

최 종
연구보고서

GA0396-0249

계담 및 계관으로 부터의 생리활성 물질 분리 및
이용에 관한 연구

Studies on Isolation and Utilization of Functional
Compounds from Chicken Bile and Comb

연 구 기 관

한국식품개발연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “계담 및 계관으로 부터의 생리활성 물질 분리 및 이용에 관한 연구”에 관한 연구 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2003년 8월 일

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 이 남 혁

연 구 원 : 양 승 용

연 구 원 : 성 기 승

연 구 원 : 조 진 호

연 구 원 : 김 영 호

연 구 원 : 김 현 덕

요 약 문

I. 제 목

계담 및 계관으로 부터의 생리활성 물질 분리 및 이용에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 계관 및 계담으로부터의 생리활성 물질의 분리 정제기술 개발
- 건강보조식품 개발(음료, 캡슐)

III. 연구개발 내용 및 범위

- 1차년도 : 생리활성 물질의 분리 정제 기술개발
 - 계담 및 계관으로부터의 생리활성 물질 탐색
 - 생리활성 물질의 분리 및 정제
 - 각종 생리활성 물질의 *in vitro* 시험
- 2차년도 : 생리활성 물질의 대량생산 공정 개발 및 제품개발
 - 각종 생리활성 물질의 *in vivo* 시험
 - 생리활성 물질의 대량생산 공정 개발
 - 생리활성 물질을 이용한 건강보조식품 개발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 실험에서는 닭 쓸개 및 벼슬의 생리활성 물질 분리 및 이용 연구를 하기 위하여 TLC, HPLC 및 SDS-PAGE를 이용하여 정성 및 정량 분석을 하였다. 쓸개에서 분리된 물질은 항균활성, 전자공여능, 아질산염 소거능 및 ACE 저해능을, 벼슬에서 분리된 추출물은 겔화 식품의 보수력에 관한 것을 검토하였다.

(1) TLC 및 HPLC를 이용하여 정성 및 정량 분석한 결과 닭 쓸개 담즙 산에서 taurochenodeoxycholic acid와 taurocholic acid를 확인하였고 이들의 함량은 taurochenodeoxycholic acid가 5893mg/100g, taurocholic acid는 385mg /100g 이었다.

(2) 닭 쓸개의 methanol 추출물은 *Bacillus cereus*에 대하여 강한 항균활성을 보였으며 *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* 그리고 *Vibrio parahaemolyticus*에 대해서도 항균 spectrum를 나타내었다. 그러나 일반 식품오염 미생물인 *Escherichia coli*에 대해서는 항균활성을 보이지 않았다.

(3) 닭 쓸개의 methanol 추출물과 냉동건조물에서의 전자공여능은 시료의 농도가 증가할수록 유의적으로 증가하였다. 또한 pH 1.2에서 측정 한 아질산염 소거작용은 methanol 추출물이 냉동건조물 보다 우수하였으며 두 시료 모두 농도가 높을수록 소거능은 유의적으로 증가하였다.

(4) Angiotensin I-converting enzyme (ACE) 저해 작용도 methanol 추출물과 냉동건조물 모두에서 나타났으며, 첨가량을 증가시켰을 때 methanol 추출물의 작용이 냉동건조물의 경우 보다 상승폭이 큰 것으로 확인되었다.

(5) rat를 이용한 동물실험은 혈중 총콜레스테롤, LDL, HDL, 중성지방 GOT 및 GPT를 측정한 결과 계담을 첨가한 것이 HDL을 제외하고 약간 낮게 나타나는 경향을 보여주었다.

(6) 닭 벼슬로부터 분리한 추출물의 주성분은 약 30만의 분자량을 지니고 있는 무코단백질인 것으로 추정되었다.

(7) 0.6M NaCl 공존하의 근원섬유 단백질에 벼슬 추출물을 첨가한 결과, 단백질과 추출물과의 상호작용이 일어나 고분자화가 일어나는 것으로 사료되었다.

SUMMARY

I. Title

Studies on Isolation and Utilization of Functional Compounds from Chicken Bile and Comb

II. Objective and Significance of Research

- o Preparation of functional compounds.
- o Development of functional foods (drink, capsule).

III. Scope

- o First year : Preparation of functional compounds.
 - Study on physiological activities of functional compounds from chicken bile and comb.
 - Preparation of function compounds.
 - *In vitro* test on physiological activities of functional compounds.
- o Second year : Development of manufacturing process of functional compounds and functional foods.
 - *In vivo* test on physiological activities of functional compounds.
 - Development of manufacturing process of functional compounds.
 - Development of functional foods using functional compounds.

IV. Results and Recommendation

The chicken bile and comb were investigated for the determination of physiological activities and the profile of bile salts by HPLC TLC and SDS-PAGE. In the case of extract isolated from chicken bile, the activities determined were antimicrobial activity, electron donating ability, nitrite scavenging ability and the inhibitory activity to angiotensin I-converting enzyme (ACE), and extract of comb were investigated for interaction between comb extract and myofibrillar protein from pork.

1. Taurochondeoxycholic acid (TCDOA) and taurocholic acid (TCA) were found to be the major bile salts, and their amounts determined by HPLC to 5893 and 385mg/100g respectively.

2. The methanol extracts of chicken bile showed growth inhibitory effect to *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*, whereas no effect against *Escherichia coli*.

3. The electron donating ability was increased significantly with the increased concentration of bile samples, the methanol extracts and the freeze dried powder. The nitrite scavenging ability indicated also a positive result. The electron donating activity was estimated to show higher in the freeze dried powder than that of the methanol extracts, whereas nitrite scavenging activity of methanol extracts higher than that of freeze dried sample.

4. The inhibitory activity to ACE was determined to positive from both of two samples. A significant evidence was detected that the

methanol extracts showed higher activity than that of freeze dried powder at high level of bile sample, 5 and 10%. No significant difference, however, was detected at level of 0.1 and 1 %.

5. *In vivo* test using rat for total cholesterol, HDL, LDL, triglyceride, GOT and GPT showed low value except for HDL.

6. On the other hand, main component of extract prepared from comb was estimated muco-protein of correspond to M.W 300kD.

7. When extract of comb were reacted with myofibrillar protein in 0.6M NaCl, it occurred polymerization by interaction between comb extract and myofibrillar protein.

CONTENTS

SUMMARY.....

Chapter 1. Outline of the research.....

Chapter 2. State-of-the-art

Chapter 3. Scopes and results of the research.....

Section 1. Scopes of the research.....

1. material
2. Component analysis
3. Preparation of bile acid
4. Extract of comb.....
5. Analysis of bile acid using TLC.....
6. Analysis of bile acid using HPLC.....
7. Analysis of comb extract using SDS-PAGE.....
8. Measurement of antimicrobial activity
9. Measurement of electron donating ability
10. easurement of nitrite scavenging ability
11. Measurement of ACE inhibition
12. Measurement of digestive ability
13. Breeding of experimental animal
14. Analysis of GOT
15. Analysis of GPT
16. Analysis of HDL
17. Analysis of LDL

18. Analysis of triglyceride
19. Analysis of total cholesterol
20. H₂O₂ content
21. SOS activity
22. Catalase activity
23. GP activity
24. MDA activity
25. Light microscope

Section 2. Result and discussion.....

1. Isolation of functional compounds from chicken bile and comb

- 1) Component analysis
- 2) Preparation of functional compounds
- 3) TLC analysis of functional compound
- 4) HPLC analysis of functional compound

2. Functionality of extraction isolated from chicken bile and comb

- 1) Antimicrobial activity
- 2) Electron donating ability
- 3) Nitrite scavenging ability
- 4) ACE inhibition
- 5) Digestive ability
- 6) Interaction between comb extract and myofibrillar protein

3. *In vivo* test using rat and mouse

- 1) Weight of rat

- 2) Total cholesterol
- 3) Low density lipoprotein
- 4) High density lipoprotein
- 5) Triglyceride
- 6) Glutamic-oxaloacetic transaminase
- 7) Glutamic-puruvic transaminase
- 8) SOD activity of mouse liver by oral administration
- 9) H₂O₂ content of mouse liver by oral administration
- 10) Catalase activity of mouse liver by oral administration
- 11) MDA content of mouse liver by oral administration
- 12) GP activity of mouse liver by oral administration
- 13) Light microscope of mouse liver by oral administration
- 14) H₂O₂ content of mouse liver treated with paraquat
- 15) SOD activity of mouse liver treated with paraquat
- 16) Catalase activity of mouse liver treated with paraquat
- 17) GP activity of mouse liver treated with paraquat
- 18) MDA content of mouse liver treated with paraquat
- 19) Light microscope of mouse liver treated with paraquat

Section 4. Preparation of functional compounds and manufacturing of experimental functional-product

1. Flow chart of manufacturing process
2. Manufacturing of experimental functional-product
3. Examination of sensory evaluate of functional drink

Chapter 4. Achievement and contribution to related field

Chapter 5. Application plan of the results

Chapter 6. Technical oversea information collected during
research

Chapter 7. Reference.....

목 차

요 약 문.....	
제 1 장 연구개발과제의 개요.....	
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	
제 1 절 연구개발수행 내용	
1. 시료	
2. 일반성분 분석	
3. Chicken bile acid의 추출	
4. 계관 추출물	
5. TLC를 이용한 bile acid의 정성분석	
6. HPLC를 이용한 bile acid의 정량분석	
7. SDS-PAGE를 이용한 계관 추출물의 분석	
8. 항균활성	
9. 전자공여능 측정	
10. 아질산염 소거능	
11. ACE 저해작용	
12. 소화력 측정	
13. 실험동물의 사육	
14. GOT 분석	
15. GPT 분석	
16. HDL 분석	
17. LDL 분석	

18. Triglyceride 분석
19. Total cholesterol 분석
20. H₂O₂ 함량
21. SOS 활성
22. Catalase 활성
23. GP 활성
24. MDA 활성
25. 간장의 조직학적 변화

제 2 절 결과 및 고찰

1. 계담 및 계관으로부터의 생리활성 물질 분리

- 1) 일반 성분 분석
- 2) 생리활성 물질 추출
- 3) Bile acid의 정성분석
- 4) HPLC를 이용한 bile acid의 함량 측정

2. 계담 및 계관 추출물의 기능성

- 1) 항균활성
- 2) 전자공여능
- 3) 아질산염 소거작용
- 4) ACE 저해작용
- 5) 소화력 측정
- 6) 계관 추출물과 돈육 단백질의 상호작용

3. 동물시험

- 1) rat의 체중에 미치는 계담의 영향
- 2) 혈중 총콜레스테롤 함량

- 3) Low density lipoprotein(LDL) 함량
- 4) High density lipoprotein(HDL) 함량
- 5) Triglyceride 함량
- 6) Glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT)
- 7) Glutamic-pyruvic transaminase (GPT)
- 8) 경구 투여한 mouse의 SOD 활성도 변화
- 9) 경구 투여한 mouse의 H₂O₂ 함량 변화
- 10) 경구 투여한 mouse Catalase 활성도 변화
- 11) 경구 투여한 mouse의 MDA 함량 변화
- 12) 경구 투여한 mouse의 GP 활성도 변화
- 13) 경구 투여한 mouse의 간장의 조직학적 변화
- 14) Paraquat 투여한 mouse의 H₂O₂ 함량 변화
- 15) Paraquat 투여한 mouse의 SOD 활성도 변화
- 16) Paraquat 투여한 Catalase 활성도 변화
- 17) Paraquat 투여한 GP 활성도 변화
- 18) Paraquat 투여한 MDA 함량 변화
- 19) Paraquat 투여한 mouse의 간장의 조직학적 변화

4. 계담 및 계관으로부터의 기능성 물질 추출 및 시제품 제조

- 1) 공장규모의 시제품 제조 공정도
- 2) 시제품 제조
- 3) 관능검사

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

세계적으로 3대 식육자원중의 하나인 닭은 오래 전부터 식용으로 이용되어진 것으로 추정된다. 닭은 원래 야계였으나 B.C. 1700년경 인도에서 사육하기 시작했으며, 처음에는 신성시되었으나 언제부터인가 달걀과 함께 식용하게 되었다. 우리나라에서는 <고려사>에 충렬왕 때 포계를 금하였다는 기록이 있는 것으로 보아, 이미 그 이전부터 닭이 식용되어 온 것을 알 수 있다. 닭고기는 수육에 비해 연하고 맛이 담백하며 조리하기도 간편하므로 세계적으로 폭 넓게 식용되어 왔다. 최근 국민소득이 증가함에 따라 육류의 소비량이 급증하고 있다. 우리나라의 닭고기의 연간 소비량은 그 동안 계속적인 증가로 인하여 1977년에는 6.1 kg으로 쇠고기 7.9 kg과 거의 비슷한 수준에 이르렀다^(1,2). 2000년도 국내 닭고기 생산량은 21만 6천 500톤, 수입량은 6만 6천 600톤으로서 총 공급량은 32만 8천 100톤이었다. 지난 '98년 21만 1천 200톤에 대비하여 25.6% 증가한 것으로 국내 생산량 약 6.8%, 수입량은 약 51.2%가 증가하였다⁽³⁾.

계육의 소비가 이렇게 큰 폭으로 증가하는 것은 과거에 비하여 현재의 소비형태가 다른데서 오는 결과라고 생각된다. 즉 외식산업과 즉석식품의 발달로 인하여 계육을 재료로 한 식품의 종류가 다양해지면서 과거보다 젊은 층의 소비가 증가하였고, 또한 계육은 지방함량이 낮아 맛이 담백하고 사육기술의 발달로 가격이 저렴하다는 것도 소비 증가의 한 원인이라 할 수 있다. 따라서 이러한 추세는 앞으로도 계속될 전망이다⁽⁴⁾. 더욱이 축산물의 포함한 식품의 소비경향이 양적인 면보다는 품질 위주로 전환되면서 고품질의 식품에 대한 소비자들의 요구가 늘고 있는 추세를 보이고 있다. 서양 선진국에서는 닭고기를 저지방, 저콜레스테롤, 저칼로리, 고단백질 식품으로 인식하여 그 소비 추세가 현재 적육보다 늘고 있

으며, 추가가공에 의한 신제품개발 등으로 계육을 비롯한 가금육의 소비가 급증하고 있고, 특히 닭고기는 부드럽고 특이한 맛과 향이 있어 기호성도 뛰어나기 때문에 모든 연령층에서 애용되고 있다⁽¹⁾.

닭을 비롯한 가금류의 소비가 증가하고 있는 현재의 시점에서 육계도계와 가공처리시 나오는 불가식 및 폐기부산물은 폐기물로 처리되거나 가공하지 않은 채 특수사료(여우 밉크 사료 등)로 이용되거나 또는 rendering(고온 고압 건조 분쇄)공정을 거쳐 사료 원료로 사용된다. 닭과 가금류의 부산물이 폐기물로 처리될 경우 혈액의 경우에는 수질오염의 주된 원인이 되며 이를 처리하기 위해서는 폐수처리시설과 운영경비가 필요하다. 특수사료로 이용할 경우 높은 수분함량에 따른 운송비 증가와 도로 환경오염 그리고 냉장이나 냉동운반 설비 미비로 인한 사료원료로서 품질저하 등의 문제가 발생하며 rendering은 비싼 시설설비와 운영비 그리고 가열에 따른 많은 에너지가 필요하다. 또한 높은 온도로 가열해서 병원성 세균을 죽이고 수분함량을 줄이기 때문에 제품의 영양소 파괴나 손실이 생기게 된다⁽⁵⁾.

이와같이 닭의 부산물이 경제적, 환경적인 문제점으로 부각되는 시점에서 국내·외 최근 연구동향을 보면 Kim 등⁽⁶⁾은 국내 실용 재래닭의 지방산 조성 및 관능적 특성에 대한 연구를 하였고, Jun 등⁽⁷⁾은 많은 공급량에도 불구하고 이용률이 매우 낮은 닭발을 이용하여 죽편을 개발하고자 닭발 사용시 발생하는 닭 특유의 이취를 제거하기 위하여 부재료를 다양한 수준으로 첨가한 후 바람직한 정도를 평가하여 이들의 최적 수준을 결정하였고 냉장시 shelf-life를 측정하였으며, 부재료 첨가로 인해 감소된 닭고기 향미를 증진시키는 동시에 생산 원가를 낮출 수 있는 분말형 닭육수(powdered chicken broth)를 여러 수준으로 첨가한 죽편을 제조하고 관능적 특성을 조사하였다. Chae 등⁽²⁾은 국내산 닭고기의 유통규

격별 지방산, 아미노산 및 콜라겐 함량의 변화에 대하여 조사하였다. 또한 Nam 등⁽⁴⁾은 도살 후 4시간 이내의 신선 계육(신선육), -18℃에서의 동결 계육(동결육) 및 동결 계육을 해동 후 재동결한 계육(재동결육)의 품질을 상호 비교·검토하였다. 이처럼 기존의 식품소재로서 사용되었던 닭의 가식부위에 대한 품질향상 및 특성조사, 소재화 연구등의 식품 가공학적 연구는 많이 이루어지고 있었다.

또한 닭의 비가식 부위(닭머리, 닭벼슬, 닭쓸개 등)에 대한 연구로서 Lee 등⁽⁸⁾에 의해 닭머리를 이용한 육수제품을 개발하기 위한 기초 단계로서 닭머리의 침지 및 데침과정과 같은 전처리 조건이 닭머리 육수의 품질에 미치는 영향에 대한 연구와 Cha 등⁽⁵⁾에 의한 닭 불가식 및 폐기 부산물의 사료자원화 가능성을 검토하기 위한 부산물에 산을 첨가한 뒤 자가분해(autolysis)중 일어나는 pH 및 지방산 조성 변화 그리고 자가분해산물과 탄수화물 filler인 소맥피(wheat bran, WB)의 혼합과 혼합물의 오븐(oven) 건조에 따른 일반성분과 미생물 총균수 변화를 조사하였다.

최근들어 생리활성 성분에 대한 관심과 연구가 활발해 지면서 닭 부산물에 대한 관심도 높아져 Shim 등⁽⁹⁾에 의하여 초식동물의 쓸개즙 추출물(bovine bile)에서 항산화 활성을 가진 물질을 분리하고 이 물질의 다양한 항산화성 역가측정과 mouse에서 척수신경세포의 살아있는 세포수를 조사하여 그 생물학적 효과를 검증하고 그 기능성 물질의 패턴을 확인하는 등의 연구만이 이루어졌을 뿐이다.

닭 부산물에 대한 국외의 연구로는 식품원료로서의 연구에서부터 가공 및 기능성 등의 자료들이 그다지 많지 않으며 그 중 생리활성 물질에 대한 내용은 단지 닭 부산물인 닭 쓸개에 대한 연구로 Li 등⁽¹⁰⁾의 닭 쓸개가 심혈관계에 미치는 영향과 Hwang 등⁽¹¹⁾의 Rat을 이용한 닭, 뱀 및 어류 쓸개의 독성에 관한 연구 등이 보고되고 있다. 또한 Rudy 등⁽¹²⁾의

닭 쓸개가 담석에 미치는 영향과 Cotter⁽¹³⁾의 닭 쓸개가 항원-항체 반응에 미치는 영향 등 주로 의학적인 분야에서 많은 연구가 이루어졌다. 하지만 식품학적 연구로는 단순히 닭 쓸개의 성분분석 및 특정성분의 추출 등이 이루어 졌을 뿐 성분분리와 생리활성물질의 탐색이 동시에 이루어진 연구는 거의 없으며 매우 부족한 실정이다.

이와 같이 국내, 외의 연구는 닭의 가식 및 비가식부위에 대한 가공학적 연구로부터 생리활성 물질에 대한 탐색에 이르기까지 활발히 진행되어 왔다. 하지만 국내에서는 닭의 부산물 중 닭 쓸개로부터의 생리 활성 물질에 관한 체계적인 연구의 예가 거의 없는 실정이다. 닭 쓸개의 경우에는 한방에서 전통적으로 가래제거 효능이 있는 것으로 알려져 있어, 한약재로서 일부 쓰여지고 있다. 또한 계담즙의 주성분은 담즙산류, 담즙 색소, mucin, 지방류 및 무기물 등이 존재하고 있으며 그 중 담즙산류에는 taurochenodeoxycholic acid, taurocholic acid, chenodeoxycholic acid, lithocholic acid 및 3 α -hydroxy-6-oxo-5 α -cholanolic acid가 존재하는데, 이들 성분은 대부분 글리신과 결합된 형태로 존재하고 있는 것으로 알려지고 있다. 하지만 지금까지 알려진 닭 쓸개의 주요 생리활성 효능에(가래제거 기능, 소염, 해독등의 민간처방) 대해서는 대부분 한방적인 경험에서부터 전해오는 것일 뿐 정확한 과학적 근거와 고찰이 매우 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 축산 폐기부산물로 폐기처분되는 닭의 내장 부위 중 닭 쓸개를 이용하여 식품학적 성분분석으로 일반성분등을 분석하고, 몇 가지의 생리활성 물질을 TLC, HPLC를 이용하여 탐색, paper-disc법 등으로 항균활성을 측정하고 전자공여능, 아질산염 소거능 및 ACE 저해능을 비교 검토하여 닭 쓸개의 식품가공시 활용될 수 있는 기초자료를 제공하고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

계관은 대부분 산성 mucopolysaccharide으로 이루어져 있으며, 산성 mucopolysaccharide이 특정의 단백질과 복합체를 구성하고 있으면 mucin 또는 mucoprotein으로 불리워 진다. 이와 같은 당단백질은 다당이 중량의 대부분을 차지하고 있으며 점질성이 강하고 미끈미끈한 특성을 지니고 있다. 가장 풍부한 muco단당은 hyaluronic acid로 척추동물의 결합조직 등에 존재하고 있다. hyaluronic acid의 반복 단위는 D-glucuronic acid과 N-acetyl-D-glucosamine이 $\beta(1\rightarrow3)$ 결합한 2당체이다. 각 2당 단위는 $\beta(1\rightarrow4)$ 결합으로 인접해 있는 단위와 결합하므로 $\beta(1\rightarrow3)$ 결합과 $\beta(1\rightarrow4)$ 결합이 교호(交互)형태로 이루어져 있으며 섬유상의 polymer로 존재하고 있다. mucopolysaccharide의 다른 대표적인 것으로서 chondroitin은 hyaluronic acid과 거의 유사한 구조를 지니고 있으나, 단지 한가지 상이한 점은 N-acetyl-D-glucosamine 잔기 대신에 N-acetyl-D-galactosamine 잔기를 함유하고 있는 것이다. N-acetyl-D-glucosamine은 세포외물질의 소수성분에 지나지 않지만, 그 황산유도체 chondroitin 4-황산(chondroitin A)과 chondroitin 6-황산(chondroitin C)은 척추동물의 결합조직 구조체의 주요 구조성분인 것으로 알려지고 있다. 상기와 같이 계관의 주요 성분은 hyaluronic acid 및 chondroitin으로 구성되어 있으며, 이와 같은 성분들은 생리활성의 기능을 갖는 물질로서 알려지고 있다. 즉, 이와 같은 다당류는 시력회복, 시력보호작용, 항장력, 탄력증진효과 등의 생체면역 및 생리반응에 관여하고 있는 것으로 알려지고 있으므로 건강보조 식품 및 의약품으로서 이용 가능할 것으로 사료된다. 그 외의 다른 연구에 의하면 상기와 같은 다당류는 단백질과의 친화성이 우수하며, 물분자와 강하게 결합하는 특성을

지니고 있어서 화장품의 보습제, 육제품의 보수력 향상을 위한 첨가제로서 이용 가능할 것으로 생각된다.

계담즙의 주성분은 담즙산류, 담즙색소, mucin, 지방류 및 무기물 등으로 구성되어 있다. 지금까지 밝혀진 생리활성 물질은 담즙산 중에 다량 함유하고 있으며, 담즙산 중에는 chenodeoxycholic acid, 3 α -hydroxy-6 oxo-5 α -cholanic acid 및 lithocholic acid이 포함되어 있다. 이들은 거의 glycine과 결합하여 존재한다. 그 외에도 hyocholic acid 및 hyodeoxycholic acid을 포함하고 있다. 이와 같은 물질은 일종의 생리활성 기능을 보유하고 있으며, 지금까지 알려진 바에 의하면 지해(止咳)효과, 소염, 항알러지 작용, 항균작용, 디프테리아 예방, 급성 위장염 설사 등의 치료, 백일해 치료, 급성 전염성 간염의 치료, 만성 기관지염의 치료, 단순성 소화불량의 치료, 산부인과의 각종 수술 및 염증 감염의 치료, trachoma(전염성 만성 결핵염)의 치료, 만성 화농성 중이염의 치료에 효과가 있는 것으로 알려지고 있다. 그러나 상기와 같은 효능에 대해서는 대부분이 경험적으로 옛 부터 전해오는 것이므로 과학적인 근거에 의한 결과는 아닌 것으로 생각되고 있다.

한편, 최근에 동,식물로부터의 생리활성물질에 대한 탐색이 활발히 진행되고는 있으나, 특히, 국내에서는 계관 및 계담으로부터의 생리활성 물질에 관하여 체계적으로 연구한 예는 거의 없는 실정이다. 따라서, 현재 거의 이용되고 있지 않는 계관 및 계담으로부터 생리활성 물질을 탐색한 후 체계적인 기초연구 및 응용기술을 개발하여 산업화할 필요성이 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구개발수행 내용

1. 시료

본 실험에 사용한 닭쓸개 및 비늘은 (주)하림의 협조를 얻어 2002년에 가공 처리된 닭의 부산물로부터 채취하였다. 드라이아스를 사용하여 -25°C 이하로 냉동시킨 상태에서 운송하였으며, 실험실에서 해동하여 사용하였다.

2. 일반성분

일반성분조성은 AOAC방법⁽¹⁴⁾에 따라 수분함량은 0.002g 이하의 유의차를 함량으로하여 105°C 상압가열건조법으로 측정하였고, 조단백질 함량은 semi micro kjeldahl법으로 측정하여 질소보정계수 6.25를 곱하였으며, 조지방 함량은 Soxhlet 추출법으로 측정하였으며, 회분 함량은 550°C 회화법으로 측정 하였다. 수화물은 100에서 조단백질, 조지방, 회분을 뺀 값으로 하였다.

3. Chicken bile acid의 추출

닭 쓸개로부터 담즙산의 추출은 Haslewood⁽¹⁵⁾에 방법에 따라 냉동 상태의 닭 쓸개를 해동하여 4배의 ethanol을 첨가한 후 waring blender로 60초간 마쇄하였다. 이 마쇄액을 Whatman No. 2로 여과한 후 light petroleum ether을 첨가하여 지방질 제거를 2-3회 반복하였다. 지방질이 제거된 마쇄액에 methanol을 첨가하여 담즙산 성분을 추출하였다. 추출된 담즙산을 적당한 농도로 감압 농축한(40°C) 후 동결 건조하여 분말화 하였다.

4. 계관 추출물

도살 후 계관을 채취하여 80~100℃에서 30분간 가열한 후 세절하여 여기에 4배량의 증류수를 첨가하여 교반하였다. 0.05 N이 되도록 고흡수 산화나트륨을 첨가하여 50℃에서 1시간 동안 교반한 후 4 N HCl로 pH 7.0이 되도록 조정하였다. 규조토를 첨가하여 교반한 후 여과액을 추출액으로 하였다. 추출액 100 mL에 대하여 황산암모니움 70g을 첨가하여 용해하였으며 이때에 생성된 침전을 원심분리하였다. 침전을 증류수에 용해시킨 후 투석에 의해서 황산암모니움을 제거하였으며, 진공동결건조한 것을 추출물로 하였다.

5. TLC를 이용한 bile acid 정성분석

닭쓸개로 부터 추출된 bile acid의 유용성 성분들 정성분석은 Anderson등⁽¹⁶⁾의 방법과 같이 TLC를 이용하여 확인하였다. 담즙산 정성분석에 사용된 전개판은 Merck사의 silicagel 20×20 plate 이었으며, 전개용매는 chloroform : methanol : ammonia water를 15 : 10 : 1의 비율로 또는 ethylacetate : acetic acid : water를 15 : 12 : 2의 부피비로 혼합하여 사용하였다. Loading sample은 담즙산 1 mg을 50 μL methanol에 녹여 사용하였고 시료를 spotting 한 후 전개된 TLC판은 105℃ 건조기에서 건조시킨 후 10~20%의 황산용액으로 발색시켜 분리된 bile acid 성분들의 Rf치를 계산하여 비교하였다. 이때 사용한 표준물질로는 chenodeoxycholic acid(CDOCA), dehydrocholic acid(DHCA), deoxycholic acid(DOCA), cholic acid(CA), glycocholic acid(GCA), taurodeoxycholic acid(TDOCA), glycochenodeoxy cholic acid(GCDOCA), taurocholic acid(TCA), taurochenodeoxycholic acid

(TCDOCA) 이었다.

Rf치 값 측정

$$Rf치 = \frac{\text{원점에서 이동된 각 성분의 spot 중심까지의 거리}}{\text{원점으로 부터 전개 용매의 끝까지의 거리}}$$

6. HPLC를 이용한 bile acid 정량분석

닭 쓸개로부터 추출한 bile acid의 성분분석은 Yeh와 Hwang⁽¹⁷⁾의 방법에 따라 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석에 사용된 표준물질로는 DHCA, CA, GCA, TCA, CDOCA, GCDOCA, DOCA, TCDOCA, TDOCA이었다. Bile acid 분말 시료는 buffer (0.3% ammonium carbonate solution : acetonitrile)에 녹인 후 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 분석하였다. 닭 쓸개로부터 추출한 bile acid의 HPLC 분석조건은 Table 1. 와 같다.

Table 1. HPLC analytical condition.

Requester	Condition
Instrument	Younglin
Detector	Younglin M 720
Column	Lichrospher 100RP-18(25 \times 0.3cm)
Mobile Phase	0.3% Ammonium carbonate solution : Acetonitrile(70:30)
Injection Volume	10 μ L
Flow Rate	0.8 mL/min
Detector	UV 210 nm

7. SDS-PAGE를 이용한 계관추출물의 분석

계관 추출물을 8M urea, 2% mercaptoethanol, 2% SDS, 20mM Tris-HCl (pH8.0)에 가용화 시켰다. Laemmli 법에 따라서 10% 또는 2% SDS-PAGE를 행하였으며, Commassie Brilliant R로 염색하였다. 탈색은 50% MeOH, 7% Acetic acid를 이용하여 겔의 배경이 투명화될 때까지 수행하였다.

8. 항균활성

닭 쓸개로부터 추출한 bile acid의 항균성 검색은 Paper disk agar diffusion 법⁽¹⁸⁾에 따라 측정 하였다. 각 시험균주를 해당 액체 배지에 18~24시간 전배양하여 이 배양액 0.1 mL 씩 petridish에 접종한 후 멸균시킨 배지(Nutrient agar) 10 mL를 pouring하고 멸균된 paper disk(8 mm thick, Advanted)에 추출액 30 μ L가하여 plate상에 접촉시키고 미생물의 종류에 따라 적정온도에서 12~24시간 동안 배양 후 형성된 저해부위의 크기를 측정하였다. 항균력은 저해부위 크기를 6종으로 분류하여 평원반의 크기를 포함하여 직경이 8 mm이하 인 것은 항균력이 없는 것으로 8~14 mm의 것은 항균력이 매우 약한 것으로, 14~20 mm의 것은 항균력이 약한 것으로, 20~26 mm의 것은 항균력이 중간인 것으로, 26~32 mm의 것은 항균력이 강한 것으로, 32 mm이상의 것은 항균력이 매우 강한 것으로 판단하였다. 항균성 실험에 사용된 균주 및 배지는 Table 2. 와 같다.

Table 2. List of strains and media used for antimicrobial experiment

Microorganisms tested		Media used	Temp. (°C)
<i>Bacillus cereus</i>	KFRI 00437	TSB & NA*	30
<i>Escherichia coli</i>	KCTC 1682	TSB & NA	37
<i>Salmonella typhimurium</i>	KFRI 00191	TSB & NA	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	KFRI 00171	MRS & NA**	37
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCTC 2471	TSB & MA***	30

* TSB & NA: Tryptic soy broth & Nutrient agar

** MRS & NA : Lactobacilli broth & Nutrient agar

*** TSB & MA : Tryptic soy broth & Marine agar

9. 전자공여능 측정

전자공여작용(electron donating ability, EDA)은 각 시료의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical에 대한 소거효과 측정으로 Blois⁽¹⁹⁾방법을 사용하였다. 0.15 mM DPPH solution 4 mL과 샘플 0.4mL 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하여, DPPH radical 소거활성을 다음 식에 의하여 측정하였다.

$$\text{EDA (\%)} = 1 - \frac{\text{SA}}{\text{CA}} \times 100$$

SA : Sample absorbance

CA : Control absorbance

10. 아질산염 소거능

아질산염 소거작용은 Gray와 Dugan⁽²⁰⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 즉 1 mM NaNO₂ 용액 1 mL에 일정농도의 시료 1 mL를 가하고 0.1 N HCl (pH 1.2)을 사용하여 반응용액의 pH를 1.2로 조정하여 다음 총량을 10 mL로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간반응 시킨 후 각 반응액을 1 mL씩 취하여 2% 초산용액 5 mL, Griess 시약(30% acetic acid로 조제한 1% sulfanilic acid 와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합한 것, 사용직전에 조제) 0.4 mL 가하여 잘 혼합시킨 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후 분광 광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염을 구하였다. 공 시험은 Griess시약 대신 증류수를 0.4 mL 가하여 동일하게 행하였다. 아질산염 소거작용은 시료를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 아질산염 백분율로써 나타냈으며, 이 값이 큰 것일수록 아질산염 소거작용이 크다는 것을 의미한다.

$$N(\%) = 1 \frac{A - C}{B} \times 100$$

N : Nitrite scavenging ability

A : Absorbance of 1 mM NaNO₂ added
sample after standing for 1h(hour)

B : Absorbance of 1 mM NaNO₂

C : Absorbance of Control

11. ACE 저해작용

ACE 활성은 Chsuman and Cheung⁽²¹⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, Angiotensin- I 전환효소는 토끼의 허파에서 아세톤 분말로 정제한 1 g에 400 mM sodium borate buffer (pH 8.3) 10 mL를 가한 다음 5°C에서 24시간 교반한 후 원심분리 (8,000 × g, 30 min)하여 얻은 상등액을 ACE 조효소액으로 사용하였다. 시료 50 μL에 ACE 조효소액 50 μL 및 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3) 100 μL를 가한 다음 37°C에서 5분간 preincubation 시켰다. 이 반응액에 기질인 hippuryl-histidyl-leucine 용액(HHL 27 mg/ 2.5 mL in sodium borate buffer)50 μL를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응 시킨 후 1N HCl 250 μL를 가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 ethyl acetate 1.5 mL를 가하여 vortex mixer로 15초간 교반한 후 3000 rpm에서 5분간 원심분리시켜 상등액 1.0 mL를 취하였다. 이 상등액을 완전히 건조시킨 뒤 증류수 3.0 mL를 가하여 용해한 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하였고, 이때 공시험은 추출물 대신 증류수 50 μL를 첨가하였다. ACE 저해 효과는 다음 계산식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{ACE inhibition (\%)} = 1 - \frac{S - SC}{C - CC} \times 100$$

S : Sample absorbance

C : Control absorbance

SC : Absorbance of Sample Control

CC : Absorbance of Control Control

12. 소화력 측정

돼지근육 3g을 취하여 10배 량의 20mM Tris-HCl (pH 7.0~9.0) 및 20mM Citrate(pH 4.0~6.0) 완충액으로 10초간 균질화시켰다. 그런다음 시료의 단백질 농도를 biuret 법⁽²²⁾ 이용하여 측정한다(표준곡선 Fig. 참조) 후 시료의 단백질 농도를 10mg / mL로 조절하였다. 여기에 각각의 농도의 bile acid 추출물을 첨가하여 균질화시킨 다음 37°C에서 1시간 동안 shaking incubation 하였다. bile acid 추출물에 대한 근육의 소화력은 SDS-PAGE⁽²³⁾에 의해서 검토하였다. 즉, 샘플 1 ml를 취하여 가용화용액(8M urea, 2% SDS, 2%mercaptoethanol, 20mM Tris-HCl(pH 8.0))을 첨가한 후 100°C에서 2분간 가열하여 공시 시료로 하였다. SDS-PAGE에 의한 단백질의 분자량 측정은 표준 분자량 marker (myosin, 205 kDa: β -glactosidase, 116kDa: phosphorylase, 97.4kDa: bovine serum albumine, 66 kDa: ovalbumin, 45 kDa: carbonic anhydrase, 29kDa)를 사용하였다. 시료의 공시량은 10 μ l였다. 단백질의 염색은 0.05%(w/v) coomassie blue R-250 염색액을 사용하였으며, 탈색은 7% acetic acid와 30% methanol이 함유된 탈색액을 사용하였다.

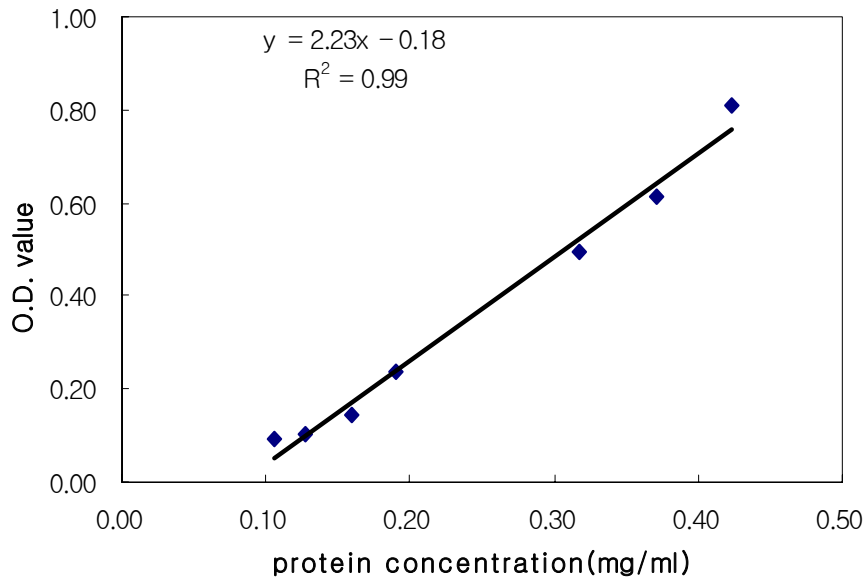


Fig. 3. Standard curve of BSA(Bovine Serum Albumin)

13. 실험 동물의 사육

실험 동물은 rat 또는 mouse를 한 케이지당 2마리씩 넣고, 22℃에서 사육하였고 12시간씩 형광등으로 명암을 조절하였다. 실험식은 매일 타블렛 형태로 공급하였으며, rat의 실험식의 조성은 사료조성 1 및 mouse의 실험식의 조성은 사료조성 2와 같다.

[사료조성 1]

항목	A(일반사료+돈지+콜레스테롤)	B(일반사료+돈지+콜레스테롤+계담5%)	C(일반사료+돈지+콜레스테롤+계담10%)
사료(일반)	18.5kg	18.5kg	18.5kg
돈지	1.3kg(사료에 6.5%)	1.3kg(사료에 6.5%)	1.3kg(사료에 6.5%)
콜레스테롤	200g(사료에 대한 1%)	200g(사료에 대한 1%)	200g(사료에 대한 1%)
계담	-	1kg	2kg
총 사료 무게	20kg	20kg	20kg

[사료조성 2]

항목	A(일반사료+돈지+콜레스테롤)	B(일반사료+돈지+콜레스테롤+계담1%)	C(일반사료+돈지+콜레스테롤+계담3%)
사료(일반)	18.5kg	9.15kg	8.95kg
돈지	1.3kg(사료에 6.5%)	650g(사료에 6.5%)	650g(사료에 6.5%)
콜레스테롤	200g(사료에 대한 1%)	100g(사료에 대한 1%)	100g(사료에 대한 1%)
계담(분말)	-	100g	300g
총 사료 무게	20kg	10kg	10kg

14. Glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) 분석

제 10항과 같은 조건하에서 사육한 rat의 혈액 중의 GOT를 측정하였다. GOT 분석용 시약은 AST kit(Boehringer Mannheim, 독일)를 사용하였으며, 분석기기는 자동 생화학 분석기(Hitachi 747, 일본)를 이용하였다.

15. Glutamic-pyruvic transaminase (GPT) 분석

rat의 혈액 중의 GPT 분석은 ALT kit (Boehringer Mannheim, 독일)를 사용하였으며, 분석기기는 제 11항의 기기와 같다.

16. High density lipoprotein (HDL)분석

HDL 분석은 HDL-cholesterol kit(Boehringer Mannheim, 독일)를 사용하였으며, 분석기기는 자동 생화학 분석기(Hitachi 7150, 일본)를 이용하였다.

17. Low density lipoprotein (LDL) 분석

LDL 분석은 LDL-cholesterol kit(Boehringer Mannheim, 독일)를 사용하였으며, 분석기기는 제 13항의 기기와 같다.

18. Triglyceride(TG) 분석

TG 분석은 TG kit(Boehringer Mannheim, 독일)를 사용하였으며, 분석기기는 자동 생화학 분석기(Hitachi 747, 일본)를 이용하였다.

19. Total cholesterol 의 분석

총 콜레스테롤 분석은 E분석 kit(영동제약)를 사용하여 효소법에 의하여 측정하였다.

20. H₂O₂ 함량측정

시료의 H₂O₂ 양은 Wolff의 분광학적 방법으로 측정하였다. 즉 100μM xylenol orange, 250μM ammonium ferrous sulfate, 100mM sorbitol, 25mM H₂SO₄가 되도록 각각을 혼합한 용액을 FOX I 시약으로 조제하고 시료 50μl에 FOX I 시약 950μl를 혼합한 후 실온에서 최소 30분 이상 방치한 다음, 원심분리하여 응결된 물질을 제거하고 560nm에서 흡

광도를 측정하였으며, 과산화 수소를 표준시약으로 하였다.

21. Superoxide dismutase (SOD) 활성도

시료의 SOD 활성도는 간 균질액의 10,000×g 부유층에서 Flohe와 Otting의 Ferricytochrome-c 환원방법으로 측정하였다. 즉, 5μM Xnathine, 20μM cytochrome-c와 0.1 mM EDTA가 함유된 50mM 인산 완충액(pH 7.8)이 혼합된 반응액 2.9ml에 희석시료 50μl를 넣은후 50μl의 xanthine oxidase를 가한 다음 25℃에서 550nm에서의 흡광도 증가속도를 측정하였으며, SOD 활성도는 위의 조건에서 cytochrome c 환원속도를 50%억제하는 효소의 양을 1 units로 표시하였다. SOD는 Sen 등(1994)의 분석방법을 근거로 흡광도를 이용하여 3회 반복 분석하였다.

22. Catalase 활성도

Catalase 활성도는 Aebi (1984)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 50mM 인산 완충액(pH 7.0)으로 희석시킨 측정 시료 2.0ml에 30mM H₂O₂ 용액 1.0ml를 넣은 후 20℃에서 파장 240nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다. Catalase의 활성도는 1분 간 H₂O₂ 1μmol을 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 표시했다. CAT는 Sen 등(1994)의 분석방법을 근거로 흡광도를 이용하여 3회 반복 분석하였다.

23. Glutathione peroxidase (GPx) 활성도 측정

GPx 활성은 Flohe 등의 방법으로 측정하였다. 즉 1mM EDTA를 함유된 0.1M 인산완충용액(pH 7.0) 500μl에 100μl의 측정시료, 0.24U의 glutathione reductase 100μl와 10mM GSH(환원형) 100μl를 넣고 전체 반응액에서 농도가 1mM이 되도록 NaN₃을 첨가한 후 37℃에서 10분간

incubation한 다음 파장 340nm에서 3분 동안 NADPH의 농도변화를 측정하였으며, 전체반응은 위 반응액에 1.5mM H₂O₂ 용액 100 μ l를 가한 후 위와 같은 조건에서 5분간 흡광도 감소를 측정하였다. 비효소적 반응은 위와 동일한 조건으로 측정하였으며, 단위는 분당 산화된 NADPH μ mol를 효소 활성으로 하였다.

24. MDA 수준의 측정

측정 시료의 지질과산화 수준은 지질의 최종 과산화물인 MDA를 Ohkawa 등(1979)의 방법을 사용하여 thiobabituric acid(TBA) 반응물질을 측정하였다. 간 조직의 10% 균질액 0.1ml, 8.1% sodium deoxyl sulfate 용액 0.2ml, 20% acetic acid 용액(pH 3.5) 1.5ml, 0.8% thiobabituric acid 용액 1.5ml를 혼합한 다음 95 $^{\circ}$ C의 진탕수조에서 60분간 반응시킨 다음 즉시 냉각시켰다. 1ml의 증류수와 n-butanlol과 pyridine 혼합용액(15:1. v/v) 5ml을 가하여 충분히 혼합한 다음, 원심분리(4000 rpm, 10분)하여 얻은 상층액(유기층)의 흡광도를 파장 532nm에서 측정하였으며, 표준 검량선을 얻기 위하여 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane을 표준 물질로 사용하였다.

25. 간장의 조직학적검사

대조군을 포함한 모든 실험동물에 대하여 항산화 시료를 채취하고 남은 간엽의 일부를 채취하여 즉시 적당한 크기의 간 절편을 만들어 10% 중성 포르말린액에 고정시키고 24시간 이상 고정을 거친 모든 장기조직은 70%, 80%, 90%, 95% 및 100% ethanol액에 각각 3시간, 100% Xylene 에 2회 3시간씩 방치하여 탈수하고 파라핀 포매기(SAKURA, Tissue-Tek VIP, vaccum infiltration Processor)에 포매하여 마이크로톰

(Microm, HM340E)으로 3 μ m 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin 염색을 하여 광학현미경하에서 200-400배로 관찰하였다.

제 2 절 결과 및 고찰

1. 계담 및 계관으로부터의 생리활성 물질 분리

1) 계담 및 계관의 일반성분 분석

계담 및 계관의 일반성분을 분석하여 Table 3 및 4에 결과를 제시하였다. Table 3에 제시한 계담의 의 경우는 건중량을 기준으로 조단백질 34.9%, 조지방 22.17%, 조회분 5.17%, 및 탄수화물 31.7%로 나타났다.

Aoyagi와 Baker⁽²¹⁾등 보고에서 동결 건조한 닭 쓸개의 단백질 함량이 17.1%, 지방 86.0%, 조회분의 함량이 8.1% 라는 보고를 하였다. 본 결과와는 상이한 경향을 나타내었는데, 이는 사육조건, 품종의 차이에서 기인 한 것으로 사료된다.

Table 3. Approximate composition of chicken bile
(dry basis %)

Constituents	Contents
Moisture	79.7
Crude protein ¹⁾	34.9
Crude fat	22.1
Crude ash	5.1
Carbohydrate	31.7

¹⁾Calculation of protein content = N(%)×6.25(nitrogen factor)

Table 4에 제시한 계관의 일반성분은 수분 32.3%, 조단백질, 45.1%, 조지방 2.8%, 회분 8.7% 및 탄수화물 11.1%를 나타내었다.

Table 4. Approximate composition of cockscomb

Constituents	Contents
Moisture	32.3
Crude protein	45.1
Crude fat	2.8
Crude ash	11.1
Carbohydrate	8.7

¹⁾Calculation of protein content = N(%)×6.25(nitrogen factor)

2) 계담 및 계관으로부터의 생리활성 물질 추출

실험실 규모의 담즙산의 추출 공정은 Fig. 1과 같다. 닭 쓸개로부터 담즙산의 추출은 닭 쓸개를 해동하여 4배의 ethanol을 첨가한 후 waring blender로 60초간 마쇄하였다. 이 마쇄액을 Whatman No. 2로 여과한 후 light petroleum ether을 첨가하여 지방질 제거를 2-3회 반복하였다. 지방질이 제거된 마쇄액에 methanol을 첨가하여 담즙산 성분을 추출하였다. 추출된 담즙산을 적당한 농도로 감압 농축한(40℃) 후 동결 건조하여 분말화 하였다. 또한 이와 같은 방법으로 추출한 결과 수율은 약 50%를 나타내었다.

한편, 계관의 구성성분은 대부분 당과 단백질이 결합된 형태의 뮤코 단백질인 것으로 알려져 있다. Fig. 2에는 계관으로부터 뮤코단백질을 추출하는 공정을 실험실 규모로 나타내었다.

도살 후 계관을 채취하여 80~100℃에서 30분간 가열한 후 세절하여 여기에 4배량의 증류수를 첨가하여 교반하였다. 0.05 N이 되도록 고형수산화나트륨을 첨가하여 50℃에서 1시간 동안 교반한 후 4 N HCl로 pH 7.0이 되도록 조정하였다. 규조토를 첨가하여 교반한 후 여과액을

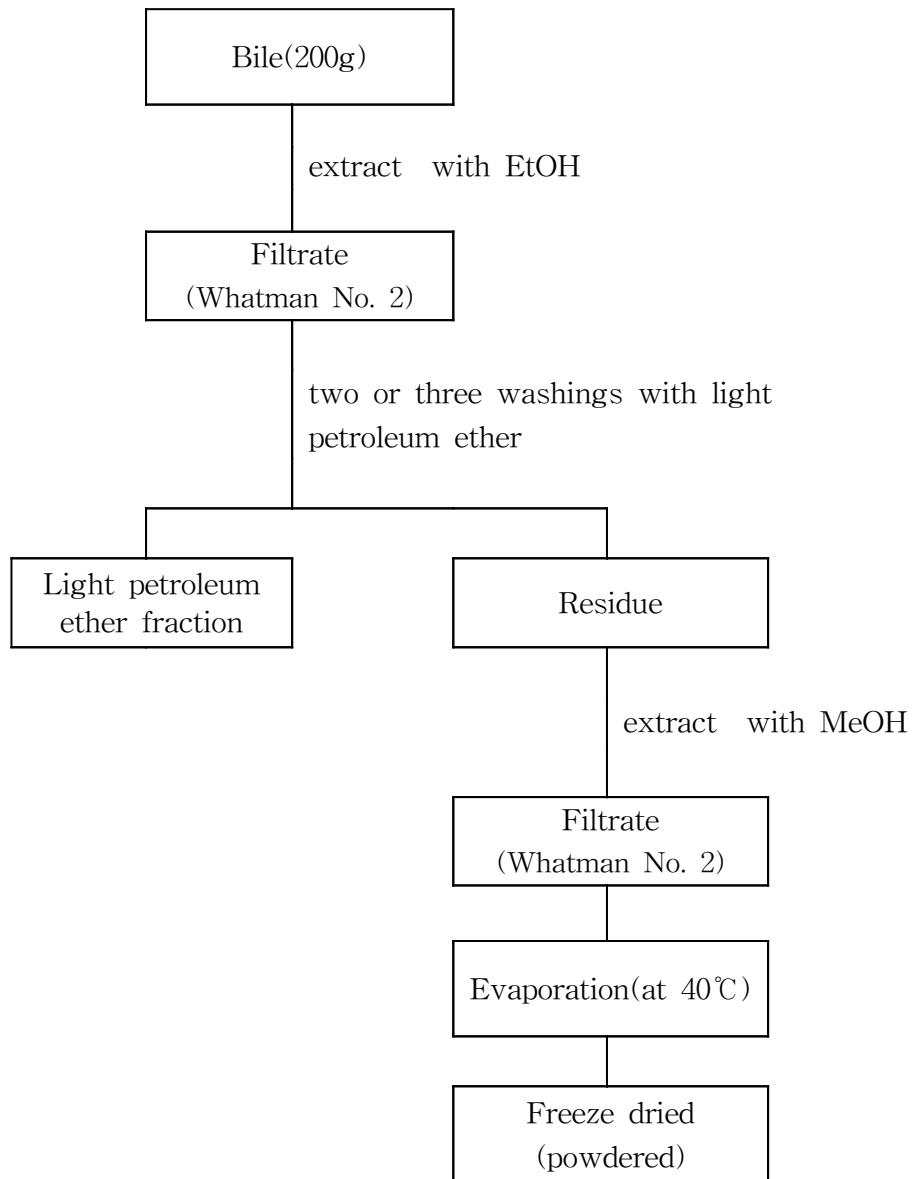


Fig.1. Solvent fractionation procedure of chicken bile extract

추출액으로 하였다. 추출액 100 mL에 대하여 황산암모니움 70g을 첨가하여 용해하였으며 이때에 생성된 침전을 원심분리하였다. 침전을 증류

수에 용해시킨 후 투석에 의해서 황산암모늄을 제거하였으며, 진공동결건조 하였다. 이와 같은 방법으로 추출하였을 때 수율은 약 80%를 나타내었다.

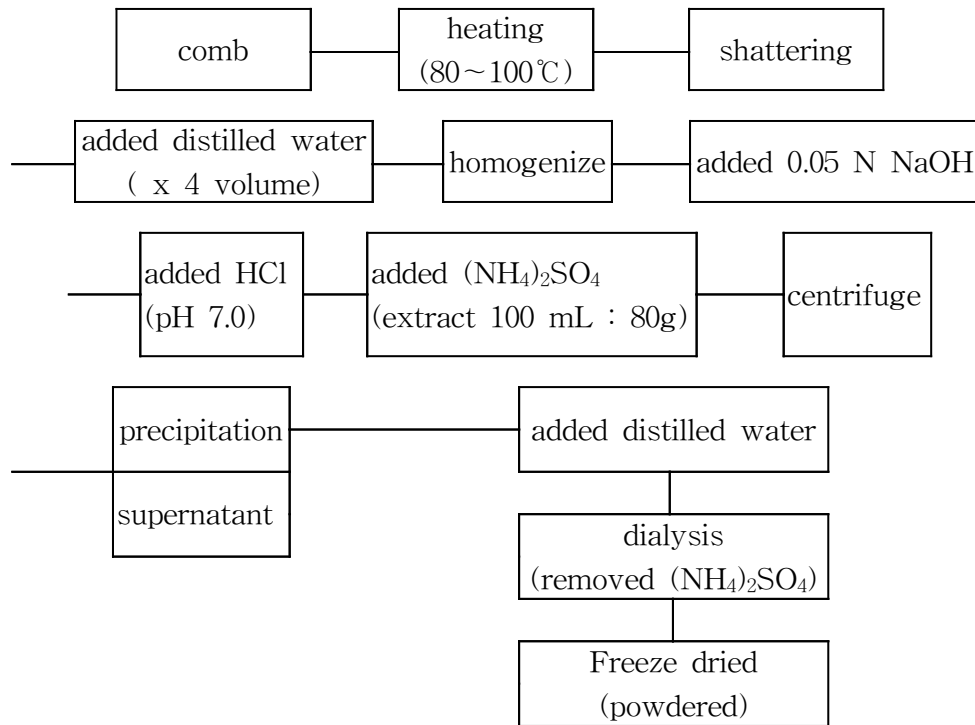
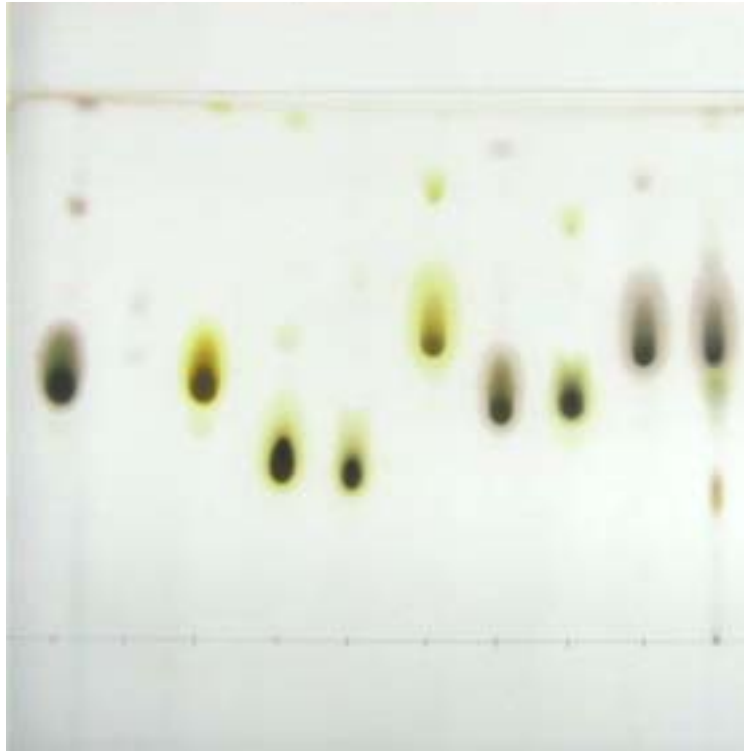


Fig. 2. Extract procedure of mucoprotein from comb

3) TLC를 이용한 bile acid 정성분석

닭 쓸개로부터 추출한 bile acid 성분들을 TLC로 분리한 결과 Fig. 3. 과 같다. Fig. 3.에서 보는바와 같이 시료의 bile acid는 모두 3개의 성분으로 분리되었으며 각각의 Rf치는 0.15, 0.44, 0.54이었다. Bile acid의 9개 표준물질에 대한 Rf치는 각각 CDOCA(0.45), DHCA(0.60), DOCA(0.46), CA(0.31), GCA(0.30), TDOCA(0.55), TCA(0.43), TCDOCA(0.53), GCDOCA(0.42)이었다. TLC에 의해 분리된 닭 쓸개의 bile acid 중 TCA(0.43), TCDOCA(0.53)는 표준물질의 TCA 및 TCDOCA와 비슷한 Rf치를 나타내었다. 하지만 닭 쓸개로부터 추출한 bile acid의 시료와 표준물질간의 Rf치가 정확하게 일치하지 않으므로 HPLC등을 통한 정확한 분석이 필요한 것으로 사료되었다.

곰쓸개인 웅담의 주요성분을 HPTLC로 분석한 이⁽¹²⁾의 결과와 비교해보면 웅담의 주요성분이 taurooursode-oxycholic acid, TCDOCA 및 TCA라고 보고한 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 하지만 웅담의 주요성분을 단순히 정성 분석적인 면에서만 파악하였을 뿐 웅담의 주요성분에 대한 절대적인 양을 측정하지는 못하였다.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

**Fig. 3. TLC analysis of the standard bile acid
chicken bile acid extract**

1 : CDOCA	6 : TDOCA
2 : DHCA	7 : GCDOCA
3 : DOCA	8 : TCA
4 : CA	9 : TCDOCA
5 : GCA	10 : chicken bile extract

4) HPLC를 이용한 bile acid의 함량 측정

닭 쓸개로부터 추출한 bile acid의 각각의 구성성분을 확인하고자 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 4 및 5와 같다. Fig. 4는 bile acid의 표준물질로서 9가지 bile acid 구성성분의 표준물질에 대한 검량선은 0.1~10 mg/g 농도의 범위 안에서 각각의 표준물질의 면적에 대한 농도 변화를 함수로 도식하여 직선을 얻었다. 각각의 표준물질에 대한 표준 곡선의 식과 상관계수는 다음과 같다.

$$\text{DHCA} : y = 0.9262x + 29.052(R^2 = 0.9998)$$

$$\text{CA} : y = 0.1054x - 4.7801(R^2 = 0.9996)$$

$$\text{GCA} : y = 1.3498x - 2.2187(R^2 = 0.9998)$$

$$\text{TCA} : y = 1.2465x + 16.227(R^2 = 0.9995)$$

$$\text{CDOCA} : y = 0.1184x + 27.135(R^2 = 0.9993)$$

$$\text{GCDOCA} : y = 1.2509x - 73.365(R^2 = 0.9997)$$

$$\text{DOCA} : y = 0.1103x + 23.383(R^2 = 0.9969)$$

$$\text{TCDOCA} : y = 0.6974x + 47.183(R^2 = 0.9998)$$

$$\text{TDOCA} : y = 0.7879x + 49.377(R^2 = 0.9995)$$

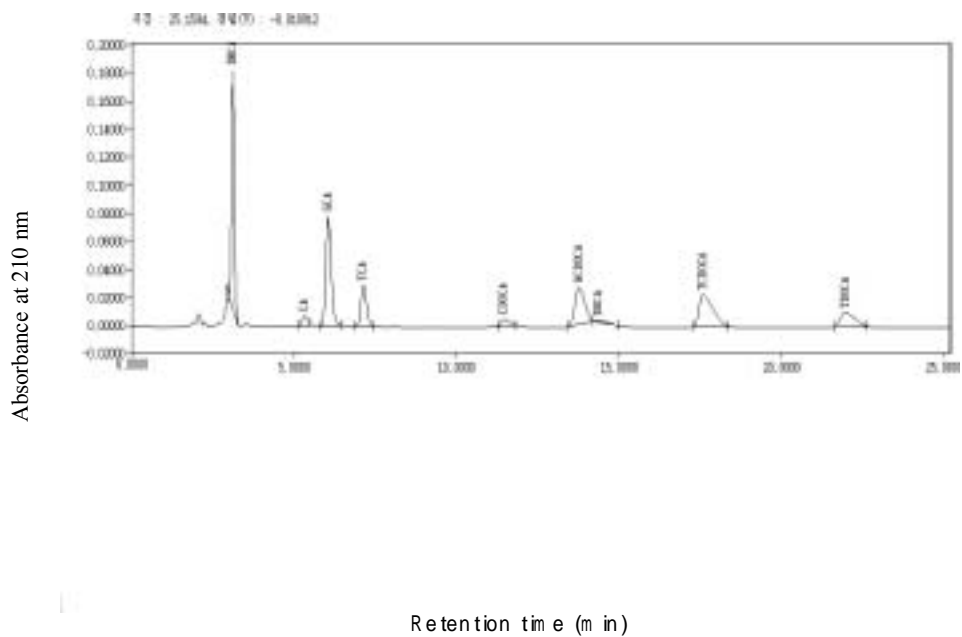


Fig. 4. HPLC chromatogram of the standard bile acid mixture composition

Column : Lichrospher 100RP-18(25×0.3cm)

Flow Rate : 0.8mL/min

Mobile Phase : 0.3% Ammonium carbonate solution :
Acetonitrile(70:30)

Detector : UV at 210 nm

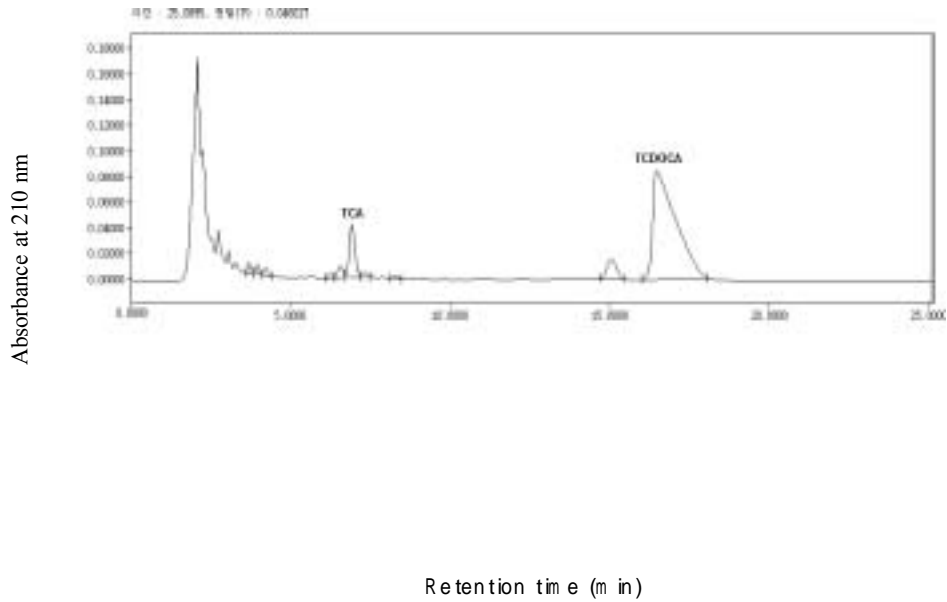


Fig. 5. HPLC chromatogram of bile acid

Column : Lichrospher 100RP-18(25×0.3cm),

Flow Rate : 0.8mL/min

Mobile Phase : 0.3% Ammonium carbonate solution :
Acetonitrile (70:30)

Detector: UV at 210 nm

Fig. 5에서 보는바와 같이 닭 쓸개로부터 추출한 bile acid의 성분 중 taurochenodeoxycholic acid(TCDOA)와 taurocholic acid(TCA)가 검출되었다. 표준물질과 비교하여 이들의 함량을 구한 결과 TCA는 385 mg/100g, TCDOA는 5893 mg/100g으로 나타났다. 이는 TLC에서의 정성분석 결과와 비교하여 볼 때 TCA와 TCDOA가 검출된 것과 비슷한 경향을 나타내었다. 하지만 그 밖의 bile acid 성분인 CDOCA, DHCA, DOCA, CA, GCA, TDOCA, GCDOCA는 검출되지 않았다.

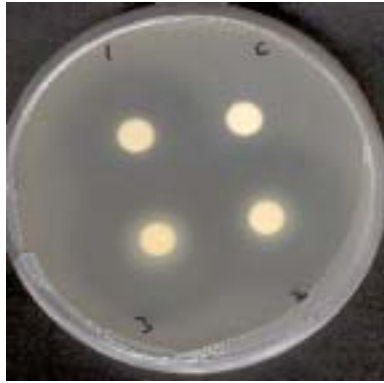
Yeh와 Hwang⁽¹³⁾등에 보고에 의하면 본 실험의 종과는 다른 여러종류의 어류표본에 함유한 bile acid를 분석한 결과 어류 표본의 주요 구성 bile acid가 TCA와 TCDOA라는 결과와 같은 경향을 나타내었으며 또한 본 실험에서의 시료(닭)와 같은 종의 닭과 오리의 주요 bile acid를 분석한 결과 ursodeoxycholic acid 및 TCA와 TCDOA가 주요 bile acid라는 보고와 본 실험의 결과와는 같은 경향을 나타내었다.

2. 계담 및 계관 추출물의 기능성

1) 항균활성

Chicken bile로부터의 추출물의 항균력을 paper disk법으로 분석한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* 및 *Escherichia coli* 에 각각 추출물 10~30%용액을 30 μ L 투여한 결과 *Bacillus cereus*의 경우 paper disk 주위에 매우 광범위하게 환이 관찰되었으며, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* 및 *Vibrio parahaemolyticus*의 경우는 *Bacillus cereus*와 비교하여 다소 작은 환의 형성을 나타내었다. 한편, *Escherichia coli*는 전혀 환이 형성되지 않았다. 이상의 결과로부터 bile로부터의 추출물은 균에 대한 항균력의 특이성을 나타내었으며, 균의 종류에 따라서 항균력이 다름을 나타내었다.

이상의 결과를 자세히 분석하여 결과를 Table 5에 제시하였다. 즉, 추출물을 10, 20, 30% 수준의 농도로 멸균된 paper disk(8 mm thick, Advanted)에 추출액 30 μ L가하여 plate상에 접촉시키고 미생물의 종류에 따라 적정온도에서 12~24시간 동안 배양 후 형성된 저해 부위의 크기를 측정하여 (-) : 항균력 없음, (+) : 항균력 매우 약함, (\pm) : 항균력 약함, (++) : 항균력 있음, (+++) : 항균력 강함 및 (++++): 항균력 매우 강함으로 나타내었다. 이 결과에 의하면 특히 *Bacillus cereus*에 대하여 매우 강한 항균력을 보였으며 *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*에 대해서도 항균력을 나타내었다. 그러나 일반 식품오염 미생물인 *Escherichia coli*에 대해서는 항균력을 관찰 할 수 없었다. 본 실험에서 실시한 균들에 대한 결과 *E. coli*를 제외



Bacillus cereus



Salmonella typhimurium



Staphylococcus aureus



Vibrio parahaemolyticus

Fig. 6. Antimicrobial effects of chicken bile extract

C : control

1 : chicken bile extract 10%

2 : chicken bile extract 20%

3 : chicken bile extract 30%

한 대상균주에 대하여 농도가 증가함에 따라 생육저해환 직경이 커지며 항균력이 증가하는 것을 알수 있었다.

Table 5. Antimicrobial ability of chicken bile extract

Microorganisms tested	Concentration(%)		
	10%	20%	30%
<i>Bacillus cereus</i>	+++	++++	++++
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	±	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	±
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	+	±	++

Size of clear zone (+; 8~14 mm, ±; 14~20 mm, ++; 20~26 mm, +++; 26~32 mm, ++++; >32 mm, -; no activity)

2) 전자공여능

전자공여작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 식품의 지방질 산화를 억제하는 목적으로 사용되고, 인체내에서는 활성 라디칼에 의한 노화를 억제시키는 작용으로 이용되고 있다⁽²¹⁾. 라디칼 소거작용은 인체의 질병과 노화를 방지하는데 대단히 중요한 역할을 한다. 따라서 전자공여능 측정은 DPPH라디칼 소거법으로 측정하며, DPPH는 비교적 안정한 라디칼을 갖는 물질로 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되어 탈색되는 점을 이용하여 항산화 활성을 검정한다⁽²³⁾.

Shim등⁽⁹⁾의 보고에 의하면 bovine bile에서 에탄올로 추출, 분리, 정제하여 각 분획물을 인공 항산화제인 BHT와의 DPPH에 의한 항산화력을 실험한 결과 광학활성이 0.448와 0.862으로 항산화력이 BHT(100%)에 비해 약 50% 정도의 수준이라고 보고 하였다.

Chicken bile에서 추출한 MeOH 추출물과 동결건조물에서의 전자공여능을 측정한 결과는 Fig. 7과 같다. BHA 0.01%를 기준으로 하였을 때 DPPH가 76.01%으로 나타났다. 본 실험의 경우 시료의 농도가 증가할 수록 전자공여능은 유의적으로 증가하여 MeOH 추출물 0.1, 1, 5, 및 10%에서 2.16, 8.12, 68.31 및 92.85% 전자공여작용을 나타내었고 0.1, 1, 5 및 10%에서 2.22, 22.59, 82.98 및 86.90%의 전자공여 효과를 나타내었다($p < 0.001$).

Kang 등⁽²⁴⁾의 보고에 의하면 전자공여능은 전반적으로 농도가 상승함에 따라 증가한다고 하였으며, 1~6 mM 사이에서는 농도차에 의한 효

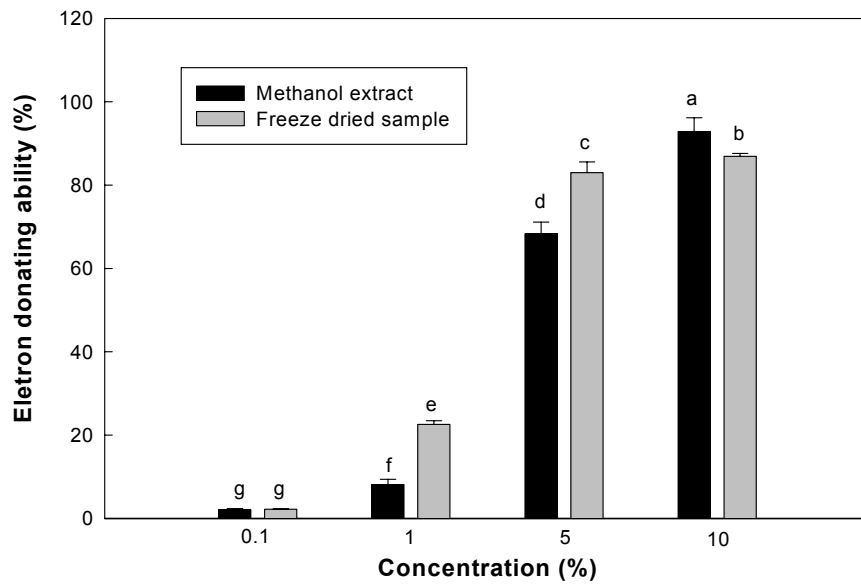


Fig. 7. Electron donating ability of chicken bile extract

a,b,c,d,e,f,g values are significantly different with different letter (p<0.001)

과는 크지 않았으며, 페놀성 화합물중 hydroxybenzoic acids류에서 gallic acid, hydroxycinnamic acids에서 hydrocaffeic acid, flavonoids 중에서는 (+) catechin류가 높은 전자공여능을 나타내었으며, 전자공여능은 환원력이 큰 것이 높은 값을 나타낸다고 하였다.

3) 아질산염 소거작용

식품의 가공 및 저장 특히 수산물이나 식육제품에 첨가되어 독소생성 억제와 발색, 산패방지제로 널리 이용되고 있는 아질산염은 그 자체가 독성을 나타내어 일정농도 이상 섭취하게 되면 혈액중의 헤모글로빈이 산화되어 메트헤모글로빈을 형성하며 메트헤모글로빈증 등 각종 중독을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 단백질 식품이나 의약품 및 잔류농약 등에 존재하는 2급, 3급 아민과의 nitroso화 반응 위장내의 낮은 산성 조건에서 쉽게 일어나며 발암물질은 nitrosamine을 생성 할 수 있으므로 아질산염과 아민을 동시에 섭취했을 때 위에서 nitrosamine의 생성을 억제 할 수 있는 많은 연구가 진행되고 있다⁽²⁵⁾.

본 실험에서는 위의 pH 조건과 비슷한 조건으로 pH 1.2에서 아질산염 소거작용을 측정하였고 결과는 Fig. 8.과 같다. MeOH 추출물의 경우 0.1, 1, 5 및 10%에서 아질산 소거율은 1.52, 20.40, 63.08 및 92.47%를 나타내어, 동결건조물의 0.1, 1, 5, 및 10%에서 0.54, 13.62, 25.35 및 68.60% 보다 높은 수치를 나타내었다($p < 0.001$). MeOH 추출물과 동결건조물 모두 농도가 증가할수록 아질산염 소거능은 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다($p < 0.001$).

그러므로 위내의 pH 1.2에서 아질산염 소거능을 보인 닭 쓸개를 아질

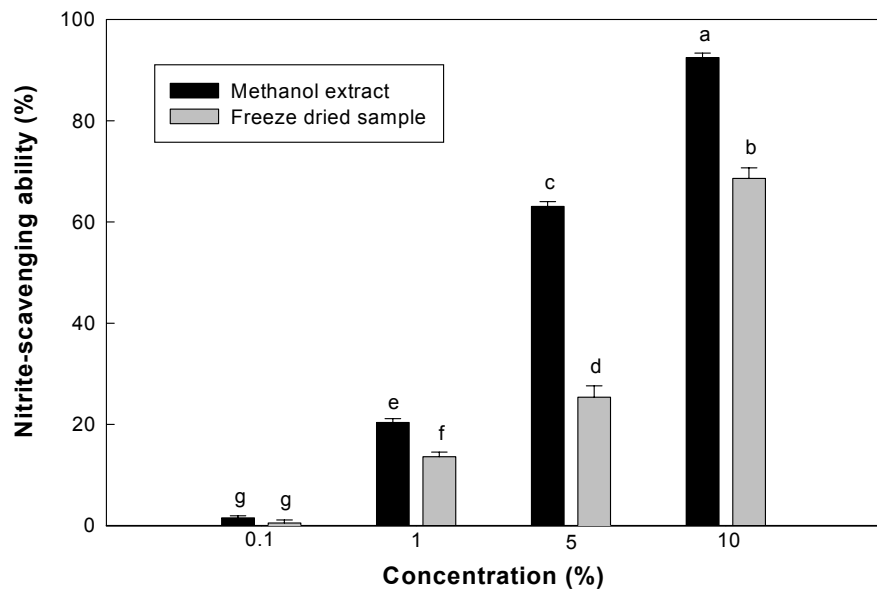


Fig. 8. Nitrite scavenging ability of chicken bile extract

a,b,c,d,e,f,g values are significantly different with different letter (p<0.001)

산염과 아민이 존재할 수 있는 가공식품 등과 함께 섭취하도록 함으로써 니트로사민에 의한 암의 발생을 예방 할 수 있을 것으로 사료된다.

4) ACE 저해작용

Angiotensin I-converting enzyme(ACE)은 불활성인 angiotensin-I의 C말단 dipeptide(His-Leu)를 절단하여 혈관벽 평활근 수축 등의 작용에 의하여 강한 혈압상승작용을 나타내는 agiotensin II를 생성하는 한편, 혈압강하작용을 가지는 bradykinin을 분해하여 불활성화시킴으로써 고혈압의 원인이 되고 있다. ACE 저해인자로 인식되어지는 성분으로써 peptide와 그 유도체들, 그리고 차에 존재하는 catechin, 메밀의 rutin과 같은 polyphenol 성분들이라는 보고가 있다^(26,27).

Chicken bile의 MeOH 추출물과 동결건조물의 ACE 저해작용을 측정한 결과는 Fig. 9에서 나타낸 바와 같다. MeOH 추출물의 경우 0.1, 1, 5 및 10%에서 3.86, 19.79, 52.87 및 56.68%의 저해작용을 나타내었고 동결건조물의 경우 0.1, 1, 5 및 10%에서 6.10, 19.97, 37.20 및 46.87%의 ACE 저해효과를 보였다($p < 0.001$). 첨가량이 증가됨에 따라 ACE 저해효과가 유의적으로 증가하는 것으로 나타났으며, MeOH 추출물의 경우 더 높은 저해작용을 나타내었다($p < 0.001$).

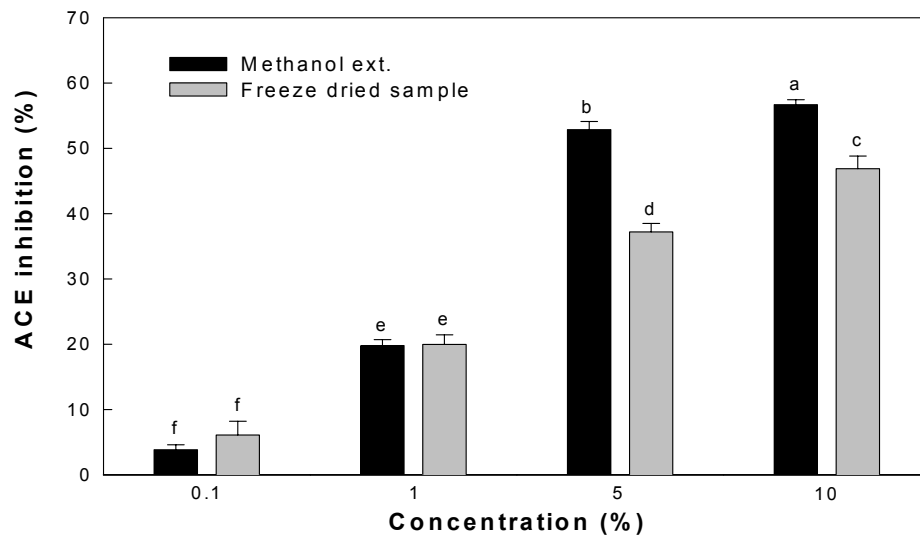


Fig. 9. Angiotensin I-converting enzyme(ACE) inhibitory effect of chicken bile extract

a,b,c,d,e,f,g values are significantly different with different letter ($p < 0.001$)

5) 소화력 측정

계담은 민간요법으로서 소화촉진작용이 있는 것으로 알려지고 있다. 그러나 이에 대한 과학적인 근거자료는 전혀 없는 상태이며, 만일 소화촉진 작용이 있다고 하면 천연 소화촉진제로서 이용가능할 것으로 사료된다. 따라서 Fig. 10~Fig. 14에서는 계담 동결건조물 및 계담추출물을 여러 조건하에서 소화력을 검토하여 소화촉진제로서 이용가능한지를 살펴보았다.

Fig. 10에는 계담을 동결건조한 후 돼지 근육에 각각 1~10%를 첨가하여 소화시켰을 때의 SDS-PAGE pattern의 결과를 나타내었다. 또한, 계담의 동결건조물을 비교하기 위하여 시판의 소화촉진제의 경우도 함께 검토하였다. 이 결과에 의하면 시판의 소화제 1%만 첨가하여도 근육단백질의 저분자화가 일어나기 시작하였으며, 농도가 높아질수록 돼지근육을 구성하고 있는 단백질의 밴드가 크게 소실되는 현상을 나타내었다. 그러나 계담의 동결건조물의 경우는 고농도의 조건하에서도 근육 단백질의 소실은 관찰되지 않아, 이 조건하에서는 계담의 경우 소화 촉진작용이 없는 것으로 판단되었다.

이상의 결과에서는 계담이 소화촉진에 미치는 영향이 인정되지 않았으므로 다음은 계담으로부터 추출한 추출물의 경우를 살펴보기 위하여 시판되고 있는 단백질 소화효소인 파파인의 경우와 비교 검토하였다. Fig. 11에는 파파인과 계담추출물의 근육의 소화력을 비교검토하여 그 결과를 제시하였다. 파파인의 경우는 1%만의 첨가로 완전히 단백질의 밴드가 소실됨을 알 수 있었다. 그러나 계담추출물의 경우는 10%의 고농도의 계담추출물을 첨가하여도 전혀 단백질 밴드의 소실은 관찰되지 않았으며, 따라서 계담 추출물의 경우도 소화촉진작용과는 상관이 없는

것으로 사료되었다.

상기와 같이 계담의 동결건조물 및 추출물의 경우 소화촉진 작용이 없는 것으로 나타났으므로 다음은 소화 조건을 산성 및 알카리의 조건하에 서는 어떤지를 검토하였다. 우선 pH 4.0 및 5.0에서 검토한 결과를 Fig. 12에 제시하였다. 이 결과의 경우에 있어도 Fig. 10 및 11과 마찬가지로 전혀 소화촉진 작용은 없는 것으로 나타났으며, 적어도 산성 및 중성에 있어서는 계담의 경우 소화촉진능은 없는 것으로 사료되었다.

한편, pH 9.0인 알카리의 조건하(Fig. 13)에서도 전혀 그효과는 인정되지 않았으며, 계담의 경우는 소화촉진과는 전혀 무관한 것으로 사료되었다.

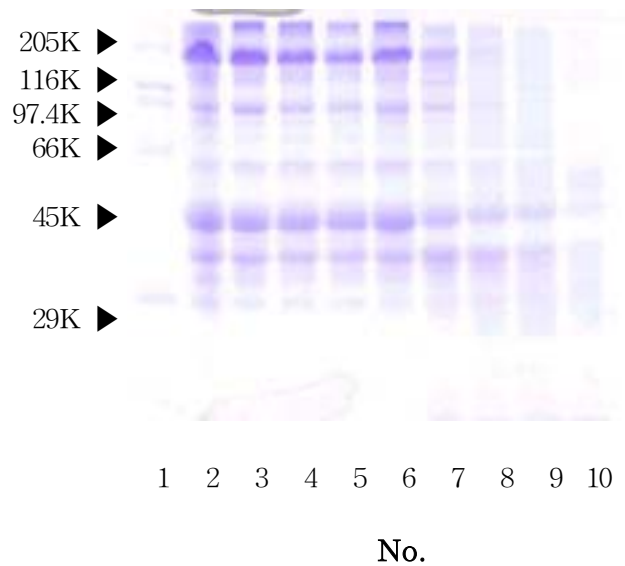


Fig. 10. SDS-PAGE patterns of pork protein digested by freeze dried chicken bile at various concentration conditions.

- | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 : M.W maker | 2 : Pork muscle |
| 3 : Freeze dried chicken bile 1% | 4 : Freeze dried chicken bile 3% |
| 5 : Freeze dried chicken bile 5% | 6 : Freeze dried chicken bile 10% |
| 7 : Commercial digestive 1% | 8 : Commercial digestive 3% |
| 9 : Commercial digestive 5% | 10 : Commercial digestive 10% |

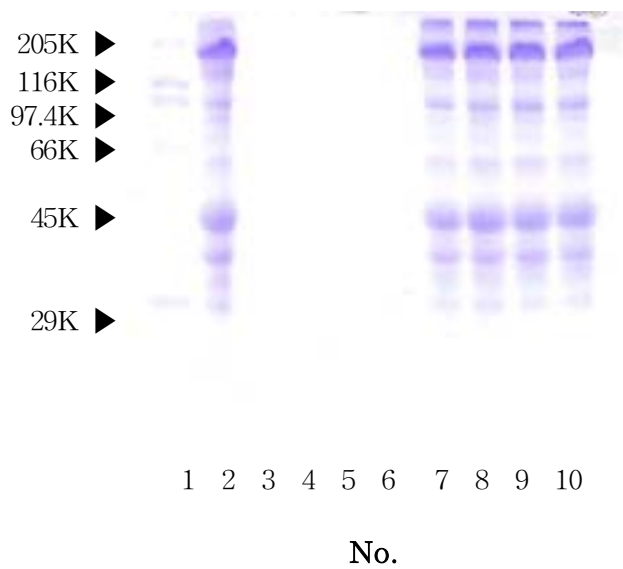


Fig. 11. SDS-PAGE patterns of pork protein digested by chicken bile extract at various concentration conditions.

1 : M.W maker

2 : Pork muscle

3 : Papain 1%

4 : Papain 3%

5 : Papain 5%

6 : Papain 10%

7 : Bile extract 1%

8 : Bile extract 3%

9 : Bile extract 5%

10 : Bile extract 10%

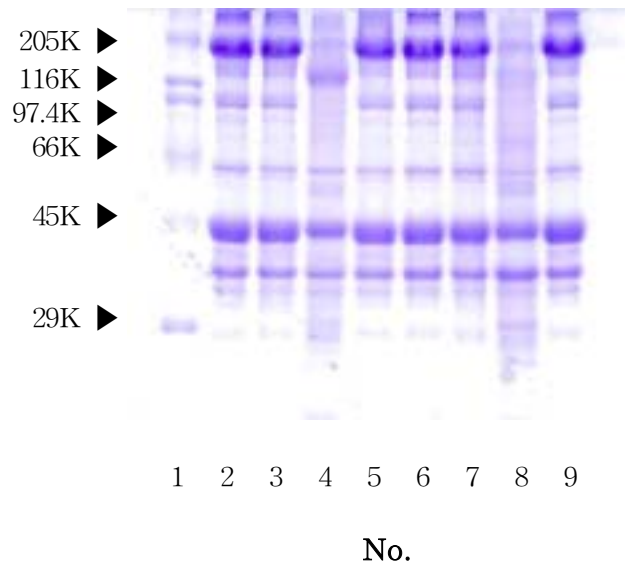


Fig. 12. SDS-PAGE patterns of pork protein digested by chicken bile extract at various pH conditions.

- | | |
|--------------------------------|----------------------------------|
| 1 : M.W maker | 2 : Pork muscle(pH 4.0) |
| 3 : Freeze dried bile (pH 4.0) | 4 : Commercial digestive(pH 4.0) |
| 5 : Bile extract (pH 4.0) | 6 : Pork muscle(pH 5.0) |
| 7 : Freeze dried bile (pH 5.0) | 8 : Commercial digestive(pH 5.0) |
| 9 : Bile extract (pH 5.0) | |

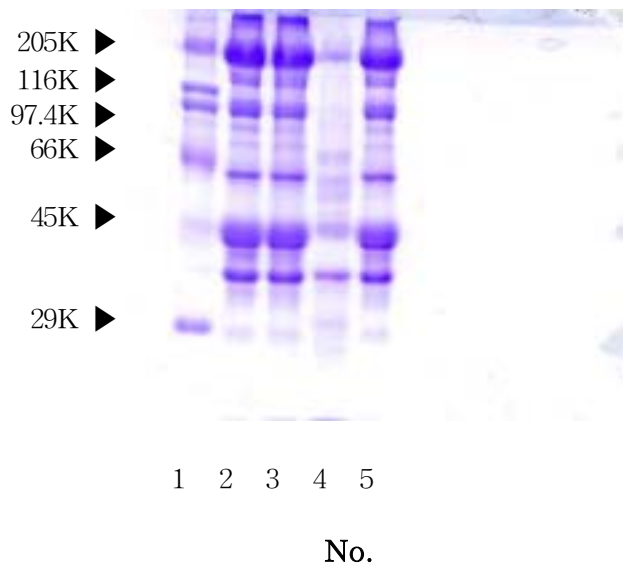


Fig. 13. SDS-PAGE patterns of pork protein digested by chicken bile extract at pH 9.0.

1 : M.W maker

2 : Pork muscle

3 : Freeze dried bile

4 : Commercial digestive

5 : Bile extract

6) 계관 추출물과 근육 단백질의 상호작용

계관 추출물의 구성성분은 무코 다당류 및 단백질로 이루어져있다. 무코 다당류는 단백질과의 친화성이 우수하여 물분자와 강하게 결합하는 성질을 지니고 있어 높은 보수성을 나타내는 것으로 알려지고 있다. 또한 생체내에서는 생체의 수분 보지를 위하여 존재하는 것으로 생각되고 있다. 이와 같이 생리기능적인 특성을 지니고 있다고 알려진 계관추출물의 기능성을 알아보기 위하여 단백질과의 상호작용 및 이에 따른 보수력 등을 검토하였다.

우선 Fig. 14에는 계관 추출물의 SDS-PAGE를 이용하여 그 성분을 조사하였다. 2% polyacrylamide gel을 이용하여 검토한 결과 분자량 약 30만에 상당하는 주요 성분이 검출되었으며, 그 외에 수백만의 거대 분자량에 상당하는 성분들이 검출되었다.

이와 같은 성분을 단백질에 첨가하였을 때 어떤 반응이 일어나는 지를 검토하였다. 즉, 근원섬유 단백질을 0.6M NaCl로 용해시킨 후 여기에 0~10%의 범위에서 계관 추출물을 첨가하였다. 약 1시간 동안 반응시킨 후 원심분리하여 상층액 중의 성분을 조사함으로써 단백질과 계관 추출물과의 상호작용을 검토하였다. Fig. 15에는 10% polyacrylamide gel을 이용한 전기영동법을 통하여 단백질과 계관과의 상호작용을 나타내었다. 우선 No.2에 제시한 계관 추출물에 어떠한 성분도 관찰되지 않았다. Fig. 14에 제시한 것과 같이 계관의 주성분은 분자량 약 30만인 것으로 나타나 10%의 polyacrylamide gel에는 침입하지 못하였기 때문인 것으로 사료되었다. No. 3에는 근원섬유 단백질을 0.6M NaCl에 가용화시킨 후 가용화된 성분을 나타낸 것이다. 이 결과에 의하면 근원섬유의 주요 성분인 myosin(분자량 20만) 및 actin(분자량 4만3천)의 성분이 대량 검출되었다. 이것을 가열처리 하면 No.4에 제시한 것과 같이 근원섬유 중

의 단백질간 상호작용에 의한 aggregation이 일어나 침전으로 이전된다. 이와 같은 원리는 일반적인 햄, 소시지 등과 같은 겔화 식품의 제조원리에 이용되고 있다. 한편, 0.6M NaCl에 가용화된 근원섬유 단백질에 계관 추출물을 첨가하였을 때의 변화를 No.5~7에 제시하였다. 각각 3, 5, 10%를 첨가하여 분석한 결과 근원섬유의 주요성분들은 거의 검출되지 않았다. 여기에서는 가열을 하지 않은 상태에서 검토한 결과지만 비가열임에도 불구하고 단백질이 불용화되는 결과를 가져왔다. 이와 같은 결과는 계관 추출물을 첨가함으로써 단백질과의 상호작용이 일어나 침전으로 이전되었기 때문인 것으로 사료되었다. 즉, 계관 추출물은 대부분 무코-단백질인 것으로 알려져 있으며, 이는 단백질과의 친화성이 강하기 때문인 것으로 사료되었다.

계관 추출물과 단백질의 친화성이 강하다면, 겔화식품에 있어서 보수력 등을 향상시킬 것으로 예상된다. 따라서 Fig. 16에는 돈육에 수분 및 NaCl을 첨가하여 교반한 후 여기에 5% 계관 추출물을 첨가하여 가열하였을 때의 보수력을 검토하였다. 이 결과에 의하면 전체적으로 단백질 농도가 증가할수록 보수력도 상승하는 경향을 나타내었으며, 또한 계관 추출물을 첨가한 것이 첨가하지 않은 것보다 높은 보수력을 나타내었다. 보수력의 증가 형태도 단백질 농도와 관계가 있었으며, 단백질 농도가 낮으며 수분함량이 높은 것은 계관 추출물을 첨가함으로써 그 효과가 뛰어난 것으로 나타났다. 즉, 단백질 함량이 높으면 그 자체만으로도 수분을 보유할 수 있는 충분한 능력이 있으나, 단백질 함량이 낮은 경우 수분을 보유할 수 있는 힘이 약해지므로 이때에 계관 추출물을 첨가하면 단백질과 계관추출물과의 상호작용으로 보수력을 증가시키는 것으로 사료되었다. 따라서 계관으로부터의 추출물은 겔화식품의 물성개량제로서 충분히 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

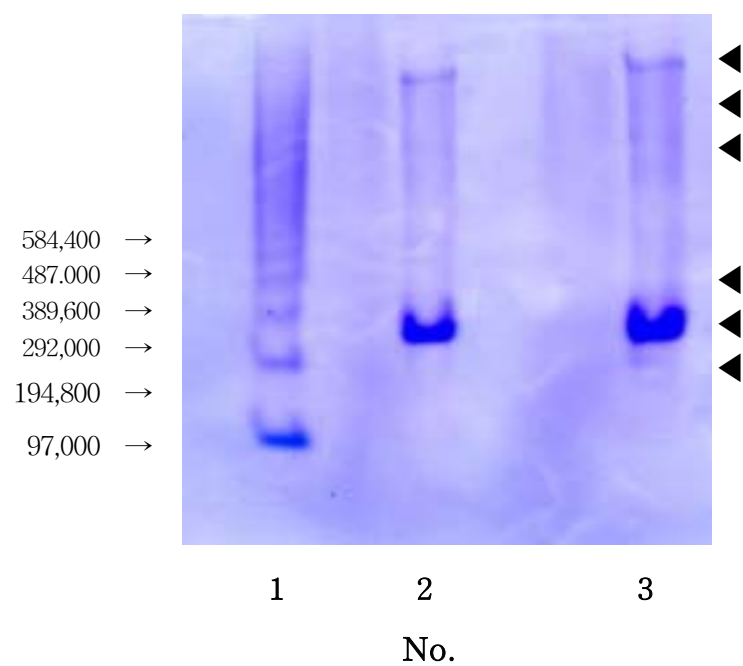


Fig. 14. SDS-PAGE pattens of comb extract

1 : MW maker

2 : Comb extract ($20\mu\ell$)

3 : Comb extract ($30\mu\ell$)

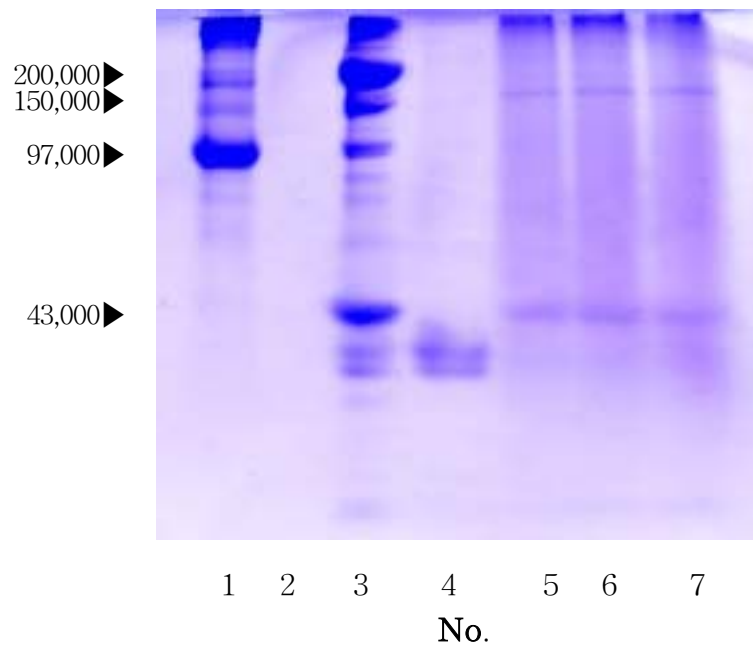


Fig. 15. SDS-PAGE patterns of interaction between myofibrillar protein of pork and comb extract.

1. MW maker 2. Comb extract
- 3 : Supernatant of myofibrillar protein dissolved in 0.6M NaCl solution (pH 7.0)
4. Supernatant of myofibrillar protein with 0.6M NaCl heated at 85°C for 30 min.
5. Supernatant after reaction between 3% comb extract and myofibrillar protein in 0.6M NaCl.
6. Supernatant after reaction between 5% comb extract and myofibrillar protein in 0.6M NaCl.
7. Supernatant after reaction between 10% comb extract and myofibrillar protein in 0.6M NaCl.

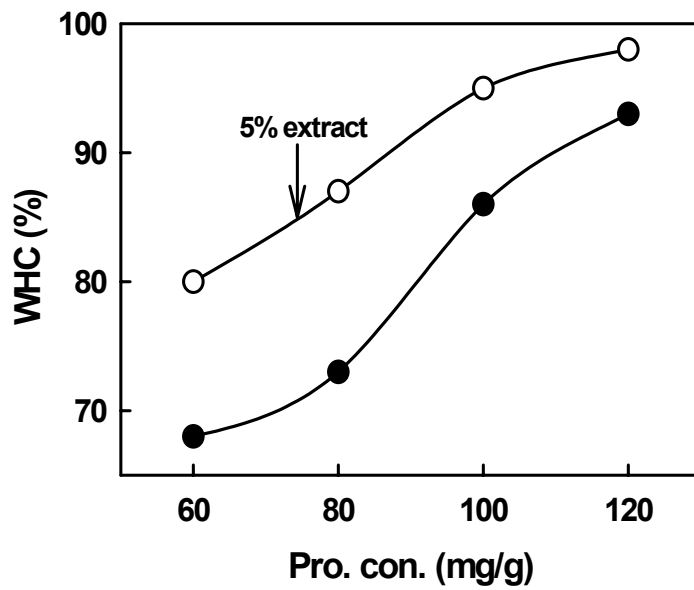


Fig. 16. Water holding capacity of hettig gel prepared from pork meat with 5% extract and without.

3. 동물시험

1) rat의 체중에 미치는 계담의 영향

각각 사료에 5%, 10%의 계담을 혼합하여 rat에 급여하였을 때의 무게의 변화를 Fig. 14. 에 나타내었다. 전체적으로 계담 10%를 첨가한 사료가 체중이 높게 나타나는 경향이었으나, 사육시간이 경과함에 따라서 그 차이는 작아지는 것으로 나타났다. 5%를 첨가한 사료를 급여한 경우는 대조구와 비교하여 큰 차이는 인정되지 않았다. 10%에서의 다른 구간과 비교하여볼 때 다소 높은 체중을 나타내고 있는데, 이는 rat 개체간의 체중 차이에서 기인되는 것으로 사료되었다.

2) 혈중 총콜레스테롤 함량

Fig. 14와 같이 사육한 rat로부터 혈액을 채취하여 혈액 중의 총 콜레스테롤 분석하여 Fig. 15에 그 결과를 제시하였다. 이 결과에 의하면 3주까지는 전체적으로 증가하는 경향이었으나 그 후로는 증가 속도가 저하되었다. 또한 계담을 첨가한 사료가 대조구와 비교하여 전체적으로 다소 낮은 총콜레스테롤 함량을 나타내었으며, 또한 계담의 첨가량이 높을수록 낮은 콜레스테롤 함량을 나타내었다. 이와 같은 결과는 Fig.14 에 제시한 체중의 변화와 상반되는 결과를 나타내었는데 계담을 급여함으로써 체중에는 크게 영향을 미치지 않는 반면 콜레스테롤 생성을 다소 억제하는 기능이 있는 것으로 사료되었다. 혈중 콜레스테롤은 간 및 장관의 콜레스테롤 대사에 영향을 미치는 각종 인자와 관련하여 체내 지질대사를 반영하고 있으므로 임상적 지표로서 이용할 수 있다.

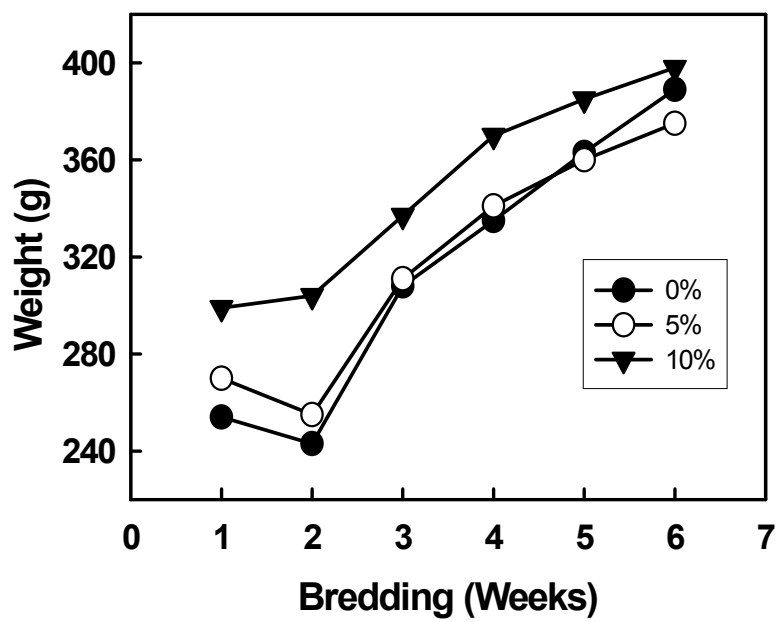


Fig. 14. Changes in weight of rat fed chicken bile

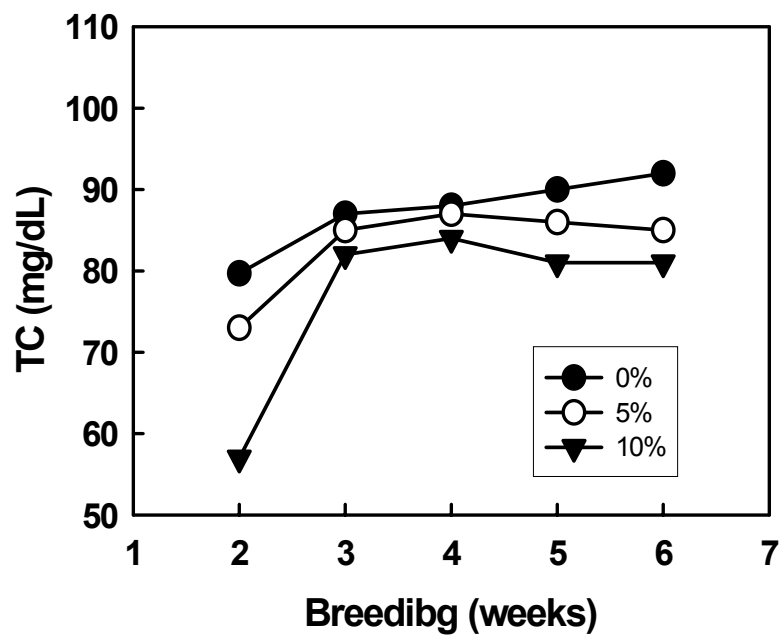


Fig. 15. Changes of total cholesterol in blood of rat fed chicken bile

3) Low density lipoprotein(LDL) 함량

LDL은 혈중 콜레스테롤의 주요 운반체이며, 대동맥죽상경화소에 축적되어있는 콜레스테롤의 거의가 LDL 유래로 알려지고 있다. 섬유아세포, 동맥평활근세포에는 특이적으로 결합하는 부위가 있으며, 이들 세포에 둘러싸인 LDL의 단백질 부분은 리소솜으로 분해되어, 콜레스테롤은 에스테르화되어 hydroxymethylglutaryl-CoA reductase 활성을 억제한다. 즉, 이와 같은 기작에 의해서 콜레스테롤 생성을 억제한다.

Fig. 16에는 혈중 LDL의 변화를 측정하여 결과를 제시하였다. 전체적으로는 rat의 사육기간의 경과와 함께 약간 저하하는 경향이였다. 그러나, 계담을 첨가하여 급여한 구가 대조구와 비교하여 높은 LDL 값을 나타내었으며, 계담을 첨가함으로써 콜레스테롤 생성을 억제시키는 LDL의 함량이 높게 유지되는 것으로 사료되었다. Fig. 15에 제시한 것과 같이 대조구가 계담을 첨가한 구 보다도 다소 콜레스테롤 함량이 높게 나타났는데 이와 같은 결과는 LDL 함량의 차이에서 기인한 것으로 사료되었다.

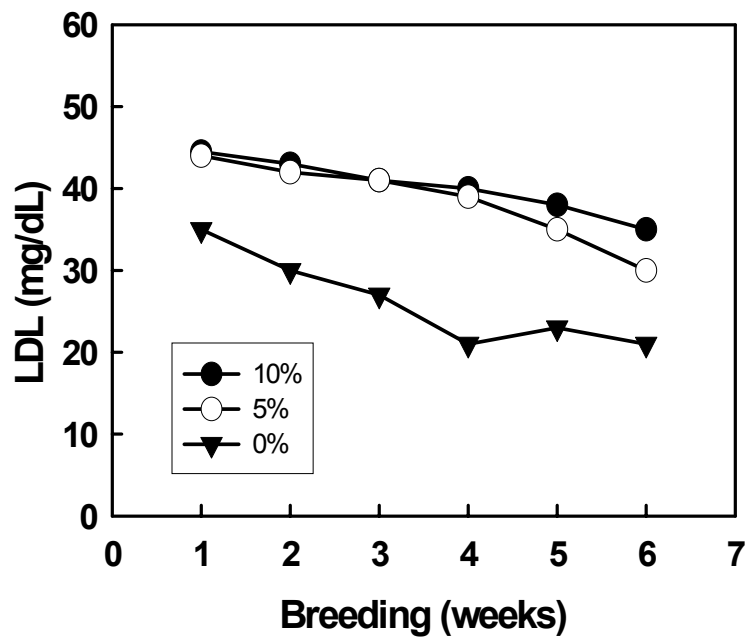


Fig. 16. Changes of low density lipoprotein(LDL) in blood of rat fed chicken bile.

4) High density lipoprotein(HDL) 함량

계담을 첨가한 사료를 급여한 후 채취한 혈액중의 HDL의 함량을 분석한 결과 Fig. 17과 같다. 계담을 첨가하지 않은 대조구의 경우는 4주째 까지 증가하는 경향을 나타내었으며, 이후에는 큰 변화는 인정되지 않았다. 5%의 계담을 첨가한 HDL의 함량은 최초 4주까지는 증가하는 추세였으나, 이후부터는 저하하는 경향을 나타내었다. 또한 10%의 계담을 첨가한 구간은 다른 구간과는 달리 초기에 증가하는 경향이 없었으며, 계속적으로 다른 구간과 비교하여 낮은 HDL 값을 나타내었다. 이와 같은 결과는 대조구의 경우 사료에 콜레스테롤 및 돈지를 다량 첨가하였으나, 그 외의 것은 대조구에 계담을 각각 5% 및 10%를 첨가하였다. 따라서 대조구는 다량의 돈지 및 콜레스테롤을 섭취하였기 때문에 높은 HDL 값을 나타낸 반면, 계담과 함께 섭취한 것은 HDL 값이 초기의 HDL 값과 거의 변화가 없었으며, 이것은 계담이 HDL의 생성을 다소 억제시킨 것으로 추측되었다.

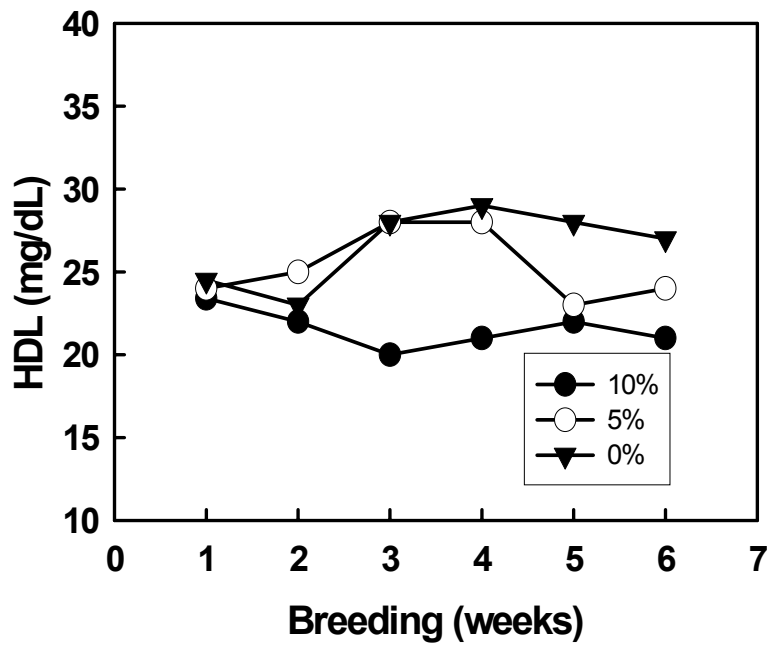


Fig. 17. Changes of high density lipoprotein(HDL) in blood of rat fed chicken bile.

5) Triglyceride 함량

Fig. 18에는 계담을 급여한 rat의 혈중 triglyceride 함량을 검토하여 결과를 제시하였다. 계담의 무급여 및 급여와 관계없이 전체적으로 사육 기간의 경과와 함께 triglyceride 함량은 증가하는 경향을 보였다. 그러나 사료의 구성에 따라서 그 정도에 있어서 차이가 있었으며 계담의 첨가 비율이 높을수록 triglyceride의 증가 속도는 느리게 나타났다. 즉 이와 같은 결과는 Fig. 15에 제시한 혈중 총콜레스테롤, Fig. 16에 제시한 LDL 및 Fig. 17에 제시한 HDL의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 또한 사료에 계담을 첨가함으로써 중성 지질인 triglyceride 생성을 억제하는 것으로 사료되었으며, 그 이유에 대한 것은 앞으로 좀더 자세한 연구를 필요로 하였다.

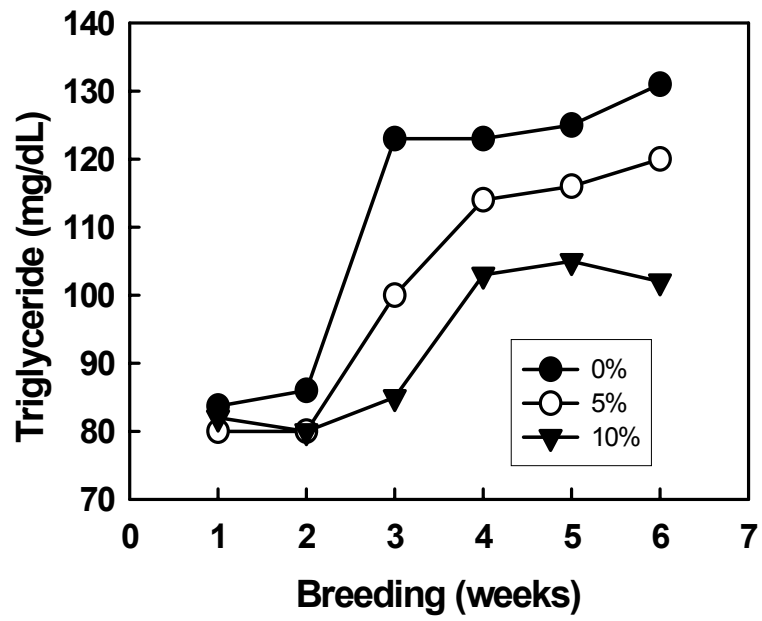


Fig. 18. Changes of triglyceride in blood of rat fed chicken bile.

6) Glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT)

GOT는 sGOT 및 mGOT의 2가지 타입이 존재하며, 포유동물의 장기에 존재한다. 염증 등의 세포막 투과성의 변화 및 세포 괴사에 의하여 세포내 GOT는 혈중에 흘러 들어간다. 따라서 혈중의 GOT의 분석으로부터 임상검사상 간염, 심근경색 등의 진단에 기초적인 자료로 활용되기도 한다.

계담을 급여한 rat의 혈중 GOT 함량을 측정하여 Fig. 19에 제시하였다. 이 결과에 의하면 계담을 급여하지 않은 대조구와 비교하여 전체적으로 낮은 GOT 값을 나타내었으며 계담의 급여량이 많을수록 GOP의 상승속도가 늦음을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 사료에 계담을 첨가함으로써 장기의 손상을 예방할 수 있을 것으로 사료되었다. 즉, 사료중에 계담을 첨가하지 않은 대조구의 경우는 급격히 GOP의 상승이 관찰되었으며, 이대로 방치하면 간 및 심장 등에 손상을 입힐 것으로 예측되었으나, 계담 첨가구의 경우 대조구와 비교하여 GOP의 상승 속도가 느리게 나타났으므로 장기의 손상을 다소 예방할 수 있을 것으로 예상되었다. 이상의 결과는 앞으로 좀더 자세한 연구를 통하여 확실한 예방 효과가 입증된다면 건강보조식품, 의약품으로서의 이용 가능성을 시사한 것이다.

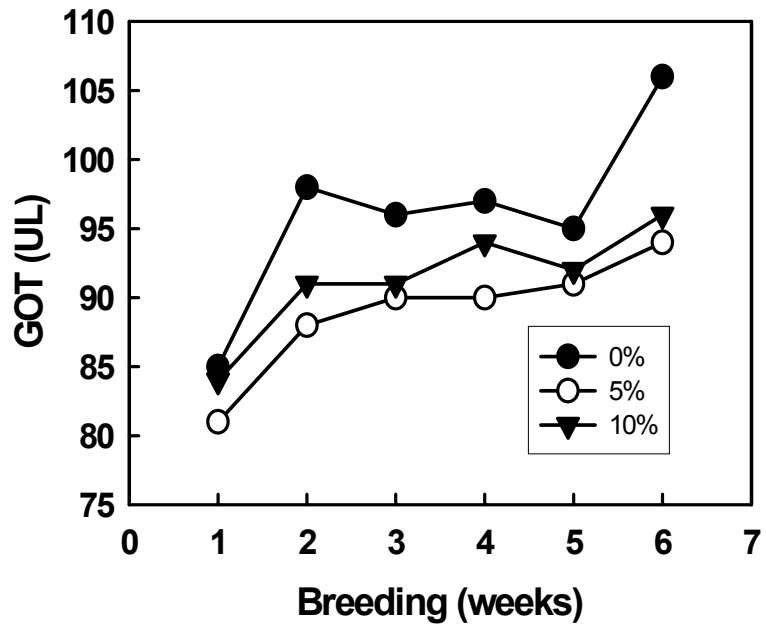


Fig. 19. Changes of GOP in blood of rat fed chicken bile.

7) Glutamic-pyruvic transaminase (GPT)

GPT는 간에 특이적으로 많이 포함되어 있으며, 위에서도 간의 약 1/3의 활성을 나타낸다. 그러나, 다른 장기에서는 거의 활성이 인정되지 않는다. 간세포 장애 시에는 간의 GPT는 감소하며, 혈중의 GPT는 증가한다. 따라서, 혈중의 GPT 증가는 임상에 있어서 간 등의 질환을 진단하는데 자료로 이용된다.

계담을 급여한 rat의 혈중 GPT 함량을 측정하여 Fig. 20에 제시하였다. 이 결과에 의하면 계담을 급여하지 않은 대조구와 비교하여 전체적으로 낮은 GPT 값을 나타내었으며 계담의 급여량이 많을수록 GPT의 상승속도가 늦음을 알 수 있었다. 이 결과를 토대로 하여 고찰하면 사료에 계담을 첨가함으로써 간 등의 장기 손상을 예방할 수 있을 것으로 사료되었다. 즉, 사료 중에 계담을 첨가하지 않은 대조구의 경우는 급격히 GPT의 상승이 관찰되었으며, 이대로 방치하면 간 등의 장기에 손상을 입힐 것으로 예측되었으나, 계담 첨가구의 경우 대조구와 비교하여 GPT의 상승 속도가 느리게 나타났나 장기의 손상을 어느 정도 예방할 수 있을 것으로 예상되었다.

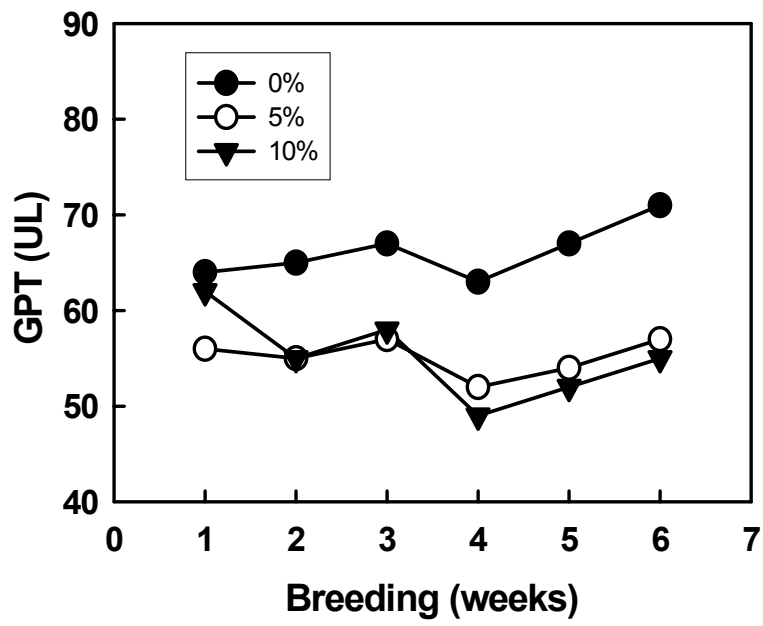


Fig. 20. Changes of GPT in blood of rat fed chicken bile.

8) 경구 투여한 mouse의 SOD 활성도 변화

생쥐에 고지방 식이를 급여하고 계담 추출물을 28일 동안 경구 투여한 후 간 조직에서의 SOD활성도를 측정된 결과 Fig. 21에서 보는 바와 같이 대조군(57.4 ± 2.81 Umg Protein)에 비해 계담 투여군은 $57.16 \pm 2.57 \sim 58.04 \pm 2.74$ 로 계담을 투여하지 않은 고지방 식이 섭취군에 비하여 SOD 활성이 증가하는 경향을 보였다.

한편 계담과 계담 추출물 투여군 사이에서는 5% 계담 투여군이 다른 군 보다 높게 증가하였고 계담 추출물 보다도 높은 증가를 보였다.

9) 경구 투여한 mouse의 H_2O_2 함량 변화

생쥐에 계담 추출물을 15일 동안 경구 투여한 후 간 조직에서의 H_2O_2 함량을 조사한 결과 Fig. 22에서 보는 바와 같이 대조군(6.9 ± 0.65 mM/g liver)에 비해 고지방 식이 투여군은 7.52 ± 0.64 mM/g liver로 증가하였으나, 계담투여군에서는 계담 10%투여군 6.86 ± 0.49 mM/g liver과 계담 추출물 3%투여군에서 6.7 ± 0.72 mM/g liver로 유의성 있는 감소를 보였다($p < 0.05$).

본 결과와 비슷한 견해로서 이 등²⁶⁾ paraquat 투여 생쥐에서 홍삼 추출물이 paraquat 투여군 보다 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였다고 보고하였고, Lee 등¹⁷⁾은 홍삼 물 추출물을 생후 6주부터 투여하여 노화에 따른 홍삼의 항산화 효과를 조사한 결과 나이가 들어감에 따라 대조군에 비해 인삼 투여군에서는 높은 활성도를 유지하였으며 노화와 더불어 나타나는 활성도의 감소도 지연되어 활성산소와 과산화 수소의 함량이 줄어들었으나 상호 유의성은 없었다고 보고하였다. 이러한 결과로 종합하여 볼 때 H_2O_2 의 함량 변화는 SOD활성도의 활성 증가로 인하여 catalase의 유도가 증가함으로써 과산화수소의 함량이 유의성 있게 감소되었다고 생각된다.

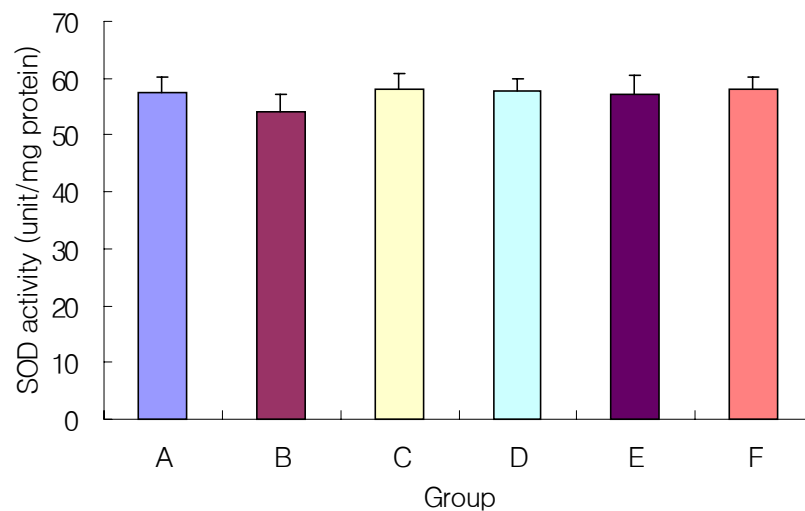


Fig 21. Effect of chicken bile on hepatic SOD activity of mouse treated with high fat diet.

A: Control. B: High fat diet.

C: High fat diet with 5% chicken bile.

D: High fat diet with 10% chicken bile.

E: High fat diet with 1% chicken bile ethanol extract.

F: High fat diet with 3% chicken bile ethanol extract.

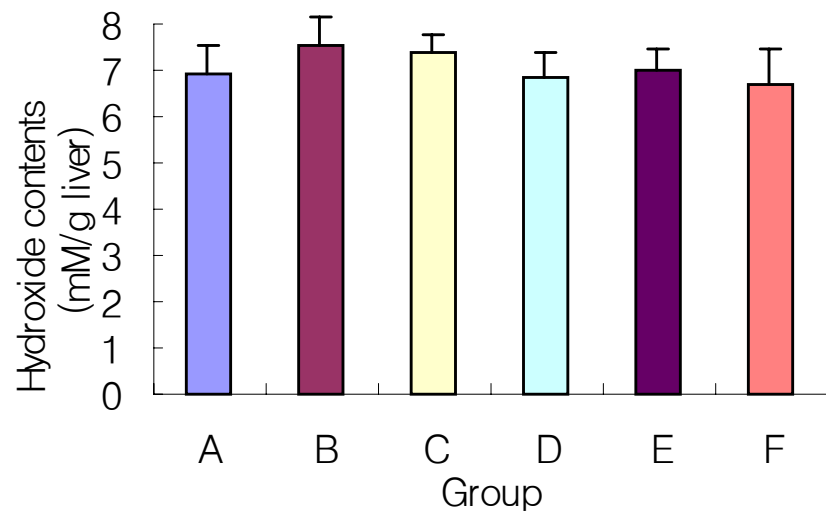


Fig 22. Effect of chicken bile on hepatic hydroperoxide level of mouse treated with high fat diet.

A: Control. B: High fat diet.

C: High fat diet with 5% chicken bile.

D: High fat diet with 10% chicken bile.

E: High fat diet with 1% chicken bile ethanol extract.

F: High fat diet with 3% chicken bile ethanol extract.

10) 경구 투여한 mouse의 Catalase 활성화도 변화

생쥐에 홍삼 추출물을 15일 동안 경구 투여한 후 간 조직에서의 catalase활성도 변화를 조사한 결과 Fig. 23에서 보는 바와 같이 생리식 염수 투여군인 정상 대조군(54.26 ± 2.56 U/mg protein)에 비해 고지방 식이 투여군은 53.08 ± 1.78 U/mg protein로 감소하였으나, 고지방 식이 투여후 계담을 투여한 군에서는 계담 투여군은 54.36 ± 2.69 U/mg protein, 55.64 ± 3.01 U/mg protein으로 조사되었으며, 계담 추출물 투여군은 54.24 ± 3.25 U/mg protein, 55.62 ± 3.48 U/mg protein로 약간 증가하는 것으로 나타났다.

이러한 결과와 비슷한 견해로서 Rao 등(27)은 쥐에서 항산화효소의 발현을 조사한 결과 나이에 따라 Catalase는 뇌와 간세포, 신장에서 유의성 있게 감소한다고 보고하였고, 전 등(28)은 감마선 조사군은 대조군에 비하여 활성도가 증가하다가 감소하는 경향인 반면에 홍삼 추출물 투여군의 활성도는 감마선 조사군에 비해서 빠르게 회복됨을 관찰할 수 있었다고 보고하였다.

또한 Kim 등(23)과 장 등(24)은 전통적으로 노화 및 항암 효과에 대한 효능이 알려진 인삼 사포닌 분획중 PD와 Rb2를 SOD-catalase 융합 유전자에 처리하여 그 유도효과가 5배 이상 됨을 증명하였으며, 사포닌 분획 중 Rb2가 특이적으로 활성산소 제거효과를 나타낸다고 보고하였다.

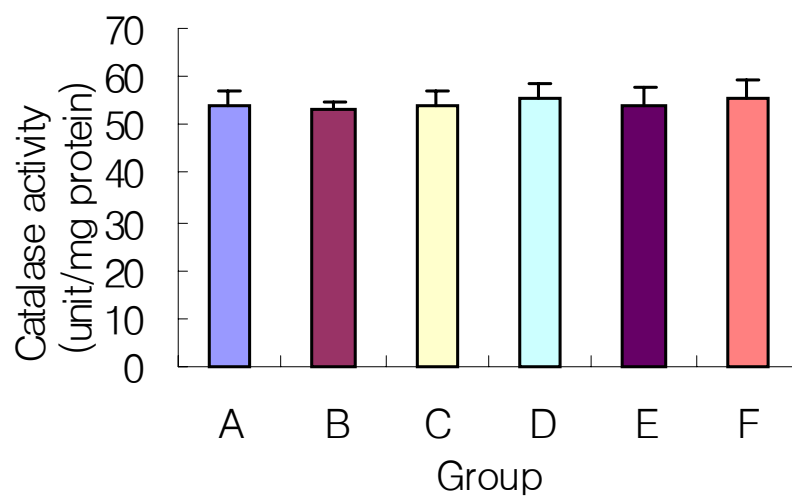


Fig 23. Effect of chicken bile on hepatic catalase activity of mouse treated with high fat diet.

A: Control. B: High fat diet.

C: High fat diet with 5% chicken bile.

D: High fat diet with 10% chicken bile.

E: High fat diet with 1% chicken bile ethanol extract.

F: High fat diet with 3% chicken bile ethanol extract.

11) 경구 투여한 mouse의 MDA 함량 변화

생쥐에 계담과 계담 추출물을 28일 동안 경구 투여한 후 간 조직에서 활성산소에 의하여 야기되는 세포막 지질과산화의 최종산물인 MDA 함량 변화를 조사한 결과 Fig. 24에서 보는 바와 같이 대조군에 비해 계담 투여군은 2.1~3.5%의 감소하였고, 계담 추출물 투여군은 3.7~5.4%의 감소를 나타냈다. 고지방 식이군에서는 계담 추출물 3% 투여군에서 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하였다.

이러한 결과를 종합하여 볼 때 활성산소에 의해서 생성된 지질과산화의 최종산물인 MDA 함량 변화는 SOD, catalase 등의 항산화 효소의 활성도가 증가함에 따라 유의성($p < 0.01$) 있게 감소됨을 볼 수 있었으며, 계담 중에서 추출물에 포함된 성분이 항산화 효과가 가장 좋은 것으로 조사되었다. 따라서 앞으로 계담 추출물에 대한 폭 넓은 연구가 진행되어야 될 것으로 생각된다.

12) Glutathione peroxidase(GP) 활성도 변화

생쥐의 간 조직내 glutathione peroxidase(GP)의 활성도 변화는 Fig. 25와 같이 나타났다. 정상 대조군의 GP 활성도는 3.62 ± 0.265 U/mg protein 이었으나, 고지방식이투여군의 GP 활성도는 3.52 ± 0.15 U/mg protein로 정상 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있는 GP 감소를 보였다.

그러나 계담 투여군과 계담 추출물 투여군에서는 고지방 식이만 투여한 군보다는 높은 GP 치를 나타냈다.

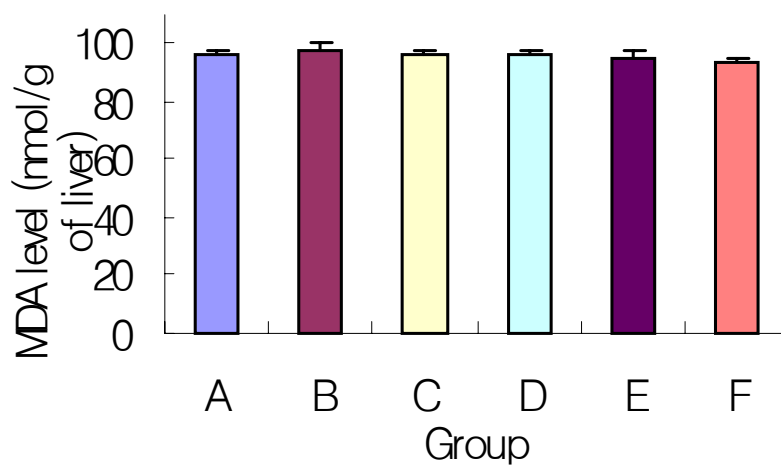


Fig 24. Effect of chicken bile on hepatic MDA level of mouse treated with high fat diet.

- A: Control.
- B: High fat diet.
- C: High fat diet with 5% chicken bile.
- D: High fat diet with 10% chicken bile.
- E: High fat diet with 1% chicken bile ethanol extract.
- F: High fat diet with 3% chicken bile ethanol extract.

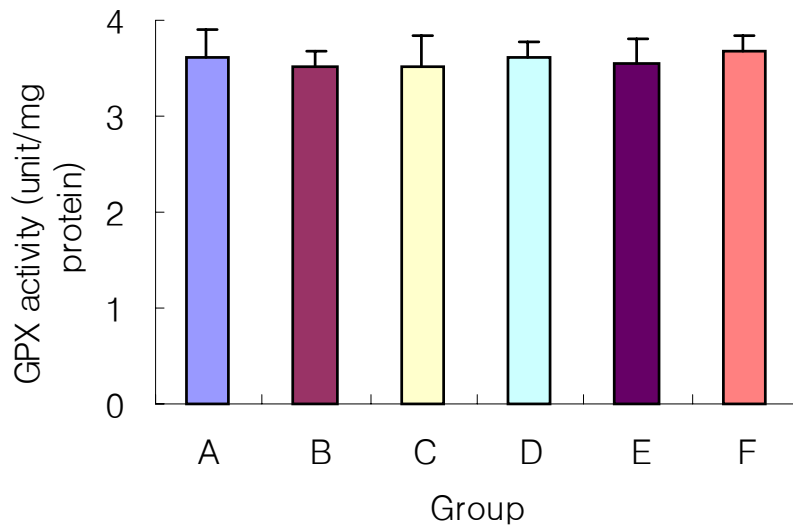


Fig 25. Effect of chicken bile on hepatic glutathione peroxidase activity of mouse treated with high fat diet.

- A: Control.
- B: High fat diet.
- C: High fat diet with 5% chicken bile.
- D: High fat diet with 10% chicken bile.
- E: High fat diet with 1% chicken bile ethanol extract.
- F: High fat diet with 3% chicken bile ethanol extract.

13) 간장의 조직학적 변화

시험식으로 4주간 사육한 마우스의 간세포조직을 H&E 염색을 통하여 광학현미경으로 관찰한 결과는 Fig 26과 같다. 고지방 식이를 급여한 마우스의 간세포에서는 지방세포의 침윤이 관찰되고 경도의 공포변성이 관찰되고 있으나 계담 추출물 투여군에서는 간세포의 지방침윤이 대조군에 비하여 줄어들고 공포변성이 관찰되지 않았다. 특히 추출물 3% 투여군에서는 고지방 식이를 급여하지 않은 대조군과 유사한 정도의 간세포들이 관찰되었다.

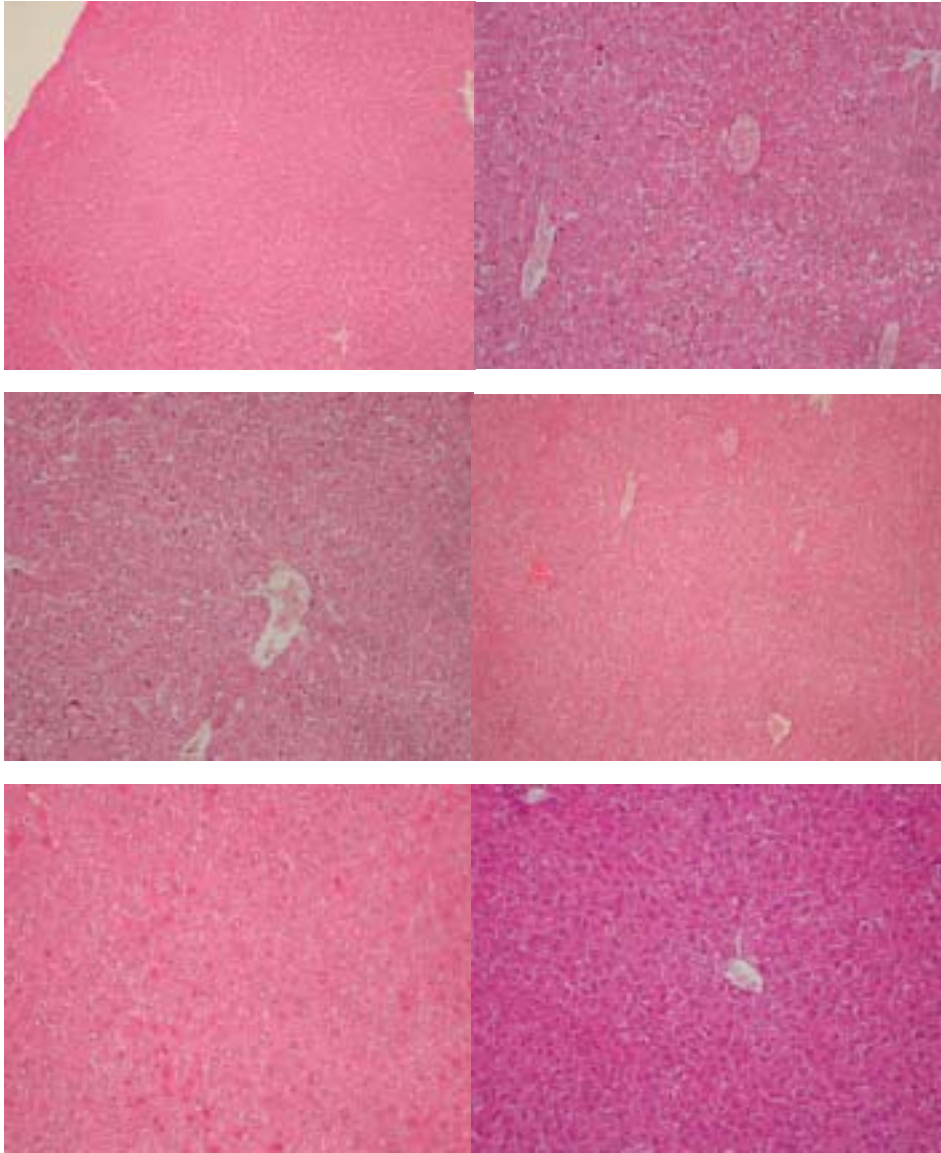


Fig 26. Light microscoph of livers of mouse with chicken bile.

- A: Control. B: High fat diet.
- C: High fat diet with 5% chicken bile.
- D: High fat diet with 10% chicken bile.
- E: High fat diet with 1% chicken bile ethanol extract.
- F: High fat diet with 3% chicken bile ethanol extract.

14. Paraquat 투여한 mouse의 H₂O₂ 함량의 변화

생쥐 간 조직내의 H₂O₂ 함량은 Fig. 27과 같이 대조군에서는 간조직 1g 당 5.92±0.34 mM이었으며, paraquat 만을 투여한 생쥐간에서는 6.36±0.51 mM로 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보였다(p<0.05).

그러나 paraquat 투여 전 계담 및 계담추출물을 투여한 생쥐의 간에서는 paraquat 투여전 계담을 투여한 모든 군에서 H₂O₂ 함량이 감소되는 현상을 보였다.

계담 투여군 보다는 계담 추출물 투여군에서 보다 높은 수준의 H₂O₂ 감소를 보였다.

15) Paraquat 투여한 mouse의 SOD 활성도 변화

생쥐에 계담 추출물을 28일 동안 경구 투여한 후 paraquat를 복강내 주사한 다음 24시간 경과 후 간 조직에서의 SOD활성도를 측정된 결과 Fig. 28에서 보는 바와 같이 대조군(52.6±2.38 Umg Protein)에 비해 Paraquat 단독투여군은 48.48±2.57 Umg Protein로 유의성있게 감소하였다(p<0.05). 계담 추출물 투여후 Paraquat 투여군은 50.08±3.24 Umg ~ 52.7±1.91 Umg Protein으로 Paraquate 단독 처리군에 비하여 SOD 활성이 증가하는 경향을 보였다.

한편 계담 추출물 투여군 사이에서는 3% 추출물 투여군이 다른 군보다 높게 증가하였다. 이러한 결과는 계담 추출물 성분이 SOD의 활성도를 유의성 있게 증가시키는 것으로 생각되며 그 중에서 어떤 성분이 가장 활성을 띠는가에 대해서는 계속적인 실험이 수행 되어져야 한다고 생각된다.

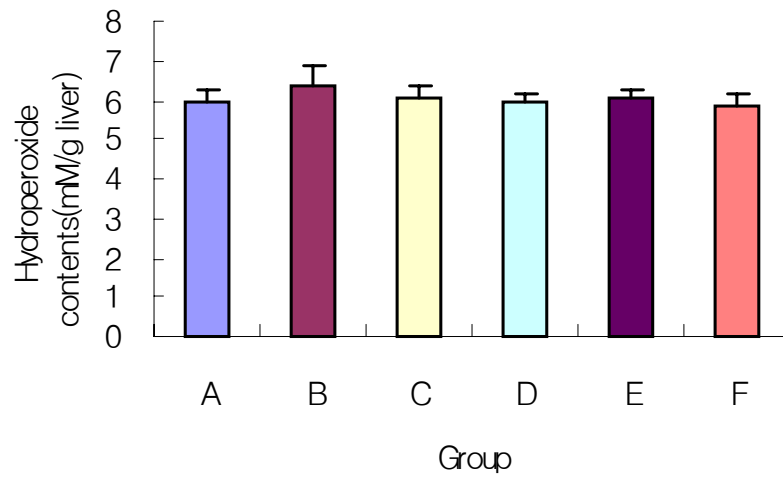


Fig 27. Effect of chicken bile on hepatic hydroperoxide level of mouse treated with paraquat.

- A: Control. B: High fat diet.
- C: Five percent chicken bile diet with Paraquat.
- D: Ten percent chicken bile diet with Paraquat.
- E: One percent chicken bile ethanol extract diet with Paraquat.
- F: Three percent chicken bile ethanol extract diet with Paraquat.

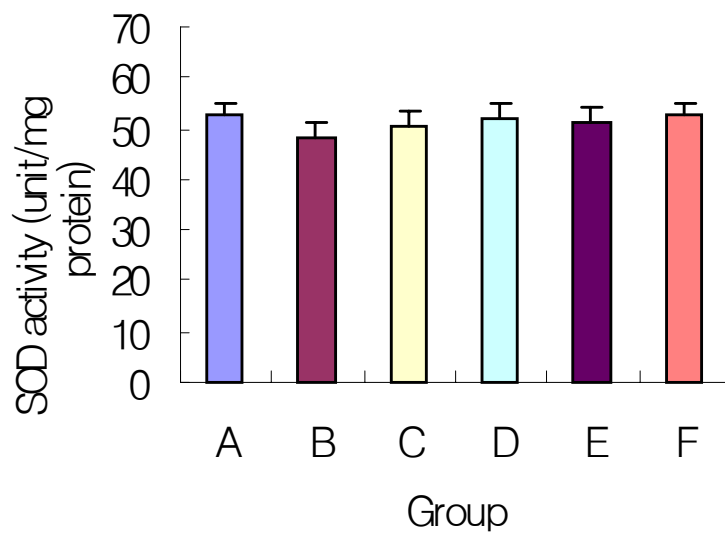


Fig 28. Effect of chicken bile on hepatic SOD activity of mouse treated with paraquat.

- A: Control.
- B: High fat diet.
- C: Five percent chicken bile diet with Paraquat.
- D: Ten percent chicken bile diet with Paraquat.
- E: One percent chicken bile ethanol extract diet with Paraquat.
- F: Three percent chicken bile ethanol extract diet with Paraquat.

16) Paraquat 투여한 mouse의 catalase의 활성도 변화

생쥐의 간조직 세포 내 catalase 활성도는 Fig. 29에 나타난 바와 같다. 정상 대조군의 catalase 활성도는 54.02 ± 3.34 U/mg protein인데 비하여 생쥐에 paraquat를 단독 투여한 군의 catalase 활성도는 52.66 ± 2.83 U/mg protein으로 약간 감소하였다. 그러나 paraquat 투여전 계담 추출물을 투여한 모든 군에서는 catalase 활성이 paraquat 단독투여군에 비하여 증가하였고 대조군과 유사한 결과를 보였고 특히 계담 추출물 3%는 55.44 ± 3.81 U/mg protein로 대조군 보다도 높은 활성도를 나타내었다.

17) Paraquat 투여한 mouse의 Glutathione peroxidase(GP) 활성도 변화

생쥐의 간 조직내 glutathione peroxidase(GP)의 활성도 변화는 Fig. 30과 같이 나타났다. 정상 대조군의 GP 활성도는 3.78 ± 0.23 U/mg protein 이었으나, paraquat단독 투여군의 GP 활성도는 2.94 ± 0.26 U/mg protein이어서 정상 대조군에 비하여 유의성($p < 0.01$) 있는 GP 감소를 보였다.

그러나 계담 5, 10% 투여군과 계담 추출물 투여군에서는 정상 대조군 보다는 낮지만 Paraquate 단독투여군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있는 변화를 나타냈다(Fig. 30).

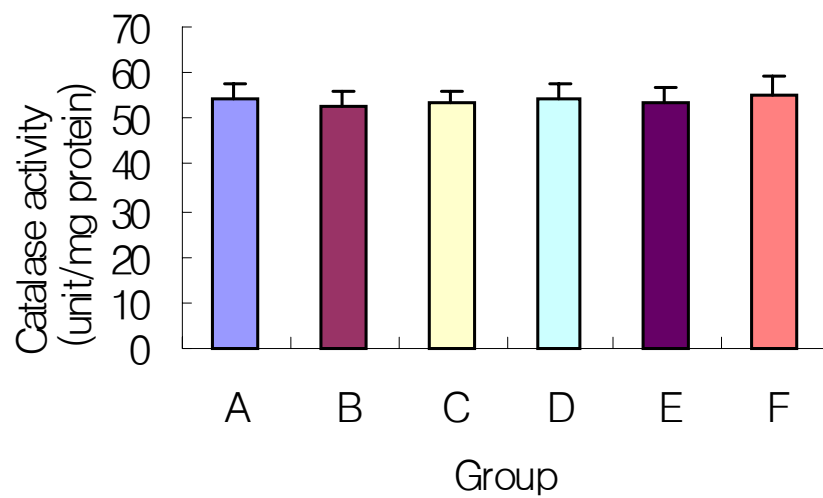


Fig 29. Effect of chicken bile on hepatic catalase activity of mouse treated with paraquat.

A: Control.

B: High fat diet.

C: Five percent chicken bile diet with Paraquat.

D: Ten percent chicken bile diet with Paraquat.

E: One percent chicken bile ethanol extract diet with Paraquat.

F: Three percent chicken bile ethanol extract diet with Paraquat.

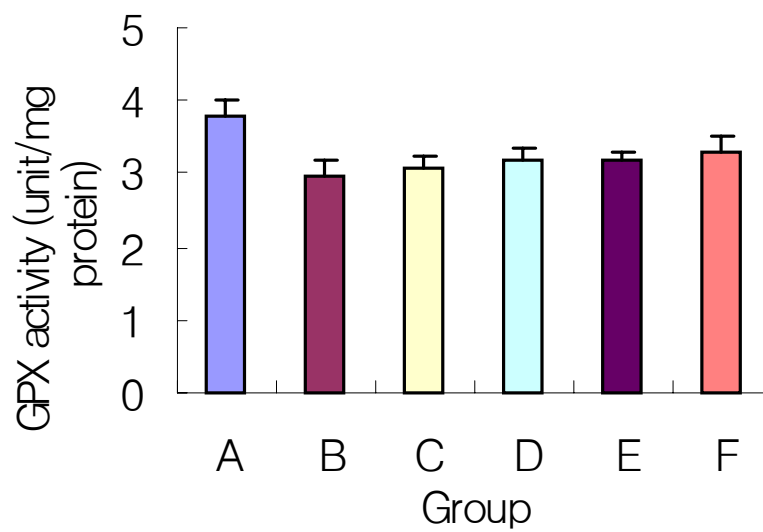


Fig 30. Effect of chicken bile on hepatic glutathione peroxidase activity of mouse treated with paraquat.

- A: Control. B: High fat diet.
- C: Five percent chicken bile diet with Paraquat.
- D: Ten percent chicken bile diet with Paraquat.
- E: One percent chicken bile ethanol extract diet with Paraquat.
- F: Three percent chicken bile ethanol extract diet with Paraquat.

18) Paraquat 투여한 mouse의 지질과산화 수준의 변화

Paraquat투여전에 계담추출물을 투여 받은 생쥐 간에서 지질과산화물(MDA)수준량 변화를 알아보기 위하여 간조직내 지질과산화 최종산물인 MDA함량을 측정된 결과 Fig. 31과 같이 나타났다. 정상 대조군에서의 MDA함량은 간 조직 1g당 96.8 ± 4.07 nmo1 MDA량 이었으나, paraquat 단독 투여군에서는 109.3 ± 3.91 nmo1로 정상 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$)있는 증가를 보였다. 계담추출물을 투여 후 paraquat투여를 한 생쥐군에서 계담 추출물을 투여한 3군 모두에서 대조군에 비하여 약간 증가하였으나 Paraquat 투여군에 비하여는 감소하는 경향을 보였다. 특히 계담 10%투여군과 추출물 3%투여군에서는 MDA 함량이 paraquat 투여군에 비하여 유의성($p < 0.01$)있는 감소를 보였다.

19) Paraquat 투여한 mouse의 간장의 조직학적 변화

계담 추출물을 사료에 혼합하여 4주간 사육한 다음 Paraquat를 투여한 마우스의 간세포조직을 H&E 염색을 통하여 광학현미경으로 관찰한 결과는 Fig 32와 같이 나타났다. Paraquat를 단독투여한 마우스의 간세포에서는 세포의 공포변성과 수종변성, 간세포종대 등의 소견이 관찰되었으나 계담 추출물을 투여한 다음 Paraquat를 투여한 마우스의 간세포에서는 정도의 공포변성이 관찰되었으나 간세포종대나 수종변성은 단독투여군에 비하여 서서히 줄어들고 있는 것으로 관찰되었고, 추출물 3%투여군에서는 간세포의 크기나 형태가 정상대조군에 매우 유사한 간세포들이 관찰되었다.

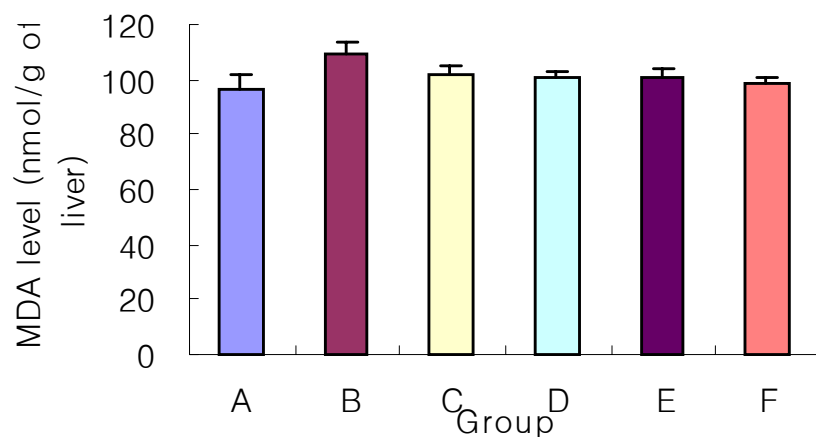


Fig 31. Effect of chicken bile on hepatic MDA level of mouse treated with paraquat.

A: Control. B: High fat diet.

C: Five percent chicken bile diet with Paraquat.

D: Ten percent chicken bile diet with Paraquat.

E: One percent chicken bile ethanol extract diet with Paraquat.

F: Three percent chicken bile ethanol extract diet with Paraquat.

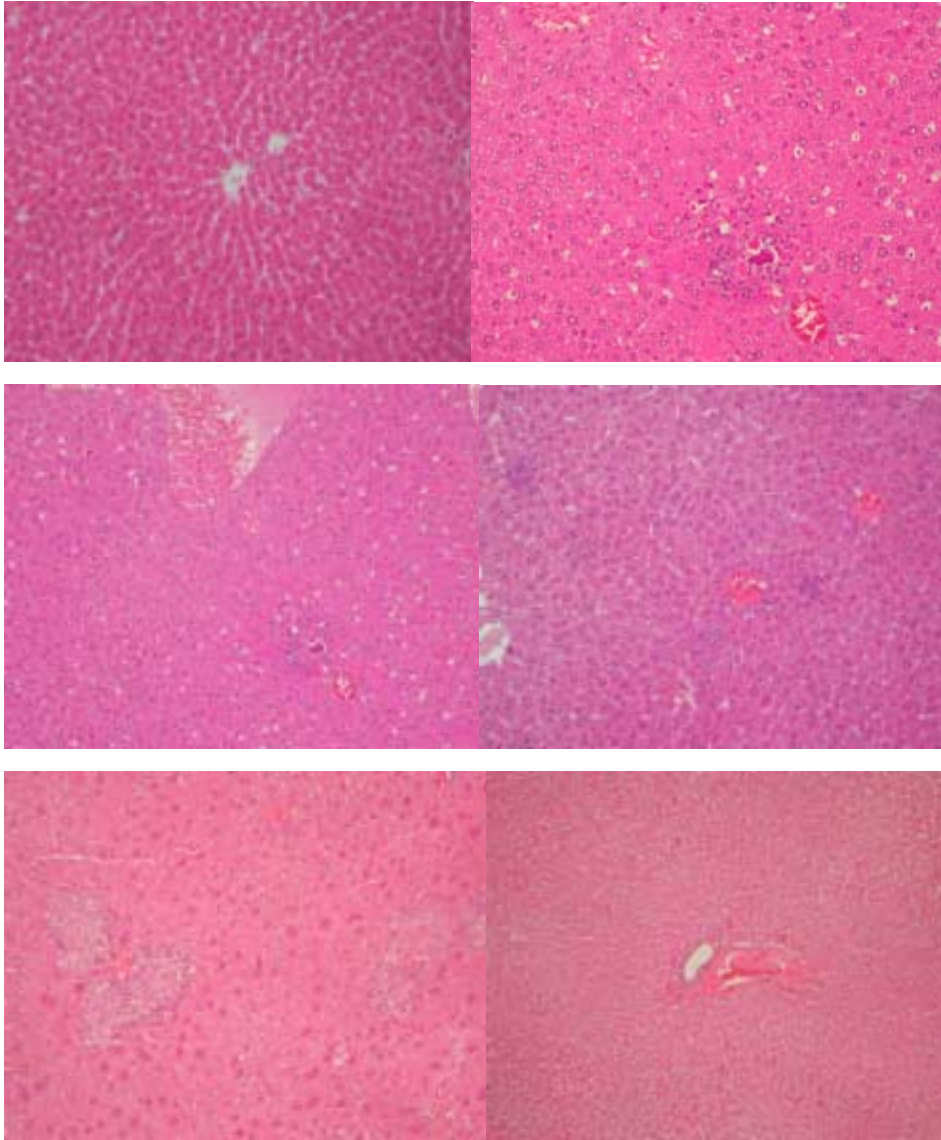


Fig 32. Light microscoph of livers of mouse with Paraquat.

- A: Control. B: High fat diet.
- C: Five percent chicken bile diet with Paraquat.
- D: Ten percent chicken bile diet with Paraquat.
- E: One percent chicken bile ethanol extract diet with Paraquat.
- F: Three percent chicken bile ethanol extract diet with Paraquat.

[동물사육장]



[rat로부터 혈액 채취]

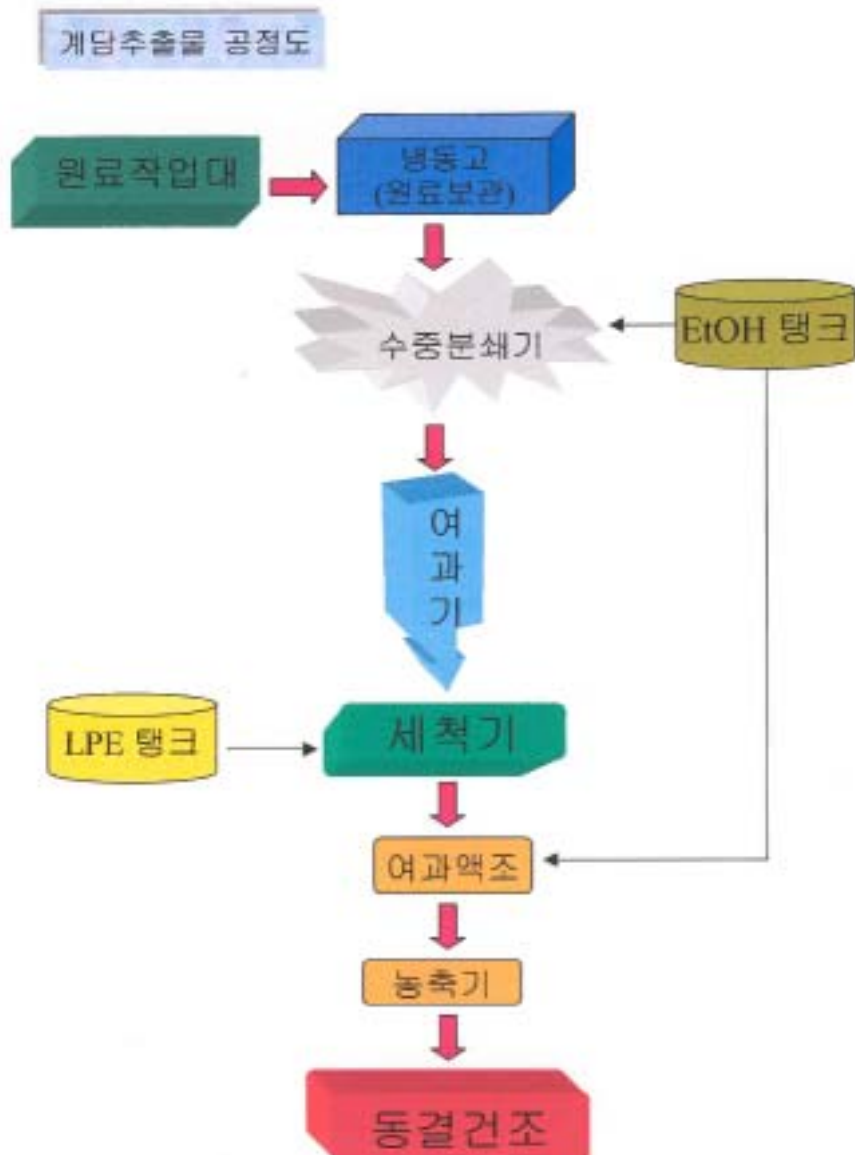


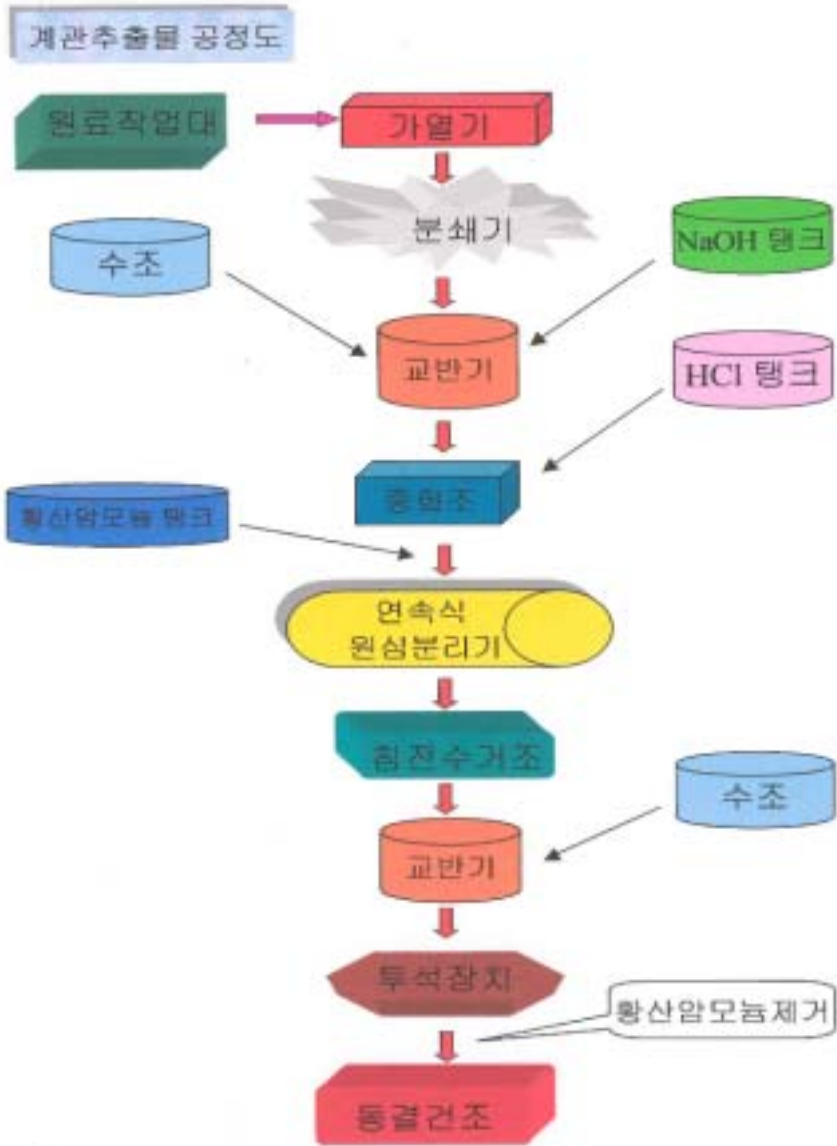
[간세포 분리]



4. 계담 및 계관으로부터의 기능성 물질 추출 및 시제품 제조

1) 공장규모의 시제품 제조 공정도





2) 시제품 제조



Fig. 21 Bile acid and frozen dried powder made from chicken bile.



Fig. 22. Powder of muco-protein prepared from comb.



Fig. 23. Functional foods manufactured at experiment scale.

3) 관능검사

Table 5. Sensory evaluate of functional-drink made from bile extract powder.

Sensory \ No.	200	300	400	500	600
Color	5	4.6	5	4.5	3
Mouth feel	5	5	5	5	4.3
Flavour	5	5	4.1	3.7	2.8
Taste	5	5	4.5	3.5	3
Overall acceptability	5	5	4.5	4.0	3.5

200: Control

300: Added 0.1% extract powder

400: Added 1% extract powder

500: Added 5% extract powder

600: Added 10% extract powder

1 : very poor

2 : poor

3 : neither like nor neither dislike

4 : good

5 : very good

bile extract powder를 이용한 기능성 음료의 산업화 가능성을 타진하기 위하여 모델 음료를 제조하여 관능검사를 실시한 결과를 표 5에 제시하였다.

그 결과 control(200)을 5점 만점으로 하였을 때 1%(200, 300) 까지 첨가하였을 때에는 control과 비교하여 비교적 양호한 관능검사 결과를 나타내었다. 그러나 그 이상의 bile extract powder를 첨가하면 기호도에

있어서 저하하는 경향을 나타내었으며, 5% 이상의 첨가에 있어서는 전체적으로 비릿한 맛이 느껴진다는 결과가 얻어졌다. 또한, 색도에 있어서도 사람이 싫어하는 진한 녹색을 육안으로 확실히 느껴질 정도로 되어 있었다.

이상의 결과로부터 bile extract를 이용한 기능성 음료는 첨가량을 1% 이하가 적절한 것으로 나타났으며, 기능성 음료로서의 가능성을 충분히 시사한 결과였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

계담의 생리활성에 관한 탐색은 항균활성, 항산화, 아질산염 소거능, ACE 저해능, 소화력, 혈중 콜레스테롤 등을 검토하였다. 또한 계관의 기능적 특성 조사는 단백질과의 상호작용에 대해서 검토하였다.

생리활성 물질의 분리는 이미 본문에서 제시한 것과 같이 간단히 분리할 수 있는 방법을 채택하였으며, 대량 생산을 할 수 있는 기본 lay-out도 설정하였다.

계담의 생리활성에 관한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서는 항균활성, 항산화, 아질산염 소거능 혈중 콜레스테롤 등의 효능이 검증되었다. 또한, 계관 추출물의 경우는 이중의 단백질과 친화력이 강한 것으로 나타났다.

이상의 결과로부터 계관 및 계담은 기능성 식품에 활용할 수 있는 기초 자료를 충분히 마련하였으며, 이를 토대로 모델 기능성 음료 및 캡슐 등을 제조하였으며, 기능성 식품으로서의 가능성을 충분히 보여주었다.

본 연구의 결과는 2년간에 걸쳐 수행하였으며, 계획서상에 있는 연구내용은 충분히 수행되었다고 사료되며, 소기의 목적을 달성하였다고 사료된다. 또한 이와 같이 축산 폐기물의 효율적인 이용 방법이 본 연구를 통하여 제기되었으며, 거의 대부분 폐기에 따른 환경오염 문제, 축산자원의 낭비를 일거에 해결할 수 있을 것으로 사료되며, 이 결과를 관련업체에 기술을 전수하면 새로운 고부가가치 자원으로서 각광을 받을 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통하여 개발된 생산공정 및 제품은 참여업체 및 관련업체에 기술을 전수할 계획이며, 또한, 본 연구를 통하여 획득한 기초 및 응용 자료는 학회 발표 및 학회지에 투고할 예정이다. 현재 계담의 생리활성에 관한 논문을 투고할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

계담의 생리활성과 관계된 국외에서의 연구는 그다지 많지 않은 실정이며, 오히려 국내에서 다소 연구가 진행 중에 있다. 계담의 경우 국내에서는 옛부터 한방의 약재로서 취급되어 왔으며, 가래제거, 소염, 해독 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있으나, 이에 대한 과학적인 근거는 찾아볼 수 없다. 그러나 최근 비가식 부위에 대한 연구로서 Lee 등의 닭머리를 이용한 육수제품 개발, Shim 등의 소 쓸개로부터의 항산화 물질 분리에 관한 연구 등이 진행되었다. 한편, 국외에서의 계담의 생리활성에 관한 연구는 매우 적은 편이나 이와 유사한 연구로서 Li(1997) 등의 rat을 이용한 동물실험에서 혈압과 계담과의 관계를 검토하였으며, 계담 추출물을 rat에 급여한 결과 혈압이 떨어지는 결과를 얻고 있다. Danzinger(1972) 등은 계담의 구성성분인 chenodeoxycholic acid가 혈액 중의 cholesterol을 저하시키는 결과를 얻어내었으며, Haslewood(1978)는 bile salt가 미생물의 생육에 미치는 영향, 즉 항균력에 대한 연구를 수행하였다. 또한, Yeh(2001) 등은 생리활성에 관한 연구의 전 단계로서 어류, 닭 및 오리의 쓸개 구성성분을 high-performance liquid chromatographic에 의한 조사를 하였으며, 쓸개의 구성성분은 동물의 종류에 따라서 다소 상이하다는 결과를 얻고 있다.

한편, 계관의 생리활성 및 응용 연구에 대한 정보는 국내외를 통하여 그다지 많지 않다. 계관의 주요 성분은 muco-protein으로서 muco 다당류 중에는 Hyaluronic acid가 주요 성분인 것으로 알려져 있다. Hyaluronic acid는 생체내에서의 역할은 연골 같은 조직세포를 채워주고

있어 접착제의 역할을 하고 있는 것으로 생각되며, 또한 박테리아의 침입, 독의 확산을 막는 역할을 하고 있을 것으로 추측하고 있다. 또한 최근의 연구 결과에서는 Hyaluronic acid는 보습력이 강하여 화장품 등에 이용되고 있으며, 그 외에 의료용으로서 일부 이용되고 있다. 즉, 의료용으로서는 안과 수술용, 관절염 치료용 등으로 이용되고 있다. 앞으로 이용 가능성이 있는 분야로서는 의료부분으로 인공혈관, 인공장기에 흡착시킴으로서 거부반응을 줄일 수 있는 연구가 진행 중에 있으며 이것이 완성되면, 앞으로 장기 및 혈관 등의 이식수술에 널리 사용될 것으로 기대된다. 한편, 본 연구에서는 계담으로부터 추출한 muco-protein은 이종의 protein과 친화성이 강하다는 것을 시사하였으며, 식품분야에서의 이용은 겔화 식품의 물성 개량제로서의 가능성을 충분히 보여주고 있다.

제 7 장 참 고 문 헌

- 0). Ahn, K.H., Park, S.Y., Kwon, Y.J. and Sung, S.K. Postmortem Changes in Myofibrillar Proteins in Muscles of Korean Native Chickens. Korean J. Anim. Sci. 39: 577-586 (1997)
- 0). Chae, H.S., Cho, S.H., Park, B.Y., Yoo, Y.M., Kim, J.H., Ahn, C.N., Lee, J.M., Kim, Y.K., Choi, Y.I. Changes of the Fatty Acid, Amino Acids and Collagen Contents in Domestic Broiler Chickens of Different Marketing Standard. Korean J. Food Sci. Technol. 22: 1-7 (2002)
- 0). Korea Lomestic animals Combination (2001)
- 0). Nam, J.H., Park, C.K., Song, H.I., Kim, D.S., Moon, Y.H., Jung, I.C. effects of Freezing and Refreezing Treatments on Chicken Meat Quality. Korean J. Food Sci. Technol. 20: 222-229 (2000)
5. Cha, S.H., Cho, J.H., Chung, K.S., Chang, P.S. and Yi, Y.H. Proximate Composition and Microbial Content Change of Broiler Waste Silage by Mixing with wheat Bran and Oven-drying. Korean J. Food Sci. 27: 63-67 (1995)
6. Kim, Y.H., Min, J.S., Hwang, G.S., Lee, S.O., Kim, I.S., Bark, H.I., Lee, M.H. Fatty Acids Xomposition and Sensory characteristics of the

Commercial Native Chicken Meat. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 964-970 (1999)

7. Jun, M.R., Oh, S.S., Kim, K.O. Effects of Levels of Flavoring Materials on the Sensory Properties of Chicken Feet *Jokpyun* (Korean Traditional Gel Type Food). Korean J. Food Sci. Technol. 32 : 1306-1312 (2000)

8. Lee, J.M., Kim, K.O. and Choi, S.E. Effect of soaking and Blanching Chicken-head in the Preparation of Chicken-head Broth. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 674-680 (2000)

9. Shim, J.G., Park, M.W., Lim, K.T. Natural Antioxidant activity of Ethanol Extracted from Bovine Bile ; Biological effects and Characterization. Korean J. Environmental Agriculture. 18: 221-228 (1999)

10. Li, P., Guan, H., Has, S. Effect of chicken bile on heart and blood pressure in animals. *Zhongguo-Zhong-Yao-Za-Zhi*. 22: 113-115 (1997)

11. Hwang, D.F., Lai, Y.S., Chiang, M.T. Toxic effects of grass carp, snake and chicken bile juices in rats. *Toxicol. Lett.* 85: 85-92 (1996)

12. Danzinger, R.G., Hofmann, A.F., Schoenfield, L.J. and Thistle, J.L. Dissolution of cholesterol gallstons by chenodeoxycholic acid. *New*

Eng. J. Med. 286: 1-8 (1972)

13. Cotter, P.F. Analysis of chicken Bile by Gel Precipitation Reactions Using a Lectin in the Place of Antibody. Poultry Sci. 79: 1276-1281 (2000)

14. A.O.A.C. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA (1990).

15. Haslewood, G.A.D. The Biological Importance of Bile Salts, North-Holland, Amsterdam, 35-36(1978)

16. Anderson, I.G., Haslewood, G.A.D., Oldham, R.S., Amos, B., Ioke's, I., A More Detailed Study Bile Salt Evolution, Including Techniques for Small-Scale Identification and their Application to Amphibian Biles. Biochem. J. 141: 485-494 (1974)

17. Yeh, Y.H., Hwang, D.F. High-Performance liquid chromatographic determination for bile components in fish, chicken and duck. J. chromatography B 751: 1-8 (2001)

18. Kim, M.S., Lee, D.C., Hong, J.E., Chang, K.S., Cho, H.Y., Kwon, Y.K., Kim, H.Y. Antimicrobial Effects of Ethanol Extracts from Korean and Indonesian Plants. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 949-958(2000)

19. Blois, M.S. . Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 26: 1119-1200(1958)
20. Gray, J.I. and Dugan, Jr.L.R. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. *J. Food Sci.* 40: 981-985 (1975)
21. Cushman, D.W. and H.S. Cheung. Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*. 20: 1637-1648 (1971)
22. Umemoto, S. A modification method for estimation of muscle protein by biuret method. *Bull. J. Soc. Sci. Fish.* 32, 427-435 (1996)
23. Laemmli, J.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680 (1970)
21. Aoyagi, S., Baker, D.H. Biological efficacy of copper in chicken bile. *J. Nutr.* 123: 870-875(1993)
22. Lee, K.D., Chang, H.K. and Kim, HK. Antioxidative and nitrite scavenging activities of edible mushrooms. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 432-436 (1997)
23. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free

radical Nature, 26: 1199-1200 (1958)

24. Kang, Y.H., Park, Y.K. and Lee, G.D. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 232-239 (1996)

25. Jin, Q., Park, J.R., Kim, J.B., Cha, M.H. Physiological activity of zizyphus leaf extracts. J. Korean Food Soc. Food sci. Nutr. 28: 593-598 (1997)

26. Maruyama, S., Miyoshi, S. and Tanaka, H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from ficus carica. Agric, Biol. Chem, 53: 2763-2767 (1989)

27. Hara, Y., Matsuzaki, T. and Suzuki, T. Angiotensin I-converting enzyme inhibiting activity of tea components. Nippon Nogeikaku kaishi. 61: 803-807 (1987)