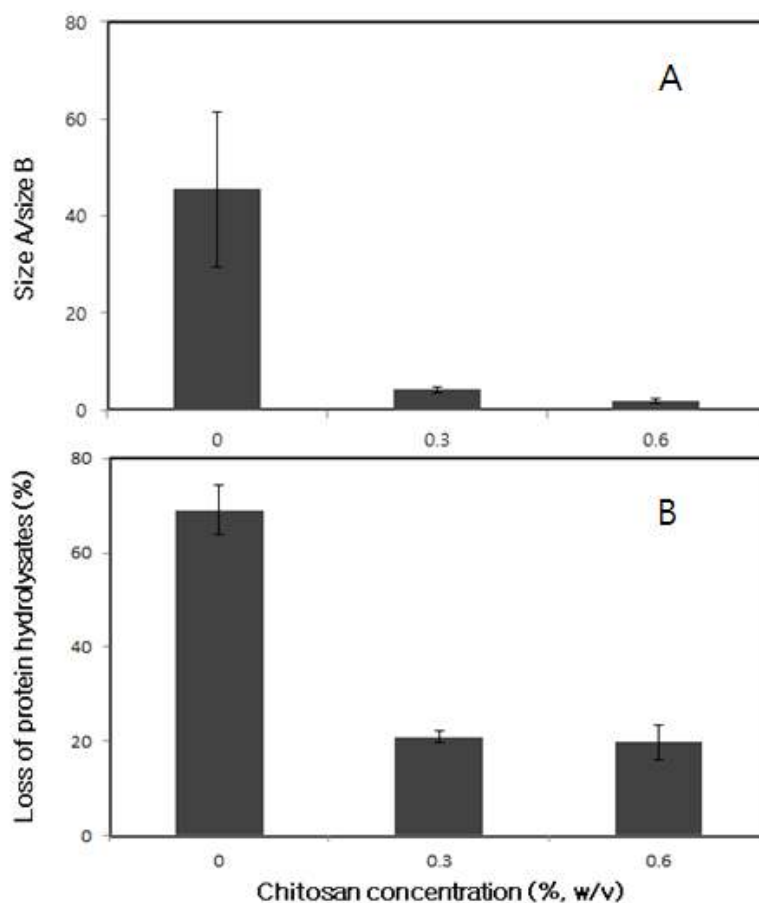


Fig 178. Relative particle size(A) and Percent loss of encapsulated OPH(B) after freeze-drying and rehydration for chitosan coated and uncoated 3% (w/v) liposomes. Relative particle size is the ratio of freeze-thawed particle size to original size. * indicates significantly different means ($p < 0.05$). Data are depicted as the mean \pm SD ($n \geq 3$).

(라) 4°C 와 20°C 에서 키토산 코팅 리포솜의 장기 보존시 평균직경 및 PDI 변화

키토산 코팅 나노 리포솜의 안정성은 리포솜 안에 캡슐화 된 펩타이드의 양과 리포솜 평균직경의 변화에 의하여 결정된다. 보존하는 동안 리포솜들의 융합(fusion)은 캡슐화된 펩타이드의 손실의 가장 큰 요인으로 보인다 키토산 코팅 나노 리포솜 과 코팅이 되지 않은 리포솜들의

장기간 보존시 최적 제형화된 리포솜의 평균직경과 펩타이드의 손실의 변화에 대하여 측정을 하였다. 일반적으로 보존에 사용하는 냉장온도인 5 °C 와 상온 온도인 25°C에서 수행을 하였다. 보존온도 5 °C에서 코팅이 되지 않은 리포솜의 평균직경은 Fig. 179-A에서 보여 진다. 보존기간에 따라 완만하게 증가함을 보여 주었다. 코팅 리포솜들은 보존 전의 평균직경에 비하여 거의 차이가 없었다. 따라서 보존온도 5 °C에서는 리포솜의 키토산 코팅의 상관성이 없이 평균직경의 변화를 주는 응집 현상 및 표면 제타 전하의 보존하는 기간 동안 차이가 적었다고 볼 수 있다. 0.3% 및 0.6% 키토산 코팅 리포솜들의 경우에 PDI 값의 변화도 의미 있는 차이가 없는 것은 이와 같은 결과를 설명한다. 보존온도 25 °C에서 코팅이 되지 않은 리포솜의 평균직경은 Fig. 179-B에서 보여진다. 보존기간에 따라 위의 결과처럼 완만하게 증가함을 보여 주었지만 처음 평균직경보다 약 3.6배 정도 증가를 하였다. 리포솜의 다분산지수(PDI) 값 또한 완만하게 증가함을 Table. 53. 에서 볼 수 있다. 코팅 리포솜들은 저장기간 동안 평균직경의 변화가 저온 저장에서보다 훨씬 크게 나타났다. 코팅 농도에 따라 차이가 있었지만 보존기간 일주일 후부터 급격히 평균직경이 증가를 하여 4 주 후에는 약 2,600 - 5,700 nm 으로 나타났다. 0.3% 및 0.6% 키토산 코팅 리포솜들의 경우에 코팅 양이 많은 경우에 응집 현상이 크게 나타났고 PDI 값은 보존 전보다 두 경우에 약간의 증가를 보여 주었는데 이러한 현상은 작은 평균직경의 리포솜들이 응집으로 응집된 리포솜들의 평균직경의 균질성(homogeneity)이 증가한 것으로 보인다. 위의 결과로부터 오계 내장 펩타이드의 전달 매체로서 리포솜의 제조 공정 및 제형화 개발에 키토산 코팅이 펩타이드의 손실을 완화시키는데 매우 효율적으로 판단이 된다. 또한 키토산 코팅 농도의 과도한 증가는 오히려 응집속도의 증가, 응집에 의한 리포솜 막의 붕괴 및 내부에 존재하는 펩타이드의 확산을 촉진시켜 펩타이드의 손실을 초래하는 것으로 나타났다.

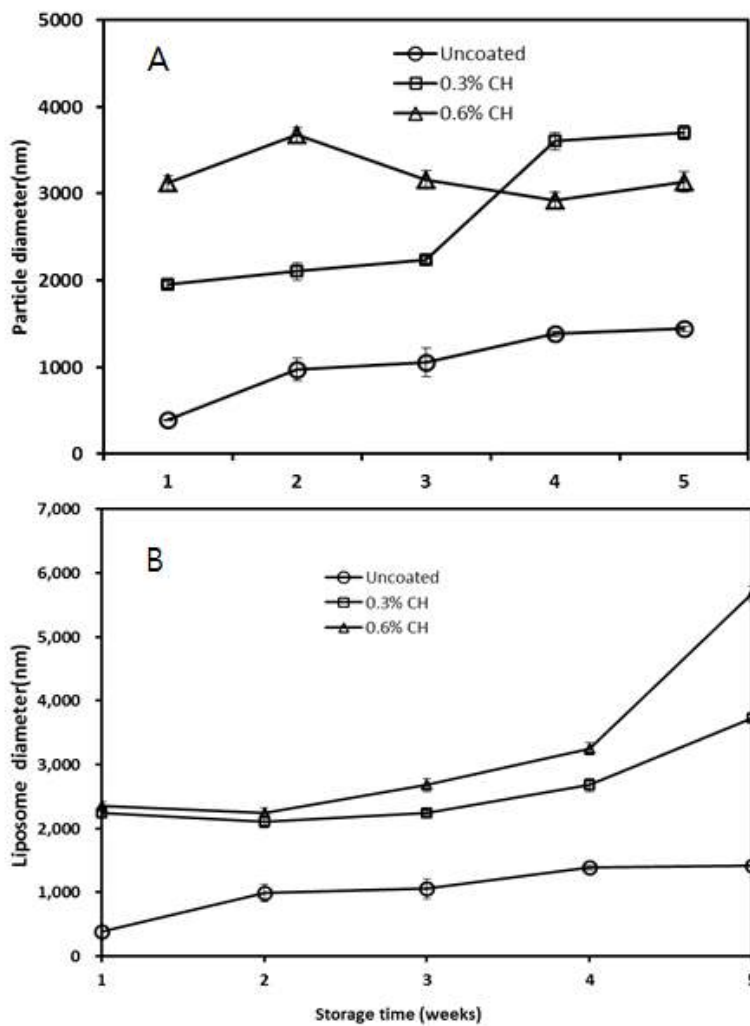


Fig 179. Comparison of Sizes of uncoated liposomes and 0.3 and 0.6% (W/V) chitosan coated liposomes stored at 25°C(A), 5°C(B). Data are depicted as the mean \pm SD ($n \geq 3$).

Table 53. Effect of concentration of chitosan coating layers on polydispersity index (PDI) of liposomes.

Chitosan coating concentration	Storage time	Storage temperature	
		4°C	20°C
w/v, %	week	PDI	PDI
0.0	0	0.312	0.278
	1	0.219	0.312
	2	0.345	0.681
	3	0.412	0.620
0.3	0	0.234	0.212
	1	0.226	0.135
	2	0.391	0.221
	3	0.264	0.285
0.6	0	0.321	0.238
	1	0.210	0.183
	2	0.303	0.139
	3	0.392	0.272

4. 연구 결론

가. 본 연구에서는 오계 부위별육, 란, 내장 및 부산물 육의 주성분인 단백질로부터 상업적인 효소를 이용하여 최적 효소를 선정하고 반응조건 연구를 통하여 최적 pH, 온도, 효소의 양을 확정하였다. 가수분해 최적 온도는 58°C, pH 7.5, 효소의 농도는 3% 이었다. 최적 조건에서 2 시간 효소 가수분해를 한 결과 75-80% 이었다. 유리 아미노산 총량은 168.131 mg/100 g 이었다. 분자량을 MALDI-TOF 으로 분석을 한 결과 90% 이상이 300-1,000 Da 분포를 보여주었다.

나. 고압기를 이용한 오계육 단백질 가수분해물을 생산 공정은 압력은 높을수록, 시간은 3시간 반응하였을 때, 기질의 농도는 20% 정도일 때가 최적 이었으며 최대 가수분해도가 34.10%이였다. 유리 아미노산은 총 344.805 mg/100 g 검출되었으며, 그리고 펩타이드 분자량 분포결과 대부분의 m/z 400에서 1,000 이하 분자량 분포를 보여 주었다.

다. 단백질 분해효소 종류에 따라 생산된 펩타이드의 기능성은 다르게 나타 났으며 DPPH 라 디칼 소거능 최대값은 bromelain(57.23%)에서 나타나고 bromelain에 의한 최대값은 DPPH 소 거능(IC50, 2.46 mg/ml)이었다.

라. 오계란 단백질 분해 효소에 의하여 생산된 가수분해물을 반복된 RF-HPLC, 이온교환수지, 젤 필터레이션 등 분리 정제 공정을 거쳐 성능을 보여주는 펩타이드의 서열은 AAGKDEAGAQQPPGPTGPAGERG를 확인하였다. 분자량은 2103.99 이었으며, 이 서열은 Ala-Ala-Gly-Lys-Gln-Glu-Ala-Gln-Pro-Pro-Gly-Pro-Thr-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Arg-Gly 이었다.

마. 오계육 단백질 가수분해물의 항산화능 펩타이드 아미노산 서열은 TAAEAETEAEAETSNTL를 나타냈다. 분자량은 1736.75 mV이었다. 이 서열은 Thr-Ala-Ala-Glu-Ala-Glu-Thr-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Thr-Ser-Asn-Leu-Thr 이었다.

바. 오계 펩타이드 캡슐화한 레시친 리포솜의 생체 이용율을 높이기 위해서 키토산 코팅을 한 결과 0.2% 이상의 키토산으로 코팅을 하는 경우 리포솜의 안정성을 보여주었다.

사. 제조 펩타이드 캡슐화 리포솜은 동결 및 동결건조에 크기의 변화로 응집현상이 있었지만 키토산 코팅 리포솜들은 안정하였다.

아. 제조 펩타이드 키토산 캡슐화 리포솜들은 0.2% 키토산 용액에서 약 70-80% 캡슐화 효율 을 보여주었으며 약 5°C 냉장온도에서 약 한달이상 안정성을 보여주었다.

자. 제조 펩타이드 키토산 캡슐화 리포솜들에 대한 위와 장에 대한 시뮬레이션 연구는 위에서 는 키토산 코팅 리포솜들은 안정하였다. 장에서도 약 60-70% 이상 안정성을 보여주었다.

제 2 절 연산오계의 약리 작용 탐색 및 기능성 소재를 이용한 생리 활성 평가와 개발된 기능성 소재에 대한 면역 증진, 항노화, 항산화 등의 전 임상 단계 효능 입증

1. 연구개발 배경

한의학에 대한 현대적인 탐구가 활발히 이루어지고 있는 오늘날에도 동의보감, 본초강목, 신농초본경 등의 고문헌은 임상, 교육, 연구 현장에서 중요한 텍스트로 활용되고 있다. 또한, 고문헌에 제시된 약재들은 일상생활에서 건강기능식품, 천연물, 식재료 등으로 쉽게 접할 수 있으나 아직까지도 과학적인 검증을 필요로 하는 소재들이 많은 실정이다.

연산 화악리의 오계 (連山 花岳里의 烏鷄, 이하 연산오계)라는 명칭으로 천연기념물 제265호에 지정되어 있는 연산오계는 외형뿐만 아니라 뼈까지 검은 우리나라의 전형적인 재래닭으로써 털은 흰 반면 뼈가 검은 일본의 천연기념물인 오골계와는 차이가 있다. 동의보감 금수편에는 “骨必黑, 乃眞烏鷄也”라 하여 오계와 오골계의 차이를 뒷받침 해주고 있다.

烏鷄는 《東醫寶鑑 湯液編》에 烏雄鷄肉이라 하여 “性微溫, 無毒. 主心病肚病, 除心腹惡氣, 及風濕癱痺. 補虛羸, 安胎. 治折傷, 并癰疽”라고 기재되어 있으며, 《東醫寶鑑 雜病編》에서는 “治中風語澁, 及風寒濕痺”로 기재되어 있어 오계가 다양한 효능이 있음을 나타내고 있다.

이미 해외에서는 오골계의 생리활성에 대한 효능 검증을 통해 천연물 신약개발에 연구를 활발히 진행하고 있으며, 새로운 항산화물질이 다량 함유된 슈퍼푸드(superfood)로 각광받고 있어 다양한 음식과 건강기능식품 등의 제품개발을 통한 상품화가 시도되었다.

반면 連山烏鷄는 단백질이 풍부한 식품으로 알려져, 허약자를 위한 건강식으로 주로 탕으로써 이용되어 지고 있으나, 사육의 어려움, 저수익성으로 인해 수요가 많지 않고 연산오계에 대한 다양한 연구가 이루어지지 않아 식·의약품으로써의 기능성 소재화에 대한 제품 개발은 매우 미비한 실정이다.

본 시료에 대한 국내 연구로는 채현석 등이 오골계와 십전대보탕의 증탕액이 흰쥐의 혈중 호르몬, cytokine 및 특이항체에 미치는 영향을 연구하였으나, 연산오계 자체로만 진행된 연구는 이루어지지 않았다.

이에 본 연구에서는 《東醫寶鑑》에 수재된 補虛羸, 安胎 등 일종의 補劑에 해당되는 치료법과 더불어 癰疽, 寒濕痺, 折傷, 中風 등의 다양한 증상을 치료하는 治療劑으로써 兩價 효능에 착안하여 이와 같은 질환의 공통적인 병리적 인자로 인식되고 있는 항산화, 항염증, 면역조절 작용 등의 생리활성 연구를 통해 고부가가치 식품으로써의 가능성을 확보하고자 하였다.

대식세포는 외부에서 이물질이나 바이러스, 병원 미생물 등이 침입할 경우, 생체 방어를 보다 효과적으로 수행하기 위해 반응성이 높은 독성 물질인 활성산소(ROS)를 생산하게 된다. 즉, 활성산소의 제 1의 기능은 살균작용과 세포 상해작용이라 할 수 있다. 그러나 이러한 활성산소는 정상세포에 작용하면 심혈관계 질환, 암 등을 유발하고 피부 세포 및 조직 손상을 주도한다. 이들은 항산화효소와 비효소적 항산화제들로 구성된 피부 항산화 방어망을 파괴함으로써 멜라닌 생성반응 촉진, DNA산화와 같은 생체 구성 성분들의 손상을 준다. 이로 인해 피부에 염증을 유발시키고, 피부면역기능을 억제시켜 탄력감소, 주름살 및 기미, 주근깨 등으로 피부 노화가 가속화된다. 따라서 항산화에 대한 우수한 효과는 산화적 손상이 노화를

비롯하여 암, 심혈관계 질환 유발에 기본적인 병리인자라는 점에서 오계가 항산화 식품으로써 활용될 수 있을 가능성을 확보하고자 하며, 실제로 오계를 활용하여 다양한 건강식품들이 개발된 예는 이를 증명해주고 있다. 아울러 오계의 항산화 효능에 대한 객관적인 효능 결과확보는 본 연구의 목적 중 하나인 노인 허약자 및 암환자의 식이를 개발하는데 있어 기초적 자료를 제공할 수 있다.

현대인들은 산업화 및 서구화에 따른 생활환경의 변화로 인해 환경오염물질의 노출과 스트레스, 인스턴트 및 포화지방산이 함유된 식품 섭취 등으로 면역기능이 저하됨에 따라 아토피피부염, 천식, 알러지, 류마티스 관절염 등 다양한 면역 질환에 대한 관심이 높아지고 있다. 이로 인해 다양한 음식과 건강기능성 식품, 한약 등을 통해 면역력 증강을 도모하고자 많은 노력을 하고 있는 실정이다.

면역(immunity)의 기본적인 기능은 내부 및 외부 병원성 물질로부터 인체를 보호하기 위해 다양한 세포로 구성된 방어 체계를 통해 이상 세포를 감시하고 제거하는 것으로 염증반응은 생체를 방어하기 위해 가장 먼저 일어나는 선천성 면역(innate immunity) 반응으로 알려져 있다. 염증반응은 미생물의 산물인 lipopolysaccharide(LPS)나 박테리아 DNA, 바이러스 등의 자극에 의해 대식세포(macrophage)가 활성화되어 생성된 염증매개물질인 사이토카인(cytokine), 산화질소(nitric oxide, NO), 활성산소(Reactive oxygen species, ROS) 등을 생성하여 이들에 의해 활성화된 백혈구와 대식세포에 의해 이물질을 제거한 후 조직재생을 통해 종료된다. 이러한 염증반응은 생체 방어에 있어 필수적인 반응이지만, 과도한 염증반응은 폐혈성 쇼크, 면역과민반응으로 발전될 수 있으므로 생명현상 유지를 위해 매우 중요한 면역 반응이라고 할 수 있다. 인체 면역계는 크게 면역을 억제, 조절하는 면역관용(tolerance)과 면역을 증진하는 면역반응(immunity)로 구성되어 면역 세포마다 지니고 있는 특이적 기능 및 세포간의 상호교류를 통해 이루어진다. 이러한 면역계가 한쪽으로 치우치는 불균형이 발생하여 면역관용이 강해지면 암 또는 바이러스 질환을 발생시키며, 이와 반대로 면역 반응이 강해지면 자가 면역질환, 알러지성 질환과 같은 염증성 질환을 초래하게 된다.

염증성 질환의 근원적 발병 원인은 과도한 면역반응으로 인해 Th1/Th2 type immune response의 항상성의 균형이 깨져 발생하게 되는데, Th1 cell의 경우 특이적으로 IFN- γ , TNF와 같은 사이토카인과 macrophage를 활성화 시키고 B cell을 자극하여 면역글로블린과 같은 항체를 특이적으로 생산한다. 즉, Th1 cell은 pro-inflammatory 혹은 cell-mediated immune response를 담당한다. 급성 염증은 이와 같은 Th1 cell로 인해 Th1 type immune response(IFN- γ , TNF 등)가 증가하여 Th2 type immune response(IL-4, IL-5, IL-13)를 감소시켜 다발성경화증(multiple sclerosis), 제 1형 당뇨(type 1 diabetes), 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease) 등의 질환으로 발전될 수 있으므로 면역력 증강을 통해 신체의 방어능력을 높이는 것은 최선의 질병 예방책이라 할 수 있다. 또한, 염증반응을 야기시키고 B세포의 분화 및 항체생산을 증가시키는 IL-1 β 와 IL-6은 대식세포가 생산하는 대표적인 염증성 사이토카인으로 알려져 있다. 또한 인체에서 면역세포는 탐식 작용, 항원제시, 항체 생산, 이상세포 살해 등의 기능을 수행하게 된다. 면역세포 중 급성염증반응에서 주역을 담당하며, 세균의 살균 작용을 하는 호중구와 기생충을 방어하는 호산구, 염증 반응에 관여하는 호염기구 등으로 구성된 과립구는 혈관에서 조직으로 빠져나와 인체에 침투한 세균이나 바이러스, 이물질에 대해 세균감염방어에 있어 최우선적으로 활동을 하게 된다. 이후,

단핵구가 혈액을 순환하다 조직으로 이동하면 대식 세포로 분화하여 염증 유발 물질을 제거하고 체액면역을 담당하는 림프구는 대식세포의 탐식과 파괴 과정을 항진시킨다. 이와 같은 면역 세포와 기전을 담당하는 것이 백혈구이다. 즉, 면역 반응은 백혈구가 침입한 병원체를 포식하고 면역 세포들을 분비하여 염증반응과 작동세포들의 소환 및 활성화를 유도하게 되는 것이다. 이에 따라 오계가 면역력 개선을 시킬 수 있는 건강기능성 식품 소재로써 활용될 수 있는 가능성을 확인하고자 하였다.

현대사회는 의학 기술의 발달과 생활수준의 향상으로 평균수명이 연장되어 노인인구의 비율이 날로 증가하고 있다. 국가통계포털 자료에 의하면, 65세 이상 인구수는 2010년 약 542만 명에서 2015년 약 656만 명으로 증가하였으며, 이와 같은 통계자료는 앞으로 고령화 사회가 빠르게 진행되어 노인성 질환에 대한 문제가 더욱 심각해질 것이라는 전망을 뒷받침하고 있다. 단편적인 예로 대표적인 노인성 질환이라 할 수 있는 골관절염 (Osteoarthritis)에 대한 진료인원은 2011년 약 336만 명에서 2015년 약 376만 명, 총 진료비는 2011년 9,468억 원에서 2015년 11,632억 원으로 점차 증가되고 있음이 보고되었다.

골관절염은 유전, 연령, 과체중, 관절 외상 등 다양한 원인으로 발생한다고 알려져 있으나, 아직까지도 정확한 원인이 밝혀지지 않아 연골 및 관절 기능 저하로 인한 관절운동 범위 제한과 함께 종창, 통증 등의 증상을 호소하는 환자가 많은 실정이다.

현재 골관절염의 치료를 살펴보면, 약물치료 (소염진통제, 연골 보호제, 비스테로이드성 항염증제 등)과 비약물 치료 (인공관절 치환술)가 주를 이루고 있으나, 약물치료의 경우는 장기간 복용 시 위장관, 심혈관 등의 부작용에 대한 우려가 있고 비약물 치료는 염증 또는 재수술 등의 문제점으로 인해 많은 사람들이 골관절염을 미연에 방지하고자 인대, 건, 근육 등을 튼튼하게 해주는 한약이나 건강보조식품을 활용하고 있는 실정이다.

골관절염은 주로 고관절, 손가락, 무릎 등 장기간 지속적인 사용을 하는 관절 부위에 발생하며, 연골뿐만 아니라 인대, 근육, 활액 등 관절을 구성하는 요소들로 인해 더욱 심화되어 심한 통증을 수반한 채 관절의 운동범위를 제한하게 된다. 이와 같은 골관절염은 특정 연령대에서 발생하는 대표적인 퇴행성 질환으로 인식 되었으나, 현재는 사회적인 손실을 가져다주는 관절의 만성 질환으로 인식되고 있다. 이로 인해 효과적인 골관절염 치료에 대한 관심이 사회적으로 고조되고 있어 관절염을 미리 예방하고 치료 할 수 있는 안전하고 효과적인 약물 확보에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

골관절염은 관절연골의 소실 및 골 파괴 증상을 동반하게 되는데 단백질 분해효소로 알려진 matrix metalloproteinase (MMP)-2, 9은 생체에서 관절주변의 콜라겐 파괴로 인해 proteoglycan을 감소시킴에 따라 연골의 변화와 마모로 인해 제 2교원질 조각인 Collagen type II (CTX II)와 같은 세포 외 기질의 농도가 혈액에서 증가하게 된다. 이와 같은 원인으로 골 손실이 지속되면 연골에 포함된 단백질 성분이 떨어져나가 혈액 내에서 순환하게 되어 혈액 내 COMP 생성량이 증가한다. 특히, 연골 마모 정도를 측정하는 지표로 알려진 CTX II의 농도의 증가는 무릎에서는 6배, 고관절에서는 8배 이상의 골관절염이 빠르게 진행된다는 연구결과가 있어, 관절염 발생에 대한 지표로써 중요하다고 할 수 있다. 이처럼 골관절염을 악화시키는 요인이 있는 반면 골 형성에 도움을 주는 골 대사 지표들 중 대표적인 calcitonin과 glycosaminoglycan 등의 지표 역시 중요하다. Calcitonin은 칼슘의 손실을 예방하고 치료하는

호르몬으로써 갑상선에서 분비되어 혈중 칼슘을 뼈로 유입하는 작용을 하며, glycosaminoglycan은 관절 연골의 주요 성분인 proteoglycan을 형성하고 관절연골에 탄력성을 제공한다. 이와 같은 혈액 인자를 통해 골 파괴 및 강화 등의 골 대사 인자의 검사 결과는 전 임상 단계에서 뒷발 부하 측정결과와 더불어 micro-CT 및 조직병리 검사 등을 통해 증명함으로써 연산오계의 활용성을 높이고 고부가가치 식품의 소재로서의 가능성과 그 효능에 대해 다양한 평가 결과를 과학적으로 입증하여 면역 및 항노화, 항산화 기능을 가진 제품으로써의 활용 가치를 높이고자 하였다.

2. 연구 내용 및 방법

가. 재료

(1) 세포

본 연구에 사용된 RAW 264.7 세포와 Human osteoblast-like MG-63는 서울대학교 한국 세포주 은행 (KCLB : Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다.

(2) 시료

본 연구에 사용한 연산오계(Yeonsan Ogye 이하, YO로 표기)는 1년산 수탉, 3년산 수탉과 암탉을 지산농원(Chungnam, Korea)에서 구입하였고, 대전대학교 TBRC-RIC에서 정선 후 사용 하였다.

(3) 시약 및 기기

본 연구에 사용된 시약은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : Gibco BRL Co., U.S.A.), RPMI-1640 (Welgene Co., Korea), 우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), cell viability assay kit (Daeillab sevice, Korea), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), nitric oxide detection kit (Intron Biotechnology, Korea), (2,7)-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA : Sigma Co., U.S.A.), mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.), 1,1 - diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH : Sigma Co., U.S.A.), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS : Sigma Co., U.S.A.), Whatman filter paper No. 3 (Whatman Co., UK), β -glycerol phosphate (Sigma Co., U.S.A.), Ascorbic Acid (Sigma Co., U.S.A.), dimethyl sulfoxide (DMSO : Sigma Co., U.S.A.), Alizarin red (Sigma Co., U.S.A.), naphthol AS-BI phosphate (Sigma Co., U.S.A.), fast garnet GBC (Sigma Co., U.S.A.), agarose (FMC Co., U.S.A.), total RNA prep kit (Intronbio., Korea), Monosodium iodoacetate (MIA ; Sigma Co., U.S.A.), Rat COMP ELISA kit (MyBioSource Co., U.S.A.), LTB₄ Parameter Assay Kit (R&D systems Co., U.S.A.), Rat MMP-2 (Matrix Metalloproteinase 2) ELISA Kit (Elabscience, U.S.A.), Rat MMP-9 (Matrix

Metalloproteinase 9/Gelatinase B) ELISA Kit (Elabscience, U.S.A.), Rat TIMP-1 (Tissue Inhibitors of Metalloproteinase 1) ELISA Kit (Elabscience, U.S.A.), Rat CTXII (Cross Linked C-telopeptide of Type II Collagen) ELISA Kit (Elabscience, U.S.A.), Rat glycosamionglycan ELISA Kit (MyBioSource Co., U.S.A.), Rat calcitonin ELISA Kit (MyBioSource Co., U.S.A.), Rat aggrecan ELISA Kit (MyBioSource Co., U.S.A.), Rat cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.) 등을 사용하였으며, 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo Co., Japan), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), centrifuge (Sigma Co., U.S.A.), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-Line Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), 유세포 분석기 (Flow cytometer, Becton Dickinson, Co., U.S.A.), 환류 추출기(Mtops, Korea), 동결 건조기(IIShinBioBase, Korea), 가열교반기(DAIHAN scientific Co., Korea), Luminex (Millipore Co., U.S.A.), thermocycler system (MWG Biotech Co., Germany), Fusion-SL (Vilber Lourmat., Germany), incapitance test meter (IITC Life Science Co., U.S.A), optical microscope (Carl ZEISS Co., Germany) 등을 사용하였다.

나. 방법

(1) 시료 제조

YO를 뼈, 살, 껍질로 분리하여 각 30 g에 물 500 ml을 넣고 3시간 동안 환류추출 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축 하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 1년산 수탉의 뼈는 3.7 g, 살은 1.6 g, 껍질은 4.9 g의 분말을 얻었으며, 3년산 암탉의 뼈는 4.2 g, 살은 0.5 g, 껍질은 3.2 g의 분말을 얻었다. 또한, 3년산 수탉의 뼈는 2.9 g, 살은 2.2 g, 껍질은 1.8 g의 분말을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80℃)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

YO의 펩타이드 추출 공정은 YO를 가슴살, 다리살, 날개살로 분리하여 각 120 g에 0.1M Phosphate Buffer pH6 800 ml과 Enzyme 3%를 넣고 교반기를 이용하여 온도 50℃에서 4시간동안 반응시켰다. 반응시킨 용액 800 ml에 0.3 M TCA(Trichloroacetic acid)를 1600 ml을 넣고 상온에서 침지시켰다. 그 후, 용액의 상청액만을 여과하여 pH 7이 되게끔 보정 후 동결 건조하여 1년산 수탉의 가슴살은 4.4 g, 다리살은 3.2 g의 분말을 얻었으며, 3년산 암탉의 가슴살은 4.2 g, 다리살은 4.6 g, 날개살은 4.0 g의 분말을 얻었다. 또한, 3년산 수탉의 가슴살은 3.2 g, 다리살은 3.9 g, 날개살은 4.2 g의 분말을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80℃)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

연산오계 란과 내장, 육 각각 1 kg을 반응기에 넣고 증류수 10 l와 bromelain BR 1200 3%를 혼합한 후 반응기 (50℃, 100 rpm)에서 4시간 동안 반응시켰다. 이후, 불활성화를 위하여 100℃에서 30분 동안 가열하고 연산오계 란과 내장, 육 펩타이드 시료를 3,000 rpm, 10분 동안 원심분리하여 상등액을 수거하였으며 수거된 상등액은 초저온냉동고 (-80℃)에서 동결 후 동결 건조하여 분말화하였다. 얻어진 분말은 냉동고에 보관하며 필요한 농도로 3차 증류수에

회석하여 사용하였다.

쌍화탕(백작약 50 g, 감초 30 g, 숙지황, 황기, 당귀, 천궁, 생강 각 20 g, 계피, 대조 각 15 g 이하, SHT)은 2.1 ℓ의 물을 넣고 2시간동안 환류추출 후 필터로 여과하여 여과액을 얻은 후 식품첨가물 (올리고당 10 g, 탄산나트륨 0.2 g, 구연산 0.16 g, 솔비톨 0.11 g, 비타민C 0.07 g, 젖산칼륨 0.05 g, 구연산나트륨 0.04 g, 말산 0.04 g, 인산칼륨 0.03 g)을 섞어 냉장보관 하였다.

경옥고(생지황 960 g, 꿀 640 g, 백복령 180 g, 인삼 90 g 이하, KOG)는 생지황은 즙을 내고 인삼과 백복령은 가루를 내어 사용하며, 벌꿀은 정제하여 준비하고 네 가지를 모두 섞어 92 °C에서 72시간 동안 증탕하고 만들어진 KOG 300 g에 증류수 1.5 ℓ를 넣어 혼합한 후 냉장보관 하였다. 이 후, SHT와 KOG를 용매로 사용하여 연산오계 펩타이드를 용해시켜 시료를 조제하였다.

(2) 세포 배양

(가) RAW 264.7

동결된 RAW 264.7 세포를 50 ml 튜브에 옮기고 PBS 9 ml을 넣어 세포를 부유시킨 뒤 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상청액을 제거하였다. 세포가 있는 튜브에 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin으로 조성된 DMEM 배지 1 ml을 넣어 부유시켰다. 100 mm dish에 9 ml의 배지를 넣고, 세포를 부유시켜 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상으로 하였고, 시료들을 처리하기 전에 24시간을 적응시켰다.

(나) 조골 세포 배양

Human osteoblast-like MG-63 세포를 RPMI 배지에 10%의 FBS와 1%의 penicillin 및 streptomycin을 첨가하여 37°C의 CO₂ 배양기에서 2~3일 마다 계대배양하고, 분화유도를 위해 10mM β-glycerol phosphate와 50 mg/ml의 Ascorbic Acid를 첨가하여 분화유도 배지로 사용하였으며, 3일마다 배지를 교환하였다.

(3) 세포독성 측정

(가) RAW 264.7

RAW 264.7 세포는 배양한 cell을 0.4% trypan blue를 사용하여 계수한 후 96 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 실험을 하기 전에 새로운 배양액으로 교체하였고, 연산오계 추출물을 각각 필요한 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μl의 WST solution을 첨가하여 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

(나) 조골세포

조골세포는 96 well plate에 배양한 cell을 0.4% trypan blue를 사용하여 계수한 후 5×10^4 cells/well로 조정하여 분주한 다음 24시간동안 37°C의 CO₂ 배양기에서 배양 하였다. 그리고 배지에(250, 500, 1000 µg/ml)의 농도로 조절한 시료를 분주하고 24시간 배양 후 MTT시약 5 mg/ml을 분주한 다음 4시간 더 배양 후 배양액을 제거하고 침전물을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시켜 microplate reader로 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) 항산화 효능 측정

(가) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능 측정

자유라디칼 소거 활성 시험은 안정한 자유라디칼 DPPH를 사용하는 방법이다. 연산오게 추출물은 최종 농도가 필요한 농도가 될 수 있게 희석시켰으며, 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 µl와 연산오게 추출물을 각각 필요한 농도로 100 µl씩 혼합하여 37°C에서 30분간 반응 시켰다. 반응 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료액의 대조군은 증류수를 넣었으며, DPPH 용액의 대조군으로써는 에탄올을 넣어 보정값을 얻었다. DPPH 자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율 (\%)} = \left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

(나) 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical 소거능 측정

ABTS assay 방법은 기존에 보고된 방법을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다. 연산오게 추출물은 최종 농도가 필요한 농도가 될 수 있게 희석시켰으며, ABTS 용액은 7.4 mM ABTS (2,2 - azino - bis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))와 2.6 mM potassium persulphate를 제조한 후, 암소에 하루 동안 방치하여 양이온 (ABTS·+)을 형성시킨 다음 734 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 1.5 이하가 나오도록 희석하고, 희석된 ABTS·+ 용액 150 µl와 연산오게 추출물을 각각 5 µl 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 증류수를 대조군으로 하여 대조군에 대한 ABTS 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다.

$$\text{소거율 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{(시료 첨가군의 흡광도)}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

(다) 세포내 ROS (Reactive oxygen species) 생성 측정

세포 내 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하였다. 12 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×10^5 cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, 연산오게 추출물을 각각 필요한 농도와 LPS를 1 µg/ml의 농도로 처리한 후, 다시 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 모은 세포를

차가운 PBS로 2회 세척하고, DCF-DA은 10 μM 이 되도록 첨가하여 15분 동안 암소, 상온에 두었다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 한 다음 상청액을 제거하고 다시 PBS 400 μl 를 부유시켜 유세포 분석기를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

(5) 항염증 효능 측정

(가) Nitric oxide (NO) 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitric oxide 농도를 griess reagent system을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고 연산오계 추출물을 각각 필요한 농도와 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer 50 μl 를 각 well에 처리하여 10분간 상온에서 반응 한 후, N2 buffer 50 μl 를 각 well에 처리하고 10분간 반응시켰다. 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

(나) 사이토카인 생성량 측정

세포 내에서 염증성 사이토카인을 측정하기 위하여 12 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×10^5 cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고, 연산오계 추출물을 각각 필요한 농도와 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 원심분리 후 상청액으로 IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 Luminex를 이용하여 다음과 같이 측정하였다.

96 well plate에 standard, control, 2배 희석한 샘플을 25 μl 씩 분주하고 assay buffer 및 antibody-immobilized beads를 각 25 μl 씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 실온에서 반응시키고 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 이를 다시 25 μl 의 detection antibody을 가하여 1시간 동안 실온에서 빛을 차단한 채 반응시키고 추가로 25 μl 의 Streptavidin-Phycoerythrin을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 후 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후 PBS를 150 μl 넣고 5분 간 shaking한 후 Luminex를 이용하여 측정하였다.

(6) 면역활성 효능 측정

세포 내에서 면역활성 사이토카인을 측정하기 위하여 12 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×10^5 cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고, 연산오계 추출물을 각각 필요한 농도로 처리 후 24시간 동안 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 원심분리 후 상청액으로 IL-6, TNF- α 는 Luminex를 이용하여 다음과 같이 측정하였다.

96 well plate에 standard, control, 2배 희석한 샘플을 25 μl 씩 분주하고 assay buffer 및

antibody-immobilized beads를 각 25 μl 씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 실온에서 반응시키고 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 이를 다시 25 μl 의 detection antibody을 가하여 1시간 동안 실온에서 빛을 차단한 채 반응시키고 추가로 25 μl 의 Streptavidin-Phycoerythrin을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 후 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후 PBS를 150 μl 넣고 5분 간 shaking한 후 Luminex를 이용하여 측정하였다.

(7) 골 형성 효능 측정

(가) Alkaline phosphatase (ALP) 활성

배양된 MG-63 cell을 5×10^4 cells/ml로 조정하여 96 well plate에 분주한 다음 24시간 후 분화유도배지로 교환하고 농도별로 시료처리를 하였다. 4일동안 배양한 뒤 배양액을 제거하고 증류수로 세척한 다음 0.1% Triton X-100을 20 μl 씩 첨가하여 37°C에서 30분간 lysis하였다. lysis된 cell의 상층액에 0.1N glycine과 100 mM의 p-nitrophenylphosphate (p-NPP)를 첨가한 뒤 37°C 배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.1N NaOH을 넣어 반응을 정지시킨 다음, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나) 골 석회화 형성도 측정

배양한 MG-63 cell을 5×10^4 cells/ml로 조정하여 96 well plate에 배양한 후 석회화 유도를 위해 분화유도 배지와 추출물을 농도별로 첨가하여 3일마다 배지를 갈아주며 14일동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 증류수로 세척한 뒤 fixative solution (citrate solution + acetone + formaldehyde)으로 1시간 고정 시켰다. Alizarin red solution은 Alizarin red를 증류수에 녹여 40 mM로 농도를 맞추고 pH 4.2로 조정하였다, 고정된 cell에 AR solution으로 실온에서 10분간 염색하고 증류수로 5번 세척한 뒤 PBS를 가하고 15분간 방치하였다. PBS를 제거한 뒤 현미경으로 석회화 형성 정도를 관찰하고 10% cetylpyridinium chloride를 첨가한 10 mM sodium phosphate (pH 7.0) 용액을 200 μl /well로 첨가하여 15분간 녹이고 얻은 흡광도를 570 nm에서 측정하였다. 골 석회화 형성능은 대조군의 흡광도를 기준으로 계산하였다.

(다) 파골세포의 TRAP(tartrate resistant acid phosphatase) 활성과 염색

RAW 264.7 cell을 5×10^4 cells/ml로 조정하여 96 well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 DMEM 배지에 분화인자인 receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 50 ng/ml, 10 μM PD98059와 시료를 농도별로 처리하여 4일간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 fixative solution (citrate solution + acetone + formaldehyde)으로 세포를 고정하였고 기질용액으로는 1.36 mg/ml 4-nitrophenyl phosphate disodium salt, 10 mM tartrate를 포함하는 50 mM citrate buffer (pH 4.6)를 제조하여 고정한 세포에 분주하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 반응 후 효소 반응액을 0.1N NaOH로 반응을 중지시키고 ELISA reader로 405nm에서 흡광도를 측정하였다. TRAP 활성은 시료의 흡광도를

대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

TRAP 염색은 기질로 50 mM tartrate acid를 포함하는 50 mM sodium acetate buffer에 naphthol AS-BI phosphate를 사용하였고, 염색제로는 fast garnet GBC 용액을 사용하여 37°C에서 30분간 염색 후 현미경으로 관찰하였다.

(8) 동물 및 사료

본 실험을 위하여 사용된 BALB/c mouse (5주령, 수컷, 20~27 g)는 (주)샘타코 (Korea)에서, SD-Rat (6주령, 수컷, 170~200 g)는 (주)라운바이오 (Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 1주간의 안정기를 가지면서 순화를 시켰으며, 안정기 및 실험기간에 모든 실험군에는 일반 사료 (ENVIGO., U.S.A.)를 자유식이 하며 물을 충분히 공급하였다. 1주간의 안정기 이후 6주령부터 동물 실험을 진행하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2°C, 1일 중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 본 실험은 대전대 동물실험윤리 위원회의 승인 (승인번호 DJUARB2016-020)을 받아 동물윤리준칙에 의거하여 실험하였다.

(9) 급성 염증 유발 및 시료 처리

5주령의 BALB/c 생쥐를 1주간 안정기를 거친 뒤 6주령이 된 생쥐를 실험에 사용하였다. 아무것도 처리하지 않은 정상군과 증류수만을 투여하는 대조군, 오계 란과 내장, 육 단백질 가수분해물의 펩타이드 시료를 각각 500, 1000, 2000 (mg/kg/day)로 투여하는 실험군 등 총 11개의 그룹으로 나누어 매일 1회, 오후 2시에 200 μ l씩 oral zonde를 이용하여 4주간 경구 투여하였으며, 실험이 진행되는 동안 자유 식이를 하였다. 경구투여 4주 후 LPS 1 mg/kg을 복강에 주사한 후 90분 후에 ethyl ether로 마취하고 심장 천자법으로 채혈하였다. 시료의 투여량은 1회 분량을 성인 체중 60 kg에 1회 섭취량으로 하고, 1회 섭취량으로부터 얻은 시료를 마우스 체중 30 g으로 기준하여 산출하였다.

(10) 체중 및 식이량 변화 측정

실험이 진행되는 동안 매주 월요일에 저울을 이용하여 오전 10시에 체중 및 식이량을 g 단위로 측정하였다.

(11) 혈청 내 사이토카인 측정

실험 종료 후 ethyl ether로 마취한 상태에서 심장에서 혈액을 채취한 후 1,000×g에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청으로 사이토카인 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α , IFN- γ 를 custom-made 6-plex cytokine Milliplex panel을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 96well plate에 50배 희석한 혈청 25 μ l씩 분주하고 assay buffer 및 matrix buffer, antibody-immobilized beads를 각 25 μ l씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 실온에서 반응시키고 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후 25 μ l의 detection

antibody을 가하여 1시간 동안 실온에서 암소 반응시키고 추가로 25 μl 의 Streptavidin-Phycoerythrin을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 뒤 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후 PBS를 150 μl 넣고 5분 간 shaking한 후 Luminex를 이용하여 측정하였다.

(12) 혈액 내 면역세포 측정

실험 종료 후 ethyl ether로 마취한 상태에서 심장에서 혈액을 채취한 후 Microtainer® tube with Dipotassium EDTA에 전혈을 담아 백혈구 및 호산구, 호중구, 림프구, 단핵구의 함량을 혈액분석 기기를 통해 분석하였다.

(13) 유전자 발현 측정

(가) RNA 추출

실험 종료 후 비장조직에서 면역 관련 인자를 측정하기 위해 RT-PCR을 시행하였다. 분리 한 비장조직을 동결시킨 뒤 homogenizer로 조직을 파쇄하여 easy blue 1 ml을 넣고 혼합한 후 chloroform (CHCl_3) 200 μl 를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 4°C 원심분리기를 이용하여, 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 400 μl 의 상청액을 회수하여 binding buffer 400 μl 와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 column에 용액을 주입하였다. 이를 다시 4°C 원심분리기로 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 washing buffer를 넣어주고 또 다시 원심 분리 한 후 washing buffer를 다시 넣어 수세한 후 elution buffer 50 μl 을 넣고 1분간 암소하여 RNA를 추출하였다.

(나) cDNA 합성

역전사 (reverse transcription) 반응은 RT premix kit의 mixture (reaction buffer, dNTPs mixture, RNase inhibitor, stabilizer, oligo dT₁₅ primer)를 사용하여 total RNA 1 μg 이 되게 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수에 최종 부피가 20 μl 가 되도록 하여 첨가하였다. 이 20 μl 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 45°C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하였다. 이를 다시 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(다) 유전자 발현 측정

RT-PCR은 DNA polymerase 1U/tube에 250 mM dNTPs mix, RT buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 30 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2)를 포함한 mixture에 각 샘플과 primer를 넣고 PCR을 시행하였다. TNF- α 는 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분, IFN- γ 는 95°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분, IL-4는 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분, IL-5는 95°C에서 30초, 59°C에서 30초, 72°C에서 1분, IL-6는 95°C에서 10초, 60°C에서

10초, 72°C에서 30초, IL-13는 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분 동안 각각 35~45 cycles 조건으로 PCR을 수행하였으며, 사용된 primer는 아래와 같다. 1% agarose gel에 전기영동 후 유전자발현의 여부를 UV로 촬영하여 각 그룹별로 band를 확인하고, RNA 발현을 나타내었다.

Table 1. The sequences of primers in used this study

Primer	F/R	Sequences	Cycle	Annealing (°C)
TNF- α	F	CTA CTC CTC AGA GCC CCC AG	40	60
	R	AGG CAA CCT GAC CAC TCT CC		
IFN- γ	F	TGA ACG CTA CAC ACT GCA TCT TGG	45	57
	R	CGA CTC CTT TTC CGC TTC CTG AG		
IL-4	F	TCA CTG ACG GCA CAG AGC TA	40	60
	R	CCT TCT CCT GTG ACC TCG TT		
IL-5	F	GGC TGG CCT CAA ACT GGT AA	40	59
	R	CCC TGA TGC AAC GAA GAG GA		
IL-6	F	CCT ACC CCA ATT TCC AAT GC	35	60
	R	CGC ACT AGG TTT GCC GAG TA		
IL-13	F	GCA TCT CAG CTG TGG ACT CA	35	58
	R	CTC ACG GTC TTG CTG CAG TT		
GR	F	TTTTCACCCCTGAGCCTCGAC	267	59
	R	CTCGAAATGTTGCGTAGCCG		
GPx	F	AAGGTGCTGCTCATTGAGAATG	403	61
	R	CGTCTGGACCTACCAGGAACTT		
GST	F	GCTGGAGTGGAGTTTGAAGAA	579	62
	R	GTCCTGACCACGTTCAACATAG		
SOD	F	GGTCCACCTCGAACTACTTTATG	405	65
	R	GGTGATCAGGAACATGGAATCT		
Catalase	F	CTGACTGACGCGATTGCCTA	181	59
	R	GTGGTCAGGACATCGGGTTT		
GAPDH	F	AGTGCCAGCCTCGTCTCATA	248	58
	R	GATGGTGATGGGTTTCCCGT		

* F : forward, R : reverse

(14) 관절염 유발 및 실험군 분류

실험군은 관절염을 유발하지 않은 정상군과 관절염을 유발하고 증류수를 투여한 대조군, 연산오계 란과 육질 펩타이드 추출물을 500, 1000, 2000 (mg/kg)으로 각각 투여한 실험군 총 8그룹으로 나눠 그룹 당 6마리씩 분류하였다.

또한 3차년도에는 SHT와 KOG를 각각 500, 1000, 2000 mg/kg 농도로 경구 투여하는 실험군 등 총 8개의 그룹으로 나누었다. 정상군 10마리를 제외한 나머지 그룹은 각 14마리씩 분류하였다.

시료 투여는 MIA로 관절염을 유발하는 대조군과 실험군은 매일 1회(오후 2시) 2 ml씩 oral zonde를 이용하여 2주간 각각의 시료를 경구 투여하고 관절염을 유발한 후에도 4주간 추가적인 경구 투여를 지속적으로 진행하였다.

관절염 유발은 2주간의 경구 투여가 종료된 이후 럼푼과 케타민을 1 : 4 비율로 혼합하고 300 μ l씩 복강주사 하여 마취하고 마취된 SD-Rat의 우측 무릎을 제모하여 우측 무릎 관절낭에 0.9 % saline에 용해시킨 MIA(60 mg/ml)를 당뇨주사기(BD insulin syringe)로 50 μ l 주입함으로써 관절염을 유발하였다. 관절염 유발 후 유발되지 않은 동물과 그룹 당 10마리를 초과한 경우는 동물윤리준칙에 맞추어 안락사를 진행하여 최종적으로 그룹 당 10마리로 그룹간의 동물 수를 맞추었다.

시료 투여는 관절염의 예방과 치료에 대하여 효능을 알아보고자, 관절염 유발 2주전부터 추출물을 각각 매일 1회 2 ml (각 투여량)씩 오전 10시에 경구 투여 하였고 관절염 유발 후에도 4주 동안 계속 진행하였다.

(15) 체중부하 측정

뒷발 체중부하 측정은 실험 종료 주차에 Incapacitance Test Meter를 이용하여 측정하였으며, 기기 설치된 플라스틱 케이지에 비스듬히 세운 후, 각 뒷발에 가해진 세기를 10초에 걸쳐 평균 산출하였다. 산출 된 결과는 MIA로 관절염을 유발한 오른쪽 뒷발에 분포된 체중의 백분율을 다음과 같은 방정식을 이용하여 계산한 뒤 다시 대조군에 대한 체중 부하측정 결과를 백분율로 표시하였다.

$$\text{Weight bearing ratio (\%)} = \left(\frac{\text{유발된 하지의 무게}}{\text{정상 하지의 무게}} \right) \times 100$$

(16) 혈청 내 관절염 유관 인자 측정

(가) Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 생성량 측정

혈청 내 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청을 100배 희석시킨 후 측정하였다. 96 well plate에 RD1-116 시약을 각 50 μ l씩 넣은 후 스펀다드와 혈청 샘플을 추가로 50 μ l를 넣고 2시간 동안 plate shaker를 이용하여 혼합하였다. 이후, wash buffer 200 μ l씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 200 μ l의 Total

MMP-2 Conjugate를 넣고 다시 2시간 동안 plate shaker에서 혼합하였다. 다시 washing 작업 후 200 μl 의 Substrate Solution 용액을 첨가한 후 30분 동안 37°C incubator에서 빛을 차단한 채 반응시키고 50 μl 의 Stop Solution을 넣어 ELISA reader 450 nm 파장에서 측정하였다. 측정결과는 4 parameter logistic curve-fit을 이용하여 자동 계산된 값을 절대 값으로 정리하였다.

(나) Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 생성량 측정

혈청 내 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청을 10배 희석시킨 후 측정하였다. 96 well plate에 RD1-34 시약을 각 50 μl 씩 넣은 후 스펠다드와 컨트롤, 혈청 샘플을 추가로 50 μl 를 넣고 2시간 동안 plate shaker를 이용하여 혼합하였다. 이후, wash buffer 200 μl 씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 100 μl 의 Total MMP-2 Conjugate를 넣고 다시 2시간 동안 plate shaker에서 혼합하였다. 다시 washing 작업 후 100 μl 의 Substrate Solution 용액을 첨가한 후 30분 동안 37°C incubator에서 빛을 차단한 채 반응시키고 100 μl 의 Stop Solution을 넣어 ELISA reader 450 nm 파장에서 측정하였다. 측정결과는 4 parameter logistic curve-fit을 이용하여 자동 계산된 값을 절대 값으로 정리하였다.

(다) Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 생성량 측정

혈청 내 TIMP-1 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청을 20배 희석시킨 후 측정하였다. 96 well plate에 RD1-21 시약을 각 50 μl 씩 넣은 후 스펠다드와 컨트롤, 혈청 샘플을 추가로 50 μl 를 넣고 2시간 동안 plate shaker를 이용하여 혼합하였다. 이후, wash buffer 200 μl 씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 100 μl 의 TIMP-1 Conjugate를 넣고 다시 2시간 동안 plate shaker에서 혼합하였다. 다시 washing 작업 후 100 μl 의 Substrate Solution 용액을 첨가한 후 30분 동안 37°C incubator에서 빛을 차단한 채 반응시키고 100 μl 의 Stop Solution을 넣어 ELISA reader 450 nm 파장에서 측정하였다. 측정결과는 4 parameter logistic curve-fit을 이용하여 자동 계산된 값을 절대 값으로 정리하였다.

(라) Aggrecan 생성량 측정

혈청 내 aggrecan 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청을 2배 희석시킨 후 측정하였다. 96 well plate에 50 μl 의 스펠다드와 혈청 샘플을 넣고 100 μl 의 Conjugate를 추가한 후 1시간 동안 incubator에 넣어 반응시켰다. 이후, wash buffer 200 μl 씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 50 μl 의 Substrate A용액과 B용액을 순차적으로 넣은 후 15분 동안 37°C incubator에서 빛을 차단한 채 반응시키고 ELISA reader 450 nm 파장에서 측정하였다. 측정결과는 4 parameter logistic curve-fit을 이용하여 자동 계산된 값을 절대 값으로 정리하였다.

(마) Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) 생성량 측정

혈청 내 Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청을 3배 희석시킨 후 측정하였다. 96 well plate에 100 μ l의 스탠다드와 혈청 샘플을 넣고 1시간 30분 동안 incubator에 넣어 반응시켰다. 이후, wash buffer 200 μ l씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 100 μ l의 Rat COMP antibody를 넣고 1시간 동안 incubator에서 반응시켰다. 다시 washing 작업을 실행한 후 100 μ l의 enzyme-conjugate를 넣고 30분 동안 incubator에서 반응시키고 washing 작업을 실행하고 Color Reagent를 100 μ l 넣어 30분 동안 반응시켰다. 추가로 100 μ l의 Color reagent C 용액을 넣고 ELISA reader 450 nm 파장에서 측정하였다. 측정결과는 log-log fit을 이용하여 자동 계산된 값을 절대 값으로 정리하였다.

(바) Leukotriene B₄ (LTB₄) 생성량 측정

혈청 내 LTB₄ 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청으로 측정하였다. 96 well plate에 50 μ l의 스탠다드와 혈청 샘플을 넣고 50 μ l의 Primary Antibody Solution을 추가한 후 1시간 동안 plate shaker를 이용하여 혼합하였다. 이후, 500 μ l의 LTB₄ Conjugate를 넣고 다시 3시간 동안 plate shaker에서 혼합하고 wash buffer 200 μ l씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 200 μ l의 Substrate Solution 용액을 첨가하여 30분 동안 37°C incubator에서 빛을 차단한 채 반응시키고 100 μ l의 Stop Solution을 넣어 ELISA reader 450 nm 파장에서 측정하였다. 측정결과는 4 parameter logistic curve-fit을 이용하여 자동 계산된 값을 절대 값으로 정리하였다.

(사) Calcitonin 생성량 측정

혈청 내 calcitonin 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청으로 측정하였다. 96 well plate에 50 μ l의 스탠다드와 컨트롤, 혈청 샘플을 넣고 100 μ l의 HRP-conjugate reagent를 추가한 후 1시간 동안 incubator에 넣어 반응시켰다. 이후, wash buffer 200 μ l씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 50 μ l의 Chromogen Solution A와 B를 순차적으로 넣고 15분 동안 incubator에서 반응시키고 50 μ l의 Stop Solution을 넣고 ELISA reader 450 nm 파장에서 측정하였다. 측정결과는 log-log fit을 이용하여 자동 계산된 값을 절대 값으로 정리하였다.

(아) C-Terminal Telopeptides of Type II Collagen (CTX II) 생성량 측정

혈청 내 C-Terminal Telopeptides of Type II Collagen (CTX II) 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청으로 측정하였다. 96 well plate에 50 μ l의 스탠다드와 컨트롤, 혈청 샘플을 넣고 100 μ l의 HRP-conjugate reagent를 추가한 후 1시간 동안 incubator에 넣어 반응시켰다. 이후, wash buffer 200 μ l씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 50 μ l의 Chromogen Solution A와 B를 순차적으로 넣고 15분 동안 incubator에서 반응시키고 50 μ l의 Stop Solution을 넣고 ELISA reader 450 nm 파장에서 측정하였다. 측정결과는 log-log fit을 이용하여 자동 계산된 값을 절대 값으로 정리하였다.

(자) Glycosaminoglycan 생성량 측정

혈청 내 glycosaminoglycan 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청으로 측정하였다. 96 well plate에 100 μ l의 스탠다드와 혈청 샘플을 넣고 50 μ l의 Conjugate를 추가한 후 1시간 동안 incubator에 넣어 반응시켰다. 이후, wash buffer 200 μ l씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 50 μ l의 Substrate A용액과 B용액을 순차적으로 넣은 후 15분 동안 37°C incubator에서 빛을 차단한 채 반응시키고 ELISA reader 450 nm 파장에서 측정하였다. 측정결과는 4 parameter logistic curve-fit을 이용하여 자동 계산된 값을 절대값으로 정리하였다.

(차) Hs-CRP 수치 측정

최종 실험 종료 후 심장 천자법을 이용하여 튜브형 주사기로 심장 혈액 10 ml를 채혈하였다. 30분간 상온에서 굳힌 뒤 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 얻은 후 서울의과학연구소 (Korea)에 의뢰하여 hs-CRP를 측정하였다.

(17) Micro CT-arthrography 측정

Micro-CT 측정은 실험 종료 후 대퇴부를 절단하여 우측 무릎의 근육과 피부를 제거한 후 포르말린에 고정시켜 동국대학교(일산캠퍼스)측에 의뢰하여 실시하였으며, micro-CT-arthrography를 사용하여 무릎 관절의 연골양 (cartilage volume)을 2D 및 3D로 변환하여 분석하였다.

(18) Structural parameter 측정

실험 종료 후 micro-CT 촬영을 진행하고 난 후 무릎 관절의 정중앙을 기준으로 하여 structural parameter 측정을 통해 연골양과 골밀도, 관절 염증 수치를 측정하였다.

(19) 조직병리학적 검사

Micro-CT 촬영이 끝난 후 무릎 부위를 절단하여 10 % EDTA가 포함된 10 % 포르말린 용액에 넣어 관절 조직을 탈칼슘화 시켰다. Radiographic technique을 이용하여 decalcification 유무를 확인한 후 파라핀 왁스에 관절 조직을 넣고 고정된 다음 coronal section을 실시하였다. 탈칼슘화 과정을 거쳐 파라핀으로 고정된 조직을 7 μ m의 크기로 자른 뒤, Hematoxylin and Eosin (H&E) 및 Safranin-O 염색을 실시하여 조직의 상태를 관찰하였다. 염증 반응 발생 유무나 활막세포의 증식, 염증세포의 조직 침윤 여부는 H&E 염색 결과에서 확인할 수 있으며, proteoglycan 층을 염색하는 Safranin-O 염색 결과에서는 연골 조직의 손상 여부를 확인하였다.

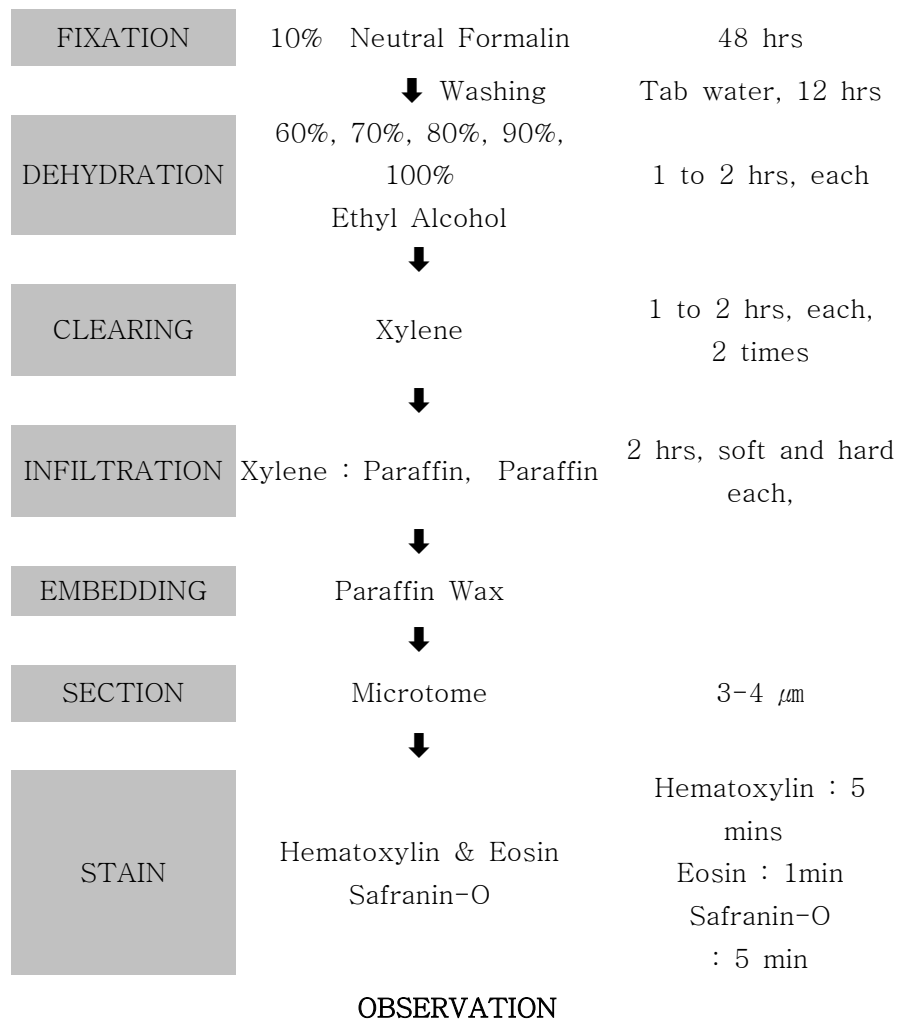


Fig. 1. Tissue Preparation Processing.

(20) 항산화 활성 실험군 분류 및 조직 적출

5주령의 BALB/c 생쥐를 1주간 안정기를 거친 뒤 6주령이 된 생쥐를 실험에 사용하였다. 아무것도 처리하지 않은 대조군과 오계 란과 내장, 육 단백질 가수분해물의 펩타이드 시료를 각각 500, 1000, 2000 (mg/kg/day)로 투여하는 실험군 등 총 10개의 그룹으로 나누어 매일 1회, 오후 2시에 200 μ l씩 oral zonde를 이용하여 4주간 경구 투여하였으며, 실험이 진행되는 동안 자유 식이를 하였다. 경구투여 4주 후 90분 후에 ethyl ether로 마취하고 간 조직을 채취하였다. 시료의 투여량은 1회 분량을 성인 체중 60 kg에 1회 섭취량으로 하고, 1회 섭취량으로부터 얻은 시료를 마우스 체중 30 g으로 기준하여 산출하였다.

(21) 조직 내 항산화 측정

(가) Catalase 측정

적출한 간 조직을 PBS로 1회 세척한 뒤 assay buffer 150 μ l를 넣은 후 sonication 방법으로 균질화 시킨 후 10,000 g에서 15분 동안 원심 분리하여 얻어낸 상등액을 단백질 정량 후

실험에 사용하였다. 96 well plate에 assay buffer를 68 μl 씩 분주한 후 상등액을 high control 부분을 포함하여 동일하게 10 μl 씩 넣어주었다. High control 부분만 stop solution을 10 μl 씩 넣은 후 H_2O_2 (1 mM)을 상등액과 high control 부분 모두 12 μl 씩 넣고 실온에서 30분 동안 반응시킨다. High control 부분을 제외한 곳에 stop solution을 10 μl 씩 넣어준 후 develop mix (assay buffer 46 μl , oxidized 2 μl , HRP 2 $\mu\text{l}/\text{well}$)를 50 μl 씩 넣어주었다. 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Catalase 활성은 1 nmol의 formaldehyde를 생성하는데 필요한 catalase의 양을 1 nmol로 하여 분당 활성정도(nmol/min/ml)를 나타내었다.

(나) Glutathione reductase (Gr) 항산화 측정

적출한 간 조직을 PBS로 1회 세척한 뒤 assay buffer 150 μl 를 넣은 후 sonication 방법으로 3분 동안 균질화 시킨 후 10,000 g, 4°C에서 15분 동안 원심 분리하여 얻어낸 상등액을 단백질 정량하여 실험에 사용하였다. 시료 100 μl 에 3% H_2O_2 를 5 μl 넣은 후 실온에서 5분 동안 반응시킨 다음 catalase를 5 μl 넣고 실온에서 5분 동안 반응시킨다. Assay buffer 30 μl 를 96well plate에 분주한 후 반응액 20 μl 와 reaction mix (GR assay buffer 40 μl , DTNB solution 2 μl , NADPH-GNERATTM solution 2 μl , GSSG solution 6 $\mu\text{l}/\text{well}$) 50 μl 를 넣고 405 nm 파장에서 흡광도를 1차 측정 후 10분 후에 2차 측정하였다. GR의 활성은 ΔOD 값(2차 측정-1차 측정)으로 kit 상의 TNB standard 검량선에 따라 계산되었다.

$$\text{GPx Activity (mU/ml)} = \left(\frac{B}{\Delta T(T_2 - T_1) \times 0.9 \times V} \right) \times \text{Sample dilution factor}$$

* B is the TNB amount from TNB standard Curve; ΔT is time of reaction; V is Sample volume added into the reaction well

(다) Glutathione peroxidase (GPx) 항산화 측정

적출한 간 조직을 PBS로 1회 세척한 뒤 차가운 HEPES beffer (pH 7.2, containing 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, and 70 mM sucrose) 5 ml에 넣은 후 sonication 방법으로 3분 동안 균질화하였다. 균질화 된 시료를 1,500 g에서 5분 동안 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 남은 pellet을 sample buffer 200 μl 씩 넣어 녹여 단백질 정량 후 실험에 사용하였다. 96 well plate에 radical detector를 200 μl 씩 분주한 뒤 시료 10 μl 와 xanthine oxidase 20 μl 를 넣은 후 30분 동안 실온에서 shaking하여 반응시킨 후 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. SOD 활성은 superoxide radical을 50% dismutation 하는데 필요한 SOD량을 1 unit으로 하여 분당 활성정도 (U/mL)로 나타내었다.

(22) 골다공증 효능 평가(in-vitro)

(가) MG-63, RAW 264.7 세포 배양

세포는 RPMI (MG-63), RAW 264.7 (DMEM) 배지에 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin 를 첨가하였으며 5% CO₂ incubator에서 37°C 로 배양하였다.

(나) 세포 생존율

MG-63, Raw264.7 세포를 96웰 플레이트에 5×10⁴로 24시간 배양 후 시료를 농도별로 처리한 뒤 MTT시약을 처리하고 4시간 뒤 DMSO로 생성된 formazan salts의 흡광도를 540nm에서 측정하였다.

(다) ALP 활성

MG-63세포를 96웰 플레이트에 5×10⁴로 24시간 배양 후 시료를 첨가하여 96시간 배양하였고 0.1% Triton X-100으로 세포 균질화, p-nitrophenyl phosphate 1시간 처리하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(라) 골 석회화 측정

MG-63세포를 시료와 함께 14일 배양한 뒤 세포를 에탄올로 고정하고 alizarin red S를 처리하여 석회화 결절을 관찰하였고 cetylpyridinium을 넣어 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(마) TRAP 활성 및 염색

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 5×10⁴로 24시간 배양 후 시료를 첨가하여 96시간 배양하였고 3.5% formaldehyde로 고정 후 sodium tartrate, p-NPP를 넣어 반응시키고 0.1 N NaOH로 반응 중지시킨 뒤 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. TRAP 염색은 세포 고정 후 leukocyte acid phosphatase assay kit을 사용하여 다핵화 된 세포를 관찰하였다.

(바) 콜라겐 함량 측정

열수추출물 300 mg을 6 N HCl, 110 °C에서 24 h 처리 후 chloramine-T, Ehrlich's reagent를 처리하여 558 nm에서 hydroxyproline을 표준물질로 하여 콜라겐의 함량을 측정하였다.

(사) 유리아미노산 측정

0.5 g 시료를 3% trichloroacetic acid solution로 희석한 뒤 10,000 rpm으로 15분 원심분리 하였다. 상층액을 필터 후 유리아미노산을 측정하였다.

(23) 골다공증 유발 및 실험군 분류

30마리의 5주령 wistar-rat의 난소를 절제하고 1주간 회복기간을 거친 뒤 6마리당 한 군으로 총 5종류의 군으로 나누었다. 1) Con (난소절제+정상식이) 2) Ca 결핍 (난소절제+Ca결핍식이) 3) 살 추출물 (난소절제+Ca결핍식이+살 추출물) 4) 껌질 추출물 (난소절제+Ca결핍식이+껌질추출물) 5) 콜라겐 (난소절제+Ca결핍식이+콜라겐) 사료와 물을 자유급식 하였으며 8주 실험기간 동안 체중 및 사료섭취량을 측정하였다. 희생 후 혈액은 1000 rpm에서 30 분 진행하였고 -80°C에서 보관하였다.

(24) 혈액 분석

실험 종료 후 혈액을 심장천자법으로 채혈하고 원심 분리한 혈청으로 Total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST)을 측정하기 위해 서울의과학연구소(Korea)에 분석의뢰 하였다.

(25) 골강도 측정

골 강도는 쥐의 경골을 사용하였으며 물성분석기를 사용하였다.

(26) 칼슘 함량 측정

경골의 칼슘함량은 AOAC 방법을 통해 측정하였다.

(27) H&E 염색

쥐의 경골을 포르말린으로 고정하고 10% EDTA로 탈회한 뒤 파라핀 블록을 제조하였다. 이후 단면 절편으로 H&E stain을 진행하였다.

(28) RT-PCR

RNA는 TRIzol를 통해 얻었고 SuperScript III로 역전사 하였으며 BMP-2, Osteocalcin, COL-1 primer를 사용하여 1.2% agarose/EtBr 겔에서 확인하였다.

(29) 면역 염색

경골 단면 절편을 파라핀을 xylene으로 제거하고 0.3% H₂O₂를 30분 처리하고 10% goat serum 30분 처리 이후 1차 antibody (BMP-2, Runx2, Wnt3a, Osteocalcin, COL-1)를 처리하였다. 2차 antibody는 goat anti-rabbit IgG (H+L) HRP conjugate 를 사용하였다. 면역염색은 DAB으로 갈색 염색을 확인 한 뒤 haematoxylin으로 염색하였다.

(30) 흑질색소의 생리적 기능 연구

(가) 멜라닌 추출

연산오계 껍질 200g을 1 M NaOH 200 ml 110°C 에서 30분 균질화 시킨 뒤 필터 후 2 M HCl (pH 2.5) 를 상온에서 2시간 방치한다. 이후 12000 rpm에서 30분동안 원심분리하여 얻은 검은색 멜라닌을 7 M HCl 100°C 2시간, 1 M KOH, chloroform, 1-butanol 순서로 세척한다. 세척을 거친 멜라닌은 중화시켜 -80°C 보관하였다.

(나) 멜라닌 구조 분석

멜라닌 구조 분석을 위해 EI-mass, ATR FT-IR, ¹³C-NMR 등으로 측정하였다.

(다) Western blot

세포는 RIPA 버퍼를 통해 용해시켰고 Bio-Rad protein kit을 사용하여 단백질 정량하였다. Antibody는 Runx2, BMP-2, SMAD5를 사용하였고, 2차 antibody는 goat anti-rabbit (or mouse) IgG (H+L) HRP conjugate를 사용하였다.

(31) 단회/반복 독성 평가

단회/반복 독성 평가는 ‘비임상시험관리기준(식약청고시 제2012-61)’ 및 ‘의약품등의 독성시험기준(식약청고시 제2012-86)’을 바탕으로 실험을 수행하였으며, 경구 투여 시 기술적으로 투여하는 최대 용량이 2,000 mg/kg이므로 고용량군의 투여량은 2,000 mg/kg 으로 설정하였다. 실험군은 증류수만을 투여하는 대조군, SHT와 KOG를 각각 500, 1000, 2000 mg/kg 농도로 투여하는 실험군 등 총 7개의 그룹으로 나누어 일회용 존대를 이용하여 단회 및 반복 투여하였다. 시료 투여량은 성인 60 kg을 기준으로 1회에 500, 1000, 2000 mg을 섭취하는 용량을 SD-rat의 체중 200 g으로 환산하여 산출하고 단회 독성 실험은 투여에 앞서 12시간 이상 금식을 시킨 후 설정된 고정 용량을 1회 투여한 후 14일 동안 경과 관찰을 진행하며, 반복 독성 실험은 28일간의 고정 용량을 투여를 진행하며 경과 관찰을 하였다.

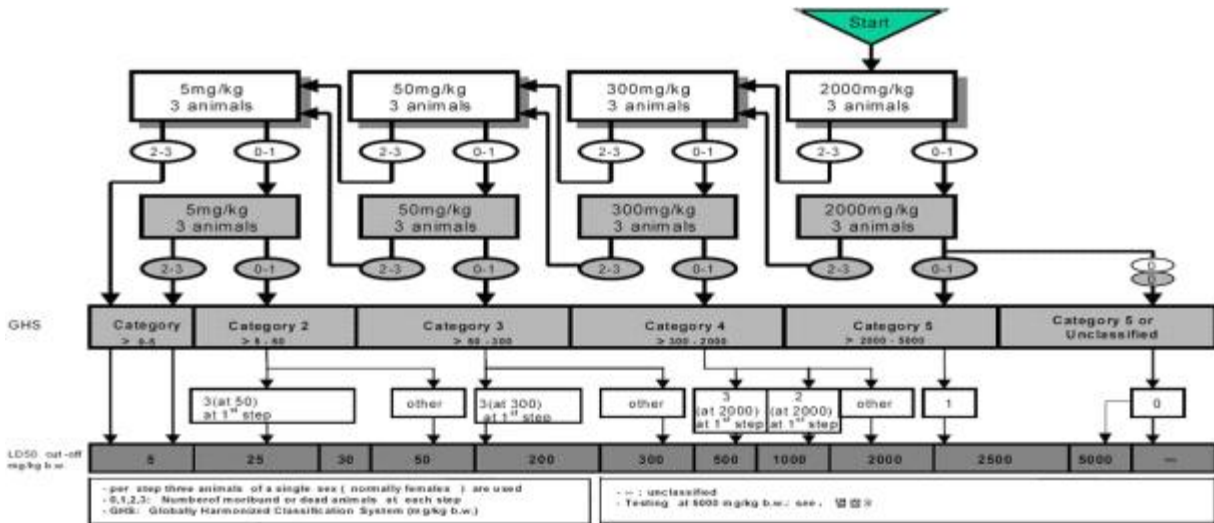


Fig. 2. Experimental guidelines for toxicity assessment.

(32) 일반증상 관찰

단회 독성 실험은 투여에 앞서 12시간 이상 금식을 시킨 후 설정된 고정 용량을 1회 투여한 후 14일 동안 경과 관찰을 진행하며, 반복 독성 실험은 28일간의 고정 용량을 투여를 진행하며 경과 관찰을 하였다.

(33) 혈액학적 검사

모든 동물에 대하여 부검 전 약 12시간 이상 절식을 시킨 후, ether로 마취하여 심장 천자법을 통해 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 이용하여 Table 1, Table 2의 항목을 KPNT(Korea)에 분석 의뢰 하였다.

Table 2. List of hematological measurement

list	unit	list	unit
총 백혈구수 (Total leucocyte count, WBC)	$\times 10^3$ cells/ μ l	혈소판수 (platelet, PLT)	$\times 10^3$ cells/ μ l
총 적혈구수 (Total erythrocyte count, RBC)	$\times 10^6$ cells/ μ l	림프구 (lymphocyte, LYMP)	%
혈색소량 (hemoglobin concentration, HGB)	g/dl	단핵구 (monocyte, MONO)	%
헤마토크리트치 (hematocrit, HCT)	%	산호성 백혈구 (eosinophil, EOS)	%

평균 적혈구용적 (mean cell volume, MCV)	fl	중성호성 백혈구 (neutrophil. NEUT)	%
평균 헤모글로빈양 (mean cell hemoglobin, MCH)	pg	염기호성 백혈구 (basophil, BASO)	%
평균 적혈구 헤모글로빈농도 (mean cell hemoglobin concentration, MCHC)	g/dl		

Table 3. List of biochemical measurement

list	unit	list	unit
아스파테이트 아미노기전이효소 (Aspartate aminotransferase, AST)	U/l	총 콜레스테롤 (Total cholesterol, TC)	mg/dl
알라닌 아미노기전이효소 (Alanine aminotransferase, ALT)	U/l	트라이글리세라이드 (Triglycerides, TG)	mg/dl
혈액요소질소 (Blood urea nitrogen, BUN)	mg/dl	에이치디엘콜레스테롤 (High density lipoprotein-cholesterol, HDL)	mg/dl
크레아티닌 (Creatinine, CREA)	mg/dl	엘디엘콜레스테롤 (Low density lipoprotein-cholesterol, LDL)	mg/dl

(34) 장기중량 측정

부검 후 다음과 같은 항목을 적출하여 전자저울을 이용하여 측정하였으며, 양쪽 대칭 장기는 모두 측정하였다.

Table 4. List of organ weights measurement

list	list	list	list
심장 (Heart)	간 (Liver)	폐 (Lung)	비장 (Spleen)
신장 (Kidney)	부신 (Adrenal gland)	흉선 (Thymus)	갑상선 (Thyroid)
난소 (Ovary)	자궁 (Uterus)	뇌 (Brain)	뇌하수체 (Pituitary gland)

(35) 면역 억제 유도 및 실험군 분류

7주령이 된 ICR mouse 복강에 면역억제제 (Cyclophosphamide)를 실험 0일차, 3일차에 100 mg/kg 농도로 100 μ l 주사하여 면역 억제를 유도하였다. 어떠한 처리를 하지 않는 정상군과 면역 억제제 처리 후 증류수만을 투여하는 대조군, 면역 억제제 처리 후 SHT와 KOG를 각각 500, 1000, 2000 mg/kg 농도로 투여하는 실험군 등 총 8개의 그룹으로 나누어 매일 1회, 오후 2시에 200 μ l씩 oral zonde를 이용하여 3주간 경구 투여하였다. 시료 투여량은 성인 60 kg을 기준으로 1회에 200, 400 mg을 섭취하는 용량을 마우스 체중 30 g으로 환산하여 산출하였다.

(36) 혈청 내 면역글로불린 생성량 측정

실험 종료 후 분리한 혈청으로 면역글로불린 IgA, IgG, IgM은 Mouse immunoglobulin isotyping multiplex assay kit를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 96 well plate에 standard, control, 10배 희석한 혈청을 50 μ l씩 분주하고 anti-mouse multi-immunoglobulin beads를 각 25 μ l씩 가하여 혼합하여 15분 동안 실온에서 빛을 차단한 채 반응시키고 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 이 후 25 μ l의 anti-mouse κ Light Chain, PE를 가하여 15분 동안 실온에서 빛을 차단한 채 반응시키고 PBS를 150 μ l 넣어 5분 간 shaking한 후 Luminex를 이용하여 측정하였다.

(37) 통계 처리

본 연구의 실험 결과는 그룹별로 평균값 \pm 표준 편차(mean \pm S.D.)로 표시하였다. 각 처리군의 비교는 one-way analysis of variance(ANOVA) 방법을 이용하였고, Student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다(** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05).

4. 연구 결과

■ In-vitro

가. RAW 264.7 세포 독성

(1) 뼈 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 세포 독성을 측정한 결과, 대조군을 100.0 \pm 4.8%로 나타냈을 때 1년산 수탁은 1, 10, 100 (μ g/ml) 농도에서 99.8 \pm 8.6%, 92.4 \pm 6.8%, 104.1 \pm 6.0%의 세포 생존율을 나타내었으며, 3년산 수탁은 1, 10, 100 (μ g/ml) 농도에서 132.2 \pm 7.3%, 136.3 \pm 23.3%, 122.6 \pm 18.5%의 세포 생존율을 나타내었다. 또한, 3년산 암탁은 1, 10, 100 (μ g/ml) 농도에서 98.1 \pm 7.8%, 91.1 \pm 14.3%, 103.9 \pm 7.2%의 세포 생존율을 나타내어 안전한 것으로 나타났다. 이를 종합해 보면, 연산오계 뼈 추출물은 RAW 264.7 세포 독성을 나타내지 않았으며 성별과 연령간의 유의적 차이를 보이지 않았다.

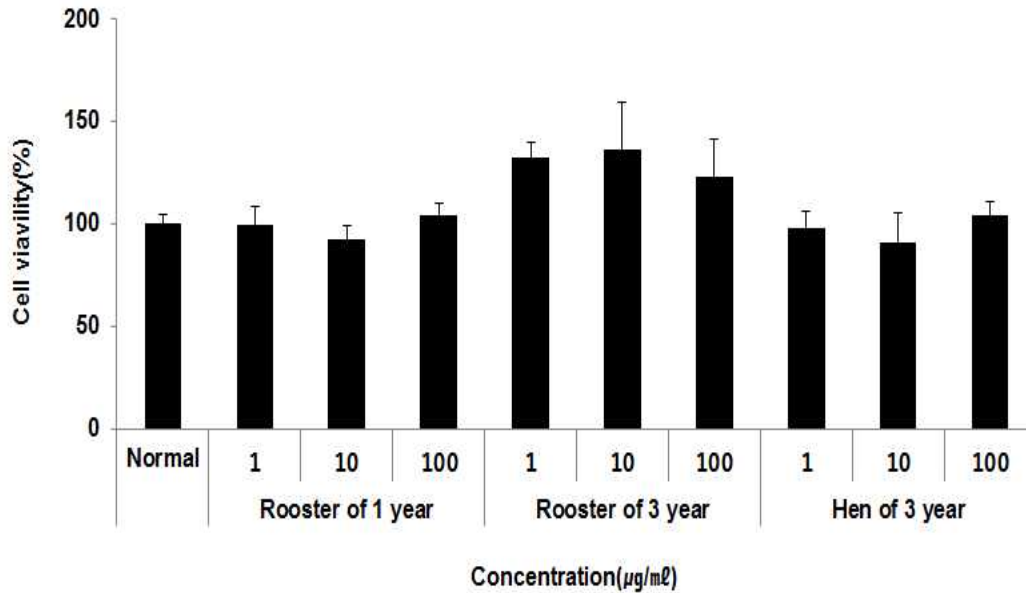


Fig. 3. Cell viability of the bone extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the MTT assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of bone extracts of year and sex condition for 24hr. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(2) 살 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 살 추출물의 세포 독성을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 3.8\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $100.6 \pm 13.5\%$, $119.8 \pm 17.2\%$, $134.7 \pm 16.8\%$ 의 세포 생존율을 나타내었으며, 3년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $106.7 \pm 11.7\%$, $132.6 \pm 27.3\%$, $120.6 \pm 30.6\%$ 의 세포 생존율을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $113.6 \pm 11.4\%$, $140.3 \pm 22.7\%$, $149.5 \pm 39.3\%$ 의 세포 생존율을 나타내어 안전한 것으로 나타났다. 이를 종합해 보면, 연산오계 살 추출물은 RAW 264.7 세포 독성을 나타내지 않았으며 성별과 연령간의 유의적 차이를 보이지 않았다.

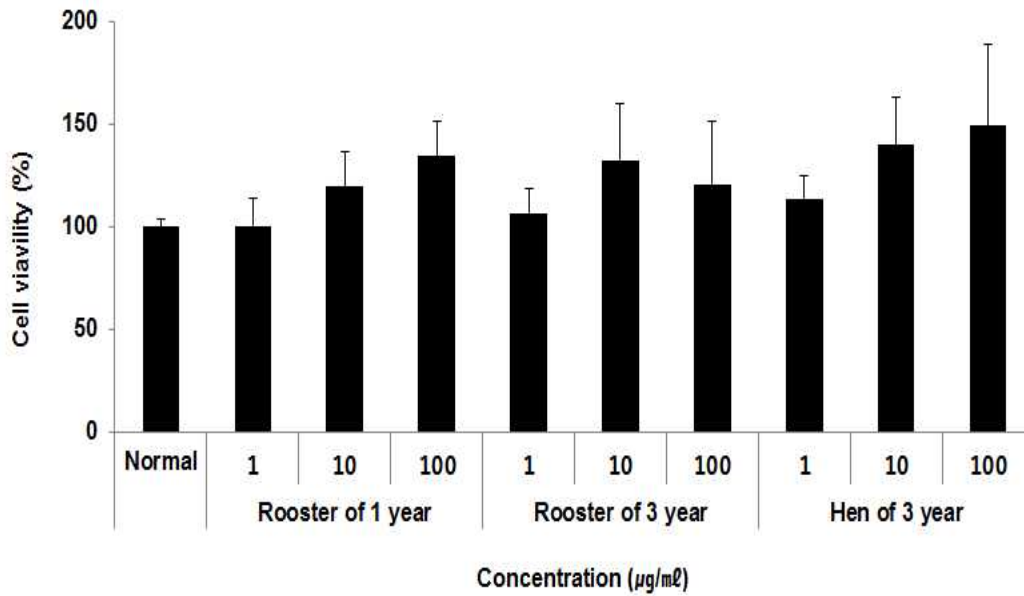


Fig. 4. Cell viability of the meat extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the MTT assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of meat extracts of year and sex condition for 24hr. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(3) 껍질 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 껍질 추출물의 세포 독성을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 8.4\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $147.6 \pm 23.7\%$, $136.2 \pm 10.8\%$, $126.8 \pm 12.2\%$ 의 세포 생존율을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $123.8 \pm 37.7\%$, $121.1 \pm 9.8\%$, $115.3 \pm 11.0\%$ 의 세포 생존율을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $102.4 \pm 14.8\%$, $109.2 \pm 20.2\%$, $103.9 \pm 7.3\%$ 의 세포 생존율을 나타내어 안전한 것으로 나타났다. 이를 종합해 보면, 연산오계 껍질 추출물은 RAW 264.7 세포 독성을 나타내지 않았으며 성별과 연령간의 유의적 차이를 보이지 않았다.

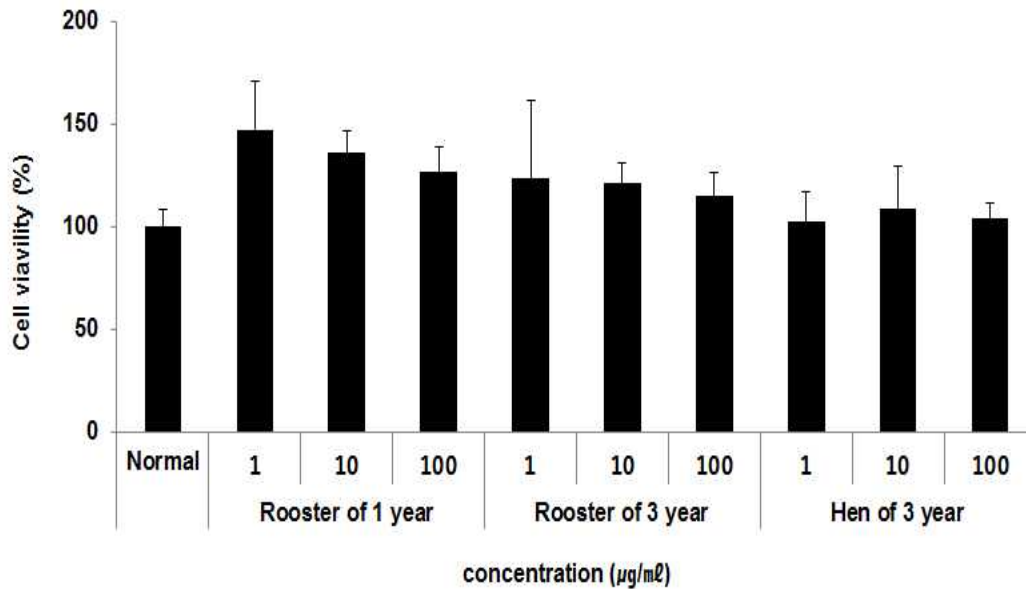


Fig. 5. Cell viability of the skin extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the MTT assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of skin extracts of year and sex condition for 24hr. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

나. 조골 세포 독성

(1) 살 추출물

조골세포에서 연산오계 살의 물 추출물에 대한 세포 독성을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉의 살 추출물은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $95.3 \pm 1.0\%$, $92.1 \pm 3.6\%$, $95.5 \pm 5.7\%$ 의 세포 생존율을 나타내었으며, 3년산 수탉의 살 추출물은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $94.8 \pm 3.4\%$, $83.9 \pm 1.8\%$, $84.5 \pm 1.9\%$ 의 세포 생존율을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 살 추출물은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $93.5 \pm 1.0\%$, $86.5 \pm 3.2\%$, $88.3 \pm 5.2\%$ 의 세포 생존율을 나타내어 안전한 것으로 나타났다(그림 A).

조골세포에서 연산오계 살의 에탄올 추출물에 대한 세포 독성을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉의 살 추출물은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $64.6 \pm 14.4\%$, $20.2 \pm 0.7\%$, $12.4 \pm 3.0\%$ 의 세포 생존율을 나타내었으며, 3년산 수탉의 살 추출물은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $74.9 \pm 10.5\%$, $16.6 \pm 2.3\%$, $11.8 \pm 3.3\%$ 의 세포 생존율을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 살 추출물은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $81.5 \pm 5.7\%$, $38.5 \pm 1.0\%$, $13.3 \pm 3.6\%$ 의 세포 생존율을 나타내어 3년산 암탉의 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 제외한 모든 추출물의 농도에서 독성을 나타내었다(그림 B). 이를 종합해 보면, MG-63 세포에서 연산오계 물 추출물들의 육질과 껍질, 연령, 성별간의 유의적 차이가 보이지 않았으며 모든 시료에서 세포생존율이 높게 나타났으나, 에탄올 추출물은 모든 시료가 조골세포에 세포 손상을 유도하는 것으로 사료된다

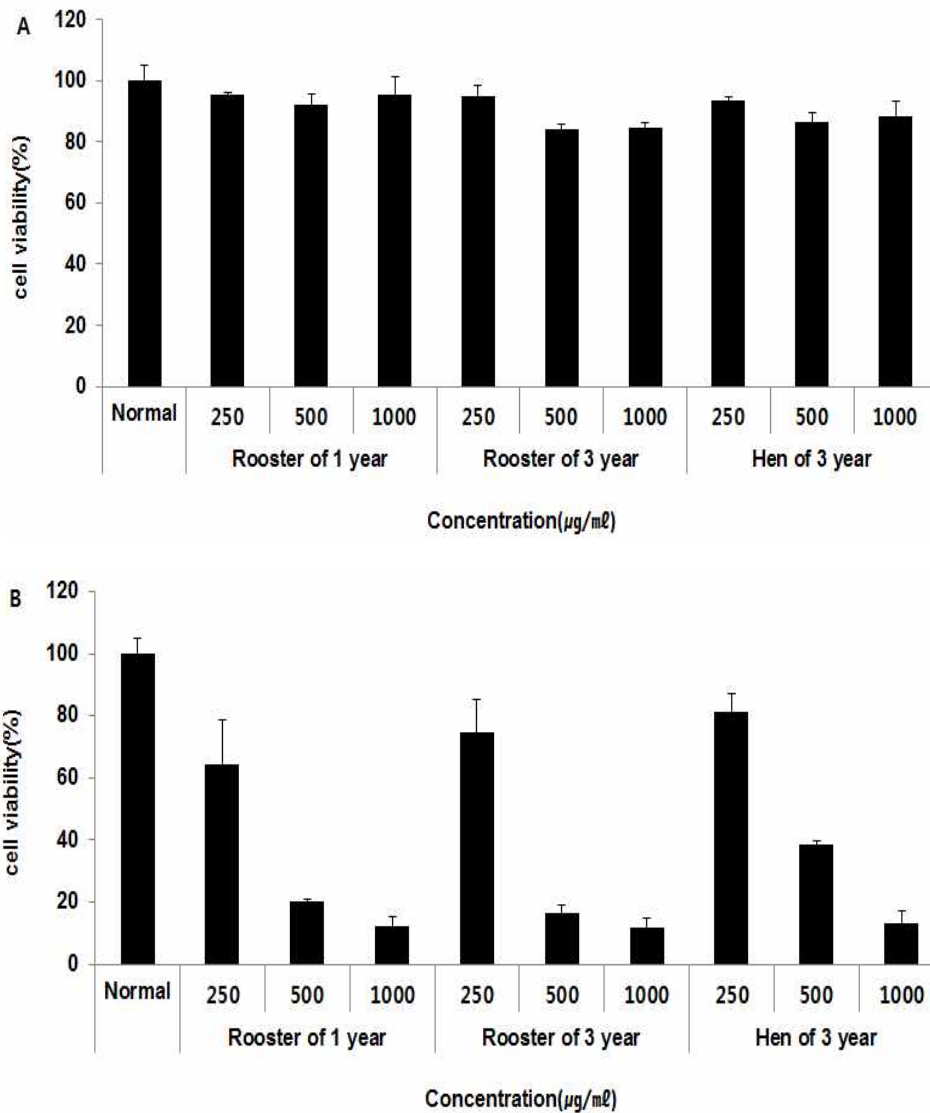


Fig. 6. Cell viability of the meat extracts of year and sex condition in MG-63 cells as determined using the MTT assay. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of meat extracts of year and sex condition for 24hr. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(2) 껌질 추출물

조골세포에서 연산오계 살의 물 추출물에 대한 세포 독성을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉의 살 추출물은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $90.7 \pm 1.0\%$, $87.7 \pm 6.8\%$, $90.6 \pm 4.2\%$ 의 세포 생존율을 나타내었으며, 3년산 수탉의 살 추출물은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $94.2 \pm 2.5\%$, $85.8 \pm 5.3\%$, $87.3 \pm 3.9\%$ 의 세포 생존율을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 살 추출물은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $90.7 \pm 8.2\%$, $88.4 \pm 1.7\%$, $92.3 \pm 5.0\%$ 의 세포 생존율을 나타내어 안전한 것으로 나타났다(그림 A).

조골세포에서 연산오계 살의 에탄올 추출물에 대한 세포 독성을 측정한 결과, 대조군을

100.0±5.0%로 나타냈을 때 1년산 수탉의 살 추출물은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 69.0±5.5%, 22.1±5.9%, 10.3±1.0%의 세포 생존율을 나타내었으며, 3년산 수탉의 살 추출물은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 89.6±0.6%, 22.5±11.5%, 8.3±1.0%의 세포 생존율을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 살 추출물은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 88.1±2.7%, 21.3±4.0%, 10.4±3.1%의 세포 생존율을 나타내어 3년산 암탉과 수탉의 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 제외한 모든 추출물의 농도에서 독성을 나타내었다(그림 B). 이를 종합해 보면, MG-63 세포에서 연산오계 물 추출물들의 육질과 껍질, 연령, 성별간의 유의적 차이가 보이지 않았으며 모든 시료에서 세포생존율이 높게 나타났으나, 에탄올 추출물은 3년산 암탉과 수탉의 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 제외한 모든 시료가 조골세포에 세포 손상을 유도하는 것으로 사료된다.

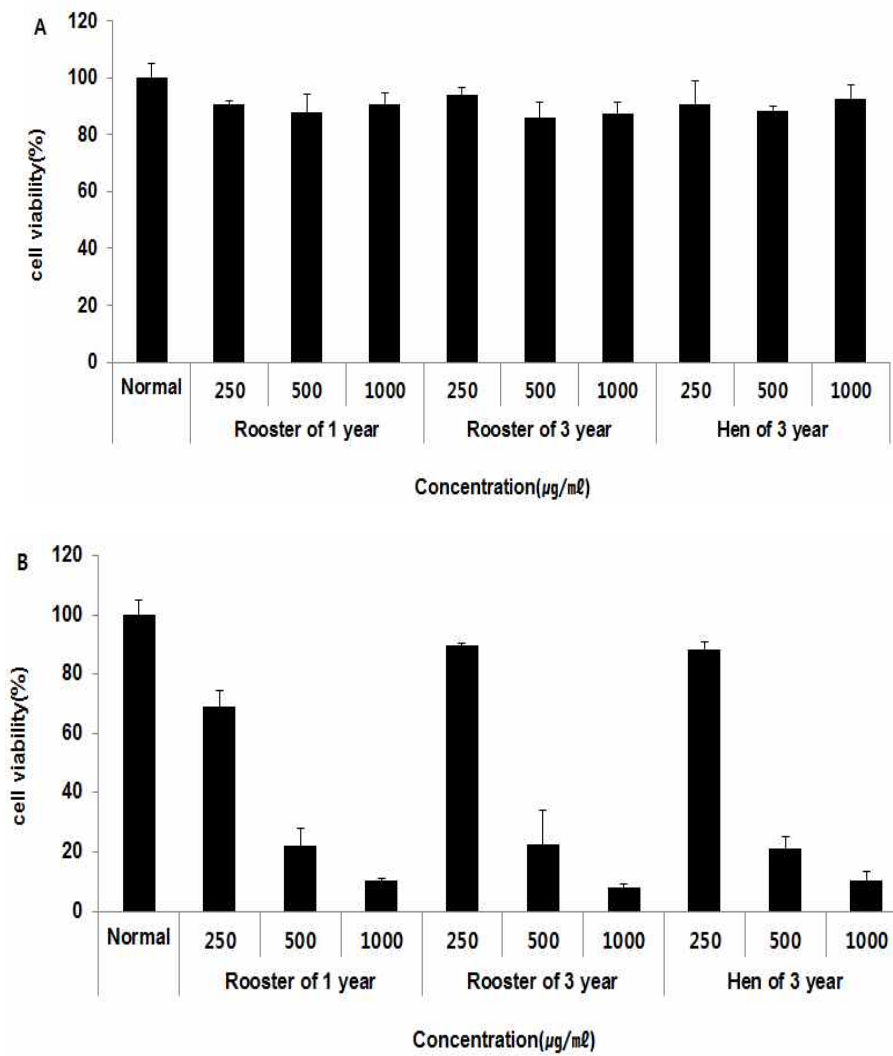


Fig. 7. Cell viability of the skin extracts of year and sex condition in MG-63 cells as determined using the MTT assay. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g/ml}$) of skin extracts of year and sex condition for 24hr. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(3) 다리살 펩타이드 추출물

조골세포에서 연산오계 다리살 펩타이드 추출물에 대한 세포 독성을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $92.4 \pm 2.1\%$, $103.1 \pm 4.8\%$, $101.4 \pm 8.3\%$ 의 세포 생존율을 나타내었으며, 3년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $92.4 \pm 4.2\%$, $103.1 \pm 5.7\%$, $95.2 \pm 3.2\%$ 의 세포 생존율을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $95.3 \pm 9.3\%$, $122.3 \pm 9.1\%$, $107.1 \pm 10.3\%$ 의 세포 생존율을 나타내어 안전한 것으로 나타났다.

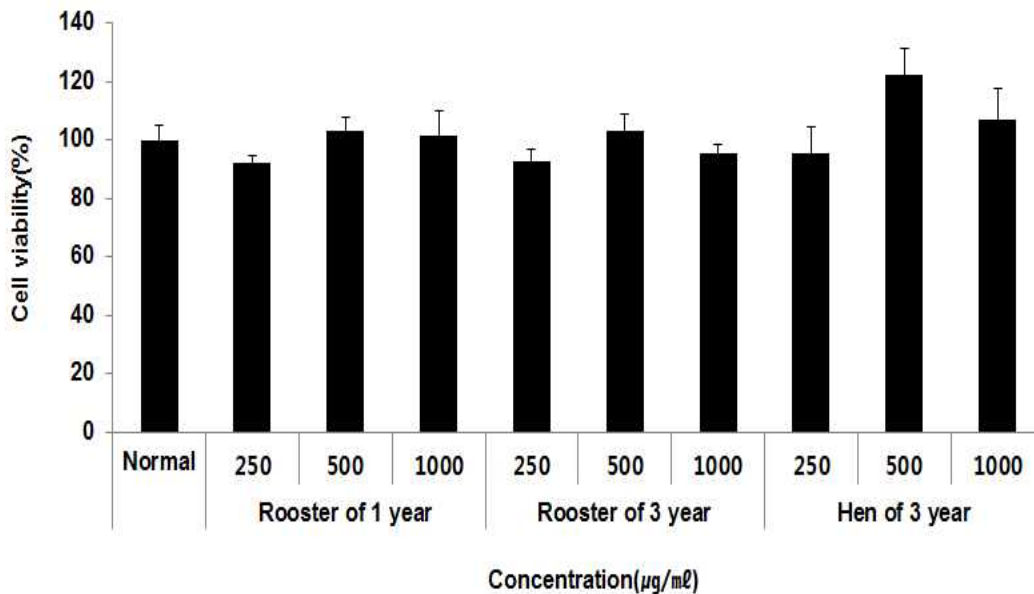


Fig. 8. Cell viability of the thigh peptide extracts of year and sex condition in MG-63 cells as determined using the MTT assay. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g/ml}$) of thigh peptide extracts of year and sex condition for 24hr. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(4) 가슴살 펩타이드 추출물

조골세포에서 연산오계 가슴살 펩타이드 추출물에 대한 세포 독성을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $95.0 \pm 6.5\%$, $101.4 \pm 4.9\%$, $94.0 \pm 5.0\%$ 의 세포 생존율을 나타내었으며, 3년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $97.3 \pm 3.1\%$, $114.5 \pm 4.5\%$, $99.4 \pm 6.9\%$ 의 세포 생존율을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $98.4 \pm 7.9\%$, $105.1 \pm 5.7\%$, $99.7 \pm 13.2\%$ 의 세포 생존율을 나타내어 안전한 것으로 나타났다.

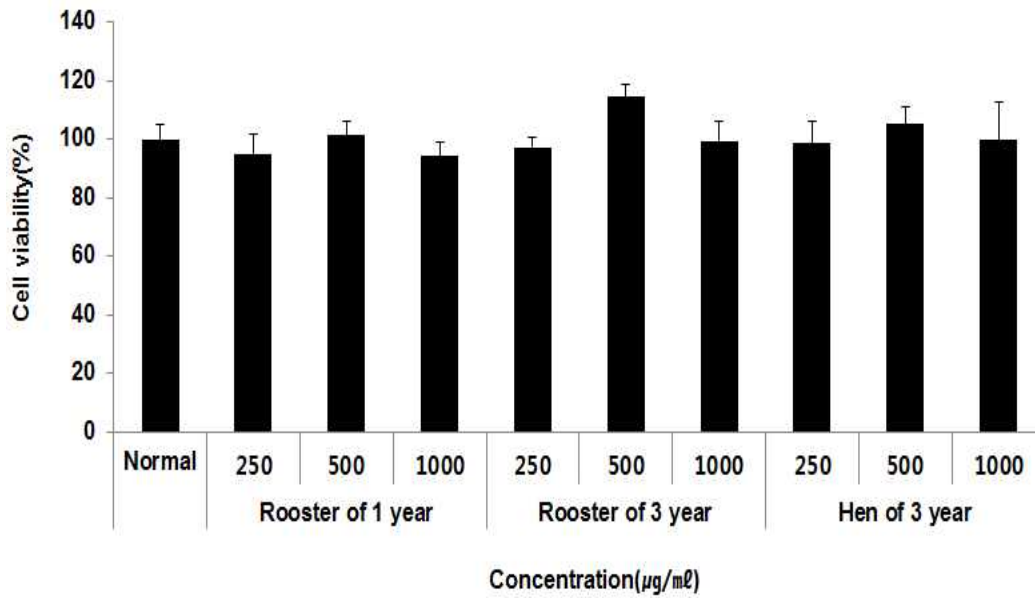


Fig. 9. Cell viability of the breast peptide extracts of year and sex condition in MG-63 cells as determined using the MTT assay. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g/ml}$) of breast peptide extracts of year and sex condition for 24hr. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(5) 날개살 펩타이드 추출물

조골세포에서 연산오계 날개살 펩타이드 추출물에 대한 세포 독성을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 3년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $96.0 \pm 4.2\%$, $104.4 \pm 1.2\%$, $98.7 \pm 2.5\%$ 의 세포 생존율을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $95.9 \pm 8.4\%$, $107.3 \pm 5.1\%$, $95.0 \pm 5.2\%$ 의 세포 생존율을 나타내어 안전한 것으로 나타났다.

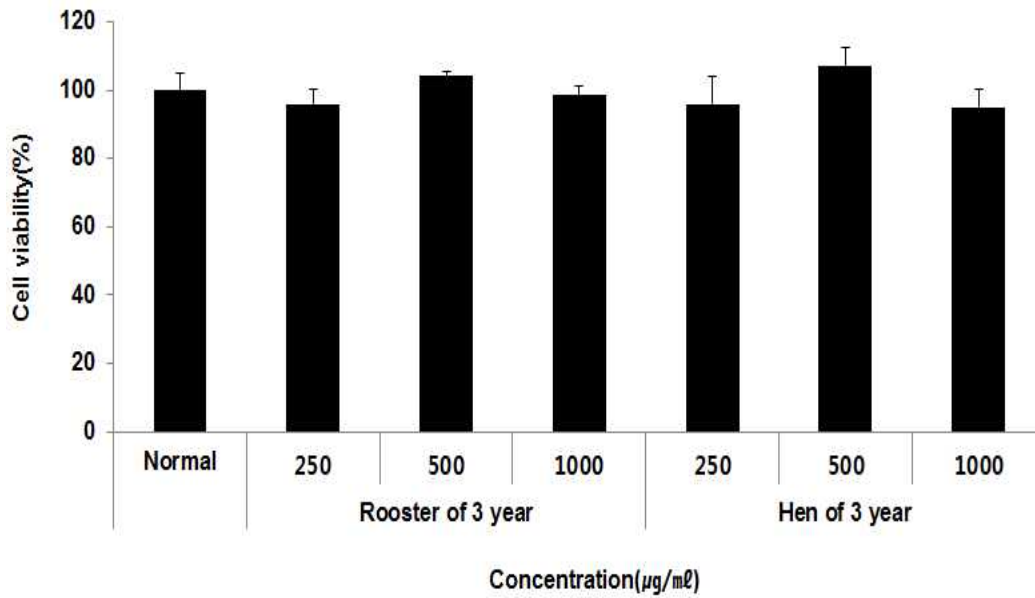


Fig. 10. Cell viability of the wings peptide extracts of year and sex condition in MG-63 cells as determined using the MTT assay. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of wings peptide extracts of year and sex condition for 24hr. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(6) 오계란 및 내장 펩타이드 추출물

조골세포에서 연산오계란 및 내장 펩타이드 추출물에 대한 세포 독성을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 오계란은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $99.3 \pm 3.0\%$, $108.5 \pm 6.8\%$, $94.5 \pm 7.5\%$ 의 세포 생존율을 나타내었으며, 3년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $101.6 \pm 9.2\%$, $112.0 \pm 6.9\%$, $98.6 \pm 9.8\%$ 의 세포 생존율을 나타내어 안전한 것으로 나타났다.

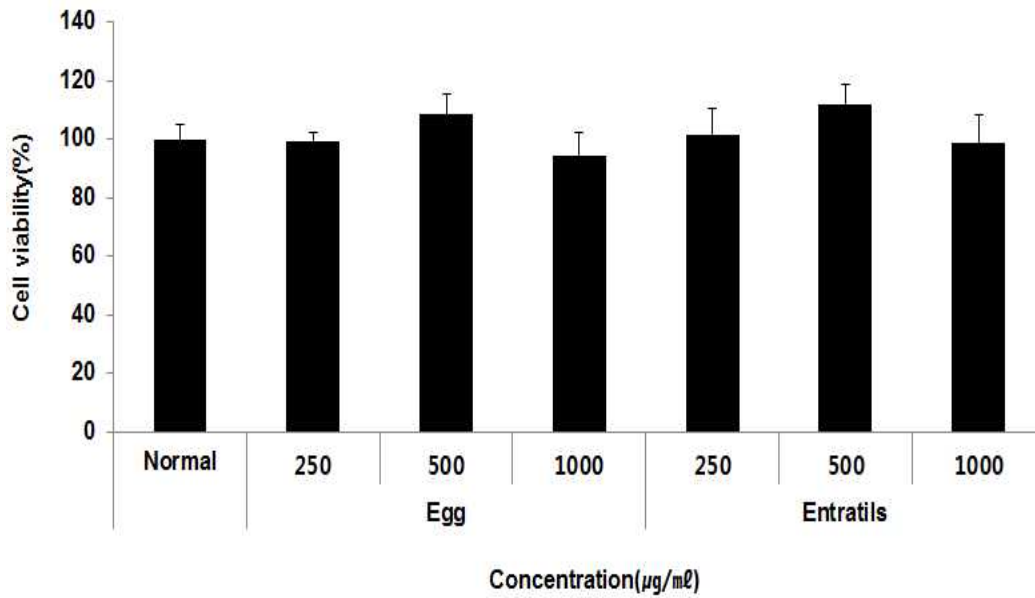


Fig. 11. Cell viability of the egg and entratils peptide extracts in MG-63 cells as determined using the MTT assay. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of egg and entratils peptide extracts for 24hr. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

다. 항산화 효능 측정

(1) DPPH radical scavenging

(가) 가슴살 펩타이드

연산오계 가슴살 펩타이드 추출물에 대한 DPPH 라디컬 소거능을 측정한 결과, 1년산 수탉은 10, 20, 30, 40, 50 (mg/ml) 농도에서 $12.3\pm 0.7\%$, $16.4\pm 2.0\%$, $32.4\pm 0.7\%$, $55.1\pm 3.6\%$, $59.3\pm 1.5\%$ 의 라디컬 소거능을 나타내었으며, 3년산 수탉은 10, 20, 30, 40, 50 (mg/ml) 농도에서 $4.7\pm 0.6\%$, $14.5\pm 4.1\%$, $27.0\pm 3.3\%$, $50.6\pm 8.0\%$, $59.2\pm 4.9\%$ 의 라디컬 소거능을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉은 10, 20, 30, 40, 50 (mg/ml) 농도에서 $6.6\pm 0.6\%$, $14.7\pm 0.1\%$, $25.9\pm 1.0\%$, $57.8\pm 2.5\%$, $76.8\pm 1.0\%$ 의 라디컬 소거능을 나타내어 농도 의존적으로 라디컬 소거능이 증가하였다. 이와 같은 결과는 3년산 암탉의 50 mg/ml 의 농도는 1년산과 3년산 수탉의 결과에 비해 높은 라디컬 소거능을 나타내어, 노화 및 조직 손상 등과 관련된 제품 개발에 있어 효과적일 것이라 사료되는 바이다.

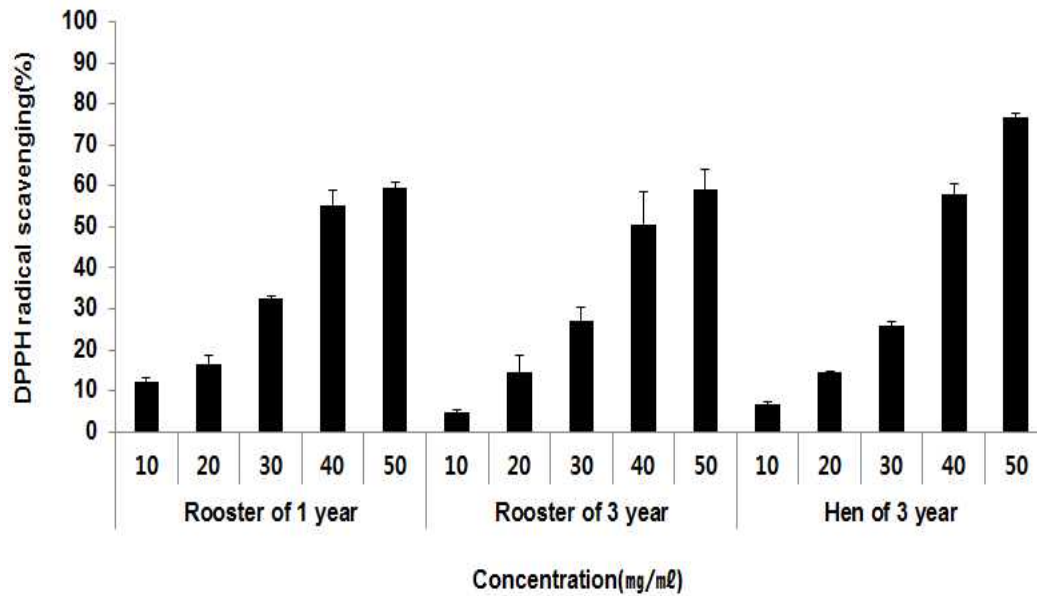


Fig. 12. DPPH free radical scavenging activity of the breast peptide extracts at various concentration. Extract was incubated with DPPH solution at 37°C for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(나) 날개살 펩타이드 추출물

연산오계 날개살 펩타이드 추출물에 대한 DPPH 라디컬 소거능을 측정한 결과, 3년산 수탉은 10, 20, 30, 40, 50 (mg/ml) 농도에서 6.6 \pm 3.1%, 12.3 \pm 0.6%, 31.4 \pm 2.5%, 61.2 \pm 3.1%, 76.7 \pm 3.2%의 라디컬 소거능을 나타내었으며, 3년산 암탉은 10, 20, 30, 40, 50 (mg/ml) 농도에서 2.1 \pm 0.9%, 6.4 \pm 1.3%, 12.7 \pm 0.8%, 55.5 \pm 3.0%, 73.7 \pm 1.6%의 라디컬 소거능을 나타내어 농도 의존적으로 라디컬 소거능이 증가하였다.

이와 같은 결과는 날개살 펩타이드 추출물은 성별간의 차이는 거의 나타나지 않았으며, 가슴살 펩타이드 추출물 중 가장 높은 DPPH 라디컬 소거능을 나타낸 3년산 암탉의 50 mg/ml 농도와 비교하였을 때도 비슷한 결과가 나타났다. 즉, 날개살 펩타이드 추출물 역시 노화 및 조직 손상 등과 관련된 제품 개발에 있어 효과적일 것이라 사료되는 바이다.

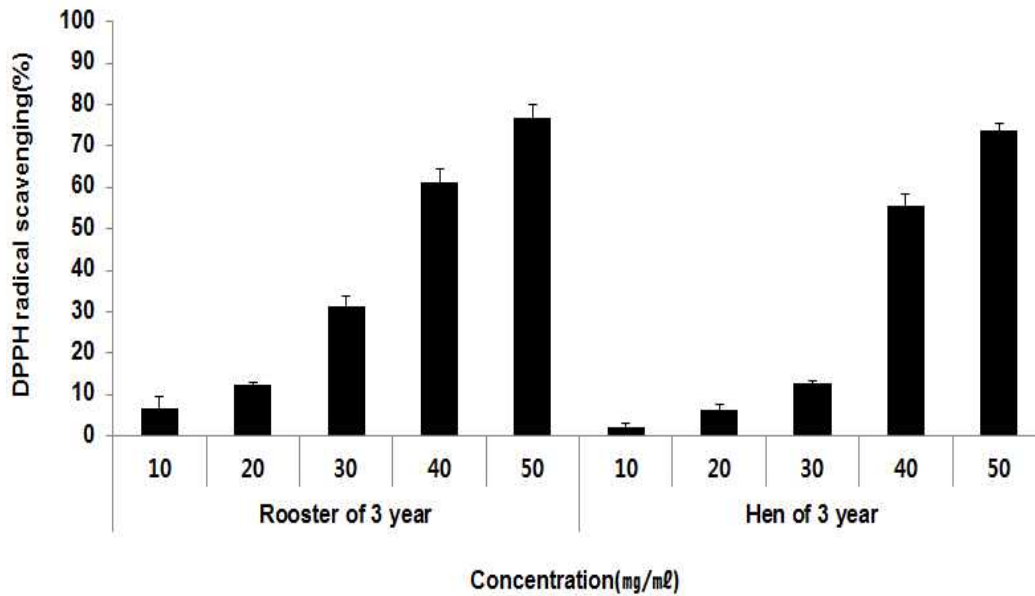


Fig. 13. DPPH free radical scavenging activity of the wings peptide extracts at various concentration. Extract was incubated with DPPH solution at 37°C for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(2) ABTS radical scavenging

(가) 가슴살 펩타이드 추출물

연산오계 가슴살 펩타이드 추출물에 대한 ABTS 라디컬 소거능을 측정한 결과, 1년산 수탉은 10, 20, 30, 40, 50 (mg/ml) 농도에서 27.0 \pm 1.2%, 46.7 \pm 3.5%, 49.6 \pm 6.0%, 52.5 \pm 1.7%, 56.5 \pm 3.6%의 라디컬 소거능을 나타내었으며, 3년산 수탉은 10, 20, 30, 40, 50 (mg/ml) 농도에서 33.9 \pm 0.9%, 48.6 \pm 2.0%, 54.1 \pm 5.2%, 59.6 \pm 4.0%, 67.6 \pm 1.1%의 라디컬 소거능을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉은 10, 20, 30, 40, 50 (mg/ml) 농도에서 29.0 \pm 2.7%, 51.7 \pm 1.9%, 51.7 \pm 3.3%, 50.9 \pm 1.6%, 56.2 \pm 6.0%의 라디컬 소거능을 나타내어 농도 의존적으로 라디컬 소거능이 증가하였다. 이와 같은 결과는 가슴살 펩타이드 추출물의 성별과 연식간의 차이가 거의 나타나지 않았다. DPPH 라디컬 소거능과 비교하였을 때, 낮은 농도에서 ABTS 소거능이 더 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 이는 radical 소거능이라는 점에서는 같으나 DPPH 경우는 free radical 이지만 ABTS는 cation radical이라는 점에서, 또는 페놀성 물질의 종류가 다름에 따라 두 기질에 결합하는 정도가 다르고, radical을 제거하는 기작이 다르다는 점에서 활성이 더 높게 나타난 것으로 판단된다.

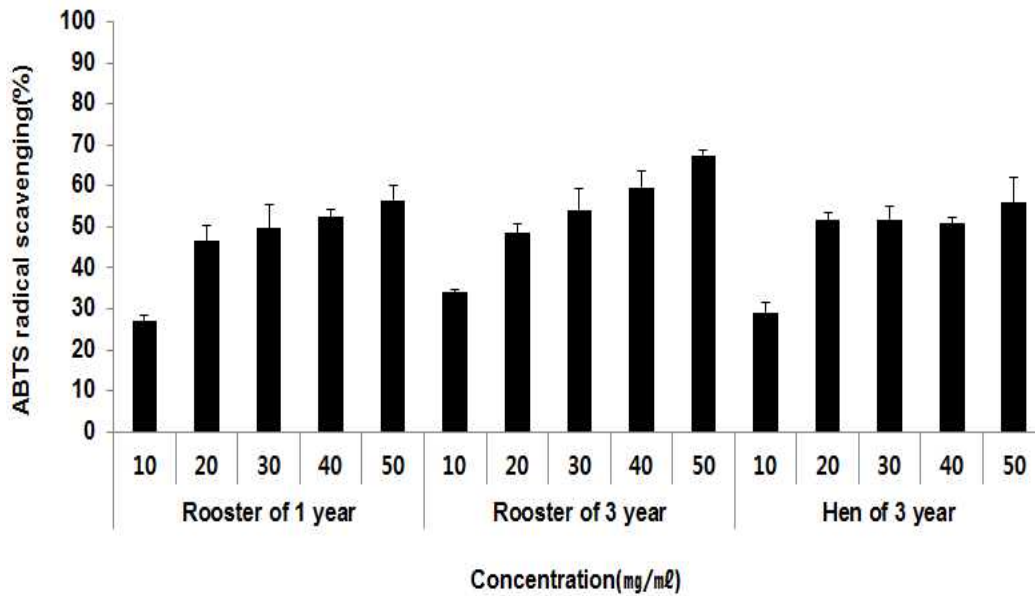


Fig. 14. ABTS cation radical scavenging activity of the breast peptide extracts at various concentration. Extract was incubated with ABTS solution at 37°C for 10 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 732 nm. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments.

(나) 날개살 펩타이드 추출물

연산오계 날개살 펩타이드 추출물에 대한 ABTS 라디컬 소거능을 측정한 결과, 3년산 수탉은 10, 20, 30, 40, 50 (mg/ml) 농도에서 37.3±1.8%, 53.5±5.7%, 66.0±1.6%, 64.6±0.8%, 72.4±0.6%의 라디컬 소거능을 나타내었으며, 3년산 암탉은 10, 20, 30, 40, 50 (mg/ml) 농도에서 32.7±5.7%, 54.1±2.6%, 52.8±2.3%, 67.2±6.4%, 70.1±6.1%의 라디컬 소거능을 나타내어 농도 의존적으로 라디컬 소거능이 증가하였다. 이와 같은 결과는 날개살 펩타이드 추출물은 성별간의 차이는 거의 나타나지 않았으며, 가슴살 펩타이드 추출물과 마찬가지로 낮은 농도에서 DPPH 라디컬 소거능의 결과보다 높은 결과가 나타났다.

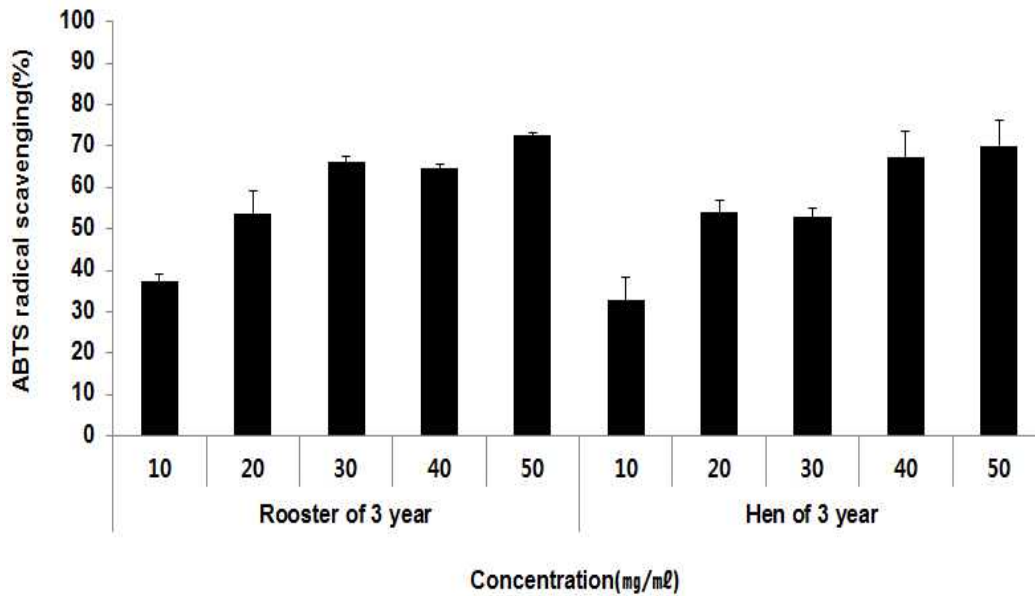


Fig. 15. ABTS cation radical scavenging activity of the wings peptide extracts at various concentration. Extract was incubated with ABTS solution at 37°C for 10 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 732 nm. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(3) ROS 생성량

(가) 뼈 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 ROS 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 8.1\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $234.6 \pm 1.1\%$, $136.2 \pm 1.2\%$, $103.6 \pm 2.0\%$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $120.6 \pm 7.2\%$, $138.1 \pm 11.1\%$, $114.2 \pm 3.2\%$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $138.1 \pm 11.1\%$, $74.4 \pm 17.1\%$, $66.5 \pm 5.2\%$ 의 생성을 나타내어 3년산 암탉의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 (** : $p < 0.01$) 감소를 나타내었다. 이와 같은 결과는 3년산 암탉의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 활성산소의 유의성 있는 감소 효능을 바탕으로 활성 산소와 연관된 다양한 건강 기능 식품의 천연 재료로써 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

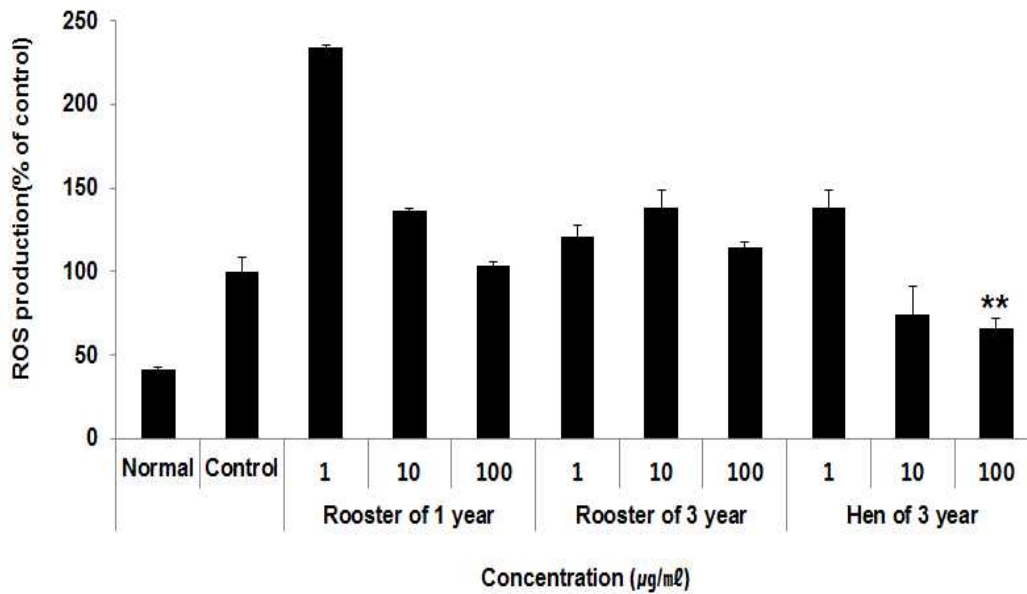


Fig. 16. Reactive oxygen species production of the bone extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the ROS assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of bone extract and LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The ROS production was analyzed by flow cytometry. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, ** : $p < 0.01$).

(나) 살 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 살 추출물의 ROS 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 8.1\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $91.8 \pm 10.3\%$, $108.2 \pm 8.1\%$, $179.1 \pm 1.2\%$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $108.6 \pm 12.7\%$, $130.1 \pm 9.7\%$, $110.8 \pm 2.6\%$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $120.1 \pm 10.9\%$, $104.5 \pm 3.1\%$, $107.2 \pm 3.0\%$ 의 생성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 1년산 및 3년산 수탉과 3년산 암탉의 살 추출물은 성별과 연식간의 ROS 생성량에 있어 차이를 나타내지 않았다.

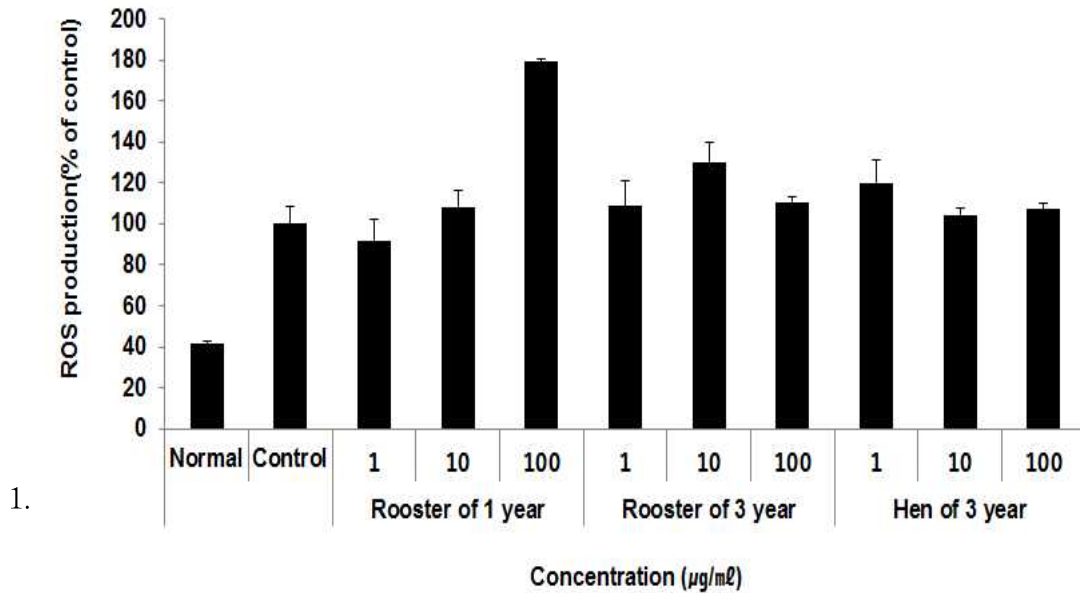


Fig. 17. Reactive oxygen species production of the meat extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the ROS assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of meat extract and LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The ROS production was analyzed by flow cytometry. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(다) 껍질 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 ROS 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 3.2\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $87.3 \pm 11.5\%$, $68.2 \pm 3.1\%$, $58.5 \pm 0.8\%$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $43.8 \pm 9.1\%$, $56.1 \pm 8.1\%$, $43.4 \pm 1.7\%$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $81.7 \pm 7.8\%$, $70.3 \pm 17.6\%$, $82.8 \pm 5.8\%$ 의 생성을 나타내어 1년산 수탉의 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도와 3년산 수탉의 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도, 3년산 암탉의 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 유의성 있는 (***) : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$) 감소를 나타내었다. 이와 같은 결과는 1년산 및 3년산 수탉과 3년산 암탉의 껍질 추출물이 뼈와 살의 추출물과 비교하였을 때, 매우 우수한 활성산소를 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 상기한 활성산소 저해 효과는 산화적 손상이 노화를 비롯하여 암, 심혈관계 질환 유발에 기본적인 병리인자라는 점에서 오계의 껍질이 항산화 식품으로써 활용될 수 있음을 시사해주고 있으며, 실제로 오계를 활용하여 다양한 건강식품들이 개발된 예는 이를 증명해주고 있다. 아울러 오계의 항산화 효능에 대한 객관적인 효능 결과는 본 연구의 목적 중 하나인 노인 허약자 및 암환자의 식이를 개발하는데 있어 기초적 자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

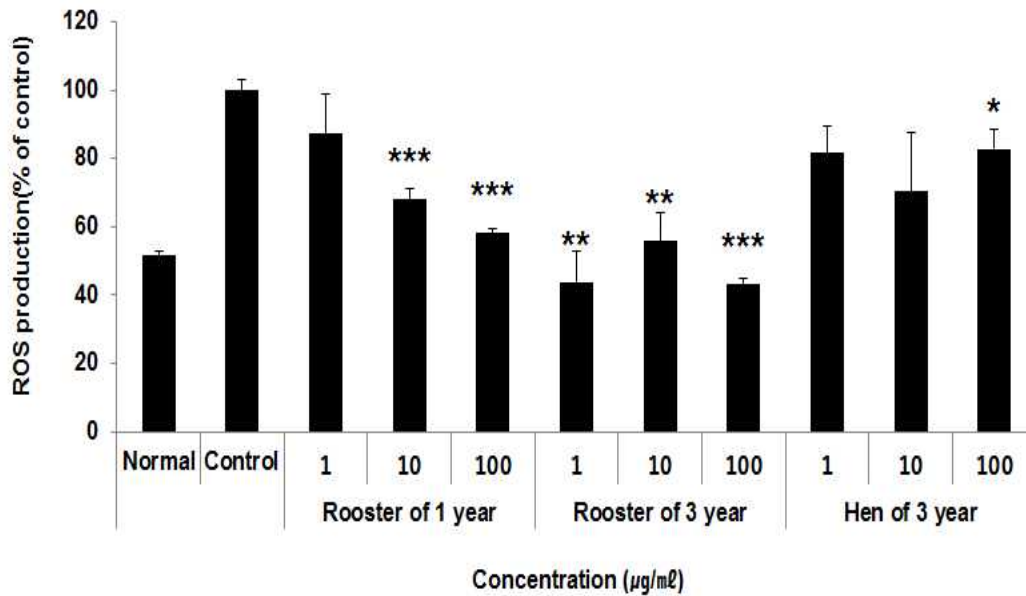


Fig. 18. Reactive oxygen species production of the skin extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the ROS assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of skin extract and LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24hr. The ROS production was analyzed by flow cytometry. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, *** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

(라) 다리살 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 가슴살 펩타이드 추출물의 ROS 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 3.0\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $85.4 \pm 2.1\%$, $76.1 \pm 2.7\%$, $83.7 \pm 1.1\%$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $102.7 \pm 4.2\%$, $110.9 \pm 6.6\%$, $113.8 \pm 8.7\%$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $80.4 \pm 1.2\%$, $75.0 \pm 3.1\%$, $73.2 \pm 4.1\%$ 의 생성을 나타내어 1년산 수탉의 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도와 3년산 암탉의 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 유의성 있는 (** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$) 감소를 나타내었다.

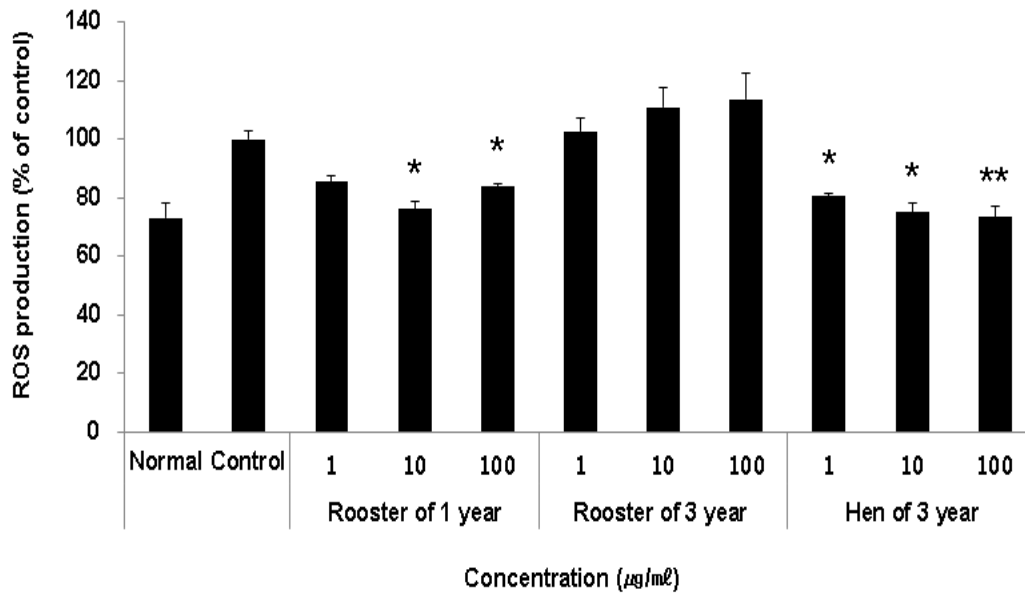


Fig. 19. Reactive oxygen species production of the thigh peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the ROS assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of thigh peptide extract and LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The ROS production was analyzed by flow cytometry. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

(마) 가슴살 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 가슴살 펩타이드 추출물의 ROS 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 3.2\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $78.0 \pm 2.1\%$, $81.7 \pm 3.7\%$, $86.8 \pm 1.9\%$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $101.5 \pm 3.1\%$, $87.1 \pm 4.6\%$, $94.7 \pm 1.5\%$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $100.3 \pm 9.9\%$, $87.7 \pm 4.5\%$, $68.3 \pm 5.6\%$ 의 생성을 나타내어 1년산 수탉의 1, 10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도와 3년산 암탉의 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 유의성 있는 (** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$) 감소를 나타내었다.

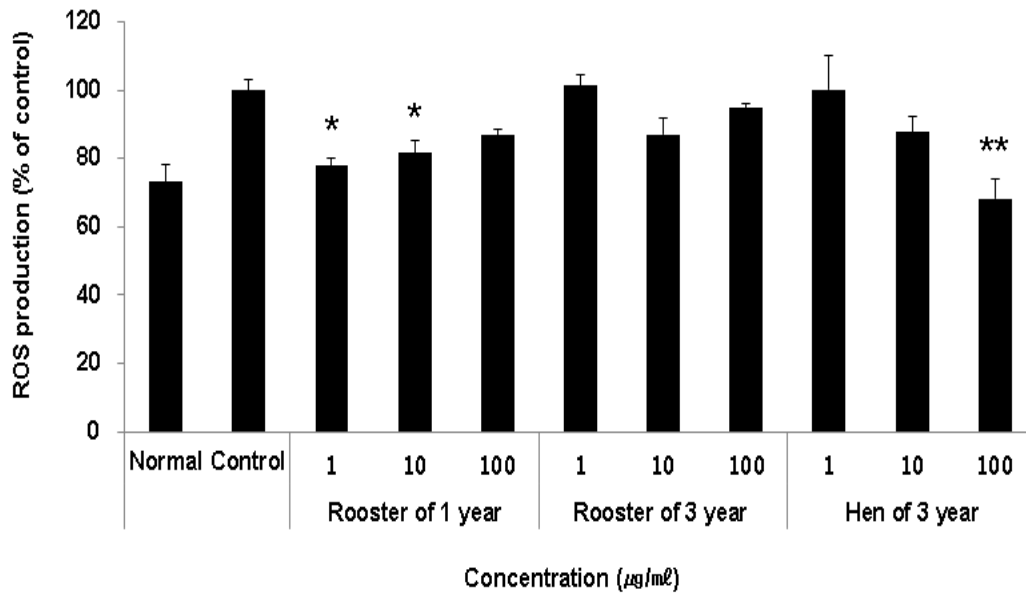


Fig. 20. Reactive oxygen species production of the breast peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the ROS assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of breast peptide extract and LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for 24hr. The ROS production was analyzed by flow cytometry. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

(바) 날개살 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 날개살 펩타이드 추출물의 ROS 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 3.0\%$ 로 나타냈을 때 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $109.2 \pm 9.0\%$, $108.6 \pm 10.9\%$, $100.4 \pm 7.6\%$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $95.3 \pm 1.0\%$, $104.1 \pm 3.7\%$, $109.4 \pm 1.7\%$ 의 생성을 나타내었다.

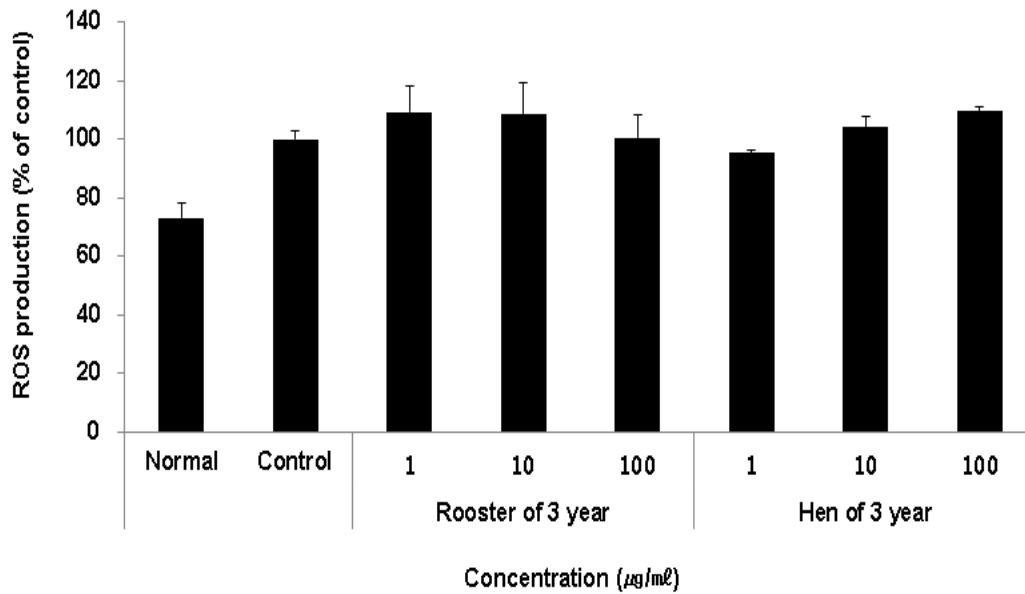


Fig. 21. Reactive oxygen species production of the skin extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the ROS assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of skin extract and LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The ROS production was analyzed by flow cytometry. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, *** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

(사) 오계란 및 내장 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계란 및 내장 펩타이드 추출물의 ROS 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 3.0\%$ 로 나타냈을 때 오계란은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $78.3 \pm 5.5\%$, $75.8 \pm 4.1\%$, $61.9 \pm 2.0\%$ 의 생성을 나타내었으며, 내장은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $79.3 \pm 2.0\%$, $76.7 \pm 5.3\%$, $61.0 \pm 0.3\%$ 의 생성을 나타내어 오계란의 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도와 내장의 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 유의성 있는 (***) : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$) 감소를 나타내었다. 이와 같은 결과는 오계란과 내장 펩타이드 추출물이 매우 우수한 활성산소를 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 오계란과 내장 펩타이드 추출물은 항산화 제품의 기능성 소재로서의 활용 가치가 높을 것이라 사료되는 바이다.

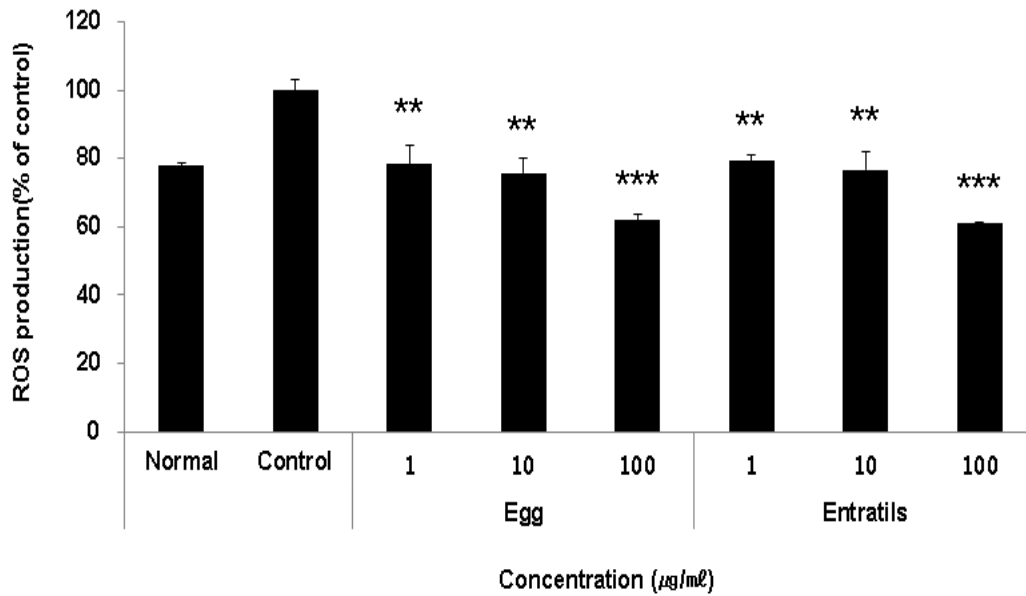


Fig. 22. Reactive oxygen species production of the egg and entrails extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the ROS assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of egg and entrails extract and LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for 24hr. The ROS production was analyzed by flow cytometry. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, *** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$).

라. 항염증 효능

(1) NO 생성량

(가) 뼈 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 NO 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 4.6\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $72.8 \pm 2.4\%$, $84.3 \pm 1.1\%$, $94.1 \pm 2.3\%$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $97.2 \pm 2.2\%$, $102.0 \pm 4.1\%$, $88.0 \pm 4.3\%$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $96.0 \pm 5.3\%$, $97.4 \pm 6.0\%$, $82.6 \pm 10.6\%$ 의 생성을 나타내어 1년산 수탉의 1, 10 ($\mu\text{g/ml}$) 농도와 3년산 수탉의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도, 3년산 암탉의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 (***) : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$) 감소를 나타내었다. 이와 같은 결과는 ROS와 NO 생성량에 대한 연구 결과가 서로 상반된 결과를 나타내었는데, 이는 연산오계의 뼈 추출물은 대식세포가 LPS를 통해 염증 반응을 일으킴에 따라 식균작용을 위해 활성산소를 많이 분비해 NO 생성량 감소에 영향을 주었다고 사료된다.

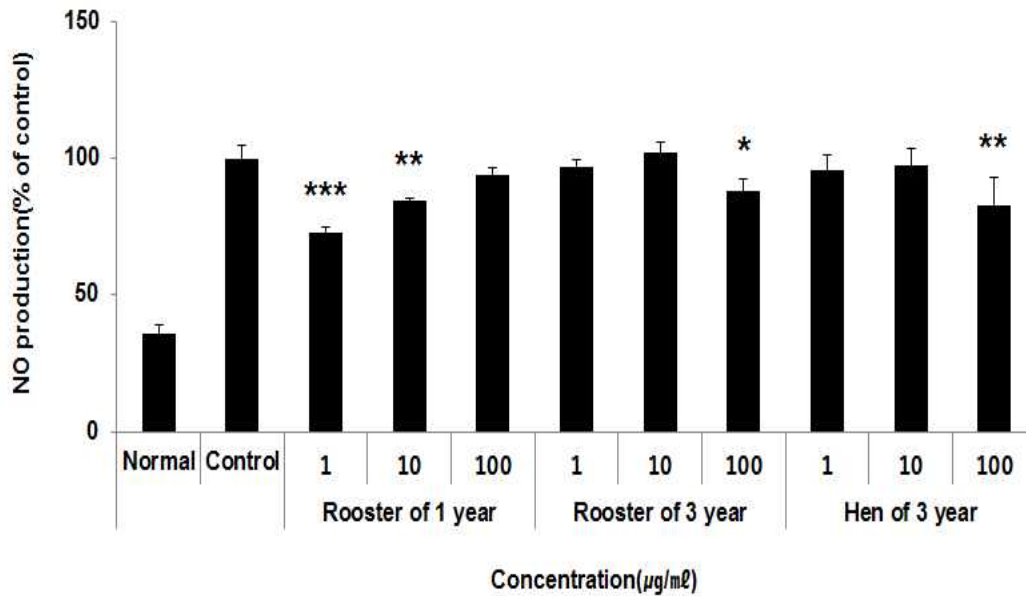


Fig. 23. Nitric oxide production of the bone extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the NO assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of bone extract and LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24hr. The NO production was analyzed by ELISA reader. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, *** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

(나) 살 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 NO 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 2.1\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $110.0 \pm 1.0\%$, $110.4 \pm 2.2\%$, $76.6 \pm 3.5\%$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $94.6 \pm 9.2\%$, $101.3 \pm 2.8\%$, $97.1 \pm 14.3\%$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $104.2 \pm 4.5\%$, $96.0 \pm 6.6\%$, $90.3 \pm 5.4\%$ 의 생성을 나타내어 1년산 수탉의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 (** : $p < 0.01$) 감소를 나타내었다. 이와 같은 결과는 1년산 수탉을 통해 피부 질환, 혈관 및 혈압 등의 염증과 관련된 다양한 기능성 소재로써 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

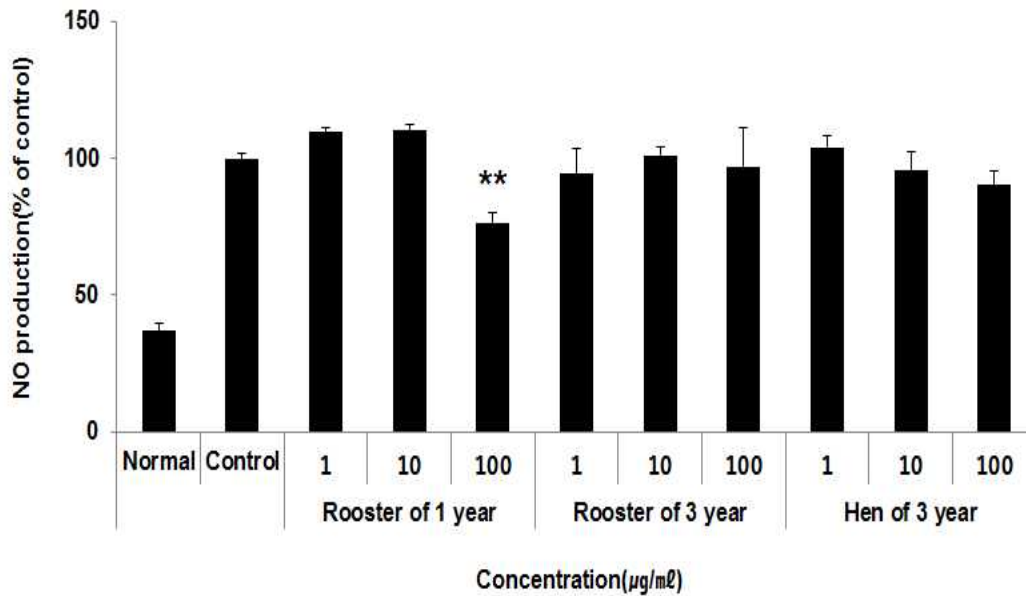


Fig. 24. Nitric oxide production of the meat extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the NO assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of meat extract and LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The NO production was analyzed by ELISA reader. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, ** : $p < 0.01$).

(다) 껍질 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 NO 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 2.8\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $92.0 \pm 1.5\%$, $96.0 \pm 2.0\%$, $85.3 \pm 4.8\%$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $98.7 \pm 2.1\%$, $99.1 \pm 6.0\%$, $91.3 \pm 3.1\%$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $100.8 \pm 4.9\%$, $98.3 \pm 2.5\%$, $83.8 \pm 5.0\%$ 의 생성을 나타내어 1년산 수탉의 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도와 3년산 암탉의 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 유의성 있는 (* : $p < 0.05$) 감소를 나타내었다. 이와 같은 결과는 뼈와 살 추출물과 마찬가지로 1년산 수탉과 3년산 암탉을 이용하여 NO와 관련된 다양한 질환과 증상에 있어 다양한 기능성 소재로서의 가능성을 시사하고 있다.

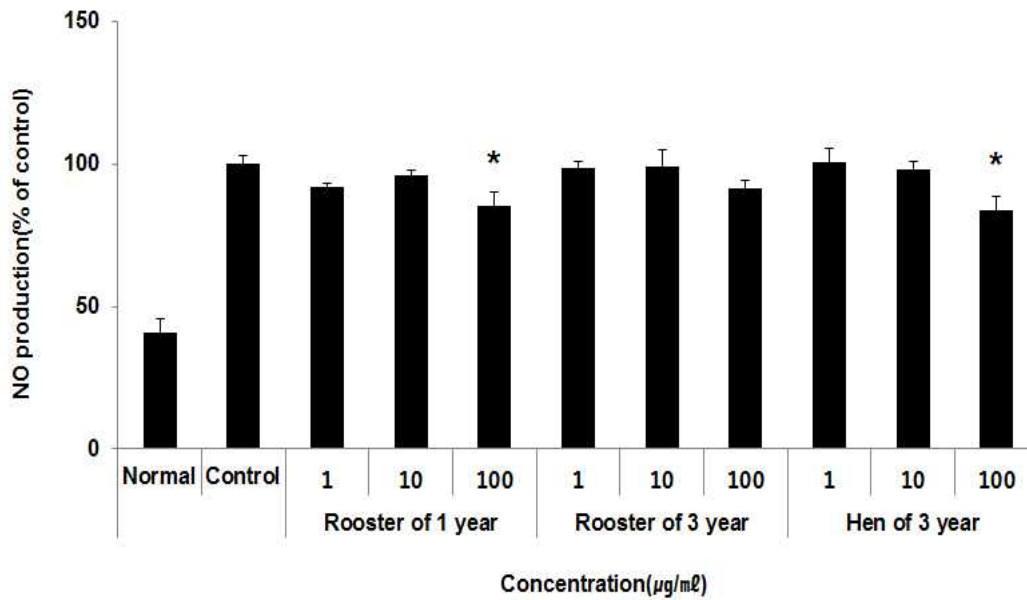


Fig. 25. Nitric oxide production of the skin extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the NO assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of skin extract and LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The NO production was analyzed by ELISA reader. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, * : $p < 0.05$).

(2) 사이토카인 생성량

(가) IL-6

① 뼈 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $12347.8 \pm 2525.4 \text{ pg}/\text{ml}$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $13799.9 \pm 1256.4 \text{ pg}/\text{ml}$, $12274.9 \pm 457.1 \text{ pg}/\text{ml}$, $11914.8 \pm 1952.4 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $11407.9 \pm 1925.9 \text{ pg}/\text{ml}$, $11304.1 \pm 1558.9 \text{ pg}/\text{ml}$, $9838.3 \pm 1257.9 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $12343.8 \pm 960.1 \text{ pg}/\text{ml}$, $12462.9 \pm 1148.0 \text{ pg}/\text{ml}$, $11634.9 \pm 527.4 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었다.

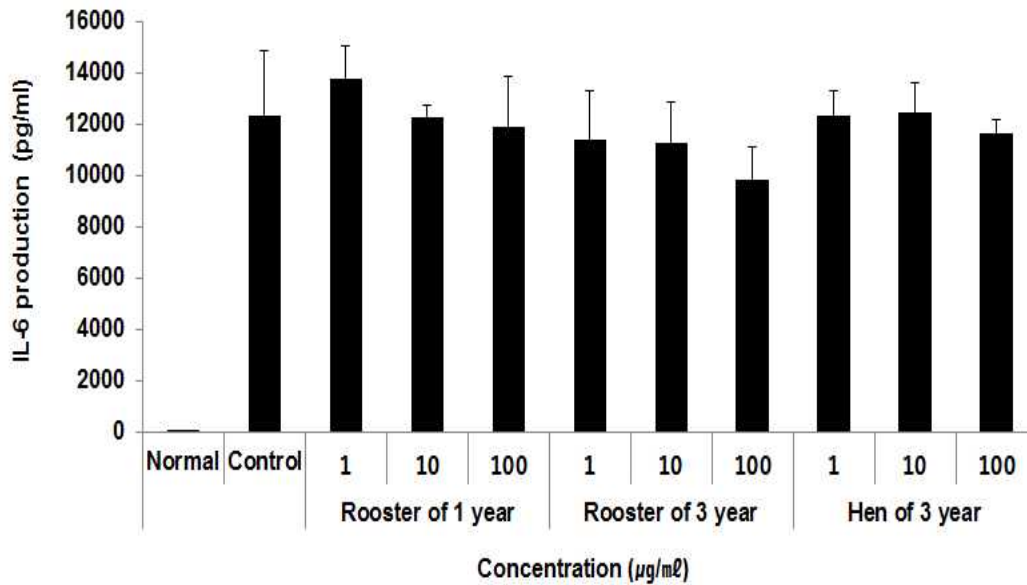


Fig. 26. IL-6 production of the bone extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of bone extract and LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24hr. The IL-6 production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

② 살 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $12347.8 \pm 2525.4 \text{ pg/ml}$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $12152.6 \pm 2519.6 \text{ pg/ml}$, $13503.3 \pm 1887.6 \text{ pg/ml}$, $18820.6 \pm 2509.2 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $7823.0 \pm 1363.6 \text{ pg/ml}$, $7161.5 \pm 1132.6 \text{ pg/ml}$, $6556.6 \pm 1335.1 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $11168.1 \pm 1373.6 \text{ pg/ml}$, $8627.0 \pm 1555.6 \text{ pg/ml}$, $8372.5 \pm 1103.6 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내어 3년산 수탉의 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도와 3년산 암탉의 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 유의성 있는 (** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$) 감소를 나타내었다. 이와 같은 결과는 3년산 수탉과 3년산 암탉이 IL-6의 조절을 통해 염증성 질환의 환자의 식이 또는 다양한 형태의 제품에 대한 소재로써 활용될 수 있음을 시사하고 있다.

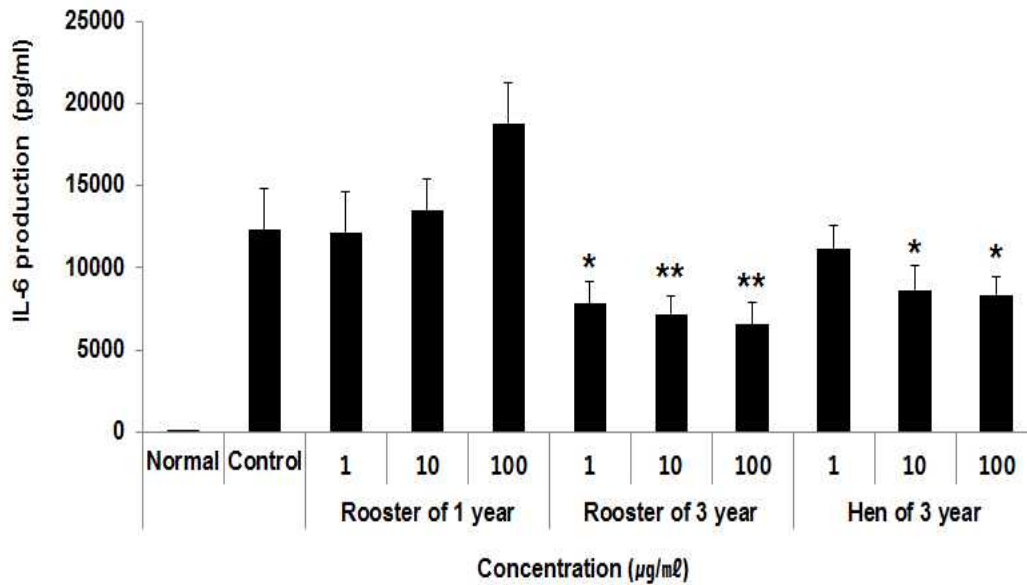


Fig. 27. IL-6 production of the meat extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of meat extract and LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for 24hr. The IL-6 production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

③ 껍질 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군을 12347.8 ± 2525.4 pg/ml로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 7564.1 ± 1988.5 pg/ml, 7203.0 ± 1642.0 pg/ml, 7751.3 ± 106.7 pg/ml의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 7961.8 ± 1328.3 pg/ml, 7315.5 ± 1803.8 pg/ml, 5134.6 ± 404.9 pg/ml의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 8875.0 ± 2460.1 pg/ml, 7908.5 ± 702.3 pg/ml, 7325.5 ± 1845.8 pg/ml의 생성을 나타내어 1년산 수탉의 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도와 3년산 수탉의 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도, 3년산 암탉의 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 유의성 있는 (** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$) 감소를 나타내었다. 이와 같은 결과는 연산오계의 살과 마찬가지로 껍질이 급성 염증기 또는 만성기 직전의 염증기 병변에 있어 효과적인 소재가 될 수 있으며, 환자 식이로써 유용한 소재가 될 수 있다고 사료된다.

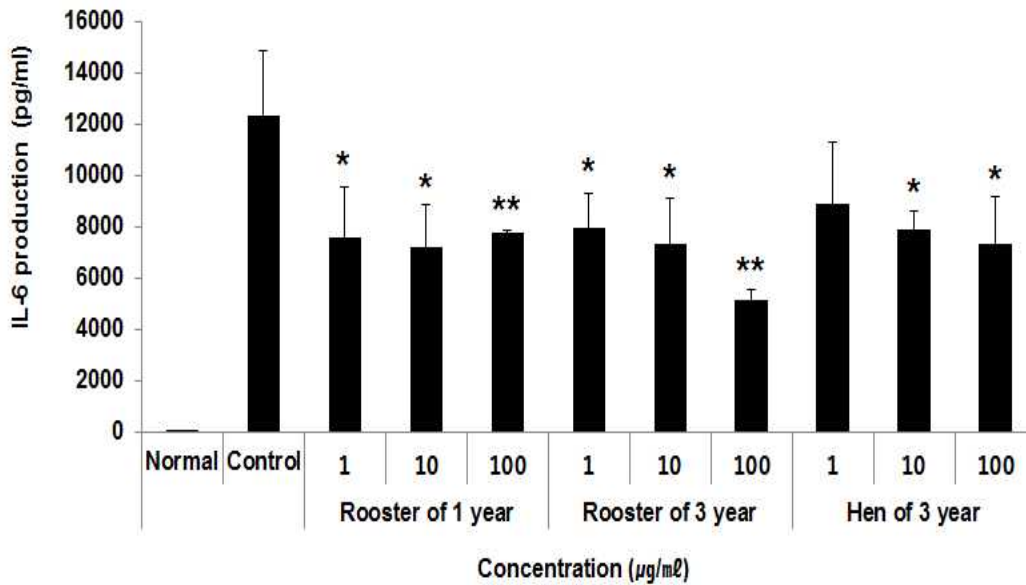


Fig. 28. IL-6 production of the skin extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of skin extract and LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24hr. The IL-6 production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

④ 다리살 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 다리살 펩타이드 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $92.3 \pm 0.6 \text{ pg/ml}$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $35.8 \pm 2.3 \text{ pg/ml}$, $45.8 \pm 1.0 \text{ pg/ml}$, $33.7 \pm 0.8 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $57.0 \pm 0.3 \text{ pg/ml}$, $36.1 \pm 0.4 \text{ pg/ml}$, $62.3 \pm 2.4 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $58.4 \pm 1.7 \text{ pg/ml}$, $50.1 \pm 1.1 \text{ pg/ml}$, $86.3 \pm 1.6 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내어 1년산 수탉의 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도와 3년산 수탉의 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도, 3년산 암탉의 1, 10 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 유의성 있는 (***) : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$) 감소를 나타내었다. 이와 같은 결과는 연산오계의 다리살 펩타이드 추출물은 LPS로 유도 된 IL-6에 있어 뛰어난 감소가 나타나, IL-6와 관련된 질병에 있어 매우 효과적일 것이라 사료된다.

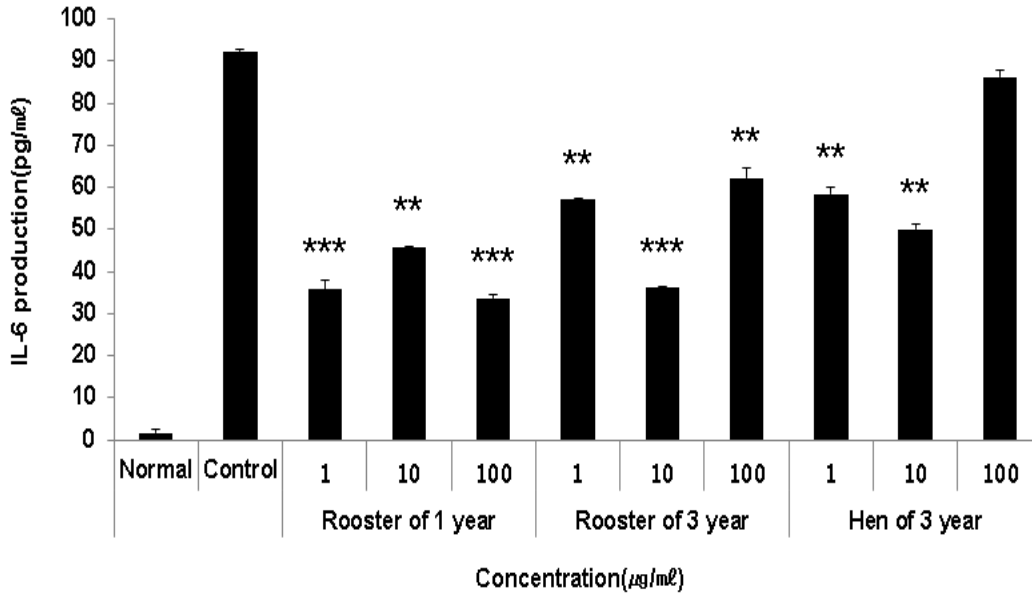


Fig. 29. IL-6 production of the thigh peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of thigh peptide extract and LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24hr. The IL-6 production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, *** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$).

⑤ 가슴살 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 가슴살 펩타이드 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $92.3 \pm 0.6 \text{ pg/ml}$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $52.6 \pm 1.8 \text{ pg/ml}$, $50.8 \pm 1.4 \text{ pg/ml}$, $44.0 \pm 0.4 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $53.1 \pm 1.0 \text{ pg/ml}$, $45.0 \pm 1.1 \text{ pg/ml}$, $35.3 \pm 1.5 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $57.2 \pm 2.1 \text{ pg/ml}$, $50.8 \pm 1.4 \text{ pg/ml}$, $95.6 \pm 0.3 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내어 1년산 수탉의 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도와 3년산 수탉의 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도, 3년산 암탉의 1, 10 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 유의성 있는 (*** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$) 감소를 나타내었다. 이와 같은 결과는 연산오계의 가슴살 펩타이드 추출물은 다리살 펩타이드 추출물과 마찬가지로 LPS로 유도 된 IL-6에 있어 뛰어난 감소가 나타나, IL-6와 관련된 질병에 있어 매우 효과적일 것이라 사료된다.

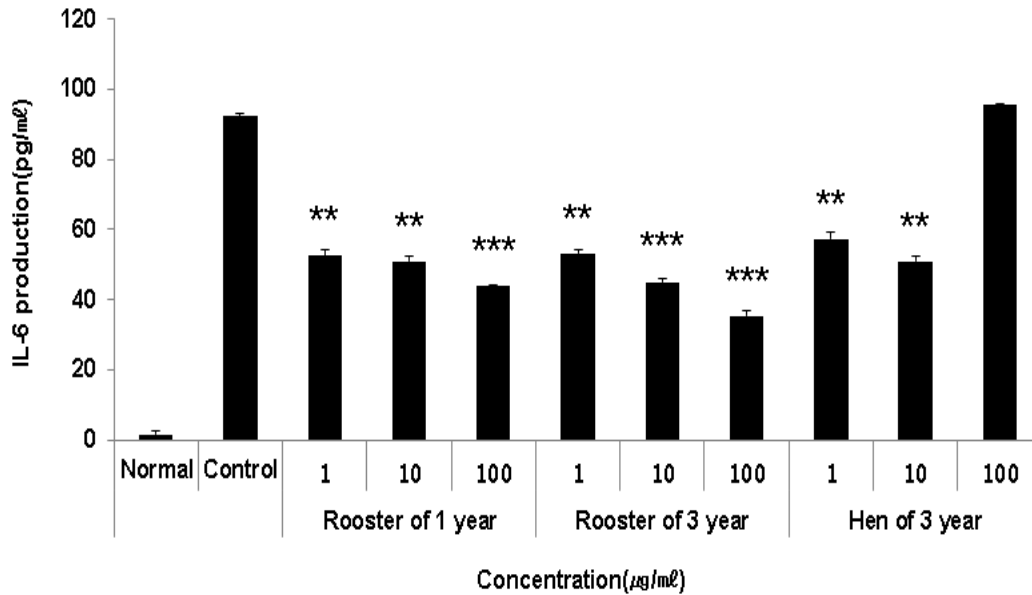


Fig. 30. IL-6 production of the breast peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of breast peptide extract and LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The IL-6 production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, *** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$).

⑥ 날개살 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 다리살 펩타이드 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $92.3 \pm 0.6 \text{ pg}/\text{ml}$ 로 나타냈을 때 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $46.0 \pm 2.5 \text{ pg}/\text{ml}$, $38.2 \pm 1.1 \text{ pg}/\text{ml}$, $61.8 \pm 1.7 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $54.8 \pm 1.4 \text{ pg}/\text{ml}$, $57.2 \pm 0.7 \text{ pg}/\text{ml}$, $106.2 \pm 0.6 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내어 3년산 수탉의 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도와 3년산 암탉의 1, 10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 유의성 있는 (***) : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$) 감소를 나타내었다. 이와 같은 결과는 연산오계의 날개살 펩타이드 추출물 역시 LPS로 유도 된 IL-6에 있어 뛰어난 감소가 나타나, IL-6와 관련된 질병에 있어 매우 효과적일 것이라 사료된다. 다만, 펩타이드 추출물의 모든 농도에서 뛰어난 감소가 나타난 것과는 달리 3년산 암탉의 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 감소가 나타나지 않은 점은 앞으로 심도있는 연구를 통해 밝혀내야 할 것이다.

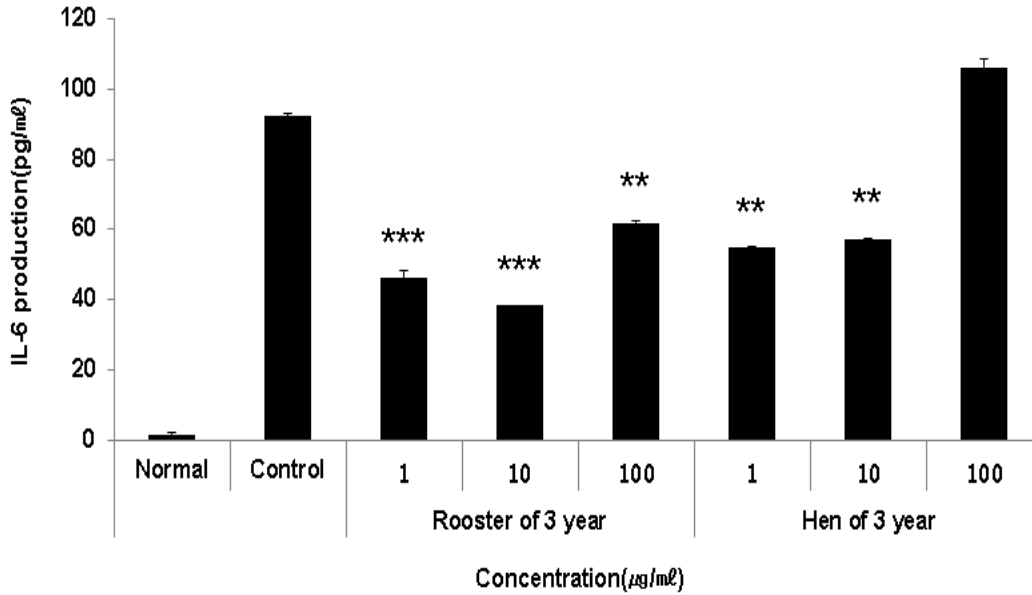


Fig. 31. IL-6 production of the wings peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of wings peptide extract and LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for 24hr. The IL-6 production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, *** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$).

⑦ 오계란 및 내장 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 오계란과 내장 펩타이드 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군을 92.3 ± 0.6 pg/ml로 나타냈을 때 오계란은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 51.8 ± 1.0 pg/ml, 75.2 ± 3.3 pg/ml, 34.7 ± 0.8 pg/ml의 생성을 나타내었으며, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 45.0 ± 1.1 pg/ml, 33.1 ± 1.5 pg/ml, 68.9 ± 1.0 pg/ml의 생성을 나타내어 오계란과 내장 펩타이드의 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 유의성 있는 (*** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$) 감소를 나타내었다. 이와 같은 결과는 연산오계의 오계란과 내장 펩타이드 추출물 역시 LPS로 유도 된 IL-6에 있어 뛰어난 감소가 나타나, IL-6와 관련된 질병에 있어 매우 효과적일 것이라 사료된다.

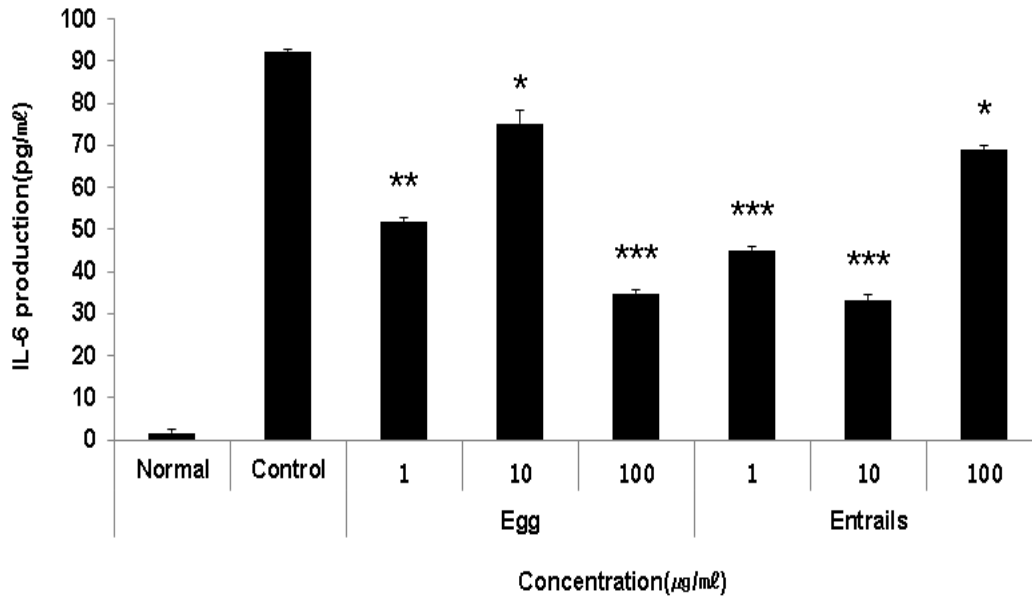


Fig. 32. IL-6 production of the egg and entrails peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of egg and entrails peptide extract and LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The IL-6 production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, *** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

(나) TNF- α 생성량

① 뼈 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $6925.7 \pm 576.8 \text{ pg}/\text{ml}$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $6973.1 \pm 482.2 \text{ pg}/\text{ml}$, $6779.8 \pm 257.1 \text{ pg}/\text{ml}$, $6762.4 \pm 402.9 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $6885.6 \pm 876.5 \text{ pg}/\text{ml}$, $6416.5 \pm 1502.4 \text{ pg}/\text{ml}$, $6012.9 \pm 782.9 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $6013.4 \pm 375.2 \text{ pg}/\text{ml}$, $5840.0 \pm 678.2 \text{ pg}/\text{ml}$, $5654.3 \pm 384.8 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내어 3년산 암탉의 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 유의성 있는 (* : $p < 0.05$) 감소를 나타내었다.

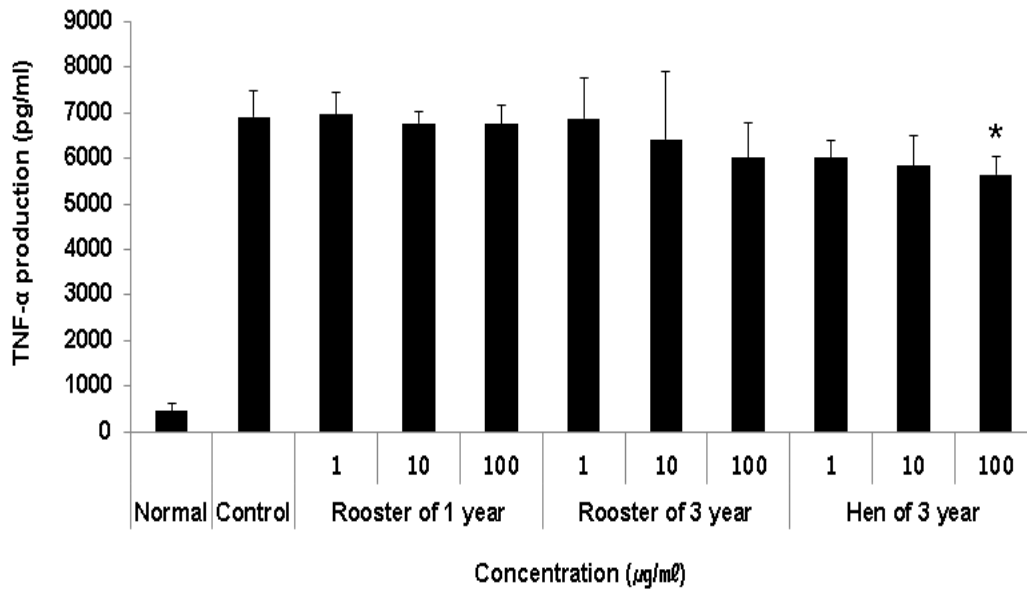


Fig. 33. TNF- α production of the bone extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of bone extract and LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The TNF- α production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, * : $p < 0.05$).

② 살 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $6925.7 \pm 576.8 \text{ pg}/\text{ml}$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $5683.9 \pm 579.4 \text{ pg}/\text{ml}$, $5479.6 \pm 777.6 \text{ pg}/\text{ml}$, $6143.3 \pm 251.8 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $6203.3 \pm 371.4 \text{ pg}/\text{ml}$, $6185.0 \pm 879.1 \text{ pg}/\text{ml}$, $6099.5 \pm 403.8 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $7470.6 \pm 556.1 \text{ pg}/\text{ml}$, $7230.5 \pm 428.0 \text{ pg}/\text{ml}$, $7654.1 \pm 472.6 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내어 1년산 수탉의 1, 10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 유의성 있는 (* : $p < 0.05$) 감소를 나타내었다. 이와 같은 결과는 1년산 수탉이 TNF- α 의 조절을 통해 염증성 질환의 환자의 식이 또는 다양한 형태의 제품에 대한 소재로써 활용될 수 있음을 시사하고 있다.

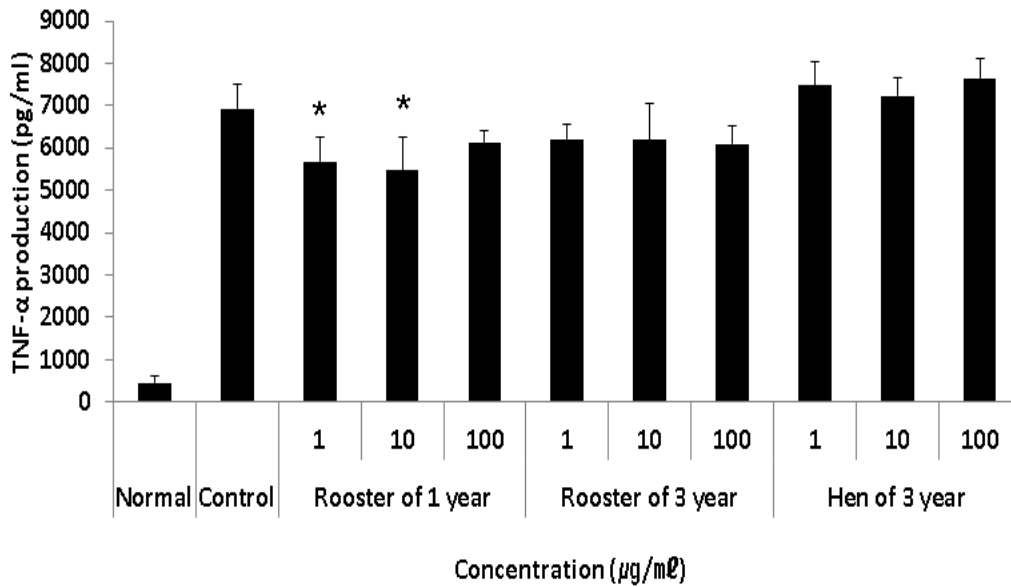


Fig. 34. TNF- α production of the meat extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of meat extract and LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The TNF- α production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

③ 껍질 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $6925.7 \pm 576.8 \text{ pg}/\text{ml}$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $7895.3 \pm 677.1 \text{ pg}/\text{ml}$, $7372.6 \pm 1183.7 \text{ pg}/\text{ml}$, $7655.0 \pm 351.9 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $7581.3 \pm 289.7 \text{ pg}/\text{ml}$, $7290.6 \pm 1080.8 \text{ pg}/\text{ml}$, $7276.3 \pm 386.9 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $7057.0 \pm 156.7 \text{ pg}/\text{ml}$, $7134.9 \pm 700.4 \text{ pg}/\text{ml}$, $7159.0 \pm 730.2 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었다.

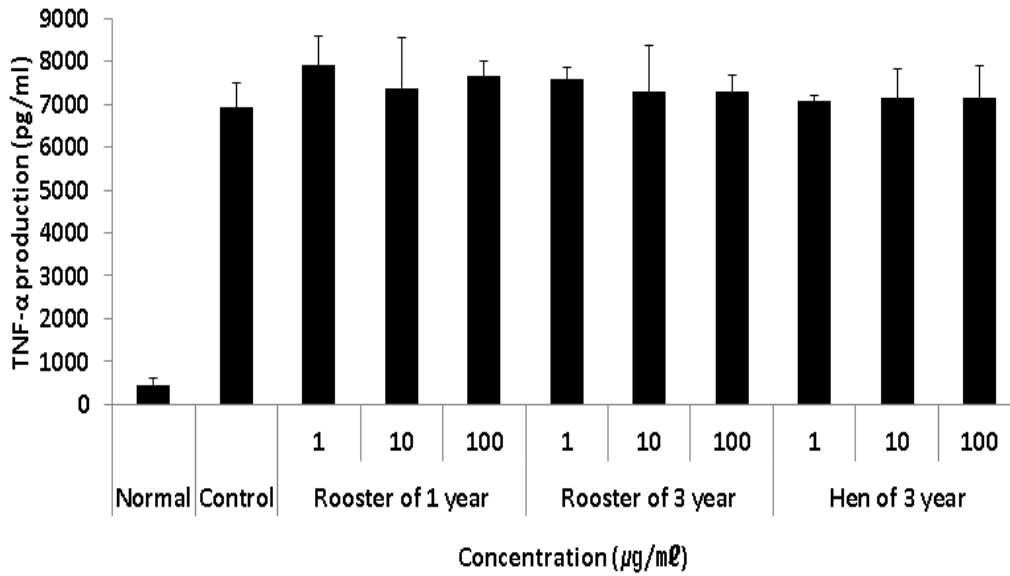


Fig. 35. TNF- α production of the skin extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of skin extract and LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24hr. The TNF- α production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

④ 다리살 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 다리살 펩타이드 추출물의 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $6985.0 \pm 55.2 \text{ pg/ml}$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $6795.0 \pm 49.5 \text{ pg/ml}$, $6141.0 \pm 256.0 \text{ pg/ml}$, $6554.5 \pm 169.0 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $6627.0 \pm 17.0 \text{ pg/ml}$, $6522.3 \pm 194.1 \text{ pg/ml}$, $6780.5 \pm 47.4 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $6595.3 \pm 184.2 \text{ pg/ml}$, $6746.5 \pm 67.2 \text{ pg/ml}$, $6933.5 \pm 154.9 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었다.

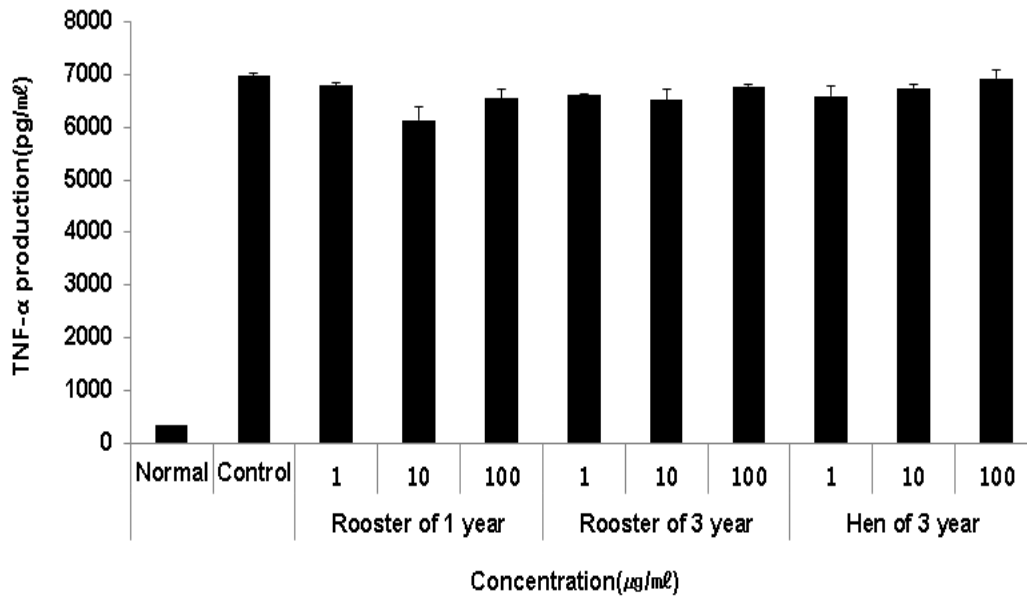


Fig. 36. TNF- α production of the thigh peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of thigh peptide extract and LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24hr. The TNF- α production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

⑤ 가슴살 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 가슴살 펩타이드 추출물의 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $6985.0 \pm 55.2 \text{ pg/ml}$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $6612.3 \pm 189.9 \text{ pg/ml}$, $6464.0 \pm 39.6 \text{ pg/ml}$, $6453.0 \pm 101.1 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $6559.8 \pm 71.8 \text{ pg/ml}$, $6862.5 \pm 23.3 \text{ pg/ml}$, $6643.8 \pm 105.7 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $6898.8 \pm 163.0 \text{ pg/ml}$, $6707.5 \pm 152.0 \text{ pg/ml}$, $6810.8 \pm 6.7 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었다.

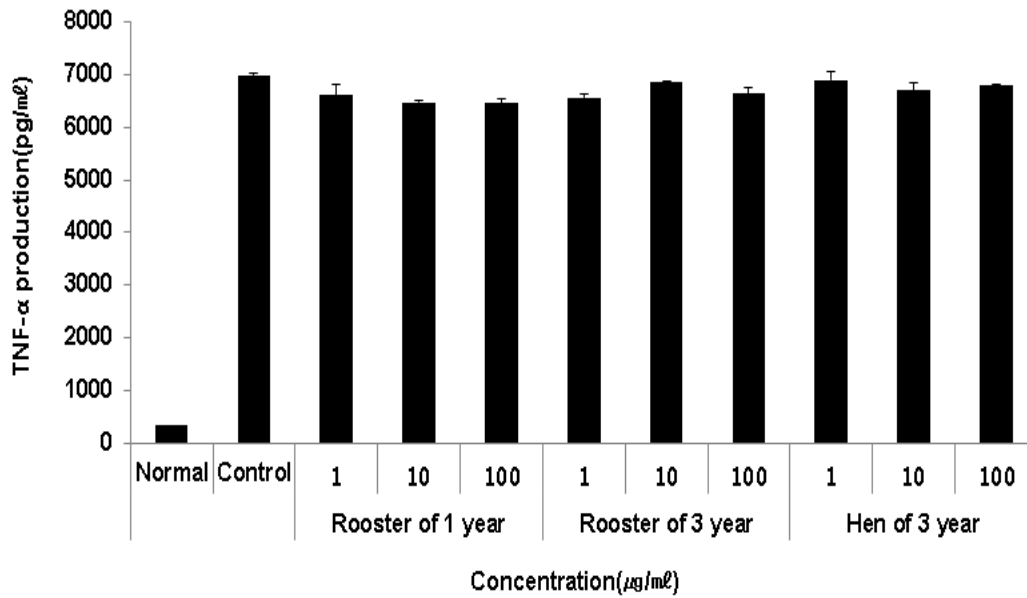


Fig. 37. TNF- α production of the breast peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of breast peptide extract and LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The TNF- α production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

⑥ 날개살 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 다리살 펩타이드 추출물의 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $6985.0 \pm 55.2 \text{ pg}/\text{ml}$ 로 나타냈을 때 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $6571.8 \pm 54.8 \text{ pg}/\text{ml}$, $6502.8 \pm 16.6 \text{ pg}/\text{ml}$, $6879.5 \pm 35.4 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $6617.5 \pm 14.1 \text{ pg}/\text{ml}$, $6730.0 \pm 18.4 \text{ pg}/\text{ml}$, $6943.3 \pm 123.4 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었다.

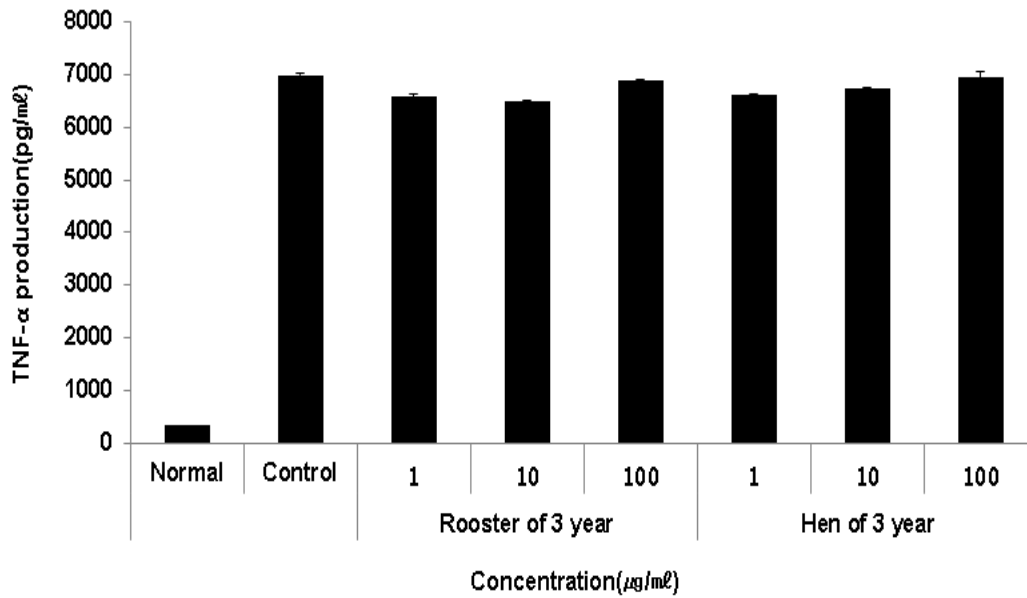


Fig. 38. TNF- α production of the wings peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of wings peptide extract and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The TNF- α production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

⑦ 오계란 및 내장 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계란과 내장 펩타이드 추출물의 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 대조군을 6985.0 ± 55.2 pg/ml로 나타냈을 때 오계란은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 6735.5 ± 140.7 pg/ml, 6839.0 ± 83.4 pg/ml, 6301.8 ± 47.0 pg/ml의 생성을 나타내었으며, 내장은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 6550.8 ± 11.0 pg/ml, 6242.3 ± 192.0 pg/ml, 6621.0 ± 113.1 pg/ml의 생성을 나타내었다.

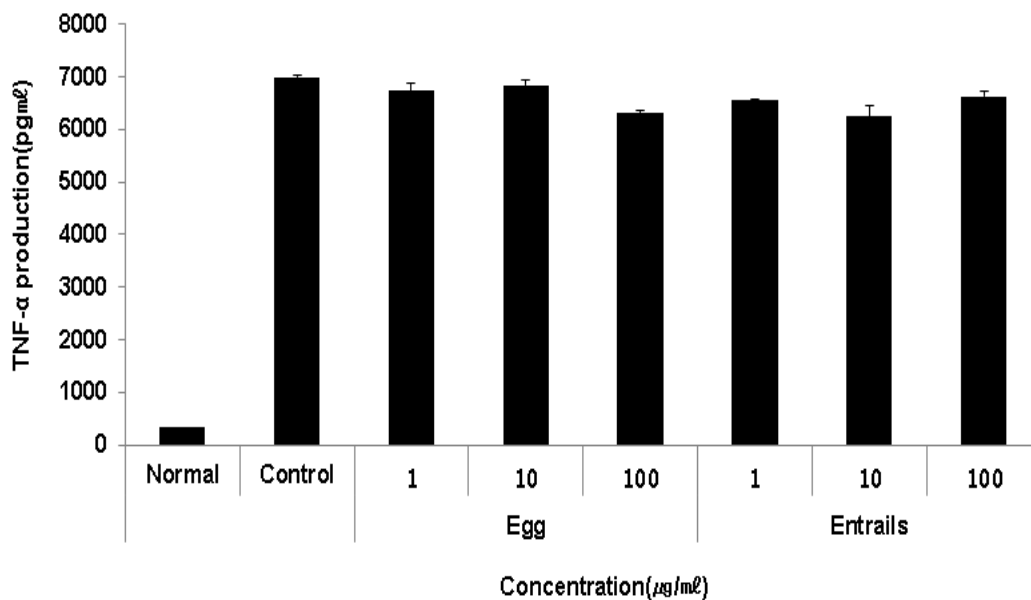


Fig. 39. TNF- α production of the egg and entrails peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of egg and entrails peptide extract and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The TNF- α production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

마. 면역증진 효능

(1) IL-6 생성량

(가) 뼈 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군을 17.6 ± 6.4 pg/ml 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 13.1 ± 2.2 pg/ml , 17.5 ± 1.1 pg/ml , 17.0 ± 1.2 pg/ml 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 23.9 ± 0.6 pg/ml , 77.4 ± 1.0 pg/ml , 125.7 ± 26.7 pg/ml 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 25.2 ± 1.0 pg/ml , 15.7 ± 1.4 pg/ml , 58.3 ± 3.7 pg/ml 의 생성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 3년산 수탉의 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도와 3년산 암탉의 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군에 비해 증진을 시키는 것으로 확인되었으며, 특히 3년산 수탉이 1년산 수탉과 3년산 암탉에 비해 효과적인 것이라 사료된다.

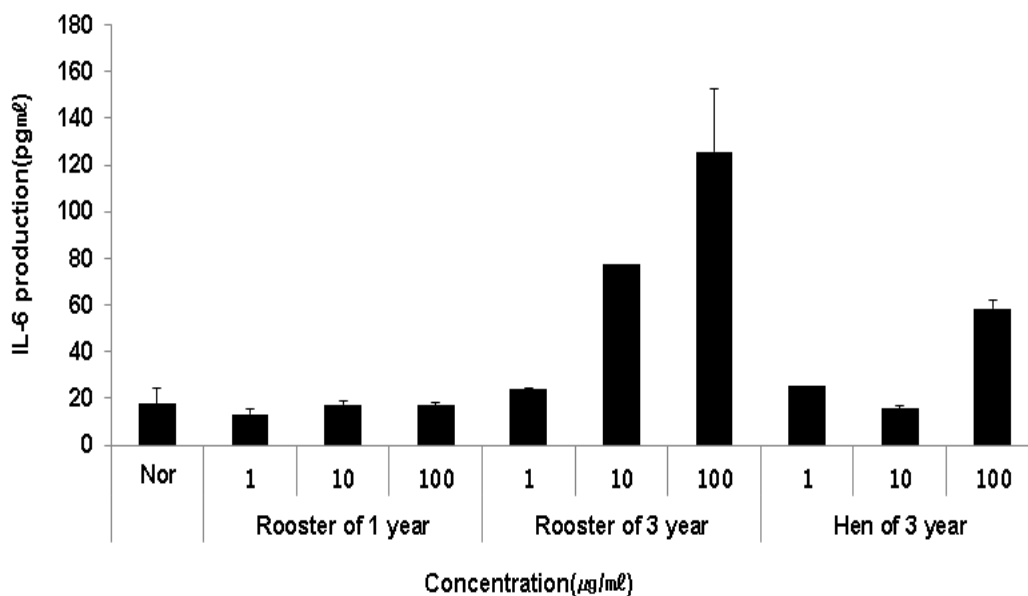


Fig. 40. IL-6 production of the bone extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of bone extract for 24hr. The IL-6 production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(나) 살 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군을 17.6 ± 6.4

pg/ml로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 15.2 ± 1.0 pg/ml, 50.5 ± 0.8 pg/ml, 71.5 ± 1.0 pg/ml의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 18.5 ± 2.9 pg/ml, 20.2 ± 4.5 pg/ml, 59.3 ± 7.8 pg/ml의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 17.2 ± 1.3 pg/ml, 52.3 ± 6.4 pg/ml, 99.5 ± 10.1 pg/ml의 생성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 1년산 수탉의 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도와 3년산 수탉의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도, 3년산 암탉의 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도가 IL-6의 조절을 통해 면역 질환의 환자의 식이 또는 다양한 형태의 제품에 대한 소재로써 활용될 수 있음을 시사하고 있다.

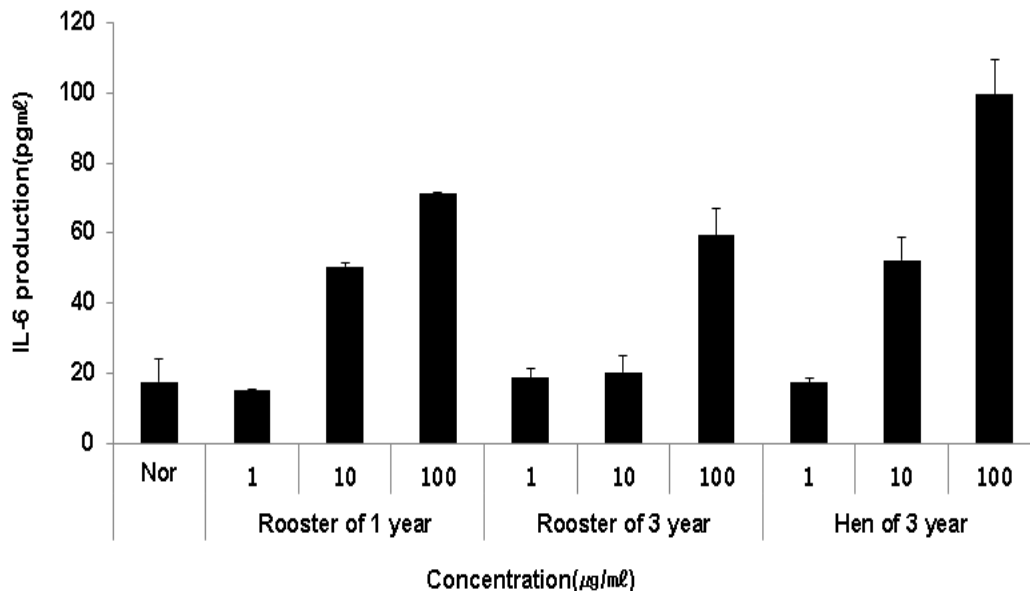


Fig. 41. IL-6 production of the meat extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of meat extract for 24hr. The IL-6 production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(다) 껍질 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군을 17.6 ± 6.4 pg/ml로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 16.5 ± 2.5 pg/ml, 18.3 ± 0.8 pg/ml, 18.1 ± 0.6 pg/ml의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 17.9 ± 2.0 pg/ml, 25.7 ± 2.1 pg/ml, 80.0 ± 12.1 pg/ml의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 7.8 ± 1.3 pg/ml, 5.8 ± 0.7 pg/ml, 8.0 ± 0.8 pg/ml의 생성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 연산오계의 3년산 수탉의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도가 다른 연식의 닭보다 IL-6 생성에 있어 효과적인 것으로 확인되었다.

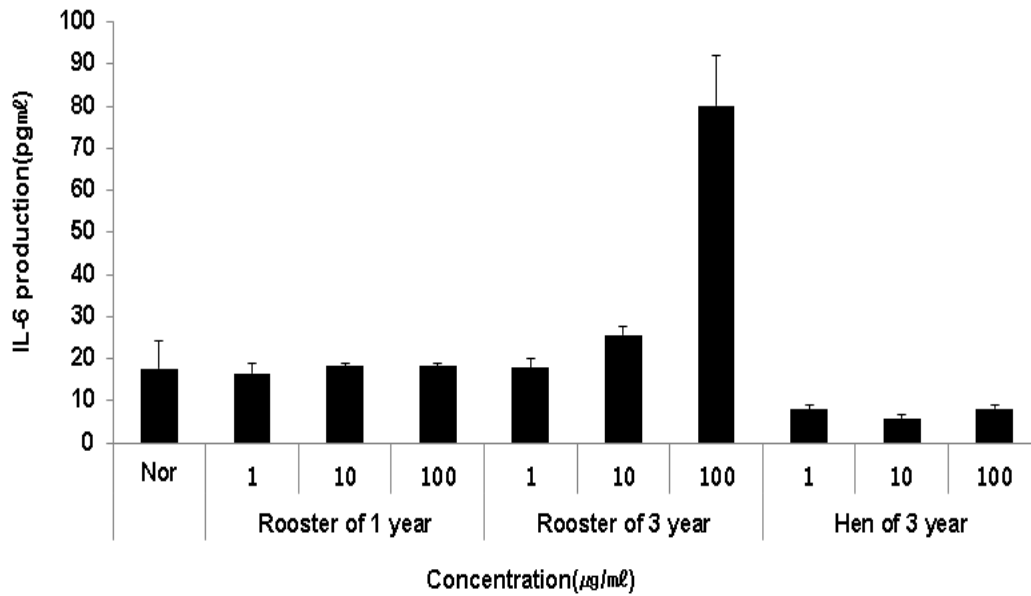


Fig. 42. IL-6 production of the skin extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of skin extract for 24hr. The IL-6 production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(라) 다리살 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 다리살 펩타이드 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군을 24.9 ± 9.9 pg/ml로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 28.0 ± 7.1 pg/ml, 24.9 ± 9.9 pg/ml, 18.9 ± 1.4 pg/ml의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 14.2 ± 5.3 pg/ml, 10.1 ± 11.0 pg/ml, 24.9 ± 9.9 pg/ml의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 10.9 ± 0.7 pg/ml, 2.8 ± 0.7 pg/ml, 2.8 ± 0.7 pg/ml의 생성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 연산오계의 다리살 펩타이드 추출물은 1년산 수탉이 3년산 수탉과 3년산 암탉에 비하여 IL-6 생성량에 효과적인 것으로 확인되었다.

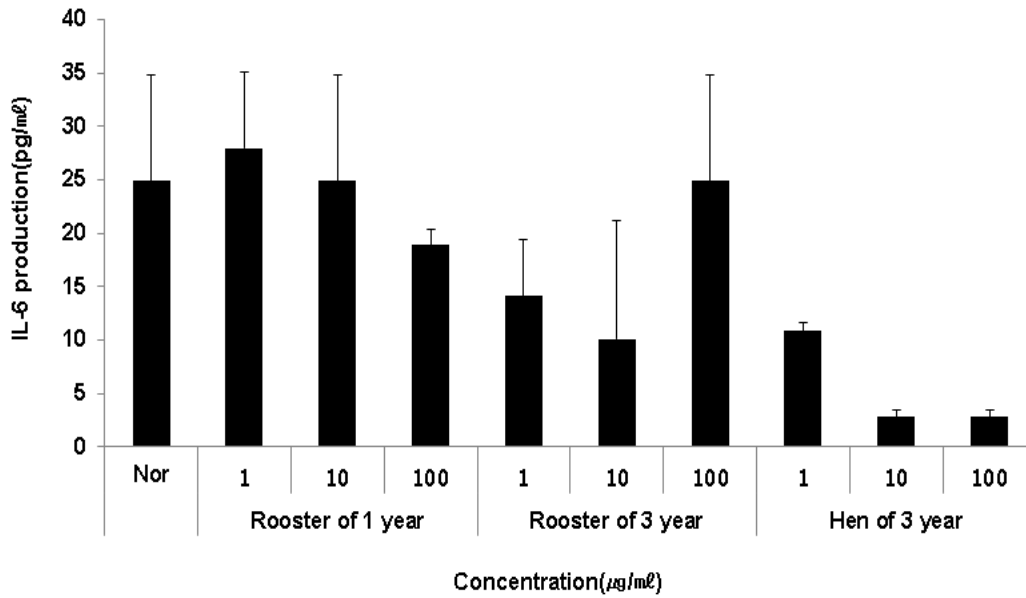


Fig. 43. IL-6 production of the thigh peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of thigh peptide extract and LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for 24hr. The IL-6 production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, *** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$).

(마) 가슴살 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 가슴살 펩타이드 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군을 24.9 ± 9.9 pg/ml로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 32.4 ± 0.7 pg/ml, 28.0 ± 7.0 pg/ml, 28.5 ± 4.9 pg/ml의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 23.8 ± 30.4 pg/ml, 17.1 ± 20.9 pg/ml, 10.1 ± 11.0 pg/ml의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 17.1 ± 20.9 pg/ml, 10.1 ± 11.0 pg/ml, 17.1 ± 20.9 pg/ml의 생성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 연산오계의 가슴살 펩타이드 추출물은 다리살 펩타이드 추출물과 마찬가지로 1년산 수탉의 펩타이드 추출물이 3년산 수탉과 3년산 암탉에 비하여 효과적일 것으로 확인되었다.

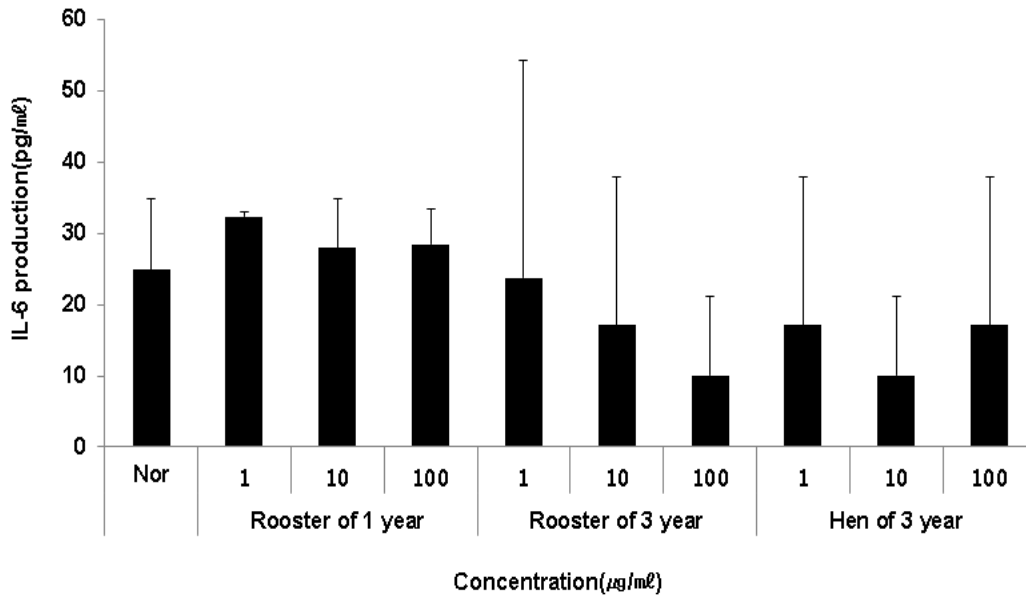


Fig. 44. IL-6 production of the breast peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of breast peptide extract and LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24hr. The IL-6 production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, *** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$).

(바) 날개살 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 다리살 펩타이드 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $24.9 \pm 9.9 \text{ pg/ml}$ 로 나타냈을 때 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $10.1 \pm 11.0 \text{ pg/ml}$, $10.1 \pm 11.0 \text{ pg/ml}$, $21.2 \pm 15.2 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $14.2 \pm 5.3 \text{ pg/ml}$, $21.2 \pm 15.2 \text{ pg/ml}$, $18.9 \pm 1.4 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 펩타이드 추출물은 연산오계 살 추출물의 결과와는 상반되게 가슴살, 다리살, 날개살에서 대조군에 비하여 효과적이지 않아 면역에 있어 IL-6의 생성량은 순수한 연산오계로써의 공정이 더 효과적일 것이라 판단된다.

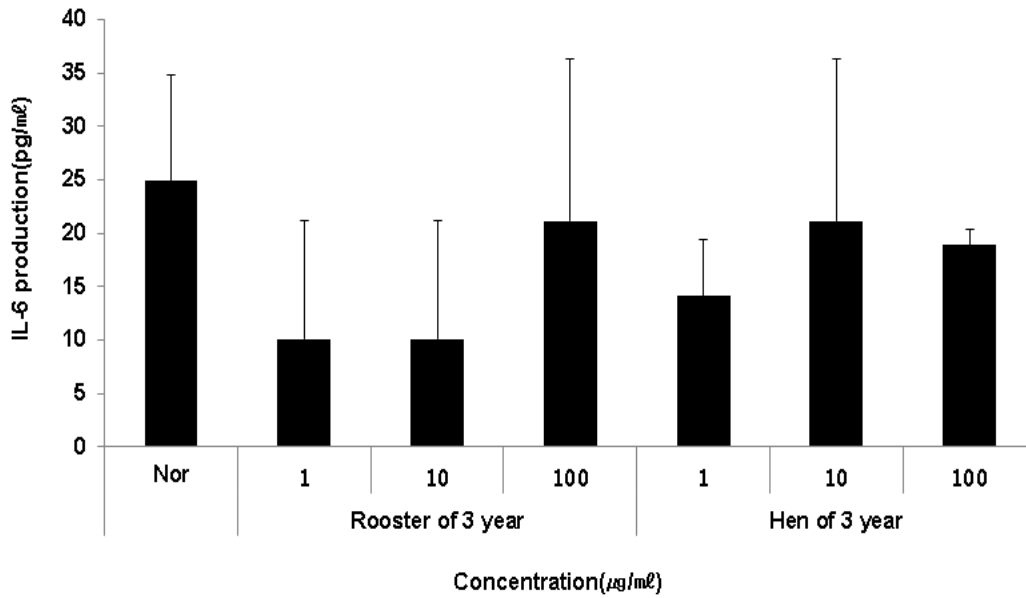


Fig. 45. IL-6 production of the wings peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of wings peptide extract for 24hr. The IL-6 production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(사) 오계란 및 내장 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계란과 내장 펩타이드 추출물의 IL-6 생성량을 측정하는 결과, 대조군을 $24.9 \pm 9.9 \text{ pg/ml}$ 로 나타냈을 때 오계란은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $17.1 \pm 20.9 \text{ pg/ml}$, $45.8 \pm 0.7 \text{ pg/ml}$, $18.9 \pm 1.4 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었으며, 내장은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $17.1 \pm 20.9 \text{ pg/ml}$, $21.2 \pm 15.2 \text{ pg/ml}$, $14.2 \pm 5.3 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었다.

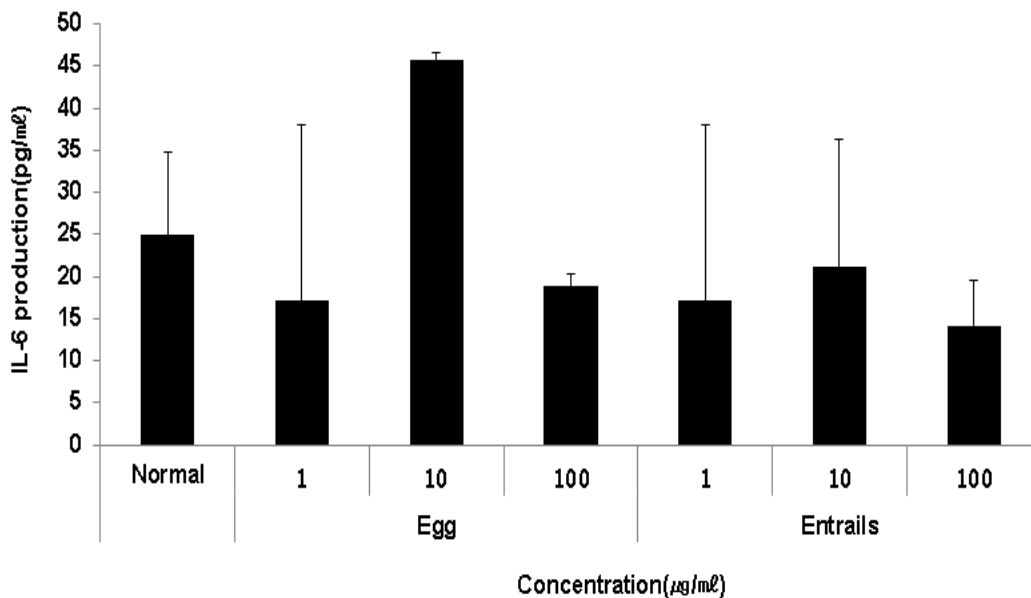


Fig. 46. IL-6 production of the egg and entrails peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of egg and entrails peptide extract for 24hr. The IL-6 production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(2) TNF- α 생성량

(가) 뼈 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 대조군을 1176.4 ± 126.7 pg/ml로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 1033.1 ± 5.4 pg/ml, 1199.1 ± 144.0 pg/ml, 1069.5 ± 22.7 pg/ml의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 뼈 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 1348.8 ± 97.2 pg/ml, 1569.5 ± 1.0 pg/ml, 1829.3 ± 1.0 pg/ml의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 뼈 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 2473.2 ± 1166.1 pg/ml, 1096.4 ± 51.6 pg/ml, 1227.5 ± 38.3 pg/ml의 생성을 나타내어 3년산 암탉의 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비하여 높은 생성량을 나타내었다.

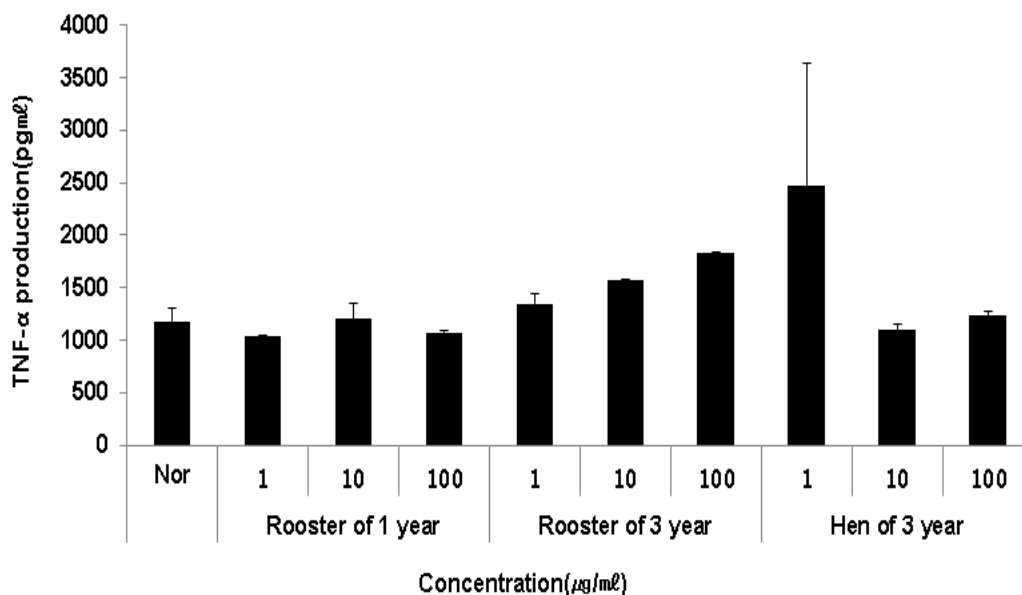


Fig. 47. TNF- α production of the bone extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of bone extract for 24hr. The TNF- α production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(나) 살 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 살 추출물의 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 대조군을 1176.4 ± 126.7 pg/ml로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 1223.8 ± 31.5 pg/ml, 1372.6 ± 18.4 pg/ml, 2055.7 ± 490.4 pg/ml의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 살

추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $1252.7 \pm 291.8 \text{ pg/ml}$, $1133.1 \pm 15.1 \text{ pg/ml}$, $18661 \pm 45.3 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 살 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $1115.1 \pm 14.7 \text{ pg/ml}$, $1685.9 \pm 17.6 \text{ pg/ml}$, $1986.7 \pm 33.2 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내어 1년산 수탉의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도와 3년산 수탉의 100 $\mu\text{g/ml}$, 3년산 암탉의 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 대조군에 비하여 높은 생성량을 나타내었다. 이와 같은 결과는 모든 닭의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 바탕으로 면역과 관련된 다양한 형태의 제품에 대한 소재로써 활용될 수 있음을 시사하고 있다.

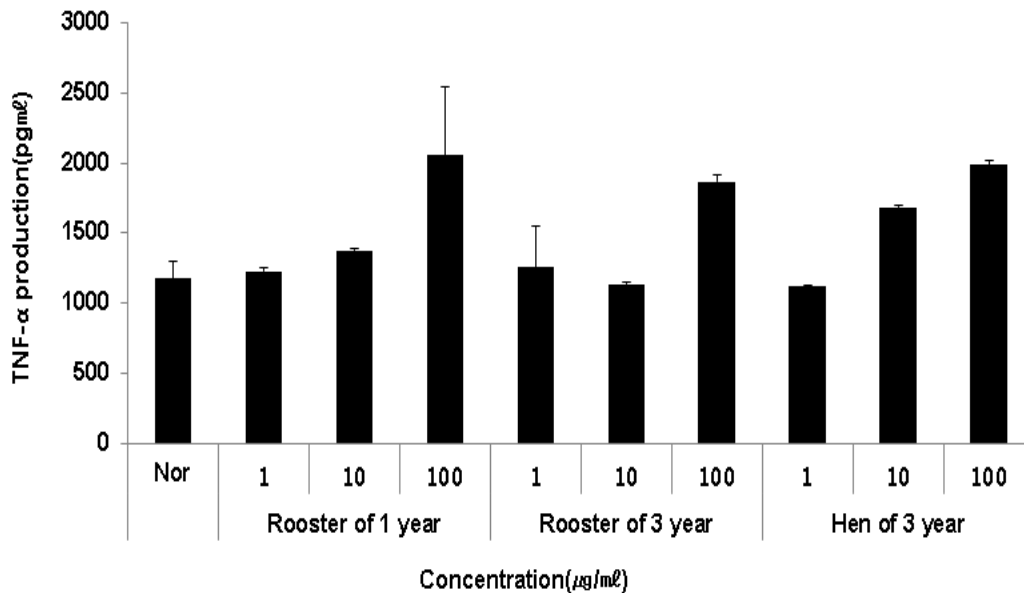


Fig. 48. TNF- α production of the bone extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of bone extract for 24hr. The TNF- α production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(다) 껍질 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 뼈 추출물의 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $1176.4 \pm 126.7 \text{ pg/ml}$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $1111.6 \pm 106.3 \text{ pg/ml}$, $1158.3 \pm 7.1 \text{ pg/ml}$, $1340.4 \pm 179.6 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $1280.8 \pm 165.5 \text{ pg/ml}$, $1326.1 \pm 256.6 \text{ pg/ml}$, $1911.8 \pm 348.5 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $802.4 \pm 125.1 \text{ pg/ml}$, $693.7 \pm 70.3 \text{ pg/ml}$, $560.0 \pm 30.0 \text{ pg/ml}$ 의 생성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 3년산 수탉 껍질의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도가 TNF- α 생성에 있어 효과적인 것으로 나타났다.

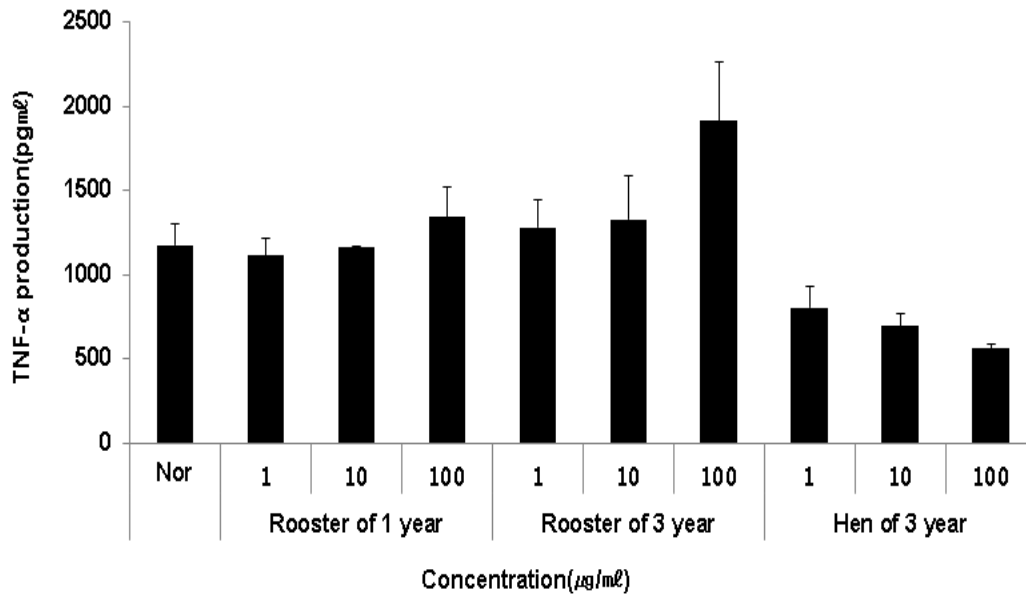


Fig. 49. TNF- α production of the skin extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of skin extract for 24hr. The TNF- α production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(라) 다리살 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 다리살 펩타이드 추출물의 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 대조군을 420.5 ± 3.5 pg/ml로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 341.0 ± 0.7 pg/ml, 372.5 ± 3.5 pg/ml, 400.0 ± 4.2 pg/ml의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 387.3 ± 12.4 pg/ml, 352.0 ± 11.3 pg/ml, 366.5 ± 2.1 pg/ml의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 408.8 ± 9.5 pg/ml, 364.5 ± 2.1 pg/ml, 391.5 ± 14.1 pg/ml의 생성을 나타내었다.

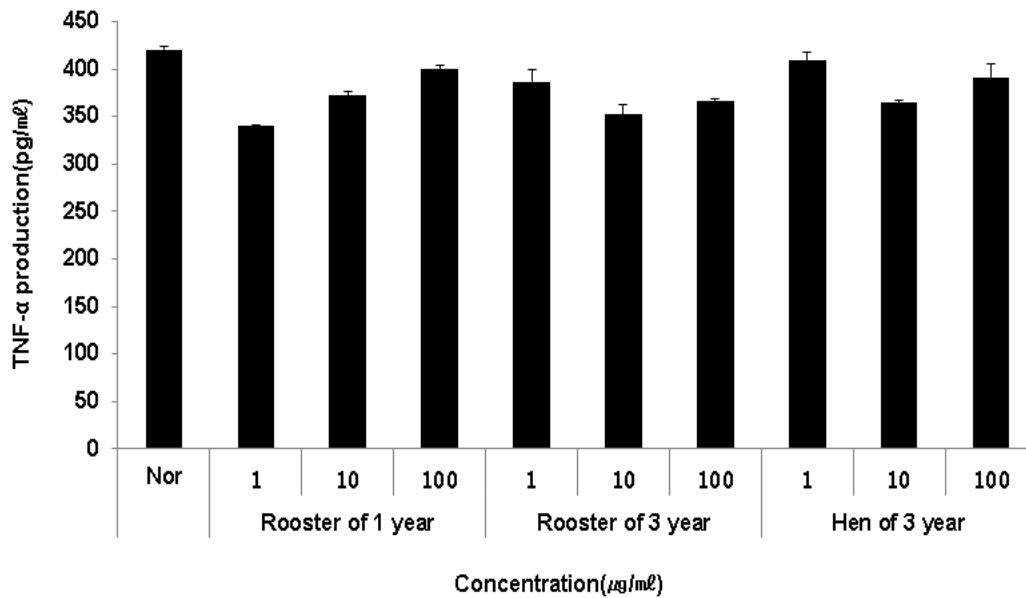


Fig. 50. TNF- α production of the thigh peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of thigh peptide extract for 24hr. The TNF- α production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(마) 가슴살 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 가슴살 펩타이드 추출물의 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 대조군을 420.5 ± 3.5 pg/ml로 나타냈을 때 1년산 수탉은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 430.5 ± 6.4 pg/ml, 435.3 ± 13.1 pg/ml, 349.8 ± 1.1 pg/ml의 생성을 나타내었으며, 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 359.3 ± 15.2 pg/ml, 393.5 ± 0.7 pg/ml, 383.5 ± 3.5 pg/ml의 생성을 나타내었다. 또한, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 427.8 ± 13.1 pg/ml, 322.0 ± 2.8 pg/ml, 311.3 ± 8.1 pg/ml의 생성을 나타내었다.

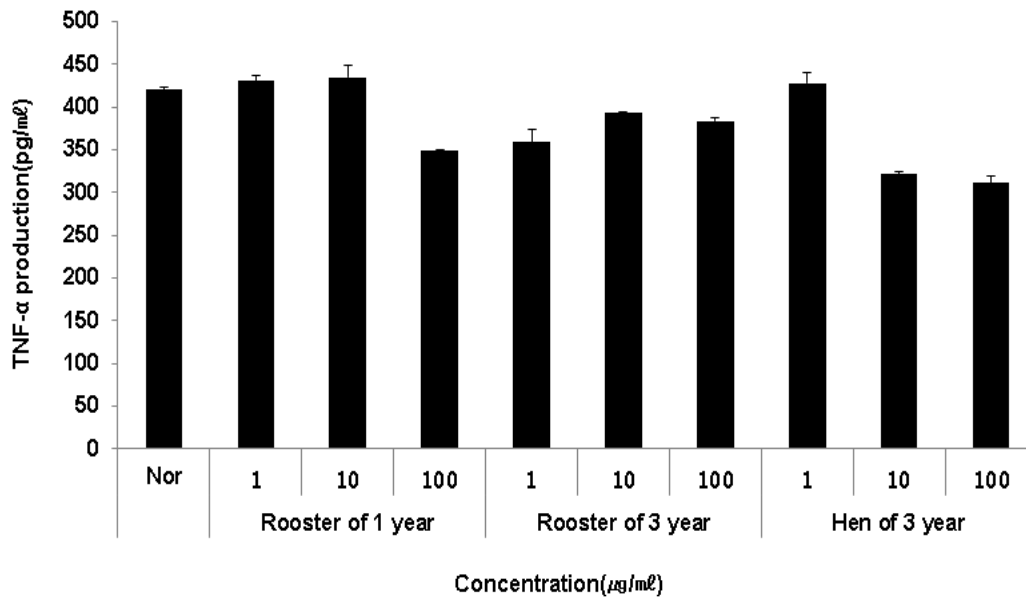


Fig. 51. TNF- α production of the breast peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of breast peptide for 24hr. The TNF- α production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(바) 날개살 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계 다리살 펩타이드 추출물의 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $420.5 \pm 3.5 \text{ pg}/\text{ml}$ 로 나타냈을 때 3년산 수탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $447.8 \pm 7.4 \text{ pg}/\text{ml}$, $331.0 \pm 2.8 \text{ pg}/\text{ml}$, $393.0 \pm 1.4 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었으며, 3년산 암탉의 껍질 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $390.0 \pm 2.1 \text{ pg}/\text{ml}$, $402.8 \pm 6.7 \text{ pg}/\text{ml}$, $375.0 \pm 2.8 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었다.

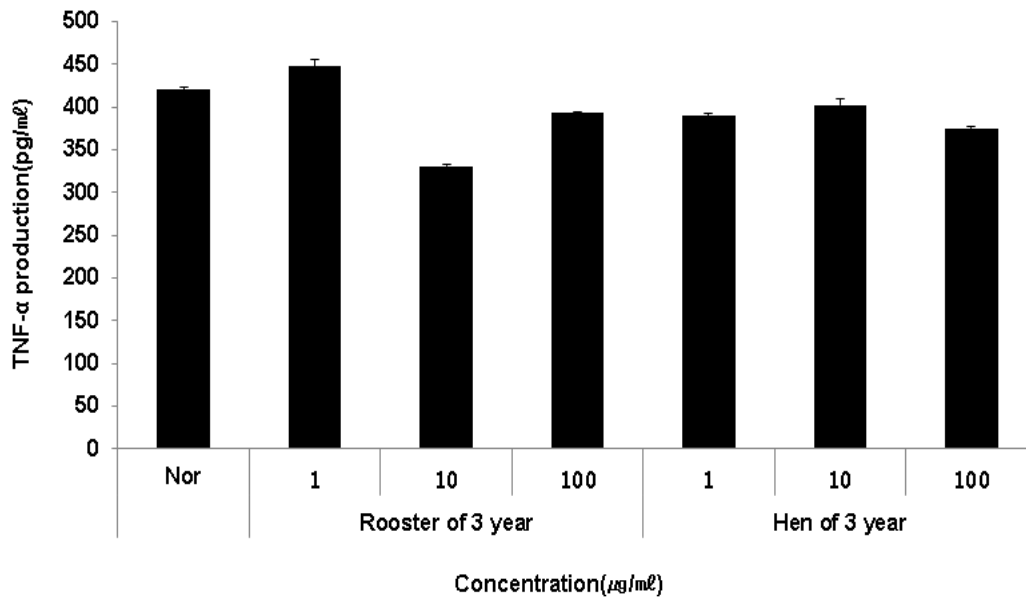


Fig. 52. TNF- α production of the wings peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of wings peptide extract for 24hr. The TNF- α production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(사) 오계란 및 내장 펩타이드 추출물

RAW 264.7 세포에서 연산오계란과 내장 펩타이드 추출물의 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 대조군을 420.5 ± 3.5 pg/ml로 나타냈을 때 오계란은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 381.8 ± 10.3 pg/ml, 313.8 ± 1.1 pg/ml, 324.0 ± 9.9 pg/ml의 생성을 나타내었으며, 내장은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 418.3 ± 11.7 pg/ml, 321.0 ± 12.0 pg/ml, 325.0 ± 7.1 pg/ml의 생성을 나타내었다.

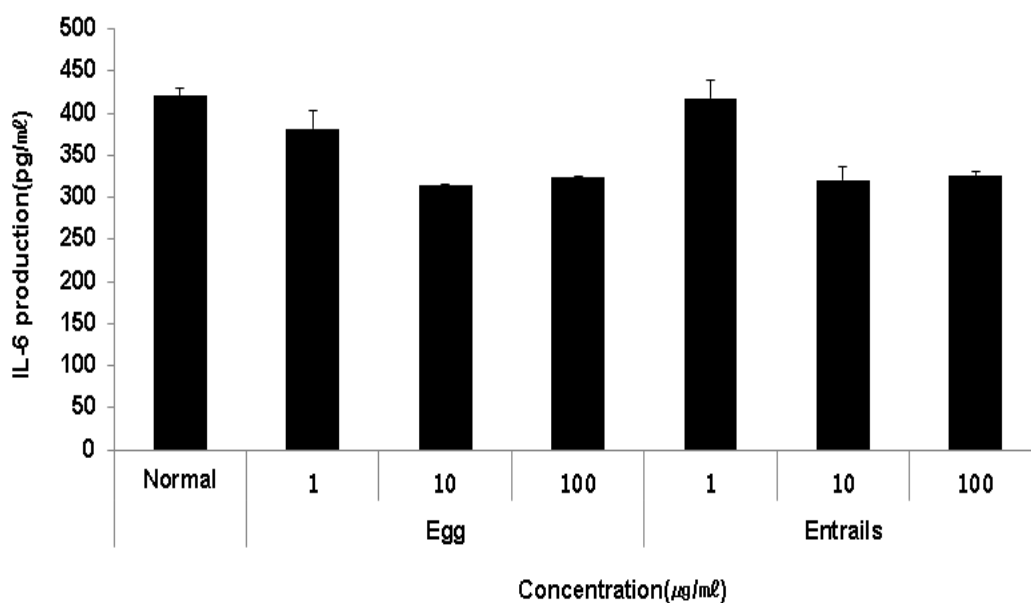


Fig. 53. TNF- α production of the wings peptide extracts of year and sex condition in RAW 264.7 cells as determined using the cytokine assay. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of wings peptide extract for 24hr. The TNF- α production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

바. 조골세포의 ALP 활성도 측정

(1) 살 추출물

조골 세포에서 연산오계 살 추출물의 ALP 활성도를 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $94.0 \pm 10.7\%$, $109.6 \pm 10.4\%$, $85.7 \pm 6.7\%$ 의 활성도를 나타내었으며, 3년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $100.1 \pm 6.7\%$, $99.0 \pm 10.7\%$, $83.9 \pm 18.9\%$ 의 활성도를 나타내었다. 또한, 3년산 암탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $112.8 \pm 1.8\%$, $117.4 \pm 0.7\%$, $98.8 \pm 23.6\%$ 의 활성도를 나타내었다.

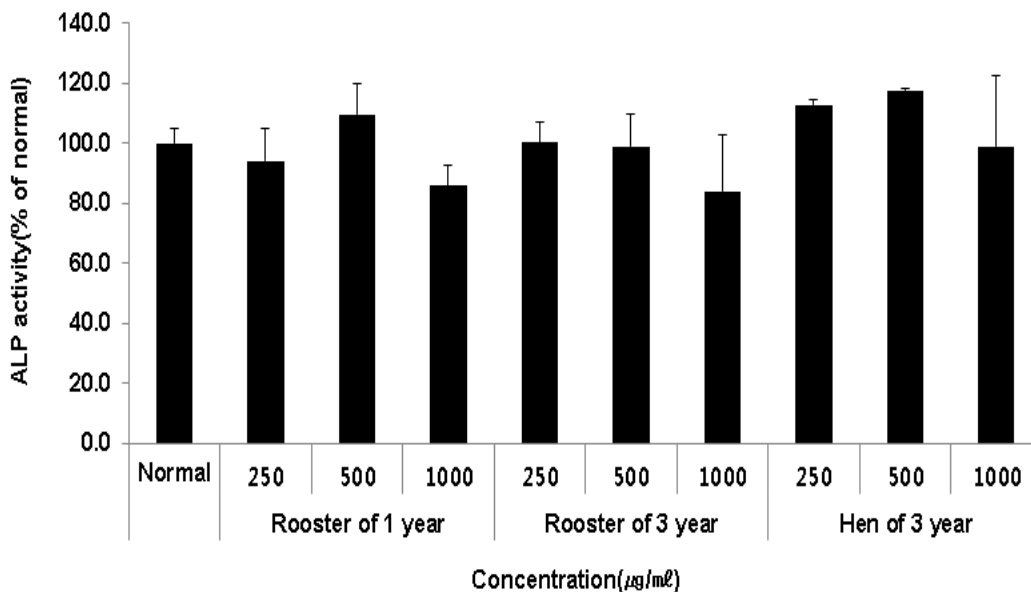


Fig. 54. Effects of water extracts of the meat in YO on the alkaline phosphatase activities of the MG-63 osteoblastic cell during the differentiation. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of meat extract for 24hr. The ALP activity was analyzed by ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(2) 껍질 추출물

조골 세포에서 연산오계 살 추출물의 ALP 활성도를 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $80.4 \pm 1.8\%$, $92.3 \pm 9.4\%$, $85.0 \pm 10.0\%$ 의 활성도를 나타내었으며, 3년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $85.2 \pm 8.7\%$, $90.8 \pm 4.2\%$, $89.4 \pm 6.5\%$ 의 활성도를 나타내었다. 또한, 3년산 암탉은 250, 500, 1000

($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $97.9\pm 9.9\%$, $101.1\pm 2.7\%$, $95.9\pm 1.0\%$ 의 활성도를 나타내었다.

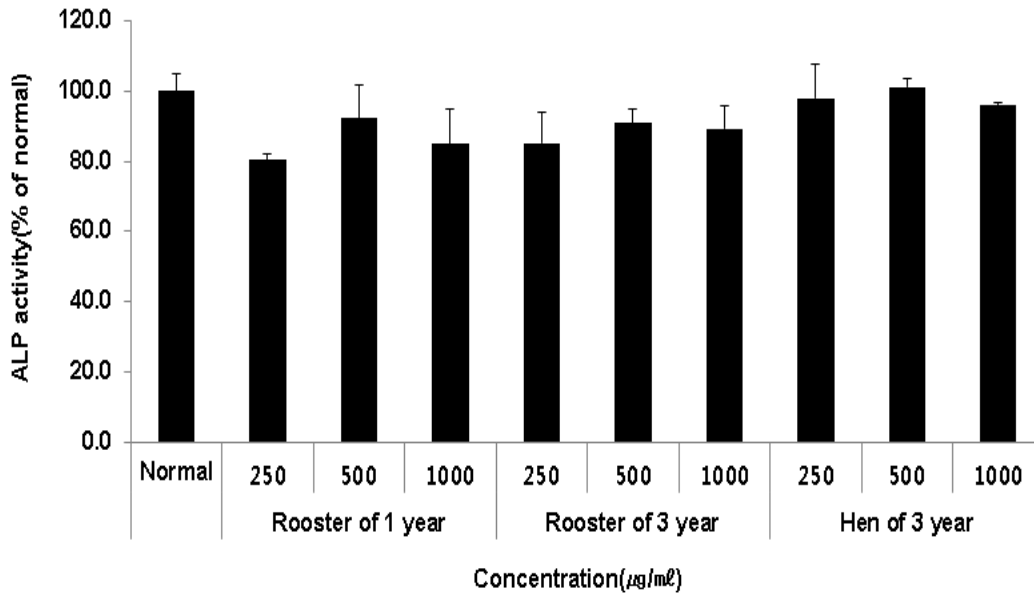


Fig. 55. Effects of water extracts of the meat in YO on the alkaline phosphatase activities of the MG-63 osteoblastic cell during the differentiation. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of meat extract for 24hr. The ALP activity was analyzed by ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(3) 다리살 펩타이드 추출물

조골 세포에서 연산오계 다리살 펩타이드 추출물의 ALP 활성도를 측정한 결과, 대조군을 $100.0\pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $97.8\pm 11.4\%$, $99.2\pm 9.3\%$, $101.7\pm 15.0\%$ 의 활성도를 나타내었으며, 3년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $84.0\pm 8.1\%$, $90.0\pm 2.1\%$, $98.0\pm 20.4\%$ 의 활성도를 나타내었다. 또한, 3년산 암탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $107.3\pm 10.2\%$, $118.1\pm 2.1\%$, $114.3\pm 11.3\%$ 의 활성도를 나타내었다.

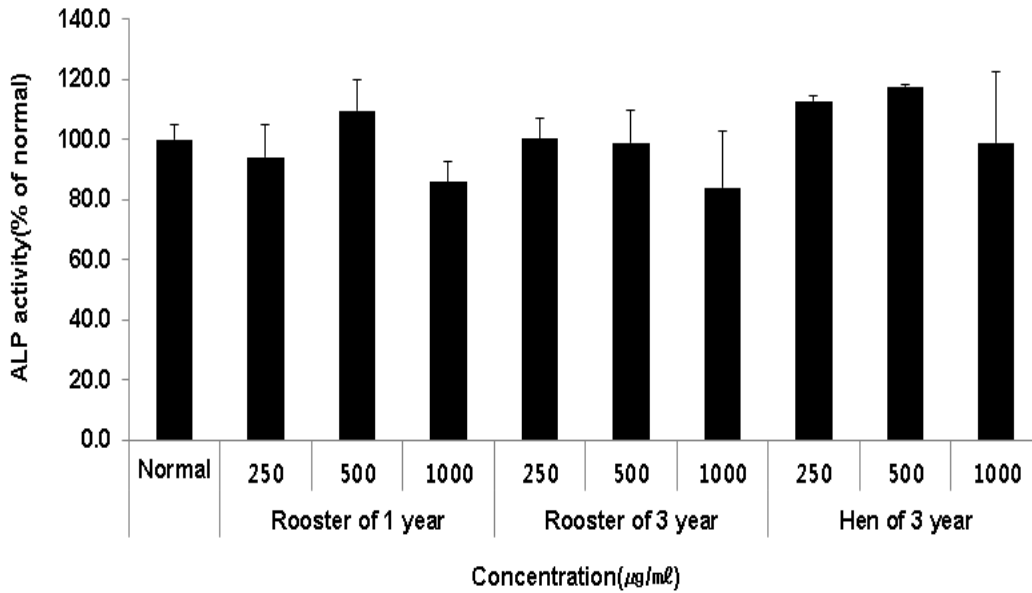


Fig. 56. Effects of water extracts of the thigh peptide in YO on the alkaline phosphatase activities of the MG-63 osteoblastic cell during the differentiation. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of thigh peptide extract for 24hr. The ALP activity was analyzed by ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(4) 가슴살 펩타이드 추출물

조골 세포에서 연산오계 가슴살 펩타이드 추출물의 ALP 활성도를 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $76.9 \pm 7.7\%$, $85.4 \pm 3.2\%$, $76.0 \pm 4.5\%$ 의 활성도를 나타내었으며, 3년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $105.2 \pm 11.9\%$, $107.9 \pm 7.8\%$, $114.7 \pm 11.8\%$ 의 활성도를 나타내었다. 또한, 3년산 암탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $91.7 \pm 9.8\%$, $91.5 \pm 10.9\%$, $76.0 \pm 10.1\%$ 의 활성도를 나타내었다.

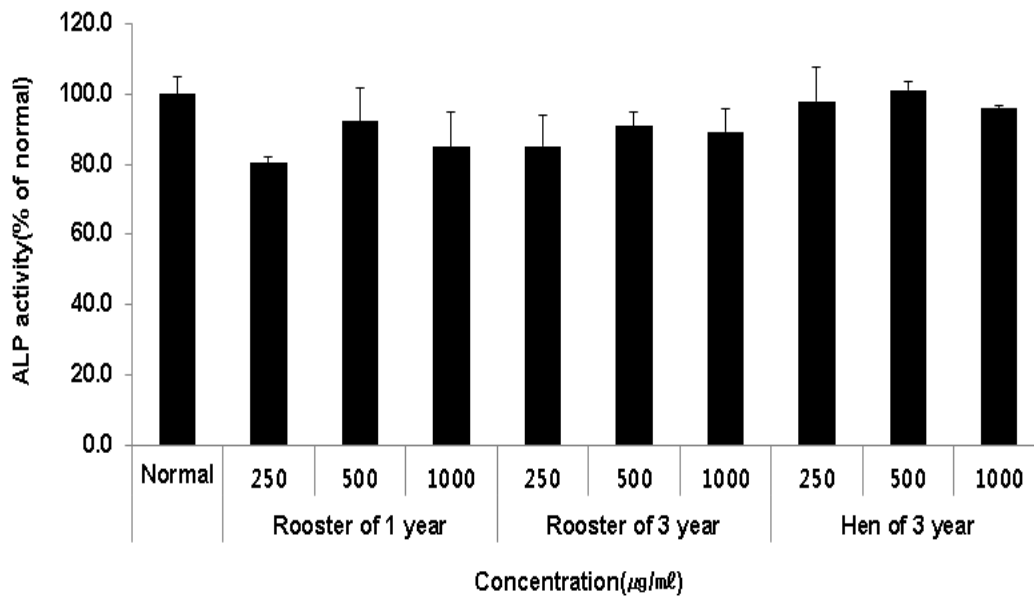


Fig. 57. Effects of water extracts of the breast peptide in YO on the alkaline phosphatase activities of the MG-63 osteoblastic cell during the differentiation. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of breast peptide extract for 24hr. The ALP activity was analyzed by ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(5) 날개살 펩타이드 추출물

조골 세포에서 연산오계 날개살 펩타이드 추출물의 ALP 활성도를 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 3년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $95.7 \pm 9.6\%$, $104.7 \pm 4.8\%$, $103.4 \pm 9.9\%$ 의 활성도를 나타내었으며, 3년산 암탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $89.0 \pm 13.8\%$, $93.5 \pm 3.0\%$, $89.0 \pm 16.3\%$ 의 활성도를 나타내었다.

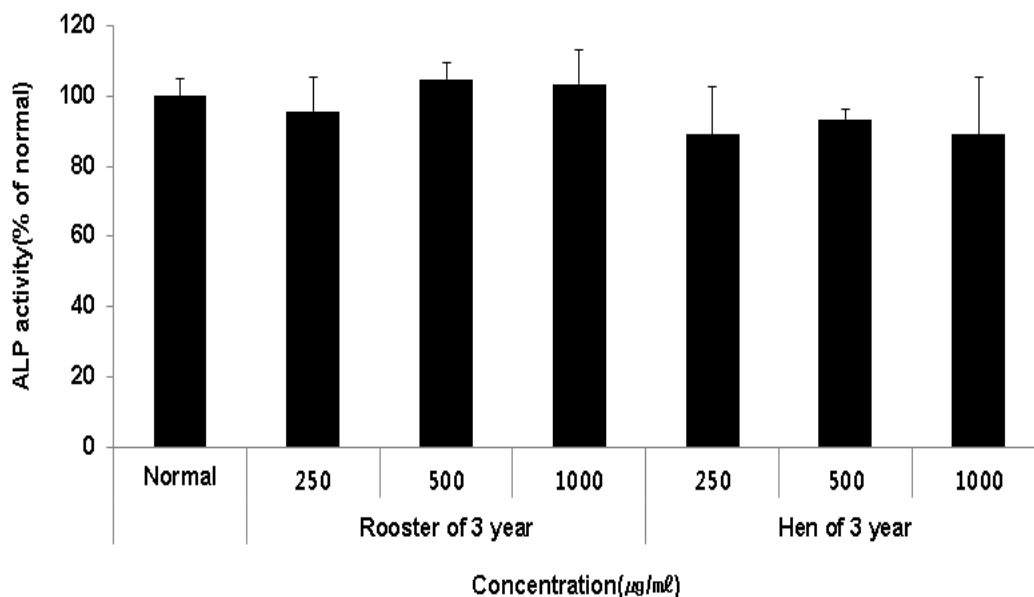


Fig. 58. Effects of water extracts of the meat in YO on the alkaline phosphatase activities of the MG-63 osteoblastic cell during the differentiation. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of meat extract for 24hr. The ALP activity was analyzed by ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(6) 오계란 및 내장 펩타이드 추출물

조골 세포에서 연산오계란 및 내장 펩타이드 추출물의 ALP 활성도를 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 오계란은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $102.8 \pm 9.9\%$, $106.4 \pm 6.8\%$, $103.7 \pm 8.8\%$ 의 활성도를 나타내었으며, 3년산 암탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $89.0 \pm 9.5\%$, $94.0 \pm 8.6\%$, $87.2 \pm 8.4\%$ 의 활성도를 나타내었다.

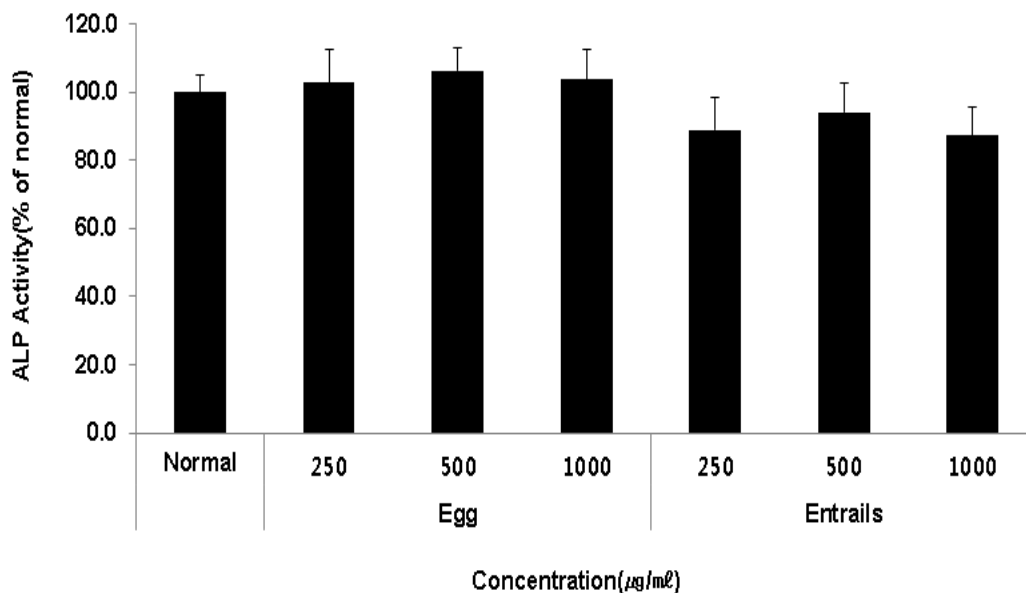


Fig. 59. Effects of water extracts of the meat in YO on the alkaline phosphatase activities of the MG-63 osteoblastic cell during the differentiation. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of meat extract for 24hr. The ALP activity was analyzed by ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

사. 골 석회화 형성

(1) 살 추출물

조골 세포에서 연산오계 살 추출물의 골 석회화 형성을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $85.8 \pm 9.1\%$, $102.6 \pm 5.4\%$, $110.5 \pm 12.5\%$ 의 형성도를 나타내었으며, 3년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $95.5 \pm 7.9\%$, $99.4 \pm 3.3\%$, $104.6 \pm 5.8\%$ 의 형성도를 나타내었다. 또한, 3년산 암탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $124.3 \pm 2.9\%$, $107.0 \pm 5.8\%$, $109.9 \pm 12.5\%$ 의 형성도를 나타내었다.

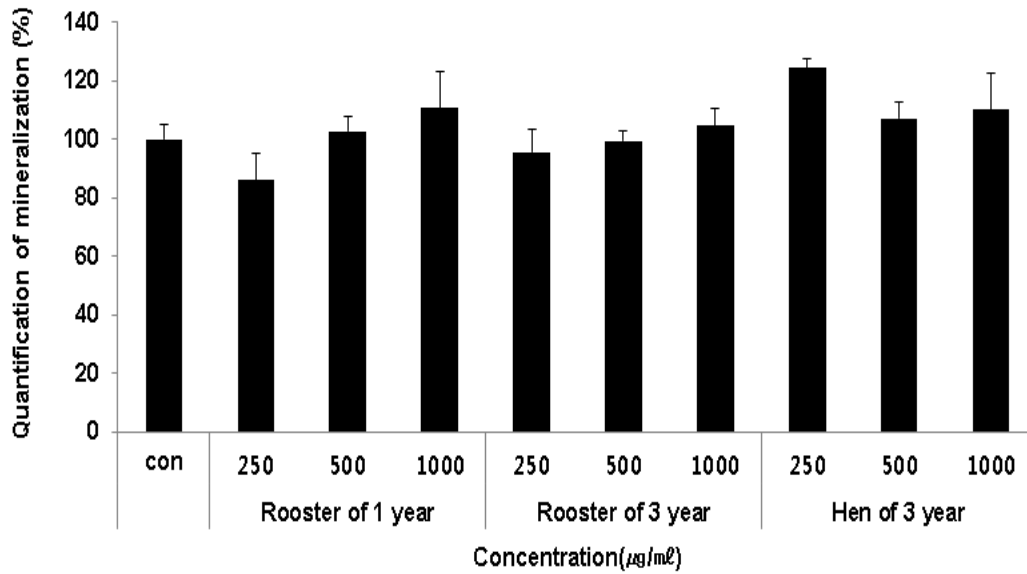


Fig. 60. Quantification of mineralization on the meat extracts of YO in MG-63 cells during differentiation 14 days. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of meat extract for 24hr. The Quantification of mineralization was analyzed by ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(2) 껍질 추출물

조골 세포에서 연산오계 살 추출물의 골 석회화 형성도를 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $87.3 \pm 2.9\%$, $94.9 \pm 0.4\%$, $97.9 \pm 1.2\%$ 의 형성도를 나타내었으며, 3년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $118.8 \pm 10.8\%$, $94.4 \pm 0.4\%$, $93.5 \pm 4.2\%$ 의 형성도를 나타내었다. 또한, 3년산 암탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $116.4 \pm 9.1\%$, $112.9 \pm 4.2\%$, $112.9 \pm 11.6\%$ 의 형성도를 나타내었다.

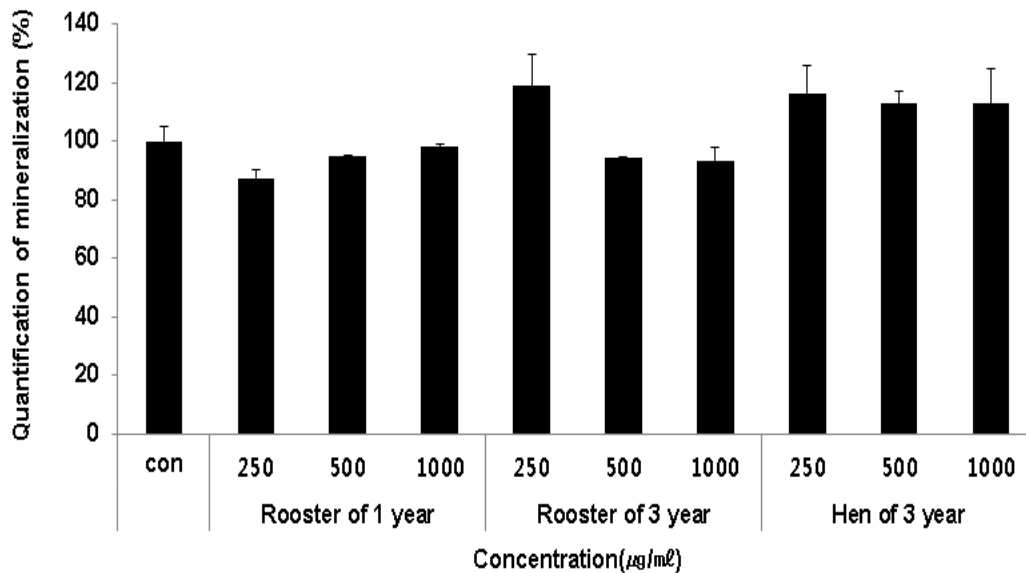


Fig. 61. Quantification of mineralization on the skin extracts of YO in MG-63 cells during differentiation 14 days. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of skin extract for 24hr. The Quantification of mineralization was analyzed by ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

아. 파골세포의 TRAP 활성 측정

(1) 살 추출물

파골세포의 TRAP 활성을 측정한 결과, 3년산 수탉이 3년산 암탉보다 뛰어남을 보였다. 이와 같은 결과는 파골세포를 이용한 ELISA 데이터에서도 확인 할 수 있었다. 파골 세포에서 연산오계 살 추출물의 TRAP 활성을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $31.9 \pm 3.6\%$, $36.9 \pm 0.4\%$, $32.2 \pm 1.5\%$ 의 형성도를 나타내었으며, 3년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $31.8 \pm 2.5\%$, $34.0 \pm 5.2\%$, $34.3 \pm 3.3\%$ 의 형성도를 나타내었다. 또한, 3년산 암탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $75.9 \pm 4.6\%$, $66.0 \pm 5.1\%$, $54.6 \pm 27.9\%$ 의 형성도를 나타내었다.

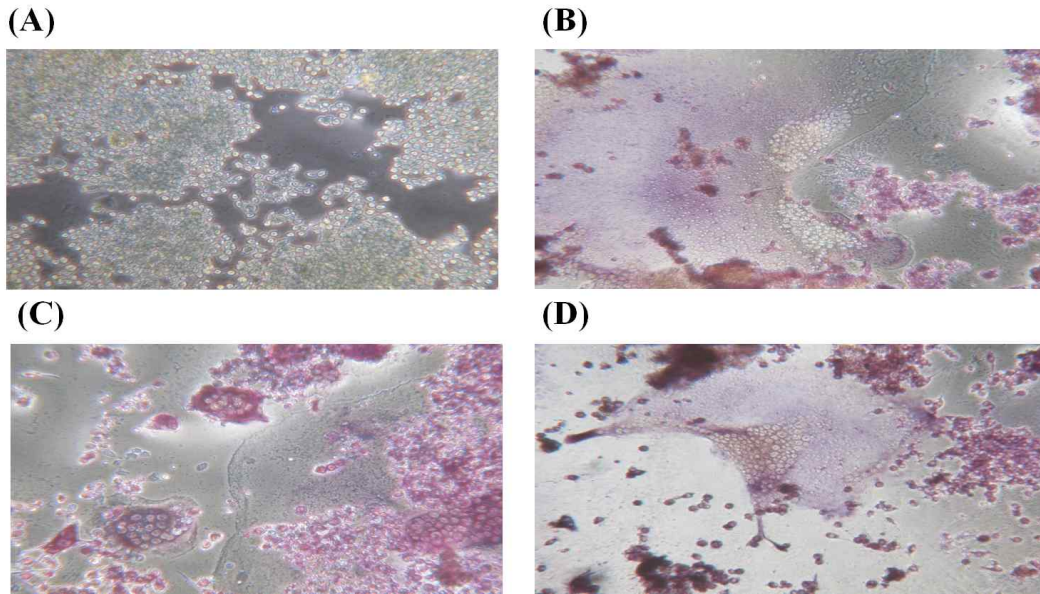


Fig. 62. The morphology of cell at the end of cell cultures after TRAP staining by addition of YO water extract.

(A) Raw 264.7 cells + no treated (standard). (B) RANKL + PD98059 (con). (C) RANKL + PD98059 + Rooster of 3 year. (D) RANKL + PD98059 + Hen of 3 year.

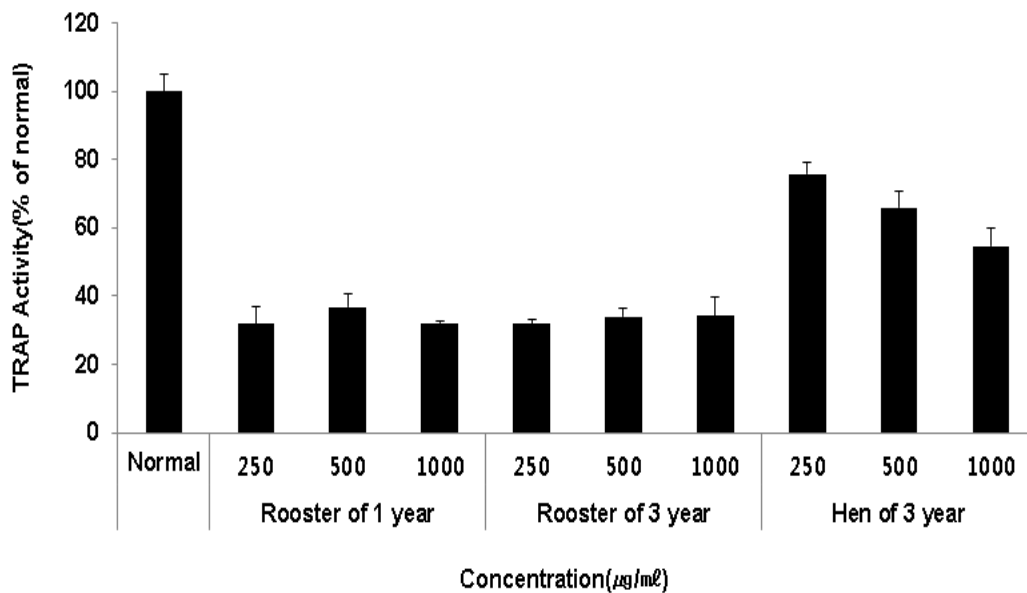


Fig. 63. Effects of water extracts of the meat in YO on the TRAP activities of the RAW 264.7 osteoclast cell during the differentiation. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of meat extract for 24hr. The TRAP activity was analyzed by ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(2) 껍질 추출물

과골 세포에서서 연산오계 껍질 추출물의 TRAP 활성도를 측정한 결과, 대조군을 100.0 \pm 5.0%로 나타냈을 때 1년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 53.5 \pm 16.0%,

37.1±7.7%, 38.9±9.1%의 활성도를 나타내었으며, 3년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 62.8±0.8%, 73.7±20.5%, 48.1±12.8%의 활성도를 나타내었다. 또한, 3년산 암탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 70.0±2.9%, 65.7±3.8%, 43.4±3.7%의 활성도를 나타내었다.

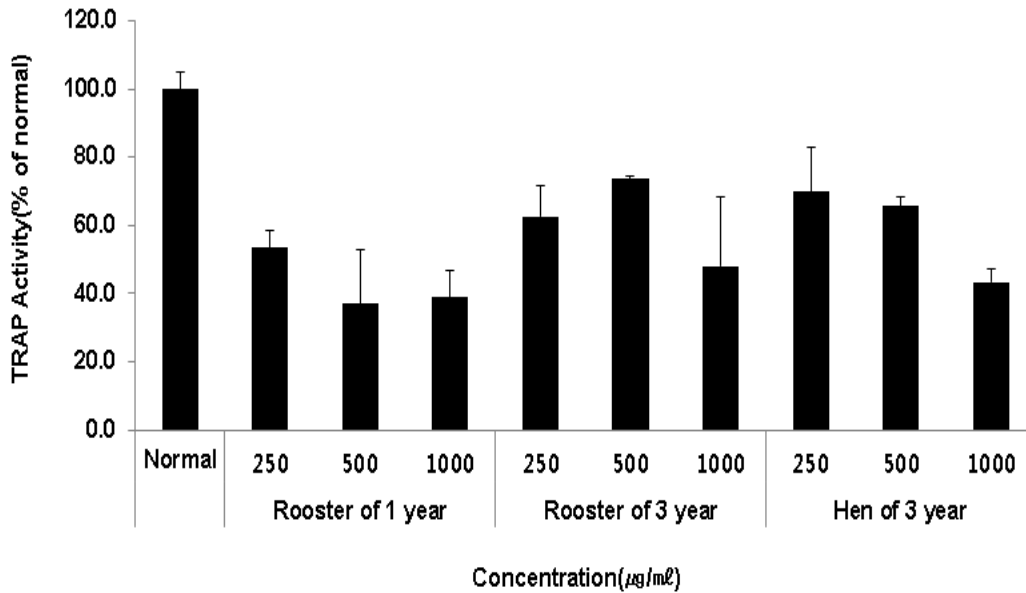


Fig. 64. Effects of water extracts of the skin in YO on the TRAP activities of the RAW 264.7 osteoclast cell during the differentiation. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of kin extract for 24hr. The TRAP activity was analyzed by ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(3) 다리살 펩타이드 추출물

과골 세포에서 연산오계 다리살 펩타이드 추출물의 TRAP 활성도를 측정한 결과,, 대조군을 100.0±5.0%로 나타냈을 때 1년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 60.2±5.4%, 51.1±6.1%, 39.5±4.6%의 활성도를 나타내었으며, 3년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 65.1±5.5%, 48.2±2.0%, 45.1±5.4%의 활성도를 나타내었다. 또한, 3년산 암탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 56.5±0.9%, 47.8±3.3%, 41.4±5.4%의 활성도를 나타내었다.

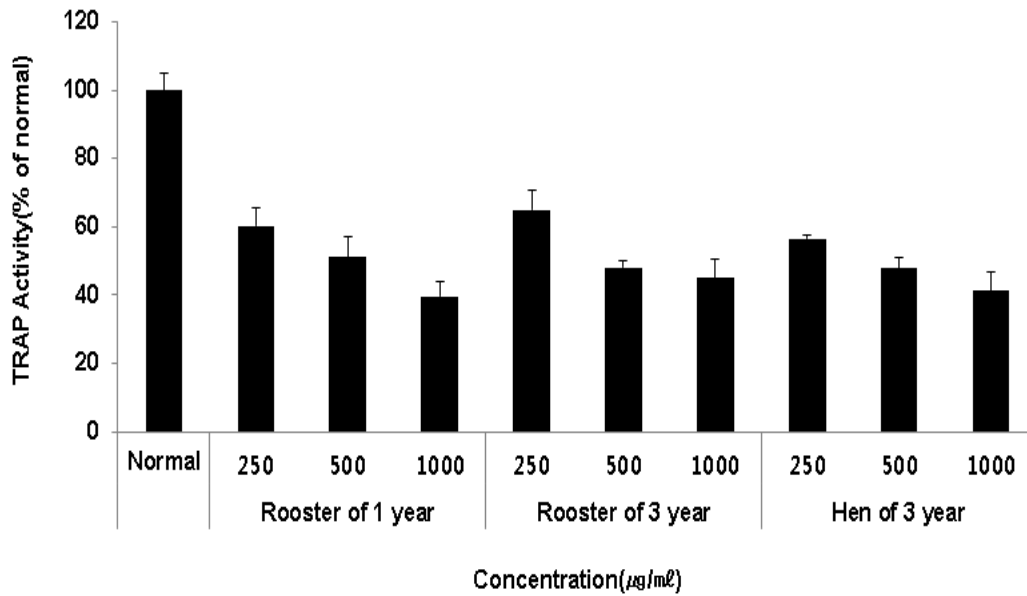


Fig. 65. Effects of water extracts of the thigh in YO on the TRAP activities of the RAW 264.7 osteoclast cell during the differentiation. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g/ml}$) of kin extract for 24hr. The TRAP activity was analyzed by ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(4) 가슴살 펩타이드 추출물

과골 세포에서 연산오계 가슴살 펩타이드 추출물의 TRAP 활성도를 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 1년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $60.8 \pm 1.6\%$, $53.6 \pm 4.1\%$, $40.5 \pm 5.2\%$ 의 활성도를 나타내었으며, 3년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $53.9 \pm 3.1\%$, $43.8 \pm 0.8\%$, $36.0 \pm 4.6\%$ 의 활성도를 나타내었다. 또한, 3년산 암탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $47.3 \pm 0.0\%$, $43.5 \pm 4.9\%$, $41.4 \pm 6.2\%$ 의 활성도를 나타내었다.

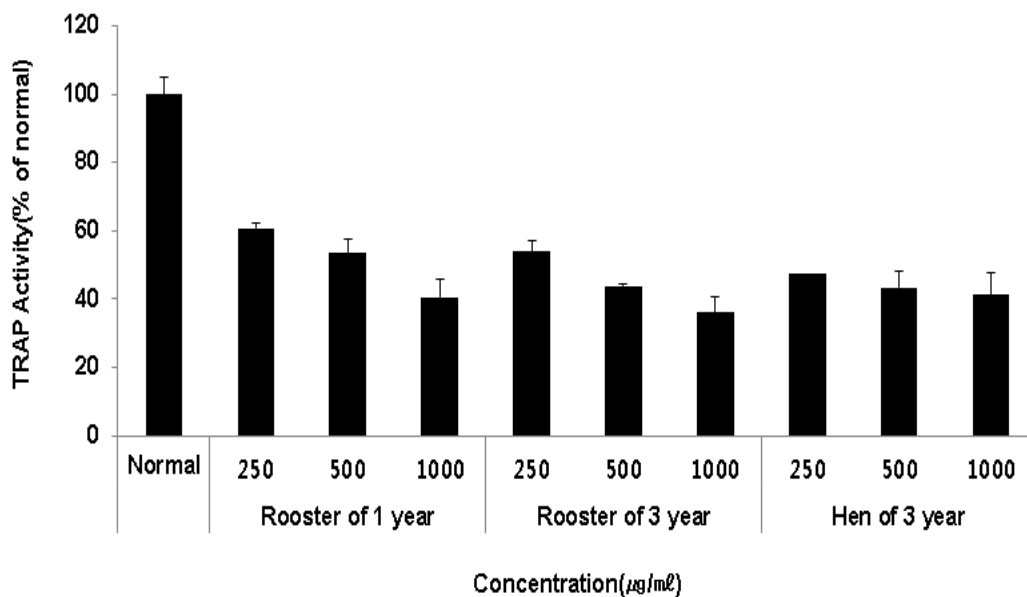


Fig. 66. Effects of water extracts of the breast peptide in YO on the TRAP activities of the RAW 264.7 osteoclast cell during the differentiation. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of breast peptide extract for 24hr. The TRAP activity was analyzed by ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(5) 날개살 펩타이드 추출물

파골 세포에서 연산오계 날개살 펩타이드 추출물의 TRAP 활성도를 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 3년산 수탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $58.6 \pm 8.4\%$, $55.5 \pm 5.2\%$, $50.7 \pm 6.1\%$ 의 활성도를 나타내었으며, 3년산 암탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $56.3 \pm 3.0\%$, $48.6 \pm 3.4\%$, $41.9 \pm 3.4\%$ 의 활성도를 나타내었다.

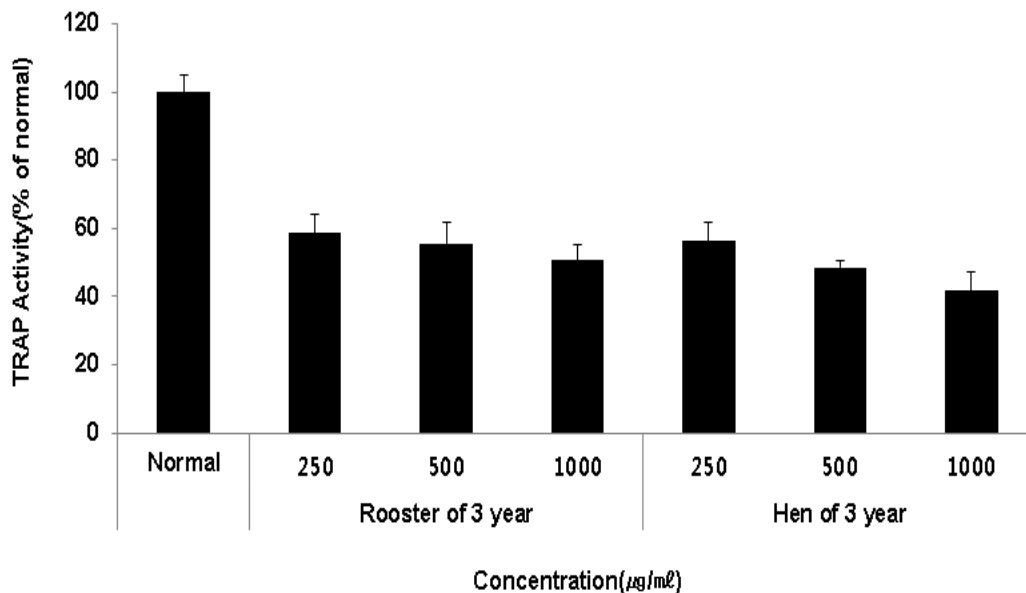


Fig. 67. Effects of water extracts of the wings peptide in YO on the TRAP activities of the RAW 264.7 osteoclast cell during the differentiation. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of wings peptide extract for 24hr. The TRAP activity was analyzed by ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(6) 오계란 및 내장 펩타이드 추출물

파골 세포에서 연산오계란 및 내장 펩타이드 추출물의 TRAP 활성도를 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 5.0\%$ 로 나타냈을 때 오계란은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $55.2 \pm 4.0\%$, $42.6 \pm 2.9\%$, $36.8 \pm 5.4\%$ 의 활성도를 나타내었으며, 3년산 암탉은 250, 500, 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $47.9 \pm 4.2\%$, $37.5 \pm 4.0\%$, $36.8 \pm 4.9\%$ 의 활성도를 나타내었다.

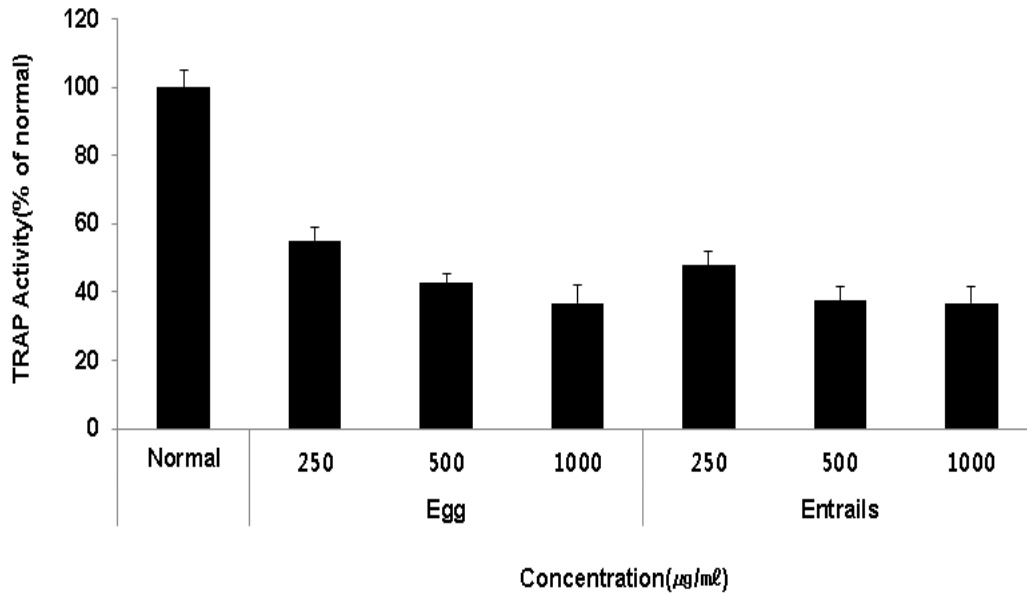


Fig. 68. Effects of water extracts of the egg and entrails in YO on the TRAP activities of the RAW 264.7 osteoclast cell during the differentiation. Each cell was treated with 250, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of egg and entrails extract for 24hr. The TRAP activity was analyzed by ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

■ In-vivo (생리활성)

가. 체중 및 식이량 변화

실험이 진행되는 동안 오계 단백질 가수분해물의 펩타이드 시료의 부위 및 농도에 따른 체중과 식이량 변화를 확인한 결과, 그룹간의 변화는 큰 차이가 나타나지 않았다.

Table 5 Change of Feed Intake and Body Weight in BLAB/c Mice

Composition	Normal	Control	Peptide of egg			Peptide of viscera			Peptide of meat		
			500	1000	2000	500	1000	2000	500	1000	2000
Feed intake (g)	2.89	2.95	2.88	2.79	3.01	2.94	2.86	2.88	3.08	2.89	3.02
Initial body weight (g)	21.51	21.83	21.41	21.69	22.54	22.18	22.14	21.27	21.67	21.51	21.95
Final body weight (g)	26.22	26.55	26.26	26.41	27.29	26.73	27.12	26.10	26.48	26.57	26.80
Feed intake (g/day/10 g of body weight)	1.21	1.22	1.21	1.16	1.21	1.20	1.16	1.22	1.28	1.20	1.24
Daily weight gain / daily feed intake	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06

나. 혈청 내 사이토카인 생성량 측정

(1) TNF- α

실험 종료 후 혈청 내 TNF- α 를 측정된 결과, 정상군은 7.6 ± 6.4 pg/ml, 대조군은 407.0 ± 28.2 pg/ml로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 164.9 ± 15.3 pg/ml, 114.9 ± 22.7 pg/ml, 61.8 ± 34.4 pg/ml로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 64.2 ± 26.9 pg/ml, 72.1 ± 13.6 pg/ml, 82.7 ± 15.1 pg/ml로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 79.2 ± 18.1 pg/ml, 59.2 ± 25.2 pg/ml, 58.3 ± 28.3 pg/ml로 나타나, 모든 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (***) : $p < 0.001$) 감소를 나타내어 단백질 가수분해물의 펩타이드 시료를 부위 및 농도별로 투여한 모든 그룹에서 효능을 확인됨에 따라 선천 면역력을 상승시켜 준 것으로 판단된다.

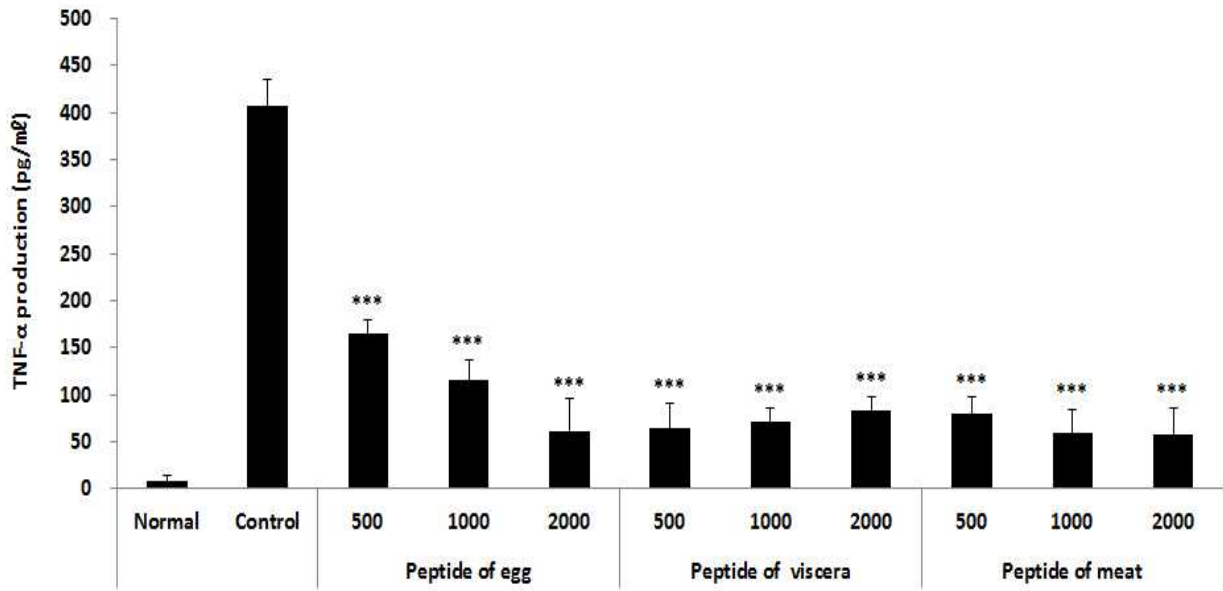


Fig. 69. Effect of Yeonsan Ogye on TNF- α production in the serum of LPS-induced inflammatory model mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (significance of results, *** : $p < 0.001$ compare of control)(n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

(2) IFN- γ

실험 종료 후 혈청 내 IFN- γ 를 측정된 결과, 정상군은 4.2 ± 1.6 pg/ml, 대조군은 6.3 ± 2.1 pg/ml로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 34.3 ± 29.8 pg/ml, 205.7 ± 94.9 pg/ml, 498.5 ± 134.2 pg/ml로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 400.4 ± 161.8 pg/ml, 378.9 ± 117.0 pg/ml, 671.4 ± 74.3 pg/ml으로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 585.8 ± 98.2 pg/ml, 586.5 ± 167.4 pg/ml, 811.4 ± 16.0 pg/ml로 나타나, 란 500 mg/kg/day 실험군을 제외한 모든 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 증가를 나타내었다.

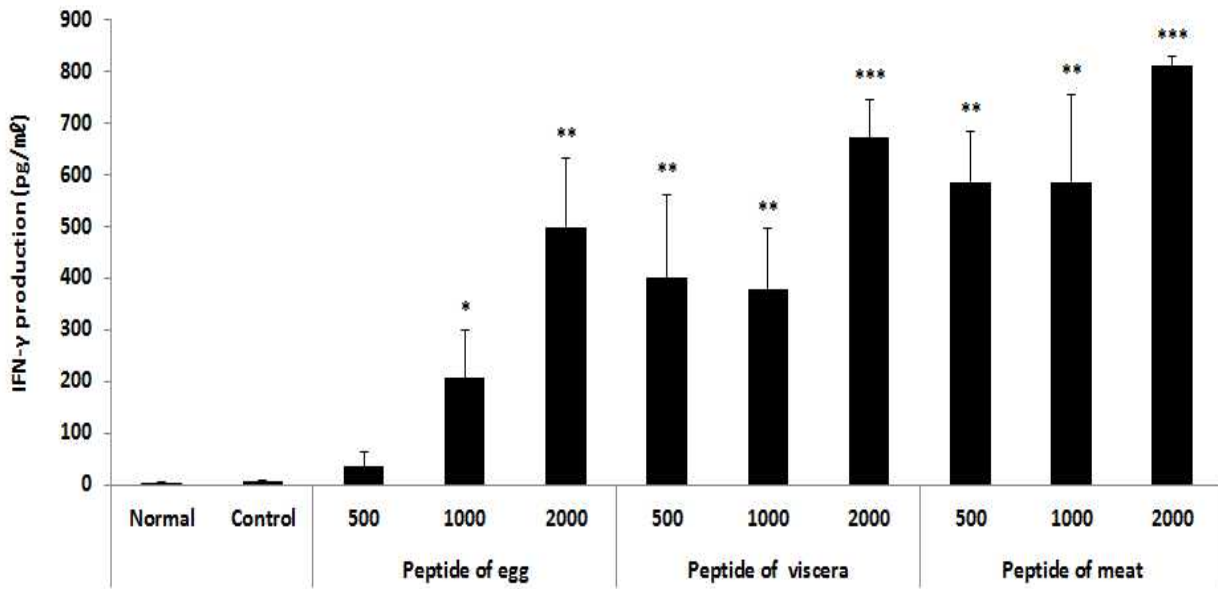


Fig. 70. Effect of Yeosan Ogye on IFN- γ production in the serum of LPS-induced inflammatory model mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compare of control)(n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

(3) IL-4

실험 종료 후 혈청 내 IL-4를 측정된 결과, 정상군은 32.3 ± 2.1 pg/ml, 대조군은 29.3 ± 2.3 pg/ml로 나타났을 때,란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 31.7 ± 5.5 pg/ml, 34.0 ± 5.3 pg/ml, 38.7 ± 1.5 pg/ml로 나타났으며. 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 32.0 ± 4.0 pg/ml, 31.3 ± 1.2 pg/ml, 34.0 ± 2.0 pg/ml로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 35.3 ± 2.3 pg/ml, 32.0 ± 2.0 pg/ml, 34.7 ± 5.0 pg/ml로 나타나, 모든 실험군은 대조군에 비해 증가를 나타내었다.

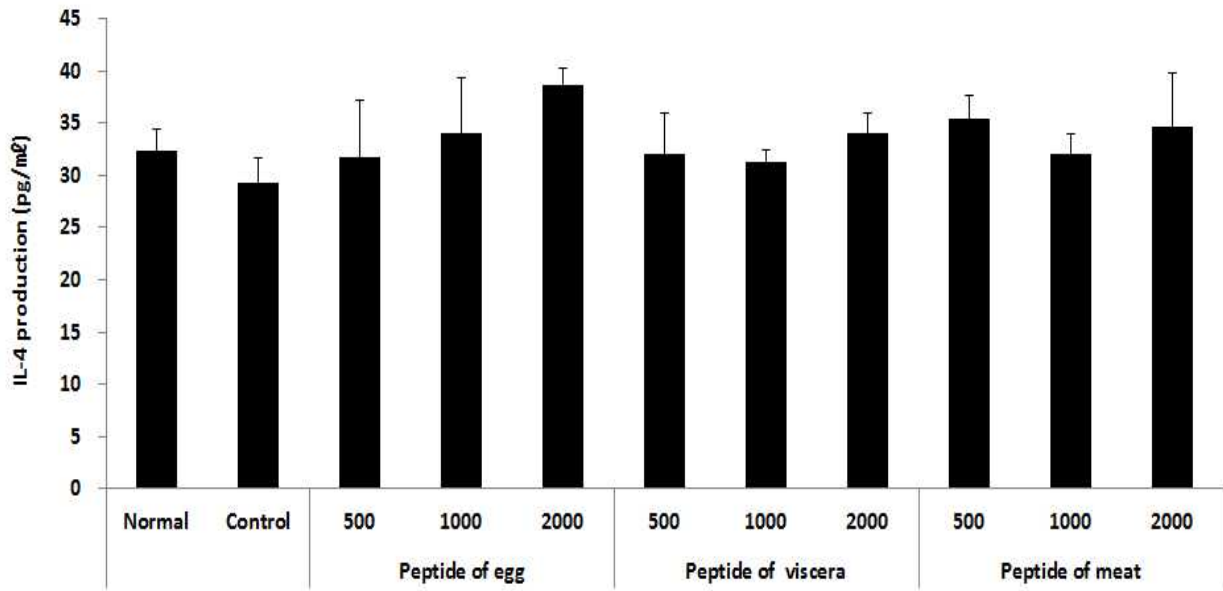


Fig. 71. Effect of Yeonsan Ogye on IL-4 production in the serum of LPS-induced inflammatory model mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

(4) IL-5

실험 종료 후 혈청 내 IL-5를 측정된 결과, 정상군은 0.3 ± 0.1 pg/ml, 대조군은 12.0 ± 4.5 pg/ml로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 19.4 ± 0.8 pg/ml, 19.5 ± 1.6 pg/ml, 20.3 ± 1.3 pg/ml로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 27.7 ± 5.6 pg/ml, 27.9 ± 7.5 pg/ml, 28.3 ± 5.7 pg/ml로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 42.7 ± 2.6 pg/ml, 44.1 ± 1.8 pg/ml, 45.3 ± 3.1 pg/ml로 나타나, 모든 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 증가를 나타내었다.

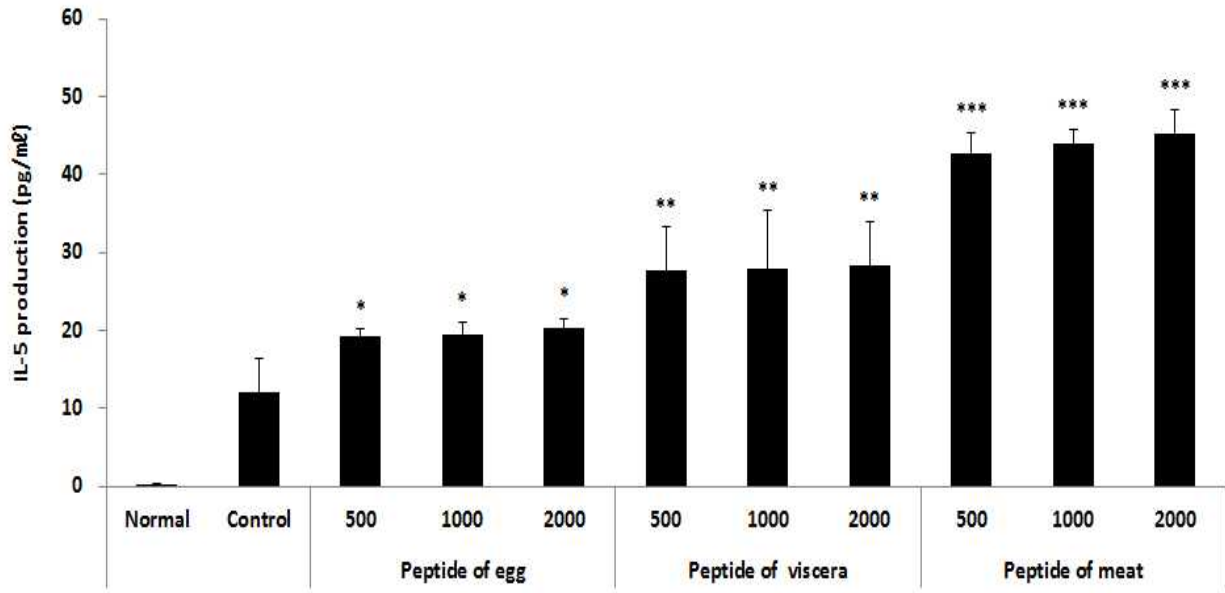


Fig. 72. Effect of Yeonsan Ogye on IL-5 production in the serum of LPS-induced inflammatory model mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compare of control)(n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

(5) IL-6

실험 종료 후 혈청 내 IL-6를 측정된 결과, 정상군은 1.6 ± 0.7 pg/ml, 대조군은 76998.9 ± 5031.7 pg/ml로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 79098.9 ± 1410.5 pg/ml, 76243.3 ± 2405.8 pg/ml, 56786.0 ± 4107.0 pg/ml로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 50963.2 ± 5849.4 pg/ml, 51933.9 ± 9940.1 pg/ml, 66449.0 ± 5514.2 pg/ml로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 45994.7 ± 2063.0 pg/ml, 36993.4 ± 2551.9 pg/ml, 30606.8 ± 4754.1 pg/ml로 나타나, 란 2000, 내장 500, 1000, 육 1000, 2000 mg/kg/day 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소를 나타내어 급성 염증에 의한 방어 뿐만 아니라 관절염 질환에도 효능을 가질 것으로 확인되었다.

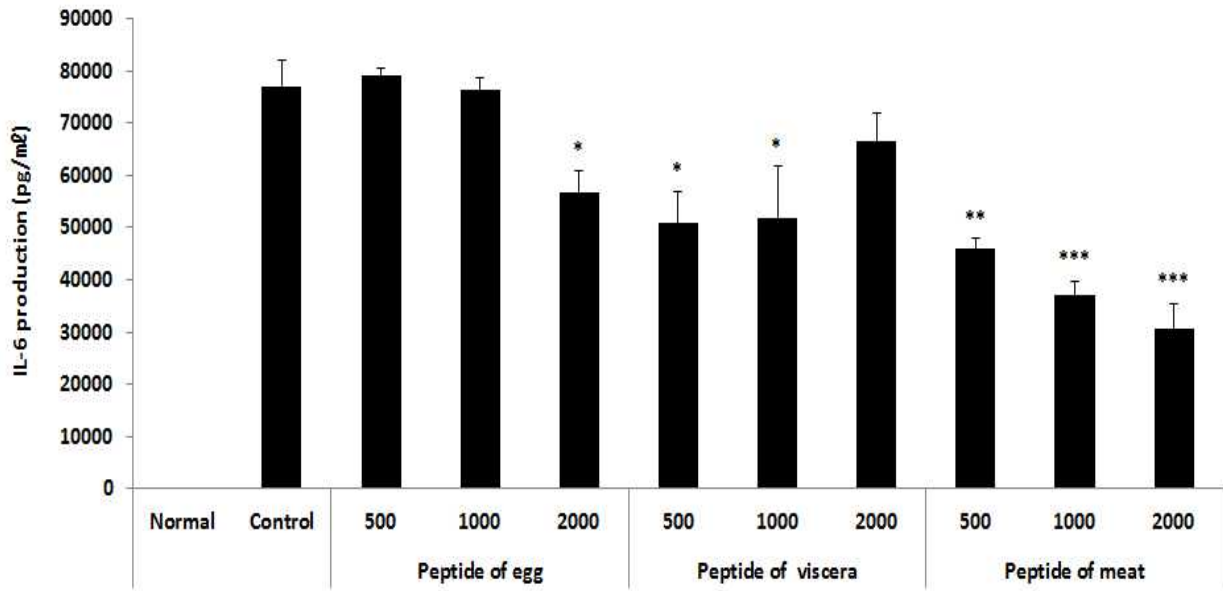


Fig. 73. Effect of Yeonsan Ogye on IL-6 production in the serum of LPS-induced inflammatory model mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compare of control)(n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

(6) IL-13

실험 종료 후 혈청 내 IL-13를 측정된 결과, 정상군은 47.3 ± 3.1 pg/mL, 대조군은 38.7 ± 1.2 pg/mL으로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 40.7 ± 1.2 pg/mL, 42.0 ± 4.0 pg/mL, 43.3 ± 3.1 pg/mL로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 43.3 ± 3.1 pg/mL, 43.7 ± 4.9 pg/mL, 40.7 ± 5.0 pg/mL로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 44.7 ± 1.2 pg/mL, 41.3 ± 2.3 pg/mL, 40.7 ± 5.0 pg/mL로 나타나, 그룹간의 차이는 나타나지 않았다.

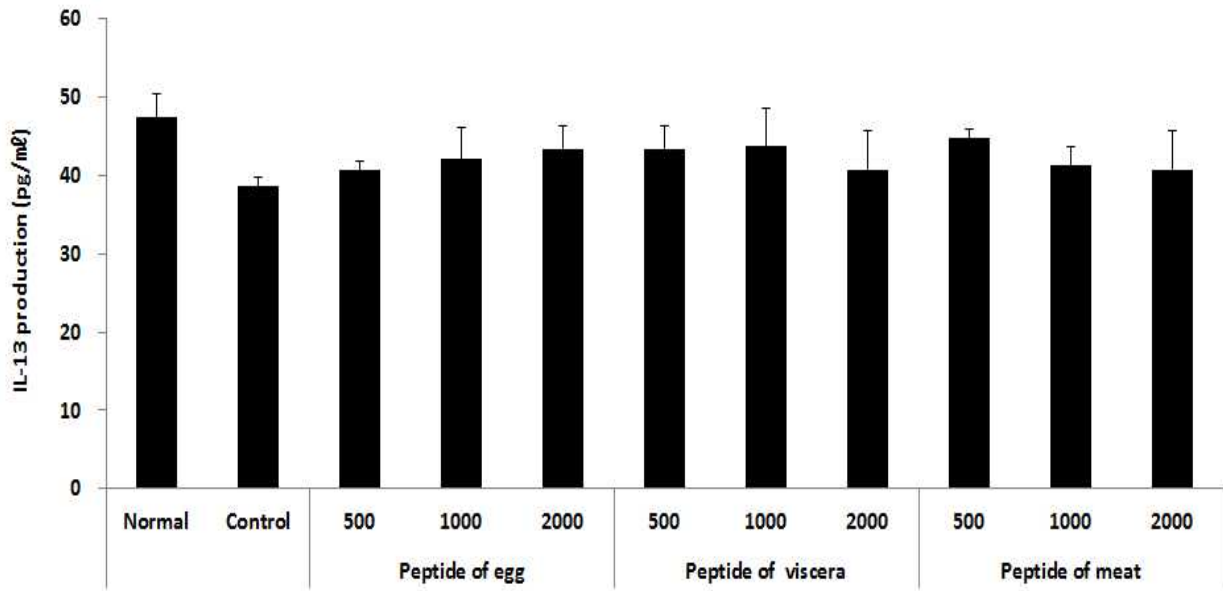


Fig. 74. Effect of Yeonsan Ogye on IL-13 production in the serum of LPS-induced inflammatory model mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

다. 혈액 내 면역세포 수

(1) 백혈구 수

실험 종료 후 혈액 내 백혈구를 측정된 결과, 정상군은 $1.0 \pm 0.4 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$, 대조군은 $4.6 \pm 0.7 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$ 로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $1.7 \pm 0.7 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$, $1.3 \pm 0.1 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$, $1.0 \pm 0.2 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$ 로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $1.5 \pm 0.8 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$, $1.6 \pm 0.4 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$, $1.6 \pm 0.6 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$ 으로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $0.9 \pm 0.2 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$, $2.0 \pm 1.3 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$, $1.3 \pm 0.1 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$ 로 나타나, 육질 1000 mg/kg/day 실험군을 제외한 모든 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소를 나타내었다.

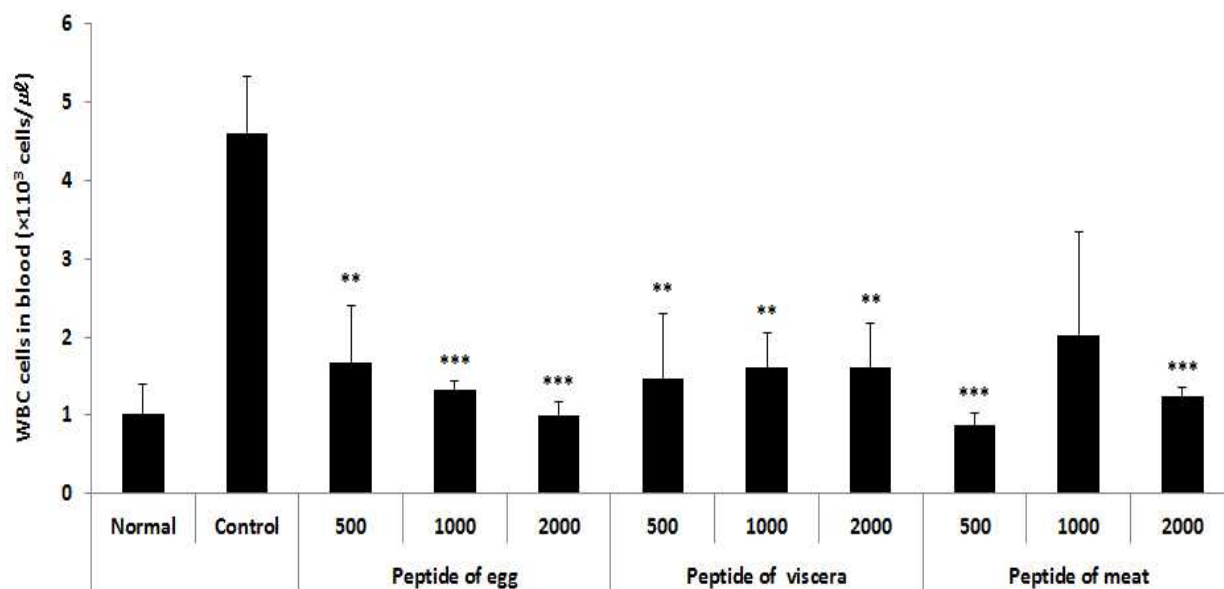


Fig. 75. Effect of Yeonsan Ogye on WBC in the blood of LPS-induced inflammatory model mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (significance of results, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compare of control)(n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

(2) 호중구

실험 종료 후 백혈구에 대한 호중구 비율을 측정한 결과, 정상군은 $3.6 \pm 1.5\%$, 대조군은 $8.7 \pm 4.1\%$ 로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $13.4 \pm 4.5\%$, $14.0 \pm 2.6\%$, $8.5 \pm 5.6\%$ 로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $7.9 \pm 3.7\%$, $8.4 \pm 4.8\%$, $14.6 \pm 3.9\%$ 으로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $11.6 \pm 4.8\%$, $10.8 \pm 3.3\%$, $4.4 \pm 1.2\%$ 로 나타나, 육질 2000 mg/kg/day 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (* : $p < 0.05$) 감소를 나타내었다.

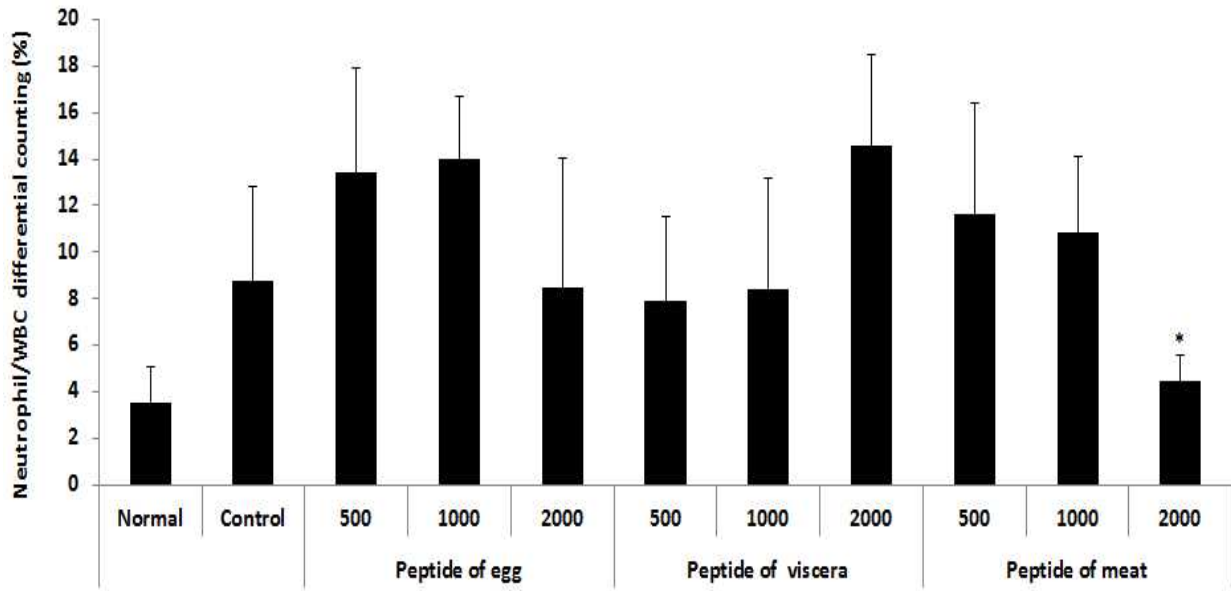


Fig. 76. Effect of Yeonsan Ogye on ratio of Neutrophil to WBC in LPS-induced inflammatory model mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (significance of results, * : $p < 0.05$ compare of control)(n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

(3) 림프구

실험 종료 후 백혈구에 대한 림프구 비율을 측정된 결과, 정상군은 $94.8 \pm 0.4\%$, 대조군은 $83.1 \pm 6.7\%$ 로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $80.6 \pm 6.8\%$, $78.6 \pm 8.7\%$, $86.8 \pm 6.6\%$ 로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $83.3 \pm 6.7\%$, $81.4 \pm 17.2\%$, $73.2 \pm 9.4\%$ 으로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $69.8 \pm 12.3\%$, $79.6 \pm 12.1\%$, $87.4 \pm 8.3\%$ 로 나타나, 그룹간의 차이는 나타나지 않았다.

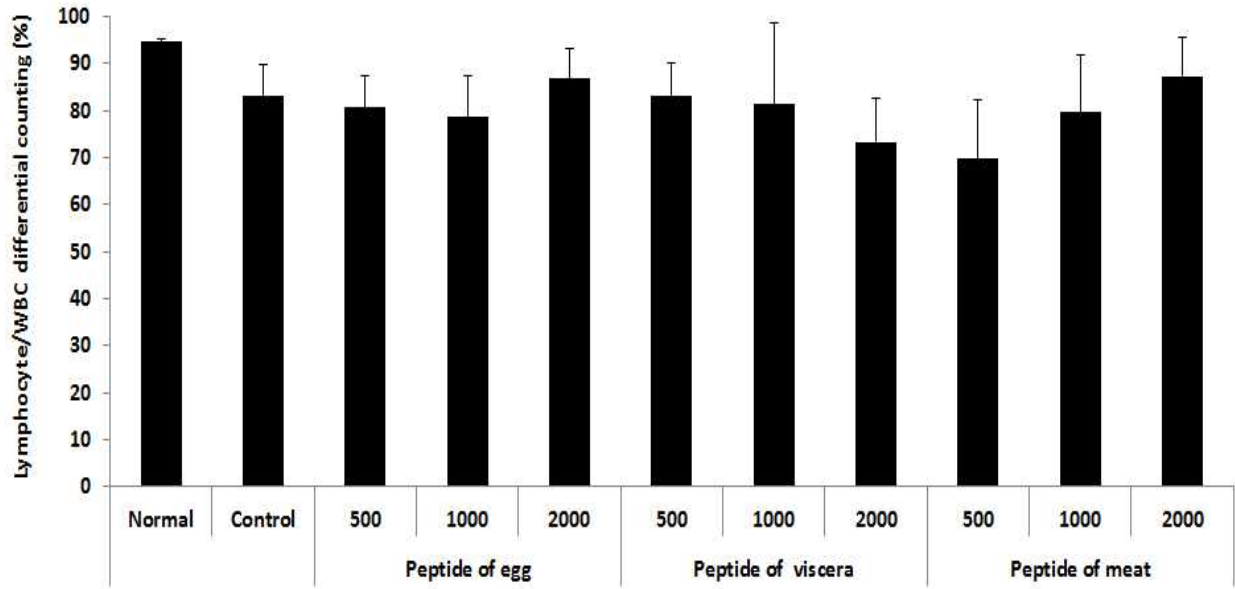


Fig. 77. Effect of Yeonsan Ogye on ratio of Lymphocyte to WBC in LPS-induced inflammatory model mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

(4) 대식세포

실험 종료 후 백혈구에 대한 단핵구 비율을 측정된 결과, 정상군은 $1.5 \pm 1.4\%$, 대조군은 $10.9 \pm 3.0\%$ 로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $5.6 \pm 3.0\%$, $8.5 \pm 3.3\%$, $4.0 \pm 2.4\%$ 로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $11.4 \pm 1.3\%$, $13.7 \pm 0.8\%$, $16.5 \pm 3.8\%$ 으로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $15.2 \pm 4.3\%$, $13.1 \pm 2.8\%$, $10.5 \pm 4.9\%$ 로 나타나, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 실험군을 제외한 모든 실험군은 대조군에 비해 증가를 나타내었다.

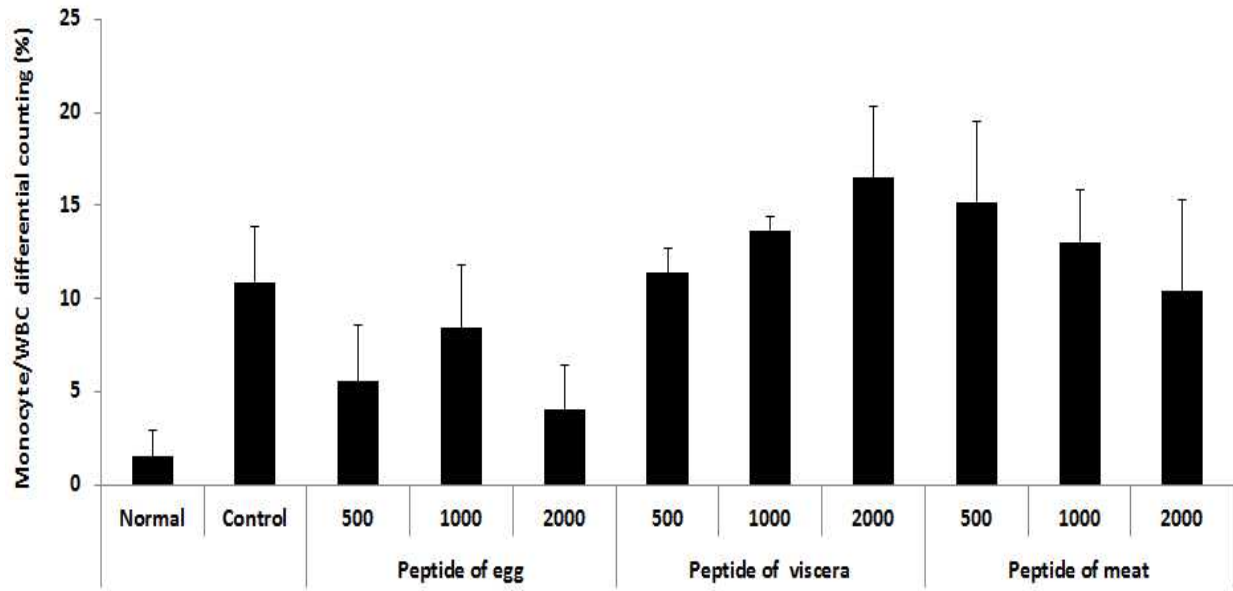


Fig. 78. Effect of Yeonsan Ogye on ratio of Monocyte to WBC in LPS-induced inflammatory model mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

라. 유전자 발현

(1) TNF- α

실험 종료 후 TNF- α 유전자 발현을 측정된 결과, 정상군은 $9.4 \pm 0.7\%$, 대조군은 $100.0 \pm 1.9\%$ 로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $47.9 \pm 1.2\%$, $45.3 \pm 2.4\%$, $42.3 \pm 2.2\%$ 로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $72.3 \pm 2.6\%$, $52.1 \pm 3.0\%$, $12.4 \pm 2.3\%$ 으로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $84.9 \pm 3.3\%$, $52.6 \pm 1.5\%$, $36.7 \pm 0.5\%$ 로 나타나, 모든 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소를 나타내어 혈청 내 사이토카인 측정 결과와 부합되는 결과가 나타났다.

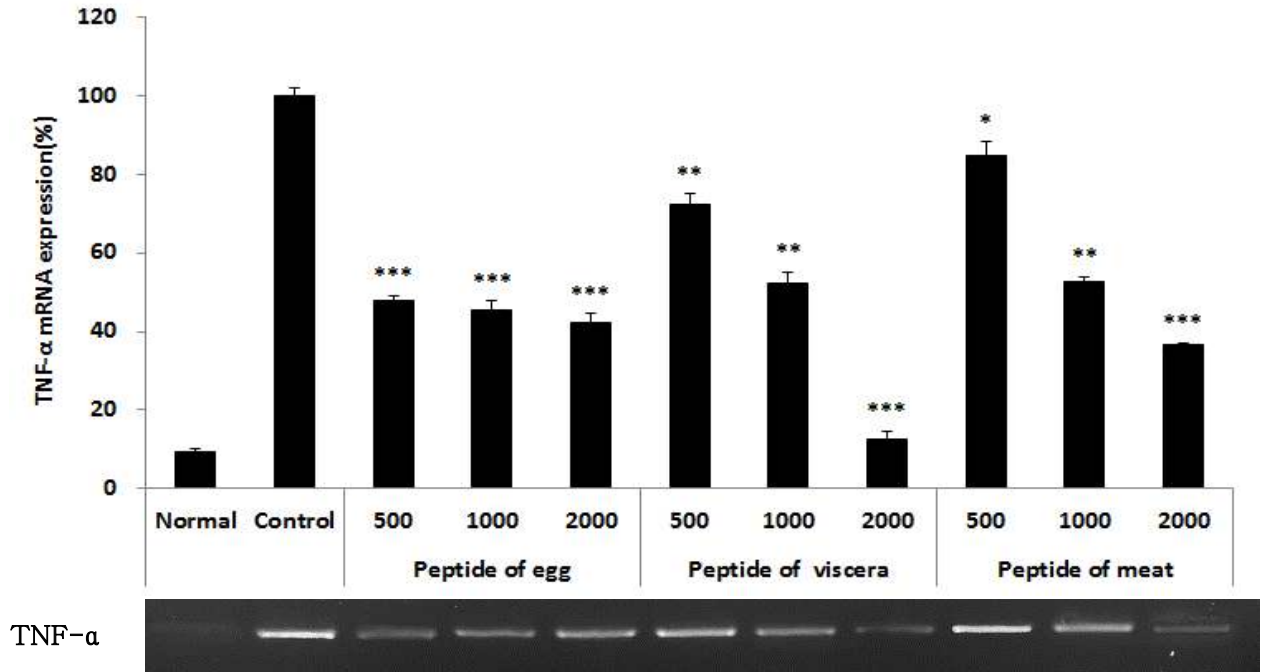


Fig. 79. Effect of Yeonsan Ogye on TNF- α mRNA expression in spleen of LPS-induced inflammatory model mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compare of control)(n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

(2) IFN- γ

실험 종료 후 IFN- γ 유전자 발현을 측정 한 결과, 정상군은 $6.7 \pm 3.9\%$, 대조군은 $100.0 \pm 7.6\%$ 로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $96.1 \pm 11.5\%$, $83.7 \pm 7.3\%$, $108.1 \pm 4.0\%$ 로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $116.6 \pm 9.4\%$, $114.9 \pm 11.6\%$, $201.6 \pm 10.5\%$ 으로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $132.6 \pm 5.4\%$, $204.1 \pm 11.5\%$, $223.9 \pm 11.3\%$ 로 나타나, 내장 2000, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (* : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$) 증가를 나타내었다.

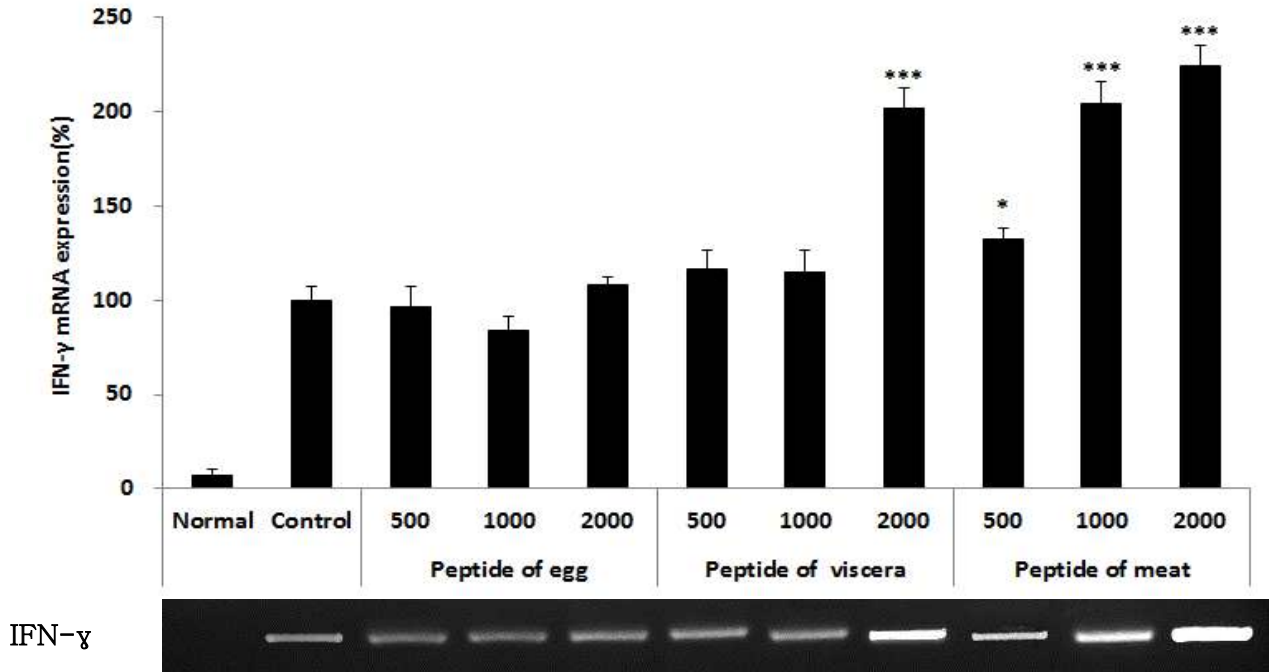


Fig. 80. Effect of Yeonsan Ogye on IFN- γ mRNA expression in spleen of LPS-induced inflammatory model mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (significance of results, * : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$ compare of control)(n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

(3) IL-4

실험 종료 후 IL-4 유전자 발현을 측정한 결과, 정상군은 $31.1 \pm 2.9\%$, 대조군은 $100.0 \pm 1.1\%$ 로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $49.6 \pm 1.5\%$, $79.9 \pm 2.6\%$, $80.6 \pm 3.3\%$ 로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $62.7 \pm 2.1\%$, $74.5 \pm 3.6\%$, $75.9 \pm 4.1\%$ 으로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $64.2 \pm 2.9\%$, $76.0 \pm 1.1\%$, $77.5 \pm 1.8\%$ 로 나타나, 모든 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소를 나타내었다.

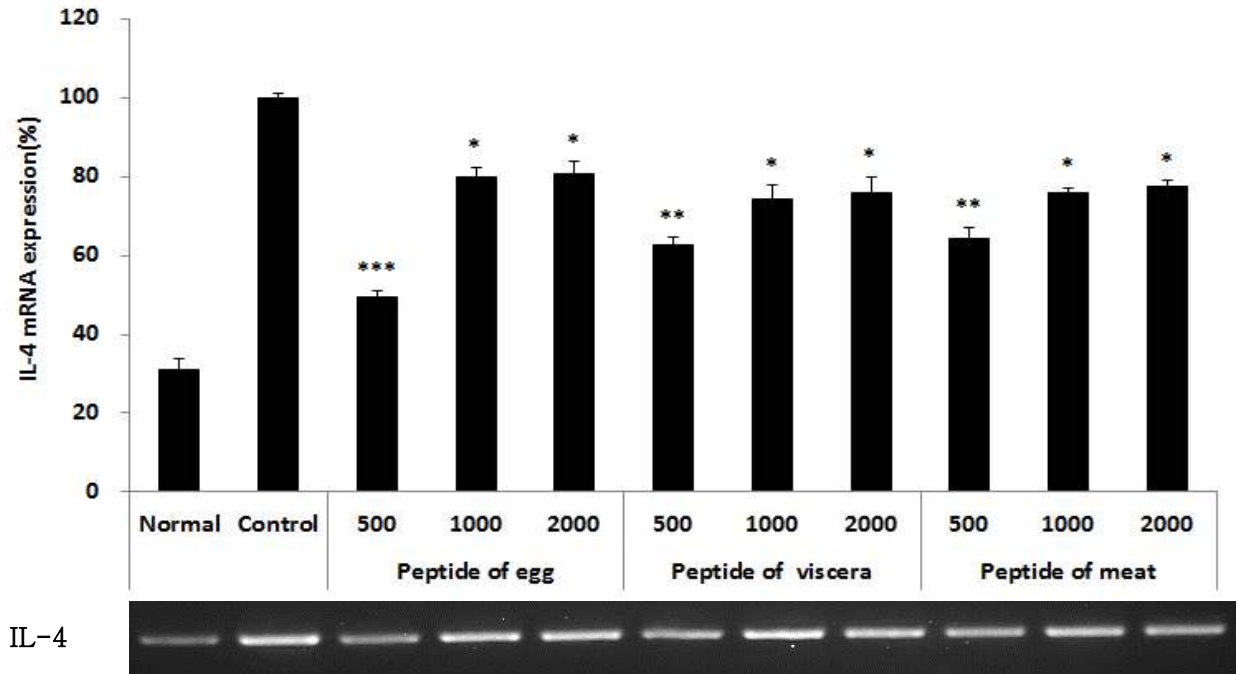


Fig. 81. Effect of Yeonsan Ogye on IL-4 mRNA expression in spleen of LPS-induced inflammatory model mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compare of control)(n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

(4) IL-5

실험 종료 후 IL-5 유전자 발현을 측정한 결과, 정상군은 $0.1 \pm 3.7\%$, 대조군은 $100.0 \pm 2.0\%$ 로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $114.8 \pm 1.1\%$, $121.0 \pm 2.6\%$, $122.7 \pm 4.8\%$ 로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $157.8 \pm 1.9\%$, $158.7 \pm 2.5\%$, $170.0 \pm 3.8\%$ 으로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $140.7 \pm 1.6\%$, $151.1 \pm 2.7\%$, $160.1 \pm 2.0\%$ 로 나타나, 모든 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 증가를 나타내었다.

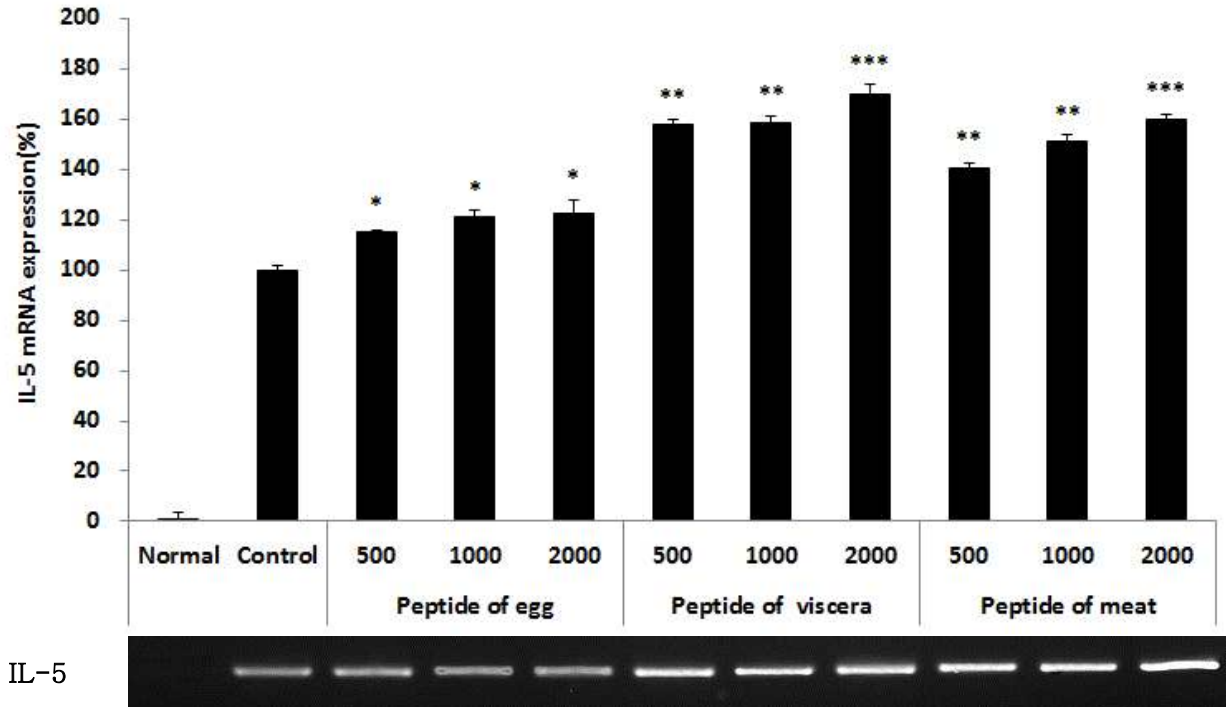


Fig. 82. Effect of Yeonsan Ogye on IL-5 mRNA expression in spleen of LPS-induced inflammatory model mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compare of control)(n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

(5) IL-6

실험 종료 후 IL-6 유전자 발현을 측정한 결과, 정상군은 $22.1 \pm 1.1\%$, 대조군은 $100.0 \pm 5.6\%$ 로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $83.4 \pm 4.5\%$, $75.2 \pm 4.1\%$, $42.4 \pm 3.2\%$ 로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $19.5 \pm 3.7\%$, $28.6 \pm 2.9\%$, $77.1 \pm 1.5\%$ 으로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $64.1 \pm 4.1\%$, $49.1 \pm 4.3\%$, $48.2 \pm 1.8\%$ 로 나타나, 모든 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소를 나타내었다.

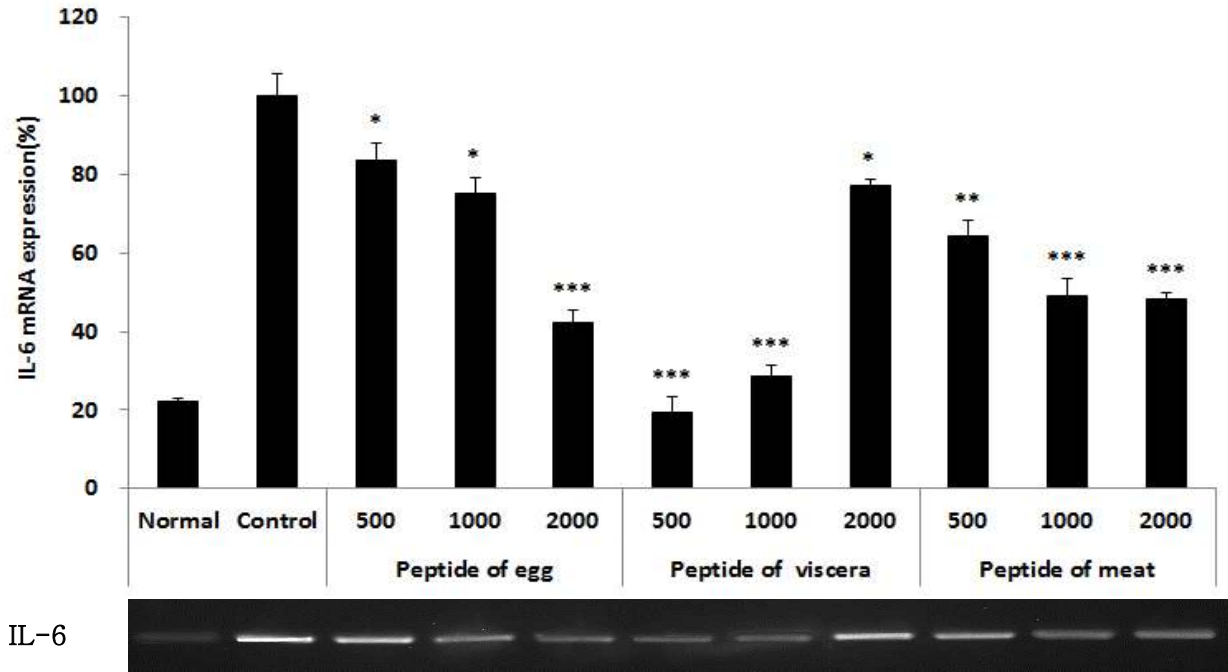


Fig. 83. Effect of Yeonsan Ogye on IL-6 mRNA expression in spleen of LPS-induced inflammatory model mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compare of control)(n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

(6) IL-13

실험 종료 후 IL-13 유전자 발현을 측정한 결과, 정상군은 $70.5 \pm 2.6\%$, 대조군은 $100.0 \pm 3.2\%$ 로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $83.4 \pm 3.7\%$, $83.6 \pm 1.8\%$, $69.6 \pm 3.8\%$ 로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $69.5 \pm 1.6\%$, $72.8 \pm 2.2\%$, $68.7 \pm 2.9\%$ 으로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $71.2 \pm 1.0\%$, $74.0 \pm 1.9\%$, $76.0 \pm 3.5\%$ 로 나타나, 모든 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$) 감소를 나타내었다.

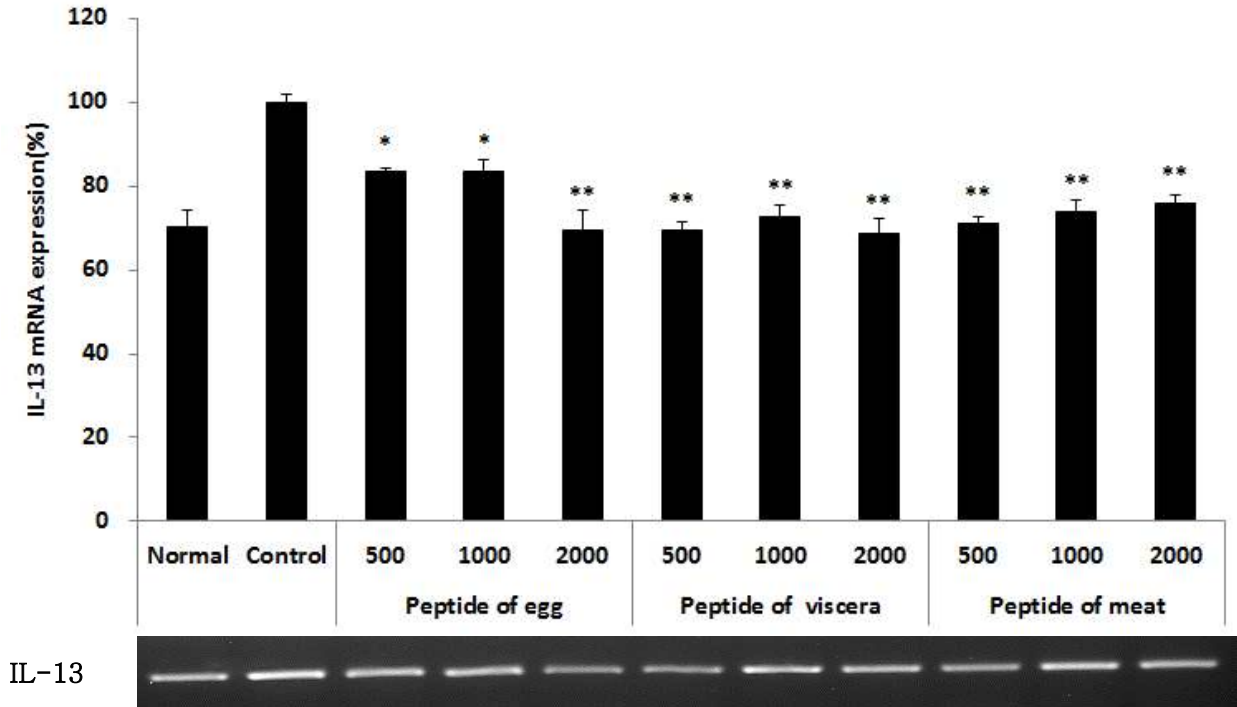


Fig. 84. Effect of Yeonsan Ogye on IL-13 mRNA expression in spleen of LPS-induced inflammatory model mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare of control)(n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

■ In-vivo (퇴행성관절염)

가. 체중 부하 측정

실험 종료 주차에 체중부하측정을 진행한 결과, 정상군은 $209.5 \pm 31.0\%$, 대조군은 $100.0 \pm 31.1\%$ 로 나타난 반면, 연산오계란 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 $149.7 \pm 15.8\%$, $150.7 \pm 40.2\%$, $156.1 \pm 11.2\%$ 로 나타났고 연산오계육질 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 $132.2 \pm 26.8\%$, $172.8 \pm 38.2\%$, $136.4 \pm 24.8\%$ 로 나타나, 연산오계란 펩타이드 추출물과 육질 펩타이드 추출물 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 (***) : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$) 증가가 나타나 퇴행성 관절염 질환을 늦추는 것으로 확인되었다.

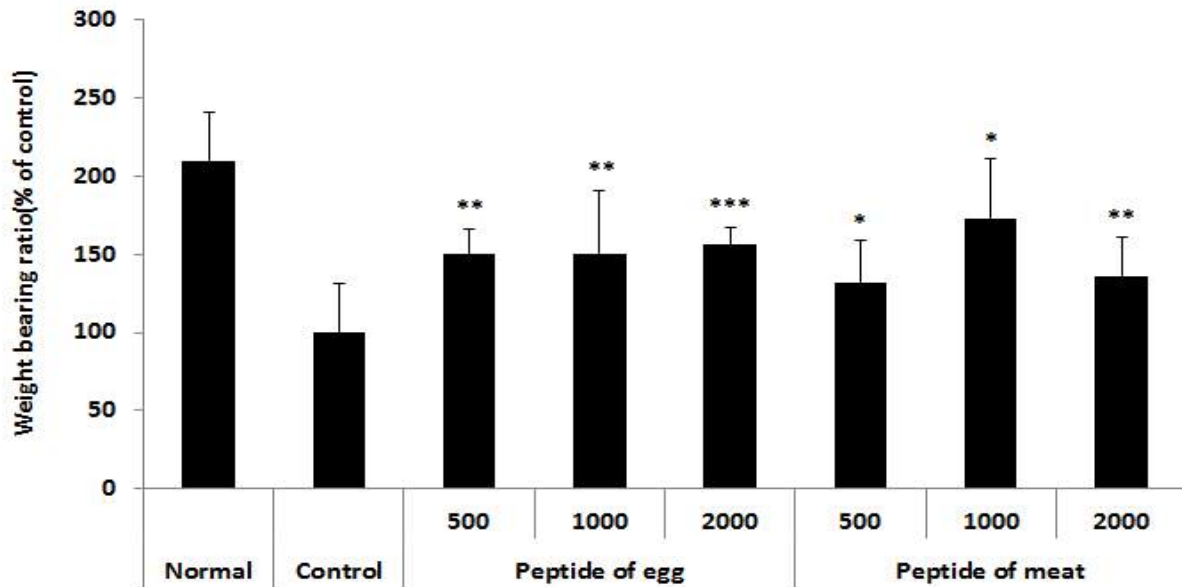


Fig. 85. Effects of peptide of egg and meat extract on weight bearing ratio in the hind paw of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test (*** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

Normal : Normal SD-rat group

Control : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group

500 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 500 mg/kg/day

1000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 1,000 mg/kg/day

2000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 2,000 mg/kg/day

나. 관절염 유관 인자

(1) MMP-2 생성량

혈청 내 MMP-2 생성량을 측정한 결과, 정상군은 848.4 ± 14.9 ng/ml, 대조군은 1544.3 ± 187.9 ng/ml로 나타난 반면, 연산오계란 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 1024.4 ± 132.7 ng/ml, 1351.3 ± 340.2 ng/ml, 1252.6 ± 226.4 ng/ml로 나타났고 연산오계육질 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 1102.5 ± 178.6 ng/ml, 1388.1 ± 91.0 ng/ml, 1185.3 ± 246.3 ng/ml로 나타나, 연산오계란 펩타이드 추출물 500 mg/kg 투여군과 육질 펩타이드 추출물 500, 1000 (mg/kg) 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 (** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$) 감소가 나타났다.

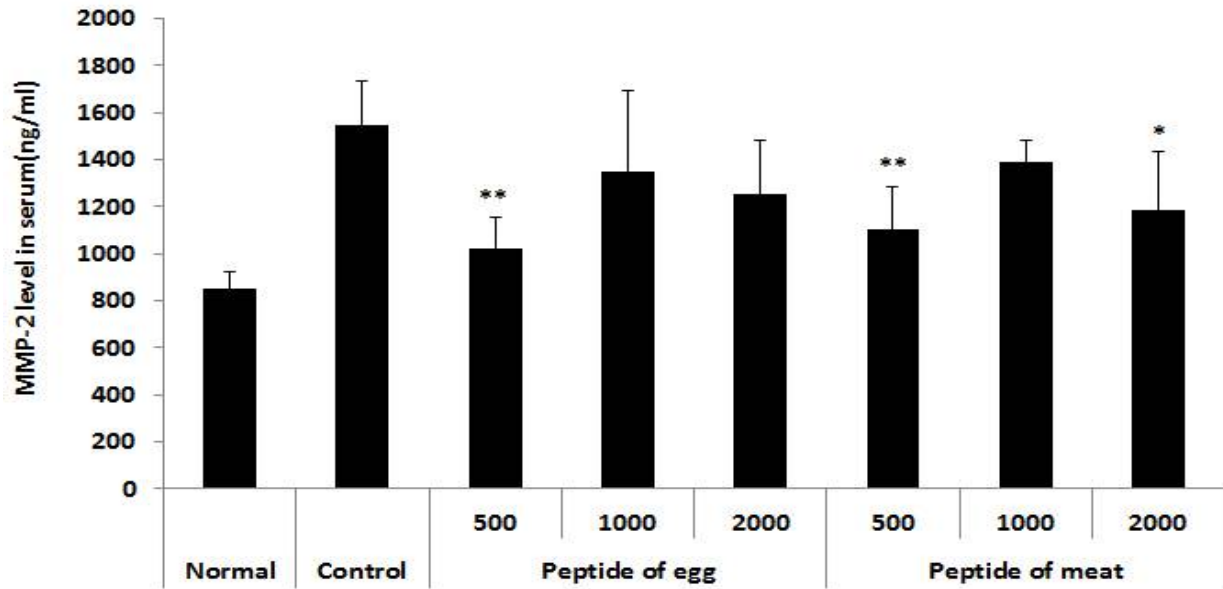


Fig. 86. Effects of peptide of egg and meat on levels of MMP-2 in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test (** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

Normal : Normal SD-rat group

Control : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group

500 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 500 mg/kg/day

1000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 1,000 mg/kg/day

2000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 2,000 mg/kg/day

(2) MMP-9

혈청 내 MMP-9 생성량을 측정된 결과, 정상군은 11.5 ± 2.3 ng/ml, 대조군은 18.6 ± 4.5 ng/ml로 나타난 반면, 연산오계란 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 14.7 ± 3.6 ng/ml, 16.2 ± 5.9 ng/ml, 18.5 ± 4.7 ng/ml로 나타났고 연산오계육 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 13.0 ± 5.5 ng/ml, 13.1 ± 5.9 ng/ml, 15.2 ± 4.2 ng/ml로 나타나, 연산오계란 펩타이드 추출물과 육질 펩타이드 추출물 투여군은 대조군에 비해 감소되는 경향을 보였으나 유의성이 나타나지는 않았다.

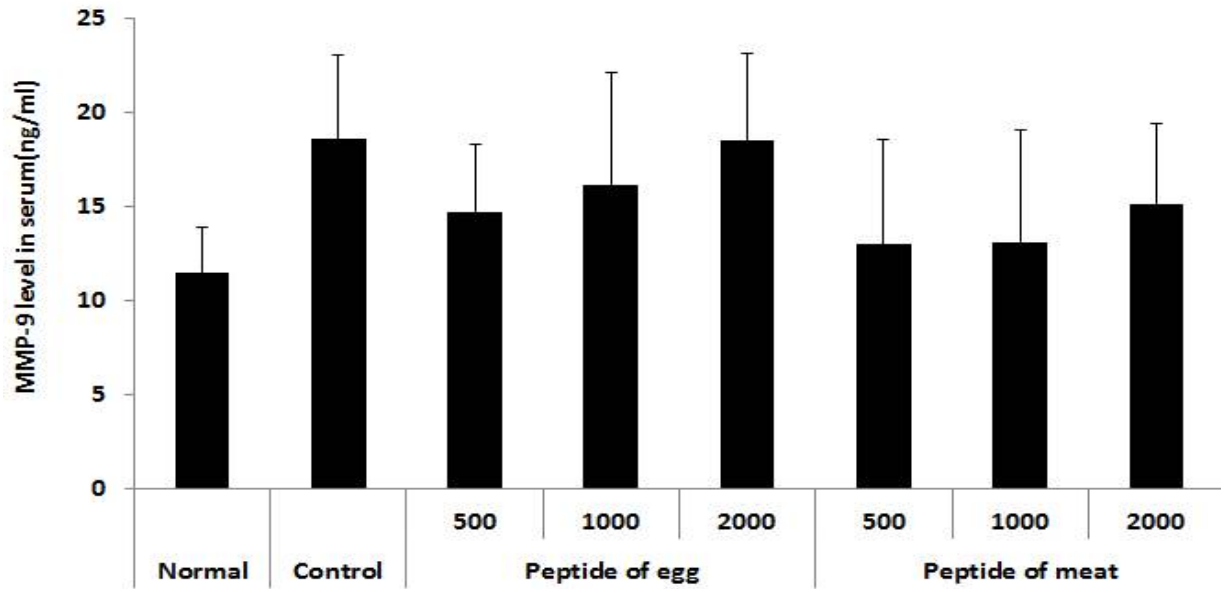


Fig. 87. Effects of peptide of egg and meat on levels of MMP-9 in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats.

Normal : Normal SD-rat group

Control : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group

500 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 500 mg/kg/day

1000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 1,000 mg/kg/day

2000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 2,000 mg/kg/day

(3) TIMP-1

혈청 내 TIMP-1 생성량을 측정된 결과, 정상군은 10431.4 ± 1657.6 pg/ml, 대조군은 12396.6 ± 910.4 pg/ml로 나타난 반면, 연산오계 란 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 9733.1 ± 698.5 pg/ml, 10573.6 ± 1171.2 pg/ml, 10573.6 ± 1171.2 pg/ml로 나타났고 연산오계 육질 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 9530.4 ± 816.5 pg/ml, 9595.9 ± 890.7 pg/ml, 9714.8 ± 819.0 pg/ml로 나타나, 연산오계 란 펩타이드 추출물과 육질 펩타이드 추출물 투여군은 대조군에 비해 감소되는 경향을 보여 MMP-2, -9과 부합되는 결과가 확인되어 연골 손상 방지 할 수 있을 것이라 판단된다.

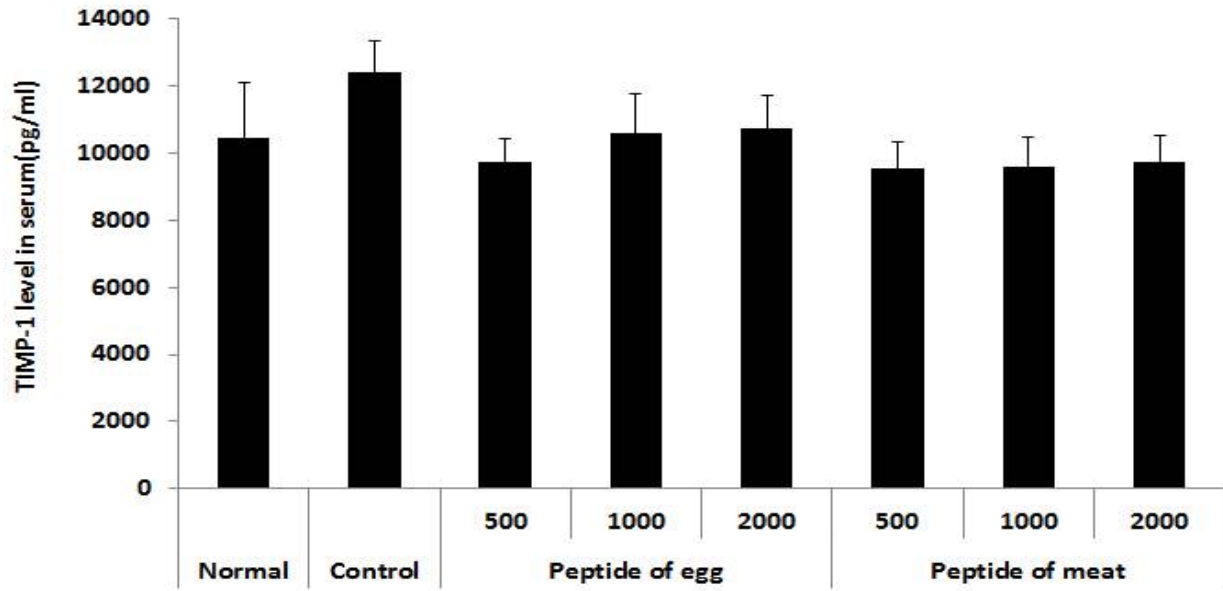


Fig. 88. Effects of peptide of egg and meat on levels of TIMP-1 in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats.

Normal : Normal SD-rat group

Control : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group

500 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 500 mg/kg/day

1000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 1,000 mg/kg/day

2000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 2,000 mg/kg/day

(4) Aggrecan 생성량

혈청 내 aggrecan 생성량을 측정한 결과, 정상군은 28.5 ± 0.4 pg/ml, 대조군은 35.1 ± 1.9 pg/ml로 나타난 반면, 연산오계 란 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 15.6 ± 3.4 pg/ml, 36.6 ± 0.6 pg/ml, 32.6 ± 2.5 pg/ml으로 나타났고 연산오계 육질 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 33.3 ± 1.6 pg/ml, 14.1 ± 3.1 pg/ml, 30.4 ± 5.7 pg/ml로 나타나, 연산오계 란 펩타이드 추출물 500 mg/kg 투여군과 육질 펩타이드 추출물 500 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 (** : $p < 0.01$) 감소가 나타났다.

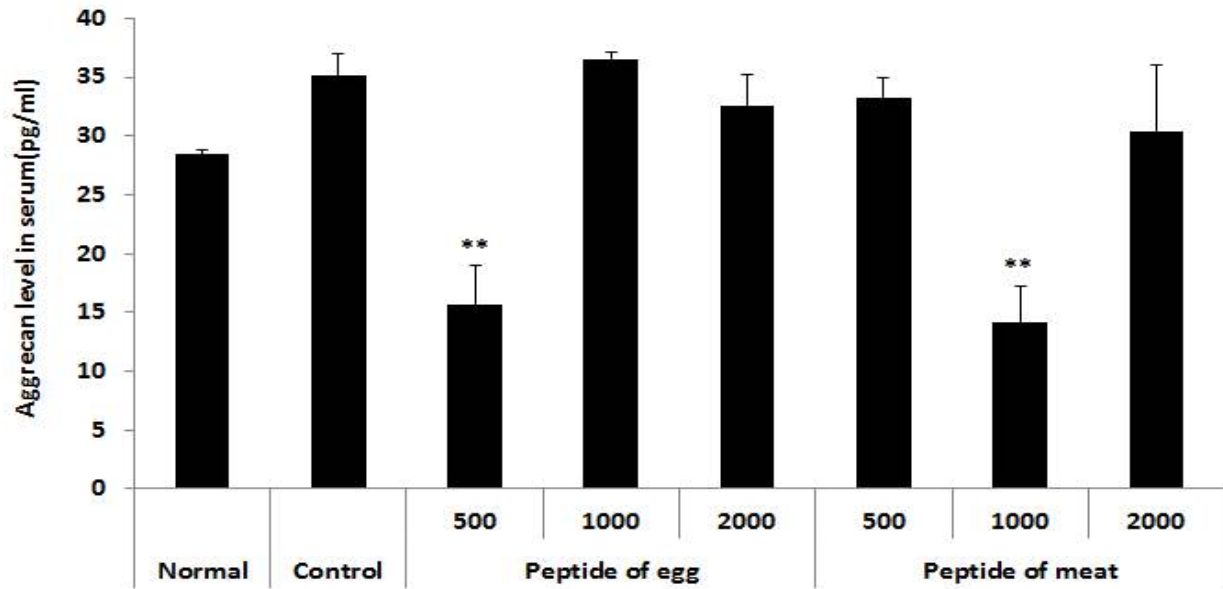


Fig. 89. Effects of peptide of egg and meat on levels of aggrecan in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test (** : $p < 0.01$).

Normal : Normal SD-rat group

Control : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group

500 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 500 mg/kg/day

1000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 1,000 mg/kg/day

2000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 2,000 mg/kg/day

(5) COMP 생성량

혈청 내 COMP 생성량을 측정한 결과, 정상군은 148.6 ± 4.3 ng/ml, 대조군은 111.1 ± 9.9 ng/ml로 나타난 반면, 연산오계란 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 121.4 ± 10.4 ng/ml, 136.4 ± 7.0 ng/ml, 75.1 ± 10.5 ng/ml로 나타났고 연산오계육질 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 72.0 ± 5.0 ng/ml, 48.0 ± 6.8 ng/ml, 67.1 ± 4.4 ng/ml로 나타나, 연산오계란 펩타이드 추출물 2000 mg/kg 투여군과 육질 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 (mg/kg) 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 (***) : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$) 감소가 나타나 연골에 포함된 단백질 성분의 유출을 방어하는 것으로 확인되었다.

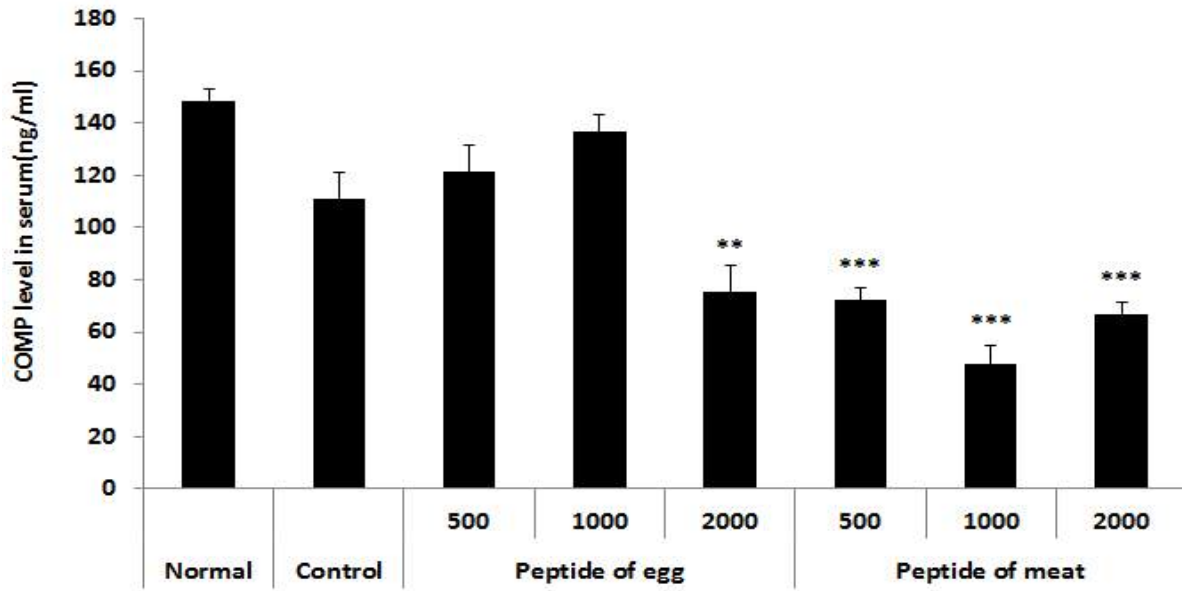


Fig. 90. Effects of peptide of egg and meat on levels of COMP in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test (*** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$).

Normal : Normal SD-rat group

Control : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group

500 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 500 mg/kg/day

1000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 1,000 mg/kg/day

2000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 2,000 mg/kg/day

(6) LTB_4 생성량

혈청 내 LTB_4 생성량을 측정된 결과, 정상군은 1265.7 ± 162.9 ng/ml, 대조군은 1462.3 ± 280.2 ng/ml로 나타난 반면, 연산오계란 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 1209.1 ± 172.2 ng/ml, 1249.9 ± 477.2 ng/ml, 1040.0 ± 183.2 ng/ml으로 나타났고 연산오계육 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 1453.7 ± 389.5 ng/ml, 1437.6 ± 339.6 ng/ml, 1114.8 ± 344.7 ng/ml로 나타나, 연산오계란 펩타이드 추출물 2000 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 (* : $p < 0.05$) 감소가 나타났다.

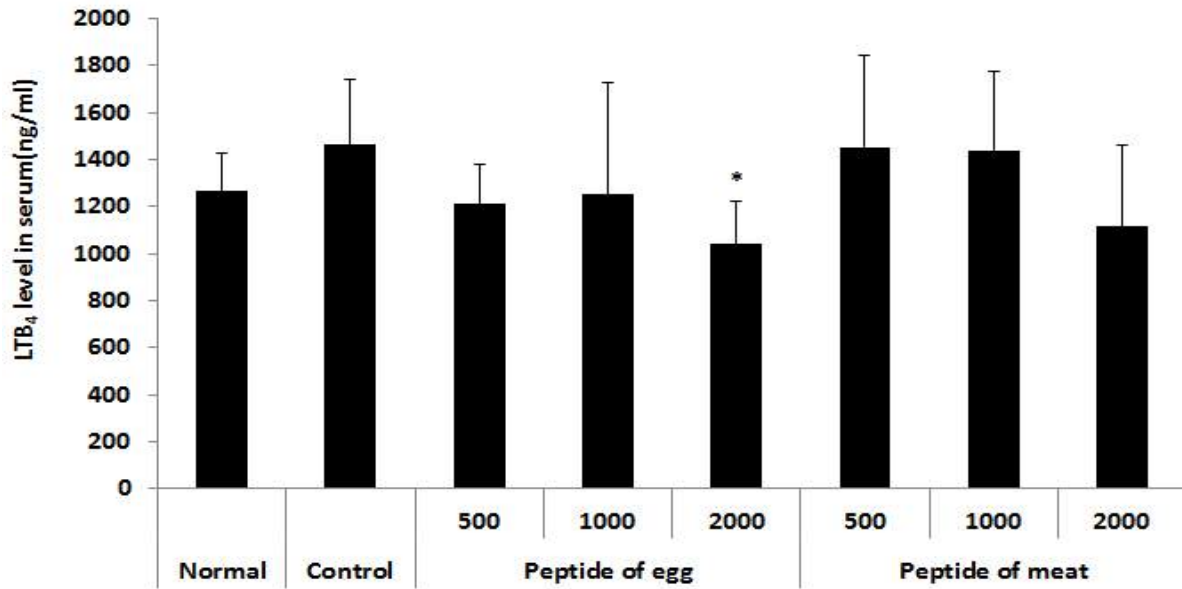


Fig. 91. Effects of peptide of egg and meat on levels of LTB₄ in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test (* : $p < 0.05$).

Normal : Normal SD-rat group

Control : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group

500 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 500 mg/kg/day

1000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 1,000 mg/kg/day

2000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 2,000 mg/kg/day

(7) Calcitonin 생성량

혈청 내 calcitonin 생성량을 측정한 결과, 정상군은 28.5 ± 4.7 pg/ml, 대조군은 26.7 ± 3.2 pg/ml로 나타난 반면, 연산오계란 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 29.4 ± 4.3 pg/ml, 28.9 ± 4.8 pg/ml, 30.6 ± 4.9 pg/ml으로 나타났고 연산오계육질 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 30.8 ± 6.1 pg/ml, 26.8 ± 1.4 pg/ml, 33.3 ± 10.3 pg/ml로 나타나, 연산오계란 펩타이드 추출물과 육질 펩타이드 추출물 투여군은 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으나 유의성이 나타나지는 않았다.

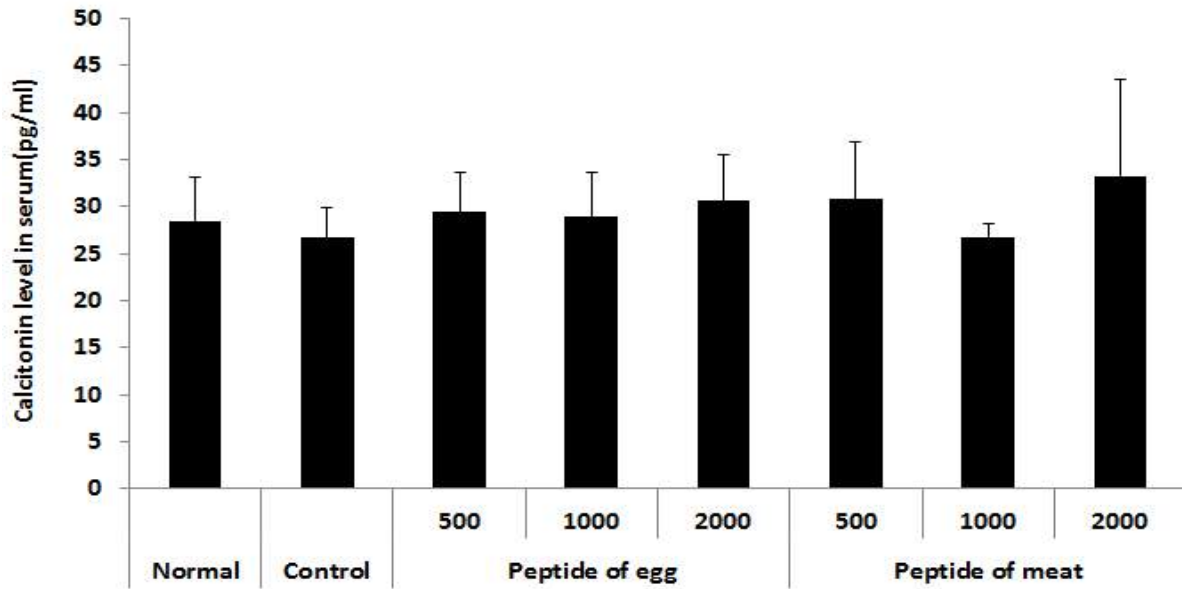


Fig. 92. Effects of peptide of egg and meat on levels of calcitonin in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats.

Normal : Normal SD-rat group

Control : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group

500 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 500 mg/kg/day

1000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 1,000 mg/kg/day

2000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 2,000 mg/kg/day

(8) CTXII 생성량

혈청 내 CTXII 생성량을 측정한 결과, 정상군은 346.9 ± 69.6 pg/ml, 대조군은 326.5 ± 46.3 pg/ml로 나타난 반면, 연산오계 란 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 290.9 ± 77.8 pg/ml, 267.8 ± 48.5 pg/ml, 329.6 ± 98.1 pg/ml으로 나타났고 연산오계 육질 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 261.8 ± 69.3 pg/ml, 194.1 ± 75.8 pg/ml, 245.4 ± 46.9 pg/ml로 나타나, 연산오계 육질 펩타이드 추출물 1000, 2000 (mg/kg) 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 (* : $p < 0.05$) 감소가 나타났다.

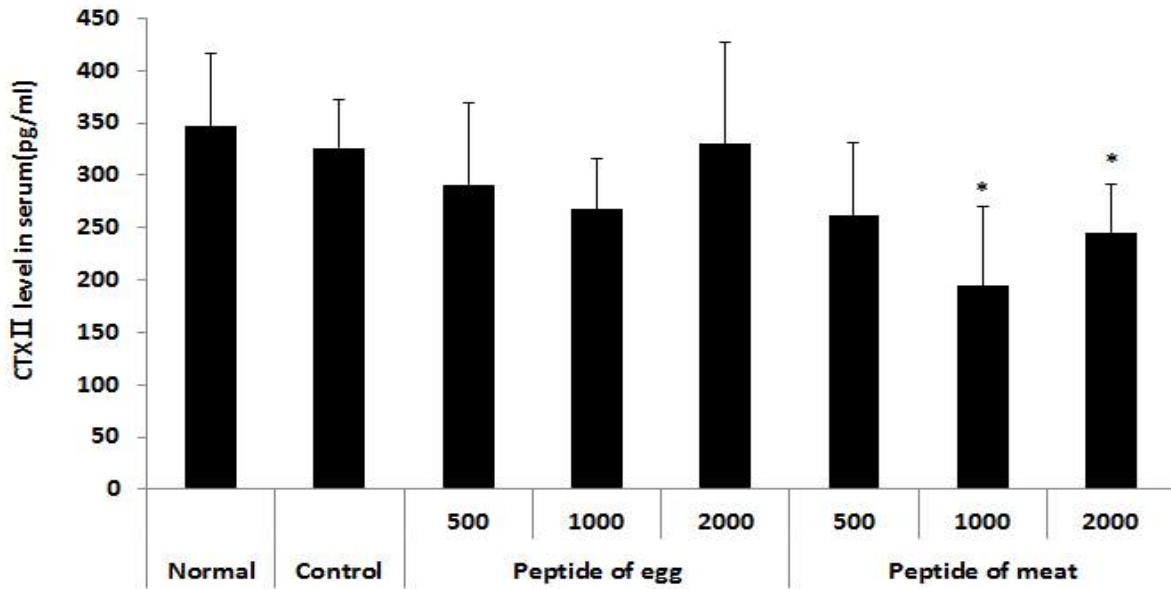


Fig. 93. Effects of peptide of egg and meat on levels of MMP-2 in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test (* : $p < 0.05$).

Normal : Normal SD-rat group

Control : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group

500 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 500 mg/kg/day

1000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 1,000 mg/kg/day

2000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 2,000 mg/kg/day

(9) Glycosaminoglycan 생성량

혈청 내 glycosaminoglycan 생성량을 측정된 결과, 정상군은 87.8 ± 12.9 ng/ml, 대조군은 40.7 ± 1.9 ng/ml로 나타난 반면, 연산오계 란 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 68.8 ± 10.5 ng/ml, 53.1 ± 5.9 ng/ml, 53.5 ± 4.0 ng/ml으로 나타났고 연산오계 육질 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 65.5 ± 3.8 ng/ml, 70.3 ± 10.5 ng/ml, 66.5 ± 8.1 ng/ml로 나타나, 연산오계 란 펩타이드 추출물과 육질 펩타이드 추출물 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 (***) : $p < 0.001$, **) : $p < 0.01$) 증가가 나타났다.

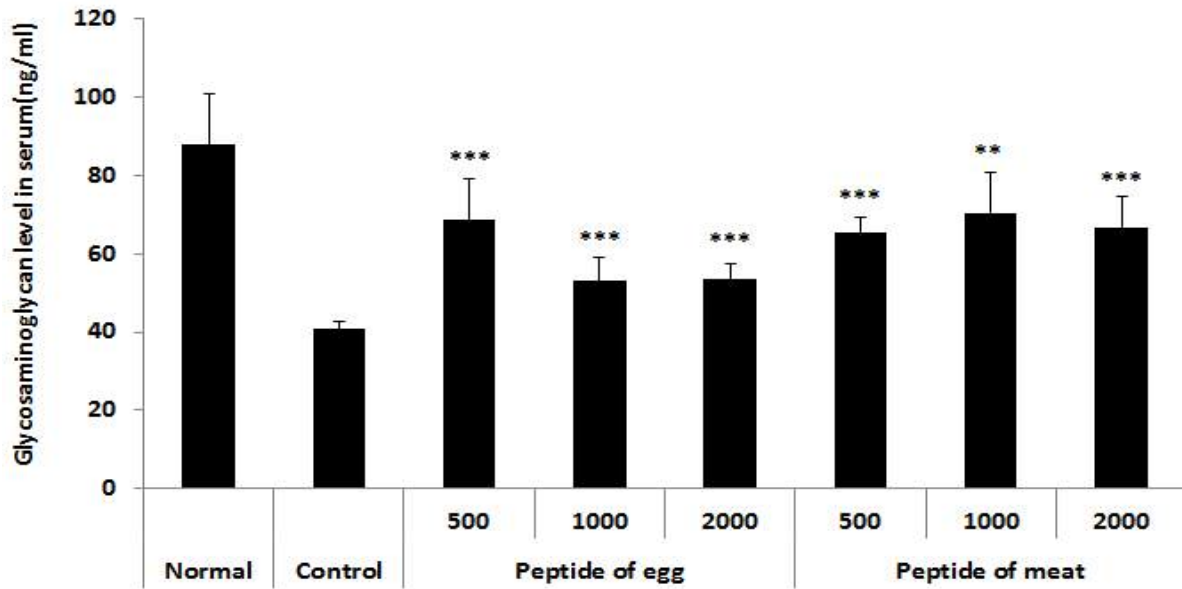


Fig. 94. Effects of peptide of egg and meat on levels of glycosaminoglycan in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test (*** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$).

Normal : Normal SD-rat group

Control : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group

500 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 500 mg/kg/day

1000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 1,000 mg/kg/day

2000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 2,000 mg/kg/day

(10) Hs-CRP

혈청 내 hs-CRP를 측정된 결과, 정상군은 $2.0 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$, 대조군은 $1.9 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ 로 나타난 반면, 연산오계란 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 $2.0 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$, $1.8 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$, $2.1 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ 으로 나타났고 연산오계육질 펩타이드 추출물 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군은 각각 $2.1 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$, $1.9 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$, $1.8 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ 로 나타나, 연산오계란 펩타이드 추출물과 육질 펩타이드 추출물 투여군은 대조군에 비해 큰 차이가 나타나지 않아 류마티스 관절염이 아닌 퇴행성 관절염 질환에서는 CRP 수치가 크게 작용하지 않은 것으로 보인다.

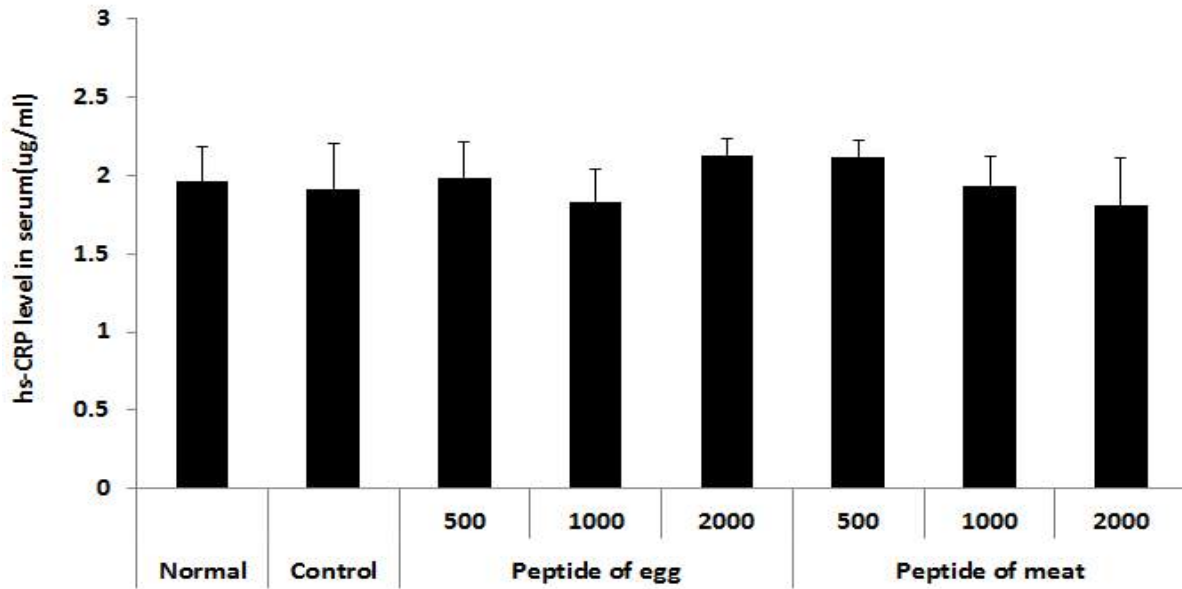


Fig. 95. Effects of peptide of egg and meat on levels of hs-CRP in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats.

Normal : Normal SD-rat group

Control : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group

500 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 500 mg/kg/day

1000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 1,000 mg/kg/day

2000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 2,000 mg/kg/day

다. Micro-CT 촬영

(1) 2D 변환

무릎 관절을 micro CT를 이용하여 촬영 후 2D로 변환한 결과, 정상군에 비해 대조군의 연골이 많이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 연산오계 란 펩타이드 추출물과 육질 펩타이드 투여군에서 연골 양이 더 보존되었음을 확인할 수 있었다. 특히, 대조군은 2D 상으로 연골이 없이 대퇴골과 종아리뼈가 서로 맞닿을만큼 심한 퇴행성 관절염 증상을 나타내었으나 란과 육질 펩타이드 투여군은 대조군에 비해 증상을 상당히 늦추는 것으로 확인되었다.

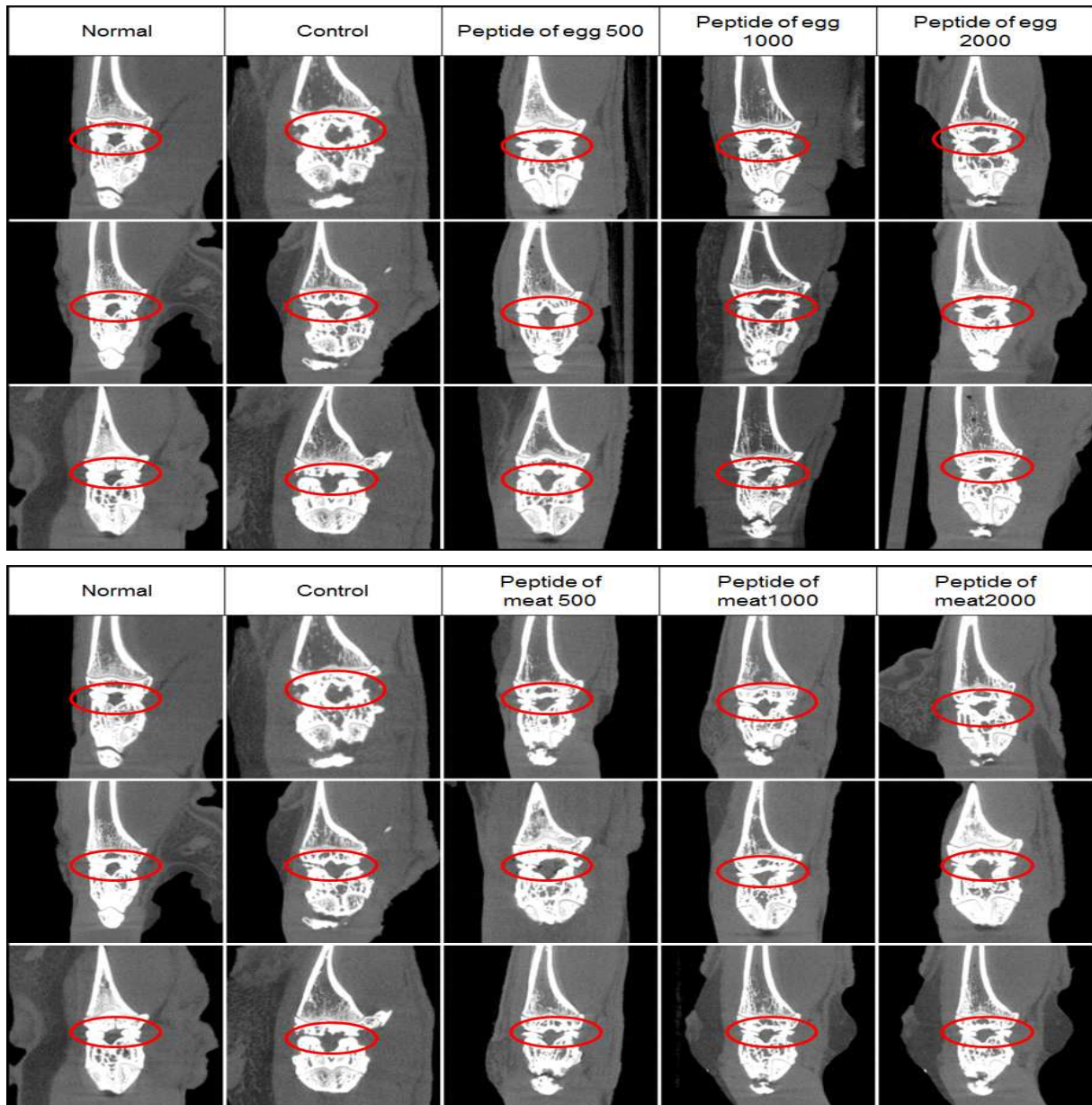


Fig. 96. Effects of peptide of egg and meat on 2D-imaging of cartilage degeneration using micro CT in joint of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats.

Normal : Normal SD-rat group

Control : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group

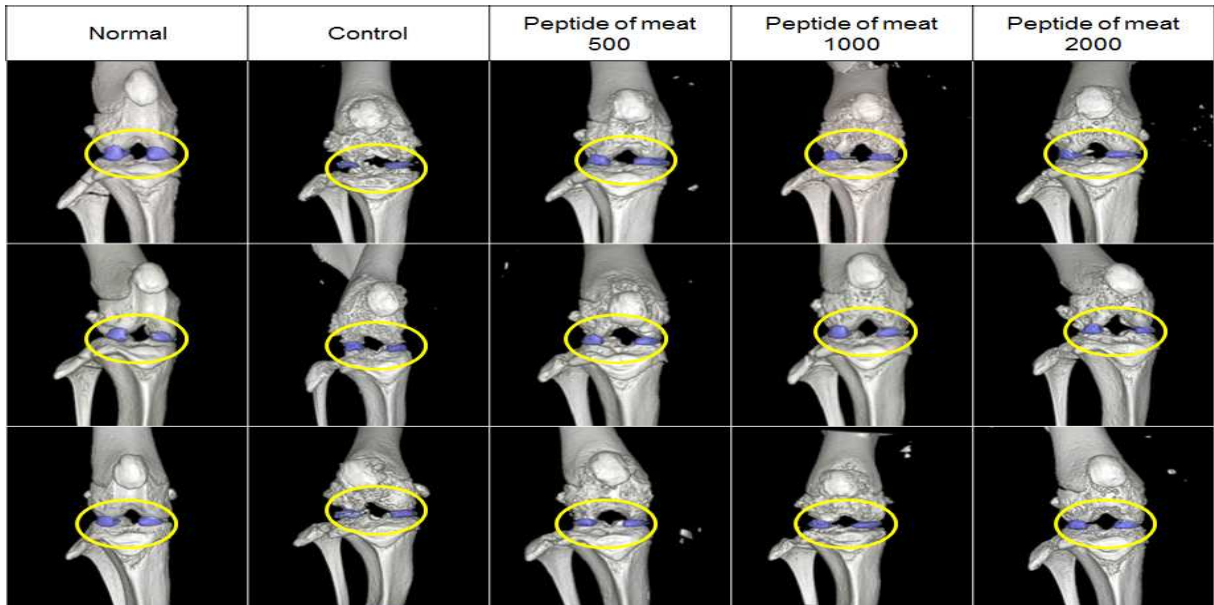
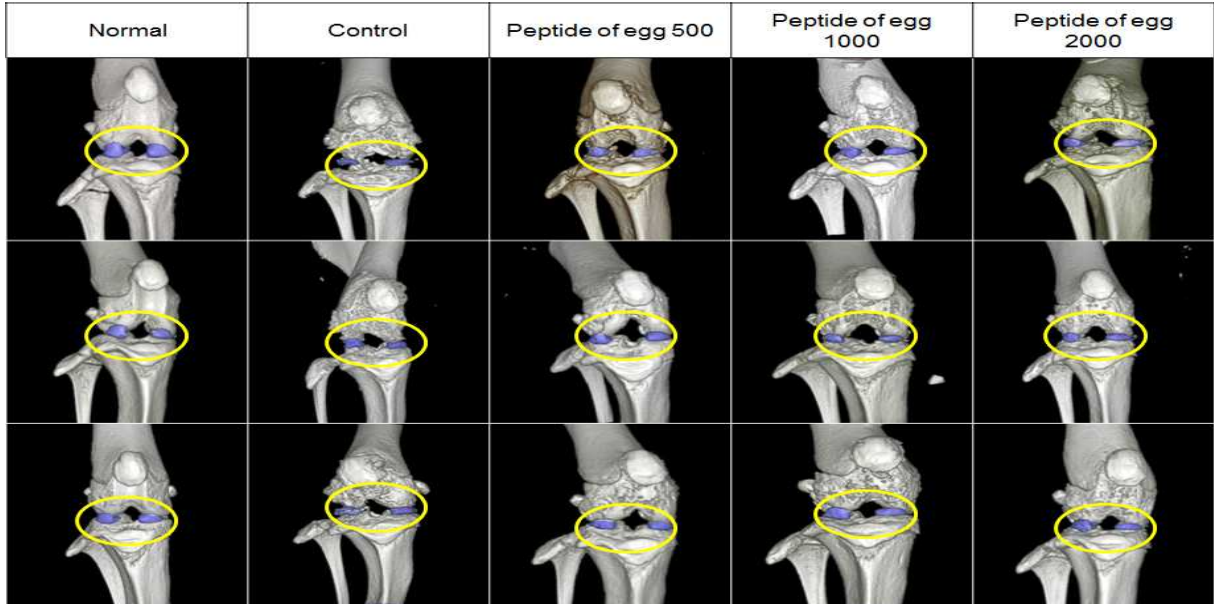
500 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 500 mg/kg/day

1000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 1,000 mg/kg/day

2000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 2,000 mg/kg/day

(2) 3D 변환

무릎 관절을 micro CT를 이용하여 촬영한 결과, 정상군에 비해 대조군의 연골이 많이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 연산오계란 펩타이드 추출물과 육질 펩타이드 투여군에서 연골 양이 더 보존되었음을 확인할 수 있었다. 또한, 대조군은 정상군에 비해 대퇴골의 하단 측의 골의 부식과 파괴가 심하게 일어난 반면, 연산오계란 펩타이드 추출물과 육질 펩타이드 투여군에서 골의 부식이나 파괴가 적었음을 육안적으로 확인할 수 있었다.



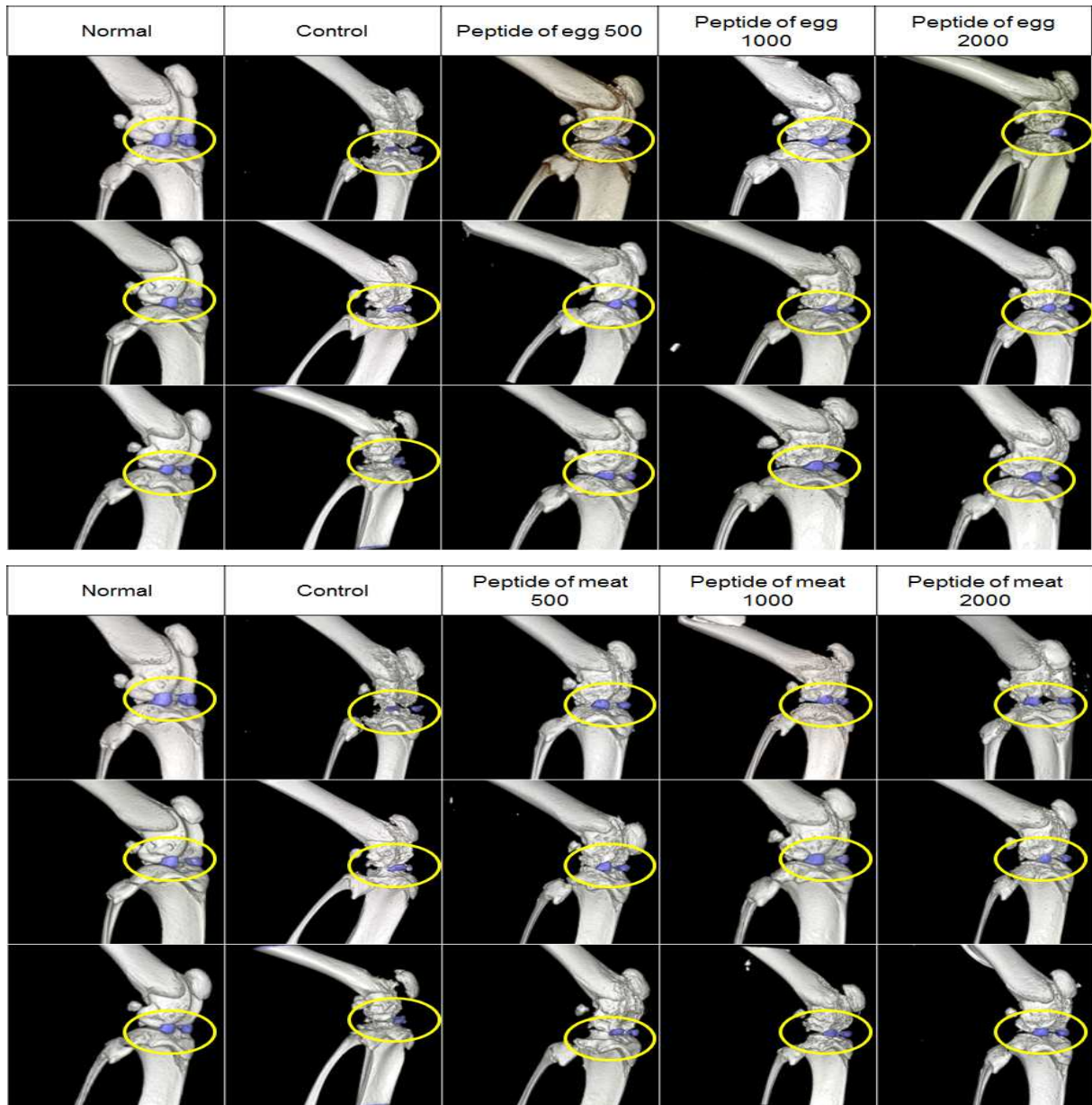


Fig. 97. Effects of peptide of egg and meat on 3D-imaging of cartilage degeneration using micro CT in joint of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats.

Normal : Normal SD-rat group

Control : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group

500 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 500 mg/kg/day

1000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 1,000 mg/kg/day

2000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 2,000 mg/kg/day

라. 조직 병리학적 검사

(1) Hematoxylin & Eosin 염색

무릎 관절의 H&E 염색을 실시한 결과, 정상군에 비해 대조군은 대퇴골과 경골 사이의 연골이 상당히 많이 닳아 있는 것을 확인할 수 있었으며, 침윤 세포가 상당히 많이 퍼져 있는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 연산오계란 펩타이드 추출물과 육질 펩타이드 추출물 투여군은 대조군에 비해 연골이 많이 남아 있었고 침윤 세포도 관절 주변에 많이 분포되지 않은 것을 확인할 수 있었다.

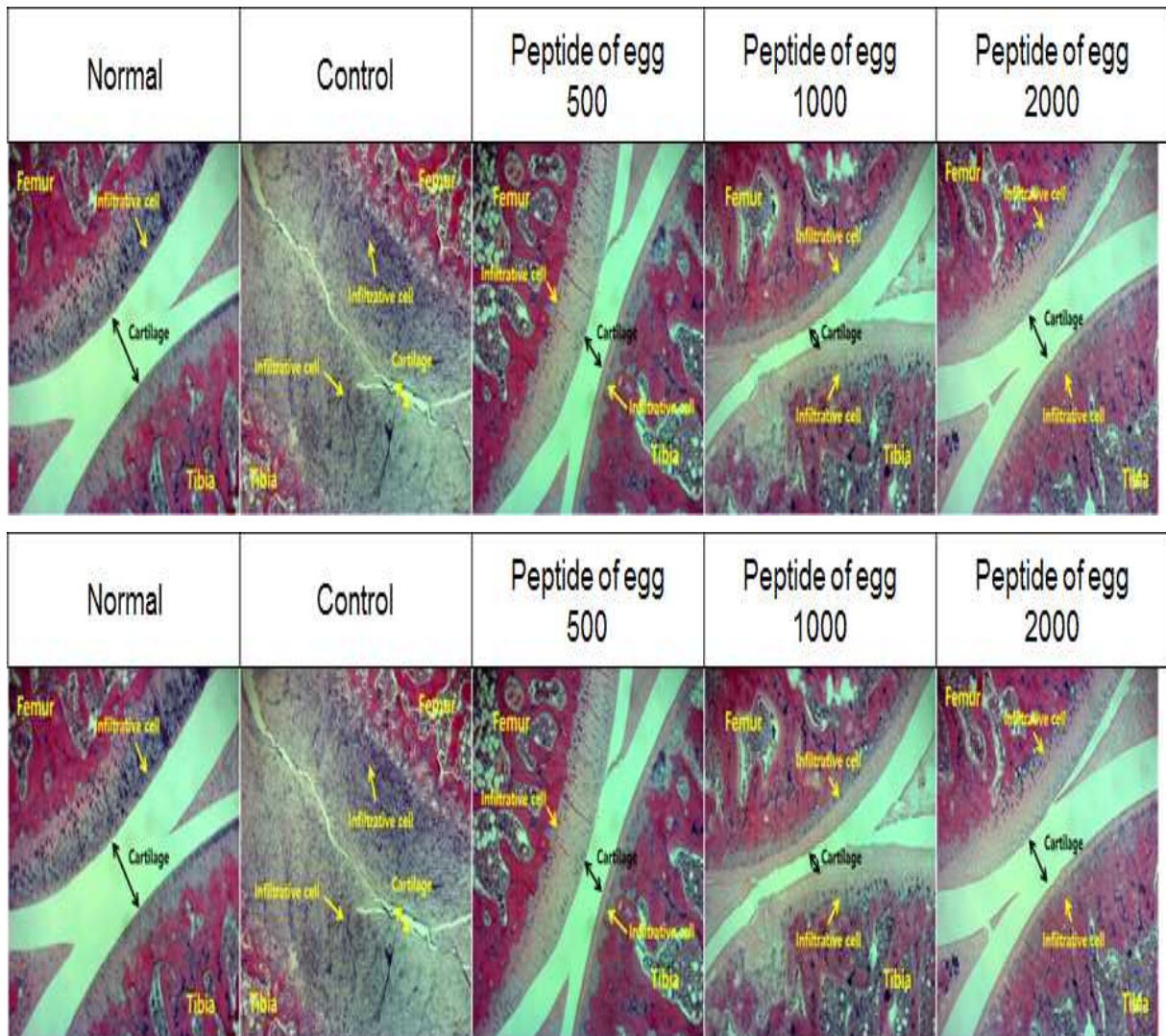


Fig. 98. Effects of peptide of egg and meat on joint pathology (Hematoxylin & Eosin staining) from joint of MIA-induced osteoarthritis rats. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats.

Normal : Normal SD-rat group

Control : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group

500 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 500 mg/kg/day

1000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 1,000 mg/kg/day

2000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 2,000 mg/kg/day

(2) Safranin-O 염색

무릎 관절의 Safranin-O 염색을 실시한 결과, 정상군에 비해 대조군은 대퇴골과 경골 사이의 연골 주변에 proteoglycan 형성이 많이 되어 있음을 확인할 수 있었다. 반면, 연산오계 란 펩타이드 추출물과 육질 펩타이드 추출물 투여군은 대조군에 비해 연골 주변에 proteoglycan 형성이 적게 되었음을 확인할 수 있었다.

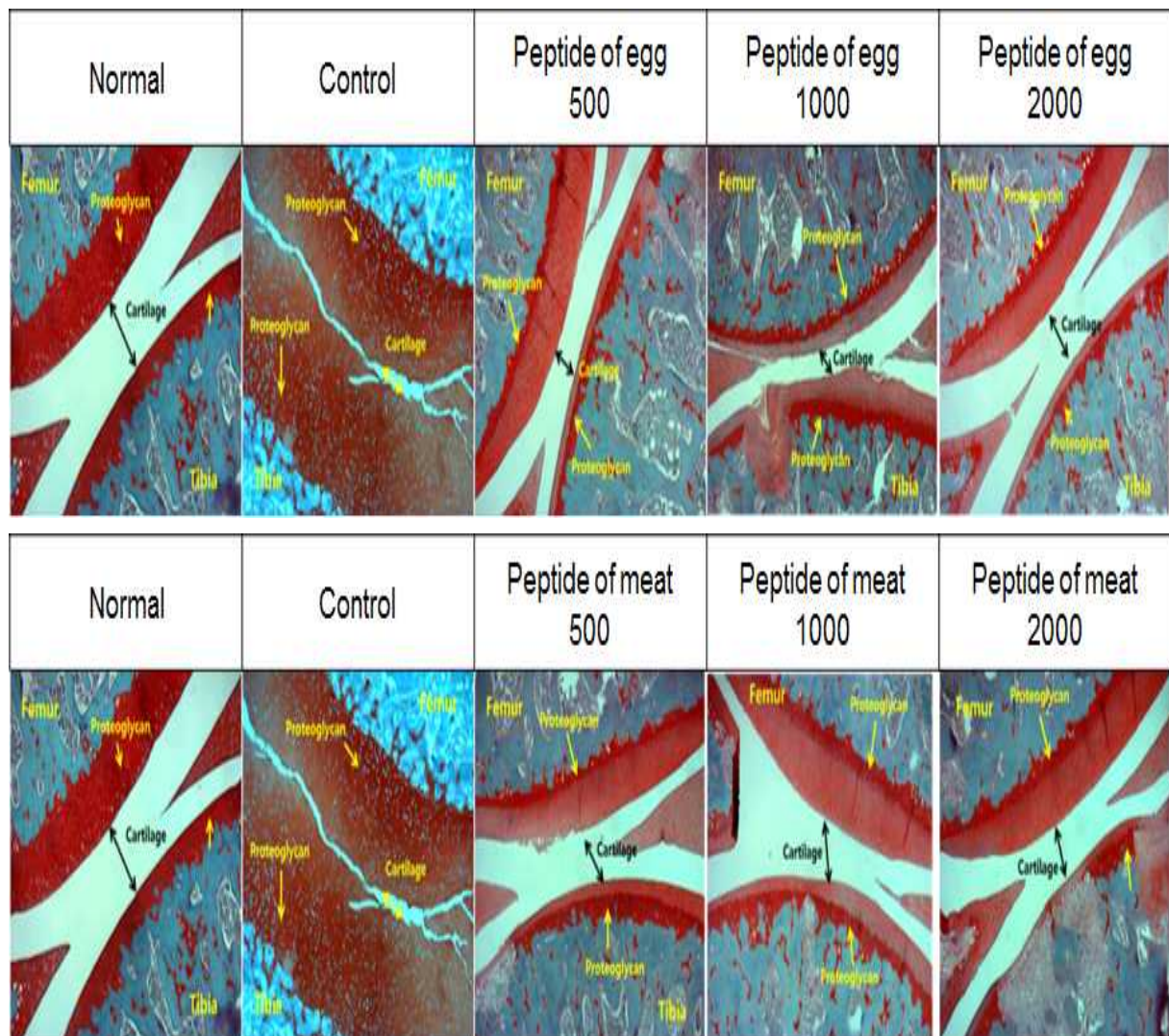


Fig. 99. Effects of peptide of egg and meat on joint pathology(Safranin-O staining) from joint of MIA-induced osteoarthritis rats. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats.

Normal : Normal SD-rat group

Control : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group

500 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 500 mg/kg/day

1000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 1,000 mg/kg/day

2000 : MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group was treated orally with samples (peptide of egg and meat) 2,000 mg/kg/day

■ In-vivo (항노화)

가. 항산화 효능

(1) Catalase activity

실험 종료 후 catalase activity를 측정한 결과, 대조군은 100.0±1.0%로 나타냈을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 103.0±5.3%, 101.4±6.5%, 105.2±6.2%로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 106.9±9.7%, 114.2±7.2%, 119.9±4.1%으로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 118.0±9.2%, 132.8±7.8%, 131.0±4.9%로 나타나, 모든 실험군은 농도 의존적으로 증가하였으며, 내장 1000, 2000, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$) 증가를 나타내었다.

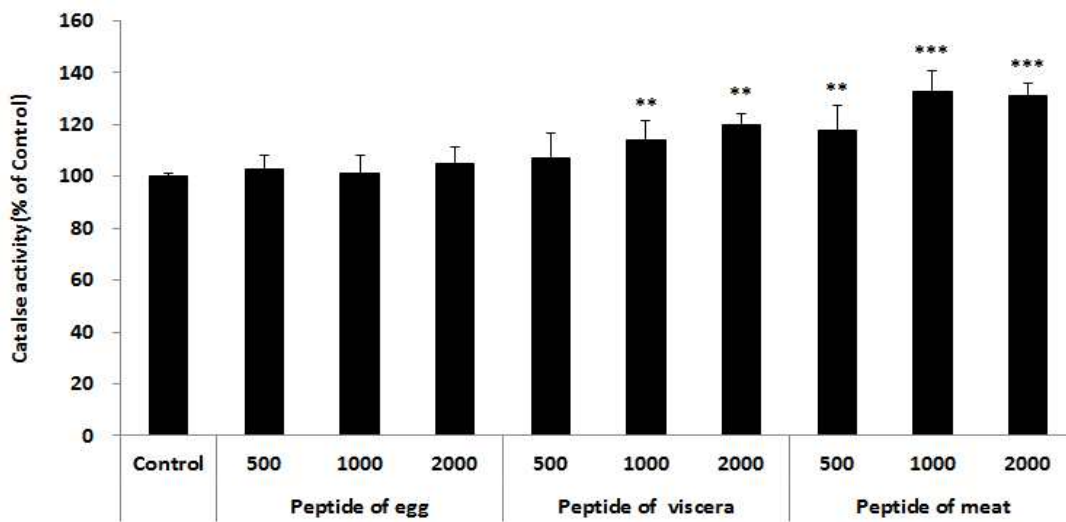


Fig. 100. Effect of Yeonsan Ogye on Catalase activity in liver of BALB/c mice. The results were expressed as mean ± S.D. (significance of results, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$ compare of control)(n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

(2) Glutathione reductase (Gr) activity

실험 종료 후 glutathione reductase activity를 측정된 결과, 대조군은 $100.0 \pm 1.0\%$ 로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $109.5 \pm 4.3\%$, $104.0 \pm 2.1\%$, $114.2 \pm 4.2\%$ 로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $104.2 \pm 5.6\%$, $104.3 \pm 3.7\%$, $105.1 \pm 2.8\%$ 으로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $100.7 \pm 1.2\%$, $108.5 \pm 3.2\%$, $109.1 \pm 4.1\%$ 로 나타나, 모든 실험군은 대조군에 비해 증가를 나타내었다.

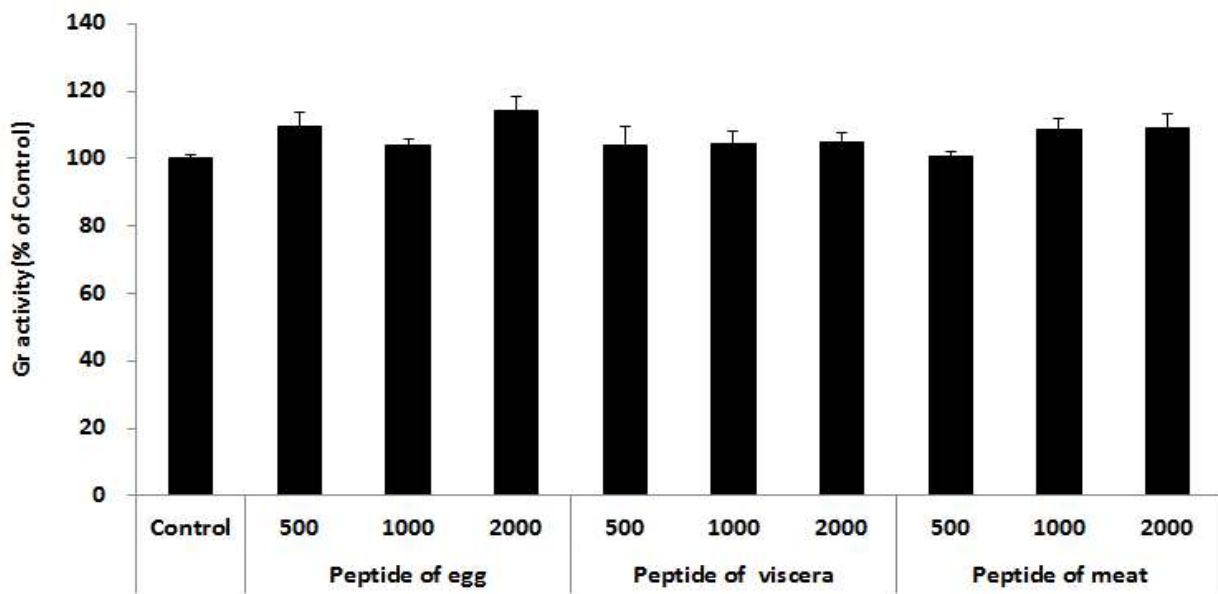


Fig. 101. Effect of Yeonsan Ogye on Gr activity in liver of BALB/c mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

(3) Glutathione peroxidase (GPx) activity

실험 종료 후 glutathione peroxidase activity를 측정된 결과, 대조군은 $100.0 \pm 1.0\%$ 로 나타났을 때, 란 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $116.1 \pm 2.7\%$, $174.0 \pm 4.4\%$, $224.7 \pm 5.7\%$ 로 나타났으며, 내장 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은 각각 $180.4 \pm 3.7\%$, $168.0 \pm 4.5\%$, $176.6 \pm 4.5\%$ 으로 나타났다. 또한, 육질 500, 1000, 2000 mg/kg/day 경구 투여 그룹은

각각 207.3±3.8%, 221.9±5.8%, 229.6±3.9%로 나타나, 모든 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 증가를 나타내었다.

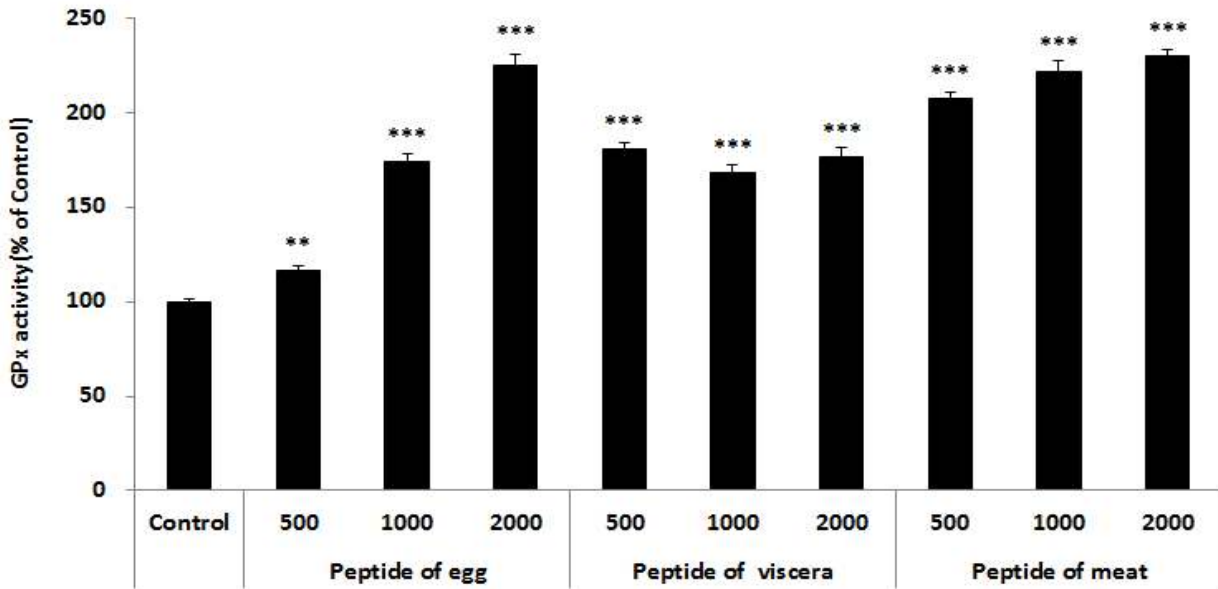


Fig. 102. Effect of Yeonsan Ogye on GPx activity in liver of BALB/c mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (significance of results, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compare of control)(n = 6).

Normal : Non treated BALB/c mice

Control : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with DW

500 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 500 mg/kg/day

1000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 1000 mg/kg/day

2000 : LPS-induced inflammatory model mice group was treated orally with samples (peptide of egg, viscera and meat) 2000 mg/kg/day

나. 골다공증 효능

(1) 유리아미노산 측정

hydroxyproline, proline, collagen이 살보다 껍질에서 높은 함량을 보여주었다

Varieties	HF (mg/100 g)	RS (mg/100 g)
Phosphoserine	0.593	0.740
Taurine	76.636	76.733
Phosphoethanolamine	0.235	0.224
Urea	nd	nd
Aspartic acid	17.073	18.198
Hydroxyproline	0.437	1.313
Threonine	15.370	16.162
Serine	28.936	30.396
Asparagine	9.604	9.259
Glutamic acid	42.201	48.435
Sarcosine	1.537	1.431
α -aminoadipic acid	nd	nd
Proline	6.203	25.953
Glycine	18.463	19.660
Alanine	41.328	43.870
Citrulline	nd	nd
α -aminobutyric acid	0.217	0.171
Valine	18.080	19.305
Cystine	0.287	0.244
Methionine	10.989	11.268
Cystathionine	nd	nd
Isoleucine	12.593	13.154
Leucine	23.014	24.409
Tyrosine	14.005	14.695
Phenylalanine	16.704	14.437
Homocystine	nd	nd
β -alanine	0.597	0.590
β -aminoisobutyric acid	0.198	0.195
γ -amino-n-butyric acid	0.312	0.272
Histidine	11.255	11.980
1-methylhistidine	0.203	0.112
3-methylhistidine	0.283	0.267
Carnosine	nd	nd
Anserine	537.296	554.539
Tryptopan	1.648	2.185
Hydroxylysine	nd	nd
Ornithine	0.136	0.204
Lysine	22.060	23.588
Ethanolamine	0.298	0.202
Arginine	15.864	16.065
Collagen (protein g/100g)	28.371	37.702

Fig. 103. Comparison of the amino-acid content in meat and skin.

(2) 조골세포 생존율 및 분화능력 측정

ALP 활성은 껍질이 살보다 높은 활성을 보였고, 물 추출물은 세포독성이 관찰되지 않았으나 에탄올 추출물은 고농도에서 세포독성이 관찰되었다. 골 석회화는 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 살 껍질 모두 높은 활성을 보였다.

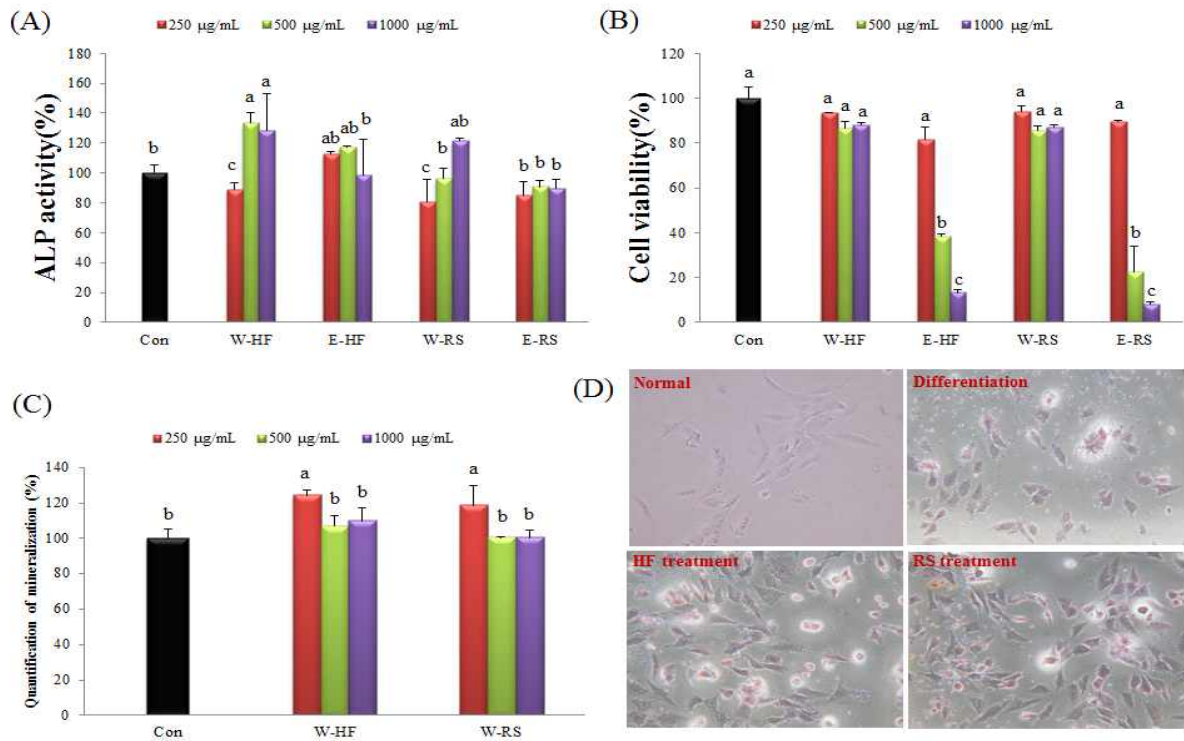


Fig. 104. Effects of Yeonsan Ogye on the ALP activities and osteogenic ability in osteoblasts cells.

(3) 파골세포 생존율 및 분화능력 측정

TRAP 활성은 껌질이 살보다 높은 활성을 보였고, 물 추출물은 세포독성이 관찰되지 않았으나 에탄올 추출물은 고농도에서 세포독성이 관찰되었다. 골 석회화는 250 $\mu\text{g/mL}$ 에서 살 껌질 모두 높은 활성을 보였다.

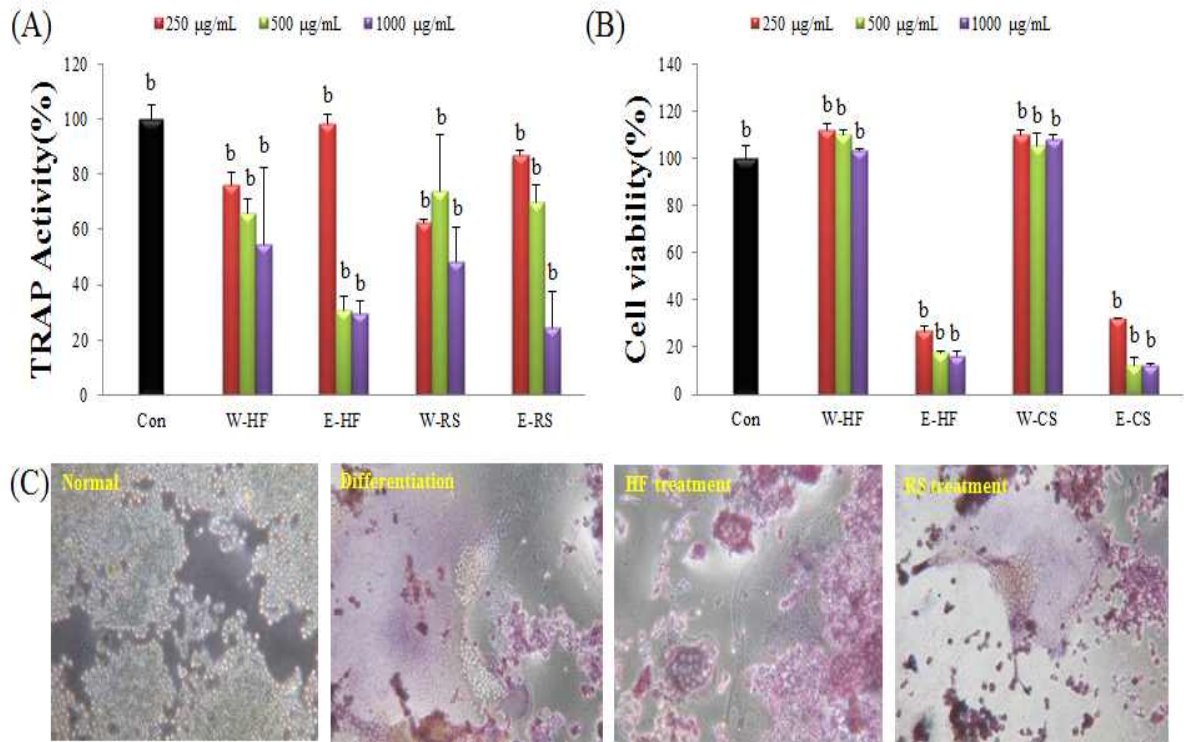


Fig. 105. Effects of Yeonsan Ogye on the trap activities, cell viability and osteogenic ability in osteoclasts cells.

(4) 칼슘 함량 및 골강도 측정

경골의 칼슘함량과 골강도는 콜라겐 그룹에서 가장 높았으며 칼슘 결핍 군에서 가장 낮았다.

Table 6. Comparison of Calcium Content and Bone Strength in Osteoporotic Rat

Sample	Con	Low Ca	HF	RS	Collagen
Calcium content	1.59 ± 0.04 ^a	1.17 ± 0.02 ^c	1.22 ± 0.02 ^b	1.28 ± 0.03 ^b	1.67 ± 0.07 ^a
Breaking force (N)	27.78 ± 3.81 ^b	24.68 ± 5.57 ^c	29.90 ± 5.03 ^b	30.14 ± 5.06 ^b	34.49 ± 5.72 ^a

(5) 혈액 분석

GOT, GTP 및 TG에서는 유의적 차이가 없었으나 TC에서 대조군과 살 추출물 그룹에서 다른 그룹보다 낮은 수치를 보였다. HDL 콜레스테롤은 껍질 추출물에서 다른 그룹보다 5%이상 낮은 함량을 보였다.

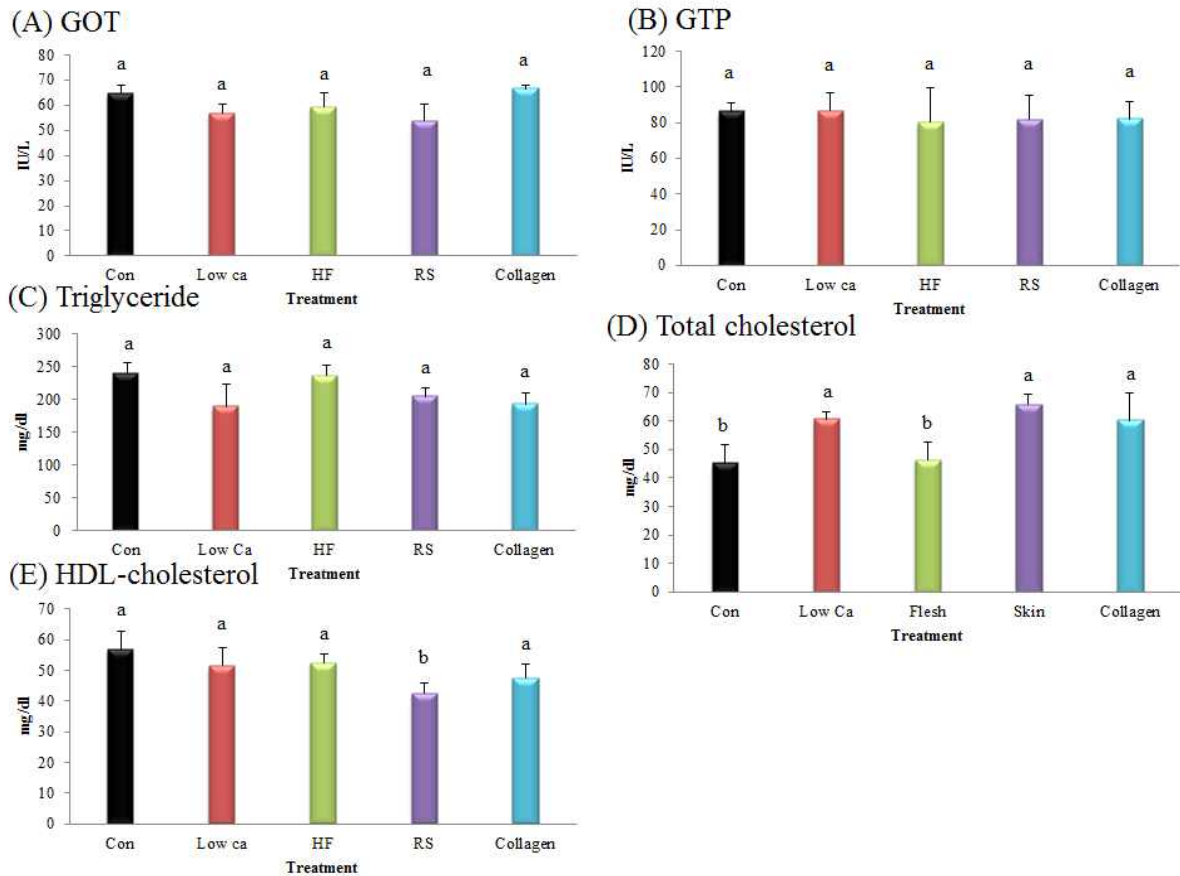


Fig. 106. Effects of Yeonsan Ogye on GOT, GTP, TG, TC and HDL-c level of serum in osteoporotic rat.

(6) H&E 염색

H&E 염색에서 칼슘결핍 군이 다른 그룹에 비해 골 밀도가 낮게 나타났으며 살, 껍질, 콜라겐- 그룹에서 골 밀도가 높게 나타났다.

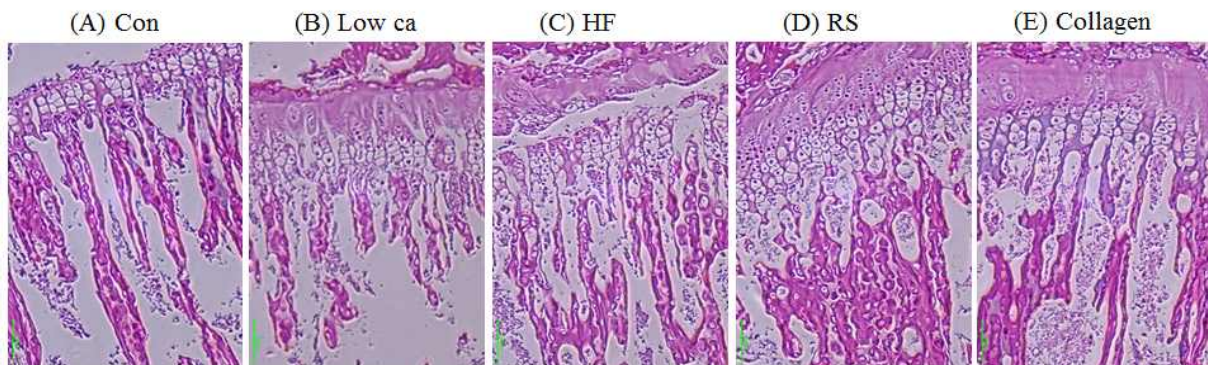


Fig. 107. Effects of Yeonsan Ogye on joint pathology (Hematoxylin & Eosin staining) from joint of osteoporotic rat.

(7) RT-PCR

난소 절제 동물모델에서 연산오계 살추출추물, 껍질 추출물, 가수분해 콜라겐은 wint3a,

BMP-2, Run2, osteocalcin, col-1 의 발현이 ca 결핍식이 군에 비해 증가함을 보였다.

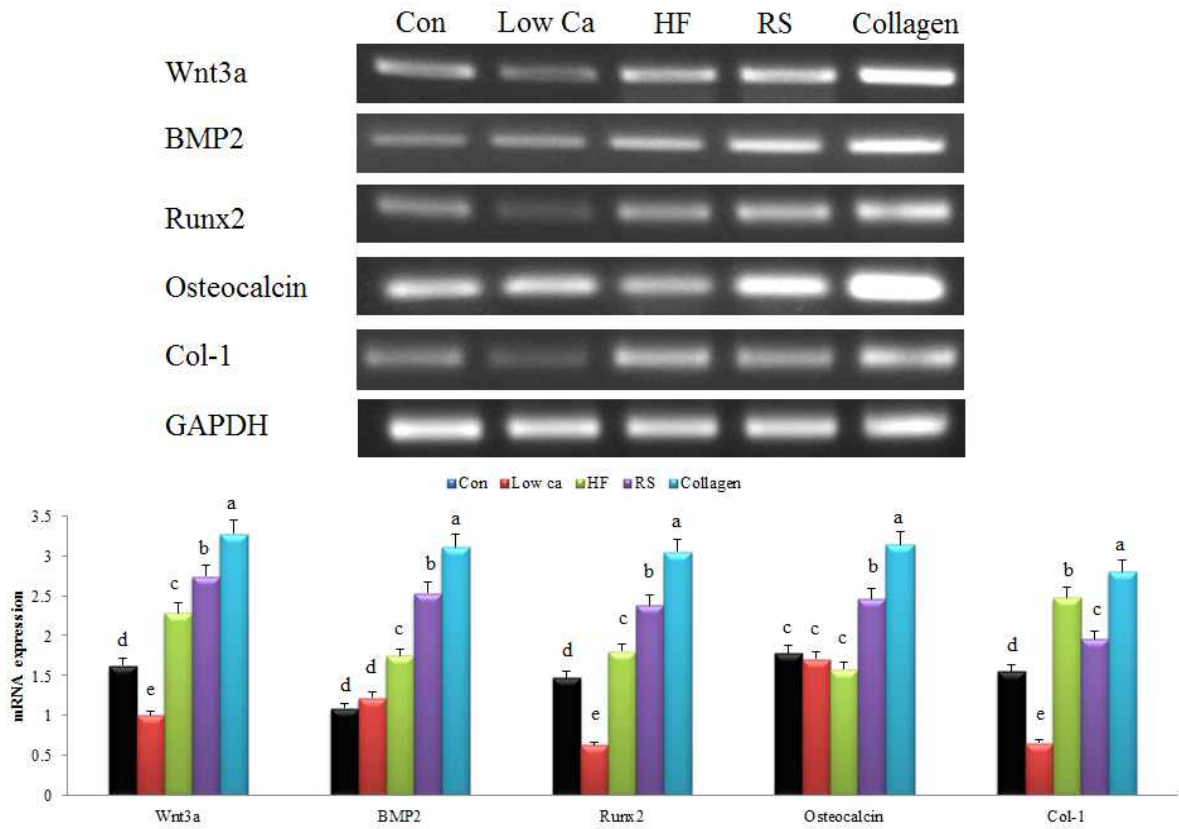


Fig. 108. Effect of Yeonsan Ogye on wnt3a, BMP2, runx2, osteocalcin, and col-1 mRNA expression in osteoporotic rat.

(8) 면역 염색

난소 절제 동물모델에서 연산오계 살추출추물, 껍질 추출물 , 가수분해 콜라겐은 wnt3a, BMP-2, Run2, osteocalcin, col-1 의 발현이 ca 결핍식이 군에 비해 증가함을 보였다.

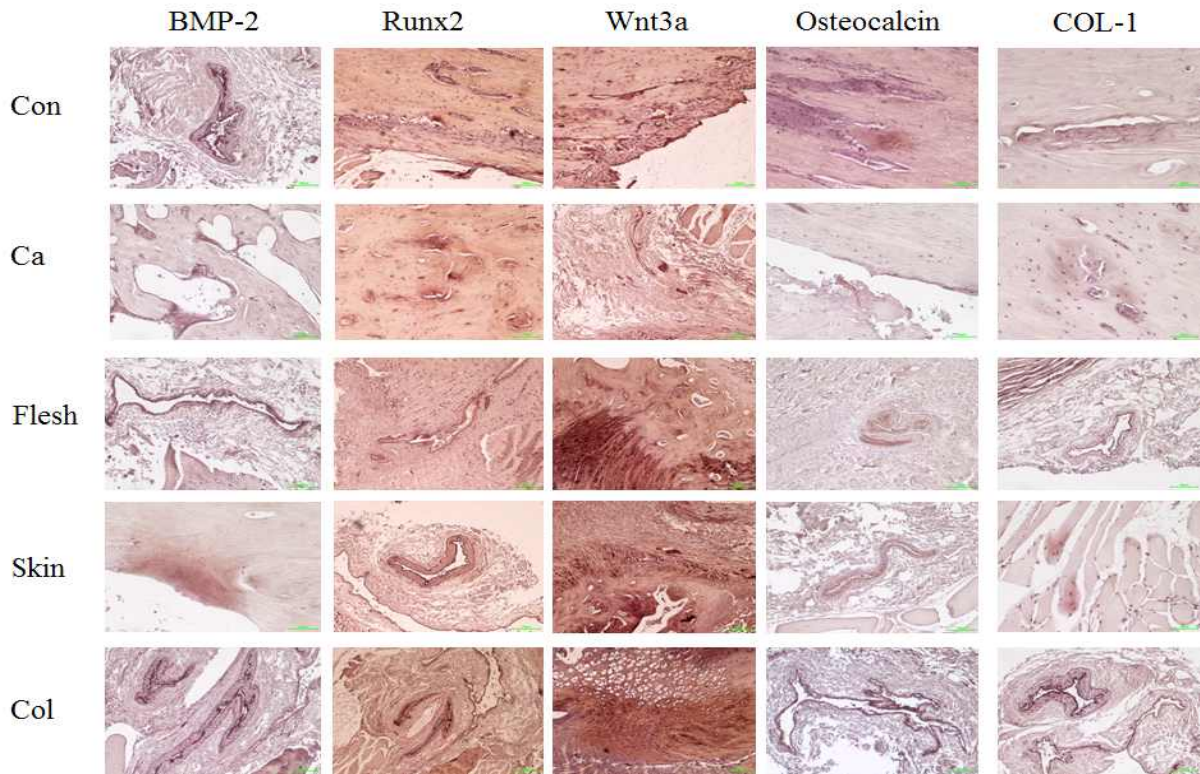
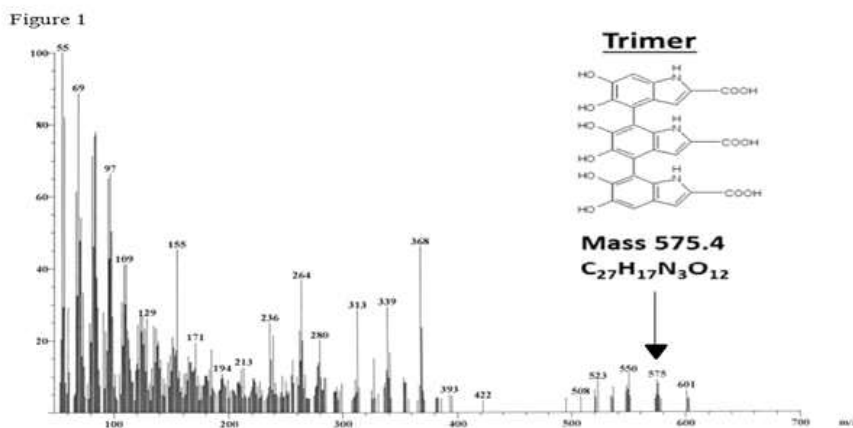


Fig. 109. Effects of Yeonsan Ogye on immune staining from joint of osteoporotic rat.

■ 흑질색소의 생리적 기능 연구

가. 멜라닌 구조 분석

연산오계에서 추출한 멜라닌은 EI-mass결과, m/z 575에서 trimer melanin으로 밝힌 wild turkey의 멜라닌과 유사하였고, FT-IR의 $2,922\text{ cm}^{-1}$ (C-H stretching), $1,625\text{ cm}^{-1}$ (C=Cstretching)은 *Klebsiella* sp. GSK 과 *Shewanellaalgae* BrY에서 추출한 멜라닌과 유사했다. 또한 ^{13}C -NMR에서 *Lachnum* YM404에서 추출한 멜라닌과도 유사한 구조를 보였다.



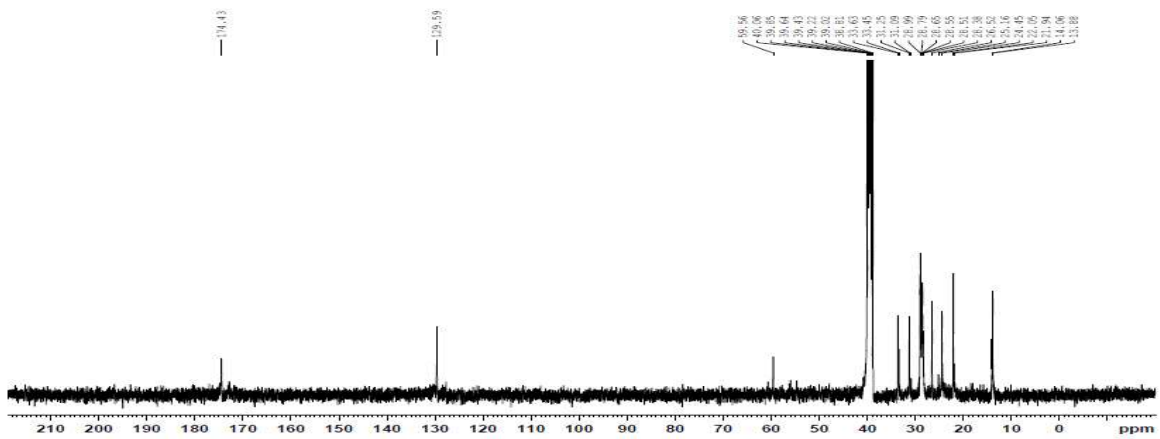
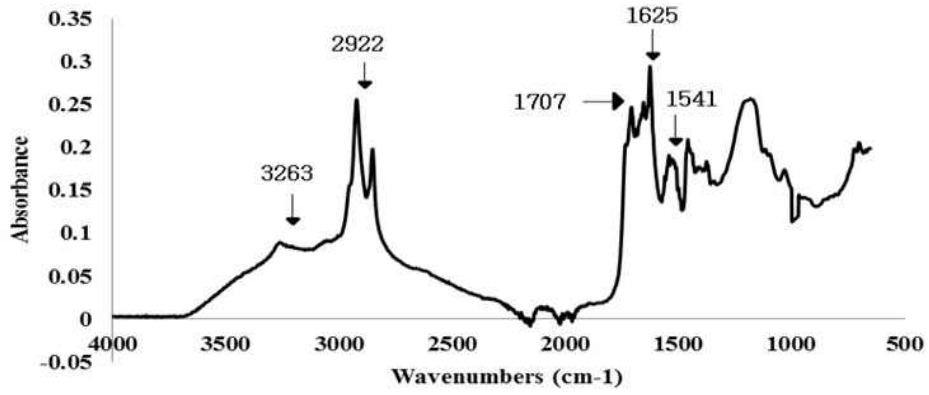


Fig. 110. Structure Analysis of melanin of yeonsan ogye.

나. 추출된 멜라닌의 세포 생존율 및 조골세포 분화 능력

50, 150, 250 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도로 멜라닌을 처리한 결과 세포독성은 발견되지 않았고 농도의존적으로 조골세포 분화능력을 증가시켰으며 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도일 때 대조군보다 1.5배 높은 활성을 나타냈다.

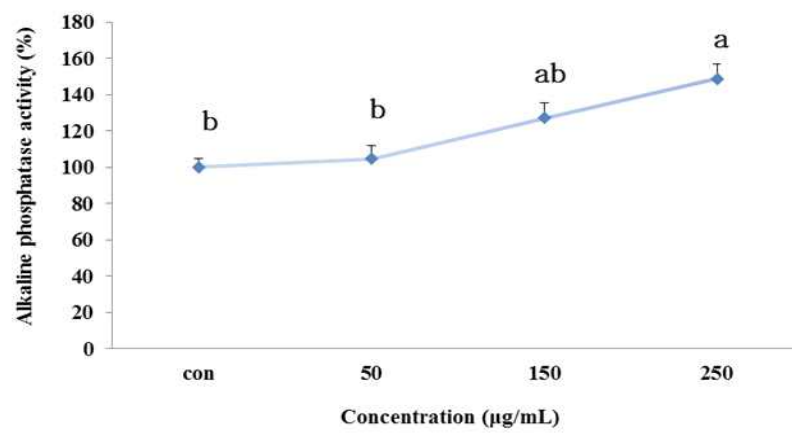
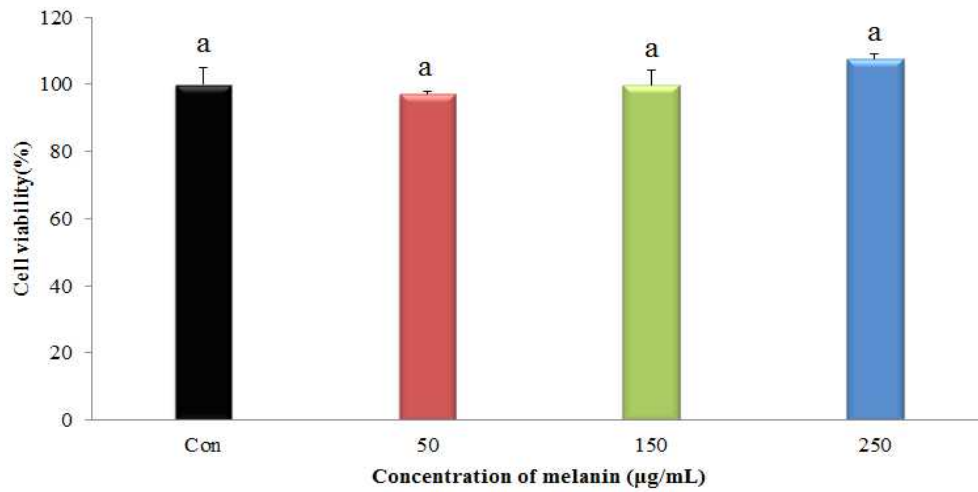


Fig. 111 Effects of melanin of Yeonsan Ogye on cell viability and osteogenic ability in osteoblast cells.

다. 골 석회화 측정

골 석회화는 500 µg/ml 농도로 멜라닌을 처리했을 때 가장 높은 활성을 나타냈다.

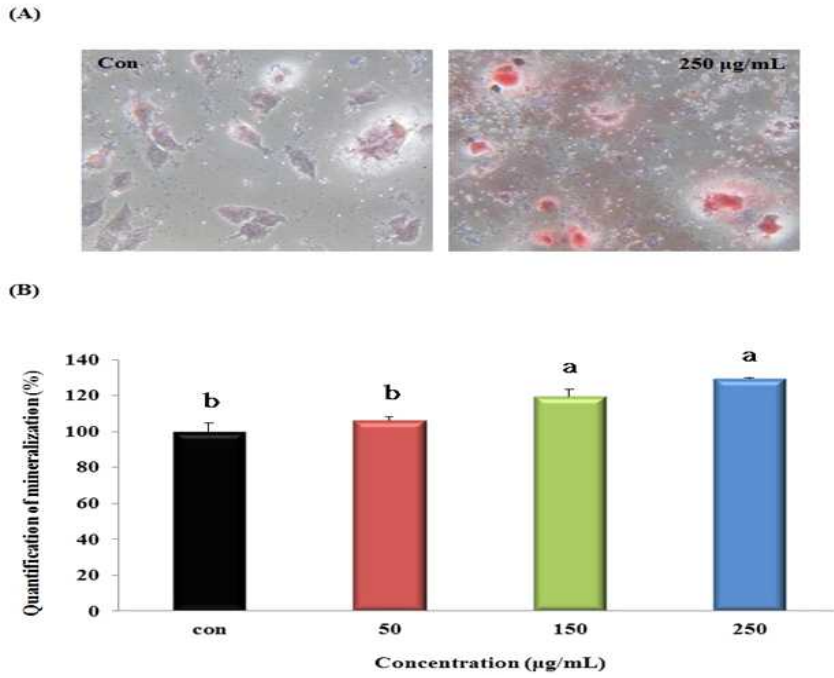


Fig. 112. Quantification of mineralization on water extracts of melanin of Yeonsan ogolgye in osteoblast cells.

라. 파골세포 생존율과 분화능력

500 µg/ml 농도로 멜라닌을 처리했을 때 세포독성을 나타내었지만, 대조군에 비해 77.65%의 TRAP활성 (22.35% 억제)을 나타냈다.

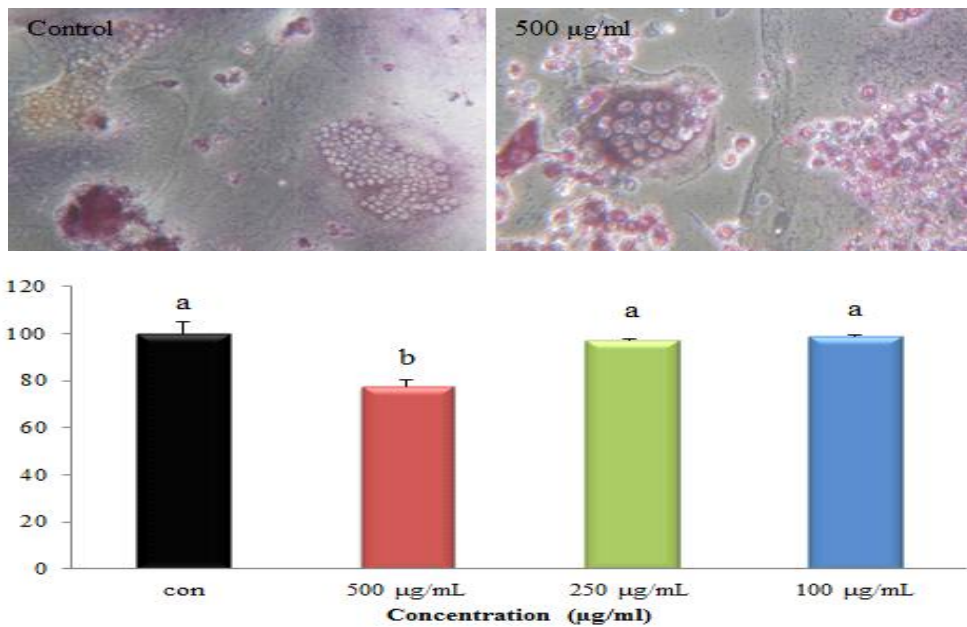


Fig. 113. Effects of melanin of Yeonsan Ogye on cell viability and osteogenic ability in osteoclast cells.

마. 조골세포 분화관련 유전자 발현

BMP-2는 대조군보다 1.72배 높은 유전자 발현을 나타냈고, Osteocalcin과 COL-1은 각각 4.44배, 2.12배 높은 유전자 발현수치를 나타냈다. 또한, 멜라닌 추출물은 Runx2의 발현을 증가시키고 BMP-2와 Smad1/5/8의 발현을 증가시켰다.

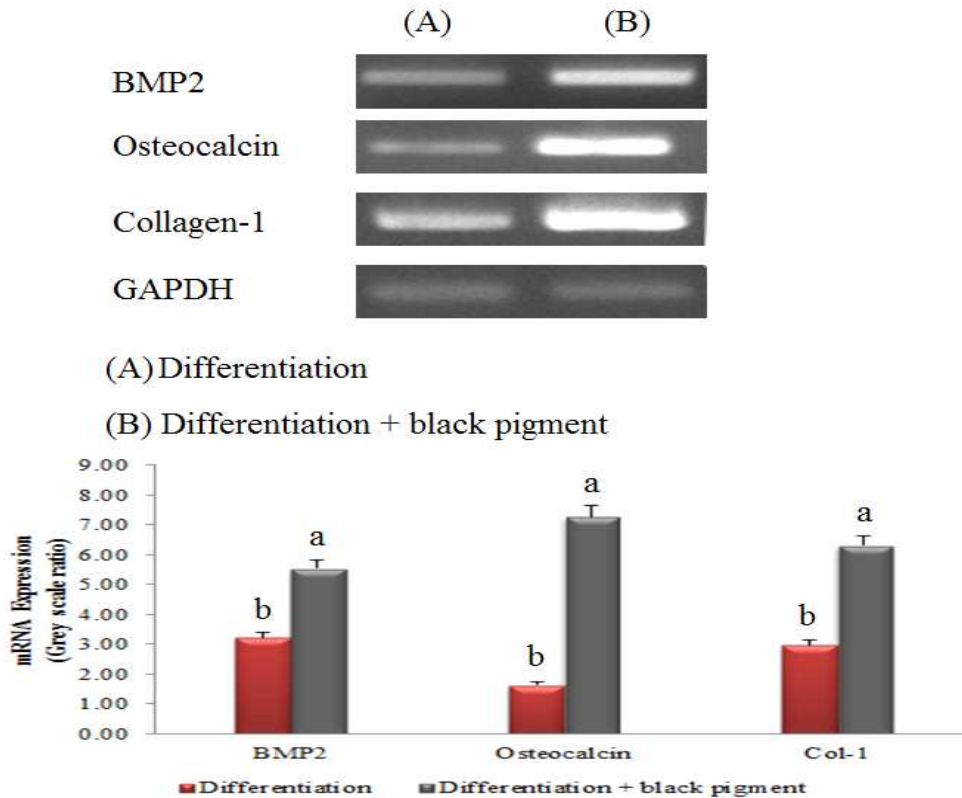


Fig. 114. Effect of melanin of Yeonsan Ogye on BMP2, osteocalcin and col-1 mRNA expression in osteoblast cells.

■ 개발된 건강기능성 제품에 대한 안전성 평가(단회/반복 독성)

가. 일반 증상 관찰

SHT와 KOG를 농도별로 단회 및 반복 투여하여 경과를 관찰한 결과, SHT와 KOG로 인한 폐사 및 특이적인 일반증상이 관찰되지 않았다.

나. 혈액학적 검사

단회 및 반복 투여 종료 후 경과 관찰이 종료된 후 혈액학적 검사를 실시한 결과, 총 적혈구수(RBC), 혈색소량(HGB), 헤마토크리트치(HCT), 평균 적혈구용적(MCV), 평균 헤모글로빈양(MCH), 평균 적혈구 헤모글로빈농도(MCHC), 혈소판수(PLT), 총 백혈구수(WBC), 림프구(LYMP), 단핵구(MONO), 산호성 백혈구(EOS), 중성호성 백혈구(NEUT), 염기호성 백혈구(BASO)의 수치가 대조군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.

Table 7. Hematological Values of Female Rats Treated with SHT and KOG for Once

list	Control	SHT			KOG		
		500	1000	2000	500	1000	2000
RBC ($\times 10^6$ cells/ $\mu\ell$)	7.6 \pm 0.6	7.5 \pm 0.6	7.6 \pm 0.4	7.7 \pm 0.2	7.5 \pm 0.5	7.5 \pm 0.3	7.6 \pm 0.1
HGB (g/dl)	16.3 \pm 0.3	16.1 \pm 0.2	16.2 \pm 0.4	16.4 \pm 0.2	16.3 \pm 0.5	16.1 \pm 0.6	16.4 \pm 0.3
HCT (%)	41.1 \pm 0.9	41.2 \pm 1.5	41.1 \pm 1.1	41.1 \pm 1.6	40.9 \pm 1.2	41.0 \pm 1.6	41.3 \pm 1.0
MCV (fl)	48.9 \pm 2.9	47.5 \pm 2.5	47.6 \pm 2.3	47.9 \pm 2.6	46.7 \pm 2.1	47.5 \pm 1.6	49.2 \pm 2.0
MCH (pg)	19.1 \pm 1.6	19.3 \pm 1.1	18.8 \pm 1.0	18.6 \pm 1.5	19.1 \pm 1.6	19.2 \pm 1.6	19.3 \pm 1.4
MCHC (g/dl)	39.5 \pm 0.6	39.5 \pm 0.6	39.4 \pm 0.9	38.9 \pm 0.4	38.8 \pm 0.5	38.9 \pm 0.6	38.7 \pm 0.5
PLT ($\times 10^3$ cells/ $\mu\ell$)	786.6 \pm 31.0	780.8 \pm 26.1	777.6 \pm 20.5	774.9 \pm 29.7	774.4 \pm 27.2	780.6 \pm 23.4	779.7 \pm 25.4
WBC ($\times 10^3$ cells/ $\mu\ell$)	4.4 \pm 0.6	4.3 \pm 0.5	4.6 \pm 0.3	3.9 \pm 0.6	4.4 \pm 0.1	4.3 \pm 0.2	4.2 \pm 0.4
LYMP (%)	89.1 \pm 2.8	89.9 \pm 1.2	85.9 \pm 3.9	87.3 \pm 3.0	90.5 \pm 2.5	88.1 \pm 3.1	85.2 \pm 2.7
MONO (%)	2.4 \pm 0.3	2.3 \pm 0.2	2.2 \pm 0.3	2.4 \pm 0.4	1.9 \pm 0.5	2.1 \pm 0.6	2.4 \pm 0.2
EOS (%)	2.5 \pm 0.4	2.2 \pm 0.3	2.9 \pm 0.1	2.8 \pm 0.1	2.1 \pm 0.4	2.1 \pm 0.3	2.2 \pm 0.3
NEUT (%)	17.6 \pm 0.6	17.9 \pm 0.9	17.6 \pm 0.3	17.9 \pm 0.7	16.3 \pm 0.7	17.1 \pm 0.4	17.8 \pm 0.5
BASO (%)	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0

Table 8. Hematological Values of Female Rats Treated with SHT and KOG for 4 weeks

list	Control	SHT			KOG		
		500	1000	2000	500	1000	2000
RBC ($\times 10^6$ cells/ $\mu\ell$)	8.5 \pm 0.2	8.3 \pm 0.4	8.5 \pm 0.2	8.5 \pm 0.4	8.5 \pm 0.3	8.5 \pm 0.5	8.6 \pm 0.2
HGB (g/dl)	17.3 \pm 0.9	17.1 \pm 0.7	17.2 \pm 1.1	16.9 \pm 1.1	16.9 \pm 0.8	16.9 \pm 0.7	17.2 \pm 0.2

HCT (%)	42.7±1.3	42.7±2.1	42.2±3.0	41.9±2.9	41.9±1.5	41.5±1.5	42.1±1.2
MCV (fl)	49.6±2.1	49.6±1.7	49.8±2.3	49.3±1.7	49.7±3.2	48.5±0.9	48.8±1.5
MCH (pg)	18.8±1.8	18.2±3.1	18.7±2.6	18.6±1.5	18.5±0.9	18.4±1.4	18.9±1.9
MCHC (g/dl)	41.6±3.2	39.7±3.1	39.9±3.1	40.0±1.7	39.8±1.2	39.4±2.8	38.9±3.4
PLT (×10 ³ cells/μl)	833.2±20.0	835.4±21.5	834.6±19.4	831.5±20.0	833.6±17.2	829.4±15.9	829.1±12.9
WBC (×10 ³ cells/μl)	4.7±0.1	4.6±0.2	4.7±0.1	4.7±0.2	4.6±0.2	4.7±0.1	4.9±0.3
LYMP (%)	82.1±3.9	80.9±2.1	81.2±2.6	83.1±4.1	85.6±3.5	83.1±3.3	85.3±3.7
MONO (%)	2.3±0.1	2.1±0.3	2.3±0.1	2.2±0.2	2.2±0.4	2.1±0.3	2.2±0.1
EOS (%)	2.3±0.9	2.3±0.7	2.2±0.5	2.2±0.5	2.2±0.2	2.3±0.5	2.1±0.2
NEUT (%)	14.5±0.6	14.2±0.9	14.8±0.5	14.3±0.7	14.7±0.5	14.6±0.2	14.8±0.9
BASO (%)	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.0	0.3±0.0	0.2±0.0	0.1±0.2	0.1±0.1

다. 생화학적 검사

단회 및 반복 투여 종료 후 경과 관찰이 종료된 후 생화학적 검사를 실시한 결과, 아스파테이트 아미노기전이효소(AST), 알라닌 아미노기전이효소(ALT), 혈액요소질소(BUN), 크레아티닌(creatinine), 총 콜레스테롤(TC), 트라이글리세라이드(TG), 에이치디엘콜레스테롤(HDL), 엘디엘콜레스테롤(LDL)의 수치는 대조군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.

Table 9. Biochemical Values of Female Rats Treated with SHT and KOG for Once

list	Control	SHT			KOG		
		500	1000	2000	500	1000	2000
AST (U/l)	245.1±25.4	243.6±21.4	244.5±22.8	244.3±21.0	240.4±20.8	241.6±26.8	244.6±20.7
ALT (U/l)	75.3±5.5	72.1±5.6	78.1±5.9	75.2±5.9	72.4±4.9	76.7±4.1	77.2±3.7
BUN (mg/dl)	21.4±3.1	21.2±3.3	21.5±3.9	21.5±3.1	21.5±2.8	21.9±3.4	21.5±1.7

Creatinine (mg/dℓ)	0.5±0.1	0.5±0.2	0.5±0.1	0.5±0.0	0.5±0.1	0.5±0.1	0.5±0.1
TC (mg/dℓ)	118.8±19.6	117.9±16.5	120.6±17.9	117.9±12.6	118.9±13.9	116.2±13.4	115.5±12.6
TG (mg/dℓ)	146.4±17.2	153.4±12.3	146.7±15.0	151.9±13.6	149.8±11.6	147.3±16.8	143.6±11.6
HDL (mg/dℓ)	68.6±7.6	66.7±7.8	64.6±7.1	66.5±5.1	69.0±6.9	65.2±8.5	63.4±4.9
LDL (mg/dℓ)	15.5±1.9	14.2±1.2	14.0±1.6	13.8±1.6	15.1±2.0	14.8±1.1	14.2±1.0

Table 10. Biochemical Values of Female Rats Treated with SHT and KOG for 4 weeks

list	Control	SHT			KOG		
		500	1000	2000	500	1000	2000
AST (U/ℓ)	327.5±21.2	321.5±25.3	321.6±23.1	325.2±19.8	330.1±21.8	331.6±19.2	326.6±21.5
ALT (U/ℓ)	63.6±4.7	62.2±3.9	61.5±4.2	62.7±2.6	62.4±2.1	66.7±3.5	67.2±2.6
BUN (mg/dℓ)	23.8±4.1	23.3±3.6	23.9±5.1	23.7±3.2	23.2±1.7	23.2±3.1	23.1±2.7
Creatinine (mg/dℓ)	0.5±0.1	0.5±0.1	0.5±0.0	0.5±0.0	0.5±0.1	0.5±0.1	0.5±0.1
TC (mg/dℓ)	118.6±4.1	117.2±3.2	119.5±2.7	111.9±8.6	118.9±13.9	112.2±12.5	118.5±17.2
TG (mg/dℓ)	148.4±9.6	151.2±6.4	150.7±10.1	149.9±7.1	151.8±10.4	148.3±6.8	149.6±5.7
HDL (mg/dℓ)	98.7±1.3	99.8±1.6	95.2±1.8	97.4±2.0	99.0±2.3	95.2±2.6	93.4±3.7
LDL (mg/dℓ)	17.2±1.3	17.9±2.2	19.0±2.0	18.8±2.0	19.1±1.5	18.8±0.8	19.2±0.4

라. 장기중량 측정

단회 및 반복 투여 종료 후 경과 관찰이 종료된 후 부검을 통해 장기중량을 측정한 결과, 심장(Heart), 간(Liver), 폐(Lung), 비장(Spleen), 신장(Kidney), 부신(Adrenal gland), 흉선(Thymus), 갑상선(Thyroid), 난소(Ovary), 자궁(Uterus), 뇌(Brain), 뇌하수체(Pituitary gland)의 중량은 대조군과 비교하여 큰 차이를 나타내지 않았다(Table 9 and 10).

Table 11. Organ Weights of Female Rats Treated with SHT and KOG for Once

list	Control	SHT			KOG		
		500	1000	2000	500	1000	2000
Heart	0.79±0.03	0.81±0.03	0.79±0.02	0.82±0.01	0.80±0.02	0.81±0.02	0.82±0.03
Liver	10.94±0.95	10.98±1.00	10.72±1.11	10.94±0.94	11.05±1.69	11.12±0.94	10.74±1.05
Lung	1.53±0.22	1.49±0.20	1.60±0.18	1.56±0.23	1.60±0.24	1.55±0.18	1.51±0.21
Spleen	0.55±0.05	0.57±0.04	0.55±0.03	0.57±0.02	0.55±0.07	0.54±0.03	0.58±0.03
Kidney	2.03±0.11	1.97±0.11	1.98±0.09	1.99±0.15	1.84±0.11	2.09±0.10	2.02±0.11
Adrenal gland	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.00
Thymus	0.42±0.01	0.44±0.01	0.44±0.01	0.41±0.02	0.42±0.03	0.42±0.01	0.45±0.02
Thyroid	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Ovary	0.08±0.01	0.08±0.00	0.08±0.01	0.07±0.02	0.08±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01
Uterus	0.93±0.08	0.91±0.07	0.92±0.08	0.91±0.02	0.92±0.06	0.93±0.06	0.91±0.05
Brain	1.91±0.10	1.94±0.09	1.94±0.09	1.94±0.10	1.95±0.07	1.95±0.10	1.93±0.11
Pituitary gland	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00

Table 12. Organ Weights of Female Rats Treated with SHT and KOG for 4 weeks

list	Control	SHT			KOG		
		500	1000	2000	500	1000	2000
Heart	1.20±0.07	1.20±0.03	1.20±0.03	1.19±0.03	1.21±0.03	1.20±0.03	1.21±0.02
Liver	15.54±0.91	15.53±0.81	15.54±0.85	15.68±0.95	16.05±0.59	16.23±1.16	15.94±1.21
Lung	1.73±0.21	1.71±0.23	1.73±0.22	1.69±0.20	1.70±0.14	1.65±0.28	1.71±0.28
Spleen	0.85±0.03	0.82±0.03	0.85±0.04	0.84±0.01	0.85±0.03	0.84±0.02	0.81±0.02
Kidney	2.05±0.12	2.11±0.23	2.13±0.20	2.12±0.19	2.16±0.21	2.11±0.23	2.12±0.20

Adrenal gland	0.02±0.00	0.02±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.00
Thymus	0.42±0.01	0.43±0.01	0.42±0.01	0.43±0.01	0.42±0.02	0.43±0.03	0.42±0.01
Thyroid	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Ovary	0.08±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01
Uterus	1.13±0.08	1.12±0.05	1.13±0.02	1.11±0.03	1.12±0.04	1.13±0.06	1.09±0.02
Brain	1.89±0.10	1.88±0.09	1.89±0.10	1.93±0.07	1.88±0.03	1.84±0.61	1.93±0.11
Pituitary gland	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00

■ 개발된 건강기능성 제품에 대한 항노화(퇴행성관절염) 효과

3. 혈청 내 항염증 효능

(1) LTB₄ (leukotriene B₄) 생성량

LTB₄ 생성량을 측정한 결과, 정상군은 1125.5±66.0 ng/ml, 대조군은 1671.2±61.5 ng/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1666.8±72.2 ng/ml, 1453.7±41.3 ng/ml, 1314.7±83.2 ng/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1509.1±38.3 ng/ml, 1326.9±53.5 ng/ml, 1240.0±57.8 ng/ml로 나타나, SHT 1000, 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (**p<0.001, **p<0.01, *p<0.05) 감소가 나타났다.

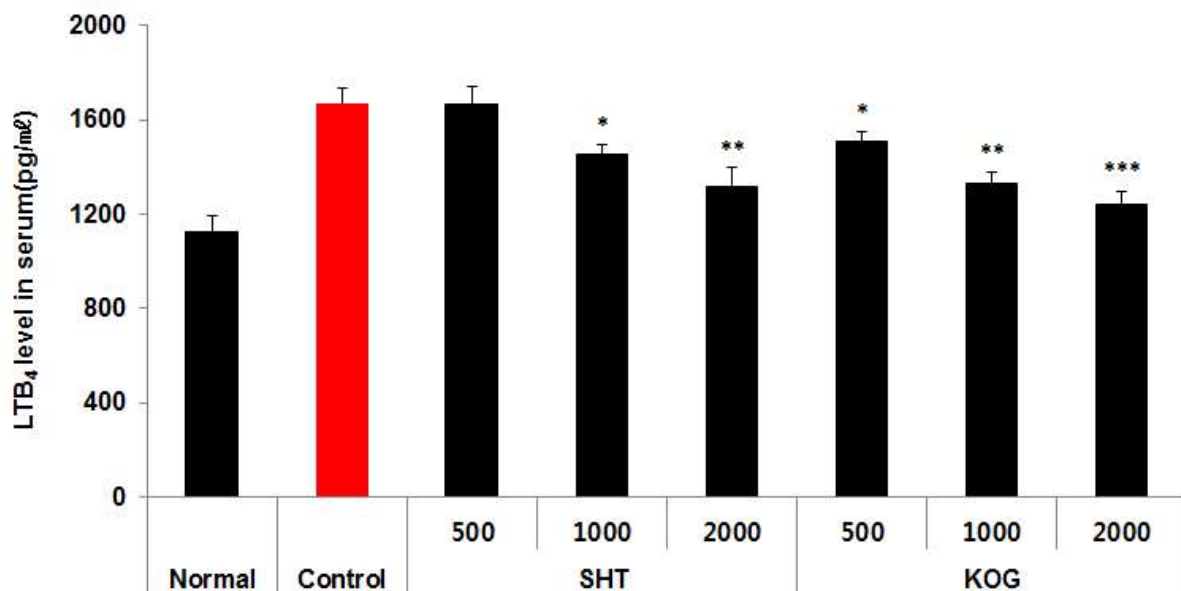


Fig. 115. Effects of SHT and KOG on LTB₄ level in serum of a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The results were expressed as

mean \pm S.D. (Significance of results, *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05 compared to the control)($n = 10$).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

(2) IL-1 β 생성량

IL-1 β 생성량을 측정한 결과, 정상군은 28.7 \pm 4.8 pg/ml, 대조군은 65.4 \pm 5.3 pg/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 60.3 \pm 2.5 pg/ml, 57.1 \pm 2.9 pg/ml, 51.2 \pm 4.6 pg/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 61.8 \pm 3.9 pg/ml, 59.8 \pm 4.4 pg/ml, 55.0 \pm 1.1 pg/ml로 나타나, SHT 1000, 2000, KOG 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** p <0.01, * p <0.05) 감소가 나타났다.

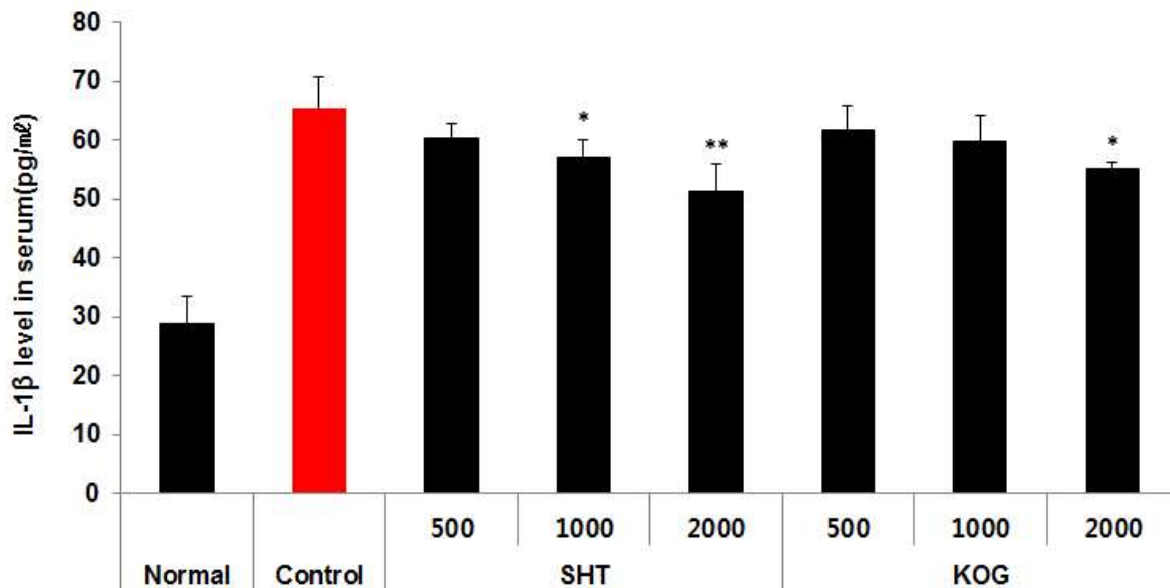


Fig. 116. Effects of SHT and KOG on IL-1 β level in serum of a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** p <0.01, * p <0.05 compared to the control)($n = 10$).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before

the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

(3) IL-6 생성량

IL-6 생성량을 측정한 결과, 정상군은 367.8 \pm 39.7 pg/ml, 대조군은 838.2 \pm 36.1 pg/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 772.8 \pm 16.0 pg/ml, 701.8 \pm 18.5 pg/ml, 616.2 \pm 24.7 pg/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 692.0 \pm 33.2 pg/ml, 636.4 \pm 26.4 pg/ml, 584.9 \pm 9.1 pg/ml로 나타나, 모든 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05) 감소가 나타났다.

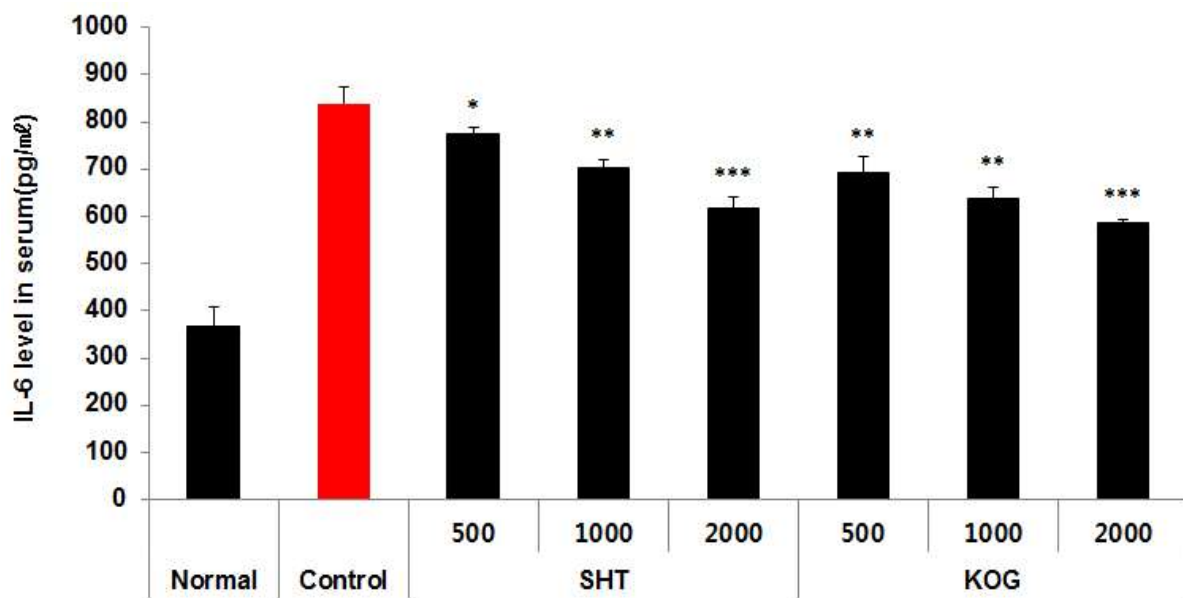


Fig. 117. Effects of SHT and KOG on IL-6 level in serum of a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05 compared to the control)(n = 10).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

(4) TNF- α 생성량

TNF- α 생성량을 측정한 결과, 정상군은 293.2 \pm 49.0 pg/ml, 대조군은 1668.2 \pm 54.1 pg/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1616.1 \pm 25.5 pg/ml, 1483.4 \pm 29.6 pg/ml, 1323.1 \pm 47.0 pg/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1531.4 \pm 39.8 pg/ml, 1511.0 \pm 45.0 pg/ml, 1361.9 \pm 51.6 pg/ml로 나타나, SHT 1000, 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (**p<0.01, *p<0.05) 감소가 나타났다.

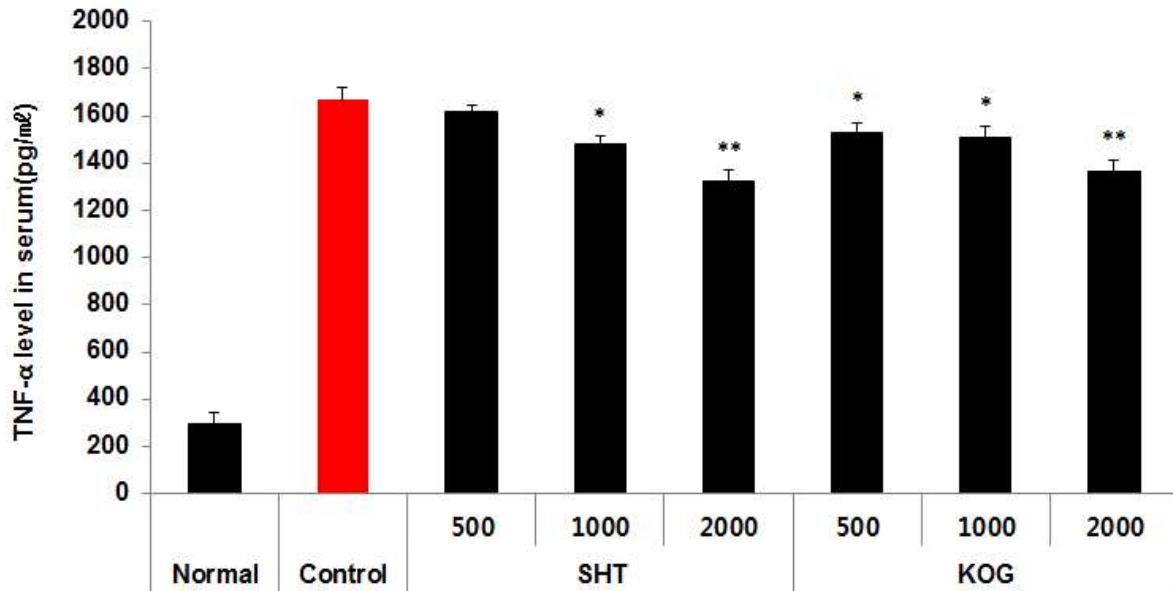


Fig. 118. Effects of SHT and KOG on TNF- α level in serum of a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, **p<0.01, *p<0.05 compared to the control)(n = 10).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

나. 혈청 내 콜 및 연골 파괴 억제 효능

(1) CTXII (c-terminal telopeptides of type II collagen) 생성량

CTXII 생성량을 측정한 결과, 정상군은 176.9 \pm 19.6 ng/ml, 대조군은 326.5 \pm 16.3 ng/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 296.5 \pm 13.8 ng/ml, 290.9 \pm 17.8 ng/ml, 257.8 \pm 18.5 ng/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 270.2 \pm 10.2 ng/ml, 261.8 \pm 19.3 ng/ml, 234.1 \pm 15.8 ng/ml로 나타나, SHT 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (**p<0.01, *p<0.05) 감소가 나타났다.

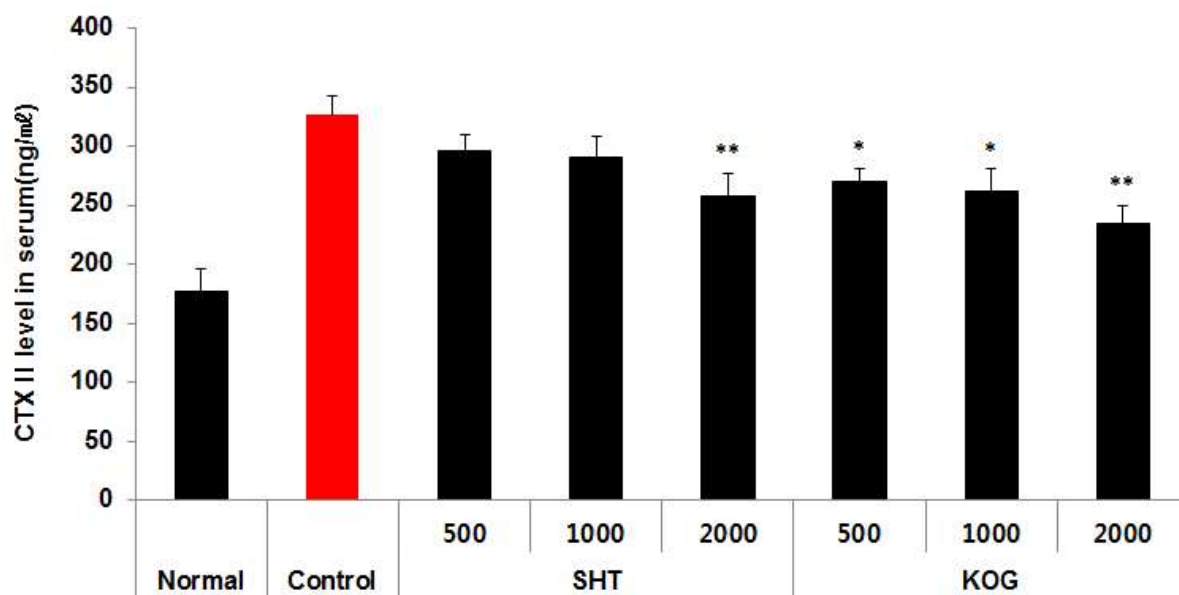


Fig. 119. Effects of SHT and KOG on CTXII level in serum of a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to the control)($n = 10$).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

(2) COMP (cartilage oligomeric matrix protein) 생성량

COMP 생성량을 측정한 결과, 정상군은 61.5 ± 4.3 ng/ml, 대조군은 148.6 ± 4.6 ng/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 136.4 ± 3.6 ng/ml, 121.4 ± 7.0 ng/ml, 120.1 ± 5.5 ng/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 142.0 ± 5.0 ng/ml, 128.0 ± 3.7 ng/ml, 117.1 ± 4.9 ng/ml로 나타나, SHT 500, 1000, 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 감소가 나타났다.

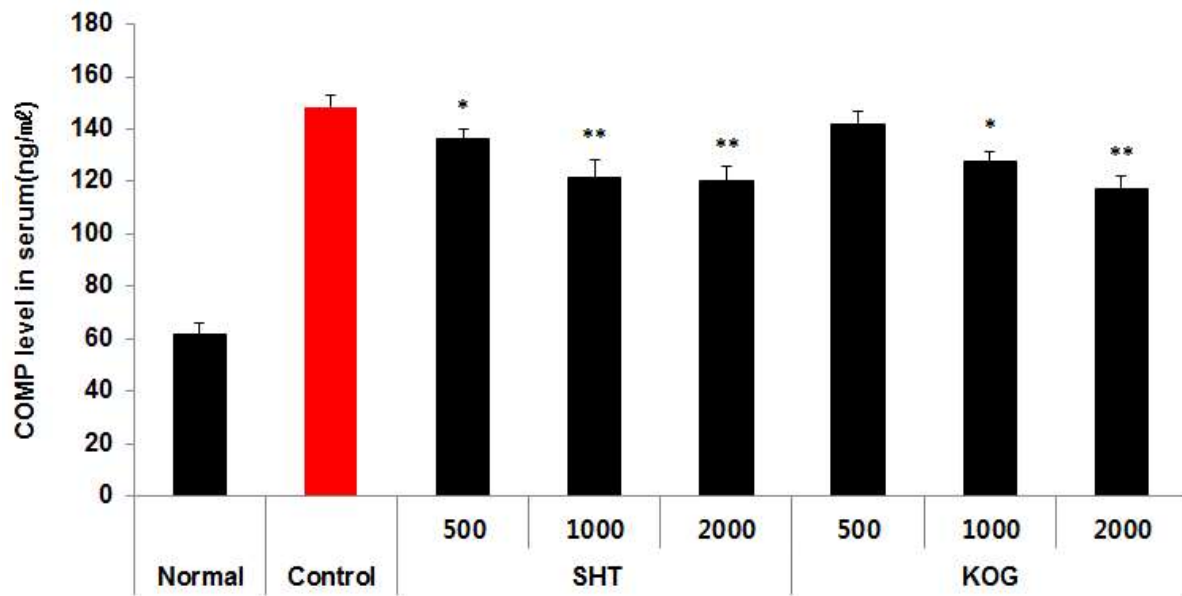


Fig. 120. Effects of SHT and KOG on COMP level in serum of a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to the control)($n = 10$).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

(3) MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) 생성량

MMP-2 생성량을 측정한 결과, 정상군은 848.4 ± 74.9 ng/ml, 대조군은 1544.3 ± 87.9 ng/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1470.2 ± 92.1 ng/ml, 1324.4 ± 64.7 ng/ml, 1291.3 ± 64.2 ng/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1439.3 ± 88.2 ng/ml, 1302.5 ± 58.6 ng/ml, 1188.1 ± 91.0 ng/ml로 나타나, SHT 1000, 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 감소가 나타났다.

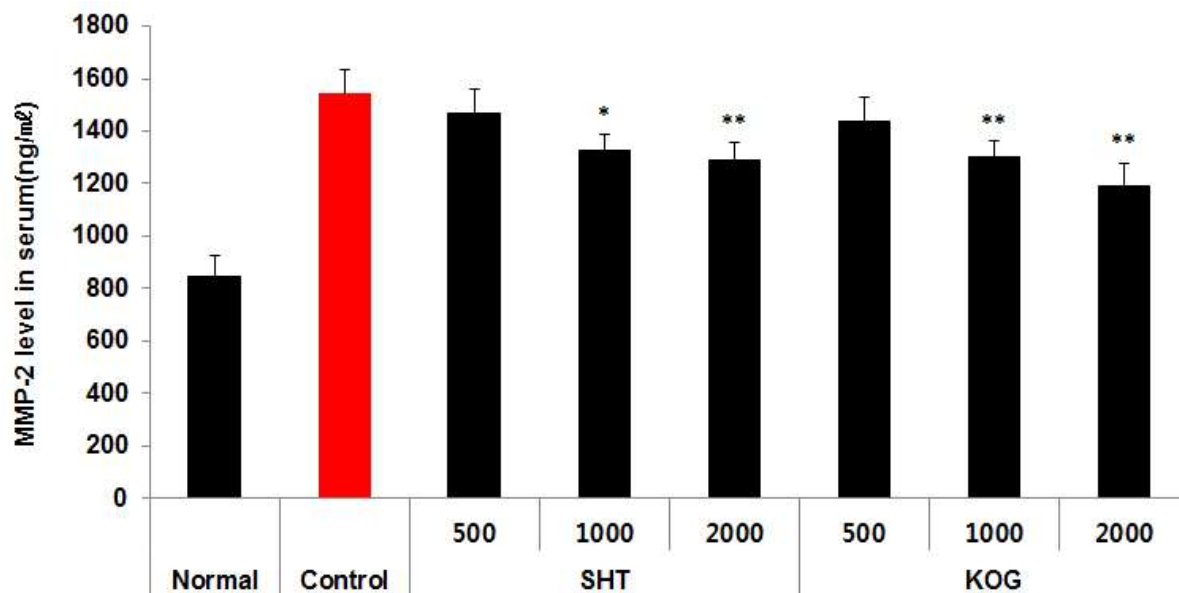


Fig. 121. Effects of SHT and KOG on MMP-2 level in serum of a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** p <0.01, * p <0.05 compared to the control)($n = 10$).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

(4) MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) 생성량

MMP-9 생성량을 측정한 결과, 정상군은 851.9 ± 46.1 ng/ml, 대조군은 1967.0 ± 138.4 ng/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1865.7 ± 138.2 ng/ml, 1783.6 ± 135.8 ng/ml, 1754.5 ± 114.4 ng/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1789.1 ± 192.2 ng/ml, 1619.6 ± 123.3 ng/ml, 1513.5 ± 89.6 ng/ml로 나타나, SHT 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05) 감소가 나타났다.

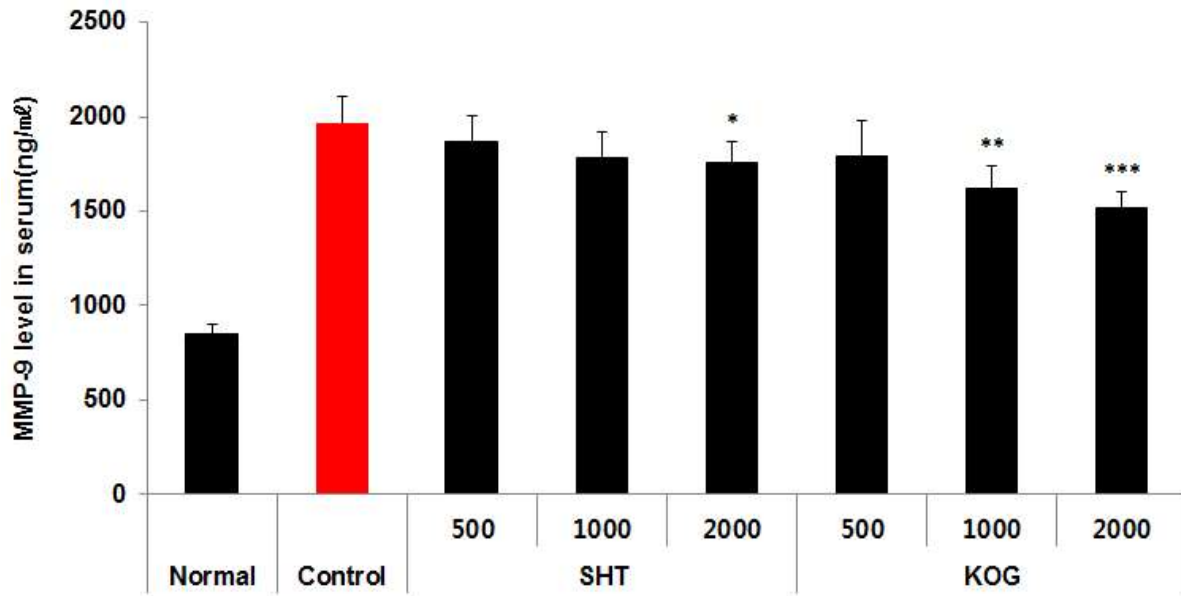


Fig. 122. Effects of SHT and KOG on MMP-9 level in serum of a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05 compared to the control)($n = 10$).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

다. 혈청 내 골 및 연골 보호 효능

(1) TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) 생성량

TIMP-1 생성량을 측정한 결과, 정상군은 690.1 \pm 19.1 ng/ml, 대조군은 492.3 \pm 20.0 ng/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 476.5 \pm 12.1 ng/ml, 479.8 \pm 14.9 ng/ml, 536.1 \pm 18.6 ng/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 520.2 \pm 19.0 ng/ml, 528.7 \pm 10.8 ng/ml, 598.7 \pm 14.5 ng/ml로 나타나, SHT 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05) 증가가 나타났다.

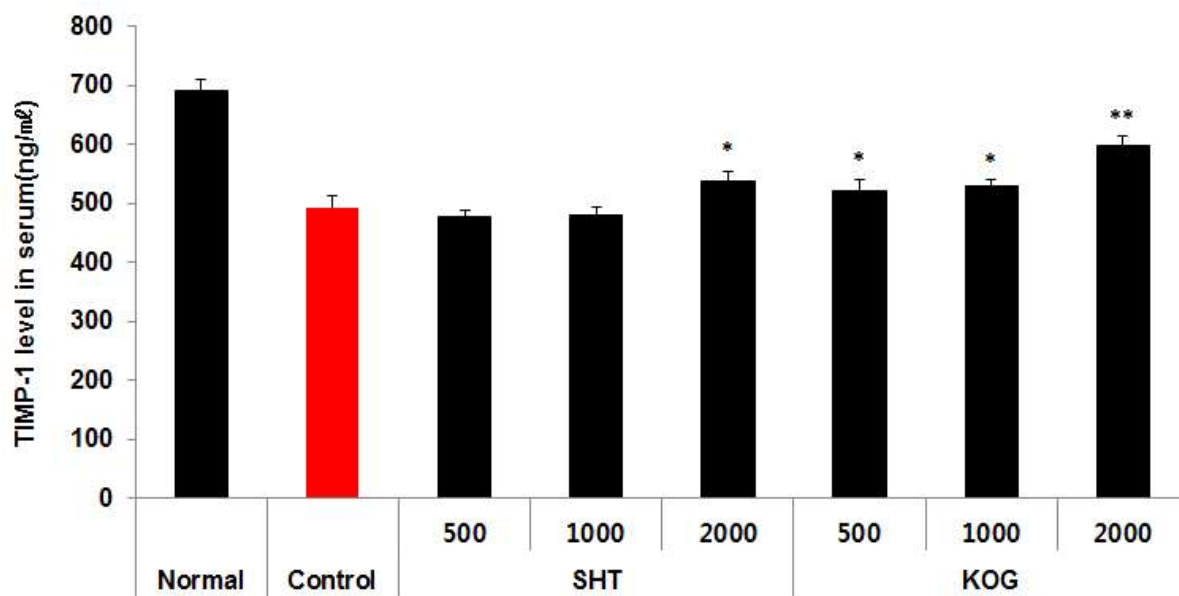


Fig. 123. Effects of SHT and KOG on TIMP-1 level in serum of a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05 compared to the control)($n = 10$).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

(2) GAGs (glycosaminoglycan) 생성량

GAGs 생성량을 측정한 결과, 정상군은 87.9 ± 6.6 ng/ml, 대조군은 40.7 ± 5.9 ng/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 45.5 ± 5.1 ng/ml, 53.1 ± 5.9 ng/ml, 55.1 ± 4.0 ng/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 48.1 ± 3.8 ng/ml, 55.4 ± 3.8 ng/ml, 66.5 ± 4.1 ng/ml로 나타나, SHT 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** p <0.01, * p <0.05) 증가가 나타났다.

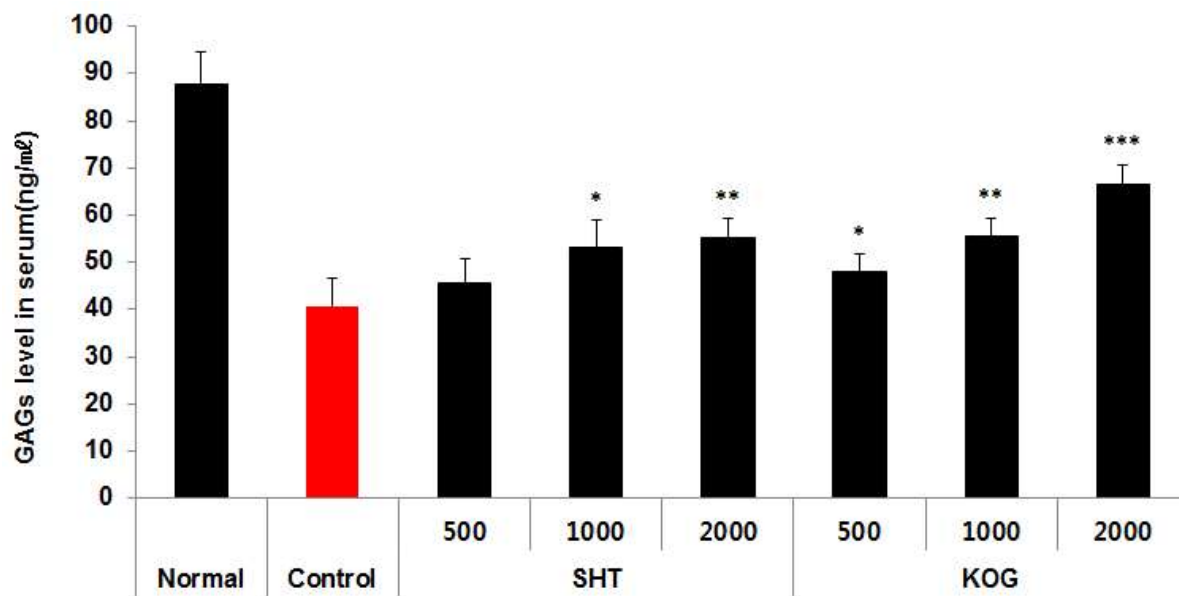


Fig. 124. Effects of SHT and KOG on GAGs level in serum of a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to the control)($n = 10$).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

(3) Aggrecan 생성량

Aggrecan 생성량을 측정한 결과, 정상군은 42.5 ± 1.3 ng/ml, 대조군은 33.9 ± 1.7 ng/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 34.9 ± 1.6 ng/ml, 35.8 ± 1.1 ng/ml, 36.7 ± 1.3 ng/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 34.9 ± 1.5 ng/ml, 35.3 ± 1.6 ng/ml, 38.1 ± 1.7 ng/ml로 나타나, KOG 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (* $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

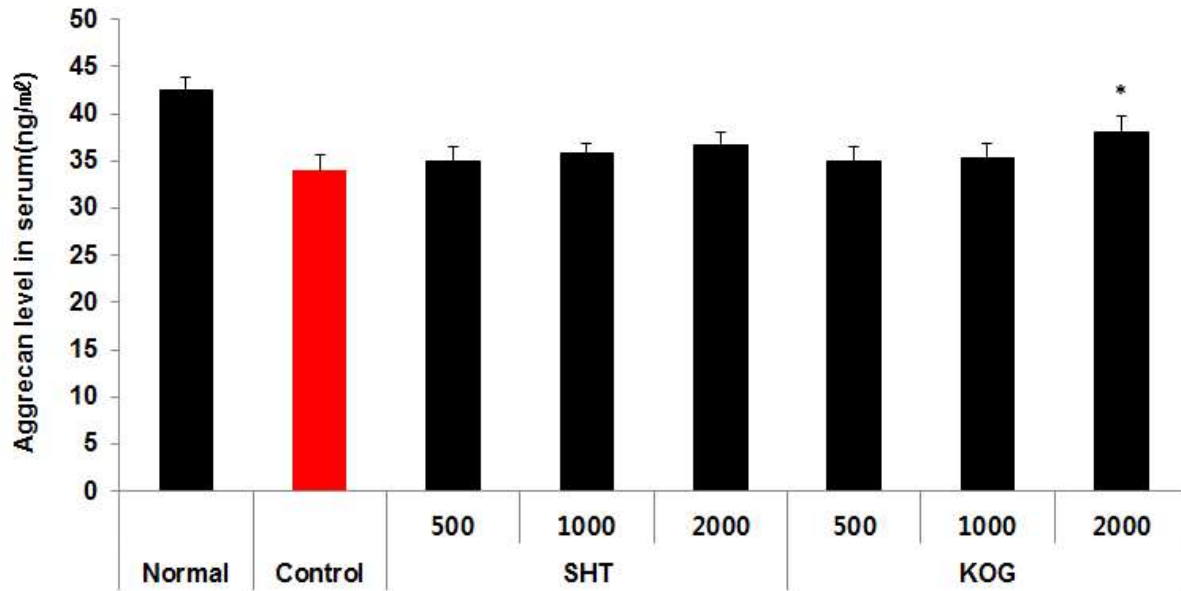


Fig. 125. Effects of SHT and KOG on aggrecan level in serum of a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, * p <0.05 compared to the control)($n = 10$).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

(4) Calcitonin 생성량

Calcitonin 생성량을 측정한 결과, 정상군은 33.5 ± 1.7 ng/ml, 대조군은 23.7 ± 1.2 ng/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 26.4 ± 1.1 ng/ml, 28.4 ± 1.3 ng/ml, 29.9 ± 1.8 ng/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 27.5 ± 1.9 ng/ml, 30.8 ± 1.1 ng/ml, 31.0 ± 1.4 ng/ml로 나타나, SHT 1000, 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** p <0.01, * p <0.05) 증가가 나타났다.

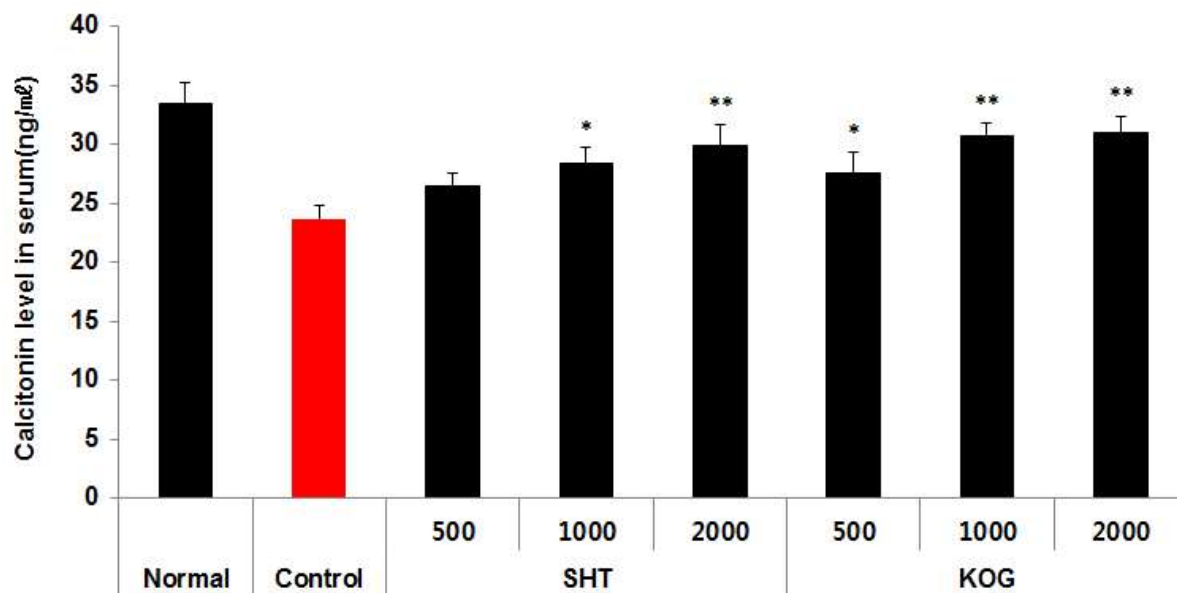


Fig. 126. Effects of SHT and KOG on calcitonin level in serum of a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to the control)($n = 10$).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

라. Micro-CT 촬영

Micro-CT 촬영 결과, 정상군에 비해 대조군과 CDT 투여군은 연골 부피 (cartilage volume, 노란색 원형표기)의 감소 및 대퇴골(femur) 하단부위의 골 파괴가 심하게 진행된 것이 확인되었다. 하지만 상대적으로 SHT와 KOG 실험군은 대조군에 비해 골 파괴는 큰 차이가 나타나지 않았으나 연골 부피는 보존이 잘 되어있는 것이 확인되었다.

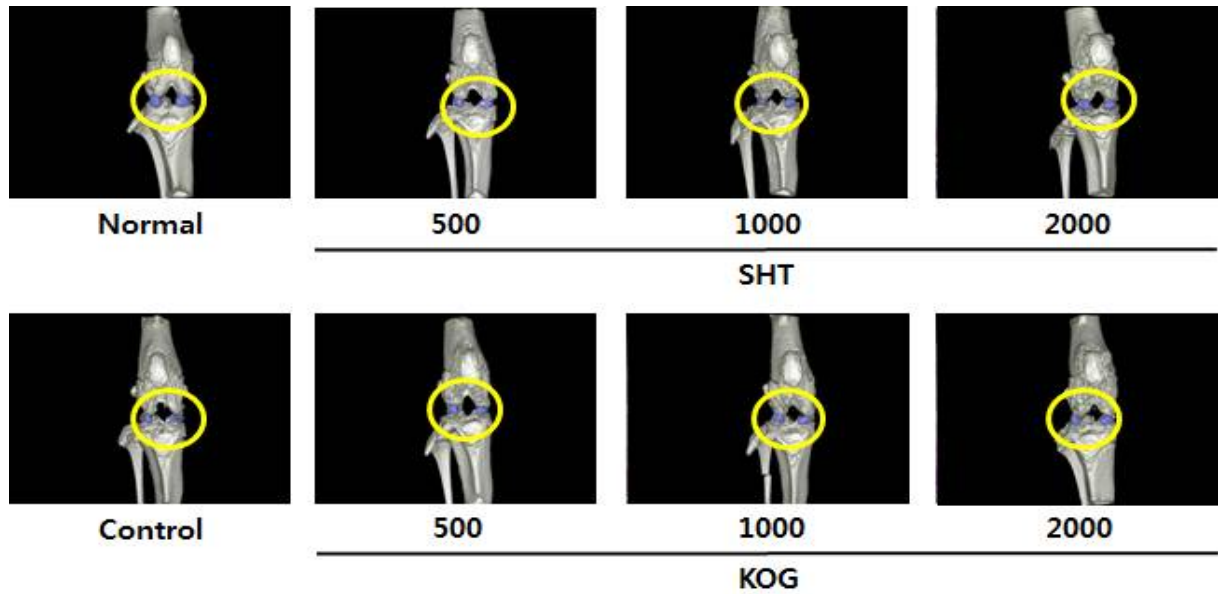


Fig. 127. Effects of SHT and KOG on femur bone architecture and cartilage volume in a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. Representative morphological images of the knee joint tissues were obtained using three-dimension micro-computed tomography.

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

마. Structural parameter 측정

(1) 연골량 (cartilage volume)

연골량 (cartilage volume) 측정 결과, 정상군은 $3.75 \pm 0.31 \text{ mm}^3$, 대조군은 $2.20 \pm 0.22 \text{ mm}^3$ 로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $2.40 \pm 0.34 \text{ mm}^3$, $2.50 \pm 0.39 \text{ mm}^3$, $2.80 \pm 0.29 \text{ mm}^3$ 로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $2.45 \pm 0.24 \text{ mm}^3$, $2.67 \pm 0.33 \text{ mm}^3$, $3.00 \pm 0.27 \text{ mm}^3$ 로 나타나, SHT 1000, 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

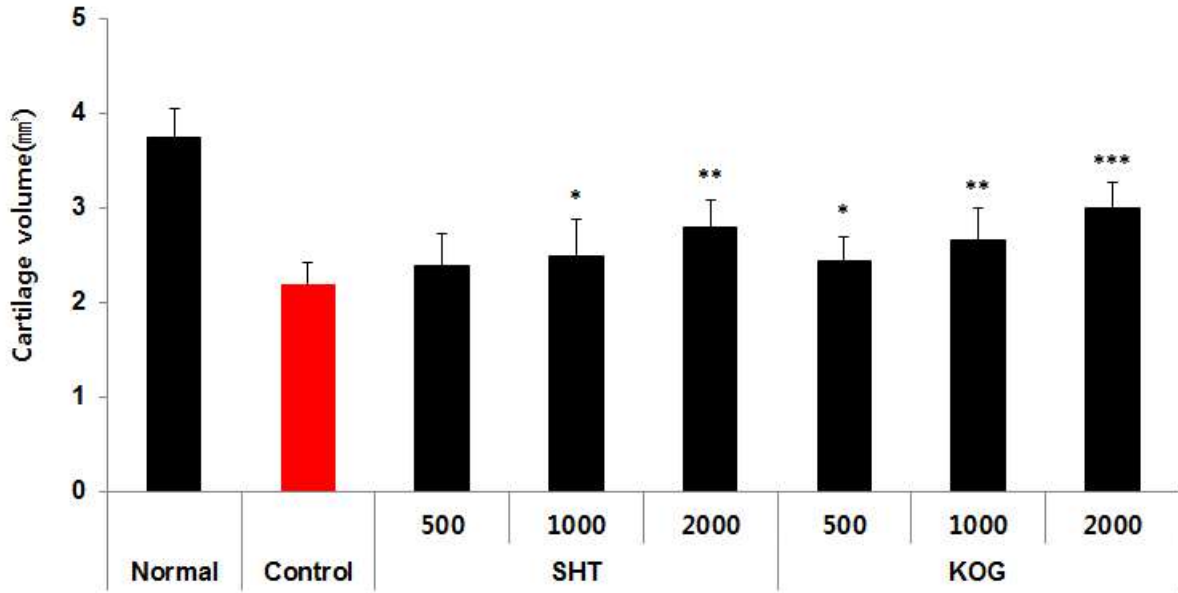


Fig. 128. Effects of SHT and KOG on cartilage volume in a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05 compared to the control)($n = 10$).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ l of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ l of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

(2) 골밀도 (bone volume)

골밀도 (bone volume) 측정 결과, 정상군은 $0.51 \pm 0.03 U^3$, 대조군은 $0.22 \pm 0.05 U^3$ 로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $0.27 \pm 0.03 U^3$, $0.31 \pm 0.05 U^3$, $0.34 \pm 0.04 U^3$ 로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $0.30 \pm 0.03 U^3$, $0.33 \pm 0.04 U^3$, $0.37 \pm 0.05 U^3$ 로 나타나, SHT 1000, 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** p <0.01, * p <0.05) 증가가 나타났다.

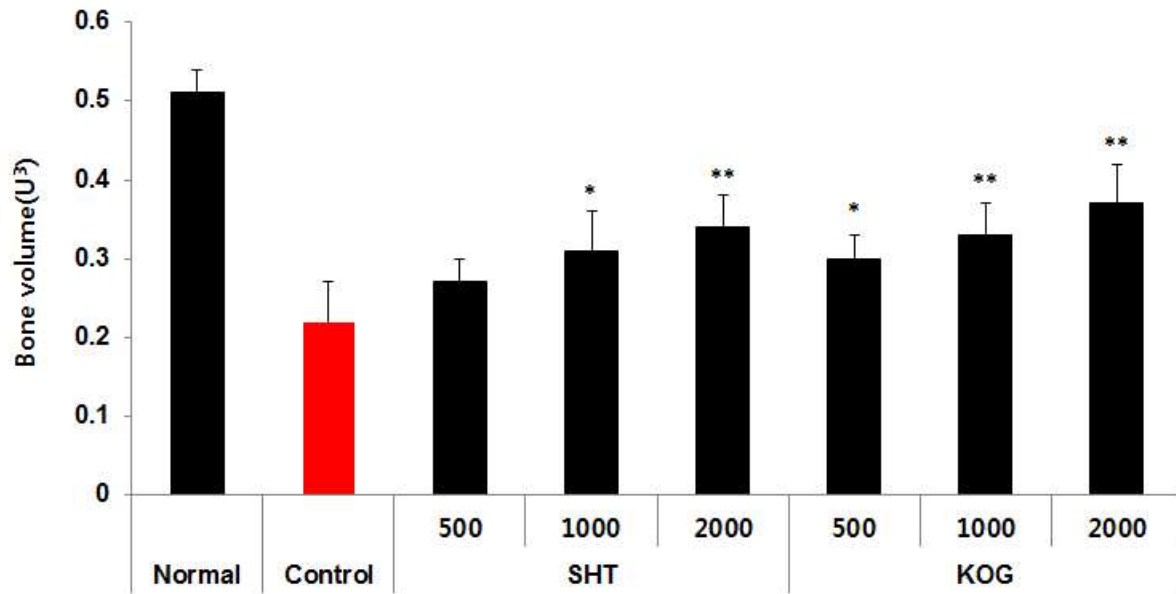


Fig. 129. Effects of SHT and KOG on bone volume in a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to the control)($n = 10$).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ l of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ l of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

(3) 관절염증

BS (bone surface)와 BV (bone volume)에 대한 ratio를 산출하여 관절 염증정도를 측정 한 결과, 정상군은 12.8 ± 1.1 1/U, 대조군은 25.7 ± 2.2 1/U로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 21.2 ± 3.4 1/U, 20.1 ± 2.9 1/U, 18.0 ± 2.7 1/U로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 21.1 ± 2.4 1/U, 19.3 ± 3.3 1/U, 16.9 ± 2.4 1/U로 나타나, SHT 1000, 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 감소가 나타났다.

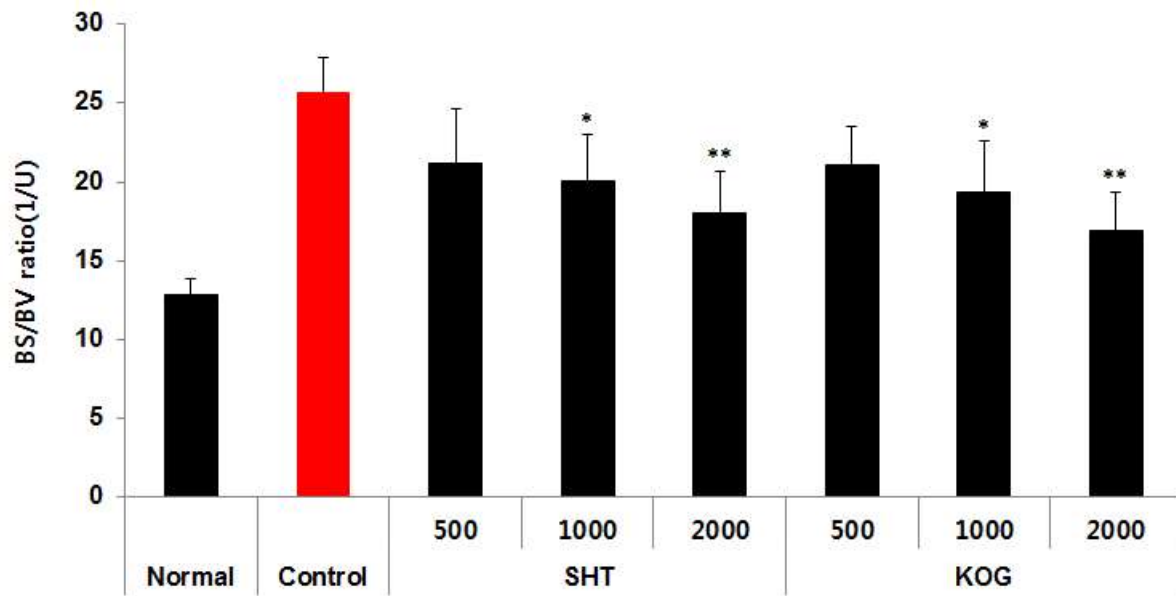


Fig. 130. Effects of SHT and KOG on BS/BV ratio in a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to the control)($n = 10$).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ l of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ l of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

바. 조직학적 검사

(1) H&E (hematoxylin and eosin) 염색

H&E 염색을 실시한 결과, 정상군에 비해 대조군과 SHT와 KOG 실험군은 대퇴골과 경골 사이의 연골 부피 (cartilage, 노란색 원형표기)의 감소가 확인되었다. 하지만 상대적으로 SHT와 KOG 실험군은 대조군에 비해 용량 의존적으로 연골의 보존이 잘 되어있음이 확인되었다.

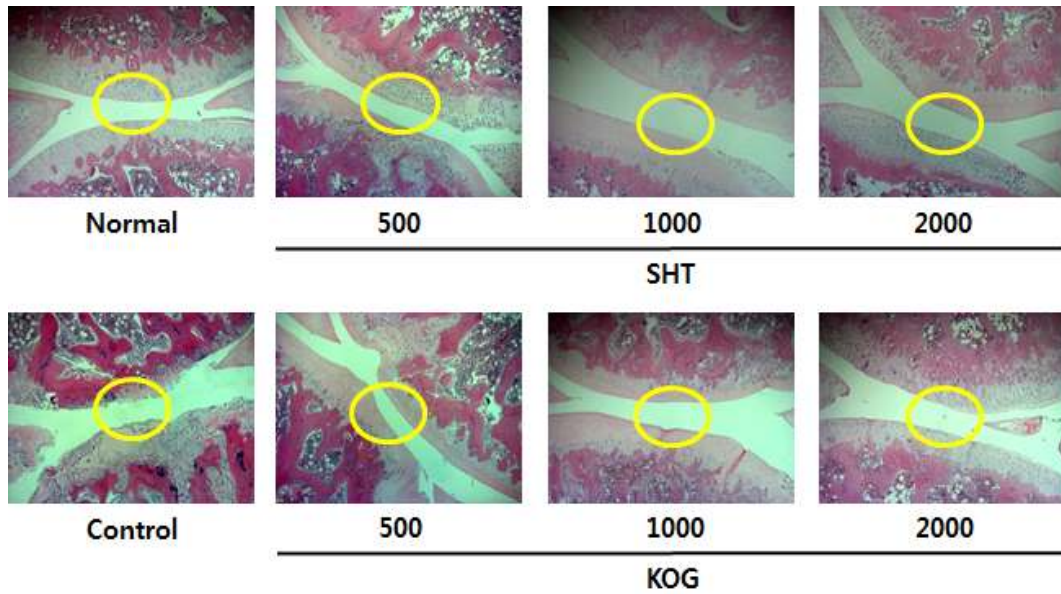


Fig. 131. Histopathological effects (H&E staining) of SHT and KOG on knee joints in a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. Representative histological images of knee joint tissues were stained using hematoxylin and eosin (magnification, 200X).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

(2) Safranin-O 염색

Safranin-O 염색을 실시한 결과, 정상군에 비해 대조군과 SHT와 KOG 실험군은 연골 주변과 활막 내에 붉은 색으로 염색된 프로테오글리칸 (proteoglycan, 노란색 화살표)이 고르게 형성되어 있지 않은 것을 확인할 수 있었으며, 상대적으로 SHT와 KOG 실험군은 대조군에 비해 연골 주변과 활막 내 프로테오글리칸의 분포가 높은 것을 확인할 수 있었다.

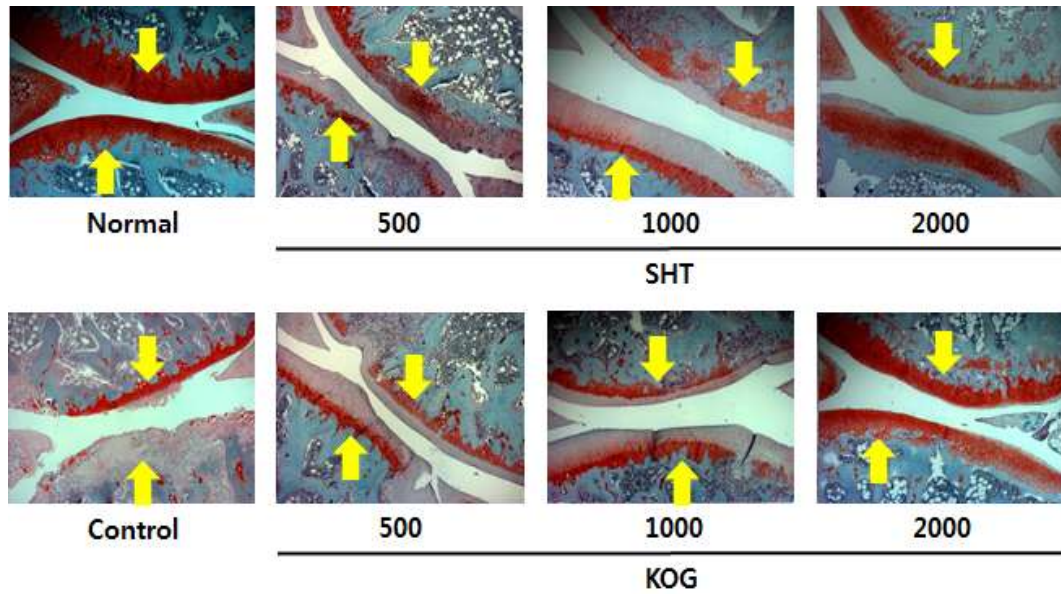


Fig. 132. Histopathological effects (safranin-O) of SHT and KOG on knee joints in a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. Representative histological images of knee joint tissues were stained using safranin-O (magnification, 200X).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

사. 체중부하 측정

체중부하변화를 측정한 결과, 정상군은 $100.0 \pm 4.7\%$, 대조군은 $46.4 \pm 5.1\%$ 로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $57.0 \pm 6.0\%$, $61.0 \pm 8.2\%$, $70.3 \pm 4.2\%$ 로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $60.1 \pm 6.5\%$, $63.3 \pm 7.0\%$, $71.8 \pm 3.5\%$ 로 나타나, 모든 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

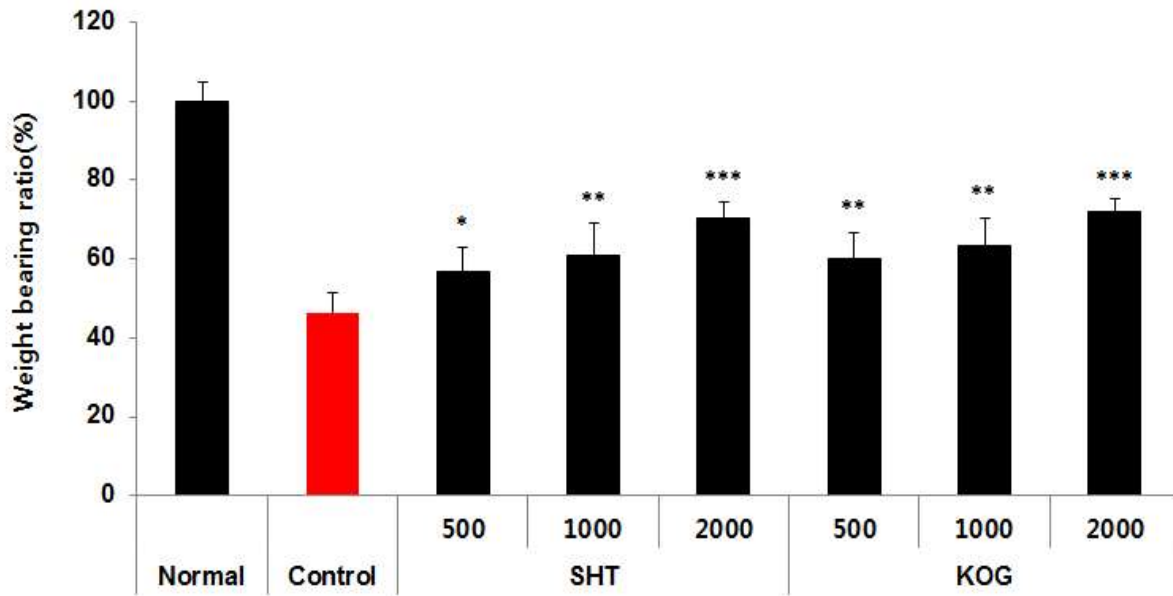


Fig. 133. Effects of SHT and KOG on weight bearing ratio in serum of a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05 compared to the control)($n = 10$).

Normal, Non-treated the MIA solution in rat; Control, DW was administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the same doses of DW for 4 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks before the MIA solution (3 mg/50 μ L of 0.9% saline) was injected directly into the intra-articular space of the rats' right knees. After the injection of MIA, the rats with MIA-induced osteoarthritis received the each doses of SHT and KOG for 4 weeks.

■ 개발된 건강기능성 제품에 대한 생리활성 평가(항산화 및 면역증진)

가. 혈액 내 면역세포 수 측정

(1) 백혈구

혈액 내 백혈구 수를 측정한 결과, 정상군은 $2.40 \pm 0.13 \times 10^3$ cells/ μ L, 대조군은 $1.65 \pm 0.20 \times 10^3$ cells/ μ L로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $1.75 \pm 0.17 \times 10^3$ cells/ μ L, $1.94 \pm 0.13 \times 10^3$ cells/ μ L, $2.04 \pm 0.15 \times 10^3$ cells/ μ L로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $1.85 \pm 0.11 \times 10^3$ cells/ μ L, $2.03 \pm 0.12 \times 10^3$ cells/ μ L, $2.15 \pm 0.16 \times 10^3$ cells/ μ L로 나타나 SHT 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는(** p <0.01, * p <0.05) 증가가 나타났다.

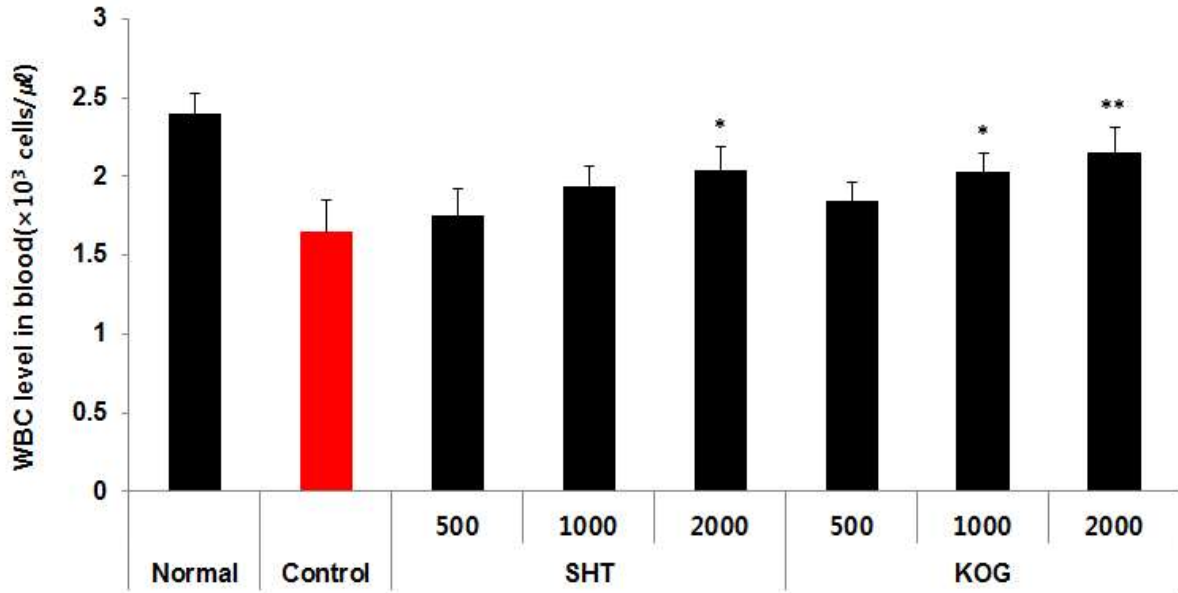


Fig. 134. Effect of SHT and KOG on WBC level in blood of cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Normal, Non-treated ICR mice; Control, DW was administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution (100 mg/kg) 100 μl was injected intraperitoneal injection; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution 100 μl was injected intraperitoneal injection.

(2) 호산구

백혈구 내 호산구 수를 측정한 결과, 정상군은 $10.19 \pm 1.26\%$, 대조군은 $28.49 \pm 2.67\%$ 로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $30.16 \pm 2.19\%$, $32.76 \pm 1.49\%$, $33.17 \pm 1.94\%$ 로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $31.17 \pm 1.65\%$, $33.59 \pm 1.55\%$, $35.88 \pm 1.40\%$ 로 나타나 SHT 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는(** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

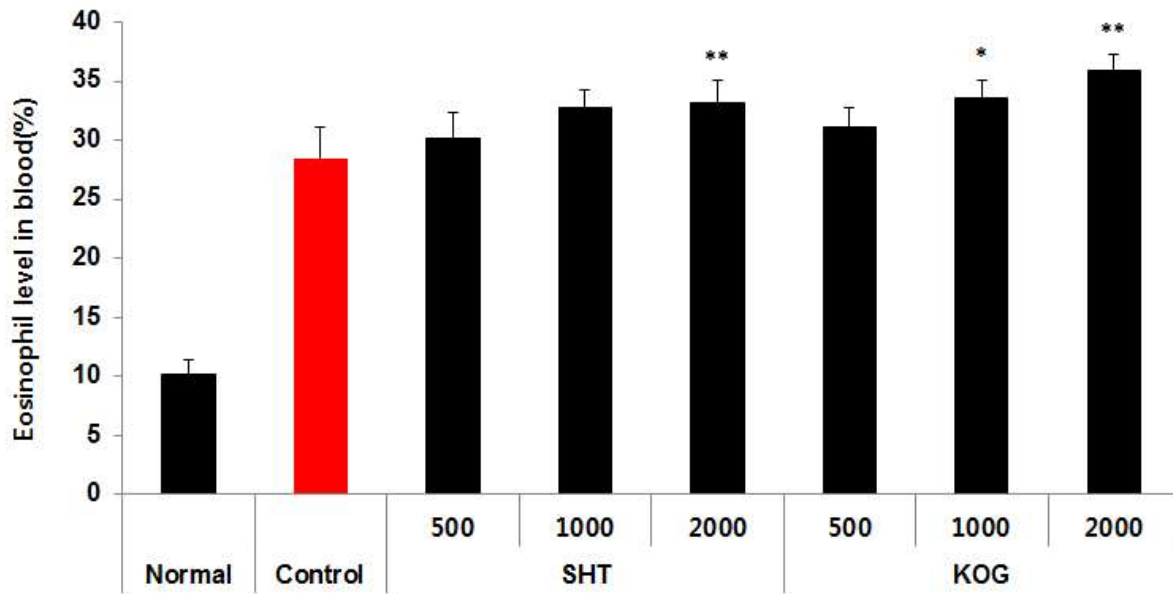


Fig. 135. Effect of SHT and KOG on eosinophil level in blood of cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Normal, Non-treated ICR mice; Control, DW was administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution (100 mg/kg) 100 μ l was injected intraperitoneal injection; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution 100 μ l was injected intraperitoneal injection.

(3) 호중구

백혈구 내 호중구 수를 측정한 결과, 정상군은 $14.65 \pm 1.46\%$, 대조군은 $23.50 \pm 1.07\%$ 로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $27.56 \pm 2.94\%$, $29.46 \pm 2.24\%$, $30.06 \pm 2.28\%$ 로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $28.59 \pm 1.59\%$, $29.47 \pm 1.64\%$, $31.35 \pm 1.38\%$ 로 나타나 SHT 1000, 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는(** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

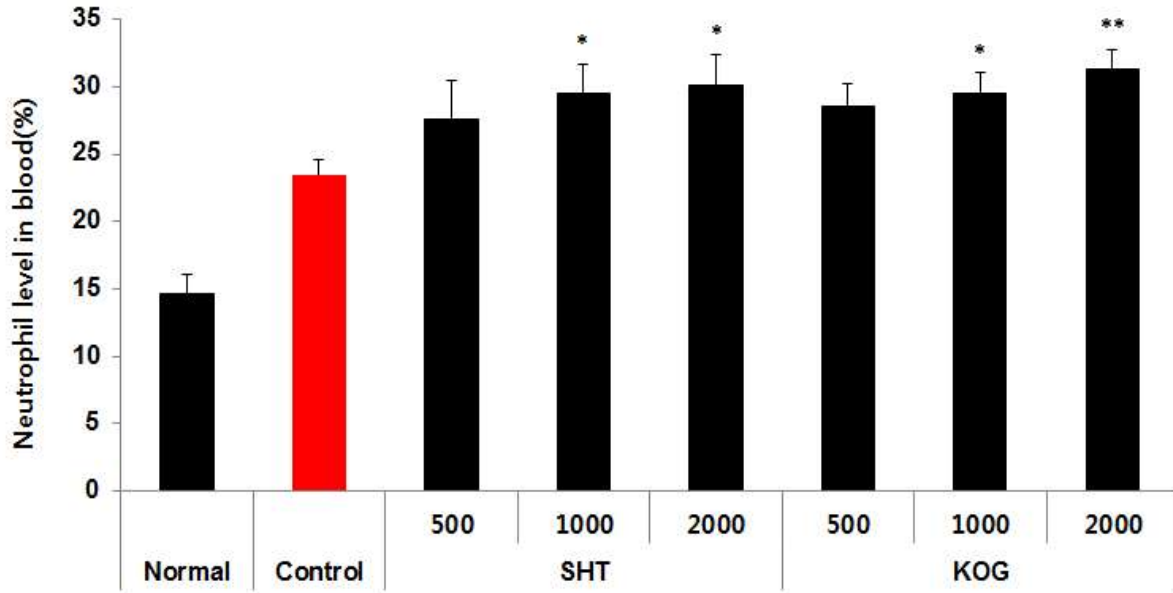


Fig. 136. Effect of SHT and KOG on neutrophil level in blood of cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Normal, Non-treated ICR mice; Control, DW was administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution (100 mg/kg) 100 μ l was injected intraperitoneal injection; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution 100 μ l was injected intraperitoneal injection.

(4) 호염기구

백혈구 내 호염기구 수를 측정한 결과, 정상군은 $0.33 \pm 0.01\%$, 대조군은 $0.30 \pm 0.02\%$ 로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $0.32 \pm 0.03\%$, $0.31 \pm 0.05\%$, $0.33 \pm 0.02\%$ 로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $0.30 \pm 0.03\%$, $0.33 \pm 0.04\%$, $0.34 \pm 0.06\%$ 로 나타나 모든 실험군은 대조군에 비해 차이가 나타나지 않았다.

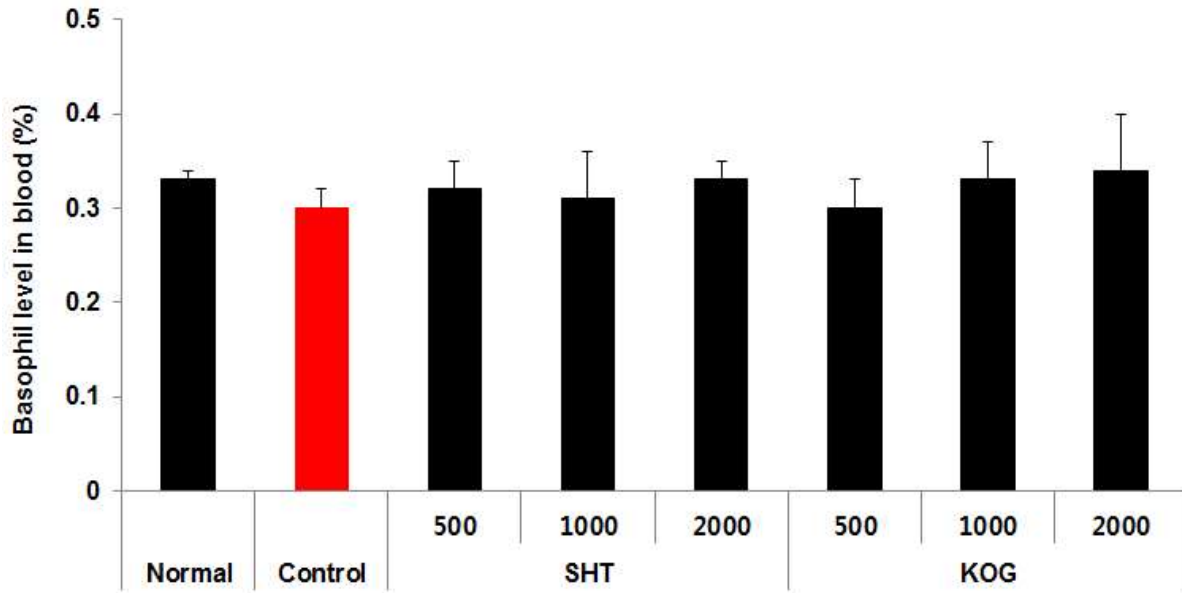


Fig. 137. Effect of SHT and KOG on basophil level in blood of cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (n = 6).

Normal, Non-treated ICR mice; Control, DW was administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution (100 mg/kg) 100 μ l was injected intraperitoneal injection; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution 100 μ l was injected intraperitoneal injection.

(5) 단핵구(대식세포)

혈액 내 단핵구 수를 측정한 결과, 정상군은 $1.08 \pm 0.10\%$, 대조군은 $1.20 \pm 0.12\%$ 로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $1.25 \pm 0.15\%$, $1.29 \pm 0.13\%$, $1.41 \pm 0.15\%$ 로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $1.34 \pm 0.13\%$, $1.33 \pm 0.19\%$, $1.50 \pm 0.18\%$ 로 나타나 SHT 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는(** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

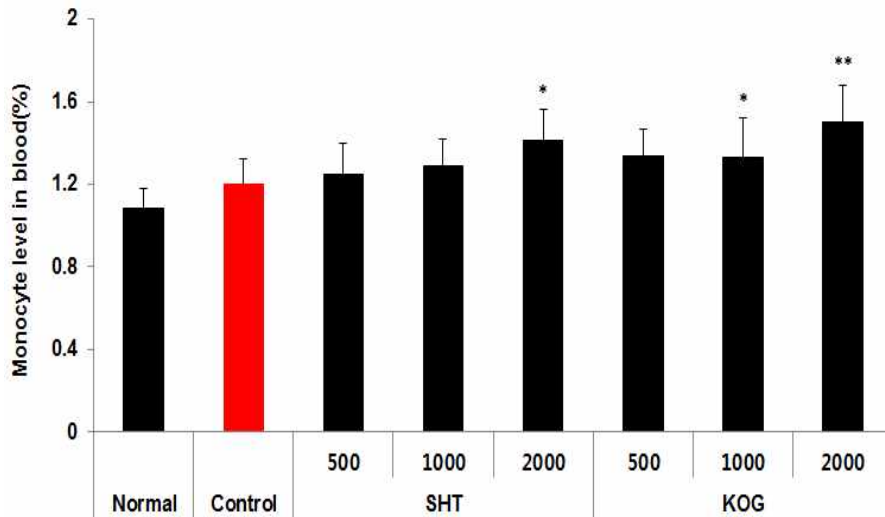


Fig. 138. Effect of SHT and KOG on monocyte level in blood of cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Normal, Non-treated ICR mice; Control, DW was administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution (100 mg/kg) 100 μ l was injected intraperitoneal injection; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution 100 μ l was injected intraperitoneal injection.

(6) 림프구

혈액 내 림프구 수를 측정한 결과, 정상군은 $69.01 \pm 5.12\%$, 대조군은 $35.76 \pm 3.25\%$ 로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $42.15 \pm 5.59\%$, $44.66 \pm 3.54\%$, $45.75 \pm 3.12\%$ 로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 $42.84 \pm 3.75\%$, $45.11 \pm 2.90\%$, $48.52 \pm 4.15\%$ 로 나타나 SHT 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는(** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

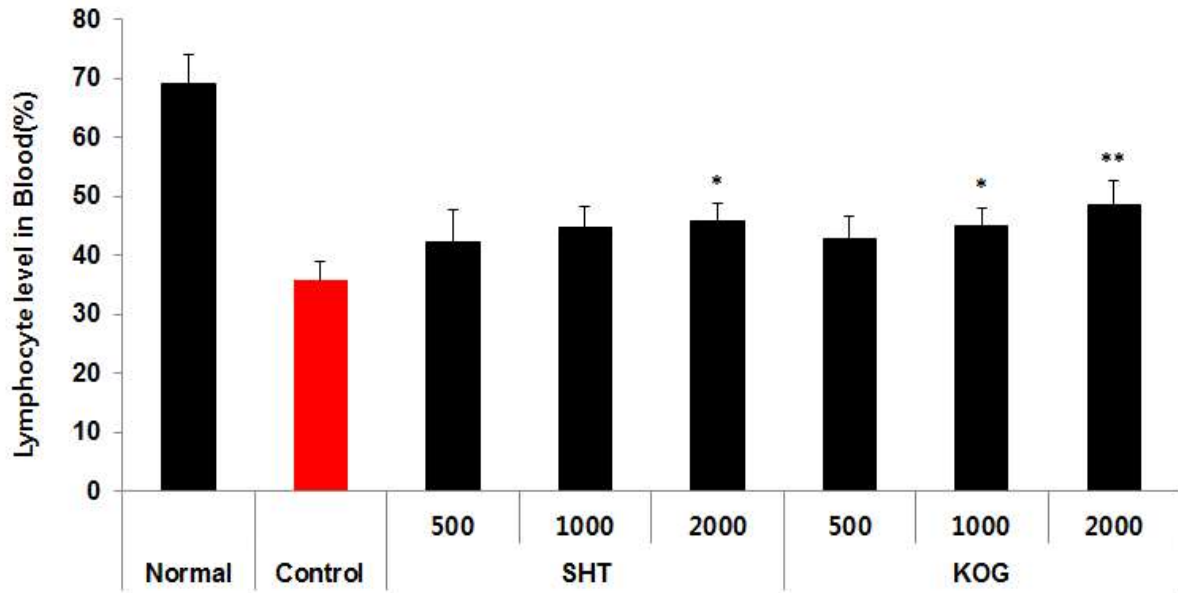


Fig. 139. Effect of SHT and KOG on lymphocyte level in blood of cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Normal, Non-treated ICR mice; Control, DW was administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution (100 mg/kg) 100 μ l was injected intraperitoneal injection; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution 100 μ l was injected intraperitoneal injection.

나. 혈청 내 면역글로불린 생성량 측정

(1) IgA

혈청 내 IgA 생성량을 측정한 결과, 정상군은 1006.93 ± 96.95 pg/ml, 대조군은 701.69 ± 86.67 pg/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 745.53 ± 74.92 pg/ml, 805.62 ± 86.08 pg/ml, 867.99 ± 59.20 pg/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 809.11 ± 55.38 pg/ml, 831.95 ± 55.82 pg/ml, 870.95 ± 60.23 pg/ml로 나타나 SHT 1000, 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

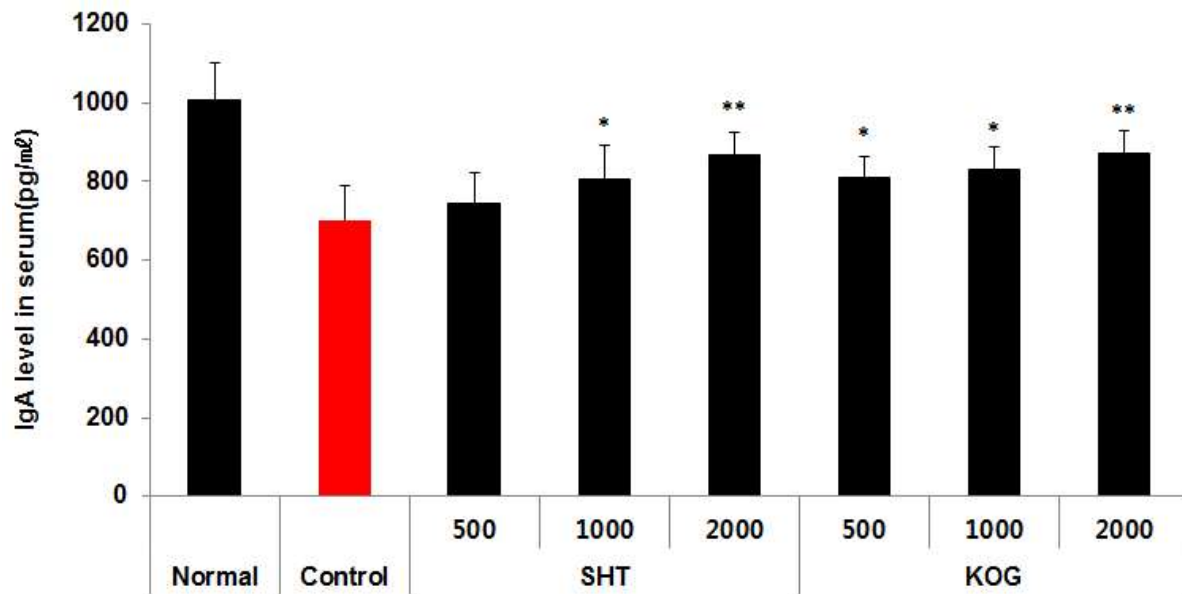


Fig. 140. Effect of SHT and KOG on IgA level in serum of cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Normal, Non-treated ICR mice; Control, DW was administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution (100 mg/kg) 100 μ l was injected intraperitoneal injection; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution 100 μ l was injected intraperitoneal injection.

(2) IgG

혈청 내 IgG 생성량을 측정한 결과, 정상군은 1224.74 ± 155.42 pg/ml, 대조군은 624.96 ± 109.71 pg/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 724.63 ± 100.57 pg/ml, 759.44 ± 118.85 pg/ml, 795.47 ± 164.56 pg/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 727.91 ± 173.71 pg/ml, 766.80 ± 100.57 pg/ml, 812.42 ± 127.99 pg/ml로 나타나 SHT 2000, KOG 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (* $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

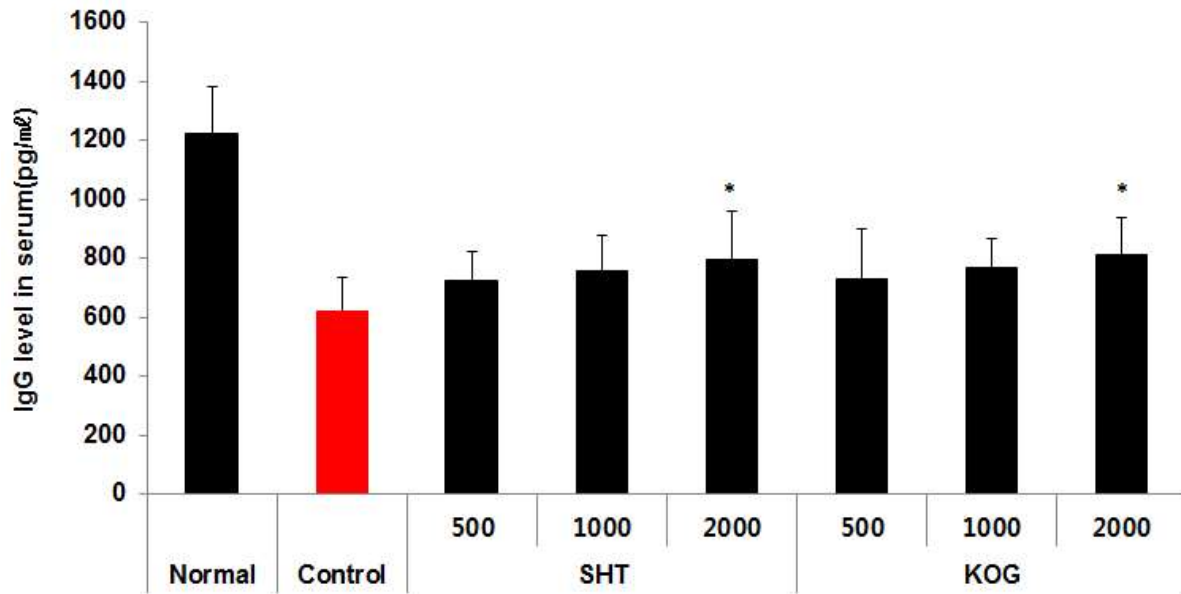


Fig. 141. Effect of SHT and KOG on IgG level in serum of cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Normal, Non-treated ICR mice; Control, DW was administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution (100 mg/kg) 100 μ l was injected intraperitoneal injection; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution 100 μ l was injected intraperitoneal injection.

(3) IgM

혈청 내 IgM 생성량을 측정한 결과, 정상군은 676.39 ± 34.71 pg/ml, 대조군은 509.65 ± 43.77 pg/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 554.75 ± 41.44 pg/ml, 568.58 ± 28.49 pg/ml, 583.53 ± 33.67 pg/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 555.55 ± 38.85 pg/ml, 561.27 ± 41.18 pg/ml, 605.79 ± 44.03 pg/ml로 나타나 KOG 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (* $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

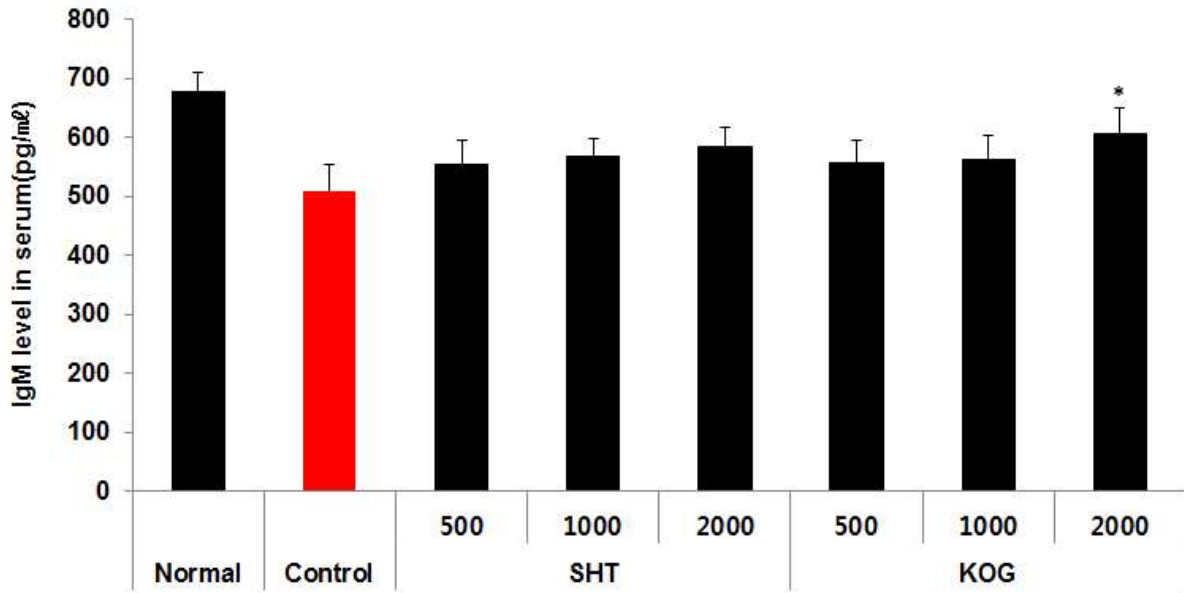


Fig. 142. Effect of SHT and KOG on IgM level in serum of cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Normal, Non-treated ICR mice; Control, DW was administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution (100 mg/kg) 100 μ l was injected intraperitoneal injection; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution 100 μ l was injected intraperitoneal injection.

다. 혈청 내 사이토카인 생성량 측정

(1) IL-2

혈청 내 IL-2 생성량을 측정한 결과, 정상군은 45.40 ± 3.65 pg/ml, 대조군은 28.70 ± 4.03 pg/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 30.15 ± 1.90 pg/ml, 34.26 ± 2.20 pg/ml, 36.54 ± 3.50 pg/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 30.90 ± 2.96 pg/ml, 35.88 ± 3.34 pg/ml, 39.25 ± 1.10 pg/ml로 나타나 SHT 1000, 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

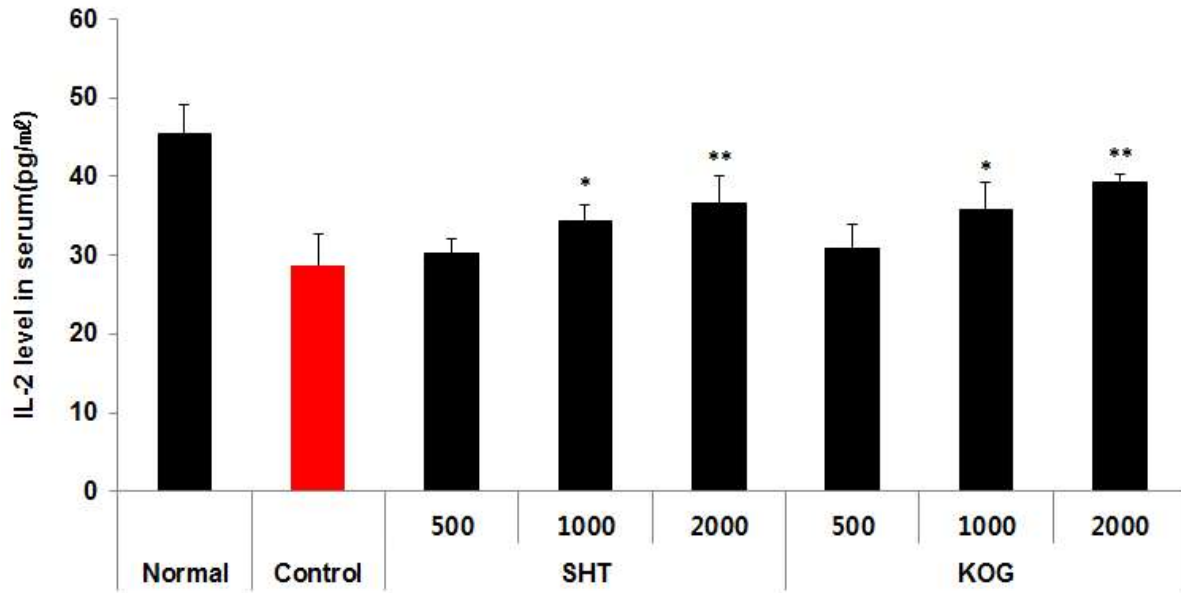


Fig. 143. Effect of SHT and KOG on IL-2 level in serum of cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Normal, Non-treated ICR mice; Control, DW was administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution (100 mg/kg) 100 μ l was injected intraperitoneal injection; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution 100 μ l was injected intraperitoneal injection.

(2) IL-4

혈청 내 IL-4 생성량을 측정한 결과, 정상군은 63.39 ± 7.47 pg/ml, 대조군은 43.32 ± 5.10 pg/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 45.51 ± 5.36 pg/ml, 49.60 ± 5.84 pg/ml, 51.79 ± 6.10 pg/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 43.75 ± 4.80 pg/ml, 44.97 ± 5.30 pg/ml, 49.16 ± 5.79 pg/ml로 나타나 SHT 1000, 2000, KOG 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

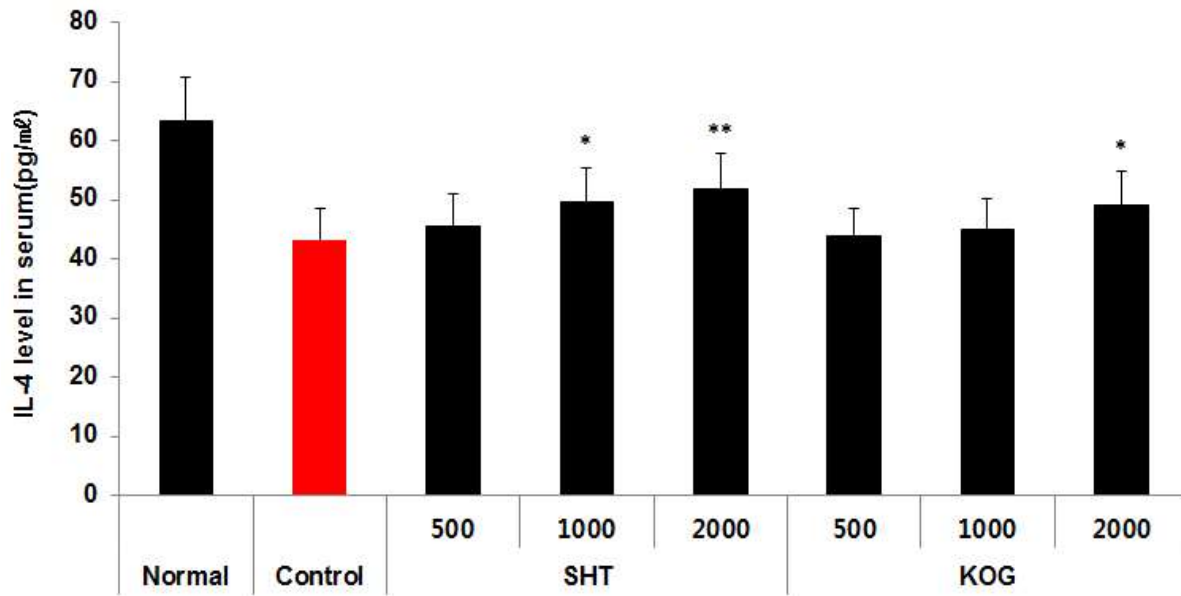


Fig. 144. Effect of SHT and KOG on IL-4 level in serum of cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Normal, Non-treated ICR mice; Control, DW was administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution (100 mg/kg) 100 μ l was injected intraperitoneal injection; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution 100 μ l was injected intraperitoneal injection.

(3) IL-5

혈청 내 IL-5 생성량을 측정한 결과, 정상군은 57.96 ± 2.94 pg/ml, 대조군은 37.28 ± 3.25 pg/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 40.40 ± 1.53 pg/ml, 44.50 ± 1.78 pg/ml, 47.21 ± 2.82 pg/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 43.28 ± 2.39 pg/ml, 45.33 ± 2.70 pg/ml, 48.59 ± 3.10 pg/ml로 나타나 SHT 1000, 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

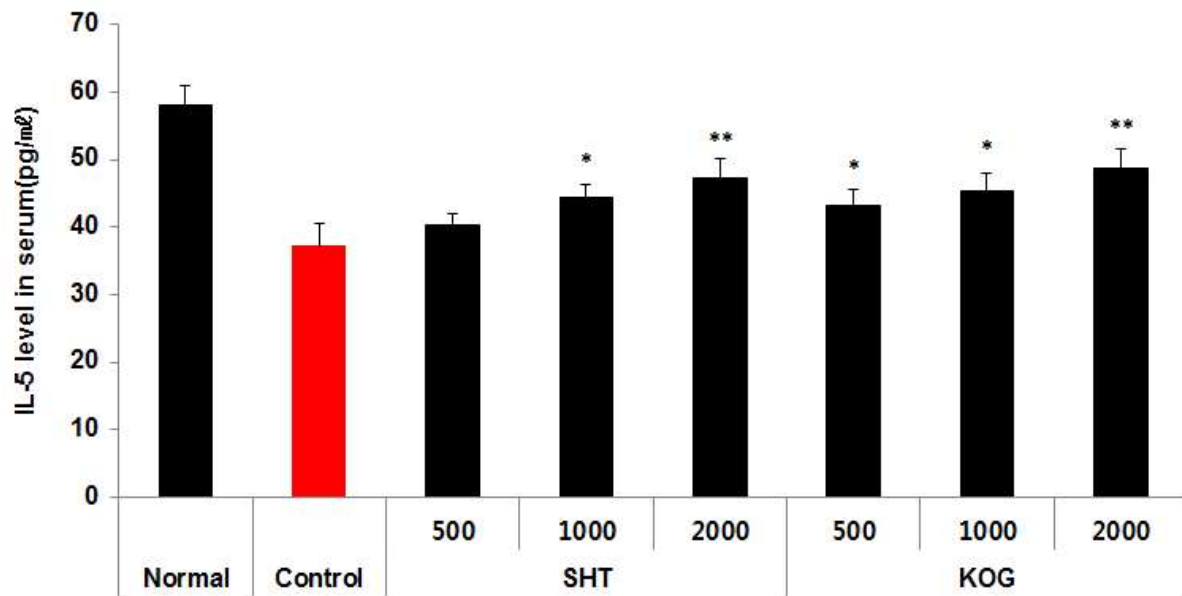


Fig. 145. Effect of SHT and KOG on IL-5 level in serum of cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Normal, Non-treated ICR mice; Control, DW was administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution (100 mg/kg) 100 μ l was injected intraperitoneal injection; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution 100 μ l was injected intraperitoneal injection.

(4) IL-6

혈청 내 IL-6 생성량을 측정한 결과, 정상군은 113.56 ± 7.94 pg/ml, 대조군은 67.63 ± 7.22 pg/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 69.20 ± 3.19 pg/ml, 76.37 ± 3.70 pg/ml, 83.47 ± 4.95 pg/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 77.28 ± 6.64 pg/ml, 84.21 ± 5.29 pg/ml, 87.94 ± 1.82 pg/ml로 나타나 SHT 1000, 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

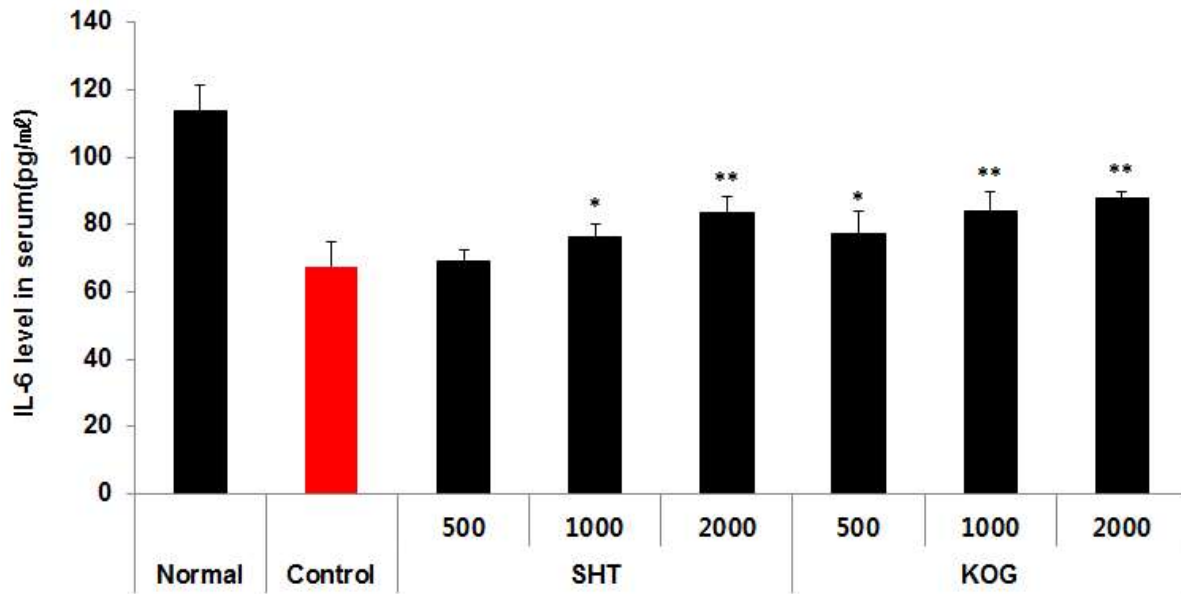


Fig. 146. Effect of SHT and KOG on IL-6 level in serum of cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Normal, Non-treated ICR mice; Control, DW was administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution (100 mg/kg) 100 μ l was injected intraperitoneal injection; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution 100 μ l was injected intraperitoneal injection.

(5) IL-10

혈청 내 IL-10 생성량을 측정한 결과, 정상군은 248.31 ± 19.81 pg/ml, 대조군은 187.04 ± 21.88 pg/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 191.42 ± 10.32 pg/ml, 226.64 ± 11.97 pg/ml, 242.97 ± 18.99 pg/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 202.01 ± 16.10 pg/ml, 222.51 ± 18.16 pg/ml, 236.04 ± 20.85 pg/ml로 나타나 SHT 1000, 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

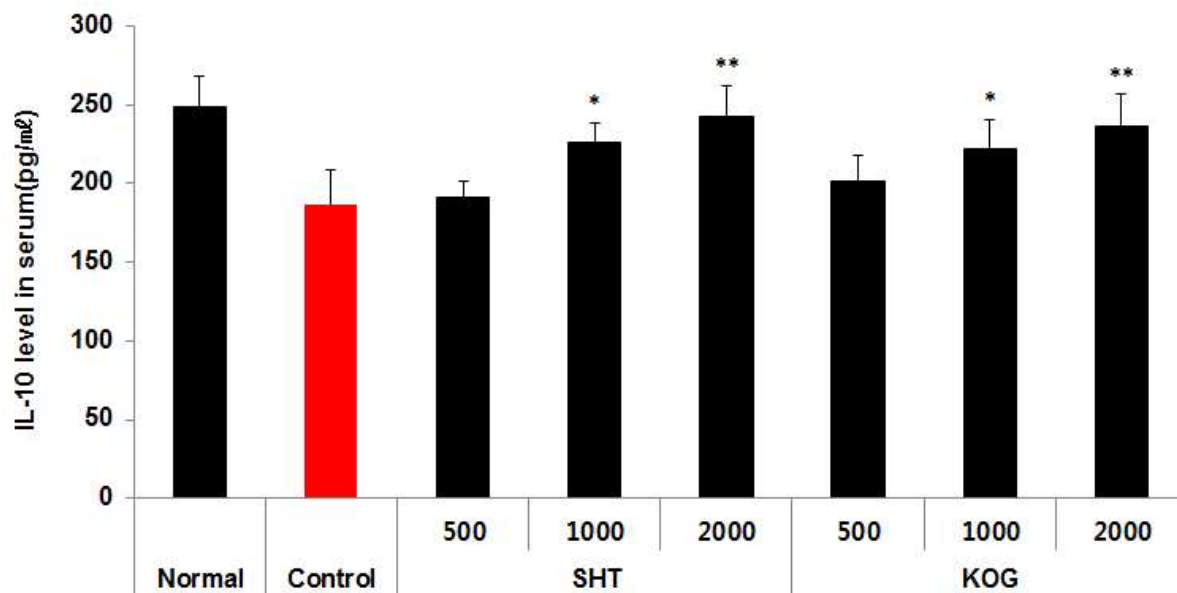


Fig. 147. Effect of SHT and KOG on IL-10 level in serum of cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Normal, Non-treated ICR mice; Control, DW was administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution (100 mg/kg) 100 μ l was injected intraperitoneal injection; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution 100 μ l was injected intraperitoneal injection.

(6) TNF- α

혈청 내 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 정상군은 112.11 ± 39.68 pg/ml, 대조군은 79.41 ± 15.96 pg/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 79.41 ± 15.96 pg/ml, 82.11 ± 18.52 pg/ml, 89.76 ± 24.74 pg/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 83.10 ± 33.20 pg/ml, 90.55 ± 26.44 pg/ml, 94.56 ± 9.09 pg/ml로 나타나 SHT 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

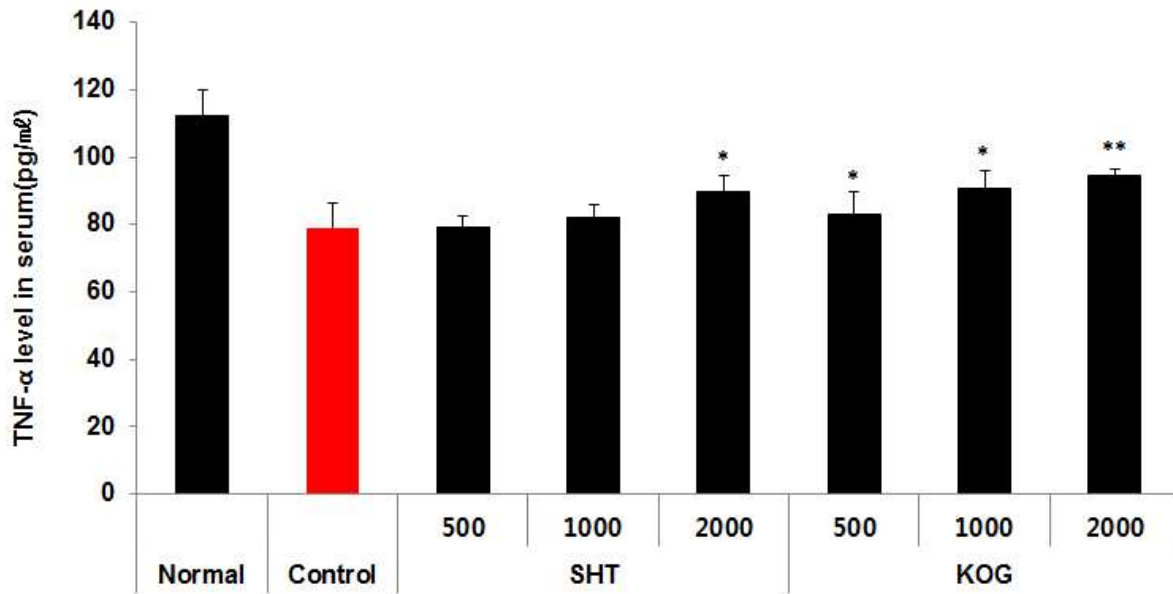


Fig. 148. Effect of SHT and KOG on TNF- α level in serum of cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Normal, Non-treated ICR mice; Control, DW was administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution (100 mg/kg) 100 μ l was injected intraperitoneal injection; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution 100 μ l was injected intraperitoneal injection.

(7) IFN- γ

혈청 내 IFN- γ 생성량을 측정한 결과, 정상군은 733.71 ± 49.04 pg/ml, 대조군은 380.34 ± 54.15 pg/ml로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 442.31 ± 25.54 pg/ml, 557.33 ± 29.63 pg/ml, 593.67 ± 47.00 pg/ml로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 493.89 ± 39.85 pg/ml, 578.44 ± 44.95 pg/ml, 612.26 ± 51.60 pg/ml로 나타나, 모든 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

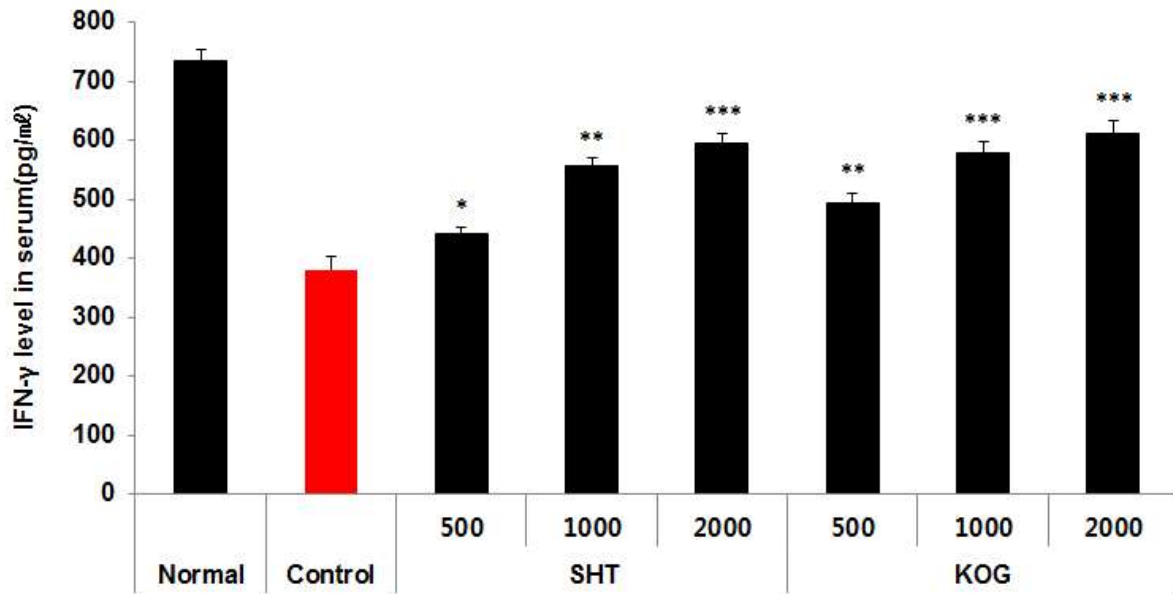


Fig. 149. Effect of SHT and KOG on IFN- γ level in serum of cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, *** p <0.01, ** p <0.001, * p <0.05 compared to control)(n = 6).

Normal, Non-treated ICR mice; Control, DW was administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution (100 mg/kg) 100 μ l was injected intraperitoneal injection; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 3 weeks after the cyclophosphamide solution 100 μ l was injected intraperitoneal injection.

라. 항산화 효능 측정

(1) GR (glutathione reductase)

GR 유전자 발현량을 측정한 결과, 대조군은 1.00 ± 0.06 로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1.05 ± 0.05 , 1.05 ± 0.05 , 1.13 ± 0.06 으로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1.08 ± 0.07 , 1.10 ± 0.04 , 1.15 ± 0.05 로 나타나 SHT와 KOG 실험군은 대조군에 비해 증가가 나타났으나 유의성은 나타나지 않았다.

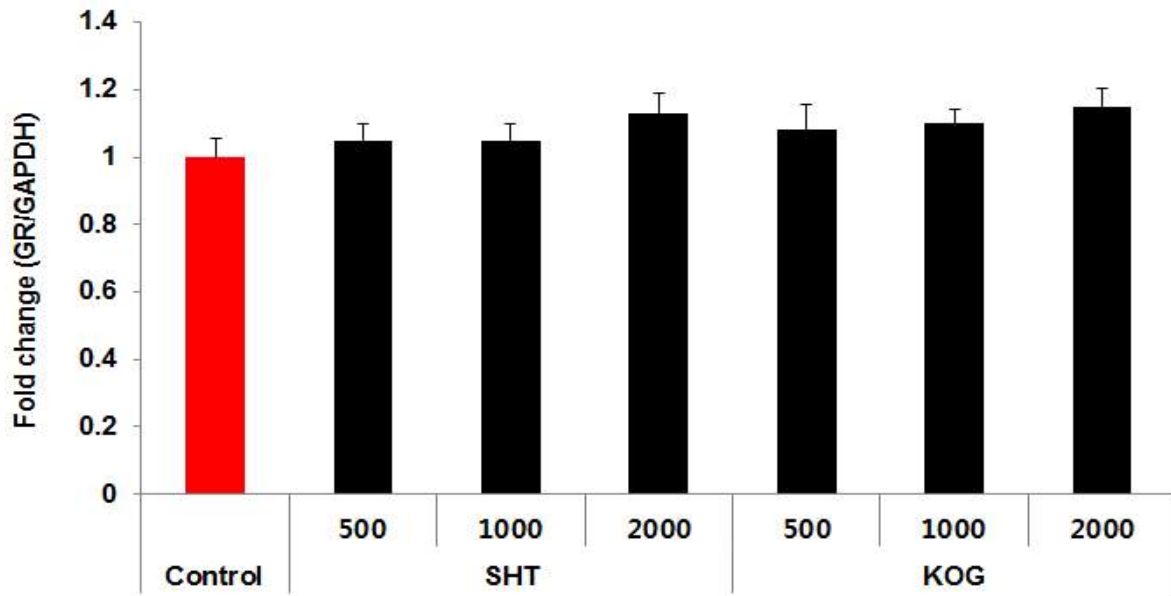


Fig. 150. Effect of SHT and KOG on GR mRNA expression in liver of rat. The results were expressed as mean \pm S.D. (n = 6).

Control, DW was administered orally for 2 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks.

(2) GPx (glutathione peroxidase)

GPx 유전자 발현량을 측정 한 결과, 대조군은 1.00 ± 0.05 로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1.03 ± 0.05 , 1.05 ± 0.08 , 1.12 ± 0.07 로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1.01 ± 0.09 , 1.06 ± 0.06 , 1.21 ± 0.06 으로 나타나 KOG 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.05$) 증가가 나타났다.

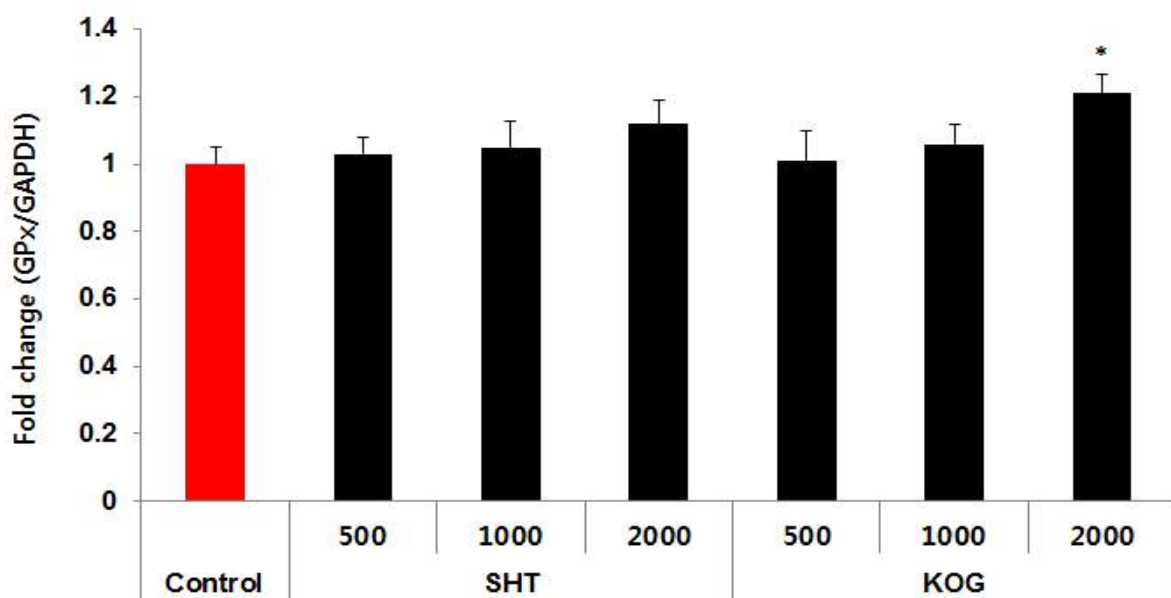


Fig. 151. Effect of SHT and KOG on GPx mRNA expression in liver of rat. The

results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Control, DW was administered orally for 2 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks.

(3) GST (glutathione S-transferase)

GST 유전자 발현량을 측정한 결과, 대조군은 1.00 ± 0.14 로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1.03 ± 0.09 , 1.12 ± 0.19 , 1.15 ± 0.07 로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1.06 ± 0.14 , 1.10 ± 0.14 , 1.23 ± 0.10 로 나타나 KOG 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (* $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

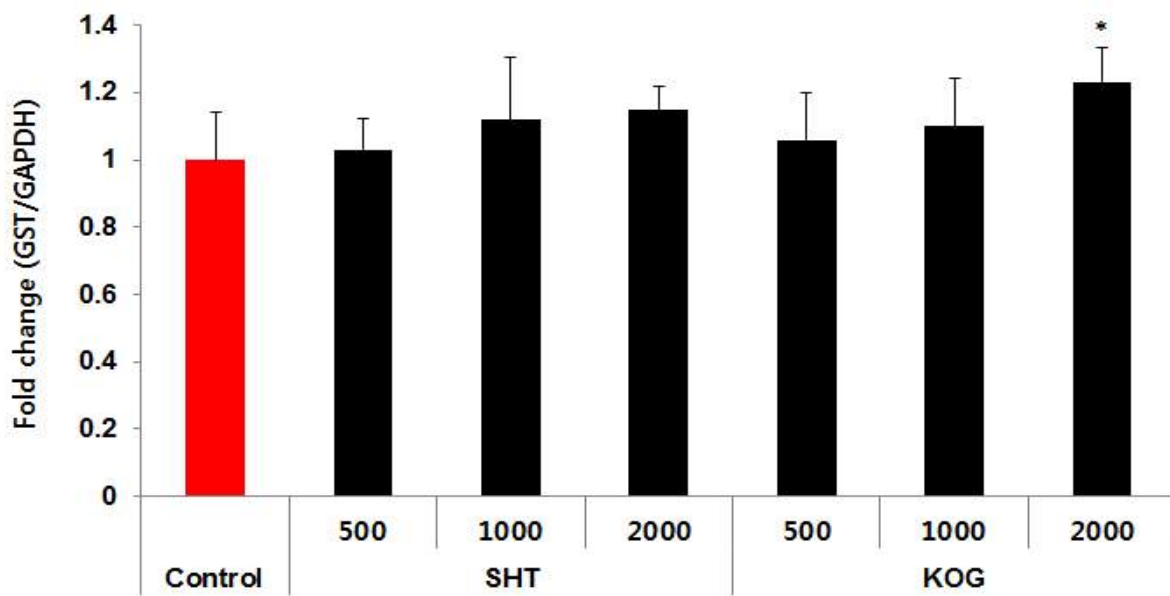


Fig. 152. Effect of SHT and KOG on GST mRNA expression in liver of rat. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Control, DW was administered orally for 2 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks.

(4) SOD (Superoxide dismutase)

SOD 유전자 발현량을 측정한 결과, 대조군은 1.00 ± 0.09 로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1.03 ± 0.10 , 1.05 ± 0.13 , 1.12 ± 0.13 로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1.04 ± 0.13 , 1.05 ± 0.11 , 1.13 ± 0.12 로 나타나 SHT와 KOG 실험군은 대조군에 비해 증가가 나타났으나 유의성은 나타나지 않았다.

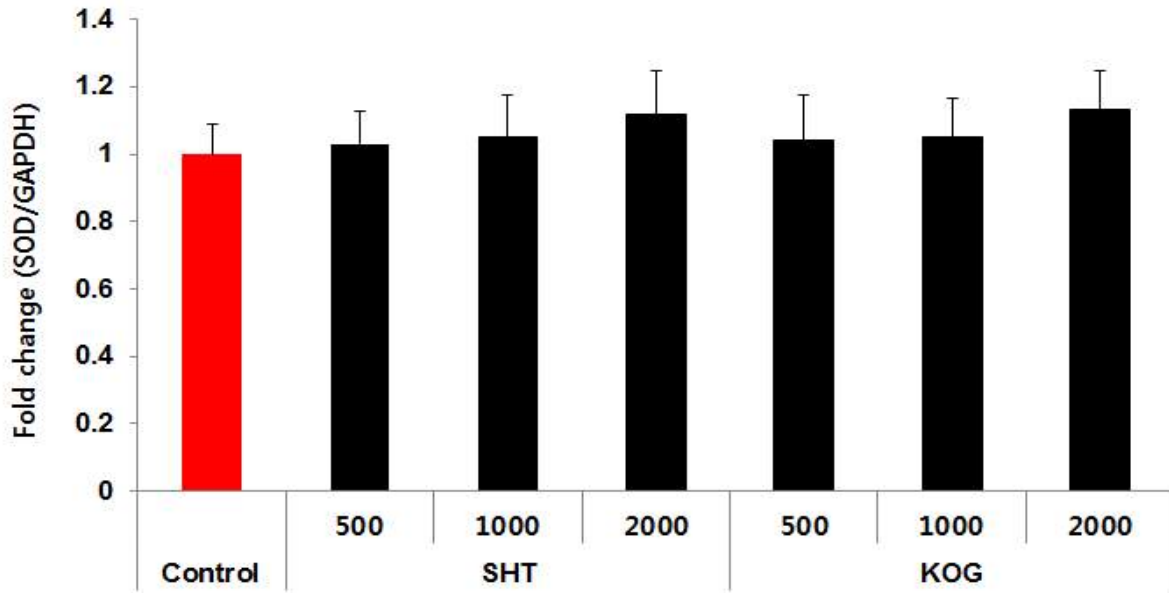


Fig. 153. Effect of SHT and KOG on SOD mRNA expression in liver of rat. The results were expressed as mean \pm S.D. (n = 6).

Control, DW was administered orally for 2 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks.

(5) Catalase

Catalase 유전자 발현량을 측정한 결과, 대조군은 1.00 ± 0.10 로 나타났고 SHT 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1.05 ± 0.06 , 1.11 ± 0.07 , 1.23 ± 0.06 로 나타났으며, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 각각 1.06 ± 0.07 , 1.16 ± 0.07 , 1.29 ± 0.05 로 나타나 SHT 2000, KOG 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 (* $p < 0.05$) 증가가 나타났다.

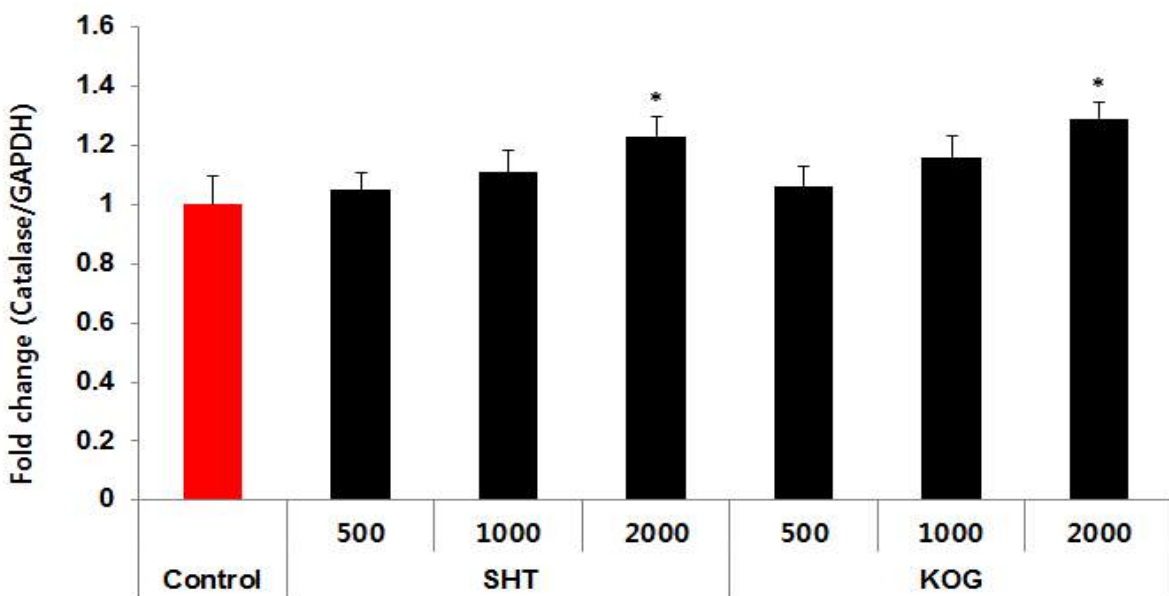


Fig. 154. Effect of SHT and KOG on catalase mRNA expression in liver of rat. The

results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, * $p < 0.05$ compared to control)($n = 6$).

Control, DW was administered orally for 2 weeks; 500 or 1000 or 2000, Each concentrations of SHT and KOG were administered orally for 2 weeks.

5. 결론

개발된 건강기능성 식품에 대한 안전성 평가 및 노화질환(퇴행성관절염), 면역증진, 항산화 효능 등에 대한 효능을 객관적으로 검증하기 위하여 최대 투여 용량인 2000 mg/kg을 기준으로 500, 1000 (mg/kg)까지 범위를 설정하여 혈액, 조직, 임상적 증상, 방사선 검사 등을 시행한 결과는 다음과 같다. 개발된 2가지 건강기능성 식품 소재는 단회 및 반복 독성 평가를 통해 폐사가 진행되지 않음을 확인하였으며, 혈액 및 장기에 대한 변화가 거의 진행되지 않아 안전성이 확보되었다.

개발된 2가지 건강기능성 식품 소재는 퇴행성관절염에 대한 평가 중 염증과 관련된 혈액 바이오마커 측정을 통해 LTB_4 , $TNF-\alpha$ 생성은 SHT 1000, 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군, $IL-1\beta$ 생성은 SHT 1000, 2000, KOG 2000 mg/kg 실험군, $IL-6$ 생성은 모든 실험군에서 대조군에 비해 유의적인 감소 효능이 확인되었으며, 이를 통해 SHT와 KOG는 항염증 효과를 통해 관절염에 대한 효능이 확인되었다. 골밀도 감소와 골 및 연골 등의 파괴에 관여하는 혈중 바이오마커 측정에서 $CTXII$ 생성은 SHT 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군, COMP 생성은 SHT 500, 1000, 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군, MMP-2 생성은 SHT 1000, 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군, MMP-9 생성은 SHT 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군에서 대조군에 비해 유의적인 감소 효능이 확인되었으며, 이를 통해 SHT와 KOG는 골관절염을 악화시키고 골 파괴에 관련된 인자에 대한 효능이 확인되었다. 골 파괴를 방어하고 연골 생성에 관여하는 혈중 바이오마커 측정에서 TIMP-1 생성은 SHT 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군, GAGs, calcitonin 생성은 SHT 1000, 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군, aggrecan 생성은 KOG 2000 mg/kg 실험군에서 대조군에 비해 유의적인 증가 효능이 확인되었으며, 이를 통해 SHT와 KOG는 골관절염을 방어 및 개선하는 인자에 대한 효능이 확인되었다. Micro CT 촬영 결과, SHT와 KOG 실험군은 대조군에 비해 대퇴골 끝부분의 파괴는 큰 차이가 나타나지 않았으나, 관절 사이의 연골 부피는 보존이 더 잘 되어있는 것이 확인되었다. 또한, H&E 및 Safranin-O 염색을 통한 조직학적 검사 결과, SHT와 KOG 실험군은 농도 의존적으로 대조군에 비해 연골의 보존과 연골 주변으로 프로테오글리칸 분포가 높은 것을 확인되었다. 이를 통해 SHT와 KOG의 관절 조직 및 구조 변화 예방 효능이 확인되었다. 체중 부하 측정 결과, SHT와 KOG 실험군은 대조군에 비해 체중 부하가 높게 나타나, 골관절염 임상증상 개선 효능이 확인되었다.

위와 같은 퇴행성관절염에 대한 결과를 종합해 볼 때, MIA로 유도한 골관절염을 모델에서 SHT와 KOG는 항염증 작용과 더불어 관절의 구성과 방어, 관절 파괴에 관련된 다양한 인자에 대한 농도 의존적인 효능이 혈액 바이오마커 검증을 통해 유의적인 결과가 도출되었으며, 이와 같은 결과는 micro-CT, 조직병리학적 검사, 체중 부하 측정 결과를 통해 더욱 증명되었다. 이에 따라, 추후 임상실험 결과가 뒷받침된다면 골관절염 예방 및 개선을 통한 사회적, 경제적 손실을 줄여줄 수 있는 관절건강기능식품으로써의 가능성이 확보되었다.

개발된 2가지 건강기능성 식품 소재는 면역증진에 대한 평가 중 면역세포 수를 측정된 결과, SHT 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군은 백혈구, 호산구, 호중구, 단핵구, 림프구 수를 유의성 있게 증가시켜 면역세포 증진에 대한 효능이 확인되었다. 면역글로불린 생성량 측정 결과, SHT 1000, 2000, KOG 500, 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 IgA 생성을 유의성 있게 증가시켰고 SHT 2000, KOG 2000 mg/kg 실험군은 IgG 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, KOG 2000 mg/kg 실험군은 IgM 생성을 유의성 있게 증가시켜 면역글로불린에 대한 효능이 확인되었다. 사이토카인 생성량을 측정된 결과, SHT 1000, 2000, KOG 1000, 2000 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ 생성을 유의성 있게 증가시켰고 KOG 500 mg/kg 실험군은 IL-5, IL-6, TNF- α , IFN- γ 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, SHT 500 mg/kg 실험군은 IFN- γ 생성을 유의성 있게 증가시켜 면역과 관련된 사이토카인에 대한 효능이 확인되었다.

위와 같은 면역증진에 대한 결과를 종합해 볼 때, SHT와 KOG는 조혈기계 억제 및 T 림프구 수를 현저히 감소시키는 것으로 알려진 면역억제제(Cyclophosphamide)로 면역력을 저하시킨 ICR mouse에서 백혈구 수의 증가가 나타났으며, T helper 1(Th1) 사이토카인 IL-2와 IFN- γ , T helper 2(Th2) 사이토카인 IL-4, IL-5, 면역체계 조절 사이토카인 IL-10의 증가를 통해 SHT와 KOG가 세포면역과 체액면역을 개선시킬 수 있음을 확인하였다. 또한, 체내의 다양한 면역반응을 조절하는 사이토카인인 IL-6와 TNF- α 의 증가를 통해 면역개선에 대한 효능이 확인되어 면역력을 높일 수 있는 건강기능성 식품으로의 가능성이 확보되었다.

개발된 2가지 건강기능성 식품 소재는 항산화 효능에 대한 평가 중 항산화 효소의 유전자 발현량을 측정된 결과, GR 및 SOD 유전자 발현량을 측정된 결과, SHT와 KOG 실험군은 대조군에 비해 증가가 나타났으나 유의성이 확인되지는 않았으며, GPx, GST 유전자 발현량은 KOG 2000 mg/kg 실험군에서 Catalase 유전자 발현량은 SHT 2000, KOG 2000 mg/kg 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가가 확인되었다.

위와 같은 항산화 효능에 대한 결과를 종합해 볼 때, 체내에서 산화환원반응에 중요한 역할을 하는 글루타티온의 반응을 촉매하는 효소인 GR, GPx, GST 유전자 발현량의 증가는 체내에서 글루타티온과 과산화수소 또는 지질과산화물의 반응을 촉진하여 과산화물 제거에 도움 줄 수 있음이 확인되었다. 또한, 초과산화이온을 산소와 과산화수소로 바꿔 주는 불균등화 반응을 촉매하는 효소인 SOD와 과산화수소를 분해하는 catalase 유전자 발현량을 증가시켜 세포 내 항산화반응을 증가시키는 것이 확인되어 항산화제 역할이 가능한 건강기능성 식품으로의 가능성이 확보되었다.

3 절. 한국 특용 가금자원 소재를 활용한 가공식품 개발

1. 연구개발 배경

연산오계는 우리 국민의 음식 문화에 맞는 육질과 맛을 갖고 있으며, 예로부터 다양한 약재들과 함께 왕가의 질병을 다스리는데 이용되어 왔는데, 지금까지 남아있는 고전의서들에 포함된 진료기록 및 처방내역을 살펴보면 동의보감의 탕약편 금수부에 ‘간장과 신장에 피가 부족한데 좋고, 어혈을 제거하며 또한 피를 새롭게 하고 체력을 활성화한다’고 기록되어 있으며, 신수본초에서는 오계가 부인병 치료에 효과적이라고 기록되어 있다. 오계는 예로부터 그 기능성을 인정받아 사용되어져 왔음에도 불구하고, 실제 오계를 활용한 제품개발은 거의 이루어지지 못하고 있는 실정이다.

약선레시피는 약선藥膳은 약이 되는 음식이라는 뜻을 말하며, 조선시대에 편찬된 우리나라 최고最古의 식이요법서인 식료찬요食療纂要에서도 볼 수 있듯이 우리 조상들은 음식으로 몸을 다스려왔고, 최근 우리도 건강한 삶을 추구하게 되면서 몸에 좋은 음식에 대한 관심이 높아지고, 이에 따라 약선이 새롭게 주목받고 있는 추세이다. 그동안 우리 사회의 급격한 성장과 더불어 남녀노소 할 것 없이 식생활에도 많은 변화를 가져왔으며, 이러한 식생활의 결과가 대사증후군을 비롯한 생활 습관병의 주요 원인으로 작용한다는 점은 잘 알려져 있습니다. 이런 가운데 대사증후군 및 생활 습관병 예방을 위하여 약이 되는 식재료인 오계를 활용한 약선 조리법 개발과 보급은 더욱더 의미가 있는 연구인 것으로 보인다.

한방음료는 생활수준의 향상으로 기호성이 변하여 천연물, 한약재를 주원료로 하는 제품의 판매량이 점차 증가되고 있다. 건강에 대한 관심 증가로 원료의 약리학적 성분을 살려 기능성을 가지는 건강 음료, 건강기능성 식품이 개발되고 있으며 천연물을 주원료로 이용하는 추세이다. 매실이나 모과 등을 이용한 약재식품도 판매되고 있으며, 감식초와 솔잎 추출물, 쑥 등의 전통적 소재를 이용한 음료들도 계속 개발 중이며 소비자들로부터 높은 가격에도 불구하고 선호되고 있다. 이와 같이 음료시장의 트렌드가 변화하면서 약리성분을 살린 기능성 건강음료, 기능성 제품이 개발되고 있으며 그 소재도 채소나 약초 등으로 다양해지고 있다.

하지만 이러한 한방음료의 손쉬운 접근성과 뛰어난 효능에도 불구하고 커피, 홍차 등의 범람으로 전통적인 음료는 약세를 면치 못하고 있고, 기존의 연구는 단일재료를 이용한 음료의 형태가 많았으며 혼합음료의 경우 생리통 완화에 대한 한방음료의 임상체험 평가 정도만이 보고되고 있으며, 약선 효과를 가지는 음료의 혈중 지질농도에 미치는 영향, 비만에 미치는 영향과 관련된 연구들이 진행이 되어 있어 한방 혼합음료의 다양한 효과에 대한 연구는 부족한 실정이다.

생리활성 펩타이드는 보통 3-20개의 아미노산으로 구성되어 있고 그 중 생리적 활성을 가지는 펩타이드를 칭하며, 생리활성 펩타이드는 신체 기능이나 상태에 긍정적으로 작용하여 건강에 좋은 영향을 미칠 수 있고, 아미노산의 조성이나 서열에 따라 펩타이드의 활성이 다양하다. 효능을 인정을 받은 생리활성 펩타이드들의 제품화 및 이를 위한 연구가 활발히 이루어지고 있지만, 연산오계와 생리활성 펩타이드에 관한 선행연구에서 연산오계가 가지는 약제로써의 효

능에 비하여 식·의약품으로써의 기능성 소재화에 대한 제품 개발은 미비한 상태이고, 특히 연산오계 펩타이드의 경우 그 효능에 관한 연구가 거의 이루어지지 않았다. 그리고 한방음료 역시 뛰어난 효능을 가지고 있음에도 불구하고 이를 이용한 다방면의 연구가 부족한 실정이다. 조미료 시장은 웰빙 트렌드에 따른 ‘건강조미료 확대’와 1~2인 가구를 위해 ‘편의성을 강조한 소용량 제품 출시’로 요약해볼 수 있으며, 편의성을 강조한 액상형태의 조미료, 스틱형태의 조미료, 고체큐브형태의 조미료 등 다양한 형태로 등장하였다. 조미료 종류별 비중을 보면 2017년 2/4분기 매출액 기준으로, 일반조미료가 38.1%로 가장 많은 비중을 차지하고 있으며, 이어서 자연조미료(37.5%), 발효조미료(24.4%) 순으로 나타났으며 일반조미료가 아닌 건강조미료(자연, 발효조미료)가 전체 매출 비중의 61.8%로 건강조미료 시장의 절반 이상을 차지한다. 일반조미료는 보통 소고기와 같은 육류 이용한 가공혼합조미료가 대부분인데, 육류를 이용한 조미료도 건강한 자연조미료로 제조되어 이용되고 있다. 하지만 대부분이 소와 일반 양계를 활용한 제품이며 오계 및 오골계의 조미료 제품에 대한 연구는 미비한 실정이다.

전통 오계를 활용한 제품 개발은 농축산업과 식품산업의 동반 성장을 도모할 수 있을 뿐만 아니라, 아직 초기 단계에 머물러 있는 전통 신소재 개발을 통한 식품산업의 국제 경쟁력을 제고할 수 있을 것으로 생각된다.

또한, 서양을 비롯한 일본, 중국에서는 오골계의 생리활성 효능에 근거한 여러 가지 제품 개발이 시도되고 있다. 특히 미국과 유럽에서는 오골계(주로 중국산)의 생리활성에 대한 효능 검증 등을 통해 천연물 신약개발에 대한 연구를 활발히 진행하고 있으며, 오골계가 새로운 항산화물질이 다량 함유된 “슈퍼푸드(Superfood)”로 각광받고 있음. 또한 중국과 일본에서도 이미 오계의 기능성 소재를 활용하여 다양한 음식과 건강기능식품 등의 제품개발을 통한 오골계의 상품화를 시도하고 있다. 위의 내용들의 배경을 토대로 1)연산오계란과, 연산오계육, 부산물을 이용하여 오계육수의 영양학적 유용성을 평가하고, 2) 영양학적 효용에 기반한 약선레시피 개발과 환자(노인)영양식 및 유아식의 레시피 개발 3) 오계 흑색소와, 펩타이드를 활용한 오계 펩타이드 음료개발 4) 오계를 활용한 다양한 기능성 식품을 연구를 수행하고 기능성 식품소재로 활용될 수 있는 실험적인 근거자료 및 이를 통한 제품화 개발을 위한 기초자료로의 활용 가능성을 제시하고자 한다.

2. 연구개발 방법

가. 연산오계의 영양성분 분석

(1) 실험재료 및 시료 제조

연산오계의 영양성분 분석은 계육, 육수, 계란을 대상으로 시행하였다. 이를 위해, (주)지산농원으로부터 얻은 오골계(순종) 수컷 1년산 5구(평균 1018g)와 3년산 4구(평균 1144g), 오계란 7개를 사용하였으며, 일반계 및 일반계란과의 비교를 위해 (주)하림에서 생산하는 국내산 일반닭 5구(평균 961g)과 한국양계농협산 유정란 7개를 대전시에 위치한 중형마트에서 구입하여 사용

하였다. 계육의 영양성분 분석은 가슴살과 다리살을 이용하였고, 연산오계의 연차별 영양성분의 차이를 알아보기 위해 1년산과 3년산 계육을 각각 분석하였다. 육수의 영양성분 분석을 위해서는 닭 전체를 사용한 전육육수와 부산물(피부, 뼈, 내장, 머리)을 이용한 부산물 육수(1년산만) 2가지를 제조하여 비교하였다. 육수의 제조방법은 (주)지산농원에서 시판되는 오골계탕의 육수 제조법과 같은 방법으로, 전육육수의 경우 피부와 지방을 포함한 닭 1마리에 물 5L를, 부산물 육수의 경우 닭 1마리 분량의 피부, 뼈, 내장, 머리에 물 5L를 첨가하여 압력증기 솥에서 40분 이상 가열하여 얻어진 육수를 얻어 분석에 사용하였다. 계란의 영양성분 분석은 난황과 난백을 각각 분리하여 실시하였다.

(2) 영양소 함량 분석

(가) 일반성분 분석

일반성분 분석은 AOAC법에 따라 수분함량은 105℃ 건조법, 조지방은 Soxhlet법, 회분은 550℃ 회화법으로 분석하였고 조단백질은 원소분석기(Thermo Quest사, Flash 2000)를 이용하여 전질소량을 정량하고 질소계수 6.25를 곱하여 조단백질로 하였으며 탄수화물은 100에서 수분, 조단백질, 조지방, 회분의 값을 제한한 값으로 하였다.

(나) 비타민 및 무기질

비타민 A와 E의 분석을 위해 계육 4g, 육수 30g에 ascorbic acid 0.1 g과 ethanol 15 mL를 첨가하여 균질화한 후 80℃에서 20분간 추출한 다음 50% KOH용액을 0.25ml 첨가하고, 증류수 3 mL와 hexane 5 mL를 가하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리시킨 다음 잔사에 hexane 5 mL를 가하여 균질화하여 80℃에서 20분간 추출시켜 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상등액을 합하여 무수황산나트륨을 가해 탈수시킨 후 50℃에서 감압 농축하고 methanol로 용해시킨 후 membrane filter(0.45 μ m)로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 비타민 B2와 B6는 정육 4 g, 육수 30 g에 시료에 따라 증류수 2 mL를 넣어 균질화한 후 acetonitrile 8 mL를 가하여 20분동안 추출한 다음 4,000 rpm에서 20분간 원심분리시킨 후 잔사에 동일 용액을 가하여 재추출하였고, 상등액을 합하여 rotary vacuum evaporator에서 감압·농축하고 초순수로 용해시킨 후 membrane filter(0.45 μ m)로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 비타민 C는 시료 4 g을 균질화하여 10% metaphosphoric acid(HPO₃) 용액을 가하여 추출한 다음 4,000rpm에서 20분간 원심분리한 후에 상등액을 membrane filter(0.45 μ m)로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 무기질의 경우 Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrophotometer를 이용하여 시료의 Calcium, Magnesium, Iron, Zinc, Selenium의 함량을 분석하였다

(다) 아미노산 조성 분석

아미노산 분석을 위해 시료 0.1 g을 18 ml test tube에 측량하여 6 N HCl 5 ml를 가하여 감압 밀봉(질소가스 충전)한 후 110℃로 setting된 heating block에 24시간 이상 동안 가수분해시켰다. 가수분해가 끝난 시료는 50℃에서 rotary evaporater로 산을 제거한 후 Sodium dilution buffer로 10 ml 정용한 다음, 이중 1 ml를 취하여 membrane filter 0.2 μ m로 여과시켜 아미노산 자동분석기(S433-H)로 정량분석하였다.

(라) 지방산 조성 분석

지방산 분석을 위해 계육 4 g, 육수 30 g에 chloroform-methanol로 추출·여과하여 감압농축한 지방질 약 100 mg을 가지형 플라스크에 취하고 1N-KOH·ethanol 용액 4 mL를 섞어 유지방율이 없어질 때까지 교반시킨 다음 14% BF₃-Methanol 5 mL를 가하였다. 냉각기를 부착하여 5분간 80℃에서 가열하여 methylester화 하였고, 이 용액에 NaCl 포화용액 3mL를 가하고, 다시 hexane 1 mL를 가하여 흔들어 섞은 후 시험관에 옮겨 정치하였고 상층을 분취하여 무수 Na₂SO₄를 넣어 수분을 제거하고 1 mL를 vial에 채취한 후 Gas Chromatography로 분석하였다.

(마) 통계처리

본 연구에서 분석한 모든 결과에 대한 통계처리는 SPSS 18.0 program을 이용하였으며, 분석 결과는 2회 반복 실험한 값을 평균±표준편차로 산출하였고, 관능검사를 통한 오계육수의 품질 특성 비교는 one-way ANOVA를 이용하였으며, Duncan's multiple range test를 실시하여 95% 유의수준에서 사후검정 하였다.

나. 연산오계 활용 육수의 관능검사

연산오계와 오계 부산물(머리, 염통, 모래집, 발) 및 일반계를 이용하여 첨가물을 달리한 총 9가지의 육수를 제조, 이에 대해 관능검사를 시행하였다.

(1) 관능검사 시료 준비

오계 전육육수의 경우 첨가물 없는 것과, 기본 첨가물-마늘,대파,대추,월계수-을 사용한 것, 기본첨가물에 각각 향기와 수삼을 더한 것으로 4가지의 육수를 제조하였다. 오계 부산물육수의 경우도 첨가물 없는 것과, 기본 첨가물-마늘,대파,대추,월계수-을 사용한 것, 기본 첨가물에 각각 향기와 수삼을 더한 것으로 4가지의 육수를 제조하였다. 일반계 전육육수의 경우 첨가물 없이 전육을 그대로 사용하여 육수를 제조하고 Table 1과 같이 샘플번호를 부여하였다.

Table 1. Various cooking conditions of Yeonsan Ogye broths

Materials		Additives	Sample code
Yeonsan Ogye	Whole meat	None	A1
		Garlic, Green onion, Dried dates, Bay leaf	A2
		Garlic, Green onion, Dried dates, Bay leaf, Milk vetch root	A3
		Garlic, Green onion, Dried dates, Bay leaf, Fresh Ginseng	A4
	By product	None	B1
		Garlic, Green onion, Dried dates, Bay leaf	B2
		Garlic, Green onion, Dried dates, Bay leaf, Milk vetch root	B3
		Garlic, Green onion, Dried dates, Bay leaf, Fresh Ginseng	B4
Common chicken	Whole meat	None	C1

관능검사 시료(육수) 제조 방법은, 오계 전육육수(A1-A4) 및 일반계 전육육수(C1)의 경우 닭의 복강 내부를 깨끗이 세척한 후, 날개 끝과 콩지의 지방층을 제거하고 껍질이 있는 상태로 준비하였다. 세척된 닭 1마리와 첨가물을 압력솥에 넣고, 물 4L를 첨가하여 센불로 끓여 추가 움직임이면 약불로 40분간 더 조리하여 육수를 얻었다. 오계 부산물육수(B1-B4)는 오계 5마리 분량의 머리, 염통, 모래집, 발을 철저히 세척한 후 첨가물과 함께 압력솥에 넣고, 물 4L 첨가하여 센불로 끓여 추가 움직임이면 약불로 40분간 조리하였다. 첨가물 사용량은 마늘(大)12알, 대파 1뿌리, 대추(中)3개, 월계수잎 1장, 황기 1쪽(약 20g), 수삼(小) 1뿌리(약 25g)였다.

(2) 관능검사 방법

관능검사는 대전대학교 식품영양학과 재학생 40명을 패널로 선정하고, 제품의 기호를 측정하는 방법 중 가장 유용하게 사용되는 9점 기호척도법으로 맛(단맛, 짠맛, 쓴맛, 감칠맛)과 향(구수한 향, 비린내), 종합적 기호도를 평가하였다(9점:극도로 좋다/강하다 ←→ 1점:극도로 싫다/약하다). 검사물(육수)는 평가 전날 제조하여 냉장 보관 후, 관능평가 시에 60℃로 온도를 균일하게 맞추고, 검사물의 제공량은 각 50ml로 균일하게 맞추어 동일한 용기(일회용 컵 사용)에 담아 패널에게 제공하였다. 검사물은 1회에 5개씩 제시하여 오계전육육수(A1-A4)와 일반계전육육수(C1)를 비교하였고, 오계부산물육수(B1-B4)와 오계전육육수(A1)를 비교 평가하였다. 각 평가시 검사물은 재음미를 허용하고, 각 검사물 음미 사이에 물을 마시고 입을 헹구 낼 수 있도록 생수를 같이 제공하였다.



Fig 1.

다. 연산오계를 활용한 가정간편식 레시피 개발

연산오계를 활용한 가정간편식 레시피 개발을 위해, 전통적으로 사용되어 온 닭보양식 레시피를 조사하고 닭 관련 가정간편식 제품의 시장조사를 실시하였다. 이러한 과정을 통해 본 연구에서 개발될 연산오계 활용 레시피의 주제와 타겟소비층을 선정하고 이를 바탕으로 시장성을 고려한 가정간편식 레시피를 개발하였다. 레시피 개발은 실험조리 과정을 거쳐 문제점을 개선시키고, 전문가를 통한 자문과정을 거쳐 관능성을 향상시킨 레시피를 수립하였다. 개발 레시피는 제품 개발을 위한 위탁업체로 전달되어 대량생산을 위한 조리공정을 확립하도록 하였고, 위탁업체로부터 개발된 시제품의 관능평가를 통해 레시피의 취약점을 보완하고 최종 레시피를 확정하였다. 이상의 레시피 개발 과정은 Fig 2과 같다.

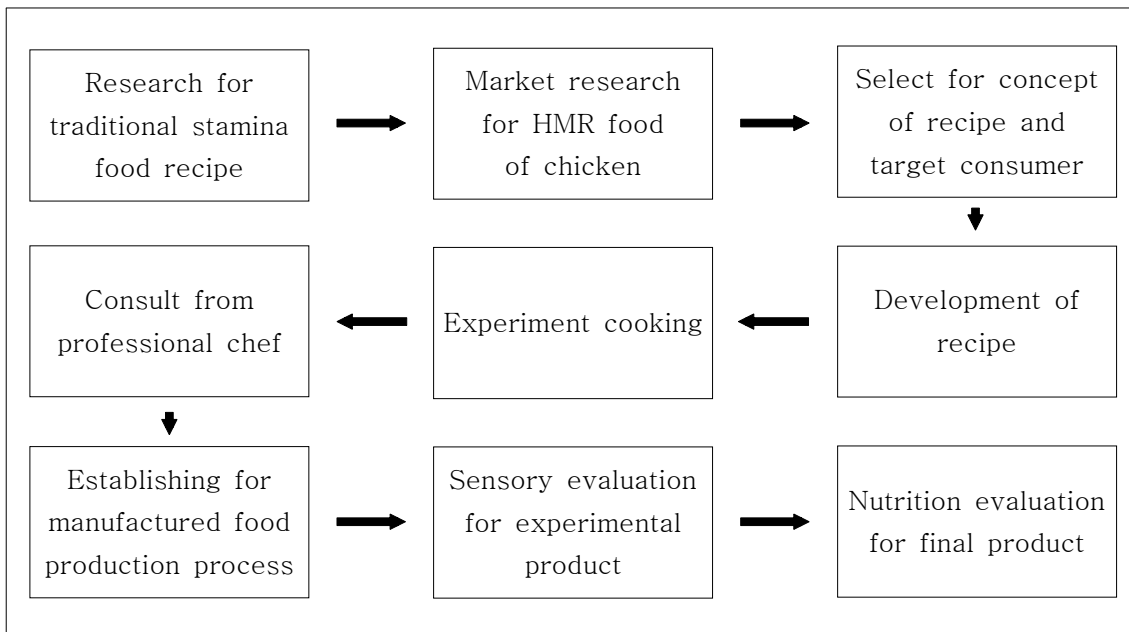


Fig 2. The developing procedures for HMR(Home Meal Replacement) food of Yeosan-Ogye







라. 건강음료 레시피 개발

(1) 펩타이드 및 흑질 색소 활용 기능성 음료 제품 개발 방향 설정

본 연구에서는 연산오계 펩타이드의 영양학적 우수성에 근거하여 연산오계 펩타이드의 영양적 효용을 최대한 활용하고 소비자 니즈에 맞는 기능성 음료를 개발하기 위해 세 가지 형태의 초기 제품의 레시피를 도출하였다.

첫째, 식물성 단백질 보충과 ‘검은 색’의 이미지를 강조하기 위한 검은콩과 검은 깨를 이용한 흑색음료, 둘째 소비자 요구도에 맞추어 피로감 개선과 허약체질 개선의 목적으로 한 쌍화탕 펩타이드음료, 셋째 원기회복과 노화방지를 목적으로 한 경옥고펩타이드 음료를 컨셉으로 제품을 개발하고자 하였다(Table 2).

Table 2. Concept setting up for functional drink recipes of Yeonsan Ogye

Raw Material	Outstanding characteristics of functional values in the materials	Food trend & consumer needs	Target consumer: Product
 Black Soybean & Ogye peptide	High in protein	Black Food & Protein supplement	
 Ssanghwatang & Ogye Peptide	High effect Increased Energy Fatigue recovery	Energetic drink	
 Gyung-ok-go & Ogye Peptide	High effect Increased Energy	LWE for Energy increasing	

다음은 개발하고자 하는 각 음료의 재료별 특성과 보고된 한의학적, 영양학적 효능에 관한 고찰이다.

(2) 흑색음료

흑색음료의 경우, 추출된 펩타이드와 흑질색소와 함께 검정콩과 검은깨를 보충함으로써 검정색을 나타내는 식물성 안토시아닌과 함께 동물성 음료의 흑질색소의 항산화 작용을 기대했고, 그 밖에도 검정콩의 경우 비교적 균형잡힌 아미노산과 함께 질 좋은 단백질 식품으로 알려져 있어, 동물성 연산오계에서 유래한 펩타이드와 함께 사용했을 경우, 단백질 보충의 목적에 부합할 것으로 생각된다. 또 펩타이드 특유의 신맛과 쓴맛을 개선하고자 흑색음료에 활력증진의 효과가 알려져 예로부터 연산오계탕의 부재료로 사용되어 온 여러 가지 한약재 중 함께 사용되어 온 약재들을 첨가하고자 하였다. 다음은 흑색음료에 사용되는 주재료의 기대되는 효능이다.

(가) 검정콩(黑豆, 흑두)

예로부터 검정콩은 시각적 식미감을 증진시키기 위한 목적으로 밥밑콩, 콩자반, 콩강정, 떡소용으로 이용되어 왔으며, 최근 검정콩의 기능성을 부각시켜 여러 건강식품에도 활용되고 있다. 검정콩의 한방 약리적 효과로 '약콩'이라는 이름으로 한방약재로 사용되어 왔는데, 동의보감에 따르면 검정콩은 오장(五臟)에 뭉친 적(積)을 흩트리고, 중풍, 열독에 의한 부종 등을 치료하며, 인병에도 효과가 있다고 기록되어 있다. 그 외에도 검정콩은 부스럼을 없애고 신장과 방광의 병을 치료할 뿐만 아니라 검정콩의 껍질은 시력증진 효과가 있으며, 뇌를 맑게 하고 두통을 치료하는데 이용되기도 했다고 한다.

영양학적으로도 검정콩은 단백질의 대표적인 급원식품이면서 불포화지방산과 식이섬유, 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 E 등의 영양소와 안토시아닌과 사포닌, 식물성스테롤, 피토산 등의 생리활성물질의 좋은 급원이다. 연구자료에 따르면 검정콩에 함유된 이소플라본은 암세포의 증식을 억제하고 노화의 원인 물질을 제거하는 역할을 하는 것으로 보고되었으며, 껍질 부분에 많이 존재하는 안토시아닌 색소는 항산화작용을 통해 산화적스트레스에 대한 방어효과를 가진다. 검정콩에 함유된 안토시아닌 색소는 항균작용과 유방암 억제효과를 지닌 델피니딘-3-글루코사이드 안토시아닌과, 위장보호와 염증억제 효과, 항산화작용 효과가 있는 것으로 보고된 시아니딘-3-글루코사이드 안토시아닌, 및 페튜니딘-3-글루코사이드 안토시아닌 외 최근 새롭게 분리 동정한 6가지의 안토시아닌 성분들이 들어 있다. 검정콩의 안토시아닌의 생리활성 효과는 항산화 기능 이외에도 콜레스테롤 저하, 시력개선효과, 혈관보호기능, 동맥경화, 심장병예방, 항케양기능, 항암, 항염증, 당뇨억제 및 자외선으로부터의 보호기능 등이 있으며, 세포노화 억제 작용이 있는 것으로 보고되어 있다. 특히 항산화력은 검정콩이 일반콩에 비해 종실은 4배, 종피는 50배 이상 높은 것으로 알려져 있다(정명근, 한국육종학회 32(1):11-15, 2000, 신미경, 한성희. 검정콩 추출물 음용이 흰쥐의 혈청 지질성분에 미치는 효과, 한콩연구 19(1):48-54, 2002, 김용호, 이재호, 이영상, 윤홍태. 검정콩 천연색소의 항산화효과 및 적정 추출효율. 한콩연구 23(1):1-9, 2006).

(나) 검은깨(黑荏子 흑임자, 巨僧 거승)

검은깨는 흑지마, 호마, 거승, 구슬, 홍장, 오마, 유마, 교마, 흑임자 등으로 불리는데, 동의보감에 따르면 검은깨는 맛이 달고 독이 없으며 기력을 돕는다고 하였고, 피부와 살을 좋게 하고 골수와 뇌수를 튼튼하게 하는 효능이 있다고 기록되어 있다. 또 신농본초에는 불로장수의 명약, 생명의 근원이라는 언급도 있으며, 뼈를 튼튼하게 하며 오장을 건강하게 하여 오래 살도록 하고, 피부색을 젊게 한다고 한다. 따라서 한의학에서는 허약하고 기운이 없는 환자에게 검은깨를 가하여 처방한다. 또 허약한 신체와 오장을 보강하고 기력을 북돋아 주며 머리를 좋게 한다고 설명되어 있으며, 신장의 기능을 좋게하고 두발을 검게한다는 자료도 있다. 그 뿐만 아니라 장의 기능을 좋게하여 변비를 예방한다는 효과도 알려져 있다.

검은깨는 영양학적으로 트립토판 성분을 포함하고 있으며, 아연과 칼슘 함량이 높은 것으로 알려져 있고, 검은깨의 안토시아닌 성분은 면역력 증가와 콜레스테롤 저하 효과가 보고되었다. 또 비타민 E과 셀레늄이 풍부하며, 필수지방산인 리놀레산의 좋은 공급원이라고 하겠다. 예로부터 회복기 환자들을 위한 흑임자죽이 이용될만큼 소화가 편하고 기력 증진에 도움을 줄 수 있는 것으로 알려져 있다.

(3) 쌍화탕 펩타이드 음료

(가) 쌍화탕

쌍화탕은 다른 말로 쌍화산(雙和散)이라고도 하며 방약합편과 동의보감 탕약편에 기록되어 있다. 동의보감 처방에 따르면 쌍화탕은 백작약, 숙지황, 황기, 당귀, 천궁, 계피, 감초 및 생강, 대조로 만들어진다. 사물탕(四物湯)과 황기건중탕(黃耆建中湯)을 합한 것으로 허로손상(虛勞損傷)으로 기혈(氣血)이 허해진 데, 힘든 일을 한 뒤나 중병을 앓은 뒤에, 온 몸이 노곤하고 몹시 피로감을 느끼며 현운(眩暈)이 나고 가슴이 두근거리며 저절로 땀이 나는 데, 허약한 사람이 감기에 자주 걸리는 데 쓰며, 피로 회복약으로 많이 쓰인다. 쌍화탕은 정신과 육체가 피로하고 기혈이 모두 손상되었을 때 주로 처방되며, 특유의 단맛과 한약재의 쓴맛이 상대적으로 적은 편이어서 기호식품 및 건강식품으로 널리 이용되고 있다. 흰쥐를 대상으로 진행된 쌍화탕에 대한 실험의 연구결과 항피로 효과(손낙원. 쌍화탕이 흰쥐의 간 및 근육 glycogen함량에 미치는 영향에 대한 조직화학적 연구. 대한본초학회 9(1):115-125, 1994; 이강옥. 쌍화탕의 투여가 운동수행 후 피로회복율에 미치는 영향. 한국체육과학회지 8(2):475-484, 1999), 간 기능 개선 효과(안병락, 김신근, 심창구, 정운복. 쌍화탕이 간손상 rat에서 sulfobromophthalein,의 체내동력에 미치는 영향, 약학회지 28:207-215, 1984), 항염증 효과(김일혁, 황규진. 쌍화탕의 항염증 작용에 관한연구. 생약학회지 12(3):131-135, 1981), 항경련 효과(한대숙, 이형규, 조희재. 쌍화탕의 진통 및 한경련효과에 관한 연구. 생약학회지 14(2):60-63, 1983), 지방암 전이억제 등에서 유의성 있는 결과가 보고된 바 있으며, 쌍화탕에는 페놀산, 플라보노이드, 리그닌과 멜라닌, 탄닌 등이 들어 있음이 확인되었고, 실제 항산화능 역시 우수한 것으로 평가되었다. 현재 1회 복용

량은 100mL 정도이다(김동선, 엄영란, 양민철, 윤나영, 마진열. 쌍화탕과 발효쌍화탕 분획물의 폴리페놀함량 및 항산화 활성, 한국한방학연구원논문집 16(3):175-178, 2010). 다음은 쌍화탕에 구성되는 주 재료들의 한의학적 효능을 소개한 것이다.

① 백작약(白芍藥)

작약 *Paeonia lactiflora* Pallas (작약과 Paeoniaceae)의 뿌리로서 주피를 제거한 후 삶아서 말린 것이다. 백작약은 산지와 가공 방법에 따라 박백작(亳白芍), 항백작(杭白芍) 및 천백작(川白芍) 등으로 나눈다. 뿌리로 원기둥 모양이며 때로 구부러져 있고 길이 5~20cm, 지름 1~2.5cm이며 큰 뿌리는 세로로 쪼개져 있다. 바깥 면은 흰색~갈색을 띠고 깨끗하나 세로주름이 뚜렷하며 때로 주름 또는 잔뿌리의 잘린 자국이 오목하게 패어 있고 가로로 피공이 뚜렷하며 뿌리 상부에는 줄기 자국이나 털 벗겨진 갈색의 껍질이 간혹 남아있다. 질은 단단하며 쉽게 꺾어지지 않는다. 횡단면을 확대경으로 볼 때 입상이고 매우 치밀하며 형성층이 뚜렷하고 유백색~갈색이며 방사상으로 된 수선과 형성층이 보인다. 특유한 냄새가 있고 맛은 처음에는 조금 달고 후에 떫으며 약간 쓰다. (한약재감별도감, 아카데미서적)

② 숙지황(熟地黃)

지황 *Rehmannia glutinosa* Liboschitz ex Steudel (현삼과 Scrophulariaceae)의 뿌리를 포제가 공한 것이다. 잘 정제된 지황을 보통 술, 사인, 진피를 보료로 하여 속과 길이 검게 되고 윤기가 흐르며 질이 부드럽고 연하며 점조하게 될 때까지 찌고 햇볕에 말리는 것을 반복하여 말린 것이다. 숙지황의 제법중 구증구폭(九蒸九曝)이라 함은 “여러 번 찌서 말린다”라는 의미이다.

포제한 뿌리로서 불규칙한 덩어리이고 크기가 고르지 않다. 바깥 면은 검고 광택이 나며 점성이 크다. 질은 유연하고 질겨서 잘 잘라지지 않으며 자른 면은 흑색이고 광택이 있다. 약간 특유한 냄새가 있고 맛은 달다 (한약재감별도감, 아카데미서적).

③ 황기

만 이름은 대심(戴椹) · 대삼(戴糝) · 독심(獨椹) · 촉지(蜀脂) · 백본(百本)이다. 콩과 식물인 단너삼 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.의 뿌리를 말린 것이다. 우리 나라 북부의 높은 산지대의 양지 쪽에서 자란다. 각지에서 널리 심기도 한다. 가을이나 봄에 뿌리를 캐 물에 씻어 햇볕에 말린다. 맛은 달고 성질은 약간 따뜻하다.

비경(脾經) · 폐경(肺經) · 삼초경(三焦經) · 신경(腎經)에 작용한다. 원기를 북돋우고 땀을 멎게 하며 소변이 잘 나오게 하고 고름을 없애며 새살이 돋아나게 한다. 강장(強壯) 작용 · 면역기능 조절 작용 · 강심(強心) 작용 · 이뇨 작용 · 혈압 강하 작용 · 소염 작용 등이 실험에서 밝혀졌다. 허약한 데, 병이 나은 뒤 보약으로, 절로 땀이 나는 데, 식은땀, 기허증(氣虛證), 비기

허증(脾氣虛證), 폐농양(pulmonary abscess), 소갈(消渴), 부종, 옹종(癰腫), 창양(瘡瘍), 혈허증(血虛證), 내장하수증 등에 쓴다.

만성 위염, 위십이지장 궤양, 심장 기능 부전증, 관상 혈관 순환 장애, 뇌빈혈, 만성 신장염, 습진 등에 쓰기도 한다. 하루 6~15g을 탕제 · 환제 · 산제 형태로 만들어 먹는다. 황기에 별갑(鼈甲) · 백선근피(白鮮根皮)을 섞어서 쓰면 약효가 떨어진다.(한의학대사전, 도서출판 정담)

④ 당귀

참당귀 *Angelica gigas* Nakai (산형과 Umbelliferae)의 뿌리이다. 당귀의 기원식물로는 현재 참당귀, 중국당귀 및 일당귀가 유통되고 있다. 본초학적인 연구에 의하면 중국당귀를 정품으로 보고 있다. 그러나 지금까지 우리나라에서는 참당귀를, 중국에서는 중국당귀를, 일본에서는 일당귀를 정품으로 취급해 왔다. 함유성분으로 보면 중국당귀와 일당귀는 비슷하지만 참당귀는 다르다. 2013년에 이르러 우리나라도 KHP에 일당귀를 정품으로 수재했으나 중국당귀는 배제되었다. 그러나 여러 가지 정황에서 중국당귀를 배제하기는 어렵다고 본다.

뿌리로 굵고 짧은 주근으로부터 줄기 및 잎의 잔기가 남아 있다. 주근의 길이는 약 3~7cm, 지름 2~5cm이고 가지뿌리의 길이는 15~20cm이다. 바깥 면은 연한 황갈색~흑갈색으로 주근 및 가지뿌리에는 세로 주름이 많으며 주근에는 가로 주름이 있는 것도 있다. 껍질 면은 평탄하고 형성층에 의하여 목부와 피부의 구별이 뚜렷하며 목부와 형성층 부근의 피부는 어두운 황색이나 나머지 부분은 흰색이다. 특유한 냄새가 있고 맛은 약간 쓰면서 달다.(한약재감별도감, 아카데미서적)

⑤ 천궁

판 이름은 호궁(胡藟) · 향과(香果) · 작뇌궁(雀腦芎)이다. 미나리과 식물인 궁궁이 *Ligusticum officinale* Kitag.나 산궁궁이 *Ligusticum jeholense* Nakai의 뿌리줄기를 말린 것이다. 궁궁이는 각지에서 심고 산궁궁이(산천궁 · 토천궁)는 우리 나라 중부 이북의 깊은 산골짜기에서 자라거나 각지에서 심는다. 늦가을에 서리가 내린 다음 뿌리를 캐서 줄기를 버리고 물에 씻어 햇볕에 말린다. 맛은 맵고 성질은 따뜻하다. 심포경(心包經) · 간경(肝經) · 담경(膽經) · 삼초경(三焦經)에 작용한다. 혈액 순환을 촉진하고 월경을 고르게 하며 풍사(風邪)를 몰아내며 아픔을 완화시킨다.

약리 실험에서 진정(鎮靜) 작용 · 혈압 강하 작용 · 자궁 수축 작용 · 항균 작용 등이 밝혀졌다. 향기름 성분은 중추 신경 계통에 대하여 적은 양에서는 흥분적으로, 많은 양에서는 억제적으로 작용한다. 풍한두통(風寒頭痛), 무월경, 월경 장애, 생리통, 산후 복통, 협통(脇痛), 근육이 썩기는 데, 고혈압증(hypertension), 옹종(癰腫) 등에 쓴다. 하루 6~12g을 탕제 · 산제 · 환제 형태로 만들어 먹는다. 음(陰)이 허하여 머리가 아픈 데, 월경과다, 임신부에게는 쓰지 않는다.(한의학대사전, 도서출판 정담)

⑥ 계피

녹나무과의 육계(Cinnamomum cassia Blume : 肉桂) 또는 동속 근연식물의 수피 또는 주피를 다소 제거한 수피를 말한다. 계피는 방향성을 가진 건위제로서 그 분말을 다른 산제와 배합하여 식욕 증진제로 사용한다. 한방에서는 땀이 나게 하고 식은땀을 거두게 하는 이 약재를 계지탕·갈근탕(취뿌리탕)에 배합하며, 특히 감기를 포함한 소화기와 순환기 질환·급성열병·노인병 등에 첨가하여 사용한다. 계피나무는 녹나무과에 속하는 상록교목으로 곧게 서고 높이는 약 7~8m에 달하며 작은 가지는 녹색이다. 잎은 장타원형으로 어긋나며 3개의 주맥이 있다. 꽃은 집산화서로 담황색을 띤 녹색이며 작은 꽃이 5~6월에 핀다. 과실은 장과이고 12월경에 암자색으로 익는다. 중국산, 한국산 등이 있으며 향기는 어느 것이나 비슷하니 방향, 쓴맛, 매운맛을 가지고 있으나 산지에 따라 특성이 다르다. 우리나라의 제주도에서 시험재배하고 있다.

계피나무의 껍질은 계피(桂皮), 옥계(玉桂), 대계(大桂) 등으로 부른다. 국제적으로 유통되고 있는 것은 시론계피, 중국계피 등으로 말린 껍질을 이용하고 일부는 정유원료로 이용된다. 계피껍질에는 탄닌과 정유성분의 대부분을 차지하는 신남 알데히드(cinnamic aldehyde), 신남산(cinnamic acid) 등이 함유되어 있다. 시나몬은 실론과 인도산의 계피껍질을 24시간 발효 후 속껍질을 분리하여 건조한 것으로서 어린 줄기의 얇은 껍질로 만든 것이 가장 좋다. 계피유는 계피를 증류한 유상의 물질로서 특유한 향기 및 감미와 신미가 많다. 계피유는 화채, 도넛, 제과, 콜라 등에 이용된다. 분말정유는 과자류, 빵, 콜라, 음료, 아이스크림, 커피 등에 이용한다. 우리나라산 계피는 중국에서 이식된 것이며 나무껍질을 건조한 것으로 과자, 음료 등의 향료로서 오래 전부터 사용되어 왔다.(식품과학기술대사전, 광일문화사)

⑦ 감초

뿌리 및 뿌리줄기이다. 뿌리는 원주형이며 길이 25~100cm, 지름 0.5~3.5cm이다. 바깥 면은 주로 적갈색이고 때로 회갈색이며 피목에 의한 가로 또는 세로무늬가 있고, 패인 무늬 및 뿌리털 자국이 뚜렷하다. 이 중 주로 적갈색인 피목은 감초의 특징이기도 하다. 질은 단단하고 자른 면은 섬유성이며 황백색이고 분상(粉狀)이며 형성층 고리가 뚜렷하다. 또한 수선은 방사상이고 빈틈이 있을 때가 있으며 전체적으로 국화꽃 모양(국화심)이다. 뿌리줄기는 원주형이고 표면에는 싹이 있었던 자국이 있으며 자른 면의 가운데에는 수가 있다. 유통되는 절편은 잔뿌리의 절편 등 다양하다.(한약재감별도감, 아카데미서적)쌍화탕의 원료 특성은 Table 3과 같이 요약정리 하였다.

Table 3. Ssanghwatang Oriental medicine characteristics

	원재료	이명	학명	생약명	식용가능여부		
					가능	제한적	불가능
백작약	작약	함박꽃, 백작약, (白芍), 백작약, 참작약, Paeny Root, 초작약, 가백작약, 집함박꽃	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall <i>Paeonia albiflora</i> Pall.(이명) <i>Paeonia lactiflora</i> var.hortensisMakino (이명)	작약 芍藥 <i>Paeoniae Radix</i>		뿌리	
숙지황 (熟地黃)	지황	Rehmannia 생지황: 건강, 새양, 새양, 강땅줄기 건지황: 건생지황 숙지황: 생숙지황	<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertn.) Libosch.ex Steud <i>Rehmannia glutinosa</i> var <i>purpurea</i> (Makino) Makino & Nemoto	지황(地黃), 지황의 뿌리, 생지황 (生地黃, Rehmaniae Radix Crudus), 건지황(건생지황, 乾生地黃, Rehmanniae Radix), 숙지황(생숙지황, 生熟地黃, Rehmanniae Radixet Rhizoma Preparata)		뿌리	
황기 (黃芪)	황기	단너삼, 독지, 백분, 옥순, 황지, 목황기, 면화기, 황초, 황계	<i>Astragalus-membraneus</i> Bunge	황기 (黃耆, <i>Astragali Radix</i>)	뿌리 /잎 /싹		
당귀 (當歸)	참당귀	Korean angelica, 승검초, 당귀, 당귀잎	<i>Angelica gigas</i> N	당귀(當歸, <i>Angelicae Gigantis Radix</i>)	뿌리 /잎		

천궁 (川芎)	천궁	궁궁이풀, 호궁, 향과, 경궁, 마함궁궁	<i>Cnidium officinale</i> Makino	천궁(川芎, Cnidii Rhizoma)		뿌리 줄기	
계피 (桂皮)	계피	계주, 자주, 대주, 육계, 계지	<i>Cinnamomum aromaticum</i> Nees <i>Cinnamomum cassia auct.</i> <i>Cinnamomum cassia</i> J.Presl. <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume var cassia Nees	계피(桂皮, Cinnamon Bark), 육계(肉桂, Cinnamomi Cortex), 계지(桂枝, Cinnamomi Ramulus), 계심(桂心, Cassiae Cortex Interior)	줄기 껍질 /나무 껍질 /가지	잎	
감초	감초	미초(美草), 국로(國老), 밀감(蜜甘), 밀초(蜜草), 분초(粉草), Glycyrrhiza, Liquorice root, Licorice 감중황: 금즙(金汁)	Glycyrrhiza uralensis Fisch (만주감초) <i>Glycyrrhiza glabra</i> Linne (유럽감초)	감초(甘草)- 뿌리 및 주출경 (走出逕), 감초절 (甘草節, Glycyrrh izae Resina), 감중황 (甘中黃, Glycyrrhizae Pr aeparatus Pulvis), 감초초 (甘草梢)	뿌리 /뿌리 줄기		
생강	생강	새양, 새양, ginger, 백강(白薑), 균강, Amomum zingiber, 외강(外薑)	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	생강피 (生薑皮, Zingiberis Exocarpium) 생강즙 (生薑汁, Zingiberis Succus), 건강 (乾薑, Zingiberis Rhizoma Siccus)	뿌리 /뿌리 줄기		

대추	대추	대추나무: 건추, 홍추, 조(棗), 목밀(木蜜), jujube, 건조 (乾棗)	<i>Zizyphus</i> <i>jujuba</i> var. <i>inermis</i> (Bunge) Rehder (대추나무)	대조(大棗), 목밀(木蜜) 대추나무 열매	잎 /열매	씨
		보은대추나 무	<i>Zizyphus</i> <i>jujuba</i> Miller var. <i>hoonensis</i> (Kawamoto) T.Lee (보은대추나무)			

(4) 경옥고 펩타이드 음료증강제

경옥고는 동의보감에서 유래된 대표적인 처방으로, 불로장생의 선약개발 사상이 집약되어 만들어 졌다고 알려져 있다. 동의보감에는 경옥고의 효능에 대해 전정(填精), 보수(補髓), 조진양성(調眞養性), 반로(返老), 환동(還童)하며, 백손(百損)을 보(補)하고 백병(百病)을 제거하며, 만신(萬神)이 모두 족(足)하고 오장(五臟)을 충일(充溢)하게 하여 백발(白髮)을 검게 하고, 락치(落齒)가 다시 나며 분마(奔馬)처럼 달리게 한다.” 라고 기재되어 있다. 즉, 정(精)과 수(髓)를 보충하고 원기를 북돋우며 혈액을 풍부하게 하여 늙는 것을 막고 몸을 튼튼하게 하며 허로(虛勞)로 머리털이 일찍 희어지고 이가 흔들리며 쉽게 피곤해지는 데 쓴다. 경옥고의 재료는 생지황, 인삼, 백복령, 벌꿀로 기술되어 있다.

또 소모성 질병 때 보약으로 사용되어져 왔다. 이러한 문헌에 근거하여 이루어진 경옥고의 약리활성에 대한 연구 결과, 경옥고는 항산화 (곽병준, 이송실, 백진웅, 이상재, 김광호. 경옥고가 노화유발 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향. 대한예방한의학회 7(2):85-96, 2003), 항염증(이가순, 김관후, 김현호, 성봉재, 김선익, 한승호, 강은주, 유영춘. 국내시판 경옥고 제품의 품질특성 및 항염증 활성. 한국식품영양과학회 42(3):335-341, 2013), 위궤양억제, 진통효과 및 정상체온 유지(황완균, 오인세, 이숙희, 최수부, 김일혁. 경옥고의 생리활성(3)- 염증, 위궤양, 진통 및 정상체온에 미치는 영향- 생약학회지 25(2):193-159, 1994), 혈당강하, 혈청 총 콜레스테롤 및 총 지질 감소 효과 및 혈압강하 효과, 지구력 및 체중 감소에도 유의한 효과가 있는 것으로 보고되었다(황완균, 오인세, 이숙희, 최수부, 김일혁. 경옥고의 생리활성 (2) - 고혈당, 고혈압, 지구력 및 체중감소에 미치는 영향. 생약학회지 25(1): 51-58, 1994).

그밖에도 경옥고는 점진적 운동부하 후 젖산 및 암모니아의 감소에도 효과가 있다는 보고가 있었다. 실제 고등학교 축구선수를 대상으로 경옥고를 투여했을 때 운동수행능력이 향상되었고, 심박수 회복률을 증가시켜 피로 회복을 빠르게 하는 것이 관찰되어 경옥고의 ergogenic

aid로서의 가능성을 제시하였다(김동건, 박원형, 차운엽. 경옥고 섭취가 고등학교 축구선수의 운동수행능력 향상 및 피로회복에 미치는 영향, 동의생리병리학회지 25(5):934-944, 2011). 한번에 1~2숟가락씩 데운 술이나 물에 타서 하루 2~3번 먹는다.(네이버 지식백과)

① 생지황

지황 *Rehmannia glutinosa* Liboschitz ex Steudel (현삼과 Scrophulariaceae)의 신선한 뿌리이다. CP에는 “가을에 채취하여 노두, 뿌리털 및 흙모래를 제거하고 신선한 것을 쓰거나 80%까지 마르도록 hong건한 것을 쓴다. 전자를 선지황(鮮地黃), 후자를 생지황(生地黃)이라 한다.”라 하였다. 이로 보면 KHP의 생지황은 CP의 선지황이고, KP의 지황은 CP의 생지황임을 알 수 있다. 지황의 품종으로는 도지약재인 회경지황(恢慶地黃) *Rehmannia glutinosa* Liboschitz ex Steudel f. *hueichingensis* Hsiao이 잘 알려져 있다. 회경지황은 일반지황에 비해 그 뿌리가 훨씬 충실하다.

신선한 뿌리로 원기둥모양~방추형을 이루고 길이 5~15cm, 지름 0.8~2cm로서 더러는 꺾이어졌거나 구부러진 것도 있다. 바깥 면은 황적색~황적갈색을 띠고 가로로 깊이 패어진 골이 있다. 질은 매우 연하여 잘 꺾인다. 꺾은 면은 평탄하며 목부는 흰색, 피부는 연한 황적색이다. 특유한 냄새가 약간 있고 맛은 달고 약간 쓰다.(한약재감별도감, 아카데미서적)

② 꿀

양봉꿀벌 *Apis mellifera* Linné 또는 재래꿀벌 *Apis cerana* Fabricius(꿀벌과 Apidae)이 벌집에 모은 감미물을 채취한 것이다. KP에는 재래꿀벌을 *Apis indica* Radoszkowski라고 기재하고 있다. 꿀은 꿀벌의 종류에 따라 양봉꿀과 재래꿀로 나누고, 양봉꿀은 다시 밀원식물의 종류에 따라 아카시아꿀, 밤꿀, 잡꿀 등으로 나누는데 그 종류에 따라 맛, 색깔 및 향기가 다르다. 이에 반하여 재래꿀은 1년에 한 번만 채취하는 것이기 때문에 어느 한 종류의 꽃에 따른 향기가 아니라 혼합적인 향기가 나고 갈색이 더 진하다. KP에서는 꿀의 성상을 일반화시켜 기재하고 있다.

연한 노란색-연한 황갈색의 시럽같은 액으로 대개 투명하지만 때로 결정이 생겨 불투명해지기도 한다. 특유한 냄새가 있고 맛은 매우 달다.(한약재감별도감, 아카데미서적)

③ 복령

복령균 *Poria cocos* Wolf (구멍장이버섯과 Polyporaceae)의 균핵이다. CP에는 복령의 제법에 “대부분 7~8월에 채취하여 흙과 모래를 제거하고 높게 쌓아 발한(發汗)시킨 후에 이들을 펴서 바깥 면이 마를 때까지 햇볕을 쬐인다. 이를 다시 발한시키고 주름이 생길 때까지 여러 차례 되풀이 하여 내부 수분을 대부분 날려보낸 후에 음건한 것을 복령개(茯苓个)라 한다. 이 복령

개를 만들기 전에 신선한 복령의 껍질을 벗겨 다듬는데 껍질이 있는 쪽을 복령피라 하고, 껍질이 없는 쪽을 복령피라 한다. 또, 복령피는 그 색에 따라 백복령과 적복령으로 나눈다. 그리고 이 복령피 중에서 가운데 소나무 뿌리가 있는 것을 복신괴(茯神塊)라 한다.

이 복신괴도 그 색에 따라 백복신과 적복신으로 나눈다. 그리고 복신괴에서 얻어진 소나무 뿌리를 복신목(茯神木)이라 한다.”라 하였다. 최근 중국에서는 복령의 인공재배를 성공시켰다. 인공재배라 하더라도 그 내용과 질에서 자연산보다 질이 더 좋다고 할 정도로 성공적이었다.(한약재감별도감, 아카데미서적)

④ 인삼

인삼 *Panax ginseng* C. A. Meyer (두릅나무과 Araliaceae)의 뿌리로서 그대로 또는 가는 뿌리와 코르크층을 제거한 것이다. 우리나라의 ‘인삼산업법’에 의하면 ‘인삼류’는 수삼, 홍삼, 태극삼, 백삼과 그 밖의 인삼을 가리키고 있다. 이 중 ‘태극삼(太極蔘)’은 수삼을 물로 익히거나 그 밖의 방법으로 익혀서 말린 것을 말하고, ‘그 밖의 인삼’이란 수삼을 원료로 하여 제조한 것(홍삼, 태극삼, 백삼은 제외)으로서 농산축산식품부령으로 정한 것을 말한다.

이로 보면 우리나라 생약공정서에 수재된 인삼류는 정확히 수삼, 백삼, 미삼과 홍삼임을 알 수 있다. 그러므로 우리나라 생약공정서에 수재된 인삼류도 ‘인삼산업법 시행규칙’ 제15조에 관련된 ‘인삼류의 제조기준’에서의 인삼류를 참고하여 살펴볼 필요가 있다. ‘인삼류의 제조기준’ 중의 인삼의 부위에 관한 용어와 같은 항의 ‘인삼류의 제조공정 및 규격’에서의 직삼, 곡삼, 반곡삼을 비롯하여 인삼이 출아(出芽)하여 자란 햇수를 말하는 연근(年根)이 그것이다.

뿌리로 가늘고 원기둥 모양~네모뿔 모양으로 때로 중간쯤에서 2~5개로 뿌리가 갈린다. 길이 5~20cm이며 주근은 지름 0.5~3cm이다. 바깥 면은 연한 황갈색~연한 회갈색을 띠며 세로주름과 가는 뿌리자국이 있다. 근두부는 약간 구부러져 있고 줄기의 잔기가 붙어있던 뇌두가 있다. 껍질은 거의 평탄하며 연한 황갈색이고 형성층 부근은 갈색이다. 특유한 냄새가 있으며 맛은 처음에 조금 달고 후에 약간 쓰다.(한약재감별도감, 아카데미서적) 경옥고의 원료 특성은 Table 4와 같이 요약정리 하였다.

Table 4. Characteristics of hard jade material

	원재료	이명	학명	생약명	식용가능여부		
					가능	제한적	불가능
생지황 (生地黃)	생지황	지황, 선지황(鮮地黃), 생지황(生地黃), 회경지황	Rehmannia glutinosa Liboschitz ex Steudel Rehmannia glutinosa Liboschitz ex Steudel f. hueichimensis Hsiao	생지황 (生地黃)		뿌리	
꿀 (蜂蜜)	꿀	재래꿀, 양봉꿀 (아카시아꿀, 밤꿀, 잡꿀 등)	Apis indica RadoszkowskiRe		액상		
복령분 (茯苓粉)	복령	복령개, 복령피, 복령괴, 백복령, 적복령, 복신포	Poria cocos Wolf (구멍장이버섯과 Polyporaceae)	황기 (黃耆, Astragal i Radix)	구멍 장이 버섯 과의 균핵		
인삼 분말 (人蔘 粉末)	인삼	수삼, 홍삼, 태극삼, 백삼	Panax ginseng C. A. Meyer			뿌리	

(5) 연산오계 유래 펩타이드를 이용한 건강 음료 레시피 개발

연산오계 유래 펩타이드를 활용한 건강 음료 레시피 개발을 위해, 시판 중인 기능성 음료를 조사하고, 펩타이드 음료 제품의 시장조사를 실시하였다. 이러한 과정을 통해 본 연구에서 개발될 연산오계 유래 펩타이드 활용 건강 음료 레시피의 주 기능성을 “자양강장 및 피로회복”으로 하고, “수험생과 직장인, 회복기 환자 및 노인”을 타겟소비층으로 선정하였다.

현재 풀뿌리사업단 단장이자, 한의학자인 대전대학교 한의과대학 김병수교수의 자문으로 여러 가지 후보 중 흑질음료와 한방음료에 들어갈 처방으로 ‘쌍화탕’과 ‘경옥고’를 선정하였다. 처방 선택의 조건은 첫째 자양강장 및 피로회복 효과를 가진 것, 둘째 일반 소비자에게 대중적으로 처방 가능한 것, 셋째 기존에 생리활성 효과가 입증된 것, 넷째 관능적으로 거부감이 적은 것이었다.

자문을 바탕으로 처방을 한방재료들을 선별하고, 제조 의뢰하였으며, 이를 바탕으로 시장성을

고려한 건강 음료 레시피를 개발하였다. 레시피 개발은 실험조리 과정을 거쳐 문제점을 개선시켰고, 개발 레시피는 제품 개발을 위하여 위탁업체로 전달되어 대량생산을 위한 조리공정이 확립된 펩타이드 원료를 포함하여 최종 시제품의 레시피를 수립하였다.

공동연구자 및 소비자를 대상으로 한 관능평가를 통해 레시피를 확정하였다. 이상의 레시피 개발 과정은 Fig. 3과 같다.

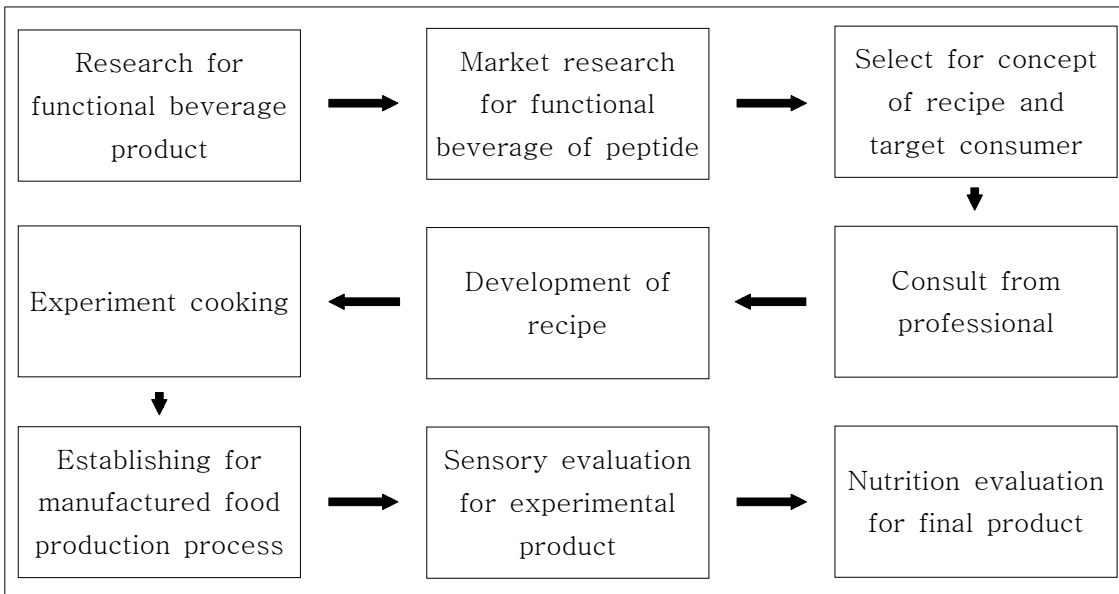


Fig. 3. The developing procedures for peptides drink from Yeonsan-Ogye

(가) 흑색음료

연산오계의 펩타이드와 흑질의 활용 및 최근 주목받고 있는 블랙푸드(흑미, 흑임자, 검은콩)와의 조합을 통해 학생, 직장인 및 노인들을 위한 새로운 기능성 음료를 개발하고자 하였다. 검은콩은 일찍이 성악가들이 아름다운 목소리를 유지하기 위해 자주 복용했다고 하는데, 정신적인 스트레스 등으로 뒷덜미가 뻐뻐할 때 기분을 맑게 풀어주는 작용이 있다고 믿었다고 한다. 이 레시피는 연산오계의 펩타이드의 영양학적 유효성분의 효과 뿐 아니라, Black food에 함유된 수용성 물질인 안토시아닌 색소 성분의 항산화, 항암, 항궤양 효과를 기대할 수 있을 것이다

(나) 한방 오계 펩타이드 음료 1 : 쌍화탕 펩타이드 음료

액상 펩타이드 특유의 신맛과 쓴맛에 대한 문제를 해결하기 위하여 한방 펩타이드 음료 제조 시에는 파우더 형태의 분말건조 된 펩타이드를 사용하였다. 연산오계의 펩타이드 활용 및 쌍화탕과의 조합을 통해 수험생, 운동선수, 직장인 및 노인들을 위한 새로운 기능성 음료를 개발하

고자 하였다. 쌍화탕은 허로손상으로 기혈이 허해진데, 힘든 일을 한 뒤나 증병을 앓은 뒤에, 온 몸이 노곤하고 몹시 피로감을 느끼며 현운이 나고 가슴이 두근거리며 저절로 땀이 나는 허약한 사람이 감기에 자주 걸리는데 쓰며 피로 회복제로 많이 사용되어 이 레시피는 연산오계의 펩타이드의 영양학적 유효성분의 효과 뿐 아니라, 쌍화탕의 효과까지 함께 기대할 수 있을 것이다

(다) 한방 오계 펩타이드 음료 2 : 경옥고 오계 펩타이드 음료증강제

연산오계의 펩타이드와 흑질의 활용 및 경옥고와의 조합을 통해 수험생, 운동선수, 직장인 및 노인들을 위한 새로운 기능성 음료를 개발하고자 하였다. 경옥고는 동의보감에서 정과 수를 보충하고 원기를 북돋으며 혈액을 풍부하게 하여 늙는 것을 막고 몸을 튼튼하게 하며 허로로 머리카락이 희어지고 이가 흔들리며 쉽게 피로해지는데 이용한다고 하였다. 이 레시피는 연산오계의 펩타이드의 영양학적 유효성분의 효과 뿐 아니라, 경옥고의 효과까지 함께 기대할 수 있을 것이다.

(6) 흑색음료의 관능검사

(가) 관능검사 시료 준비

실험조리를 통해 개발한 흑색음료에 펩타이드를 첨가한 것과 펩타이드와 쌍화탕을 첨가한 것으로 2가지 시료를 준비했다. Table 5과 같이 샘플번호를 부여하였다.

Table 5. Various cooking conditions of Yeonsan Ogye Peptide Soybean milk

Materials	Additives	Sample code
Black drink	Yeonsan-Ogye Peptide	P1
	Yeonsan-Ogye Peptide + Ssanghwatang	P2

(나) 관능검사 방법

관능검사는 현재 과제 수행 중인 연구원들과 지산농원 직원 13명을 패널로 선정하고, 5점 기호척도법으로 맛과 향, 색감과 식감, 종합의견을 평가하였다(5점:매우 좋다/강하다 ←→ 1점:매우 싫다/약하다). 검사물(두유)는 평가 당일 오전에 제조하여 관능평가 사용하였으며 검사물의 제공량은 각 30ml로 균일하게 맞추어 동일한 용기(일회용 컵 사용)에 담아 패널에게 제공

하였다. 검사물은 1회에 2개씩 제시하여 펩타이드 두유(P1)와 쌍화탕 펩타이드 두유(P2)를 비교 평가하였다. 각 평가시 검사물은 재음미를 허용하고, 각 검사물 음미 사이에 물을 마시고 입을 헹구 낼 수 있도록 생수를 같이 제공하였다.

(7) 한방 펩타이드 음료의 관능검사

(가) 관능검사 시료 준비

한방펩타이드 음료의 경우 쌍화탕과 경옥고를 베이스로 연산오계 펩타이드 500mg을 첨가한 것, 연산오계 펩타이드를 첨가하지 않은 것으로 총 4가지의 시료를 제조하였다. 각 시료에는 Table 6과 같이 샘플번호를 부여하였다.

Table 6. Various cooking conditions of Yeonsan Ogye Peptide Ssanghwatang and Gyung-ok-go

Materials		Additives	Sample code
Ssanghwatang	None		S1
		Yeonsan Ogye Peptide	S2
Gyung-ok-go	None		G1
		Yeonsan Ogye Peptide	G2

관능검사 시료 제조 방법은, 쌍화탕(S1)은 대전대학교 한의과대학 생리학 실험실(김병수 교수)에서 직접 만든 것을 사용하여 연산오계 펩타이드가 첨가된 쌍화탕(S2)의 경우 쌍화탕 30ml에 500mg의 펩타이드를 섞어 제조하였다. 경옥고(G1)는 대전대학교 부속 한방병원에서 판매중인 경옥고를 사용하여 연산오계 펩타이드가 첨가된 경옥고(S2)의 경우 30ml 증류수에 경옥고 1회 제공량인 3g을 녹이고 500mg의 펩타이드를 섞어 제조하였다.

(나) 관능검사 방법

관능검사는 실제 제품 구매력이 있는 30세 이상 여성 30명을 패널로 선정하고, 제품의 기호를 측정에 사용되는 5점 기호 척도법으로 맛(단맛, 신맛, 쓴맛, 맛 기호도)과 향(구수한 향, 누린내, 시큼한 향, 비린내, 향미 기호도), 색, 농도, 종합적 기호도를 평가하였다(5점:매우 좋다/강하다 ←→ 1점:매우 싫다/약하다).

시료는 평가 전날 제조하여 냉장 보관 후 사용하였고, 검사물의 제공량은 각 20ml로 균일하

게 맞추어 동일한 용기(일회용 컵 사용)에 담아 패널에게 제공하였다. 검사물은 1회에 4가지 시료를 한번에 제시하여 쌍화탕(S1)과 연산오계 펩타이드 쌍화탕(S2), 경옥고(G1)와 연산오계 펩타이드 경옥고(G2)를 비교 평가하였다. 각 평가시 시료의 재음미를 허용하고, 각 시료 음미 사이에 물을 마시고 입을 헹궈 낼 수 있도록 생수를 같이 제공하였다.

(8) 건강음료의 영양성분 평가

(가) 오계 펩타이드 영양성분 분석

① 일반성분 분석

일반성분 분석은 AOAC법에 따라 수분함량은 105°C 건조법, 조지방은 Soxhlet법, 회분은 550°C 회화법으로 분석하였고 조단백질은 원소분석기(Thermo Quest사, Flash 2000)를 이용하여 전질소량을 정량하고 질소계수 6.25를 곱하여 조단백질로 하였으며 탄수화물은 100에서 수분, 조단백질, 조지방, 회분의 값을 제한한 값으로 하였다.

② 비타민 및 무기질

비타민 A와 E의 분석을 위해 계육 4g, 육수 30g에 ascorbic acid 0.1 g과 ethanol 15 mL를 첨가하여 균질화한 후 80°C에서 20분간 추출한 다음 50% KOH용액을 0.25ml 첨가하고, 증류수 3 mL와 hexane 5 mL를 가하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리시킨 다음 잔사에 hexane 5 mL를 가하여 균질화하여 80°C에서 20분간 추출시켜 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상등액을 합하여 무수황산나트륨을 가해 탈수시킨 후 50°C에서 감압 농축하고 methanol로 용해시킨 후 membrane filter(0.45 μ m)로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 비타민 B2와 B6는 정육 4 g, 육수 30 g에 시료에 따라 증류수 2 mL를 넣어 균질화한 후 acetonitrile 8 mL를 가하여 20분동안 추출한 다음 4,000 rpm에서 20분간 원심분리시킨 후 잔사에 동일 용액을 가하여 재추출하였고, 상등액을 합하여 rotary vacuum evaporator에서 감압·농축하고 초순수로 용해시킨 후 membrane filter(0.45 μ m)로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 비타민 C는 시료 4 g을 균질화하여 10% metaphosphoric acid(H₃PO₃) 용액을 가하여 추출한 다음 4,000rpm에서 20분간 원심분리한 후에 상등액을 membrane filter(0.45 μ m)로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 무기질의 경우 Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrophotometer를 이용하여 시료의 Calcium, Magnesium, Iron, Zinc, Selenium의 함량을 분석하였다.

(나) 흑색음료의 영양성분 분석

영양소 함량 분석 프로그램인 Can-pro (한국영양학회)를 이용하여 흑질음료의 영양성분 분석을 하였고, 식품의약품 안전처 식품표시 프로그램을 활용하여 %영양소 기준치 값을 산출하였다.

(다) 경옥고 오계 펩타이드 음료강화제의 영양성분 분석

영양소 함량 분석 프로그램인 Can-pro (한국영양학회)를 이용하여 흑질음료의 영양성분 분석을 하였고, 식품의약품 안전처 식품표시 프로그램을 활용하여 %영양소 기준치 값을 산출하였다.

(9) 건강음료의 기능성 평가

(가) 기능성 평가 목적

시장조사 결과 나타난 기능성 음료의 트렌드를 반영하고 향후 소비도가 높을 것으로 예상되는 제품을 고려하여 연산오계가 활용된 두유 개발하고 레시피 개발 후 연구 팀 내 관능평가를 실시하였으나 제조 공정상의 문제점 및 연산오계 펩타이드가 가지는 누린내, 쓴맛 등의 조절이 어려워 한방 재료를 이용한 쌍화당과 경옥고를 활용하여 한의학 적인 효능을 추가하고 연산오계 펩타이드의 단점을 보완하는 고부가가치 기획 제품으로 한방 펩타이드 음료 2가지를 최종 결정하고 영양학적 효능 평가를 실시하였다.

연산오계 유래 펩타이드를 활용한 기능성 음료의 효능평가를 위해, rat을 이용한 동물실험을 실시하였다. 실험을 통해 본 연구에서 개발될 연산오계 유래 펩타이드 활용 기능성 음료의 자양강장 효과와 항산화, 항염 효과를 평가하였다.

(나) 실험동물 및 실험 방법

① 실험동물과 실험

Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를(브릿지, Korea) 사용하였으며 1주일간 고형배합사료로 적응시킨 후 난피법에 의해 각 군에 8마리(PD, SD, GD군은 9마리)씩 7군으로 나누어 4주간 실험을 실시하였다.

② 실험식이

AIN-93식이를 급여하면서 대조군(control, C)에게는 증류수를, 펩타이드 급여군(250mg/kg, PB, 500mg/kg, PD)에게는 펩타이드, 펩타이드 쌍화탕 급여군(SB, SD)에게는 연산오계 펩타이드 쌍화탕을 그리고 펩타이드 경옥고 급여군(GB, GD)에게는 펩타이드 경옥고를 매일 아침 일정한 시간에 경구 feeding 하였으며(Fig 4), 기타 실험식이의 자세한 사항은 Table 7과 Table 8에 제시하였다.

Table 7. Experimental groups and the diet

Diet group	Experimental diet
C	distilled water(DW)
PB	DW+250mg/kg · bw peptide
PD	DW+500mg/kg · bw peptide
SB	AIN-94M + Ssanghwatang+250mg/kg · bw peptide
SD	Ssanghwatang+500mg/kg · bw peptide
GB	Gyung-ok-go(DW)+250mg/kg · bw peptide
GD	Gyung-ok-go(DW)+250mg/kg · bw peptide

Table 8. AIN-94M diet

material	quantity
Cornstarch	529.486
Sucrose	100.000
Casein	200.000
Soybean oil	70.000
Fiber	50.000
Mineral mix	35.000
Vitamin mix	10.000
L-Cystine	3.000
Choline bitartrate	2.500
Tert-butylhydrpquin	0.014
Total(g)	1000.000
Total cal	3948
CHO : PRO : FAT	64 : 20 : 16



Fig. 4. Experimental transfer

4주간의 실험 기간 동안 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 공급하였고 동물 사육실의 환경은 온도 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$, 그리고 12시간 명암주기를 유지하였다. 식이 섭취량은 매일 일정한 시간에 측정하였고 체중 증가량은 1주일에 1회 일정한 시간에 측정하였다.

③ 실험동물 희생

실험동물은 부검 12시간 전에 식이를 제거하여 해부 직전 한 마리씩 Ether 흡입 마취 후 부검을 실시하였다. 마취 후 해부대에 고정하고 복부를 갈라 심장에서 주사기를 이용하여 혈액을 채취하였고 채취한 혈액은 원심분리기에서 3000rpm으로 30분 간 원심분리하여 혈청을 뽑아내고 냉동 보관 하였다. 장기는 간, 신장, 비장, 흉선, 부고환지방을 적출하였으며 적출 후 생리식염수로 세척하고 물기를 닦아 무게를 측정한 뒤 개별 포장하여 라벨을 부착한 후 냉동 보관하였다.

마. 건강식품 및 건강음료에 대한 소비자 요구도 조사

(1) 조사 목적

오계펩타이드 한방음료의 제품화에 앞서, 최근 급부상하고 있는 중국 시장을 타깃으로 건강식품의 수출 전망과 시장 가능성을 타진하기 위하여 중국인을 대상으로 소비자 요구도 조사를 실시하였고, 한국인 소비자와 비교 분석하고자 하였다.

중국 건강식품 시장의 경우 가격 경쟁 보다는 제품의 품질 경쟁으로 고부가가치 제품 개발이 필요하며, 중국의 경우 오픈계를 활용한 건강식품이 시판되고 있어 미국이나 유럽시장에 비해

시장 진출이 용이할 것으로 평가된다.

최근 국내외 건강식품 동향 분석 보고서에 따르면, 건강식품의 구매자가 점차 20~30대 젊은 층과 40대로 확대하고 있어 잠재적 소비자로 분류되고 있으므로, 2차년도 건강음료에 관한 주부를 대상으로 한 소비자 요구도 예비 조사를 바탕으로 조사 대상자를 20대에서 60대까지 확대 실시하였다.

(2) 조사 방법

(가) 설문지 개발 및 요구도

설문조사는 10가지 문항으로 개발되었고, 조사 내용은 일반사항, 건강식품 복용 경험, 건강음료 이용 목적, 구입경로, 건강음료 구입이 필요한 가족 등이 포함되었다. (Table 9. 설문지).

Table 9. A Study on the Needs of Healthy Food Consumers Utilizing the Computer-Based Five Food System

<p>乌骨鸡功能性饮料的需求度调查研究</p>	<p>연산 오계 활용 건강식품 소비자 요구도 조사</p>
<p>尊敬的先生/女士：</p> <p>您好，感谢您在百忙之中填写这份问卷，这是一份关于功能性饮料的需求度问卷调查，需要了解您对下列问题的真实想法，您的回答有正确与错误的区别，只要是您的真实想法，都是对我莫大的帮助。本问卷采用不记名的方式填写，所收集的信息仅用于产品开发研究，不用做其他用途，回答前请先仔细阅读问题，逐一回答，不要遗漏。谢谢您！</p> <p>1.您现在是否有过一周2回以上服用过营养补充剂或者健康机能性料？[单选题] [必答题]</p>	<p>조사소개 : 본 조사는 농림수산부의 고부가가치식품기술개발의 일환인 한국 특용 가금자원을 이용한 기능성 소재 및 가공식품 개발을 위한 소비자의 요구도를 분석하고, 개발된 제품에 대한 평가를 하고자 합니다. 모든 자료는 연구 및 제품개발을 위한 목적으로만 사용될 것이며, 익명으로 처리되오니, 아래에 기술한 내용을 참고하셔서 설문에 답해주시기를 바랍니다.</p> <p>문제 1) 현재 주 2회 이상 복용 중인 영양보충제를 포함한 건강 기능성 식품 혹은 음료가 있습니까? 1. 예 2. 아니요</p>

중국과 한국 소비자들이 섭취한 기능성 음료의 종류와 섭취 목적에 대해 on line 조사 (중국어: <http://www.wjx.cn>, 한국어: <http://www.ksdcdb.kr>)를 실시하였다. 중국인 800명, 한국인 200명, 총 1000명의 성인을 대상으로 조사를 실시하였으며, 중국 소비자들은 중국내 남방, 북방의 34개의 행정구에서 조사되었다.

(다) 통계처리 방법

설문 결과는 각 항목별로 한국인과 중국인의 건강음료 복용 패턴을 비교하여 제시하였다. 한국인과 중국인의 건강음료에 대한 인식도 차이에 대한 유의성 평가는 SPSS 프로그램(ver 14.0)을 사용하여 유의수준 0.05를 기준으로 실시하였다. 한국인과 중국인의 건강음료 이용에

대한 비교 및 연령별 건강음료 이용에 대한 비교는 Chi-square analysis를 이용하여 분석하였고,

기타 건강음료 이용목적, 구입경로 등의 순위 항목들은 대상인원과 사회 및 국가간 차이로 인해 통계처리 하지 않고 순위 점수를 산출하여 그 결과만 제시하였다. 설문 조사 결과는 주로 항목별 빈도수를 제시하였고, 관능평가 결과는 평균±표준편차로 나타내었다.

바. 오계 펩타이드 한방음료의 평가

(1) 오계 펩타이드 한방음료의 관능 평가

(가) 관능검사 시료 준비

관능검사 시료 제조 방법은 동의보감처방에 따라 대전대학교 지역혁신센터에서 만든 쌍화탕 (SA1, SB1, SC1)에 8가지의 식품첨가물 (D-솔비톨 0.11mg, 함수구연산 0.16mg, 구연산삼나트륨0.04mg, 비타민 C 0.07mg, 탄산수소나트륨 0.2mg, 말산 0.04mg, 제2인산칼륨 0.03mg, 올리고당10,000mg)을 첨가하여 제조한 것에 오계 펩타이드 분말의 양 (0mg(SB1),500mg(SB2),1,000mg(SB3))을 다르게 첨가하여 제조한 하여 준비하였다. 두 번째 세트는 동의보감 처방에 감초 함량을 2배로 개량하여 만든 쌍화탕 음료 100g에 동일한 식품첨가물과 오계 펩타이드 분말을 각각 0mg(SB1), 500mg(SB2), 1,000mg(SB3)을 첨가하여 제조하였다. 세 번째 세트는 한 것, 동의보감 처방에 계피를 2배로 개량하여 만든 쌍화탕 음료 100g에 동일한 식품첨가물과 오계 펩타이드 분말을 각각 0mg(SC1), 500mg(SC2), 1,000mg(SC3)을 첨가하여 제조하였다.

각 시료에는 Table 10과 같이 샘플번호를 부여하였다

Table 10. Various cooking conditions of Yeonsan Ogye Peptide Ssanghwatang

Materials	Additives	code
Ssanghwatang	None	S1
	food additive +Yeonsan Ogye Peptide 500mg	S2
	food additive +Yeonsan Ogye Peptide 1,000mg	S3
Ssanghwatang (Cinnamomum 6g)	None	SC1
	food additive +Yeonsan Ogye Peptide 500mg	SC2
	food additive +Yeonsan Ogye Peptide 1,000mg	SC3
Ssanghwatang (Glycyrrhiza 6g)	None	SG1
	food additive +Yeonsan Ogye Peptide 500mg	SG2
	food additive +Yeonsan Ogye Peptide 1,000mg	SG3

(나) 관능검사 방법

일반 소비자 30명을 패널로 선정하고, 제품의 기호를 측정에 사용되는 9점 기호 척도법으로 맛(단맛, 신맛, 쓴맛, 맛 기호도)과 향(구수한 향, 누린내, 시큼한 향, 비린내, 향미 기호도), 색, 농도, 종합적 기호도를 평가하였다(5점:매우 좋다/강하다 ←→ 1점:매우 싫다/약하다).

시료는 평가 전날 제조하여 냉장 보관 후 사용하였고, 검사물의 제공량은 각 10ml로 균일하게 맞추어 동일한 용기(일회용 컵 사용)에 담아 패널에게 제공하였다. 검사물은 1회에 9가지 시료를 한번에 제시하여 일반 쌍화탕 음료(SA1), 일반 쌍화탕 펩타이드 500mg 음료(SA2), 일반쌍화탕 펩타이드 음료(SA3)와 감초 쌍화탕 음료(SB1), 감초 쌍화탕 펩타이드 500mg 음료(SB2), 감초 쌍화탕 펩타이드 음료(SB3), 계피 쌍화탕 음료(SC1), 계피 쌍화탕 펩타이드 500mg 음료(SC2), 계피 쌍화탕 펩타이드 음료(SC3)와 비교 평가하였다.

음료 평가시 평가 순서를 펩타이드가 들어 있지 않은 SA1, SB1, SC1을 먼저 평가하도록 하였고, 그 다음으로 SA2, SB2, SC2, SA3, SB3, SC3의 순으로 평가하도록 하였다. 각 평가시 시료의 재음미를 허용하고, 각 시료 음미 사이에 물을 마시고 입을 헹구 낼 수 있도록 생수를 같이 제공하였다.

(2) 오계 펩타이드 한방음료의 in-vivo 흡수율 평가

(가) 평가 방법

동물실험을 통해 투여 전 후 혈중 아미노산 수준을 비교하여 오계 펩타이드 한방음료 섭취 후 흡수율을 평가하고자 하였다.

실험동물은 9주령 Sprague-Dawley종 흰쥐는 수컷 30 마리를 구입하여 2일 동안 고형 배합사료로 예비 사육 후 체중에 따라 난괴법으로 5마리씩 6 그룹으로 나누어 오계 펩타이드 음료 6 종류의 흡수율을 실험하였다.

오계펩타이드한방 음료의 흡수율을 평가하기 위하여 쌍화음료에 펩타이드를 0, 500, 1000mg 을 gastric tube로 흰쥐에게 투여하고 혈중 아미노산의 차이를 통해 흡수율을 평가하고자 하였다.

시료 용액을 주사기로 각 5m씩 투여 후, 일반적으로 아미노산의 흡수가 완료되는 시점으로 알려진 1시간 뒤 혈액을 개복 없이 heart puncture 방식으로 채취하여 2반복 실험하여 혈중 개별 아미노산의 평균값을 구하여 흡수율을 분석하였다.



Fig 5. in-vivo Animal Experiment Process for Evaluation of Absorption Rates

사. 오계펩타이드 경옥고 환 개발

(1) 건강기능성 식품인 오계펩타이드 경옥고 환 개발 컨셉

오계 펩타이드 기능성과 자양강장 효과가 알려진 경옥고를 이용하여 바탕으로 오계 펩타이드 경옥고 환 제품을 개발하였다. 오계 펩타이드에 자양강장 효과가 알려진 경옥고, 기호도 향상을 위해 우리나라 토종 벌꿀을 더하여 제조하였고, 관능성과 환제품 성형에 필요한 국내산 찹쌀가루로 구성하여 레시피를 만들었다.

(2) 오계 펩타이드 한방음료 및 오계경옥고환 용액의 효능 평가

(가) 혈중 지질 농도에 미치는 영향

오계펩타이드 한방음료가 혈중 지질농도에 미치는 영향을 보기 위하여 4주간 쌍화탕과 경옥고에 오계펩타이드를 첨가한 용액을 4주간 흰쥐에게 투여하고 혈중 중성지방, 총 콜레스테롤 농도, HDL-콜레스테롤 농도를 분석하였다.

(나) 항산화에 미치는 영향

오계 펩타이드 한방음료와 오계경옥고 펩타이드 환의 생체 내 항산화 작용을 평가하기 위하여 간의 일산화질소(NO)와 과산화 지질(MDA), 대표적 항산화 효소인 SOD 활성도와 CAT 활

성도를 비교하였다.

아. 오계부산물을 활용한 조미육수 및 조미용 첨가제품 개발

(1) 오계 부산물 육수를 활용한 조미육수 개발 컨셉

오계 펩타이드 활용 및 HMR 활용에 따른 부산물인 오계 머리를 이용하여 조미육수를 개발하고자 하였다. 1차년도 연구 결과 오계 부산물 육수의 경우 비타민과 무기질 등 미량 영양소 함량이 일반 오계 육수에 비해 높아 생산 비용을 절감할 수 있는 좋은 소재로 평가되었다.

오계 머리는 도축과 동시에 슬을 이용하여 깨끗하게 세척되었고 즉시 냉동하여 실험 조리에 활용하였다.



Fig 6. 부산물 조미 육수 제조에 활용된 오계 머리 부위

(2) 오계부산물을 활용한 조미용 첨가제품의 관능평가

(가) 관능검사 시료 준비

오계부산물을 활용한 조미 육수의 경우 일반 양계 머리에 일반 양계 발, 향미채소4종(양파 100g, 마늘30g, 당근90g, 셀러리30g)에 월계수잎을 베이스로 제조한 것 (C1)을 대조시료로 하고, 오계머리와 일반 양계 발(발톱제거된 것), 향미채소 4종에 월계수잎을 베이스로 한꺼번에 삶아 제조한 것(Y1), 오계머리와 일반 양계 발, 향미채소 4종에 월계수잎을 베이스로 오븐에 구워 브라운스톡제조방법으로 제조한 것(Y2)으로 총 3가지의 시료를 제조하였다. 각 시료에는 Table 11과 같이 샘플번호를 부여하였다.

Table 11. Various cooking conditions of Yeonsan Ogye Chicken head stock and Normal Chicken head stock

Materials	Additives	Sample code
Normal Chicken head stock	Boiled Onions, celery, carrots, garlic, laurel leaves	C1
Yeonsan Ogye Chicken head stock	Boiled Onions, celery, carrots, garlic, laurel leaves	Y1
	Roasted Onions, celery, carrots, garlic, laurel leaves	Y2

(나) 관능검사 방법

관능검사는 관능평가 훈련을 받은 30명을 패널로 하여, 제품의 기호도 측정에 사용되는 5점 기호 척도법으로 맛(단맛, 짠맛, 쓴맛, 감칠맛)과 향(구수한 향, 비린내), 맛의 기호도와 종합적 기호도를 9점 척도로 평가하였다(9점:매우 좋다/강하다 ←→ 1점:매우 싫다/약하다).

시료는 평가 전날 제조하여 냉동 보관 후 검사직전 해동하여 사용하였고, 검사물의 제공량은 각 20ml로 균일하게 맞추어 동일한 용기(일회용 컵 사용)에 담아 패널에게 제공하였다. 검사물은 1회에 3가지 시료를 한번에 제시하여 일반 양계머리 육수(C1)와 연산오계머리육수(Y1), 구운 연산오계 머리육수(Y2)를 비교 평가하였다. 각 평가시 시료의 재음을 허용하고, 각 시료 음미 사이에 물을 마시고 입을 헹구 낼 수 있도록 생수를 같이 제공하였다.

관능평가 결과는 SPSS를 이용하여 통계처리 하였으며, 모든 자료는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 각 시료별 맛, 향, 기호도의 차이는 paired t-test를 이용하여 평균값의 유의성을 검증하였다. 모든 자료는 유의수준 0.05로 평가되었다.

자. 최종 개발 제품의 영양소 함량 분석

(1) 오계펩타이드 한방음료, 오계경육고 펩타이드 환, 오계부산물 조미육수의 일반성분

최종 레시피로 개발된 제품 3종을 전남대학교 공동실험실습관에 성분분석을 의뢰하였으며 각 제품별로 식품성분 분석을 진행하였다. 성분분석 항목은 일반성분 분석(수분, 조회분, 조단백질, 조지방(한방환제품만 분석)), Vitamin A/E, Vitamin B군, Vitamin C, Total fatty acids, Amino acid 총 6가지 항목이다.

4. 연구 결과

가. 시장조사 결과

(1). 시판 중인 피로회복 및 자양강장 음료 시장 조사 결과



현재 국내 시판 중인 피로회복 및 자양강장 음료는 크게 비타민 음료나 에너지드링크, 발효 음료, 간기능 개선 및 숙취개선 음료로 판매되고 있었다. Table12은 현재 시판 중인 피로회복 및 자양강장 음료와 그 함량에 관한 것이다.

현재 시중에 유통중인 건강음료의 시장조사를 실시 결과, 동물성 식품을 원료로 한 기능성음료는 거의 전무한 실정이며 생약재나 한방 음료의 가격이 가장 높게 책정되어 있으며, 대개 10개입 10,700~21,000원 정도로 판매되고 있었다. 판매 제품의 형태 및 용량은 바이얼 형태의 경우 50mL, 병입 제품이나 파우치 제품은 100~120mL 단위로 판매되고 있음을 알 수 있었다.

또 최근 생약재를 활용한 기능성음료 소재 발굴의 트렌드는 단일 생약재 보다는 다양한 생약재 복합에 의한 한 가지 이상의 효능을 기대하고 있다는 것이 생약재 소재 기능성 음료 특유의 특징이라고 할 수 있다.

그러나, 생약재의 경우, 인체에 유용한 생리활성 물질이 많이 함유되어 있음에도 불구하고, 특유의 쓴맛과 신맛, 떫은 맛 등으로 인해 음료 가공 소재로 부적합하다는 문제를 가지고 있어 관능적 문제를 해결하고 동시에 최적의 생리활성을 나타내는 생약재를 선별하여 조합하는 것이 중요하다고 하겠다.

Table 12. Market research for Functional beverage product

Cate-gories	Base material	Companies	Product type	Volume	Price (ae)
피로회복, 자양강장	타우린, 비타민B1 등	 박카스D 10병 박카스D (동아제약)	liquid	100ml	520~
	흑마늘 혼합추출물94%	 발효숙성 흑마늘600 (풀무원)	liquid	80ml	1,800~

	<p>침즙 77%, 헛개나무농축액 1.1%</p>	 <p>침즙과 헛개나무 (폴무원)</p>	liquid	120ml	2,455~
피로회복, 자양강장	<p>쌍화탕 연조엑스</p>	 <p>쌍화탕 (동화약품)</p>	liquid	100ml	500~
	<p>쌍화골드농축액</p>	 <p>쌍화골드 (광동제약)</p>	liquid	100ml	500~
면역기 능 증진	<p>아연 비타민C 비타민D</p>	 <p>부스트오리지날 (네슬레)</p>	liquid	237ml	3,100~
과일식 초	<p>석류식초48.9%, 파인애플농축액, 3색정통발효식초</p>	 <p>마시는 홍초 바이탈 플러스 석류 (대상 청정원)</p>	liquid	900ml	4,800~
	<p>청포도발효식초2 5%, 청포도 농축액</p>	 <p>뽀띠첼 미조 청포도 (CJ제일제당)</p>	liquid	500ml	2,990~
비타민 음료	<p>비타민C</p>	 <p>비타500</p>	liquid	100ml	450~

(광동제약)

비타민C



비타파워
(롯데칠성음료)

liquid

100ml

390~

비타민C



오로나민C
(동아오즈카)

liquid

120ml

790~

사과농축과즙,
수용성대두다당
류



데일리C 비타민워터
스킨글로우
(롯데칠성음료)

liquid

500ml

960~

아세로라추출물,
블루베리농축액,
라즈베리농축액



브이푸드 비타민 위크
(한국야쿠르트)

liquid

20ml

2,000

생마 퓨레 13%,
우유 15%,
바나나퓨레



한뿌리 마
(CJ제일제당)

liquid

120ml

1,070~

인삼분말2.613%



한뿌리 인삼유
(CJ제일제당)

liquid

120ml

1,635~

한방음
료

홍삼농축액5%,
식물성분(황기,
대추, 구기자,
생강,오미자)무기
염류, 타우린 등



활기력
(정관장)

ample

20ml





2,100~

	홍삼농축액 3%		liquid	50ml	1,720~
	대두발효추출액, 커큐민, 표고버섯균사체 추출분말, 칩, 대추, 매실, 맥문동 등		liquid	100ml	3,500~
숙취해소	열대과일농축액 3.0%, 레드오렌지 농축액 2.4%,		liquid	120ml	2,800~
	헛개나무열매추출 농축액 1.3%		liquid	100ml	2500~
	밀크씨슬추출분 말, 과라나추출분말, 울금엑기스 분말, 미아대두추출액		liquid	100ml	1,700~
에너지 대사개 선, 다이어 트음료	가르시아 캄보지아 추출물 1.3% HCA, 나이아신		liquid	100ml	1,580~

(2). 미국의 음료증강제 (LWE) 시장 조사 결과

다음은 미국에서 판매되는 음료증강제 대표 제품들이다.(Table 13)

Table 13. Beverage enhancer

브랜드	Mio	Dasani Drops	Minute Maid Drops	Skinnygir
제조업체	Kraft Foods Inc.	Coca Cola Company	Coca Cola Company	Heartland Food Products Group
LWE				
가격	\$3.50 ~ 7.50 (1.62 fl oz)	\$3.59 ~ 5.00 (1.9 fl oz)	\$3.50 ~ 3.99 (1.9 fl oz)	\$3.49 ~ 4.99 (1.62 fl oz)
특징	- 오리지널, 에너지, 휘트니스로 3가지 분류에 따른 12가지 이상 맛 - 소량 설탕과 저칼로리 제품 - 액이 새지 않는 용기	- 천연재료 사용 - 제로 칼로리 - 6가지 종류의 맛 출시	- 4가지 종류의 맛 - 소량을 첨가해 주스의 맛을 낼 수 있음.	- 천연 맛과 향을 사용 - 4가지 종류의 맛 - 5칼로리


주: 온라인마켓에서 판매되는 가격임. Mio 제품은 오리지널, 에너지, 휘트니스 등 종류에 따라 가격차이 남.








자료원: Mio , Dasani , Minute Maid , Skinnygirl <http://blog.seoulfood.or.kr/700>




(3) 시판 중인 펩타이드 제품 시장조사 결과

본 연구에서는 전년도 기능성 물질로 연산오계 유래 저분자 펩타이드를 원료로 기능성 음료를 개발하고자 하였으며, 현재 시판 중인 펩타이드 제품에 대한 조사를 실시하였다. 현재 시판 중인 펩타이드를 원료로 한 기능성 음료는 콜라겐 펩타이드, 콩 펩타이드, 유청 단백질 펩타이드 음료가 주를 이루고 있다(Table 14).

Table 14. Market research for Functional beverage product

Cate- gories	Product and Companies	Function	Produc t type	Volume	Price
Collagen Peptides	 센스 콜라겐 (JW pharma)	- 피부 밸런스 - 콜라겐 보충	Powder	2g*30	18,000

	<ul style="list-style-type: none"> - 혈압조절 - 면역기능 	Pouch	600ml*1 20	228,000
리턴큐 (Cosmaxbio)				
	<ul style="list-style-type: none"> - 피부 개선 - 수분, 보습 	Powder	4g*30	150,000
유한m콜라겐 (Korea C&S pharm)				
	<ul style="list-style-type: none"> - 피부보습 - 피부탄력 	과립형	2g*7	53,000
에버콜라겐타임 (유스랩)				
	<ul style="list-style-type: none"> - 피부보습 	liquid (bottle)	100ml*1 0	12,000
이너비				
	<ul style="list-style-type: none"> - 피부미용 - 피부회복 	liquid (bottle)	100ml	1,500
콜라겐 5000 (칠성음료)				
	<ul style="list-style-type: none"> - 피부회복 - 피부미용 	liquid (bottle)	180ml	750
하이콜라겐				
Silk Peptides	<ul style="list-style-type: none"> - 소화기능 - 단백질 보충 	Powder	2.4g*45	68,000
				

<p>실크 단백질 (Sindobiosilk)</p>		<p>- 단백질 보충</p>	<p>Powder</p>	<p>3g*90</p>	<p>50,000</p>
<p>실크 파우더 100 (Sindobiosilk)</p>		<p>실크단백질 0.07% - 아침대용</p>	<p>Powder</p>	<p>20g*90</p>	<p>35,000</p>
<p>모닝 실큐 천마차 (Goodmorning world)</p>		<p>실크펩타이드 0.1% - 아침대용</p>	<p>Powder</p>	<p>20g*50</p>	<p>20,000</p>
<p>천잠 골드 (Chunzam)</p>		<p>- 건강유지 - 건강증진 - 체질개선</p>	<p>Powder</p>	<p>2.5g*30</p>	<p>169,000</p>
<p>위너 프라센 골드 (CKDHC)</p>		<p>- 피부보습 - 호흡촉진작용</p>	<p>Ample</p>	<p>20ml*36</p>	<p>65,000</p>
<p>펩타이드 커피</p>		<p>- 건강유지</p>	<p>Powder</p>	<p>12g*100 (펩타이드 드 0.08%)</p>	<p>25,000</p>

	실큐아라비카 (제이앤푸드)		함유)		
검은콩 펩타이드	 검은콩 펩타이드 (농심)	- 체지방 감소 - 혈압강하 - 혈당 조절	liquid (bottle)	30ml*30	20,900
정어리 펩타이드	 정어리펩타이드 (농심)	- 혈압조절	Pill	72g*120	160,000

* Datas are based on April 2016.

현재 시판 중인 펩타이드 제품은 대부분 파우더 형태였고, 음료 형태는 20mL짜리 앰플용과 120 mL 짜리 파우치용 제품이 있었고, 가격은 일반 기능성 음료나 한방음료에 비해 18,000 원~22,800원까지 높은 가격이 형성되어 있었다.

(4) 시판 중인 건강기능 환제품 시장 조사

현재 시중에 유통중인 건강음료의 시장조사를 실시 결과, 동물성 식품을 원료로 한 기능성음료는 거의 전무한 실정이며 침향 등 고가의 국내산 한약재로 제조된 제품의 가격이 가장 높게 책정되어 있으며, 평균 10~30환 정도 저렴한 제품은 5,900~399,000원까지 다양한 가격대로 판매되고 있었다.

판매 제품의 형태 및 용량은 녹두환형태의 경우 150g, 날개의 병입 제품으로 1세트 단위로 판매되고 있음을 알 수 있었다. 다음은 현재 시판 중인 건강기능 환제품과 그 함량에 관한 것이다(Table 15).

Table 15. Market research for Functional beverage product

Cate- gories	Base material	Companies	Product type	Volume	Price (ae)
피로회 복, 자양강 장	미네랄, 식이섬유 ,비타민B1 등	 인진썩환 (동광제약)	Solid	150g	5,900~



유근피, 찹쌀 등		Solid	150g	7,500~
	유근피환 (동광)			
당귀, 산수유 녹용추출액 등		Solid	3.75g x 60	90,000~
	황보환 (중근당 건강)			
당귀, 산수유, 홍삼, 녹용 등 식품혼합분말첨 가		Solid	3.75g x60	197,200~
	기력보환 (농협홍삼 한삼인)			
녹용16%, 당귀16% 등		Solid	5g x 10	213,700~
	황궁환 (홍가원)			
침향, 구기자 등		Solid	4.5g x 20	198,100~
	황제침향원 (네슬레)			
금지환식물혼합 분말, 당귀분말 등		Solid	3.75g x 60	72,000~
	삼성금지환 (삼성 제약공업)			
인삼, 율복, 지황, 꿀 등		Solid	3.75g x 30	152,000~

	궁중대보환 (옵니허브)				
꽃송이버섯, 홍삼, 꿀 등	 꽃송이홍삼 수옥환 (나우리)	Solid	4.8g x 10	71,500~	
침향,구기자, 복분자,오미자 등	 왕실침향인 (왕실침향인)	Solid	4g x 10	180,000~	
건지황분말, 복령분말 등	 정우상왕환 (두두바이오)	Solid	3g x 30	79,000~	
당귀, 작약, 산약,오가피 하수오 등	 황실공봉환골드 (경주생약)	Solid	3.75g x 30	399,000~	

(5) 닭을 이용한 조미료 시장조사 결과

다음은 우리나라에서 판매되는 닭을 이용한 조미료 제품들의 시장조사 결과이다.(Table 16)

Table 16. Chicken seasoning

Cate- gories	Base material	Companies	Product type	Volume	Price (ae)
닭육수 (liquid)	닭뼈, 양파 등	 참프레 닭육수 (참프레)	liquid	700ml	1,790~
	닭뼈, 닭육수향, 양파분말,		liquid	960ml	8,821~

로즈마리 등	오가닉 프리 레인지 닭육수 (Pasipic/수입제품)			
닭뼈 26%, 무 20%	 자연맛 육수-닭사골 (뽀뽀뜨)	liquid	200ml	2,000~
닭뼈, 야채분말 (당근, 양파, 버섯, 셀러리), 후추, 월계수잎, 백리향	 오리지널 치킨스톡 닭육수 (KitchenBasics)	liquid	233ml	1,800~
치킨스톡엑기스 텍스트린 정제염	 다시다 요리수 치킨스톡 (CJ제일제당)	liquid	300ml	3,900~
치킨맛육수베이스 12%	 첫맛 닭육수 진국 (청우식품)	extract	1,000ml	8,900~
닭육수 농축액 (extract) 유기농닭뼈추출물 89%, 닭고기 등	 유기농 치킨스톡 (헬로네이처)	extract	200ml	7,900~

치킨맛육수엑기스



extract 1,000ml 8,100~

진한닭육수
(초담원)

치킨스톡,
양파시즈닝



extract 1,000ml 9,680~

다시다 치킨스톡
(CJ)

제니스엑기스,
치킨엑기스-180



extract 1,100ml 9,600~

치킨스톡농축액
(코리아제니스)

닭고기추출물3%
,
닭고기지방
2.5%



extract 1,200ml 15,530~

매기콘센트레이트치킨
스톡
(네슬레)

치킨육수엑기스
6%



extract 1,000ml 9,200~

청정원치킨스톡
(청정원)

<p>치킨육수농축액 48.78%</p>		<p>extract</p>	<p>340ml</p>	<p>5,940~</p>	
<p>청정원셰프의치킨스톡 (청정원)</p>					
<p>치킨육수엑기스 15%</p>		<p>extract</p>	<p>2,000ml</p>	<p>10,800~</p>	
<p>치킨스톡 (대상 셰프원)</p>					
<p>계골추출물91%</p>		<p>extract</p>	<p>1,000ml</p>	<p>15,000~</p>	
<p>미가푸드 닭육수농축액 (미가푸드)</p>					
<p>정제염, 치킨맛분말</p>		<p>powder</p>	<p>1,000g</p>	<p>13,000~</p>	
<p>계정 (화미)</p>					
<p>닭육수 분말 (powder)</p>	<p>닭고기분말 5.47%, 닭고기유지 1.497%</p>		<p>powder</p>	<p>1,000g</p>	<p>11,000~</p>
<p>크노르치킨 파우더 (CJ제일제당)</p>					

<p>닭고기분말 9.0%, 닭고기유지 8.4%</p>		<p>powder cube</p>	<p>66g</p>	<p>7,700~</p>	
<p>닭고기 1.0% 닭고기지방 1.5%</p>		<p>powder cube</p>	<p>1,000g</p>	<p>12,000~</p>	
<p>닭육수 큐브 (powder cube)</p>	<p>닭고기분말 5.1% 닭고기지방 4.91%</p>		<p>powder cube</p>	<p>60g</p>	<p>5,500~</p>
<p>치킨시즈닝분말</p>		<p>powder cube</p>	<p>94g</p>	<p>6,500~</p>	
<p>건조닭고기 3.0% 천연닭고기향 0.5%</p>		<p>powder cube</p>	<p>110g</p>	<p>1,900~</p>	

향미증진제(닭고기향)0.3%



powder cube 720g 12,900~

델리쉬 치킨향 스탁 (델리쉬 터키)

주: 온라인마켓에서 판매되는 가격임. 수량, 포장 등 종류에 따라 가격차이남.
 자료원: NAVER 마켓, 이마트 물

나. 소비자조사 결과

(1). 건강음료에 대한 소비자 요구도 예비 조사 결과

(가). 예비 조사 대상 소비자

기능성 음료 개발 전 총 25명의 소비자를 대상으로 건강기능성 음료에 대한 요구도 조사를 실시하였다. 조사 대상자는 소비의 주체가 되는 30대 이상 여성을 대상으로 하였으며, 평균 연령은 43.96±8.16세였으며, 전체의 76%가 직장인이고, 나머지 24%는 전업주부였다(Table 17).

Table 17. Consumer general matters

연령	직업	
	직장인	전업주부
43.96±8.16	76%	24%

(나). 건강음료 복용 경험

현재 건강 유지와 질병 예방의 목적으로 이용하고 있는 시판 건강음료를 그 재료에 따라서 채소추출, 과일추출, 생약재 추출, 한약재 혹은 한방처방제, 생리활성물질 추출음료 및 비타민과 펩타이드, 벌꿀과 유산균 함유 음료로 나누고, 이러한 건강음료를 복용한 경험이 있는지에 대하여 조사하였다. 건강음료에 대한 질문에 전체의 96%가 섭취한 경험이 있다고 응답하였고, 본인이 복용하는 것 이외에 가족을 위하여 구입하는 것까지 포함하면 훨씬 더 많은 건강음료가 소비되고 있음을 알 수 있었다.

복용한 건강음료의 형태로 가장 많은 형태는 비타민 음료와 과일 추출 음료로 전체의 80%가 복용한 경험이 있다고 응답하였고, 그 외 양파즙, 마늘즙, 도라지즙, 미나리즙, 생강즙 등 매우 다양한 여러 가지 채소 추출음료가 판매되고 있었고 대상자의 56%가 복용해 본 경험이 있었다.

유산균 음료도 대상자의 68%가 복용한 경험이 있다고 했다. 생약재와 한방음료는 각각 44%와 60%를 차지하였다. 펩타이드 음료의 경우 24%가 복용 경험이 있다고 응답하여 최근 일반 소비자층으로 많이 확대되었을 알 수 있었다.

Table 18. Experience of drinking healthy drink

제품 분류	제품	사용 경험 (%)	
		있다	없다
채소 추출 음료	양파즙, 마늘즙, 도라지즙, 미나리즙, 생강즙, 야채즙 등	56%	44%
과일 추출 음료	아사이베리, 사과즙, 포도즙 등	80%	20%
생약재 소재 음료	어성초, 쑥, 녹차, 뽕잎, 동충하초, 알로에 등	44%	56%
한약재 포함 한방음료	녹용, 쌍화탕, 당귀, 진피, 울금, 산수유 등	60%	40%
펩타이드, 아미노산 음료	누에고치, 우유, 연어, 콩 펩타이드 등	24%	76%
벌꿀 유래 음료	프로폴리스, 로얄제리, 벌꿀 등	44%	56%
유산균 및 유가공 음료	헬리코박터 억제 음료 등	68%	32%
키토산/식이섬유/생리활성물질	루테인, 리코펜, 이소플라본 등	24%	76%
비타민/무기질 음료	비타민 C, 복합 비타민, 무기질 등	80%	20%
식사대용음료		48%	52%

(라). 건강음료 이용 목적

건강기능성 식품으로 허가된 제품 이외에 소비자들은 건강을 위해 선택하는 음료를 건강음료로 정의하였을 때 소비자들이 건강음료를 선택하는 이유는 매우 다양하게 나타났다. 조사 대상 소비자들이 기능성 음료를 이용하는 목적 중 가장 많은 사람이 1순위로 여긴 것이 ‘자양강장’과 ‘원기회복’이었다.

즉, 응답자의 40%가 자양강장이거나 원기회복을 기능성음료를 이용하는 가장 큰 목적으로 꼽았으며, 두 번째로는 24%의 응답자가 ‘암예방이나 면역증진’을 1순위로 꼽았다. 기타 혈압개선과 노화방지나 미용, 혹은 영양보충을 목적으로 건강음료를 활용하고 있었다(Table 19).

Table 19. Purpose of use of health drink

이용 목적	1순위 빈도	2순위 빈도	3순위 빈도	4순위 빈도	5순위 빈도
심혈관질환예방	8%	20%	7%	3%	3%
혈중 지질농도 개선					
자양강장, 원기회복	40%	13%	7%	10%	-
혈압개선	8%	-	3%	7%	17%
혈당개선	4%	3%	3%	-	3%
노화방지, 미용	8%	17%	13%	17%	3%
다이어트	-	3%	3%	10%	7%
숙취해소	-	3%	3%	-	7%
암예방, 면역증진	24%	23%	13%	3%	7%
학습향상	-	-	3%	-	3%
영양보충	4%	10%	17%	17%	13%
기타	-	-	-	-	-

(마). 건강음료 선택시 가장 중요하게 생각하는 요인

조사 대상 소비자들이 건강음료를 선택할 때 가장 중요하게 생각하는 요인은 ‘기능성’이었으며, 전체 대상자의 52%가 기능성이 가장 중요하다고 응답했다. 두 번째로는 ‘원재료와 원산지’, ‘형태’에 대한 것으로 각각 전체의 20%가 가장 중요한 점이라고 응답하였다. 또 2순위 선택요인으로는 가격을, 3순위 선택요인으로는 맛과 향미가 가장 많은 응답률을 보였다(Table 20)

Table 20. Factors most important to choosing healthy drinks

항목	1순위 빈도	2순위 빈도	3순위 빈도
기능	52%	13%	7%
맛과 향미	20%	17%	27%
브랜드	-	20%	17%
가격	4%	27%	17%
형태	-	7%	3%

판매처/구입처	-	-	-
원재료/원산지	24%	10%	23%

(바). 건강음료 구입처

조사 대상 소비자들의 건강음료 구입처는 비교적 다양하게 나타났으며, 그 중 가장 많은 비율을 차지했던 것은 약국으로, 전체의 28%가 약국을 이용하는 것으로 나타났다. 그밖에 대형마트 역시 건강음료의 주요 구입처임을 알 수 있었으며, 기타 병원과 한의원에서도 건강음료를 구입하는 경우들이 비교적 높은 것을 알 수 있었다(Table 21).

Table 21. Health Beverage Purchase

항목	1순위 빈도	2순위 빈도	3순위 빈도
구입한 적 없음	8%	-	-
백화점	8%	3%	13%
대형마트	24%	30%	7%
약국	28%	17%	23%
병원/한의원	12%	17%	23%
방문판매	20%	10%	10%

(사). 건강음료가 필요한 가족

건강음료가 가장 필요하다고 생각되는 가족으로는 부모님이라고 응답한 비율이 44%로 가장 높았고, 다음으로는 본인에게 건강음료가 필요하다고 응답한 경우도 36%로 나타났다. 2순위로는 40%가 배우자라고 응답하였다(Table 22).

Table 22. A family in need of healthy drink

항목	1순위 빈도	2순위 빈도	3순위 빈도
없음	8%	-	3%
본인	36%	27%	17%
배우자	8%	40%	17%
자녀	4%	-	33%
부모님 (노인)	44%	20%	13%

(2). 건강식품 및 건강음료에 대한 소비자 요구도 조사 결과

(가). 조사 대상 소비자 일반사항

조사 대상자는 중국인 성인 826명, 한국인 206명으로 하였으며, 평균 연령은 한국인 20.0±7.1, 중국인은 35.1±12.2세였으며, 전체의 71%가 직장인이고, 나머지 29%는 학생이었다.(Table 23)

Table 23. Consumer general matters

연령		직업	
한국인 (n=206명)	중국인 (n=826명)	직장인	학생
30.0±7.1	35.1±12.2	71%	29%

평균±표준편차, N (%)

(나). 건강식품의 이용도

중국인과 한국인 대상자의 건강식품 섭취 현황을 보기 위하여 주당 2회 이상 건강식품을 이용하는지 여부를 질문하였다. Table 24과 같이 중국인 대상자의 10.6%가 일주일에 2번 이상 건강식품을 섭취하였고 한국인 대상자들은 23.0%가 일주일에 2번 이상 건강식품을 이용한다고 응답하였다. 한국인에서 건강음료의 이용도가 중국인에 비해 더 높은 것을 알 수 있었다. 또 중국인에서 89.4%, 한국인에서 77%는 2번 미만으로 섭취하는 것으로 조사되어 아직까지는 건강식품의 이용비율이 높지 않은 것으로 조사되었다.

Table 24. Number of times Koreans and Chinese intake of healthy drink (including nutrition supplement)

	한국인 (n=206)	중국인 (n=826)	전체 (n=1032)	Chi-square
2번 이상	47명(23.0)	88명(10.6)	135(13.1)	21.448***
2번 미만	159명(77.0)	738명(89.4)	897(86.9)	

***P<0.001

연령대별 건강음료 섭취 빈도를 살펴본 결과 2번 이상 섭취하는 빈도는 유의적이지는 않았으나 20대와 50대 이상에서 30~40대에 비해 더 높은 경향을 보여 20대 역시 건강음료의 이용비율이 높음을 알 수 있었고, 건강음료 개발시 타겟 소비자층을 양분화할 필요성이 있을 것으로 생각된다. (Table 25)

Table 25. Number of times healthy drink intake by age group N(%)

연령	18-29세 (N=355)	30-49세 (N=484)	50세 이상 (N=193)	Chi-square
2번 이상	56(15.8)	53(11)	26(13.5)	4.224
2번 미만	299(84.2)	431(89)	167(86.5)	

(다). 건강음료의 이용도

중국인과 한국인 모두 건강음료에 대한 이용도가 높게 나타나, 대부분의 조사대상자들이 1가지 이상의 건강음료를 이용한 경험이 있었다. 최근 생활수준의 향상으로 건강에 대한 관심이 높아져 기호 이외에도 음료 섭취를 통해 생체 방어나 생리조절능력 등에 대한 관심이 높아지고 있는데, 본 연구 결과에서도 이러한 경향이 반영된 것이라고 할 수 있다.

(라). 이용하는 건강음료 종류

한국인의 경우 과일추출음료와 비타민무기질 음료의 섭취가 가장 높았고, 중국인의 경우 과일추출음료와 요구르트 등의 유가공음료의 섭취 빈도가 가장 높았다. 과일추출음료는 과일을 농축하여 비타민과 무기질, 생리활성물질 등 과일의 영양성분을 섭취할 수 있다.(Fig 7).

연령별 건강음료의 이용도를 살펴본 결과, 20대의 경우 채소추출 음료나 과일 추출음료, 비타민 음료의 이용이 높았고, 생약재나 한약재로 만든 음료의 경우 30~40대의 이용이 높았으며, 프로폴리스 음료나 로얄제리 음료 등 벌꿀 유래 음료의 이용은 50대 이상에서 높게 나타났다. 또 식사대용 음료의 경우 20~40대에서 가장 높게 나타나, 바쁜 생활 속에서 식사대용음료로 건강음료를 많이 선택하는 것을 알 수 있었다(Table 26).

생약재 함유 음료와 한약재 함유 음료의 이용은 한국인의 경우 각각 41.7%와 48.5%, 중국인의 경우 각각 35.5%, 14.1%로 나타나 다른 건강음료에 비해 이용도가 높은 편이었다. 최근 다양한 한약재와 약용식물에 대한 기능성이 보고되고 있고, 오미자, 진피, 홍화, 산약, 두충, 인삼, 홍삼, 민들레, 동충하초 등의 기능성에 대한 연구들이 활발하게 이루어지고 있지만 아직까지도 과학적인 근거가 부족한 생약재나 한약재를 포함한 음료들도 많아 이에 관한 연구가 필요한 실정이다. 따라서 과학적 근거를 바탕으로 한 한방음료의 개발은 국내 시장뿐만 아니라 전통적 소재를 활용하여 세계 시장에 진출할 수 있을 것으로 생각되며, 특히 중약재 음료에 익숙한 중국인들의 경우 거부감이 적을 것으로 생각된다.

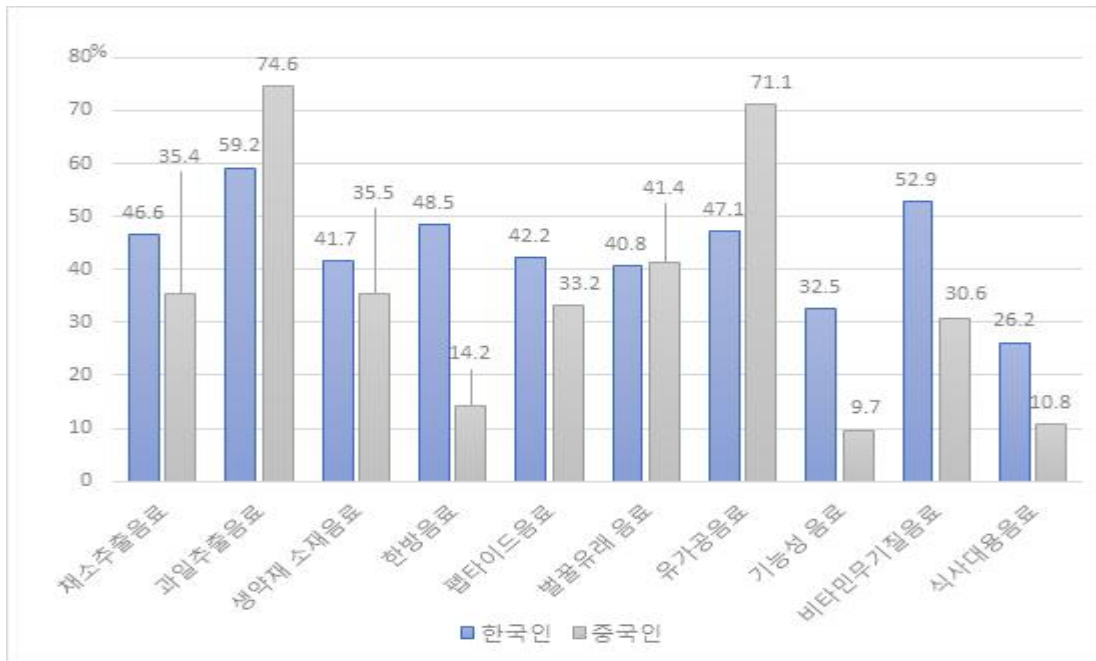


Fig 7. 한국인과 중국인의 이용하는 건강음료의 종류

실제로 중국의 음료 시장을 살펴본 결과, 전체 음용수나 탄산음료의 시장점유율 47.6%를 제외하고 차와 한방음료의 비중이 각각 16.4%와 7.2%로 시장 점유율이 가장 높다고 할 수 있다.

생약재의 경우 주로 식물 소재로 폴리페놀 성분들이 풍부하고, 과일이나 채소류에 비해 약리 효과가 우수하여 음료의 주원료나 부재료로 활용이 가능하다. 특히 식물류의 항산화 활성과 면역기능의 조절, 질병 예방 및 노화 지연에 대한 기대에 대한 일관성 있는 효과가 보고되고 있다. 펩타이드 함유 음료의 이용도도 중국인 33.17%, 한국인 42.2%로 예상했던 것에 비해 높았는데, 현재 시판 중인 펩타이드를 원료로 하는 음료는 콜라겐 펩타이드, 콩 펩타이드, 유청 단백질 펩타이드 음료 등이 주를 이루고 있었다.

주로 피부 밸런스를 유지하거나 수분 보습효과를 주는 콜라겐 펩타이드 음료가 가장 그 종류가 많았고 인지도가 높은 것으로 알려져 있으며, 체지방 감소와 혈압강하, 혈당 조절의 목적으로 개발된 검은 콩 펩타이드 음료, 정어리 펩타이드 음료가 시판 중인 것으로 조사되었다. 미용에 대한 높은 관심으로 최근 중국에서 역시 콜라겐 펩타이드 음료 시장이 확대되고 있는 추세이다.

(Table 26). Use of age-based healthy drinks kind

종류	18-29세 (N=355)	30-49세 (N=484)	50세 이상 (N=193)	Chi-square
채소추출	149(42)	181(37.4)	58(30.1)	7.587*
과일추출	270(76.1)	352(72.7)	116(60.1)	16.279***
생약재	100(28.2)	214(44.2)	64(33.2)	23.945***
한약재	75(21.1)	121(25.0)	22(11.4)	15.319***

펙타이드	115(32.4)	174(36.0)	73(37.8)	1.923
벌꿀유래	106(29.9)	217(44.8)	102(52.8)	32.303***
유산균	230(64.8)	318(65.7)	136(70.5)	1.939
생리활성	41(11.5)	91(18.8)	15(7.8)	16.959***
비타민	154(43.4)	156(32.2)	51(26.4)	18.832***
식사대용	58(16.3)	71(14.7)	14(7.3)	9.148*

(마). 건강식품 및 음료 이용목적

이용목적에 대하여 5순위까지 응답하였고, 1순위로 응답한 항목에 대해서는 5점을, 2순위 4점, 4순위 3점, 5순위 2점, 5순위 1점으로 하여 1~5순위까지 응답자의 수를 곱한 후 총 응답자 수로 나눈 것을 우선 이용 점수로 평가하였다.

중국조사자들은 Table 27에서와 같이 우선 순위가 심혈관질환 예방/ 혈중지질농도 개선이 3.3점으로 가장 높았고, 영양보충 3.2점, 영양활력 회복 3.1점, 그 외 혈압개선 3.0점. 노화방지, 미용2.9점, 다이어트 2.8점, 암예방, 면역증진 2.8, 숙취해소 2.8점, 혈당 개선 2.7점, 학습도 향상 2.5점으로 나타났다.

이에 비해 한국조사들은 우선 순위가 자양강장, 원기회복 경우 4.3점으로 가장 높았고, 다이어트 3.2점, 노화방지, 미용3.2점, 영양보충 3.0점으로 높게 나타났다. 그 외 혈압개선 3.0점, 심혈관질환 예방 및 혈중지질농도 개선 2.5점, 암예방, 면역증진 2.3점, 숙취해소 2.2점, 혈당 개선 2.1점, 학습도 향상 2.0 점으로 나타났다.

Table 27. Comparison of Korean and Chinese use of healthy food and drink(명(%))

이용목적	한국인 (n=206)	중국인 (n=826)	전체 (n=1032)	Chi-square
자양강장	177(85.9)	567(68.6)	744(72.1)	24.466***
다이어트	90(43.7)	465(56.3)	555(53.8)	10.541**
노화방지	172(83.5)	552(66.8)	724(70.2)	21.875***
영양보충	123(59.7)	573(69.4)	696(67.4)	7.010**
혈압개선	26(12.6)	260(31.5)	286(27.7)	29.262***
심혈관질환 예방	89(43.2)	351(42.5)	440(42.6)	0.034
암예방	76(36.9)	580(70.2)	656(63.6)	79.062***
숙취해소	57(27.7)	175(21.2)	232(22.5)	3.977*
혈당 개선	24(11.7)	244(29.5)	268(26)	27.447***
학습향상	77(37.4)	363(43.9)	440(42.6)	2.908

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

연령별 건강음료 이용목적을 살펴본 결과, 20대의 경우 다이어트나 영양보충의 목적으로 많이 이용하는 반면, 자양강장의 효과와 숙취해소를 위해 건강음료를 마신다고 응답한 사람들은 주

로 20~30대였고, 30~40대는 피부미용이나 노화방지를 위해 이용한다고 응답하였다. 50대의 경우 혈압개선이나 심혈관질환 예방, 암예방 등 구체적인 질병 예방 및 치료 효과를 기대하고 건강음료를 마신다는 것을 알 수 있었다.

조사 결과 중국인들은 건강음료 이용 목적이 심혈관계 질환의 예방이 가장 높았고, 영양보충, 영양활력 혈압개선도 높게 나타났다. 반면 한국 소비자들의 건강음료 이용 목적은 자양강장이 가장 높았고, 체중조절이나 영양보충을 목적으로 건강음료를 섭취하는 것으로 나타났다.

최근 기능성 관련 음료에 대한 특허 출원을 살펴보면 생체방어, 특정 질병의 예방, 생체리듬의 조절, 노화억제 및 비만 억제 등을 위한 생약재 소재 발굴에 대한 특허가 주를 이루고 있으며, 생약재를 활용한 소재 발굴의 경우 다양한 생약재 복합에 의한 한 가지 이상의 효능을 기대하고 있다는 것이 생약재 소재 기능성 음료 특허의 특징이다.

Table 28. Comparison of purpose of healthy food and drink use by age group

종류	18-29세 (N=355)	30-49세 (N=484)	50세이상 (N=193)	Chi-square
자양강장	255(71.8)	376(77.7)	113(58.5)	25.134***
다이어트	214(60.3)	257(53.1)	84(43.5)	14.295**
노화방지	241(67.9)	355(73.3)	128(66.3)	4.582***
영양보충	288(81.1)	285(58.9)	123(63.7)	47.630***
혈압개선	66(18.6)	143(29.5)	77(39.9)	29.855***
심혈관질환 예방	108(30.4)	214(44.2)	118(61.1)	49.164***
암예방	228(64.2)	286(59.1)	142(73.6)	12.601**
숙취해소	84(23.7)	118(24.4)	30(15.5)	6.615*
혈당 개선	78(22)	135(27.9)	55(28.5)	4.524
학습향상	172(48.5)	173(35.7)	95(49.2)	17.732**

(바). 건강음료 구입 장소

건강음료 혹은 기능성 음료는 주로 어디에서 구입 하는지 1~3까지 순위를 매겨 점수화한 결과이다. 중요도 순위의 점수 산출 방식은 이용목적 분석과 동일하였고 점수가 높을수록 높은 순위를 반영한다.

중국조사자들은 Table 29에서와 같이 가장 많이 구입하는 장소는 대형마트로 2.5점으로 가장 높았고, 그 다음이 백화점2.1, 점 약국을1.6점, 인터넷이나 TV쇼핑을1.5점, 병원을1.4점. 순으로 조사되었다. 한국조사자들 역시 가장 많이 구입하는 장소는 대형마트로 2.2점으로 가장 높았고, 그 다음이 백화점2.1 점, 약국을1.9점, 병원을1.8점, 방문 판매를1.4점. 순으로 조사되었다.(Table 30)

Table 29. Health Beverage Place Priority Score Results(점*)

장소	한국인 (n=206명)	중국인 (n=826명)
대형마트	2.1	2.5
백화점	2.2	2.1
약국	1.9	1.6
인터넷, TV쇼핑	1.8	1.5
병원	1.4	1.4

*우선순위 점수

Table 30. Comparison of locations of health drink purchases (multiple responses) (명(%))

구입장소	한국인 (n=206)	중국인 (n=826)	전체 (n=1032)	Chi-square
대형마트	150(72.8)	785(95.0)	935(90.6)	95.601
백화점	106(51.5)	642(77.7)	748(72.5)	57.036***
약국	132(64.1)	557(67.4)	689(66.8)	0.837
인터넷,TV쇼핑	61(29.6)	290(35.1)	351(34)	2.220
병원	115(55.8)	204(24.7)	319(30.9)	74.808

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

연령별 구입 장소를 살펴본 결과, 50세 이상인 사람들의 경우 다른 연령층에 비해 대형마트의 구입이 높은 것으로 나타났고, 상대적으로 20대에서 백화점에서 구입한다는 비율이 낮은 경향이 있었다.

Table 31. 건강음료 구입 장소 연령별 비교(명(%))

구입 장소	18-29세 (N=355)	30-49세 (N=484)	50세 이상 (N=193)	Chi-square
대형마트	316(89.0)	429(88.6)	190(98.4)	17.190***
백화점	251(70.7)	355(73.3)	142(73.6)	0.860
약국	240(67.6)	316(65.3)	133(68.9)	0.989
인터넷,TV쇼핑	118(33.2)	175(36.2)	58(30.0)	2.435
병원	114(32.1)	150(31)	55(28.5)	0.768

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

본 연구 조사 결과 건강음료 혹은 기능성 음료를 중국인은 주로 슈퍼마켓에서, 백화점, 약국에 높게 나타났다. 한국인은 백화점, 슈퍼마켓, 약국에서 구입하는 것으로 조사되었다. 이러한 경향은 건강음료 선택에 있어 브랜드를 중요하게 생각하는 경향과 일치하는 것으로 신뢰성 있는 백화점이나 대형마트가 건강음료 시장에서 차지하는 비중이 가장 높다고 할 수 있다.

(사). 건강음료가 가장 필요하다고 생각되는 가족

현재 건강음료 혹은 기능성 음료가 가장 필요하다고 생각되는 가족을 1~3까지 순위를 매겨 점수화한 결과이다. 점수가 높을수록 높은 순위를 반영한다. 중국조사자들은 Table 32에서와 같이 본인은 2.3점으로 가장 높았고, 부모님은 2.2점, 배우자는 1.7점, 자녀는 1.6점으로 가장 낮게 나타났다. 한국조사자들은 Table 33에서와 같이 부모님은 2.3점으로 가장 높았고, 본인은 2.2점, 배우자는 1.8점, 자녀는 1.5점으로 가장 낮게 나타났다.

Table 32. 한국인과 중국인에서 건강음료가 가장 필요하다고 생각되는 가족 점수(점*)

가족	한국인(n=206명)	중국인(n=826명)
본인	2.3	2.3
부모님	2.2	2.2
배우자	1.8	1.7
자녀	1.5	1.6

*우선순위 점수

Table 33. 건강음료 가장 필요하다고 생각되는 가족(복수응답)(명(%))

가족	한국인 (n=206)	중국인 (n=826)	전체 (n=1032)	Chi-square
본인	169(8.02)	678(82.1)	847(82.1)	NS
부모님	149(72.3)	661(80.0)	810(78.5)	5.781*
배우자	109(52.9)	691(83.7)	800(77.5)	89.425***
자녀	91(44.2)	448(54.2)	539(52.2)	6.691**

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

연령별로 비교해 보면, 20대의 경우 88~90%는 본인과 부모님을 위해 건강음료가 필요하다고 응답하였고, 상대적으로 50대 이상의 경우 배우자나 자녀용으로 건강음료가 필요하다고 응답하였다. 따라서 50대 이상의 경우 건강음료의 이용목적 등이 본인이 아닌 20~30대 자녀를 대상으로 한다는 점을 감안하면 20~30대의 주요 건강음료의 이용목적인 자양강장에 초점을 두고 제품을 개발해야 할 것으로 생각된다.

Table 34. 연령별 건강음료가 가장 필요하다고 생각되는 가족(명(%))

가족	18-29세 (N=355)	30-49세 (N=484)	50세 이상 (N=193)	Chi-square
본인	312(87.9)	392(81)	143(74.1)	16.895***
부모님	319(89.9)	357(73.8)	134(69.4)	42.973***
배우자	227(63.9)	398(82.2)	175(90.7)	62.873***
자녀	146(41.1)	267(55.2)	126(65.3)	32.396***

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

다. 오계 활용 제품 최종 레시피 개발 결과



(1) 가정간편식(HNR) 레시피 개발 결과


(가) 오계 부산물을 활용한 육수

오계 부산물을 활용한 육수는 연산오계의 가공식품-가정간편식- 개발 시 원가를 절감하여 가격경쟁력에 도움이 되는 요인으로 볼 수 있다. 본 연구에서는 오계의 부산물 육수 활용을 위해 육수의 관능검사를 시행하여, 부산물 육수 제조 시 가장 이상적인 조합의 첨가물을 선정하고 그 레시피를 확립하였다.

연산오계의 부산물 육수 제조 레시피는 Table 35과 같다. 이러한 레시피를 통해 얻어진 오계의 부산물 육수를 이미 개발된 연산오계 가정간편식 레시피 중 흑미오계죽과 흑임자오계죽의 오계육수 사용시 대체 활용하여 실험조리를 거쳐 활용 육수를 완성함.

Table 35. 연산오계 부산물 육수 제조 레시피

							일시	2015.07.15.
연산오계 부산물 육수								
No	과정사진	중분류	식자재	중량	기물	만드는 순서	비고	
1		침지	오계머리 오계발 오계염통 오계모래 집	10개 20개 10개 10개	불	1. 연산오계의 머리와 발, 염통, 모래집을 찬물에 3시간 이상 담귀 핏물과 이물질을 제거한다.		
2		세척	부산물	준비량 4TS 2Cup	불	1. 큰 불에 물기를 뺀 각각의 부산물을 따로 담은 후, 천일염과 밀가루를 뿌려 주물러가며 불순물과 잡내를 제거하고 찬물에 여러 차례 깨끗이 행귀낸다.		

2		끓이기	부산물, 대파, 마늘, 대추, 월계수잎, 수삼, 물	준비량 1대 12쪽 3알 1장 소1뿌리 5L	압력솥	1. 압력솥에 모든 재료를 넣고 물 5L를 첨가하여 센불에서 끓이기 시작한다. 2. 압력솥 추가 돌고 나면 약한불로 줄여 약 40분 경과 후 육수를 고운 체에 걸러낸다..	수삼은 약 20g 정도 되는 것을 사용한다.
---	---	-----	--	--	-----	--	--------------------------

(나) 흑미오계죽

오계육의 길이를 보다 작은 크기로 일정하게(1.5cm) cutting 하였고, 대추, 흑임자가루의 후첨 프레이크와 별도로, 소량의 참기름(2g)도 후첨 양념으로 제품화하기로 하였다. 또 대추 고명은 말아서 얇게 슬라이스하여 꽃모양 형태로 cutting 하여 최종 레시피를 개발하였다. 흑미오계죽 개발의 최종 레시피 및 제조과정은 다음과 같았다.

Table 36. 흑미오계죽 레시피 및 제조 과정

							일시	2015.09.01.
흑미 오계죽								
No	과정사진	중분류	식자재	중량	기물	만드는 순서	비고	
1		분리기	쌀, 흑미, 검은콩	1컵 1컵 반컵	계량컵 볼	1. 쌀과 흑미는 각각 따로 씻어서, 30분가량 물에 불려 채반에 건져 물기를 빼 놓는다. 2. 검은콩은 반드시 찬물(5~12℃)에 8시간 이상 불려 준비한다.		
2		삶기	오계, 대파, 마늘, 대추, 물	1마리 1대 8쪽 1알 10컵	계량컵 냄비	1. 오계는 깨끗이 손질해서 물을 붓고 대파, 마늘, 대추를 넣어 삶는다.	국기름을 줄이기 위해 국기를 걸러내고 찬물을 붓는다	

3		밥짓기 삶기	쌀, 흑미, 검은콩	1컵 1컵 반컵	계량컵 냄비 믹서	1. 쌀과 흑미는 각각 따로 밥을 지어 놓는다. 2. 은 찬물에서 끓이기 시작한 후 10~15분 정도 익혀내고, 삶아 낸 물은 따로 받아둔다.	덜 익은 콩의 비가 내리면 내기가 어렵다. 덜 익은 콩의 비가 내리면 내기가 어렵다.
4		믹싱	쌀밥, 흑미밥, 검은콩 (삶은 것)	1컵 1컵 1/2컵	믹서기 계량컵	1. 쌀밥과 흑미밥은 물이 충분히 졸아들 때까지 찐다. 2. 삶아 놓은 검은콩은 믹서에 곱게 간다.	1. 쌀밥과 흑미밥은 물이 충분히 졸아들 때까지 찐다. 2. 삶아 놓은 검은콩은 믹서에 곱게 간다.
5		손질	삶은 오계	1 마리	볼	1. 오계가 충분히 익으면 건져 빼는 발라내고 잘게 찢어 놓는다. 2. 육수는 체에 걸러 따로 준비해 둔다.	
6		삶기	쌀밥& 흑미밥 퓨레, 검은콩 퓨레, 오계육, 육수, 검은콩, 삶은 물	2컵 반컵 4컵 2컵	계량컵 냄비 나무주걱	1. 냄비에 쌀밥&흑미밥 퓨레를 넣고 오계육수를 첨가하여 끓인다. 2. 1이 균일한 농도로 풀어지면 검은콩 퓨레와 한소끔 끓인다.	나 무 주 사 격 을 해 야 죽 이 삭 다. 않
7		완성	오계육, 소금	50g 약간	냄비 나무주걱	1. 약불로 줄이고 찢어놓은 오계육을 넣고 소금으로 간을 한다.	
8		완성	흑임자 가루, 마른대추, 참기름	1ts 1/2ts 2g	계량 스푼	1. 흑임자는 가루로 으깨 준비한다. 2. 마른대추는 깨끗이 씻어 씨를 발라내고 돌 썰어서 말아서 단면으로 썰는다. 3. 1,2와 참기름을 완성된 죽 위에 고명으로 얹는다.	

--	--	--	--	--	--	--	--

(다). 흑임자야채죽

2차 레시피 개발을 토대로 관능평가를 실시하고, 전문가 자문을 얻어 오계육의 길이를 보다 작은 크기로 일정하게(1.5cm) cutting 하고, 딱딱한 후레이크 때문에 식감이 좋지 않아서, 곡물 후레이크를 오크 믹스 후레이크 대신 현미 후레이크로 변경하여, 첨가량을 1.5 TS/1회 분량으로 포장하기로 했던 것을 2ts/1회포장으로 변경하기로 했다. 흑임자오계죽의 최종레시피는 다음 Table 37과 같았다.

Table 37. 흑임자오계죽 최종레시피 및 제조 과정

흑임자 오계죽							일시	2015.09.01.
No	과정사진	중분류	식재료	중량	기물	만드는 순서	비고	
1		불리 기	쌀	2/3컵	계량컵 볼	1. 쌀은 씻어서, 2시간 동안 물에 불린 후 채반에 건져 물기를 빼 놓는다.		
2		끓이 기	누룽지 물	50g 1컵	저울 계량컵 볼	1. 누룽지를 물에 넣고 끓인다. 2. 누룽지가 다 풀어지고 나면 불을 끄고 믹서로 곱게 갈아 놓는다.		
3		삶기	오계, 대파, 마늘, 대추, 물	1마리 1대 12쪽 5알 10컵	계량컵 냄비	1. 오계는 깨끗이 손질 해서 물을 붓고 대파, 마늘, 대추를 넣어 푹 삶는다.	국물의 기름기를 줄이기 위해 껍질을 벗기고 조리한다	





4		믹싱	쌀, 물	1컵 1컵	계량컵 믹서	1. 불려 놓은 쌀과 물을 믹서에 넣고 곱게 갈아 쌀물을 만들어 놓는다.	
5		볶기	흑임자	1컵	계량컵	1. 흑임자는 깨끗이 씻어 체에 받혀 물기를 뺀 후, 팬에 약불로 볶아준다.	
6		믹싱	흑임자 (볶은것), 물	1컵 2컵	믹서기 계량컵	1. 볶아 놓은 흑임자와 물을 믹서에 넣고 곱게 갈아 흑임자 물을 만든다.	
7		손질	삶은 오계	1 마리	볼	1. 오계가 충분히 익으면 건져 빼는 발라내고 살은 1.5cm 길이로 잘게 찢어 놓는다. 2. 육수는 체에 걸러 따로 준비해 둔다.	
8		끓이기	쌀물, 누룽지, 오계육수, 물	준비량 , 준비량 2컵 2.5컵	계량컵 냄비 나무주 걱	1. 냄비에 갈아놓은 쌀물과 오계육수, 물을 넣고 센불에서 저어가며 끓인다. 2. 끓기 시작하면 중불로 줄여 10분 정도 저어가며 끓이다가, 누룽지 같은 것을 넣고 10분 더 끓인다.	나무주걱을 사용하여 죽이 삭지 않는다.
8		끓이기	흑임자물, 오계육, 생크림 소금	준비량 50g, 2TS 약간	냄비 나무주 걱	1. 갈아놓은 검은깨물을 넣고 5분간 더 끓인 후, 찢어놓은 오계육과 생크림을 넣고 소금으로 간을 한다.	
9		고명 완성	잣가루, 현미 후레이크	1ts 2ts	계량 스푼	1. 잣가루와 현미 후레이크를 완성된 죽 위에 고명으로 얹어 낸다.	

(라) 오계란야채죽

전문가 자문 및 관능평가 결과, 이유식의 오계육은 살짝 분쇄하여 사용하고, 색감을 올리기 위해 야채의 양을 추가한다. 각 야채별로 10g 씩 첨가되는 것을 당근→20g, 시금치→15g, 브로콜리→15g, 감자→10g 으로 변경하고, 좀 더 일정한 크기로 cutting 하기로 했다.

‘오색’이란 단어는 대부분의 구매자로 하여금 다분히 컬러풀한 상품으로 인지되는데, 제품명의 기대 치와 완성품의 Gap을 완화하여 기대에 부응하지 못하는 제품에 대한 부정적 영향을 없애기 위해 ‘오계란야채죽’으로 변경하였다.

Table 38. 오계란야채죽의 최종레시피 및 제조 과정

오계란야채죽							일시	2015.09.01.
No	과정사진	중분류	식자재	중량	기물	만드는 순서	비고	
1		불리기	쌀	1컵	계량컵 볼	1. 쌀을 씻어서 30분 가량 물에 불린 다음 채반에 건져 물기를 빼 놓는다.		
2		삶기	오계 대파 마늘 양파 대추 물	1마리 20cm 12쪽 1/2개 3알 8컵	계량컵 냄비	1. 오계는 깨끗이 손질 해서 물을 붓고 대파, 마늘, 양파, 대추를 넣어 푹 삶는다.	국물의 기름기를 줄이기 위해 걸걸을 벗기고 조리한다	
3		믹싱	쌀	1컵	믹서기 계량컵	1. 쌀은 믹서에 넣고 살짝 갈아준다.		
4		삶기	오계란	1개	냄비	1. 오계란은 15분 정도 완숙으로 삶는다.	소금과 식초를 넣으면 달걀이 깨지지 않는다.	

5		데치기	감자 시금치 당근 브로콜리	10g 15g 20g 15g	냄비	1. 채소는 각각 끓는 물에 30초 정도 데친다.	
6		손질	오계육 가슴살	25g	불	1. 오계가 충분히 익으면 건져 빼는 발라내고 가슴살 부위를 살짝 분쇄하여 준비한다. 2. 육수는 체에 걸러 따로 준비해 둔다.	
7		재료 손질	오계난 황 감자 시금치 당근 브로콜리	반개 10g 15g 20g 15g	도마 칼	1. 오계의 난황과 데친 채소를 잘게(3*3*3mm) 다진다.	브로콜리는 형태가 보이도록 다진다.
8		끓이기	쌀 육수 물 오계육 오계난 황 삶은야 채	1컵 1컵 3컵 25g 반개 준비량	계량컵 냄비 주걱	1. 냄비에 참기름을 두르고 갈아 놓은 쌀을 볶다가 오계 육수와 물을 넣어 끓인다. 2. 약한 불로 줄여 오계 가슴살과 채소를 넣고 한소끔 끓인다.	
9		완성			국자	용기에 담아낸다.	

(마). 오계란요거트 비스코티

관능평가 등의 결과를 토대로 정백당 첨가량을 40g → 30g 으로 감소하고, 4세이상의 유아를 타겟소비층으로 선정한 점을 고려할 때 아몬드 슬라이스의 양이 다소 많고 이로 인해 딱딱한 식감이 제품 선호도를 저해할 수 있을 것으로 보여, 토핑(아몬드 슬라이스)의 양을 줄이기로 했으며, 둥그란 모양 이외에 다양한 형태의 성형을 시도해 보았다. 오계란요거트 비스코티의 최종레시피 및 제조 과정은 다음과 같았다.

Table 39. 오계란요거트 비스코티 최종 레시피 및 제조과정

						일시	2015.09.07.
비스코티							
No	과정사진	중분류	식자재	중량	기물	만드는 순서	비고
1		머랭 만들기	오계란 난백, 정백당	200g 30g	계량컵 핸드믹서	1. 계란흰자에 설탕을 나눠가며 거품기로 혼합한다.	머랭을 만들 때, 용기를 뒤집어도 흐르지 않을 만큼의 농도로 만든다.
2		부재료 혼합	쌀가루, 요거트 파우더, 아몬드 파우더, 소금	20g 30g 30g 0.5g	저울 믹싱볼 주걱	1. 요거트 파우더, 아몬드가루, 소금, 쌀가루(바삭한 식감을 위해)를 넣고 혼합한다.	
3		성형	아몬드, 머랭반죽	15g 준비량	짤주머니, 오븐팬, 유산지	부재료가 혼합된 머랭을 짤주머니로 성형 한 후, 아몬드 슬라이스를 뿌린다.	성형 시유산지를 사용하여 팬에 달라붙는 현상을 방지한다.
4		굽기	성형반죽	준비량	오븐	오븐 120℃, 30분 조리 후 식힌다.	



(2) 오계 펩타이드 한방음료 제품 레시피 결과

(가). 오계 유래 저분자 펩타이드 및 흑질 색소를 활용한 건강음료

연산오계의 펩타이드와 흑질의 활용 및 최근 주목받고 있는 블랙푸드(흑미, 흑임자, 검은콩)와의 조합을 통해 학생, 직장인 및 노인들을 위한 새로운 기능성 음료를 개발하고자 하였다. 검은콩은 일찍이 성악가들이 아름다운 목소리를 유지하기 위해 자주 복용했다고 하는데, 정신적인 스트레스 등으로 뒷덜미가 뻐뻐할 때 기분을 맑게 풀어주는 작용이 있다고 믿었다고 한다.

이 레시피는 연산오계의 펩타이드의 영양학적 유효성분의 효과 뿐 아니라, Black food에 함유된 수용성 물질인 안토시아닌 색소 성분의 항산화, 항암, 항계양 효과를 기대할 수 있을 것이다(Table 40).

Table 40. Yeonsan Ogye Black drink (Black Ogye-Soybean milk) recipe





연산오계 펩타이드를 첨가한 흑색음료 (120ml 분량)						일시	
No	과정사진	중분류	식자재	중량	기물	만드는 순서	비고
1		검은콩 불리기	검은콩	26g	저울 불	1. 검은콩은 씻어서 3시간 가량 물에 불린 다음 채반에 건져 물기를 빼 놓는다.	
2		삶기	검은콩		냄비	1. 불린 검은콩을 냄비에 넣고 삶다가 물이 끓어오르고 3분 뒤에 채반에 건져 물기를 빼 놓는다.	
3		볶기	흑임자	1.95g	저울 냄비	1. 흑임자는 볶아준다.	
4		믹싱	검은콩 흑임자 잣 아몬드 호두 물 펩타이드 올리고당	26g 1.95g 2.6g 1g 0.5g 71.5ml 1 6.5ml 9.75g 0.13g	믹서기 저울	1. 검은콩, 잣, 흑임자 순으로 믹서에 넣고 돌린다.	물은 한번에 다 넣지 않고 재료가 잠길 정도만 넣어 갈아 준 뒤 나머지 물을 넣는다.

			소금				
5		거르기			채 면보	1. 4에서 믹싱한 두유 를 걸러 준다.	
9		완성	쌍화탕	39ml		1. 거른 두유에 쌍화 탕을 넣고 잘 섞어 준 다.	

(나). 오계 펩타이드 한방음료 1 : 쌍화탕 펩타이드 음료

액상 펩타이드 특유의 신맛과 쓴맛에 대한 문제를 해결하기 위하여 한방 펩타이드 음료 제조 시에는 파우더 형태의 분말건조 된 펩타이드를 사용하였다. 연산오계의 펩타이드 활용 및 쌍화탕과의 조합을 통해 수험생, 운동선수, 직장인 및 노인들을 위한 새로운 기능성 음료를 개발하고자 하였다

Table 41. 쌍화탕 펩타이드 음료

쌍화탕 펩타이드 음료(60ml 분량)						일시	
No	과정사진	과정	식자재	증량	기물	만드는 순서	비고
1		재료준비	백작약 숙지황 황기 당귀 천궁 계피 감초 생강 대조	10g 4g 4g 4g 4g 3g 3g 3쪽 2개		1. 동의보감의 처방에 따라 약재를 준비하였다.	
2		열수추출			약탕기 (오쿠)	2. 약탕기에 범제된 재료들을 넣고, 시료의 10배에 해당하는 물을 첨가하여 100℃에서 2시간 달인다.	수율 10~15 %
3		혼합	쌍화탕 연산오 계 펩타이드	60ml 1.0g		3. 쌍화탕에 연산오계 펩타이드 1,000mg을 녹인다.	
4		완성					

(다). 오계 펩타이드 한방음료 2 : 경옥고 오계 펩타이드 음료 증강제

연산오계의 펩타이드와 흑질의 활용 및 경옥고와의 조합을 통해 수험생, 운동선수, 직장인 및 노인들을 위한 새로운 기능성 음료를 개발하고자 하였다.

Table 42. Yeonsan Ogye Gyung-ok-go recipe

경옥고 오계 펩타이드 음료증강제(20ml 분량)						일시	
No	과정사진	중분류	식자재	중량	기물	만드는 순서	비고
1		재료 준비	생지황 인삼 백복령 별꽃	960g 90g 180g 640g		1. 생지황은 짓쪼개 즙을 내고, 인삼과 백복령은 가루를 내어 사용하며, 별꽃은 정제하여 찌꺼기를 걸러 준비한다.	풀뿌리 사업단 제조
2		경옥고 제조			사기 그릇 술	2. 사기 그릇에 넣고 기름 종이로 5겹 정도 싼 다음 김이 새지 않게 뚜껑을 덮는다. 이것을 물이 든 스테인레스 용기 안에 들여 놓고 물을 계속 보충하면서 92-93℃에서 72시간 달여서 졸여 엷상태로 되게 한다. 3. 2를 5℃로 12시간 냉각시킨 후 다져서 고 떠먹는 형태가 되게 한다.	풀뿌리 사업단 제조
3		혼합	경옥고 증류수	3.0g 60ml		3. 경옥고 3g을 녹인다.	
4		혼합	연산오계 펩타이드	1.0g		4. 과정 1에 연산오계 펩타이드 1,000mg을 녹인다.	
5		완성				5. 경옥고 펩타이드 음료를 농축하여 음료증강제를 만든다.	

(라). 오계 펩타이드 한방음료 레시피 결과

2차년도에 개발된 오계 펩타이드 한방음료 레시피를 바탕으로 오계 펩타이드 한방음료 시제품 레시피를 개발하였다. 오계 한방 펩타이드 음료는 오계 펩타이드에 자양강장 효과가 알려진 여러 가지 한방 처방 중 체질에 따른 부작용이나 효능의 차이가 없이 대중적으로 인지도가 높은 쌍화탕과 처방에 의거한 한약재를 첨가하여 제조하였고, 관능성과 기호도 향상을 위한 식품 첨가물로 구성하여 레시피를 만들었다.

2차년도에 개발된 오계 펩타이드 한방음료의 관능 평가에서 점수가 낮게 나온 단맛을 보강함으로써 액상 펩타이드 특유의 신맛과 쓴맛에 대한 문제를 해결하기 위하여 한방 펩타이드 음료 제조 시에는 파우더 형태의 분말건조 된 펩타이드를 사용하였고, 연산 오계의 펩타이드 활용 및 쌍화탕과의 조합을 통해 수험생, 운동선수, 직장인 및 노인들을 위한 새로운 기능성 음료를 개발하고자 하였다.

쌍화탕은 허로 손상으로 기혈이 허해진데, 힘든 일을 한 뒤나 중병을 앓은 뒤에, 온 몸이 노곤하고 몹시 피로감을 느끼며 현기증이 나고 가슴이 두근거리며 저절로 땀이 나는 허약한 사람이 감기에 자주 걸리는데 쓰며 피로 회복제로 많이 사용되어 이 레시피는 연산 오계의 펩타이드의 영양학적 유효성분의 효과 뿐 아니라, 쌍화탕의 효과까지 함께 기대할 수 있을 것이다

Table 43. 오계 펩타이드 한방음료 시제품 레시피 및 제조 과정




오계 펩타이드 쌍화탕 음료(100ml 분량)							일시
No	과정사진	과정	식자재	중량	기물	만드는 순서	비고
1		쌍화탕 재료 준비	백작약 숙지황 황기 당귀 천궁 계피 감초 생강 대조	10g 4g 4g 4g 4g 3g 6g 3쪽 2개		1. 동의보감의 처방에 따라 약재를 준비하였고, 감초는 일반처방에 2배를 배합해 제조하였다.	
2		열수 추출			약탕기 (오쿠)	2. 약탕기에 법제된 재료들을 넣고, 시료의 10배에 해당하는 물을 첨가하여 100℃에서 2시간 달인다.	수율 10~15 %
3		식품 첨가물 재료 준비	D-솔비톨 함수구연산 구연산삼나트륨 비타민C 탄산수소나트륨 말산 제2인산칼륨 올리고당	0.11mg 0.16mg 0.04mg 0.07mg 0.2mg 0.04mg 0.03mg 10,000mg	미량 저울	3. 각 첨가물의 용량에 따라 계량한다.	
4		혼합	생수 쌍화탕 연산오계 펩타이드 식품첨가물	50ml 50ml 1g *3번참고		4. 쌍화탕에 연산 오계 펩타이드 1,000mg을 희석한 뒤 필터페이퍼로 거른 후 식품첨가물을 녹인다.	



(3). 오계경옥펩타이드 환 제품 레시피 결과

오계 펩타이드 기능성과 자양강장 효과가 알려진 경옥고를 이용하여 바탕으로 오계 펩타이드 경옥고 환 제품을 개발하였다. 오계 펩타이드에 자양강장 효과가 알려진 경옥고, 기호도 향상을 위해 우리나라 토종 벌꿀을 더하여 제조하였고, 관능성과 환제품 성형에 필요한 국내산 찹쌀가루로 구성

하여 레시피를 만들었다

Table 44. 오게 경옥 펩타이드 환

오게 경옥 펩타이드 환(환 1개당 3g 분량/총 300g)						일시	
No	과정사진	중분류	식자재	중량	기물	만드는 순서	비고
1		재료준비	생지황 인삼 백복령 벌꿀	960g 90g 180g 640g		1. 생지황은 짓쪼개어 즙을 내고, 인삼과 백복령은 가루를 내어 사용하며, 벌꿀은 정제하여 찌꺼기를 걸러 준비한다.	폴뿌리 사업단 제조
2		경옥고 제조			사기 그릇 술	2. 사기 그릇에 넣고 기름 종이로 5겹 정도 싸 다음 김이 새지 않게 뚜껑을 덮는다. 이것을 물이 든 스테인레스 용기 안에 들여 놓고 물을 계속 보충하면서 92-93℃에서 72시간 달여서 졸여 엷 상태로 되게 한다. 3. 2를 5℃로 12시간 냉각시킨 후 다져서 고 떠먹는 형태가 되게 한다.	폴뿌리 사업단 제조
3		혼합	경옥고 참쌀가루 연산 오게 펩타이드 벌꿀	300g 150g 1g 50g	스텐볼 저울 나무주걱	3. 경옥고에 참쌀가루를 2번정도 나누어 섞어주고, 연산오게 펩타이드 분말1,000mg을 넣고, 꿀을 넣어 1덩어리로 혼	



						합한다.	
4		성형			저울	4. 환 1개당 각 5g, 3g, 1g(녹두 환크기)씩 나누어 3가지 크기로 성형한다.	
5		완성			포장지	5. 개별 포장하여 완성한다.	

(4) 오계부산물을 활용한 오계조미육수 레시피 개발 결과

(가). 오계 부산물을 활용한 오계조미육수 1차 레시피

1차년도에 개발된 레시피를 보완하고, 오계 부산물(머리)을 활용한 조미용 육수 제조를 위하여 전문가 자문을 요청하였으며, 그 결과 다음과 같은 두 가지 레시피를 개발하였다. 다음은 오계머리에 향미채소를 더해 한꺼번에 넣고 삶아 특유의 비린내를 제거하는 과정을 특징으로 하는 레시피이다.

Table 45. 1차 오계 조미 육수 레시피


1차 오계 조미육수-A01(2.2L 분량)						일시	
No	과정사진	중분류	식자재	중량	기물	만드는 순서	비고
1		해동 및 핏물 제거	오계머리	300g	스텐볼	1. 오계머리의 10배의 물에 24시간 동안 냉장고에서 핏물을 빼두고 다시 새물로 바꾸어 2시간동안 흐르는 물에 담궈둔다.	
2		재료 손질 및 전처리	일반양계 발 양파 마늘 당근	200g 100g 30g 90g	저울 도마 칼	2. 야채를 깨끗이 씻어 손질하여 계량한다.	

			샐러리 월계수잎 물	30g 2장 2.8L			
3		삶기			냄비	3. 1과 2의 분량의 재료를 모두 솥에 넣고 센불로 끓여 오르면 불을 줄여 75~80도로 유지하고 뚜껑을 덮어 약 2시간 동안 문근하게 끓여낸다.	
4		거르기			칼때기 면보 용기	4. 채에 식혀 보관한다.	
5		거르기 및 완성					

(나). 오게 조미 육수의 2차 레시피 개발

오게 부산물을 활용한 오게 조미 육수의 2차 레시피는 브라운 스톡의 제조방법을 활용하여 오게머리, 향미채소를 오븐에 구워 특유의 비린맛을 제거하고, 구수하고 담백한 향을 더하는 과정을 특징으로 하는 레시피이다.

Table 46. 2차 오게 조미 육수 레시피





						일시	
2차 오게 조미 육수-R01(2.15L 분량)							
No	과정사진	중분류	식자재	중량	기물	만드는 순서	비고
1		해동 및 핏물 제거	오게머리	300g	스텐볼	1. 오게머리의 10배의 물에 24시간 동안 냉장고에서 핏물을 빼두고 다시 새물로 바꾸어 2시간 동안 흐르는 물에 담궈둔다.	




2		재료 손질 및 전처리	일반양계 밭 양파 마늘 당근 샐러리 월계수잎 물	200 g 100 g 30g 90g 30g 2장 2.8L	저울 도마 칼 팬 기름	2. 오게머리와 분 량의 월계수잎을 제외한 채소를 기 름을 둘러 각각 예열된 팬에 진한 갈색이 나도록 볶 아준다.	
3		굽기			오븐 팬	3. 2의오게머리를 오븐팬에 담고 230도로 예열된 오븐에서 약 1시 간동안 바삭 익혀 준다.	
4		삶기			냄비 갈때기 면보 용기	4.모든재료를 냄비에 넣고 센불로 끓여 오르면 불을 줄여 75~80도로 유지하고 뚜껑을 덮어 약 2시간동안 몽근하게 끓여 낸다.	
5		거르기 및 완성				5. 채에 식혀 보 관한다.	

(3). 오게부산물 한방육수 (황기탕육수)의 레시피

오게 부산물과 한약재를 넣어 제조한 한방 육수의 2차 레시피와 제조과정은 다음과 같았다.

Table 47. 2차 연산오게 부산물(머리) 한방 육수

						일시	
2차 연산오게 부산물(머리) 한방 육수(분량)							
No	과정사진	중분류	식자재	중량	기물	만드는 순서	비고
1		해동 및 핏물 제거	오 게 머 리	300g	스텐볼	1. 오게머리의 10배의 물에 24시간 동안 냉장고에서 핏물을 빼두고 다시 새물로 바꾸어 2시간동안 흐르는 물에 담궈둔다.	
2	 	재료 손질 및 전처리	*육수 일 반 양 계발 200g 양파 100g 마늘 30g 당근 90g 샐러리 30g 월 계 수 2장 잎 물 2.8L *쌍화탕 백작약 40g 숙지황 40g 황기 40g 당귀 40g 천궁 30g 계피 60g 감초 7쪽 생강 6개 대조		저울 도마 칼 팬 기름	2. *육수 오게머리와 분량의 월계수잎을 제외한 채소를 기름을 둘러 각각 예열된 팬에 진한 갈색이 나도록 볶아준다. *쌍화탕 쌍화탕약재와 생강을 채에 받쳐 흐르는 물에 씻어 낸다,	
3		굽기			오븐 팬	3. 2의오게머리를 오븐팬에 담고 230도로 예열된 오븐에서 약 1시간동안 바싹 익혀 준다.	
4		삶기			냄비	4.	





					<p>*육수 모든 재료를 냄비에 넣고 센불로 끓여 오르면 불을 줄여 75~80도로 유지하고 뚜껑을 덮어 약 2시간 동안 문근하게 끓여 낸다.</p> <p>*쌍화탕 물 4L와 2의 쌍화탕 재료들을 넣고 끓여오르면 중불로 줄여 (약 70도에서 80도) 뚜껑을 덮고 약 3시간 동안 우려낸다,</p>	
5		베이스 완성			<p>5. *육수 체에 식혀 보관한다. *쌍화탕 면보에 걸러 냉각시켜 보관한다,</p>	
6		혼합 및 최종 완성		불 냄비	<p>6. 완성된 육수 9: 쌍화탕 1의 비율로 혼합하여 100도까지 가열하여 식힌다.</p>	

라. 관능평가 결과

(1). 연산오계 활용 가정간편식 개발레시피의 시제품 관능평가

가정간편식 개발 레시피의 시제품 관능평가 결과는 Table 48과 같았다. 흑미오계죽의 경우 향에 대한 기호도가 높았고, 흑임자오계죽은 흑임자 특유의 질감으로 인해 식감에 대한 선호도가 낮게 평가되었다. 오계란야채죽과 오계란요거트 비스코티의 경우 색감에 대한 기호도가 높

게 나타났다.

Experimental product				
	Black rice Ogye soup	Black sesame Ogye soup	Ogye egg vege-soup	Ogye egg-yogurt biscotti
Flavor	4.2	3.5	3.2	3.8
Color	4.0	3.5	4.3	4.5
Taste	3.7	3.4	3.2	4.1
Texture	3.8	3.2	3.1	4.1

종합적 기호도에 대한 평가는 제품별로 다음과 같았다.

Table 48. Sensory evaluation for experimental product of Yeonsan Ogye HMR recipes

개발 시제품	종합적 기호도 평가 결과
흑미오계죽	참기름과 고소한 향이 잘 어울림. 고소하다 / 그냥 맛있음 / 단팥죽과 같은 느낌이나 씹을 수록 식감이 점차 진득거리는 느낌/ 참기름이 가미되어 고소한 향이 좋음, 대추고명의 단맛이 좋으며 부드러운 식감. /향은 가장 좋음, 식감도 부드러워 노약자들이 먹기에 용이 / 맛있음, 식감이 부드러워 환자식으로 적합할 것 같음 / 고소한 향으로 비린내를 잘 느낄 수 없어 좋음, 씹기 힘든 사람도 쉽게 먹을 수 있을 것 같음, 애기들이 먹기에도 적절할 것 같음 /끝에 약간 비린내가 묻어나옴 / 향미강하고 오계의 색감이 특징적으로 나타남, 맛이 부드럽고 식감이 두꺼운 맛이 남 /고기가 질긴감이 있어 식감은 보통, 향은 좋았음 / 육질에 다소 거칠고 질긴 느낌이 나 약간 맛에 까지 영향
흑임자오계죽	건강식이라는 이미지가 강하게 느껴짐, 오계가 포함되었는지에 대한 의문이 들 정도로 씹는 느낌은 없었음/ 곡류맛이 강하고 색감이 약함, 전반적으로 맛은 부드러움, 식감은 부드러움./ 씹히는 맛이 있어 재미있었음/ 고소한 맛을 좋아하는 사람의 경우 아주 좋아할 맛, 함께 섞인 시리얼이 없어도 괜찮을 것 같음/ 맛있고 식감은 약

	간 거친 느낌/ 곡물플레이크 중 딱딱한것 있어서 씹기 힘들다 / 토핑이 어금니에 자꾸 달라 붙어 먹기 불편합니다 / 딱딱한 후레이크가 있어 식감이 불편함, 후레이크를 씹을 수록 고소한 맛이 더해져 좋으나 찌꺼기가 입안에 남아 불편함을 줌/ 곡물이 너무 딱딱해서 맛과 식감에 영향을 줌, 고기도 질김
오계란야채죽	야채 씹히는 식감이 좋고, 이유식으로 괜찮을 듯. 닭냄새가 나지않고 고소하다 / 당근이 조금 딱딱한 느낌, 고소한 맛이 식욕을 자극함 / 오계란의 향이 좋고 색감이 강함, 맛은 두꺼운 부드러운 맛, 식감은 씹히는 알갱이가 많음/ 이유식 같이 부드러움/ 간이 안되어 싱겁고 수분이 부족한 느낌이 있어 식감이 좋지는 않으나 색감은 맛있어 보임/ 점도가 강하여 물기가 금방 사라지는 것 같아 첫 술을 뜨는데 어려움이 있음 / 향에서는 비린 향이 없었는데 맛은 비린/ 향은 비릿함, 맛은 좋음, 식감은 거친느낌/ 어른이 먹기에는 거의 씹는 맛이 느껴지지 않음, 비린 맛 / 이유식개발로 이루어진 까닭에 약간 싱겁게 느껴짐, 무난함, 다른 이유식과 차별성이 무엇인지에 대한 답이 필요함
오계란요거트비스코티	부드럽고 매우 좋아 남녀노소 좋아할 것 같음 / 과자, 간식으로 좋을 것 같음 / 설탕향이 진하다. 수제쿠키의 느낌, 일반쿠키보다 부드럽다 / 단맛이 너무 강함, 전반적인 풍미에는 아몬드 파우더가 더 들어가면 좋을듯함, 바삭한 식감과 입안에서 녹는 재미는 좋음 / 맛있었음/ 색감과 맛이 고급스럽고 좋으나 식감에서 스넵과 비슷한 느낌의 가벼움이 있고 향은 무난함 / 바삭한 식감, 뒷맛이 비교적 좋고 향은 부드러움 향이 강함 색감은 좀더 짙은색이 좋을듯 함/ 무난한 맛이나 매력적인 맛은 아닌것 같다, 건강 쿠키로 인식되면 좋겠는데 상용화될수 있는 과자로 개발하려면 2% 부족한것 같다 / 입에 넣을 때 끈적임이 좋지 않음 / 맛은 짠맛, 단맛이 있음, 식감은 너무 부드러워 씹는 맛이 없는 아쉬움이 있음 / 단맛이 많이 남, 많이 먹기에는 어려움 부드러워서 아이들이 먹기에도 좋을 듯, 그러나 아몬드가 날카로워 아이들은 자칫 입안에 상처를 입을수도 있을것 같음, 아몬드를 가루형태로 뿌려 고소한 맛을 유지하면 좋을 것 같음

(2). 흑색음료의 관능평가 결과

(가). 흑색음료

관능검사 결과, 연산오계 펩타이드를 첨가한 흑색음료, 연산오계 펩타이드 흑색음료에 쌍화당을 넣어 제조된 시료의 관능평가 결과는 Table 49과 같이 나타났다. 연산오계 펩타이드 흑색음료는 첨가물 없이 제조한 것(P1)에 비해 쌍화당을 첨가한 경우(P2) 맛과 향, 식감이 좋아지고 색감은 감소하는 것으로 나타났다.

그러나, 두유 형태의 연산오계 펩타이드 흑색음료의 경우, 5점 만점에 평균 3점대 초반의 관능평가 결과를 얻었고, 시간의 경과에 따른 침전물 형성으로 인해 건강음료 제품으로는 적합하지 않다는 결론을 얻었다.

Table 49. Sensory evaluation of Yeonsan Ogye Peptide Soybean milk

Sample	Taste	Flavor	Color	Texture
P1	3.00±0.58	3.15±0.55	3.23±0.73	3.08±0.64
P2	3.38±0.51	3.69±0.75	3.23±0.60	3.31±0.63

(나). 1차 한방 펩타이드 음료의 관능평가 결과

연산오계 펩타이드를 사용, 쌍화탕과 경옥고에 첨가하여 제조된 연산오계 쌍화탕과, 연산오계 경옥고 및 쌍화탕, 경옥고의 관능평가 결과는 Table 50와 같이 나타났다. 대부분의 항목에서 큰 차이는 없었으나 단맛의 경우 연산오계 펩타이드 경옥고(G2)가 가장 낮은 수치를 보였고, 신맛과 쓴맛은 큰 차이가 없었으며 단맛에 대한 기호도는 경옥고(G1)에서 가장 높게 나타났다.

향의 경우 구수한 향은 차이가 없었으나 누린내의 경우 연산오계 펩타이드 쌍화탕(S2)에서 높게 나타났으며 시큼한 향은 경옥고(G1)가 가장 높은 수치를 보였다. 비린 향은 쌍화탕에서 가장 적게 나타났으며 향에 대한 기호도는 경옥고(G1)이 가장 높은 수치를 보였고 연산오계 펩타이드 쌍화탕(S2)가 가장 낮은 수치를 보였다.

색은 경옥고와 연산오계 경옥고(G1, G2)가 다른 시료(S1, S2)보다 짙은 색을 보였으며, 농도 역시 같은 결과를 보였다. 맛과 향, 색, 농도를 종합한 전반적 기호도에서는 경옥고(G1)가 가장 높은 기호도를 보였으며 나머지 시료들은 큰 차이가 없었다.

쌍화탕, 경옥고 각 원료별로 펩타이드를 넣은 것과 안 넣은 것을 비교해 봤을 때는 큰 차이가 없어 쌍화탕과 경옥고가 연산오계 펩타이드가 가지고 있는 이취 및 쓴맛 등을 쉽게 조절하는 것으로 사료되어 이와 같은 재료를 활용하여 관능적 유효요인을 해결할 수 있음을 시사한다고 볼 수 있을 것이다. 또한 이러한 결과는 오계의 영양학적 우수성을 활용하기 위해 가공식품으로의 개발 시 제품으로서의 기호도를 향상시킬 수 있는 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

Table 50. Taste sensory evaluation of Yeonsan Ogye Peptide Ssanghwatang and Gyung-ok-go

Sample	Taste			
	Sweet	Sourness	Bitter	Savory
S1	2.07±1.07	1.73±0.94	2.17±1.02	2.70±1.21
S2	2.10±1.03	1.93±1.01	2.57±1.22	2.23±1.19

G1	2.90±1.35	2.13±1.07	2.07±1.20	3.33±1.21
G2	1.80±1.06	1.60±0.97	2.17±1.34	2.53±1.22

Table 51. Flavor sensory evaluation of Yeonsan Ogye Peptide Ssanghwatang and Gyung-ok-go

Sample	Flavor				
	Delicate scent	Savory odor	Sour smell	Smell of blood	Savory
S1	2.40±1.25	1.47±0.94	1.69±0.93	1.70±1.12	2.93±1.31
S2	2.37±1.30	2.03±1.38	1.83±1.04	2.27±1.36	2.27±1.28
G1	2.73±1.31	1.40±0.72	2.54±1.50	2.13±1.38	3.20±1.13
G2	2.23±1.28	1.70±1.18	1.97±1.35	1.87±1.11	2.50±1.36

Table 52. Sensory evaluation of Yeonsan Ogye Peptide Ssanghwatang and Gyung-ok-go

Sample	Color	Concentration	Overall Preference
S1	1.60±0.72	1.83±0.97	2.77±1.25
S2	2.24±0.87	2.07±0.84	2.17±1.07
G1	4.07±1.00	3.67±0.99	3.73±1.17
G2	4.27±0.94	3.33±1.35	2.50±1.11

(다) 2차 한방 펩타이드 음료 관능검사 결과

동의보감 처방에 따른 쌍화음료에 비해 감초나 계피를 더 첨가한 쌍화음료에서 단맛이 유의적으로 더 증가하였고, 쓴맛은 약간 감소한 것을 알 수 있었다. 반면 감초를 추가한 경우 신맛이 약간 증가하기는 하였으나 유의적인 수준은 아니었다.

쌍화음료 베이스에 오계펩타이드를 각각 500mg과 1000mg을 첨가하였을 때 맛의 변화를 살펴본 결과, 펩타이드를 추가했을 때 단맛은 감소하였으나 음료의 맛으로 부정적인 신맛이나 쓴맛의 경우 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 또 오계펩타이드 500mg과 1000mg의 차이를 비교했을 때에도 맛의 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 53. 오계한방음료의 맛 평가

Sample	Taste		
	단맛	신맛	쓴맛
SA1	3.27 ± 0.98 ^{a1)}	1.93 ± 0.74 ^a	4.03 ± 0.81 ^a
SB1	4.03 ± 0.77 ^b	2.07 ± 0.79 ^{ab}	3.53 ± 0.10 ^b
SC1	3.73 ± 1.02 ^b	2.43 ± 0.68 ^b	3.73 ± 0.69 ^{ab}
SA2	3.03 ± 0.93 ^c	2.07 ± 0.74 ^{NS}	4.00 ± 0.79 ^{NS}
SB2	3.87 ± 0.77 ^d	2.03 ± 0.62	3.57 ± 0.90
SC2	2.93 ± 0.74 ^c	2.07 ± 0.41	3.77 ± 0.94
SA3	2.70 ± 0.60 ^{e†}	2.73 ± 0.52 ^e	3.80 ± 0.66 ^{NS}
SB3	3.53 ± 0.68 ^{f†}	2.07 ± 0.79 ^f	3.60 ± 0.72
SC3	3.23 ± 0.63 ^f	2.27 ± 0.69 ^f	3.80 ± 0.79

^{a-c}Means with different letters in the same column are significantly different(P<0.05).

[†]Significantly different in Ogye-peptide added samples, compared to each control samples (SA1, SB1, SC1) (P<0.05).

NS : no-significant

¹⁾Mean±SD

한약재의 깊은 맛을 대변하는 구수한 향과 이취로 느껴질 수 있는 단백질 가수분해물로 펩타이드의 시큼한 향과 누린내를 평가한 결과, 펩타이드 첨가량이 많을수록 시큼한 향에 대한 점수가 높게 나타나는 경향이 있으나, 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그밖에 모든 시료에서 향의 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 54. 오계 한방음료의 향 평가

Sample	향미		
	구수한 향	누린내	시큼한 향
SA1	1.70 ± 0.54 ^{NS1)}	2.07 ± 0.79 ^{NS}	2.30 ± 0.75 ^{NS}
SB1	1.73 ± 0.58	2.30 ± 0.60	2.27 ± 0.52
SC1	1.93 ± 0.64	2.23 ± 0.68	2.23 ± 0.68
SA2	2.17 ± 0.70 ^{NS}	2.73 ± 0.64 ^{NS}	2.73 ± 0.74 ^{NS}
SB2	2.27 ± 0.69	2.77 ± 0.14	2.77 ± 0.86
SC2	2.33 ± 0.66	2.40 ± 0.68	2.43 ± 0.68
SA3	2.47 ± 0.57 ^{NS}	2.80 ± 0.48 ^{NS}	2.97 ± 0.62 ^{NS}
SB3	2.37 ± 0.67	2.87 ± 0.73	2.87 ± 0.73
SC3	2.50 ± 0.51	2.83 ± 0.75	2.83 ± 0.70

^{a-c}Means with different letters in the same column are significantly different(P<0.05).

[†]Significantly different in Ogye-peptide added samples, compared to each control samples (SA1, SB1, SC1) (P<0.05).

NS : no-significant

¹⁾Mean±SD

오계한방음료의 색과 농도에 대한 평가에서, 펩타이드를 첨가하지 않은 음료에서는 색과 농도에 유의적인 차이가 없다고 응답하였으나, 펩타이드를 첨가한 용액들에서 유의적으로 색이 더 연하고 농도가 약하다고 평가 하였다. 부유물로 인해 색이 탁해지지 않았다고 할 수 있겠다.

Table 55. 오계 한방음료의 외양 평가

Sample	외양	
	색	농도
SA1	2.73 ± 0.91 ^{NS}	2.20 ± 0.76 ^{NS}
SB1	2.77 ± 0.63	2.13 ± 0.73
SC1	2.80 ± 0.61	2.03 ± 0.77
SA2	2.33 ± 0.66 ^{ab}	2.07 ± 0.83 ^{NS}
SB2	2.57 ± 0.57 ^{a†}	2.40 ± 0.62
SC2	2.23 ± 0.57 ^{b†}	2.17 ± 0.75
SA3	2.27 ± 0.64 ^{a†}	1.97 ± 0.62 ^{NS}
SB3	2.70 ± 0.60 ^{b†}	1.90 ± 0.80 [†]
SC3	2.50 ± 0.78 ^{ab}	1.93 ± 0.58

^{a-c}Means with different letters in the same column are significantly different(P<0.05).

[†]Significantly different in Ogye-peptide added samples, compared to each control samples (SA1, SB1, SC1) (P<0.05).

NS : no-significant

¹⁾Mean±SD

기호도를 맛과 향미, 종합적 기호도로 나누어 평가하였다. 그 결과, 맛에 대한 기호도는 계피를 추가한 시료가 가장 높았고, 향미에 대한 기호도와 종합적인 기호도는 감초를 첨가한 시료가 유의적으로 가장 높았다.

펩타이드를 첨가한 경우 맛과 향미에 대한 기호도는 유의적으로 감소되었으나, 종합적 기호도에 있어서는 유의적인 수준은 아니었다. 동의보감 처방에 따라 쌍화탕을 제조하고, 이를 희석하여 만든 한방음료에 펩타이드 500mg을 첨가한 시료 SA2의 경우 맛에 대한 기호도가 첨가하지 않은 대조시료 SB1에 비해 유의적으로 낮았으나, 계피나 감초를 더 추가한 군에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

이상의 결과를 볼 때, 감초나 계피의 추가는 펩타이드 추가에 따른 관능성의 저하를 보완하고, 전체적인 기호도를 증진시킬 수 있는 것으로 평가되었다.

Table 56. 오계 한방음료의 기호도 평가

Sample	Preference		
	Taste Preference	Flavor Preference	Overall Preference
SA1	3.67 ± 0.71 ^a	2.30 ± 0.54 ^a	3.23 ± 0.63 ^a
SB1	3.83 ± 0.59 ^a	3.13 ± 0.73 ^b	3.57 ± 0.86 ^{ab}
SC1	3.50 ± 0.63 ^{ab}	3.33 ± 0.61 ^b	3.63 ± 0.72 ^b
SA2	3.13 ± 0.63 ^{NS†}	3.27 ± 0.79 ^{NS†}	3.10 ± 0.61 ^{NS}
SB2	3.23 ± 0.82	3.30 ± 0.75	3.03 ± 0.67
SC2	3.13 ± 0.78	3.43 ± 0.77	3.00 ± 0.64
SA3	2.07 ± 0.69 ^{a†}	3.10 ± 0.76 ^{NS†}	3.07 ± 0.58 ^{NS}
SB3	3.37 ± 0.72 ^b	2.87 ± 0.73	2.97 ± 0.72
SC3	2.27 ± 0.74 ^a	3.07 ± 0.69	2.93 ± 0.69

^{a-c}Means with different letters in the same column are significantly different(P<0.05).

[†]Significantly different in Ogye-peptide added samples, compared to each control samples (SA1, SB1, SC1) (P<0.05).

NS : no-significant

¹⁾Mean±SD

(1). 연산오계 활용 육수의 관능평가

(가). 오계 전육육수의 관능평가 결과

연산오계 전육을 사용, 첨가물을 달리하여 제조된 오계 전육육수의 관능평가 결과는 표 와 같이 나타났다. 오계 전육육수는 첨가물 없이 제조한 것(A1)에 비해 황기, 수삼과 같은 한약재를 첨가한 경우(A3, A4) 쓴맛은 증가하고, 단맛, 감칠맛, 구수한 향이 향상되고 비린향은 감소하는 것으로 나타났다. 일반계 전육육수(C1)와 비교하였을 경우에도 수삼을 첨가한 오계육수(A4)에서 구수한 향과 종합적 기호도가 높게 나타났다.

이러한 결과로부터 오계가 첨가물 없이 증탕될 경우 일반인들의 입맛에 익숙한 일반계에 비해 지방산 조성 등의 차이로 인해 비린향이 다소 느껴질 수 있으나, 첨가물을 활용하여 관능적 위해요인을 해결할 수 있음을 시사한다고 볼 수 있을 것이다. 또한 이러한 결과는 오계의 영양학적 우수성을 활용하기 위해 가공식품으로의 개발 시 제품으로서의 기호도를 향상시킬 수 있는 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

Table 57. 오계 전육육수의 관능평가 결과

Sample	Taste				Flavor		Overall Preference
	Sweet	Salty	Bitter	Savory	Savory odor	Smell of blood	
A1	3.5	2.9	1.9	3.3	3.1	4.8	3.3
A2	3.0	2.3	2.3	3.1	4.2	3.8	3.6
A3	3.3	2.4	2.5	3.2	4.0	3.6	3.7
A4	3.4	2.9	3.9	3.6	5.4	3.5	4.2
C1	3.9	3.2	2.1	4.0	4.4	4.1	4.8

(나). 오계 부산물육수의 관능평가 결과

연산오계 부산물을 사용, 첨가물을 달리하여 제조된 오계 부산물육수의 관능평가 결과는 표와 같이 나타났다. 연산오계의 부산물 육수는 첨가물 없이 제조되었을 경우(B1) 종합적인 기호도가 오계전육육수(A1)에 비해 낮았고, 특히 비린향이 강하게 나타났다. 닭머리 soup base와 닭 soup base의 향미 성분을 분석한 최성은의 연구(2011)에서 지방산패취의 원인 물질로 알려진 hexanal이 닭 soup base의 11배나 되는 양이 닭머리 soup base에서 동정되어, 신경조직의 구성성분인 인지질이 닭 근육보다 닭머리에 많이 함유되어 있다고 보고되었다.

닭머리에 특히 많은 고도의 불포화 지방산의 분해산물인 hexanal의 함량이 높을 수 있으며, 촉매작용으로 철분을 포함한 heme 화합물로 인해 산패취가 높아질 수 있다. 따라서 오계의 부산물을 활용한 육수 제조시, 비린향 등의 관능적 위해요소를 감소시키기 위해 닭머리 및 내장류의 침지과정을 거쳐 조직내 남아있는 혈액을 제거하는 과정이 반드시 필요하다고 사료된다.

오계 부산물 육수 중 마늘, 대파, 대추의 기본 첨가물과 황기 및 수삼 첨가 시 비린향이 감소하고 종합적인 기호도가 증가하였다. 그러나 황기보다 수삼을 첨가한 경우에 쓴맛이 높게 나타났다. 수조육류를 이용한 육수 제조시 동양이나 서양 조리 모두에 있어서 육류의 누린내 제거를 위한 향신채소의 사용은 필수적이다(Choi SE 2012).

서양 조리에 있어서 양파, 셀러리, 당근 등을 사용한 미르쁘와(mirepox)와 파슬리(parsely), 타임(thyme), 월계수 잎(bay leaf), 통후추 등을 묶은 부케가르니(bouquet garni)는 육수 재료의 중요 구성 성분이며(Choi 2001; Brown 2008; Kim 등 2008), 우리나라 전통 조리에 있어서도 육수 제조시 파, 마늘, 생강, 후추, 무 등의 향신채소가 항상 사용되고 있다(Chung 1990; Kang 1990; Hwang 1992). Lee 등(1999)의 연구를 통해 보면 한국의 주부들은 육수 제조시 누린내

제거를 위해 사용하는 재료로서 마늘(72%), 생강(68%)을 가장 많이 사용하고 있었고 그 다음으로는 파(60%), 양파(%), 후추(44%), 무(25%)를 사용하는 것으로 나타났다.

황기와 수삼은 전통적으로 닭을 이용한 탕요리에 사용되어 온 한약재로서 향신채로서의 기능 이외에 보양식을 위한 첨가물로서의 기능을 기대해 볼 수 있다. 닭머리 육수 제조를 위한 향신채소의 최적수준에 관한 연구(Choi SE 2012) 결과를 살펴보면, 향신 채소를 사용하지 않은 닭머리 육수에 비해 hexanal, pentanal 등의 aldehyde 화합물의 함량이 현저히 감소되었는데 이는 향신채소에 있는 향산화물질이 닭머리 육수의 지방 산패를 억제시켰기 때문인 것으로 파악하였다. 따라서 닭머리 육수 제조시 문제가 되는 이취(off-flavor)는 향신채소를 첨가함으로써 상당량 감소시킬 수 있는 것으로 보고하였다.

본 연구에서도 향신 채소로서 마늘, 대파, 월계수 잎 등의 사용이 오계 부산물 육수의 비린향을 감소시키는데 바람직한 결과를 나타냈고, 특히 황기와 수삼 첨가로 부산물 육수의 지방산패를 억제시키는 작용을 하여 관능성을 향상시킬 수 있었다. 이러한 결과는 오계를 활용한 가공식품 개발과정에서 부산물을 활용하여 경제성을 높일 수 있는 식품공정개발의 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

(다) 오계조미육수의 관능검사 결과

전통적인 방법으로 오계 머리와 향채류를 함께 넣어 끓인 경우, 대조시료와 비교했을 때 단맛이나 짠맛에는 차이가 없었으나, 쓴맛과 감칠맛이 더 강하다고 평가되었다 ($P<0.05$).

이에 비해 오계 머리를 오븐에 구운 후 제조한 부산물 육수의 경우 단맛과 짠맛, 감칠맛이 유의적으로 더 강하게 나타났고 쓴맛은 세 가지 시료 중 가장 낮게 나타났다. 특히 감칠맛의 경우 다른 시료의 약 2배 정도 감칠맛이 느껴지는 것으로 평가되었다.

구워서 제조한 오계부산물 육수 역시 전혀 염분을 추가하지 않고, 조리법만 변경되었음에도 불구하고 짠맛 역시 2배 이상 강하게 느껴졌다고 응답되었는데, 이는 상대적으로 높은 단맛과 감칠맛으로 인한 것으로 생각된다. 실제 제품 개발시 염분을 적게 사용하고도 짠맛을 즐길 수 있을 것으로 판단된다.

Table 58. 오계 조미 육수 관능평가 결과

Sample	Taste			
	Sweet	Salty	Bitter	Savory
C1	2.57 ± 2.01 ^{a1)}	1.97 ± 1.38 ^a	2.27 ± 1.80 ^a	2.60 ± 1.38 ^a
Y1	2.60 ± 1.69 ^a	2.30 ± 1.39 ^a	3.03 ± 2.31 ^b	3.23 ± 1.79 ^b
Y2	4.63 ± 2.14 ^b	5.93 ± 2.43 ^b	1.83 ± 0.91 ^a	6.03 ± 2.04 ^c

^{a-c}Means with different letters in the same row are significantly different(P<0.05).

¹⁾Mean±SD

구수한 향 역시 오계 머리를 구워서 제조한 시료에서 유의적으로 가장 크다고 응답하였고, 전체적 맛의 기호도와 종합적 기호도 역시 구워서 제조한 시료에서 가장 높게 나타났다.

Table 59. Flavor sensory evaluation of Yeonsan Ogye Chicken head stock and Normal Chicken head stock

Sample	Flavor		기호도	
	구수한 향	비린내	맛의 기호도	종합적 기호도
C1	4.53 ± 1.93 ^{a1)}	3.90 ± 2.50 ^{NS}	2.77 ± 1.78 ^a	2.80 ± 1.63 ^a
Y1	4.63 ± 2.25 ^a	3.60 ± 1.79	3.10 ± 1.67 ^a	3.20 ± 1.87 ^a
Y2	5.93 ± 1.93 ^b	4.17 ± 2.07	5.93 ± 2.35 ^b	6.07 ± 2.20 ^b

^{a-c}Means with different letters in the same row are significantly different(P<0.05).

¹⁾Mean±SD

맛의 기호도와 종합적 기호도에 어떤 요소들이 영향을 미치는지 알아보기 위하여 상관분석을 실시하다. 단맛, 짠맛, 쓴맛, 감칠맛의 4가지 맛과 구수한향과 비린내의 2가지 향 중 가장 유의적으로 상관성이 높게 나타난 것은 ‘감칠맛’으로 나타났고, 그 결과는 다음 표에 제시하였다.

자료를 제시하지는 않았으나 향 중에서는 비린향과 기호도와의 음의 상관관계 보다는 구수한 향과의 양의 상관관계가 더 크게 나타나는 경향을 보였다. 따라서 오계부산물 육수의 경우 감칠맛을 강조할 필요가 있을 것으로 생각된다.

Table 60. Pearson's correlation coefficient between sensory parameters and favor

Sample	맛의 기호도			종합적 기호도		
	C1	Y1	Y2	C1	Y1	Y2
C1	0.524 ^{**}			0.455 [*]		
감칠맛		0.764 ^{***}			0.666 ^{***}	
			0.597 ^{***}			0.430 [*]

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

이상의 관능평가 결과를 볼 때, 가장 관능성과 기호도가 높게 평가된 오계머리를 구워서 만든 조미 육수를 최종제품 레시피로 선정하다. 오계 부산물 육수의 활용은 원가 절감과 부산물 활용 및 영양적 측면에서도 우수하다고 할 수 있다.

마. 영양성분분석 및 영양소 함량 평가 결과

(1). 연산오계육의 영양성분 분석 결과

(가). 일반성분과 비타민 및 무기질

연산오계육과 일반계육의 일반조성은 Table 와 같다. 수분함량의 경우 연산오계육과 일반계육에 유의적 차이가 없었지만, 연산오계육의 경우 1년산과 3년산 연산오계육에서 각각 22.8g/100g와 22.7g/100g로 일반계육에서 22.4g/100g에 비해 유의적(P<0.05)으로 높게 나타났다. 지방 함량 역시 1년산 및 3년산 연산오계육에서 각각 0.79g/100g와 0.95g/100g으로 일반계육(0.35g/100g)보다 유의적(P<0.05)으로 높았다.

단백질 함량은 오계에서 일반 계육에 비해 유의적으로 높게 나타났는데 (P<0.05), 이러한 결과는 농촌진흥청 농촌생활연구소에서 발간한 식품성분표(1996)에 수록된 오골계 가슴살의 영양 성분 분석 결과 수분 74%, 단백질 19%, 지방 6.1%, 탄수화물 0.0%, 회분 0.8%와 비교할 때, 일반계육에 비해 단백질과 지방 함량이 높은 것으로 나타났다.

오계육의 지방 함량이 연구마다 이러한 차이를 보이는 것은 일반닭과는 달리 육용으로 사육장에 사육되지 않고, 넓은 공간에서 사육되는 환경 및 사료의 차이로 인한 것으로 사료된다.

3년산 오계육의 비타민 B2, B6, C의 함량이 유의적으로 가장 높았고, 특히 3년산 오계육의 비타민 C 함량이 일반계육 및 1년산 오계육과 비교하여 월등히 높은 것으로 보아 3년산 연산오계의 약리작용과 관련이 있을 것으로 사료된다.

철분 함량의 경우 일반계육에서는 검출되지 않은 반면, 3년산 오계육이 1년산 오계육보다 유의적으로 높게 나타났고, 아연 함량 역시 3년산 오계육이 1년산 오계육보다 유의적으로 높게 나타나, 같은 오계육에서도 연령차에 따른 영양소 함량의 변화를 파악할 수 있었다.

특히 3년산 오계육은 Ca 및 Fe, Zn 과 같은 무기질 함량이 유의적으로 높은 것으로 보아 전통적으로 사용되어 온 오계의 약리적 효능을 뒷받침 해 주는 결과라고 사료된다.

Table 61. Chemical Composition and Vitamin and Mineral Contents of Yeosan Ogye and Common Chicken Meats (Unit : per 100g)

Items	Common	Yeosan Ogye	Yeosan Ogye
-------	--------	-------------	-------------

	Chicken	(1-year-old)	(3-years-old)
Moisture(g)	75.06±0.18 ¹⁾	74.98±0.15	75.33±0.07
Protein(g)	22.39±0.05 ^a	22.80±0.08 ^b	22.70±0.03 ^b
Fat(g)	0.35±0.06 ^a	0.79±0.02 ^b	0.95±0.08 ^b
Carbohydrate(g)	0.76±0.02 ^c	0.10±0.03 ^a	0.22±0.01 ^b
Ash(g)	1.46±0.04 ^b	1.34±0.07 ^a	0.81±0.01 ^b
Vitamin A(mg)	1.11±0.01 ^c	0.72±0.01 ^b	0.07±0.00 ^a
Vitamin B ₂ (mg)	0.20±0.02 ^a	0.70±0.04 ^b	0.85±0.04 ^c
Vitamin B ₆ (mg)	0.72±0.01 ^b	0.48±0.04 ^a	1.07±0.02 ^c
Vitamin C(mg)	0.24±0.01 ^a	0.26±0.01 ^a	5.33±0.17 ^b
Vitamin E(mg)	1.91±0.02 ^c	1.83±0.01 ^b	0.01±0.00 ^a
Calcium(mg)	3.52±0.31 ^a	4.06±0.24 ^a	8.62±0.04 ^b
Magnesium(mg)	24.90±0.49 ^c	22.23±0.48 ^b	19.73±0.06 ^a
Iron(mg)	N.D.	0.68±0.08 ^a	2.42±0.11 ^b
Zinc(mg)	0.04±0.01 ^a	0.35±0.19 ^b	1.74±0.03 ^c

a-cMeans with different letters in the same row are significantly different(P<0.05).

1)Mean±SD.

(나). 지방산 조성

연산오계육과 일반계육의 지방산 조성은 Table 61과 같다. 필수지방산의 경우 연산오계육이 일반육보다 그 함량이 유의적으로(P<0.05) 높게 나타났는데, 특히 1년산 오계육이 3년산 오계육보다 필수지방산의 함량이 유의적으로(P<0.05) 더 높았다(20.54% vs 16.20%). 포화지방산 함량은 일반계육에서(47.89%) 1년산 오계육(44.20%)보다 유의적(P<0.05)으로 높았으며, 3년산 오계육(49.96%)에서 일반계육보다 유의적으로 높게 나타났다.

반면 다중불포화지방산은 연산오계육에서 일반계육보다 유의적(P<0.05)으로 높았는데, 연차별로 비교하였을 때 3년산 오계육(33.27%)의 경우 1년산 오계육(30.78%)보다 유의적(P<0.05)으로 높은 경향을 보였다.

특히, n-3 및 n-6 지방산 모두 3년산 오계육에서 유의적으로 가장 높은 수준을 보였다. 이러한 결과는 최근 기능성 식품에 대한 관심이 높아지면서 n-3 계열의 지방산에 대한 소비요구도가 증가하고 있는 것을 고려할 때, 연산오계육의 기능성 식품화에 대한 기초 자료를 뒷받침 할 수 있는 근거가 될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 62. 연산오계육과 일반계육의 지방산 조성 (Unit : g/100g total fatty acids)

Items	Common Chicken	Yeonsan Ogye (1-year-old)	Yeonsan Ogye (3-year-old)
Essential Fatty Acid	14.46±0.09 ^a	20.54±0.06 ^c	16.20±0.11 ^b
Saturated Fatty Acid	47.89±0.06 ^b	44.20±0.10 ^a	49.96±0.07 ^c
Monounsaturated Fatty Acid	26.39±0.15 ^c	25.02±0.01 ^b	16.77±0.14 ^a
Polyunsaturated Fatty Acid	25.73±0.21 ^a	30.78±0.08 ^b	33.27±0.07 ^c
n-3 fatty Acid	4.08±0.08 ^b	3.33±0.07 ^a	5.33±0.13 ^c
n-6 fatty Acid	21.65±0.13 ^a	27.45±0.01 ^b	27.94±0.06 ^c
Very Long Chain Fatty Acid(C≥22)	6.38±0.01 ^a	9.07±0.11 ^b	17.24±0.04 ^c

a-cMeans with different letters in the same row are significantly different(P<0.05).

1)Mean±SD.

(다). 아미노산 조성

일반계육 및 연산오계육의 아미노산 조성을 분석한 결과는 Table 63와 같다. 먼저 가슴살의 경우, 일반계육보다 1년산 및 3년산 오계육 모두에서 그 함량이 유의적(P<0.05)으로 높은 아미노산은 aspartic acid, threonine, proline, glycine, alanine, valine, isoleucine, histidine 이었다. Glutamic acid와 methionine의 경우에는 3년산 오계육에서 그 함량이 유의적(P<0.05)으로 가장 높았고, tyrosine과 phenylalanine의 경우에는 1년산 오계육보다 일반계육에서 그 함량이 유의적(P<0.05)으로 높았으나, 3년산 오계육의 함량이 일반계육보다는 높게(P<0.05)나타났다.

다리살의 아미노산 조성을 살펴보면 1년산 및 3년산 오계육의 aspartic acid, glutamic acid, cystine, methionine 함량이 일반계육 보다 유의적(P<0.05)으로 높았고, 연차별로 비교하였을 때 3년산 오계육이 1년산 오계육보다 aspartic acid, glutamic acid, cystine, methionine, tyrosine, phenylalanine, histidine, lysine 성분이 유의적으로(P<0.05) 높은 것으로 조사되었다.

Table 63. 일반계육과 연산오계육의 아미노산 조성 분석 결과 (Unit : mg/100g)

Items	Breasts			Legs		
	Common Chicken	Yeonsan Ogye (1-year-old)	Yeonsan Ogye (3-years-old)	Common Chicken	Yeonsan Ogye (1-year-old)	Yeonsan Ogye (3-years-old)
Aspartic acid	1,947.7±62.9 ¹⁾ a	2,194.3±40.8b	2,322.0±19.3b	1,682.1±139.2a	1,871.7±3.6a	2,230.3±1.9b
Threonine	955.0±35.2a	1,193.0±1.8c	1,110.4±11.1b	828.7±73.5a	1,014.6±4.2b	1,076.5±24.4b
Serine	816.0±30.1a	1,116.7±48.1b	923.9±15.7a	729.2±60.5a	1,022.8±0.3b	943.6±6.0b
Glutamic acid	3,048.3±99.7a	3,182.7±11.9a	3,659.3±76.1b	2,822.6±244.4a	2,822.3±25.3a	3,739.9±16.5b
Proline	796.7±54.7a	1,062.2±21.5b	928.1±46.4ab	823.9±160.3	1,565.4±635.6	1,054.6±68.3
Glycine	828.3±33.1a	1,712.3±62.5c	974.3±8.5b	1,013.6±332.7a	2,048.9±397.3b	1,271.4±30.9a

Alanine	1,146.5±38.2a	1,937.3±47.0c	1,367.8±0.0b	1,065.7±30.5	1,470.9±553.7	1,376.9±24.4
Valine	984.7±19.1a	1,223.8±29.1b	1,184.3±19.4b	820.6±84.3a	1,059.7±11.0b	1,092.3±4.2b
Methionine	585.2±13.2a	600.9±7.7a	704.3±11.1b	489.5±52.6a	499.8±7.4a	654.7±19.3b
Isoleucine	947.6±19.1a	1,073.3±16.5b	1,151.4±5.2c	790.2±103.2a	915.9±22.2ab	1,075.3±5.9c
Leucine	1,619.0±42.6a	1,882.5±24.6b	1,958.4±26.7b	1,390.5±155.6a	1,594.1±17.3ab	1,857.8±4.4b
Tyrosine	676.7±25.9	578.3±19.0a	815.7±10.2c	595.5±92.8ab	482.0±22.0a	773.6±19.1c
Phenylalanine	783.4±14.0	721.5±22.2a	942.1±4.6c	695.8±72.0a	644.4±6.5a	912.6±8.1b
Histidine	950.9±15.1a	1,187.4±90.5b	1,427.5±88.7c	584.8±64.1a	634.9±0.3a	856.4±8.4b
Lysine	1,914.9±13.6a	1,824.1±52.0a	2,152.9±6.9b	1,590.7±203.5a	1,567.4±38.0a	2,084.2±9.0b
Arginine	1,244.8±31.4a	1,120.2±9.0a	1,531.4±55.6	1,158.8±6.7a	991.3±12.1b	1,558.2±49.2c

a-cMeans with different letters in the same row are significantly different(P<0.05).

1)Mean±SD

일반계육 및 연산오계육의 아미노산 구성별 함량은 Table 63에 제시하였는데, 가슴살의 경우 필수 아미노산 및 결사슬 아미노산의 함량이 유의적(P<0.05)으로 높고, 특히 3년산 오계육의 황함유 아미노산 및 방향족 아미노산의 함량이 유의적(P<0.05) 높은 것을 알 수 있었다. 다리살의 경우에는 3년산 오계육에서 필수 아미노산과 결사슬 아미노산, 황함유 아미노산의 함량이 유의적(P<0.05)으로 높았다.

이와 같은 결과를 종합해 보면 일반계육에 비해 오계육에서 필수아미노산과 결사슬 아미노산 함량이 높고, 오계육 중에서도 3년산 오계육의 황함유 아미노산 함량이 높아 최근 황함유 아미노산의 여러 가지 기능성과 관련이 있을 것으로 생각된다.

Table 64. 아미노산 구성별 함량 (Unit : g/100g)

Items	Breasts			Legs		
	Common Chicken	Yeonsan Ogye (1-year-old)	Yeonsan Ogye (3-years-old)	Common Chicken	Yeonsan Ogye (1-year-old)	Yeonsan Ogye (3-years-old)
Essential Amino acid	8.7 ± 0.2 ^{1)a}	9.7 ± 0.2 ^b	10.6 ± 0.1 ^c	7.2 ± 0.8 ^a	7.9 ± 0.1 ^a	10.1 ± 0.1 ^b
Branched chain Amino acid	3.6 ± 0.1 ^a	4.2 ± 0.1 ^b	4.3 ± 0.0 ^b	3.0 ± 0.3 ^a	3.6 ± 0.0 ^{ab}	4.0 ± 0.0 ^b
Sulfur containing Amino acid	0.6 ± 0.0 ^a	0.6 ± 0.1 ^a	0.7 ± 0.1 ^b	0.5 ± 0.1 ^a	0.5 ± 0.0 ^a	0.7 ± 0.0 ^b
Total Amino acid	19.2 ± 0.5 ^a	22.6 ± 0.5 ^b	23.2 ± 0.2 ^b	17.1 ± 0.8 ^a	20.2 ± 0.2 ^b	22.6 ± 0.3 ^c

a-cMeans with different letters in the same row are significantly different(P<0.05).

1)Mean±SD

(2). 연산오계 활용 육수의 영양소 분석 결과

(가). 일반성분과 비타민 및 무기질

일반계와 1년산 및 3년산 연산오계를 활용한 육수의 일반조성과 비타민 및 무기질 함량은 Table 65과 같다. 육수의 특성상 98% 이상이 수분이었고, 실제 수분을 제외한 나머지 건중량이 많지는 않으나, 영양성분 차이는 다음과 같았다.

먼저 일반닭육수와 오계육수를 비교한 결과, 일반닭육수에 비해 3년산 오계 육수의 단백질과 비타민 B6, 비타민 C, 칼슘함량이 유의적으로 높은 반면, 지방 함량은 낮았다. 부산물 육수의 경우 단백질과 지방, 비타민 A, 비타민 B2, 비타민 B6, 비타민 C, 비타민 E 함량이 유의적으로 전육수에 비해 높았다.

특히 3년산 오계의 부산물 육수는 특히 비타민 A, 비타민 B2, 비타민 C, 비타민 E를 포함한 비타민 함량이 높았다. 자세히 살펴보면, 3년산 오계 전육수의 비타민 B6 및 Ca 함량이 일반계 및 1년산 오계를 활용한 전육수보다 유의적(P<0.05)으로 높게 나타났다. 또한 1년산과 3년산 오계 전육수 모두에서 비타민 C의 함량이 일반계 전육수보다 유의적(P<0.05)으로 높았다.

이것은 3년산 오계육의 비타민 B6와 비타민 C, 그리고 Ca 함량이 일반계육보다 유의적으로 높았던 것을 고려할 때, 이 성분들이 육수로 용출 되었음을 짐작할 수 있으나, 비타민 C의 경우 1일 필요량에 영향을 미칠만한 수준은 아니었다.

1년산 오계의 부산물 육수에서는 일반계 부산물 육수보다 비타민 B2, 비타민 C, Mg 함량이 유의적으로 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과들로부터 3년산 오계 전육수의 경우 단백질 대사에 중요한 비타민 B6 및 Ca 함량이 높아 그 영양적 가치를 1년산 오계 전육수 보다 더 높게 평가할 수 있으며, 오계 부산물 육수의 경우 특히 비타민 B2 함량이 높고 Mg 함량도 유의적으로 높게 나타나, 부산물 육수의 관능적 위해요인을 해결한다면 일반계의 부산물 육수보다 더 우수한 영양성분의 섭취가 가능할 것으로 사료된다.

Table 65. Chemical Composition and Vitamin and Mineral Contents of Yeonsan Ogye and Common Chicken Broths (Unit : per 100g)

Items	Whole Meat Broths			By-Product Broths	
	Common Chicken	Yeonsan Ogye (1-year-old)	Yeonsan Ogye (3-years-old)	Common Chicken	Yeonsan Ogye (1-year-old)
Moisture(g)	98.05±0.04 ¹ _a	98.60±0.02 ^d	98.51±0.01 ^c	98.04±0.01 ^a	98.21±0.03 ^b
Protein(g)	1.14±0.03 ^b	1.04±0.01 ^a	1.23±0.03 ^c	1.30±0.01 ^c	1.29±0.04 ^c
Fat(g)	0.46±0.02 ^d	0.20±0.01 ^b	0.06±0.01 ^a	0.49±0.02 ^d	0.31±0.01 ^c

Carbohydrate(g)	0.25±0.04 ^c	0.08±0.02 ^a	0.14±0.01 ^b	0.05±0.01 ^c	0.05±0.01 ^a
Ash(g)	0.12±0.01 ^c	0.09±0.00 ^b	0.07±0.00 ^a	0.13±0.01	0.15±0.00 ^d
Vitamin A(mg)	0.054±0.001 ^c	0.038±0.00 ^b	0.011±0.00 ^a	0.144±0.00 ^d	0.159±0.00 ^e
Vitamin B ₂ (mg)	1.20±0.04 ^b	1.27±0.01 ^c	0.12±0.01 ^a	1.69±0.01 ^d	2.07±0.04 ^e
Vitamin B ₆ (mg)	0.23±0.01 ^b	0.12±0.01 ^a	0.74±0.04 ^d	0.38±0.03 ^c	0.22±0.02 ^b
Vitamin C(mg)	0.06±0.01 ^a	0.11±0.01 ^b	0.97±0.02 ^d	0.10±0.01 ^b	0.14±0.00 ^c
Vitamin E(mg)	0.027±0.001 ^b	0.029±0.00 ^c	0.001±0.00 ^a	0.069±0.00 ^d	0.074±0.00 ^e
Calcium(mg)	1.89±0.18 ^a	1.81±0.75 ^a	3.31±0.19 ^b	1.10±0.01 ^a	1.22±0.26 ^a
Magnesium(mg)	1.64±0.00 ^b	1.39±0.11 ^a	1.41±0.04 ^a	1.64±0.01 ^b	1.82±0.04 ^c
Iron(mg)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Zinc(mg)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Selenium(mg)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

a-cMeans with different letters in the same row are significantly different(P<0.05).

1)Mean±SD

(나). 지방산 조성

일반계와 1년산 및 3년산 연산오계를 이용한 육수의 지방산 조성은 Table 66과 같았다. 필수지방산 함량은 3년산 오계 전육수가 일반계 및 1년산 오계 전육수보다 유의적으로 높았다. 부산물 육수의 경우에는 필수지방산, 다중불포화지방산, n-6 지방산 함량이 일반계보다 1년산 오계에서 유의적으로 높게 나타났고, n-3 지방산 함량도 일반계 보다 높은 수준을 보여, 오계 부산물 육수의 높은 영양학적 활용가치를 기대해 볼 수 있는 것으로 사료된다.

특히 오계를 활용한 가공식품 개발시 부산물 육수의 활용은 원가절감에 긍정적인 영향을 끼칠 수 있는 요인이 될 수 있다. 따라서 이러한 결과는 전육육수 보다 바람직한 지방산 조성을 갖는 오계 부산물 육수의 영양학적 우수성을 뒷받침하고, 가공식품 개발시 가격 경쟁력에 도움이 되는 근거 자료로 활용될 수 있을 것이다.

Table 66. Composition of Fatty Acid in Yeonsan Ogye and Common Chicken Broths (Unit : g/100g total fatty acids)

Items	Whole Meat Broths			By-Product Broths	
	Common Chicken	Yeonsan Ogye (1-year-old)	Yeonsan Ogye (3-years-old)	Common Chicken	Yeonsan Ogye (1-year-old)
Essential FA	11.80±0.04 ^{1)c}	11.60±0.02 ^b	15.85±0.11 ^a	13.87±0.06 ^d	22.34±0.00 ^e
Saturated FA	44.6±0.17 ^c	58.20±0.11 ^e	50.91±0.03 ^d	42.93±0.08 ^a	43.65±0.00 ^b
MUFA	39.98±0.09 ^d	18.47±0.02 ^b	30.22±0.01 ^a	40.63±0.01 ^e	23.36±0.04 ^c
PUFA	15.40±0.08 ^a	23.31±0.04 ^d	18.88±0.04 ^c	16.44±0.06 ^b	32.95±0.04 ^c
n-3 fatty Acid	11.0±0.01 ^a	7.64±0.06 ^e	2.62±0.02 ^c	1.35±0.01 ^b	4.17±0.01 ^d
n-6 fatty Acid	14.30±0.06 ^a	15.67±0.04 ^d	16.26±0.01 ^c	15.09±0.04 ^b	28.78±0.05 ^e
Very Long Chain Fatty Acid(C≥22)	2.06±0.11 ^b	11.96±0.03 ^d	3.40±0.07 ^c	1.47±0.02 ^a	3.57±0.06 ^c

a-cMeans with different letters in the same row are significantly different(P<0.05).

1)Mean±SD

(라). 아미노산 조성

일반계와 1년산 및 3년산 연산오계를 이용한 육수의 아미노산 조성은 Table 66,67와 같았다. Histidine성분은 유일하게 전육수 및 부산물 육수 모두에서 연산오계를 활용한 경우가 일반계보다 유의적으로 그 함량이 높게 나타났다. Threonine과 proline 및 황함유 아미노산은 1년산 오계 부산물 육수에서 일반계 부산물 육수보다 유의적으로 높게 나타났다.

Table 67. Contents of Amino Acids in Yeonsan Ogye and Common Chicken Broths (Unit : mg/100g)

Items	Whole Meat Broths			By-Product Broths	
	Common Chicken	Yeonsan Ogye (1-year-old)	Yeonsan Ogye (3-years-old)	Common Chicken	Yeonsan Ogye (1-year-old)
Threonine	14.34±4.51 ^{bc}	11.86±0.46 ^{bc}	2.41±0.29 ^a	9.52±0.86 ^b	15.54±0.71 ^c
Serine	8.77±2.68	7.97±0.46	5.45±2.31	6.45±0.14	9.38±0.93
Glutamic acid	11.74±1.03	10.55±1.01	10.29±10.01	10.44±0.70	8.20±1.53
Proline	65.09±11.39 ^a	62.41±13.41 ^a	51.73±1.79 ^a	46.30±15.91 ^a	96.00±11.99 ^b
Glycine	ND	ND	5.10±1.11	ND	ND
Alanine	51.03±0.37 ^d	97.07±0.91 ^e	7.04±0.46 ^a	45.72±0.62 ^c	31.15±0.58 ^b
Valine	7.00±0.64 ^b	8.13±0.05 ^a	3.13±0.00 ^a	7.21±0.12 ^{bc}	7.55±0.47 ^{bc}
Methionine	2.80±0.43 ^{bc}	2.35±0.36 ^b	0.89±0.07 ^a	3.18±0.17 ^c	2.45±0.30 ^{bc}
Isoleucine	4.27±0.00 ^b	4.16±0.32 ^b	1.55±0.26 ^a	4.63±0.14 ^b	4.62±0.08 ^b
Leucine	9.98±0.24 ^c	9.03±0.37 ^b	3.30±0.29 ^a	10.11±0.06 ^c	9.95±0.22 ^c
Tyrosine	2.29±0.32 ^{cd}	1.56±0.27 ^{ab}	0.90±0.04 ^a	2.69±0.10 ^d	1.62±0.41 ^{bc}
Phenylalanine	4.33±0.56 ^b	3.81±0.66 ^b	1.66±0.06 ^a	4.65±0.45 ^b	4.80±0.25 ^b
Histidine	20.00±0.34 ^b	32.82±0.24 ^d	31.40±0.81 ^c	15.10±0.18 ^a	20.00±0.79 ^b
Lysine	16.85±0.09 ^c	10.34±0.22 ^b	4.30±0.88 ^a	15.91±0.20 ^c	11.28±0.34 ^b
Arginine	15.90±0.14 ^d	12.63±0.11 ^b	4.20±0.23 ^a	14.63±1.00 ^{cd}	13.77±1.22 ^{bc}

a-cMeans with different letters in the same row are significantly different(P<0.05).

1)Mean±SD

Table 68. Composition of Amino Acid in Yeonsan Ogye and Common Chicken broth (Unit : g/100g)

Items	Whole Meat Broths			By-Product Broths	
	Common Chicken	Yeonsan Ogye (1-year-old)	Yeonsan Ogye (3-years-old)	Common Chicken	Yeonsan Ogye (1-year-old)
Essential amino acid	90.8±5.8 ^{1)b}	86.2±2.9 ^b	48.6±1.9 ^a	86.2±2.0 ^b	83.2±1.6 ^b
Branched chain Amino acid	25.8±0.9 ^c	23.3±0.7 ^b	8.0±0.5 ^a	28.7±0.0 ^d	25.8±0.7 ^c
Sulfur containing amino acid	12.5±0.5 ^b	14.4±0.1 ^c	0.9±0.1 ^a	16.2±0.1 ^d	26.8±0.8 ^e
Total amino acid	234.4±21.9 _{bc}	274.7±17.7 _c	133.4±17.9 ^a	196.5±11.8 _b	236.3±7.6 ^b _c

a-dMeans with different letters in the same row are significantly different(P<0.05).

1)Mean±SD

(3). 연산오계란의 영양소 분석 결과

(가). 일반성분과 비타민 및 무기질

연산오계 계란의 일반성분과 비타민 및 무기질 함량을 분석한 결과는 Table 69과 같다. 난황과 난백에서 모두 일반계란과의 유의적인 차이는 없었으나, 비타민 C 함량이 난황과 난백에서 모두 일반계란보다 높은 경향을 나타냈다.

Table 69. Chemical Composition and Vitamin and Mineral Contents of Yeonsan Ogye and Common Chicken eggs (Unit : per 100g)

Items	Egg yolks		Egg whites	
	Common Chicken	Yeonsan Ogye	Common Chicken	Yeonsan Ogye
Moisture(g)	54.08±0.17 ¹⁾	55.34±0.57	86.85±0.05	87.64±0.04*
Protein(g)	15.35±0.25	15.13±0.18	10.60±0.07	9.68±0.04
Fat(g)	26.5±70.19	26.09±0.13	0.04±0.00	0.03±0.01
Carbohydrate (g)	1.73±0.04	1.53±0.13	1.60±0.01	1.70±0.01
Ash(g)	1.88±0.04	1.92±0.16	0.92±0.04	0.97±0.06
Vitamin A(mg)	1.402±0.008	0.640±0.012	0.010±0.01	0.007±0.01
V i t a m i n B ₂ (mg)	0.21±0.01	0.12±0.02*	0.21±0.01	0.09±0.01*
V i t a m i n B ₆ (mg)	0.32±0.02	0.18±0.01*	0.49±0.05	0.28±0.01
Vitamin C(mg)	0.04±0.01	0.15±0.01*	0.04±0.00	0.17±0.01*
Vitamin E(mg)	0.751±0.004	0.445±0.01*	0.040±0.001	0.035±0.001*
Calcium(mg)	64.94±0.97	62.28±4.97	2.95±0.30	2.56±0.49
Magnesium (mg)	8.96±0.38	7.84±0.28*	10.61±0.16	7.45±0.04*
Iron(mg)	3.48±0.19	7.84±0.28	N.D.	N.D.
Zinc(mg)	1.82±0.04	2.77±0.13	N.D.	N.D.
Selenium(mg)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

a-cMeans with different letters in the same row are significantly different(P<0.05).

1)Mean±SD

(나). 지방산 조성

오계란의 지방산 조성 결과는 Table 70과 같이 나타났다. 난황과 난백 모두 일반계란과 유의적인 차이는 없으나, 오계란의 난황, 난백에서 필수지방산과 불포화지방산, 특히 n-3 지방산 함량이 높은 경향을 보였다.

또한 일반계란에 비해 오계란의 난황, 난백에서 모두 긴사슬 지방산함량이 적고, 짧은 사슬 지방산 위주로 구성되어 있어 소화작용에 보다 용이한 식품으로 사료된다. 이러한 결과로부터 오계란은 영유아를 위한 가공식품 개발 시 적합하며, 특히 두뇌발달에 도움이 되는 영양급원이 풍부한 식품으로서의 효과를 기대해 볼 수 있을 것이다.

Table 70. Composition of Fatty Acid in Yeonsan Ogye and Common Chicken Eggs (Unit : g/100g total fatty acids)

Items	Egg yolks		Egg whites	
	Common Chicken	Yeonsan Ogye	Common Chicken	Yeonsan Ogye
Essential Fatty Acid	8.67±0.10 ¹⁾	10.62±0.07	8.62±0.08	12.94±0.02
Saturated Fatty Acid	41.64±0.12	39.02±0.08	67.74±0.06	65.53±0.09
MUFA	36.04±0.04	32.51±0.03	14.79±0.05	15.40±0.08
PUFA	22.33±0.16	28.47±0.06	17.48±0.11	19.08±0.01
n-3 fatty Acid	7.97±0.04	11.31±0.01	0.51±0.02	2.26±0.04
n-6 fatty Acid	14.36±0.12	17.31±0.06	16.98±0.09	16.83±0.05
Very Long Chain Fatty Acid (C≥22)	16.95±0.04	17.57±0.03	10.93±0.00	5.48±0.07

a-cMeans with different letters in the same row are significantly different(P<0.05).

1)Mean±SD

(다). 아미노산 조성

연산오계의 난황, 난백의 아미노산 조성과 아미노산 구성별 함량은 각각 Table 71과 Table 72와 같이 분석되었다. 일반계란과 비교하여 연산오계란의 아미노산 성분이 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나, 오계란의 난황에서 glutamic acid와 aspartic acid 함량이 높은 경향을 보였는데 아미노산 중 glutamic acid와 aspartic acid는 감칠맛을 가진 것으로 알려져 있어(Kim SS 2010), 오계 난황을 활용한 가공식품 개발 시 감칠맛을 증진을 기대해 볼 수 있을 것으로 사료된다.

Table 71. Contents of Amino Acids in Yeonsan Ogye and Common Chicken Broths (Unit : mg/100g)

Items	Egg yolks		Egg whites	
	Common Chicken	Yeonsan Ogye	Common Chicken	Yeonsan Ogye
Aspartic Acid	1253.98±59.22	1349.71±40.42	1199.18±87.03	1041.82±0.31
Threonine	736.42±53.58	704.63±24.05	535.93±40.56	511.24±3.85
Serine	1356.28±26.63	1120.83±11.92*	803.32±54.77	860.68±0.68
Glutamic acid	1458.12±47.74	1712.59±21.56*	1553.35±109.52	1179.51±4.46
Proline	574.85±23.77	478.75±21.30	423.07±25.81	378.99±42.33
Glycine	680.39±31.54	415.49±11.40*	392.93±27.86	378.99±42.33*
Alanine	993.06±51.08	717.17±19.35	664.21±46.38	117.84±0.02*
Cystine	94.18±28.24	179.98±14.55	230.19±11.87	117.84±0.02
Valine	859.84±22.77	780.31±37.19	730.74±53.67	717.43±5.30*
Methionine	295.01±17.87	358.55±11.55	442.65±35.11	334.37±2.26
Isoleucine	655.97±27.63	691.67±6.19	565.78±38.40	488.15±0.02*
Leucine	1134.04±65.19	1201.67±24.05	915.18±24.37	828.55±1.15*
Tyrosine	399.85±20.38	597.38±37.86	450.33±35.24	281.43±1.35
Phenylalanine	438.74±27.53	602.74±31.82*	677.60±52.22	467.18±0.11
Histidine	392.43±8.23	545.63±17.09*	568.93±38.96	404.59±16.48
Lysine	898.66±45.41	1052.97±48.75	774.77±63.64	611.88±6.94
Arginine	634.67±92.11	845.13±31.93	637.63±57.31	444.76±34.49

a-cMeans with different letters in the same row are significantly different(P<0.05).

1)Mean±SD

Table 72. Composition of Amino Acid in Yeonsan Ogye and Common Chicken Meats(Unit : g/100g)

Items	Egg yolks		Egg whites	
	Common Chicken	Yeonsan Ogye	Common Chicken	Yeonsan Ogye
Essential amino acid	5.5±0.3 ^{NS}	6.0±0.2	5.2±0.3	4.4±0.0
Branched chain Amino acid	2.7±0.1 ^{NS}	2.7±0.0	2.2±0.1	2.0±0.0
Sulfur containing amino acid	0.4±0.0 ^{NS}	0.5±0.0	0.7±0.0	0.5±0.2
Total amino acid	12.9±0.6 ^{NS}	13.4±0.4	11.6±0.8	10.1±0.0

a-dMeans with different letters in the same row are significantly different(P<0.05).

1)Mean±SD

(4). 최종 개발 제품의 영양소 함량 분석

(가). 오계펩타이드 한방음료, 오계경육고 펩타이드 환, 오계부산물 조미육수의 일반성분

최종 레시피로 개발된 제품 3종을 전남대학교 공동실험실습관에 성분분석을 의뢰하였으며 각 제품별로 식품성분 분석을 진행하였다. 성분분석 항목은 일반성분 분석(수분, 조회분, 조단백질, 조지방(한방환제품만 분석)), Vitamin A/E, Vitamin B군, Vitamin C, Total fatty acids, Amino acid 총 6가지 항목이며 이에 대한 결과는 아래와 같다.

Table 73. proximate analysis of Yeonsan Ogye product (Unit : %)

	수분	조회분	조단백질	조지방
SP-1 (오계펩타이드 한방음료)	95.75	0.28	0.92	-
Y2 (오계부산물 조미육수)	97.12	0.30	2.25	-
GW (오계경육펩타이드 환)	40.22	0.52	2.15	0.81

(나). 오계펩타이드 한방음료, 오계경육고 펩타이드 환, 오계부산물 육수의 미량 영양소 분석

세 가지 시료 모두에서 비타민 A와 E는 검출되지 않았으며, 오계펩타이드 한방음료의 경우 100g당 비타민 B군의 함량은 20mL를 1회 분량으로 했을 때 1일 요구량을 충족시킬 수 있는

수준으로, 동물성 식품이 주요 급원이며, 특히 단백질과 에너지 대사에서 조효소로 중요한 역할을 수행하는 이들 비타민 함량이 높다는 점은 개발된 음료의 영양적 우수성이라고 평가될 수 있다.

Table 74. Retinol and tocopherol contents of Yeonsan Ogye product (Unit: mg/100g)

	Vitamin A	Vitamin E
SP-1 (오계펩타이드 한방음료)	N.D.	N.D.
Y2 (오계부산물 조미육수)	N.D.	N.D.
GW (오계경옥펩타이드 환)	N.D.	N.D.

* N.D. : Not Detected

Table 75. B vitamin contents of Yeonsan Ogye product (Unit:mg/100g)

	B1 (thiamine)	B3 (Nicotinic acid)	B6 (pyridoxine)	B12 (cyanocobalamin)
SP-1 (오계펩타이드 한방음료)	8.722	13.378	5.476	6.709
Y2 (오계부산물 조미육수)	N,D	N,D	N,D	N,D
GW (오계경옥펩타이드 환)	9.276	33.422	11.013	3.024

비타민 C 수준은 높은 수준은 아니었으나, 열수 추출물인 점을 감안해 100g 당 65mg과 53mg으로 과일음료나 비타민 음료를 제외하고 다른 음료에 비해 비교적 높은 수준이라고 할 수 있다.

Table 76. Ascorbic acid contents of Yeonsan Ogye product (Unit : mg/100g)

	Vitamin C
SP-1 (오계펩타이드 한방음료)	65.22
Y2 (오계부산물 조미육수)	N.D
GW (오계경옥펩타이드 환)	53.27

* N.D. : Not Detected

최종 개발 제품의 지방산 조성은 다음과 같았으며, 오계 조미육수 제품의 경우 단일불포화지방산 함량이 매우 높은 것이 특징이며, 특히 올리브유의 주요 성분인 oleic acid 함량이 매우 높아 일반 닭육수에 비해 영양학적 가치가 있다고 할 수 있겠다.

(다). 오계펩타이드 한방음료, 오계경옥고 펩타이드 환, 오계부산물 육수의 지방산 분석 결과

Table 77. Total fatty acids contents of Yeonsan Ogye product (Unit : g/100g total fatty acids)

Fatty acid	Sample name	SP-1	Y2	경옥고 환
Butyric acid (C4:0)		0.00	0.00	0.00
Caproic acid (C6:0)		0.00	0.00	0.00
Caprylic acid (C8:0)		0.00	0.00	0.00
Capric acid (C10:0)		0.00	0.00	0.00
Undecanoic acid (C11:0)		0.00	0.00	0.00
Dodecanoic acid (C12:0)		0.00	0.00	0.00
Tridecanoic acid (C13:0)		0.00	0.00	0.00
Myristic acid (C14:0)		0.00	0.00	1.21
Pentadecanoic acid (C15:0)		0.00	0.00	0.00
Palmitic acid (C16:0)		38.75	18.13	33.63
Heptadecanoic acid (C17:0)		0.00	20.96	0.00
Stearic acid (C18:0)		26.97	6.46	2.63
Arachidic acid (C20:0)		0.00	0.00	0.00
Heneicosanoic acid (C21:0)		0.00	0.00	0.00
Behenic acid (C22:0)		0.00	0.00	0.00
Tricosanoic acid (C23:0)		0.00	0.00	0.00
Lignoceric acid (C24:0)		0.00	0.00	0.00
Saturated		65.71	45.55	37.46
Myristoleic acid (C14:1)		0.00	0.00	0.00
cis-10-Pentadecenoic acid (C15:1)		0.00	0.00	0.00
Palmitoleic acid (C16:1)		0.00	4.13	0.00
cis-10-Heptadecenoic acid (C17:1)		0.00	0.00	0.00
Elaidic acid (C18:1n9t)		0.00	0.00	0.00
Oleic acid (C18:1n9c)		18.24	36.04	20.11
cis-11-Eicosenoic acid (C20:1)		0.00	0.00	0.00
Erucic acid (C22:1n9)		0.00	0.00	0.00
Nervonic acid (C24:1)		0.00	0.00	0.00
Monounsaturated		18.24	40.16	20.11
Linolelaidic acid (C18:2n6t)		0.00	0.00	0.00
Linoleic acid (C18:2n6c)		16.05	14.29	41.98
cis-11,14-Eicosadienoic acid (C20:2)		0.00	0.00	0.00

cis-13,16-Docosadienoic acid (C22:2)	0.00	0.00	0.00
γ-Linolenic acid (C18:3n6)	0.00	0.00	0.00
Linolenic acid (C18:3n3)	0.00	0.00	0.00
cis-8, 11, 14-Eicosatrienoic acid (C20:3n6)	0.00	0.00	0.00
cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid (C20:3n3)	0.00	0.00	0.00
Arachidonic acid (C20:4n6)	0.00	0.00	0.00
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (C20:5n3)	0.00	0.00	0.44
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid (C22:6n3)	0.00	0.00	0.00
Polyunsaturated	16.05	14.29	42.42

- : Not Detected

(라). 오계펩타이드 한방음료, 오계경옥고 펩타이드 환, 오계부산물 육수의 아미노산 분석결과

Table 78. Amino Acid contents of Yeonsan Ogye product

	SP -1	Y2	HW
Aspartic acid	164.791	12.041	55.274
Threonine	61.433	3.652	13.643
Serine	87.195	4.760	14.034
Glutamic acid	325.844	23.313	54.935
Proline	64.231	17.487	28.631
Glycine	76.840	29.290	17.681
Alanine	93.020	12.772	22.036
Cystine	N. D.	N. D.	0.756
Valine	86.926	3.673	14.109
Methionine	32.411	1.276	4.641
Isoleucine	65.383	2.344	12.792
Leucine	133.166	4.878	21.125
Tyrosine	30.627	1.712	7.973
Phenylalanine	84.984	3.708	11.027
Histidine	85.460	2.560	16.359
Lysine	45.688	6.222	24.435
Arginine	91.239	14.845	37.757
TOTAL	1,529.238	144.533	357.207

바. In-vivo study를 활용한 건강음료의 기능성 평가

(1). 오계펩타이드 한방음료, 오계 경옥고환 용액의 효능평가 실험 결과

(가). 체중 증가 및 식이효율

실험동물의 시작 체중과 최종 체중, 식이섭취량과 체중증가량, 식이효율은 Table 32에 제시되었다. 실험동물의 시작 체중은 평균 56g 이었으며 쌍화탕에 250mg/kg · bw 펩타이드(SB) 투여군이 가장 높은 체중 증가량과 식이섭취량을 보였고 식이효율은 군별 차이가 없었다.

Table 79. Initial bodyweight, Final bodyweight, Food intake, Weight gain and feed efficiency ratio(FER)

Diet group	Initial bodyweight (g)	Final bodyweight (g)	Food intake (g/day)	Weight gain (g/day)	FER
C	¹⁾ 55.19±2.72 ^{NS2)}	249.69±22.97 ^{NS}	17.83±3.16 ^{NS}	6.95±0.79 ^{NS}	0.39±0.03 ^{a3)}
PB	57.19±4.67	235.63±31.39	17.52±2.65	6.37±1.04	0.36±0.02 ^b
PD	56.39±4.58	240.94±13.97	17.31±3.06	6.59±0.47	0.38±0.01 ^b
SB	54.56±4.20	254.25±22.88	18.95±2.87	7.13±0.72	0.38±0.03 ^b
SD	58.78±3.05	242.06±14.09	17.67±3.22	6.55±0.49	0.37±0.02 ^b
GB	54.31±4.61	245.25±16.92	18.43±2.42	6.82±0.51	0.37±0.02 ^b
GD	56.83±2.87	250.61±16.41	18.75±2.48	6.92±0.61	0.37±0.01 ^b

1) Mean ± S.E. 2) NS : Non-significant

3) abValues with different alphabetical superscript was different from each other

실험동물의 지방량과 장기 무게는 Table 80에 제시되었다. 간의 무게는 군별로 뚜렷한 차이는 보이지 않았으나 대조군(C)이 가장 컸으며 신장의 무게도 차이가 없었다. 비장의 무게는 경옥고에 500mg/kg · bw 펩타이드 급여군(GD)이 가장 컸으며 흉선의 무게는 큰 차이가 없었으며 부고환 지방의 무게도 군별로 뚜렷한 차이는 보이지 않았다.

Table 80. Organ weight of the experimental animals (Unit : g)

Diet group	liver	Kidney	Spleen	Thymus	Periepididymal adipose tissue
C	¹⁾ 9.22±1.16 ^{NS2)}	1.04±0.08 ^{NS)}	¹⁾ 0.65±0.08 ^{NS)}	0.90±0.17 ^{NS)}	¹⁾ 2.18±0.68 ^{NS)}
PB	8.02±1.58	0.97±0.19	0.64±0.14	0.85±0.12	1.93±0.55
PD	7.97±0.73	0.97±0.06	0.65±0.07	0.92±0.10	2.00±0.50
SB	8.62±0.66	1.07±0.09	0.69±0.08	0.89±0.17	2.30±0.31
SD	8.11±0.61	1.01±0.09	0.68±0.06	0.92±0.18	1.80±0.40
GB	7.81±0.37	0.96±0.10	0.66±0.07	0.87±0.10	2.00±0.42
GD	8.23±0.84	1.06±0.09	0.73±0.15	0.93±0.18	2.04±0.21

1) Mean ± S.E. 2) NS : Non-significant

(나). 운동성 평가

실험동물의 운동성 평가는 Forced swimming test로 하였으며 그 결과는 Table 81에 제시하였다. 수영 시간은 대조군에 비해 펩타이드 급여군의 수영시간이 유의적으로 높게 나타났으며, 그 중 쌍화탕에 250mg/kg · bw 펩타이드 급여군(SB)이 평균 202.25초로 가장 높았다. 그러나 펩타이드 함량을 두 배로 늘린 쌍화탕 펩타이드 음료의 수영시간은 dose-response하게 증가하지는 않았다.

경옥고 펩타이드 음료의 경우 250mg/kg · bw 펩타이드 급여군(GB)은 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 500mg/kg · bw을 투여한 군에서 수영시간이 길어짐을 관찰하였다.

Table 81. Time of Forced Swimming Test (Unit : seconds)

Diet group	Swimming time
C	¹⁾ 147.7 ± 14.9 ^{a2)}
PB	167.3 ± 47.5 ^{ab)}
PD	176.7 ± 74.7 ^{ab)}
SB	216.3 ± 90.4^{b)}
SD	164.8 ± 32.9 ^{ab)}
GB	153.1 ± 43.3 ^{ab)}
GD	176.0 ± 50.5 ^{ab)}

1) Mean ± S.E.

2) abValues with different alphabetical superscript was different from each other

이상의 결과를 종합하면, 펩타이드의 첨가만으로 운동성 향상을 나타내지는 못했으나, 자양강장 및 피로회복을 위한 쌍화탕 펩타이드 음료의 운동성 향상을 기대할 수 있으며, 1협동 과제의 펩타이드의 기능성과 함께 관능적인 특성 역시 향상시킬 수 있어 건강 음료 개발에 있어

과학적 근거를 제시한 것이라고 할 수 있다.

펩타이드를 첨가한 시료를 투여한 실험동물의 경우, 대조군에 비해 수영시간의 개체 차이가 매우 컸다. 다른 요건이 통제된 상황에서 이루어진 실험이었음에도 불구하고, 이러한 차이를 보인 점은 시료에 대한 반응의 개체 간 차이를 나타내는 것으로 추측할 수 있어, 한방음료 개발시 그 효능에 대한 개인 차이가 있을 수 있음을 시사한다고 하겠다.

(다). 오계 펩타이드 한방음료 및 오계경옥고환 용액의 효능 평가

(1). 혈중 지질 농도에 미치는 영향

오계 경옥고펩타이드 음료에서 혈중 총 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤 농도가 감소가 관찰되었고, 500mg의 오계펩타이드를 쌍화음료에 첨가한 경우(S500) HDL 콜레스테롤 농도가 상승한 것으로 보이나, dose-dependent한 효과는 보이지 않았다.

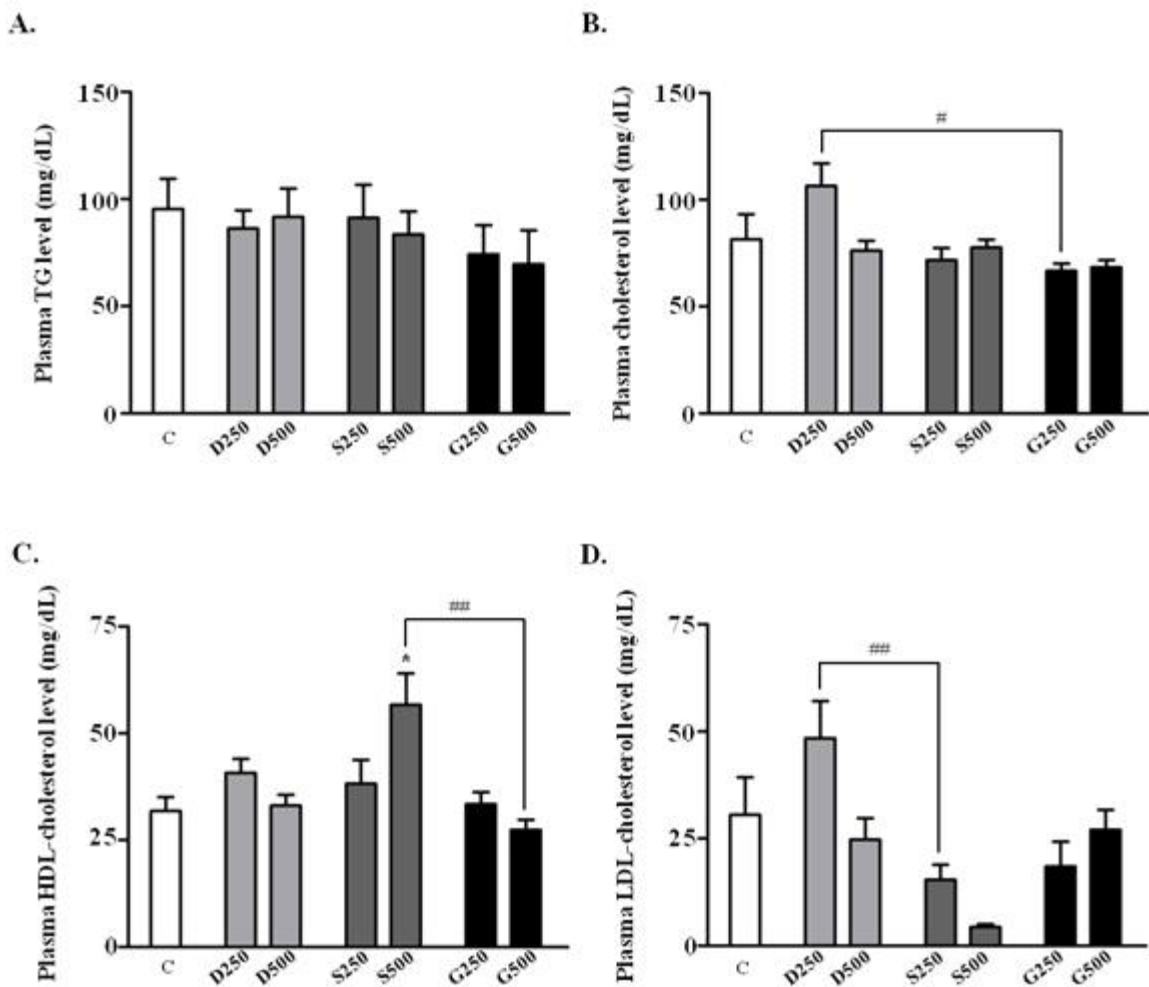


Fig 8. 오계펩타이드 한방음료가 흰쥐의 혈중 지질농도에 미치는 영향

(2). 항산화에 미치는 영향

그 결과, 오계펩타이드 250mg를 첨가한 시료를 투여한 경우에 비해 500mg의 오계펩타이드를 첨가한 용액에서 NO 및 과산화지질 생성이 감소되었다. 이상의 결과로, 오계 펩타이드 한방음료 및 오계경육고 펩타이드 환의 경우 체내 산화적 스트레스를 방지하고 염증반응을 억제시킬 수 있을 것으로 생각되며, 이러한 효과는 경육고 펩타이드 환 용액에서 가장 감소 폭이 컸다.

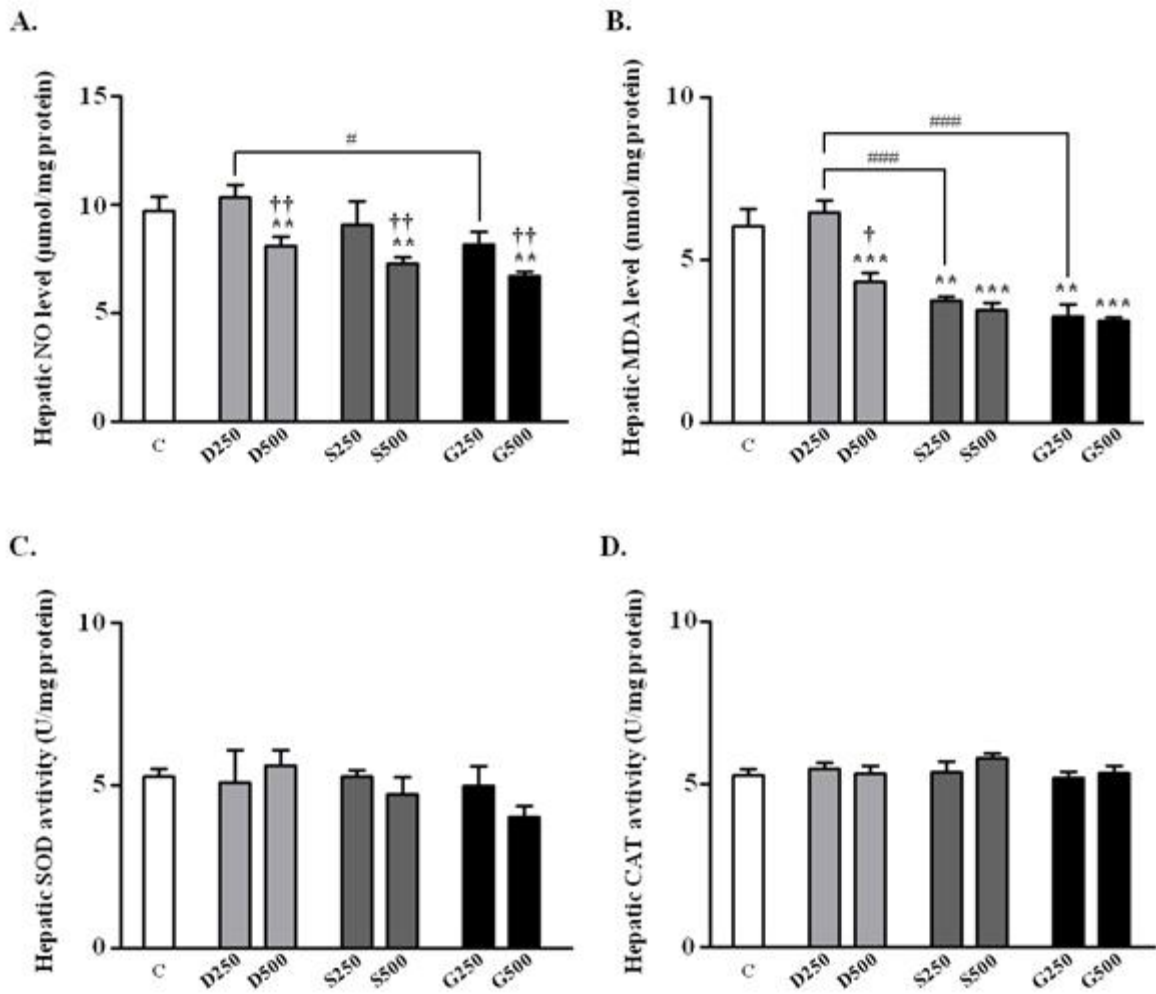


Fig 9. 오계 펩타이드 한방음료의 체내 항산화 효과 평가 결과

제 4 절 위탁과제 : 다손

1. 연구개발 배경

최근 국민들의 건강에 대한 관심이 급증함에 질병을 예방 개선 및 치유 가능한 식품 및 천연물 소재 개발에 대한 관심이 고조됨에 따라 이에 관련된 제품들의 연구개발이 활성화 되고 있고 우리나라에서는 건강기능식품 법을 제정하여 국가적으로 지원을 하고 있다.

건강기능식품 규정에 따르면 기능성의 내용들이 면역기능증진, 항산화, 항노화등 24여 가지 정도로 분류를 하고 있고 이에 관련된 제품의 시장 규모는 계속 증가를 하고 있음. 식품의약품안전처 2014년 보도자료에 따르면 2014년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 총 생산액은 1조 4,820억 원으로 2012년 1조 4,091억 원에 비해 5% 증가하였고 경기 침체에도 불구하고 이러한 경향은 지속될 것으로 예상하고 있다.

전세계적으로 고부가가치 생물유전자원에 대한 세계적 관심이 고조되고 있으며, 강대국들은 자원전쟁의 시작을 대비하여 국가적 차원에서 생물 관리체계를 정비하고 있다.

한편, 중국의 농업 R&D 투자액은 2008년에 146억 위안(약 2.6조 원)에 달하며 최근 민간부문의 농업 R&D 투자가 지속적으로 증가하고 있다.

최근 전 세계적인 웰빙 트렌드, 건강과 천연에 대한 관심증가, 그리고 한류 열풍으로 인하여 한식에 대한 관심이 증가하고 있으며, 세계 가공식품 시장규모는 2008년 1조7,000억 달러로 2003년 이후 연평균 7.0%의 꾸준한 성장을 보이고 있다..

반조리식품(Ready meals) 시장 점유율은 냉동 반조리식품(Frozen ready meals)이 59.6%, 냉장 반조리식품(Chilled ready meals) 23.3%, 캔류 반조리식품(Canned ready meals) 10.7%, 건조 반조리식품(dried ready meals) 6.5%를 나타내고 있다.

식품 소비 트렌드는 건강지향, 고급화, 다양화, 간편화되는 추세로 첨단 과학기술과의 접목, 산업간 경제 영역의 파괴 등으로 다양한 형태의 식품시장이 창출·확산되고 있다.

선진국에서는 새로운 가공기술을 활용하여 냉동 가정간편식 제품에서 품질(맛, 영양, 기능 등)과 안전성 및 저장기간이 연장된 냉장 가정간편식 제품이 보편화 되고 있는 추세이다..

선진국들은 이미 전 세계에 분포하는 자원 생물에 대한 경제적 효용가치를 평가하고 보다 다양한 생물종의 확보에 주력하고 있으며, 다양한 생물종으로부터 신기능성 식품 및 의약품 소재를 생산하는 체계적인 개발 정책을 펼치고 있다.

미국과 유럽에서는 오골계(주로 중국산 오골계)의 생리활성에 대한 효능 검증을 통해 천연물 신약개발에 연구를 활발히 진행하고 있으며, 새로운 항산화물질이 다량 함유된 “슈퍼푸드(superfood)”로 각광받고 있다

(출처:<http://voices.yahoo.com/what-black-chicken-superfood-397387.html>).

중국과 일본은 이미 식품 및 한의학 임상에서 오골계의 뼈를 이용하여 근골계를 비롯한 내분비계, 순환계의 질환의 임상적 활용을 위한 소재에 대해 다양한 기초 연구와 산업화가 이루어진 상태임.

또한 중국과 일본은 오계의 기능성 소재를 활용하여 다양한 음식과 건강기능식품 등의 제품 개발을 통한 오계의 상품화를 시도하였음.

이러한 국내외 동향들을 볼 때, 오계를 활용한 건강기능식품의 개발은 농축산업과 식품산업의 동반성장을 도모할 수 있을 뿐만 아니라, 아직 초기 단계에 있는 오계 등과 같은 전통 신소재 개발을 통한 식품산업의 국제경쟁력을 제고하기 위해서도 반드시 필요함

질병치료 및 건강증진에 대한 오계의 다양한 효능에도 불구하고 사육이 까다롭고, 사육기간도 오래 걸리는 등 수익성 차원에서 경제적 가치가 낮아 국내에서는 사육농가가 제한적이며, 사육농가를 중심으로 백숙이나 한약재를 함께 넣고 만든 탕 정도로만 이용되고 있음.

또한, 오계의 경우 국내 천연물로 지정되었음에도 개인에 의해 소규모적이고 단편적인 민간 차원에서 보존되고 있음.

연산오계의 생리 활성의 규명 연구는 실험실 수준에서 시행되고 있으며 일부 소규모 민간차원에서 생리적 활성 연구가 진행되고 있고, 식·의약품으로써의 기능성 소재화에 대한 제품 개발은 매우 미비한 실정임.

연산오계의 식·의약 소재 개발에 대한 연구가 지속적, 조직적, 효율적, 체계적으로 이루어지지 않아 산업화로 연계되지 못하고 있는 실정이며 이에 따른 기능성 물질의 소재화 및 산업화를 증진할 필요가 요구됨.

따라서 연산오계를 이용한 건강기능식품을 개발하고, 다차원적인 생리활성 연구를 통해 오계의 고부가가치화를 통한 수요를 창출하는 것이 시급한 실정임.

오계를 이용한 건강기능식품의 부가가치를 높이기 위해서는, 약용식물 혹은 한약재(韓藥材)와의 복합사용을 통해 건강기능식품산업 뿐만 아니라 전통 문화적 가치를 바탕으로 급성장하는 한방산업의 '미래식품'으로서의 기술개발이 요구됨.

이러한 차원에서 오랜 기간의 경험을 바탕으로 적용된 고문서들의 해석과 양·한방 측면에서의 과학적 분석을 통한 이론적 근거의 마련은 신소재 개발 및 제품화에 있어 위험성(risk)을 줄이고, 비용절감 효과를 기대할 수 있음.

2. 연구 수행 내용

가. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

(1) 최종목표

연산오계 기능성 소재를 이용하여 소비자 니즈를 기반으로 한 고부가가치 맞춤형 가정간편식(HMR), 기능성음료, 분말제품, 환자영양식, 노인전문식, 유아식 등 가공식품의 개발

(2) 연구개발 최종 주요 내용

연산오계의 육질, 뼈, 흑질 등으로부터 유래 기능성 소재를 이용 일반 조리방법과의 경제성, 작업편리성, 안정성, 품질향상 등의 차이점 비교 검토하여 경쟁력 있는 제품 개발 예정

오계 식재료 전처리 기술 확립 하고 제품표준화 위한 품질지표를 기반으로 HMR, 기능성음료, 분말제품, 환자 영양식, 노인 전문식, 및 유아식을 위한 가공식품 개발

개발 제품에 대한 살균기술 개발 및 오골계 가공 부산물 활용 제품 개발 및 포장방법개발, 가공 식품의 살균처리 조건 확립 및 품질특성, 미생물학적 안전성 등 비교

4. 연구결과

가. 연산오계 가공 기술 확립

(1) 냉동 오계 비린내 제거

(가) 실험 재료

실험의 주재료는 현물로 지원받은 천연기념물 265호로 지정된 연산오계를 사용하였으며 국가 지정 사육장인 (주)지산 농원에서 1년산 냉동오계를 받아 실험하였다.

(나) 실험 방법

급속 냉동시킨 오계의 비린내를 제거하기 위해, 손쉽게 구할 수 있는 우유를 농도별로 설정하여 실험하였다. 우유의 농도는 0 %, 25 %, 50 %, 100 %로 최종 800 g 으로 맞추었다. 냉동 오계의 비린내를 제거하기 위한 전처리 방법은 <Fig. 2>에 나타내었다.

- ① 오계를 세척한다.
- ② 우유의 비율별로 최종 800g을 맞춘 용액에 2시간 해동시킨다.
- ③ 오계를 건져 탈수 시킨다.
- ④ 끓는 물에 15분간 데친다.
- ⑤ 오계를 건져 탈수 시킨다.

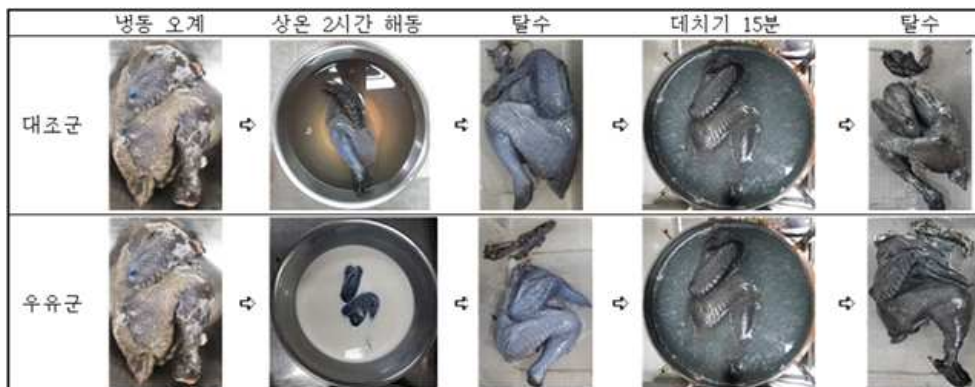


Fig. 2. Process of Milk Pretreatment for Removing Smell of blood.

(다) 실험결과

전처리에 따른 냉동오계의 비린내 제거 효과를 보기 위하여, 위의 탈수된 오계를 <Fig. 3>과 같이 부위별 관능평가를 실시하였다. 부위별 관능이 끝난 후, 오계육만 발라 죽을 제조하여 관능평가를 실시하였으며, 관능 평가는 맛, 냄새, 조직감, 외관의 형태, 색 전반적인 기호도를 나쁘면 1.0에서 좋으면 7.0 까지 7점 척도로 평가하여 비교하였다.<Table 1, Fig. 4>

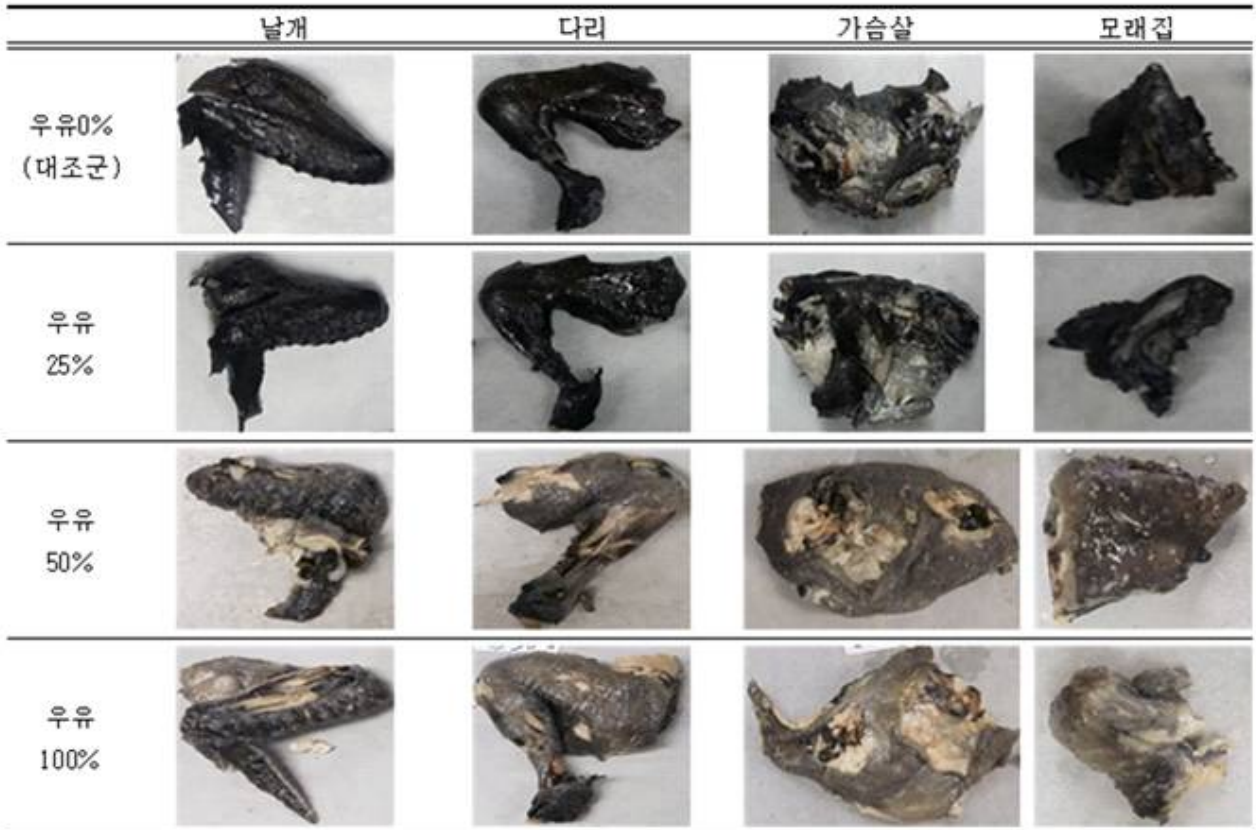


Fig. 3. Pre-processing by region according to the amount of milk addition in the frozen five system.

냉동 오계 부위별 비린내는 전처리 시 우유 함량이 높아짐에 따라 비린내가 적게 났지만, 날개부분과 모래집 부분의 비린내는 여전히 심하여, 조리 전에 제거를 하는 방법이 좋다고 사료된다.

Table 1. Sensory evaluation of milk addition by milk addition amount

N=20

첨가량(%)	맛	냄새	조직감	외관		전반적인 기호도
				형태	색	
0	3.4±1.5	3.0±1.2	3.6±1.7	2.8±1.3	2.6±1.1	3.6±1.7
25	3.7±2.1	3.0±1.7	3.3±1.2	2.3±1.2	2.3±1.2	3.5±1.5
50	3.7±1.5	3.3±1.2	4.0±1.0	2.3±1.2	2.7±0.6	3.7±0.6
100	3.8±1.1	2.8±1.2	3.8±0.8	2.8±1.3	2.6±1.1	3.3±1.5

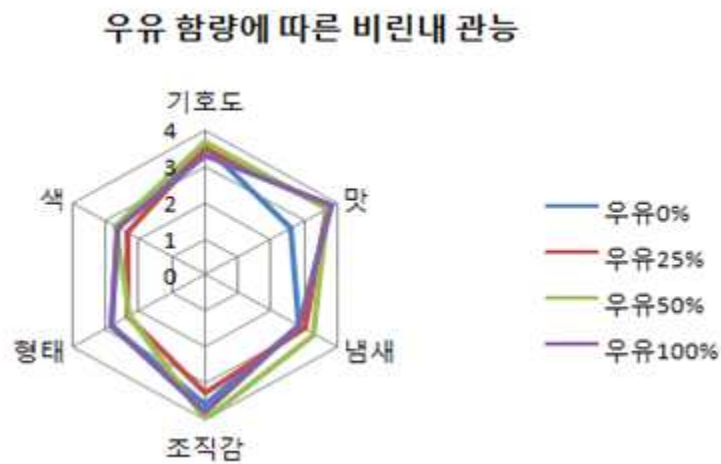


Fig. 4. Result of Sensory Evaluation by Milk Attachment Amount.

우유 첨가량을 달리하여 만든 오계죽의 경우, 우유 100%는 우유의 특유 냄새가 강하였다. 우유 50%는 외관 형태를 제외한, 맛, 냄새, 조직감, 외관 색, 전반적인 기호도가 높게 나왔다.

나. 연산오계를 함유한 가정간편식 (HMR)공정 개발

(1) 흑미 오계죽(환자식)

최근 Black food가 항암 효과 및 유효한 영양성분을 많이 함유하고 있는 것으로 인식되고 있음에 따라 흑미, 검은콩, 흑임자의 조합으로 노인 및 환자용 흑미오계죽을 개발하였다.

(가) 실험 재료

실험의 주재료는 현물로 지원받은 천연기념물 265호로 지정된 연산오계로 국가지정 사육장인 (주)지산 농원에서 1년산 냉동오계를 받아 실험하였다.


부재료인 대과, 마늘, 대추, 백미, 흑미, 검은콩, 흑임자가루, 소금 등은 일반 마트(홈플러스)에서 산업적으로 판매되는 재료를 구입하였다.

(나) 실험 방법 및 결과

흑미오계죽의 레시피는 제2협동기관인 대전대학교의 셰프 개발 레시피를 기본으로 하여 <Table 2>와 같은 레시피로 제조하였으며 원료의 투입 순서, 조리 시간, 방법 등을 수정 보완 하여 각각의 전처리 공정들을 확립하였다.

Table 2. 대전대학교 셰프 레시피에 의한 흑미 오계죽

흑미 오계죽							
No	과정사진	중분류	식자재	중량	기물	만드는 순서	비고
1		불리기	쌀, 흑미, 검은콩	1컵 1컵 반컵	계량컵 볼	1. 쌀과 흑미는 각각 따로 씻어서, 30분가량 물에 불려 채반에 건져 물기를 빼 놓는다. 2. 검은콩은 반드시 찬물(5~12℃)에 8시간 이상 불려 준비한다.	
2		삶기	오계, 대파, 마늘, 대추, 물	1마리 1대 8쪽 1알 10컵	계량컵 냄비	1. 오계는 깨끗이 손질해서 물을 붓고 대파, 마늘, 대추를 넣어 푹 삶는다.	국물의 기름기를 줄이기 위해 껍질을 벗기고 조리한다
3		밥짓기 삶기	쌀, 흑미, 검은콩	1컵 1컵 반컵	계량컵 냄비 믹서	1. 쌀과 흑미는 각각 따로 밥을 지어 놓는다. 2. 충분히 불린 검은콩은 찬물에서 가열하여 끓기 시작한 후 10~15분 정도 익혀내고, 삶아 낸 물은 따로 받아둔다.	콩은 덜 익으면 비린내가 나고 너무 익으면 묵은내가 난다.
4		믹싱	쌀밥, 흑미밥, 검은콩 (삶은 것)	1컵 1컵 1/2컵	믹서기 계량컵	1. 쌀밥과 흑미밥은 물을 첨가하여 살짝 갈아서 걸쭉한 퓨레를 만든다. 2. 삶아 놓은 검은콩은 믹서에 곱게 간다.	1. 쌀밥과 흑미밥의 혼합비율은 기호에 따라 조절한다. 2. 검은콩 삶아 낸 물을 첨가하여 믹서에 깎
5		손질	삶은 오계	1 마리	볼	1. 오계가 충분히 익으면 건져 빼는 발라내고 살은 잘게 찢어 놓는다. 2. 육수는 체에 걸러 따로 준비해 둔다.	
6		완성	흑임자 가루, 마른대추	1ts 1/2ts	계량 스푼	1. 흑임자는 가루로 으깨고, 마른대추는 깨끗이 씻어 잘게 다진다. 2. 1을 완성된 죽 위에 곱명으로 얹어 낸다.	
7		삶기	쌀밥& 흑미밥퓨레, 검은콩 퓨레, 오계육수, 검은콩 삶은 물	2컵 반컵 4컵 2컵	계량컵 냄비 나무주걱	1. 냄비에 쌀밥&흑미밥 퓨레를 넣고 오계육수를 첨가하여 끓인다. 2. 1이 균일한 농도로 풀어지면 검은콩 퓨레와 검은콩 삶은 물을 넣어 한소끔 끓인다.	나무주걱을 사용해야 죽이 삭지 않는다.

8		완성	오계육, 소금	50g 약간	냄비 나무주걱	1. 약불로 줄이고 찢어놓은 오계육을 넣고 소금으로 간을 한다.	
---	---	----	------------	-----------	------------	---	--

(2) 백미·흑미 퓨레

백미와 흑미 혼합물의 취반방법은 일반 밥솥을 사용하는 일반조리법과 과열증기(Superheated steam) 조리법을 실시하여 관능성 및 조리 효율성을 비교하였다.

과열증기(Super-heated Steam)은 물을 끓여 발생한 수증기를 가열하여 350~400 ℃에 도달하는 고온스팀 상태의 무색 투명한 기체로 식품재료에 대량의 잠열(潛熱 ; 100 ℃ 물과 비교해서 350 ℃ 과열증기에는 약 6.64배의 열량 보유)을 순간적으로 균일하게 전달하므로 일반 열처리 방법과는 차별화되어 신속하고 품질이 우수하고 영양성분 파괴도 최소화하여 다양한 식품재료(각종 곡류, 수산물, 육류 등)의 건조, 조리 및 가공에 활용된다. 열전도성이 매우 빠르고 고열 용량의 스팀을 이용하여 저산소 상태에 의한 산화방지는 물론 직화 또는 유탕처리하지 않고 가공 및 조리함으로서, 건강지향형의 고부가가치 식품의 개발에 활용될 수 있다.

과열증기에 의한 열전달 메카니즘은 <Fig. 5>와 같이 전도, 대류, 복사에 의한 열전달 특성을 모두 나타내어 식재료의 가열 및 가공시간을 단축시키며 식재료가 과열증기에 둘러싸여 가공되므로 공기 중의 산소와의 접촉을 피할 수 있어 식재료의 영양성분, 비타민C 산화, 지방의 자동산화, 산소에 의한 갈변현상 등의 발생을 억제시킬 수 있는 장점이 있다.

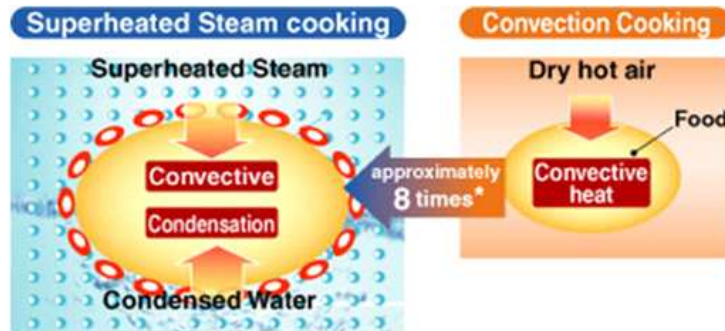


Fig. 5. 과열증기(superheated steam)에 의한 열전달 메카니즘.

백미와 흑미 혼합물의 일반 조리방법은 다음과 같으며 이 과정을 <Fig. 6>에 나타내었다.

- (가) 백미 80 g, 흑미 80 g을 찬물에 30분간 불린다.
- (나) 불린 백미와 흑미를 탈수 시킨다.
- (다) 불린 백미, 흑미 각각 100 g에 물 300 g을 넣고 분쇄한다.
- (라) 약불에서 50분 조리 한다. (가수 1,200 g)



Fig. 6. 백미·흑미 퓨레의 일반 제조 방법.

불린 흑미를 사용하고, 1,200 g의 가수를 하여 50분 조리를 하여도, 흑미의 거친 식감은 계속 남아있었다. 흑미를 사용한 부드러운 식감의 퓨레를 만들려면, 백미와 별도로 오랜 시간 조리를 하거나, 위의 일반 조리과 같이 백미와 흑미를 각각 취반하여 혼합한 후 퓨레를 제조하여야만 하였다. 백미·흑미 과열증기(Superheated steam) 제조방법은 다음과 같으며 <Fig. 7>에 나타내었다.

(가) 백미 80 g, 흑미 80 g을 찬물에 30분간 불린다.

(나) 불린 백미와 흑미를 탈수 시킨다.

(다) 불린 백미, 흑미 각각 100 g에 물 150 g을 넣고 분쇄한다.

(라) 과열증기(Superheated steam) 장치는 <Fig. 8>과 같은 설비를 사용하여 Heater 200 °C, Steam 300 °C, Steam양 大, 10분 조리한다.

(마) 취반된 백미·흑미 300 g과 물 150 g을 넣고 분쇄하여 백미·흑미 퓨레를 만든다.

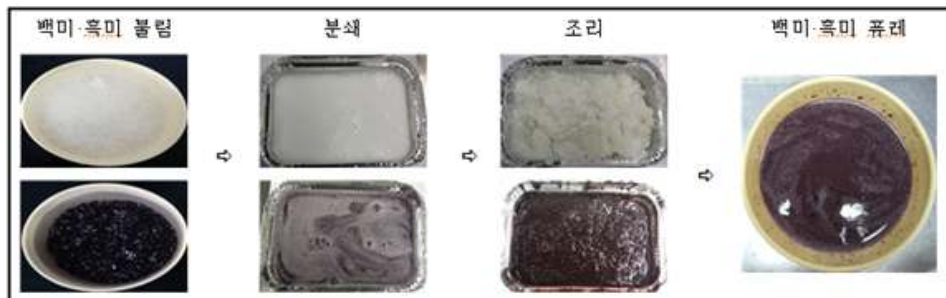


Fig. 7. 백미·흑미 퓨레의 과열증기(Superheated steam)를 이용한 제조 방법.



Fig. 8. 과열증기(Superheated steam) 설비

과열증기(Superheated steam)를 이용하여 제조한 백미·흑미 푸레는 일반 제조방법을 사용할 경우 50분 이상의 제조시간이 요구되는데 반하여 과열증기를 사용할 경우 10분 정도의 단시간이 소요됨을 알 수 있었다. 과열증기(Superheated steam)를 이용한 조리방법은 다음과 같은 우수한 장점을 나타내는 것으로 알려져 있다.

검은콩 푸레는 흑미와 함께 Black food의 색을 강조하기에 좋고, 구수한 맛을 내는 장점이 있다. 백미·흑미 푸레와 같이 제2협동인 대전대학교 셰프가 개발한 레시피를 기본으로 하여 실험을 진행하였다. 검은콩 푸레는 일반조리와, 과열증기(Superheated steam)조리 방법을 비교 실험하였다. 검은콩 푸레의 일반 제조방법은 다음과 같으며 제조과정을 <Fig. 9> 에 나타내었다.

- (가) 검은콩 50 g을 찬물에 8시간 이상 불린다.
- (나) 불린 검은콩 100 g에 물 750 g을 넣고, 15분간 삶는다.
- (다) 삶은 콩 100 g에 삶은 물 200 g을 넣고 분쇄 한다.

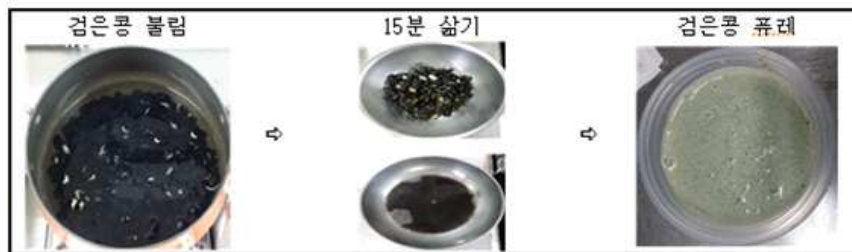


Fig. 9. 검은콩 푸레의 일반 제조 방법.

과열증기(Superheated steam)조리 방법으로 제조한 검은콩 푸레는 다음과 같은 방법으로 제조하였으며 <Fig. 10> 과 같은 과정을 거친다.



Fig. 10. 검은콩 푸레의 과열증기 제조 방법.

검은콩 삶는 시간은 대전대학교 셰프의 레시피를 기본으로 하였다. 검은콩의 일반조리 시 덜 익으면 비린내가 나고, 너무 익으면 묵은내가 나기 때문에, 10~15분이 적당한 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 부드러운 식감을 내기 위하여 15분간 조리로 진행하였다. 검은콩은 푸레 형태 외에 검은콩 삶은 물도 사용하였다. 가수량은 불린 검은콩 100 g에 가수 750 g으로 하였

다.

과열증기(Superheated steam) 조리 시, 일반조리 방법으로 15분 조리한 검은콩의 식감과 비슷한 식감을 나타내는 시간대는 8분 정도로 일반 조리에 비해 약 절반 정도 조리 시간이 단축되었다.

(3) 오계육의 투입 시간 설정

손질된 오계육을 투입하는 시간에 따라, 죽의 식감, 맛, 향 등의 관능의 영향을 줄 것으로 판단하여 오계의 투입시간별 오계의 비린내와, 오계육의 조직감, 죽의 점도 등을 분석하였다.

흑미 오계죽의 오계육 투입 전 준비한 기본 재료들의 제조 방법은 다음과 같다.

(가) 찬물에 30분 불린 백미, 흑미 각각 100 g을 물 300 g을 넣고 취반하여, 취반된 백미·흑미 300 g과 물 150 g을 넣고 균질하여 푸레로 만든다.

(나) 찬물에 8시간 이상 불린 검은콩 100 g에 750 g을 가수하여, 15분간 조리 한 뒤, 삶은 콩 100 g과 삶은물 200 g을 균질하여 푸레로 만든다.

(다) 오계 껍질, 날개, 모래집을 제거한 오계를, 대과 1대, 마늘 8쪽, 대추 1알, 물 2,000 g 넣고 30분간 끓여, 육수를 분리하고 오계육은 적당한 크기로 찢어 손질한다.

흑미 오계죽의 오계육 투입 시간은 0, 5, 10, 15, 20분으로 설정하였다. 오계육 투입 시간에 따른 죽의 관능평가는 <Table 3, Fig. 11> 과 같다.

Table 3. 연산오계육 투입시간별 흑미 오계죽의 관능평가

N=20

	맛	냄새	조직감	외관		전반적인 기호도
				형태	색	
0분	3.6±1.1	4.0±0.7	4.2±1.3	3.6±1.1	3.8±0.8	3.5±1.1
5분	5.2±1.1	4.8±0.4	4.4±0.9	4.2±0.8	4.2±0.8	4.8±1.1
10분	4.2±1.3	4.2±0.8	3.8±1.3	4.0±1.2	3.8±0.4	4.3±0.8
15분	4.6±0.9	4.8±0.8	4.8±1.3	4.2±0.8	4.2±0.8	4.5±1.0
20분	4.2±1.3	3.8±1.1	3.2±0.8	4.0±0.7	4.0±0.7	3.9±1.1

오계육 투입시간별 흑미 오계죽의 관능평가

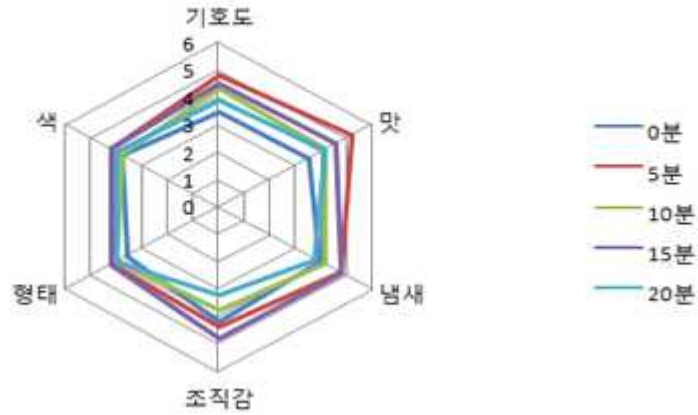


Fig. 11. 오계육 투입 시간별 흑미 오계죽의 관능평가.

점도측정은 Brookfield LV 모델로, 가정용 균질기로 2분 분쇄한 샘플 350g을 25 °C에 맞춰, 64Spindle, 100rpm, 5분간 측정하였고, 결과는 <Table 4, Fig. 12> 와 같다.

Table 4. 연산오계육 투입 시간별 점도

unit : cP

0분	5분	10분	15분	20분
398.3±29.6	506.3±6.8	905.8±45.1	1339.4±293.8	2401.8±18.05

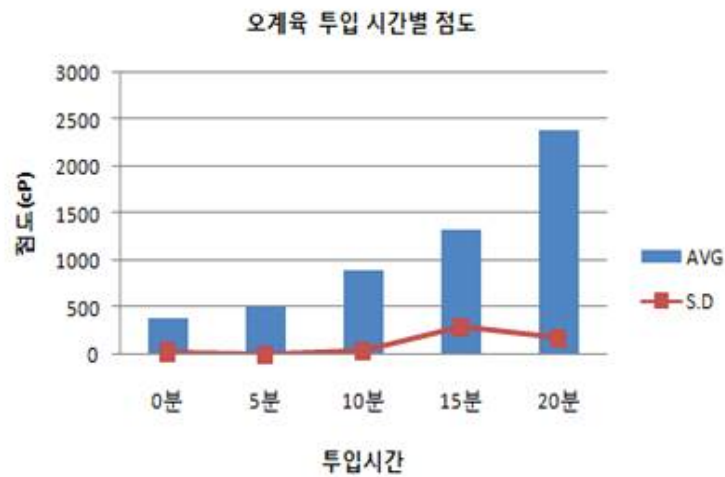


Fig. 12. 연산오계육 투입 시간별 점도변화.

오계육 투입시간별 관능 평가를 실시한 결과, 5분 조리의 기호도가 가장 좋았다. 5분 조리는 15분 조리와 외관형태와 색, 냄새, 관능은 비슷하였으나, 맛에서 월등히 점수가 높았다. 흑미 오계죽은 환자식이기 때문에, 죽의 점도가 너무 높아서는 안된다. 실험 결과 오계의 투입시간

이 길어질수록 죽의 점도가 높아졌고, 관능 평가, 점도의 결과를 보면 오계육 투입 시간 조리는 5분이 적당하였다.

(4) 흑미 오계죽 조리 공정도

흑미 오계죽의 백미·흑미 퓨레, 검은콩 퓨레, 오계 육수 및 오계육의 제조 공정은 다음과 같으며 <Fig. 13>에 나타내었다.

(가) 백미·흑미 퓨레 : 찬물에 30분간 불린 백미·흑미 200 g에 물 300 g을 넣어 일반밥솥에 조리 한 뒤, 취반 된 백미·흑미 300 g에 물 150 g을 넣고 가정용 균질기로 분쇄한다.

(나) 검은콩 퓨레 : 찬물에 8시간 이상 불린 검은콩 100 g에 물 750 g을 넣고 15분간 삶은 뒤, 삶은 콩 100 g에 삶은물 200 g을 넣고 가정용 균질기로 분쇄한다.

(다) 오계육수 및 오계육 : 껍질, 날개, 모래집을 제거한 오계를 대과 1대, 마늘 8쪽, 대추 1알, 물 2,000 g을 넣고 30분간 조리한 후 오계육수와 오계육을 손질한다

(라) 백미·흑미 퓨레 400 g, 검은콩 삶은물 400 g, 오계육수 800 g을 넣고 중불에서 10분, 약불에서 20분 조리한다.

(마) 검은콩 퓨레 100 g을 넣고 약불에서 15분 조리한다.

(바) 소금 3 g과, 손질 된 오계육 50 g을 넣고 5분간 조리한다.

(사) 대추 1/2 ts, 흑임자 1/2 ts, 참기름 2 g을 첨가하여, 고명으로 한다.



Fig. 13. 흑미 오계죽의 제조 공정

가공 수율은 조리 전 순수 무게는 1,753 g이고, 조리 후 무게는 925.5 g으로 약 52.79 %의 수율을 나타낸다. 1회 제공량 280 g을 기준으로 하여, 위 레시피는 3.3회 분량이 제조된다.

(5) 흑임자 오계죽(노인식)

흑임자는 지방산과 아미노산이 풍부하고 소화효소가 많아, 위장을 매끄럽게 하고 탈모와 피부 건강에 탁월한 것으로 알려져 있다.





(가) 실험 재료

실험의 주재료는 현물로 지원받은 천연기념물 265호로 지정된 연산오계로 국가지정 사육장인 (주)지산 농원에서 1년산 냉동오계를 받아 실험하였다. 부재료인 대파, 마늘, 대추, 누룽지, 백미, 흑임자, 생크림, 잣가루, 현미후레이크, 소금 등은 일반 마트(홈플러스)에서 산업적으로 판매되는 재료를 구입하였다.

(나) 실험 방법 및 결과

연산오계를 활용한 흑임자 오계죽을 만들어, 영양과 건강을 생각한 노인 영양식을 만들었으며 제조 레시피는 대전대의 셰프의 레시피를 받아, 원료의 투입 순서, 조리 시간, 방법 등을 수정 보완 하여 각각의 제조 공정을 확립하였다. <Table 5>

Table 5. 대전대학교 셰프 레시피에 의한 흑임자 오계죽

No	과정사진	중분류	식자재	중량	기물	만드는 순서	비고
1		불리기	쌀	2/3컵	계량컵 볼	1. 쌀은 씻어서, 2시간 동안 물에 불린 후 채반에 건져 물기를 빼 놓는다.	
2		끓이기	누룽지 물	50g 1컵	저울 계량컵 볼	1. 누룽지를 물에 넣고 끓인다. 2. 누룽지가 다 풀어지고 나면 불을 끄고 믹서로 곱게 갈아 놓는다.	
2		삶기	오계, 대파, 마늘, 대추, 물	1마리 1대 12쪽 5알 10컵	계량컵 냄비	1. 오계는 깨끗이 손질해서 물을 붓고 대파, 마늘, 대추를 넣어 푹 삶는다.	국물의 기름기를 줄이기 위해 껍질을 벗기고 조리한다
3		믹싱	쌀, 물	1컵 1컵	계량컵 믹서	1. 불려 놓은 쌀과 물을 믹서에 넣고 곱게 갈아 쌀물을 만들어 놓는다.	

4		볶기	흑임자	1컵	계량컵	1. 흑임자는 깨끗이 씻어 체에 반혀 물기를 뺀 후, 팬에 약불로 볶아준다.	
5		믹싱	흑임자 (볶은것), 물	1컵 2컵	믹서기 계량컵	1. 볶아 놓은 흑임자와 물을 믹서에 넣고 곱게 갈아 흑임자 물을 만든다.	
6		손질	삶은 오게	1 마리	볼	1. 오게가 충분히 익으면 건져 빼는 발라내고 삶은 잘게 찢어 놓는다. 2. 육수는 체에 걸러 따로 준비해 둔다.	
7		끓이기	쌀물, 누룽지, 오게육수, 물	준비량, 준비량 2컵 2.5컵	계량컵 냄비 나무주 걱	1. 냄비에 갈아놓은 쌀물과 오게육수, 물을 넣고 센불에서 저어가며 끓인다. 2. 끓기 시작하면 중불로 줄여 10분 정도 저어가며 끓이다가, 누룽지 같은 것을 넣고 10분 더 끓인다.	나무주걱을 사용해야 죽이 삭지 않는다.
8		끓이기	흑임자물, 오게육, 생크림 소금	준비량 50g, 2TS 약간	냄비 나무주 걱	1. 갈아놓은 검은깨물을 넣고 5분간 더 끓인 후, 찢어놓은 오게육과 생크림을 넣고 소금으로 간을 한다.	
9		고명 완성	잣가루, 현미 후레이크	1ts 2ts	계량 스푼	1. 잣가루와 현미 후레이크를 완성된 죽 위에 고명으로 얹어 낸다.	

① 전처리 공정 확립

흑임자 오게죽은 노인 영양식으로, 연하작용이 편하고, 소화를 잘 시킬 수 있도록 부드럽게 조리되어야 한다.

흑임자 오게죽의 1차 제조 방법은 백미·흑미 퓨레, 검은콩 퓨레, 오게육수를 사용하여 다음과 같이 흑미 오게죽과 유사하게 제조하였으며 제조과정은 <Fig. 14>과 같다.

㉠ 찬물에 30분 불린 백미, 흑미 각각 100 g을 물 300 g을 넣고 취반하여, 취반된 백미·흑미 300 g과 물 150 g을 넣고 균질하여 퓨레로 만든다.

㉡ 찬물에 8시간 이상 불린 검은콩 100 g에 750 g을 가수하여, 15분간 조리 한 뒤, 삶은콩 100 g과 삶은물 200 g을 균질하여 퓨레로 만든다.

㉢ 오게 껍질, 날개, 모래집을 제거한 오게를, 대파 1대, 마늘 8쪽, 대추 1알, 물 2,000 g 넣고 30분간 끓여, 육수를 분리하고 오게육은 적당한 크기로 찢어 손질한다.



Fig. 14. 흑임자 오계죽의 기본 재료 준비과정.

○ 흑임자 오계죽의 1차 레시피의 제조 방법은 다음과 같으며 <Fig. 15> 와 같은 공정으로 제조하였다.

㉠ 백미·흑미 퓨레 400 g, 검은콩 삶은물 400 g, 오계육수 800 g을 넣고 처음 10분은 중불에서, 20분은 약불 조리한다.

㉡ 검은콩 퓨레 100 g, 흑임자 가루 10 g, 양파 1/4개를 넣고 약불에서 25분간 조리한다.

㉢ 소금 3 g과 손질된 오계육 50 g을 넣고 5분간 조리한다.

㉣ 대추 후레이크 1/2 ts을 곁들인다.



Fig. 15. 흑임자 오계죽의 1차 레시피 제조 방법.

흑미 오계죽 레시피를 수정 보완하여 만든 흑임자 오계죽의 1차 레시피는, 양파향이 강하여 양파를 제거하고 흑미를 빼고 흑임자 양을 늘렸다. 그리고 누룽지를 활용하여 죽의 고소함을 더할 수 있는 레시피로 수정 보완 하여 다음과 같이 제조하였다.

- ㉠ 찬물에 2시간 불린 쌀 200 g에 물 200 g 을 넣고 가정용 균질기로 분쇄하여 쌀 물을 만든다.
- ㉡ 누룽지 50 g에 물 200 g을 넣고 10분 조리하여, 가정용 균질기로 분쇄하여 누룽지 물을 만든다.
- ㉢ 흑임자 1컵을 세척, 탈수 한 후 약불에서 15분간 볶아 물 400 g을 넣고, 가정용 균질기로 분쇄하여 흑임자 물을 만든다.

흑임자 오계죽의 최종 제조 방법은 <Fig. 16>와 같은 제조 공정으로 만들어진다.

- ㉣ 쌀 물 400 g, 오계육수 400 g, 물 500 g을 넣고 중불에서 10분간 조리한다.
- ㉤ 누룽지물 170 g, 흑임자물 500 g을 넣고 약불에서 10분간 조리한다.
- ㉥ 소금 5 g, 손질된 계육 50 g을 넣고 약불에서 5분간 조리한다.
- ㉦ 잣가루 1/2 ts을 고명으로 한다.

2차 제조 레시피에 의해 제조된 흑임자 오계죽은 흑임자의 맛과 향이 증진되었으며 구수한 맛을 내기 위해 첨가한 누룽지는 구수한 맛과 향이 약하여 현미 후레이크를 고평으로 첨가하여 구수한 맛을 증진시켰다. 흑임자의 거친 식감은 유크림을 첨가하여 부드럽게 하였으며, 흑임자의 양의 증가에 따라 육수의 부재료에 마늘과, 대추의 양을 늘려서 육수의 풍미를 증진시켰다.



Fig. 16. 흑임자 오계죽 2차 제조 공정

② 흑임자 오계죽의 제조 공정도

1차와 2차 제조 방법 검토 후 확립한 흑임자 오계죽의 최종 제조 방법은 다음과 같으며, <Fig. 17> 에 나타내었다.

- ㉠ 쌀 물 : 찬물에 2시간 불린 백미 200 g에 물 200 g을 넣고 가정용 균질기로 분쇄한다.
- ㉡ 흑임자물 : 1컵의 흑임자를 세척, 15분 볶아 물 400 g을 넣고 가정용 균질기로 분쇄한다
- ㉢ 오계육수 및 오계육 : 껍질, 날개, 모래집을 제거한 오계를 대과 1대, 마늘 8쪽, 대추 1알, 물 2,000 g을 넣고 30분간 조리한 후 오계육수와 오계육을 손질한다.
- ㉣ 쌀 물 400 g, 오계육수 400 g, 물 500 g을 넣고 중불에서 10분간 조리한다.
- ㉤ 흑임자 물 500 g을 넣고 약불에서 10분간 조리한다.
- ㉥ 소금 5 g, 유크림 30 g, 오계육 50 g을 넣고 약불에서 5분간 조리한다.

㉔ 잣가루 1/2 ts, 현미 후레이크 2 ts 후첨하여, 고명으로 한다.

흑임자 오계죽의 가공 수율은 조리 전 순수 무게는 1,885 g이고, 조리 후 무게는 1,502 g으로 약 79.68 %의 수율을 나타내었다. 1회 제공량 280 g을 기준으로 하여, 위 레시피는 5.3회 분량이 제조되었다.



Fig. 17. 흑임자 오계죽의 제조 공정도

(6) 오계란 야채죽(이유식)

필수 아미노산 함량이 높은 오계란의 난황을 사용하여, 중기 이유식을 먹는 아이들을 소비자 타겟으로 설정하였다.

(가) 실험 재료

실험의 주재료는 현물로 지원받은 천연기념물 265호로 지정된 연산오계로 국가지정 사육장인 (주)지산 농원에서 오계란을 받아 실험하였다.



부재료인 대파, 마늘, 대추, 누룽지, 백미, 흑임자, 생크림, 잣가루, 현미후레이크, 소금 등은 일반 마트(홈플러스)에서 산업적으로 판매되는 재료를 구입하였다.

(나) 실험 방법 및 결과

연산오계란을 활용하여 난황은 노란색, 시금치와, 브로콜리의 초록색, 당근의 주황색, 감자의 흰색이 조화를 이루어, 맛, 영양, 시각적으로 높은 효과를 줄 수 있도록 하였으며 대전대학교의 셰프 레시피를 받아, 원료의 투입 순서, 조리 시간, 방법 등을 수정 보완하여 각각의 공정들을 확립하였다.

Table 6. 대전대학교 셰프 레시피에 의한 오계란 야채죽

No	과정사진	중분류	식자재	중량	기물	만드는 순서	비고
1		불리기	쌀	1컵	계량컵 불	1. 쌀을 씻어서 30분가량 물에 불린 다음 채반에 건져 물기를 빼 놓는다.	
2		삶기	오계 대파 마늘 양파 대추 물	1마리 20cm 12쪽 1/2개 3알 8컵	계량컵 냄비	1. 오계는 깨끗이 손질해서 물을 붓고 대파, 마늘, 양파, 대추를 넣어 푹 삶는다.	국물의 기름기를 줄이기 위해 껍질을 벗기고 조리한다
3		믹싱	쌀	1컵	믹서기 계량컵	1. 쌀은 믹서에 넣고 살짝 갈아준다.	
4		삶기	오계란	1개	냄비	1. 오계란은 15분 정도 완숙으로 삶는다.	소금과 식초를 넣으면 달걀이 깨지지 않는다.
5		데치기	감자 시금치 당근 브로콜리	10g 10g 10g 10g	냄비	1. 채소는 각각 끓는 물에 30초 정도 데친다.	
6		손질	오계육 가슴살	25g	불	1. 오계가 충분히 익으면 건져 빼는 발라내고 가슴살 부위를 잘게 찢어 놓는다. 2. 육수는 체에 걸러 따로 준비해 둔다.	

7		재료 손질	오계난황 감자 시금치 당근 브로콜리	반개 10g 10g 10g 10g	도마 칼	1. 오계의 난황과 데친 채소를 잘게(3*3*3mm) 다진다.	
8		끓이기	쌀, 육수 물, 가슴살 오계난황 감자 시금치 당근 브로콜리	1컵,1컵 3컵,25g 반개 10g 10g 10g 10g	계량컵 냄비 주걱	1. 냄비에 참기름을 두르고 갈아 놓은 쌀을 볶다가 오계육수와 물을 넣어 끓인다. 2. 약한 불로 줄여 오계가슴살과 채소를 넣고 한소끔 끓인다.	

① 전처리 공정 확립

오계란 야채죽은 이유식 중기 어린이를 위한 것으로 죽의 적당한 점도와, 야채의 식감이 유지되도록 조리되어야 한다. 1차 레시피의 오계란 야채죽의 기본 재료 준비는 쌀의 분쇄, 난황의 분리, 야채의 데치기, 오계 육수 제조, 오계육 손질 등의 공정이 필요하다.

오계란 야채죽의 제조 방법은 다음과 같다.

- ㉠ 찬물에 30분 불린 쌀 200 g을 가정용 균질기에 분쇄한다.
- ㉡ 오계란이 잠길 만큼 가수를 한 후, 소량의 식초와 소금을 넣고 15분간 삶아, 난황만 분리한다. 식초와 소금을 넣으면 오계란이 깨지지 않게 조리가 된다.
- ㉢ 브로콜리, 시금치, 감자, 당근 10 g을 끓는물에 30초 데친 후 찬물에 냉각 시킨 뒤, 3×3×3 mm 사이즈로 자른다.
- ㉣ 오계 껍질, 날개, 모래집을 제거한 오계를, 대파 20 cm, 마늘 12쪽, 대추 3알, 물 1,600 g 넣고 30분간 끓여, 육수를 분리하고 오계육은 적당한 크기로 찢어 손질한다.

② 오계란 야채죽 제조공정

1차 제조 방법을 바탕으로 난황의 양을 2배로 증가시켜, 노란색을 강조하고, 야채의 색을 살리기 위해 양을 늘리고, 투입 시간을 조절 하여, 조리 마지막 단계에 넣었다. 야채의 크기가 이유식용으로는 크기 때문에, 좀 더 작게 다지고 오계육도 잘게 분쇄를 하여 조리하였으며 죽의 점도가 너무 높아 가수량을 늘려 레시피를 수정 하였다.

이상의 방법으로 기본 재료의 제조 공정 및 오계란 야채죽의 제조 방법을 다음과 같이 확립하였다.

- ㉤ 분린 쌀 분쇄 : 찬물에 2시간 불린 백미를 가정용 균질기로 분쇄한다.
- ㉥ 오계란 조리 : 오계란이 잠길 정도의 물에 식초와 소금을 넣고 15분간 조리하여, 난황을 분리하여 다진다.

- ㉔ 야채 데치기 : 당근 20 g, 시금치와 브로콜리 15 g, 감자10 g을 데친 후 잘게 다진다.
- ㉕ 오계육수 및 오계육 : 껍질, 날개, 똥집을 제거한 오계를 대과 20 cm, 마늘 12쪽, 대추 3알, 물 1,600 g을 넣고 30분간 조리한 후 오계육수와 오계 가슴살을 가정용 균질기로 분쇄한다.
- ㉖ 냄비에 참기름을 5 g 두르고, 분린 분쇄 쌀 200 g을 넣고 중불에서 5분 조리한다.
- ㉗ 오계 육수 200 g과 물 1,050 g을 넣고 약불에서 20분 조리한다.
- ㉘ 분쇄한 오계육 가슴살 25 g을 넣고 3분간 조리한다.
- ㉙ 난황, 당근, 시금치, 브로콜리, 감자를 넣고 2분간 조리한다.

위의 1차 제조 방법의 수정보완 사항은, 난황의 양을 2배로 증가시켜, 노란색을 강조하고, 야채의 색을 살리기 위해 양을 늘리고, 투입 시간을 조절 하여, 조리 마지막 단계에 넣었다. 야채의 크기가 이유식용으로는 크기 때문에, 좀 더 작게 다지고 오계육도 잘게 분쇄를 하여 조리하였으며 죽의 점도가 너무 높아 가수량을 늘려 레시피를 수정 하였고, 최종 가공공정은 <Fig. 18>과 같다.

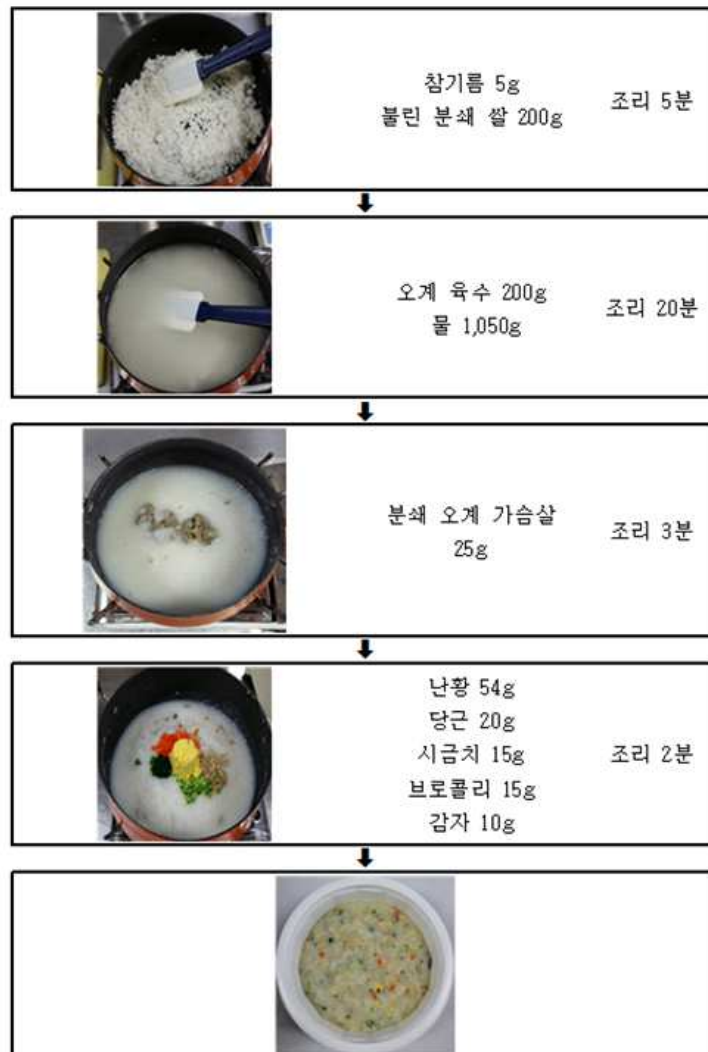


Fig. 18. 오계란 야채죽 최종 제조 공정

가공 수율은 조리 전 순수 무게는 1,594 g이고, 조리 후 무게는 1,190 g으로 약 74.65 %의 수율을 나타내었으며 1회 제공량 280 g을 기준으로 하였을 때 4.2회 분량이 제조되었다.

(7) 오계란 요거트 비스코티 (간식류)

오색 야채죽 이유식 제조시 부산물로 남는 오계란의 난백을 사용하여 첨가물 없는 간식으로 오계란 요거트 비스코티를 만들었다. 오계란 비스코티는 버터의 무첨가로 가벼운 간식이 될 수 있다.

(가) 실험 재료

실험의 주재료는 현물로 지원받은 천연기념물 265호로 지정된 연산오계로 국가지정 사육장인 (주)지산 농원에서 오계란을 받아 실험하였다.

정백당, 아몬드 파우더, 슬라이스, 쌀가루, 요거트 파우더, 소금은 일반 마트(홈플러스)에서 산업적으로 판매되는 재료를 구입하였다.

(나) 실험 방법 및 결과

오계란 요거트 비스코티의 레시피는 대전대의 셰프의 레시피를 받아, 원료의 투입 순서, 조리 시간, 방법 등을 수정 보완 하여 각각의 제조 공정을 확립하였다. <Fig. 19>

◎ 제목 : 오계란 요거트 마이크로 비스코티

오븐 사용 없이 전자레인지로 이용해 간단하고 무첨가물 안전한 간식을 만들 수 있다.

재 료 (약 10개 분량) :

- 계란 흰자 (개당 약 300g) 5개
- 정백당 60g
- 아몬드 파우더 60g
- 박력 밀가루 20g
- 요거트 파우더 60g
- 질소가스 휘핑기 1대
- 종이컵 10개

방 법 :

1. 분량의 재료를 잘 섞은 후 휘핑기에 넣고 종이컵 2/3정도 분사해 전자레인지에 약 1분 (끓어 넘치지 않도록 시간 조절) 돌려 익혀낸다.
2. 1을 컵에서 분리하여 그늘지고 통풍이 되는 상온에 반나절 정도 식혀 굳힌다.
3. 1이 따뜻하고 부드러울때 먹어도 좋고 바삭하게 먹어도 좋다.

Fig. 19. 대전대학교 셰프 레시피에 의한 오계란 요거트 비스코티 레시피.

① 계란 요거트 비스코티의 제조 방법

오계란의 난백을 이용한 비스코티는 편의간식류로 간단한 레시피로 만들 수 있게 만들었다. 1차 레시피에서의 제조 방법은 다음과 같으며 이를 <Fig. 20>에 나타내었다.

- ㉠ 난백 5개 분량 200 g과 정백당을 넣고 머랭을 만든다.
- ㉡ 아몬드 파우더 60 g, 박력밀가루 20 g, 요거트 파우더 60 g을 넣고 혼합한다.
- ㉢ 종이컵 2/3정도 분사하여 전자레인지 1분 조리한다. (끓어 넘치지 않도록 시간 조절, 돌려 가면서 익힌다.)
- ㉣ 그늘지고 통풍 되는 상온에서 반나절 정도 식혀 굳힌다.



Fig. 20. 오계란 요거트 비스코티 1차 제조 공정.

전자레인지 조리 시 안에 있는 반죽이 익지 않아, 밀가루 맛이 많이 났다. 전자레인지 시간을 추가 하면 종이컵과, 반죽 윗부분이 타는 현상이 발생했다. 그러므로 2차 제조 방법에서는 전자레인지 조리를 오븐 조리로 바꿔 실험하였다.

2차 레시피의 비스코티 끝 부분이 많이 갈변되어, 오븐의 온도와 시간을 조절하였다. 바삭한 식감이 덜하여, 박력 밀가루를 쌀가루로 대체하였으며 단맛과 신맛이 강하여 정백당과, 요거트 파우더 양을 줄이고, 약간의 소금을 첨가하였다. 아몬드 파우더 양은 많이 들어갔음에도, 외관상으로 보이지 않아, 아몬드 슬라이스를 비스코티 위에 토핑하여 오븐에서 조리하였다.

① 오계란 요거트 비스코티 제조 공정

오계란 난백의 활용으로 만든 요거트 비스코티의 1차, 2차 레시피 수정 보완을 거쳐 최종 조리 공정을 확정하였다. 이를 바탕으로 오계란 요거트 비스코티의 제조 방법은 다음과 같으며 이를 <Fig. 21>에 나타내었다.

- ㉠ 머랭 만들기 : 난백 5개분량 200 g, 정백당 30 g을 넣고 머랭을 만든다.
- ㉡ 부재료 혼합 : 아몬드 파우더 30 g, 쌀 가루 20 g, 요거트 파우더 30 g, 소금 0.5 g을 넣고 섞는다.
- ㉢ 아몬드는 성형한 머랭 위에 토핑한다.
- ㉣ 오븐 120 ℃, 30분 조리 하고 70 ℃ 건조기에서 30분간 건조 시킨다.



Fig. 21. 오계란 요거트 비스코티 최종 제조 공정

(8) 황기탕

기존 지산농원 메뉴 중 가격이 적절하고, 기타원료 함량이 적은 메뉴인 황기탕을 선정했다.

- 황기탕의 첨가되는 한약재들의 식품재료 사용 가능 여부 조사결과, 첨가 한약재 모두 식품으로 사용 가능한 것으로 조사되어, 간편편이식으로 개발이 가능한 것으로 분석되었다.

(가) 실험 재료

실험의 주재료는 현물로 지원받은 천연기념물 265호로 지정된 연산오계로 국가지정 사육장인 (주)지산 농원에서 황기탕을 받아 대조군으로 사용하였으며 본 실험에서 제조된 레토르트 처리 (처리군) 후 공급받은 황기탕(대조군)과의 품질 비교 분석하였다.

(나) 실험 방법 및 결과

① 황기탕 제품 구성

지산농원의 황기탕을 받아, 황기탕의 중량 및 제품 구성 비율을 살펴보았다. 시판 오글계 삼계탕과 비교 분석하였다. <Table 7>, <Fig. 22>, <Table 8>

Table 7. 시판 오골계 삼계탕

제품명	형태	가격/중량/유통기한	원재료함량	제조원	판매원
고전한방 오골계 삼계탕		13,900원/1kg /1년6개월	닭고기(국내산)40%, 참쌀(국내산)6%,수삼(국내산)1%,밤 (국내산),은행(국내산),대추(국내산) 0.3%,고전삼계탕용51%,생강(국내 산),마늘,들깨,황기,둘굴레. 침.정제수	고전푸드	우리존농산
오골계 삼계탕		10,160원/1kg /1년6개월	정제수,오골계(국산)48%,참쌀(국산))3.5%,멥쌀(국산),수삼(국산)0.6%, 사골엑기스,통마늘(국산),대추(국산))..재제소금,5'-리보뉴클레오티드이 나트륨100%(향미증진제)	포유F&B	소래영농 조합법인
궁궐 오골계 삼계탕		29,700원/1kg g*3팩/ 1년6개월	정제수,오골계(국산)48%,참쌀(국산) ,멥쌀(국산),수삼(국산)0.6%,식육추 출가공품,통마늘,대추, 밤..재제소금,5'-리보뉴클레오티드이 나트륨100%(향미증진제)	소래 영농 조합법인	소래영농 조합법인



Fig. 22. 지산농원 황기탕(황기탕 총 중량 912g).

Table 8. 지산농원 황기탕 제품 구성 비율

(unit : g)

오계	수삼	홍고추	육수
535	30	10	276
58.66%	3.28%	1.09%	30.26%

시중 오골계 삼계탕은 첨가물이 많이 들어있고, 계육 함량에도 황기탕은 58 % 인 반면에, 시판 오골계 삼계탕은 40 %대를 보였다. 계육 함량을 줄이기 위해, 부재료 첨가가 많았다.

(9) 오계란 분말

계란 분말을 제과제빵과, 헬스 보충제로 많이 사용 되고 있다. 우리는 계란의 단점인 짧은 유통기한(냉장 보관시 약 35일)과, 운반 시 잘 깨지는 점을 보완하기 위하여, 계란을 분말화 하기로 하였다.

(가) 실험 재료

실험의 주재료는 현물로 지원받은 천연기념물 265호로 지정된 연산오계로 국가지정 사육장인 (주)지산 농원에서 오계란을 받아 실험하였다.

(나) 실험 방법 및 결과

지산농원에서 받은 오계란을, 난백과 난황을 분리하여 동결 건조하여, 오계란 난백, 난황 분말을 만들었다. 동결 건조기는 일신랩 PVTFD20R 모델로, 기기 설정은 $-40^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ 로 자동 프로그램을 사용하였으며 제조 공정은 아래 <Fig. 23> 와 같다.

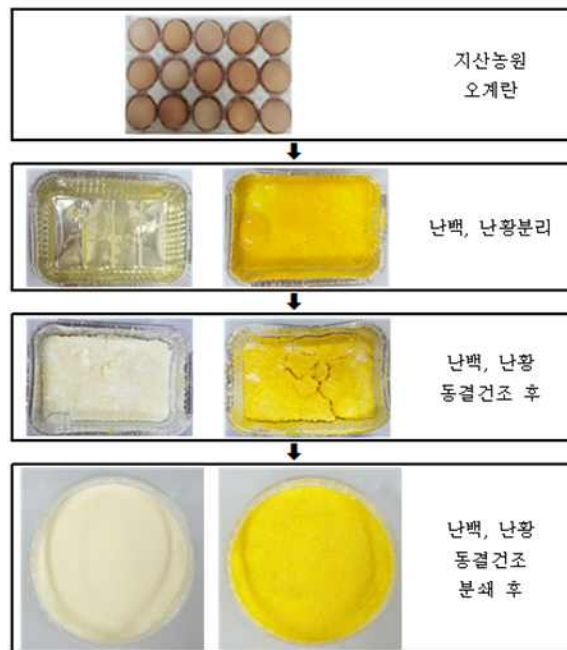


Fig. 23. 오계란 분말 동결건조 시제품.

동결건조 수율은 난백 초기무게 171 g에서 동결 건조 후 28 g 으로 16.4 %이고, 난황은 초기 무게 201 g에서 동결건조 후 97 g으로 48.3 % 이었다.

나. 연산오계 가공 간편편이식 유통기한 설정 실험

오계를 활용한 간편편이식 개발 제품의 유통기한 설정 실험을 진행하였다.

(1) 실험 재료

흑미 오계죽, 흑임자 오계죽, 오계란 요거트 비스코티 죽 3종은 레토르트 121 °C, 15분 처리한 제품으로 미생물학적 품질검사를 진행하였다.

오계란 요거트 비스코티는 스낵류로 이화학적 품질 특성인, 수분과 수분활성도 분석을 하였다. 황기탕은 지산농원에서 받은 대조군과, 레토르트 121 °C, 15분 처리 한, 레토르트 처리군 두 가지를 실험 하였으며, 육수는 이화학적 품질인 pH, 환원당, 염도, 당도 분석하였다.

황기탕 오계육은 이화학적 품질인 휘발성 아미노산 질소, 지질산패도, 미생물학적 품질인 총균수, 대장균군을 분석하였고, 대조군 처리군 0일째 물리적 품질인 경도를 측정하였다.

(2) 실험 방법

이화학적 품질, 물리적 품질, 미생물학적 안정성을 각 항목에 맞는 유통기한 설정 실험을 진행하였다.

Table 9. 간편편이식 품질 지표 선정

	항 목	분석방법
이화학적 품질	수분(WHC)	AOAC측정법
	수분활성도 (AW)	수분활성도 측정기
	pH	pH측정기
	휘발성 아미노태	미량확산법
	질소(VBN)	TBA
	지질 산패도	AOAC측정법
	환원당	굴절 염도계
	염도	굴절 도계
	당도	일반성분분석법
	지방산 분석	일반성분분석법
	영양성분분석	HPLC(분석의뢰)
물리적 품질	경도(Hardness)	Texture analyser(TA분석)
	총균수	
미생물학적 품질	대장균군	평판도말 배양법
	살모넬라	
	황색포도상구균	

(가) 이화학적 품질 특성

① 수분함량

일반성분 분석방법에서 수분 함량은 AOAC의 방법에 따라 105℃ 상압가열 건조법 조건으로 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다.

② 수분활성도

시료의 수분활성도는 수분활성도 분석기기(Aqualab water activity meter model series 3, Decagon Devices, Inc, Pullman, USA)를 사용하여 분석하였다. 모든 분석은 3회 반복하여 측정되었다.

③ pH

pH는 시료 10ml를 취하여 90ml의 2차 증류수에 희석한 후 filter paper(Whatman™ cellulose filter paper Grade 1, GE Healthcare companies, UK)로 여과하여, pH meter(Orion Research Inc., USA)를 이용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다.

④ 휘발성 비단백태 질소(VBN)

식육류와 어패류의 부패한 정도를 알아보기 위하여 사용되는 휘발성염기태질소화합물 즉, VBN(Volatile basic nitrogen)은 conway unit을 이용한 미량확산법을 사용하였으며, 어육마쇄

물 10g에 증류수 50ml를 가하여 11,000rpm에서 30초간 균질 한 후 5,000rpm, 30분 4℃ 원심분리 액을 여과하고, 5% H₂SO₄를 이용하여 약산성(PH 4)으로 맞춘 후 100ml 정용하여 시험용액으로 사용하였다. conway unit 내실에 0.01N-H₂SO₄ 0.1ml을 주입한 후, 외실 한쪽에 여과된 균질액 1ml를 넣고 다른 한쪽에 K₂CO₃ 1ml을 주입 하여 잘 혼합시킨 후 37℃에서 120분간 배양하였다. 반응 종료 후 conway unit의 내실에 Brunswik 시약 한 방울을 첨가한 후 미량 수평 뷰렛을 이용하여 0.012N NaOH 용액으로 적정하였다. 적정량에 대한 계산법은 [eq.1]과 같다. a는 분시험 적정치(ml)를 의미하고, b는 공시험 적정치(ml)를 의미한다.

$$\text{VBN(mg\%)} = 0.28 \times (a \times b) \times F \times 100 / 0.1 \quad [\text{eq.1}]$$

⑤ 지방산패도(TBA)

시료 분쇄물 5g에 butylated hydroxyanisole(BHA) 50 μ l와 증류수 15ml를 첨가하여 균질화시킨 후 균질액 1ml를 시험관에 넣고 2ml thiobarbituric acid(TBA) / trichloroacetic acid(TCA) 혼합용액을 넣어 혼합한 후 90℃의 항온수조에서 15분간 열처리한 후 냉각시켜 3,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 한시료의 상층을 회수하여 531nm에서 흡광도를 측정하여 지방산패도를 산출하고 mgMA(malonaldehyde)/kg으로 나타냈다.

⑥ 환원당

시료 1g을 증류수에 100ml 정용한 다음 마개를 막고 1시간 sonication을 시켜준 다음 0.45 μ m filter지로 여과하여 시료 1ml에 DNS 3ml을 넣고 물중탕으로 발색시킨 후 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로는 포도당을 사용하여 검량선을 작성하였고 시료중의 환원당량을 검량선에 따라 결정하였다. DNS시약은 NaOH 10g과 DNS 10g을 소량의 증류수에 녹인 후 phenol 2g, sodium bisulfite 0.5g, Rochelle 200g을 순서대로 녹인 후 1L로 조제하여 냉암소에 저장하여 실험하였다. 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다.

⑦ 염도

상온에서 휴대용 디지털 염도계를 이용하여 3회 반복 측정하였다.

⑧ 당도

상온에서 휴대용 굴절 당도계 (ATAGO digital refractometer, PR-101, Japan)를 이용하여 3회 반복 측정하였다.

⑨ 지방산 분석

지방산 분석은 식약처 공인기관인 수원여자대학교 식품분석센터에 의뢰했다.

⑩ 영양성분분석

영양성분 분석인 열량, 탄수화물, 당류, 단백질, 지방, 포화지방산, 트랜스 지방, 콜레스테롤, 나트륨에 관하여 진행하였다. 식약처의 식품분석 공인기관인 수원여자대학교 식품분석센터에 의뢰하였다.

⑪ 아미노산 분석

아미노산 분석은 구성아미노산과, 유리 아미노산을 환경부, 지식경제부 기술표준원으로부터 국제공인시험기관으로 인정된 서울대학교 농생명과학공동기기원에 의뢰하였다.

(나) 물리적 품질 특성(Texture Analysis)

TA.XT EXPRESS Enhanced texture analyser(stable micro system, UK)를 사용하여 5회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었고, 다음과 같은 조건으로 분석하였다.

Table 10. 황기탕 경도 조건

T.A	Value
probe	10
Test mode	compression
pre-test speed(mm/sec)	1.00
Test speed(mm/sec)	1.00
Post-test speed(mm/sec)	10.00
Target mode	Distance 10mm
Trigger Type	Auto(Force)
Trigger Force(g)	10.0
Tare mode	Auto
Advanced option	On
Control oven	Disabled

(다) 미생물학적 품질 특성(미생물 생존률 분석)

총균수, 대장균군, 살모넬라, 황색포도상구균 검사는 3M 건조필름(3MTM Petrifilm™ Aerobic count plates, Coliform count plates)을 이용하여 진행하였으며, 35 ℃로 고정시킨 배양기에서 48시간 배양 한 후 1평판당 25~250개의 집락을 형성한 평판을 택하여 g당 집락수를 계산하였다.

(3) 실험결과

(가) 흑미 오계죽

지산농원으로부터 받은 1년산 연산오계를 이용하여 흑미 오계죽을 조리 한 후 레토르트 처리 (121 ℃, 15분 멸균)후 냉동 보관한 샘플로 실험하였고 <Table 11> 에 측정치를 나타내었다.

Table 11. 흑미 오계죽 미생물학적 품질

unit : CFU/g

총균수	대장균군	황색포도상구균	살모넬라
N.D	N.D	N.D	N.D

(나) 흑임자 오계죽

지산농원으로부터 받은 1년산 연산오계를 이용하여 흑임자 오계죽을 조리 한 후 레토르트 처리(121℃, 15분 멸균)후 냉동 보관한 샘플로 실험하였고 <Table 12>에 측정치를 나타내었다.

Table 12. 흑임자 오계죽 미생물학적 품질

unit : CFU/g

총균수	대장균군	황색포도상구균	살모넬라
N.D	N.D	N.D	N.D

(다) 오계란 야채죽

지산농원으로부터 받은 1년산 연산오계와 오계란의 난황을 이용하여 오계란 야채죽을 조리 한 후 레토르트 처리(121℃, 15분 멸균)후 냉동 보관한 샘플로 실험하였고 <Table 13> 에 측정치를 나타내었다.

Table 13. 오계란 야채죽 미생물학적 품질

unit : CFU/g

총균수	대장균군	황색포도상구균	살모넬라
N.D	N.D	N.D	N.D

흑미 오계죽, 흑임자 오계죽, 오계란 야채죽의 경우 미생물학적 품질인 총균수, 대장균군, 황색포도상구균, 살모넬라에서 모두 N.D의 결과로, 미생물학적 안전성을 나타내었다.

(라) 오계란 요거트 비스코티

지산농원으로부터 오계란의 난백을 이용하여 오계란 요거트 비스코티를 조리 한 샘플로 실험하였고 <Table 14>에 측정치를 나타내었다.

Table 14. 오계란 요거트 비스코티 이화학적 품질

수분함량(%)	수분활성도
1.6554±0.0671	0.253±0.008

오계란 요거트 비스코티는 간편 편이식 스낵류로, 수분 1.6654 %, 수분활성도 0.253 으로 이화학적, 미생물학적으로 안전하다.

(마) 황기탕

지산농원으로부터 받은 황기탕(대조군)과 레토르트 처리 (121 °C, 15분 멸균)한 처리군을 비교 실험 하였다. 대조군은 일반 냉장 저장으로 5 °C에서 7일에 한번 씩 4회 실험을 진행 하였다. 레토르트 처리한 처리군은 레토르트 처리 후 상온 보관 하면서 1달에 한번씩 5회 실험을 진행 하였다. 대조군 실험은 종료 되었고, 레토르트 처리군 실험은 5 개월까지 진행하였다.

① 경도 측정

대조군과, 처리군의 0일째 황기탕에 포함된 오계육의 경도 측정된 결과를 <Table 15> 에 나타내었다.

Table 15. 황기탕 0일째 대조군 처리군 경도 측정 결과

(unit : g)

대조군	처리군 0 개월	처리군 4 개월	처리군 5 개월
248.872±30.088	64.914±19.059	70.150±17.365	77.044±12.928

황기탕 대조군과 처리군의 경도를 보면 레토르트 처리한 처리군의 경도가 낮았다. 이는 레토르트 처리 시 고온에 압력을 가하기 때문에 오계육의 경도가 낮아지는 것을 알 수 있다. 레토르트 처리 5 개월까지 물성의 변화가 없다. 일반적으로 시판되고 있는 레토르트 처리 오골계 삼계탕의 유통기한은 1 년 6 개월이다. 그러므로 위의 실험과 같이 레토르트 처리를 하면 황기탕의 유통기한은 최소 6 개월 이상은 충분히 보장할 수 있는 것으로 판단된다.

② pH

저장일수에 따른 대조군의 pH 변화는 <Table 16, Fig. 24> 와 같다.

Table 16. 대조군 저장 기간에 따른 pH 변화

0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
6.11±0.01	6.12±0.03	6.11±0.02	6.04±0.02	6.04±0.01

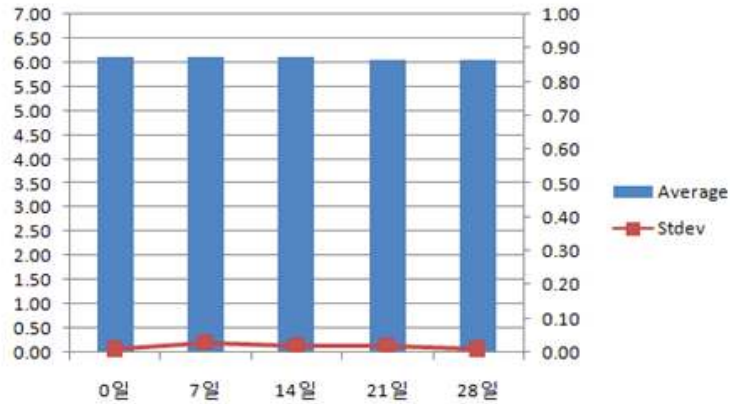


Fig. 24. 대조군 저장 기간에 따른 pH 변화.

저장 일수에 따른 레토르트 처리군의 pH변화는 <Table 17>과 같다.

Table 17. 처리군 저장 기간에 따른 pH 변화

0 개월	1 개월	2 개월	3 개월	4 개월	5 개월
6.12±0.03	6.10±0.01	6.07±0.01	6.06±0.01	6.04±0.02	6.04±0.03

황기탕 대조군은 5 °C 저장에서 4주간 pH의 변화가 0.07정도의 차이로, 많은 차이가 없었다. 처리군 역시 상온 저장 5 개월까지는, pH 0.08로 차이가 거의 없었다.

③ 환원당

저장일수에 따른 대조군의 환원당 변화는 <Table 18, Fig. 25>와 같다.

Table 18. 대조군 저장 기간에 따른 환원당 변화

(unit : %)

0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
24.846±0.418	39.349±0.185	40.360±0.428	41.027±0.243	40.377±0.506

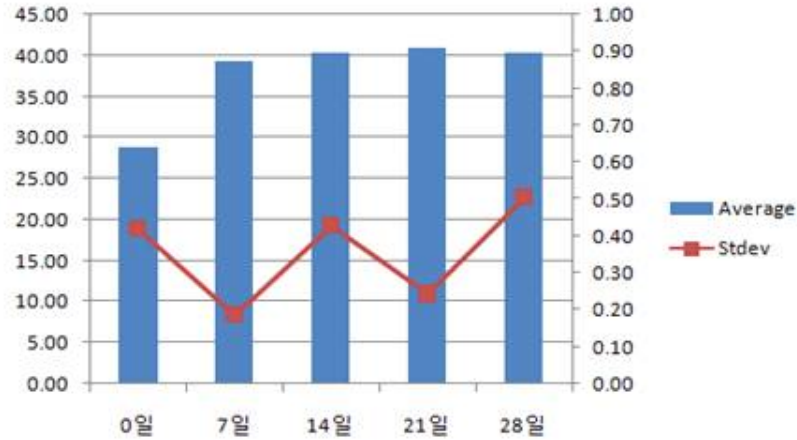


Fig. 25. 대조군 저장 기간에 따른 환원당 변화.

저장 일수에 따른 레토르트 처리군의 환원당 변화는 <Table 19> 과 같다.

Table 19. 처리군 저장 기간에 환원당 변화

(unit : %)

0 개월	1 개월	2 개월	3 개월	4 개월	5 개월
42.979±0.301	43.733±0.922	43.647±0.208	43.613±0.286	43.836±0.259	43.921±0.235

황기탕 대조군은 5 °C 저장에서 4주간 환원당의 변화가 약 16 % 환원당이 높아지는 결과를 보였다. 특히 0일과 7일 사이에 약 15 %의 큰 폭으로 증가하였는데 이는 저장 기간 중 오계육의 아미노산 성분 등이 나와 환원당이 높아진 것으로 판단된다. 대조군과 처리군의 차이는 18 %로 처리군의 환원당이 높는데, 이는 레토르트 처리 시 고온에 압력을 가하여 처리하기 때문에 오계육의 아미노산 성분 등이 나와 대조군보다 환원당이 높은 것으로 판단된다.

처리군 저장 5달째 까지, 0.942 % 높아졌으나, 그 차이가 미미하다.

④ 염도

저장일수에 따른 대조군의 염도 변화는 <Table 20, Fig. 26> 과 같다.

Table 20. 대조군 저장 기간에 따른 염도 변화

(unit : %)

0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
0.09±0.00	0.08±0.01	0.10±0.01	0.11±0.00	0.10±0.00

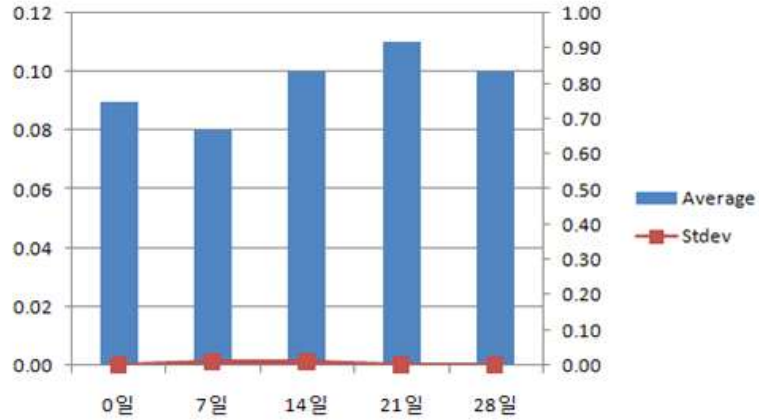


Fig. 26. 대조군 저장 기간에 따른 염도 변화.

저장 일수에 따른 레토르트 처리군의 염도 변화는 <Table 21> 과 같다.

Table 21. 처리군 저장 기간에 염도 변화

unit : %

0 개월	1 개월	2 개월	3 개월	4 개월	5 개월
0.12±0.00	0.11±0.00	0.13±0.00	0.12±0.00	0.12±0.00	0.12±0.00

염도는 대조군보다 레토르트 처리군의 염도가 0.02 %정도 높았으며, 저장 기간에 따른 차이는 거의 없었다.

⑤ 당도

저장일수에 따른 대조군의 당도 변화는 <Table 22, Fig. 27> 과 같다.

Table 22. 대조군 저장 기간에 따른 당도 변화

unit : ° Brix

0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
4.20±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00



Fig. 27. 대조군 저장 기간에 따른 당도 변화.

저장 일수에 따른 레토르트 처리군의 당도 변화는 <Table 23> 과 같다.

Table 23. 처리군 저장 기간에 당도 변화

unit : ° Brix

0 개월	1 개월	2 개월	3 개월	4 개월	5 개월
4.40±0.00	4.40±0.00	4.20±0.00	4.20±0.00	4.20±0.00	4.20±0.00

당도는 처리군이 대조군보다 0.2 °로 약간 높았지만, 저장 기간에 따른 차이는 거의 없었다.

⑥ 휘발성 아미노태 질소(VBN)

저장일수에 따른 대조군의 VBN 변화는 <Table 24, Fig. 28> 과 같다.

Table 24. 대조군 저장 기간에 따른 VBN 변화

unit : mg%

0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
15.96±0.00	15.96±0.00	15.96±0.00	15.96±0.00	16.89±0.05

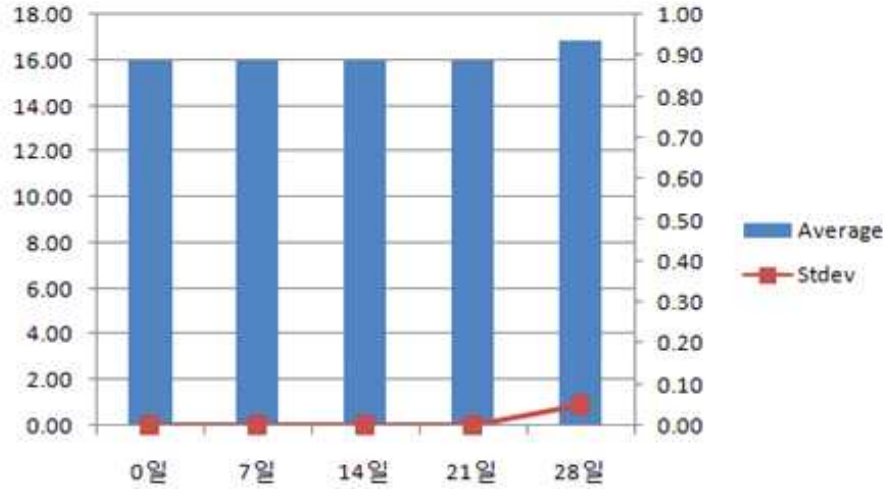


Fig. 28. 대조군 저장 기간에 따른 VBN 변화.

저장 일수에 따른 레토르트 처리군의 VBN 변화는 <Table 25> 와 같다.

Table 25. 처리군 저장 기간에 VBN 변화

unit : mg%

0 개월	1 개월	2 개월	3 개월	4 개월	5 개월
15.03±1.62	15.96±0.00	18.76±0.00	18.76±0.00	18.76±0.00	18.76±0.00

VBN의 값은 대조군의 경우 5 °C 4주 저장 기간 중의 변화는 거의 없었으며, 레토르트 상온보관 2달째에는 수치가 약간 높아졌긴 했지만 적정량의 차이는 많이 나지 않았다.

⑦ 지질 산패도 (TBA)

저장일수에 따른 대조군의 TBA 변화는 <Table 26, Fig. 29> 와 같다.

Table 26. 대조군 저장 기간에 따른 TBA 변화

unit : mgMA/kg

0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
0.655±0.019	0.685±0.024	0.820±0.018	0.955±0.024	0.958±0.019

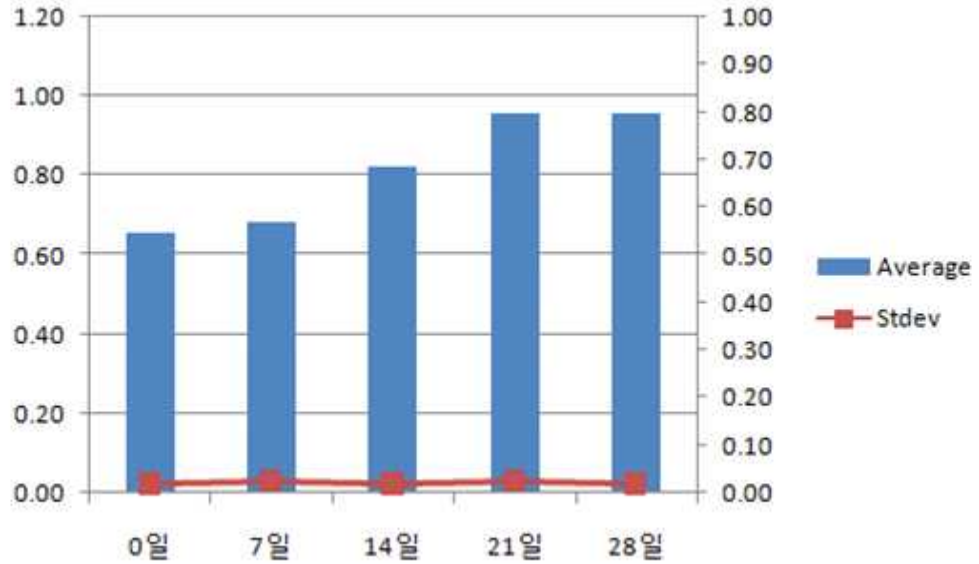


Fig. 29. 대조군 저장 기간에 따른 TBA 변화.

저장 일수에 따른 레토르트 처리군의 TBA 변화는 <Table 27>과 같다.

Table 27 . 처리군 저장 기간에 TBA 변화

unit : mgMA/kg

0 개월	1 개월	2 개월	3 개월	4 개월	5 개월
0.757±0.016	0.784±0.062	0.982±0.094	0.910±0.018	0.937±0.032	0.946±0.018

지질 산패의 TBA는 대조군, 처리군 모두 증가하는 결과를 나타냈다. 이는 저장 기간이 길어짐으로 선행 연구의 이화학적, 미생물학적 품질 지표의 문제가 없어도 육수의 탁도가 약간 높아짐에 따라 TBA값도 증가하는 것으로 판단된다.

⑧ 지방산 분석

지방산 분석은 전문분석기관인 수원여자대학교 식품분석센터에 의뢰하였으며, 황기탕 대조군 지방산 분석 결과는 <Fig. 30> 에 그리고 황기탕 처리군 지방산 분석 결과는 <Fig. 31> 에 각각 나타내었다.

황기탕 대조군, 레토르트 지방산 함량의 차이는 거의 없었다.

[445-895] 경기도 화성시 봉담읍 주석로 1098
수원여자대학교 식품분석연구센터 309호
Tel. 031-290-8217 Fax. 031-209-8220

접수번호	A5-150403-046-01	접수일자	2015년 4월 3일
시험용도	위생/과제	검사항목	지방산조성
제품명	연산오겔-황기탕 대조군	식품유형	기준규격 외
제조일자	-	유통기한	-
업체명	(주)다손	대표자	조은경
업체주소	경기 부천시 오정구 삼정동 365 부천테크노파크303동 601,904호		

귀하께서 의뢰하신 검체에 대하여 다음과 같이 시험성적서를 고부합니다

시험결과

No.	Arrevation	Common Name	단위	결과	비고
1	C4:0	Butyric acid	g/100 g	0.000	
2	C6:0	Caproic acid	g/100 g	0.000	
3	C8:0	Caprylic acid	g/100 g	0.000	
4	C10:0	Capric acid	g/100 g	0.001	
5	C11:0	Undecanoic acid	g/100 g	0.000	
6	C12:0	Lauric acid	g/100 g	0.002	
7	C13:0	Tridecanoic acid	g/100 g	0.000	
8	C14:0	Myristic acid	g/100 g	0.014	
9	C14:1	Myristoleic acid	g/100 g	0.001	
10	C15:0	Pentadecanoic acid	g/100 g	0.002	
11	C15:1	Pentadecenoic acid	g/100 g	0.000	
12	C16:0	Palmitic acid	g/100 g	0.406	
13	C16:1	Palmitoleic acid	g/100 g	0.036	
14	C17:0	Margaric acid	g/100 g	0.005	
15	C17:1	Heptadecenoic acid	g/100 g	0.000	
16	C18:0	Stearic acid	g/100 g	0.251	
17	C18:1,trans	Oleic acid	g/100 g	0.007	
18	C18:1,Cis		g/100 g	0.677	
19	C18:2,trans	Linoleic acid	g/100 g	0.003	
20	C18:2,Cis		g/100 g	0.845	
21	C20:0	Arachidic acid	g/100 g	0.005	
22	C18:3n-6	γ-Linolenic acid	g/100 g	0.000	
23	C18:3n-3	Linolenic acid	g/100 g	0.066	
24	C20:1	Gadoleic acid	g/100 g	0.016	
25	C21:0	Heicicosanoic acid	g/100 g	0.000	
26	C20:2	Eicosadienoic Acid	g/100 g	0.012	
27	C22:0	Behenic acid	g/100 g	0.002	
28	C20:3n-6	Dihomo-γ-linolenic acid	g/100 g	0.006	
29	C22:1n-9	Erucic acid	g/100 g	0.006	
30	C20:3n-3	Eicosatrienoic acid	g/100 g	0.002	
31	C20:4n-6	Arachidonic acid	g/100 g	0.000	
32	C23:0	Tricosanoic acid	g/100 g	0.096	
33	C22:2	Brassic acid	g/100 g	0.000	
34	C24:0	Lignoceric acid	g/100 g	0.002	
35	C20:5n-3	EPA	g/100 g	0.001	
36	C24:1	Nervonic acid	g/100 g	0.003	
37	C22:6n-3	DHA	g/100 g	0.014	

- 비고: 1. 위 판정은 의뢰원 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
2. 이 시험성적서는 의뢰자가 제시한 제품 및 제품명으로 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지 않음.
3. 이 시험성적서는 당 센터의 사전 서면 동의 없이 홍보,선전,광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며,용도 이외의 사용을 금함

2015년 4월 20일



수원여자대학교 식품분석연구센터
Suwon Women's University Food Analysis Research Center



Fig. 30. 황기탕 대조군 지방산 분석 시험성적서.

[445-895] 경기도 화성시 봉담읍 주석로 1098
수원여자대학교 식품분석연구센터 309호
Tel. 031-290-8217 Fax. 031-209-8220

접수번호	A5-150403-046-02	접수일자	2015년 4월 3일
시험용도	위생/과제	검사항목	지방산조성
제품명	연산오계-황기탕 레토르트	식품유형	기준규격 외
제조일자	-	유통기한	-
업체명	(주)다손	대표자	조은경
업체주소	경기 부천시 오정구 삼정동 365 부천테크노파크303동 601,904호		

귀하께서 의뢰하신 검체에 대하여 다음과 같이 시험성적서를 교부합니다.

시험 결과

No.	Arreivation	Common Name	단위	결과	비고
1	C4:0	Butyric acid	g/100 g	0.000	
2	C6:0	Caproic acid	g/100 g	0.000	
3	C8:0	Caprylic acid	g/100 g	0.000	
4	C10:0	Capric acid	g/100 g	0.000	
5	C11:0	Undecanoic acid	g/100 g	0.000	
6	C12:0	Lauric acid	g/100 g	0.002	
7	C13:0	Tridecanoic acid	g/100 g	0.000	
8	C14:0	Myristic acid	g/100 g	0.009	
9	C14:1	Myristoleic acid	g/100 g	0.001	
10	C15:0	Pentadecanoic acid	g/100 g	0.002	
11	C15:1	Pentadecenoic acid	g/100 g	0.000	
12	C16:0	Palmitic acid	g/100 g	0.301	
13	C16:1	Palmitoleic acid	g/100 g	0.024	
14	C17:0	Margaric acid	g/100 g	0.003	
15	C17:1	Heptadecenoic acid	g/100 g	0.000	
16	C18:0	Stearic acid	g/100 g	0.205	
17	C18:1,trans	Oleic acid	g/100 g	0.005	
18	C18:1,Cis		g/100 g	0.489	
19	C18:2,trans	Linoleic acid	g/100 g	0.003	
20	C18:2, Cis		g/100 g	0.619	
21	C20:0	Arachidic acid	g/100 g	0.004	
22	C18:3n-6	γ-Linolenic acid	g/100 g	0.000	
23	C18:3n-3	Linolenic acid	g/100 g	0.047	
24	C20:1	Gadoleic acid	g/100 g	0.012	
25	C21:0	Henicosanoic acid	g/100 g	0.000	
26	C20:2	Eicosadienoic Acid	g/100 g	0.009	
27	C22:0	Behenic acid	g/100 g	0.002	
28	C20:3n-6	Dihomo-γ-linolenic acid	g/100 g	0.005	
29	C22:1n-9	Erucic acid	g/100 g	0.004	
30	C20:3n-3	Eicosatrienoic acid	g/100 g	0.001	
31	C20:4n-6	Arachidonic acid	g/100 g	0.000	
32	C23:0	Tricosanoic acid	g/100 g	0.091	
33	C22:2	Brassic acid	g/100 g	0.000	
34	C24:0	Lignoceric acid	g/100 g	0.001	
35	C20:5n-3	EPA	g/100 g	0.000	
36	C24:1	Nervonic acid	g/100 g	0.003	
37	C22:6n-3	DHA	g/100 g	0.013	

- 비고: 1. 위 판정은 의뢰한 시험-검사 항목만을 대상으로 한것입니다.
2. 이 시험성적서는 의뢰자가 제시한 제품 및 제품명으로 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지 않음
3. 이 시험성적서는 당 센터의 사전 서면 동의 없이 홍보,선전,광고 및 소송등으로 사용될 수 없으며,용도 이외의 사용불 가능

2015년 4월 20일



수원여자대학교 식품분석연구센터
Suwon Women's University Food Analysis Research Center



Fig. 31. 황기탕 레토르트 처리군 지방산 분석 시험성적서.

⑨ 영양성분 분석

영양성분 분석은 전문분석기관인 수원여자대학교 식품분석센터에 의뢰하였으며, 황기탕 대조군 영양성분 분석 결과는 <Fig. 32>에, 황기탕 처리군 영양성분 분석 결과는 <Fig. 33> 에 각각 나

타내었다.

[445-895] 경기도 화성시 봉담읍 주석로 1098
수원여자대학교 식품분석연구소 309호
Tel. 031-290-8217 Fax. 031-290-8220

검수번호	A3-150403-012-01	검수일자	2015년 04월 03일
시험용도	영양성분검사	시험항목	열량 외 8종
제품명	연산오계-황기탕 대조군	식품유형	영양성분분석
제조일자		유통기한	
업체명	(주)다손	대표자	조은경
업체주소	경기 부천시 오정구 삼정동 365 부천테크노파크303동 601,904호		

귀하께서 의뢰하신 검체에 대하여 다음과 같이 시험성적서를 교부합니다.

시험결과

시험항목	결과	100g(㎖)당	표시량	% 영양소 기준치
열량(kcal/100 g)	78.27	78.27	78.27	
탄수화물(g/100 g)	13.00	13.00	13.00	4%
당류(g/100 g)	0.37	0.37	0.37	
단백질(g/100 g)	0.65	0.65	0.65	1%
지방(g/100 g)	2.63	2.63	2.63	5%
포화지방(g/100 g)	0.79	0.79	0.79	5%
트랜스지방(g/100 g)	0.01	0.01	0.01	
콜레스테롤(mg/100 g)	60.30	60.30	60.30	20%
나트륨(mg/100 g)	57.73	57.73	57.73	3%

비고: 1. 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
2. 이 시험성적서는 의뢰자가 제시한 제품 및 제품명으로 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지 않습니다.
3. 이 시험성적서는 당 센터의 사전 서면 동의 없이 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용할 수 없으며, 무단 이외의 사용을 금합니다.

2015년 04월 17일



수원여자대학교 식품분석연구소
Suwon Women's University Food Analysis Research Center



Fig. 32. 황기탕 대조군 영양성분 분석 시험성적서.

[445-895] 경기도 화성시 봉담읍 주석로 1098
수원여자대학교 식품분석연구센터 309호
Tel. 031-290-8217 Fax. 031-290-8220

접수번호	A3-150403-012-02	접수일자	2015년 04월 03일
시험용도	영양성분검사	시험항목	열량 외 8종
제품명	연산오계-황기탕 레토르트	식품유형	영양성분분석
제조일자		유통기한	
업체명	(주)다손	대표자	조은경
업체주소	경기 부천시 오정구 상정동 365 부천테크노파크303동 601,904호		

귀하께서 의뢰하신 검체에 대하여 다음과 같이 시험성적서를 교부합니다.

시험결과

시험항목	결과	100g(%)당	표시량	% 영양소 기준치
열량(kcal/100 g)	63.98	63.98	63.98	
탄수화물(g/100 g)	9.08	9.08	9.08	3%
당류(g/100 g)	0.53	0.53	0.53	
단백질(g/100 g)	2.28	2.28	2.28	4%
지방(g/100 g)	2.06	2.06	2.06	4%
포화지방(g/100 g)	0.62	0.62	0.62	4%
트랜스지방(g/100 g)	0.01	0.01	0.01	
콜레스테롤(mg/100 g)	23.31	23.31	23.31	8%
나트륨(mg/100 g)	60.91	60.91	60.91	3%

비고: 1. 위 관점은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
2. 이 시험성적서는 의뢰자가 제시한 제품 및 제품명으로 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지 않습니다.
3. 이 시험성적서는 당 센터의 사전 서면 동의 없이 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.

2015년 04월 17일



수원여자대학교 식품분석연구센터
Suwon Women's University Food Analysis Research Center



Fig. 33. 황기탕 레토르트 처리군 영양성분 분석 시험성적서.

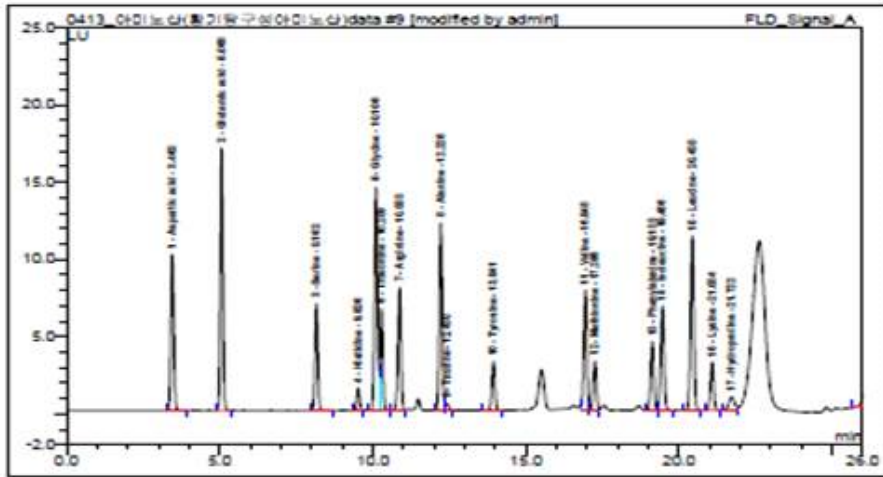
황기탕 대조군 샘플이, 레토르트 처리 한 샘플보다 열량, 탄수화물, 지방, 포화지방, 콜레스테롤이 약간 높게 측정되었다.

⑩ 아미노산 분석

아미노산은 전문분석기관인 서울대학교 농생명과학공동기기원에 의뢰하였으며, 대조군과 처리

군의 구성 아미노산과, 유리 아미노산을 분석하였다. 대조군, 처리군의 구성아미노산분석 결과는 <Fig. 34>와 <Fig. 35> 에, 그리고 대조군, 처리군 유리 아미노산 분석 결과는<Fig. 36>와 <Fig. 37> 에 각각 나타내었다.

9 대조군 구성아미노산			
Sample Name:	대조군 구성아미노산	Injection Volume:	1.0
Vial Number:	RD1	Channel:	FLD_Signal
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	Amino acid-1	Bandwidth:	n.a.
Quantf. Method:	아미노산	Dilution Factor:	500.0000
Recording Time:	2015-4-13 14:02	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	34.90	Sample Amount:	1.0000



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height LU	Area LU*min	RelArea %	Amount mg/kg	Rel.Amount %
1	3.46	Aspartic acid	10.119	1.145	8.19	21024.7453	9.04
2	5.07	Glutamic acid	16.968	1.697	12.14	35497.4240	15.26
3	8.16	Serine	6.941	0.752	5.38	9125.3437	3.92
4	9.53	Histidine	1.459	0.158	1.13	6141.8675	2.64
5	10.11	Glycine	14.424	1.644	11.76	14827.9162	6.38
6	10.29	Threonine	6.605	0.736	5.26	10277.3169	4.42
7	10.88	Arginine	7.950	0.946	6.77	16925.2530	7.28
8	12.23	Alanine	12.134	1.399	10.01	13880.6755	5.97
9	12.43	Taurine	0.418	0.047	0.34	543.6269	0.23
10	13.94	Tyrosine	3.139	0.372	2.66	7254.0728	3.12
11	16.95	Valine	7.732	0.929	6.65	10530.9754	4.53
12	17.26	Methionine	3.144	0.388	2.77	5470.4653	2.35
13	19.13	Phenylalanine	4.448	0.554	3.96	8968.1596	3.86
14	19.46	Isoleucine	6.768	0.850	6.08	10460.1969	4.50
15	20.44	Leucine	11.299	1.432	10.25	17646.7746	7.59

아미노산/Integration

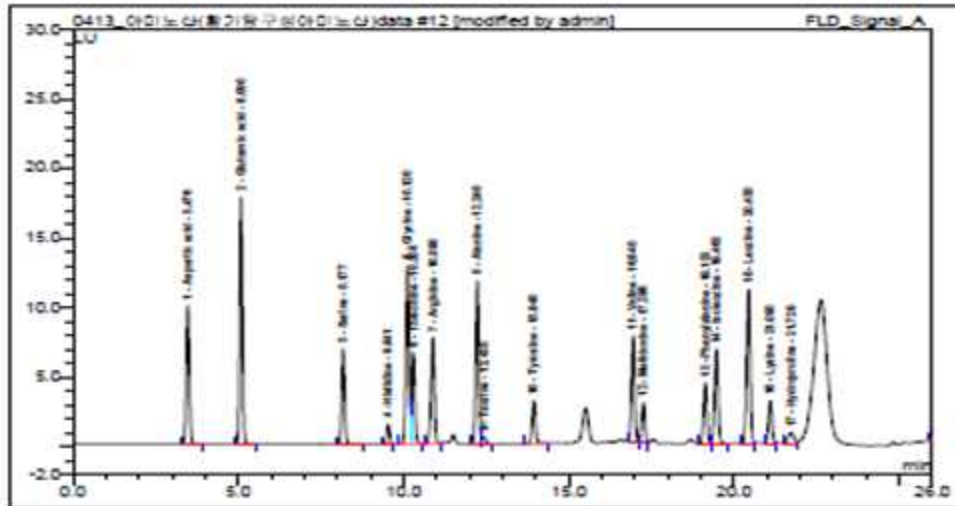
Chromleon (c) Dionex 1996-2006
Version 6.80 SR13 Build 3967 (216758)

Operator:admin Timebase:U-3000 Sequence:0413_아미노산(황기탕구성아미노산)data Page 2-2
2015-4-14 오후 17:47

16	21.08	Lysine	3.092	0.381	2.73	33627.8037	14.46
17	21.72	Hydroproline	0.840	0.174	1.24	2333.2076	1.00
18	26.11	proline	1.780	0.375	2.68	8058.3848	3.46
Total:			119.261	13.981	100.00	232594.210	100.000

Fig. 34. 황기탕 대조군 구성 아미노산 분석결과.

12 레토르트 구성아미노산			
Sample Name:	황기탕 레토르트 구성아미노산	Injection Volume:	1.0
Vial Number:	RD4	Channel:	FLD_Signal
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	Amino acid-1	Bandwidth:	n.a.
Quantf. Method:	아미노산	Dilution Factor:	500.0000
Recording Time:	2015-4-13 16:07	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	34.90	Sample Amount:	1.0000



No.	Ret. Time min	Peak Name	Height LU	Area LU*min	Rel.Area %	Amount mg/kg	Rel.Amount %
1	3.48	Aspartic acid	9.943	1.116	8.20	20458.3469	8.95
2	5.09	Glutamic acid	17.736	1.765	12.97	36909.5198	16.12
3	8.18	Serine	6.853	0.738	5.42	8948.5426	3.91
4	9.54	Histidine	1.405	0.151	1.11	5870.1849	2.56
5	10.12	Glycine	12.809	1.460	10.73	13167.6704	5.75
6	10.30	Threonine	6.542	0.733	5.39	10241.2385	4.47
7	10.90	Arginine	7.588	0.894	6.57	15983.3085	6.98
8	12.24	Alanine	11.715	1.335	9.81	13248.9485	5.79
9	12.44	Taurine	0.434	0.047	0.34	540.2942	0.24
10	13.95	Tyrosine	3.094	0.361	2.65	7040.7152	3.08
11	16.95	Valine	7.699	0.919	6.75	10417.8156	4.55
12	17.26	Methionine	2.917	0.355	2.61	5012.7027	2.19
13	19.13	Phenylalanine	4.388	0.541	3.97	8758.3809	3.83
14	19.46	Isoleucine	6.790	0.842	6.19	10358.1062	4.52
15	20.44	Leucine	11.124	1.395	10.25	17180.2195	7.50

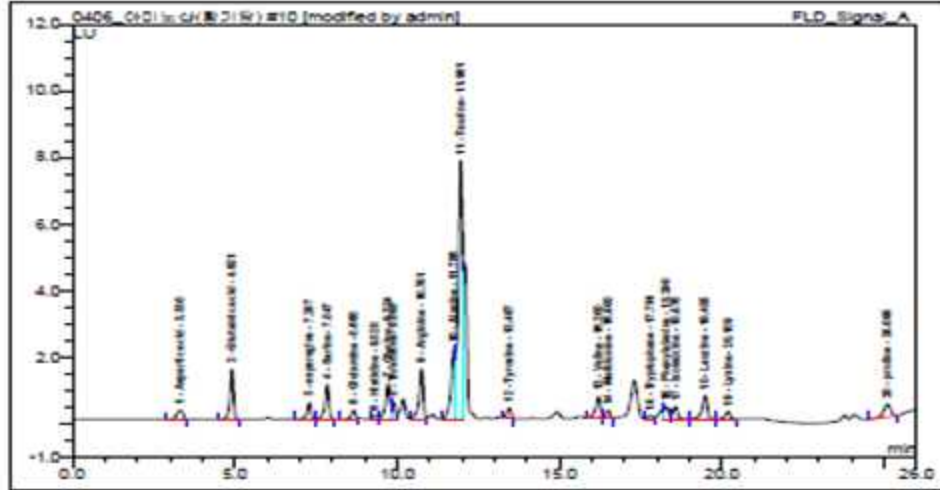
아미노산/Integration Chromeleon (c) Dionex 1996-2006
Version 6.80 SR13 Build 3967 (218758)

Operator:admin Timebase:U-3000 Sequence:0413_아미노산(황기탕구성아미노산)data Page 2-2
2015-4-14 오후 17:47

16	21.10	Lysine	3.064	0.383	2.82	33829.5227	14.78
17	21.73	Hydroproline	0.799	0.173	1.27	2321.7658	1.01
18	25.12	proline	1.967	0.401	2.95	8616.7095	3.76
Total:			116.868	13.609	100.00	229933.992	100.000

Fig. 35. 황기탕 레토르트 처리군 구성 아미노산 분석결과.

10 대조군			
10g/50ml 75% EtOH, 5배 희석			
Sample Name:	대조군	Injection Volume:	1.0
Vial Number:	RE2	Channel:	FLD_Signal
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	Amino acid-1	Bandwidth:	n.a.
Quantf. Method:	아미노산	Dilution Factor:	25.0000
Recording Time:	2015-4-5 9:42	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	34.90	Sample Amount:	1.0000



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height LU	Area LU*min	Rel.Area %	Amount mg/kg	Rel.Amount %
1	3.33	Aspartic acid	0.264	0.056	1.75	52.2407	2.32
2	4.92	Glutamic acid	1.505	0.198	6.13	206.9635	9.17
3	7.30	asparagine	0.503	0.070	2.18	53.6606	2.38
4	7.85	Serine	1.046	0.153	4.75	93.1618	4.13
5	8.67	Glutamine	0.272	0.040	1.24	36.5584	1.62
6	9.33	Histidine	0.097	0.017	0.53	45.1254	2.00
7	9.72	Glycine	1.073	0.176	5.45	74.2033	3.29
8	9.89	Threonine	0.515	0.055	2.03	46.8372	2.08
9	10.75	Arginine	1.501	0.231	7.16	205.1485	9.09
10	11.76	Alanine	2.121	0.329	10.20	164.3735	7.29
11	11.96	Taurine	7.760	1.289	39.90	746.9345	33.11
12	13.46	Tyrosine	0.318	0.050	1.56	49.3067	2.19
13	16.20	Valine	0.667	0.125	3.87	61.2571	2.72
14	16.50	Methionine	0.240	0.038	1.18	27.4399	1.22
15	17.79	Tryptophane	0.093	0.017	0.54	21.0902	0.93

아미노산/Integration

Chromleon (c) Dionex 1996-2005
Version 6.80 SR13 Build 3967 (218758)

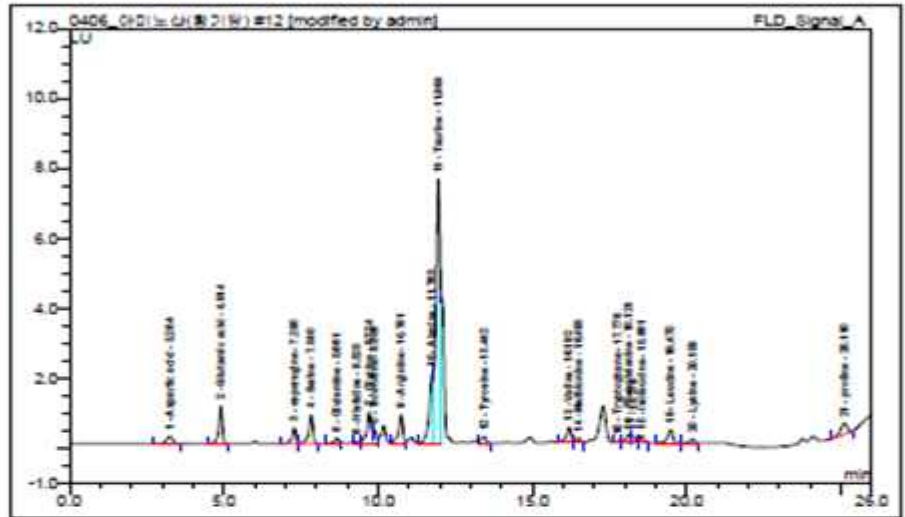
Operator:admin Timebase:U-3000 Sequence:0406_아미노산(황기탕)

Page 2-2
2015-4-14 오후 13:29

16	18.29	Phenylalanine	0.367	0.059	1.84	48.1964	2.14	
17	18.58	Isoleucine	0.359	0.057	1.77	35.7119	1.58	
18	19.49	Leucine	0.698	0.126	3.92	78.2566	3.47	
19	20.19	Lysine	0.218	0.036	1.12	84.6831	3.75	
20	25.10	proline	0.374	0.094	2.91	125.0909	5.54	
Total:				19.990	3.230	100.00	2256.240	100.000

Fig. 36. 황기탕 대조군 유리 아미노산 분석결과.

12 레포트			
10g/50ml 75% EtOH, 5배 희석			
Sample Name:	레포트	Injection Volume:	1.0
Vial Number:	RE4	Channel:	FLD_Signal
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	Amino acid-1	Bandwidth:	n.a.
Quantf. Method:	아미노산	Dilution Factor:	25.0000
Recording Time:	2015-4-5 11:05	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	34.90	Sample Amount:	1.0000



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height LU	Area LU*min	Rel.Area %	Amount mg/kg	Rel.Amount %
1	3.26	Aspartic acid	0.194	0.044	1.64	41.1722	2.27
2	4.91	Glutamic acid	1.066	0.143	5.26	149.1891	8.22
3	7.29	asparagine	0.454	0.064	2.37	49.0773	2.71
4	7.84	Serine	0.816	0.121	4.47	73.7452	4.07
5	8.66	Glutamine	0.153	0.023	0.85	21.1762	1.17
6	9.33	Histidine	0.064	0.013	0.49	34.9804	1.93
7	9.72	Glycine	0.903	0.145	5.36	61.3031	3.38
8	9.89	Threonine	0.391	0.052	1.90	36.8915	2.03
9	10.75	Arginine	0.816	0.135	4.96	119.4394	6.58
10	11.76	Alanine	2.011	0.289	10.65	144.1592	7.95
11	11.95	Taurine	7.551	1.262	46.48	731.1550	40.31
12	13.44	Tyrosine	0.185	0.033	1.20	31.7478	1.75
13	16.19	Valine	0.443	0.085	3.11	41.4580	2.29
14	16.49	Methionine	0.126	0.019	0.72	14.0517	0.77
15	17.78	Tryptophane	0.058	0.009	0.35	11.5433	0.64

아미노산/Integration Chromeleon (c) Dionex 1996-2006 Version 6.80 SR13 Build 3967 (218756)

Operator:admin Timebase:U-3000 Sequence:0406_아미노산(황기탕) Page 2-2
2015-4-14 오후 13:29


16	18.12	Phenylalanine	0.221	0.044	1.63	35.7440	1.97
18	18.56	Isoleucine	0.205	0.032	1.18	20.0610	1.11
19	19.48	Leucine	0.389	0.074	2.71	45.5651	2.51
20	20.19	Lysine	0.117	0.020	0.73	46.3887	2.56
21	25.11	proline	0.315	0.079	2.91	105.1489	5.80
Total:			16.481	2.686	98.97	1813.997	100.000

Fig. 37. 황기탕 레포트 처리군 유리 아미노산 분석결과.

구성 아미노산은 레포트 군이 Glutamic acid, Lysine, Proline이 높게 나타났다. 유리 아미노산은 대조군이 더 높았으며 Arginine, Methionine, Tryptophane, Lysine이 많이 측정되었다.

① 황색포도상구균, 살모넬라, 세균수 분석

황기탕의 대조군, 처리군의 0일째 샘플을 황색 포도상구균, 살모넬라, 세균수를 전문분석기관인 수원여자대학교 식품분석센터에 의뢰하였으며, 황기탕 대조군의 황색포도상구균, 살모넬라, 세균수의 분석결과를 <Fig. 38> 에 그리고 처리군의 결과를 <Fig. 39>에 각각 나타내었다.



수원여자대학교
식품분석연구센터

[445-895] 경기도 화성시 봉담읍 주석로 1098
수원여자대학교 식품분석연구센터 309호
Tel. 031-290-8217 Fax. 031-290-8220

시험성적서

접수번호	A5-150403-045-01	접수일자	2015년 04월 03일
시험용도	위생/과제	시험항목	황색포도상구균 외 2종
재 품 명	연산오계-황기탕 대조군	시험유형	기준규격 외
제조일자		유통기한	
업 체 명	(주)디손	대 표 자	조은경
업 처 주 소	경기 부천시 오정구 삼정동 365 부천테크노파크303동 601,904호		

귀하께서 의뢰하신 검체에 대하여 다음과 같이 시험성적서를 교부합니다.

시험 결과

시험항목	단위	결과	비고
황색포도상구균		음성	
살모넬라		음성	
세균수	(CFU/g(mL))	20	

비고: 1. 위 판정은 의뢰한 시험·검사 항목만을 대상으로 판정합니다.
 2. 이 시험성적서는 의뢰자가 제시한 제품 및 제품명으로 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지 않습니다.
 3. 이 시험성적서는 당 센터의 사전 서면 동의 없이 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용할 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.

2015년 04월 08일



수원여자대학교 식품분석연구센터
Suwon Women's University Food Analysis Research Center



Fig. 38. 황기탕 대조군 황색포도상구균, 살모넬라.

[445-895] 경기도 화성시 봉담읍 주석로 1098
수원여자대학교 식품분석연구센터 309호
Tel. 031-290-6217 Fax. 031-290-8220

접수번호	A5-150403-045-02	접수일자	2015년 04월 03일
시험응도	위생/과제	시험항목	황색포도상구균 외 2종
제품명	연산오계-황기탕 레토르트	식품유형	기준규격 외
제조일자		유통기한	
업체명	(주)다손	대표자	조은경
업체주소	경기 부천시 오정구 상정동 365 부천테크노파크303동 601,904호		

귀하께서 의뢰하신 검체에 대하여 다음과 같이 시험성적서를 교부합니다.

시험결과

시험항목	단위	결과	비고
황색포도상구균		음성	
살모넬라		음성	
세균수	(CFU/g(ml))	0	

비고: 1. 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
2. 이 시험성적서는 의뢰자가 제시한 검체 및 계통명으로 시험한 결과로서 잔치차폐에 대한 품질을 보증하지 않습니다.
3. 이 시험성적서는 당 센터의 사전 사전 동의 없이 홍보, 안전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.

2015년 04월 08일



수원여자대학교 식품분석연구센터
Suwon Women's University Food Analysis Research Center



Fig. 39. 황기탕 레토르트 처리군 황색포도상구균, 살모넬라, 세균수 분석.

황색포도상구균, 살모넬라, 세균수 분석결과 대조군에서만 세균수 20 CFU/g 로 분석되어 레토르트 살균에 의한 미생물학적 품질은 안전한 것으로 판단되었다. 그리고, 5개월까지 세균수와 대장균군 실험 한 결과, 균이 검출되지 않아 품질이 안전한 것으로 판단된다.

다. 연산오계 저분자 펩타이드 개발

연산 오계 이용 초고압 효소분해기술 개발 및 연산 오계 저분자 펩타이드 원액 제조

(1) 연산 오계 단백질을 기질로 이용하는 상업용 효소제의 탐색

- 현재 시판 중인 기원(세균, 곰팡이)이 다른 다양한 protease(proteinase, aminopeptidase, glutaminase, etc)의 특성을 조사 분석하여 후보 효소들 탐색
- 초고압 하에서 가수분해율 측정 후 후보 효소 선별

(2) 초고압 액화 효소분해 조건의 최적화

본 연구를 통해 개발된 오계 유래 저분자 펩타이드 원액은 제2협동기관인 대전대학에 전달되어 오계 건강음료 소재로 사용하였다.

연산오계의 가수 분해물을 이용하여, 건강음료를 제조한다. 일반적인 오계의 건강음료의 제조방법은 고온에서 장시간 고압증탕을 하여 제조하는데, 이러한 방법은 고온 고압에서 오계 원물에 함유된 기능성 성분 및 아미노산과 다른 성분의 생화학 반응을 유발시켜 기능성 생리활성 물질의 활성을 현저하게 낮추는 단점이 있다.

본 연구에서는 새로운 가공 기술로써 효소 첨가 고압액화 공정을 적용하여 오계 단백질을 가수분해 하여 체내 흡수율을 높인 저분자 펩타이드 원액을 제조하였으며, 이를 원료로 하여 제1협동 기관인 대전대학교에서 노약자를 위한 건강음료를 개발하였다.

(가) 오계 저분자 펩타이드 건강음료 효소 선정

① 실험 재료

실험의 주재료는 현물로 지원받은 천연기념물 265호로 지정된 연산오계를 사용하였으며 국가 지정 사육장인 (주)지산 농원에서 1년산 냉동오계를 받아 실험하였다. 예비 테스트로 사용한 닭가슴살은 시중 마트에서 구매한 하림 닭가슴살을 사용하였다.

실험에 사용한 효소는 대중상사(Seoul, Korea)에 의해 수입된 효소제품들을 사용하였다. 본 연구에서는 아래 표와 같이 Alcalase, Flavourzyme, Protamex, Bromelain 등을 이용한 가수분해물의 제작 및 분석을 진행하였다.

연산 오계의 저분자 펩타이드 원액은 <Fig. 40>와 같은 고압액화기를 사용하여 제조하였다. 고압액화 처리 시, 연산오계 단백질의 가수분해 효율을 높이기 위해 가수분해율이 높은 효소를 선정하기 위하여 단백질 분해 효소로 널리 사용하는 Alcalase, Flavourzyme, Protamex, Bromelain 등을 사용하여 실험하였다.



Fig. 40. 50 L 고압처리 시스템((주)이노웨이).

② 실험 방법

연산오계의 가수 분해물을 제작하기 전, 예비 테스트로 닭가슴살로 실험을 진행하였다. 닭 가슴살은 시중 마트에서 구매한 하림 닭가슴살을 사용하였다.

닭가슴살 가수 분해물은 닭가슴살 40 g과 물 80 g 을 (1 : 2 비율) 섞어 가정용 균질기로 균질화 한 후, 닭가슴살 무게의 1 %의 효소를 첨가하여 효소가 고루 섞이도록 한 후 고압용 파우치에 담아 실험하였다.

효소의 종류는 Alcalase, Flavourzyme, Protamex, Bromelain, Bromelain:Flavourzyme(1:1) 총 다섯 개의 효소로 실험하였다.

고압액화기를 사용하여 <Fig. 41>과 같이 100 Mpa, 50 °C에서 24 시간 처리하여 닭가슴살의 가수분해물을 제작하였다. 효소 촉진 반응 후 효소를 불활성화 시키기 위해 90 °C Water bath 에서 15 분 처리 후, 4 °C Chiller에서 30 분간 냉각시켰다. 닭가슴살 가수분해물을 원심분리기 로 10,000 rpm에서 30 분간 원심분리 한 후 Filter paper로 여과하여 저분자 펩타이드 원액을 제조하였다.

효소별 닭가슴살 가수 분해물의 특성 분석은 고형분 함량, 아미노태 질소, 수율 세 가지 항목을 분석하였다.

고형분 함량

닭가슴살 가수분해물의 Filter paper 여과 후 남아있는 고형분을 105°C에서 항량에 도달할 때 까지 상압 건조를 하여 분석하였다. 모든 실험은 3회 반복하였다.

아미노태질소의 함량

Formol 적정법을 이용하여 측정하였다. 시료를 증류수에 40 배 희석한 후 0.1 NHCl로 pH를 7.0으로 맞추고, formalin 10 mL을 넣은 후 0.1 N NaOH를 이용해 pH 8.5로 맞춘다. 적정에 사용된 NaOH양으로부터 질소의 함량을 산출하였다.

$$\text{mg formol nitrogen} = \text{mL NaOH} \times \text{normality of NaOH} \times 14$$

수출

닭가슴살 가수분해물의 Filter paper 여과 여액의 중량으로 계산하였다.



Fig. 41. 닭가슴살 효소별 저분자 펩타이드 제조 공정.

③ 실험결과

닭가슴살 분해 효소별 고형분 함량을 측정한 결과 <Table 28>과 같이 효소를 첨가 하지 않은 C는 9.19 g, Protamex (P) 6.93 g, Flourvozyme (F) 6.51 g, Alcalase (A) 6.41 g, Bromelain:Flavourzyme (1:1) (B+F) 4.84 g, Bromelain (B) 2.99 g 으로 나타났다.

효소를 첨가하지 않은 C의 경우 고형분 무게가 가장 높게 나타났고, 효소 중 Bromelain (B) 처리군의 고형분 무게가 가장 낮은 것으로 보아, 닭가슴살 가수분해의 효율은 Bromelain 효소로 처리 한 시료가 높다는 것을 알 수 있었다.

Table 28. 닭가슴살 효소 종류 별 고형분 함량 (g)

함량 (g)	C	A	F	P	B	B+F
	9.19±3.15	6.41±2.76	6.51±1.44	6.93±2.47	2.99±2.79	4.84±1.99

효소를 첨가하지 않고 고압액화 처리한 시료 C와 각기 다른 효소를 첨가한 시료들의 가수분해 효율은 <Table 29> 와 같이 나타났다. 닭가슴살 고형분 무게에 따른 가수분해 효율은

Protamex (P) 24.55 %로 가장 낮았고, Bromelain (B) 효소 처리한 시료가 67.45 % 로 가장 높아, 효율이 높다는 것을 알 수 있었다.

Table 29. 닭가슴살 효소 종류 별 가수분해율(%)

분해율 (%)	C	A	F	P	B	B+F
	0.00±0.00	30.25±2.76	29.11±1.44	24.55±2.47	67.45±2.79	47.35±1.99

닭가슴 분해 효소 종류별 아미노태 질소(Formol 질소)의 함량을 측정한 결과 <Table 30> 과 같이 효소를 첨가하지 않은 C의 경우 1.59 Nmg/mL로 나타났다. Bromelain (B) 7.48 Nmg/m, 혼합효소 Bromelain:Flavourzyme (1:1) (B+F) 7.39 Nmg/mL Alcalase (A) 6.95 Nmg/mL, Flavourzyme (F) 6.79 Nmg/mL , Protamex (P) 6.77 Nmg/mL로 나타났다.

Bromelain (B) 효소의 경우, 무처리군 (C) 보다 효소를 첨가하여 가수분해 한 시료들의 아미노태 질소가 높게 나타났으며 효소 중 Bromelain (B) 처리군의 아미노태 질소의 함량이 높은 것으로 보아 Bromelain 효소의 효율이 높은 것을 알 수 있었다.

Table 30 닭가슴살 효소 종류 별 아미노태 질소 Fomol(mg/ml)

mg /m L	C	A	F	P	B	B+F
	1.59±0.08	6.95±0.05	6.79±0.12	6.77±0.04	7.48±0.11	7.39±0.06

닭가슴의 가수분해 효소 종류 별 수율은 <Table 31 와 같이 가수분해 후 여과한 여액의 중량으로 측정하였다. 무처리군 (C)은 86.40 g, Alcalase (A) 103.68 g , Flavourzyme (F) 103.36 g, Protamex (P) 99.76 g, Bromelain (B) 107.76 g, 혼합효소 Bromelain Flavourzyme (1:1) (B+F) 107.60 g 으로 측정 되었다.

Table 31 닭가슴살 가수 분해 효소 종류 별 가수분해액 무게(g)

무게 (g)	C	A	F	P	B	B+F
	86.40±1.98	103.68±1.41	103.36±0.35	99.76±1.68	107.76±0.41	107.60±3.36

닭가슴살 가수분해 효소별 가수분해 수율은 <Table 32 과 같이 가수분해 후 여과한 여액의 3 수율을 계산하였다. 효소를 첨가하지 않은 C는 72.00 %, Alcalase (A) 86.40 %, Flavourzyme (F) 86.13 %, Protamex (P) 83.13 %, Bromelain (B) 89.80 %, 혼합효소 Bromelain Flavourzyme (1:1) (B+F) 89.67 %로 나타났다.

Table 32. 닭가슴살 가수 분해 효소 종류 별 가수분해 수율(%)

수율 (%)	C	A	F	P	B	B+F
	72.00±1.98	86.40±1.41	86.13±0.35	83.13±1.68	89.80±0.41	89.67±3.36

닭가슴살 가수분해 효소 종류별 공정사진은 <Fig. 42> 과 같다. 효소를 종류별로 첨가하여, 고압액화 전, 후와 원심분리 후, Filter paper 여과 후의 형태를 나타내었다. 무처리군(C)의 경우 고압액화 후에도 가수분해가 잘되지 않아 원심분리 후 닭가슴살 고형분이 많이 붙어 있는 것을 확인할 수 있었다. Filter paper 여과 후의 무처리(C) 시료의 색이 가장 투명하였으며 효소 처리한 시료는 갈색을 나타내었다.

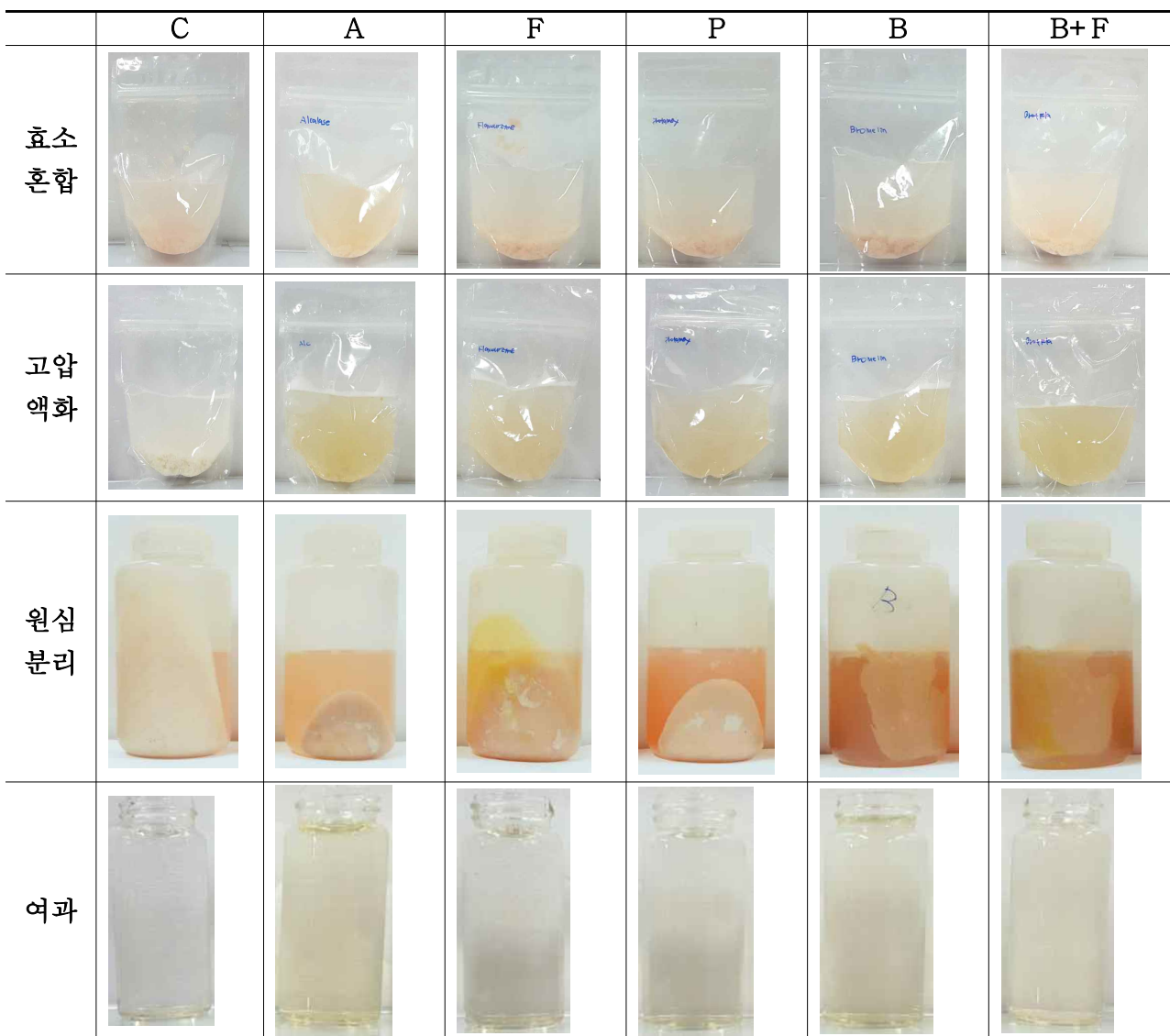


Fig. 42 . 닭가슴살 가수 분해 효소 종류별 공정 사진.

실험 결과 오계의 가수분해물의 수율은 효소를 첨가한 고압액화 공정이 효과가 있음을 확인하

였다. 수용성 단백질 함량은 무처리군(C) 보다 Bromelain(B)이 높아, 닭가슴살 대부분이 가수 분해 되었음을 알 수 있었고, 아미노태 질소 함량과, 수율을 확인 한 결과, Bromelain (B) 효소 처리군의 함량이 높아, 오계의 저분자 펩타이드 수율이 높다는 결론이 도출 되었다. 이에 따라 연산 오계의 단백질 가수 분해를 위한 최적 효소로 Bromelain을 선정하였다

(나) 고압액화 공정 조건

연산오계 가수 분해물의 최적 효소로 선정된 Bromelain 효소를 사용하여, 고압액화의 최적 시간을 도출하여, 고압액화 공정 조건을 확립한다.

① 실험재료

실험의 주재료는 현물로 지원받은 천연기념물 265호로 지정된 연산오계를 사용하였으며 국가 지정 사육장인 (주)지산 농원에서 1년산 냉동오계를 받아 실험하였고, 오계의 단백질 가수분해 효소로 Bromelain을 사용하였다.

② 실험 방법

오계 건강음료의 주원료인 오계의 저분자 펩타이드를 제작하기 위해 지산농원의 1년산 냉동 오계를 40 °C 항온수조에서 20분간 해동하여 사용하였다. 오계 껍질은 지방 성분이 많아, 건강 음료 품질 저하의 원인이 되므로, 오계 껍질을 제외한 오계육 부분으로만 실험을 진행 하였다. 오계의 단백질 가수분해물은 오계육 40 g과 물 80 g 을 (1 : 2 비율) 섞어 가정용 균질기로 균질 한 후, 오계육 무게의 1 %의 Bromelain을 첨가하여 효소가 고루 섞이도록 한 후 고압용 파우치에 담아 실험 하였다.

고압액화기를 사용하여 100 Mpa, 50 °C에서 각각 0 시간, 6 시간, 12 시간, 18 시간, 24 시간 처리하여 오계 저분자 펩타이드 원액을 제작하였다. 고압액화 처리 후 효소를 불활화 시키기 위하여 90 °C Water bath에서 15 분 처리 후, 4 °C Chiller에서 30 분간 냉각시켰다. 오계 가수 분해물의 여과를 위해, 원심분리기를 사용하여 10,000 rpm에서 30분간 원심분리를 하여, Filter paper로 여과한 저분자 펩타이드 원액으로 실험을 진행하였다.

고압액화 시간별 오계 가수 분해물의 특성 분석은 고형분 함량, 아미노태 질소, 가용성 저분자 펩타이드 수율 등 세 가지 항목을 분석하였다.

오계 가수분해물의 최적 효소인 Bromelain 으로, 고압액화 공정의 최적 시간을 도출하기 위해 가수분해 후 고형분 함량, 아미노태 질소 (Formol법), 수율 실험을 진행하여 고압액화 공정 최적 시간을 도출하였다.

③ 실험 결과

오계 가수분해물을 고압액화 시간별 고형분 함량은 <Table 33> 과 같다. 0시간 8.68 g, 6시간 6.62 g, 12시간 5.22 g, 18시간 5.26 g, 24시간 5.08 g 으로 나타났다. 고압 액화의 시간이 늘어

남에 따라 오계 고형분 함량이 전반적으로 감소하여, 고압액화 24시간에서 가수분해 효율이 높다는 것을 알 수 있었다.

Table 33. 오계 고압액화 시간별 고형분 함량 (g)

함량 (g)	0	6	12	18	24
	8.68±1.65	6.62±1.74	5.22±1.12	5.26±1.85	5.08±2.31

오계 가수분해물의 고압액화 0시간의 고형분 함량을 기준으로 하여, 고압액화 시간별 고형분의 무게 차이로 계산한 가수분해 효율을 <Table 34>와 같다. 오계 가수분해물의 고압액화 시간별 효율은 24시간이 41.50 %로 가장 높았다.

Table 34. 오계 고압액화 시간별 가수분해 효율(%)

분해율 (%)	0	6	12	18	24
	0.00±0.00	23.78±1.74	39.82±1.12	39.39±1.85	41.50±2.31

고압액화 시간에 따른 오계 가수분해물의 아미노태 질소 함량의 결과는 아래 <Table 35>과 같다. 0 시간 3.03 mg/mL, 6 시간 3.61 mg/mL, 12 시간 4.96 mg/mL, 18 시간 5.62 mg/mL, 24 시간 5.93 mg/mL 으로, 고압액화 시간이 늘어남에 따라 아미노태 질소 함량이 높아지는 것을 볼 수 있다. 고압액화 6 시간은 0.58 mg/mL으로 약간 증가 한 것으로 나타났지만, 24 시간 처리시 약 2배로 증가하는 것을 볼 수 있다. 이는, 고압액화의 시간이 늘어남에 따라 오계 단백질의 가수분해율이 증가함으로써 아미노태 질소의 함량이 증가한 것으로 나타났다.

Table 35. 오계 고압액화 시간별 아미노태 질소 Fomol(mg/ml)

mg /mL	0	6	12	18	24
	3.03±0.20	3.61±0.09	4.96±0.30	5.62±0.02	5.93±0.16

오계 가수분해물의 시간별 고압액화 수율은 <Table 36>과 같다. 전처리 공정을 끝낸 오계 가수분해물의 Filter papper로 걸러진 여액 0 시간에는 80.11 %, 6 시간 83.00 %, 12 시간 81.90 %, 18 시간 83.30 %, 24 시간 83.78 %로 나타났다. 오계 고압액화 시간에 따른 수율 차이는 미미하였으나, 24시간이 가장 높게 나타났다.

Table 36. 오계 고압액화 시간별 가수분해물 중량(g)

무게 (g)	0	6	12	18	24
	96.13±2.35	99.60±0.47	89.28±0.16	99.96±2.37	100.54±0.75

오계 가수분해물의 시간별 고압액화 수율은 <Table 37>과 같다. 오계 시간별 가수분해물의 Filter papper로 걸러진 여액의 중량으로 계산하였으며, 0시간 80.11 %, 6시간 83.00 %, 12시간 74.40 %, 18시간 83.30 %, 24시간 83.78 %로, 고압액화 24시간의 수율이 가장 높게 나타났다.

Table 37. 오계 고압액화 시간별 가수분해물 수율(%)

%	0	6	12	18	24
	80.11±2.35	83.00±0.47	74.40±0.16	83.30±2.37	83.78±0.75

오계 고압액화 시간별에 따른 사진은 <Fig. 43>과 같다. 초기 0 시간 효소를 첨가한 오계 분쇄물은 고압액화의 시간이 지남에 따라, 오계육 가수분해가 일어났음을 시각적으로 알 수 있었다. 고압액화 시간이 증가할수록 육안으로 보이는 오계육의 불용성 부분들이 24시간 처리 후에는 거의 가수분해가 되어 거의 액상 상태로 존재하고 압력에 의해 거품이 많이 발생한 것을 볼 수 있었다.

○ 원심 분리 후 고압액화 시간별에 따른 오계 가수 분해물은 고압액화 시간이 지날수록 여액의 색이 많이 진해지는 것을 볼 수 있었다(Fig. 43). 이것은 고압액화 시간이 지남에 따라, 오계육의 가수분해가 많이 일어나 오계육의 색인 검은 색이 많이 침출 되어 여액의 색이 진해진 것으로 나타났다.

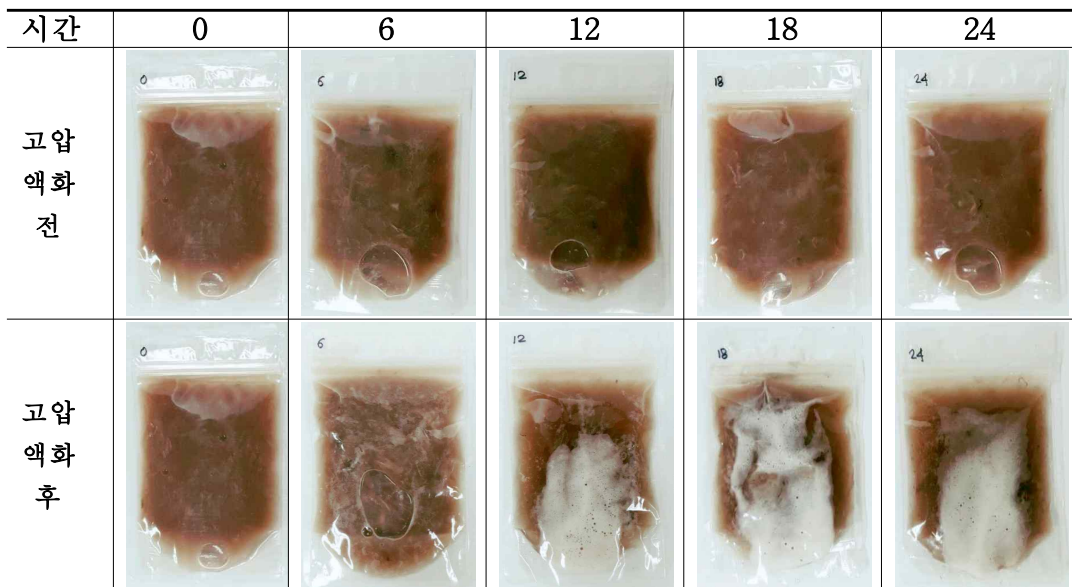


Fig. 43. 오계 시간별 고압액화 전 후 사진.

(다) 건강음료의 최적 살균 조건

연산오계 저분자 펩타이드 원액을 활용한 건강음료 제품의 안전성과 유통기한을 확보하기 위한 최적 살균기술 공정을 확립하였다. 일반적인 살균공정의 가열 살균과, 상온 유통 시 가장 많이 사용되는 레토르트 살균법을 활용하여, 최적 조건과 유통기한 설정 실험을 진행하였다.

가열 살균은 온도별 조건을 달리 하여 저장 기간 중의 시료의 품질 변화를 관찰하였다. 연 산 오계 저분자 펩타이드 원액의 가열 살균온도를 각각 80 °C, 90 °C, 100 °C에서 15 분간 살균하여 시료로 하였다.

레토르트 살균은 온도는 121°C로 고정하고, 시간별 조건을 달리하여 실험을 진행하였다. 연 산 오계 가수 분해물을 레토르트 살균 5 분, 10 분, 15 분 처리하여, 저장 기간 중 시료의 품질 변화를 실험하였다.

연산오계 저분자 펩타이드 원액은 상온 유통 가속화 실험의 온도인 25 °C, 35 °C, 45 °C에 저장하면서 7일에 한 번씩 실험 하였다.

① 실험재료

실험의 주재료는 현물로 지원받은 천연기념물 265호로 지정된 연산오계를 사용하였으며 국가 지정 사육장인 (주)지산 농원에서 1년산 냉동오계를 받아 실험하였다.

② 실험 방법

오계 저분자 펩타이드 원액을 제작하기 위해 지산농원의 1년산 냉동 오계를 40 °C 항온수조에 서 20분간 해동하여 사용하였다. 오계 껍질은 지방 성분이 많아, 건강음료 품질 저하의 원인이 되므로, 오계 껍질을 제외한 오계육 부분으로만 실험을 진행 하였다.

오 가수 분해물은 오계육과 물을 1:2 비율로 섞어 가정용 균질기로 균질 한 후, 오계육 무게의 1 %의 Bromelain을 첨가하여 효소가 고루 섞이도록 한 후 고압용 파우치에 담아, 고압액화를 사용하여 100 Mpa, 50 °C 조건에서 24 시간 처리 하여 오계 저분자 펩타이드 원액을 제작하였다. 고압액화 후 효소 불활성을 위해 90 °C Water bath에서 15 분간 처리한 후, 4 °C Chiller에서 30 분간 냉각시켰다. 오계 가수분해물은 원심분리기를 사용하여 10,000 rpm에서 30 분간 원심분리 하여, Filter paper로 여과하여 저분자 펩타이드 원액을 제조하여 실험에 사용하였다.

연산 오계 유래 저분자 펩타이드 원액의 최적 살균 조건의 품질 지표는 Table 와 같다.

가열 살균은 각각 80 °C, 90 °C, 100 °C에서 15 분간 처리하였고, 레토르트 살균은 121 °C에서, 5 분, 10 분, 15 분간 살균 처리하여 냉각 시킨 샘플을 저장온도 25 °C, 35 °C, 45 °C에 저장하면서, 7일 마다 총 4회 미생물 실험을 진행하였다.

저장기간 중 pH 변화

시료 10 ml를 취하여 90 ml의 2차 증류수에 희석한 후 filter paper(Whatman™ cellulose filter paper Grade 1, GE Healthcare companies, UK)로 여과하여, pH meter(Orion Research Inc., USA)를 이용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다.

휘발성 아미노태 질소(VBN)

식육류와 어패류의 부패한 정도를 알아보기 위하여 사용되는 휘발성염기태질소화합물 즉, VBN(Volatile basic nitrogen)은 conway unit을 이용한 미량확산법을 사용하였으며, 시료 10 g에 증류수 50 ml를 가하여 11,000 rpm에서 30 초간 균질화 한 후 5,000 rpm, 30 분 4 °C 원

심분리액을 여과하고, 5 % H₂SO₄를 이용하여 약산성(pH 4)으로 맞춘 후 100 ml 정용하여 시험용액으로 사용하였다. conway unit 내실에 0.01N-H₂SO₄ 0.1 ml을 주입한 후, 외실 한쪽에 여과된 균질액 1 ml를 넣고 다른 한쪽에 K₂CO₃ 1 ml을 주입 하여 잘 혼합시킨 후 37 °C에서 120 분간 배양하였다. 반응 종료 후 conway unit의 내실에 Brunswik 시약 한 방울을 첨가한 후 미량 수평 뷰렛을 이용하여 0.012 N NaOH 용액으로 적정하였다. 적정량에 대한 계산법은 [eq.1]과 같다. a는 본시험 적정치(ml)를 의미하고, b는 공시험 적정치(ml)를 의미한다.

$$\text{VBN(mg\%)} = 0.28 \times (a \times b) \times F \times 100 / 0.1 \text{ [eq.1]}$$

지방산패도(TBA)

시료 분쇄물 5 g에 butylated hydroxyanisole(BHA) 50 µl와 증류수 15 ml를 첨가하여 균질화 시킨 후 균질액 1 ml를 시험관에 넣고 2 ml thiobarbituric acid(TBA) / trichloroacetic acid(TCA) 혼합용액을 넣어 혼합한 후 90 °C의 항온수조에서 15 분간 열처리한 후 냉각시켜 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리하였다. 원심분리한 시료의 상층액을 회수하여 531 nm에서 흡광도를 측정하여 지방산패도를 산출하여 mgMA(malonaldehyde)/kg으로 나타냈다

총균수, 대장균군

3M 건조필름(3MTM Petrifilm™ Aerobic count plates, Coliform count plates)을 이용하여 진행하였으며, 35 °C로 고정시킨 배양기에서 48 시간 배양 한 후 1평판당 25~250 개의 집락을 형성한 평판을 택하여 g당 집락수를 계산하였다.

Table 38. 연산오계 건강음료 최적 살균 조건의 품질 지표

	항 목	분석방법
이화학적 품질	pH, 지질 산패도 휘발성 아미노태 질소(VBN)	pH측정기, 미량확산법, TBA
미생물학적 품질	총균수, 대장균군	평판도말 배양법

③ 실험결과

㉔ 가열 살균의 최적 조건

가열 살균 온도 차이에 따른 저장성 실험의 이화학 품질 지표인 pH 결과는 <Table 39, Fig. 44>와 같다.

살균온도 80 °C의 초기 pH는 5.63으로 저장 온도 25 °C에서 7일 pH 5.08, 14일 pH 5.09, 21일 pH 5.00, 저장온도 35 °C 7일 pH 4.95, 14일 pH 5.13, 21일 pH 5.07로, 두 온도 모두 초기 pH 보다 0.6 정도 감소하였고, 저장 7일에 급격히 감소하였고, 저장온도 45 °C는 pH 21 일 후 pH 5.47로, 초기보다 0.16 정도 감소하였다.

살균 온도 90°C의 초기 pH는 5.66이고, 21일후 pH 값은 저장온도 25°C pH 5.42, 35°C pH

5.40, 45℃ pH 5.57로 초기보다 0.1 정도 감소하였다.

살균온도 100℃의 초기 pH는 5.65로, 21일 후 pH는 저장온도 25℃ pH 5.51, 35℃ pH 5.55, 45℃ pH 5.54로 차이는 거의 미미하다고 볼 수 있다.

Table 39. 살균 온도에 따른 저장기간 중 pH 변화

80℃	0 일	7 일	14 일	21 일
25℃	5.63±0.01	5.08±0.02	5.09±0.01	5.00±0.01
35℃	5.63±0.01	4.98±0.01	5.13±0.01	5.07±0.02
45℃	5.63±0.01	5.52±0.02	5.56±0.01	5.47±0.03

90℃	0 일	7 일	14 일	21 일
25℃	5.66±0.02	5.52±0.01	5.59±0.02	5.42±0.02
35℃	5.66±0.02	5.51±0.01	5.54±0.01	5.40±0.01
45℃	5.66±0.02	5.51±0.00	5.59±0.01	5.57±0.02

100℃	0 일	7 일	14 일	21 일
25℃	5.65±0.01	5.52±0.01	5.59±0.00	5.51±0.01
35℃	5.65±0.01	5.52±0.02	5.59±0.00	5.55±0.02
45℃	5.65±0.01	5.52±0.01	5.59±0.01	5.54±0.01

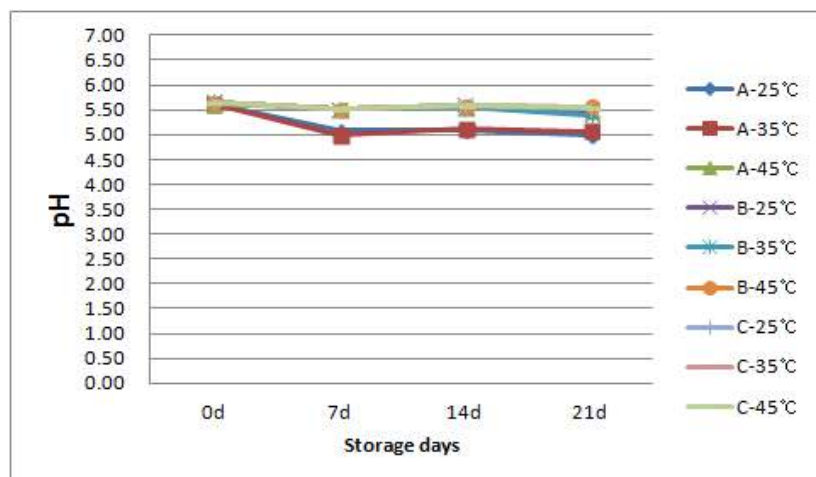


Fig. 44. 온도별 가열 살균에 따른 저장성 pH, A-살균온도 80℃, B-90℃ C-100℃.

가열 살균 온도 차이에 따른 저장성 실험의 이화학 품질 지표 휘발성 아미노태 질소(VBN)

의 결과는 <Table 40>과 <Fig. 45>과 같다.

살균 온도 80 °C의 초기 휘발성 아미노태 질소의 함량은 12.23 mg%이고, 저장 온도 25 °C의 7일 후 함량은 15.59 mg%, 14일 21.37 mg%, 21일 21.56 mg%로 7 일과 14 일에 급속히 증가 하는 경향을 보였다. 저장 온도 35 °C의 7 일 17.73 mg%, 14 일 19.79 mg%, 21 일 26.88 mg%로 7 일과 21 일에 급격히 증가 하는 것으로 나타났다. 45 °C는 저장 7 일 16.61 mg%, 14 일 18.85 mg%, 21 일 21.28 mg%로 나타났다.

살균 온도 90 °C의 초기 함량은 11.39 mg%로 측정되었고, 저장 21 일 후의 변화는, 저장 25 °C 14.75mg%, 35 °C 16.24 mg%, 45 °C 18.57 mg% 로, 증가 함량이 3.36~7.18로 나타났다.

살균온도 100 °C의 초기 함량은 12.04 mg%이고, 21일 후의 값은 저장 도 25 °C 14.09 mg%, 35 °C 15.59 mg%, 45 °C 17.45 mg%로 측정되었다. 살균 온도가 낮을수록 저장 7 일째의 함량이 급격하게 증가 되었고, 저장 21 일째의 함량도 더 높게 측정되었다. 휘발성 아미노태 질소 실험으로 저장성을 볼 때 살균온도를 80 °C 보다는 90 °C, 100 °C가 살균 효과가 뛰어나다는 것을 알 수 있었다.

Table 40. 살균 온도에 따른 저장 중 휘발성 아미노태 질소(VBN) 함량

(unit : mg%)

80 °C	0 일	7 일	14 일	21 일
25 °C	12.23±0.43	15.59±0.43	21.37±0.16	21.56±0.48
35 °C	12.23±0.43	17.73±0.43	19.79±1.41	26.88±0.00
45 °C	12.23±0.43	16.61±0.98	18.85±0.32	21.28±0.00

90 °C	0 일	7 일	14 일	21 일
25 °C	11.39±0.43	12.32±0.48	14.75±0.86	14.75±1.62
35 °C	11.39±0.43	13.81±0.86	16.71±0.43	16.24±0.48
45 °C	11.39±0.43	17.92±2.11	18.67±0.16	18.57±0.16

100 °C	0 일	7 일	14 일	21 일
25 °C	12.04±0.48	13.63±0.65	14.00±0.48	14.09±0.58
35 °C	12.04±0.48	15.49±0.16	15.59±0.58	15.59±0.16
45 °C	12.04±0.48	16.99±1.17	17.17±0.32	17.45±0.16

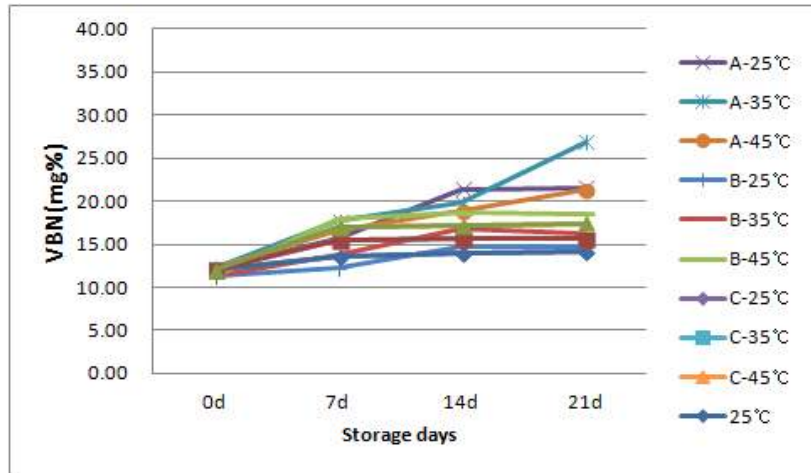


Fig. 45. 온도별 가열 살균에 따른 저장성 휘발성 아미노태 질소(VBN),
A-살균온도 80℃, B-90℃ C-100℃.

가열 살균 온도 차이에 따른 저장성 실험의 이화학 품질 지표 지질 산패도 (TBA)의 결과

는 <Table 41> <Fig. 46>과 같다. 살균온도 80℃의 초기 TBA값은 0.367 mgMA/kg 이고, 저장온도 25℃ 7일 0.429 mgMA/kg, 14일 0.405 mgMA/kg, 21일 0.432 mgMA/kg, 저장온도 35℃ 7일 0.378 mgMA/kg, 14일 0.342 mgMA/kg, 21일 0.354 mgMA/kg, 저장온도 45℃ 7일 0.375 mgMA/kg, 14일 0.303 mgMA/kg, 21일 0.321 mgMA/kg로 측정되었다. 90℃의 초기 함량은 0.317 mgMA/kg, 저장 25℃의 21일 후 함량은 0.351 mgMA/kg, 35℃ 0.351 mgMA/kg, 45℃ 0.348 mgMA/kg으로 유의적 차이는 거의 없었다. 살균온도 100℃도 역시 초기 0.314 mgMA/kg에서 21일 후, 저장온도 25℃ 0.390 mgMA/kg, 35℃ 0.363 mgMA/kg, 45℃ 0.360 mgMA/kg으로, 저장 온도에 따른 차이는 거의 없었다.

Table 41. 살균 온도에 따른 저장 중 지질 산패도 (TBA)

(unit : mgMA/kg)

80℃ 살균	0 일	7 일	14 일	21 일
25℃	0.367±0.014	0.429±0.014	0.405±0.009	0.432±0.009
35℃	0.367±0.014	0.378±0.016	0.342±0.018	0.354±0.005
45℃	0.367±0.014	0.375±0.050	0.303±0.010	0.321±0.010

90℃ 살균	0 일	7 일	14 일	21 일
25℃	0.317±0.005	0.435±0.014	0.351±0.009	0.351±0.000
35℃	0.317±0.005	0.384±0.005	0.414±0.016	0.351±0.009
45℃	0.317±0.005	0.318±0.005	0.357±0.010	0.348±0.010

100℃ 살균	0 일	7 일	14 일	21 일
25℃	0.314±0.009	0.408±0.014	0.348±0.014	0.390±0.014
35℃	0.314±0.009	0.357±0.005	0.321±0.019	0.363±0.019
45℃	0.314±0.009	0.318±0.005	0.330±0.021	0.360±0.016

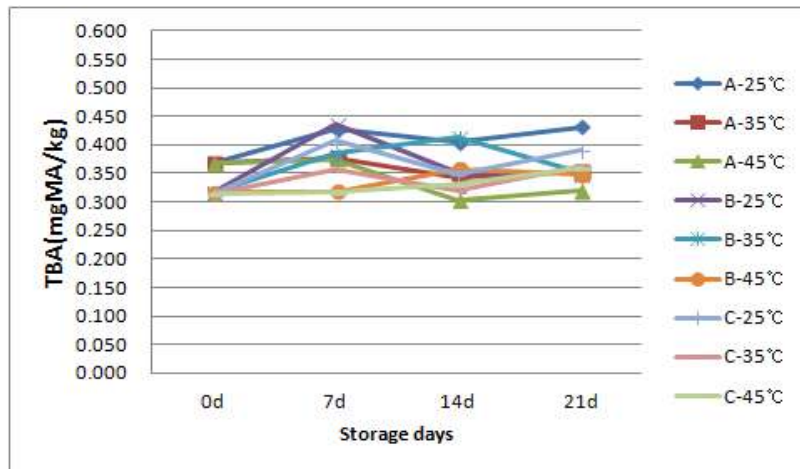


Fig. 46. 온도별 가열 살균에 따른 저장성 지질 산패도 (TBA),
A-살균온도 80℃, B-90℃ C-100℃.

가열 살균 온도 차이에 따른 저장성 실험의, 미생물학적 품질 총균수, 대장균군의 결과는 <Table 42> <Fig. 47>과 같다.

살균 온도 80℃의 저장 온도 25℃ 시료는, 7일 후 log 4에서 14일, 21일에는 log 6 수준으로 증가하였다. 저장온도 35℃는, 저장 14일, 21일 log 4 수준이고, 45℃는 균이 발견되지 않았다. 살균온도 90℃의 저장온도 35℃ 21일 시료는 log 3수준, 살균온도 100℃의 저장온도 35℃ 21일 시료도 역시 log 3 수준의 균이 발견되었다. 대장균군은 모두 검출되지 않았다.<Table 43>

Table 42. 살균 온도에 따른 저장 중 총균수 변화

(unit : CFU/g)

80℃ 살균	0 일	7 일	14 일	21 일
25℃	N.D	3.9×10 ⁴	5.5×10 ⁶	6.7×10 ⁶
35℃	N.D	N.D	2.7×10 ⁴	7.1×10 ⁴
45℃	N.D	N.D	N.D	N.D

90℃ 살균	0 일	7 일	14 일	21 일
25℃	N.D	N.D	N.D	N.D
35℃	N.D	N.D	N.D	3.8×10 ³
45℃	N.D	N.D	N.D	N.D

100℃ 살균	0 일	7 일	14 일	21 일
25℃	N.D	N.D	N.D	N.D
35℃	N.D	N.D	N.D	1.4×10 ³
45℃	N.D	N.D	N.D	N.D

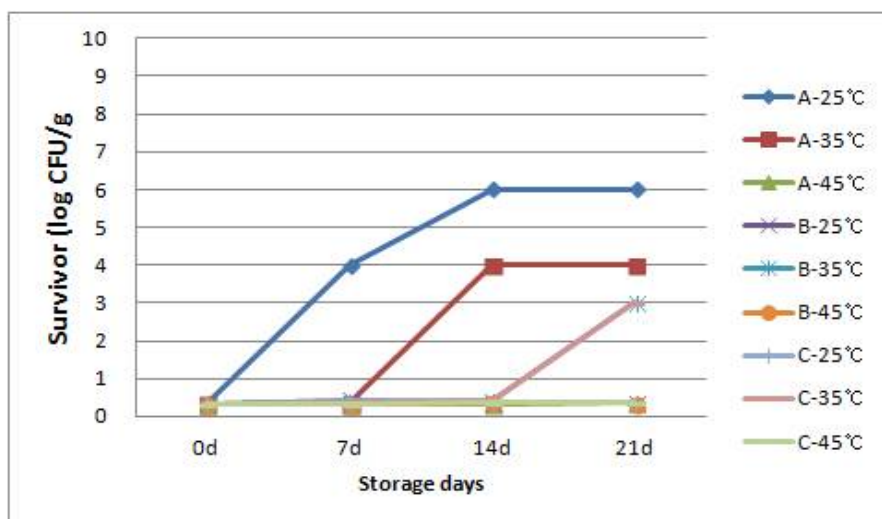


Fig. 47. 온도별 가열 살균에 따른 저장성 총균수,
A-살균온도 80℃, B-90℃ C-100℃.

Table 43. 살균 온도에 따른 저장 중 대장균군 변화

(unit : CFU/g)

80℃ 살균	0 일	7 일	14 일	21 일
25℃	N.D	N.D	N.D	N.D
35℃	N.D	N.D	N.D	N.D
45℃	N.D	N.D	N.D	N.D

90℃ 살균	0 일	7 일	14 일	21 일
25℃	N.D	N.D	N.D	N.D
35℃	N.D	N.D	N.D	N.D
45℃	N.D	N.D	N.D	N.D

100℃ 살균	0 일	7 일	14 일	21 일
25℃	N.D	N.D	N.D	N.D
35℃	N.D	N.D	N.D	N.D
45℃	N.D	N.D	N.D	N.D

㊤ 레토르트 살균의 최적 조건

레토르트 살균의 시간 차이에 따른 저장성 실험의, 이화학 품질 지표 pH의 결과는 <Table 44> <Fig. 48>과 같다.

살균 5분의 초기 pH는 5.69 이고, 저장 25 ℃ 7일 5.80, 14일 5.72, 21일 5.40, 28일 5.39이고, 저장 35 ℃ 7일 5.66, 14일 5.60, 21일 5.36, 28일 5.35 이며, 저장 45 ℃ 7일 5.70, 14일 5.45, 21 일 5.30, 28일 5.30으로 초기보다 0.3 정도 감소하는 경향을 보였다.

살균 10분의 초기 pH는 5.68로 측정 되었고, 저장온도 25 ℃의 21일 후 pH는 5.51, 35 ℃는 5.24, 45 ℃ 5.30 으로 살균시간 5분과 비슷한 결과였다.

살균 15분의 초기 pH는 5.78이며, 21일 후 저장 온도 25 ℃pH는 5.35, 35 ℃ 5.36, 45 ℃ 5.38 로 나타나, 유의적인 차이는 거의 없었다.

Table 44. 레토르트 살균 시간에 따른 저장 중 pH 변화

121℃-5분	0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
25℃	5.69±0.01	5.80±0.02	5.72±0.01	5.40±0.01	5.39±0.05
35℃	5.69±0.01	5.66±0.01	5.60±0.03	5.36±0.02	5.35±0.00
45℃	5.69±0.01	5.70±0.04	5.45±0.02	5.30±0.01	5.30±0.01

121℃-10분	0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
25℃	5.68±0.02	5.70±0.01	5.62±0.04	5.50±0.02	5.51±0.00
35℃	5.68±0.02	5.68±0.02	5.45±0.02	5.24±0.02	5.24±0.00
45℃	5.68±0.02	5.67±0.02	5.41±0.01	5.32±0.01	5.30±0.01

121℃-15분	0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
25℃	5.78±0.01	5.76±0.01	5.54±0.01	5.37±0.01	5.35±0.01
35℃	5.78±0.01	5.76±0.01	5.56±0.02	5.36±0.02	5.36±0.01
45℃	5.78±0.01	5.73±0.01	5.59±0.01	5.39±0.01	5.38±0.01

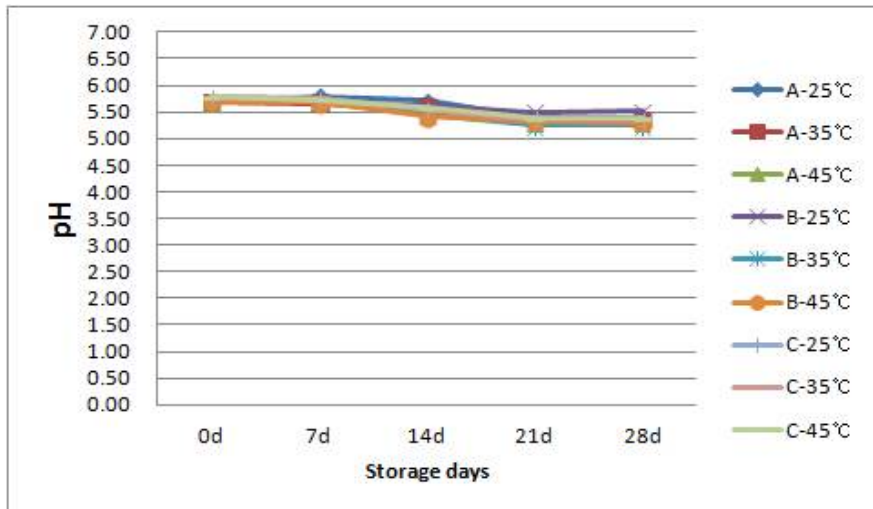


Fig. 48. 레토르트 살균시간에 따른 저장 중 pH 변화,
A-살균시간 5분, B-10분 C-15분.

레토르트 살균의 시간 차이에 따른 저장성 실험의, 이화학 품질 지표 휘발성 아미노태 질소 (VBN)의 결과는 <Table 45>, <Fig. 49>와 같다.

○살균 시간 5분의 초기 휘발성 아미노태 질소 값은 17.08 mg%로, 저장 25℃ 7일 17.36 mg%, 14일 23.15 mg%, 21일 26.97 mg%, 28일 21.28 mg%이고, 저장 35℃ 7일 18.39 mg%, 14일 20.74 mg%, 21일 20.91 mg%, 28일 24.08 mg%이며, 저장 45℃ 7일 19.51 mg%, 14일 22.96 mg%, 21일 21.28 mg%, 28일 21.65 mg%로 측정되었고, 초기보다 4~7 mg%로 증가 하였다. 레토르트 살균 10분의 초기 함량은 17.06 mg% 이고, 저장 28일 후의 저장 온도별 함량은 3~7 mg%의 증가로 나타났다. 살균 15분도 역시 초기함량이, 저장 28일 후보다 4~6 mg%의 증가로, 살균온도 세 종류 모두 비슷한 수준의 증가를 보였다.

Table 45. 레토르트 살균 시간에 따른 저장 중 휘발성 아미노태 질소(VBN) 변화

(unit : mg%)

121℃-5분	0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
25℃	17.08±0.00	17.36±0.97	23.15±0.32	26.97±0.16	21.28±0.00
35℃	17.08±0.00	18.39±0.43	20.74±0.98	20.91±0.65	24.08±0.04
45℃	17.08±0.00	19.51±0.43	22.96±0.56	21.28±0.28	21.65±0.65

121℃-10분	0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
25℃	17.06±1.56	17.36±1.01	24.55±1.07	22.12±0.00	24.36±0.48
35℃	17.06±1.56	20.72±1.48	23.61±1.21	24.17±0.43	24.64±0.48
45℃	17.06±1.56	22.31±1.78	21.93±0.54	23.89±1.82	20.53±1.29

121℃-15분	0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
25℃	17.12±0.90	17.55±0.32	23.55±1.62	21.00±0.74	21.84±0.48
35℃	17.12±0.90	19.23±0.70	19.79±0.32	21.28±0.56	21.28±0.00
45℃	17.12±0.90	18.16±0.58	21.93±1.80	20.81±1.32	23.05±0.58

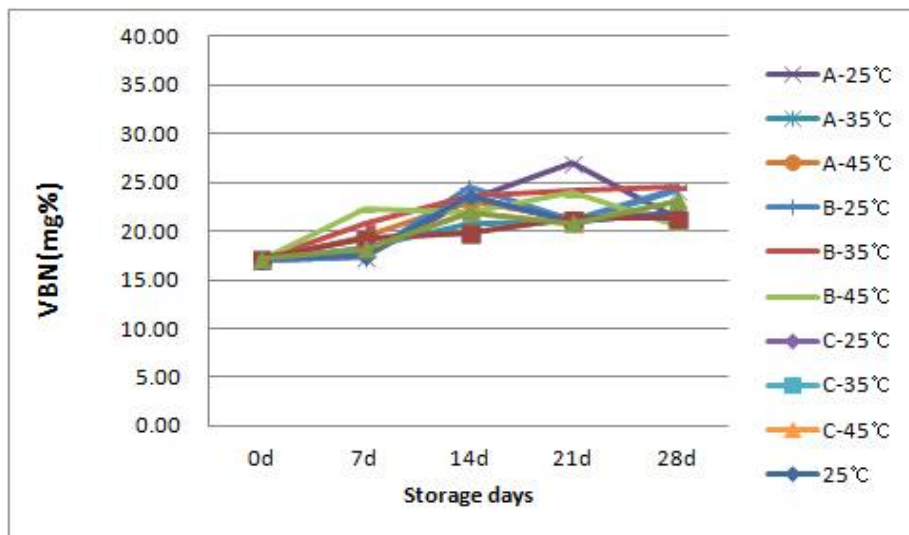


Fig. 49. 레토르트 살균 시간에 따른 저장 중 휘발성 아미노태 질소(VBN) 변화.

A-살균시간 5분, B-10분 C-15분.

레토르트 살균의 시간 차이에 따른 저장성 실험의, 이화학 품질 지표 지질 산패도 (TBA)의 결

과는 <Table 46>, <Fig. 50>과 같다.

살균시간 5 분의 초기 TBA가는 0.345 mgMA/kg이고, 7일 후 저장온도 25 °C는 0.475 mgMA/kg, 35°C 0.478 mgMA/kg, 45 °C 0.490 mgMA/kg으로, 저장 28 일 기간 중 변화가 가장 많이 일어나는 기간이다. 이와 같이 살균 10 분도 초기 0.408 mgMA/kg의 값이, 7 일 후 저장 온도 25 °C의 TBA가 0.505 mgMA/kg, 35 °C 0.559 mgMA/kg,, 45 °C 0.595 mgMA/kg, 로, 살균 5분과 같은 경향을 보인다. 이는 저장기간 7일 중에 시료의 품질 변화가 일어난 것으로 보인다. 지질 산패도의 결과로 저장성을 보면, 저장 기간 중 큰 변화가 없는, 레토르트 살균 15 분이 적합하다는 것을 알 수 있다.

Table 46. 레토르트 살균 시간에 따른 지질 산패도 (TBA) 변화

121 °C-5분	0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
25 °C	0.345±0.113	0.475±0.005	0.406±0.031	0.472±0.005	0.457±0.019
35 °C	0.345±0.113	0.478±0.000	0.495±0.059	0.487±0.009	0.430±0.014
45 °C	0.345±0.113	0.490±0.014	0.475±0.014	0.508±0.005	0.523±0.018

121 °C-10분	0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
25 °C	0.408±0.094	0.505±0.009	0.523±0.012	0.535±0.005	0.563±0.014
35 °C	0.408±0.094	0.559±0.009	0.571±0.008	0.586±0.000	0.548±0.010
45 °C	0.408±0.094	0.595±0.009	0.587±0.003	0.571±0.005	0.598±0.005

121 °C-15분	0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
25 °C	0.488±0.023	0.484±0.005	0.547±0.005	0.511±0.005	0.557±0.005
35 °C	0.488±0.023	0.481±0.009	0.538±0.010	0.539±0.005	0.544±0.010
45 °C	0.488±0.023	0.487±0.000	0.427±0.091	0.484±0.014	0.475±0.005

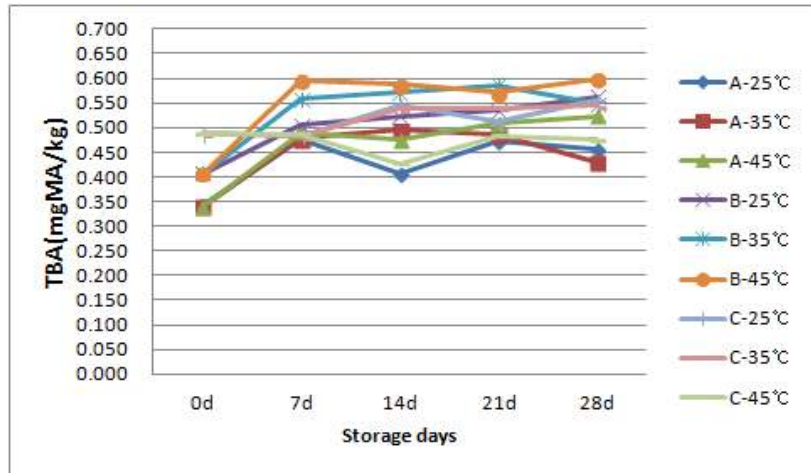


Fig. 50. 레토르트 살균 시간에 따른 저장 중 지질 산패도 (TBA) 변화.
A-살균시간 5분, B-10분 C-15분.

레토르트 살균의 시간 차이에 따른 저장성 실험, 미생물학적 품질 총균수, 대장균군의 결과는 <Table 47>, <Fig. 51>, <Table 48> 과 같다.

살균 시간 5 분의 저장 온도에 따른 총균수 변화는, 저장 25 °C의 21 일 log 2에서 28 일 log 3으로, 저장 35 °C는 28 일 log 3 수준으로 증가 하였고, 저장 45 °C에서는 균이 측정 되지 않았다. 살균 시간 10 분의 경우, 저장 25 °C의 28 일은 log 2 수준, 35 °C의 28 일도 log 2 수준으로 나타났다. 레토르트 살균 15 분의 경우 균이 발견 되지 않았다. 대장균군의 경우, 모든 시료에서 균이 발견되지 않았다.

Table 47. 레토르트 살균 시간에 따른 저장 중 총균수 변화

(unit : CFU/g)

121 °C-5분	0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
25 °C	N.D	N.D	N.D	2.0×10 ²	7.6×10 ³
35 °C	N.D	N.D	N.D	N.D	6.0×10 ³
45 °C	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

121 °C-10분	0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
25 °C	N.D	N.D	N.D	N.D	6.0×10 ²
35 °C	N.D	N.D	N.D	N.D	4.4×10 ²
45 °C	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

121℃-15분	0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
25℃	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
35℃	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
45℃	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

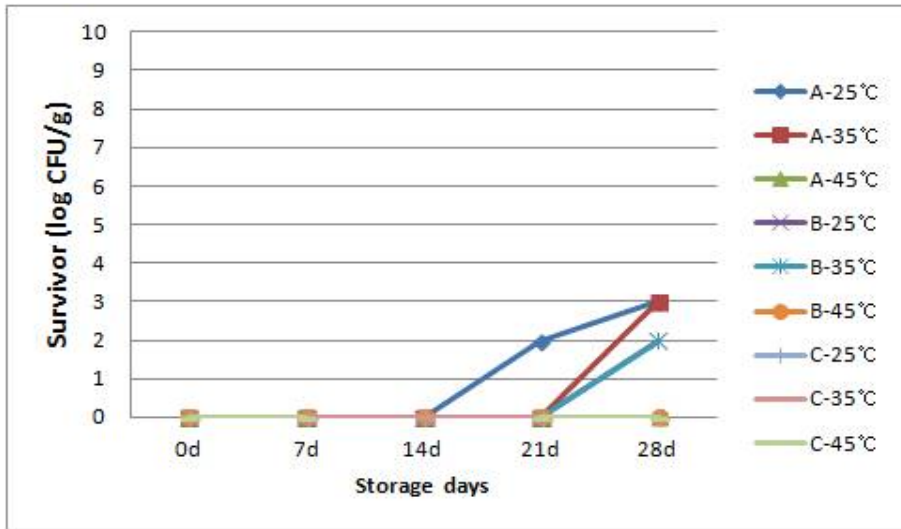


Fig. 51. 레토르트 살균 시간에 따른 저장 중 총균수 변화,
-살균시간 5분, B-10분 C-15분.

Table 48. 레토르트 살균 시간에 따른 저장 중 대장균군 변화

(unit : CFU/g)

121℃-5분	0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
25℃	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
35℃	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
45℃	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

121℃-10분	0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
25℃	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
35℃	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
45℃	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

121℃-15분	0 일	7 일	14 일	21 일	28 일
25℃	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
35℃	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
45℃	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

(라) 건강음료 용기 선정

○ 본 연구에서는 오계 건강음료 용기를 선정하기 위해 <Fig. 53>과 같은 병과 파우치 두 가지 타입으로 실험을 진행하였다. 열과 레토르트 살균에도 용이한, 알루미늄 포장지는 제품이 외부에 노출 되지 않고, 습기를 차단해 주며 알루미늄 형태를 그대로 유지하는 장점이 있으나, 제품 내부를 볼 수 없다는 단점이 있다. 이에 비해 병은 제품 내부가 보이고, 고급스럽게 보일 수 있으나, 알루미늄 파우치에 비해 단가가 높다는 단점이 있다.



Fig. 52. 건강음료 용기.

① 실험재료

실험의 주재료는 현물로 지원받은 천연기념물 265호로 지정된 연산오계를 사용하였으며 국가 지정 사육장인 (주)지산 농원에서 1 년산 냉동오계를 받아 실험하였다.

② 실험 방법

오계 가수 분해물을 제작하기 위해 지산농원의 1년산 냉동 오계를 40 °C 항온수조에서 20분간 해동하여 사용하였다. 오계 껍질은 지방 성분이 많아, 건강음료 품질 저하의 원인이 되므로, 오계 껍질을 제외한 오계육 부분으로만 실험을 진행 하였다.

오계 가수 분해물은 오계육과 물을 1:2 비율로 섞어 가정용균질기로 균질 한 후, 오계육 무게의 1 %의 Bromelain을 첨가하여 효소가 고루 섞이도록 한 후 고압용 파우치에 담아, 고압액화 시스템에서 100 Mpa, 50 °C, 24 시간 처리 하여 오계 가수 분해물을 제작 하였다. 효소 불활성을 위해 90 °C Water bath에서 15 분 처리 후, 4 °C Chiller에서 30 분간 냉각 시켰다. 오계 가수 분해물의 여과를 위해, 원심분리기 10,000 rpm에서 30 분간 원심분리를 하여, Filter paper로 여과한 여액으로 실험을 진행하였다.

용기에 따른 차이를 보기위하여, 위의 <Fig. 52>와 같이, 레토르트 병과 알루미늄 파우치 두 가지 형태의 종류로 실험을 진행 하였고, 가열 살균한 알루미늄 파우치도 비교 실험을 진행 하였다.

레토르트 살균은 121°C에서 15분 살균 처리 하여 냉각 시킨 샘플을 저장온도 25, 35, 45 °C에 저장 하였다. 가열 살균은 90°C에서 15분 살균 처리 하여 냉각 시킨 샘플을 저장 온도 25, 35, 45°C에 저장 한 후, 7일 마다 실험하였다.

이화학적 품질 지표는 <Table 49>와 같이 pH, 휘발성 아미노태 질소(VBN), 지질 산패도

(TBA), 미생물학적 품질 지표는 총 균수, 대장균군을 실험하였다.

아미노산 분석은 구성아미노산과, 유리 아미노산을 환경부, 지식경제부 기술표준원으로부터 국제공인시험기관으로 인정된 서울대학교 농생명과학공동기기원에 의뢰하여 분석하였다.. 구성 아미노산의 분석은 Agilent HPLC 1200 system (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) 을 사용하여 수행되었다. 시료는 C18 column (4.6×150 mm, 5 μm)으로 분리되었고, 분리된 시료는 두 개의 검출기 (fluorescence detector, UV detector)에서 분석되었다. 오게 가수 분해물은 초순수로 적정농도로 희석되었고, 실린지 필터 (DISMIC-13CP 0.45 micron syringe filter, Advantec Co., Saijo, Japan)로 분석 전 여과하였다. 이동상은 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.8)와 45% (v/v) acetonitrile/45% (v/v) methanol 용액이 사용되었다. 시료는 O-phthalaldehyde (OPA)와 반응한 경우 형광검출기(450 nm emission, 305 nm excitation)로, 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC)와 반응시킨 경우 UV 검출기(338 nm)로 분석하였다.

Table 49. 연산오게 건강음료 최적 용기의 품질 지표

	항 목	분석방법
이화학적 품질	pH	pH측정기
	휘발성 아미노태 질소(VBN)	미량확산법
	지질 산패도	TBA
	아미노산 분석	HPLC(분석의뢰)
미생물학적 품질	총균수	평판도말 배양법
	대장균군	

③ 실험결과

오게 가수 분해물의 최적 용기 선정을 위하여, 레토르트 살균 병, 알루미늄 파우치, 가열 살균 알루미늄 파우치 세 종류의 저장일수에 따른 pH 변화를 <Fig. 53>에 나타내었다.

레토르트 살균 병의 초기 pH는 5.78이고, 6주후 저장 25 °C, 35 °C, 45 °C의 값은 pH 5.20 정도로, 초기보다 0.5 정도 감소하였다. 레토르트 살균 파우치의 경우, 저장 2주 이후 0.4 정도로 감소하였고, 가열 살균 파우치의 경우 초기 pH 5.66에서, 저장 6주 pH 5.3 정도로 감소하는 것을 알 수 있었다.

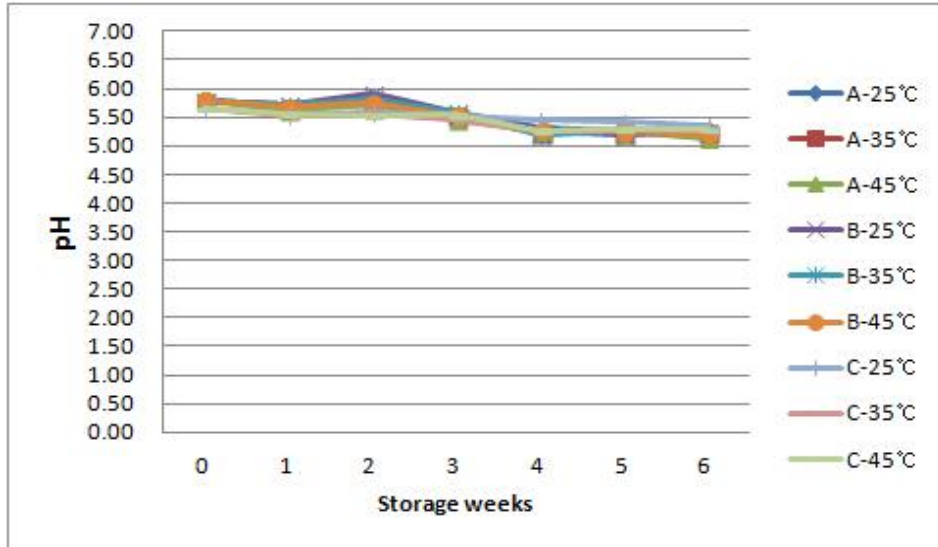


Fig. 53. 살균방법 및 용기 종류별 저장 중 pH 변화,
A-Retort bottle, B-Retort pouch, C-Heat pouch.

살균 방법 및 용기 종류에 따른 저장 중 휘발성 아미노태 질소 VBN의 변화는 <Fig. 54> 와 같다. 레토르트 병의 경우 저장 25°C의 초기 함량은 18 mg%이고, 6 주 22.00 mg%로, 35 °C 6 주 23.15 mg%, 45 °C 6 주 22.74 mg%로 약 4~5 mg%의 증가를 나타냈다. 레토르트 파우치는 초기 함량 17.12 mg%이고, 저장온도 25°C의 6 주 22.21 mg%, 35 °C 6 주 21.30 mg%, 45 °C 6 주 24 mg%로 4~6 mg%로 레토르트 병과 비슷한 증가율을 나타냈다. 가열살균 파우치는 초기 11.39 mg%에서, 저장 온도 25 °C의 6 주 21.75 mg%, 35 °C 6 주 26.97 mg%, 45 °C 6 주 27.16 mg%로 10~16mg%의 증가율을 보였다. 가열 살균의 45 °C의 샘플은 저장 1주와 5주의 값이 약 6 mg%의 증가로, 품질 변화의 큰 영향을 미치는 것으로 보여진다.

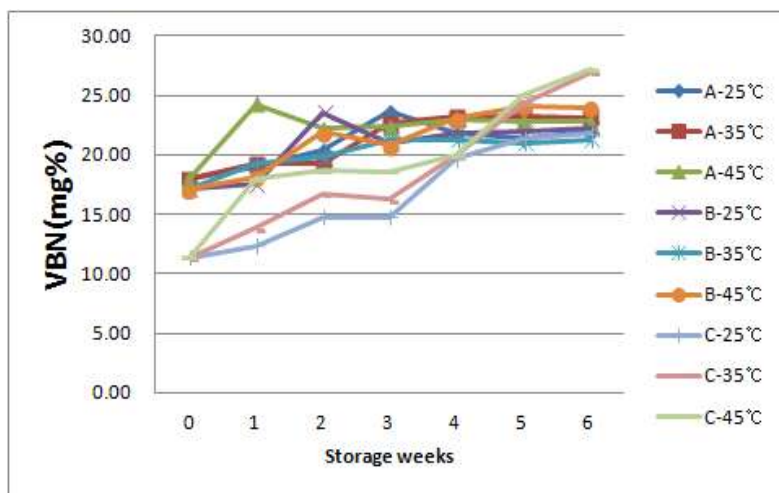


Fig. 54. 살균방법 및 용기 종류에 따른 저장 중 휘발성 아미노태 질소(VBN) 변화,
A-Retort bottle, B-Retort pouch, C-Heat pouch.

○ 레토르트 살균 병의 저장기간의 TBA를 보면 <Fig. 55>와 같이 초기에는 0.478 mgMA/kg

이고, 저장 온도 25 °C의 3 주 0.565 mgMA/kg, 6 주 0.490 mgMA/kg, 저장온도 35 °C 3 주 0.522 mgMA/kg, 6 주 0.577 mgMA/kg, 저장 온도 45 °C 3 주 0.533 mgMA/kg, 6 주 0.604 mgMA/kg로 미미한 수준으로 변화 하고 있었다. 이와 마찬가지로 레토르트 살균 알루미늄 파우치도, 초기 0.488 mgMA/kg이, 저장 온도 25 °C 6 주 0.445 mgMA/kg, 35 °C 0.412 mgMA/kg, 45 °C 0.457 mgMA/kg 으로, 레토르트 살균 병과 비슷하였다.

가열살균 파우치의 경우 초기 값이 0.317 mgMA/kg에서, 저장 온도 25 °C 0.457 mgMA/kg, 35 °C 0.451 mgMA/kg, 45 °C 0.481 mgMA/kg로 나타났지만, 5 주와 6 주 사이에 약 0.1 mgMA/kg의 값이 상승하면서 품질 변화가 크게 일어나고 있는 것을 알 수 있었다.

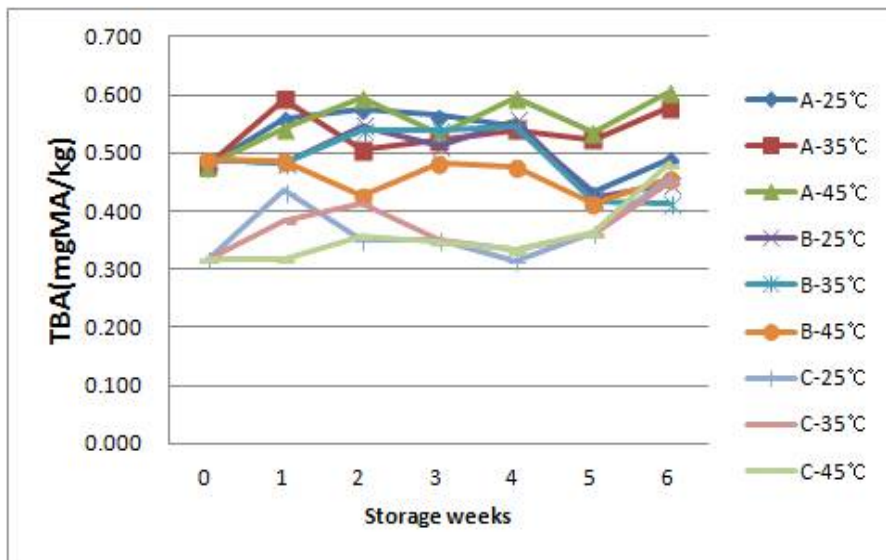


Fig. 55. 살균방법 및 용기 종류에 따른 저장 중 지질 산패도(TBA) 변화, A-Retort bottle, B-Retort pouch, C-Heat pouch.

레토르트 살균 병, 알루미늄 파우치의 저장 기간 중 총균수는 <Fig. 56>과 같이 균이 검출 되지 않았다. 가열 살균 파우치의 경우 저장 온도 25 °C 5 주 log 4, 6 주 log 5, 7 주 log 6 수준으로 증가 하였고, 35 °C 4 주, 5 주 log 3, 6 주 log 4, 7 주 log 6 수준이며, 45 °C 5 주, 6 주 log 2, 7 주 log 3 수준으로 증가하는 결과가 나타났다. 가열살균 파우치의 경우 4주에 품질 변화가 서서히 일어나, 균이 점점 증가하는 추세를 보였다. 이 결과 가열 살균 파우치는 유통 기간이 한 달 이상이 될 수 없음을 알 수 있었다.

대장균군은 <Fig. 57>과 같이 레토르트 살균 병, 레토르트 살균 파우치, 가열살균 파우치 모두 균이 검출 되지 않았다.

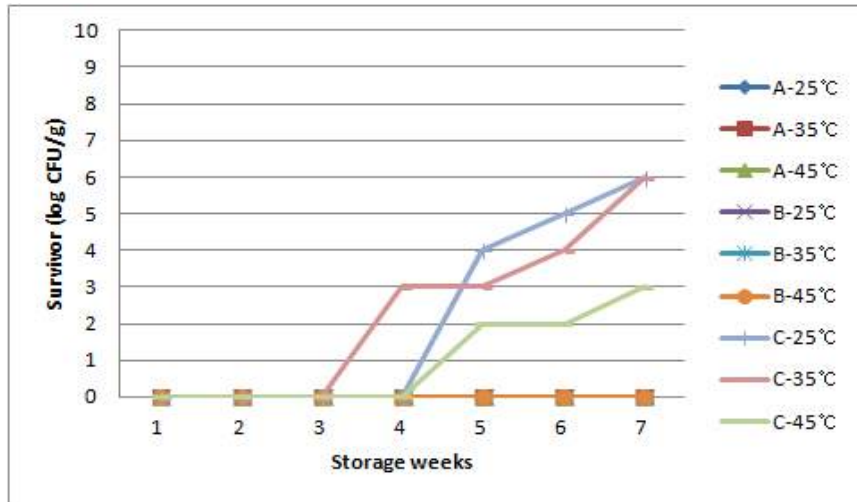


Fig. 56. 살균방법 및 용기 종류에 따른 저장 중 총균수 변화.
A-Retort bottle, B-Retort pouch, C-Heat pouch.

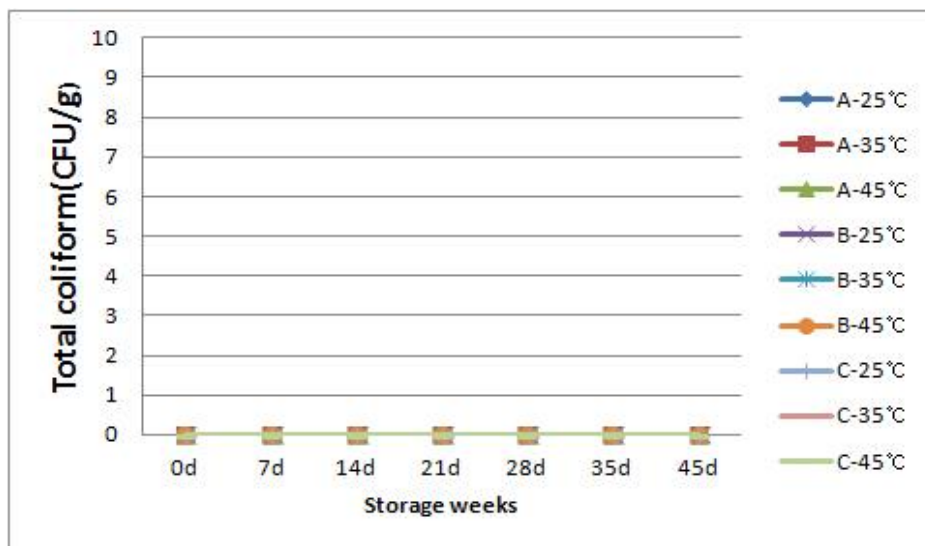


Fig. 57. 살균방법 및 용기 종류에 따른 저장 중 대장균군 변화,
A-Retort bottle, B-Retort pouch, C-Heat pouch.

레토르트 살균한 오계 유래 저분자펩타이드 원액의 아미노산 분석은 <Fig. 58>, <Fig. 59>, <Fig. 60>과 같다.

구성 아미노산의 경우 Glutamic acid 12737.78 mg/kg로 가장 높았고, Aspartic acid 7089.57 mg/kg, Arginine 6339.61 mg/kg, Leucine 5867.17 mg/kg, Lysine 5380.21 mg/kg 나타났다.

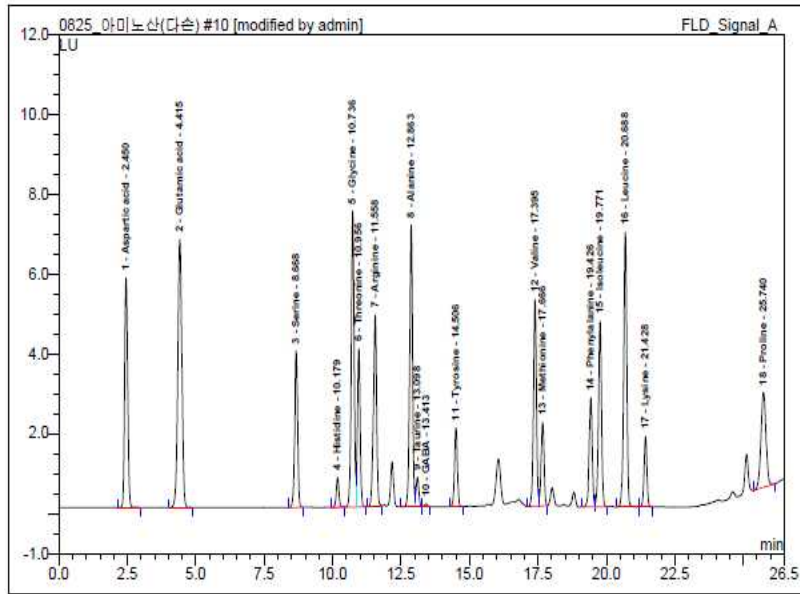


Fig. 58. 오계 유래 저분자 펩타이드 건강음료 원액의 구성아미노산 함량.

유리 아미노산은 Leucine 4159.35 mg/kg로 가장 높았고, Glutamic acid 3569.96 mg/kg, Lysine 3342.82 mg/kg, Alanine 2618.51 mg/kg, Arginine 2618.51 mg/kg, Isoleucine 2025.13 mg/kg로 분석되었다.

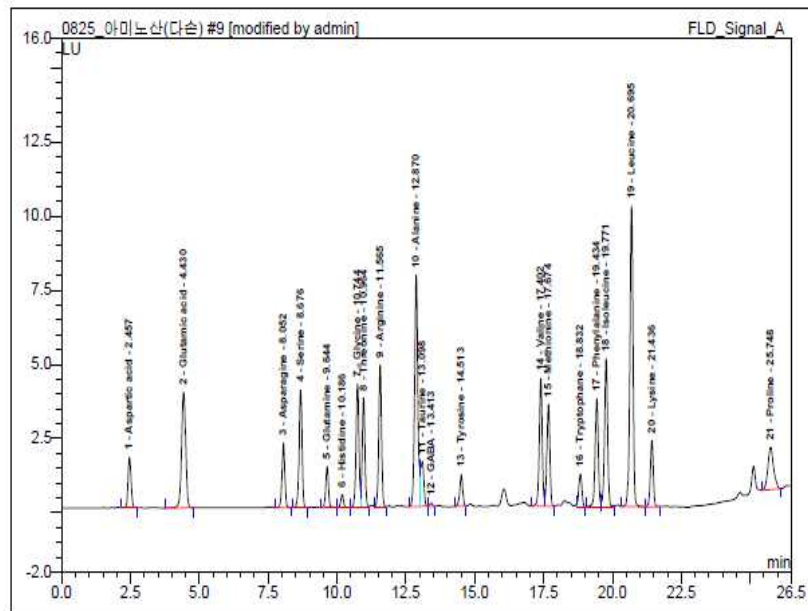



Fig. 59. 오계 유래 저분자 펩타이드 건강음료 원액의 유리 아미노산 함량.

시 험 결 과

샘플 분석성분	오계 유리아미노산 (mg/kg)	오계 구성아미노산 (mg/kg)
Aspartic acid	997.09	7089.57
Glutamic acid	3569.96	12737.78
Asparagine	878.84	N.D.
Serine	1500.31	3073.83
Glutamine	618.72	N.D.
Histidine	596.94	2114.85
Glycine	1096.49	4067.30
Threonine	1545.38	3423.91
Arginine	2591.23	6339.61
Alanine	2618.51	4300.48
Taurine	580.84	560.60
GABA	35.98	43.69
Tyrosine	679.96	2329.75
Valine	1574.20	3891.52
Methionine	1580.24	1991.61
Tryptophane	751.70	N.D.
Phenylalanine	1972.13	3020.43
Isoleucine	2025.13	3911.61
Leucine	4159.35	5867.17
Lysine	3342.82	5380.21
Proline	1057.00	3286.57

* N.D. : Not Detected



서울대학교 농업생명과학대학 농생명과학공동기기원장

National Instrumentation Center for Environmental Management




Fig. 60. 오계 유래 저분자 펩타이드액의 유리 아미노산 및 구성 아미노산 함량(mg/kg).

(마) 고압 액화 기술을 활용한 오계 저분자 펩타이드 원액의 제조과정

건강음료용 오계 유래 저분자 펩타이드 원액의 제조과정은 <Fig. 61>과 같다.

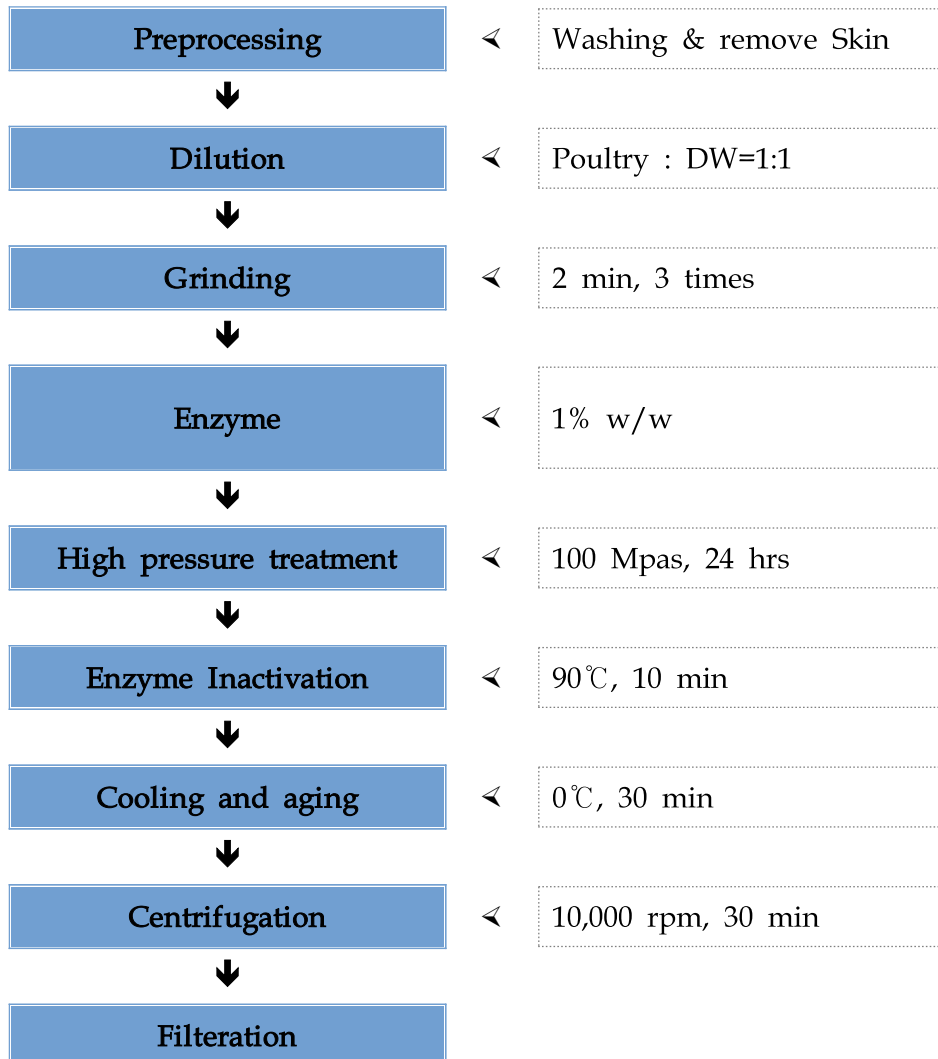


Fig. 61. 고압 액화 기술을 활용한 오계 저분자 펩타이드 원액의 제조과정.

① 연산오계 저분자펩타이드 함유 한방음료

한국 특용 가금 중 하나인 연산오계는 우리나라 고유의 품종으로 천연기념물 제 265호로 지정되어 있고, 예로부터 귀한 약재로 사용되어 도경본초, 본초비요, 동의보감, 중약대사전 등에 기술되어 있으며 다양한 약재들과 더불어 왕가의 질병을 다스리는데 이용되었으며 간과 신장, 혈이 잘못된 병, 허약체질, 복통, 냉 대하, 심신쇠약, 당뇨 및 중풍 치료에 효과가 있다고 한다. 생리활성 펩타이드는 보통 3-20개의 아미노산으로 구성되어 있고 그 중 생리적 활성을 가지는 펩타이드를 칭하며, 생리활성 펩타이드는 신체 기능이나 상태에 긍정적으로 작용하여 건강에 좋은 영향을 미칠 수 있고, 아미노산의 조성이나 서열에 따라 펩타이드의 활성이 다양하다. 펩

타이드는 단백질에 비해 크기가 작아 다양한 기능적 특성을 가지며 설사, 고혈압, 혈전증, 충치, 항산화 스트레스, 광물질 흡수장애 및 면역 결핍의 치료에 사용될 수 있다.

펩타이드의 효능과 관련된 연구에서 김 등은 동물성 펩타이드인 콜라겐 펩타이드가 혈장 중성지방의 농도를 개선시키고 HDL-콜레스테롤 농도를 상승시켜 혈장 지질개선 효과가 있다고 하였고, 다른 연구에서는 casein과 유청, 난백, 난황, 대두와 같은 식품의 단백질 유래 펩타이드의 항산화 활성이 보고되었다. 펩타이드의 항산화 활성은 특정 아미노산 서열과 관련이 있으며 식품단백질 유래 펩타이드의 항산화 활성과 관련된 연구는 계속 진행 중에 있다. 그리고 또 다른 연구에서는 아편상 펩타이드, 탐식작용 펩타이드, 혈압강하 펩타이드, 혈소판 응집저해 펩타이드, 칼슘흡수촉진 펩타이드, 혈중 콜레스테롤 감소 펩타이드 등으로 구분하여 규정하였고 기능성을 가지는 펩타이드의 아미노산 서열도 밝혔다. 최근 정어리 펩타이드, 유청 펩타이드, 대두 펩타이드는 그 기능성을 인정받아 기능성 음료 등의 형태로 제품화 되어 이용되고 있고, 닭의 경우 부산물인 닭털의 단백질로부터 가수분해물 제조 및 철분 결합 펩타이드의 분리에 관한 연구가 진행 되는 등, 다양한 원료에서 펩타이드를 추출하고 그 효능까지 인정을 받은 생리활성 펩타이드들의 제품화 및 이를 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

현재 식약처장이 별도로 인정한 펩타이드 원료 또는 성분으로는 체지방 감소 도움의 서목태 펩타이드와 피부 보습에 도움을 주는 저분자콜라겐펩타이드, 식후 혈당상승 억제에 도움을 주는 서목태 펩타이드 복합물, 실크단백질효소 가수분해물, 혈중 중성지방 개선에 도움을 주는 글로빈 가수분해물, 스트레스로 인한 긴장완화에 도움을 주는 유단백가수분해물, 높은 혈압 감소에 도움을 주는 가쓰오부시 올리고 펩타이드, 연어 펩타이드, 정어리 펩타이드, 카제인 가수분해물, 해태 올리고 펩타이드, 서목태 펩타이드가 있으며, 몇몇 펩타이드는 음료로 만들어져 시판 중에 있다.

한방음료는 한의학 이론을 적용하여 한방재료의 잎, 뿌리, 열매, 과실 및 껍질 등을 볶거나 말린 후 달인 것으로 한방음료의 원료는 다류 및 장기복용 처방에도 많이 쓰이고 식품으로도 사용할 수 있다.

쌍화탕은 십전대보탕과 함께 우리나라에서 보편적으로 애용 되고 있는 보약 중의 하나로 동의보감에 기록되어 있는 약재들로 구성되어 있다. 오래 전부터 혈기가 손상 되었을 때나 강정 및 피로회복, 병 후 기가 허약할 때 효과가 있으며, 현재 한방처방전 뿐만 아니라 분말차, 액상음료 등의 기호식품 및 건강식품으로도 이용되고 있다. 특히 쌍화탕의 재료에 들어가는 당귀, 계피, 천궁, 감초는 한방에서 뛰어난 항산화 효과를 가진다고 보고되었다. 또 임상적 효능으로 항피로효과, 간 기능 개선효과, 중추신경억제 및 항염증효과, 진통 및 항경련효과, 성 호르몬 분비 촉진 효과, 골다공증 개선효과 등이 보고되었고 박 등의 연구에서 항산화 및 항노화 효소 활성을 갖는다고 하였으며 김 등의 연구에서는 free radical 소거 기능 평가로 항산화능을 평가하여 쌍화탕과 발효쌍화탕이 항산화 효과가 있다고 보고 하여, 쌍화탕은 다양한 효능을 가지면서도 쉽게 접할 수 있는 한방음료라고 할 수 있다.

본 연구개발을 통해 개발된 연산오계 저분자펩타이드는 생리활성 펩타이드, 즉, 생리적 활성을

가지는 3-20개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로 신체 기능이나 상태에 긍정적으로 작용하여 건강에 좋은 영향을 미칠 수 있고 그 조성이나 서열에 따라 활성이 다양하다. 많은 생리활성 펩타이드들의 아미노산 서열과 그 활성이 밝혀지고 고혈압, 항산화 스트레스, 면역 결핍 등의 치료에 효과가 있는 것으로 보고되었다.

본 연구에서는 쌍화탕은 대전대학교 한의학과 생리학 연구실에서 동의보감 탕약편에 기록된 제조법을 따라 <Fig. 62>와 같이 제조한 것을 사용하였다.

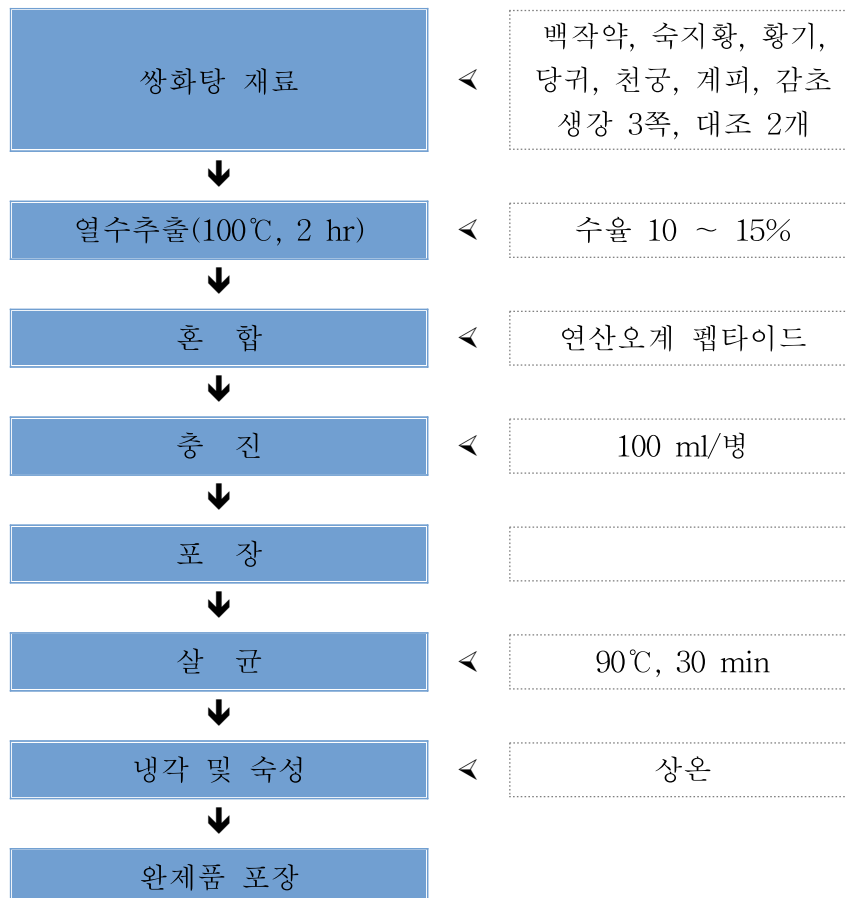


Fig. 62. 연산오계 저분자 펩타이드 함유 한방음료 제조방법

연산오계 유래 펩타이드는 중부대학교 식품생명과학과에서 연산오계육을 과인애플에서 얻어진 식물성프로테아제인 bromelain 효소로 가수분해 하여 제조한 것을 대전대학교 TBRC-RIC에서 분말화 시킨 것을 사용하여 연산오계 저펩타이드 함유 한방음료를 개발하였으며 <Table 50> 과 <Table 51>에서 산업화공정 및 경제성을 분석하였다

② 연산오계 저분자펩타이드 함유 한방음료 생산공정 설계

지금까지 연구개발 결과를 토대로 다음과 같이 단계별 공정의 고려사항을 제시하고, 시설 및 장비를 <Table 50>에 정리하여 제안하였다. 하루 80 kg의 연산오계 저분자펩타이드 함유 한방 음료 생산 공정을 아래에 제시하였다.

Table 50. 연산오계 저분자펩타이드 함유 한방음료 제조공정 설비 및 고려사항

제 조 공 정	처 리 조 건	내 용	설 비 명	비 고	
1	세척(washing)	원료 세척	흙, 이물 제거	세척기	
2	탈피(peeling) & 절단(Cutting)	표피 제거. 절단	스ライス 전 탈피 후 절단	탈피기	
3	작업대 (work table)	SUS 이동용 작업보조대	작업용	작업대	
4	추출 (Extreactor)	원료 추출	제조 전 성분추출	진공 저온 추출	
5	혼합(Mixing)	원료 Mixing Tank	농축원료에 첨가물 혼합	Blade Type Mixing Tank	
6	여과 (Filtering)	액상 반제품 여과	미세 여과	Filter m/c	
7	포장(packing)	액상 Pilling	충진, 포장	사면Pillow m/c	
8	후살균 (retort sterilizer)	고압 고온 살균	제품 살균	살균기	
9	완제품 포장 (Boxing)	외포장	내포장. 외포장	박스 포장	

-일일 생산 80 kg/일 기준(일 800 봉/100 ml 기준)

- 추출 8 시간/일 기준시(제품별 점도에 따라 상이)

하루 80 kg의 연산오계 저분자펩타이드 함유 한방음료 생산시 음료 생산단가를 <Table 51>에 나타내었다. 100ml 음료 1병당 생산단가는 2,481원/병이었으며 물류비 등을 고려하여 소비자가

는 10,000원/병 이상으로 예상된다.

Table 51. 연산오계 펩타이드 음료(100 ml) 원가계산서

항 목	단 가(원)	산 출 내 역
원 료 비	1,431	
		쌍화탕 50 g/1,165 원 연산오계펩타이드 1 g/250 원 기준 식품첨가물 16 원, 계:1,431 원/100 g
재 료 비	87	
일 매	32	110 원 × 160 L 200,000 개/롤, 32 원/개
볼 케 이 스	40	800 원 ÷ 20 개 = 40 원
박 스	15	1,200 원 /개 ÷ 4 볼 ÷ 20 개 = 15 원
직 접 제 조 비	429	일 80 KG 추출 기준 80 KG ÷ 100 ml = 800 봉
노 무 비	250	남 1명/여 2명 기준(20만 원/일) ÷ 800 봉 = 250원
식 대	18	5,000 원 x 3 = 15,000 원 ÷ 800 봉 = 18 원
연 료 비		
동 력 비	37	30,000 원/일 ÷ 800 봉 = 37 원
소 모 품 비		
수 선 비	37	30,000 원/일 ÷ 800 봉 = 37 원
복 리 후 생 비	62	50,000 원/일 ÷ 800 봉 = 62 원
공 과 잡 비	25	20,000 원/일 ÷ 800 봉 = 25 원
간 접 제 조 비	109	정액법 0.7억 ÷ 5 년 ÷ 12 월 = 1 16만 ÷ 20 일 = 58,000 원/일
감 가 상 각 비	72	58,000 원/일 ÷ 800 봉 = 72 원
간 접 인 건 비	12	100,000 원/일 ÷ 800 봉 = 12 원
이 울		
건 물		
기 타 경 비	25	20,000 원/일 ÷ 800 봉 = 25 원
운 송 비	12	100 박스(8,000 봉)/100,000 원/대 기준
소 계	2,068	
이 익	413	20 %
합 계	2,481	

연산오계 저분자펩타이드 함유 한방음료의 영양성분은 <Table 52>에 나타내었다.

Table 52. 연산오계 저분자펩타이드 함유 한방음료 영양성분

영양성분		100mL 기준			
에너지	20.47	kcal	비타민 B6	0.17	mg
탄수화물	2.75	g	비타민 E	0.002	mg
단백질	1.72	g	나트륨	7.93	mg
지질	0.29	g	칼슘	6.99	mg
비타민 A	0.001	mgRE	마그네슘	9.32	mg
비타민 C	-	mg	철	0.39	mg
비타민 B2	0.23	mg	아연	0.13	mg

③ 연산오계 저분자 펩타이드를 이용한 경옥고환 제조



경옥고는 동의보감에서 유래된 대표적인 처방으로 백삼과 복령분말에 생지황 즙과 꿀을 넣어 장시간 중탕 가열하여 만들며, 정과 수를 채워주고 진기를 고르게 하며 원기를 보하고 늙은이를 젊어지게 하며, 모든 허손증을 보하여 온갖 병을 낮게 하며 또 정신이 좋아지고 오장이 충실해지며 흰머리가 다시 검어지고 빠진 이가 다시 나오며 하루에 두세 번 먹으면 온종일 배고프거나 목마를 일이 없을 정도로 뛰어난 약효를 가진다고 기록되어 있다. 경옥고에 대한 연구는 면역반응과 항암작용에 대한 연구가 진행되었고, 항산화능 증진 효과가 있다고 보고되었다. 경옥고환은 제2협동기관인 대전대학교 산학협력단에서 제공한 <Fig. 63>과 같은 원료 및 성분비에 따라 경옥고는 대전대학교 한방병원에서 판매하고 있는 혜화당 경수고((주)다린에프앤비, 대한민국, 대전)를 사용하였고, 연산오계 유래 펩타이드는 중부대학교 식품생명과학과에서 연산오계육을 파인애플에서 얻어진 식물성프로테아제인 bromelain 효소로 가수분해 하여 제조한 것을 대전대학교 TBRC-RIC에서 분말화 시킨 것을 사용하여 제조하였으며 이를 산업화 하기 위한 제조 공정 및 설비를 <Table 53>에 나타내었다.



Fig. 63. 연산오계 저분자 펩타이드 함유 경옥고환 제조방법

Table 53. 연산오계 저분자 펩타이드 함유 경옥고환의 제조공정 및 설비

제 조 공 정	처 리 조 건	내 용	설 비 명	비 고
1 세 척 (washing)	원료 세척	흙, 이물제거	세척기	
2 탈피(peeling) & 절단(Cutting)	표피 제거. 절단	스ライス 전 탈피 후 절단	탈피기	
3 작업대 (work table)	SUS 이동용 작업보조대	작업용	작업 테이블	
4 분쇄기 (Crusher)	Mesh 분쇄	건조원료분쇄	건식 Pin Crusher	
5 추출. 농축	원료추출 후 농축	환 제조 전 원료 농축	진공 저온 추출 농축기	
6 혼 합 (Mixing)	원료 Mixing	농축원료에 첨가물 혼합	Blade Type Mixer	
7 제환기 (Pill Making M/C)	자동 제환기	원료를 환 형태로 성형	자동제환기 Ø3~Ø25 성형기	
8 건 조 (drying)	수분조절	제품별 유통을 위한 적정 수분으로 건조	Batch식 채반	

9	선 별 (Separator)	건조 후 규격품 선별	환 자동 선별	원형 선별기	
10	포 장 (packing)	제품별 내, 외포장	완제품 포장	Pillow m/c	

- 일생산 40 kg/일 기준(일 13,300 개/3 g 기준)

- 추출, 농축 8~10 시간/일 기준시(제품별, 함수율에 따라 생산량 상이)

하루 40 kg의 연산오계 저분자펩타이드 함유 경옥고환 생산시 생산단가를 <Table 54>에 나타내었다. 경옥고환 1병(100 개/병)당 생산단가는 5,946 원/병이었으며 물류비 등을 고려하여 소비자가는 180,000원/병 이상으로 예상된다.

Table 54. 연산오계 저분자 펩타이드 함유 경옥고환(3 g×100 개) 원가계산서

항 목	단 가(원)	산 출 내 역
원 료 비	706	
경옥고 300 g	4,959	500 g 투입 × 수율 60 % = 300 g ÷ 3=100개 7,066 원 ÷ 100 개 = 706 원/100 개
참쌀가루 150 g	1,026	
연산오계펩타이드 1 g	250	
별꽃50 g	831	
재 료 비	84	
일 매	24	120 원 × 180 L, 120,000 개/롤, 24 원/개
박 스	60	1,200 원/개 ÷ 20 볼 = 60 원
직 접 제 조 비	2,590	일 40 KG 추출 기준 40 KG ÷ 300 g = 133 봉(3 g×100 개)
노 무 비	1,503	남 1 명/여 2명 기준 (20만 원/일) ÷ 133 봉 = 1,503 원(3 g × 100 개)
식 대	112	5,000 원 x 3 = 15,000 원 ÷ 133 봉 = \ 112
연 료 비		
동 력 비	225	30,000 원/일 ÷ 133 봉 = 225 원
소 모 품 비		
수 선 비	225	30,000 원/일 ÷ 133 봉 = 225 원
복 리 후 생 비	375	50,000 원/일 ÷ 133 봉 = 375 원
공 과 잡 비	150	20,000 원/일 ÷ 133 봉 = 150 원
간 접 제 조 비	1,525	정액법 1억 ÷ 5 년 ÷ 12 월 = 166만 ÷ 20 일 = 83,000 원/일
감 가 상 각 비	624	83,000 원/일 ÷ 133 봉 = 624 원
간 접 인 건 비	751	100,000 원/일 ÷ 133 봉 = 751 원
이 율		
건 물		
기 타 경 비	150	20,000 원/일 ÷ 133 봉 = 150 원
운 송 비	50	100 박스(2,000 봉)/100,000 원/대 기준
소 계	4,955	
이 익	991	20 %
합 계	5,946	5,946 원 ÷ 100 개 = 59 원/ 3 g

④ 연산오계의 부산물을 이용한 육수 제조

본 연구는 연산오계의 부산물을 사용하여 육수를 제조하여 음식조리시 편리하게 사용할 수 있는 식소재를 개발함으로써 연산오계의 경제적 부가가치를 높여 연산오계 사육농가의 소득을 증대시킬 수 있는 효과를 기대할 수 있다.

연산오계의 부산물을 이용한 육수의 제조는 연산오계의 육단백질과 기능성 성분이 함유되어

있어 건강증진에 도움을 줄 수 있다.

연산오계의 부산물을 사용한 육수의 제조에 사용한 원료 및 원료비는 <Table 55>와 같다.

Table 55. 연산오계 부산물을 사용한 육수 성분비

성분	중량
오계머리	300 g
일반 양계발(발톱제거)	200 g
통양파	100 g
당근	90 g
셀러리	30 g
통마늘	30 g
월계수잎	2 장
물	2.8 L

○ 연산오계의 부산물을 사용한 육수의 제조방법은 <Fig. 64>와 같다.

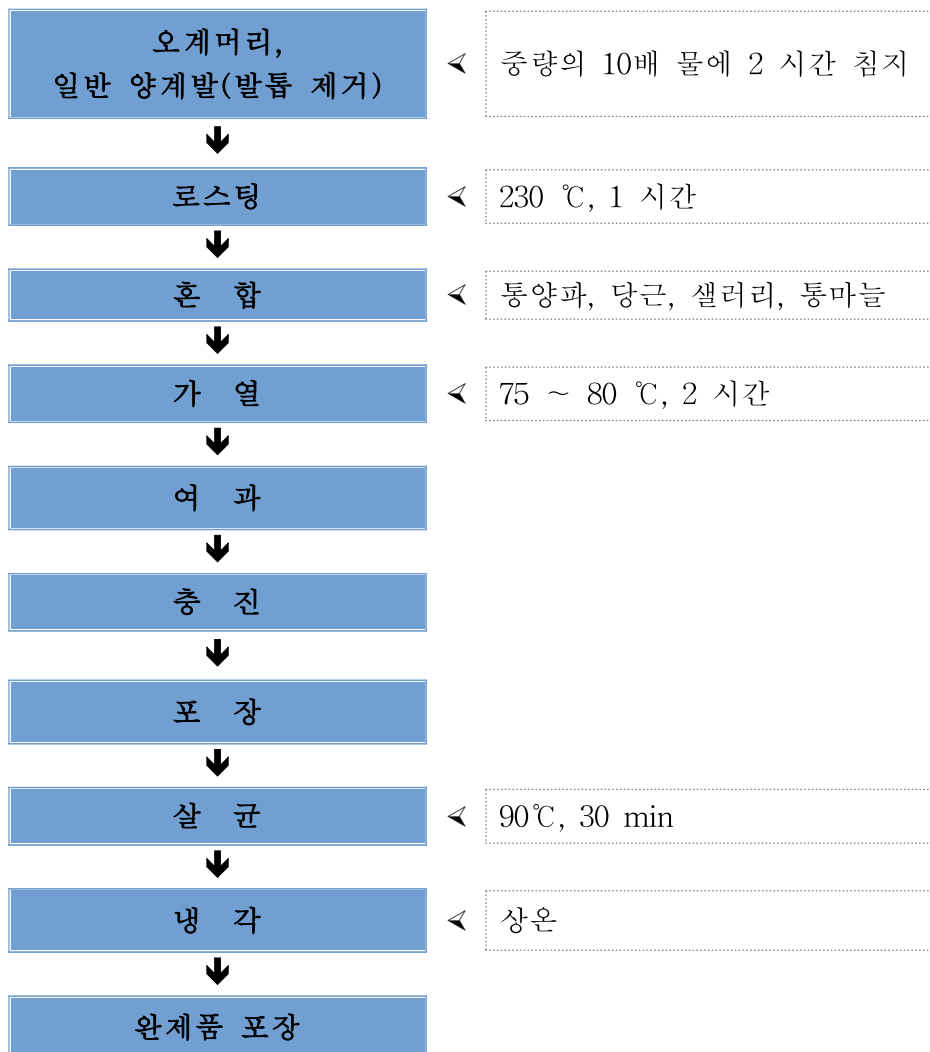











Fig. 64. 연산오계 부산물을 활용한 육수의 제조방법

연산오계의 부산물을 사용한 육수를 상업적으로 제조하기 위한 공정 및 설비는 <Table 56>에 나타내었으며, 생산단가는 <Table 57>에 표시하였다.

Table 56. 연산오계 부산물을 이용한 육수 제조공정 및 설비

제 조 공 정		처 리 조 건	내 용	설 비 명	비 고
1	세척 (washing)	원료 세척	흙, 이물제거	세척기	
2	탈피(peeling) & 절단(Cutting)	표피 제거. 절단	탈피 후 절단	탈피기	
3	작업대 (work table)	SUS 이동용 작업보조대	작업용	작업대	
4	굽기 (Oven roast)	오계 roasting	머리 로스팅	오븐	
5	원료 추출 (Exteactor)	오계 추출	육수 추출	무압력 추출기	
6	저장 (Storage Tank)	원료 저장 Tank	추출 반제품 육수저장	Tank	
7	포장(packing)	액상 Pilling	충진,포장	사면Pillow m/c	
8	후 살균 (retort sterilizer)	고압 고온 살균	제품 살균	살균기	
9	완제품 포장 (Boxing)	외포장	내포장. 외포장	박스포장	

-일생산 80 kg/일 기준(일 800 봉/100 ml 기준)

-추출 8/일 기준시(제품별 점도에 따라 상이)

연산오계의 부산물을 사용한 육수 제조원가는 Kg 당 10,000 원이며, 유통 판매가는 30,000 원 /Kg 이상이 예상되었다.

Table 57. 연산오계 부산물을 이용한 육수(100 g) 원가계산서

항 목	단 가(원)	산 출 내 역
원 료 비	394	
		오계머리 부산물 300 g, 10,000 원 기준
		야채류 300 g, 650 원 기준
		추출효율 80 % 기준, $2,700 \text{ ml} \div 100 \text{ ml} = 27 \text{ 팩}$
		$10,650 \text{ 원} \div 27 \text{ 팩} = 394 \text{ 원}$
재 료 비	87	100 ml 소포장 기준시
일 매	32	$110 \text{ 원} \times 160 \text{ L}$, 200,000 개/롤, 32 원 /개
볼 케 이스	40	$800 \text{ 원} \div 20 \text{ 개} = 40 \text{ 원}$
박 스	15	$1,200 \text{ 원/개} \div 4 \text{ 볼} \div 20 \text{ 개} = 15 \text{ 원}$
직 접 제 조 비	429	일 80 KG 추출 기준 $80 \text{ KG} \div 100 \text{ ml} = 800 \text{ 봉}$
노 무 비	250	남 1 명 / 여 2 명 기준(\backslash 20만/일) \div 800 봉= \backslash 250
식 대	18	$5,000 \text{ 원} \times 3 = 15,000 \text{ 원} \div 800 \text{ 봉} = 18 \text{ 원}$
연 료 비		
동 력 비	37	$30,000 \text{ 원/일} \div 800 \text{ 봉} = 37 \text{ 원}$
소 모 품 비		
수 선 비	37	$3 \text{ 0,000 원/일} \div 800 \text{ 봉} = 37 \text{ 원}$
복 리 후 생 비	62	$50,000 \text{ 원/일} \div 800 \text{ 봉} = 62 \text{ 원}$
공 과 잡 비	25	$20,000 \text{ 원/일} \div 800 \text{ 봉} = 25 \text{ 원}$
간 접 제 조 비	109	정액법 $0.7 \text{ 억} \div 5 \text{ 년} \div 12 \text{ 월} = \backslash$ 116만 $\div 20 \text{ 일} = 58,000 \text{ 원/일}$
감 가 상 각 비	72	$58,000 \text{ 원/일} \div 800 \text{ 봉} = 72 \text{ 원}$
간 접 인 건 비	12	$100,000 \text{ 원/일} \div 800 \text{ 봉} = 12 \text{ 원}$
이 율		
건 물		
기 타 경 비	25	$20,000 \text{ 원/일} \div 800 \text{ 봉} = 25 \text{ 원}$
운 송 비	12	100 박스(8,000 봉)/100,000 원/대 기준
소 계	1,031	
이 익	206	20 %
합 계	1,237	1 KG 대포장 경우 날개포장비 공제 후 약 10,000 원/1 KG 정도 예상

4. 결 론

○ 오계 가공을 위한 전처리 기술 확립으로 냉동 오계의 비린내를 해결하기 위하여, 해동 시 우유에 침지 하여 비린내를 없애는 방법을 설정하였다. 우유의 비율별로 0, 25, 50, 100%로 냉동 오계가 잠길 정도의 용액에 2시간 침지 시켜 해동 후, 15분 데친 오계의 부위별 비린내 실험을 진행 하였다. 날개와 모래집에서 비린내가 가장 심하여, 이 부분은 조리시 제거하기로 하였다. 우유 비율별 해동한 데친 오계의 살을 발라, 죽을 만들어 비린내 실험을 진행하였다. 우유 50%의 관능이 가장 좋게 나왔다.

○ 흑미 오계죽은 대전대학교 셰프의 레시피를 바탕으로 수정 보완하였다. 전처리 공정인 백미·흑미 퓨레의 취반 조리 방법에 따른 실험을 한 결과 백미와 흑미를 함께 넣어 일반 밥솥 조리로 정하였다. 검은콩 퓨레도 조리 방법에 따른 실험을 한 결과 일반 조리로 15분 삶는 공정으로 확정 되었고, 오계육 투입 시간에 따른 오계육의 점도, 관능 평가에서 5분 조리가 가장 좋았다.

○ 흑임자 오계죽은 오계의 특유 향을 감소시키기 위해 누룽지 물과 현미 후레이크를 후첨하고, 흑임자 양을 늘리고, 부드러움 식감을 위해 유크림도 첨가하였다.

○ 오계란 야채죽은 필수 아미노산 함량이 높은 오계란의 난황을 사용하여, 중기 이유식을 먹는 아이들을 소비자 타겟으로 설정하였으며 난황과 당근, 시금치, 브로컬리, 감자 등의 야채를 사용하여 오계란 야채죽의 색감과 영양 균형을 맞추었다.

○ 오계란 야채죽의 난황을 사용하고, 남은 난백의 활용으로 오계란 요거트 비스코티를 개발하였다. 바삭한 식감을 위하여 밀가루 대신 쌀가루를 첨가하였으며 아몬드는 파우더로 반죽에 들어가고, 슬라이스 형태는 반죽 위에 토핑 되어 식감과, 맛, 시각적 효과를 높였다. 오계란 비스코티의 수분은 1.6554%와 수분활성도 0.253으로 이화학적, 미생물학적 안전하였다.

○ 오계란 분말은, 동결건조 공정을 통해 오계란 분말을 개발하였다.

○ 오계 가공 간편 편이식 죽 3종에 관한 유통기한 설정 실험을 미생물학적 품질 분석을 하였고, 총균수, 대장균군, 황색포도상구균, 살모넬라 실험을 진행 할 결과 N.D로 균이 나오지 않았다.

○ 지산농원의 메뉴 중 가격이 적절하고, 기타 원료 함량이 적은 황기탕을 선정하여, 레토르트 제품의 가공 적성을 비교분석하였다. 황기탕의 육수는 쌍화탕의 한약재 레시피를 기초로 하고 있어, 쌍화탕의 한약재의 원료와, 식용가능 여부, 특성 등을 조사하였다. 황기탕과 시판 제품을 비교 분석하여 황기탕의 장점을 나타내었다.

○ 황기탕은 지산농원에서 받은 황기탕을 대조군으로 하여 121℃, 15분간 레토르트 처리한 샘플과 비교 실험하였다. 대조군은 5℃에서 7일에 한번 씩 4회, 레토르트 처리군은 상온보관 1달에 한 번씩 12회 실험 진행 하였다. 오계육의 경도는 레토르트 처리한 샘플이 낮았고, pH, 당도, 염도, VBN 값은 대조군과 처리군 모두 거의 차이가 없었다. 대조군의 환원당은 0일에서 7일 사이 수치가 약15 %의 큰 폭의 증가를 나타냈다. 7일 이후에는 거의 비슷한 수치가 나왔

다. 지질 산패도인 TBA는 저장 기간에 따라 수치가 높아진다. 이는 오계육수가 시간이 지남에 따라, 이화학적, 미생물학적 품질 지표에는 문제가 없으나, 육수의 탁도가 높아져 TBA 값이 증가하였다.

○ 황기탕의 대조군과 처리군의 지방산 차이는 대조군, 처리군 간의 차이가 거의 없었다. 영양 성분 분석은 대조군이 처리군보다 열량, 탄수화물, 지방, 포화지방, 콜레스테롤이 약간 높았다. 황색 포도상구균, 살모넬라는 검출되지 않았으며, 세균수는 대조군에서만 20CFU/g가 나왔다.

○ 아미노산 분석은 서울대학교 농생명과학공동기기원에 의뢰하였다. 구성 아미노산은, 레토르트 군이 Glutamic acid, Lysine, Proline이 높게 나왔다. 유리 아미노산은 대조군이 Arginine, Methionine, Tryptophane, Lysine이 높게 나왔다.

○ 오계 건강음료 제조를 위한, 가수분해 효소 선정을 위하여, 시중 닭가슴살로 예비 테스트를 진행 하였다. 효소는 Alcalase(A), Flavourzyme(F), Protamex(P), Bromelain(B), 혼합효소 Bromelain: Flavourzyme (1:1) (B+F)를 사용하였다. 고압액화기 100 Mpa, 50 °C, 24 시간 효소별 액화를 하여, 가수분해가 좋은 효소 Bromelain을 선정하였다.

○ 고압액화의 최적 시간을 도출하기 위해 100 Mpa, 50 °C에 0 시간, 6 시간, 12 시간, 18 시간, 24 시간을 처리하여 실험하였다. 아미노태 질소 Formol은 0 시간 3.03 mg/mL, 24 시간 5.93 mg/mL 으로 시간이 늘어남에 따라 아미노태 질소 함량이 높아지는 것으로 나타났고, 고압액화의 최적 조건은 24 시간으로 도출되었다.

○ 건강음료의 최적 살균 기술공정을 확립하기 위하여, 가열 살균 80 °C, 90 °C, 100 °C에서 15 분 살균한 시료를 25 °C, 35 °C, 45 °C에서 저장 하여 시료의 품질 변화를 실험하였다.

○ 저장 중 pH 변화는 가열살균온도 80 °C의 경우 초기 pH는 5.63 이었으며, 저장온도에 따른 pH 변화는 저장 21 일 후 저장 온도 25 °C의 경우 pH 5.00, 35 °C의 경우 pH 5.07 로 0.6의 감소를 나타냈다. 가열살균온도 90 °C, 100 °C의 경우 초기와 0.1~0.2 정도로 차이가 미미하였다.

○ 휘발성 아미노태 질소의 경우 초기 11~12mg%의 값이, 21 일 후 80 °C살균은 9~14 mg%로 증가하였고, 90 °C와 100 °C의 경우 3~7 mg%의 증가를 보였고, TBA는 초기 0.3 mgMA/kg의 값이 저장 7 일에 약간 높아졌다가, 저장함에 따라 초기 값과 유사하게 측정 되었다.

○ 미생물학적 품질 변화의 총균수는 80 °C의 저장 온도 25 °C 시료는, 7 일 후 log 4에서 14 일, 21 일에는 log 6 수준으로 증가 하였다. 저장온도 35 °C는, 저장 14 일, 21 일 log 4 수준이고, 45 °C는 균이 발견되지 않았다. 살균온도 90 °C의 저장온도 35 °C 21 일 시료는 log 3수준, 살균온도 100 °C의 저장온도 35 °C 21 일 시료도 역시 log 3 수준의 균이 발견되었다. 대장균군은 모두 검출되지 않았다.

○ 레토르트 살균은 121 °C, 5 분, 10 분, 15 분 살균한 시료를 25 °C, 35 °C, 45 °C에서 저장 하여 시료의 품질 변화를 실험하였다.

○ 살균한 시료의 pH는 살균 시간 5 분, 10 분, 15 분의 초기 보다 0.3 정도의 감소를 보여 유

의적인 차이는 거의 없었고, 휘발성 아미노태 질소와 TBA도 유의적 차이는 거의 없었다.

○ 저장 온도에 따른 총균수 변화는, 살균 시간 5 분의 경우 저장 25 °C의 21 일 log 2에서 28 일 log 3 으로, 저장 35 °C는 28 일 log 3 수준으로 증가 하였고, 저장 45 °C에서는 균이 측정 되지 않았다. 살균 시간 10 분의 경우, 저장 25 °C의 28 일은 log 2 수준, 35 °C의 28 일도 log 2 수준으로 나타났다. 레토르트 살균 15 분의 경우 총균수, 대장균군 모두 검출되지 않았다.

○ 레토르트 병, 레토르트 파우치, 가열 살균 파우치에 따른 저장성 실험을 진행하였다. 레토르트는 121 °C 15 분 살균, 가열 살균은 90 °C, 15 분 살균을 하였다.

○ 레토르트 살균 병의 초기 pH는 5.78이고, 6 주후 저장 온도에 따른 값은 5.20 정도로, 초기 보다 0.5 정도 감소하였다. 레토르트 살균 파우치의 경우, 저장 2 주 이후 0.4 정도로 감소하였고, 가열 살균 파우치의 경우 초기 5.66 에서, 저장 6 주 5.3 정도로 감소하는 것을 알 수 있었다.

○ 휘발성 아미노태 질소의 경우, 레토르트 병과, 레토르트 파우치는 저장 6 주후 4~6 mg%의 증가하였고, 가열 살균의 경우 초기 약 11 mg%의 값이 저장 6 주 후 10~16 mg%로 증가 하였다.

○ 지질 산패도인 TBA값은 레토르트 병, 레토르트 파우치의 경우 미미한 수준의 변화였지만, 가열살균 파우치의 경우 4 주에서 6 주 사이에 값이 0.1 mgMA/kg으로 상승하면서, 품질 변화가 크게 일어난 것으로 보인다.

○ 미생물학적 변화는 레토르트 병과 파우치 용기는 총균수와 대장균군이 검출되지 않았고, 가열살균 파우치용기의 총균수는 저장 3 주부터 7 주까지 log 1 수준씩 증가하였다.

○ 연산오계 저분자펩타이드 함유 한방음료는 하루 80 kg의 생산시 100ml 음료 1병당 생산단가는 2,481원/병이었으며 물류비 등을 고려하여 소비자가는 10,000원/병 이상으로 예상되었다.

○ 연산오계 저분자펩타이드 함유 경옥고환은 하루 40 kg 생산시 경옥고환 1병(100 개/병)당 생산단가는 5,946 원/병이었으며 물류비 등을 고려하여 소비자가는 180,000 원/병 이상으로 예상 되었다.

○ 연산오계의 부산물을 사용한 육수 제조원가는 Kg 당 10,000 원이었으며, 유통 판매가는 30,000 원/Kg 이상이 예상되었다.

4 장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

1 절. 목표달성도

1. 제 1 세부 목표 달성도

연구계획서상의 목표	비중	달성도	자체평가
1. 연산오계의 육으로부터 기능성 소재 생산 및 추출공정 확립	10	100	<p>1.연구목표: 연산오계 부위별 육 단백질 및 추출물 가수분해물 제조공정 확립</p> <p>2.연구성과 :</p> <p>가. 연산오계 부위별 육슬러리 제조 하여 상업용 프로티아제를 이용하여 펩타이드 형태의 가수분해물 제조</p> <p>나. 효소 최적반응 확립 (최적효소선정, pH, 온도, 효소량 등)</p> <p>다. 가수분해물의 물리화학적 특성분석</p> <p>3. 종합목표: 연구목표대비 성과 완료</p>
2. 연산오계의 흑질로부터 기능성 소재 생산 및 추출공정 확립	10	100	<p>1.연구목표: 연산오계 육 부위에서 흑질 추출공정 확립 및 특성 분석</p> <p>2.연구성과 :</p> <p>가. 흑질 분리를 위한 multiful 효소 처리 공정 확립 (프로티아제)</p> <p>나. 흑질 분리를 위한 반응기제작</p> <p>다. 추출 흑질의 형태 및 물리화학적 특성 확립</p> <p>3. 종합목표: 연구목표대비 성과 완료</p>
3. 연산오계의 난 및 부산물로부터 기능성 소재 생산 및 추출공정 확립	10	100	<p>1.연구목표: 연산오계 난 및 부산물 내장으로부터 단백질 및 추출물 가수분해물 제조공정 확립</p> <p>2.연구성과 :</p> <p>가. 연산오계 난 및 부산물 내장 부위별 상업용 프로티아제를 이용하여 펩타이드 형태의 가수분해물 제조</p> <p>나. 효소 최적반응 확립 (최적효소선정, pH, 온도, 효소량 등)</p> <p>다. 가수분해물의 물리화학적 특성분석</p> <p>라. 콜라겐 추출공정 확립</p> <p>3. 종합목표: 연구목표대비 성과 완료</p>
4. 연산오계로부터 기능성 소재의 분리 및 물리화학적 특성 규명	40	100	<p>1.연구목표: 연산오계 부위별 육으로부터 생산된 단백질 가수분해물의 기능성 성분 분리, 추출 및 구조동정.</p> <p>2.연구성과 :</p> <p>가. 효소별 생산 단백질 가수분해물의 항산화 특성 비교 및 구성 아미노산 등 영양 비교.</p> <p>나. 가수분해물로부터 기능성 펩타이드 분리 공정 확립 (이온교환수지, 겔 수지, RF-HPLC).</p> <p>다. MALDI-TOFF, LC/MS를 기능성 펩타이드 구조분석 통한 동정.</p> <p>3. 목표대비 성과 완료</p>

5. 연산오계로부터 기능성 소재의 생산체계 확보를 위한 제형화 공정개발	30	100	<p>1.연구목표: 연산오계 기능성 펩타이드의 생체 이용율을 높이고 기능성 유지를 위한 제형화 기술 개발</p> <p>2.연구성과 :</p> <p>가. 기능성 펩타이드 운반체로서 리포솜 선택 및 캡슐화 공정 개발</p> <p>나. 키토산 코팅 리포솜 제작 및 제작 리포솜의 simulation를 통한 위와 장내 거동 연구.</p> <p>다. 장기간 보관 및 온도에 따른 안정성 연구</p> <p>3. 목표대비 성과 완료</p>
---	----	-----	--

2. 제 1 협동 목표 달성도

연구계획서상의 목표	비중	달성도	자체평가
○ 연산오계의 약리 작용 탐색 및 기능성 소재를 이용한 생리 기능성 평가	20	100	<p>1.연구목표: 연산오계 및 가수분해물에 대한 약리 작용 탐색 및 이를 활용한 생리 기능성 평가</p> <p>2.연구성과 :</p> <p>가. 특용 가금자원의 추출방법 표준화</p> <p>나. 특용 가금자원 증탕액과 함께 사용된 한약제 선별 및 표준 제조 방법 확립</p> <p>다. 단백질 분석을 통한 근섬유단백에서 특용 가금자원을 판별하기 위한 바이오마커 탐색</p> <p>3. 목표대비 성과 완료</p>
연산오계의 육질, 흑질, 및 뼈로부터 기능성 소재 생산 및 추출공정으로부터 확립된 소재를 이용한 (in vivo 항산화 활성, 면역 활성, 항노화 (골다공증 치료효과	35	100	<p>1.연구목표: 연산오계 및 부산물 등의 펩타이드 추출물에 대한 전임상 단계 효능 탐색</p> <p>2. 연구성과 :</p> <p>가. In vivo 모델에서 면역 세포, 면역 관련 장기 및 면역 활성 인자에 대한 효능 확인</p> <p>나. In vivo 모델에서 B림파구, 항산화 및 항노화 (골다공증) 활성 효능 확인</p> <p>다. 한국 특용 가금자원의 근섬유 근단백질을 프로테오 방법으로 비교 분석을 위한 단백질 분해 및 정량</p> <p>3. 목표대비 성과 완료</p>

연산오계의 흑질, 및 뼈로부터 기능성 소재 생산 및 추출 공정으로부터 확립된 소재를 이용한 (in vivo 항산화 활성, 면역활성, 항노화 (골다공증 치료효과))	45	100	<p>1. 연구목표: 개발된 기능성 소재에 대한 안전성 확보 및 면역, 항노화, 항산화 효능 탐색</p> <p>2. 연구성과 :</p> <p>가. 단회 및 반복 독성 평가를 통한 장기의 변화 유무, 해부학 및 조직학적 등 안전성 확보</p> <p>나. 관절 건강 및 노화 질환과 관련된 예방 및 개선 효능 결과 도출</p> <p>다. 면역 세포 변화 및 항산화 효능, 유전자 발현에 대한 결과 도출</p> <p>3. 목표대비 성과 완료</p>
--	----	-----	---

3. 제 2 협동 목표 달성도

연구계획서상의 목표	비중	달성도	자체평가
연산오계와 오계란의 영양학적 유용성 평가 및 간편식 제품 개발	40	100	<p>1. 연구목표 연산오계와 오계란의 영양학적 유용성 평가 및 노인식, 환자식, 유아식 등 가정간편식 레시피 개발</p> <p>2. 연구성과</p> <p>가. 가금류를 활용한 가정간편식 시장조사</p> <p>나. 연산오계육, 육수, 오계란, 오계부산물 육수의 영양성분 분석을 통한 영양학적 우수성 평가</p> <p>다. 흑미오계죽, 흑임자오계죽, 오계란야채죽, 오계란 비스코티 개발</p> <p>라. 개발 제품의 관능평가 및 영양소 함량 평가</p> <p>마. 오계 가공을 위한 전처리 기술 확립 (위탁)</p> <p>바. 환자(노인) 영양식 및 유아식을 위한 가정간편식 (HMR) 공정 개발 (위탁)</p> <p>3. 종합목표 : 연구목표대비 성과 완료</p>
연산오계 및 오계란 저분자 펩타이드 및 오계 흑질 색소를 활용한 건강음료 개발	30	100	<p>1. 연구목표 연산오계와 오계란 저분자 펩타이드 및 흑질 색소를 활용한 건강음료 레시피 개발 및 영양학적 효능 평가</p> <p>2. 연구성과</p> <p>가. 건강음료 시장 조사 및 소비자 요구도 조사</p> <p>나. 연산오계 및 오계란 펩타이드 쌍화음료, 경옥음료, 흑색음료 레시피 개발</p> <p>다. 오계펩타이드 건강음료의 운동성과 항산화능 평가</p> <p>라. 건강음료의 관능평가 및 영양소 함량 평가</p> <p>마. 건강음료 제조공정 확립 (위탁)</p> <p>바. 건강음료의 저장성 향상을 위한 최적 살균 기술 및 공정 확립 (위탁)</p> <p>3. 종합목표 : 연구목표대비 성과 완료</p>
한국 특용 가금자원인 연	30	100	1. 연구목표

<p>산오계 유래 저분자 펩타이드를 활용한 보충용 식품을 개발</p>		<p>연산오계 유래 저분자펩타이드를 활용한 보충용 식품 개발</p> <p>2. 연구성과</p> <p>가. 시장조사와 소비자 요구도 조사</p> <p>나. 오계경옥펩타이드 환 개발 및 영양학적 우수성 평가</p> <p>다. 오계펩타이드 한방음료의 in-vivo 흡수율과 항산화능 평가 및 관능평가, 영양소 함량 평가</p> <p>마. 오계부산물을 활용한 조미육수 개발</p> <p>바. 흑임자오계죽, 오계펩타이드 한방음료, 오계경옥펩타이드 환의 시제품 및 공정 개발(위탁)</p> <p>3. 종합목표 : 연구목표대비 성과 완료</p>
--	--	---

2 절. 관련분야 기여도

세부연구목표	관련분야기여도
<p>1. 연산오계의 육, 흑질, 부산물로부터 기능성 소재 생산 및 추출공정 확립</p>	<p>1. 국내외 연산오계로부터 기능성 소재를 확보를 통하여 산업화 및 상품화 활성화 기여.</p> <p>2. 국내 토종 동물 자원 활용을 활성화 및 확대 방안 제시.</p>
<p>2. 연산오계로부터 기능성 소재 의 분리 및 물리 화학적 특성 규명</p>	<p>1. 연산오계의 단백질 가수분해물 기능성 규명을 통하여 항산화, 면역기능강화 및 항노화 제품 개발 토대 구축</p> <p>2. 지표 펩타이드 성분 구조 분석을 통하여 기능성 원료 생산을 위한 표준화 기반제시</p>
<p>3. 연산오계로부터 기능성 소재의 생산체계를 확보를 위한 제형화 공정개발</p>	<p>1. 기능성 펩타이드 형태 소재의 안정적인 생체 이용율을 높이기 위한 제형기술확보</p> <p>2. 연산오계 육의 건강 기능식품 제품화 기반 구축 제시.</p>
<p>4. 특용 가금자원의 추출방법 표준화 및 특용 가금자원 증탕액 및 한방 증탕액의 항산화 활성화</p>	<p>1. 고문헌 연구에 기재된 근거를 바탕으로 신소재를 개발함으로써 새로운 연구 기법 도입이 가능</p> <p>2. 향후 전통소재를 활용한 고부가가치 사업 창출을 위한 기술 개발 모델 제시</p>
<p>5. 특용 가금자원 증탕액과 함께 사용된 한약재 선별 및 표준 제조 방법 확립</p>	<p>1. 문헌으로만 기록된 효능을 과학적인 입증</p> <p>2. 다양한 연구에 활용할 수 있는 기초적 자료 제공 및 활용성 제고</p>
<p>6. 단백질 분석을 통한 근섬유단백에서 특용 가금자원을 판별하기 위한 바이오마커 탐색</p>	<p>1. 대한민국만이 가진 전통 가금자원을 전세계에 알릴 수 있는 독보적 자원 입증</p>
<p>7. In vivo 모델에서 면역 인자 및 항산화, 항노</p>	<p>1. 면역력 증진에 따른 결과를 바탕으로 난치성</p>

<p>화 활성 탐색</p>	<p>면역 질환을 치료할 수 있는 기대 효과</p> <p>2. 항산화 효능을 가진 소재를 통해 식의약품, 화장품 등의 다양한 형태로 활용될 수 있는 가능성 제시</p>
<p>8. 기능성 소재의 안전성 및 독성 평가 등의 전 임상 연구</p>	<p>1. 안전성과 효능이 동시에 입증된 개별인정형 건강기능식품 개발을 통해 건강기능성식품에 대한 제조 노하우를 축적</p> <p>2. 향후 연산오계를 기본으로 한 신약 또는 식품 개발로 확대시켜 기술력 강화 및 국제 경쟁력을 높이는데 기여</p>
<p>9. 연산오계 및 오계란 저분자 펩타이드 및 오계 흑질 색소를 활용한 건강음료 개발</p>	<p>1. 연산오계 펩타이드 및 흑질 색소를 함유한 건강음료 개발 과정에서 흡수율 평가를 통해 유용성을 탐색하였고, 펩타이드의 생리학적 효능에 대한 과학적 근거 마련</p> <p>2. 생약재와 한방소재를 활용한 건강음료 개발 기반 구축</p>
<p>10. 한국 특용 가금자원인 연산오계 유래 저분자 펩타이드를 활용한 보충용 식품을 개발</p>	<p>1. 연산오계경옥펩타이드의 효능을 바탕으로 한 환 제품 개발 및 오계부산물 조미 육수 개발을 통한 간편 보양식 제품 개발의 기반 구축</p>
<p>11. 개발된 기능성 식품에 대한 생리활성 평가 (항산화, 면역, 항노화 질환 등)</p>	<p>1. 관절과 관련된 다양한 효과 및 관절염이라는 질환에 대한 예방 및 회복 효과를 확인함으로써 관절건강 개선에 도움이 되는 개별인정형 건강기능 식품 개발에 기여</p> <p>2. 천연기념물인 연산오계로부터 관절건강, 면역력 개선 및 항산화 효능을 갖는 건강기능 식품 개발을 통해 가금류 관련 산업의 활성화, 농가 소득 증대에 기여</p> <p>3. 대한민국의 천연기념물을 소재로 한 제품화된 건강기능성식품의 판매를 국내뿐만이 아닌 해외 수출을 통해 대한민국 연산오계에 대한 대표 브랜드로 자리매김</p> <p>4. 이를 통한 국가 수익 증대 기대 및 일자리 창출</p>
<p>12. 연산오계와 오계란의 영양학적 유용성 평가 및 간편식 제품 개발</p>	<p>1. 연산오계와 오계란의 영양소 구성 성분의 특징 규명을 통한 영양학적 효용성을 입증함으로써 건강식품 소재 개발에 기여</p> <p>2. 환자 및 노인, 유아용, 어린이용 가정간편식 개발을 통한 맞춤형 고부가가치 제품 개발</p>

5 장. 연구결과의 활용계획

1 절. 연산오계의 육, 흑질, 난 및 부산물로 부터 기능성 소재 생산 및 추출공정 확립 과 기능성 소재 의 분리 및 물리화학적 특성 규명 하고 연산오계로부터 기능성 소재의 생산체계 확보를 위한 제형화 공정개발

1. 활용계획

가. 연산오계 부위별 원료로부터 기능성 소재 개발을 통하여 전통적인 오계의 약리 효능 및 기능성을 컨셉으로 하는 다양한 제품 개발 및 상품화 가능성 제시를 통한 사업화.

나. 오계육 펩타이드 형태의 가수분해물의 지표성분 동정을 기반으로 소재의 표준화공정 확립.

다. 기능성 원료를 기반으로 향산화, 항노화, 면역 기능강화 기능성 시품 개발 예정.

2. 추가연구필요성

가. 중장기 추가 연구를 통하여 고가의 연산오계원료 수월한 확보 대책 필요(대량생산 체계)..

나. 단기 추가 연구를 통하여 고가원료의 손실을 최소 현장 적용 공정 확보 필요.

다. 기능성 펩타이드 기능 및 지표성분 확보로 다양한 제품 개발을 위한 표준화 공정 확립 필요.

3. 타 연구에로 응용

가. 국가의 10-10 프로젝트의 실현의 가능성 신장을 위하여 개발기술을 국내 토속 자원에 확대.

나. 건강기능식품 인정 확보를 위한 기반 연구의 토대.

4. 기업화 추진방향

가. 현재 지산농원은 소규모 기업으로 고부가 가치 원료를 통하여 고부가가치 제품을 출시할 예정.

나. 전통적인 방법으로 제공하는 오계 로컬푸드에 다양한 가공기술을 통하여 사업화 추진 예정.

2 절. 연산오계의 약리 작용 탐색 및 기능성 소재를 이용한 생리 활성 평가와 개발된 기능성 소재에 대한 면역 증진, 항노화, 항산화 등의 전임상 단계 효능 입증

1. 활용계획

- 가. 특용 가금자원인 연산오계를 부위별, 성별, 연식별로 in vitro 실험을 통해 다양하게 활용할 수 있는 소재 개발에 대한 가능성을 1차년도에 확보
- 나. 이를 바탕으로 세부 및 협동과의 연계를 통해 항노화(관절염, 항산화), 면역력 증진에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 후보군에 대한 in vivo 실험을 통해 항노화(관절염, 항산화), 면역력 증진과 안전성을 동시에 확보
- 다. 또한 고문헌에 기재되어 있는 소재를 과학적으로 효능이 입증됨으로써 다방면으로 활용할 수 있는 기초적 자료를 제공함
- 라. 이와 같은 결과를 통해 추후 관절 또는 항산화, 면역과 관련되어 건강기능성식품의 원료 소재뿐만이 아닌 식의약, combination biochemistry 등의 분야에서 다양한 형태로 활용하고자 함.

2. 추가연구필요성

- 가. 현재 연구된 건강기능성식품 소재에 한약의 가미를 통한 최적화된 원료 개발
- 나. 다양한 생리활성의 검증으로 약물후보물질로 개발

3. 타 연구에응용

- 가. 식의약 소재의 개발 기술로 활용
- 나. 고지혈증 치료제, 아토피피부염, 천식 등 약물후보물질로 활용
- 다. 면역기능 조절 신소재 개발 및 작용기전 규명을 통한 근원적인 기반 기술로 활용
- 라. 면역기능 저하가 원인이 되는 다양한 질병 치료를 위한 기술 확립 및 효과적인 예방용 식품소재 개발에 활용
- 마. 항암, 항염 및 심혈관 질환 연구에 원천기술 개발 소재로 활용
- 바. 면역 증강물질 개발 및 기술 확립에 의한 각종 질병에 대한 의약품 개발에 활용

4. 기업화 추진방향

가. 기술이전

(1) 연구성과: 특허

(2) 핵심 기술명:

(가) 연산오계 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증용 조성물

(나) 관절염 예방 및 치료 효능을 갖는 연산오계 추출물 및 이를 포함하는 관절염 예방 및 치료용 조성물

(다) 항염증 활성을 갖는 연산오계 추출물 및 이를 포함하는 항염증용 조성물

(3) 이전형태: 유상(300 만원 이상/건)

(4) 이전방식: 통상실시권

3 절. 제 2 협동 한국 특용 가금소재를 활용한 가공식품 개발

1. 활용계획

나. 연산오계 펩타이드 한방음료의 in-vivo 생리학적 효능 평가 결과를 통해 연산오계를 컨셉으로 하는 다양한 제품 개발에 활용할 수 있는 과학적 근거 제시

다. 오계 및 오계란을 활용한 노인식, 환자식, 유아식 등 가정간편식 레시피, 오계펩타이드를 활용한 한방음료, 오계펩타이드 환 레시피와 제조 공정 기술을 개발하고, 기술이전을 통한 제품화, 사업화에 이용

2. 추가연구 필요성

가. 연산오계 부산물 조미 한방 육수, 연산오계를 활용한 가정간편식 등 다양한 제품 개발을 통해 원가를 절감하고 부산물을 활용하여 대상자 및 수출 대상국 맞춤 수출용 제품개발 연구 필요

나. 기능성 펩타이드로서의 지표 물질 개발 및 in-vivo 흡수 기전을 밝힘으로써 향후 펩타이드 제품 개발의 과학적 근거를 마련하고 국가 경쟁력 확보

3. 타 연구에로 응용

가. 연산오계육의 우수한 아미노산 및 지방산 조성과 연산오계육수, 특히 부산물 육수의 풍부한 미량영양소는 전통적인 오계의 약리 효능과 기능성을 뒷받침함으로써 향후 한방 및 전통 소재를 활용한 제품 개발에 활용 가능

나. 건강기능식품 인정 확보를 위한 기반 연구의 토대.

4. 기업화 추진방향

가. 고부가가치 식품 개발은 지산농원(주) 수익의 향상으로 오계 양계 사업을 확대하고, 기업화를 추진을 가능하게 할 것으로 생각됨

나. 기술이전 및 기술지도, 생산라인 확보를 통한 지산농원의 기업화 추진 예정.

4 절. 주요 연구성과 활용 계획

가. 본 연구과제에서 생산된 오계의 단백질 가수분해물, 흑질, 콜라겐, 증탁액 소재에 대한 연구결과 최적화 공정을 바탕으로 추출, 건조 및 분말화 공정에 대한 표준화를 통하여 원료 품질 규격화 수행.

나. 연구결과를 통하여 도출된 오골계와 일반 육계의 차이점은 제 2 협동 연구결과에서 보여주는 것처럼 영양 성분의 차이점이 뚜렷하고 항산화, 면역증진, 관절염 예방에 대한 효능이 입증되어 기존 육계의 영양공급 수단과 과는 차이가 있어 오계의 탁월한 효능을 바탕으로 건강기능식품으로 부가가치화.

다. 연산오계는 천년기념물로서 사유두수의 제한이 있어 왔지만 본 과제를 통하여 사업화 가능성을 확보하였기 때문에 사육기간 단축, 육계로서 체형의 변화로 중량강화를 통하여 원료에 대한 경제적 가치를 높이고 사육농가의 확대에 대량 생산 체계 구축 계획.

6 장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

1 절. 연산오계의 육, 흑질, 난 및 부산물로 부터 기능성 소재 생산 및 추출공정 확립 과 기능성 소재 의 분리 및 물리화학적 특성 규명 하고 연산오계로부터 기능성 소재의 생산체계 확보를 위한 제형화 공정개발

1. 기능성 펩타이드 분야

최근 호르몬처럼 생리기능을 지닌 펩타이드들은 항산화, 고혈압 완화, 면역조절, 진통완화 및 항균작용이 있는 것으로 알려져 있어 기능성 식품 소재로 활용되어 오고 있다. 대부분의 기능성 펩타이드들은 닭 부산물, 가슴살, 날개, 난 및 피부 단백질을 상업용 프로티아제를 이용하여 생산하는 연구들이 발표되고 있다. 펩타이드 형태의 단백질 가수 분해물을 제조하는 방법 중에서 효소를 이용하여 제조하는 것이 기능성 및 안전성이 높다고 보고된 바가 있다.

최근 효소에 의한 단백질 가수분해는 고압(high hydrostatic pressure) 환경에서 활성이 향상된다고 한다. 고압처리는 우유 단백질에 펩신, 트립신 및 키모트립신과 같은 효소를 처리할 때 가수분해 속도를 증가 시켰고, 또한 고압 처리하여 생산된 육류 등 식품 소재들의 기능성이 활성화 되었다. 생리활성 펩타이드는 인체 내에서 생리학적 영향(physiological effect)을 주는 식품유래 원료로서 정의를 한다.

이들 대부분이 분자량 6,000 미만들인 2-20 아미노산 잔기를 가지고 있다. 대두, 곡류들, 어류, 난, 우유 및 육류들은 모체 단백질(parent protein)에는 온전하게 불활성 되어있는 생리활성 펩타이드들을 보유하고 있는 것으로 알려졌다. 그러나 인체 내 위내 소화 과정에서 효소 가수분해에 의하여 방출될 때 이러한 펩타이드들은 주목할 만한 건강 혜택을 준다.

최근에 식품 유래 단백질로부터 잠재적인 건강기능식품 및 약효식품 후보물질을 찾기 위하여 노력을 해왔다. 많은 식품 제조공정에서 생리적으로 활성이 있는 물질들을 제품을 개선하기 위하여 수정을 하거나 품질을 높이기 위한 강화시킬 목적으로 때때로 첨가를 한다. 예를 들면 혈압을 낮추는 기능을 지닌 펩타이드 Valyrone는 건강보조식품, 젤리, 및 음료 등 33개의 다른 제품에 포함 시켜 왔다. 이러한 복합 생리 기능을 지닌 펩타이드 들은 면역조절(immunomodulatory), 항균성(antimicrobial), 항산화(antioxidant), 항혈전(antithrombotic), 항고혈압(hypocholesterolemic), 항고혈압(antihypertensive) 특성을 보여준다.

특히 생리활성 펩타이드는 단백질에 비해 크기가 작은 생리 활성 펩타이드는 생체내로 쉽게 흡수 될 수 있으며, 다양한 기능적 특성을 갖는다. 생리활성 펩타이드의 효과로는 미네랄운송, 항고혈압, 항균활성 등이 있으며, 일부 생리활성 펩타이드는 다기능적인 특성을 가지고 있다고 보고되었다. 최근 저분자 펩타이드는 항산화 효과, 단백질 가교결합 형성 및 글리케이션 저해능, 자유라디칼과 금속이온 소거능이 매우 높은 것으로 보고되고 있으며, 이러한 기능성으로 인해 세포의 노화를 억제시킬 수 있는 물질로 여겨지고 있다.

기능성 저분자 펩타이드에 대한 연구에 있어서 주로 축육을 대상으로 하는 기능성 저분자 펩타이드 추출에 관한 연구가 이루어지고 있다. Gopalakrishnan 등은 돼지골격근 추출물에 함유된 기능성 저분자 펩타이드에 대한 연구도 보고되었다. 수산물에서도 히스티딘 계 저분자 펩타이드가 회유성 어류에 많이

함유되어 있으며, 특히 참치에 다량 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다. 히스티딘 계 저분자 펩타이드는 다른 항산화제와 달리 활성산소제거 뿐만 아니라 성인병 및 노화억제에 깊이 관련 하고 있는 것으로 보고되고 있다. 그러나 아직 가금류, 즉 오계를 이용한 기능성 펩타이드에 대한 연구는 미미한 실정이다.

2. 단백질 가수분해물 생산을 위한 프로티아제 적용 및 초고압 처리기술

초고압처리기술은 100~900 MPa의 정수압으로 압력 처리함으로써 열처리에 의한 단백질 변성, 전분 호화 및 살균효과와 같은 효과를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 영양성분의 파괴와 식품의 향과 맛을 유지할 수 있는 장점을 가지고 있다. 초고압처리는 단백질의 구조에 영향을 미치는 반면, 초고압처리에 의한 단백질 변성기작은 열처리에 의한 변성 기작과는 차이를 보인다. 초고압처리에 의한 단백질 변성은 물 분자의 수화에 기인하는 것으로 보고되고 있는데, 압력수준의 증가(< 500 MPa)에 따라 단백질 외부의 물 분자들이 단백질 내부에 침투되며, 그 결과 단백질 내부 공간 확장에 의하여 단백질 구조가 일부 풀리는 molten globule 현상을 야기하는 것으로 알려진다[12]. 압력수준이 더 증가되면(500~1,000 MPa) 단백질의 비가역적 변성이 야기되어 보수력, 유화력 및 겔 형성능력이 소실되는 현상이 나타나지만, 일반적으로 200~400 MPa 범위에서의 초고압 처리한 식육은 초고압을 처리하지 않은 대조구에 비하여 보수력이 향상되는 장점을 보이며, 따라서 초고압처리를 활용하여 육제품의 품질 향상을 기대할 수 있다.

펩타이드 형태의 단백질 가수 분해물을 제조하는 방법 중에서 효소를 이용하여 제조하는 것이 기능성 및 안전성이 높다고 보고된 바가 있다. 최근 효소에 의한 단백질 가수분해는 고압(high hydrostatic pressure) 환경에서 활성이 향상된다고 한다. 고압처리는 우유 단백질에 펩신, 트립신 및 키모트립신과 같은 효소를 처리할 때 가수분해 속도를 증가 시켰고, 또한 고압 처리하여 생산된 육류 등 식품 소재들의 기능성이 활성화 되었다.

3. 가금류 및 부산물 유래 기능성 펩타이드 분야

작은 분자량의 펩타이드는 항산화 작용, 면역기능, 고혈압 완화, 진통완화 및 항균작용 등 생리활성 기능이 높은 것으로 보고되고 있으며, 이러한 기능성으로 인해 노화를 억제시킬 수 있는 기능성 식품, 치료식, 그리고 천연 약품으로 개발의 가능성을 높여오고 있다. 이러한 기능성 펩타이드는 주로 동물성 단백질을 가수분해하여 생산하고 있는데, 최근 가금류에 관련된 것으로 닭 가공 공정 부산물 단백질, 닭 가슴살 단백질, 닭 날개 단백질, 난 단백질, 닭 피부 단백질로부터 기능성 펩타이드 생산 및 생리활성에 대한 연구들이 발표되고 있다.

특히 항암효과로 알려진 난황 단백질인 포스비틴(Phosvitin)은 아미노산 사슬의 50% 이상을 인산화된 serine이 차지하고 있는 특이한 구조로 되어있는데[22], 이러한 특이구조로 인해 phosvitin은 강력한 금속 킬레이트제(metal chelator)로 작용한다고 보고되고 있으며[23]. 금속 킬레이트 능력으로 인해 phosvitin이 항산화제로서 금속이온에 의해 발생하는 지방 산패를 억제할 수 있다[24-26].

가금류 중 계육은 필수 지방산 및 필수 아미노산의 함량이 높고 지방과 콜레스테롤의 함량은 낮아 영양학적으로 매우 우수하여 소비량이 매년 증가하는 추세이다. 오골계는 예로부터 다양한 생리활성을 지닌 것으로 알려져 왔다. 오골계로부터 생산된 올리고 펩타이드는 항 고혈압에 효과가 있는 것으로 보고되었으며, 특히 오골계 중에서 연산오골계는 한국 재래종으로서 1980년 천연기념물 265호로 지정이 되었으며, 연산 오골계의 생리활성에 한 부분의 연구들은 증탕액에 한 것으로 지질대사 개선, 조골세포 분화 및 파골세포 분화억제, 면역개선 등의 효능이 발표되었다. 또한, 펩타이드 형태의 단백질 가수 분해물을 제

조하는 방법에서 효소를 이용하여 제조하는 것이 물성이나 용해도 등의 기능성을 크게 개선시킬 뿐 아니라, 영양적으로도 우수하고 산 또는 알칼리 가수분해에 비해 독성이 거의 없으며, 생산되는 저분자형 펩타이드들은 새로운 생물활성 소재로 이용될 가능성이 크다고 하였다. 최근 파파인으로부터 추출된 프로티아제는 오메가3로부터 항산화 기능성을 지닌 펩타이드를 생산하는 것으로 보고되었다. 그러나 연산오계란 단백질로부터 유래된 펩타이드에 대한 연구들을 미비한 실정이다.

4. 기능성 단백질 가수분해물 및 펩타이드 분리 정제 기술

최근에 막분리 기술(membrane separation technology)을 이용하여 가공식품 재료 및 생리활성을 갖는 유용한 식품소재가 개발되고 있다. 한외여과법은 다른 분리기술(동결농축, 증발농축 등)들과 비교하였을 때 분리조작이 간편하고, 상변화에 의한 물질의 물리화학적 특성 변화를 최소화 할 수 있는 저에너지 분리기술로 알려져 있으며, 다양한 온도 범위(고온, 중온, 저온)에서 적용이 가능하고, 열이나 화학적 처리 없이도 목표 물질을 농축할 수 있는 장점을 지니고 있다. 한외여과법을 이용한 단백질 농축물 제조에 관한 연구가 여러 연구자들에 의하여 수행되었다. 작은 분자량의 펩타이드는 항산화 작용, 면역기능, 고혈압 완화, 진통완화 및 항균작용 등 생리활성 기능이 높은 것으로 보고되고 있으며, 이러한 기능성으로 인해 노화를 억제시킬 수 있는 기능성 식품, 치료식, 그리고 천연 약품으로 개발의 가능성을 높여오고 있다.

5. 기능성 단백질 가수분해물 리포솜을 활용한 제형화 기술

기능성 식품 및 약효식품(nutraceuticals)들에 대한 사업적인 관심은 전 세계시장에서 급속히 성장을 하고 있다. 이들 중에서 저 분자량의 단백질 가수분해물들은 뛰어난 건강기능성을 제공하는 것으로 알려지면서 새로운 물질의 개발이 지속되어 오고 있다. 작은 크기 때문에 단백질 가수분해물들은 면역기능을 유발하는 단백질에 비하여 사용가능성이 매우 높은 것으로 알려져 왔다. 단백질 가수분해물들은 영양적으로 단백질 근원 물질일 뿐만 아니라 항 당뇨, 항 고혈압, 항산화와 같은 생리활성을 제공하는 것으로 연구발표 되어 오고 있다. 그러나 불쾌한 쓴 맛의 발생 및 낮은 흡수력으로 인하여 발생하는 낮은 효력(potency)은 단백질 가수분해물들의 건강 기능식품 제조에 걸림돌이 되어 왔다.

따라서 생리활성 단백질 가수분해물들의 전달 체계는 물질 만큼 중요하다. 좋은 전달 체계란 독성과 부작용(side effect)을 최소화 하면서 생체이용률(bioavailability)의 증대 및 방출 조절(controlled release)를 해야 한다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 나노 및 초미세 크기의 소낭에 캡슐화(encapsulation), 투과 촉진제 및 효소억제제(enzyme inhibitor)들을 전달체계에 적용을 하여 왔다. 투과 촉진제 및 효소억제제(enzyme inhibitor)들은 위와 장에 존재하는 분해효소의 작용을 억제하거나 또는 세포막의 투과도를 증가 시킬 것으로 보인다. 그러나 이러한 첨가제들의 장기간 사용은 소화 장애와 바람직하지 않은 단백질 가수분해물들의 축적 또는 흡수를 허용 할 것으로 보인다. 한편 나노 및 초미세 크기의 소낭에 캡슐화(encapsulation)는 작은 크기 및 넓은 표면적으로 단백질 가수분해물들의 생체 이용률을 증가시킬 것으로 기대한다.

리포솜과 Polyflex는 단백질 가수분해물의 조립식 전달체로 집중적으로 연구되어 왔다. 두 방법을 이용한 전달 체계들은 적절한 배합(formulation) 및 조제(preparation) 방법이 선택되어 진다면 무독성 및 생분해성 방법들이다. 특히 리포솜들은 단일 소낭 안에 소수성 및 친수성 물질을 운반 할 수 있다. 또한 식품 등급에 해당하는 원료로 생산할 수 있다. 이러한 물질로서 생산된 리포솜들은 극성 및 비극성 아

미노산과 단백질 가수분해물들을 캡슐화 할 수 있다. 그러나 리포솜들은 제조과정 및 저장하는 동안 산화 될 수도 있고 소장에 존재하는 효소들과 환경적으로 산성인 위에서 분해가 될 수 있다. 이러한 문제들은 점착성(mucoadhesive), 생체 적합성(biocompatibility), 생분해성을 지닌 탄수화물인 키토산을 코팅에 의하여 문제를 해결 할 수 있다. 이러한 탄수화물과 지질의 코팅은 1) 쓴 맛의 소수성 단백질 가수분해물들의 불쾌한 향을 차단(masking)하고, 2) 효소분해 및 산성 환경에 의한 분해를 저지하는 방어벽을 구축하여 생리활성 단백질 가수분해물들의 장내 흡수를 촉진시키기 위한 것이다.

리포솜은 지질 분자들이 수용액에 분산될 때 자발적으로 형성되는 지질 분자들의 회합체로서 내부의 수용성 공간이 지질 막으로 둘러싸인 액포이다. 리포솜의 평균직경은 직경 수십 nm에서 수십 μm 로 다양하게 존재할 수 있으며, 내부의 수용성 공간이나 지질막 안에 각각 수용성 물질이나 지용성 물질을 포집할 수 있다. 또한 생체막의 기본 구조와 유사하여 인체에 대한독성이 적을 뿐만 아니라, 제조가 용이하여 최근 화장품, 제약, 식품산업 등에서 인체에 부작용 없이 투여가 가능하거나, 물질의 효과적인 전달 등의 면에서 활용도가 높다. 리포솜이 의약, 화장품 및 여러 용도로 활용도가 높은 요인들은 바로 리포솜의 유형, 조성 및 물리적, 화학적 성질 등이 다수의 제어 가능한 변수 등에 의해 다양하게 조절이 가능하기 때문이다. 그러나 일반적으로 지질로 구성된 리포솜의 액포는 고분자 입자나 다른 기능성 입자에 비하여 물리적, 화학적 안정도가 낮고, pH, 전해질의 농도, 온도, 계면활성제 등에 의해 안정도가 급격히 감소하는 단점이 있다고 보고된다. 즉, 인지질이 가수분해 되거나 산화될 수 있고 포집된 약물의 분해도 일어날 수 있다. 또한, 리포솜의 응집, 침강, 융합 등의 현상으로 인하여 리포솜은 물리적으로 불안정해져 평균직경이 변화되기도 한다. 따라서 리포솜의 물리적, 화학적 안정성을 높이기 위한 연구는 꾸준히 진행되고 있다. 리포솜은 사용 목적 즉, 리포솜의 적용분야에 따라서 그 제조방법, 인지질의 종류, 성분, 조성 등이 달라진다. 경구용 리포솜의 안정성을 위하여 고분자로 코팅한 리포솜, 혈중에 주사제로 사용하는 음이온성 리포솜, 유지방구막에서 유래한 인지질과 대두에서 유래한 인지질로 합성한 서로 다른 리포솜의 물리적 안정성 비교, 대두에서 유래된 불포화 레시틴(phosphatidyl choline) 을 이용하여 제조한 리포솜 등 외에도 서로 다른 조건으로 제조된 리포솜의 안정성에 관한 연구가 보고되고 있다.

2 절. 연산오계의 약리 작용 탐색 및 기능성 소재를 이용한 생리 활성 평가와 개발된 기능성 소재에 대한 면역 증진, 항노화, 항산화 등의 전임상 단계 효능 입증

1. 퇴행성 관절염

골관절염 (Osteoarthritis, OA)는 퇴행성관절염이라고 불리기도 하는 가장 흔한 관절염으로, 주로 체중부하 관절을 많이 침범하여 관절 연골의 국소적인 퇴행성 변화, 연골하골의 비대, 주변 골연골부의 과잉 골형성, 관절의 변형 등을 특징으로 하며 반복적인 동통, 관절 강직감 및 점진적인 운동 장애 등을 초래하는 질병이다. 골관절염의 원인은 정확히 규명되지 않았지만 유전, 연령, 관절 외상, 비만 등의 이유로 인해 유발되는 것으로 알려져 있으며, 50세 이상의 연령대에서 급격하게 증가하기 시작하여 75세 이하의 연령대까지 약 95% 이상의 높은 유병율을 나타낸다. 현재 골관절염의 치료는 아세트아미노펜이라는 진통제를 사용하지만 단시간에 효과가 나타나지 않으며, 비스테로이드성 항염증약(NSAID)는 심한 관절염에서는 효과적이지만 위장관 출혈이라는 부작용이 발생할 수 있다. 이로 인해 가장 효과적인 NSAID 계열에서는

Diclofenac을 추천하고 있는 실정이다. NSAIDs 계열과는 또 다른 COX-2 선택적 억제제 (celecoxib)는 효과적이며 NSAID가 가진 부작용이 나타나지는 않지만 심근 경색과 같은 심혈관 질환이 발생할 가능성이 보고되고 있다. 이에 따라 대체 의학 치료가 제기되고 있는 실정이다. 대표적으로 글루코사민과 콘드로이친을 들 수가 있는데 빠른 효과와 부작용이 거의 없는 장점이 있는 반면 유럽 학회에서는 권장하고 있지 않은 상황이다. 이처럼 골관절염의 치료법은 장기복용의 부담과 각종 부작용의 문제점이 나타나면서 최근 들어 골관절염에 대한 건강기능식품의 기호도 및 수요가 급격히 증가하고 있는 추세이다.

그러나 관절 및 뼈 건강 관련 건강 기능성 식품의 대부분은 일부 의학계에서 그 효능에 대한 의문점을 제기한 바 있고, 이에 향후 지속적인 관절염 건강기능식품의 시장을 유지하고 형성함에 있어서 골관절염과 관련된 기능성 소재의 개발을 위해 이를 대체할 방안이 필요하며, 이러한 시점에서 새로운 골관절염에 대한 건강기능식품의 원료개발에 대한 필요성이 증대되고 있다.

관절염 관련 바이오마커 중에 사이토카인 계열은 IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-15, IL-18, IL-2, IL-4, chemokine과 growth factor에는 VEGF, lipid mediators는 prostaglandin E2, acute phase protein은 C-reactive protein, obesity-associated factors는 COMP, MMP-3, ApoA1, 그 밖의 인자들은 CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, myeloperoxidase로 보고하였다. 최근 연구에서는 serum, urine, synovial fluid에서 바이오마커를 측정하여 관절염 진행도 및 치료정도를 진단검사하고 있다.

2. 항산화

산화적 스트레스 (oxidative stress)는 생체에서 산화촉진제 (prooxidant)와 항산화제 (antioxidant)의 불균형을 유발하여 염증성 자가 면역반응 질환을 일으키게 된다. Hitchon 등의 연구 결과에 따르면, 산화적 스트레스가 발생하면 세포막 지질과 산화, 세포사 (apoptosis) 유도, 단백질 및 콜라겐 등이 영향을 받게 됨으로써 활액과 활막 조직에 손상을 주어 RA의 원인이 된다고 밝혀내었다. 따라서 항산화를 통한 산화적 스트레스의 감소는 염증성 자가 면역질환의 치료와 개선에 도움을 줄 수 있다. 활성산소종 (reactive oxygen species)은 오염 물질, 담배 연기, 약물 등의 외인성 요인과 세포 내에서 생산되는 내인성 요인으로 발생하게 되는데 심혈관계 질환, 암, 염증, 노화 등을 유발하는 것으로 알려져 있으며, DNA에 해로우며, 미토콘드리아에 과도한 손상을 주어 세포 사멸이 나타나고 Bcl-2 단백질은 미토콘드리아의 표면에 겹쳐져 손상을 감지하고 미토콘드리아 막에 구멍을 뚫어 시토크롬 C가 누출되는 Bax 단백질을 활성화시킨다. 이 사이토 크롬 C는 Apaf-1, 또는 세포의 세포질에 자유롭게 떠 다니는 apoptotic protease activation factor-1에 결합합니다. 미토콘드리아에서 ATP의 에너지를 사용하여 Apaf-1과 시토크롬 C가 결합하여 apoptosomes를 형성합니다. apoptosomes은 caspase-9 결합 및 또 다른 자유 부동 단백질을 활성화합니다. 즉 ROS가 세포 대사에 미치는 영향은 1. DNA나 RNA의 손상, 2. 지질과산화(지질에서의 고도 불포화 지방산의 산화), 3. 단백질 내 아미노산의 산화 등이다.

3. 면역계

면역반응, 특히 후천성 면역반응의 시작은 항원제시세포에 의한 적절한 항원의 제시 및 여러 분비 단백질에 의한 자극에 의해 시작된다. 앞서 언급한 바와 같이 면역세포가 일으킬 수 있는 반응은 면역관용과 면역반응 두 가지로 나누어 질 수 있는데, 많은 연구를 통해 항원제시세포는 이 두 가지 반응 모두를 매개할 수 있음에 대한 증거들이 속속 밝혀지고 있다. 따라서 최근 면역학 분야의 중요한 연구 분야중 하나는, 이러한 면역반응의 시작점을 담당하고 있는 항원제시세포가 어떻게 면역반응 및 면역관용을 동시에 일으킬 수 있는지에 대한 질문이라 할 수 있다. 이를 설명하기 위해 두 가지 가설이 현재까지 제시되어 있다. 한 가지 가설은 Janeway에 의해 제안된 가설로서, 수지상세포의 경우 외부 병원성 항원을 특이적으로 인지 할 수 있는 pattern recognition receptors를 세포 표면에 발현함으로써 이러한 병원성 항원의 인지시 다양한 stimulatory function을 증가시키게 되고 이러한 결과로 후 천성 면역의 강화를 가지고 오게 된다. 반면에, 이러한 자극이 없을 때 수지상세포가 후천성 면역세포와 상호결합을 한다면 수지상세포는 후천면역세포의 anergy 또는 deletion을 유도 할 수 있다는 이론이다. 이러한 방법을 통해 항원제시세포는 외부 항원과 자가 항원을 구분하고 그것의 위험성에 따라 면역반응 혹은 면역관용을 적절히 유도함으로써 면역학적 항상성을 유지시킬 수 있다. 다른 한 가지 이론은 'Danger model'로서 항원제시세포가 직접적으로 병원성 항원임을 인지하는 것이 아니라 외부 침입 항원이 인체에 작용함으로써 다양한 기관, 조직 그리고 세포에서 나타내는 위험 신호 (danger signalling)을 인지하여 침입 항원이 병원성 혹은 비병원성을 판단하고 그에 따라 면역반응을 조절한다는 이론이다. 이때 위험 신호로 사용될 수 있는 것은 세포의 괴사 (necrosis)시 세포 외부로 방출되어 지는 다양한 세포의 구성물질 (heat shock protein, DNA 등)이라 생각되고 있으며, 이러한 신호 물질에 따라 앞서와 같은 방법으로 항원제시세포는 그 반응 여부를 결정 후 후천성 면역세포와의 상호결합을 통해 면역 방향을 결정하게 된다는 이론이다. 뿐만 아니라, 면역계 내에 다양한 면역조절 기능을 하는 항원제시세포들이 존재하여 항원의 여부와 상관없이 다양한 방법을 통해 후천 면역세포의 면역 관용을 유도할 수 있다. Tolerogenic DC의 경우 세포 내 tryptophan metabolic enzyme의 한 종류인 IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase)를 발현하여 T 세포의 anergy 유도 및 면역조절 T 세포의 생성을 유도하기도 하며, immature DC의 경우 immuno-modulatory cytokine 의 한 종류인 IL-10을 발현함으로써 T 세포의 활성을 억제하기도 한다. 아 직까지 항원제시세포에 의한 면역 관용의 유도 메커니즘에 대한 연구는 시작단계에 불과하며 이를 밝혀내기 위해 과학계에서는 다각도로 연구가 진행되고 있다.

3 절. 제 2 협동

1. 해외 건강기능식품 개발 기술

- 『2016년 가공식품 산업경쟁력조사』에 따르면, 건강기능식품의 경우 미국, 네델란드, 프랑스, 독일, 영국에 비해 가격경쟁력이 있으나, 품질경쟁력은 떨어지는 것으로 분석되었고, 최근 가공식품 수출 주력 국가인 브라질이나 중국에 비해서는 가격경쟁력은 낮으나 품질경쟁력은 높

은 것으로 나타났다.

- 국내 시장 대비 해외시장의 기술수준 인식도에서 건강기능식품의 경우 한국이 모든 나라에 비해 높게 나타났고, 육가공 식품의 경우 미국, 네델란드, 프랑스, 독일, 영국에 비해 낮으나 브라질, 중국에 비해서는 높은 것으로 나타났다.

2 펩타이드를 활용한 건강식품 제조의 기술개발 동향

- 최근 건강기능성 소재로 식품 중 단백질의 가수분해물인 생리활성 펩타이드에 관한 연구가 활발히 진행되고 있음. 2017년 “Food지”에 Dalin 등에 의해 발표된 생리활성 펩타이드에 관한 기술 개발 동향 보고서²⁾에 따르면, 현재 펩타이드 생산 기술로 효소의 가수분해에 의한 방법과 미생물 발효에 의한 방법이 개발되어 있다.
- 펩타이드는 체내에서 신경전달물질이나 호르몬 등 조절작용을 수행하고, 그밖에도 면역관련 인터루킨과 세포성장인자 등의 형태로 기능하는데, 대표적인 생리활성 펩타이드로 아편상 펩타이드, 탐식작용 촉진 펩타이드, 혈압강하 펩타이드 혈소판 응집저해 펩타이드, 칼슘흡수촉진 펩타이드, 혈중 콜레스테롤 감소 펩타이드 등을 들 수 있다.
- 펩타이드 제품 개발은 in-vitro study와 in-vivo study를 통한 효능 평가 결과를 바탕으로 펩타이드 함유 제품이 개발되고 있고, 대부분 영양보충의 의미나 비약리적 작용을 근거로 한 제품 개발이 이루어지고 있다.
- 현재 국내 시판중인 펩타이드를 원료로 한 기능성제품은 콜라겐 펩타이드, 콩 펩타이드, 유청 단백질 펩타이드 음료가 주를 이루고 있음. 2016년 6월 보도자료³⁾에 따르면 펩타이드 시장의 성장률은 2005년 이후 연평균 18%의 성장세를 보이고 있으며 의약품과 화장품 등 다양한 바이오소재를 활용되고 있다.
- 국내 증시 자료 분석 결과 현재 펩타이드 의약품 개발 기술력은 세계정상급 기술력을 보유하고 시장 성장에 따른 수혜주로 손꼽히는 상태이며, 세계 최초의 펩타이드 탈모 치료제 개발로 123개의 펩타이드 물질 특허를 보유하고 있고, 펩타이드 필러 분야에서 성장세가 두드러지며, 약효 지속형 당뇨치료제 기술 및 전립선암, 파킨슨병 치료제 등 다양한 약효 지속성 치료제 시장에서 주목받고 있는 기술로 평가되고 있다.

- 현재

알려진 생리활성펩타이드의 효능과 기능성은 다음과 같다.

2) Daliri EB, Oh DH, Lee BH. Bioactive Peptide, Foods 6:32-53, 2017

3) 뉴스. ‘연평균 18% 성장세’ 펩타이드 수혜주는. 2016. 7. 20 보도

Anti-oxidation	
IP, MP, VP, LP AEERYP, DEDTQAMP DHTKE, MPDAHL, FFGFN	Scavenge Hydroxyl radicals Scavenge reactive oxygen species Oxygen radical scavenging, DPPH radical scavenging.
RPNYTD, TSQLSDQ, TRTGDPFF, NFHPQ	DPPH and ABTS radical scavenging, FRAP-Fe ³⁺ reducing ability.
LANAK, PSLVGRPPVVKLTL, VKVLEHPVL WEGPK, GPP and GVPLT	DPPH radicals scavenging ability DPPH, ABTS, and hydroxyl radicals scavenging ability, inhibiting lipid peroxidation
PYSFK, GFGPEL, GGRP LSGYGP	Hydroxyl radicals scavenging.
GSGGL, GPGGFI, FIGP	DPPH, Hydroxyl and reactive oxygen radical scavenging
PIIVYWK, TTANIEDRR, FSVVPSPK YYIVS	Hydrogen peroxide radicals scavenging
FIMGPY, GPAGDY and IVAGPQ	DPPH, Hydroxyl and reactive oxygen radical scavenging
ATSHH TPP	DPPH radicals scavenging Lipid peroxidation, radical scavenging activity.
WVAPLK	DPPH, Hydroxyl and reactive oxygen radical scavenging
GASRHWFYFL PYSFK, GFGPEL, VGGRP	DPPH, superoxide, ABTS and hydroxyl radical scavenging, lipid peroxidation.

A = alanine, R = arginine, N = asparagine, D = aspartic acid, C = cysteine, E = glutamic acid, Q = glutamine, G = glycine, H = histidine, I = isoleucine, L = leucine, K = lysine, M = methionine, F = phenylalanine, P = proline, S = serine, T = threonine, W = tryptophan, Y = tyrosine, V = valine. LDL: Low-density lipoprotein, IL: Interleukin, TNF α : tumor necrosis factor alpha, DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, ABTS: 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), FRAP: ferric reducing antioxidant power, IFN γ : interferon gamma.

3. 한방음료 및 제품 평가 기술

- 생약재 성분들을 추출하여 만든 제품을 우리나라에서는 한방음료라고 주로 지칭되며, 서양에서는 herbal drink, 중국에서는 중초약배방 (中草藥配方) 음료라고 불리며, 그 자체가 건강음료로 인식되고 있다.
- 매년 1억 8천만명의 미국인들이 허브를 포함한 천연물에 약 22조원(20억 달러)을 소비하고 있으며 미정부는 FDA의 Botanical Drugs Guidance를 제정하여 천연물의약품 시장의 주도권 경쟁에 대비하고 있다.
- 미국보완대체의학연구센터(National Center for Complementary and Alternative Medicine, NCCAM)에 따르면, 생약재의 생물학적 효과에 대한 실험을 기초 연구로 하고 유효성, 신뢰성, 타당성 있는 연구방법론 구축을 위한 지원이 이루어지고 있다.
- 생약재나 한약재 사용에 대한 경험과 제품에 대한 소비자 신뢰도 등은 우리나라에서 높음

에도 불구하고, 생약제나 한약제의 추출방법이나 제조 기술의 표준화가 이루어져 있지 않아 효능 평가에 기반한 과학적 근거 마련 기술이 부족한 실정이다. 인도의 경우 아유르베다 과학연구 중앙위원회에서는 약용식물을 조사하고, 약물 표준화 연구 프로그램을 수행하고 있다.

- 중국에서 량차(加多寶涼茶)로 불리는 중방 (中草藥配方) 음료는 원래 중국 廣州省 지역에서 즐겨 마시는 음료였지만, 최근 전 중국으로 빠르게 확산되고 있다. 지난해 중국 량차(加多寶涼茶) 2010년까지 매출은 1,500억 위안으로 2002년에는 거의 10배 증가했다.
- 2006년 “중국에서 가장 오래된 브랜드 가치 목록 백”은 5위를 차지했으며 브랜드 가치는 2424억 위안으로, 차와 한방음료 시장 점유율이 각각 45.8%와 9.4%를 차지하고 있다.

7 장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

1 절. 안전 관리 목 적

연구활동에 영향을 미치는 모든 연구활동종사자에게 적절한 연구실안전환경 교육을 실시하여 위험요인 및 업무수행에 필요한 지식을 사전에 습득하도록 함으로써 효율적으로 업무를 수행하고 연구실 사고를 예방하는데 그 목적이 있다.

1. 안전관리 목표 : 안전사고 발생 0건, 안전교육 전원 12시간 이상 이수

- 연구실 안전사고가 한건도 발생되지 않아 사고로 인한 피해 발생 및 연구활동종사자의 건강을 확보한다.
- 지속적인 개선 활동을 통해 지속가능하고 안전한 연구실 환경이 유지되도록 한다.
- 연구실안전환경 조성에 관한 법률 등 관련법률 기준에 적합하도록 운영한다.
- 교육 및 훈련을 통해 연구실 안전의식을 강화하고 사고발생 시 피해가 최소화 되도록 한다.

2. 안전관리 계획

가. 안전교육

- 근거 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제18조(교육·훈련 등)
- 기간 : 매년 03.01.~이듬해 2월
- 대상 : 효능평가실 연구활동종사자 및 학위과정생, 실습 조교

순번	구분	일정	장소	비고
1	정기교육(12시간)	수시	온라인교육	안전교육센터
2	안전교육(2시간)	매년 3월	효능평가실	
3	안전교육(2시간)	매년 8월	효능평가실	
4	사고대비 훈련(1시간)	매년 9월	산학협력관 3층	대응·대피 훈련
5	안전교육(2시간)	매년 10월	효능평가실	
6	안전교육(2시간)	매년 11월	효능평가실	
7	위험성 평가	수시	효능평가실	수시로 위험성 평가 분석

교육 시간	교육 내용	비고
6시간 이상 (신규종사자 또는 특별한 경우 2시간 추가)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 연구실 안전환경 조성 법령에 관한 사항 ▪ 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항 ▪ 보호장비 및 안전장치 취급과 사용에 관한 사항 ▪ 연구실 사고사례 및 사고예방 대책에 관한 사항 ▪ 안전표지에 관한 사항 ▪ 물질안전자료에 관한 사항 ▪ 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항 	신규종사자 또는 특별한 경우 2시간

3. 건강검진

- 근거 : 연구실 안전환경 조성에 관한 시행규칙 제10조(건강검진의 실시)
- 기간 : 매년 10월 중
- 대상 : 효능평가실 연구활동종사자 전체

순번	구분	일정	장소	비고
1	건강검진	매년 10월 중	대전대학교	관리팀에서 일괄 실시
2	재검	~	~	건강검진 이상 시

4. 점검

- 근거 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 시행령 제7조
- 일상점검 : 일상점검표 양식에 맞추어 매일 연구실 안전관리자 작성, 매월 1회 이상 연구실 책임자 확인, 이상 발견 시 즉시 연구실 책임자 및 연구실안전환경관리자에게 보고
- 정기점검 및 정밀점검 : 6월 중 안전관리부서에서 실시, 실시결과에 따른 지적사항에 대해 개선

8 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

1 절. 논문

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사 여부 (단독 사사 또는 중복 사사)	특기사 항 (SCI여 부/인용 횟수 등)
1	논문	Radical scavenging activities of tannin extracted from amaranth (<i>Amaranthus caudatus</i> L.)	대전대학교	참여	Journal of microbiology and biotechnology	1.621	2015.01.22	중복	SCI
2	논문	동의보감에 수재된 오계에 대한 생리활성 연구	대전대학교	교신	대한분초학회지	1.525	2015.09.18	단독	비SCI
3	논문	동의보감에 수재된 오계의 선천면역반응 억제에 관한 연구	대전대학교	교신	동의생리병리학회지	0	2016.08.16	단독	비SCI
4	논문	Melanin extract from <i>Gallus gallus domesticus</i> promotes proliferation and differentiation of osteoblastic MG-63 cells via bone morphogenetic protein-2 signaling	대전대학교	참여	Nutrition Research and Practice	1.679	2017.01.20	중복	SCI
5	논문	Calcium Supplement Derived from <i>Gallus gallus domesticus</i> Promotes BMP-2/RUNX2/SMAD5 and Suppresses TRAP/RANK Expression through MAPK Signaling Activation	대전대학교	참여	nutrients	3.55	2017.05.17	중복	SCI
6	논문	Effect of <i>Gallus gallus</i> var. <i>domesticus</i> (Yeonsan dogolgye) Extracts on Osteoblast Differentiation and Osteoclast Formation	대전대학교	참여	Microbiology and Biotechnology Letters	0	2015.11.20	단독	비SCI

7	논문	Optimization of peptide production from Leg Meat of Yeosan Ogae by High Hydrostatic Pressure and Protein Hydrolytic Enzyme and Its Characteristic Analysis	중부대학교	교신	Journal of Korea Academia-Industrial cooperation Society	0	2016.07.07	단독	비SCI
8	논문	표면반응분석을 이용한 오게 날개육 단백질 가수분해 최적 생산 공정 개발과 생산물의 특성 분석	중부대학교	교신	Journal of The Korean Oil Chemists' Society	0	2016.06.16	단독	비SCI
9	논문	단백질 분해효소를 이용한 오게 다리육 펩타이드 생산 최적화	중부대학교	교신	Journal of The Korean Oil Chemists' Society	0	2016.04.01	단독	비SCI
10	논문	단백질 분해효소를 이용한 연산오게 내장 펩타이드 생산 최적화 및 특성분석	중부대학교	교신	Journal of Digital Convergence	0	2016.01.20	중복	비SCI
11	논문	표면 반응 분석법에 의한 곤드레 블랜칭 최적 공정 확립 및 향산화 능에 미치는 영향	중부대학교	교신	Journal of The Korean Oil Chemists' Society	10.12925	2016.12.28	단독	비SCI
12	논문	Process Optimization of Peptides Production from Protein of Sea Cucumber and Its Antioxidant Capacity Analysis	중부대학교	교신	J. of Korean Oil Chemists' Soc.,	0	2017.06.29	단독	SCI
13	논문	Optimization of Blanching Process of Cirsium setidens and Influence of Blanching Antioxidant Capacity	중부대학교	교신	J. of Korean Oil's Chemists' Soc.,	0	2017.03.31	단독	비SCI
14	논문	In vitro Antioxidant Activity of Ogae (Korean Native Black Fowl) Egg White Protein Hydrolysates Fractionated by Ultrafiltration	중부대학교	교신	Journal of Oil & Applied Science	0	2017.09.10	단독	비SCI

15	논문	Antioxidant Activity of Oga e Egg White Protein Hydrol ysates using commercial Pro tease	중부대학교	교신	Journal of Oil & Appli ed Science	0	2017.09.04	단독	비SCI
16	논문	혼합용매를 이용한 진생베리 추출물 최적 공정 개발 및 추 출물의 진세노사이드 분석	중부대학교	교신	한국산학기 술학회논문 지	0	2015.11.16	단독	비SCI
17	논문	Optimization of Blanching Pr ocess of Cirsium setidens b y Response Surface Method ology and Influence of Blanc hing on Antioxidant Capacit y	중부대학교	교신	J. of Korea n Oil Chem ists'Soc.,	0	2017.12.28	단독	비SCI
18	논문	Effect of herbal beverage co ntaining Yeonsan Ogye pepti de on locomotor capacity, le vels of plasma lipids, and-o xidant indexes in rats	대전대학교	교신		0		단독	SCI
19	논문	연산오계육 및 육수의 영양성 분 분석	대전대학교	교신	Journal of Nutrition an d Health	0		단독	비SCI

2 절. 특허

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재 지/ 특허등록 국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사 여부 (단독 사사 또는 중복 사사)	특기사항 (SCI여 부/인용 횟수 등)
1	특허	항염증 활성을 갖는 연산오계 추출물 및 이를 포함하는 항염증용 조성물	중부대학교	발명인	대한민국	N/A	2016.09.19	N/A	N/A
2	특허	관절염 예방 및 치료 효능을 갖는 연산오계 추출물 및 이를 포함하는 관절염 예방 및 치료용 조성물	중부대학교	발명인	대한민국	N/A	2016.09.19	N/A	N/A
3	특허	연산오계 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증용 조성물	중부대학교	발명인	대한민국	N/A	2015.10.15	N/A	N/A
4	특허	항염증 활성을 갖는 연산오계 추출물 및 이를 포함하는 항염증용 조성물.	중부대학교	등록인	대한민국	N/A	2017.06.21	N/A	N/A
5	특허	오계 펩타이드 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물 및 이의 제조방법	중부대학교	발명인	대한민국	N/A	2015.12.08	N/A	N/A
6	특허	연산 오계란 펩타이드 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물 및 이의 제조방법	중부대학교	발명인	대한민국	N/A	2017.11.24	N/A	N/A

3 절. 학술발표

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사 여부 (단독 사사 또는 중복 사사)	특기사항 (SCI여 부/인용 횟수 등)
1	학술	Power of Antioxidant Activity of Yeonsan Ogae (Gallus gallus domesticus) Visceral Protein Hydrolysates Produced by Different Commercial Proteases	중부대학교	발표자	New Challenges in the post-genomic Era	N/A	2016.08.23	N/A	N/A
2	학술	Characteristics of Egg White Protein Hydrolysates of Yeonsan Ogae (Gallus gallus domesticus) and Their Antioxidant Activity	중부대학교	발표자	New Challenges in the Post-genomic Era	N/A	2016.08.23	N/A	N/A
3	학술	In vitro Antioxidant Characteristics of Yeonsan Ogae (Gallus gallus domesticus) Breast Meat Protein Hydrolysates	중부대학교	발표자	New Challenges in the Post-genomic Era	N/A	2016.08.23	N/A	N/A
4	학술	Extraction and Characterization of Antioxidant Peptides Produced from Meat Protein of Yonsan Ogae by Commercial Proteases	중부대학교	발표자	Food science for Daily Living via innovation and Convergence	N/A	2016.08.19	N/A	N/A

5	학술	Characterization and in vitro of Antioxidant Activity of Peptides Derived from the Viscera Protein of Black Body Fowl (Yonsan Ogae) and its fraction a	중부대학교	발표자	2016 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting	N/A	2016.08.23	N/A	N/A
6	학술	Purification and Identification of Hydrolysate of Egg White Protein Derived from Yeonsan Ogae and Their Antioxidant properties	중부대학교	발표자	2016 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting	N/A	2016.08.19	N/A	N/A
7	학술	Optimization of Functional Peptides Production from Black Chicken Yeonsan Ogae by Proteases	중부대학교	발표자	미래창조계제를 위한 산학협력활성화	N/A	2015.05.22	N/A	N/A
8	학술	Optimization of Enzyme Reaction Parameters for Production of Functional Peptides from Legs Meat of Yeonsan Ogae using Response Surface Methodology	중부대학교	발표자	International Symposium and Annual Meeting	N/A	2014.06.04	N/A	N/A
9	학술	Process Optimization of Functional Peptides Production from Breast meat of Yeonsan Ogae by Proteases.	중부대학교	발표자	2015 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting	N/A	2015.06.04	N/A	N/A
10	학술	프로테아제를 이용한 오계 가슴살의 멜라닌 추출 공정 확립 및 물리화학적 특성	중부대학교	발표자	Phytonutrients and Healthy Foods	N/A	2015.08.25	N/A	N/A

11	학술	연산오계 부산물 내장으로부터 프로테아제를 이용한 기능성 펩타이드 최적 생산 공정개발	중부대학교	발표자	2015 KFN International Symposium and Annual Meeting	N/A	2015.08.25	N/A	N/A
12	학술	고압기를 이용한 1년산 연산오계 다리살 단백질의 가수분해물 최적 공정 확립 및 특성	중부대학교	발표자	2015 KFN International Symposium and Annual Meeting	N/A	2015.08.25	N/A	N/A
13	학술	고압기를 이용한 연산오계육 부산물인 내장단백질의 가수분해물 제조 공정 확립 및 특성	중부대학교	발표자	2015 KFN International Symposium and Annual Meeting	N/A	2015.08.25	N/A	N/A
14	학술	The Study on Biological Activities of Yeosan Ogye listed on Dong-ui-bo-gam	중부대학교	발표자	Nutrition and Omics: Challenges and Break through	N/A	2015.11.06	N/A	N/A
15	학술	Nutrient analysis of Yeosan Ogye, a Korean native chicken	대전대학교	발표자	Korean Society of Food Science and Technology	N/A	2015.11.23	N/A	N/A
16	학술	Study on Mineral Contents of Yeosan Ogye Meat and Broth	대전대학교	발표자	2015 KoSFosST International symposium and Annual Meeting	N/A	2015.06.03	N/A	N/A
17	학술	Isolation and purification of Melanin from meat of black Fowl by multi stage enzymatic reaction	중부대학교	발표자	International next generation conference technology association	N/A	2017.01.04	N/A	N/A
18	학술	나노 리포솜을 연산오계란 펩타이드 포집 효율 및 안정화 연구	중부대학교	발표자	2017 Spring Conference on The Korean Oil Chemists's Society	N/A	2017.05.19	N/A	N/A
19	학술	한외 여과막을 이용하여 분획한 연산오계 내장육 향산화 기능성 펩타이드 특성	중부대학교	발표자	2017 Spring Conference on The Korean Oil Chemists's Society	N/A	2017.05.19	N/A	N/A

20	학술	연산 오계육으로부터 생산된 기능성 펩타이드에 대한 대두 레시틴 리포솜 포집 특성	중부대학교	발표자	2017 Spring Conference on The Korean Oil Chemists's Society	N/A	2017.05.19	N/A	N/A
21	학술	홍삼박으로부터 분리 정제된 산성다당체 항산화능 특성	중부대학교	발표자	2017 Spring Conference on The Korean Oil Chemists's Society	N/A	2017.05.19	N/A	N/A
22	학술	연산오계 펩타이드의 생체 내 항산화 효능 평가를 기반으로 한 한방음료 및 경옥고환 개발	대전대학교	발표자	Integrative Nutrition for an Active Life	N/A	2017.11.03	N/A	N/A
23	학술	레시틴으로부터 제조된 리포솜으로부터 오계육으로부터 생산된 기능성 펩타이드의 in vitro 방출 특성	중부대학교	발표자	2017 Fall Conference on The Korean Oil Chemistry's Society	N/A	2017.11.03	N/A	N/A
24	학술	Antioxidant activity and skin anti-aging effect of Schisandra chinensis hot-water extract	중부대학교	발표자	2017 Fall Conference on The Korean Oil Chemistry's Society	N/A	2017.11.03	N/A	N/A
25	학술	연산오계 펩타이드 한방음료 개발	대전대학교	발표자	2017 Spring Conference on The Korean Oil Chemists' Society	N/A	2017.05.19	N/A	N/A

- 특허의 경우는 특허출원 성과는 달성하였으며, 등록(목표 2종)에 있어 1종은 등록이 완료 되었으나 1종이 현재(2018. 01.11 기준) 등록대기상태에 있음. 이는 당해연도에 등록이 완료될 것임. 따라서, 성과는 2018 년차별 “연구결과 활용보고서”제출시 제시예정임(종료). - 논문의 경우, 비SCI(목표 6건, 달성 12건)은 게재 완료되었으나, SCI부분에서 목표(4건) 대비 3건이 게재가 완료 되었으며 나머지 1 건은 게재 심사가 진행중이며, 당해연도(2018. 11.~12월)에 완료예정임. 따라서 지속적인 노력으로 학술 성과 달성을 하여 연구종료 후 성과지표에 반 영할 예정임.

9 장. 기타사항

산업기술 인력양성

No	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
1	연산오계를 이용한 가수분해물 식품산업화	연산오계를 이용한 가수분해물 식품산업화 전략 방안	지산농원	1	4	14
2	연구진행 발표 및 기술이전 방안	연산오계육 및 부산물로부터 기능성식품 소재 개발 및 기능성분석결과	중부대학교	1	4	15

홍보일	홍보유형	국내외	매체명	제목
2016 9월 8일 ~ 9월14일	지방일간지	국내	굿모닝 충청투데이	중부대, '연산오계' 고부가가치 산업화 이끈다



기술거래(이전) 등

	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
	농식품 (가공공정)	오계를 활용한 오계죽 가정간편식 레시피 및 기술공정에 관한 노하우	대전대학교 산학협력단	2016년 9월 6일	당해연도 말 기준 익월5일 이내, 순매출이익액의 2%	

10 장. 참고문헌

- [1] E.S. Harold, E. A. Darrell, I. F. Evan, A. M. John, "A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species", *Journal of Nutritional Biochemistry*, Vol. 18, pp. 567-79. (2007).
- [2] D.S. Jung, "Player's training of physical strength and reactive oxygen", Vol. 86, pp. 32-39, (2003).
- [3] Bernard, "Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity", *J E thnopharm* Vol. 82, pp. 155-158, (2002).
- [4] D.A. Dalton, L. Langeberg, N.C. Treneman, "Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules", *Physiol Plant*, Vol. 87, pp. 365-370, (1993).
- [5] O.I. Aruoma, "Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidant", *Food and Chem. Toxicol.*, Vol. 32, No 7 pp.671-683, (1994).
- [6] B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Loliger, O.I. Aruoma, "The characterization of antioxidants", *Food Chem Toxicol.*, Vol. 33, No 7 pp. 601-617, (1995).
- [7] G. Samak, R.P. Shenoy, S.M. Manjunatha, K.S. Vinayak, "Superoxide and hydroxyl radical scavenging actions of botanical extracts of *Wagatea spicata*", *Food Chem.*, Vol. 115, No 2 pp. 631-634, (2009).
- [8] C.T. Ho, Phenolic compounds in food. In : Phenolic compounds in food and their effects on health II. Maple Press. New York. p. 2-7. Huan MT, Ho CT, Lee CY Editors, (1992).
- [9] K. Azuma, M. Kakayama, M. Koshika, K. Ippoushi, Y. Yamaguchi, K. Kohata, Y. Yamachi, H. Ito, H. Higashio, "Phenolic antioxidant from the leaves of *Corchorus olitorium*L", *J Agric Food Chem*, Vol. 47, pp. 3963-3966, (1999).
- [10] S.S. Ham, J.K. Hong, J.H. Lee, "Antimutagenic effects of juices from edible Korean wild herbs", *J Food Sci Nutr*, Vol 2, pp. 155-161, (1997).
- [11] E. Salminen, J. Rintala, "Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste a review", *Bioresour. Technol*, Vol. 83, pp. 13-26, (2002).
- [12] A.L. McCarthy, Y.C. O'Callaghan, N.M. O'Brien, "Protein Hydrolysates from Agricultural Crops-Bioactivity and Potential for Functional Food Development", *Agriculture*, Vol 3, pp 112-130, (2013).
- [13] L. Qing, L.i. Yi, M. Peter, I. Brent, "Commercial proteases: Present and future", *FEBS Letters*, Vol. 587, pp. 1155-1163, (2013).
- [14] B. Cigic, M. Zelenik-Blatnik, "Preparation and characterization of chicken egg white hydrolysate", *Acta Chimica Slovenica*.Vol. 51, pp. 177-188, (2004).
- [15] K. Elavarasan, B.A. Shamasundar, B. Faraha, H. Howell, "Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and structural properties of oven- and freeze-dried protein hydrolysate from fresh water fish (*Cirrhinus mrigala*)", *Food Chemistry*, Vol. 206, pp. 210-216, (2016).

- [16] I.V. Nikolaev, S. Sforza, F. Lambertini, D.Y. Ismailova, V.P. Khotchenkov, V.G. Volik, A. Dossena, V.O. Popov, O.V. Koroleva, "Biocatalytic conversion of poultry processing leftovers: Optimization of hydrolytic conditions and peptide hydrolysate characterization", *Food Chemistry*, Vol. 197, pp. 611–621, (2016).
- [17] Y.Y. Sun, D.D. Pan, Y.X. Guo, J.J. Li, "Purification of chicken breast protein hydrolysate and analysis of its antioxidant activity", *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 50, pp. 3397–3404, (2012).
- [18] T. Mesut, E. Nevzat, O. Serkan, "Efficient production of L-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61Original", *Food and Bioprocess Technology*, Vol. 90, pp. 773–779, (2012).
- [19] F. Nahed, K. Naourez, H. Anissa, H.M. Ibtissem, D. Ines, N. Moncef, "Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity", *Process Biochemistry*, Vol. 46, pp. 1731–1737, (2012).
- [20] O. John, O.G. Abraham, T.M. Sunday, A.A. Rotimi, E.A. Michel, "Kinetics of in vitro renin and angiotensin converting enzyme inhibition by chicken skin protein hydrolysates and their blood pressure lowering effects in spontaneously hypertensive rats", *Journal of Functional Foods*, Vol. 14, pp. 133–143, (2015).
- [21] S. Jain, A.K. Anal, "Optimization of extraction of functional protein hydrolysates from chicken egg shell membrane (ESM) by ultrasonic assisted extraction (UAE) and enzymatic hydrolysis", *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 69, pp. 295–302, (2016).
- [22] R.C. Clark, "The primary structure of avian phosvitins. Contributions through the Edman degradation of methylmercaptovitins prepared from the constituent phosphoproteins". *Int. J. Biochem.* Vol. 17, pp. 983–988. (1985).
- [23] G. Tarborsky, "Interaction between phosvitin and iron and its effect on a rearrangement of phosvitin structure". *Biochem.-US.* 2, 266–271, (1963).
- [24] I. Choi, C. Jung, H. Seog, H. Choi, "Purification of phosvitin from egg yolk and determination of its physicochemical properties". *Food Sci. Biotechnol.* Vol. 13, pp. 434–437. (2004).
- [25] S.K. Lee, J.H. Han, E. A. Decker, "Antioxidant activity of phosvitin in phosphatidylcholine liposomes and meat model systems". *J. Food Sci.* Vol. 67, pp. 37–41. (2002).
- [26] C.L. Lu, R.C. Baker, "Characteristics of egg yolk phosvitin as an antioxidant for inhibiting metal-catalyzed phospholipid oxidations". *Poultry Sci.*, Vol. 65, pp. 2065–2070. (1986).
- [27] J. Park, S. Na, Y. Lee, "Present and future of nonthermal food processing technology." *Food Sci. Ind.* Vol. 75, pp. 1–20. (2010).
- [28] R.Z. Gu, W.Y. Liu, F. Lin, Z.T. Jin, L. Chen, W.X. Yi, J. Lu, M.Y. Cai, "Antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of oligopeptides derived from black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) muscle", *Food Research International*, Vol. 49, pp. 326–333, (2012).
- [29] H.S. Chae, Y.M. Yoo, C.N. Ahn, S.H. Cho, B.D. Sang, Y.G. Kim, J.M. Lee, S.K. Yun, Y.I. Choi, "Feeding Effects of the High Pressure Boiled Extract (HPBE) of the Ogol Chicken

- on Weight Gain and Serum Lipid Composition of Rat”, Korean J Poult Sci, Vol. 30, pp. 135–143, (2003).
- [30] H.S. Chae, Y.M. Yoo, C.N. Ahn, S.H. Cho, B.Y. Park, J.M. Lee, Y.K. Kim, S.G. Yun, Y.I. Choi, “Chemical and Sensory Characteristics of Boiled Soup Extracted from Crossbred Ogot Chicken as Affected by the Level of Flavourzyme”, Korean J Poult Sci, Vol. 30, pp. 11–16, (2003).
- [31] H.S. Yoo, K.H. Chung, K.J. Lee, D.H. Kim, J.H. An, “Effect of Gallus gallus var. domesticus (Yeonsan ogolgye) Extracts on Osteoblast Differentiation and Osteoclast Formation”, Microbiol. Biotechnol. Lett. Vol. 43, pp. 322–329, (2015).
- [32] H.S. Chae, C.N. Ahn, Y.M. Yoo, J.S. Ham, J.M. Lee, S.K. Yoon, Y.I. Choi, “The Effects of the High Pressure Boiled Extracts (HPBE) of the Ogot Chicken with Herbs on the Hormones, Cytokine, Specific Antibody of Serum in the Rat”, Korean J Food Sci Anim Res., Vol. 24, pp. 283–292, (2004).
- [33] W.J. Lahl, S.D. Braun, “Enzymatic production of protein hydrolysates for food use”, Food Technol, Vol. 48, pp. 68–71, (1994).
- [34] R.D. Bernardini, P. Harnedy, D. Bolton, J. Kerry, E. O’Neill, A.M. Mullen, M. Hayes “Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products”, Food Chemistry, Vol. 124, pp. 1296–1307, (2011).
- [35] H.W. Seo, E.Y. Jung, G.W. Go, G.D. Kim, S.T. Joo, H.S. Yang, “Optimization of hydrolysis conditions for bovine plasma protein using response surface methodology”, Original Research Article Food Chemistry. Vol. 185, pp. 106–111, (2015).
- [36] S. Zhu, C.Y. Wang, P. Zhang, “Characterization and in vitro antioxidation of papain hydrolysate from black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) muscle and its fractions”, Food Research International, Vol. 44, pp. 133–138, (2011).
- [37] S.S. Pitchumoni, P.M. Doraiswamy, “Current status of antioxidant therapy for Alzheimer’s disease”, J Am Geriatr Soc., Vol. 46, pp. 1566–1572. (1998).
- [38] M.S. Blois, “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical”, Nature, Vol. 18, pp. 1000, (2004).
- [39] X.B. Fan, C.J. Li, D.N. sha, “The establishment of o-phenanthroline chemiluminescent system for measuring OH radical”, Basic Medical Sciences and Clinics. Vol. 18, No. 6 pp. 468–471. (1998).
- [40] W. Yu, Y. Zhao, Z. Xue, H. Jin, D. Wang, “The antioxidant properties of lycopene concentrate extracted from tomato paste”, Journal of the American Oil Chemists Society. Vol. 78, No. 7 pp. 697–701. (2001).
- [41] I. Gulcin, “Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid)”, Toxicol., Vol. 217 No. 2 pp. 213–220, (2006).
- [42] S.H. Shon, I.H. Cho, Y.S. Kim, “Comparison of pyrazines formed in chicken by products hydrolyzed by Enzymes”, Korea J. Soc. Food Cookery Sci., Vol. 20, pp. 265–270, (2004).
- [43] I. Gulcin, D. Berashvili, A. Gepdiremen, “Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankenensis* decne”, J. Ethnopharmacol., Vol. 101, No 1–3 pp. 287–2

93, (2005).

[44] RE. Aluko, E. Monu, "Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates", *Journal of Food Science*, Vol. 68, pp. 1254-1258, (2003).

[45] S. Sakanaka, Y. Tachibana, Y. Okada, "Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha)", *Food Chemistry*, Vol.89, pp.569-575. (2005).

[46] S.N. Jamdar, V. Rajalakshmi, A. Sharma, "Antioxidant and ACE inhibitory properties of poultry viscera protein hydrolysate and its peptide fractions", *Journal of Food Biochemistry*, Vol. 36, pp. 494-501, (2012).

[47] T.Y. Kim, T.W. Jeon, S.H. Yeo, S.B. Kim, J.S. Kim, J.S. Kwak, "Antimicrobial, antioxidant and SOD-like activity effect of Jubak extracts", *Korean J Food Nutr*, Vol. 23, pp. 299-305. (2010).

[48] H.W. Kang, "Antioxidative activity of extracts from *Cichorium endivia* L.", *J Korean Soc Food Sci Nutr*, Vol. 41, pp. 1487-1492, (2012).

[49] K. Kitani, C. Minami, T. Yamamoto, S. Kanai, G.O. Ivy, M.C. Carrillo, "Pharmacological interventions in aging and age-associated disorders : potentials of propargylamines for human use." *Ann N Y Acad Sci*, Vol. 959, pp. 295-307, (2002).

[50] M.Y. Yoo, S.K. Kim, J.Y. Yang, "Characterization of an antioxidant from sporophyll of *Undaria pinnatifida*", *Korean J Microbiol Biotechnol*, Vol. 32, pp. 307-311, (2004).

[51] A.T. Girgih, C.C. Udenigwe, R.E. Aluko, "In vitro antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions", *Journal of the American Oil Chemists Society*, Vol. 88, pp. 381-389, (2010).

[52] L. Vandanjon, S. Cros, P. Jaouen, F. Quemeneur, P. Bourseau, "Recovery by nanofiltration and reverse osmosis of marine flavours from seafood cooking waters". *Desalination*, Vol. 144, No.1-3, pp. 379-385, (2002).

[53] Z.Y. Li, A.H. Kittikun, W. Youravong, "Separation of protease from yellowfin tuna spleen extract by ultrafiltration: Effect of hydrodynamics and gas sparging on flux enhancement and selectivity", *Journal of Membrane Science*, Vol. 311, No. 1-2, pp. 104-111, (2008).

[54]. L. Chabeaud, P. Vandanjon, P. Bourseau, M. Jaouen, F. Chaplain-Derouiniot, "Guerard Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: Application to the refining of bioactive peptidic fractions", *Separation and Purification Technology*, Vol. 66, No. 3, pp. 463-471, (2009).

[55] K.C. Hsu, E.C.Y. Li-Chan, C.L. Jao, "Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7", *Food Chemistry*, Vol. 126, No. 2, pp. 617-622, (2011).

[56] A.T. Girgih, C.C. Udenigwe, R.E. Aluko, "In vitro antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions", *Journal of the American Oil Chemists Society*, Vol. 88, pp. 381-389, (2010).

[57] I. Batista, C. Ramos, J. Coutinho, N.M. Bandarra, M.I. Nunes, "Characterisation of protein hydrolysates and lipids obtained from blackscabbard fish (*Aphanopus carbo*) by-products

and antioxidative activity of the hydrolysates produced", *Process Biochemistry*, Vol. 45, pp. 18-24,(2009).

[58] C.C. Udenigwe, Y.L. Lu, C.H. Han, W.C. Hou, R.E. Aluko, "Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages". *Food Chemistry*, Vol.116, pp.277-284, (2009).

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.