

To 024753

최 종
연구보고서

미더덕으로부터 기능성 소재의
산업화기술 개발

Evaluation of Application Technique with Functional Components
from Mideodeok

2007. 7.

연 구 기 관
경 상 대 학 교

해 양 수 산 부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “미더덕으로부터 기능성 소재의 산업화기술 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 7월 24일

주관연구기관명 : 경상대학교
주관연구책임자 : 최 병 대
세부연구책임자 : 이 종 수
세부연구책임자 : 강 석 중
연 구 원 : 정 성 훈
연 구 원 : 강 문 석
연 구 원 : 윤 소 미
협동연구기관명 : 서울대학교
협동연구책임자 : 조 명 행

요 약 문

I. 제 목

미더덕으로부터 기능성 소재의 산업화기술 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

미더덕은 남해안에서 생산되며 최근에는 양식가능 품종으로 허가 받기에 이르렀다. 따라서 미더덕의 생화학적 가치에 대한 연구가 매우 부족한 실정에서 단순한 1차 산업의 형태로는 어민의 소득증대를 가져올 수가 없었다. 이러한 점을 고려하여 부가가치 높은 미더덕 가공제품의 생산을 위한 기능성 성분의 검색, 미더덕에 함유된 향기성분의 조성분석 및 천연향료물질로서의 응용기술 개발, 미더덕 육 및 껍질에 함유된 기능성 소재물질의 탐색을 통하여 산업화기술 확보, 기능성 소재로서의 안전성 검증 및 용도개발 방법의 모색, 산업화를 위한 pilot 실험 및 시제품 생산을 위한 기술개발을 목표로 연구를 실행하였다.

2. 연구의 필요성

우리나라 수산물 총 생산량에서 양식업이 차지하는 비중은 꾸준히 늘어나 1980년의 양식업 점유율 22%에서 1995년 31%를 넘어선 뒤 2002년에는 36%로 높아져 사회적 관심은 증가하고 있는 실정이다. 그리고 지난 수세기 동안 우리나라의 수산업 및 양식 산업은 국민식량의 안정공급과 무역수지 개선에 기여함과 아울러 소득증대에도 이바지 하였다. 1,700여개의 어촌계와 2,200여개의 어항 등이 연안지역에 산재하여 바다접근의 주요한 통로로서의 역할을 하나 지역 특성에 맞는 어촌개발 미흡 및 어촌 정주환경이 좋지 않아 탈 어촌 현상이 가

속화되고 있어 획기적인 대책마련이 시급한 실정이다.

건강에 대한 관심과 소득수준이 향상됨에 따라 수산물의 소비패턴이 다양해지고, 이에 부응하는 특화된 수산물 개발이 이루어져야 할 시기가 다가온 것으로 여겨진다. 날로 다양해지는 수산식품에 대한 정보를 끊임없이 제공하고 수산물에 대한 흥미를 높여 국민의 관심과 행동을 유발하도록 유도해야 한다. 그러기 위해서는 수산물의 안전기준을 강화하고, 소비자들의 위생관념에 맞는 환경관리 기준을 높이는 법적 뒷받침이 필요한 시점에 다다른 것으로 판단된다.

미더덕의 어업권 현황은 2000년 거제에 2건 9.5 ha에서, 2003년 마산 68건 239 ha, 거제 33건 136 ha, 고성 25건 92 ha, 2005년 거제 46건 186 ha, 고성 44건 180 ha, 마산 73건 259 ha로 2003년 대비 127%의 폭발적인 양식어업권 증가현상이 나타나고 있다. 이는 2004년 6월 말 피조개, 진주담치 양식어업권이 수익성이 높은 미더덕 양식업으로 품종 변경신청 되었기 때문이다.

미더덕 생산현황은 2006년 경남 생산량은 1,116톤으로 전체 생산량 1,519톤의 73% 이상이 거제, 마산, 고성지역에서 생산되었고, 진동 및 거제에서 1차 가공되어 노량진, 가락동 시장 등에서 판매되고 있어 지역 간의 생산 및 가공기술의 개발에 많은 노력을 기울이고 있다. 연중 1월 판매단가가 가장 높으며 종어기인 7월이 되면 가격이 50% 이상 하락되고 4, 5월 홍수 출하되어 가격하락이 일어나고 있다. 최근 어민들의 각 가정에 냉동고가 설치되면서 일정량을 확보하고 있다가 겨울철에 필요한 양만큼 시장에 출하하여 가격조정에 성공하고 있으나 부가가치를 향상시키기 위해서 젓갈, 조미료 등의 새로운 제품이 개발되고 있으며 생체를 포장하여 활용하려는 노력이 이루어지고 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

제 1 장 미더덕 영양성분의 탐색

미더덕 영양성분의 계절적 변화를 알아보기 위하여 미더덕 양식장의 해양환경, 미더덕에 함유된 일반성분 및 glycogen 함량, 구성 아미노산 조성의 변화, 지방산 조성의 변화, 무기질 함량의 변화를 조사하였다. 미더덕으로부터 추출한 카로테노이드의 항산화활성을 검토하기 위하여 미더덕 육 및 껍질 중의 카로테노이드 함량의 변화, 육 및 껍질에 함유된 카로테노이드 조성의 변화, 총 페놀 화합물의 변화, 리노레인산을 이용한 미더덕 추출물의 항산화 활성의 변화, DPPH를 이용한 미

더덕 추출물의 유리라디칼 소거활성의 변화, hydroxyl 라디칼 소거 능의 변화를 평가하였다. 미더덕에 함유된 향기성분은 조미료, 젓갈 등의 원료로 사용하는 경우 맛과 향을 결정하는 중요한 인자이므로, 가공시 버려지는 미더덕 체액을 활용하기 위한 풍미개선 물질의 개발에 대하여 연구하였다.

제 2 장 미더덕으로부터 기능성물질의 분리 및 정제

미더덕 껍질에 함유된 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycans, GAGs)의 추출 및 정제방법을 확립하기 위하여, GAGs 추출, HPLC에 의한 GAGs의 확인, ion-chromatography에 의한 GAGs의 분리 및 정제, 전기영동에 의한 분리 정제된 GAGs의 확인, 분리 정제된 GAGs의 획분별 화학적 조성분석이 이루어졌다. 그리고 미더덕에 함유된 항균물질의 분리 및 정제하기 위하여 각 획분별 항균활성 및 수율, 항균물질의 칼럼 크로마토그래피에 의한 분획 및 활성, 50% MeOH구에서 분리한 peak no. 2 항균성 물질의 구조 해석에 관하여 연구한 결과 FAB MS분석에 의한 분자량의 추정, ^1H NMR spectrum의 측정, ^{13}C NMR spectrum의 측정, ^1H Detected Single Quantum Coherence(HSQC) spectrum의 측정, ^1H - ^1H (Corelation spectroscopy(COSY) spectrum의 측정 등 기기분석 기술을 활용하여 항균성 물질의 구조를 동정하였다. 동정된 미더덕 육에 함유된 항균성 물질의 평가하기 위해 추출용매의 선정, 액-액 분배조건, 칼럼 크로마토그래피에 의한 분리정제 조건, 구상 ODS 칼럼에서의 용출 조건, ODS 칼럼을 이용한 HPLC에서의 용출, 대량 분리정제 조건의 설정 및 분리정제, 항균물질의 정량분석, MIC 및 각종 미생물에 대한 항균 활성, 항균활성의 지속시간, pH 및 가열에 의한 항균 물질의 안정성, 마우스에 대한 급성 독성을 조사하였다.

제 3 장 미더덕에 함유된 기능성물질의 생화학적 평가

해양생물을 이용한 기능성식품 개발에 있어 가장 중요한 것은 기능성물질의 세포내 작용기작에 관한 연구이다. 이를 파악하기 위하여 미더덕 및 대조구로 사용된 멧게 껍질로부터 분획된 물질에 대하여 JB-6 세포주를 이용한 기능성 물질이 염증에 미치는 영향, NF- κ B plasmid construct를 이용한 감염 세포 시험, iNOS, ICAM-1 및 VCAM-1 등 염증관련인자에 미치는 영향, 염증반응을 조절하는 p38, JNK, ERK 대사에서의 단백질 변화조사, NF- κ B의 핵 내로의 전이조사 등에 대하여 실험한 다음 마우스를 통한 동물실험을 실시하여 활성을 구명하였다.

IV. 연구개발 결과

미더덕(*Styela clava*) 영양성분의 계절적 변화에 대하여 평가하기 위하여 2005년 1월부터 5월까지 2개월 마다 거제와 통영의 양식장에서 시료를 채취하였다. Glutamic acid, aspartic acid, arginine, leucine 및 lysine 등이 가장 풍부한 아미노산 성분이었다. 비필수 아미노산에 대한 필수 아미노산의 비율은 다른 어류와 비교하여 우수하였고, 미더덕 육 거제산의 값은 0.55~0.61, 통영산은 0.66~0.67의 범위였다. 미더덕 육에 함유된 고도불포화지방산의 함량이 높아 지방산 공급원으로 적절한 것으로 나타났다. 가장 높은 함량을 보인 지방산은 EPA와 DHA로 육 중 20.0~22.3% 및 16.5~17.9%, 껍질 중 20.3~23.2% 및 15.2~18.8%가 각각 함유되어 있었다. 총 무기질 함량은 22.2~27.3%였고, Na, Ca, Mg, K 등이 육과 껍질에 풍부하게 들어있었다.

거제와 통영으로부터 채집한 미더덕 육 및 껍질의 카로테노이드 함량은 높은 값을 보였고, 3월의 시료가 가장 높았으며, 1월 시료가 가장 낮았다. GM(거제 육), GT(거제 껍질), TM(통영 육) 및 TT(통영 껍질) 시료의 평균 카로테노이드 함량은 각각 49.1 mg/100 g, 56.7 mg/100 g, 42.0 mg/100 g 및 50.2 mg/100 g으로 조사되었다. 육에 함유된 주성분은 4'-hydroxyechinenone, canthaxanthin, cynthiaxanthin 및 β -carotene 이었고 껍질에 함유된 성분은 4'-hydroxyechinenone, canthaxanthin, cynthiaxanthin 및 halocynthiaxanthin 등 이었다.

미더덕 카로테노이드 화합물의 기능성을 파악하기 위하여 페놀 함량 및 항산화활성을 조사하였다. 모든 시료에서 낮은 함량의 페놀 값을 보였으며, DPPH 라디칼 저해활성도 낮았다. 그러나 모든 시료에서 리놀레인산에 대한 과산화 억제작용은 효과적이었고 껍질 추출물이 더 효과적이었다. 뿐만 아니라 hydroxyl 라디칼 저해활성에 대해서도 강한효과를 나타내었으며, 합성항산화제인 BHA의 IC₅₀ 값도 비슷하였다. 따라서 미더덕은 영양성분이 풍부하고 천연 항산화제로서의 가치가 있는 것으로 평가되었다.

미더덕으로부터 유용 물질을 분리하기 위하여 미더덕을 아세톤으로 추출하고 항균성을 조사하여 8개 획분에서 항균성이 있음을 확인하였으며, 그 중 구상 ODS 칼럼에서 50% MeOH로 용출된 획분의 항균성 물질을 ODS 칼럼에서 함수 MeOH로 재정제하여 항균 물질 peak no. 2 218.9 mg을 부분 정제하였다. Peak no. 2는 FAB MS 분석 결과, 분자량 272로 확인되었으며, 고분해능 MS에서 C₁₁H₂₁SO₄Na의 분자식을 확인 하였다. Proton NMR 과

carbon NMR에서 각각 이들의 C와 H를 assignment하였으며, HMBC에서 최종적으로 확인 결과, 이 물질은 4,8-dimethyl-3-nonene sodium sulfate라는 새로운 물질임을 확인하였다.

4,8-Dimethyl-3-nonene sulfate의 분리 정제는 미더덕 가식부를 3배량의 acetone으로 추출하여 여과, 농축 후 hexane으로 저극성 물질 제거하고, BuOH로 추출하여 염기성 alumina에 흡착시켜 1% ammonia-MeOH(1:1)로 용출시키고 silica 칼럼에서는 chloroform-MeOH(7:3) 용매로 용출시켜 구상 ODS 칼럼에서 60% MeOH로 용출하여 ODS 칼럼에서 70% MeOH로 분리 정제하는 것이 가능하다. 이 방법으로 분리 정제한 결과 17 kg의 미더덕으로부터 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate 395.7 mg(수율 0.0023%)을 분리 정제하였다. *Bacillus subtilis*에 대한 MIC는 200 µg/mL 이었으며, 그 이외의 그람 양성, 음성 병원성 균 및 효모, 곰팡이에 대하여 이 보다 약한 활성을 나타내었다.

HPLC에 의한 정량 분석은 ODS 칼럼에서 0.01 M 인산칼륨 완충액(pH 5.0)-MeOH(25:75)을 용매로 0.8 mL/min 유속으로 흘리며 215 nm에서 모니터링 하여 정량 분석이 가능하며(검출 한계 : 10 ng), 전처리는 80% MeOH로 추출하여 sep-pak 칼럼에서 70% MeOH로 용출하여 분석할 경우 미더덕 가식부에 29 µg/g 함유되어 있었다. 항균 활성은 24시간 이후부터 감소하여 4일 후에는 활성이 완전히 소실되어 살균보다 정균 효과밖에 없었으며, 10 0°C에서는 6시간까지, 121°C에서 15분 가열하여도 안정하였다. pH 3~11 범위에서는 24시간 두어도 안정하였으며, 마우스에 대한 치사 독성은 LD100이 1.0 g/kg 이었다.

미더덕 껍질에서 분리한 GAGs의 세포독성을 시험한 결과 미더덕 1은 7.3 mg/mL, 미더덕 2는 9.7 mg/mL, 미더덕 crude는 7.0 mg/mL의 IC₅₀ 값을 보였다. 이를 바탕으로 평균적인 IC₅₀ 값의 1/10 농도를 기준으로 각각 0.75 mg/mL, 1.5 mg/mL, 2.0 mg/mL의 농도를 사용하여 NF-κB 형광면역활성을 검색하였다. 그 결과 2.0 mg/mL의 농도에서 NF-κB의 활성이 억제되는 것으로 나타났다. 세포핵에서의 NF-κB의 발현을 관찰한 결과 NF-κB의 핵 내로의 전이를 억제하는 것으로 나타났으며, 염증관련 인자인 iNOS, ICAM-1 및 VCAM-1 등의 변화를 조사한 결과 미더덕 1과 명계 3 시료에서 단백질 발현을 억제하는 것으로 나타났다. 염증반응을 조절하는 p38, JNK, ERK 대사과정에서의 단백질 변화를 조사한 결과 p38, p-p38, ERK, p-ERK, p-JNK의 발현에 대해서는 작용이 없었으나 JNK의 발현에는 미더덕 1과 명계 3 시료에

서 효과를 나타내었다.

만성염증은 암과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다. 특히 최근의 연구결과에 의하면 VCAM과 COX-2와 같은 염증인자들은 암의 유발과 전이에서 매우 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 이러한 염증인자들의 발현억제는 염증 및 암 예방에 있어서 중요한 작용을 할 것으로 사료된다. 본 실험의 결과를 종합하여 보면 명계 껍질로부터 추출한 GAGs는 p38과 Akt의 pathway를 조절함으로써 NF- κ B의 활성화를 차단하여 TPA에 의한 VCAM과 COX-2의 발현을 억제하였다. 따라서 명계로부터 추출한 GAGs를 천연적인 항염증 치료제로 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 연구개발 결과의 활용계획

미더덕으로부터 기능성 소재의 산업화기술 연구 과제를 통하여 미더덕에 함유된 기능성 활성성분을 추출 및 정제하는 기술을 개발하고 이와 관련하여 특허출원하며, 산업체에 그 기술을 양도하여 실질적인 어민의 소득향상에 기여하고자 한다. 생리활성천연물질을 이용한 항염증제로서의 발현기작을 구명하고 학술지 게재 및 관련학회 발표를 통한 학문적 기초자료로 활용하며, 생리활성천연물질의 체계적인 추출법과 신속, 정확한 검정기술의 향상에 기여하게 될 것이다. 항균성 물질을 이용한 제품개발에 대한 기본 자료의 제공이 가능하며, 미더덕의 기능성 생리활성물질의 특성에 관한 데이터를 활용하여 대 국민홍보에 이용하고자 한다.

기술적 활용 이외에 본 과제와 관련하여 경상남도 관광기념품공모전에 출품하여 신제품생산, 원가절감, 품질향상 등에 본 연구 성과를 활용하였고, 2006년 경상남도 도민체육대회에 가조도 주민자치단체에서 제조한 미더덕 관련 상품을 출시하기도 하였다. 그리고 개발된 기술의 실용화 및 산업화는 생산어민의 자긍심 향상시킬 뿐만 아니라 국가연구개발과제를 통한 연구실적을 홍보함으로써 소비자의 신뢰성확보에 기여할 수 있다. 궁극적으로 산학협동 연구를 통한 고용창출의 효과를 극대화함으로써 산학관연의 지속적인 네트워크를 이루어 나아가도록 할 것이다.

SUMMARY

I. Title

Evaluation of Application Technique with Functional Components from Mideodeok

II. Objectives and Significance

1. Objectives

This project aimed to evaluate the applications of the functional components obtained from Mideodeok. Specifically, this addressed the following topics: seasonal variation in nutritional compositions antioxidant activities of carotenoid extracts flavor composition reaction flavor of Mideodeok extracts changes in the haematological factors of rainbow trout fed with the Mideodeok extracts development of functional feeds from Mideodeok extracts extraction and purification of anti-microbial components evaluation of antimicrobial components extraction and purification of glycosaminoglycans (GAGs) cytotoxic effects of GAGs in cell and immunohistochemistry of GAGs.

2. Significance

In the past centuries, most of Korea's fishing and coastal areas were devoted to catching of fish for direct consumption and production for export. Since then, aquaculture production has gradually increased to 22% in 1980, 31% in 1995 and 36% in 2002 of the total fisheries production in Korea. The coastal area allocated 1,700 parts leased to the fishermen in the form of cooperatives and supported with 2,200 ports throughout the country. However, this is not enough and the government has not fully addressed the support system for the fishermen, thus many of the fishermen's income are not sufficient to provide for their daily

requirements. In many cases, the fishermen migrate to the city seeking for a high paying job. Thus, the government has to find ways to increase the income of the fishermen and make them more self-sufficient, in effect curbing the migration from the coastal communities to the cities.

The times have changed and nowadays, consumers are becoming aware of the benefits of a healthy way of life including the consumption of health seafoods for their well-being. In this manner the consumption of fishery products, generally considered a health seafood, has also increased. In addition, the consumers also want to have a variety of the health seafood being offered, thus it has become a necessity to formulate different kinds of health products. As research results point to the benefits of eating fishery products, it is the government's responsibility to convey this information to the people. Quality and safety standards, like HACCP, GMP and SSOP, were being implemented in the fisheries industry, starting from the raw materials, production and cultivation area, processing and transportation, up to the point the food reaches the consumers. In this manner, the consumers are assured of being served with safe and high quality commodities.

Mideodeok production was only concentrated to around 9.5 ha in Geoje area in 2000, gradually spreading to 239 ha in Masan, 136 ha in Geoje and 92 ha in Goseong in 2003, and in 2005 increased to 186 ha in Geoje, 180 ha in Goseong and 259 ha in Masan. This represented a 127% increase in the land area involved for Mideodeok production from 2000 to 2005, as the government permitted the right to shift to the culture of Mideodeok instead of the mussel and ark shell in June 2004.

The production volume of Mideodeok in Gyeongsangnamdo and Korea were 1,116 MT and 1,519 MT, respectively. As much as 73% of the total production volume came from Geoje, Masan and Goseong. Mideodeok is processed at Jindong in Masan and Gajodo in Geoje and sold at Noryangjin and Garakdong fisheries market in Seoul. All members of the Mideodeok Producers Association (MPA) strive hard to increase their confidence in production. The selling price is highest in January and starting to decrease during the season of high production output. Most of

the Mideodeok harvesting is done until July because after this month the water temperature will quickly increase on the onset of the summer season. The fishermen can stock the Mideodeok in refrigerators provided by the municipal government during the winter season, which they can sell at the highest price during this season. The fishermen have to rely on themselves to develop value-added products from Mideodeok such as fermented and seasoning products.

III. Contents and Results

1. Seasonal variation in nutritional composition of Mideodeok

Changes in the nutritional composition of Mideodeok (*Styela clava*) harvested during the months of January, March and May 2005 were evaluated. Mideodeok was found to be a good source of essential amino acids, particularly for glutamic acid, aspartic acid, arginine, leucine and lysine. Essential amino acid ratio to non-essential amino acids were comparable to many fish species, with values ranging at 0.55-0.61 and 0.66-0.67 for Geoje muscle (GM) and Tongyeong muscle (TM), respectively. Mideodeok seemed to be a very suitable source of important fatty acids as it contained high levels of polyunsaturated fatty acids. EPA (20:5n-3) and DHA (22:6n-3) were the most dominant fatty acids, with values ranging at 20.0-22.3% and 16.5-17.9% for muscle, and 20.3-23.2% and 15.2-18.8% for tunic, respectively. Mideodeok also contained rich supplies of essential minerals ranging at 22.2-27.3% of the dry matter, mainly composed of Na, Ca, Mg, and K.

2. Antioxidant activities of Mideodeok carotenoids

Carotenoids were found in high levels in both muscle and tunic samples, with the highest values observed in March and lowest in January. Average values in GM, GT, TM, and TT samples were 49.1 mg/100g, 56.7 mg/100g, 42.0 mg/100g, and 50.2 mg/100g, respectively. The most dominant carotenoids in muscle were 4'-hydroxy-echinone, canthaxanthin,

cynthiaxanthin, and β -carotene. On the other hand, tunicarotenoids contained high levels of 4'-hydroxy-echinone, cynthiaxanthin, canthaxanthin, and halocynthiaxanthin. Crude mideodeok carotenoids were tested for phenolic content and antioxidant activity. All samples have low phenolic levels and exhibited weak DPPH radical scavenging activity. However, they were found to have strong inhibitory effects against linoleic acid peroxidation, especially the tunic extracts. They also exhibited strong hydroxyl radical scavenging activities, with IC₅₀ comparable with those of BHA. Results of this study indicate that mideodeok, aside from being rich in nutrients, could be a potential source of natural antioxidants.

3. Mideodeok flavor and reaction flavors

Flavor components of Mideodeok extracts were evaluated using GC-MS and Maillard reaction of the extracts. Major flavor components of extracts include 17 alcohols, 6 acids, 5 aldehydes and 6 hydrocarbons by the simultaneous distillation and extraction (SDE). The affluent components was aldehydes and alcohols. The solid phase micro-extraction (SPME) method was adopted to extraction of reaction Maillard flavor in extracts-sugar- amino acids system. The major components include 9 alcohols, 1 acid, 1 aldehyde, 1 hydrocarbon, 1 ester, 1 amine and 2 ketones and aldehydes was key components in this model systems.

4. Effect on the growth and heamotological factors on fishes of extracts

Effect of muscle fluid concentrates from *Styela clava* on fish diets were investigated in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and rockfish (*Sebastes schlegeli*). Fishes were fed on one of the isonitrogenous (48%) and isolipic (20%) feed containing 5 to 20% of muscle fluid concentrates for 8 week. Hematological parameters such as hemoglobin, hematocrit, albumin, glucose, total bililubin, triglyceride and glutamic pyruvate transaminase of the rainbow trout fed on the diets varied but no specific trend became apparent. However, glutamic oxaloacetic transaminase value was significantly higher than normal fishes. Therefore, concentrated ascidian fluid which is normally discarded can be combine with commercial diets

for the normal growth of fishes.

5. Extraction, purification and evaluation of anti-microbial components

Different fractions of the Mideodeok extracts were purified and evaluated for anti-microbial components. Anti-microbial activity was observed on peak No. 2 and the structure was elucidated using FAB MS spectrophotometer, ¹H NMR spectrum, ¹³C NMR spectrum, ¹H Detected Single Quantum Coherence (HSQC) spectrum and ¹H-¹H (Correlation spectroscopy (COSY) spectrum. Appropriate extraction solvents and production processes were evaluation for the mass production of the anti-microbial components, which included liquid-liquid partition, column chromatography, and HPLC analysis. The anti-microbial activity of the fraction was quantified; and its MIC and inhibitory activity on various microbes, sustainability, stability on pH and heat treatment and acute toxicity in mice was evaluated.

6. Extraction and purification of glycosaminoglycans (GAGs)

Proteoglycans combined GAGs with protein. These molecules containing a repeating disaccharide unit were included amino sugar such as N-acetylgalactosamine or N-acetylglucosamine and uronic acid (glucuronic or iduronic acid). Optimum extraction condition of GAGs from Mideodeok tunic was first extract method at 105°C heat in ion water containing 1/60 M sodium phosphate dibasic. Trichloroacetic acid (TCA), hydrochloride and 5-sulfosalicylic acid (SSA) were used for deprotein of the GAGs. Concentration for deprotein of GAGs were 5.0% TCA (w/v) and 10.0% HCl (v/v) treatment. The sulfate and protein contents of deproteinized GAGs contained 35.1% and 22.0% for TCA and 35.4% and 18.5% for HCl, respectively. Characterization of extracted crude GAGs had similar components, amino acids, composition sugars, mineral contents compared with dermatan sulfate from mammalia. Extracted GAGs from *Styela clava* tunic had similar content rate of carbon, hydrogen, nitrogen and sulfur element compared with dermatan sulfate and chondroitin-6-sulfate. Crude GAGs were fractioned two peaks by ion

exchange chromatography on DEAE-sepharode CL-6B.

7. Cytotoxic effects of GAGs in cells and its immunohistochemistry

There has been much effort recently to probe the long-recognized relationship between chronic inflammation and cancer. For example, epidemiological studies have shown that approximately 15% of human deaths from cancer are associated with chronic viral or bacterial infections. Therefore, it may be a promising strategy to inhibit the inflammatory process in order to reduce the tumor incidence. In this regard, the present study was performed to investigate the potential anti-inflammatory effects of glycosaminoglycans (GAGs) extracted from ascidian tunic and to elucidate the underlying mechanism of anti-tumor promoting effects of GAGs in TPA-induced mouse skin inflammation model. GAGs inhibited TPA-induced NF- κ B activation and subsequent COX-2 expression by blocking IKK β and Akt/PKB signaling in mouse skin in vivo, thus, suggesting that GAGs from ascidian tunic may be developed as an effective natural anti-inflammatory agent in the future. Our study would lead to the development of new and improved preventive as well as therapeutic approaches against cancer in the future.

IV. Application Plan

In order to evaluate the application technique of the functional components from Mideodeok, we tried to find the appropriate extraction and purification methods. Finding will be patented and the developed techniques will be transferred to the Mideodeok Producer Association (MPA). Hopefully, these techniques will help increase their future income. Extracted materials with functional components will be applied in cytotoxic materials, with the results submitted to international refereed journals and presented in a formal conference. The standardized extraction methods and determination techniques from unknown materials will be used in other marine research fields. The basic data obtained can

be used for new product development techniques and will be a good public information to be disseminated to the concerned users.

One of the products generated from this project won a prize in the tourism souvenir competition in Gyeongsangnamdo. In addition, the techniques applied helped to enhance the quality, reduce production cost and a created a new, innovative product. Another product was sold by the MPA to a provincial athletic tournament in 2006. Members of the MPA will be proud of the application and industrialization techniques developed by this research project. Also, it can contribute to the public administration of other national research projects. Eventually, this industry-university joint research project will maximize job creation in the area and continue the net-working between the industry-university-municipal office-institute systems.

CONTENTS

I. Objectivis and Significance	22
1. Objectives	22
2. Significance	22
II. Domestic and international scientific/technical scope	25
1. Technical scope and applications	25
2. Contribution to scientific information	26
III. Contents and results	28
Chapter 1 Seasonal variation in nutritional composition of Mideodeok	28
1. Environmental status of sampling site	31
2. Proximate composition	31
3. Amino acid composition	32
4. Fatty acid composition	33
5. Mineral composition	41
Chapter 2 Antioxidant activities of Mideodeok carotenoids	46
1. Carotenoids content of muscle and tunic	52
2. Carotenoids composition	53
3. Total phenol content	59
4. Antioxidants activities	59
5. DPPH radical scavenging effects	60
6. Hydroxyl radical scavenging effects	60
Chapter 3 Flavor of Mideodeok	67
1. Flavor extraction and identification	69
Chapter 4 Reaction flavor of Mideodeok extract	78
1. Model system of optimum conditions	80
2. Maillard reaction of extract, sugars and amino acids	81

Chapter 5 Change in hematological factors of rainbow trout	92
1. Hematological factors of rainbow trout	96
Chapter 6 Development of functional feed by Mideodeok extract	100
1. Proximate composition	102
2. Growth rate of rockfish	102
3. Fatty acids composition	103
Chapter 7 Extraction and purification of anti-microbial components	111
1. Anti-microbial activity in different fraction	115
2. Fractionation by column chromatography	115
3. Structure determination of peak No. 2	116
1) FAB MS spectrophotometer	116
2) ¹ H NMR spectrophotometer	119
3) ¹³ C NMR spectrophotometer	120
4) ¹ H Detected Single Quantum Coherence(HSQC) spectrophotometer	122
5) ¹ H- ¹ H (Corelation spectroscopy(COSY) spectrophotometer	124
Chapter 8 Evaluation of anti-microbial components	130
1. Determination of extraction solvents	135
2. Liquid-liquid partition	135
3. Column chromatography	136
4. Extraction condition of ODS column	137
5. HPLC analysis condition	138
6. Mass productions condition	138
7. Quantification of anti-microbial activity	138
8. MIC and inhibitory activity of various microbes	144
9. Sustainability of inhibitory activity	146
10. Stability on pH and heat treatment	147
11. Acute toxicity in mouse	149
Chapter 9 Extraction and purification of glycosaminoglycans(GAGs)	150
1. Extraction of GAGs	153
2. HPLC analysis of GAGs	153
3. Purification of amino sugars by ion-chromatography	153

4. Sugars and amino sugars content analysis by HPAEC-PAD	155
5. Electrophoresis of fractionated GAGs	155
6. Chemical composition of the purified GAGs	157
5. ¹ H NMR spectrophotometer	157
Chapter 10 Cytotoxic effects of GAGs in cell	162
1. Optimum concentration of GAGs in NF-κB activity	166
2. Nuclear NF-κB expression in JB-6 cell	172
3. iNOS, ICAM-1 and VCAM-1 expression in JB-6 cell	173
4. Inhibitory effect of NF-κB nuclear translocation	173
5. Inflammation signal pathway of p38, JNK, ERK	174
Chapter 11 Immunohistochemistry of GAGs	176
1. TPA-induced COX-2 and VCAM expression	178
2. TPA-induced COX-2 and VCAM expression in mouse skin	178
3. TPA-induced NF-κB activation in mouse skin	183
4. TPA-induced IKK phosphorylation in mouse skin	183
5. TPA-induced p38 phosphorylation in mouse skin	183
6. TPA-induced Akt phosphorylation in mouse skin	183
IV. Achievement and contribution to the goal	193
1. Achievement of the goals	193
2. Contribution to technical development	194
V. Application plan	195
1. Necessity of additional research	195
2. Application to other research plan	195
3. Upscale manufacture of designed products	196
VI. References	200

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	22
1. 연구개발의 목적	22
2. 연구개발의 필요성	22
가. 기술적 측면	22
나. 경제·산업적 측면	23
다. 사회·문화적 측면	23
3. 연구개발의 범위	24
가. 미더덕 영양성분의 계절적 변화	24
나. 미더덕 카로테노이드의 항산화활성	24
다. 미더덕 향기성분의 변화	24
라. 미더덕 껍질에 함유된 GAGs의 추출 및 정제	24
마. 미더덕에 함유된 항균물질의 분리 및 정제	24
바. 미더덕에 함유된 항균성 물질의 평가	24
사. 세포주에 대한 미더덕 GAGs의 세포독성 효과	24
아. 미더덕 껍질로부터 추출한 GAGs TPA에 의해 유발된 마우스 피부염증에 미치는 영향	24
제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보	25
1. 국내외 기술개발 현황	25
2. 국내외 과학기술정보	26
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	28
제 1 절 미더덕 영양성분의 계절적 변화	28
1. 미더덕 양식장의 해양환경	31
2. 일반성분 및 glycogen 함량	31
3. 구성 아미노산 조성의 변화	32
4. 지방산 조성의 변화	33
5. 무기질 함량의 변화	41

제 2 절 미더덕 카로테노이드의 항산화활성	46
1. 미더덕 육 및 껍질 중의 카로테노이드 함량의 변화	52
2. 카로테노이드 조성의 변화	53
3. 총 페놀 화합물의 변화	59
4. 리놀렌산을 이용한 미더덕 추출물의 항산화 활성의 변화	59
5. DPPH를 이용한 미더덕 추출물의 유리라디칼 소거활성의 변화	60
6. Hydroxyl 라디칼 소거능의 변화	60
제 3 절 미더덕의 휘발성향기성분	67
1. 향기성분의 분리 및 동정	69
제 4 절 미더덕 체액 풍미개선 물질의 개발	78
1. 최적조건 설정을 위한 반응모델	80
2. 반응모델에서 얻어진 반응액의 향기성분	81
제 5 절 미더덕 추출액을 섭취한 무지개 송어 혈액성상의 변화	92
1. 혈액생화학 성분의 변화	96
제 6 절 미더덕 추출액을 활용한 기능성사료 개발	100
1. 일반성분의 변화	102
2. 조피블락의 성장도	102
3. 지방산 조성의 변화	103
제 7 절 미더덕에 함유된 향균물질의 분리 및 정제	111
1. 각 획분별 향균활성 및 수율	115
2. 향균물질의 칼럼 크로마토그래피에 의한 분획 및 활성	115
3. 50% MeOH구에서 분리한 peak no. 2 향균성 물질의 구조 해석	116
가. FAB MS분석에 의한 분자량의 추정	116
나. ^1H NMR spectrum의 측정	119
다. ^{13}C NMR spectrum의 측정	120
라. ^1H Detected Single Quantum Coherence(HSQC) spectrum의 측정	122
마. ^1H - ^1H (Corelation spectroscopy(COSY) spectrum의 측정	124

제 8 절 미더덕 육에 함유된 항균성 물질의 평가	130
1. 추출용매의 선정	135
2. 액-액 분배조건	135
3. 칼럼 크로마토그래피에 의한 분리정제 조건	136
4. 구상 ODS 칼럼에서의 용출 조건	137
5. ODS 칼럼을 이용한 HPLC에서의 용출	138
6. 대량 분리정제 조건의 설정 및 분리정제	138
7. 항균물질의 정량분석	144
8. MIC 및 각종 미생물에 대한 항균 활성	146
9. 항균활성의 지속시간	147
10. pH 및 가열에 의한 항균 물질의 안정성	147
11. 마우스에 대한 급성 독성	149
제 9 절 미더덕 껍질에 함유된 GAGs의 추출 및 정제	150
1. GAGs 추출	153
2. HPLC에 의한 GAGs의 확인	153
3. Ion-chromatography에 의한 GAGs의 분리 및 정제	153
4. HPAEC-PAd에 의한 단당류 및 아미노당의 정량	155
5. 전기영동에 의한 분리 정제된 GAGs의 확인	155
6. 분리 정제된 GAGs의 획분별 화학적 조성분석	157
7. 핵자기공명분광분석	157
제 10 절 세포주에 대한 미더덕 GAGs의 세포독성효과	163
1. 적정 유효농도의 설정	166
2. 세포핵에서의 NF- κ B의 발현	172
3. 염증관련 인자인 iNOS, ICAM-1 및 VCAM-1 등의 변화조사	173
4. 기능성 물질의 NF- κ B의 핵 내로의 전이조사	173
5. 염증반응을 조절하는 p38, JNK, ERK 대사에서의 단백질 변화조사	174
제 11 절 미더덕 껍질로부터 추출한 GAGs TPA에 의해 유발된 마우스 피부염증에 미치는 영향	176
1. 미더덕껍질에서 추출한 GAGs가 피부염증에 미치는 영향	178

2. 멩게 꺽질에서 추출한 GAGs가 염증인자의 발현에 미치는 영향	178
3. 멩게 꺽질에서 추출한 GAGs가 NF-κB의 활성화에 미치는 영향	183
4. 멩게 꺽질에서 추출한 GAGs가 IKK의 활성화에 미치는 영향	183
5. 멩게 꺽질에서 추출한 GAGs가 p38의 인산화에 미치는 영향	183
6. 멩게 꺽질에서 추출한 GAGs가 Akt의 인산화에 미치는 영향	183
제 4 장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	193
1. 연구개발 목표달성도	193
2. 연구개발 기술발전예의 기여도	194
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	195
1. 추가연구의 필요성	195
2. 타 연구예의 응용	195
3. 기업화 추진방안	196
제 6 장 참고문헌	200

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적

미더덕은 남해안에서 생산되며 최근에는 양식가능 품종으로 허가 받기에 이르렀다. 따라서 미더덕의 생화학적 가치에 대한 연구가 매우 부족한 실정에서 단순한 1차 산업의 형태로는 어민들의 소득증대를 가져올 수가 없다. 이러한 점을 고려하여 부가가치 높은 미더덕 가공제품의 생산을 위한 기능성 성분의 검색, 미더덕에 함유된 향기성분의 조성분석 및 천연향료물질로서의 응용기술 개발, 미더덕 육 및 껍질에 함유된 기능성 소재물질의 탐색을 통하여 산업화기술 확보, 기능성 소재로서의 안전성 검증 및 용도개발 방법의 모색, 산업화를 위한 pilot 실험 및 시제품 생산을 위한 기술개발을 목표로 연구를 실행하였다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

해양수산부에서는 해양생명공학산업을 21세기 미래주도형 고부가가치 성장 동력산업으로 중점 육성하고 하고 있다. 이는 UN 해양법 협약의 발효로 자국 중심의 수산자원보호정책을 강화하고 있고, FTA 자유무역협정의 발효를 통하여 수산부문에 대한 기술개발로 자국의 경제 산업을 발전시키려고 하기 때문이다. 여기에 미국, 러시아, 캐나다 등 자원 확보 국가들에서도 자연산 수산물의 감소로 인한 식량문제 해결과 국가경제의 발전을 위해 지속적으로 기술개발에 투자하고 있는 것도 하나의 예가 될 수 있다. 일본 농림수산성은 일단 FTA(자유무역협정) 교섭으로 국내 농수산업에 대한 피해가 예상됨에 따라 기술개발을 통한 수출촉진을 지원하기로 결정하고 새로운 연구개발과제의 발굴에 박차를 가하고 있다.

해양수산부에서는 2004년부터 '마린바이오21사업'을 추진하여 향후 세계 5위 권 해양바이오 기술 강국 진입과 해양생명공학 산업의 획기적인 발전을 이룩하고자 노력하고 있다. 그러나 현재의 자원수준과 시장상황으로 볼 때 산출량 자체를 늘리기보다는 산출물의 부가가치를 높이거나 산출에 대한 비용투입을 줄여 경쟁력을 확보해야 하는 방향으로 연구개발이 이루어져야 한다.

나. 경제·산업적 측면

미더덕의 어업권 현황은 2000년 거제에 2건 9.5 ha에서, 2003년 마산 68건 239 ha, 거제 33건 136 ha, 고성 25건 92 ha, 2005년 거제 46건 186 ha, 고성 44건 180 ha, 마산 73건 259 ha로 2003년 대비 127%의 폭발적인 양식어업권 증가현상이 나타나고 있다. 이는 2004년 6월 말 피조개, 진주담치 양식어업권이 수익성이 높은 미더덕 양식업으로 품종 변경신청 되었기 때문이다.

미더덕 생산현황은 2006년 경남 생산량은 1,116톤으로 전체 생산량 1,519톤의 73% 이상이 거제, 마산, 고성지역에서 생산되었고, 진동 및 거제에서 1차 가공되어 노량진, 가락동 시장 등에서 판매되고 있어 지역 간의 생산 및 가공기술의 개발에 많은 노력을 기울이고 있다. 연중 1월 판매단가가 가장 높으며 종어기인 7월이 되면 가격이 50% 이상 하락되고 4, 5월 홍수 출하되어 가격하락이 일어나고 있다. 최근 어민들의 각 가정에 냉동고가 설치되면서 일정량을 확보하고 있다가 겨울철에 필요한 양만큼 시장에 출하하여 가격조정에 성공하고 있으나 부가가치를 향상시키기 위해서 젓갈, 조미료 등의 새로운 제품이 개발되고 있으며 생체를 포장하여 활용하려는 노력이 이루어지고 있다.

다. 사회·문화적 측면

우리나라 수산물 총 생산량에서 양식업이 차지하는 비중은 꾸준히 늘어나 1980년의 양식업 점유율 22%에서 1995년 31%를 넘어선 뒤 2002년에는 36%로 높아져 사회적 관심은 증가하고 있는 실정이다. 그리고 지난 수세기 동안 우리나라의 수산업 및 양식 산업은 국민식량의 안정공급과 무역수지 개선에 기여함과 아울러 소득증대에도 이바지 하였다. 1,700여개의 어촌계와 2,200여개의 어항 등이 연안지역에 산재하여 바다접근의 주요한 통로로서의 역할을 하나 지역 특성에 맞는 어촌개발 미흡 및 어촌 정주환경이 좋지 않아 탈 어촌 현상이 가속화되고 있어 획기적인 대책마련이 시급한 실정이다.

건강에 대한 관심과 소득수준이 향상됨에 따라 수산물의 소비패턴이 다양해지고, 이에 부응하는 특화된 수산물 개발이 이루어져야 할 시기가 다가온 것으로 여겨진다. 날로 다양해지는 수산식품에 대한 정보를 끊임없이 제공하고 수산물에 대한 흥미를 높여 국민의 관심과 행동을 유발하도록 유도해야 한다. 그러기 위해서는 수산물의 안전기준을 강화하고, 소비자들의 위생관념에 맞는 환경관리 기준을 높이는 법적 뒷받침이 필요한 시점에 다다른 것으로 판단된다.

선진국에서는 이미 오래전부터 위해요소중점관리제도(HACCP)를 도입하여 수산물에 대한 엄격한 위생기준을 적용하고 있고, 우리나라에서도 이 제도의

정착화에 많은 노력을 기울이고 있다. 관광객의 유치를 위한 대규모 위락단지 조성 등 인프라 구축에만 투자하고 관광객의 기대와 소비를 확대시킬 수 있는 먹거리의 개발에는 적극적이지 못하므로 이를 개선할 필요성이 있다. 그리고 세계적으로 유기수산물(organic seafood)의 건강기능에 대한 관심이 고조되고 있어 이와 관련된 제도적 뒷받침이 조속히 이루어져야 할 것이다.

3. 연구개발의 범위

- 가. 미더덕 영양성분의 계절적 변화
- 나. 미더덕 카로테노이드의 항산화활성
- 다. 미더덕 향기성분의 변화
- 라. 미더덕 껍질에 함유된 GAGs의 추출 및 정제
- 마. 미더덕에 함유된 항균물질의 분리 및 정제
- 바. 미더덕에 함유된 항균성 물질의 평가
- 사. 세포주에 대한 미더덕 GAGs의 세포독성 효과
- 아. 미더덕 껍질로부터 추출한 GAGs TPA에 의해 유발된 마우스 피부염증에 미치는 영향

제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보

1. 국내외 기술개발 현황

바이오산업은 지식, 기술, 정보에 기초를 둔 신산업으로 질병진단 및 수명 연장, 환경오염개선 등 삶의 질 향상을 추구하는 현대인의 욕구를 충족시켜 준다는 점에 있어서 어느 타 산업분야보다도 중요한 미래산업분야로 각광받고 있다. 그 중 해양 바이오산업은 해양생물의 시스템, 구성성분, 과정, 기능 등을 규명하여 유용한 물질과 서비스를 제공하는 산업을 말한다. 이는 해양학, 수산학, 생물학, 유전체학, 단백질체학, 생물정보학을 이용하여 기반기술인 해양생물의 보전, 이용과 해양생물 기능의 조절은 물론 식량과 에너지 획득, 유용물질의 생산 등에 대하여 탐구하는 산업이다.

한 때 황금알을 낳는 사업으로까지 인식되었던 수산업은 어느 틈엔가 사양산업의 하나로 인식되어, 외부로부터의 신규투자는 거의 이루어지지 않은 채 축적된 어업자본 조차 타 산업으로 유출되는 경향이 있다. 따라서 한 차원 높은 기술의 개발을 통하여 고부가가치적인 품목의 생산과 가공기술의 개발에 적극적인 연구와 투자가 필요한 시점에 와있다. 특히 최근의 FTA협정의 체결은 향후 우리나라 수산업 생산의 감소를 가져올 것이 확실하기 때문에 기술개발을 통한 경쟁력 강화가 어느 때보다 절실한 실정이다.

국내 건강기능식품의 2004년도 생산현황을 보면 알로에 제품이 351억원으로서 가장 많았으며, 다음으로 영양보충용제품 279억원, 홍삼농축액 242억원 등의 순이었으며, 수입현황에서도 알로에 제품이 213억원으로서 가장 높았고 다음은 정제어유 172억원, 키토산 99억원, 화분가공식품 85억원 그리고 조류 43억원으로 높은 실적을 보였다. 미국의 자연유기식품, 건강기능성식품, 식이보조제, 천연제품의 시장규모는 2006년 360억불에 이를 것이며 이 중 글리코사미노글리칸(GAGs)은 7.5억불/년 소비되었으며, 일본은 2003년 15,669억엔에서 2005년 20,370억엔으로 30%의 성장을 보였으며 이 중 GAGs이 식품용으로 20억엔/150톤 유통되었고, 중국은 생활수준의 향상으로 보건의료 시장은 매년 40~50% 성장하고 있으며 2005년 시장규모는 500억 인민폐에 달 하는 것으로 추정된다.

미더덕에 함유된 뮤코다당인 GAGs은 콘드로이틴황산, 드마탄황산, 하이알루론산 등 피부 및 관절의 연골을 구성하는 성분으로 구성되어 있고, 고령화사회로 진행될수록 원료의 소비도 증가하는 추세할 것이다. 1999년 이후

매년 의약품 및 화장품의 원료로 사용량이 점차 증가하고 있으며, 세계적으로 수요는 증가하는 경향이다. 주사용 및 화장품용은 상어지느러미 연골로부터 정제되고 있으며, 식품용은 소나 양의 연골, 장점막 세포로부터 정제되며, 무척추동물로는 달팽이 등이 이용되고 있다. 그러나 최근 광우병 파동으로 소나 양의 연골, 내장으로부터 추출한 제품의 사용을 금지하고 있어 원료수급난이 심각하게 일어나고 있으므로 대량생산이 가능한 미더덕은 원료로서 충분한 가치가 있다고 판단된다.

미더덕에 관련된 연구는 초보수준에 머물러 미더덕 정미성분 분석에 국한되어 연구되어 있으며, 지금까지는 기능성 물질의 원료로 응용하겠다는 연구는 이루어지지 않았다. 개발된 기술력을 활용하여 건강기능성식품, 화장품 및 의약품의 원료로 활용이 이루어진다면 어민의 소득증대 뿐만 아니라 수입대체에 따른 효과가 클 것으로 여겨진다.

2. 국내외 과학기술정보

경제발전의 필수요건으로서 생산요소 외에 기술혁신이 이루어져야 함과 아울러 기술혁신을 통하여 투자수요나 소비수요가 자극되기 때문에 기술혁신을 통한 경제발전이 선진국으로 진입하는 요소가 된다. 중국은 정부조직을 효율화하기 위하여 조직개편을 조정하면서도 국가 해양산업발전을 위하여 전담부서를 설치하기로 함으로서 해양산업의 중요성을 높게 평가하고 있다. 해양산업 부문을 수산업, 해양생명공학 등 13개 산업분야로 구분하고 2010년까지 GDP의 5%로 끌어올린다는 목표를 설정하였고, 수산부문은 2003년도에 2,820억위안(약 40조원)의 산출액을 기록하여 해양산업부문의 28%를 차지함으로써 첨단수산가공산업의 발전을 위한 연구개발을 계획하고 있다.

우리나라도 적극적 대응전략을 세워 중국의 개발계획에 참여하고 기술개발을 통하여 협력함으로써 차후 중국 관광객의 유치를 이루어야 할 준비를 해야 한다. ASEAN은 일본의 기술을 바탕으로 동남아지역을 '지속가능한 수산물 관리방안', '지속 가능한 어획관리 방안', '지속가능한 양식 산업', '지속가능한 수산부산물의 이용방안'이란 주제로 대책회의를 개최하여 각국의 투자를 유치하고 있다(2001. 11).

2020년까지 미국 전체의 식품소비 지출은 26.3%, 수산물은 25.2% 증가할 전망되며, 미국 BCC(Business Communication Company)사는 '양식어업의 기회'라는 보고서에서 세계 양식 수산물 시장이 올해 659억 달러(약 78조원)

에서 연평균 7.3%씩 성장하여 2008년에는 937억 달러(약 111조원)에 달할 것이라 전망하고 있다. 포획어업이 쇠퇴하는 반면 양식어업 기술은 나날이 발달하여 고가의 다양한 수산물을 고품질로 대량생산하는 기술개발이 이루어질 것으로 예상된다. 저개발 국가들이 양식어업 분야에 활발히 진출하여 내수시장 뿐만 아니라 수출시장에도 눈을 돌리는 등 많은 나라의 정부와 국제기구가 양식어업을 지원하는 기금과 프로그램을 개설하여 적극 지원하고 있다. 아울러 세계 인구증가와 더불어 1인당 수산물 소비량 또한 증가하고 있다는 점은 기능성 수산물의 부가가치화가 가능하다는 것을 시사하고 있다.

기능성 식품의 탐색 및 효능평가 기술은 기술격차가 매우 크고, 구조분석 및 개량기술의 개발은 높은 기술수준을 보이고 있으며 아래 표와 같은 특징을 나타내고 있다. 성공적인 해양생물자원 유래 기능성식품 소재의 개발을 위해서는 방대한 해양생물 자원에 대한 생리기능성 물질의 탐색, 기능성 소재의 분리 및 정제기술 개발, 기능성 소재의 기능활성(in vitro, in vivo) 검증 및 효력 구명, 신 기능성 소재 원료자원의 보존 및 대량생산 방안 확립, 해양생물유래 기능성 소재를 이용한 건강기능성 식품 등을 상품화하는 과정을 통하여 경쟁력을 제고해야 한다.

분야	대상기술	선진국	한국	기술의 특징
탐색 및 효능평가 기술	유효소재 탐색 기술	80	30	- 목적 유효성분의 경제적 탐색기술필요
	노화 억제효과	40	10	- 생체 산화방지를 통한 노화억제 - 장시간 지속적 투자가 필요한 고난도 기술개발
	생리활성물질 이용 건강증진 기술	40	10	- 저이용 자원활용 및 신상품 개발가능 - 전세계적으로 도입기에 있어 기술선진국 진입가능
구조분석 및 개량기술	유효성분 분리기술	80	40	- HPLC 등 각종 분리장치를 이용하여 유효성분 분리
	기능성물질의 구조결정	90	50	- 분리된 물질의 구조를 NMR, MS, FT-IR 등을 이용하여 구조분석
	신소재 물질 디자인 기술	60	10	- 구조분석에 근거하여 기능성과 구조와의 연관관계를 규명하여 새로운 물질디자인

자료 : 한국식품개발연구원 보고서(2002).

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 미더덕 영양성분의 계절적 변화

서론

미더덕(*Styela clava*)은 남해안을 중심으로 대량 양식되는 부가가치가 높은 수산식품으로 평가되고 있다. 멍게와 비슷한 향을 내며 4월부터 6월까지 수확되며, 최근에는 어민들이 여름동안 대량생산하여 각 가정에 냉동보관하고 있다가 겨울에 대도시의 어시장에 높은 가격으로 판매하고 있다. 남해안에서 생산되는 미더덕은 2001년 15,133톤을 최고기점으로, 2002년 5,325톤으로 감소하였고, 종묘채취가 어려웠던 2003년에는 3,041톤 밖에 생산되지 못하였다. 감소하는 이유에 대하여는 정확한 조사가 이루어지지 않아 정확한 원인은 밝혀지지 않았다(MOMAF, 2005).

대량생산에도 불구하고 미더덕은 가공방법이 개발되어 있지 않는 수산물이다. 지금까지 연구된 분야는 주로 발생학(Ermak, 1975; Kusakabe, 1995), 항균성(Lehrer et al., 2002; Menzel et al., 2002), 면역활성(Kelly et al., 1992; Wright and Cooper, 1984) 등에 집중되어 있다. 미더덕의 영양성분에 대한 자료는 다양하지 못하다. Kim 등(1985)은 미더덕에 함유되어 있는 지방산의 조성을 분석한 결과 EPA(C20:5n-3) 18.3%, DHA(C22:6n-3) 14.2%, C16:0 16.3%, C18:1n-9 7.0%가 함유되어 있다고 하였다. Jiang 등(2005)의 최근의 연구결과에 의하면 미더덕에는 고도불포화지방산(PUFAs) 중 특히 EPA 및 DHA 함량이 높은 것으로 나타났다. 또한, Popov 등(2002)도 지방산 조성을 분석한 결과 중성지방과 인지질 획득에서 C16:0(25.4%, 22.4%), C18:1(18.4%, 11.8%), C20:5n-3(10.7%, 10.3%), C18:0(8.3%, 9.7%), C18:2n-6(8.2%, 4.8%)가 존재하는 것으로 보고하였다. 그리고 인지질 획득에서 고도불포화지방산 중 EPA는 1.2%, DHA는 7.0%가 함유되어 있다고 하였다.

네 종류의 미색류에 함유되어 있는 영양성분을 조사한 결과 단백질은 37~67%(건물량) 였고, 구성 아미노산의 상대적인 함량은 매우 비슷하였으며, 특히 산성 아미노산의 함량이 높았다(Smith and Dehnel, 1971). 미더덕에 함유된 유리 아미노산의 조성을 분석한 결과 taurine, proline, glutamic acid, glycine 등의 함량이 높게 나타났다(Lee et al., 1975; Lee et al., 1995). Ermak(1975) 등이 생화학적 성분을 분석한 결과 장내에 다량의 glycogen이 존재한다고 하였지만 그 외 다른 생화학적 성분과 관련된 자료를 얻기가 어려웠다. 미더덕에는 독특한 향이 존재하지만 단지 한국사람 만

이 이 향을 즐겨하여 된장국, 찜, 젓갈 등으로 활용하는 것으로 조사되었고, 영양학적 품질을 평가할 필요가 있는 것으로 나타났다.

해양생물에 함유된 생화학적 성분은 계절의 변화(Ackman, 1995; Orban et al., 2002) 및 지정학적인 위치(Leu et al., 1981; Constaatinides et al., 1995)에 직접적인 영향을 받는다. 계절과 지정학적 변화에 영향을 미치는 인자는 수온, 염분농도, 해양의 먹이생물 조성 등이다(Socal et al., 2004; Pederson et al., 2005). 미더덕의 다른 한 종인 *Styela pilicata*의 발생에 대하여 조사한 결과 수온과 염분농도가 달라지면 발생 및 유충의 성장에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다(Qian and Thiyagarajan, 2003). 그 외 *Halocynthia aurantium*는 수온의 변화에 민감한 호메오 기작에 대하여 효과적으로 반응하지 못하여 수온이 증가하면 생존율이 낮아지는 것으로 밝혀졌다(Sanina and Kostetsky, 2002).

본 연구의 목적은 서로 다른 지역에서 수확된 미더덕 육 및 껍질에 함유된 영양성분의 계절에 따른 변화를 비교평가 함으로써 미색류를 연구하는 연구자와 소비자 모두에게 영양정보를 제공함으로써 미더덕의 활용범위를 확대하고자 하는데 있다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 미더덕(*Styela clava*)은 2005년 1월, 3월, 5월 경남 거제시 성포 및 통영시 수월리에서 채취하여 20 kg으로 소포장한 후 -24℃의 냉동고에 저장하여 두고 각 항목의 분석을 위하여 재료를 흐르는 수돗물에서 해동 후 실험에 사용하였다.

일반성분의 분석

AOAC(1990)에 따라 수분은 상압가열건조법, 조지방은 Bligh & Dyer 분석법, 조단백질은 Kjeldahl 정량법, 회분은 550℃에서 건식회화법으로 측정하였으며, 탄수화물은 위의 성분함량에서 감하여 구하였다.

Glycogen의 분석

시료 1 g을 15 mL 시험관에 취한 다음, 여기에 30% KOH 3 mL를 첨가하여 약 30초 동안 혼합하고 수욕 상에서 20분 동안 가열한 후 상온에 방냉하였다. 이것을 3000 rpm에서 30분 동안 원심분리 한 다음 상층액은 버리고

잔사에 2 mL의 증류수를 넣었다. 여기에 ethanol 2.5 mL를 넣고 다시 3000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 상층액은 버리고 질소가스로 ethanol을 완전히 날렸다. 그리고 증류수 5 mL를 넣어 혼합한 다음 25 mL의 정용플라스크에 정용하여 1 mL만 취하였다. 여기에 증류수 5 mL로 희석하여 다시 1 mL만 취하였다. 5% phenol 1 mL, 황산 5 mL를 넣어 혼합 한 다음. 상온에서 10분간 식힌 후 25℃ 물에 20분 정도 반응시켜 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

구성 아미노산의 분석

시험관에 약 0.25 g에 해당하는 시료를 정확히 취하여, 6 N 염산 5 mL를 가해 진공 밀봉한 다음 110℃에서 24시간 가수분해 하였다. 가수분해된 시료는 3G-4 유리여과기로 휴민을 제거하여, 감압농축 한 다음, 0.01 N 염산으로 일정량 정용하여 아미노산 자동 분석기(LKB-Biochrom 20, Pharmacia, Sweden)로 구성 아미노산조성을 분석하였다.

총 지질의 추출과 지방산조성의 분석

Bligh and Dyer의 방법(1959)에 따라 총지질을 추출하고 AOCS법(1990)에 따라 검화 및 methylester화 시킨 다음 GC 분석용 시료를 조제하였다. 이를 capillary column (Omegawax-320, 30 m×0.25 mm i.d., Supelco Ltd.)이 장착된 GC(Shimadzu GC-17A, Kyoto, Japan)로써 분석하였다. 이때 GC의 분석 조건은 Table 1과 같고, 각 구성 지방산의 동정은 표품과의 머무름 시간(RT)의 비교 및 equivalent chain length법(Ackman, 1995)에 의해 동정하였다.

무기질의 분석

무기성분 중 양이온은 시료 일정량을 회분 도가니에 취해 500~550℃에서 5~6 시간 건식화화한 후 제가 남지 않는 여과지로 여과하여 일정량으로 정용하였다. 유도플라즈마원자흡광도계(ICP, Atomscan 25, TJA, USA)로써 K, Ca, Mg, Na, Mn, Fe, Cu, Zn, Cr, Pb, Ag 및 As의 함량을 분석하였다.

통계분석

모든 자료는 3회 반복 실험하여 mean±SD로 나타내었고, JMP Statistical Discovery Software™ version 5(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 Tukey-Kramer HSD test로 통계처리 하였다.

Table 1. GC conditions for analysis of fatty acid composition

Conditions	Analysis conditions
Instrument	Shimadzu GC-14A
Column	Omegawax-320 fused silica WCOT
Carrier gas	Helium gas (1.5 kg/cm ²)
Column	185°C(8 min) → (3°C/min) → 230°C(14 min)
Injector	250°C
Detector	FID, 260°C
Split ratio	50:1

결과 및 고찰

미더덕 양식장의 해양환경

미더덕을 양식한 지역의 해양환경자료는 국립수산과학원의 자료(NFRDI, 2005)를 인용하였다. 모든 자료는 수심 0~10 m를 기준으로 평균값과 표준편차로 나타내었다. 시료채취 시기의 수온은 거제와 통영지역에서 큰 차이가 없었고, 가장 낮았던 수온은 2월의 거제가 5.3°C이었고, 통영은 5.0°C이었으며, 최고 수온은 11월의 거제가 18.8°C이었고, 통영은 18.6°C이었다. 염분농도는 큰 변화가 없었으며, 범위는 31.04~33.7 g/L이었다. Chlorophyll a의 농도는 11월에 가장 높아 거제는 4.35 µg/L이었고, 통영은 6.53 µg/L로 거제보다 먹이생물의 분포가 높은 것으로 나타났다.

일반성분 및 glycogen 함량의 변화

미더덕 육 및 껍질의 계절에 따른 일반성분의 분석결과를 Table 2에 나타내었다. 1월, 3월 및 5월 시료의 수분함량은 통영산 육 및 껍질에서 각각 87.0~87.4% 및 86.1~86.7%이었으며, 거제산은 각각 85.7~86.7% 및 84.3~84.5%로 통영산이 약간 높은 경향을 보였다. 수분함량이 가장 높은 계절은 5월이었지만 계절에 따른 유의차는 없었다(P>0.05). 조단백질 함량은 거제산 육의

경우 5월보다 1월에 약 12%가 낮은 함량을 보였으나, 통영산은 유의차가 없었다. 단백질 함량은 33.1~37.7%(건물량)으로 다른 미색류의 50.2~55.6%(건물량)과 비교할 때 낮은 값이었으나(Oh et al., 1997), 단백질 식품인 콩류와 비교하면 비슷한 값을 나타낸다(Kumar et al., 2006). 미더덕 껍질의 단백질 함량은 거제와 통영산이 각각 17.9~23.2% 및 9.4~12.9%이었고, 3월에 가장 높은 함량을 나타내었다. 미더덕 육의 조지방 함량은 6.3~9.8%로 높은 값을 나타내었다. 거제산은 1월 1.0%에서 5월 1.3%로 약간 증가하는 경향이었으나, 통영산은 1월 1.1%에서 0.8%로 감소하는 경향이였다. 껍질 중의 지질 함량은 육보다 낮아 거제산은 0.2~0.3%, 통영산은 0.1~0.2%이었다. 회분 함량은 거제산 육에서 19.6~27.3%(건물량), 통영산 육에서는 22.2~23.8%이었다. 대부분의 생물은 표피나 세포벽에 육보다 높은 함량의 무기질을 보유하고 있다. 그러나 미더덕의 경우 육과 껍질의 회분 함량을 건물량으로 계산하였을 때 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 미색류의 경우 껍질을 구성하는 물질이 대부분 식이섬유이므로 육과 큰 차이를 나타내지 않은 것으로 추정된다. 그리고 미더덕은 먹이생물을 여과하여 섭이하므로 소화관에 많은 양의 무기질을 축적하므로 육의 회분 함량이 높은 원인이 되는 것으로 여겨진다.

Glycogen 함량은 거제산과 통영산이 각각 21.6~25.9% 및 20.8~27.7%이었으며, 가장 높은 함량을 나타내었던 계절은 3월이었다. 껍질에서는 glycogen이 검출되지 않았다.

구성 아미노산 조성의 변화

계절별로 채취한 미더덕 육의 구성 아미노산 함량의 변화를 Table 3(거제산) 및 4(통영산)에 각각 나타내었다. 함량이 가장 높았던 계절은 1월과 3월이었고, 주성분은 glutamic acid, aspartic acid, arginine, leucine 및 lysine 등이었다. 거제산 육에서의 계절에 따른 이들 아미노산의 함량은 각각 50~59%, 42~44%, 27~35%, 24~25% 및 29~35%이었고, 통영산 육에서의 변화는 52~54%, 40~41%, 27~31%, 26~29% 및 31~34%이었다. 필수 아미노산(EAA)의 함량변화를 보면 leucine 및 lysine이 가장 높았다. 필수 아미노산과 비필수 아미노산(NEAA)의 비를 비교해 보면, 거제산은 0.55~0.61, 통영산은 0.66~0.67로 나타났다. 이 값은 대부분의 어류에서의 값 0.7과 비슷한 값을 보였으며, 게나 오징어의 0.59 보다는 높은 것으로 나타났다(Constantinides et al., 1995). 따라서 미더덕은 아미노산의 구성이 다양하고 양질의 필수 아미노산을 함유하고 있어 균형이 잡힌 식품으로서의 가치가 있는 것으로 여겨

진다. 그러나, FAO에서 기준으로 설정하고 있는 값과 비교하였을 때 낮은 값이므로 다른 식품과의 조화를 이루도록 섭취하는 것이 좋을 것으로 여겨진다(FAO/WHO/UNU, 1985).

지방산 조성의 변화

거제산과 통영산 미더덕 육의 지방산 조성은 Table 5, 6에, 껍질의 지방산 조성은 Table 7, 8에 각각 나타내었다. 육과 껍질에 함유된 지방산 중에서 EPA의 함량이 가장 높아 20.0~22.3%로 조사되었고, 이 전의 많은 연구에서도 20.3~23.2%로 보고하여 비슷한 결과를 나타내었다(Kim et al., 1985; Popov et al., 2002). 포화 및 모노엔산은 C14:0, C16:0, C16:1n-7, C18:0, C18:1n-9, C18:1n-7이 주성분이었고, 계절에 따른 함량은 2.3~6.6%, 10.3~13.6%, 6.0~13.9%, 3.6~5.3%, 2.2~9.5% 및 2.2~9.1%이었으며, 이들 대부분은 계절에 따른 유의차가 인정되었다. 다가불포화 지방산의 함량은 47.8~54.9%이었고, 포화산은 22.8~26.6% 그리고 모노엔산은 19.7~27.4%로 육과 껍질 모두 계절에 따른 변화가 큰 것으로 나타났다. 이와 같이 EPA($P \leq 0.05$) 및 DHA($P \leq 0.05$) 함량의 계절적 변화는 년 중 섭취하는 먹이생물의 형태와 량(식물성 및 동물성 플랑크톤)에 기인되는 것으로 여겨진다. 수산생물에 널리 분포하고 있는 이들 지방산들은 미생물, 동물성 플랑크톤 및 식물성 플랑크톤에 의하여 합성되며(Saito et al., 2002; Valentine and Valentine, 2004), 미더덕에서 이들 지방산의 함량이 높은 것은 EPA와 DHA를 다량 섭취해야 하는 우리에게 좋은 식품이 될 수 있는 것으로 판단된다.

Table 2. Proximate composition of Mideodeok muscle and tunic

Sampling Date	Proximate Composition(%) ¹⁾				
	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Ash	Glycogen
Muscle					
Geoje					
January	86.1±1.0 ^{a2)}	5.0(36.0)±0.2 ^a	1.0(7.2)±0.1 ^b	3.8(27.3)±0.3 ^a	3.0(21.6)±0.2 ^b
March	85.7±1.1 ^a	4.9(34.3)±0.1 ^a	1.3(9.1)±0.1 ^a	2.8(19.6)±0.2 ^b	3.7(25.9)±0.3 ^a
May	86.7±0.7 ^a	4.4(33.1)±0.1 ^b	1.3(9.8)±0.1 ^a	3.0(22.6)±0.4 ^b	3.1(23.3)±0.3 ^b
Tongyeong					
January	87.0±0.7 ^a	4.9(37.7)±0.3 ^a	1.1(8.5)±0.1 ^a	3.1(23.8)±0.2 ^a	2.7(20.8)±0.4 ^b
March	87.0±0.5 ^a	4.6(35.4)±0.2 ^a	0.9(6.9)±0.1 ^{ab}	2.9(22.3)±0.1 ^a	3.6(27.7)±0.3 ^a
May	87.4±1.2 ^a	4.5(35.7)±0.3 ^a	0.8(6.3)±0.1 ^b	2.8(22.2)±0.2 ^a	3.0(23.8)±0.3 ^{ab}
Tunic					
Geoje					
January	84.4±0.8 ^a	2.8(17.9)±0.1 ^b	0.3(1.9)±0.0 ^a	3.9(25.0)±0.3 ^a	n.d.
March	84.5±0.6 ^a	3.6(23.2)±0.2 ^a	0.2(1.3)±0.0 ^b	3.5(22.6)±0.2 ^a	n.d.
May	84.3±0.5 ^a	3.0(19.1)±0.1 ^b	0.2(1.3)±0.0 ^b	3.9(24.8)±0.2 ^a	n.d.
Tongyeong					
January	86.1±0.5 ^a	1.3(9.4)±0.2 ^b	0.2(1.4)±0.0 ^a	3.8(27.3)±0.2 ^a	n.d.
March	86.1±0.4 ^a	1.8(12.9)±0.2 ^a	0.1(0.7)±0.0 ^a	3.6(25.9)±0.1 ^a	n.d.
May	86.7±0.8 ^a	1.5(11.3)±0.1 ^{ab}	0.1(0.8)±0.0 ^a	3.3(24.8)±0.1 ^b	n.d.

¹⁾ Mean and standard deviation of three determinations. Parenthesis data shows the dry bases.

²⁾ Different letters within a row denote significant differences ($P < 0.05$)
n.d., not detected.

Table 3. Amino acid composition (g/100 g) of Mideodeok muscle from Geoje, Korea

Amino acid	January	March	May
Aspartic acid	0.42±0.03 ^{a2)}	0.44±0.03 ^a	0.44±0.02 ^a
Threonine ³⁾	0.24±0.01 ^a	0.25±0.01 ^a	0.20±0.00 ^b
Serine	0.22±0.02 ^a	0.23±0.00 ^a	0.19±0.00 ^b
Glutamic acid	0.59±0.01 ^a	0.59±0.02 ^a	0.50±0.03 ^b
Proline	0.24±0.01 ^b	0.28±0.00 ^a	0.21±0.00 ^c
Glycine	0.26±0.02 ^a	0.26±0.00 ^a	0.21±0.00 ^b
Alanine	0.26±0.01 ^a	0.24±0.00 ^b	0.19±0.00 ^c
Cystine	0.07±0.00 ^b	0.08±0.00 ^a	0.05±0.00 ^c
Valine ³⁾	0.24±0.00 ^a	0.22±0.01 ^b	0.18±0.01 ^c
Methionine ³⁾	0.18±0.00 ^a	0.15±0.00 ^a	0.12±0.00 ^a
Isoleucine ³⁾	0.27±0.01 ^a	0.24±0.02 ^a	0.18±0.00 ^b
Leucine ³⁾	0.35±0.02 ^a	0.32±0.01 ^a	0.24±0.01 ^b
Tyrosine	0.27±0.01 ^a	0.25±0.00 ^b	0.20±0.00 ^c
Phenylalanine ³⁾	0.26±0.01 ^b	0.28±0.00 ^a	0.21±0.01 ^c
Histidine	0.14±0.00 ^b	0.16±0.00 ^a	0.11±0.00 ^c
Lysine ³⁾	0.34±0.01 ^a	0.35±0.00 ^a	0.29±0.02 ^b
Ammonia	0.26±0.00 ^a	0.25±0.01 ^a	0.23±0.01 ^b
Arginine	0.35±0.01 ^a	0.34±0.02 ^a	0.27±0.01 ^b
Total	4.96	4.94	4.03
EAA ³⁾ /NEAA ⁴⁾	0.61	0.58	0.55

¹⁾ Mean ± SD of three replicates.

²⁾ Different letters within a row denote significant differences (P<0.05).

³⁾ Essential amino acids.

⁴⁾ Nonessential amino acids.

Table 4. Amino acid composition (g/100 g) of Mideodeok muscle from Tongyeong, Korea.

Amino acid	January	March	May
Aspartic acid	0.40±0.03 ^{a2)}	0.40±0.02 ^a	0.41±0.05 ^a
Threonine ³⁾	0.23±0.01 ^a	0.23±0.00 ^a	0.23±0.01 ^a
Serine	0.21±0.01 ^a	0.21±0.01 ^a	0.19±0.00 ^a
Glutamic acid	0.54±0.04 ^a	0.54±0.04 ^a	0.52±0.03 ^a
Proline	0.23±0.01 ^a	0.23±0.01 ^a	0.23±0.01 ^a
Glycine	0.23±0.01 ^a	0.23±0.01 ^a	0.22±0.01 ^b
Alanine	0.23±0.01 ^a	0.23±0.01 ^a	0.21±0.00 ^a
Cystine	0.07±0.00 ^a	0.06±0.00 ^b	0.05±0.00 ^c
Valine ³⁾	0.20±0.01 ^a	0.20±0.01 ^a	0.19±0.01 ^a
Methionine ³⁾	0.13±0.00 ^a	0.13±0.00 ^a	0.12±0.00 ^a
Isoleucine ³⁾	0.22±0.02 ^a	0.22±0.01 ^a	0.19±0.01 ^a
Leucine ³⁾	0.29±0.02 ^a	0.29±0.02 ^a	0.26±0.01 ^a
Tyrosine	0.24±0.01 ^a	0.24±0.01 ^a	0.21±0.02 ^b
Phenylalanine ³⁾	0.25±0.01 ^b	0.25±0.01 ^a	0.23±0.01 ^b
Histidine	0.15±0.00 ^a	0.15±0.00 ^a	0.16±0.00 ^a
Lysine ³⁾	0.34±0.01 ^a	0.33±0.03 ^a	0.31±0.02 ^a
Ammonia	0.24±0.02 ^a	0.24±0.00 ^a	0.25±0.01 ^a
Arginine	0.31±0.03 ^a	0.30±0.02 ^a	0.27±0.03 ^a
Total	4.54	4.50	4.27
EAA ³⁾ /NEAA ⁴⁾	0.67	0.67	0.66

¹⁾ Mean ± SD of three replicates.

²⁾ Different letters within a row denote significant differences (P<0.05).

³⁾ Essential amino acids.

⁴⁾ Nonessential amino acids.

Table 5. Major fatty acid composition Mideodeok muscle from Geoje

Fatty acids	Muscle(%) ¹⁾		
	January	March	May
C14:0	4.7±0.1 ^{a2)}	4.5±0.5 ^{ab}	3.7±0.4 ^b
C16:0	10.3±0.1 ^a	11.6±0.9 ^a	11.0±0.3 ^a
C16:1n-7	11.3±0.0 ^c	12.7±0.6 ^b	13.9±0.4 ^a
C18:0	4.0±0.1 ^{ab}	3.8±0.1 ^b	4.1±0.1 ^a
C18:1n-9	7.6±0.1 ^a	5.4±0.2 ^b	5.2±0.3 ^b
C18:1n-7	6.0±0.1 ^a	6.2±0.2 ^a	6.0±0.2 ^b
C20:5n-3	20.0±0.0 ^c	21.3±0.5 ^b	21.6±0.4 ^a
C22:6n-3	17.9±0.8 ^a	16.8±0.2 ^{ab}	16.5±0.5 ^b
Saturates	22.8	24.8	23.4
Monoenes	27.4	26.9	27.1
Polyenes	49.0	47.8	49.3

¹⁾ Results are mean values±SD of three replicates.

²⁾ Different letters within a row denote significant differences ($P<0.05$).

Table 6. Major fatty acid composition of Mideodeok muscle from Tongyeong

Fatty acid	Muscle(%) ¹⁾		
	January	March	May
C14:0	6.6±0.7 ^{a2)}	5.3±0.4 ^b	4.3±0.2 ^b
C16:0	12.2±0.3 ^b	13.2±0.2 ^a	11.4±0.4 ^c
C16:1n-7	7.4±0.1 ^c	10.2±0.0 ^b	10.6±0.2 ^a
C18:0	3.6±0.1 ^b	3.7±0.1 ^b	5.3±0.1 ^a
C18:1n-9	5.9±0.3 ^a	5.7±0.2 ^a	4.2±0.1 ^b
C18:1n-7	7.9±0.2 ^a	6.7±0.1 ^b	6.9±0.4 ^b
C20:5n-3	22.3±0.2 ^a	22.3±0.7 ^a	20.3±0.3 ^b
C22:6n-3	16.5±0.2 ^a	17.2±0.4 ^a	16.9±0.4 ^a
Saturates	25.8	26.0	26.6
Monoenes	23.3	24.8	23.9
Polyenes	51.6	49.2	49.6

¹⁾ Results are mean values±SD of three replicates.

²⁾ Different letters within a row denote significant differences (P<0.05).

Table 7. Major fatty acid composition of Mideodeok tunic from Geoje

Fatty acid	Tunic(%) ¹⁾		
	January	March	May
C14:0	3.6±0.3 ^b	4.9±0.1 ^a	3.0±0.2 ^c
C16:0	12.9±0.3 ^a	12.1±0.1 ^b	11.9±0.4 ^b
C16:1n-7	10.1±0.2 ^b	13.6±0.6 ^a	13.2±0.6 ^a
C18:0	3.9±0.1 ^b	3.9±0.1 ^b	5.2±0.1 ^a
C18:1n-9	3.0±0.2 ^a	2.5±0.0 ^b	2.2±0.0 ^c
C18:1n-7	9.1±0.2 ^a	7.1±0.2 ^b	7.2±0.3 ^b
C20:5n-3	22.2±0.1 ^b	22.6±0.6 ^{ab}	23.2±0.2 ^a
C22:6n-3	15.2±0.8 ^b	17.5±0.5 ^a	15.2±0.7 ^b
Saturates	24.2	24.9	24.2
Monoenes	24.8	24.4	24.8
Polyenes	50.7	50.3	51.0

¹⁾ Results are mean values±SD of three replicates.

²⁾ Different letters within a row denote significant differences (P<0.05).

Table 8. Major fatty acid composition of Mideodeok tunic from Tongyeong

Fatty acid	Tunic(%) ¹⁾		
	January	March	May
C14:0	4.0±0.2 ^a	4.5±0.3 ^a	2.3±0.0 ^b
C16:0	13.4±0.3 ^a	11.6±0.3 ^b	13.6±0.3 ^a
C16:1n-7	6.0±0.2 ^b	10.7±0.5 ^a	8.2±0.3 ^c
C18:0	4.0±0.2 ^{ab}	3.8±0.2 ^b	4.7±0.4 ^a
C18:1n-9	9.5±1.0 ^a	5.4±0.2 ^b	5.3±0.4 ^b
C18:1n-7	2.2±0.2 ^c	6.2±0.2 ^a	5.4±0.1 ^b
C20:5n-3	20.3±0.4 ^b	21.3±0.6 ^{ab}	21.6±0.3 ^a
C22:6n-3	18.0±0.3 ^b	18.8±0.2 ^a	17.1±0.2 ^c
Saturates	25.2	24.5	24.6
Monoenes	19.7	25.6	23.5
Polyenes	54.9	49.4	52.4

¹⁾ Results are mean values±SD of three replicates.

²⁾ Different letters within a row denote significant differences (P<0.05).

무기질 함량의 변화

미더덕은 플랑크톤을 먹이생물로 하기 때문에 바다로부터 각종의 미량 및 다량 무기질을 축적하는 것으로 알려져 있다. 미더덕 육 및 껍질에 함유된 무기질의 계절적 함량변화를 Table 9, 11(거제산) 및 Table 10, 12(통영산)에 각각 나타내었다. 총 무기질 함량은 건물량으로 22.2~27.7%이었고, 무기질 조성을 분석하기 위해 ICP(Inductively coupled plasma emission spectrophotometry)로 각 성분의 함량을 측정된 결과 다량원소인 K, Ca, Mg, Na와 미량원소 및 중금속 성분인 Cr, Mn, Cu, Zn, Pb, Ag 및 As가 검출되었다. 대부분의 원소들은 계절에 따른 변화를 나타내었으며, 1월에 가장 높은 농도를 나타낸 Na의 육 및 껍질 중의 함량은 1,128.7~1,471.1 mg/100 g 범위였다. K 및 Mg의 함량의 변화는 1월에 가장 높았고, 거제산과 통영산 육 및 껍질에서 각각 56.3, 98.3, 77.9 및 110.6 mg/100 g이었으며, Mg의 함량은 각각 68.3, 78.0, 53.4 및 83.3 mg/100 g 이었다. Ca 함량은 각각 129.1, 132.5, 152.8 및 112.5 mg/100 g이었고, 1월보다는 5월에 높은 함량을 나타내었다. 그 외 사람에게는 필수 무기질인 Mn, Fe, Zn의 함량은 각각 0.2~5.2 mg/100 g, 0.5~2.5 mg/100 g, 0.2~3.1 mg/100 g으로 나타났다. Cu는 평균 0.1 mg/100 g으로 매우 낮은 함량을 보였다. 그리고 중금속 이온인 Cr, Pb, Ag 및 As의 함량은 무시할 수 있을 정도로 낮은 값을 보여, 섭취에 따른 문제는 없는 것으로 여겨진다. 따라서, 미더덕은 양질의 무기질을 함유하고 있고 규칙적으로 섭취하면 하루섭취권장량(RDA)을 충족시킬 수 있을 것으로 여겨진다 (FNB, 2004).

요약

미더덕(*Styela clava*) 영양성분의 계절적 변화에 대하여 평가하기 위하여 2005년 1월부터 5월까지 2개월 마다 거제와 통영의 양식장에서 시료를 채취하였다. Glutamic acid, aspartic acid, arginine, leucine 및 lysine 등이 가장 풍부한 아미노산 성분이었다. 비필수 아미노산에 대한 필수 아미노산의 비율은 다른 어류와 비교하여 우수하였고, 미더덕 육 거제산의 값은 0.55~0.61, 통영산은 0.66~0.67의 범위였다. 미더덕 육에 함유된 고도불포화지방산의 함량이 높아 지방산 공급원으로 적절한 것으로 나타났다. 가장 높은 함량을 보인 지방산은 EPA와 DHA로 육 중 20.0~22.3% 및 16.5~17.9%, 껍질 중 20.3~23.2% 및 15.2~18.8%가 각각 함유되어 있었다. 총 무기질 함량은

22.2~27.3%였고, Na, Ca, Mg, K 등이 육과 껍질에 풍부하게 들어있었다.

Table 9. Mineral content of Mideodeok muscle from Geoje

Mineral	Muscle(mg/100 g) ¹⁾		
	January	March	May
Potassium(K)	56.3±5.0 ^{a2)}	43.0±6.7 ^b	39.0±4.5 ^b
Calcium(Ca)	129.1±7.2 ^b	141.6±2.3 ^b	192.3±11.9 ^a
Magnesium(Mg)	68.3±7.0 ^a	44.6±4.2 ^b	42.8±5.6 ^b
Sodium(Na)	1,471.1±21.8 ^a	1,257.9±12.4 ^b	1,286.0±34.3 ^b
Manganese(Mn)	5.2±0.5 ^a	0.9±0.0 ^b	1.0±0.2 ^b
Iron(Fe)	2.5±0.3 ^a	2.5±0.3 ^a	2.3±0.5 ^a
Copper(Cu)	0.2±0.0 ^a	trace	0.1±0.0 ^a
Zinc(Zn)	0.3±0.0 ^a	0.3±0.0 ^a	0.3±0.1 ^a
Chromium(Cr)	trace	0.1±0.0	trace
Lead(Pb)	trace	trace	trace
Silver(Ag)	trace	trace	trace
Arsenic(As)	trace	trace	trace

¹⁾ Results are mean values±SD of three replicates.

²⁾ Different letters within a row denote significant differences (P<0.05).

Table 10. Mineral content of Mideodeok muscle from Tongyeong

Mineral	Muscle(mg/100 g) ¹⁾		
	January	March	May
Potassium(K)	77.9±3.2 ^{a2)}	65.9±3.5 ^b	47.0±3.9 ^c
Calcium(Ca)	152.8±7.3 ^b	162.4±4.4 ^b	193.4±8.1 ^a
Magnesium(Mg)	53.4±3.3 ^a	46.1±2.2 ^{ab}	42.0±4.6 ^b
Sodium(Na)	1,326.9±16.0 ^a	1,286.2±6.3 ^b	1,244.0±19.0 ^c
Manganese(Mn)	1.9±0.0 ^a	0.3±0.0 ^c	0.5±0.1 ^b
Iron(Fe)	1.7±0.2 ^a	0.8±0.0 ^b	0.5±0.0 ^c
Copper(Cu)	0.1±0.0 ^a	0.1±0.0 ^a	0.1±0.0 ^a
Chromium(Cr)	0.1±0.0	trace	trace
Zinc(Zn)	3.1±0.1 ^a	0.4±0.0 ^b	0.2±0.0 ^c
Lead(Pb)	trace	trace	trace
Silver(Ag)	trace	trace	trace
Arsenic(As)	trace	trace	trace

¹⁾ Results are mean values±SD of three replicates.

²⁾ Different letters within a row denote significant differences (P<0.05).

Table 11. Mineral content of Mideodeok tunic from Geoje

Mineral	Tunic(mg/100 g) ¹⁾		
	January	March	May
Potassium(K)	98.3±5.3 ^{a2)}	84.5±5.4 ^b	57.3±4.5 ^c
Calcium(Ca)	132.5±6.0 ^c	168.6±12.1 ^b	273.3±8.3 ^a
Magnesium(Mg)	78.0±6.1 ^a	67.1±4.2 ^a	42.8±2.7 ^b
Sodium(Na)	1,335.1±20.4 ^b	1,391.0±12.4 ^a	1,286.0±9.7 ^c
Manganese(Mn)	0.3±0.0 ^b	0.2±0.0 ^b	1.0±0.2 ^a
Iron(Fe)	0.9±0.1 ^b	0.7±0.2 ^b	2.3±0.4 ^a
Copper(Cu)	0.1±0.0 ^a	trace	0.1±0.0 ^a
Zinc(Zn)	0.4±0.0 ^a	0.2±0.0 ^b	0.3±0.1 ^a
Chromium(Cr)	trace	trace	trace
Lead(Pb)	trace	trace	trace
Silver(Ag)	trace	trace	trace
Arsenic(As)	trace	trace	trace

¹⁾ Results are mean values±SD of three replicates.

²⁾ Different letters within a row denote significant differences (P<0.05).

Table 12. Mineral content of Mideodeok tunic from Tongyeong

Mineral	Tunic(mg/100 g) ¹⁾		
	January	March	May
Potassium(K)	110.6±2.1 ^{a2)}	81.5±3.9 ^b	49.5±4.5 ^c
Calcium(Ca)	112.5±8.4 ^c	192.2±2.3 ^b	211.3±1.6 ^a
Magnesium(Mg)	83.3±5.2 ^a	64.5±4.2 ^b	55.2±5.6 ^b
Sodium(Na)	1,128.7±15.5 ^b	1,161.0±10.4 ^b	1,368.5±22.2 ^a
Manganese(Mn)	0.3±0.0 ^b	trace	1.3±0.2 ^a
Iron(Fe)	1.3±0.3 ^b	1.5±0.2 ^b	2.2±0.0 ^a
Copper(Cu)	trace	trace	trace
Zinc(Zn)	0.5±0.1 ^a	trace	0.3±0.0 ^b
Chromium(Cr)	trace	trace	trace
Lead(Pb)	0.1±0.0 ^a	0.1±0.0 ^a	trace
Silver(Ag)	trace	trace	trace
Arsenic(As)	trace	trace	trace

¹⁾ Results are mean values±SD of three replicates.

²⁾ Different letters within a row denote significant differences (P<0.05).

제 2 절 미더덕 카로테노이드의 항산화활성

서론

해양생물은 천연물질의 보고이며 이차대사물질은 기능적 특징을 나타낸다는 많은 보고가 있다(Faulkner, 1984; Faulkner, 1986). 이차대사물질이 인간의 건강에 중요한 역할을 한다는 것과 함께 영양학적으로도 매우 중요하다는 결과가 알려지게 되었다. 이 같은 이차대사물질의 특징은 항암, 항산화, 혈액응고억제 작용과 같은 생리활성을 나타내는 것이다. 항산화작용의 특징은 세포막과 조직 내에서 자유라디칼 및 이종물질에서 유래한 산화적 손상을 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Burton and Ingold, 1989; Carini et al., 1991).

이차대사물질인 카로테노이드는 여러 종류의 미생류에 주성분으로 존재하는 것으로 알려져 있다. *Halocynthia roretzi*의 껍질에 함유된 주성분으로서는 alloxanthin(31.3%), halocynthiixanthin(15.5%) 등이 있다(Lee et al., 1994). 새로운 카로테노이드 성분인 amarouciaxanthin A 및 B는 *Amaroucium pliciferum*(Matsuno et al., 1985)로부터 분리동정 되었다. Rebachuk 등(1985)은 *Halocynthia aurantium* 껍질에 함유된 주 카로테노이드는 astaxanthin과 diatoxanthin이라고 하였다. 다양한 항산화 작용을 나타내며(Okuzumi et al., 1993; Yan et al., 1999), 최근의 연구에 의하면 카로테노이드가 풍부한 식사를 하면 관상동맥질환, 암 및 시각과 관련된 질환의 위험성을 줄일 수 있다는 연구결과도 발표되었다. 뿐만 아니라 카로테노이드는 일중항산소 소거 및 자유라디칼 억제작용을 나타낸다(Jyonouchi et al., 1995; Krinsky, 1994; Krinsky, 1992; Surai et al., 2003).

해양생물의 생화학적 성분은 계절에 따른 변화가 크고(Ackman, 1995; Gamez-Meza et al., 1999; Orban et al., 2002; Vlieg and Body, 1988), 지정학적 영향도 받는다(Leu et al., 1981; Oehlenschlager, 1991; Constantunides et al., 1995). 계절적 및 지정학적 변화는 수온, 염분농도, 해양환경에 따른 먹이생물의 변화에 큰 영향을 받는다(Socal et al., 2004; Lorenzo et al., 2005; Pederson et al., 2005). 서로 다른 수온과 염분농도에서 양식되는 *Styela plicata*(Lesueur)는 유생단계와 후기자어 발달에 이들 요소가 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다(Qian and Thiyagarajan, 2003). 또한, *Halocynthia aurantium*을 매우 변화가 심한 수온에 노출시켰을 때 생존하는 비율이 매우 낮아졌음을 지적하였고, 이는 높은 수온에 노출되면 면역기작이 효과적으로 작용하지 않기 때문이라 하였다(Sanina and Kostetsky, 2002).

이 연구의 목적은 두 지역에서 양식된 미더덕으로부터 추출한 지용성 물질에 대한

항산화성을 조사하여 식품으로서의 가치를 부여하고자 하는데 있다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 미더덕(*Styela clava*)은 2005년 1월, 3월, 5월 경남 거제시 성포(육; GM, 껍질; GT) 및 통영시 수월리(육; TM, 껍질; TT)에서 채취하여 20 kg으로 소포장한 후 -24℃의 냉동고에 저장하여 두고 각 항목의 분석을 위하여 재료를 흐르는 수돗물에서 해동 후 실험에 사용하였다.

카로테노이드 색소의 추출 및 함량측정

색소 추출은 동결 저장된 미더덕 육과 껍질을 해동시킨 후, 일정량의 시료에 3배량의 acetone을 가하고 하룻밤 실온에 방치한 다음 색소 성분을 추출·여과하였다(Fig. 1). 이 조작을 3회 반복하여 시료로부터 색소를 충분히 용출시켰다. 여과된 acetone추출물을 회전진공증발농축기로 40℃ 이하에서 농축한 후 분액여두로 옮기고, 여기에 ether를 가하여 색소성분을 전용시킨 후, 다시 회전진공증발농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거하여 색소추출물로 하였다. 총 카로테노이드 함량은 460nm에서 UV spectrophotometer(Shimadzu 160A, Kyoto, Japan)로 다음의 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Total carotenoid(mg \%)} = \frac{\text{OD}(\lambda_{\text{max}}) \times \text{Vol} \times 1000}{E_{1\text{cm}}^{1\%}(2400) \times \text{weight sample(g)}}$$

컬럼 크로마토그래피

각각의 카로테노이드 성분을 분취하기 위하여 MgO:Celite 545(1:1, w/w)가 충전된 컬럼과 용매 시스템을 활용 Fig. 2와 방법으로 분리하였다.

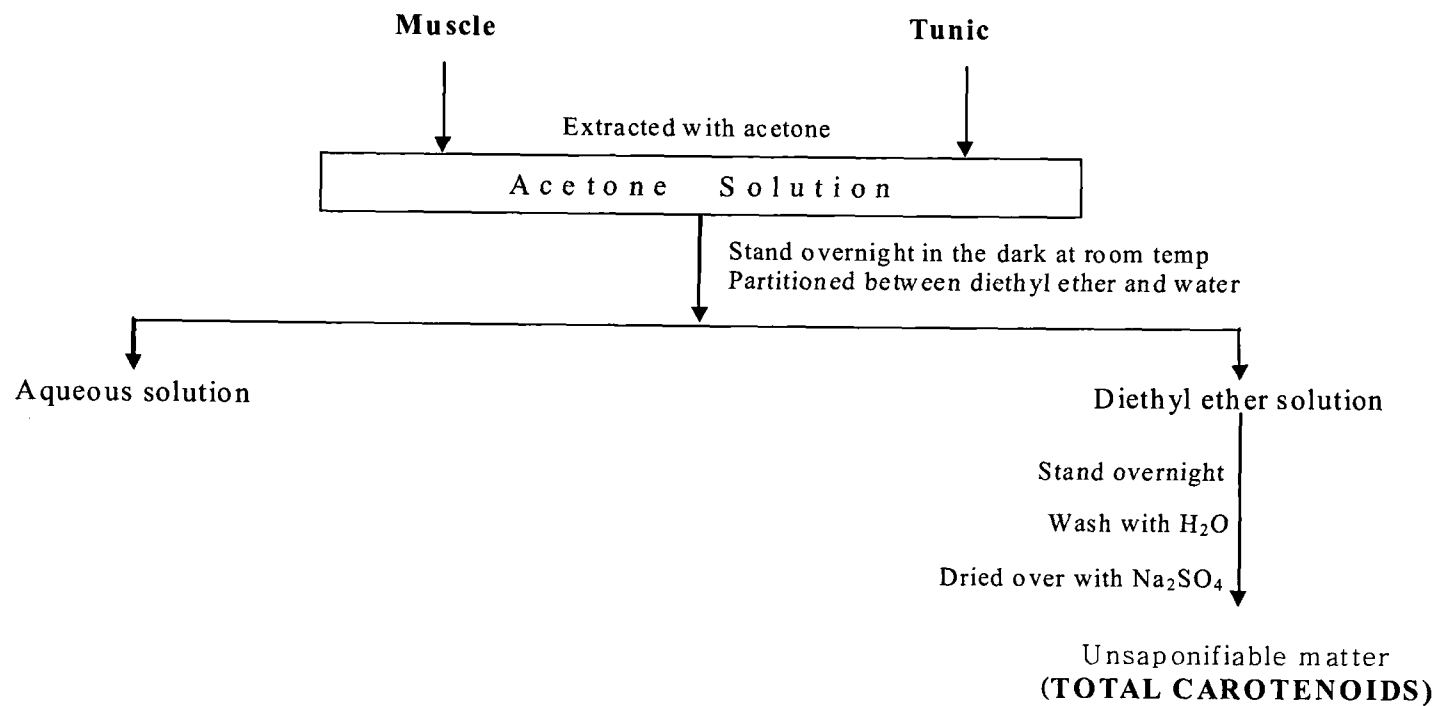


Fig. 1. Extraction method of total carotenoids in the muscle and tunic of *Styela clava*.

박층 크로마토그래피

컬럼 크로마토그래피에서 얻어진 카로테노이드 주성분을 정제하기 위해서 박층 크로마토그래피를 사용하였다. 실리카겔 G 박층 플레이트에 분리된 성분을 점적하고 ethylacetate:dichloromethane(1:4, v/v) 혼합 용액으로 전개시켰다. 분리된 각 획분은 UV 램프 아래서 Rf값을 측정하여 표품과 비교한 다음 각각의 획분을 긁어내어 아세톤으로 용해시킨 다음 다시 50 mL의 diethyl ether에 전용시켰다. 각 획분의 흡수 스펙트럼을 측정하고 McBeth(1972)의 방법에 따라 다음 식에 따라 함량 비를 계산하였다.

$$\text{Percentage} = \frac{100 \times \text{vol. OD } \lambda_{\text{max}}(\text{for each fraction})}{\Sigma[\text{vol. OD } \lambda_{\text{max}}(\text{for all fraction})]}$$

HPLC에 의한 카로테노이드의 분석

각 획분의 특성을 분석하기 위하여 HPLC(Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden)로 성분분석을 실시하였다. 분석에 사용된 시스템은 LKB VWM 2141 펌프로 470 nm에서 UV-visible spectrophotometer로 분석하였다. 사용한 컬럼은 Sumichiral OA-2000(25 cm x 4 mm I.d., 5 μ m, Sumitomo Chemical Service Ltd., Tokyo, Japan)이었고, n-hexane/CH₂Cl₂/EtOH(50:20:0.5, v/v/v) 혼합용매를 0.8 mL/min로 흘려 분리하였다. 분석된 각 성분은 표품 Mass Spectrum으로 비교동정 하였다.

총 페놀 화합물의 측정

총 페놀 화합물의 측정은 Folin-Ciocalteu(Slinkard and Singleton, 1977)법을 변형하여 적용하였다. 즉, 100 μ L의 카로테노이드 추출물(카로테노이드 추출물 0.12%/ethanol, v/v)에 1.4 mL의 탈이온수, 100 μ L의 Folin-Ciocalteu를 섞은 다음, 30 sec 동안 진탕혼합하고, 20% Na₂CO₃ 용액을 첨가 후 30 sec 동안 혼합하고, 20°C에서 2 hr 동안 발색시킨 후 공시험구를 상대로 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표품으로 하여 표준곡선을 작성하고 상대적인 값을 구하였다.

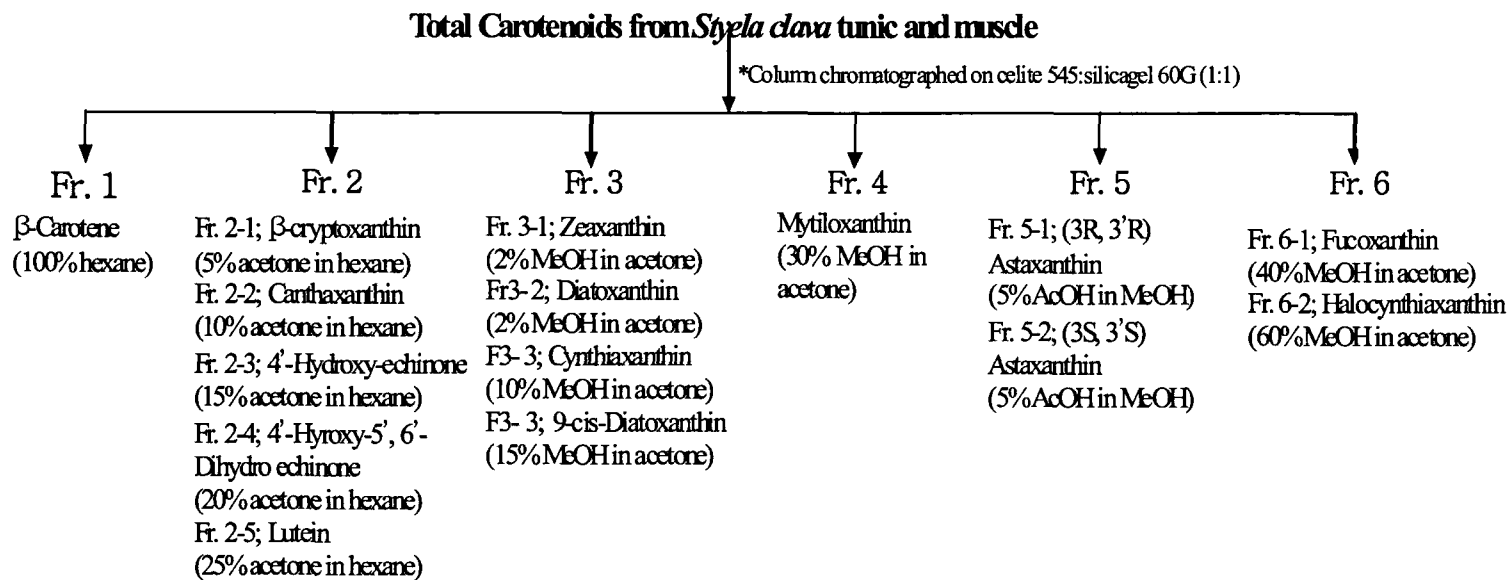


Fig. 2. Schematic diagram of column chromatography of carotenoids for Fr. 1, 2, 3, 4, 5 and 6 separated from the muscle and tunic of *Styela clava* on MgO:celite 545 (1:1, w/w).

Linoleic acid system을 이용한 미더덕 추출물의 항산화 활성 측정

Linoleic acid system을 이용한 미더덕 추출물의 항산화 활성 측정은 Osawa and Namiki 방법(1981)을 변형하여 측정하였다. 시료 액(0.12%/ethanol, w/v) 4 mL, 리놀레인산(2.5%, v/v) 4 mL/ethanol(99.5%), 인산완충액(pH 7.0, 0.05 M) 8 mL, 탈이온수 3.9 mL를 잘 섞은 다음, 마개달린 시료 병에 넣어 40°C 암소에서 incubation 시키면서 thiocyanate 방법으로 측정하였다. Linoleic acid peroxidation의 저해 백분율, 즉 % inhibition of linoleic acid = $100 - (\text{Abs increase of sample} / \text{Abs increase of control} \times 100)$ 을 계산하여 항산화 활성을 나타내었다. 표품으로 butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) 및 α -tocopherol을 사용하여 시료와 같은 조건에서 대조하였고, 비교군에는 시료 액을 첨가하지 않고 반응시켜 반응 후 2일 마다 반응정도를 측정하였다.

Ferric thiocyanate 반응

반응 액 0.1 mL에 75% ethanol 9.7 mL, 30% ammonium thiocyanate 0.1 mL을 첨가하고, 정확하게 3분이 지난다음 FeCl₂(0.02 M, 3.5% HCl) 0.1 mL를 첨가하여 붉은색 반응 생성물에 대하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Thiobarbituric acid 반응

시료 용액 1 mL에 0.75% TBA(Sigma Co.) 용액 2 mL를 첨가한 다음 100°C에서 10분간 끓였다. 방냉 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 상등액은 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 활성은 반응 마지막 날을 기점으로 평가하였다.

DPPH를 이용한 미더덕 추출물의 유리라디칼 소거활성 측정

DPPH를 이용한 유리라디칼 소거활성은 Yamaguchi(1998) 등의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.1 M Tris-HCl(hydroxymethyl aminoethane) 완충액(pH 7.4) 950 μ L에 에탄올(HPLC grade, J.T. Baker Co., USA)에 녹인 0.5 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma Co.) 1 mL(최종농도 250 μ L)를 넣고 30초 동안 vortex mixer로 혼합한 후 30분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 추출물 대신 에탄올 50 μ L를 넣고 측정하였으며, 비교군으로는 에탄올에 녹인 500 ppm의 α -tocopherol(Sigma Co.)과 BHT(Sigma Co.) 50 μ L을 첨가하여 같은 방법으로 분석하였다. 유리라디칼 소거활성은 대조구에 대한 시료구의 흡광도를 백분율로 나타내었다.

Hydroxyl 라디칼 소거능의 측정

미더덕 카로테노이드의 hydroxyl 라디칼 소거능의 측정은 2-deoxyribose oxidation 방법(Chung et al., 1997)을 변형하여 사용하였다. 미더덕 카로테노이드 추출액 (0.12%/ethanol, v/v) 각각 20, 60, 100 및 200 μ L에 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 10 mM Fe⁺²/EDTA 0.2 mL, 10 mM H₂O₂ 0.2 mL 등을 혼합하였다. 최종 농도는 100 mM 인산완충액(pH 7.4)으로 2 mL로 맞추고, 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응 후 28% trichloroacetic acid 1 mL, 1.0% thiobarbituric acid/50 mM NaOH 1 mL를 첨가한 다음 100°C에서 10분간 가열하였다. 가열 후 얼음으로 냉각하고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 두 개의 대조구는 37°C에서 반응시키고(Tc) -4°C에서 4시간 냉각한 후(To) 다음 식에 의하여 계산하였다. 즉, % scavenging activity = $1 - [(sample\ OD - To\ OD) / (Tc\ OD - To\ OD)] \times 100$ 을 계산하여 저해활성으로 나타내었다.

통계분석

모든 자료는 3회 반복 실험하여 mean \pm SD로 나타내었고, JMP Statistical Discovery SoftwareTM version 5(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 Tukey-Kramer HSD test로 통계처리 하였다.

결과 및 고찰

미더덕 육 및 껍질 중의 카로테노이드 함량의 변화

미더덕 육 및 껍질에서 추출한 총 카로테노이드 함량의 계절적 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 거제 및 통영 시료의 카로테노이드 함량은 1월 및 3월보다 5월에 높은 값을 나타내었다. GM, GT, TM 및 TT에 함유된 평균 카로테노이드 함량은 각각 49.1 mg/kg, 51.4 mg/kg, 42.0 mg/kg 및 50.2 mg/kg이었다.

미생류의 카로테노이드 함량에 대한 자료는 매우 적다. Aiello 등(1996)이 베니스의 산호초 *Aplidium nordmani* 및 *Styela partita*의 카로테노이드 함량을 분석한 결과 각각 40.0 mg/100 g, 10.0 mg/100 g이 존재하는 것으로 밝혔다. 이 같은 결과는 본 연구에서 측정한 함량보다 낮은 값을 보여주는 것이다.

미더덕 육 및 껍질에 함유된 카로테노이드의 평균함량은 다른 해양생물과 비교하면 높은 값이다. 예를 들면 새우 *Penaeus indicus*, *Parapenaeopsis stylifera*, *Metapenaeus affinis* 및 *Metapenaeus dobsoni*에 각각 10.0 mg/kg, 10.0 mg/kg, 14.0 mg/kg 및 14.4 mg/kg이 들어 있었고(Gopakumar and Nair, 1975), 야

생새우 *Penaeus semisulcatus* 및 *Metapenaeus monoceros*,에 각각 14.1 mg/kg 및 16.9 mg/kg의 농도로 함유되어 있었으며(Yanar et al., 2004), 해삼 *C. echinata*의 생식선에 20 mg/100 g의 카로테노이드가 들어있는 것을 밝혔다(Matsuno and Tsushima, 1995).

카로테노이드는 항산화 식이성분의 중요한 성분의 하나로 산화적 손상에 대응하는 생리물질이며, 만성질환인 암, 동맥경화 및 시신경의 퇴화 등을 보호하는 성분이기도 하다(Halliwel, 1994). 뿐만 아니라 β -carotene은 비타민 A의 전구체로서 작용하며, 미더덕에는 건강에 필요한 성분인 카로테노이드의 좋은 급원이 될 수 있을 것이다.

카로테노이드 조성의 변화

미더덕 육 및 껍질에 함유된 카로테노이드 조성의 변화를 Table 1~4에 각각 나타내었다. 껍질에 함유된 주성분은 4'-hydroxy echinenone(30.3~53.3%), cynthiaxanthin(12.4~19.8%), canthaxanthin(12.6~19.2%) 및 β -carotene(4.5~9.8%)이었다. 한편 육에 함유된 주성분은 4'-hydroxy echinenone(39.2~48.7%), cynthiaxanthin(7.3~14.6%) 및 halocynthiaxanthin(3.2~10.4%)이었다. 육에 함유된 β -Cryptoxanthin 및 β -carotene은 비슷한 함량이었고, lutein, zeaxanthin, diatoxanthin, 9-cis-diatoxanthin 및 mytiloxanthin의 함량은 소량이었다. 육에 함유된 위의 카로테노이드 들은 껍질에 함유된 양보다 적었다. 4'-Hydroxy echinenone, canthaxanthin, cynthiaxanthin 등은 육에 다량 함유되어 있었고, 껍질에 함유된 성분은 4'-Hydroxyechinenone, cynthiaxanthin, canthaxanthin, halocynthiaxanthin, 4'-hydroxy-5', 6'-dihydroechinenone 등으로 껍질에 함유된 성분이 더 다양한 것으로 나타났다. 4'-Hydroxyechinenone, canthaxanthin 등이 높은 함량을 나타내는 것은 canthaxanthin의 환원적 대사과정을 통하여 합성되기 때문이다(Matsuno et al., 1985). GM과 TM의 시료에서 3성분, GT에서 4성분, TT에서 2성분은 동정하지 못하였으나 높은 함량을 나타내었다.

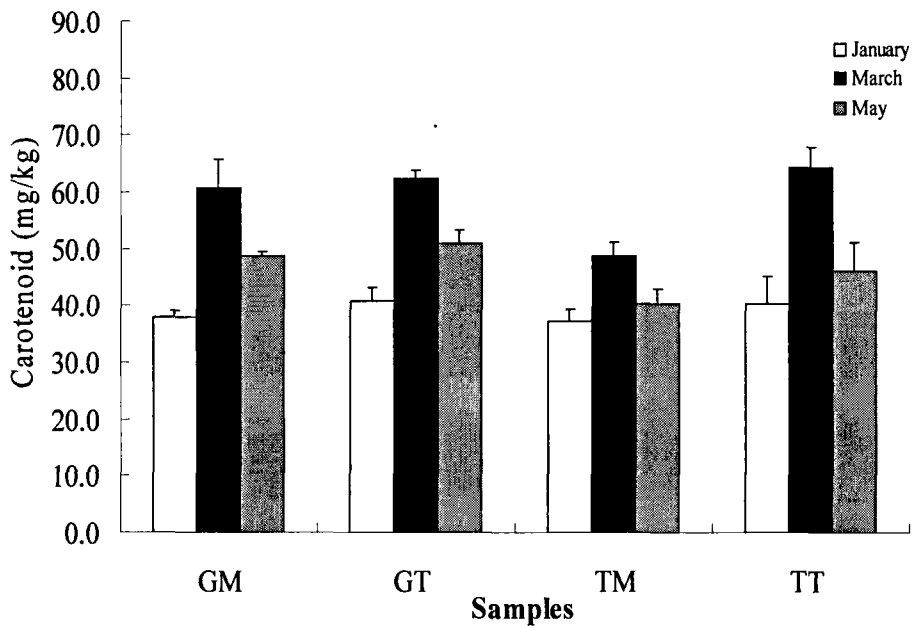


Fig. 3. Total carotenoid contents of Mideodeok muscle and tunic. Data are expressed as mean values \pm SD of three replicates. Column not connected by the same letters are significantly different($P<0.05$).

Table 1. Carotenoids composition of Mideodeok muscle from Geoje

Carotenoids	Composition(%) ¹⁾		
	January	March	May
β -Carotene	9.8±0.1 ^{a2)}	6.9±0.1 ^b	4.5±0.0 ^c
β -Cryptoxanthin	4.3±0.1 ^b	13.3±0.1 ^a	5.4±0.1 ^b
Canthaxanthin	19.1±0.0 ^a	9.8±0.1 ^b	16.2±0.1 ^a
4'-Hydroxy-echinenone	34.4±0.4 ^c	47.2±0.1 ^a	41.1±0.1 ^b
4'-Hydroxy-5'6'-dihydroechinenone	n.d.	n.d.	1.8±0.1
Lutein	n.d.	0.5±0.2	n.d.
Zeaxanthin	0.6±0.0 ^a	0.6±0.2 ^a	n.d.
Diatoxanthin	0.6±0.0	n.d.	n.d.
Cynthiixanthin	18.6±0.1 ^a	12.4±0.0 ^b	16.9±0.1 ^a
9- <i>cis</i> -Diatoxanthin	0.3±0.0	n.d.	n.d.
Mytiloxanthin	2.2±0.1 ^a	0.7±0.1 ^c	1.3±0.1 ^b
(3 <i>S</i> ,3' <i>S</i>)-Astaxanthin	n.d.	0.7±0.1	n.d.
Halocynthiixanthin	n.d.	1.5±0.1 ^b	1.8±0.1 ^a
Unknown 1	3.7±.01 ^b	5.3±0.1 ^a	4.1±0.1 ^b
Unknown 2	3.2±0.1 ^c	5.9±0.1 ^a	4.0±0.1 ^b
Unknown 3	2.5±0.1 ^b	5.0±0.0 ^a	1.4±0.1 ^c

¹⁾ Results are mean values±SD of three replicates.

²⁾ Different letters within a row denote significant differences(P<0.05).

n.d., not detected.

Table 2. Carotenoids composition of Mideodeok muscle from Tongyeong

Carotenoids	Composition(%) ¹⁾		
	January	March	May
β-Carotene	5.7±0.1 ^{a2)}	5.2±0.1 ^b	5.2±0.1 ^b
β-Crypthoxantin	5.7±0.1 ^b	3.8±0.2 ^b	2.5±0.1 ^c
Canthaxanthin	19.2±0.1	12.8±0.1 ^b	13.5±0.2 ^b
4'-Hydroxy-echinenone	43.5±0.0 ^c	53.3±0.1 ^a	30.3±0.0 ^c
4'-Hydroxy-5'6'-dihydroechinenone	n.d.	n.d.	n.d.
Lutein	n.d.	n.d.	n.d.
Zeaxanthin	n.d.	n.d.	0.4±0.0 ^c
Diatoxanthin	0.8±0.0 ^a	n.d.	n.d.
Cynthiaxanthin	16.7±0.1 ^b	13.8±0.1 ^c	19.8±0.1 ^a
9- <i>cis</i> -Diatoxanthin	1.3±0.0 ^a	1.3±0.0 ^a	n.d.
Mytiloxanthin	2.3±0.0 ^c	2.5±0.1 ^b	4.7±0.1 ^a
(3 <i>S</i> ,3' <i>S</i>)-Astaxanthin	n.d.	n.d.	n.d.
Halocynthiaxanthin	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 1	n.d.	n.d.	2.8±0.0 ^b
Unknown 2	n.d.	n.d.	4.5±0.0 ^b
Unknown 3	2.1±0.1 ^a	1.1±0.0 ^c	1.6±0.0 ^b

¹⁾ Results are mean values±SD of three replicates.

²⁾ Different letters within a row denote significant differences($P<0.05$).

n.d., not detected.

Table 3. Carotenoids composition of Mideodeok tunic from Geoje

Carotenoids	Composition(%) ¹⁾		
	January	March	May
β-Carotene	1.7±0.1 ^{a2)}	1.9±0.1 ^a	1.6±0.0 ^a
β-Crypthoxantin	5.6±0.0 ^b	3.5±0.0 ^b	2.6±0.1 ^b
Canthaxanthin	7.3±0.0 ^b	12.4±0.1 ^a	14.6±0.6 ^a
4'-Hydroxy-echinenone	44.1±0.7 ^a	47.2±0.1 ^a	41.1±0.1 ^b
4'-Hydroxy-5'6'-dihydroechinenone	5.9±0.0 ^a	3.9±0.9 ^a	5.8±0.1 ^a
Lutein	1.1±0.0 ^a	4.0±0.5 ^a	n.d.
Zeaxanthin	0.3±0.0 ^a	n.d.	n.d.
Diatoxanthin	0.6±0.0	n.d.	n.d.
Cynthiixanthin	10.5±0.1 ^a	20.6±0.5 ^a	19.7±0.5 ^a
9- <i>cis</i> -Diatoxanthin	0.4±0.0	n.d.	n.d.
Mytiloxanthin	1.4±0.1 ^a	n.d.	n.d.
(3 <i>S</i> ,3' <i>S</i>)-Astaxanthin	n.d.	n.d.	n.d.
Halocynthiixanthin	7.9±0.1 ^b	8.7±0.5 ^b	10.4±0.5 ^a
Unknown 1	4.3±0.01 ^a	0.8±0.1 ^c	1.0±0.1 ^b
Unknown 2	4.3±0.0 ^c	n.d.	n.d.
Unknown 3	2.4±0.0 ^b	4.3±0.6 ^a	3.8±0.0 ^c
Unknown 4	1.3±0.0	n.d.	n.d.

¹⁾ Results are mean values±SD of three replicates.

²⁾ Different letters within a row denote significant differences(P<0.05).

n.d., not detected.

Table 4. Carotenoids composition of Mideodeok tunic from Tongyeong

Carotenoids	Composition(%) ¹⁾		
	January	March	May
β-Carotene	2.3±0.0 ^{c2)}	3.5±0.0 ^b	4.4±0.0 ^b
β-Crypthoxantin	4.7±0.0 ^a	3.6±0.2 ^b	2.4±0.1 ^c
Canthaxanthin	8.5±0.1 ^b	8.9±0.0 ^b	13.5±0.0 ^a
4'-Hydroxy-echinenone	48.7±0.1 ^a	45.1±0.0 ^b	42.4±0.1 ^c
4'-Hydroxy-5'6'-dihydroechinenone	4.6±0.7 ^b	3.4±0.1 ^c	4.9±0.1 ^a
Lutein	1.2±0.0	n.d.	n.d.
Zeaxanthin	0.3±0.0	n.d.	n.d.
Diatoxanthin	n.d.	n.d.	n.d.
Cynthiixanthin	11.4±0.0 ^b	15.6±1.0 ^a	16.2±1.9 ^a
9- <i>cis</i> -Diatoxanthin	n.d.	n.d.	n.d.
Mytiloxanthin	2.8±0.0 ^b	4.5±0.0 ^a	n.d.
(3 <i>S</i> ,3' <i>S</i>)-Astaxanthin	n.d.	n.d.	n.d.
Halocynthiixanthin	6.2±0.2 ^b	5.7±0.1 ^b	3.2±0.1 ^b
Unknown 1	1.3±0.0 ^b	1.7±0.0 ^a	1.1±0.0 ^c
Unknown 3	2.4±0.0 ^c	3.7±0.2 ^a	3.3±0.0 ^b

¹⁾ Results are mean values±SD of three replicates.

²⁾ Different letters within a row denote significant differences($P<0.05$).

n.d., not detected.

총 페놀 화합물의 변화

미더덕 육 및 껍질 카로테노이드 추출물에 함유된 총 페놀 화합물의 함량을 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. 거제 시료의 페놀 화합물 함량이 통영의 것보다 높았고 육에 함유된 페놀 화합물의 함량이 껍질의 함유량보다 낮았다. 그러나 TT 시료를 제외하고는 각 시료간의 변화는 적었다. GM, GT, TM 및 TT 시료의 페놀 함량은 각각 12.6~13.6 µg/g, 11.9~13.0 µg/g, 11.1~13.8 µg/g 및 10.0~13.8 µg/g의 범위를 보였다. 이 결과는 옥수수나 여러 종류의 밀에서 추출한 페놀 화합물의 함량보다는 낮은 값을 보였다(Mitchell et al., 2003).

페놀 화합물은 중요한 항산화물질인 수소공여체에 대하여 효과적인 역할을 한다(Rice-Evans et al., 1995). 병원균이나 환경적 요인의 변화로 발생하는 다양한 형태의 스트레스에 대한 방어요소로서 생리학적으로 활성인 비영양성분의 이형질성분의 이차 대사산물이기도 하다. 식물에서의 페놀 화합물의 생합성은 곤충의 압박, UV에 대한 노출, 미생물의 압박과 관련이 있다(Duval et al., 1999). 해양생물에서의 페놀 화합물의 형성에 관한 자료는 부족하나 겨울철 수온의 감소와 같은 어떤 형태의 환경적 요인 때문에 이 화합물의 형성이 시작된다. 미더덕 시료를 채취하는 시기를 1월, 3월, 5월의 첫째 주로 한 이유도 여기에 있다.

Linoleic acid system을 이용한 미더덕 추출물의 항산화 활성의 변화

카로테노이드의 항산화 활성에 대한 여러 가지 논란이 이루어지고 있다. 카로테노이드 특히 β-carotene의 자유 라디칼반응에 대한 *in vitro* 결과로부터 타당성 있는 자료가 얻어지고 있다. 연쇄반응을 중단시키거나 소거작용을 나타내거나 일중항산소 소광작용 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Krinsky, 1993).

미더덕 육 및 껍질 카로테노이드 추출물에 대한 linoleic acid의 항산화 활성은 *in vitro* 방법으로 분석하였다. 지질산화에 의해 형성되는 초기단계의 과산화물의 생성은 ferric thiocyanate 방법에 의하여 정량되었고, 과산화물이 분해되어 생성되는 저분자의 2차 생성물은 thiobarbituric acid에 결합시켜 측정하였다.

Fig. 5에 나타낸 바와 같이 모든 시료에서 항산화 활성을 보였다. 두 지역의 껍질 시료 추출물이 육 시료보다 높은 항산화 활성을 보였고, 특히 3월 및 5월 시료는 linoleic acid에 대하여 α-tocopherol보다 높은 항산화 활성을 나타내었다. TBA 방법에 의한 추출물의 항산화 활성 값의 변화를 Fig. 6에 나타내었다. 3월의 GT 및 TT 시료와 5월의 TT 시료는 가장 강력한 항산화 활성을 보였으며, BHT 및 BHA와 비슷한 경향을 나타내었다($P < 0.05$). 따라서 미더덕 껍질에 함유된 카로테노이드 추출물은 항

산화물질로 활용이 가능한 것으로 평가되어 진다.

DPPH를 이용한 미더덕 추출물의 유리라디칼 소거활성의 변화

DPPH는 유리라디칼 화합물이고 유리라디칼 소거능의 측정을 위해 널리 활용되는 방법의 하나이다(Naik et al., 2003). 항산화물질과 DPPH와의 상호반응으로 전자나 수소가 DPPH로 이동함으로써 유리라디칼이 중화되는 기작이다. 미더덕 추출물의 DPPH는 유리라디칼 소거능의 결과를 Fig. 7에 나타내었다. BHA, BHT 및 α -tocopherol의 최종농도는 0.1 mg/mL로 미더덕 카로테노이드 추출물의 농도는 1 mg/mL로 하여 측정된 결과 표품에 비하여 매우 낮은 값을 보였다. 3월 GT 시료가 가장 높은 값을 보였지만, 5 mM DPPH에 대한 유리라디칼 소거능이 29.85% 밖에 되지 않았다. DPPH와 관련하여 가장 활성이 높은 화합물은 페놀화합물이며 특히, phenolic hydroxyl 원자단을 함유하는 물질의 경우 가장 높은 활성을 보이는 것으로 알려져 있다. 이는 페놀화합물의 항산화활성은 그들이 분자구조에 의한다고 추정되어 진다. 전자주계의 작용을 하여 phenoxyl radical이 형성되면 지질계는 안정화 되는 것으로 여겨진다(Aruoma, 1998).

Hydroxyl 라디칼 소거능의 변화

미더덕 육 및 껍질로부터 추출한 카로테노이드 성분에 대한 hydroxyl 라디칼 소거능을 측정하여 Fig. 8에 나타내었다. Fenton 반응에 의하여 생성되는 hydroxyl 라디칼이 미더덕 카로테노이드 성분에 의하여 소거되는 것으로 나타났다. 3월 GT 및 TT 시료의 라디칼 소거능이 가장 강력하였고, IC50 값은 각각 0.46 및 0.45 mg/mL로 나타났다. 이것은 BHA의 IC50 값인 0.45 mg/mL와 비슷한 활성을 보여주는 것이다. 또한, 3월의 GM 및 TM과 5월의 GT 카로테노이드 추출물은 BHA와 비슷한 강력한 hydroxyl 라디칼 소거능을 나타내었다. 이 결과로 미루어 볼 때 미더덕 껍질의 카로테노이드 추출물은 항산화제로서의 가치가 인정되며, 식품이나 의약품의 원료로서도 사용이 가능할 것으로 여겨진다.

활성산소 물질 중에서 hydroxyl 라디칼은 가장 활성이 강하고 단백질, DNA, PUFA, 핵산을 비롯한 생물소재에 심각한 산화에 의한 손상을 가져와 노화나 암과 같은 심각한 질병의 원인이 되기도 한다(Aruoma, 1998). 따라서 미더덕의 주기적인 섭취는 이와 같은 질환의 예방을 위해서도 바람직한 식품이 될 수 있다.

요약

거제와 통영으로부터 채집한 미더덕 육 및 껍질의 카로테노이드 함량은 높은 값을 보였고, 3월의 시료가 가장 높았으며, 1월 시료가 가장 낮았다. GM, GT, TM 및 TT 시료의 평균 카로테노이드 함량은 각각 49.1 mg/100 g, 56.7 mg/ 100 g, 42.0 mg/100 g 및 50.2 mg/100 g으로 조사되었다. 육에 함유된 주성분은 4'-hydroxyechinenone, canthaxanthin, cynthiaxanthin 및 β -carotene 이었고, 껍질에 함유된 성분은 4'-hydroxyechinenone, canthaxanthin, cynthiaxanthin 및 halocynthiaxanthin 등 이었다.

미더덕 카로테노이드 화합물의 기능성을 파악하기 위하여 페놀 함량 및 항산화활성을 조사하였다. 모든 시료에서 낮은 함량의 페놀 값을 보였으며, DPPH 라디칼 저해활성도 낮았다. 그러나 모든 시료에서 리놀레인산에 대한 과산화 억제작용은 효과적이었고 껍질 추출물이 더 효과적이었다. 뿐만 아니라 hydroxyl 라디칼 저해활성에 대해서도 강한효과를 나타내었으며, 합성항산화제인 BHA의 IC50 값도 비슷하였다. 따라서 미더덕은 영양성분이 풍부하고 천연 항산화제로서의 가치가 있는 것으로 평가되었다.

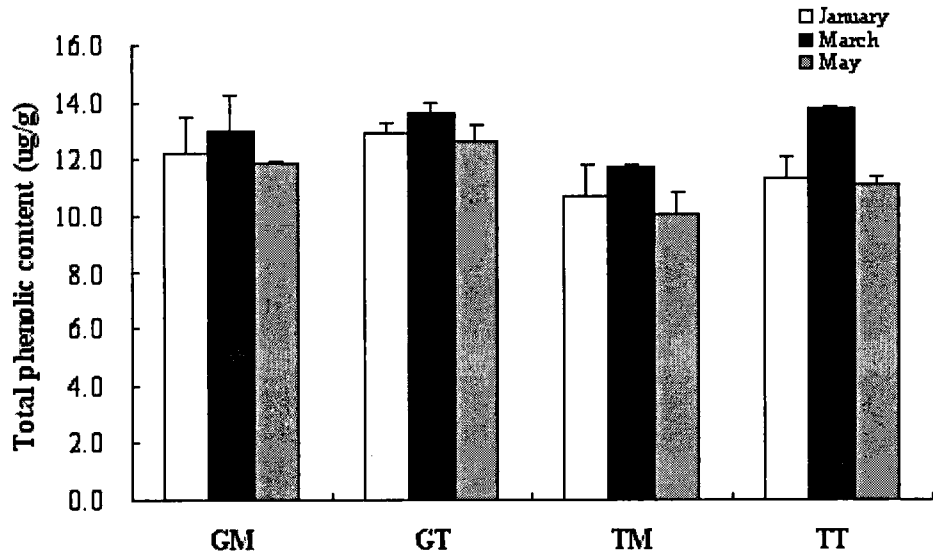


Fig. 4. Total phenolic content of Mideodeok tunic and muscle carotenoids. GM, Geoje muscle; GT, Geoje tunic; TM, Tongyeong muscle; TT, Tongyeong tunic.

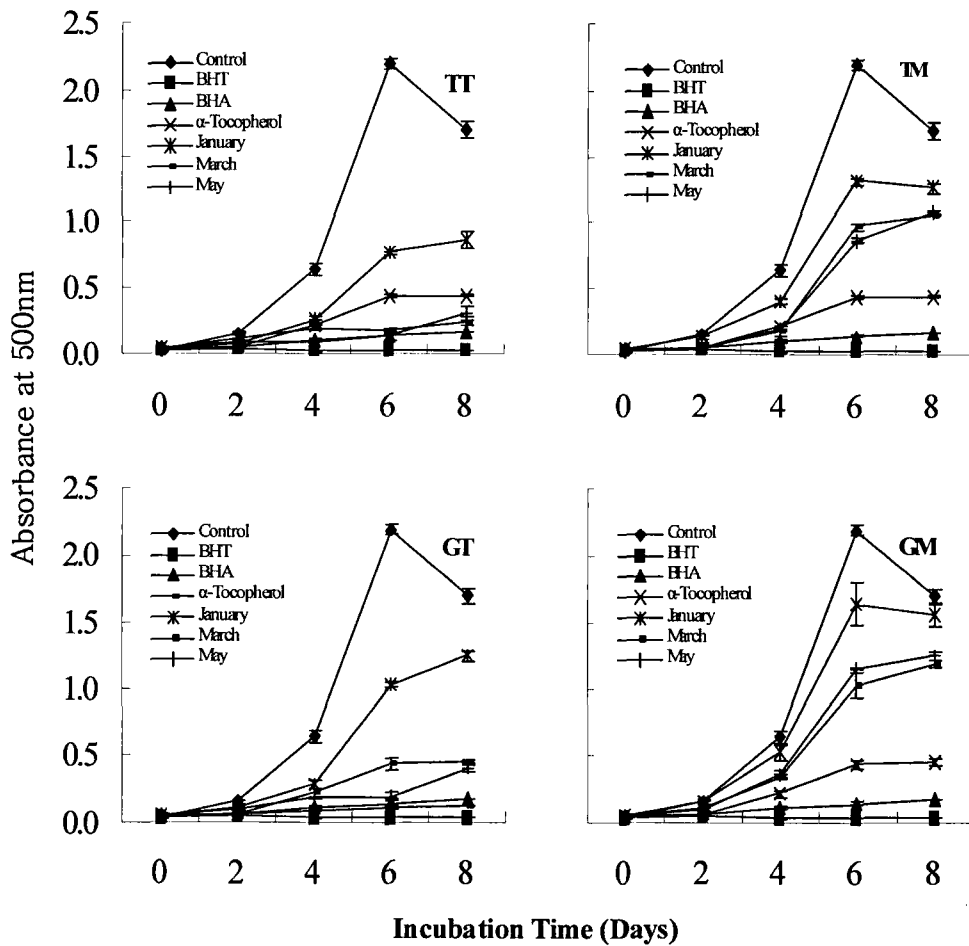


Fig. 5. Antioxidative activities of carotenoid extracts obtained from Mideodeok muscle and tunic as measured by ferric thiocyanate method. GM, Geoje muscle; GT, Geoje tunic; TM, Tongyeong muscle; TT, Tongyeong tunic.

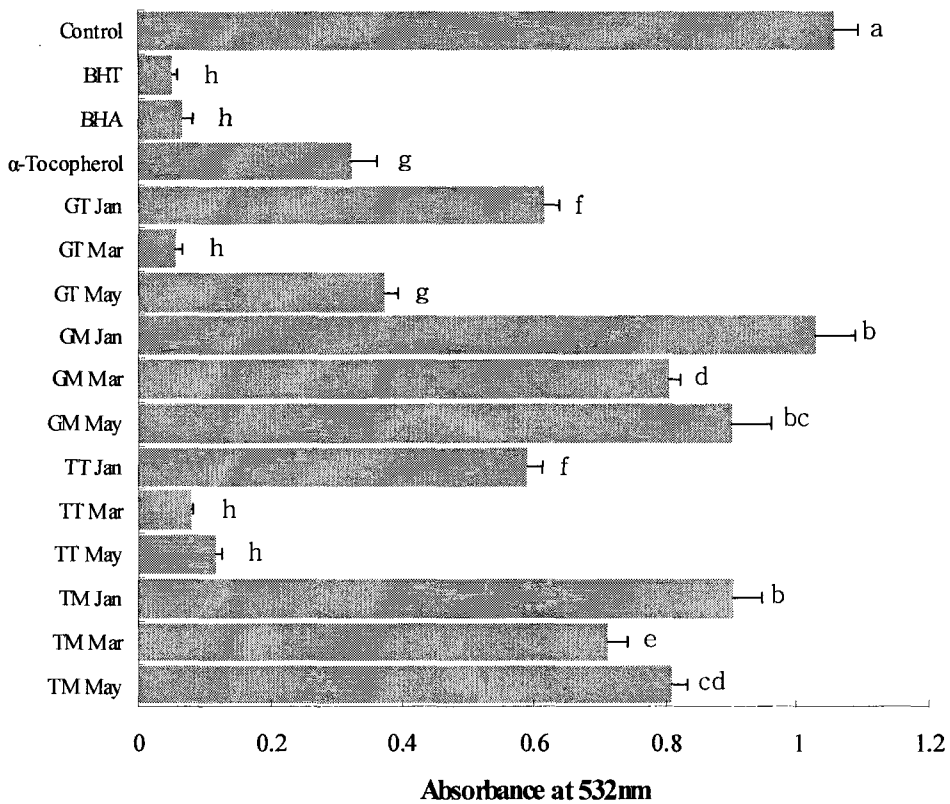


Fig. 5. Antioxidative activities of carotenoid extracts obtained from Mideodeok muscle and tunic as measured by thiobarbituric acid method. GM, Geoje muscle; GT, Geoje tunic; TM, Tongyeong muscle; TT, Tongyeong tunic.

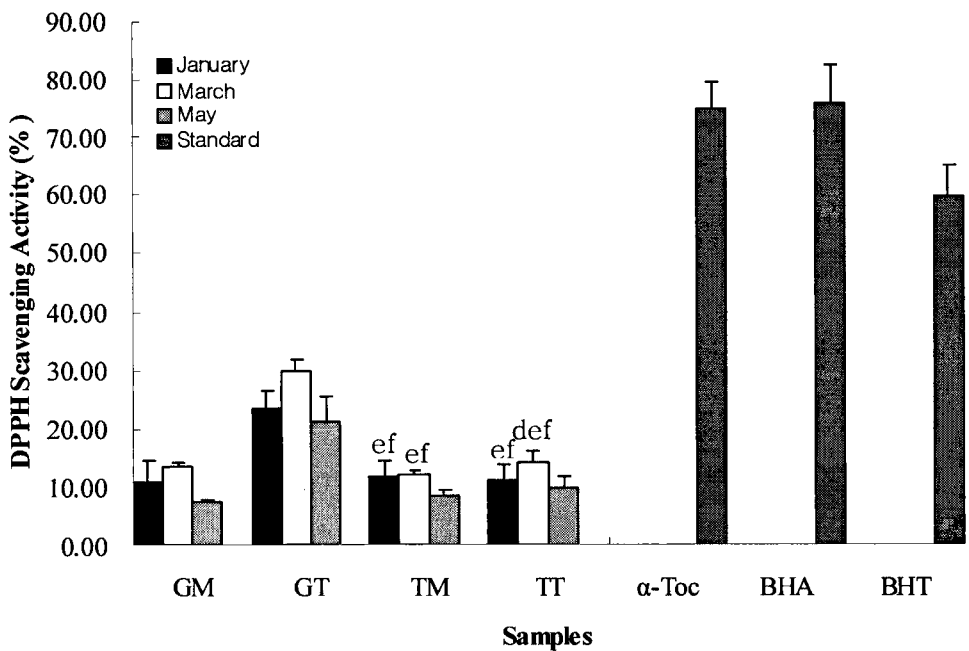


Fig. 7. Comparison of DPPH radical scavenging activity of Mideodeok carotenoid extracts. Final concentration of DPPH radical was 5 mM, while the concentration of α -tocopherol, BHA and BHT are 0.1 mg/mL. Mideodeok carotenoid concentration is 1 mg/mL; GM, Geoje muscle; GT, Geoje tunic; TM, Tongyeong muscle; TT, Tongyeong tunic.

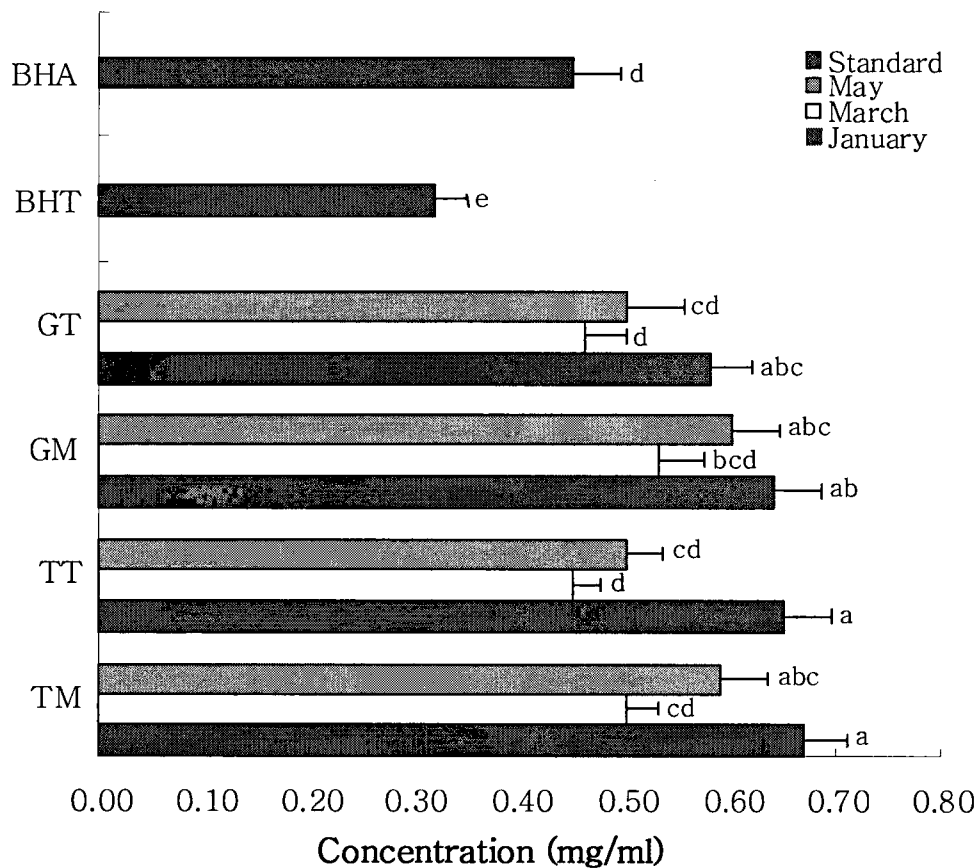


Fig. 8. Hydroxyl radical scavenging activity (IC 50) of Mideodeok carotenoid extract. GM, Geoje muscle; GT, Geoje tunic; TM, Tongyeong muscle; TT, Tongyeong tunic. BHT, butylated hydroxytoluene; BHA, butylated hydroxyanisole.

제 3 절 미더덕의 휘발성 향기성분

서론

미더덕(*Styela clava*)은 척삭동물문 미색동물아문에 속하는 해양생물로 세계에는 약 2,000여종이 자생하고 있는 것으로 알려져 있으며 독특한 향과 맛으로 인하여 우리나라에서만 식품소재로 이용되고 있다(中内, 1986). 1995년부터 2년간 수행된 미더덕 양식에 관한 농수산특정연구과제의 하나로 시작되어 1998년부터 굴과 진주 담치 등의 양식대체 종으로 허가받기에 이르렀다.

최근 건강식품의 선호현상 때문에 미더덕의 소비가 증가하고 있으며 생산량도 매년 증가하면서 어민의 소득증대에 기여하고 있다. 통영을 비롯한 거제, 고성, 마산 등 남해안에서 주로 생산되고 있으며, 3월부터 7월 사이가 생산량이 가장 많은 시기이다. 미더덕의 소비 형태는 주로 찜이나 된장찌개 등의 재료로 이용되며, 그 밖에 횡감용으로 4~5월경에 채취된 것이 이용되고 있다.

최근 미더덕에 대한 관심이 높아지면서 계절에 따른 영양성분의 비교(Loda et al., 2006), 미더덕 함유 어묵의 품질특성(Park et al., 2006), 암세포주에 대한 미더덕 추출물의 세포독성 효과(Jung et al., 2006), 아세톤 추출물이 산화적 DNA 손상억제 영향(Seo et al., 2006), 미더덕 추출물의 항산화 및 항암효과(Kim et al., 2006), 주름 미더덕 추출물의 항산화력(Kim et al., 2005), 미더덕 껍질로부터 glycosaminoglycans의 추출(Ahn et al., 2003) 등 많은 연구가 이루어지고 있다.

특히 미더덕이 갖고 있는 기능성 성분에 대한 관심이 높아지면서 기능성 식품소재로서의 가치가 높아지고 있다. 따라서 본 연구에서는 식품소재로 이용되는 경우 향의 주성분이 되는 향기성분에 대한 연구가 없어 이에 대한 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 미더덕(*Styela clava*)은 2005년 1월, 3월, 5월 경남 거제시 성포 및 통영시 수월리에서 채취하여 20 kg으로 소포장한 후 -24℃의 냉동고에 저장하여 두고 각 항목의 분석을 위하여 재료를 흐르는 수돗물에서 해동 후 실험에 사용하였다.

Simultaneous Steam Distillation and Extraction(SDE)에 의한 향기성분의 추출

초퍼(copper)로서 마쇄한 신선한 미더덕 육 및 체액 100 g에 탈이온수 900 mL와 내부표준물질(cyclohexanol, 0.1 ppm)을 첨가한 다음 SDE 장치에서 ether를 추출용매로 2 hr 추출 농축하였다(Nikerson and Likens, 1996). 추출된 향기성분은 KD(Kuderna-Danish Sample Concentrators) 농축기로 서서히 용매를 제거하여 약 1 mL가 되도록 하여 GC 및 GC-MS로 동정하였다.

Solid Phase Microextraction(SPME)에 의한 향기성분의 추출

SPME 장치(Manual type, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA)에, 흡착용 fiber는 polydimethylsiloxane/divinylbenzene(PDMS/DVB, 65 μm coating thickness)를 사용하였다. 시료 일정량을 취하여 20 mL의 headspace glass vial(Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA)에 넣고 aluminum crimp seal(20 mm, open center)과 polytetrafluoroethylene(PTEE)/silicone septum(60 mils)으로 밀봉한 후 40°C에서 30분간 fiber를 vial 내에서 노출시켜 휘발성 화합물을 흡착시켰다.

향기성분의 분석

미더덕 육 및 체액으로부터 채취한 향기물질의 조성은 capillary column (Omegawax-320, 30 m \times 0.32 mm i.d., 0.25 μm thickness, Supelco, St. Louis, MO, USA)과 FID를 장착한 GC(Shimadzu 17A, Kyoto, Japan)로 분석하였다. SPME법에 의해 추출된 시료 성분은 직접 GC에 fiber를 탈착시켜 주입하였다. 분석조건은 column 온도를 최초 5분간은 40°C로 유지하다가 분당 3°C씩 상승시켜 240°C에 도달한 다음 40분간 유지시켰다. Injector 250°C, detector 260°C, carrier gas(He)는 1 mL/min로 유지하였고, split ratio는 50:1로 하였다.

향기성분의 동정 및 정량

GC profile에 나타난 각 향기성분의 peak에 해당하는 휘발성화합물의 linear retention indices를 결정하기 위하여 탄화수소(*n*-paraffins, C₅-C₂₅, Alltech Associates, USA)를 표준물질로 사용하였고, 시료의 향기성분을 분석할 때와 동일한 조건으로 GC에 주입하여 C₅-C₂₅의 표준 머무름 시간을 구

하였다. 시료의 GC profile상에 나타난 각 향기성분의 머무름 시간과 표준 탄화수소와의 머무름 시간을 비교하여 향기성분의 retention index(RI)를 구하였다(Cadwallader et al., 1994). 각 휘발성 화합물에 대한 잠정적인 동정은 retention index 및 standard MS library data(Wiely 275K, Hewlett-Packard Co., USA)에 의하였으며, 휘발성 화합물의 함량은 내부표준물질을 이용하여 상대적 함량으로 환산하였다(factor=1, µg/g).

결과 및 고찰

향기성분의 분리 및 동정

미더덕 육 및 채액에 함유된 성분 중 가열에 의해 생성되는 향기성분을 분석하기 위하여 100℃에서 일정시간 추출·농축하는 simultaneous distillation and extraction(SDE)를 이용하여 육으로부터 34 및 16성분을 동정하여 Fig. 1, 2 및 Table 1, 2에 나타내었고, 미더덕 육 및 채액이 갖는 headspace를 얻기 위하여 solid-phase microextraction(SPME)를 이용하여 육으로부터 37 및 20성분을 동정하여 Fig. 3, 4 및 Table 3, 4에 각각 나타내었다. 총함량은 cyclohexanol을 기준으로 SDE에 의해 육 및 채액으로부터 797.8 및 859.3 µg/100 g이었고, SPME에 의해 육 및 채액으로부터 126.5 및 115.7 µg/100 g 이었다. 이들 화합물을 group별로 분류하면 SDE 추출 육의 경우 alcohol류 17종, acid류 6종, aldehyde류 5종, hydrocarbon류 6종으로 구성되었으며, aldehyde류가 가장 높은 함량이었고, alcohol류가 그 다음이었다. SDE 추출 채액의 경우 alcohol류 20종, acid류 4종, aldehyde류 6종, hydrocarbon류 7종으로 구성되었으며, aldehyde류가 가장 높은 함량이었고, alcohol류가 그 다음으로 육과 매우 유사하였다. SPME 추출 육의 경우 alcohol류 9종, acid류 1종, aldehyde류 1종, hydrocarbon류 1종, ester 1종, amine 1종, ketone 2종으로 구성되었으며, alcohol류가 가장 높은 함량이었고, acid 및 ester류가 그 다음이었다. SPME 추출 채액의 경우 alcohol류 9종, acid류 2종, aldehyde류 3종, hydrocarbon류 2종, ester 1종, amine 1종, ketone 2종으로 구성되었으며, aldehyde류가 가장 높은 함량이었고, alcohol류가 그 다음이었다.

SDE 추출 육의 향기성분(Fig. 1 및 Table 1)에서는 alcohol 화합물 중에서는 (Z)-4,5-dimethylhex-2-en-4-ol의 함량이 가장 높았고, 1-octanol, 1-nonanol,

1-tridecanol, 9,12,15-octadecatrien-1-ol 등이 동정되었으나, 이들 alcohol류는 역치가 높아 시료향의 발현에 영향을 미치지 못하나 미더덕 육의 경우 그 함량이 다른 화합물보다 높아 미더덕 향의 형성에 크게 기여한 것으로 여겨진다. Kusaka 등(1983)은 멧개 향기성분을 분석한 결과 멧개 특유의 향기성분으로서 n-octanol, n-decanol, n-decadienol 등의 포화 및 불포화 alcohol이 주 성분이라고 하였고, Fujimoto 등(1982)은 멧개의 독특한 향기성분들은 t-2, c-7-decadien-1-ol 및 이들의 이성체 등을 포함하는 불포화 1급 alcohol이 주 성분으로 근육 및 내장에 존재하는 무취의 alkyl sulfate가 내장 중의 alkylsulfohydrolase에 의해 분해되어 생성된다고 하였다.

SDE 추출 체액의 향기성분(Fig. 2 및 Table 2)에서도 1-octanol(43.2 μ g/100 g)을 비롯한 1-nonanol(40.3 μ g/100 g) 등 육과 매우 비슷한 구성을 나타내었고, Choi and Ho(1995) 등에 의하면 멧개 향기성분의 증성 획분에서 동정된 alcohol은 전체 향기성분의 약 38% 이상을 차지하여 이들이 멧개 향의 주성분인 것으로 보고하였다. 특히 육 추출물에서는 동정되지 않았던 2-furanmethanol이 검출되었다. 2-Furanmethanol은 타는 냄새와 쓴맛을 내며, 당을 가공하는 중에 생성되는 물질이다(Reineccius, 2006a). 육에서의 방향족 화합물인 phenol의 함량은 20.6 μ g/100 g이었으나, 체액으로부터는 9.8 μ g/100 g으로 낮은 함량으로 존재하는 것으로 나타났으며, 바람직하지 못한 향의 성분으로 알려져 있다(Cha et al., 1993).

Aldehyde 화합물 중에서는 hexanal이 365.4 μ g/100 g으로 가장 높았으며, 이외에 주요 aldehyde류로서는 2,4-decadienal, tridecanal, tetradecanal, 1,13-tetradecadienal, hexadecanal 등이 동정되었는데, 이들은 주로 고도불포화지방산의 산화분해에 의해 생성된 것으로 보이며(Karahadian and Lindsay, 1989), ketone류와 더불어 감미 있는 달콤한 향기발현에 기여한다는 보고도 있다(Cha et al., 1992). Acid류는 4종 동정되었으며 특히 유리지방산은 트리글리세라이드의 일부가 장기간 저장되거나 가열 살균되거나 여러 공정을 거치는 동안 가수분해되어 형성되는 물질로서 구린내로 느껴지기도 한다(Reineccius, 2006b). Hydrocarbon류는 7종이 동정되었고, 함질소 화합물 등은 동정되지 않았다.

가열 향과는 달리 SPME 방법으로 추출 동정된 화합물은 미더덕 육 및 체액의 향을 그대로 반영한다고 할 수 있다. 육으로부터 동정된 화합물을 Fig. 3 및 Table 3에 각각 나타내었다. 총 16종으로 alcohol 9종, aldehyde 1

중, acid 1종, hydrocarbon 1종, ester 1종, amine 1종, ketone 2종으로 다양한 형태를 함유하고 있었다. Alcohol 중에서는 1-nonanol이 31.6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, ester 중에서는 (E)-2-butenedioic acid dibutyl ester가 20.3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, acid 중에서는 heptadecanoic acid가 26.7 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 으로 전체 함량의 62.1%를 차지하였다.

체액으로부터는 20종으로 alcohol 9종, aldehyde 3종, acid 2종, hydrocarbon 2종, ester 1종, amine 1종, ketone 2종으로 육 추출액과 비슷한 구성을 보여주고 있었다. 1-Nonanol이 19.8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 1-undecanol은 16.4 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 으로 alcohol의 대부분을 차지하였고, aldehyde류에서는 2,4-decadienal이 18.6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, tridecanal이 31.2 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 으로 4종 화합물이 전체 함량의 74.3%를 차지하여 이들이 미더덕 체액의 향을 나타내는 것으로 여겨진다. 육과는 달리 체액에서의 acid 함량은 적은 것으로 나타났다.

요약

미더덕 육 및 체액에 함유된 성분 중 가열에 의해 생성되는 향기성분을 분석하기 위하여 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 일정시간 추출·농축하는 simultaneous distillation and extraction(SDE)와 육 및 체액이 갖는 headspace를 얻기 위하여 solid-phase microextraction(SPME)를 이용하여 향기성분을 분리동정하였다. 총함량은 cyclohexanol을 기준으로 SDE에 의해 육 및 체액으로부터 797.8 및 859.3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 이었고, SPME에 의해 육 및 체액으로부터 126.5 및 115.7 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 이었다. 이들 화합물을 분류하면 SDE 추출 육의 경우 alcohol류 17종, acid류 6종, aldehyde류 5종, hydrocarbon류 6종으로 구성되었으며, aldehyde류가 가장 높은 함량이었고, alcohol류가 그 다음이었다. SDE 추출 체액의 경우 alcohol류 20종, acid류 4종, aldehyde류 6종, hydrocarbon류 7종으로 구성되었으며, aldehyde류가 가장 높은 함량이었고, alcohol류가 그 다음이었다. SPME 추출 육의 경우 alcohol류 9종, acid류 1종, aldehyde류 1종, hydrocarbon류 1종, ester 1종, amine 1종, ketone 2종으로 구성되었으며, alcohol류가 가장 높은 함량이었고, acid 및 ester류가 그 다음이었다. SPME 추출 체액의 경우 alcohol류 9종, acid류 2종, aldehyde류 3종, hydrocarbon류 2종, ester 1종, amine 1종, ketone 2종으로 구성되었으며, aldehyde류가 가장 높은 함량이었고, alcohol류가 그 다음이었다.

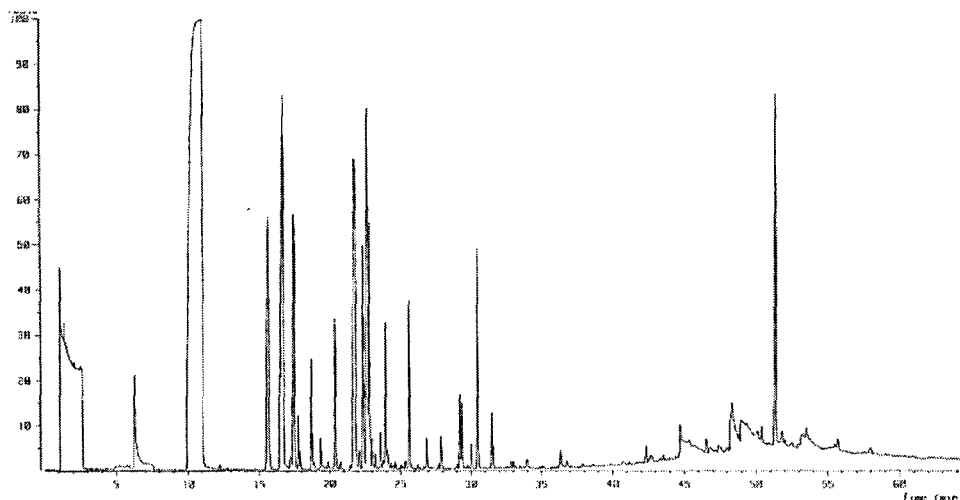


Fig. 1. Total ion chromatogram of whole volatile components of Mideodeok muscle by steam distillation and extraction(SDE).

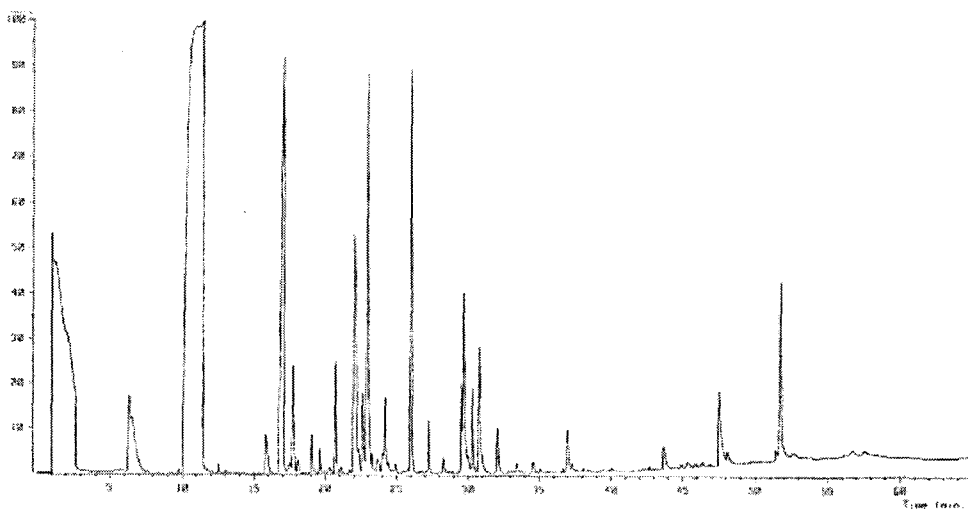


Fig. 2. Total ion chromatogram of whole volatile components of Mideodeok extract by steam distillation and extraction(SDE).

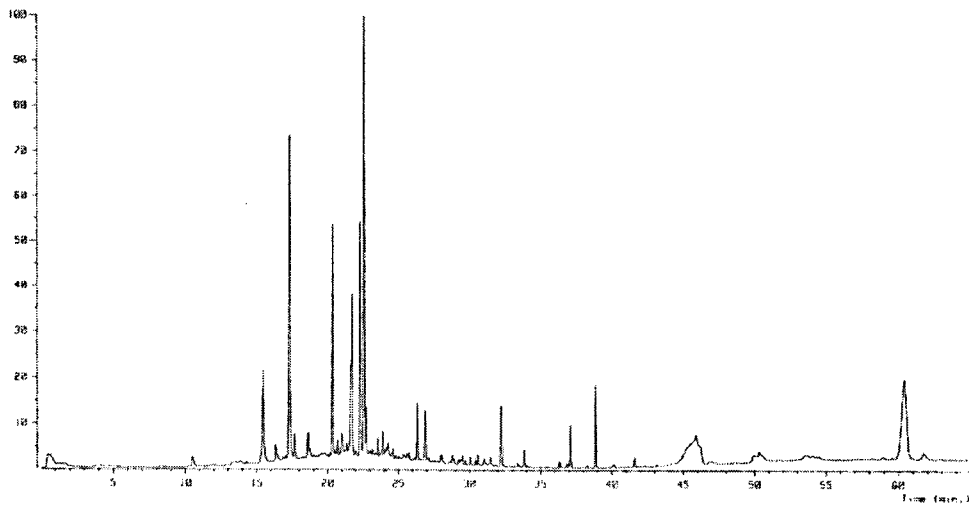


Fig. 3. Total ion chromatogram of headspace volatile components of Mideodeok muscle by solid-phase microextraction(SPME).

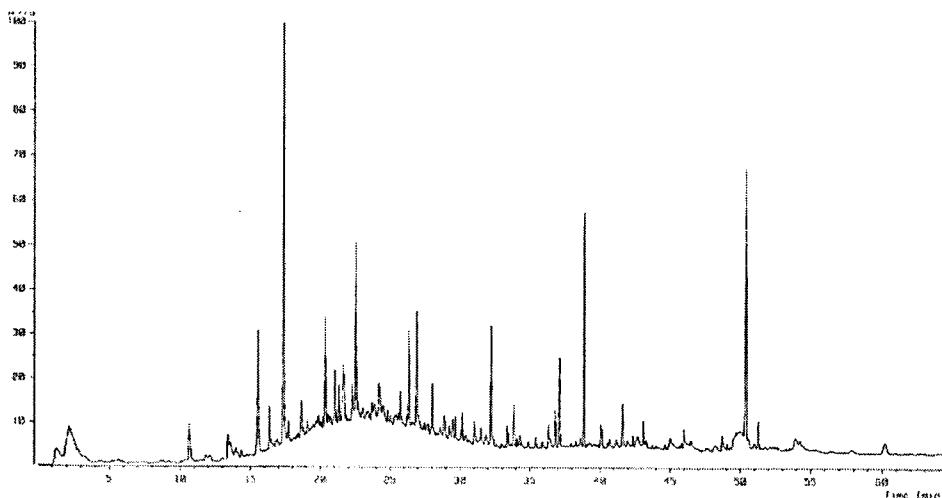


Fig. 4. Total ion chromatogram of headspace volatile components of Mideodeok extract by solid-phase microextraction(SPME).

Table 1. Whole volatile compounds of Mideodeok muscle by steam distillation and extraction(SDE)

Peak No.	R.I. ¹⁾	Conc. ²⁾	Compounds name ³⁾
2	<800	26.1	3-Ethyl-2-pentene
3	869	371.3	Hexanal
5	1198	11.5	1-Octanol
6	1230	72.1	(Z)-4,5-Dimethylhex-2-en-4-ol
7	1260	23.6	1-Nonanol
9	1270	2.1	1-Decanol
10	1300	3.8	1-Undecanol
13	1353	8.5	5-Decen-2-ol
14	1393	39.8	1-Dodecene
15	1394	0.8	1-Dodecanol
16	1405	16.2	2,4-Decadienal
17	1416	29.4	Tridecanal
18	1421	80.1	1-Tridecanol
20	1434	0.7	Tetradecanal
21	1450	2.5	1-Tetradecanol
22	1460	0.6	1,13-Tetradecanol
23	1464	1.5	2-Pentadecen-4-yne
25	1517	20.6	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol
28	1561	4.8	Tetradeca-4,9-dien-1-ol
30	1593	1.0	4-Hexadecen-6-yne
31	1634	1.8	5-Octadecyne
32	1939	18.6	9,12-Octadecadien-1-ol
33	1649	3.5	(Z)-3-Heptadecen-5-yne
34	1660	4.2	9,12,15-Octadecatrien-1-ol
35	1674	10.6	17-Octadecen-14-yn-1-ol
36	1714	3.0	Hexadecanal
39	1757	0.7	Cycloheptadecanol
40	1795	0.6	Dodecanoic acid
41	1867	0.2	(Z)-9-Octadecen-1-ol
44	2081	0.1	Tetradecanoic acid
46	2204	3.2	Hexadecanoic acid
47	2222	10.3	Heptadecanoic acid
48	2326	0.2	(Z)-9-Octadecenoic acid
49	2337	23.8	Octadecanoic acid

¹⁾Retention index on Supelcowax 320TM (30 m length x 0.25 mm I.d x 0.25 μ m thickness. Supelco Co., USA) column.

²⁾Concentration (μ g/g) of each compound was calculated as a relative content to cyclohexanol put in sample by extraction method (140.5 μ g)(factor=1.0).

³⁾These compounds were tentatively identified by MS Library data (Wiley 275 K. Hewlett-Packard Co., USA).

Table 2. Whole volatile compounds of Mideodeok fluid by steam distillation and extraction(SDE)

Peak No.	R.I. ¹⁾	Conc. ²⁾	Compounds name ³⁾
2	<800	24.3	3-Ethyl-2-pentene
3	869	365.4	Hexanal
5	1198	43.2	1-Octanol
6	1230	78.2	(Z)-4,5-Dimethylhex-2-en-4-ol
7	1260	40.3	1-Nonanol
8	1265	2.4	2-Furanmethanol
9	1270	1.5	1-Decanol
10	1300	4.1	1-Undecanol
11	1318	1.4	(E)-4-methyl-3-decen-2-ol
12	1336	8.6	Cyclodecene
13	1353	0.9	5-Decen-2-ol
14	1393	63.5	1-Dodecene
15	1394	1.8	1-Dodecanol
16	1405	19.6	2,4-Decadienal
17	1416	31.7	Tridecanal
18	1421	23.4	1-Tridecanol
19	1429	1.1	Cyclodecanol
20	1434	1.9	Tetradecanal
21	1450	2.2	1-Tetradecanol
22	1460	8.2	1,13-Tetradecadienel
23	1464	0.8	2-Pentadecen-4-yne
25	1517	9.8	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol
28	1561	1.3	Tetradeca-4,9-dien-1-ol
29	1563	1.2	4-Hexadecen-6-yne
31	1634	3.6	5-Octadecyne
32	1939	3.4	9,12-Octadecadien-1-ol
33	1649	0.9	(Z)-3-Heptadecen-5-yne
34	1660	32.6	9,12,15-Octadecatrien-1-ol
35	1674	13.2	17-Octadecen-14-yn-1-ol
36	1714	3.2	Hexadecanal
38	1744	0.2	17-Octadecadien-1-ol
39	1757	0.3	Cycloheptadecanol
41	1867	0.4	(Z)-9-Octadecen-1-ol
43	2045	0.6	Tridecanoic acid
45	2120	0.1	Pentadecanoic acid
47	2222	4.2	Heptadecanoic acid
50	2337	59.8	Octadecanoic acid

¹⁾Retention index on Supelcowax 320TM (30 m length x 0.25 mm I.d x 0.25 μ m thickness. Supelco Co., USA) column.

²⁾Concentration (μ g/g) of each compound was calculated as a relative content to cyclohexanol put in sample by extraction method (140.5 μ g)(factor=1.0).

³⁾These compounds were tentatively identified by MS Library data (Wiley 275 K. Hewlett-Packard Co., USA).

Table 3. Whole volatile compounds of ascidian muscle by solid phase SPME

Peak No.	R.I. ¹⁾	Conc. ²⁾	Compounds name ³⁾
3	869	0.3	Hexanal
4	1032	0.2	Heptane
5	1198	3.4	1-Octanol
6	1230	1.1	(Z)-4,5-Dimethylhex-2-en-4-ol
7	1260	31.6	1-Nonanol
8	1270	6.5	1-Decanol
11	1353	4.4	5-Decen-2-ol
16	1416	8.2	Tridecanol
24	1517	5.1	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol
26	1533	6.5	2,3-Diethyl-1,5,7-trimethoxyindenone
27	1557	7.6	N-Butyl-4,9-decadien-2-amine
37	1735	4.1	1-(1-Hydroxycyclohexyl)-3,3-dimethyl-2-butanone
39	1757	0.2	Cycloheptadecanol
41	1867	0.3	(Z)-9-Octadecen-1-ol
42	1948	20.3	(E)-2-Butenedioic acid dibutyl ester
47	2222	26.7	Hepatadecanoic acid

¹⁾Retention index on Supelcowax 320TM (30 m length x 0.25 mm I.d x 0.25 μ m thickness. Supelco Co., USA) column.

²⁾Concentration (μ g/g) of each compound was calculated as a relative content to cyclohexanol put in sample by extraction method (70.3 μ g)(factor=1.0).

³⁾These compounds were tentatively identified by MS Library data (Wiley 275 K. Hewlett-Packard Co., USA).

Table 4. Whole volatile compounds of ascidian fluid by solid phase SPME

Peak No.	R.I. ¹⁾	Conc. ²⁾	Compounds name ³⁾
3	869	0.2	Hexanal
4	1032	0.1	Heptane
5	1198	4.3	1-Octanol
6	1230	0.2	(Z)-4,5-Dimethylhex-2-en-4-ol
7	1260	19.8	1-Nonanol
8	1270	1.5	1-Decanol
9	1300	16.4	1-Undecanol
11	1353	0.4	5-Decen-2-ol
13	1393	0.5	1-Dodecene
15	1405	18.6	2,4-Decadienal
16	1416	31.2	Tridecanal
17	1421	1.2	1-Tridecanol
26	1533	1.8	2,3-Diethyl-1,5,7-trimethoxyindenone
27	1557	1.7	N-Butyl-4,9-decadien-2-amine
37	1735	2.0	1-(1-Hydroxycyclohexyl)-3,3-dimethyl-2-butanone
39	1757	0.4	Cycloheptadecanol
41	1867	1.6	(Z)-9-Octadecen-1-ol
42	1948	3.8	(E)-2-Butenedioic acid dibutyl ester
45	2120	9.9	Pentadecanoic acid
47	2222	0.1	Hepatadecanoic acid

¹⁾Retention index on Supelcowax 320TM (30 m length x 0.25 mm I.d x 0.25 μ m thickness. Supelco Co., USA) column.

²⁾Concentration (μ g/g) of each compound was calculated as a relative content to cyclohexanol put in sample by extraction method (70.3 μ g)(factor=1.0).

³⁾These compounds were tentatively identified by MS Library data (Wiley 275 K. Hewlett-Packard Co., USA).

제 4 절 미더덕 체액 풍미개선 물질의 개발

서론

우리나라의 생활수준이 향상되고, 식품의 안전성과 기호·영양적인 면에 대한 소비자들의 인식이 높아짐에 따라 조리식품의 고유한 맛을 향상시키고 가공식품 자체의 자연적인 맛을 충족시키기 위한 천연 풍미소재의 이용도는 날로 높아지고 있다. 이러한 천연 풍미소재는 서구에서 보편화된 쇠고기 가수분해물(beef extract)에서 그 원류를 찾을 수 있으나, 원료의 다양성, 독특한 풍미 및 영양성분이 많이 함유되어 있는 어패류가 천연 풍미소재의 원료로서 널리 이용되고 있다(Cha and Baek, 1995; Oh, 2001; Josephson and Lindsay, 1986).

게, 새우, 오징어 및 조개와 같은 수산물은 다른 어류와 달리 특유의 맛과 냄새를 지니고 있는데, 이 맛과 냄새는 대부분의 경우 기호적인 면에서 환영을 받아왔고 오래전부터 수산가공이용에 있어서 흥미를 끌어난 기능성성분들이다(Hsieh et al., 1989; Chung and Cadwellader, 1994; Tanchotikul and Hsieh, 1991). 수산식품의 풍미성분에 관한 연구는 주로 맛을 나타내는 물질에 집중되어 왔다. 그러나 1970년 초반에 와서 가스크로마토그래피(GC) 및 GC/질량분석기(GC/MS) 등의 분석기기가 발달되면서 향미성분에 대한 관심이 고조되기 시작하였다.

수산식품의 특징적인 것은 신선할 때의 자체 냄새와 요리하였을 때의 냄새는 서로 다르다는 것이다. 신선할 때의 냄새는 소비자가 느끼는 냄새이므로 매우 중요한 요소가 되며, 특히 신선한 어류와 패류의 냄새는 지질성분에 관여하는 lipoxygenase 기원의 냄새가 큰 영향을 미친다(Josephson and Lindsay, 1985). 그러나 생태환경에 따라 생성되는 아민, 특히 trimethylamines는 신선한 수산식품의 냄새에 미치는 영향이 큰 물질이기도 하다(Hirano et al., 1978).

비효소적 갈변반응은 Maillard반응이라고 하며 색소형성 및 풍미의 변화에 큰 역할을 한다. 이 반응의 특징은 aldehyde류, ketone류와 amine을 함유한 환원당류와 peptide류 및 단백질류가 서로 반응하는 것이다(Kwon et al., 1965). 이 반응을 통하여 식품의 가치를 증진시키고, 커피 및 초코렛 향과 같은 기호성을 증진시킨다(Hodge, 1953). 미더덕 체액의 냄새는 평가결과 바람

직하지 못한 것으로 나타났으나, 다량의 아미노산 및 단백질 분해물질을 포함하고 있다. 그러나 당의 함량이 낮아 가열하더라도 갈변반응과 Maillard반응이 일어나지 않는다. 따라서 체액에 일정량의 당을 첨가하고 고온에서 반응시켜 바람직한 향을 나타내는 조건을 찾고 반응물을 이용하여 조미료 등의 조제에 활용하려고 하였다.

재료 및 방법

미더덕 체액을 활용한 풍미개선 물질의 개발

최적 풍미개선 물질을 만들기 위한 반응조건을 설정하기 위하여 체액을 Brix 10°으로 농축한 다음 일정량의 당(glucose, ribose, fructose)과 아미노산(thiamine, methionine, taurine, glycine, alanine, threonine, cystine 등)을 섞어 1 N NaOH로 pH 7.0~7.2로 맞추고 반응조(stainless steel, 300 mL)에 넣어 온도 160°C에서 2.5 hr 반응시켜 미더덕 체액 풍미개선 물질을 제조하였다(Table 1).

미더덕 향기물질의 추출 및 농축

제조된 풍미개선 물질을 500 mL 비이커에 취한 다음 여기에 methylene dichloride 50 mL를 넣은 후 약 12시간 동안 미더덕 향기성분을 추출하였다. 추출된 향기성분은 Kurdena-Danishi 농축기를 사용하여 40°C 이하에서 용매를 날려 보내고 1 mL가 될 때까지 농축하였다.

향기물질의 패널평가

미더덕 향기에 익숙한 훈련된 7인의 panel을 구성하여 시료의 맛과 향 등 종합적 기호도 평가(overall acceptance) 등에 대하여 5단계 평점법(+++), 아주 좋음; ++++, 좋음; ++, 보통; ++, 좋음; +, 아주 좋음)으로 평가하고, 그 결과를 평균값으로 나타내었다.

향료물질의 GC 및 GC-MS분석

향기물질의 조성은 capillary column(Omegawax-320, 30 m×0.32 mm i.d., 0.25 μm thickness, Supelco, St. Louis, MO, USA)과 FID를 장착한 GC (Shimadzu 17A, Kyoto, Japan)로 분석하였다. 분석조건은 column 온도를 최

초 5분간은 60℃로 유지하다가 3℃/min로 240℃까지 승온한 다음 40분간 유지하였다. Injector 250℃, detector 260℃, carrier gas(He)는 1 mL/min로 유지하였고, split ratio는 50:1로 하였다.

향기성분의 동정 및 정량

GC profile에 나타난 각 향기성분의 peak에 해당하는 휘발성화합물의 linear retention indices를 결정하기 위하여 탄화수소(*n*-paraffins, C₅-C₂₅, Alltech Associates, USA)를 표준물질로 사용하였고, 시료의 향기성분을 분석할 때와 동일한 조건으로 GC에 주입하여 C₅-C₂₅의 표준 머무름 시간을 구하였다. 각 휘발성 화합물에 대한 잠정적인 동정은 retention index 및 standard MS library data(Wiely 275K, Hewlett-Packard Co., USA)에 의하였으며, 휘발성 화합물의 함량은 내부표준물질을 이용하여 상대적 함량으로 환산하였다(factor=1, µg/g).

결과 및 고찰

최적조건 설정을 위한 반응모델

미더덕 조미료를 조제하기 위한 반응조건을 설정하기 위하여 미더덕 가공시 회수되는 체액을 Brix 10.0으로 농축한 다음, 여러 종류의 당과 아미노산, 양파, 녹차, 생강 등과 160℃에서 2시간 30분 동안 stainless steel 반응조에서 반응시켜 얻어진 반응액에 대하여 7인의 panel이 평가하도록 하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다.

Maillard 반응의 기본이 되는 당과 아미노산을 결정하기 위하여 미더덕 체액, 6탄당인 glucose와 5탄당인 ribose를 기본으로 하여, 아미노산은 thiamine, methionine, methionine, taurine, glycine, alanine, threonine, cystine 등을 사용하였고, 실용적인 방안을 강구하기 위하여 식용하는 양파, 마늘, 감귤, 생강, 녹차, 파 등을 첨가하여 반응액을 만들었다. Glucose와 thiamine 모델이 ribose와 thiamine 모델보다 낮은 평가를 받았고, ribose와 methionine 모델은 아주 나쁜 향을 형성하는 것으로 나타났다. Glucose, ribose와 함황화합물인 taurine구는 보통의 평가로 나타났고, 체액에 당과 아미노산을 첨가한 경우도 thiamine구만 보통으로 평가되었다.

환원당과 아미노산 간의 비효소적 갈변반응인 Maillard 반응이 일어나기

쉬운데 이 반응은 식품의 색깔 뿐만 아니라 맛이나 향과 같은 관능적 요소에도 영향을 주며, lysine과 같은 필수 아미노산의 파괴 등 영양가의 손실을 일으키는 것으로 알려져 있다(Carpenter, 1973).

당 자체의 온도에 따른 변화를 평가한 결과 ribose가 glucose보다 나은 것으로 나타났고, 체액에 양파, 마늘, 파 첨가는 보통으로, 감귤, 녹차 첨가는 매우 좋은 결과를 보여 주었다. 그리고 체액과 glucose, glycine, cystine 구가 가장 좋은 평가를 보여 주어 이들 5개에 대하여 향기성분의 분석을 실시하였다(Table 2). Song 등(1966)은 glucose와 glycine 혼합계의 Maillard반응에 대하여 농도, pH 및 온도가 반응속도에 미치는 영향을 속도론적으로 구명하였고, Lee and Han(1989)은 fructose와 glycine의 모델반응에서 일어나는 색의 변화와 당과 아미노산의 정량적 변화에 대하여 보고하였으며, Stamp and Labuza(1983)은 aspartame과 glucose, 그리고 glycine과 glucose의 혼합용액에 대해서 수분활성도와 Maillard 반응간의 관계를 밝히기도 하였다.

반응모델에서 얻어진 반응액의 향기성분

총91개 성분을 분리·동정하였으며, hydrocarbon류 29종, aldehyde류 11종, alcohol류 8종, ketone류 7종, pyrazine류 2종, 함황화합물 5종, ester류 3종, acid류 13종, 기타 13종을 확인하였다(Table 3). A구에서는 5-methylfurfural 3.12%, 5-methyl-2(3H)-furanone 2.13%, 2-methoxy-3-ethyl-pyrazine 3.15%로 생성되었고, ester 화합물인 1,2-bezenedi-carboxylic acid dibutyl ester가 20.83%, (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoic acid methylester가 6.41%였고, 그 외 tertadecanoic acid 1.71%를 비롯한 (Z)-octadecenoic acid 8.93% 등 장쇄지방산 및 이들 이성체가 전체 향기성분의 43.99%를 차지하였다. B구에서는 5-methylfurfural이 31.44%로 6 탄당인 glucose보다는 5 탄당인 ribose가 효과적이었고, 5-methyl-2(3H)-furanone 2.51%, 2-methoxy-3-ethyl-pyrazine 2.42%가 생성되었다. 그리고 ester 화합물인 1,2-bezenedi-carboxylic acid dibutyl ester가 20.05%, (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoic acid methylester가 7.06%로 이와 같은 체액-당 반응에서는 ester 화합물의 형성에 좋은 조건을 제공하는 것으로 나타났다. 그 외 tertadecanoic acid 1.12%를 비롯한 (Z)-octadecenoic acid 6.34% 등 장쇄지방산 및 이들 이성체가 전체 향기성분의 31.32%를 차지하였다. 기본 반응구에 오렌지 껍질을 첨가하여 반응시킨 C구에서는 octenal 2.02%, 1,1,2,3-tetramethylcyclohexane 3.88%로

hydrocarbon 화합물의 형성이 두드러졌고, ester 화합물인 1,2-bezenedicarboxylic acid dibutyl ester가 20.13%, (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoic acid methylester가 2.82%로 A, B구와 비슷하였다. 그러나 tetradecanoic acid가 20.11%로 급격히 증가하여 오렌지에 함유된 유기산이 반응조건에 큰 영향을 미친 것으로 나타났고, (Z)-octadecenoic acid 2.42% 등 장쇄지방산 및 이들 이성체가 전체 향기성분의 44.38%를 차지하였다. D구에는 좀 다른 향기성분을 형성시키기 위하여 녹차를 첨가하여 반응시켰다. 5-Methyl-2(3H)-furanone 3.97%, octenal 1.08%, 2-acetylthiazole 1.10% 등 다른 구와는 다른 향기성분의 형성을 나타내었고, 특히 1,2-bezenedicarboxylic acid dibutyl ester가 1.38% 밖에 형성되지 않아 향기형성의 변화를 나타내었다. 그러나 octadecanoic acid가 30.01%로 나타나 오렌지 첨가구와는 전혀 다른 성상을 보였으며, tetradecanoic acid를 포함한 장쇄지방산의 함량이 62.71%로 높았고 panel 요원들의 평가도 우수하여 미더덕 체액을 활용한 조미료 개발의 가능성을 제시하였다.

Maillard 반응의 주 기질인 당과 아미노산은 반응과정 중 pyrazine, oxazoles, thiophenes, thiazoles 그리고 또 다른 heterocyclic sulfur 화합물 등과 같은 meat flavor에 기여하는 향기물질이 생성된다(Nursten, 1986). 따라서 amino 화합물과 carbonyl 화합물의 종류와 첨가비율, pH, 가열온도에 따른 Maillard 반응속도 연구(Chun et al., 1986), 그리고 반응영향인자에 대한 연구가 이루어졌다(Pham and Cheftel, 1990). 쇠고기에서 대부분 발견되는 hydrocarbon류는 단독기질 반응액보다 lactose와 xylose 혼합 반응액에서 많은 양을 나타내었고, 삶은 고기 향의 형성에는 cystine에 lactose와 maltose를 혼합하여 가열한 반응액이 효과적이었다고 하였다(Ko et al., 1997). 조리된 고기 냄새에는 thiophenes이 관여하였으며, 쇠고기 향의 형성에는 3-methyl thiophene과 2-thiophene carboxaldehyde 이외에 2-formyl 유도체도 존재하였고, 닭고기 향의 형성에는 이외에도 ketones류가 관여한다고 하였다(Mega, 1975). Ketones 화합물 중에는 2-heptanone이나 2-nonanone이 존재하였고, furan 화합물에서는 3-methylfuran과 2-pentylfuran이 주성분이었다. 특히 amadori 생성물의 deamination이나 dehydration에 의해 생성되는 2-furfural은 모든 반응액에 존재하였으며, 고기 향의 형성에 주성분은 아니지만 함황 화합물과 함께 고기의 향 형성에 기여한다는 보고(Evers et al., 1976)처럼 함황 화합물과 xylose와의 반응액에서 고기 향미 부여에 더욱 효과적이었다고

하였다(Ko et al., 1997).

Maillard 반응은 온도에 관계없이 반응초기에 환원당과 아미노산의 급격한 반응이 일어나며, 첨가된 아미노산의 종류에 따라 큰 차이가 나는 것으로 알려져 있다(Yoon et al., 1994). 따라서 이들 반응계를 활용하기 위하여 E구와 같이 체액-glucose-glycine-cysteine계를 만들고 반응시킨 결과, 체액에 의한 heterocyclic 화합물의 형성이 저조하였으며, (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoic acid methylester가 29.26%로 가장 높았으며 이를 포함한 장쇄지방산의 함량은 48.90%를 차지하였다. Xylose, cysteine, thiamine의 Maillard 반응계에서 함황화합물의 형성정도를 파악하기 위하여 [¹³C₅]xylose를 이용하여 145°C에서 20 min간 반응시킨 결과 2-furfural과 2-furfurylthiol은 xylose로부터 기원된 것이고, 3-mercapto-2-butanone, 4,5-dihydro-2-methyl-3(2H)-furanone, 4,5-dihydro-2-methyl-3-furanthiol, 4,5-dihydro-2-methyl-3(2H)-thiophene은 thiamine으로부터 기원된 것이며, 2-methyl-3-furanthiol, 3-mercapto-2-pentanone은 cysteine 기원인 것으로 밝혀졌다(Cerny, 2007).

요약

Maillard 반응의 기본이 되는 당과 아미노산을 결정하기 위하여 미더덕 체액, 6탄당인 glucose와 5탄당인 ribose를 기본으로 하여, 아미노산은 thiamine, methionine, methionine, taurine, glycine, alanine, threonine, cystine 등을 사용하였고, 실용적인 방안을 강구하기 위하여 식용하는 양파, 마늘, 감귤, 생강, 녹차, 파 등을 첨가하여 반응액을 만들었다. Glucose와 thiamine 모델이 ribose와 thiamine 모델보다 낮은 평가를 받았고, ribose와 methionine 모델은 아주 나쁜 향을 형성하는 것으로 나타났다. Glucose, ribose와 함황화합물인 taurine구는 보통의 평가로 나타났고, 체액에 당과 아미노산을 첨가한 경우도 thiamine구만 보통으로 평가되었다. 기본인 체액-당 반응구에서는 장쇄지방산의 함량이 31.32~62.71%로 가장 높은 함량을 보였고, A, B, C구에서는 1,2-benzenedicarboxylic acid dibutyl ester의 함량도 20%를 상회하는 것으로 나타나 이들 화합물이 전체 향기성분의 50% 이상으로 이들이 체액-당 반응계의 주된 화합물로 생성되어, 체액을 활용한 조미료의 생산을 저렴한 비용으로 할 수 있는 것으로 나타났다.

Table 1. Flavor characteristics of sugar-amino acid-Mideodeok extract solutions after Maillard reaction at 160°C for 2.5 hr

Reaction conditions *	Sensory test
0.1 M Glu 100 mL	++++
0.1 M Rib 100 mL	++++
0.1 M Glu 100 mL + 0.05 M Thi 100 mL	+++
0.1 M Rib 100 mL + 0.05 M Thi 100 mL	++++
0.1 M Glu 100 mL + 0.05 M Met 100 mL	+++
0.1 M Rib 100 mL + 0.05 M Met 100 mL	+
0.1 M Glu 100 mL + 0.05 M Tau 100 mL	+++
0.1 M Rib 100 mL + 0.05 M Tau 100 mL	+++
0.1 M Glu 100 mL + 0.05 M Gly 100 mL	++
0.1 M Glu 100 mL + 0.05 M Fru 100 mL	++
0.1 M Glu 100 mL + MSG 10 g	+++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 100 mL	+++++
Extract 100 mL + 0.1 M Rib 100 mL	+++++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 100 mL + 0.05 M Thi 100 mL	+++
Extract 100 mL + 0.1 M Rib 100 mL + 0.05 M Thi 100 mL	+++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 100 mL + 0.05 M Met 100 mL	++
Extract 100 mL + 0.1 M Rib 100 mL + 0.05 M Met 100 mL	++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 100 mL + 0.05 M Tau 100 mL	++
Extract 100 mL + 0.1 M Rib 100 mL + 0.05 M Tau 100 mL	++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 100 mL + 0.05 M Thi 100 mL + 0.05 M Met 100 mL	++
Extract 100 mL + 0.1 M Rib 100 mL + 0.05 M Thi 100 mL + 0.05 M Met 100 mL	++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 100 mL + 0.05 M Thi 100 mL + 0.05 M Met 100 mL	++
Extract 100 mL + 0.1 M Rib 100 mL + 0.05 M Thi 100 mL + 0.05 M Met 100 mL	++

*Glu; glucose, Rib; ribose, Fru; fructose, Thi; thiamine, Met; methionine, Tau; taurine, Gly; glycine, Ala; alanine, Thr; threonine, Cys; cystine, Symbols mean odor of intensity : + weak, +++ moderate, +++++ strong

Table 1. (Continued)

Reaction conditions *	Sensory test
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 100 mL + onion 10 g	+++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 100 mL + garlic 10 g	+++
Extract 100 mL + 0.1 M Rib 100 mL + onion 10 g	+++
Extract 100 mL + 0.1 M Rib 100 mL + garlic 10 g	+++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 100 mL + ctirc orange 10 g	+++++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 100 mL + ginger 10 g	++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 100 mL + green tea 10 g	+++++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 100 mL + leek 10 g	++++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 50 mL + 0.1 M Gly 50 mL + 0.1 M Tau 50 mL	++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 50 mL + 0.1 M Thr 50 mL + 0.1 M Tau 50 mL	+++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 50 mL + 0.1 M Ala 50 mL + 0.1 M Tau 50 mL	++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 50 mL + 0.1 M Gly 50 mL + 0.1 M Cys 50 mL	+++++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 50 mL + 0.1 M Thr 50 mL + 0.1 M Cys 50 mL	+++
Extract 100 mL + 0.1 M Glu 50 mL + 0.1 M Ala 50 mL + 0.1 M Cys 50 mL	++

*Glu; glucose, Rib; ribose, Fru; fructose, Thi; thiamine, Met; methionine, Tau; taurine, Gly; glycine, Ala; alanine, Thr; threonine, Cys; cystine. Symbols mean odor of intensity : + poor, +++ fair, +++++ excellent.

Table 2. Good Flavor components by panel member of sugar-amino acid-Mideodeok extract solutions after Maillard reaction at 160°C for 2.5 hr

Reaction conditions *		Sensory test
A	Extract 100 mL + 0.1 M Glu 100 mL	+++++
B	Extract 100 mL + 0.1 M Rib 100 mL	+++++
C	Extract 100 mL + 0.1 M Glu 100 mL + citric orange 10 g	+++++
D	Extract 100 mL + 0.1 M Glu 100 mL + green tea 10 g	+++++
E	Extract 50 mL + 0.1 M Glu 50 mL + 0.1 M Gly 50 mL + 0.1 M Cys 50 mL	+++++

*Glu; glucose, Rib; ribose, Gly; glycine, Cys; cystine. Symbols mean odor of intensity : + poor, +++ fair, +++++ excellent.

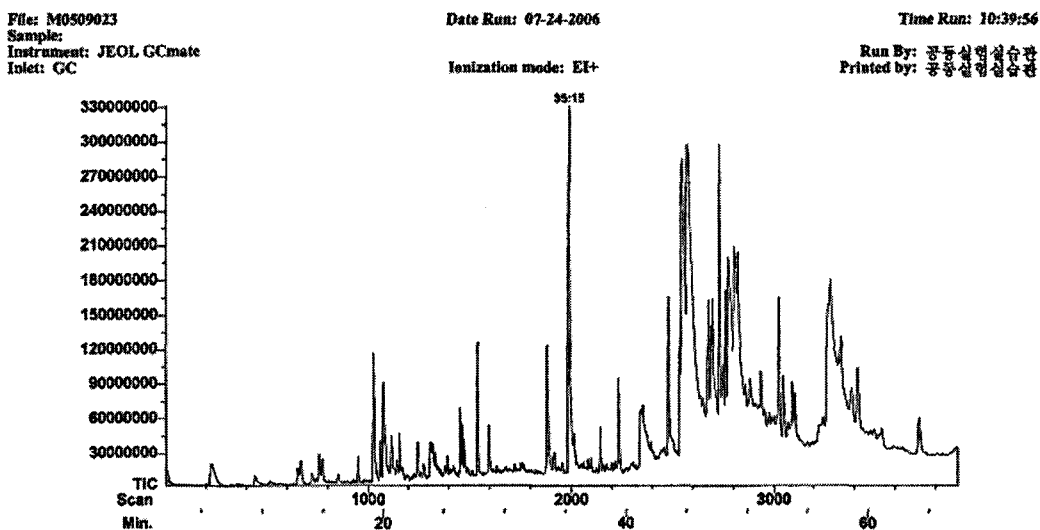


Fig. 1. Total ion chromatography of volatile flavor from Mideodeok extract and glucose solutions after Maillard reaction at 160°C for 2.5 hr.

File: M0509024
Sample:
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

Date Run: 07-24-2006

Time Run: 11:52:26

Ionization mode: EI+

Run By: 공동실험실습관
Printed by: 공동실험실습관

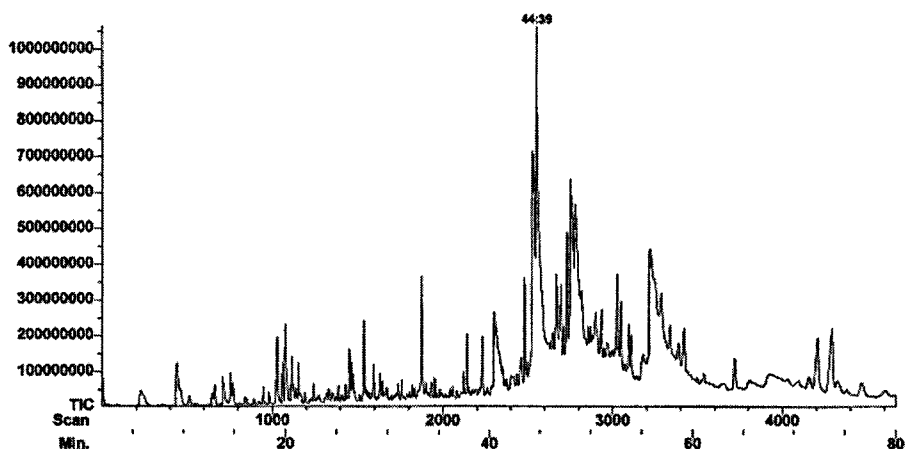


Fig. 2. Total ion chromatography of volatile flavor from Mideodeok extract and ribose solutions after Maillard reaction at 160°C for 2.5 hr.

File: M0509025
Sample:
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

Date Run: 07-24-2006

Time Run: 14:00:39

Ionization mode: EI+

Run By: 공동실험실습관
Printed by: 공동실험실습관

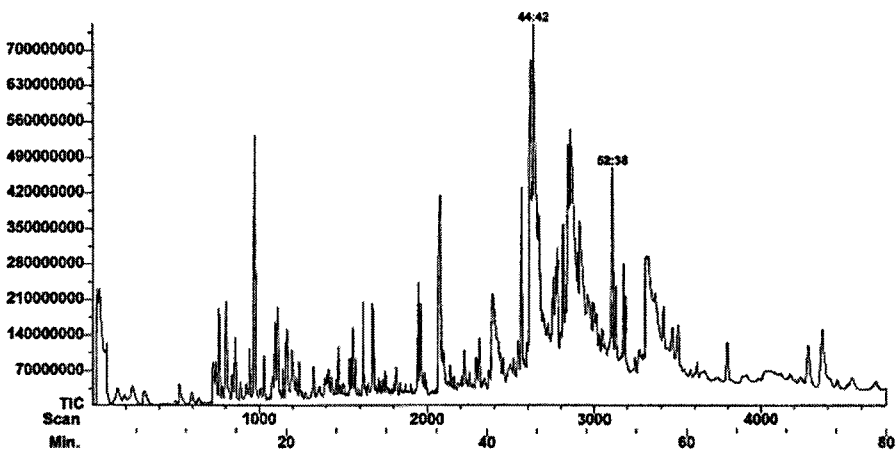


Fig. 3. Total ion chromatography of volatile flavor from Mideodeok extract, glucose solutions and citric orange after Maillard reaction at 160°C for 2.5 hr.

File: M0509027
Sample:
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

Date Run: 07-24-2006

Time Run: 15:43:11

Ionization mode: EI+

Run By: 공중심형실습관
Printed by: 공중심형실습관

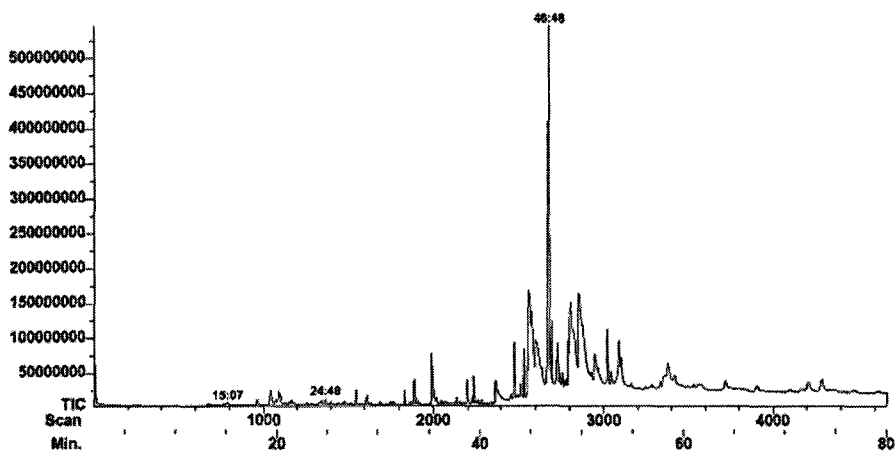


Fig. 4. Total ion chromatography of volatile flavor from Mideodeok extract, glucose solutions and green tea after Maillard reaction at 160°C for 2.5 hr.

File: M0509042
Sample:
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

Date Run: 07-25-2006

Time Run: 09:47:02

Ionization mode: EI+

Run By: 공중심형실습관
Printed by: 공중심형실습관

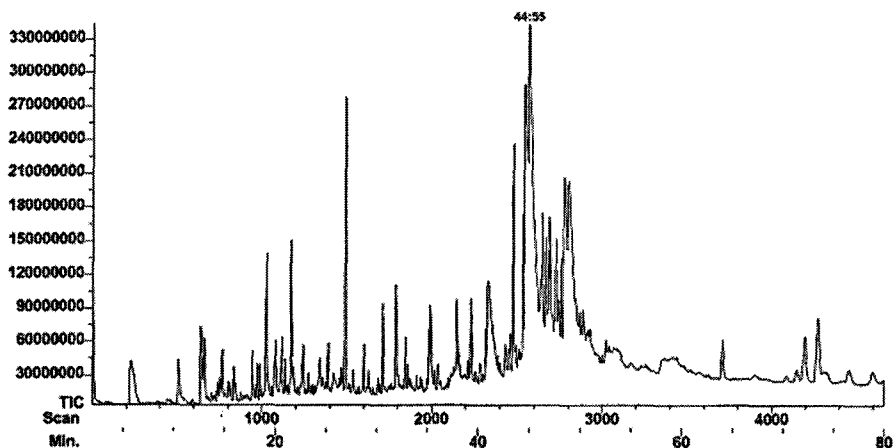


Fig. 5. Total ion chromatography of volatile flavor from Mideodeok extract, glucose, glycine and cystine solutions after Maillard reaction at 160°C for 2.5 hr.

Table 3. Whole volatile compounds from Mideodeok extract and glucose solutions after Maillard reaction at 160°C for 2.5 hr (unit: area %)

RT (min)	Compounds name ¹⁾	A ²⁾	B	C	D	E
9.25	2-Furfural	0.13	0.20	0.44	0.04	0.05
10.37	1-(2-Furanyl)ethanone	0.04	0.05	-	0.03	-
12.52	5-Methylfurfural	3.12	31.44	0.07	0.02	-
13.06	1-Octanol	0.09	0.06	0.02	0.12	-
14.06	2-Methoxy-6-methylpyrazine	0.08	0.08	0.01	0.04	-
14.25	1-Propenylcyclohexane	0.02	0.12	0.01	0.31	-
14.36	Benzeneacetaldehyde	0.03	0.15	0.04	0.42	0.02
14.40	(Z)-5-Octen-1-ol	1.31	0.12	-	1.33	0.20
14.52	2-Methyl-4-pentenal	0.08	0.23	-	0.21	-
14.55	5-Methyl-1-hexene	0.03	0.09	0.02	0.14	-
15.28	5-Methyl-2(3H)-furanone	2.13	2.51	0.02	3.97	0.20
15.36	2-Thiophenecarboxaldehyde	0.38	0.04	0.01	0.02	-
15.41	Octenal	1.03	2.93	2.02	1.08	0.03
15.56	2-Methoxy-3-ethylpyrazine	3.15	2.42	0.63	0.15	0.10
16.14	Nonanol	0.11	0.19	0.02	0.08	0.07
16.38	2-Formyl-5-methylthiophene	0.38	1.15	0.02	0.06	0.03
16.54	(E)-3,7-Dimethyl-1,3,6-octatriene	-	-	0.01	0.18	-
16.57	1-Butyl-1H-Pyrrole	0.10	0.12	0.44	0.28	-
17.24	2,6-Dimethyl-3-heptene	0.94	0.52	1.05	0.83	0.26
17.29	1,5-Dimethylcyclooctane	0.27	0.31	1.03	0.53	0.03
18.08	1-(3-Thienyl)ethanone	0.02	0.03	0.30	0.22	-
18.14	1,2,3,5-Tetramethylcyclohexane	0.16	0.19	0.10	0.25	-
18.25	5-Ethyl-4-methyl-2H-pyran-2-one	0.04	0.03	0.18	0.50	-
19.13	4,8-Dimethyl-1-nonanol	0.27	0.04	0.63	0.72	-
19.28	Butylcyclopentane	0.03	0.03	0.05	0.12	-
19.43	2,6-Dimethyl-1-heptene	0.05	0.03	0.04	0.29	0.02
19.59	1-Hexyl-3-methylcyclopentane	-	-	0.01	-	0.10
20.10	Cyclodecene	0.06	0.06	0.16	-	-
20.39	3-Nonyne	0.26	0.15	0.13	0.69	0.14
20.50	2-Ethyl-1,1-dimethylcyclopentane	0.16	0.04	0.40	0.36	0.01
21.02	1,1,2,3-Tetramethylcyclohexane	0.11	0.02	3.88	0.16	-
21.20	1-Cyclohexyl-1-butyne	-	0.01	1.04	0.14	-
21.30	7-Methyl-3,4-octadiene	1.45	0.98	0.08	0.44	0.47

¹⁾These compounds were tentatively identified by MS Library data (Wiley 275 K. Hewlett-Packard Co., USA).

²⁾The abbreviations were shown in Table 2.

Table 3. (Continued)

RT (min)	Compounds name ¹⁾	A ²⁾	B	C	D	E
21.34	5-Methyl-3-octyne	1.03	0.98	0.11	0.41	0.65
21.48	Dihydrothienothiophene	1.92	2.04	0.44	2.18	-
21.51	Octadecane	1.05	0.87	1.03	0.16	-
21.57	1-Ethyl-2-methylcyclododecane	1.51	1.08	1.12	0.44	0.45
22.18	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	0.17	0.11	0.13	0.28	-
22.30	1,2-Benzisoxiazole-3(2H)-one	0.40	0.34	0.22	0.36	0.14
22.48	2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol	1.10	0.83	0.84	0.18	0.41
23.10	3,5,5-Trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl)-2-cyclohexen-1-one	-	0.11	1.11	1.11	0.03
23.39	3-Methyl-2,6-dioxo-4-hexenoic acid	0.75	0.44	0.06	0.89	0.06
23.53	5-Methyl-1,3-benzenediol	0.70	0.40	0.41	0.58	0.05
24.04	5-Methyl-2-pyrazinylmethanol	0.05	0.16	0.13	0.39	0.15
24.35	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde	0.49	0.32	0.43	0.57	0.08
25.01	1-Methyl-4-(1-methylethyl)cyclohexene	0.35	0.22	0.42	0.33	-
25.13	(E)-2-Decen-1-ol	-	0.03	0.18	1.92	-
25.38	4-Ethyl-5-methylthiazole	0.05	0.02	0.32	0.32	-
25.57	3-Methyl-2-ethyl-1-phenyl-1-butene	0.03	0.02	0.05	0.37	0.02
26.21	5-Acetyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine	0.11	0.01	0.10	0.22	0.28
26.31	Cyclododecane	0.07	0.02	0.04	0.19	0.02
26.40	7-Methyl-3,4-Octadiene	0.06	0.01	0.03	0.04	0.14
27.29	1,13-Tetradecadiene	0.30	0.25	-	0.39	-
27.43	1,2-Propadienylcyclohexane	0.50	0.02	0.17	0.04	0.13
28.36	Tetradecanal	0.27	0.39	0.11	0.94	0.11
28.44	5-Methyl-2-(1-methylethyl)phenol	0.12	0.08	0.04	-	-
29.15	6-Methyl-3-pyridinol acetate	-	0.02	0.11	0.18	-
29.34	1-Furfuryl-2-formylpyrrole	-	0.10	0.06	0.31	-
29.57	1,12-Tridecadiene	0.39	0.43	0.39	0.57	0.04
30.09	4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde	0.23	0.20	0.19	0.16	0.06
30.34	4-(Propylthio)pyridine	0.06	0.08	0.15	4.68	0.15
31.04	1,13-Tetradecadiene	0.90	0.25	0.09	0.15	0.23
32.28	5,6,7,8-Tetrahydro-2-naphthalenamine	0.10	0.11	0.06	0.07	0.05
33.26	1,4,8-Dodecatriene	0.04	0.10	0.08	0.12	0.03

¹⁾These compounds were tentatively identified by MS Library data (Wiley 275 K. Hewlett-Packard Co., USA).

²⁾The abbreviations were shown in Table 2.

Table 3. (Continued)

RT (min)	Compounds name ¹⁾	A ²⁾	B	C	D	E
34.04	1-Hexadecene	0.03	0.05	0.08	0.12	0.01
34.36	5-Formyl-N-methylindoloin	0.04	0.02	0.11	0.52	0.13
35.43	1-Hydroxy-9H-carbazole	0.58	0.41	0.40	0.02	0.03
36.06	2-Acetylthiazole	0.65	0.43	0.06	1.10	0.30
36.24	1-Butyl-4-methoxybenzene	0.07	0.04	0.04	0.31	0.11
37.29	1-Methoxy-4-(2-propenyl)benzene	0.05	0.10	0.03	0.09	0.03
37.46	3-(2-Furanyl)-2-phenyl-2-propenal	-	0.08	0.07	0.07	-
37.49	2-Methylene-3-methylbenzothiazoline	-	0.04	0.04	0.11	-
38.52	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	0.04	0.11	0.16	0.07	0.03
39.01	2,7-Dimethylbenzo[b]thiophene	0.09	0.12	0.12	0.63	0.01
39.22	1,2-Bezenedicarboxylic acid dibutyl ester	20.83	20.05	20.13	1.38	2.81
40.42	2-Thienyl-3-thieny ketone	-	0.09	0.04	0.17	0.04
41.13	Tetradecanoic acid	1.71	1.12	20.11	0.29	2.01
42.18	Pentadecanoic acid	3.22	2.07	2.31	0.89	2.36
43.30	Hexadecanoic acid	3.39	2.04	2.13	0.22	5.45
44.24	9-Hexadecenoic acid	1.77	1.69	1.84	1.10	3.85
44.35	1-Octadecene	2.41	1.92	1.04	3.75	5.13
44.58	Heptadecanoic acid	2.39	2.14	2.13	6.69	5.64
46.19	9-Octadecenoic acid	5.53	3.76	3.88	3.76	3.79
46.42	Isomer	8.93	5.12	1.18	4.57	3.07
48.11	Octadecanoic acid	2.24	1.33	1.09	6.24	8.41
48.28	Isomer	5.53	3.73	2.14	30.31	4.27
49.09	(Z)-9-Octadecenoic acid	8.93	6.34	2.42	1.95	1.31
50.29	(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic acid	1.12	1.03	2.83	1.72	2.40
51.03	Isomer	0.94	0.95	1.28	1.22	1.21
52.37	(Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrienoic acid methyl ester	2.41	3.75	1.76	3.54	29.26
53.45	Isomer	4.00	3.31	1.06	3.49	9.79

¹⁾These compounds were tentatively identified by MS Library data (Wiley 275 K. Hewlett-Packard Co., USA).

²⁾The abbreviations were shown in Table 2.

제 5 절 미더덕 추출액을 섭취한 무지개 송어 혈액 성상의 변화

서론

양식 어류의 면역 및 생리학적 상태를 개선하고자 사료에 유용물질을 첨가한 후 일정기간 동안의 생화학적 변화를 통하여 그 효능을 평가하는 많은 연구들이 이루어졌다. 면역 활성을 나타내며 구하기 쉽고 경제적 부담도 적은 첨가물질을 탐색한 결과 peptidoglycan(Matuso and Miyazono, 1993), *Ulva*(Sato et al., 1987) 및 *Chlorella* 추출물(Nakagawa, 1985) 등의 첨가가 무지개송어, 참돔 및 은어의 질병 저항력을 증가시키는 것으로 알려져 있으며, 감초에서 분리된 triterpenoid 화합물인 glycyrrhizin도 나일틸라피아의 성장과 질병 저항성을 향상시키는 것으로 보고되었다(Jang et al., 1992).

사료첨가제의 효능은 어종이나 사료조성 및 사료품질 등에 따라서 다를 수 있으므로(Shiau and Yu, 1999), 첨가물은 사용하는 경우에는 반드시 이에 대한 고려가 있어야 한다. 즉, 품질이 우수하고 양식 대상종이 요구하는 영양소나 물질이 충분히 함유된 사료에 첨가제의 사용은 예상했던 만큼 그 효능은 발휘하지 못할 수 있다(Lee et al., 2000). 효능이 있다고 해서 첨가제의 종류에 따라서 오히려 부작용이 나타날 수도 있으며, 그에 따른 경제적인 불이익을 초래할 수 있다. 따라서 양식어의 성장, 품질 및 생리상태를 향상시킬 수 있는 첨가제의 효능은 첨가제 종류 및 첨가범위에 따른 생리적인 변화 등을 고려하여 첨가량을 결정하여야 할 것이다.

혈액성상은 어류의 사료조성 및 사육환경과 밀접한 연관이 있으며, 따라서 혈액성상을 통하여 어류의 사육환경을 예측할 수 있다(Gabriel et al., 2004). 이와 같은 자료들은 특정한 환경에 놓여있는 어류에 가해지는 스트레스와 건강상태를 판가름 하는 지표로서 효과적으로 평가되어 왔다. 본 연구에서는 미더덕을 가공할 때 부산물로 얻어지는 추출액 일정량을 사료에 첨가하고 이들이 어류 혈액성상에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

실험어

실험에 사용된 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*)는 경남 합천 대호 송어 양식장에서 성어 약 600 g 정도 중량의 100마리를 분양 받아 각 실험구마다 10마리를 수용하였고, 각 실험구는 duplicate로 하였다.

사육실험

사육 실험은 2006년 5월 2일부터 6월 27일 8주간 국립 경상대학교 해양과 학대학 어류영양 및 생리 실험실에 설치된 순환여과시스템(Fig. 1)의 1 ton 수조(Fig. 2)에 실험구별로 수용하여 실험을 하였다. 이 때 주수량은 1,000 L/hr(24회/일)가 되도록 하였으며, 용존 산소량은 7 ppm 전후였고, 전 사육 기간 수온은 14±1°C 범위였다. 먹이 급이는 실험어 체중의 3%에 해당되는 양을 하루 2회, 주 7일간 급이 하였다.

사료제조

사료조성은 Table 1, 2에 나타낸 바와 같이 어분은 미국 산 백색어분을 사용하였고, 어유는 국내시판용 피드 오일을 사용하였다. 비타민과 무기질 성분은 시중에서 판매하는 사료 첨가제를 사용하였고, 기본식이에 미더덕 추출액으로부터 얻어진 농축액(Brix 10.0)을 0%, 5%, 10%, 15%, 20%로 섞어 제조하였다. 제조한 실험사료는 소량 단위로 비닐 포장하여 질소 충전하여 -20°C의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

혈청생화학성분 분석

무지개 송어는 마취를 하지 않고 꼬리부분의 미부정맥의 혈관에서 헤파린이 첨가된 1회용 진공혈액채취기를 이용하여 5 mL 채취하여(Fig. 3) 마이크로튜브에 1 mL를 넣고, 헤마토크리트치(Ht) 및 헤모글로빈량(Hb)를 측정하였고, 나머지 혈액은 microcentrifuge로 4°C, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리한 뒤 곧바로 혈장화학 성분분석을 실시하였다. Ht는 microhematocrit법으로 측정하였고, Hb를 비롯한 총단백(TP), 알부민(ALB), 알칼리성포스파타제(ALP), 중성지방(TG), 총콜레스테롤(TCHO), 트랜스아미나제인 AST(GOT) 및 ALT(GPT), 포도당(GLU)등 11개 혈장화학성분 분석에는 동물성 생화학 분석장치인 FUJI DPI-CHEM 3000(Fuji photo film Co., Tokyo, Japan)을 이용하였다.

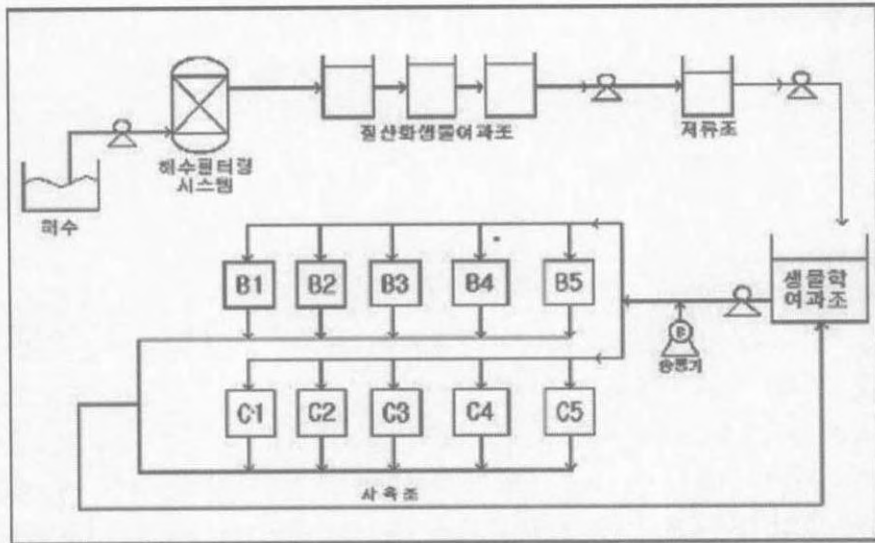


Fig. 1. Circulate-filtration system for experimental fishes.

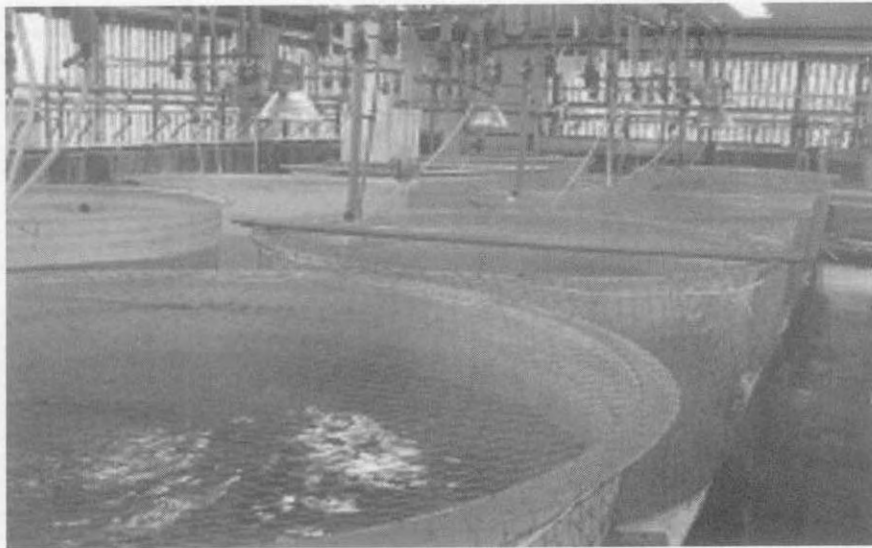


Fig. 2. Experimental tank for rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*).

Table 1. Composition of the experimental basal diets

Ingredient	Percentage
White fish meal	68
Alpha-starch	12
Flour	10
Soybean meal	4
Yeast	1
Vitamin mix ¹	2
Mineral mix ¹	1
Feed oil	2
Total	100

¹Vitamin and mineral mixture were commercially available for fish.

Table 2. Level of each extract concentrates in the experimental diets for rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*)

Extract concentration	Diets(100 g)
0%	BD + Water 2.25 L
5%	BD + Water 2.138 L + Extracts 0.112 L
10%	BD + Water 2.026 L + Extracts 0.224 L
15%	BD + Water 1.914 L + Extracts 0.336 L
20%	BD + Water 1.802 L + Extracts 0.448 L

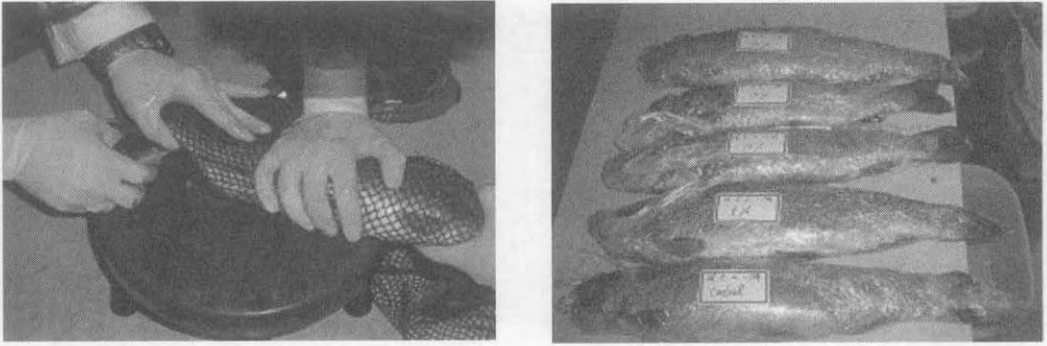


Fig. 3. Drawing blood from rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) during experiment.

결과 및 고찰

혈액 생화학성분의 변화

면역 활성을 갖는 기능성 사료조제를 위하여 거제 및 통영 지역에서 양식되고 있는 미더덕을 활용하고자 하였다. 미더덕을 가공하는 중에 얻어지는 체액에는 항균물질을 비롯한 활성물질이 다량 포함되어 있는 것으로 알려져 있다(Gandra et al., 2000). 그래서 가공 중 얻어진 농축물을 사료 배합시 물과 함께 일정량을 첨가하여 사료를 조제하였다. 조제된 사료의 조단백질 함량은 48.0%, 칼슘과 인의 함량은 2.0% 및 2.7% 함유되어 있어 무지개 송어 사료로 적절하였고, 급이시 섭취행동도 활발하게 나타나 사료로 사용하는 것이 적절한 것으로 여겨졌다.

실험사료 급이 전 사육적용 된 무지개 송어의 혈액과 사료 급이 후 4주 및 8주 후의 결과는 Table 3에 나타내었다. 실험사료 투여기간 동안의 hemoglobin(Hb) 농도와 hematocrit(Ht) 치는 전 사육기간을 통하여 10.5~11.0 g/100 mL 및 31.3~42.7%로 나타났다. 어류에게 스트레스를 가하는 경우 Hb와 Ht 값이 감소하는 것으로 나타난다고 하였으므로(Choi et al., 2002), Hb와 Ht 값의 변화가 없는 것으로 미루어 보아 사료에 따른 스트레스는 없었던 것으로 여겨진다.

Table 3. Changes in hematological factors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed the experimental diets for 8 week

	Week	Dietary treatment				
		Control	5%	10%	15%	20%
Hb (g/100 mL)	0	10.1±0.6				
	4	10.8±0.3	11.2±0.5	10.7±0.3	10.5±0.4	10.7±0.4
	8	10.1±0.4	10.8±0.3	10.3±0.4	10.7±0.5	11.0±0.5
Ht (%)	0	31.3±2.9				
	4	41.3±1.2	40.7±0.6	42.7±0.7	40.7±0.4	39.7±0.4
	8	41.3±0.6	42.3±0.7	41.3±0.5	42.1±0.9	40.3±0.4
ALB (g/100 mL)	0	1.1±0.1				
	4	1.4±0.1	1.5±0.2	1.5±0.5	1.4±0.4	1.4±0.3
	8	1.3±0.3	1.7±0.3	1.5±0.2	1.5±0.4	1.6±0.3
GLU (mg/100 mL)	0	29.7±4.0				
	4	75.7±11.5	62.7±11.0	70.0±7.0	78.7±9.3	76.7±12.0
	8	71.7±15.4	81.0±29.8	83.3±19.6	90.0±19.9	103.3±21.5
GOT (Unit/L)	0	285.1±54.9				
	4	341.4±76.4	356.8±19.8	374.1±28.3	324.6±63.6	395.8±29.7
	8	306.3±84.9	419.2±26.9	421.6±43.8	357.5±27.7	331.5±43.1
GPT (Unit/L)	0	15.3±2.3				
	4	15.3±3.5	15.7±3.1	18.7±5.9	20.3±5.4	19.3±2.1
	8	15.3±2.3	21.0±2.6	17.5±6.6	16.3±5.1	16.3±6.2
T-BIL (mg/100 mL)	0	0.2±0.0				
	4	0.3±0.0	0.3±0.1	0.5±0.2	0.5±0.2	0.3±0.1
	8	0.4±0.1	0.5±0.2	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1
TG (mg/100 mL)	0	142.5±16.3				
	4	225.6±10.6	202.7±21.2	214.5±19.2	206.3±12.7	236.7±22.5
	8	254.1±50.9	265.6±31.1	275.5±20.6	252.4±24.7	278.3±29.8

Hb; hemoglobin, Ht; hematocrit, ALB; albumin, GLU; glucose, GOT; glutamate oxaloacetate transaminase, GPT; glutamate pyruvate transaminase, T-BIL; total-bilirubin, TG; triglyceride.

무지개 송어 혈청의 알부민(ALB, 1.3~1.7 g/100 mL), 글루코스(GLU, 62.7~103.3 g/100 mL), GPT(15.3~21.0 Unit/L), 총빌리루빈(T-BIL, 0.2~0.5 mg/100 mL)의 농도는 사육기간 동안 정상적인 어류가 나타내는 수치와 비슷한 값을 보였으나, GOT 함량은 기준치인 8~33 Unit/L을 벗어나 285.1~421.6 Unit/L로 정상어의 수치에 비하여 월등히 높은 값을 보였다. Choi et al. (2002)의 연구에 의하면 참돔, 감성돔, 돌돔에서 녹간증에 걸린 돔의 혈청검 사결과 GOT 값이 324~768.5 Unit/L로 높게 나타났다고 하였다. 그러나 GPT 값은 정상 수치인 4~36 Unit/L 범위 내에 있어 간 대사이상은 아닌 것으로 판단된다. 이는 식물성 단백질을 사용하는 경우 해산어에서 주로 발생하는 독특한 증상이라고 하여 본 실험의 결과와는 차이가 있는 것으로 여겨진다. 어류의 에너지원이 되는 중성지방(TG, 142.5~278.3 mg/100 mL)의 함량은 실험 시작 전 142.5 mg/1000 mL에서 4주 후 202.7~236.7 mg/100 mL, 8주 후 252.4~278.3 mg/100 mL로 증가하는 것으로 나타나 성장에 따른 에너지 소비도 증가하여 정상적인 사료섭취가 이루어진 것으로 여겨진다.

양식 어류의 성장 및 품질개선과 생리적인 기능강화를 위한 천연식물자원 및 한방 생약제재와 같은 각종 첨가제들의 효능에 대한 많은 연구가 이루어 졌다(Nakagawa et al., 1981; Kim et al., 1998). 사료에 해조류의 첨가로 어류의 생리기능과 사료효율을 향상시킨다는 보고도 있으며(Satoh et al., 1987; Lee et al., 1998), 어보산과 고추냉이 줄기 첨가구에서 넙치의 생존율을 높임과 동시에 치어의 성장을 개선시키는 것으로 보고하였다(Park et al., 2003). 이와 같은 연구는 면역활성을 갖으며 경제성이 있는 천연물을 사료 첨가제로 개발함으로써 양식어민이 겪고 있는 대량폐사에 의한 어려움을 극복하기 위한 방안의 하나로 연구되고 있다. 따라서 미더덕 가공시 버려지는 체액 부산물을 배합사료에 20%까지 첨가하더라도 어류성장 및 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

요약

미더덕으로부터 추출한 체액을 첨가한 사료가 무지개송어에 미치는 영향을 조사하였다. 제조된 사료는 단백질 48% 및 지질 20%를 함유하였고, 여기에 체액 추출 농축물을 각각 5~20%씩 첨가하여 8주간 사육하였다. 헤모글로

빈, 헤마토크리트치, 알부민, 글루코스, 총 빌리루빈, 중성지방 및 글루타민 피루브산 트랜스퍼라제와 같은 혈액생화학 분석을 통하여 무지개송어의 사료로서의 가능성을 평가하였다. 대조구와 비교하였을 때 특별한 변화는 없었으나 글루타민 옥살로 트랜스아미나아제의 함량은 매우 높았다. 그러므로 버려지고 있는 미더덕 추출 농축액은 사료 첨가제로 사용할 수도 있는 것으로 나타났다.

제 6 절 미더덕 추출액을 활용한 기능성사료 개발

서론

수산물은 식품영양학적 측면뿐만 아니라 식품건강 및 생활의 측면에서도 매우 중요하다. 지금까지 수산식품을 통한 균형 있는 영양소의 섭취는 인간의 생명활동에 중요한 기능을 담당하여 왔다. 여기에 최근 들어 수산물을 통해서 건강성 증진, 질병예방, 면역력 증진과 같은 특수 기능을 부가하려는 노력이 이루어지고 있다.

기능성 수산물을 생산하기 위한 기능성사료의 개발과정은 사료에 첨가가 가능한 기능성 발현 물질을 찾고 이를 효과적으로 첨가하는 것이라 할 수 있다. 기능성 사료 첨가물질을 사료첨가물의 생산 유통으로 분류해 본다면 인공조작 및 합성사료와 식물, 동물, 미생물 등 생물유래 물질, 광물질 등과 같이 무생물로부터 유래한 물질이 있다. 기능성 사료에 의하여 기능성 수산물이 생산되는 과정은 일반적으로 동물의 전체 생명활동의 항진이나 변화에 의하여 결과적으로 나타나는 경우가 많다. 이러한 생명활동의 항진과정에서 병원균에 대한 항균항생 기능은 매우 중요한 역할을 수행한다. 항균력에 의하여 질병예방의 기능을 수행할 잠재력이 있는 물질로는 생균제, 약용식물, 프로폴리스 등이 있다. 또한 면역력 증진을 목적으로 활용 또는 연구되고 있는 사료 첨가물로는 아미노산, 펩타이드, 비타민, 광물질, 지방산, 특정 단백질이나 탄수화물 등 매우 다양하다. 최근에는 특정면역에 관여하는 물질의 생산을 자극하는 다양한 물질들이 연구 개발되고 있다(Oh, 2004).

양어사료에 한약제(Kim et al., 1998), 파래(Kim and Choi, 1996), 구기자, 인삼, 오미자 등의 식물성 생약제의 열수추출물(Kwon et al., 1999), 키토산을 리고당(Kim et al., 2005), 감귤발효액(Song et al., 2002), 표고버섯(Song et al., 2003) 등 사료효율 향상과 어류의 건강증진에 기여할 가능성이 높은 물질들이 연구되었다. 연어, 송어, 새우 및 가재 등의 체색을 붉게 발현시키는 astaxanthin의 첨가실험(Chien and Jeng, 1992; Okada et al., 1994), 황산화활성 실험(Winston et al., 2004) 등이 이루어졌고, 담수미세조류 인 spirulina의 기능성에 대한 연구도 이루어졌다(Richmond, 1998). 이에 본 연구에서는 미더덕 추출물에 함유된 면역성 증강물질을 우럭 사료에 일정량 첨가하고 사육한 후 우럭에 함유된 영양성분의 분석과 병원균에 대한 병원성 시험을 통하

여 그 효과를 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

실험어 및 사육관리

실험에 사용된 조피볼락(*Sebastes schlegeli*)은 주)다모여에서 분양받아 실험 수조에 2주일간 상품사료를 공급하면서 실험환경에 적응시켰다. 평균체중 150 g 전후의 성어 200마리를 순환여과시스템의 1 ton 수조(Fig. 1)에 실험구 별로 40마리를 수용하여 실험을 하였다. 이 때 주수량은 1,000 L/hr(24회/일)가 되도록 하였으며, 용존 산소량은 7 ppm 전후였고, 전 사육 기간 수온은 $22 \pm 2.6^\circ\text{C}$ 범위였다. 실험 개시 때와 시료채취 때에 측정 전일 절식시킨 후 MS222(tricaine methane sulfonate, Sigma, USA) 100 ppm에 마취시켜 각 실험수조에 수용된 실험어 전체 무게를 측정하였다. 사료는 1일 2회(10:00, 17:00, 주 7일간 공급) 손으로 체중의 3%에 해당하는 양을 공급하였다.

사료제조

시판 조피볼락 배합사료를 사용하였고 배합사료에 미더덕 추출액으로부터 얻어진 농축액(Brix 10.0)을 0%, 3%, 6%, 9%, 15%로 섞어 제조하였다. 제조한 실험사료는 소량 단위로 비닐 포장하여 질소 충전하여 -20°C 의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

일반성분의 분석

AOAC(1990)에 따라 수분은 상압가열건조법, 조지방은 Bligh & Dyer 분석법, 조단백질은 Kjeldahl 정량법, 회분은 550°C 에서 건식회화법으로 측정하였다.

총 지질의 추출과 지방산조성의 분석

Bligh and Dyer의 방법(1959)에 따라 총 지질을 추출하고 AOCS법(1990)에 따라 검화 및 methylester화 시킨 다음 GC 분석용 시료를 조제하였다. 이를 capillary column (Omegawax-320, 30 m \times 0.25 mm i.d., Supelco Ltd.)이 장착된 GC(Shimadzu GC-17A, Kyoto, Japan)로써 분석하였다. 이때 GC의 분석 조건은 Table 1과 같고, 각 구성 지방산의 동정은 표준품과의 머무름

시간(RT)의 비교 및 equivalent chain length법(1995)에 의해 동정하였다.

결과 및 고찰

일반성분의 변화

사료에 첨가된 추출물의 함량에 따라 수분함량의 차이를 보여 대조구는 10.4%, AE-3(추출물 3%)구는 11.8%, AE-6(추출물 6%)구는 13.7%, AE-9(추출물 9%)구는 15.9%, AE-15(추출물 15%)구는 20.0%였다(Table 1). 상대적으로 단백질의 함량은 수분함량이 증가함에 따라 감소하여 36.0~46.6%로 나타났으며, 지질 및 회분의 함량은 거의 비슷하여 9% 및 13% 전후로 나타났다. 사료 중의 영양성분은 일반적인 실험사료의 범위 내에 있어 적절한 것으로 여겨진다(Lee et al., 2000; Kim et al., 2003). 사육 4주 후의 어육의 수분함량은 77.1~81.2%, 단백질 함량은 15.8~18.6%였으나, 첨가물 15%구의 간 지질함량은 20.1~21.8%에 비하여 25.9%로 높은 값을 보였다. 사육 8주 후 수분의 함량에는 변동이 없었으며, 육중의 지질함량도 4주와 비슷한 값을 보였다. 간 지질함량은 9% 및 15% 첨가구에서 각각 25.4% 및 28.1%로 나타났다. 이는 n-3HUFA 급이시 조피볼락의 육 및 간지질의 함량을 조사한 결과와 비교해 볼 때 육지질은 거의 비슷한 값이었으나, 간지질은 가장 성장이 좋았을 때의 37% 보다는 낮은 값을 보였으나, 대조구의 20% 보다는 높아 미더덕 추출액 첨가에 따른 간지질의 축적을 촉진하는 것으로 보인다(Lee et al., 2000).

조피볼락의 성장도

시험어의 건강상태를 파악하기 위하여 간에 함유된 지질함량을 측정된 결과 Table 1에 나타난 것과 같이 16.9%로 사료공급이 원활하지 못하였던 것으로 여겨진다. 어육의 수분함량은 78.5%, 단백질은 18.5%, 지질은 2.1%였다. 성장효과는 Table 2에 나타내었다. 첨가물의 농도가 6%까지는 체중이 증가하다가 9% 이상에서는 정체되었으며, 사료효율도 이와 유사한 경향으로 첨가물 6%까지는 약 50%로 증가하였으나, 9~15%에서는 43.9~40.3%로 낮았다. 간 및 내장 중량지수는 대조구 2.6 및 8.3에 비해서는 첨가물구가 3.3~3.6 및 10.7~11.4로 약간 높은 값을 보였으며, 15% 첨가구는 각각 4.6 및 13.6으로 대조구에 비하여 1.6배 이상 높은 값을 보였다. 8주 후 간지질 함량이 증가하고(Table 1), 간 및 내장 중량지수가 증가하는 것으로 보아 간 지질의 대사가

원활히 이루어지지 않은 것으로 보였다. 간에 축적된 지질이나 장에서 흡수된 지질은 lipoprotein에 의해 운반된 후 저장조직에 축적되거나 에너지원으로 이용된다. Fukuzawa et al.(1971)은 육상동물의 간에 지질이 비정상적으로 높게 축적된 것은 lipoprotein의 합성이 저해된 것에 원인을 두고 있으며, Rogie and Skinner(1985)는 무지개송어의 lipoprotein 합성이 간에서 이루어진다고 보고한 것으로 미루어볼 때 간세포의 대사장애로 lipoprotein의 합성이 저해되어 간 및 장의 지질이 이용되지 못하고 축적되는 것으로 여겨진다.

지방산 조성의 변화

어류 및 미더덕 추출물 첨가사료의 지방산 조성을 Table 3에 나타내었다. 어류지질을 구성하고 있는 지방산 조성의 변화를 보면(Table 3) 육의 경우 C18:1n-9과 C16:0는 각각 21.8% 및 17.2%였고, EPA 함량은 7.5%, DHA 함량은 20.8%로 육중의 함량이 높게 나타났다. 간의 경우 C18:1n-9과 C16:0는 각각 27.1% 및 16.2%였고, EPA 함량은 6.0%, DHA 함량은 14.4%로 약간 낮은 경향을 보였다. 그러나 n-3HUFA 함량은 육에 33.7%, 간에 26.4%로 육에서의 함량이 높은 것으로 나타나 적정량의 n-3HUFA가 공급되었다.

사료의 주된 포화지방산은 C16:0으로 18.8~20.8%, 모노엔산은 C18:1n-9으로 18.2~20.3%, 다가불포화산은 C20:5n-3이 4.9~5.5%, C22:6n-3은 10.0~10.5%이었다. 어육에 함유된 C18:2n-6의 함량은 2.3%로 낮은 함량이었으나, 사료의 지방산 조성은 15.0~15.7%로 식물성 유지의 첨가량이 높은 것으로 여겨진다. 첨가농도별 사료의 포화산은 29.1~29.5%, 모노엔산은 31.7~33.4%, 다가불포화산은 37.1~39.2%로 첨가구별 큰 차이는 없었다.

추출물 농도별로 4주간 사육한 조피볼락의 육과 간의 지방산 조성의 변화를 Table 4에 나타내었다. 포화산은 육과 간의 비율이 비슷하였으며, 모노엔산은 간에서의 함량이 42.1~50.8%로 육의 31.0~39.7%보다 높은 값을 보였고, 다가불포화산의 함량은 육이 간에 비하여 높은 값을 보였다. 그리고 대조구에서의 고도불포화산은 육이 37.7%, 간은 24.4%로 다른 구에 비하여 낮았고, 첨가물의 농도가 높아질수록 육과 간에서의 다가불포화산의 함량은 비슷하였다(AE-9; 34.9%:33.5%, AE-15; 34.4%:32.3%). 당 년생 조피볼락 치어의 경우, 정제된 ester 형태의 지방산을 사료에 첨가한 연구에서 EPA와 DHA와 같은 n-3HUFA 요구량이 0.9~1.0%로 보고되고 있고(Lee et al., 1994), 평균체중 130 g 전후의 조피볼락의 n-3HUFA 요구량은 0.6~0.9% 정도로 추정되며, 조

피블락 치어보다는 그 요구량이 낮아지는 경향을 보인다고 하였다(Lee et al., 2000). 이 기준을 참고로 하면 본 실험에 공급된 n-3HUFA 함량은 충분한 것으로 판단된다.

추출물 농도별로 8주간 사육한 조피블락의 육과 간의 지방산 조성의 변화를 Table 5에 나타내었다. 사료에 포함된 C18:1n-9의 높은 농도 때문에 조피블락의 육 및 간에 축적된 함량이 사육기간의 증가에 따라 점차 높아졌다. 육중에서의 초기함량 21.8%에서 4주 후 20.3%, 그리고 8주 후에는 38.1%로 높아졌고, 간에서는 27.1%에서 4주 후 33.4%, 8주 후 22.6%로 상대적으로 낮은 값을 보였다. 따라서 모노엔산의 육중 함량이 급격히 높아짐과 아울러 DHA 함량은 5.9~9.6%로 급격히 낮아졌고, n-3HUFA 함량도 초기 33.7%에서 4주 후 28.6%, 8주 후 14.0%로 낮아졌다. 그러나 간 중의 함량은 8주 후 24.4~28.3%로 4주후의 24.3~25.6%로 비슷한 함량을 보였다. 오징어 간유나 대구 간유와 같은 해산어류에는 n-3HUFA가 다량 함유되어 있어 해산어류의 필수지방산을 충족할 수 있으므로 가장 많이 사용되는 어유이다(Lee et al., 1994). 하지만 어유 중의 n-3HUFA는 산화되기 쉽고, 비타민 E 요구량, 경제성 등을 고려하여 첨가량을 결정해야 하고, 사료의 n-3HUFA 함량이 일정 수준 이상 함유되면 지질종류에 영향을 받지 않는 것으로 밝혀짐에 따라 사료원가를 절감할 수 있는 방법을 선택해야 할 것이다.

요약

사료에 첨가된 추출물의 함량에 따라 수분함량의 차이를 보여 대조구는 10.4%, AE-3(추출물 3%)구는 11.8%, AE-6(추출물 6%)구는 13.7%, AE-9(추출물 9%)구는 15.9%, AE-15(추출물 15%)구는 20.0%였다(Table 1). 상대적으로 단백질의 함량은 수분함량이 증가함에 따라 감소하여 36.0~46.6%로 나타났으며, 지질 및 회분의 함량은 거의 비슷하여 9% 및 13% 전후로 나타났다. 사료 중의 영양성분은 일반적인 실험사료의 범위 내에 있어 적절한 것으로 여겨진다. 첨가물의 농도가 6%까지는 체중이 증가하다가 9% 이상에서는 정체되었으며, 사료효율도 이와 유사한 경향으로 첨가물 6%까지는 약 50%로 증가하였으나, 9~15%에서는 43.9~40.3%로 낮았다. 간 및 내장 중량지수는 대조구 2.6 및 8.3에 비해서는 첨가물구가 3.3~3.6 및 10.7~11.4로 약간 높은 값을 보였으며, 15% 첨가구는 각각 4.6 및 13.6으로 대조구에 비하여 1.6배 이상

높은 값을 보였다. 육의 경우 C18:1n-9과 C16:0는 각각 21.8% 및 17.2%였고, EPA 함량은 7.5%, DHA 함량은 20.8%로 육중의 함량이 높게 나타났다. 간의 경우 C18:1n-9과 C16:0는 각각 27.1% 및 16.2%였고, EPA 함량은 6.0%, DHA 함량은 14.4%로 약간 낮은 경향을 보였다. 그러나 n-3HUFA 함량은 육에 33.7%, 간에 26.4%로 육에서의 함량이 높은 것으로 나타나 적정량의 n-3HUFA가 공급되었다. 사료의 주된 포화지방산은 C16:0으로 18.8~20.8%, 모노엔산은 C18:1n-9으로 18.2~20.3%, 다가불포화산은 C20:5n-3이 4.9~5.5%, C22:6n-3은 10.0~10.5%이었다. 어육에 함유된 C18:2n-6의 함량은 2.3%로 낮은 함량이었으나, 사료의 지방산 조성은 15.0~15.7%로 식물성 유지의 첨가량이 높은 것으로 여겨진다. 첨가농도별 사료의 포화산은 29.1~29.5%, 모노엔산은 31.7~33.4%, 다가불포화산은 37.1~39.2%로 첨가구별 큰 차이는 없었다.

Table 1. Proximate compositions of experimental diets and fish tissues

		Proximate composition(%) ¹⁾			
		Moisture	Crude protein	Crude lipid	Ash
		0 week			
Experimental diets ²⁾					
	Control	10.4±0.1	46.6±0.2	8.9±0.3	13.1±0.2
	AE-3(3%)	11.8±0.2	44.3±1.0	9.2±0.1	13.5±0.2
	AE-6(6%)	13.7±0.1	42.7±0.4	9.4±0.3	13.4±0.1
	AE-9(9%)	15.9±0.6	40.5±0.4	9.8±0.2	13.2±0.4
	AE-15(15%)	20.0±0.2	36.0±0.3	8.9±0.4	13.4±0.2
Fish tissues					
	Muscle	78.5±0.2	17.5±0.8	2.1±0.1	1.4±0.2
	Liver			16.9±0.7	
		4 week			
Fish tissues					
Control	Muscle	77.1±0.1	16.1±0.2	2.5±0.1	1.2±0.1
	Liver			20.6±0.5	
AE-3	Muscle	79.0±0.2	18.6±0.7	1.6±0.3	1.2±0.1
	Liver			21.8±0.6	
AE-6	Muscle	77.8±0.2	17.4±0.6	2.3±0.1	1.2±0.1
	Liver			20.2±0.2	
AE-9	Muscle	81.2±0.2	16.0±0.2	2.2±0.2	1.0±0.1
	Liver			20.1±0.8	
AE-15	Muscle	80.3±0.4	15.8±0.2	2.2±0.3	1.1±0.1
	Liver			25.9±0.7	
		8 week			
Fish tissues					
Control	Muscle	78.7±0.2	16.3±0.3	2.9±0.1	1.5±0.1
	Liver			20.0±0.7	
AE-3	Muscle	76.3±0.1	20.7±0.5	3.3±0.3	1.4±0.1
	Liver			22.9±0.4	
AE-6	Muscle	76.6±0.2	22.3±0.4	2.8±0.1	1.4±0.1
	Liver			22.7±0.4	
AE-9	Muscle	75.9±0.2	19.8±0.9	2.4±0.2	1.3±0.1
	Liver			25.4±0.6	
AE-15	Muscle	76.0±0.1	21.5±0.8	2.1±0.3	1.3±0.1
	Liver			26.1±0.4	

¹⁾Results are mean values±SD of three replicates.

²⁾AE; ascidian extract concentrates (Brix 10.0).

Table 2. Effect of dietary extract incorporation levels on body weight, feed efficiency, hepatosomatic index and viscerosomatic index of rockfish fed during 8 week

	Dietary treatment ¹⁾				
	Control	AE-3	AE-6	AE-9	AE-15
Initial mean body weight (g)	139.0	138.8	134.0	134.4	136.1
Final mean body weight (g)	184.6	198.1	192.7	182.6	180.4
Feed efficiency (%) ²⁾	41.2	49.9	50.8	43.9	40.3
HSI ³⁾	2.6±0.2	3.6±0.5	3.3±0.4	3.5±0.6	4.6±0.3
VSI ⁴⁾	8.3±1.4	11.4±0.8	10.7±0.9	11.3±1.0	13.6±0.7

¹⁾Results are mean values±SD (n=3 except for HSI and VSI where n=30).

²⁾Fish weight gain x 100/feed intake (dry matter).

³⁾HSI=100 x (liver weight/body weight).

⁴⁾VSI=100 x (viscera weight/body weight).

Table 3. Fatty acids composition in diets and muscle, liver of rock fish

Fatty acids	Fish		Dietary treatment				
	M	L	Control	AE-3	AE-6	AE-9	AE-15
14:0	2.5	2.3	3.9	3.7	3.9	3.5	3.6
15:0	0.2	0.2	0.6	0.3	0.0	0.3	0.3
16:0	17.2	16.2	18.8	19.9	20.8	20.1	19.8
16:1n-7	6.5	8.4	4.9	4.3	4.8	4.0	4.2
Iso17:0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
16:2n-4	0.3	1.2	0.6	0.3	0.0	0.1	0.2
17:0	0.1	0.0	0.5	0.3	0.0	0.3	0.3
16:3n-4	0.3	0.4	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
16:3n-1	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
16:4n-1	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
18:0	4.4	2.9	4.5	4.6	4.4	4.9	5.0
18:1n-9	21.8	27.1	18.2	19.5	20.3	20.1	20.1
18:1n-7	3.8	5.5	2.8	2.8	1.7	2.9	2.9
18:1n-5	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
18:2n-6	2.3	3.0	15.0	15.7	15.6	15.6	15.5
18:2n-4	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
18:3n-6	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
18:3n-4	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
18:3n-3	0.7	0.8	1.6	1.4	0.9	1.3	1.4
18:4n-3	1.0	0.4	0.8	0.6	0.2	0.5	0.6
20:0	0.1	0.1	0.3	0.3	0.1	0.3	0.3
20:1n-11	0.5	0.6	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9
20:1n-9	2.2	1.9	2.2	2.4	2.5	2.6	2.6
20:1n-7	0.2	0.2	0.4	0.2	0.1	0.2	0.2
20:2n-6	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3
20:4n-6	1.5	1.3	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0
20:3n-3	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
20:4n-3	0.6	0.7	0.6	0.6	0.7	0.6	0.6
20:5n-3	7.5	6.0	5.3	5.2	5.5	5.0	4.9
22:0	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2
22:1n-9	2.0	1.5	1.8	1.9	2.0	2.1	2.1
22:1n-7	0.0	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5
21:5n-3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2
22:4n-6	0.3	0.6	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
22:5n-6	0.6	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4
22:4n-3	0.2	0.1	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0
22:5n-3	1.6	2.2	1.7	1.7	2.1	1.7	1.7
22:6n-3	20.8	14.4	10.4	10.4	10.5	10.3	10.0
Sat	24.5	21.8	29.1	29.3	29.4	29.5	29.5
Mono	37.3	45.7	31.7	32.4	32.7	33.2	33.4
Poly	38.2	32.5	39.2	38.3	37.9	37.3	37.1
n-3HUFA	33.7	26.4	22.5	22.7	23.8	22.3	22.2

M; muscle, L; liver, HUFA; Highly unsaturated fatty acid(above 20 carbon fatty acid).

Table 4. Fatty acids composition in muscle and liver of rock fish fed graded dietary levels of ascidian extracts during 4 week

Fatty acids	Dietary treatment									
	Control		AE-3		AE-6		AE-9		AE-15	
	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L
14:0	2.9	1.7	2.1	2.6	2.3	2.0	2.8	2.4	3.0	3.1
15:0	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.5
16:0	17.9	15.1	19.3	17.2	19.8	15.1	18.3	16.2	17.7	18.5
16:1n-7	6.7	7.5	5.8	8.3	5.4	7.0	7.0	7.6	7.8	9.0
Iso17:0	0.2	0.3	0.2	0.3	0.4	0.3	0.0	0.3	0.2	0.3
16:2n-4	0.7	0.7	0.6	1.1	0.6	0.7	0.6	1.1	0.7	1.1
17:0	0.5	0.6	0.6	0.7	0.6	0.7	0.6	0.7	0.6	0.7
16:3n-4	0.7	0.8	0.6	0.7	0.6	0.8	0.7	0.8	0.8	0.7
16:3n-1	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3
16:4n-1	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
18:0	4.4	6.7	5.0	2.6	5.9	3.8	4.9	3.0	3.9	2.6
18:1n-9	20.3	33.4	19.2	26.4	18.2	33.1	21.8	26.8	22.6	24.5
18:1n-7	3.6	5.8	3.5	4.2	3.5	5.4	3.9	4.3	3.9	4.0
18:1n-5	0.3	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
18:2n-6	4.7	6.4	3.0	3.3	3.2	6.3	4.2	4.8	2.6	3.5
18:2n-4	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2
18:3n-6	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2
18:3n-4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.4	0.3	0.4	0.3	0.4
18:3n-3	0.9	1.0	0.6	0.8	0.6	0.9	0.8	0.8	0.8	0.7
18:4n-3	1.1	0.5	0.7	0.5	0.8	0.6	1.0	0.4	1.0	0.5
20:0	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
20:1n-11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
20:1n-9	2.6	2.7	2.2	2.4	2.3	3.0	3.2	2.7	2.9	2.6
20:1n-7	0.2	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.2
20:2n-6	0.2	0.4	0.2	0.3	0.0	0.4	0.0	0.3	0.3	0.3
20:4n-6	1.3	0.8	1.9	1.1	1.9	0.9	1.7	1.2	1.6	1.1
20:3n-3	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
20:4n-3	0.5	0.6	0.0	0.7	0.4	0.6	0.5	0.6	0.5	0.5
20:5n-3	6.6	4.2	7.1	5.7	6.8	4.7	7.1	5.1	7.4	5.6
22:0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
22:1n-9	1.7	1.2	1.3	1.7	1.4	1.5	2.2	1.8	2.2	1.5
22:1n-7	0.3	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3
21:5n-3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.3	0.2
22:4n-6	0.2	0.3	0.2	0.5	0.0	0.3	0.3	0.4	0.2	0.4
22:5n-6	0.4	0.2	0.6	0.3	0.6	0.2	0.6	0.4	0.5	0.3
22:4n-3	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
22:5n-3	1.3	1.5	1.2	1.8	1.3	1.8	1.4	1.9	1.3	1.8
22:6n-3	17.9	5.7	21.6	15.0	22.3	7.8	15.4	14.2	15.8	14.4
Sat	26.6	24.8	27.5	23.8	29.3	22.2	27.0	23.0	25.9	25.6
Mono	35.8	50.8	32.8	43.3	31.0	50.2	38.1	43.5	39.7	42.1
Poly	37.7	24.4	39.7	32.9	39.7	27.6	34.9	33.5	34.4	32.3
n-3HUFA	28.6	14.1	33.8	25.6	33.3	17.0	27.0	24.3	27.9	24.6

M; muscle, L; liver, HUFA; Highly unsaturated fatty acid(above 20 carbon fatty acid).

Table 5. Fatty acids composition in muscle and liver of rock fish fed graded dietary levels of ascidian extracts during 8 week

Fatty acids	Dietary treatment									
	Control		AE-3		AE-6		AE-9		AE-15	
	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L
14:0	1.4	3.4	1.7	3.2	1.9	2.8	2.0	3.2	2.3	3.7
15:0	0.2	0.5	0.3	0.4	0.3	0.4	0.3	0.4	0.4	0.5
16:0	14.3	18.3	12.5	17.5	17.6	19.0	15.6	19.1	24.1	17.3
16:1n-7	6.8	8.4	6.8	8.0	7.2	7.3	7.5	7.5	0.4	8.4
Iso17:0	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3
16:2n-4	0.6	0.8	0.7	0.7	0.7	0.6	0.8	0.7	1.0	0.9
17:0	0.6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.7	0.6	0.6	0.5
16:3n-4	0.7	0.9	0.8	0.8	0.7	0.7	0.8	0.7	0.8	0.9
16:3n-1	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4
16:4n-1	0.0	0.2	0.1	0.2	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3
18:0	4.5	4.5	7.3	4.4	6.5	4.8	5.9	4.6	5.6	4.2
18:1n-9	38.1	22.6	36.5	21.8	32.6	21.2	29.6	21.4	28.0	21.2
18:1n-7	6.2	4.0	6.4	3.8	5.7	3.8	5.2	3.7	4.9	3.7
18:1n-5	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
18:2n-6	6.0	4.0	5.9	4.7	6.5	4.4	6.2	3.5	6.0	4.3
18:2n-4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2
18:3n-6	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
18:3n-4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.4	0.2
18:3n-3	0.8	1.0	0.8	1.0	0.8	0.8	0.9	0.8	0.9	1.0
18:4n-3	0.4	1.2	0.5	1.2	0.4	0.9	0.5	1.1	0.5	1.2
20:0	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.2
20:1n-11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
20:1n-9	2.6	2.5	2.7	2.9	2.4	2.5	2.9	2.5	2.7	2.9
20:1n-7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
20:2n-6	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2
20:4n-6	0.8	1.2	1.0	1.2	0.8	1.6	0.9	1.5	0.9	1.2
20:3n-3	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
20:4n-3	0.6	0.5	0.6	0.5	0.5	0.5	0.6	0.5	0.6	0.5
20:5n-3	3.8	6.9	3.5	7.3	3.4	6.5	4.6	6.6	4.3	7.0
22:0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
22:1n-9	1.1	1.6	1.2	2.0	1.0	1.6	1.5	0.4	1.5	1.9
22:1n-7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
21:5n-3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3
22:4n-6	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.4	0.2	0.4	0.2
22:5n-6	0.2	0.4	0.2	0.4	0.2	0.5	0.2	0.5	0.3	0.4
22:4n-3	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
22:5n-3	1.7	1.2	1.7	1.2	1.7	1.3	1.9	1.2	1.8	1.3
22:6n-3	5.9	13.3	5.9	14.1	6.3	15.9	8.5	17.2	9.6	14.2
Sat	21.4	27.6	22.7	26.3	27.1	27.9	24.9	28.1	33.3	26.6
Mono	55.2	39.0	53.6	38.4	49.0	36.3	46.7	35.6	37.5	38.1
Poly	23.4	33.3	23.8	35.2	23.9	35.8	28.4	36.3	29.2	35.2
n-3HUFA	14.0	24.4	14.2	25.6	13.9	27.1	17.8	28.3	18.6	25.5

M; muscle, L; liver, HUFA; Highly unsaturated fatty acid(above 20 carbon fatty acid).

제 7 절 미더덕 육에 함유된 항균성 물질의 분리 및 정제

서론

미더덕(*Styela Clava*)은 측성 해초목 미더덕과의 원색동물로서 겉모양이 산 속에 있는 더덕과 비슷하여 '물에 사는 더덕'이라는 의미를 가지며, 천해의 패류나 암초 등에 부착해서 플랑크톤 등 부유물을 섭취하여 살아가는 생물의 일종이다. 몸길이는 5~10cm 정도로 몸은 가느다란 곤봉 모양이고 손가락 만한 황갈색 몸에는 자루가 붙어있고, 자루의 아래쪽은 바위에 붙어 생활하는 자용동체의 동물이다. 입수공과 출수공이 모두 몸의 앞쪽 끝에 있으며, 입수공은 배쪽으로 약간 굽어있고 출수공은 앞쪽을 향해있다. 이전까지 어패류 위주의 양식이 성행하던 시기에 패류 양식장에서는 해적 생물로 취급할 만큼 별로 가치가 없었던 생물이었으나, 외피를 제거하고 깨끗이 씻어 찜 또는 각종 찌개에 넣어 조리하면 미더덕 특유의 향긋한 냄새와 함께 독특한 맛을 내어, 우리나라에서는 예로부터 널리 알려지고 식재료로서 많이 사용되어 왔다.

그러나, 명게 양식이 시작되면서부터 같은 부류의 미더덕의 양식도 가능하게 되고, 이제까지 주목받지 못했던 미더덕과 오만둥이의 양식이 새로운 양식 산업으로 진해만 일대에서 자리 잡게 되었다. 양식 기술의 개발로 미더덕의 생산은 해마다 급증하여 2003년도에 2,047톤이 생산되었으나, 생산량에 따르는 적절한 가공기술이 없어, 미더덕은 단순한 식재료 또는 단순 가공 용도로만 사용되었다. 다행히도 냉동 보관 기술의 도입으로 생산된 미더덕을 보관하면서 수급 조절이 원활하게 되어 년중 미더덕을 먹을 수 있게 되었다.

미더덕을 식용으로 하는 나라는 우리나라 뿐으로서 이에 관련한 연구는 거의 찾아 볼 수 없으며, 식용의 측면에서 가공적성이나 정미성분의 연구 정도가 고작이다(Lee et. al, 1975). 따라서, 생산량의 증가에 따른 새로운 이용 방법이나 기술 개발이 요구되고 있으며, 특히, 부가 가치가 높은 기능성 물질의 탐색이나 생산과 이를 산업화시키는 필요성이 요구되는 실정이다. 한편, 미더덕과 비슷한 명게에서는 halocyanine이라고 하는 boron을 함유한 peptider계의 항균성 물질들이 추출, 정제된 바 있으며(Kaoru et. al, 1990), 그 외 수 종류의 원색동물로부터 항균성 물질이 보고되었다(Crispino et. al., 1994).

따라서, 본 연구에서는 미더덕으로부터 새로운 기능성 물질을 검색, 추출

하여 이용하려 시도하였으며, 그 중 항균성을 가지는 물질을 추출하여 각종 칼럼을 통하여 분리, 정제하였으며, 극성이 강한 한 개의 성분은 NMR, MS 를 통하여 구조를 해명하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 미더덕(*Styela clava*)은 통영시 인근 양식장에서 양식된 미더덕 4.5 kg을 구입하여 껍질을 벗겨 마쇄하여 polyethylene 용기에 넣어 냉동보관 하여 두고 실험에 사용하였다.

항균활성의 측정

항균성 시험에 사용한 균주는 부패균인 고초균(*Bacillus Subtilis*)을 Nutrient Broth에서 증균하여 두었다가 10^6 CFU/mL 농도로 희석한 균 배양액 1 mL를 Plate Count Agar(PCA)에 접종하여 항균성 모니터링에 사용하였다. Lorian(1991)법을 개량하여 각 용매 희분별 활성은 각 용매 희분에서 시료 용액을 일정량 취하여 paper disk(직경 0.8 cm)에 흡습시킨 다음, 이를 건조시켜 고초균 배양액을 넣어 굳힌 PCA petri dish에 부착시킨 후 30°C에서 24시간 배양하여 생육 저지원의 형성 유무 및 크기를 측정하여 항균성을 확인하였다(Fig. 1, 2).

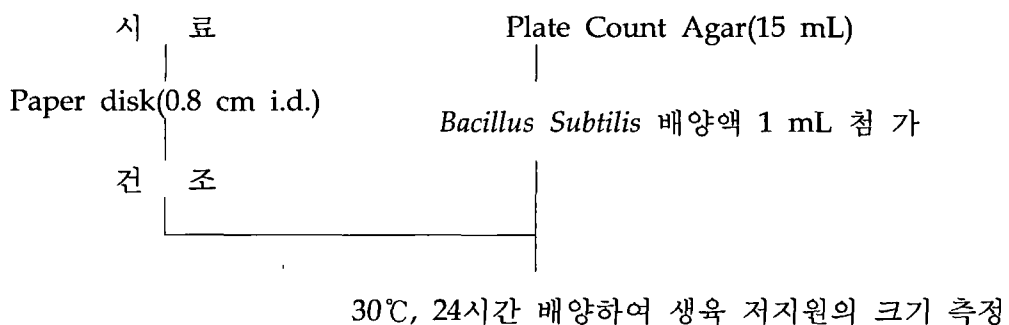


Fig. 1. Antibacterial activity evaluation method by paper disk.

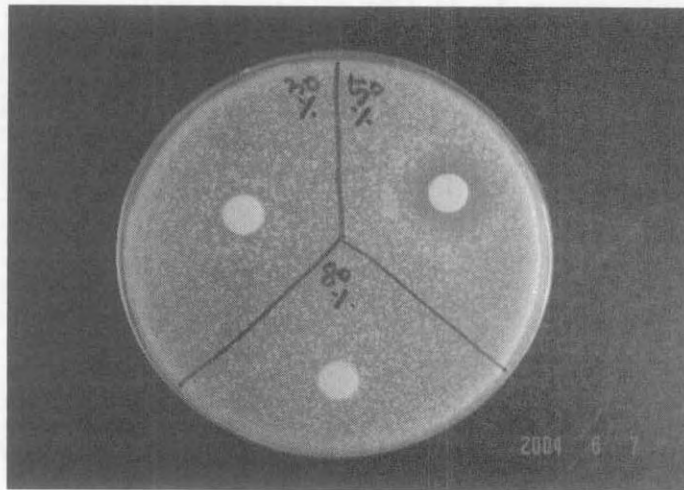


Fig. 2. Antibacterial activity from Mideodeok *Styela clava* extracts.

구조 해석

분리, 정제한 항균물질은 FAB FRIT ESI 법에 의하여 양이온 모드에서 질량분석기(Finniganmat TSQ-700)로 측정하여 분자량을 추정하였으며, 1차원 및 2차원의 각종 NMR(proton, carbon, proton-proton COSY, DEPT, HSQC 및 HMBC NMR) spectrum은 Varian Unity plus 500 NMR Spectrometer(Varian, 500 MHz)로 CD₃OD 용액에서 측정하여 구조를 해석하였다.

항균물질의 추출, 분리 및 정제

항균활성 물질은 분쇄한 시료에 3배량의 acetone을 가하여 추출하고 Toyo No. 2 여지로 여과하였다. 잔사는 acetone으로 2회 더 추출하여 여액을 합한 다음 감압 농축한 후, 동량의 80% MeOH과 Hexane으로 분배하여 Hexane획분을 분취하고, 80% MeOH획분은 순차적으로 Chloroform, BuOH, 수용성 획분으로 분획하였다.

이중 항균성이 있는 Chloroform획분을 염기성 Alumina column (Aluminoxide 90, Merck., 3 cm, id. x 17 cm)에서 1% NH₄OH-MeOH 혼합용매(1:1)로 용출한 다음, Silica column(Kiegel gel 60, Merck., 2 cm, id. x

20 cm), 구상 ODS column(2 cm, id. x 18 cm, Fuji Gel, MeOH, 2 mL/min)으로 순차 정제하였으며, 최종적으로 Develosil ODS-7 column(Nomura Chemical Co., Japan, 1 cm, id. x 25 cm)에서 항균성이 있는 물질을 분리하였다(Fig. 3).

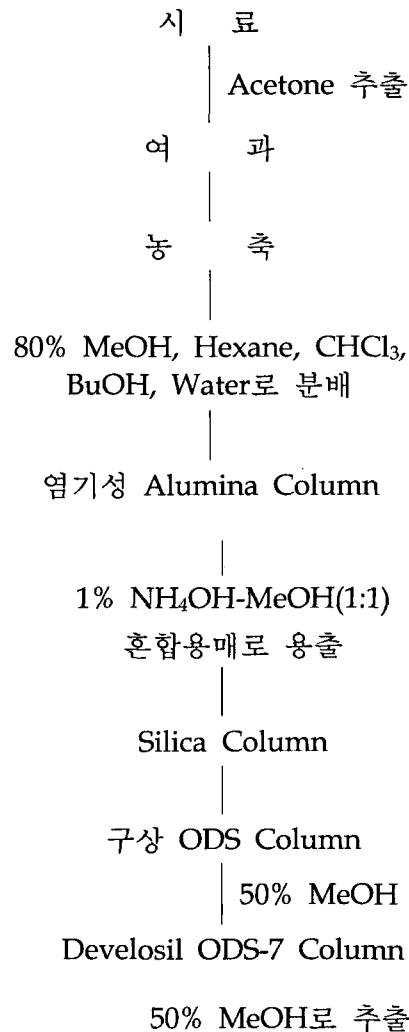


Fig. 3. Extraction, separation and purification of antibacterial substances.

결과 및 고찰

각 획분별 항균활성 및 수율

미더덕의 아세톤 추출물을 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 Hexane, Chloroform, BuOH, 수용성 획분으로 분획하여, 분획한 양의 1/10,000 농도로 항균성을 조사한 결과, Chloroform 획분에서 1.5 cm의 생육저지원이 나타났으나, 나머지 Hexane, BuOH, 수용성 획분에서는 항균활성이 나타나지 않았다.

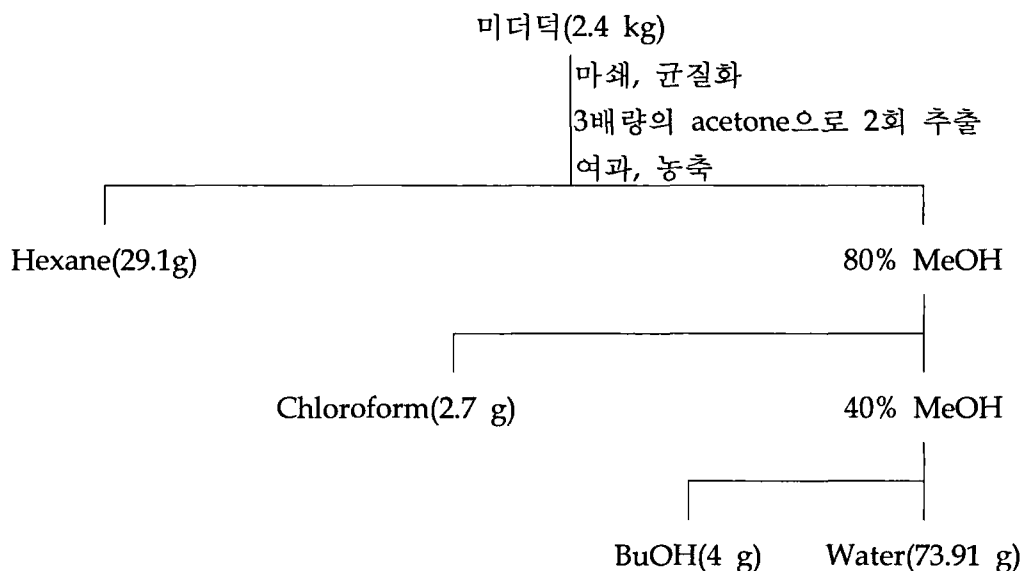


Fig. 4. Liquid-liquid partition of antibacterial substances from Mideodeok.

항균물질의 칼럼 크로마토그래피에 의한 분획 및 활성

항균성을 나타낸 Chloroform획분은 먼저 염기성 Alumina column에서 중성의 CHCl_3 -MeOH(1:1) 용매와 산성 물질을 분리하기 위하여 1% NH_4OH -MeOH(1:1) 혼합용매로 용출하여 항균성을 조사한 결과, 1% NH_4OH -MeOH(1:1) 혼합용매에서 분획한 양의 1/10,000의 농도에서 1.2 cm의 생육저지원이 형성되었다. 이 획분은 감압 농축하여 다시 Silica column상에서 chloroform-MeOH 계의 CHCl_3 , CHCl_3 -MeOH(95:5), CHCl_3 -MeOH(9:1),

CHCl₃-MeOH(7:3), CHCl₃-MeOH(1:1) 및 MeOH로 순차적으로 용출하여 분획한 양의 1/2000의 농도로 항균성을 조사한 결과 CHCl₃-MeOH(9:1), CHCl₃-MeOH(7:3)에서 각각 1 cm, 2.5 cm의 생육 저지원이 나타났다. 항균성을 나타낸 두 획분을 합쳐 구상 ODS column에서 50% MeOH, 75% MeOH, 85% MeOH, MeOH로 stepwise 용출시켜 항균성을 조사하니, 50% MeOH에서 2.3 cm, 75% MeOH에서 1.3 cm, 85% MeOH에서 1.2 cm의 생육 저지원이 나타났다(Fig. 5).

이 중 극성이 가장 강한 50% MeOH 획분은 다시 구상 ODS column에서 30% MeOH, 50% MeOH, 80% MeOH로 용출하였으며, 분획한 각 획분의 1/2000에서 항균성을 조사한 결과, 50% MeOH 획분에서 1.5 cm의 생육 저지원이 나타났으며, 잔사도 1 g 이하로 감소하였다. 따라서, 50% MeOH 획분 1/10 량을 packed column 인 분취용 Develosil ODS-7 column에서 254 nm에서 monitoring 하면서 60% MeOH를 용매로 2 mL 씩 분취하였다. UV 흡수 peak가 나타나지 않을 때까지 분취를 계속하여 총 24개의 획분을 얻었으며, 각 획분별로 항균성을 조사하여 본 결과, 11~14번 획분의 peak에서 항균성이 나타났다(Fig. 6). 따라서, 나머지 잔사량에 대하여도 동일한 방법으로 크로마토그리피를 반복하여 분리정제하였다.

앞의 24개 획분 중 항균성있는 11~14번 획분을 합쳐 Develosil ODS-7 column에서 65% 및 60% MeOH를 용매로 정제하여 peak 1, 2, 3 으로 분취하였고, 이 중 주 peak인 2번을 농축하여 다시 Develosil ODS-7 column에서 60% MeOH로 각각의 항균성을 가지는 peak 2(218.9 mg), peak 3(36.5 mg)을 분리하였다(Fig. 6).

50% MeOH구에서 분리한 peak no. 2 항균성 물질의 구조 해석

- FAB MS분석에 의한 분자량의 추정

Positive mode에서 측정한 FAB MS spectrum에서는 m/z 295에 [M+Na]⁺ 이온이 관측되었고 m/z 311 mass unit에 [M+K]⁺ 이온 peak가 관측되어 항균성 물질 peak no. 2는 분자량 272인 물질로 추정되었으며, 고분해능 MS에서는 m/z 295.0960 mass unit가 관측되어 sodium sulfate기 (-OSO₃Na)를 가지는 C₁₁H₂₁SO₄Na의 분자식을 가진 것으로 추정되었다(Fig. 7). 한편, peak 3의 경우도 peak 2와 동일한 값을 나타내어 동일 물질로 추정되었다.

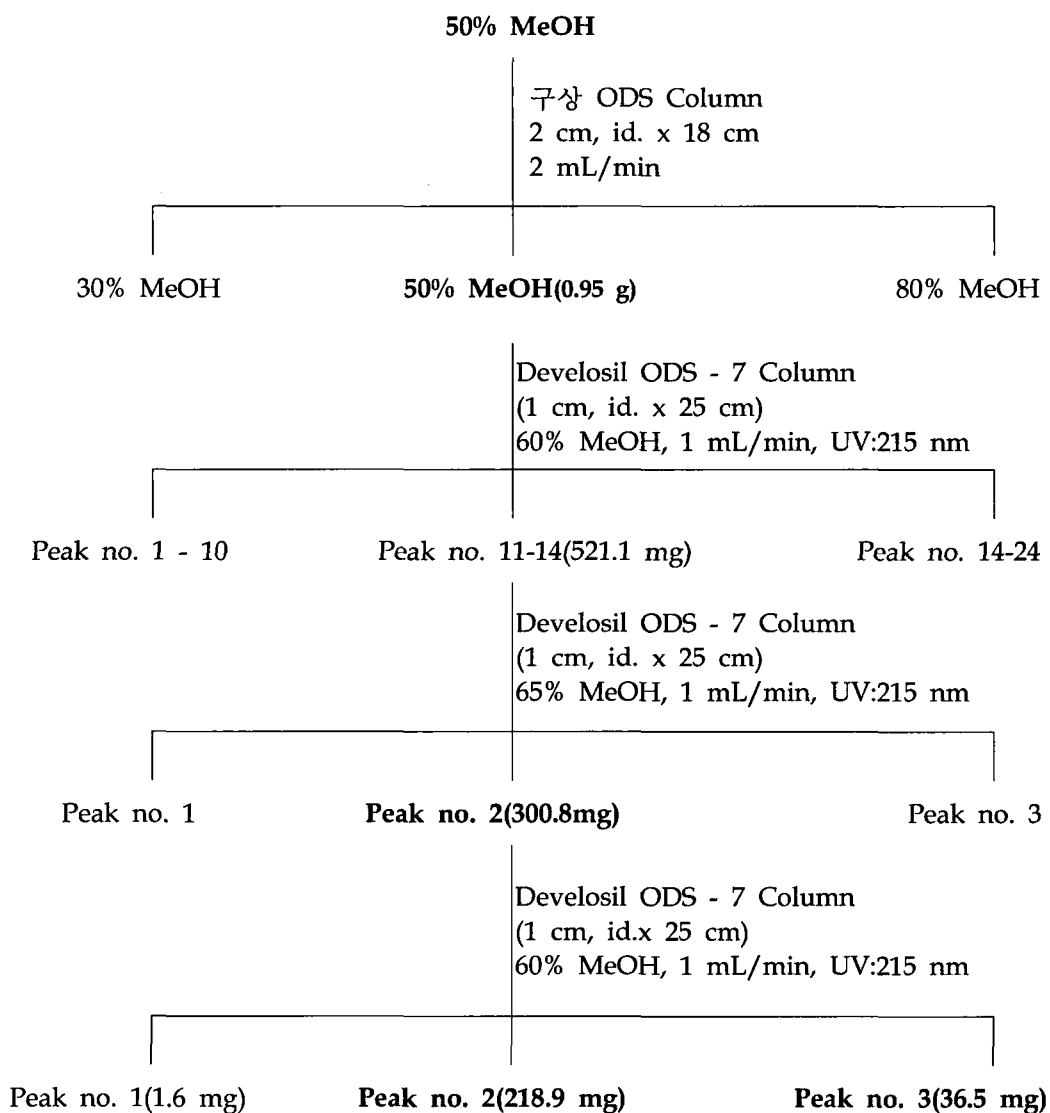


Fig. 6. Isolation procedures of 50% MeOH fraction on the ODS column rechromatography.

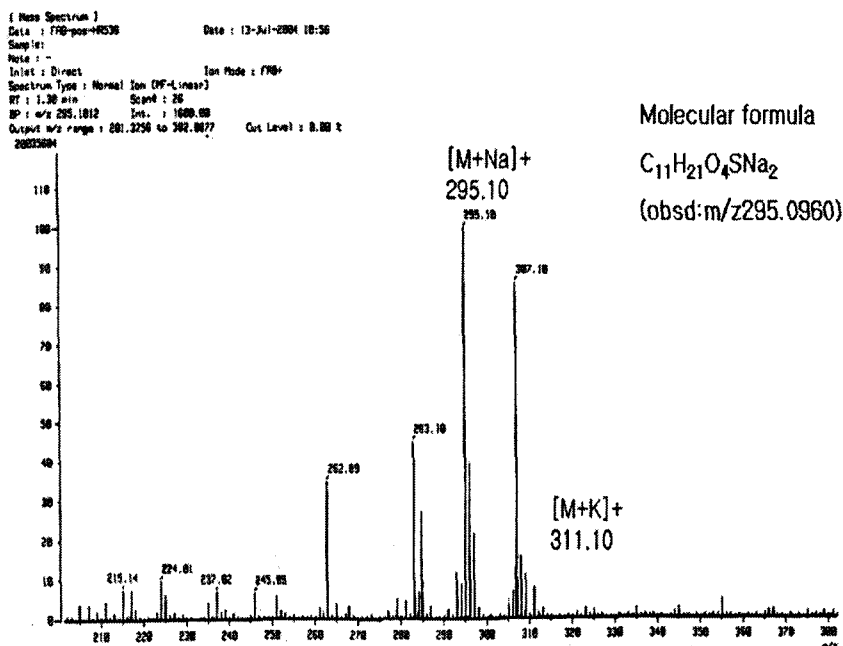


Fig. 7. FAB-MS spectrum of antibacterial substances from the peak no. 2.

- 1H NMR spectrum의 측정

항균성 물질의 1H NMR을 측정하여 Fig. 8에 나타내었다. 용매와 불순물의 signal을 제외한 각 proton의 signal을 저자장 측에서부터 순차적으로 영어 alphabet의 인쇄체 소문자로 나타내었다. Proton signal은 총 10개의 signal이 나타났으며, 적분 값으로부터 계산한 결과 methyl proton($-CH_3$)이 1.63 ppm(s)에 1개, 0.89 ppm에 2개(doublet)로 총 3개(e, i, j)가 나타났으며, methylene proton($-CH_2-$)이 3.94 ppm(t), 2.38 ppm(q), 1.98 ppm(t), 1.41 ppm(q), 1.15 ppm(q) 등 총 5개((b, c, d, f, g, h), methine($-CH=$) proton은 5.19 ppm(t), 1.54 ppm(m) 등 2개(a, f)이었다. 탄소의 수가 11개인 점을 고

려하면, 불포화도가 2로서 2중 결합이 1개 포함되어 있는 것으로 추정되었다.

한편, 고분해능 MS에서 총 21개의 수소가 들어 있는 것과 proton NMR spectrum에서 나타난 proton들을 합하면 총 21개가 되어 이 결과들이 잘 일치하였다.

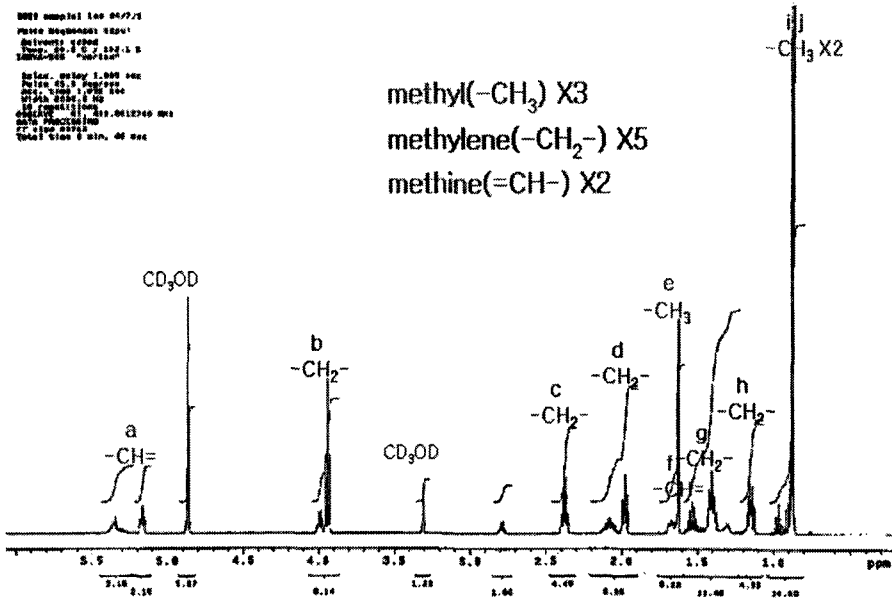


Fig. 8. Proton NMR spectrum(CD₃OD, 500 MHz) of the antibacterial substances.

- ¹³C NMR spectrum의 측정

항균성 물질의 ¹³C NMR을 측정한 spectrum은 Fig. 9에 나타내었다. 탄소는 용매의 탄소를 제외하고 methyl 탄소영역, methyl 탄소영역 methyne 탄소 등 총 11개의 탄소가 관측되었으며, 저자장 측에서부터 alphabet의 대문자로 spectrum에 표시하였다.

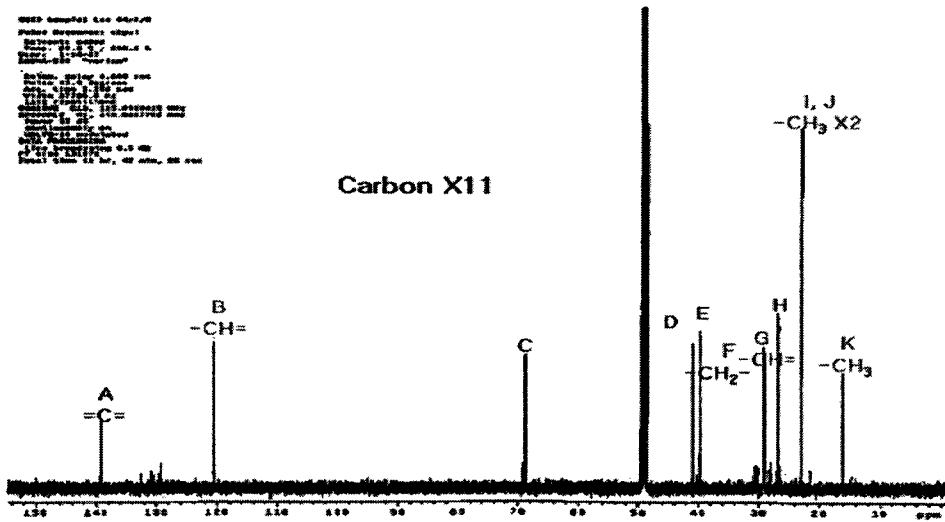


Fig. 9. ^{13}C NMR spectrum of the antibacterial substances.

DEPT spectrum을 측정하여 각 탄소의 결합 상태를 조사한 결과(Fig. 10), 위 부분의 양의 방향으로 나타난 methyne 탄소에 해당하는 signal이 3개가 관측 되었으나 이 중 항균 물질과 관련한 signal은 120.4 ppm과 29.0 ppm에 나타난 2개의 signal 이었다(B, G). 또한, 4 급 탄소에 해당하는 signal이 139.2 ppm에 1개가 관측되었으며(A), methylene 탄소에 해당하는 음의 방향으로 나타난 signal은 총 5개(69.0, 41.0, 39.7, 29.3, 26.9 ppm, C, D, E, F, H) 이었다. 한편, methyl 탄소에 해당하는 signal은 23.0 ppm에 2개, 16.1 ppm에 1개 등 총 3개((K, I, J)의 signal이 관측되었다. 이들 결과는 고분해능 MS에서 11개의 탄소가 되어 있는 것과 잘 일치하였다.

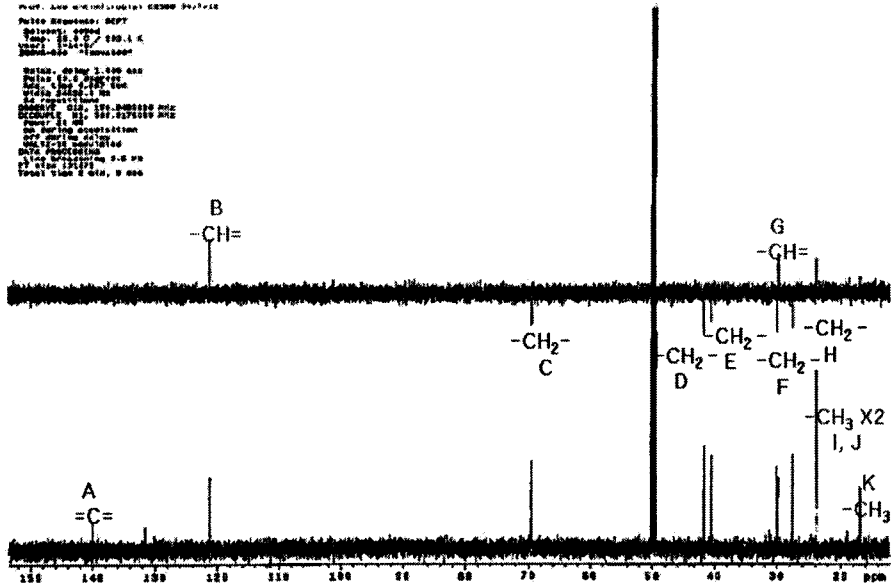


Fig. 10. DEPT NMR spectrum of the antibacterial substances.

- ^1H Detected Single Quantum Coherence(HSQC) spectrum의 측정

Proton과 탄소의 결합 상관 관계를 알아보기 위하여 proton-carbon COSY spectrum(HSQC)을 측정하여 고 자장 영역의 일부를 Fig. 11에 나타내었다. 세로축에 나타낸 a에서 j까지의 각 methine, methylene, methyl 기의 proton signal 들은 가로축에 나타낸 A에서 K까지의 methine, methylene, methyl기 의 탄소 signal 들과 잘 assignment 되었다.

즉, D, E, F, H 탄소들은 각각 d, h, c, g의 methylene proton들과 contour가 나타났으며, G의 탄소는 이에 상당하는 f의 methine protone과 contour가 관측되었다. 또한, I, J 및 K의 탄소들은 각각 이에 결합한 i, j, e의 methyl기 protone과 contour가 관측되어 이들 탄소와 proton들이 결합되어 있음을 확인하였다.

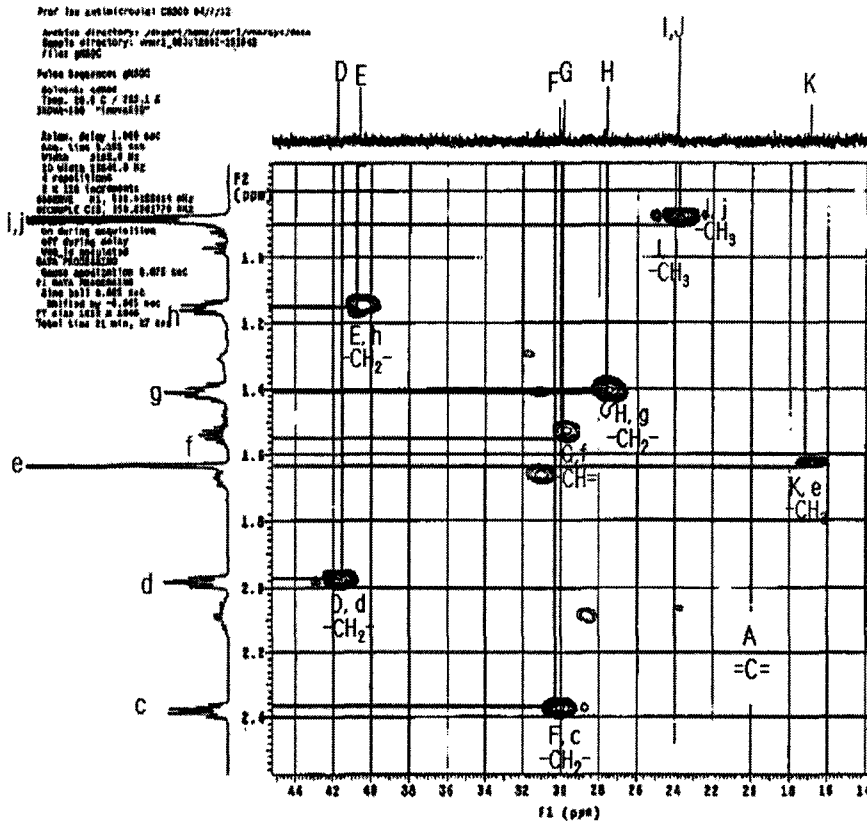


Fig. 11. 항균 물질의 HSQC spectrum of the antibacterial substances.

한편, 120.4 ppm의 methine 탄소 signal은 5.19 ppm의 methine proton과 contour가 관측되어 이 탄소가 methine 탄소임을 확인하였다. 또한, 4급 탄소인 139.2 ppm의 signal은 이와 결합된 proton이 없어 proton NMR의 signal이 없으며, contour도 나타나지 않고 있다.

이와 같이 항균 물질의 HSQC spectrum에 의하여 10개의 각 protone 들이 11개의 각 탄소들과 결합한 구조임을 확인하였다(Fig. 12).

따라서 남아 있는 139.2 ppm의 4급 탄소 A는 이들의 중간에 끼인 탄소로서 추정되어 총 11개의 탄소와 21개의 proton의 구조는 -a-c-b-A-d(e)-g-h-f-(i, j)로 연결되어 있는 구조로 추정되었다.

이 구조로 보아 sodium sulfate기는 a에 결합한 것임을 알 수 있다.

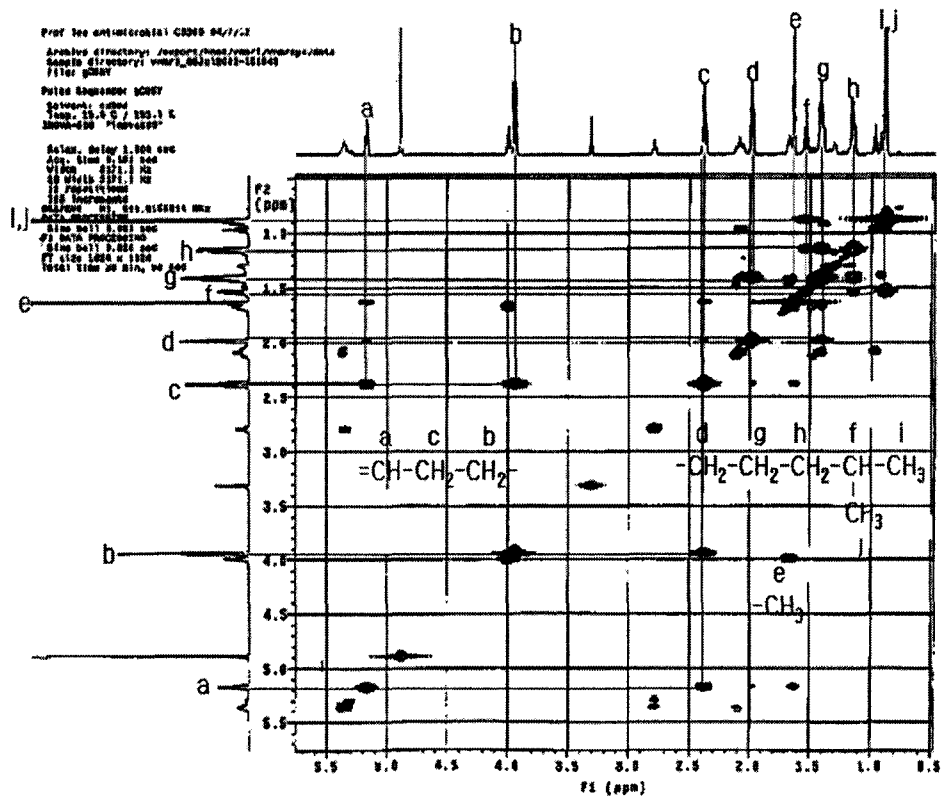


Fig. 13. ^1H - ^1H COSY spectrum of the antibacterial substances.

이들 결과를 토대로 각 proton과 탄소의 NMR spectrum 결과를 요약하여 표 1과 같이 귀속하였으며, 그림 15에 이들 구조식을 나타내었다. 즉, 탄소는 -C-F-B-A(K)-D-H-E-G-(I, J) 로 연결된 구조임을 알 수 있다.

Table 1. Determination of proton and carbon position from the ^1H and ^{13}C NMR spectrum data(CD_3OD , 500 MHz).

Position	Chemical shift(δ :ppm)	
	^1H	^{13}C
1 $-\text{CH}_2-$	3.94(2H, t,t, $J = 6.9$)	69.0(t)
2 $-\text{CH}_2-$	2.38(2H, q,q, $J = 8.4$)	29.3(t)
3 $=\text{CH}-$	5.19(H, t, $J=9.8$)	120.4(d)
4 $=\text{C}=-$	-	139.2(s)
5 $-\text{CH}_2-$	1.98(2H, t,t, $J = 7.0$)	41.0(t)
6 $-\text{CH}_2-$	1.41(2H, q,q, $J = 10.50$)	26.9(t)
7 $-\text{CH}_2-$	1.15(2H, q,q, $J = 12.2$)	39.7(t)
8 $=\text{CH}-$	1.54(H, m, $J = 7.0$)	29.0(d)
9 $-\text{CH}_3$	0.89(3H, d, $J = 6.3$)	23.0(s)
10 $-\text{CH}_3$	1.63(3H, s)	16.1(s)
11 $-\text{CH}_3$	0.89(3H, d, $J = 6.3$)	23.0(s)

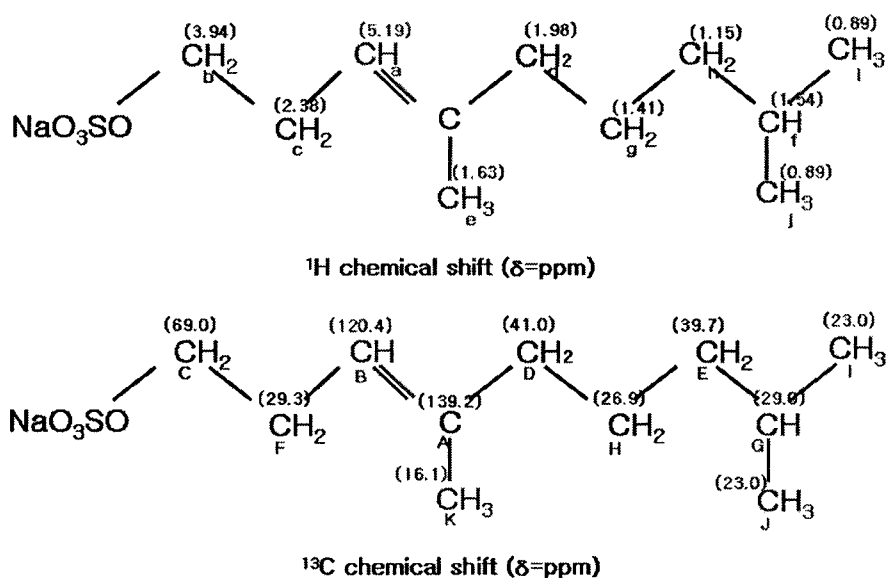


Fig. 14. Structure of the antibacterial substances by proton and carbon.

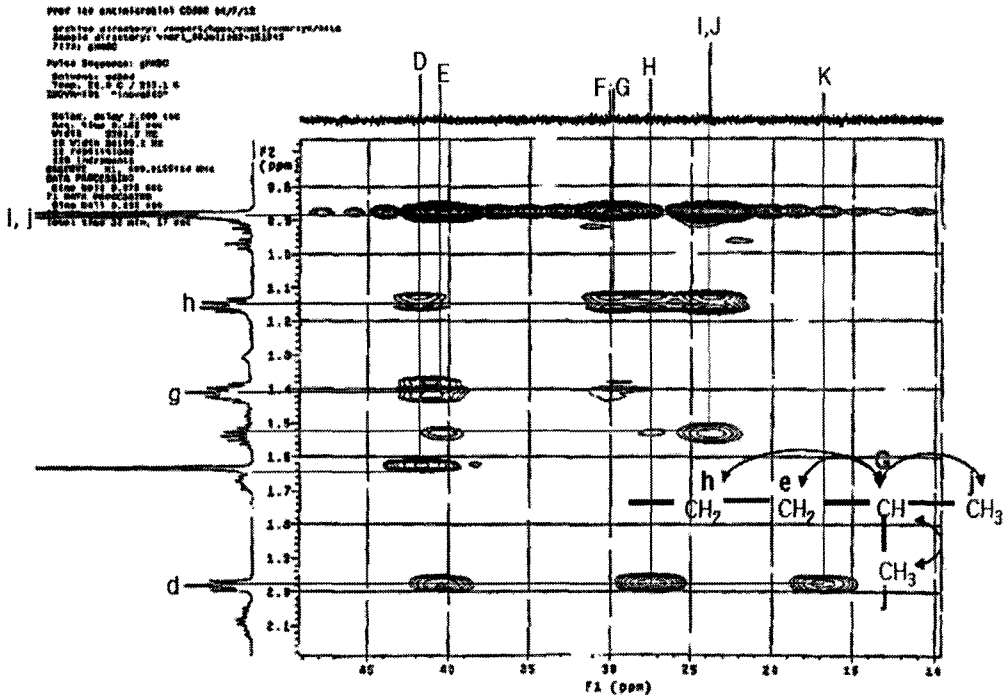


Fig. 15. HMBC spectrum in high resolution field of the antibacterial substances.

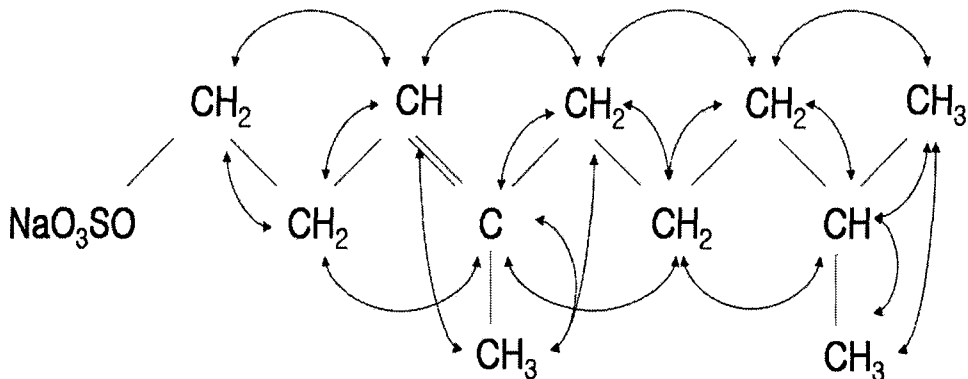


Fig. 17. HMBC spectrum of the antibacterial substances by proton and carbon.

이상의 각종 NMR과 MS spectrum으로부터 이 물질은 이제까지 알려지지 않았던 4,8-dimethyl 3-nonene sodium sulfate의 구조를 가진 새로운 물질로 추정되었다(Fig. 18).

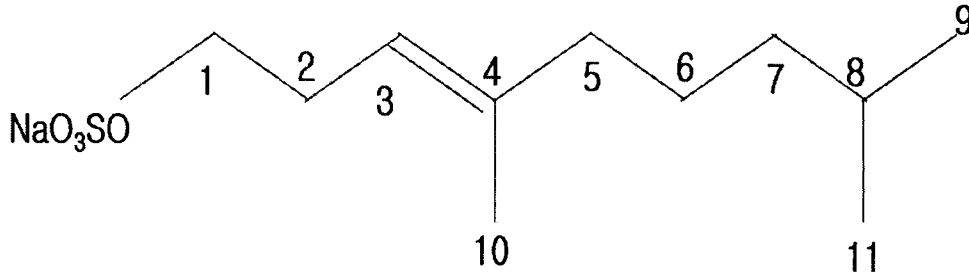


Fig. 18. Structure of 4,8-dimethyl-3-nonene sodium sulfate from Mideodeok antibacterial substances.

요약

미더덕(*Styela clava*)으로부터 유용 물질을 분리하기 위하여 미더덕을 아세톤으로 추출하고 항균성을 조사하여 8개획분에서 항균성이 있음을 확인하였으며, 그 중 구상 ODS 칼럼에서 50% MeOH로 용출된 획분의 항균성 물질을 ODS 칼럼에서 함수 MeOH로 재정제하여 항균 물질 peak no.2 218.9 mg을 부분 정제하였다.

Peak no. 2는 FAB MS 분석 결과, 분자량 272로 확인되었으며, 고분해능 MS에서 $C_{11}H_{21}SO_4Na$ 의 분자식을 확인하였다. Proton NMR 과 carbon NMR에서 각각 이들의 C와 H를 assignment하였으며, HMBC에서 최종적으로 확인 결과, 이 물질은 4,8-dimethyl-3-nonene sodium sulfate라는 새로운 물질임을 확인하였다.

제 8 절 미더덕 육에 함유된 항균성 물질의 평가

서론

해조류를 이용한 건강식품 및 그 기능성 연구는 1950년대 이후 미국, 일본 등에서 활발히 진행되어 왔다(Nisizawa, 1978; 佐藤, 1993). 해조류에 함유되어 있는 항균활성 물질들로서는 할로젠 화합물, diterpene 및 triterpene계 화합물, phenol/tanin류, 지방 산화합물 등이 보고되어져 있으며(Ali et al., 2002; Bennamara et al., 1999; Vairappan et al., 2004; Xu et al., 2003), 이는 항산화활성, 항암, 항충치작용, 항혈액 응고, 항염증활성, 항균활성 및 면역조절작용 등의 다양한 생리활성이 있는 것으로 알려져 있다(Asia et al., 2004; Mayer and Hamann, 2002; Mayer and Hamann, 2004).

1차년도 실험에서는 미더덕(*Styela clava*)의 가식부로부터 항균성 물질을 분리, 정제하여 핵자기 공명 분석 및 질량 분석에 의하여 그 구조가 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate임을 구명하였다(Fig. 1).

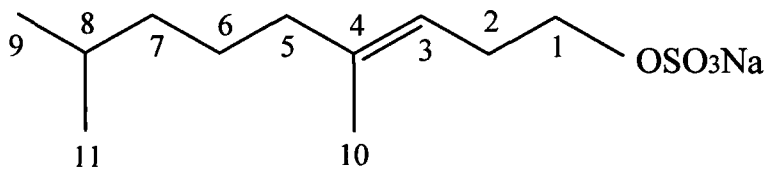


Fig. 1. Structure of 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate.

따라서, 이 항균성 물질을 이용하기 위하여 구조가 확인된 항균성 물질 4,8-dimethyl-3-nonene sodium sulfate의 대량 분리정제 및 분석방법의 개발이 필요하고, 분리 정제된 항균물질의 각종 병원성균, 부패세균 등에 대한 항균성 효능과 안정성 검토가 있어야 하며, 항균물질의 동물에 대한 급성독성 등을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

미더덕(*Styela clava*)은 통영시 연안에서 양식된 것을 구입하여 껍질을 벗겨 가식부 만을 마쇄하여, polyethylene 용기에 넣어 -20℃의 냉동고에 저장하였다가 실험에 사용하였다. 한편, 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate는 미더덕 시료로부터 정제한 것을 NMR 및 MS로 순도를 확인하여 사용하였다. 또, 활성시험에 사용한 각종 균주는 한국종균협회로부터 분양 받은 것을 사용하였다.

항균활성 시험

분리, 정제 과정 중에 항균성을 알아보기 위하여 사용한 균주는 고초균 (*Bacillus subtilis*)으로서 Nutrient Broth에서 24시간 증균 시킨 후 10^6 /mL 농도로 희석한 균 배양액 1 mL를 Plate Count Agar(PCA)에 접종하여 35℃에서 24 시간 배양하여 생육 저지원 형성 유무와 크기를 조사하였다.

항균활성 및 최소 발육 억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)의 측정

대량 분리·정제 시, 미더덕 추출물의 각 용매 희분 별 항균활성은 용매 희분에서 미더덕 10 g 추출물 상당량을 취하여 paper disk에 흡수시키고, 용매를 증발 건조시켜 고초균 배양액과 PCA 배지를 이용하여 만든 페트리디쉬에 부착시킨 후 35℃에서 24시간 배양 후 생육 저지원의 형성 유무 및 직경의 크기를 측정하여 항균성을 확인하였다.

최소 발육 억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)의 측정은 단계별 액체배지 희석법 (Broth dilution method)으로 측정하였다. 즉, 35℃에서 24시간 배양한 균액을 Nutrient Broth(Difco)에 약 10^6 /mL 농도로 접종한 후 멸균된 시험관에 무균적으로 분주하고 각 시험액을 건조하여 증발 잔사의 증량을 측정한 다음 배지 1mL에 대한 정제 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate를 200, 100, 50, 25 μ g/mL 되도록 첨가한 후 35℃에서 24시간 배양하여 균 증식 여부는 spectrophotometer로 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 동일 농도마다 3개의 시험구를 사용하였으며, 또한 첨가되는 용매의 항균력을 배제하기 위하여 모든 시험에는 positive control과 negative control을 각각 사용하였다.

$$\text{항균 활성(\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

추출용매 및 각 용매 획분별 항균활성

마쇄한 미더덕 100 g에 3배량의 acetone, 50% acetone, methanol, ethanol 및 물로 추출 여과하고, 각 추출 용매의 잔사에는 각각 동일 용매로 2회 더 추출하여 여액을 합한 다음 감압 농축한 후, 항균활성을 paper disk법으로 측정하였다(Table 1). 또한, 항균물질이 가장 많이 추출된 acetone을 미더덕 100 g에 각 1, 2, 3, 4, 5배량으로 1, 2, 3회 추출·여과하여 항균활성을 조사하였다.

한편, 각 추출액은 100 mL의 80% MeOH과 동량의 hexane으로 분배하여 hexane 획분을 분취하고, 80% MeOH 획분은 순차적으로 chloroform, BuOH 및 물로 액-액 분배하여 각 획분을 감압 농축 후 항균활성을 측정하였다 (Table 2).

Alumina 및 silica 칼럼 크로마토그래피에서의 항균활성

Acetone 추출물의 chloroform, buthanol 획분을 시료 무게의 20배 정도의 부피가 되도록 염기성 alumina 칼럼(Aluminoxide 90, Merck, 2cm, id. x 17cm)을 조제하여 CHCl₃-MeOH(1:1)과 1% NH₄OH-MeOH 혼합용매(1:1)를 각각 3배량으로 용출시켜 항균활성을 측정하였다. 한편, alumina 칼럼에서 1% NH₄OH-MeOH(1:1)에 용출시켜 농축한 항균성 획분을 시료의 20배 정도 되는 부피의 silica 칼럼(Kiegel gel 60, Merck., 2 cm, id. x 20 cm)을 만들어 CHCl₃, CHCl₃-MeOH(9:1), CHCl₃-MeOH(7:3), CHCl₃-MeOH(1:1) 및 MeOH 용매로 순차적으로 극성을 증가시켜 가면서 용출하여 항균활성을 측정하였다.

구상 ODS 칼럼 크로마토그래피에서의 항균활성

Silica 칼럼에서 항균활성을 나타낸 CHCl₃-MeOH(9:1), CHCl₃-MeOH(7:3) 획분을 시료 무게의 200배 정도 부피의 구상 ODS 칼럼(Fuji Gel, Japan, 1 cm, id. x 12 cm)에서 MeOH 농도를 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%

및 100% 로 각각 증가시켜 가면서 칼럼 부피의 3배량으로 용출시켜 각 획분의 항균활성을 조사하였다.

HPLC에서 활성물질의 용출

ODS-7 칼럼(Nomura Chemical Co., Japan, 1 cm id. x 25 cm)을 부착한 HPLC에서는 60% MeOH를 1 mL/min의 유속으로 215 nm에서 모니터링하면서 용출시켰다. 이 때, 각 2 mL씩을 분취하여 항균 활성을 조사하였다.

항균물질의 대량 추출

미더덕 가식부 10 kg을 3배량의 아세톤으로 1회 추출하여 감압 농축 후, hexane으로 비극성 지질 등을 제거한 다음, BuOH과 물로 분배하여 항균활성을 가진 BuOH 획분의 조추출액을 얻었다. 이 BuOH 획분은 감압 농축 후, 염기성 alumina 칼럼에서 1% NH₄OH-MeOH 용매로 추출하고, 추출액은 농축 후, silica 칼럼에서는 CHCl₃-MeOH(7:3) 혼합 용매로 추출하였다. 용출액은 구상 ODS 칼럼에서 60% MeOH로 추출하여 최종적으로 Develosil ODS-7 칼럼(Nomura Chemical Co., Japan, 1 cm, id. x 25 cm)에서 항균물질을 분리하였으며, 표준물질과의 HPLC 분석을 통하여 동일한 항균성 물질임을 확인하였다.

항균물질의 정량분석

4,8-Dimethyl-3-nonene sodium sulfate의 분석은 Develosil ODS-5 칼럼(Nomura Chemical Co., Japan, 4.6 mm, id.x 250 mm)을 이용하여 75% MeOH-0.01M KH₂PO₄ 완충액(pH 5.0)를 이동상으로 하여 0.8 mL/min 유속으로 흘리면서 215 nm에서 모니터링하면서 HPLC로 분석하였다.

시료의 경우는, 먼저, 시료 1 g에 4.0 mL의 MeOH를 가하여 마쇄하고 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 상등액 1.0 mL를 취하였다. 여기에 증류수 3.0 mL을 가하여 seppak ODS 칼럼에 흡착시키고, 70% MeOH로 용출하여 농축한 다음, MeOH 100 µL에 녹여 10 µL를 HPLC에 주입하여 분석하였다(Fig. 2).

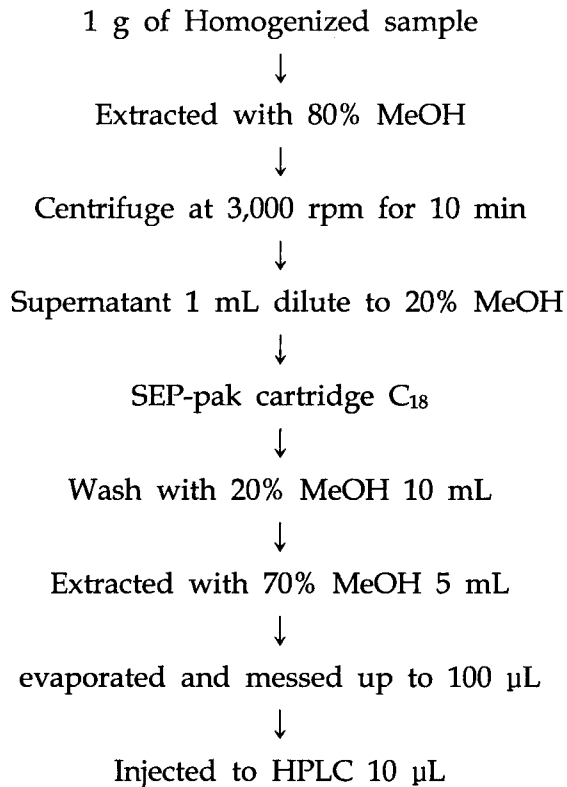


Fig. 2. Clean up procedure for determination of 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate.

pH 및 열 안정성 조사

최소 생육 억제 농도(MIC)로 희석 후 100℃ 가열하면서 2, 6, 9, 24시간에 따른 항균활성과 121℃, 15분과 115℃, 60분으로 고온 고압 하에서 물질 함량을 HPLC로 분석하였다. 한편, pH를 각각 3, 5, 7, 9, 11로 하여 8, 18, 24시간 두었을 때의 활성물질 함량을 HPLC로 확인하였다.

항균물질의 각종 세균에 대한 항균성 조사

최소 생육 억제농도(MIC)로 희석 후, 각종 그람 양성 및 음성의 부패균,

병원성균, 효모, 곰팡이 등에 대한 항균활성을 희석법으로 조사하였다(Table 3). 각 그람 양성균과 그람 음성균은 Nutrient Agar에서 증균 시킨 후 Nutrient Broth에서 최적 배양 온도에서 24시간 배양하여 실험에 사용하였고, 효모균은 YM Broth(Difco)에서 배양하여 실험에 사용하였다.

항균물질의 마우스에 대한 급성 독성 조사

시료 일정량을 1% tween 60 용액 1 mL에 현탁시키고, 체중 18 g의 ICR 계 수컷 마우스(3주령) 3마리에 각각 복강 주사하여 24시간 이내에 사망 여부를 조사하였다.

결과 및 고찰

추출용매의 선정

미더덕 가식부는 수분 함량이 93.0%, 회분이 3.1% 이었으며, 유기물 함량은 3.9%를 나타내었으며 항균성 물질은 극성의 sulfate 화합물이다. 따라서, 극성이 강하고 물과 무한대로 잘 섞이는 용매들로 추출하는 것이 좋을 것으로 추정된다. 따라서, 마쇄한 미더덕 100g을 3배량의 acetone, 50% acetone, MeOH, EtOH, 및 물로 각각 3회씩 추출하여 농축한 다음, 10g 상당량의 추출물의 항균 활성을 조사하였다. Table 1에 나타낸 바와 같이 물로 추출한 것을 비롯하여 모든 용매에서 항균 활성이 나타났으나 acetone으로 추출한 것이 가장 항균 활성이 높았다.

또한, acetone 추출의 경우, acetone의 농도를 얼마로 하는 것이 좋은지를 알아보기 위하여 시료에 대한 acetone 량을 1, 2, 3, 4, 5배량씩 가하여 추출하였을 때는 3배량까지는 항균 활성이 증가하였으나, 그 이상에서는 비슷하였고, acetone으로 1회 추출하고 난 잔사를 2회, 3회 추출한 희분에서는 항균 활성이 나타나지 않았다. 이상의 결과를 종합적으로 검토하여 볼 때, 항균 활성 물질의 추출 효율이 가장 클 뿐 아니라 여과 및 농축의 용이성, 경제성 등을 고려한다면, 항균 물질의 추출 용매는 acetone이 가장 적합하였으며, 용매량은 시료의 3배량으로 1회 추출하는 것이 적합하다고 판단되었다.

액-액 분배조건

미더덕 가식부를 acetone 용매로 추출하여 추출물을 80% MeOH와

Table 1. Antimicrobial activity of different solvent extracts

Solvent	Inhibitory activity*	Residue(g)
Acetone	+++	2.10
50% Acetone	++	1.44
MeOH	+	1.79
EtOH	++	2.89
Water	++	3.46

* Diameter of inhibition zone. + : below 1.3 cm, ++ : between 1.3 cm and 1.6 cm, +++ : over 1.6 cm.

hexane으로 분배하여 hexane 획분을 분리하고 80% MeOH 획분은 다시 농축하여 40% MeOH와 chloroform으로 분배하여 chloroform 획분을 분리하였다. 40% MeOH 획분은 농축하여 BuOH와 물로 분획하여 각각 BuOH 획분과 물 획분으로 분리하였다. 이렇게 얻은 hexane, chloroform, BuOH 및 물 등 4개 획분의 항균 활성을 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다. 비극성의 hexane 획분과 극성인 물 획분에서는 항균활성을 나타내지 않았으며, 물 획분에서는 다량의 염이 석출되었다. 항균활성은 한 가지 용매 획분에만 존재하지 않고 chloroform 획분과 BuOH 획분의 두 획분으로 나누어졌으며, 항균활성도 비슷하였다.

따라서, 용매 분획의 경우는, 먼저 hexane으로 분배하여 비극성의 중성 지질 등을 제거하고 극성이 강한 BuOH로 항균성 물질을 추출하는 것이 효율적이라고 판단되었으며, 최초 추출물의 잔사량도 80% 이상 제거되었다.

칼럼 크로마토그래피에 의한 분리정제 조건

활성이 큰 acetone 추출물과 50% acetone 추출물의 chloroform, BuOH 획분을 염기성 alumina column을 통과시킨 결과, 중성의 CHCl₃-MeOH(1:1) 용출 획분에서는 항균물질이 용출되지 않았으며, 염기성의 1% NH₄OH-MeOH(1:1) 혼합용매에서 항균물질이 용출되었다. 1% NH₄OH-MeOH(1:1) 혼합용매를 1, 2, 3, 4, 5배량까지 용출시켜 각 획분의 항균활성을

조사한 바, 3배량까지 항균성이 나타났다. 따라서 염기성 alumina column에서 항균성의 sulfate 물질을 흡착시키고 먼저 중성의 CHCl₃-MeOH(1:1) 용

Table 2. Antimicrobial activity in different fraction of partition

	Hexane (567.6 mg)	Chloroform (122.6 mg)	BuOH (191.7 mg)	Water (3,960.0 mg)
10 g equivalent	-	+++	+++	-
5 g equivalent	-	++	+	-
2.5 g equivalent	-	++	-	-
1.25 g equivalent	-	+	-	-
0.625 g equivalent	-	-	-	-

* Diameter of inhibition zone. - : 0 cm, + : below 1.3cm, ++ : between 1.3 cm and 1.6 cm, +++ : over 1.6cm

매로 column에 흡착되지 않는 물질을 제거시키고 1% NH₄OH-MeOH(1:1) 혼합용매 4배량으로 용출하는 것이 효과적이었다.

한편, silica column상에서는 칼럼 부피의 3배량 상당량의 CHCl₃, CHCl₃-MeOH(9:1), CHCl₃-MeOH(7:3), CHCl₃-MeOH(1:1) 및 MeOH로 순차적으로 용출하여 추출물의 10 g 상당량으로 항균성을 조사한 결과 CHCl₃-MeOH(9:1), CHCl₃-MeOH(7:3)에서 나뉘어 각각 1.0 cm, 2.5 cm의 생육 저지 원이 나타났다. 따라서 silica 칼럼에서는 3배량의 CHCl₃-MeOH(7:3) 용매로 용출시키는 것이 적합한 것으로 나타났다.

구상 ODS 칼럼에서의 용출 조건

Silica 칼럼에서 항균성이 나타난 CHCl₃-MeOH(9:1), CHCl₃-MeOH(7:3) 두 획분을 합하여 구상 ODS column에서 20, 50, 60, 65, 70, 85% MeOH 및 MeOH를 각각 칼럼 부피의 3배량씩 순차적으로 용출시켜 항균성을 조사한 결과, 50% MeOH에서부터 85% MeOH 획분에 이르기까지 각 획분 모두에서

항균성이 나타났다. 그러나 HPLC 정량 분석 조건에서 분석한 결과, 50% 및 60% MeOH 획분에서만 표품과 용출 시간이 일치하는 항균물질의 피크가 정량되었으며 65% 이상의 MeOH 획분은 다른 물질로 추정되었다. 따라서 구상 ODS 칼럼에서는 시료 무게의 200배 정도 되는 부피의 칼럼에서 20% MeOH로 칼럼을 세척 후 3배량의 60% MeOH로 추출하는 것이 적당한 것으로 확인되었다.

ODS 칼럼을 이용한 HPLC에서의 용출

Develosil ODS-7 칼럼(Nomura Chemical Co., Japan, 1 cm id. x 25 cm)을 부착한 HPLC에서는 60% MeOH를 1 mL/min의 유속으로 215 nm에서 모니터링하면서 용출시켰을 경우, 항균 물질은 25분~32분 사이에 용출되었다.

대량 분리정제 조건의 설정 및 분리정제

이상의 각종 액-액 분배 및 칼럼을 이용하여 미더덕 가식부 10 kg을 Fig. 3과 같은 방법으로 대량 정제하여 395.7 mg의 항균 물질 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate를 분리 정제하였다(수율 0.0023%).

항균물질의 정량분석

ODS 칼럼을 부착한 HPLC에서 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate의 정량 분석 조건은 pH 5.0의 인산 buffer를 이용하였다. 다른 방해물질과의 분리도 및 분리 시간 등을 고려하여 Develosil ODS-5 칼럼(Nomura Chemical Co., Japan, 4.6 mm, id. x 250 mm)을 사용하였으며, 75% MeOH-0.01M KH_2PO_4 완충액(pH 5.0)를 0.8 mL/min 유속으로 흘리면서, 215 nm에서 모니터링 하였다. 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate 표준물질은 6.8분대에 양호한 피크로 검출되었으며(Fig. 4), 검출 한계는 10 ng(S/N = 3배) 이었다. 또한, 0.01 μg , 0.1 μg , 0.2 μg , 0.5 μg , 1 μg , 2 μg 에 대해 3회 분석한 값으로 농도에 따른 peak 면적비를 이용하여 검량선을 작성한 결과 상관계수(r^2)가 0.993으로 양호한 직선을 나타내었다(Fig. 5).

Styela clava (17 kg, edible part 10 kg)

Homogenized
Extracted with Aceton (1st, 3 volumes)
Filterated and evaporated

Hexane
(36.7 g)

80% MeOH
(303.1 g)

BuOH
(15.4 g)

Water

Alumina column(Aluminoxide 90, Merck) 3.5 cm, id. x 67 cm

CHCl₃:MeOH(1:1)
(2.7 g)

1% NH₄OH:MeOH 4 vol.
(5.2 g)

Silic acid column(Kiegel gel 60, Merck) 3.5 cm, id. x 67 cm

CHCl₃
(13.6 mg)

CHCl₃:MeOH(7:3)
(4376.7 mg)

CHCl₃:MeOH(1:1)
(1,332.1 mg)

MeOH
(312.0 mg)

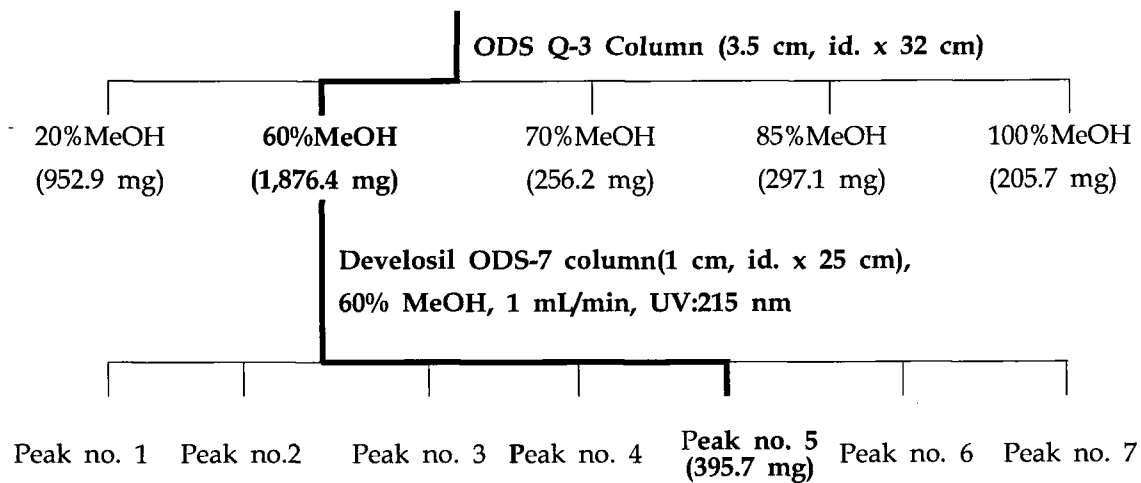


Fig. 3. Isolation procedure of 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate from tunicate.

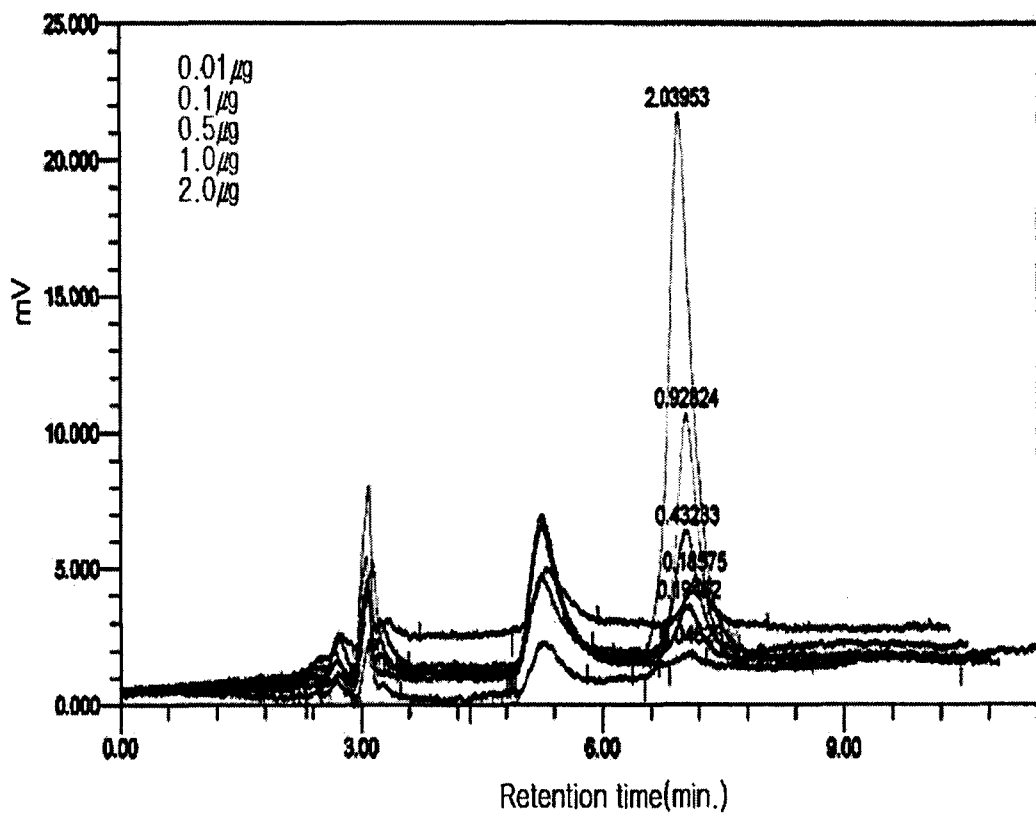


Fig. 4. HPLC chromatogram of authentic 4,8-dimethyl 3-nonene sulfate. Develosil ODS-5(0.46x25cm, Nomura chemical), 75% MeOH-0.01 M KH_2PO_4 buffer(pH 5.0), 0.8 mL/min, UV 215 nm.

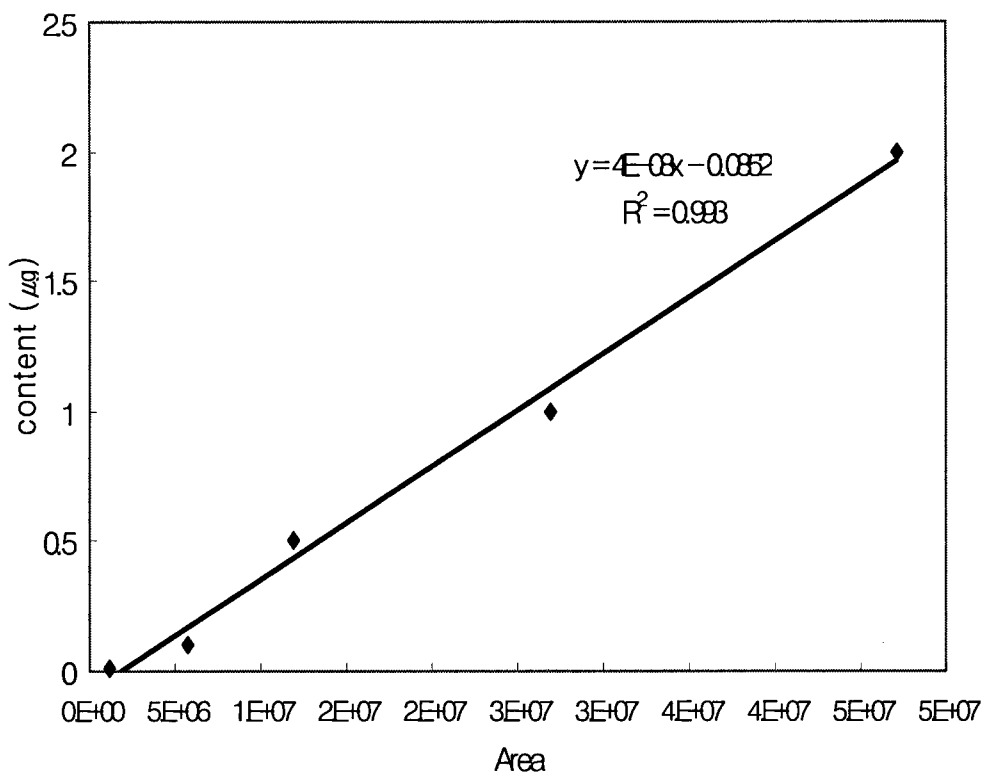


Fig. 5. Calibration curve of 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate.

시료의 경우는, 대량 분리 정제 방법에 준하여 먼저, 시료 1 g에 4.0 mL의 MeOH를 가하여 마쇄하고 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 상등액 1.0 mL를 취하였다. 여기에 증류수 3.0 mL을 가하여 seppak ODS 칼럼에 흡착시키고, 70% MeOH로 용출하여 농축한 다음, MeOH 100 μ L에 녹여 10 μ L를 HPLC에 주입하여 분석하였다. 이 방법으로 분석한 결과 미더덕 가식부에서는 1 g 당 29 μ g이 함유되어 있는 것으로 나타났다(Fig. 6). 현재, 분석 시료의 추출 및 전처리 방법을 면밀하게 검토 중에 있다.

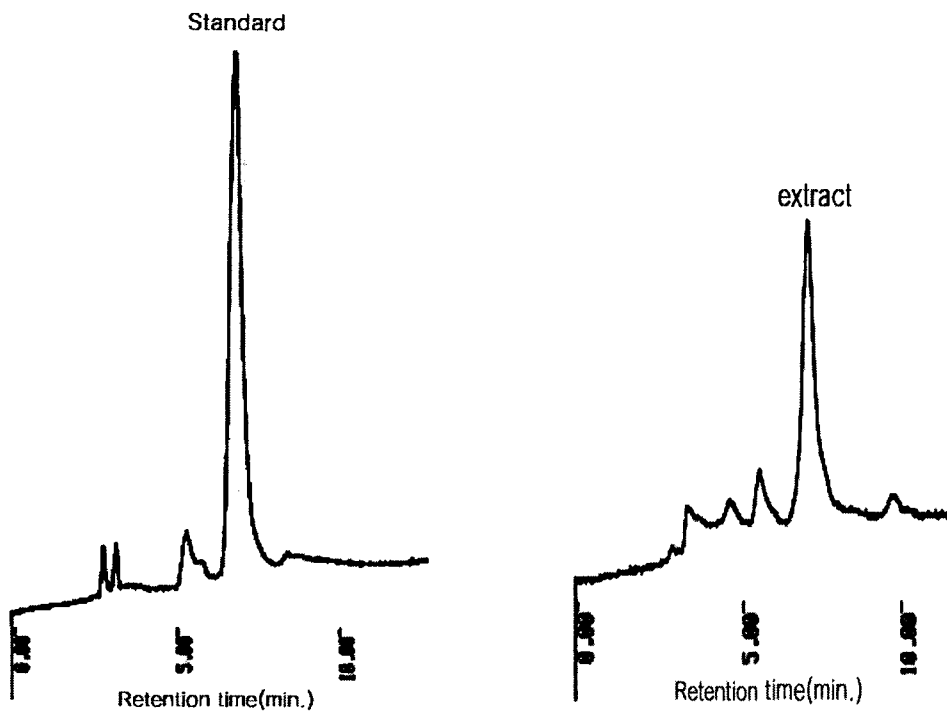


Fig. 6. Chromatograms of 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate and *Styela clava* extract.

MIC 및 각종 미생물에 대한 항균활성

그람 양성균인 *B. subtilis*에 대한 MIC는 nutrient broth 1 mL에 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate를 200, 100, 50, 25 μg 씩 첨가하여 항균성을 실험한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 따라서 *B. subtilis*에 대한 MIC는 100% 저해율을 나타낸 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었으며, 항균력은 매우 약한 편이었다.

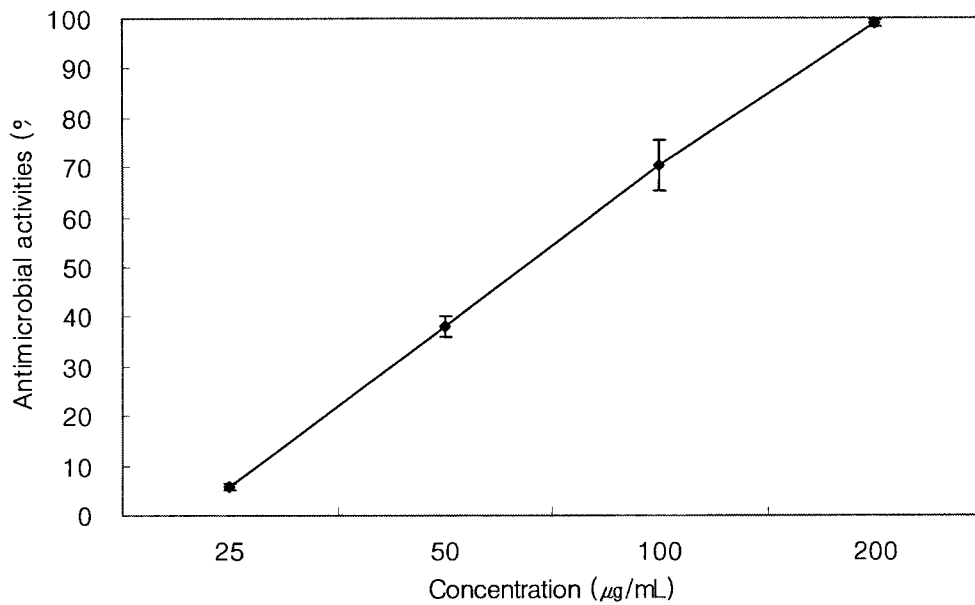


Fig. 7. Antibacterial activity of 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate to *Bacillus subtilis*.

한편, 이 물질의 병원균에 대한 치료제, 식품 방부제, 보존제, 천연 살균제 등으로의 이용 가능성을 알아보기 위하여 각종 미생물을 대상으로 *B. subtilis* 균의 MIC인 200 µg/mL에서 항균 활성을 조사하였다. 오염지표 균인 그람 음성균 *Escherichia coli*에 대하여는 37.3%, 병원성 효모인 *Candida albicans*에서 37.7%, 병원성 곰팡이인 *Epidermophyton floccosum*에 대하여는 35.0%의 항균 활성을 나타냈으며, 그 외의 병원성 세균들에 대하여는 항균 활성이 10% 내외로 나타나 이 물질은 *B. subtilis* 이외의 균주들에 대하여는 항균활성이 훨씬 약한 것으로 나타났다(Table 3).

Table 3. Inhibitory activity of 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate to various microbes

Strain	Inhibitory activity at 200 µg/mL(%)	Broth
<i>Staphylococcus aureus subsp aureus</i> 1928	9.8	NB*
<i>Bacillus subtilis</i> 3014	100.0	"
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 3341	2.0	"
<i>Enterococcus faecalis</i> 3206	0.0	"
<i>Klepsiella pneumoniae subsp pneumoniae</i> 2208	7.4	"
<i>Providencia stuartii</i> 2568	10.4	"
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2513	8.0	"
<i>Enterobacter cloacae</i> 2361	12.6	"
<i>Proteus mirabilis</i> 2510	0.0	"
<i>Escherichia coli</i> 2501	37.3	"
<i>Serratia marcescens</i> 2216	0.0	"
<i>Epidermophyton floccosum</i> 6586	35.0	"
<i>Candida albicans</i> 7965	37.7	YM broth

* NB : Nutrient Broth.

항균활성의 지속시간

항균활성의 지속시간을 알아보기 위하여 MIC 농도로 유지한 배지를 4일간 배양하여 본 결과, 최초 24시간에는 100%의 항균성을 나타내었으나, 48시간 경과 시 69.6%로, 72시간 후 30.1%, 96시간 후에는 0%로 시간이 경과함에 따라 활성이 감소하였다(Fig. 8). 따라서 세균을 죽이는 살균이나 멸균이라기보다 일시적으로 균의 증식을 억제시키는 정균 효과밖에 없는 것으로 나타났다. 이런 결과로 보아 이 물질은 다른 소독이나 살균제로서의 사용은 곤란한 것으로 판단되었다.

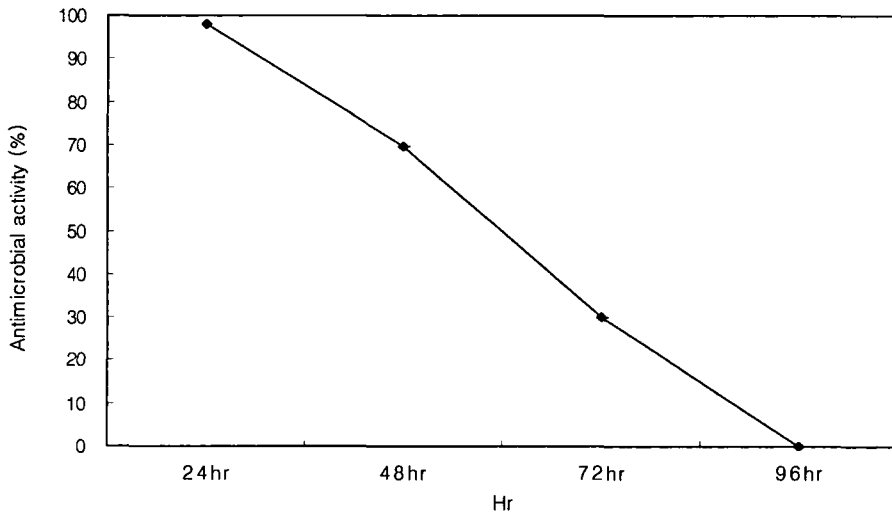


Fig. 8. Changes of Inhibitory activity of 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate.

pH 및 가열에 의한 항균 물질의 안정성

4,8-Dimethyl-3-nonene sulfat은 pH 3, 5, 7, 9, 11로 조절한 용액 중에서 0시간, 8시간, 18시간, 24시간 저장하면서 함량 변화를 조사하여 본 결과 24시간 경과 시에도 함량의 변화는 거의 없었다. 따라서 산이나 염기에서도 안정한 물질임을 알 수 있었다. 한편, 열 안정성 시험에서도 100℃에서 가열시 6시간 까지는 항균 활성이 변화하지 않았으나(Fig. 9), 9시간 경과 시에는 MIC 농도에서 30% 이상 감소하였다.

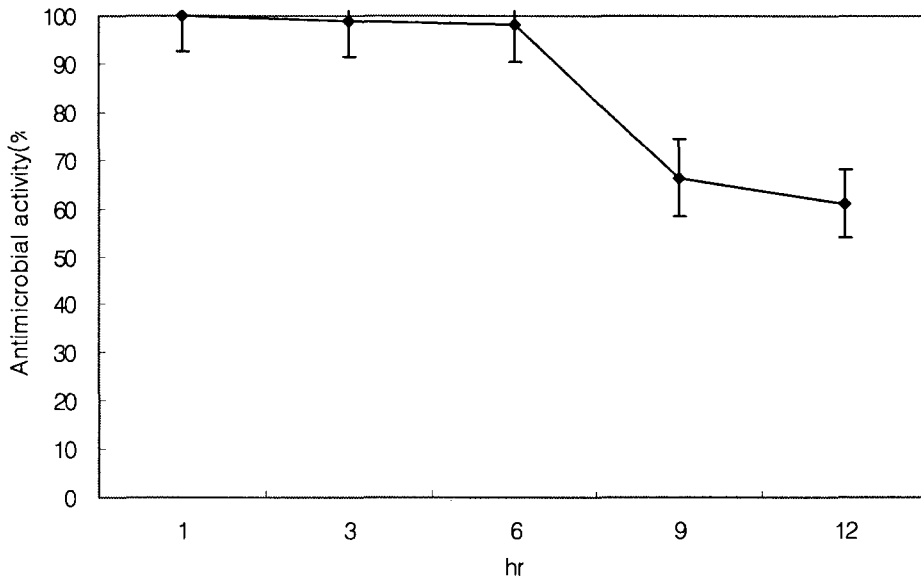


Fig. 9. Changes of Inhibitory activity of 4,8-dimethyl-3-nonene sulfat at 100℃.

일반적인 통조림 등 식품의 살균에 이용하는 115℃에서 60분 가열시 물질의 함량이 다소 감소하였으나(Fig. 10), 배지의 멸균 조건인 121℃에서 15분 가열 시에는 활성 물질의 함량이 거의 변화하지 않아 안정한 것으로 나타났다.

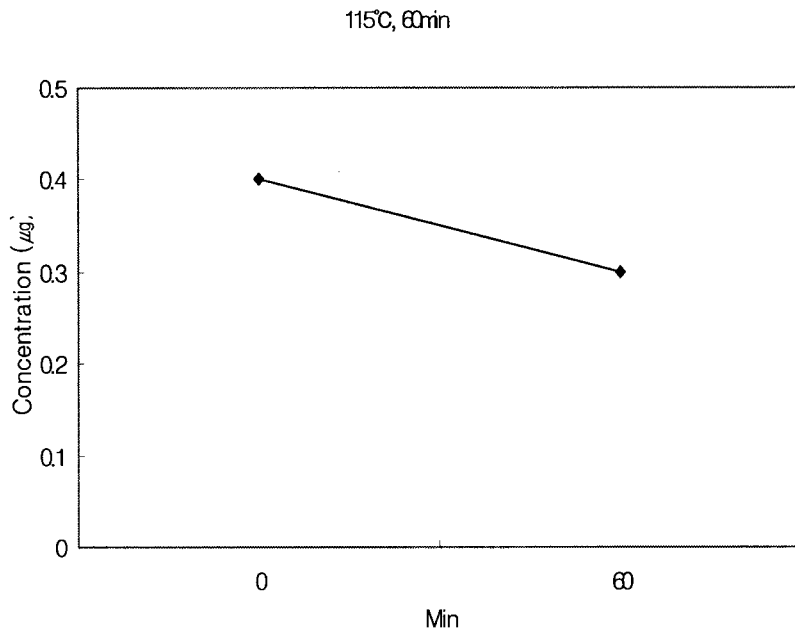


Fig. 10. Changes of Inhibitory activity of 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate at 115°C, 60min.

마우스에 대한 급성 독성

ICR계 수컷 마우스에 대한 급성 독성 시험에서 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate는 5 mg을 18 g 마우스 3마리에 복강 투여 시 24 시간 이내에 모두 사망하였으나 4 mg에서는 사망하지 않았다. 따라서, 약하지만 마우스에 대한 독성은 있는 것으로 확인되었다(LD100 = 1.0 g/kg).

요약

4,8-Dimethyl-3-nonene sulfate의 분리 정제는 미더덕 가식부를 3배량의 acetone으로 추출하여 여과, 농축 후 hexane으로 저극성 물질 제거하고, BuOH로 추출하여 염기성 alumina에 흡착시켜 1% ammonia-MeOH(1:1)로 용출시키고 silica 칼럼에서는 chloroform-MeOH(7:3) 용매로 용출시켜 구상 ODS 칼럼에서 60% MeOH로 용출하여 ODS 칼럼에서 70% MeOH로 분리 정제하는 것이 가능하다. 이 방법으로 분리 정제한 결과 17 kg의 미더덕 으로부터 4,8-dimethyl-3-nonene sulfate 395.7 mg(수율 0.0023%)을 분리 정제하였다. *Bacillus subtilis*에 대한 MIC는 200 µg/mL 이었으며, 그 이외의 그람 양성, 음성 병원성 균 및 효모, 곰팡이에 대하여 이 보다 약한 활성을 나타내었다. HPLC에 의한 정량 분석은 ODS 칼럼에서 0.01 M 인산칼륨 완충액(pH 5.0)-MeOH(25:75)을 용매로 0.8 mL/min 유속으로 흘리며 215 nm에서 모니터링 하여 정량 분석이 가능하며(검출 한계 : 10 ng), 전처리는 80% MeOH로 추출하여 sep-pak 칼럼에서 70% MeOH로 용출하여 분석할 경우 미더덕 가식부에 29 µg/g 함유되어 있었다. 항균 활성은 24시간 이후부터 감소하여 4일 후에는 활성이 완전히 소실되어 살균보다 정균 효과밖에 없었으며, 100°C에서는 6시간까지, 121°C에서 15분 가열하여도 안정하였다. pH 3~11 범위에서는 24시간 두어도 안정하였으며, 마우스에 대한 치사 독성은 LD100이 1.0 g/kg 이었다.

제 9 절 미더덕 껍질에 함유된 glycosaminoglycans의 추출 및 정제

서론

옛 부터 우리나라에서는 미색류(*Halocynthia roretzi*, *Styela clava*) 중 일부가 강장식품으로 알려져 식용되어지고 있다. 미더덕은 가공방법이 개발되지 않아 현재까지 생식으로 소비되며 최근 생산량이 증가하고 특히, 웰빙 소비 형태가 관심을 끌면서 생식 및 냉동의 형태로 가공되어지고 있다. Mauro 등 (1995)은 미색류 껍질에서 추출한 glycosaminoglycans(GAGs)가 포유동물에서 추출한 chondroitin sulfate B(dermatan sulfate)와 비슷한 [4- α -L-IdoA-1 \rightarrow 3- β -D-GalNAc-1]의 기본구조를 가진다고 밝힌바 있으며 또한 유사한 종별로 sulfated polysaccharide의 화학적조성을 밝혔다.

GAGs는 mucopolysaccharides라고 알려졌던 것으로 가지가 없는 긴 다당류 사슬로 된 polysaccharide chain이다. GAGs는 disaccharide가 반복된 구조로 두 sugar 중 하나는 아미노당(N-acetyl-glucosamine이나 N-acetyl-galactosamine)으로 구성되어 glycosaminoglycans(GAGs)라고 불린다. 이러한 GAGs는 sugar 잔기에 황이나 카보닐기(C=O)를 가지므로 음전하를 띄며, sugar 잔기들 간의 결합 형태와 sulfate의 수와 위치에 따라 7가지로 분류하며 chondroitin sulfate가 이에 속한다.

Chondroitin sulfate는 hexouronic acid(glucuronic acid, galacturonic acid)와 hexosamine(glucosamine, galactosamine)이 ester 결합한 것으로 대부분 hexosamine에 sulfate가 결합되어 있는 sulfated polysaccharide이다. Hoffman 등(1958)이 3종류의 chondroitin sulfate A, B, C의 구조를 밝혔으며, 인간과 동물조직 내에 폭넓게 존재한다고 밝혔다. 즉, N-Acetylgalactosamine의 4-O-sulfated된 것이 chondroitin sulfate A(Ch-4S), 6-O-sulfated 된 것이 chondroitin sulfate C(Ch-6S)이며 이들은 연골의 20~40%를 차지한다. Chondroitin sulfate B는 Ch-4S, Ch-6S와는 달리 glucuronic acid 대신에 L-iduronic acid를 함유한다. 성장한 동물의 표피세포에 많이 존재하므로 dermatan sulfate라고도 하며 간경변 시의 섬유화에도 관계하는 것으로 알려져 있다. 이외에 sulfated polysaccharide로 chondroitin sulfate D, E, K, keratan sulfate 그리고 heparan sulfate 등이 있다. 그리고 nonsulfated

polysaccharide로는 hyaluronic acid 와 chondroitin이 있다.

Chondroitin sulfate는 포유동물의 연골은 물론 각 조직과 체액에 이르기까지 널리 분포하고 있으며(Mourao and Dietrich, 1979), 쥐의 늑골, 발생 중에 있는 소의 태아(Sampaio and Dietrich, 1981) 및 사람의 위와 신장조직(Sekino et al., 1977)에서도 발견되었다. 또한, 사람이나 토끼의 혈액이나 뇨(Hata and Nagai, 1978)에서도 분석되었으며, 이 밖에 닭의 태아 각막 상피조직(Yonekura et al., 1982), 상어연골(Nadanaka and Sugahara, 1997), 무척추동물(Cassaró and Dietrich, 1997), 소, 돼지, 오징어 연골 등의 관절연골(Kawai et al., 1966)에서 sulfate를 가진 GAGs이 분리되었으며, 해삼의 세포벽(Vieira, 1991)에서도 새로운 황산다당류가 발견되어 포유동물 이외에서도 고루 분포하고 있음이 확인되었다.

이런 GAGs의 주원료로 현재까지 상어연골, 소의 코뼈(물렁뼈) 등이 사용되고 있었으나 최근 상어의 멸종위기로 인해 포획금지, 소 또한 광우병으로 인해 새로운 대체자원이 필요한 실정이다. 따라서 본 연구는 원료수급 사정상 여의치 않을 경우를 대비하여 폐기되고 있는 미더덕 껍질로부터 양질의 GAGs을 추출하고 정제하여 그 조성을 밝히고, 나아가 산업적 활용을 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 미더덕(*Styela clava*)은 경남 거제시 성포에서 채취하여 20 kg으로 소포장한 후 -24°C 의 냉동고에 저장하여 두고 각 항목의 분석을 위하여 재료를 흐르는 수돗물에서 해동 후 실험에 사용하였다.

GAGs 추출

미더덕 1,000 g 씩 취하여 열수추출과 효소처리를 통해 얻어진 액을 농축하여 95% ethanol 3배를 가하고, 하루 밤 방치시킨 다음 원심분리를 통한 침전물을 동결 건조한 후 GAGs 수율로 나타내었다.

HPLC에 의한 GAGs의 확인

동결 건조된 시료 10 mg을 취하여 0.02 M phosphate buffer(pH 6.5) 25

mL에 용해 후 16,000 g에서 원심 분리하여 얻은 상등액을 HPLC 시험용액으로 사용하였다. 칼럼은 300 × 7.8 mm의 BIOSEP-SEC-S 2000(Phenomenex, CA, USA)을 사용하였고, 흡광도는 UV-VIS detector(Shimadzu SPD-10AVP, Tokyo, Japan)로 210 nm에서 측정하였다. 용매는 0.02 M phosphate buffer (pH 6.5)를 1.0 mL/min씩 흘리면서 분석하였다.

Ion-chromatography에 의한 GAGs의 분리 및 정제

Mauro 등 방법(1995)에 따라 각각의 추출물은 0.5 M acetate buffer(pH 6.0)로 평형화된 DEAE-sepharose CL-6B column(33 × 1.6 cm)상에서 0~1.5 M NaCl로 농도구배를 주어 유속 1.0 mL/min로 254 nm에서 6 mL씩 분취 후 투석하고 농축하여 동결건조 하였다.

고성능음이온교환크로마토그래피(HPAEC-PAD)에 의한 단당류 및 아미노당의 정량

Ion-chromatography에 의해 분리 정제된 획분(F1, F2)은 농도구배 펌프 및 탈기장치가 부착된 BioLC system(Dionex, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하였다. 단당류 및 아미노당의 분석을 위하여 CarboPac PA1(4 × 250 mm)을 사용하였고, 시료 주입량은 10 μ L로 하였다. Pulsed amperometric detection(PAD, Concorde Waters) 검출기에서 18.0 mM NaOH를 용매로 1.0 mL/min씩 흘리면서 분석하였다. 표준의 용출시간과 농도를 비교하여 정량 하였다.

Agarose gel 전기영동에 의한 GAGs의 확인

원시료 및 Ion-chromatography에서 정제된 GAGs를 chondroitinase AC, chondroitinase ABC 등으로 가수분해한 다음 Dietrich and Dietrich 방법(1976)에 따라 0.6% agarose gel(w/v)에서 확인하였다. 0.05 M 1,3-Diaminopropane/acetate buffer(pH 9.0)를 사용하여 3시간 동안 실행하였으며, 0.1% cetyldimethyl ammonium bromide로 고정하였다. 고정된 gel을 acetic acid/ethanol/D.I.W.(0.1:5:5, v/v/v)에 용해된 0.1% toluidine blue로 착색한 후 0.1% acetic acid에서 탈색하여 확인하였다. 사용된 표준품은 chondroitin sulfate A(Sigma Co., St. Louis, USA), chondroitin sulfate B(Sigma Co., St. Louis, USA), chondroitin sulfate C(Sigma Co., St. Louis,

USA)를 사용하였다.

분리 정제된 GAGs의 획분 별 화학적 조성분석

Ion-chromatography를 통해 분리된 fraction 1과 2의 화학적 조성을 분석하기 위해 sulfated glycosaminoglycans 함량 측정을 위하여 metachromasia 법(Richard, 1986), uronic acid 함량 측정을 위하여 Bitter 등 방법(1962)을 수정한 carbazole 법(Frederik et al., 2000), hexose 함량 측정을 위해 phenol-sulfuric acid 법(Frederik et al., 2000), acetylhexosamines 함량 측정을 위해 MBTH(3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride) assay (Frederik et al., 2000), sialic acid 함량 측정을 위해 ferric orcinol assay(Frederik et al., 2000)로 실험하였다. 분석 비교를 위해 사용된 표품으로 phenol-sulfuric acid 분석에는 glucose(Sigma Co., St. Louis, USA), carbazole assay에는 glucouronolactone(Sigma Co., St. Louis, USA), MBTH(Sigma Co., St. Louis, USA) assay에는 N-acetyl-D-galactosamine (Sigma Co., St. Louis, USA), 그리고 sialic acid는 N-acetyl-neuraminic acid(Sigma Co., St. Louis, USA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

GAGs 추출

미더덕 껍질로부터 얻어진 GAGs의 추출은 Anno의 방법(1974)을 기초로 하였다. 열수추출을 위하여 증류수를 시료 량의 10배 첨가하고 121℃에서 2시간 가열한 후 추출액을 얻었다. 얻어진 추출액은 진공농축기에서 Brix 15가 되도록 농축한 다음 약 3배량의 에탄올을 가하여 침전시켰다. 침전된 GAGs는 원심분리하여 에탄올을 제거한 다음 동결건조하여 실험에 사용하였다.

HPLC에 의한 GAGs의 확인

표품 chondroitin sulfate A와 C를 이용한 HPLC 분석한 결과 머무름 시간(7.4min)이 같아 미더덕에서 추출한 GAGs가 chondroitin sulfate를 함유하고 있다는 것을 Fig. 1에 나타내었다.

Ion-chromatography에 의한 GAGs의 분리 및 정제

미더덕 껍질로부터 추출한 GAGs를 ion-chromatography로 정제하여 Fig. 2에 나타내었다. 흡광도 254 nm에서 2개의 fraction(F1, F2)으로 분획되었으며, metachromasia(hexouronic acid)와 carbazole assay(sulfated glycosaminoglycans)로 확인하였다. 분획결과 F2의 sulfated glycosaminoglycans 함량이 높았고, F1의 경우 그 함량이 낮은 것을 확인할 수 있었다. 이후 각 fraction별로 수집, 투석 후 동결 건조된 시료의 각 분획 함량은 F1이 약 60%, F2가 40%였다.

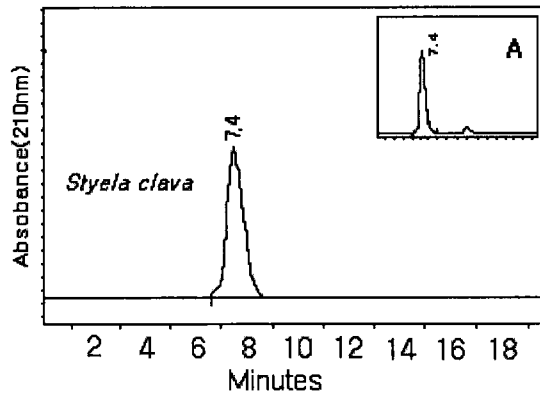


Fig. 1. HPLC analysis of crude GAGs from *Styela clava* tunic. A: Chondroitin sulfate A.

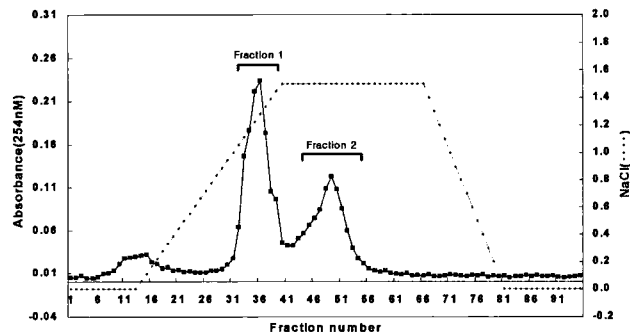


Fig. 2. Ion-chromatogram of the purification of GAGs from *Styela clava* on DEAE-sepharose CL-6B.

고성능음이온교환크로마토그래피(HPAEC-PAD)에 의한 단당류 및 아미노당의 정량

고성능음이온교환 크로마토그래피(HPAEC-PAD, high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection)로 단당류 및 아미노당의 함량을 분석하여 Fig. 3, 4 및 Table 1에 각각 나타내었다. Fig. 3(a)와 4(a)는 F1 및 F2 획분을 단당류 7개의 표품과 비교한 것이고, 3(b)와 4(b)는 아미노당 2개의 표품과 비교한 것이다. 그림에서와 같이 F1에서는 glucose의 함량이 가장 높았으나, F2에서는 galactose 함량이 가장 높게 나타났다. Glucose를 1로 하여 각 성분의 mole 비를 살펴보면(Table 1), F1에서는 glucosamine이 가장 높아 0.25였고, mannose 0.17, fucose 0.09, galactose 0.08이었으나, F2에서는 galactose가 7.28로 가장 높았고, glucosamine 1.06, galactosamine 0.41, mannose 0.27로 전형적인 GAGs의 구성성분을 보여주고 있다.

전기영동에 의한 분리 정제된 GAGs의 확인

미더덕 껍질에서 추출한 crude GAGs와 활성을 갖는 fraction 2(D2)를 표

Table 1. Sugar, amino sugar and sugar acid content of fraction 1 and 2 from Mideodeok tunic extracts

Peak name	Mole ratio	
	Fraction 1	Fraction 2
Fucose	0.09	0.13
Rhamnose	-	0.21
Galactosamine	0.09	0.41
Arabinose	0.06	-
Glucosamine	0.25	1.06
Galactose	0.08	7.28
Glucose	1.00	1.00
Mannose	0.17	0.27

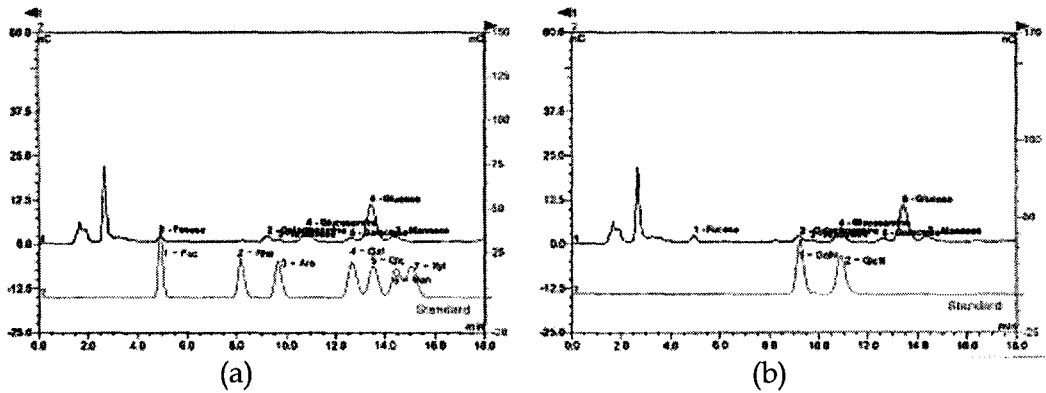


Fig. 3. Sugar(a) and amino-sugar(b) composition of Mideodeok F1. Standard: L(-)fucose, L(-)rhamnose, arabinose, D(+)-galactose, D(+)-glucose, D(+)-mannose, D(+)-xylose, D(+)-galactosamine, D(+)-glucosamine.

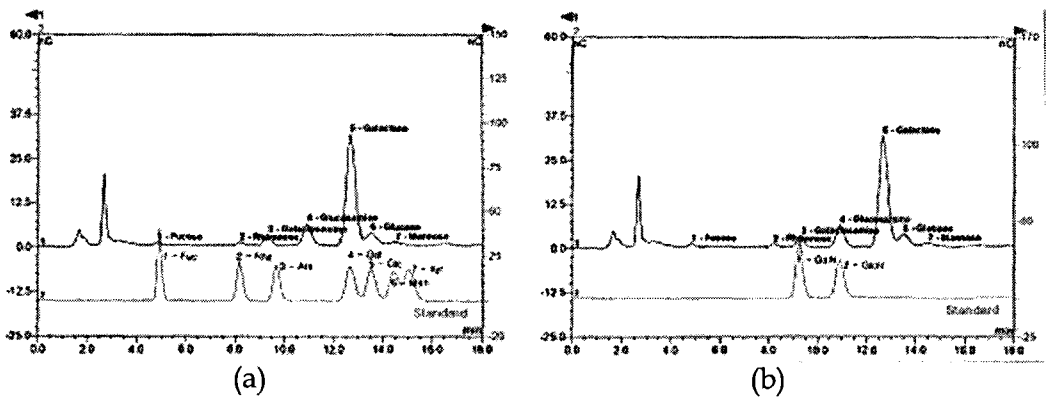


Fig. 4. Sugar(a) and amino-sugar(b) composition of Mideodeok F2. Standard: L(-)fucose, L(-)rhamnose, arabinose, D(+)-galactose, D(+)-glucose, D(+)-mannose, D(+)-xylose, D(+)-galactosamine, D(+)-glucosamine.

품과 동량(~200 µg)으로 전기영동 한 결과는 Fig. 5와 같다. Crude GAGs의 경우 표품 chondroitin sulfate A, B, C, keratan sulfate, hyaluronic acid와 비교 하였을 때, 서로 다른 Rf 값을 보였다. D2 획분과 멩계로부터 추출한 G2 및 G3 획분과 서로 같은 Rf 값은 나타내는 물질이 혼합되어 있는 것으로 나타났다. 분획물의 구성성분을 확인하기 위하여 아미노당 분해효소인 chondroitinase ABC 또는 AC로 처리한 경우 멩계의 G2 획분과 유사한 형태를 보였다.

분리 정제된 GAGs의 획분 별 화학적 조성분석

Ion-chromatography를 통한 분리된 획분의 화학적 조성함량 결과는 Fig. 6과 같다. Phenol-sulfuric acid에 의한 총탄수화물함량 분석결과 fraction 1은 1.7%, fraction 2는 3.0%로 fraction 2의 경우 총탄수화물의 함량이 fraction 2에 비해 2배가량 높은 것을 알 수 있으며, 또한 hexosamine의 함량은 각각 3.1%와 9.1%, uronic acid의 함량은 2.0%와 3.3%이다. 이것은 총탄수화물 함량뿐만 아니라, hexosamine과 uronic acid가 비례적으로 높은 fraction 2가 fraction 1보다 높은 농도의 GASGs를 함유하고 있었으며, GAGs의 hexosamine, hexouronic acid의 구성에 널리 존재하며 혈구응집력을 가진 sialic acid 분석결과 fraction 1은 0.5 mg%, fraction 2는 0.6 mg%로 서로 비슷하게 함유하고 있다는 것을 확인하였다.

핵자기공명분광(nuclear magnetic resonance spectroscopy) 분석

*Sylela clava*에서 추출한 GAGs의 ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy(NMR) 분석결과는 Fig. 7과 같고, 이들의 위치는 Mauro 등 (1995)의 문헌과 비교하여 Table 2에 나타내었다. Fraction 2는 α-L-IdceA-(2SO₄), α-L-IdceA의 존재를 강한 흡수대로 확인하였으나, Fraction 1에서는 약한 흡수대를 가지고 있음을 확인하였다. Fraction 2의 흡수대에서 β-D-GalNac-(2SO₄)에서 H4, 5, 6의 흡수대를 확인할 수 없었으며, β-D-GalNac-(6SO₄)의 H3, 5의 흡수대를 확인할 수 없으나 O-sulfated 영역인 4.14와 4.13 ppm에서 강한 흡수대를 확인하였다. 황산기 치환은 다소 다른 경향을 보이지만 *Styela clava*의 Fraction 2은 α-L-iduronic acid-(1→3)-β-D-galactosamine의 구조를 가진 황산다당류라는 것을 확인하였다.

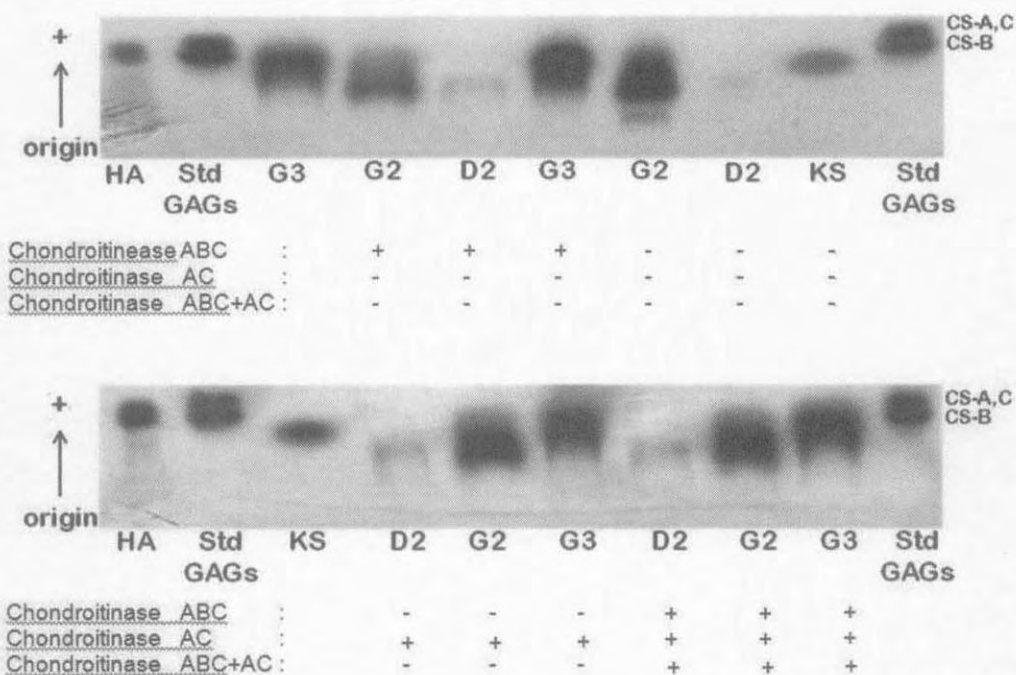


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of the purified glycosaminoglycans from *Styela clava* (D2) and *Halocynthia roretzi* (G2, G3), before (-) and after (+) treatment with Chondroitinase ABC and/or AC. The purified glycosaminoglycans (~200 µg) obtained from DEAE-cellulose column and standards were applied to a 0.6% agarose gel and run for 4 hours at 100 volts in 0.05 M 1,3-diaminopropane/acetate buffer (pH 9.0). The sulfated polysaccharides in the gel were fixed with 0.1% cetylmethylammonium bromide solution. After 8 hours, the gel was stained with 0.1% toluidin blue in acetic acid/ethanol/water (0.1:5:5, v/v). Standards: HA, hyaluronic acid; KS, keratin sulfate; CS-A, B, C, chondroitin sulfate A, B or C

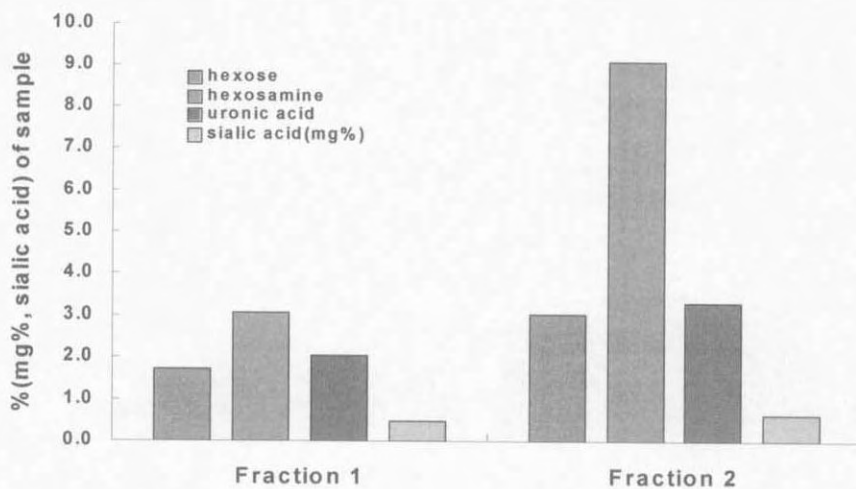
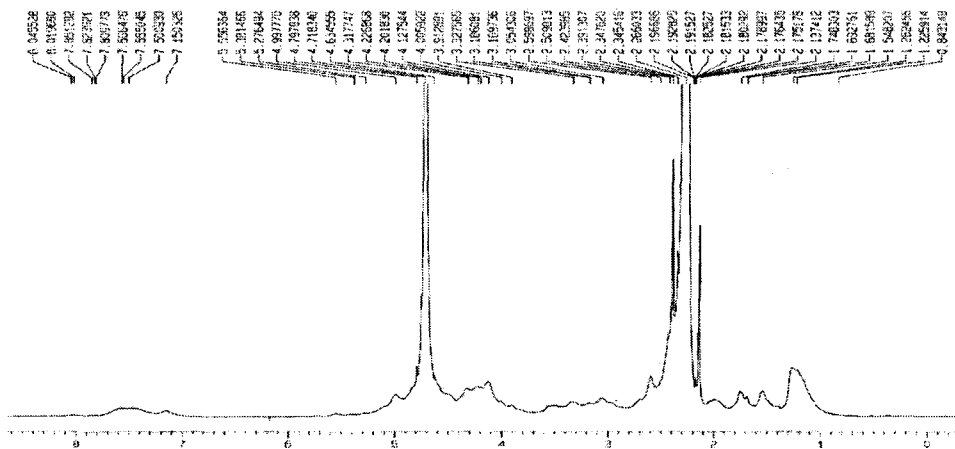


Fig. 6. Chemical compositions of the purified GAGs from *Styela clava* tunic. The purified GAGs fraction 1, 2 obtained on DEAE-sepharose CL-6B was analysed phenol-sulfuric acid assay for hexoses, carbazole assay for uronic acid, MBTH assay for hexosamines, and ferric orcinol assay for sialic acid.

F1



F2

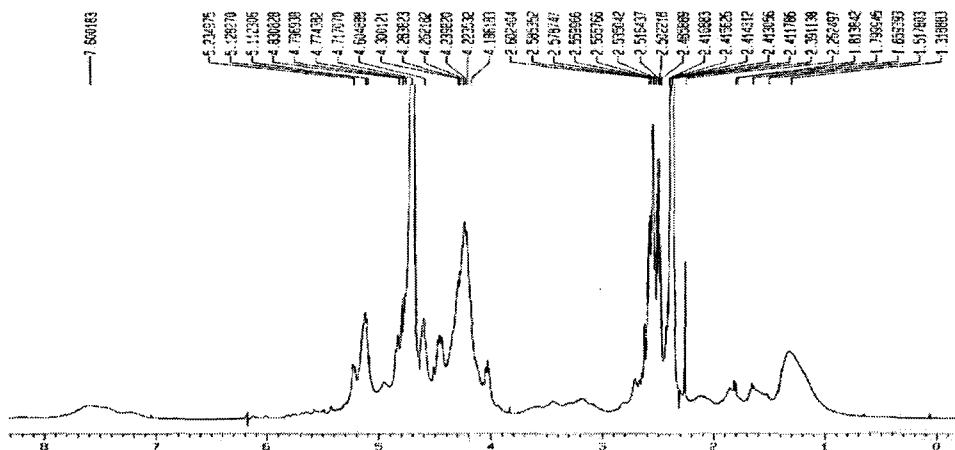


Fig. 7. ^1H NMR spectra at 500 MHz of purified F1 and F2 on ion-chromatography of extracted crude glycosaminoglycans from *Styela clava* tunic. Purified glycosaminoglycans F1 and F2 obtained from the DEAE-sepharose CL-6B column.

Table 2. ¹H NMR spectra at 500 MHz of purified F1 and F2 on ion-chromatography of the *Styela clava* tunic extract

Unit	Protons	Styela Plicata ^a	H pyriformis ^a	Bossenpec et al ^b	Pavao et al ^c	F1 ^d	F2 ^d
α-L-IdceA-(2SO ₄)	H1	5.18	5.16	5.16	5.14	-	5.17
	H2	4.17	4.16	4.17	4.14	-	4.18
	H3	4.21	4.20	4.23	4.32	4.31	4.23
	H4	4.07	4.06	4.06	4.03	4.00	4.02
	H5	4.83	4.82	4.85	4.83	-	4.84
α-L-IdceA	H1	4.90	4.88	4.88	4.90	-	4.94
	H2	3.53	3.51	3.53	3.52	3.51	3.51
	H3	3.95	3.90	3.90	4.06	-	4.06
	H4	4.10	4.10	4.10	4.06	4.12	4.06
	H5	4.72	4.72	4.72	4.80	4.79	4.71
β-D-GalNAc-(2SO ₄)	H1	4.72	4.72	4.70		4.71	4.71
	H2	4.02	4.02	4.05		-	4.02
	H3	4.02	4.01	4.03		4.00	4.02
	H4	4.65	4.64	4.69		4.63	-
	H5	3.73	3.80	3.80		-	-
	H6	3.73	3.79	3.79		-	-
	CH ₃	2.10	2.08	2.08		2.13	2.12
β-D-GalNAc-(6SO ₄)	H1				4.64	4.63	4.60
	H2				4.02	4.00	4.02
	H3				3.86	-	-
	H4				4.15	4.12	4.13
	H5				3.86	-	-
	H6				4.15	4.12	4.13
	CH ₃				2.02	2.00	2.02

^aThis results refer to Mauro et al.(1995), ^bresults refer to Ferro et al.(1990) and ^cresults refer to Mauro et al.(1998). ^dThe purified sulfated glycosaminoglycans each of *styela clava* fraction obtained from the DEAE-sepharose CL-6B column.

요약

열수추출을 위해 121°C에서 2시간 가열하여 추출한 다음 Brix 15가 되도록 농축한 다음 에탄올을 가하여 침전하였다. 시료를 HPLC로 분석하였을 때 chondroitin sulfate A, C와 동일한 분석시간을 나타내어 chondroitin sulfate의 함유 가능성을 나타내었다. Ion-chromatography를 통하여 2개의 획분으로 분리하였고, 분리된 획분은 metachromasia (hexouronic acid)와 carbazole assay (sulfated glycosaminoglycans)로 확인하였다. 각 분획의 함량은 F1이 약 60%, F2가 40%로 구성되어 전기영동을 통하여 chondroitin sulfate가 어떤 형태로 존재하는지 확인한 결과 F1의 함량은 매우 낮았고, F2는 표품과 비슷한 것으로 나타났다. 이온 농도가 높은 F2는 keratan sulfate보다 분자량이 적은 것으로 나타났다. Phenol-sulfuric acid에 의한 총탄수화물함량 분석 결과 F1은 1.7%, F2는 3.0%로 F2의 경우 총탄수화물의 함량이 F1에 비해 2배가량 높은 것을 알 수 있었으며, 또한 hexosamine의 함량은 각각 3.1%와 9.1%, uronic acid의 함량은 2.0%와 3.3%이었다. GAGs의 sialic acid 분석결과 F1은 0.5 mg%, F2는 0.6 mg%로 서로 비슷하게 함유하고 있었다. F2는 α -L-IdceA-(2SO₄), α -L-IdceA의 존재를 강한 흡수대로 확인하였으나, F1에서는 약한 흡수대를 가지고 있음을 확인하였다. F2의 흡수대에서 β -D-GalNAc-(2SO₄)에서 H4, 5, 6의 흡수대를 확인할 수 없으며, β -D-GalNAc-(6SO₄)의 H3, 5의 흡수대를 확인할 수 없으나 O-sulfated 영역인 4.14와 4.13 ppm에서 강한 흡수대를 확인하였다. 황산기 치환은 다소 다른 경향을 보이지만 *Styela clava*의 F2는 α -L-iduronic acid-(1→3)- β -D-galactosamine의 구조를 가진 GAGs라는 것을 확인하였다.

제 10 절 세포주에 대한 미더덕 GAGs의 세포독성 효과

서론

최근 노화를 비롯한 신경퇴행성질환, 심혈관계질환, 암 및 각종 성인병 질환의 주된 원인이 활성산소에 기인한다는 것이 밝혀졌다(Ames et al., 1993; Totter, 1980). 그리하여 활성산소를 조절할 수 있는 항산화제의 개발과 연구에 더 많은 관심이 집중되고 있다. Superoxide anion radical, hydroxyl radical, singlet oxygen 및 H₂O₂ 등의 활성산소는 산화력이 매우 강하기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 산화 스트레스를 유발하게 되며(Ames, 1983), 이러한 산화 스트레스는 지질과산화물을 유도하고 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 암을 비롯한 다양한 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있으며(Ames et al., 1993), Qian and Buettner(1999)와 Wink 등(1994)은 전자전달계에서 생산된 산소분자와 Fe³⁺가 각각 과산화수소와의 반응에 의하여 단백질이 손상된다고 보고 하였다.

우리가 일반적으로 먹는 여러 식품 중에는 항암, 항염증 효과를 가지고 있는 phytochemicals라고 불리는 여러 기능성 소재들이 포함되어 있다. 이러한 phytochemicals는 병원균과 같은 여러 pro-inflammatory 자극에 의해서 유도된 NF-κB 활성화를 억제시키는 것으로 알려져 있다(Youn et al., 2005; Surh, 2003; Zingarelli et al., 2003; Youn et al., 2006). Cytokine-cytokine 상호작용에서 pro-inflammatory cytokine(IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α 등)과 anti-inflammatory cytokine(IL-1 receptor antagonist, IL-4, IL-10, TGF-β 등) 간의 균형이 신경학적 증상, 정신과적 증상 및 신경면역반응의 중추적인 역할을 한다(Turrin and Plata-Salaman, 2000). 만약 pro-inflammatory cytokine의 농도가 증가되고, anti-inflammatory cytokine이 제대로 작용하지 못하는 어떤 질환상태에서는 염증반응과 세포 독성반응이 나타나게 되며 이로 인해 신경학적 및 정신의학적 증상을 유발하게 된다.

해양생물(Kamiya et al., 1987)이나 버섯류(King et al., 1981) 등과 같은 천연물로부터 분리한 물질을 대상으로 항암 및 생리활성효과 등을 검색하고 이들을 암 치료의 보조요법이나 암 예방을 위한 기능성 물질로 이용하고자 하는 노력이 계속되고 있다. 따라서 본 연구에서는 GAGs 분획물이 iNOS, ICAM-1 및 VCAM-1 등 염증관련인자에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

미더덕(*Styela clava*) 껍질 추출물과 대조구로 사용된 멧게(*Halocynthia roretzi*) 껍질로부터 분리된 glycosaminoglycans 획분은 제6절에 언급된 방법에 따라 추출정제하여 실험에 사용하였다.

JB-6 세포주를 이용한 기능성 물질이 염증에 미치는 영향

껍질에서 분리된 기능성 물질의 세포독성 시험을 실시하였다. 세포에 농도별로 기능성 물질을 처리한 후 살아있는 세포의 미토콘드리아 내로 들어가서 violet salt를 형성하는 MTT를 처리하여 살아있는 세포의 비율을 측정할 수 있는 MTT assay를 실시하였다. 96 Well plate에 1×10^4 /well의 농도로 세포를 접종한 후 다음날 기능성 물질을 농도 별로 처리하였다. 24시간 incubation 후 MTT를 세포에 첨가하고 2시간 후 배지를 제거하고 DMSO를 사용하여 세포를 용해시킨 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 OD 값을 측정하였다.

NF- κ B plasmid construct를 이용한 감염세포 시험

기능성 물질들을 NF- κ B plasmid construct를 이용한 감염세포 시험을 실시하여 각 기능성 물질들에 의한 전사단계에서의 세포내 NF- κ B 수준변화를 확인한 후 마우스 표피세포(JB-6)와 NF- κ B 발광효소를 이용하여 일시 트랜스펙션 후 발광효소 시험을 실시하였다. 세포를 5×10^4 /well의 수로 24 well plate에 접종한 후 다음날 NF- κ B plasmid construct를 FuGene6 트랜스펙션 시약을 사용하여 세포내로 트랜스펙션 시켰다. 24시간 배양한 후 기능성 물질을 처치하였다. 다시 24시간 배양한 후 배지를 제거한 후 PBS로 2번 세척하고 세포용해 완충액을 사용하여 세포를 용해시켰다. 완전히 용해시킨 후 각각 동일한 양의 시료를 수집하여 luminometer를 이용하여 발광효소 활성을 측정하였다.

iNOS, ICAM-1 및 VCAM-1 등 염증관련인자에 미치는 영향

NF- κ B 및 NF- κ B에 의해 조절되는 대표적인 iNOS, ICAM-1 및 VCAM-1 등 염증관련인자에 미치는 영향 검색하였다. TNF- α 를 이용하여 염증을 유발한 세포주에 기능성 물질을 처리한 후 세포핵과 세포질을 분리하여 Western

blot으로 세포핵에서의 NF- κ B의 발현을 관찰하였을 뿐만 아니라 iNOS, ICAM-1 및 VCAM-1 단백질의 발현량 변화를 확인하였다. 즉, 75 cm² 세포 배양기에 세포를 배양하여 집합도가 70-80%가 되도록 한 후 기능성 물질을 처리하였다. 24시간 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후에 세포용해 완충액을 이용하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해물을 원심분리하여 세포잔해를 제외한 상층액만을 수집하여 Bradford 방법을 이용하여 단백질 정량을 실시하였다. 정량 후 동일한 양의 시료를 SDS-PAGE로 단백질 분리를 실시한 후 nitrocellulose membrane에 이송하여 차단한 후 iNOS, ICAM-1 및 VCAM-1 일차항체와 반응시켰다. HRP가 공역화된 이차항체를 다시 반응시킨 후 Enhanced Chemiluminescence(ECL) kit을 사용하여 반응시킨 후 LAS 3000 영상판독기를 사용하여 단백질 발현정도를 확인하였다.

염증반응을 조절하는 p38, JNK, ERK 대사에서의 단백질 변화조사

염증반응을 조절하는 p38, JNK, ERK 대사에서 중요한 작용을 일으키는 단백질의 변화를 확인하였다. 세포주에 기능성 물질을 처리한 후 세포에서 단백질을 추출하여 Western blot으로 p38, p-p38, JNK, p-JNK, ERK, p-ERK 변화를 확인하였다. 75 cm² 세포 배양기에 세포를 배양하여 집합도가 70-80%가 되도록 한 후 기능성 물질을 처리하였다. 24시간 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후에 세포용해 완충액을 이용하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해물을 원심분리하여 세포잔해를 제외한 상층액만을 수집하여 Bradford 방법을 이용하여 단백질 정량을 실시하였다. 정량 후 동일한 양의 시료를 SDS-PAGE로 단백질 분리를 실시한 후 nitrocellulose membrane에 이송하여 차단한 후 인터루킨-6 항체와 반응시켰다. HRP가 공역화된 이차항체를 다시 반응시킨 후 Enhanced Chemiluminescence(ECL) kit을 사용하여 반응시킨 후 LAS 3000 영상판독기를 사용하여 단백질 발현정도를 확인하였다.

NF- κ B의 핵 내로의 전이조사

NF- κ B에 대한 immunohistochemistry를 이용한 NF- κ B의 핵 내로의 전이를 확인하였다. 세포주에 기능성 물질을 처리한 후 NF- κ B 항체를 이용하여 세포내 NF- κ B의 위치를 형광으로 확인하였다. 즉, 세포에 기능성 물질을 처리한 후 24시간 배양한 후에 4% 포르말데히드와 메탄올로 고정하여 NF- κ B

항체를 반응시킨 후 이차항체로서 FITC가 붙은 항체를 사용하여 다시 반응시켰다. 형광현미경을 사용하여 세포내에서의 NF- κ B의 위치를 확인하였다.

결과 및 고찰

적정 유효농도의 설정

적정한 유효농도를 설정하기 위하여 실시한 미더덕 껍질에서 분리된 기능성 물질의 세포독성 시험의 결과 미더덕 1은 7.3 mg/mL, 미더덕 2는 9.7 mg/mL, 미더덕 crude는 7.0 mg/mL, 명계 1은 6.7 mg/mL, 명계 2는 7.5 mg/mL, 명계 3은 6.7 mg/mL, 명계 crude는 4.6 mg/mL의 IC₅₀ 값을 산출하였다(Fig. 1-7). 이와 같은 결과를 바탕으로 평균적인 IC₅₀의 1/10 농도를 기준으로 각각 0.75 mg/mL, 1.5 mg/mL, 2.0 mg/mL의 농도를 사용하여 NF- κ B 형광면역 시험을 실시하여 NF- κ B의 활성을 검색하였다. 그 결과 0.75 mg/mL, 1.5 mg/mL 에서는 미더덕 1, 미더덕 2, 명계 1, 명계 2, 명계 3에서 TNF- α 에 의하여 증가된 NF- κ B의 활성을 억제하지 못하는 것을 확인하였으며 2 mg/mL에서 NF- κ B의 활성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 명계 crude, 미더덕 crude는 IC₅₀의 1/10 농도인 0.75 mg/mL에서 TNF- α 에 의하여 유도된 NF- κ B의 활성을 더 증가 시키는 것을 확인하였다(Fig. 8-9).

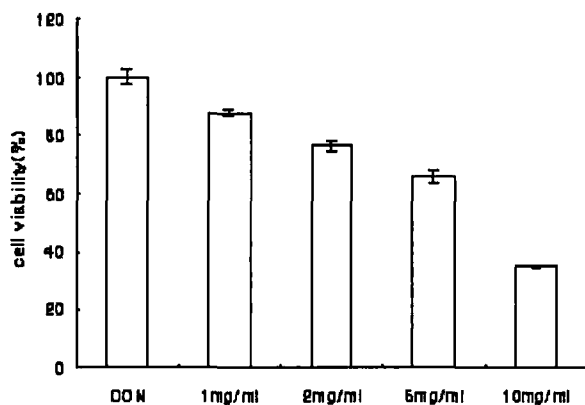


Fig. 1. MTT assay treated *Halocynthia roretzi* fraction 1 in JB-6 cell.

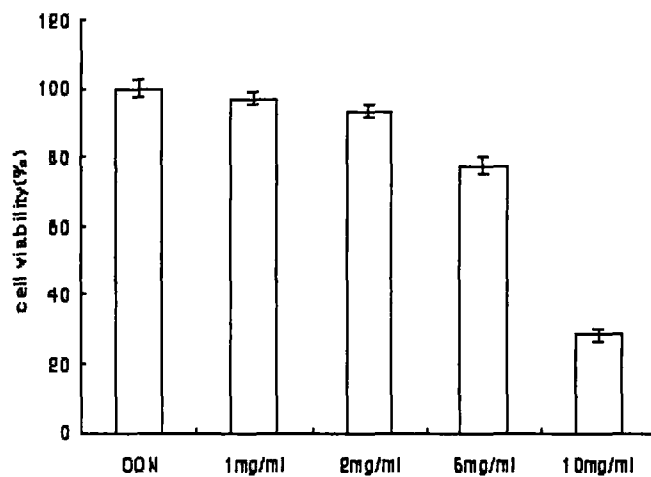


Fig. 2. MTT assay treated *Halocynthia roretzi* fraction 2 in JB-6 cell

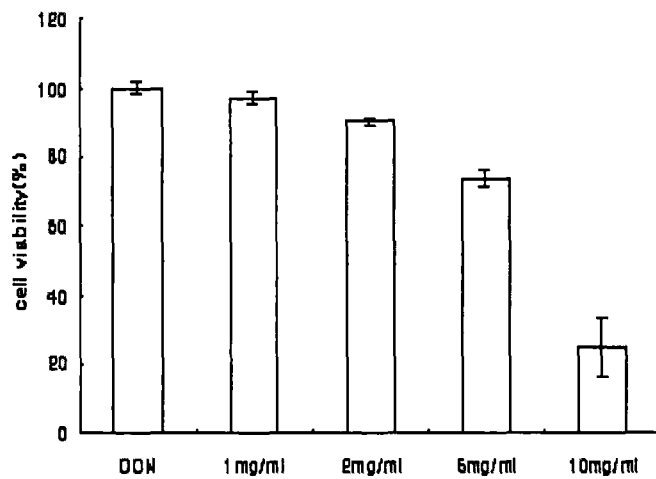


Fig. 3. MTT assay treated *Halocynthia roretzi* fraction 3 in JB-6 cell

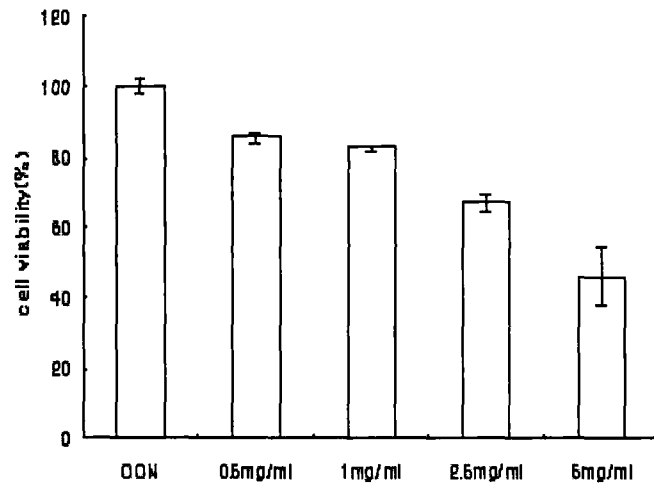


Fig. 4. MTT assay treated *Halocynthia roretzi* crude in JB-6 cell

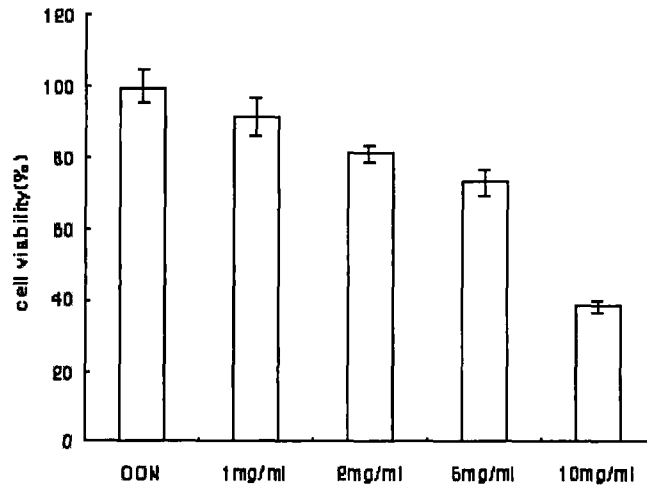


Fig. 5. MTT assay treated *Styela clava* fraction 1 in JB-6 cell.

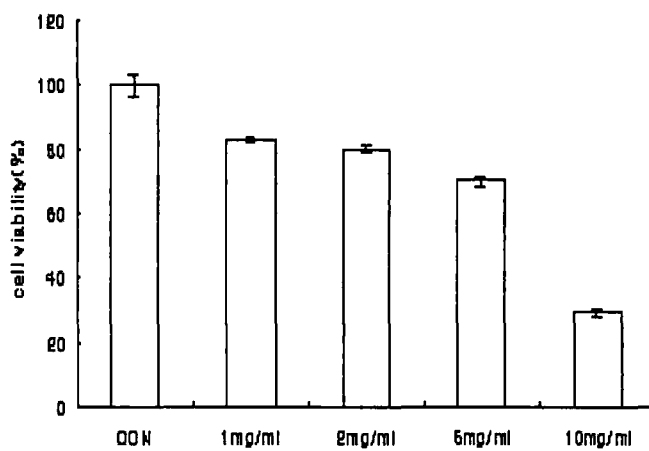


Fig. 6. MTT assay treated *Styela clava* fraction 2 in JB-6 cell

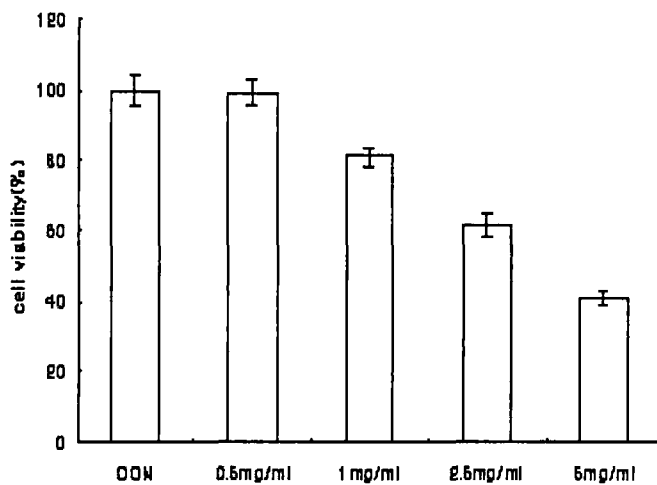


Fig. 7. MTT assay treated *Styela clava* crude in JB-6 cell.

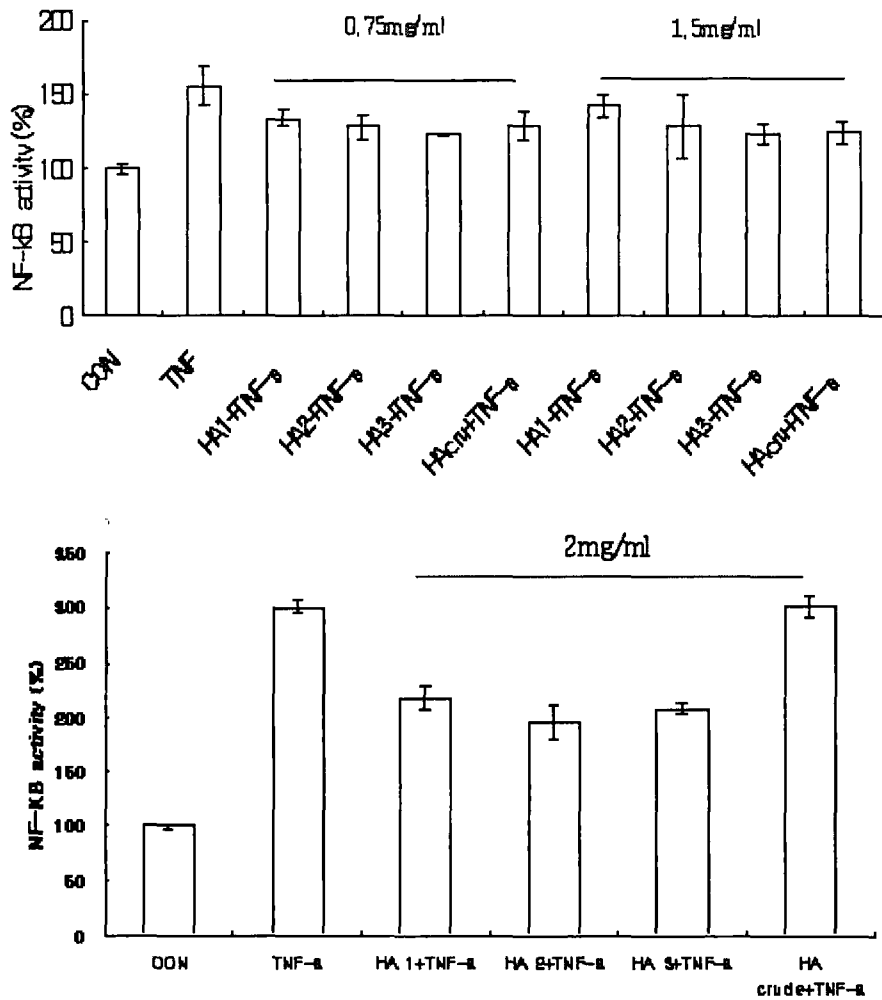


Fig. 8. Dose response of NF-κB activity treated *Halocynthia roretzi* fraction 1, 2, 3 and crude in JB-6 cell.

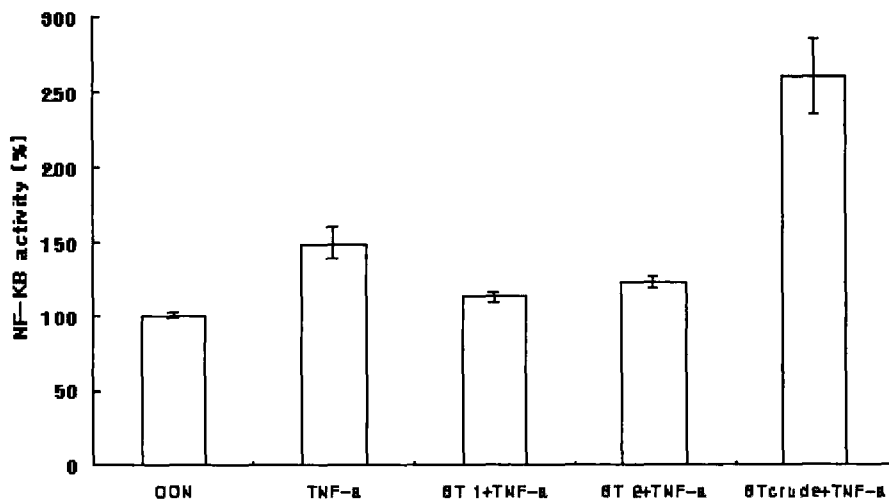
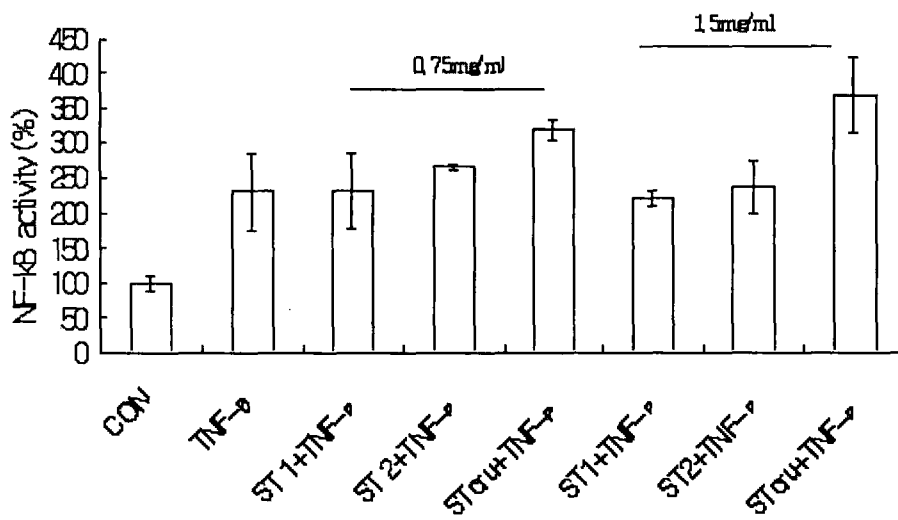


Fig. 9. Dose response of NF-κB activity treated *Styela clava* fraction 1, 2 and crude in JB-6 cell.

세포핵에서의 NF-κB의 발현

세포독성실험과 NF-κB 형광발현 시험을 통하여 설정한 유효농도인 2 mg/mL(미더덕 1, 미더덕 2, 멩게 2, 멩게 3) 그리고 0.75 mg/mL(멩게 crude, 미더덕 crude) 기능성 물질을 처리한 후 24시간 후에 세포핵을 분리하여 Western blot으로 세포핵에서의 NF-κB의 발현을 관찰하였다. 결과 미더덕 1과 미더덕 2 그리고 멩게 2 와 멩게 3이 NF-κB 형광면역 시험 결과와 비슷하게 NF-κB의 핵 내로의 전이를 억제하는데 비교적 좋은 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 10-11). 다음과정에는 효과가 좋은 미더덕 1, 미더덕 2, 멩게 2, 멩게 3을 이용하여 실험을 진행하였다.

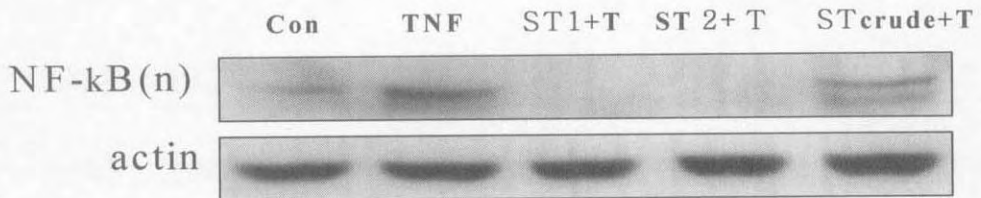


Fig. 10. *Styela clava* fraction 1, 2 and crude effected nuclear NF-κB expression.

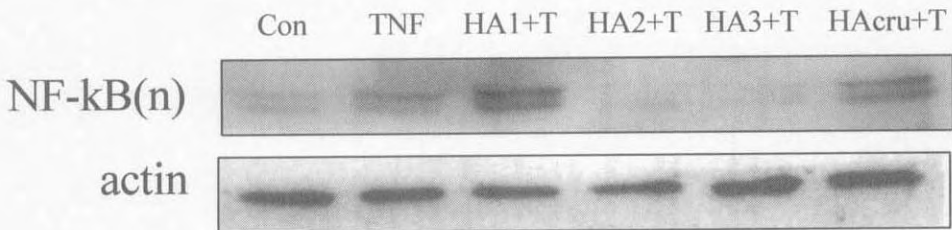


Fig. 11. *Halocynthia roretzi* fraction 1, 2, 3 and crude effected nuclear NF-κB expression.

염증관련 인자인 iNOS, ICAM-1 및 VCAM-1 등의 변화조사

앞에서의 4가지 기능성 물질(미더덕 1, 미더덕 2, 멩게 2, 멩게 3)을 처리하여 NF- κ B에 의해 발현이 조절되는 대표적인 염증관련 인자인 iNOS, ICAM-1 및 VCAM-1 등의 변화를 Western blot을 이용하여 측정한 결과 VCAM-1, ICAM-1가 미더덕 1과 미더덕 2를 처리하였을 때 모두 그 발현이 억제되는 것을 관찰할 수 있었으며 iNOS 발현에서는 미더덕 1을 처리하였을 때 억제되었지만 미더덕 2에서는 그 발현이 TNF- α 에 비해 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 멩게 2와 멩게 3에서는 세 가지 단백질의 발현이 모두 억제되었으며 그중에서 멩게 3의 억제작용이 더 좋은 것을 관찰할 수 있었다. 이어지는 실험에서는 염증관련 단백질의 발현에 억제 작용이 비교적 좋은 미더덕 1과 멩게 3을 사용하여 실험을 진행하였다(Fig. 12).

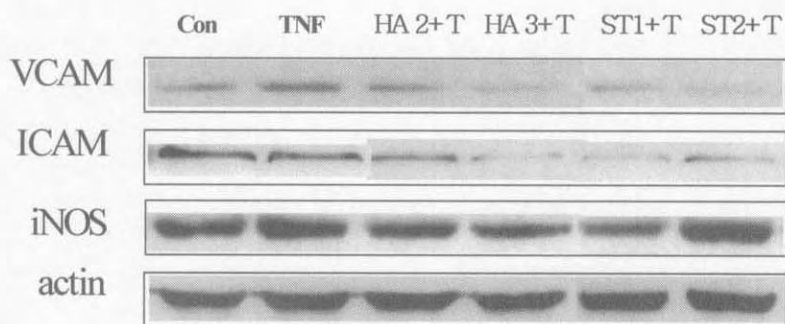


Fig. 12. VCAM, ICAM, iNOS expressin in *Styela clava* fraction 1, 2 and *Halocynthia roretzi* fraction 2, 3 treated JB-6 cell.

기능성 물질의 NF- κ B의 핵 내로의 전이조사

실험을 통하여 취득한 두 가지 기능성 물질(미더덕 1, 멩게 3)을 이용하여 NF- κ B의 핵 내로의 전이에 대한 억제작용을 형광면역염색을 통하여 확인하였다. 결과 두 가지 기능성 물질이 NF- κ B의 핵 내로의 전이에 대하여 억제 작용을 일으키는 것을 재확인 할 수 있었다(Fig. 13).

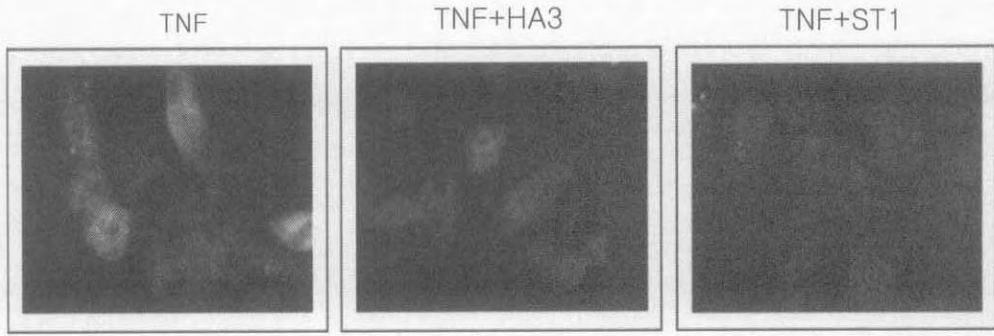


Fig. 13. *Styela clava* fraction 1 and *Halocynthia roretzi* fraction 3 inhibited NF- κ B nuclear translocation. Green : NF- κ B, blue : nuclear.

염증반응을 조절하는 p38, JNK, ERK pathway에서의 단백질 변화조사

염증관련 대사에서 중요한 역할을 하는 단백질들인 p38, JNK 그리고 ERK에 대하여 Western blot을 진행하였다. 결과 p38, p-p38, ERK, p-ERK, p-JNK의 발현에 대하여서는 작용이 없는 것을 확인할 수 있었으며, JNK의 발현에 대하여 두 가지 기능성 물질이 억제작용이 있는 것으로 확인할 수 있었다(Fig. 14).

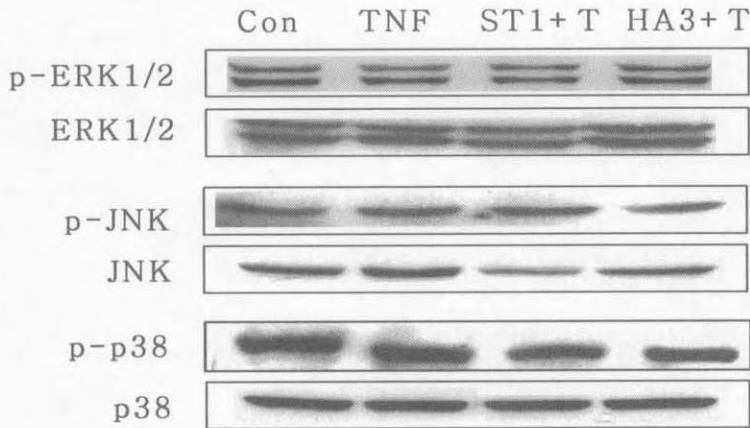


Fig. 14. *Styela clava* fraction 1 and *Halocynthia roretzi* fraction 3 effected inflammation signal pathway.

요약

미더덕 껍질에서 분리한 GAGs의 세포독성을 시험한 결과 미더덕 1은 7.3 mg/mL, 미더덕 2는 9.7 mg/mL, 미더덕 crude는 7.0 mg/mL의 IC₅₀ 값을 보였다. 이를 바탕으로 평균적인 IC₅₀ 값의 1/10 농도를 기준으로 각각 0.75 mg/mL, 1.5 mg/mL, 2.0 mg/mL의 농도를 사용하여 NF-κB 형광면역활성을 검색하였다. 그 결과 2.0 mg/mL의 농도에서 NF-κB의 활성이 억제되는 것으로 나타났다. 세포핵에서의 NF-κB의 발현을 관찰한 결과 NF-κB의 핵 내로의 전이를 억제하는 것으로 나타났으며, 염증관련 인자인 iNOS, ICAM-1 및 VCAM-1 등의 변화를 조사한 결과 미더덕 1과 명계 3 시료에서 단백질 발현을 억제하는 것으로 나타났다. 염증반응을 조절하는 p38, JNK, ERK 대사과정에서의 단백질 변화를 조사한 결과 p38, p-p38, ERK, p-ERK, p-JNK의 발현에 대해서는 작용이 없었으나 JNK의 발현에는 미더덕 1과 명계 3 시료에서 효과를 나타내었다.

제 11 절 미더덕 껍질로부터 추출한 GAGs TPA에 의해 유발된 마우스 피부염증에 미치는 영향

서론

최근 연구에 의하면 만성염증은 피부암, 위암, 전열선암 등을 포함한 많은 조직에서의 암 진행을 촉진한다고 한다(Li et al., 2005; Tan and Coussens, 2007; Arias et al., 2005). 염증의 진행에 있어서 NF- κ B라고 하는 단백질이 아주 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. NF- κ B는 전사인자로서 COX-2, VCAM, iNOS 등을 포함한 많은 대표적인 염증인자의 발현을 조절하며(Karin and Greten, 2005), 이러한 염증인자들은 암의 진행과 전이에 있어서 중요한 작용을 한다고 한다. 따라서 NF- κ B의 활성을 억제하는 것은 염증의 진행과 암을 예방하는데 있어서 매우 중요한 의의가 있을 것으로 사료된다. 실제로 Matsumoto(2005)등의 연구결과에 의하면 유방암 모델마우스에 NF- κ B 저해제 처리 시 암의 성장을 유의성 있게 억제하였다고 한다. 따라서 최근에는 천연적인 NF- κ B 저해제들에 대한 많은 연구가 진행되고 있다 (Nam, 2006).

GAGs는 가지가 없는 긴 다당류 사슬로 된 polysaccharide chain으로서 염증촉진인자와 결합하여 면역시스템에서 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Cripps et al., 2005). 그러나 염증에 있어서 GAGs의 구체적인 항염증 분자생물학적 메커니즘에 관한 연구는 아주 적다. 따라서 본 연구는 미더덕, 멧게 껍질에서 추출한 천연 GAGs를 이용하여 이들이 피부염증에 미치는 작용을 규명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

재료

Glycosaminoglycans(GAGs)는 미더덕(Fraction 1), 멧게(Fraction 3) 껍질로부터 분리된 것을 사용하였다. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서, p-Akt (Ser473) 항체는 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며 기타 Western blot 및 면역염색용 일차 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입

하였다. 2차 항체는 Zymed Laboratories(San Francisco, CA, USA)에서 구입하였다.

시험동물 및 시험군의 구성

중앙실험동물에서 구입한 5주령의 암컷 ICR 마우스를 실험에 사용하였다. 시험군은 대조군(Acetone만 처리), TPA 처리군, TPA+1 mg GAGs처리군, TPA+2 mg GAGs 처리군으로 나누었으며 매 처리군은 세 마리의 마우스로 구성되었다.

염증유발 및 시약 처리방법

제모제를 이용하여 마우스 등 부분의 털을 깨끗이 제거한 후 3일간의 적응 기간을 거친다. TPA는 acetone에 10 nmol의 농도로 용해시켜 사용했다. GAGs는 증류수에 100 mg/mL의 농도로 용해시킨 후 다시 200 μ L의 TPA용액에 용해시켰다 (1 mg GAGs/200 μ L의 TPA용액 혹은 2 mg GAGs/200 μ L의 TPA용액). GAGs가 첨가된 혹은 첨가되지 않은 TPA용액을 200 μ L씩 털을 제거한 피부에 노출시켰으며 4시간 후에 피부조직을 채취하였다. 대조군은 200 μ L의 acetone만 처리하였다.

Western blot 분석

피부조직 중의 총 단백질은 Hwang 등(Hwang et al., 2007)이 보고한 방법에 의해 추출했으며 핵은 Nuclear Extract Kit(Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 추출하였다. 추출한 단백질은 Bradford kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량하였으며 30 μ g의 단백질을 취하여 SDS-PAGE에서 전기영동한 후 nitrocellulose membrane에 전이하였다. 단백질이 전이된 membrane은 5% skim milk로 한 시간 동안 차단시킨 후 1차 항체를 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날 2차 항체를 넣고 상온에서 3시간 반응시켰다. 단백질 밴드는 luminescent image analyzer LAS-3000(Fuji film, Tokyo, Japan)을 이용하여 확인하였다.

면역염색

피부조직을 10% 포르말린에 고정하여 4 μ m 두께의 파라핀 절편을 만들었다. 면역염색을 위하여 절편은 xylene으로 파라핀을 제거한 후 알코올을 이용하여 탈수

를 진행였으며 3 % hydrogen peroxide(AppliChem, Darmstadt, Germany)로 30 분간 처리하였다. PBS로 씻은 다음 5 % BSA로 상온에서 1시간 blocking 하였다. 4°C에서 하룻밤 동안 1차 항체를 붙인 후 다음날 HRP-conjugated antibodies (1:50)로 상온에서 3시간 반응을 시켰다.

통계처리

모든 결과는 Student's *t*-test(GraphaPad software, San Diego, CA, USA)를 이용하여 통계처리를 진행했으며 means±SE형태로 표시하였다. 통계결과 *p* 값이 0.05보다 낮을 시 통계적인 유의성 차이가 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

미더덕껍질에서 추출한 GAGs가 피부염증에 미치는 영향

미더덕껍질에서 추출한 GAGs는 TPA에 의해 유도되는 VCAM, COX-2등 염증인자의 발현에 아무런 영향도 미치지 못했으며(Fig. 1) 염증유발에서 있어서 중요한 작용을 하는 단백질인 NF-κB의 핵으로의 이동도 억제하지 못했다(Fig. 2). 따라서 미더덕 껍질에서 추출한 GAGs는 항 피부염증 작용이 낮은 것으로 사료된다.

멍게 껍질에서 추출한 GAGs가 염증인자의 발현에 미치는 영향

VCAM과 COX-2는 TPA처리에 의해 유도되는 대표적인 염증인자로서 마우스 피부조직에서 TPA처리 4시간 후 제일 많이 발현된다(Chun et al., 2003; Osakabe et al., 2004). 따라서 본 실험에서는 TPA처리 4시간 경과 후 피부조직을 채취하여 Western blot과 면역염색을 통하여 VCAM과 COX-2의 발현양상을 확인하였다. 결과 TPA의 처리는 대조군에 비해 VCAM과 COX-2의 발현을 유의성 있게 증가시켰으며 TPA에 의해 유도된 염증인자들의 발현은 GAGs의 처리에 의해 유의성 있게 감소되었다. 또한 이러한 GAGs의 염증인자 발현 억제효과는 처리농도에 비례하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

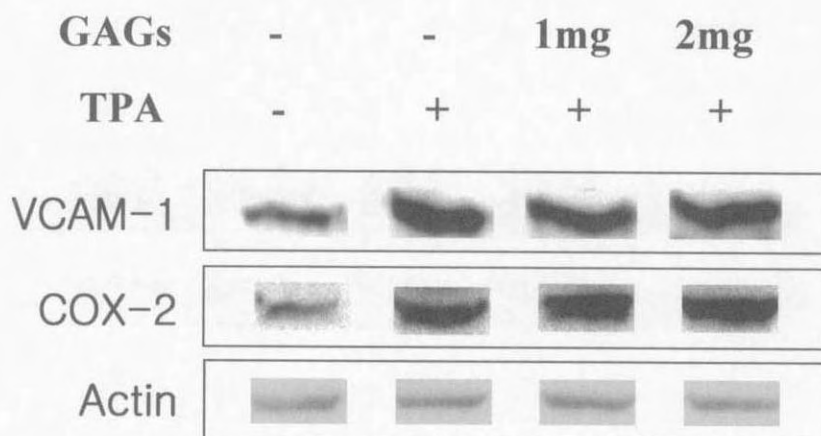


Fig. 1. Effects of GAGs extracted from the *Styela clava* tunic on TPA-induced VCAM and COX-2 expression in mouse skin. Mice were treated topically with TPA(200 μ L of 10 nmol TPA dissolved in acetone) in the presence or absence of GAGs(1 mg or 2 mg).

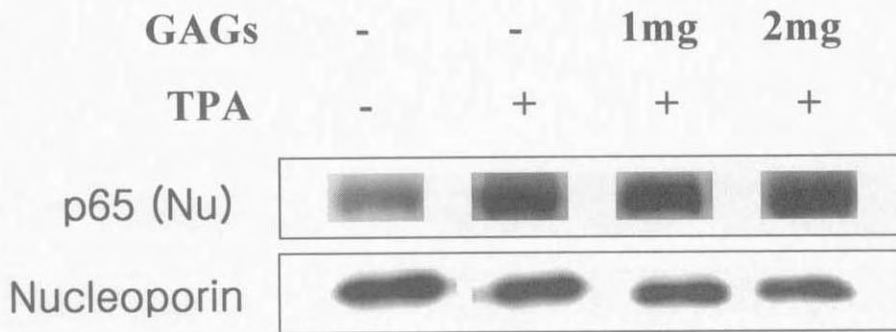


Fig. 2. Effects of GAGs extracted from ascidian tunic on TPA-induced NF- κ activation in mouse skin. Mice were treated topically with TPA(200 μ L of 10 nmol TPA dissolved in acetone) in the presence or absence of GAGs(1 mg or 2 mg).

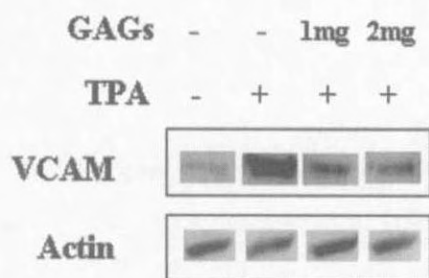
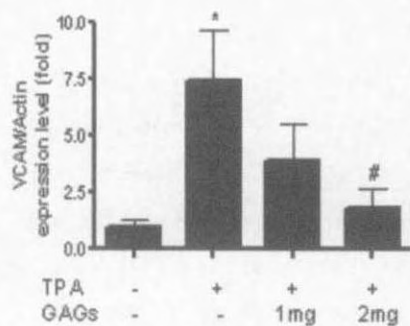
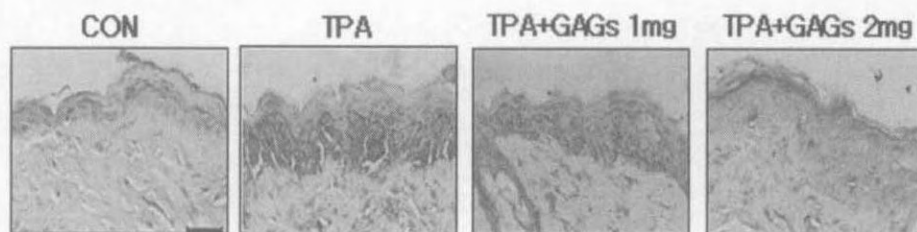
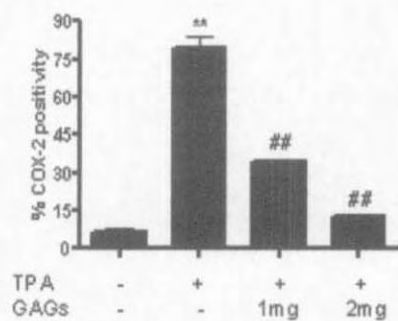
A**B****C****D**

Fig. 3. Inhibitory effects of GAGs extracted from ascidian tunic on TPA-induced VCAM and COX-2 expression in mouse skin. Mice were treated topically with TPA(200 μ L of 10 nmol TPA dissolved in acetone) in the presence or absence of GAGs(1 mg or 2 mg). Control animals were treated with acetone alone. (A) Western blot analysis of VCAM expression in mouse skin. (B) The bands-of-interests were further analyzed by densitometer. (C) Immunohistochemical measurement of COX-2 in the mouse skin. Dark brown color indicates the COX-2 expression(original magnification, 400; Bar, 100 μ m). (D) Comparison of COX-2 labeling index in the mouse skin. COX-2-positive staining was determined by counting 5 randomly chosen fields per section, determining the percentage of DAB-positive cells per 100 cells at x 400 magnification. *, $p < 0.05$, considered significant; **, $p < 0.01$ highly significant compared to control. #, $p < 0.05$, considered significant; ##, $p < 0.01$, highly significant compared with TPA alone treatment. (mean \pm SE, n=3). CON, control; TPA, TPA treated group TPA+GAGs, TPA treated mice in the presence of GAGs(1 mg or 2 mg).

명계 껍질에서 추출한 GAGs가 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향

VCAM과 COX-2의 발현은 NF- κ B에 의해 조절되며 NF- κ B는 I κ B α 라는 단백질과 결합하여 세포질에 비활성화 상태로 존재한다(Surh et al., 2001). NF- κ B는 I κ B α 가 인산화되어 분해될 때 complex로부터 방출되어 핵으로 이동해 여러 가지 염증인자들의 발현을 조절하게 된다(Karin, 1999). 시험결과를 보면 명계껍질에서 추출한 GAGs의 처리는 TPA에 의해 유도되는 I κ B α 의 인산화와 분해를 억제함으로써 NF- κ B p65의 핵으로의 이동을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

명계 껍질에서 추출한 GAGs가 IKK의 활성화에 미치는 영향

I κ B α 의 인산화와 분해는 IKK라고 하는 I κ B α 의 카이네즈에 의해 조절되며 IKK의 활성화는 IKK β 의 인산화에 의존한다(Karin, 1999). 따라서 본 연구에서는 GAGs의 처리가 IKK β 의 인산화에 미치는 영향을 조사하였다. 시험결과 명계껍질로부터 추출한 GAGs의 처리는 TPA에 의해 유도되는 IKK β 의 인산화를 효율적으로 차단하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

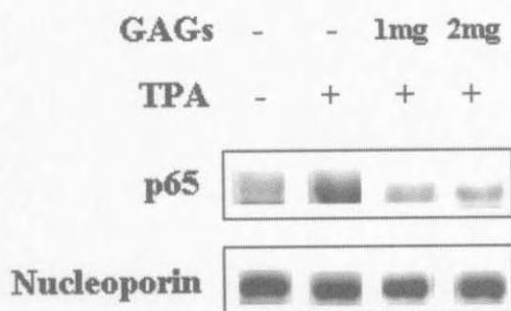
명계 껍질에서 추출한 GAGs가 p38의 인산화에 미치는 영향

MAPK p38 이라고 하는 효소는 NF- κ B 시그널을 조절함으로써 VCAM과 COX-2의 발현을 조절하는 중요한 단백질이다(Lin et al., 2007). Fig. 3에서 볼 수 있는 것처럼 GAGs의 처리는 p38의 인산화를 억제함으로써 TPA에 의한 p38의 활성화를 효율적으로 차단하였다(Fig. 6).

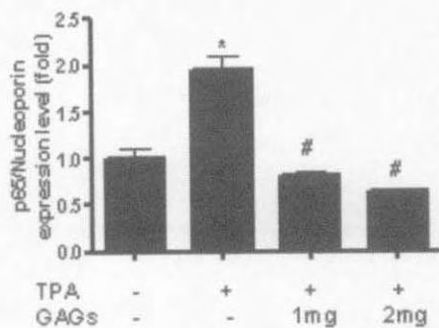
명계 껍질에서 추출한 GAGs가 Akt의 인산화에 미치는 영향

NF- κ B의 활성화와 염증인자들의 발현은 Akt라고 하는 단백질에 의해서도 조절된다는 보고가 있다(Kane et al., 1999; Romashkova and Makarov, 1999). 따라서 본 연구에서는 GAGs가 Akt에 미치는 영향을 확인하였다. Akt의 활성화되기 위해서는 인산화가 되어야 하는데 GAGs의 처리는 Akt의 인산화를 억제함으로써 TPA에 의한 Akt의 활성을 차단하였다(Fig. 7).

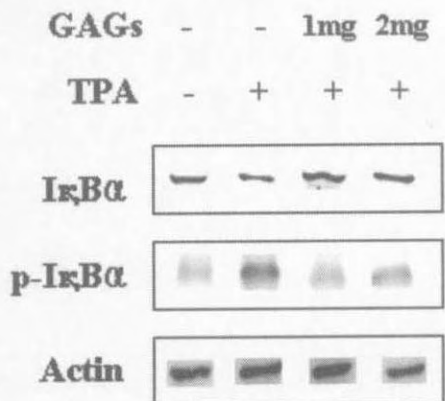
A



B



C



D

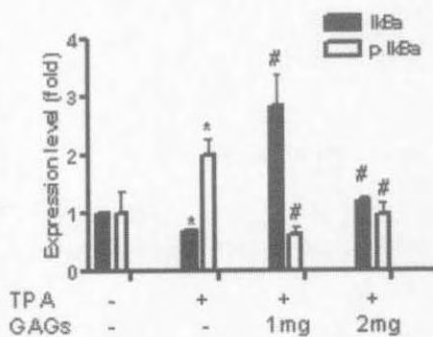
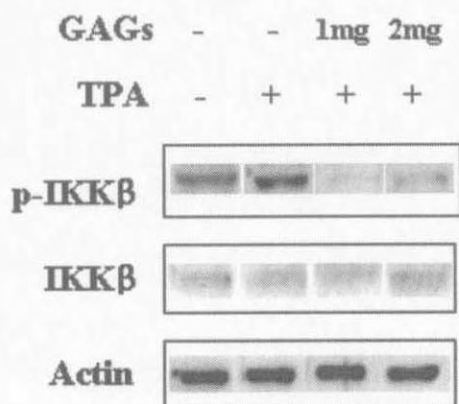


Fig. 4. Inhibitory effects of GAGs extracted from ascidian tunic on TPA-induced NF- κ activation in mouse skin. Mice were treated topically with TPA(200 μ L of 10 nmol TPA dissolved in acetone) in the presence or absence of GAGs(1 mg or 2 mg). Control animals were treated with acetone only. (A) Western blot analysis of p65 protein level in nuclear extract from mouse skin. (B) Densitometric analysis of p65. (C) Western blot analysis of I κ α and p-I κ α expression. (D) The bands-of-interests were further analyzed by densitometer. *, $p < 0.05$, considered significant compared to control. #, $p < 0.05$, considered significant compared with TPA alone treatment (mean \pm SE, n=3). CON, control; TPA, TPA treated group TPA+GAGs, TPA treated mice in the presence of GAGs(1 mg or 2 mg).

A



B

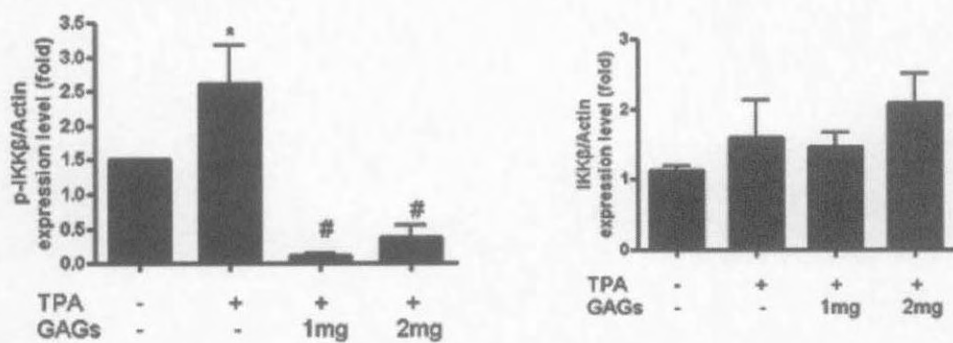
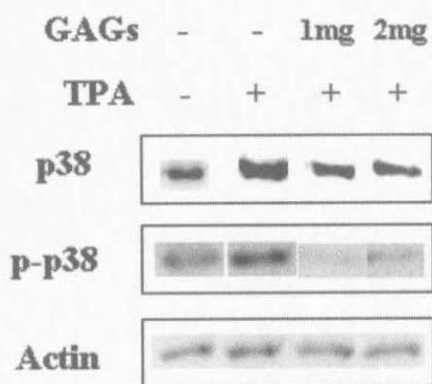


Fig. 5. Inhibitory effects of GAGs extracted from ascidian tunic on TPA-induced IKK phosphorylation in mouse skin. Mice were treated topically with TPA(10nmol 200 μ L acetone) in the presence or absence of GAGs(1 mg or 2 mg). Control animals were treated with acetone only. (A) Western blot analysis of IKK β and p-IKK β expression level in mouse skin. (B) The bands of interests were further analyzed by densitometer. *, $p < 0.05$ compared to control; #, $p < 0.05$ compared to TPA alone treatment (mean \pm SE, n=3). CON, control; TPA, TPA treated group TPA+GAGs, TPA treated mice in the presence of GAGs(1 mg or 2 mg).

A



B

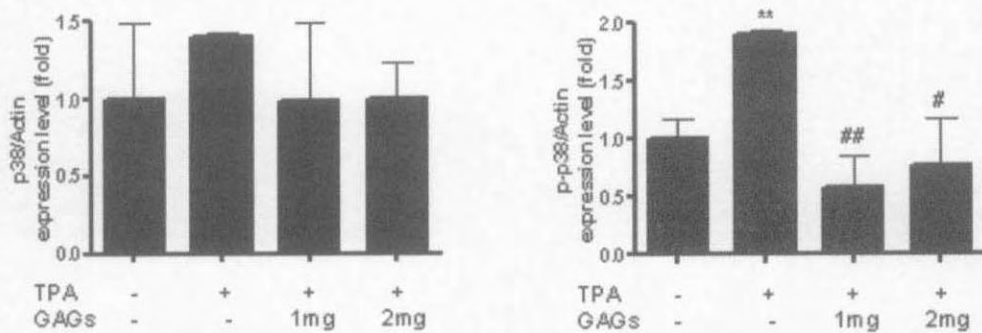
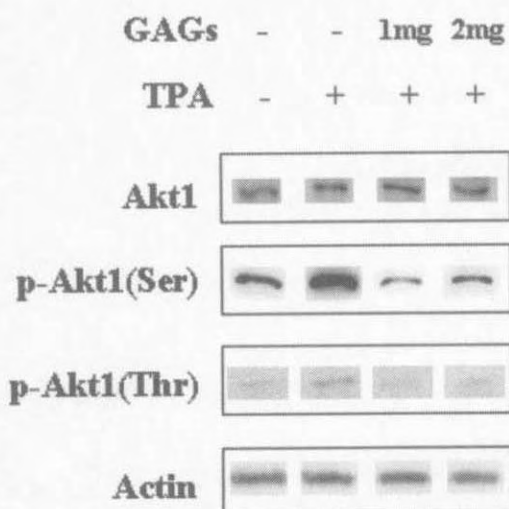


Fig. 6. Inhibitory effects of GAGs extracted from ascidian tunic on TPA-induced p38 phosphorylation in mouse skin. Mice were treated topically with TPA(10 nmol 200 μ L acetone) in the presence or absence of GAGs(1 mg or 2 mg). Control animals were treated with acetone only. (A) Western blot analysis of p38 and p-p38 expression level in mouse skin. (B) The bands of interests were further analyzed by densitometer. **, $p < 0.01$ compared to control; #, $p < 0.05$, ##, $p < 0.01$ compared to TPA alone treatment (mean \pm SE, $n=3$). CON, control; TPA, TPA treated group TPA+GAGs, TPA treated mice in the presence of GAGs(1 mg or 2 mg).

A



B

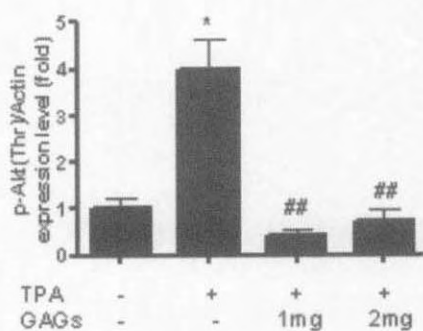
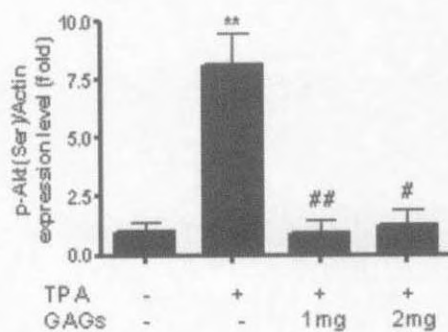
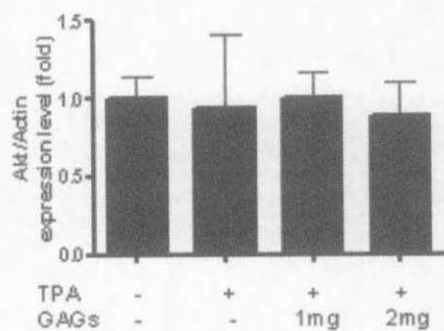


Fig. 7. Inhibitory effects of GAGs extracted from ascidian tunic on TPA-induced Akt phosphorylation in mouse skin. Mice were treated topically with TPA (10 nmol 200 μ L acetone) in the presence or absence of GAGs(1 mg or 2 mg). Control animals were treated with acetone only. (A) Western blot analysis of Akt and p-Akt expression level in mouse skin. (B) The bands of interests were further analyzed by densitometer. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ compared to control; #, $p < 0.05$, ##, $p < 0.01$ compared to TPA alone treatment(mean \pm SE, n=3). CON, control; TPA, TPA treated group TPA+GAGs, TPA treated mice in the presence of GAGs(1 mg or 2 mg).

요약

만성염증은 암과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다(Arias, 2005). 특히 최근의 연구결과에 의하면 VCAM과 COX-2와 같은 염증인자들은 암의 유발과 전이에서 매우 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 이러한 염증인자들의 발현억제는 염증 및 암 예방에 있어서 중요한 작용을 할 것으로 사료된다. 본 실험의 결과를 종합하여 보면 멩게 껍질로부터 추출한 GAGs는 p38과 Akt의 pathway를 조절함으로써 NF- κ B의 활성화를 차단하여 TPA에 의한 VCAM과 COX-2의 발현을 억제하였다. 따라서 멩게로부터 추출한 GAGs를 천연적인 항염증 치료제로 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

제 4 장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발 목표달성도

미더덕 육 및 껍질로부터 추출 정제한 기능성물질의 연차별 목표와 연구계획서상의 평가 착안점에 대한 목표달성도를 나타내었다.

구 분	목 표	평가착안점	목표달성도
1차 년도 (2 0 0 4 년)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미더덕 껍질에 함유된 천연 카로테노이드 색소 및 항산화활성 성분의 분석 ○ 육으로부터 항균성물질의 분리 및 정제 ○ 체액 및 껍질에 함유된 기능성물질의 분획 및 정제 ○ 미더덕 향기성분의 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항산화활성 ○ 항균물질의 분리 정제방법의 적합성 ○ Bioassay 및 활성 물질의 수 ○ 향기성분의 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항산화활성측정 - 100% ○ 정제방법적절성 - 100% ○ 활성물질의 수 - 2개 ○ 향기성분분석 - 100%
2차 년도 (2 0 0 5 년)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 물질의 대량 분리, 정제 및 분획방법의 개발 ○ 체액 및 껍질로부터 분리된 기능성 물질의 안전성 검증 ○ 항균성물질의 구조해석 ○ 향료생산을 위한 농축기술 및 경제성 평가 ○ 세포실험을 통한 평가 ○ 기능성 양어사료의 개발 (잉어) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대량정제방법의 적합성 ○ 항균물질의 안전성 및 안정성 ○ 효능이 있는 활성 분획 규명 ○ 향료생산을 위한 조향기술 ○ 세포실험 시 효율성 ○ 양어사료의 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대량정제적합 - 100% ○ 안정성 및 안전성 - 100% ○ 활성획분의 구조 동정 - 100% ○ 조향방법 5개 - 100% ○ 효율성 - 100% ○ 어류사료 4종 - 100%
3차 년도 (2 0 0 6 년)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 실험동물모델을 이용한 <i>in vivo</i> 시험 ○ 항균성 물질의 응용을 위한 최적 가공공정 개발 ○ 천연향료물질의 산업화 적용을 위한 공정개발 ○ 기능성 양어사료의 개발 (우럭) ○ 미더덕 추출물을 이용한 기능성 제품의 개발(3종) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 염증모델확립의 효율성 및 적합성 ○ 살균소독 및 방부 효과 ○ 병원균에 대한 치료 효과 ○ 천연향료의 대량 생산 ○ 양어사료의 개발 ○ 기능성물질의 시제품 생산 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동물실험(염증 억제) - 100% ○ 살균효과-1종 방부효과-미약 ○ 치료효과-미약 ○ 천연향료(조미료) - 80% ○ 어류사료 4종 - 100% ○ 시제품 2종 - 90%

2. 연구개발 기술발전의 기여도

기능성식품(Nutraceuticals) 역시 유망한 바이오제품의 하나이다. 2003년 현재 약 초, 건강보조 및 기능성식품 등의 세계시장은 대략 1,600억 달러 규모로 추산되고 있으며 2008년도에는 2,000억 달러까지 확대될 것으로 전망된다. 여기에 중국전통의 한방(한의학)과 대체의약을 포함하는 약초관련 의약품(herbal preparation)에 대한 수요가 크게 증가하면서 향후 2년 내 기존의 합성의약품 시장을 약 30%까지 대체할 것으로 전망되고 있다.

계절별, 지역별 미더덕에 함유된 영양성분의 변화에 대한 기본적인 자료를 확보하였으며, 미더덕 육 및 껍질에 함유되어 있는 카로테노이드의 성상과 함량을 파악할 수 있었다. 육 및 껍질에 함유된 카로테노이드의 항산화활성 평가를 통하여 미더덕의 섭취를 통하여 활성산소의 역할을 억제할 수 있어 각종 질병과 노화를 지연시킬 수 있는 결과를 얻었으므로 미더덕 소비의 활성화를 권장할 수 있는 실험적 근거를 마련하였다. 아래의 표는 한국, 일본, 중국에서 생산 가공되는 GAGs의 소재현황을 나타낸 것으로 새로운 소재를 찾기 위한 노력이 이루어지고 있다. 따라서 본 연구의 기술을 활용하면 수입에 따른 대체효과가 클 것으로 여겨진다.

	연구개발의 내용	연구개발성과의 기여도
한국	<ul style="list-style-type: none"> ○ 상어연골로부터 GAGs 추출정제 ○ 미색류로부터 GAGs를 추출정제 기술개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 상어 뼈로부터 GAGs의 정제기술 (대부분은 일본으로부터 수입) - 멧게 껍질로부터 GAG를 추출 정제하는 기술개발 (사업화되고 있지 못함)
일본	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연어두부를 활용한 GAGs의 추출 및 응용 	<ul style="list-style-type: none"> - 북해도 지역에 회귀하는 연어가공 후 두부에서 GAGs를 추출 정제하여 판매 - 주)마루하에서 2,000억원/년 판매 - 건강기능식품, 화장품, 의약품 원료로 활용됨
중국	<ul style="list-style-type: none"> ○ 소, 돼지, 닭의 부산물로부터 GAGs를 추출정제 	<ul style="list-style-type: none"> - 주로 포유동물을 사용하여 GAGs를 추출 정제하여 활용함 - 대부분을 수출함 - 최근 광우병 등 질병으로 원료 확보에 어려움을 겪고 있음

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가연구의 필요성

이미 개발되어 시판 중이거나 시판을 계획 중인 기능성식품의 경우 한 가지 식품이 항암, 항종양, 항균, 항염증, 항바이러스 및 면역조절 기능까지 매우 다양한 활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 그러나 알려진 다양한 기능에 대한 세포내 작용기작, 즉 실제로 어떤 화합물의 작용기가 세포내에서 어떤 과정을 거쳐 어떤 기능으로 나타나는가에 대한 연구가 해양생물을 이용한 새로운 식품개발과 함께 매우 중요하게 다루어져야 할 연구 분야이다. 기능성식품의 세포내 작용기작에 대한 연구가 기능성식품의 개발과 더불어 이루어지지 않으면 소비자 입장에서의 식품의 신뢰도는 반감될 것이며, 이러한 측면이 기능성식품의 가치를 떨어뜨리는 주요한 요인으로 작용되어 왔다.

미더덕 껍질로부터 추출 정제한 GAGs 성분의 구조가 밝혀지고 몇 가지의 기능이 평가되었으나 이들을 기능성식품의 원료로 활용하기 위해서는 위에서 언급한 것처럼 더 많은 생화학적 실험(In vivo) 및 동물실험(In vitro)을 통하여 검증할 필요가 있다. 기본적으로 요구되는 동물실험을 원활하게 수행하기 위해서는 추가연구를 통하여 pilot plant 수준의 정제시설과 원료확보 방안이 논의된 후 활성성분의 대량생산이 이루어져야 할 것으로 여겨진다.

미더덕 가공 시 발생하는 체액의 활용방안을 모색한 결과 어류의 사료에 일정량 첨가함으로써 바이러스에 대한 저항력을 향상시킴으로써 사료 첨가물질로의 활용이 가능한 것으로 판명되었으므로 현장실험을 통한 활용방안이 모색되어야 한다. 그리고 체액에 함유된 다량의 아미노산과 당의 반응조건을 설정하여 영양가 풍부한 천연조미료의 대량생산이 가능함으로 대량생산을 위한 pilot 시설을 통한 시제품의 생산으로 어민들의 소득증대에 기여할 수 있는 것으로 나타났다.

2. 타 연구에의 응용

해양 바이오산업의 세계시장은 연간 30억불 수준이지만, 매년 수배씩 증가하고 있다. 해양소재에서 제품화 성공률은 1/6,000으로 육상생물소재의 1/13,000보다 두 배나 높으므로 연구의 효율성인 높음을 알 수 있다. 기능성 고분자물질, 건강음료 등이 이미 상품화되었고, 신 기능성 미생물과 효소에 대한 탐색도 활발히 추진되고 있다.

본 연구에서 응용되어진 풍미개선 물질의 개발방법, 항균물질의 정제 및 구조 동정방법, 글리코사미노글리칸의 정제 및 구조 동정방법, 기능성물질의 동물 실험방법 등은 새로운 해양생물의 기능성을 탐색하는데 응용이 가능하다. 따라서 미색류 껍질에서 추출정제된 GAGs를 활용한 퇴행성관절염을 예방하고 개선할 수 있는 제품의 개발을 위한 추가연구가 필요하다. 뿐만 아니라 수산물 가공 시 발생하는 부산물에 함유되어 있는 기능성물질의 추출 및 정제 기술개발에의 활용이 가능하다.

3. 기업화 추진방안

2006년 4월 27일부터 30일까지 거제에서 개최된 경상남도민체육대회에 미더덕 관련제품을 출시하고 소비자의 반응을 체크하였다. 소비자의 반응에 따라 미더덕 관련 제품에 대한 가공방법을 확립한 다음 제조시설을 설립하기로 동의하였다. 그 이후 미더덕 관련제품 생산 및 판매를 위하여 거제시 가조도 내에 미더덕 가공공장을 설립하기로 하고 20여명의 어민을 중심으로 '거제바다영어조합법인'을 설립 등기하고 본격적인 상품생산 및 판매를 위해 아래와 같은 심벌과 캐릭터를 완성하고 생산 및 판매를 위한 준비를 마친 상태이다. 그리고 제품판매를 위한 포장지의 형태도 완성하고 각 제품별로 포장지 디자인도 마친 상태이며 아래에 사진은 샘플을 나타낸 것이다. 특히 미더덕 가공 시 발생하는 갈변현상을 억제하기 위해 사용되는 비타민 C는 소비자들에게 호응을 얻을 수 있는 소재로 매우 활용도가 높아질 것으로 여겨진다.



사진 1. 2006 경상남도 도민체육대회, 거제공설운동장에서 전시회 출품.

제 6 장 참고문헌

- Ackman RG. 1995. Composition and nutritive value of fish and shellfish lipids. In: Fish and Fishery Products. Ruither A(ed.), CAB International, UK, pp. 117-156.
- Ahn SH, Jung SH, Kang SJ, Jeong TS, Choi BD. 2003. Extraction of glycosaminoglycans from *Styela clava* tunic. *Korean J Biotechnol Bioeng* 18: 180-185.
- Aiello A, Fattorusso E, Menna M. 1996. Low molecular weight metabolites of three species of ascidians collected in the lagoon of Venice. *Biochem System Ecol* 24: 521-529.
- Ali MS, Saleem M, Yamdagni R, Ali MA. 2002. Steroid and antibacterialsteroidal glycosides from marine green alga *Codium iyengarii* Borgesen. *Nat Prod Lett* 16: 407-413.
- Alves AP, Mulloys B, Diniz JA, Mourao PAS. 1997. Sulfated Polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins. *J Biol Chem* 272: 6965-6971.
- Ames BN. 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221: 1256-1264.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen MK. 1993. Oxidant, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922.
- Anno K, Kimiko O, Seno N. 1974. A chitin Sulfate-like polysaccharide from the Test of the Tunicate *Halocynthia roretzi*. *Biochim Biophys Acta* 362: 215-219.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. In: Association of Official Analytical Chemists. 15th ed., AOCS Press, Washington, D.C., USA.
- AOCS. 1990. AOCS official method Ce 1b-89. In: Official Methods and Recommended Practice of the AOCS. 4th ed., AOCS Press, Champaign, IL, USA.
- Arias JI, Aller MA, Arias J. 2005. The use of inflammation by tumor cells. *Cancer* 104: 223-228.

- Aruoma OI. 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc* 75: 199-212.
- Asia A, Sugawara T, Ono H, Nagao A. 2004. Biotransformation of fucoxanthin into amarouchixanthin in mice and Hep G2 cells: formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites. *Drug Metab Dispos* 32: 205-211.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.
- Bennamara A, Abourriche A, Berrada M, Charrouf M, Chaib N, Boudouma M, Carneau FX. 1999. Methoxybifurcarenone: an antifungal and antibacterial mono diterpenoid from the brown algae *Cystoseria tamariscifolia*. *Phytochemistry* 52: 37-40.
- Bitter T, Muir HM. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem* 4: 330-334.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.
- Burton GW, Ingold KU. 1989. Mechanisms of antioxidant action: preventive and chain-breaking antioxidants. In: Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine. Miquel J, Quintanilha AT, Weber H(eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 29-56.
- Cadwallader KR, Baek HH, Chung HY, Moody MW. 1994. Contribution of lipid-derived components to the flavor of alligator meat. In: Lipids in Food Flavor. Ho CT, Hartman TG(eds.), American Chemical Society, Washington D.C., pp. 186-195.
- Carini R, Poli G, Diazini MU, Maddix SP, Slater TF, Cheesman KH. 1990. Comparative evaluation of the antioxidant activity of α -tocopherol, α -tocopherol poly ethylene glycol 1000 succinate and α -tocopherol succinate in isolated hepatocytes and liver microsomal suspensions. *Biochem Pharmacol* 39: 1597-1601.
- Carpenter KJ. 1973. Damage to lysine in food processing: Its measure and its significance. *Nutr Abstr Rev* 43: 424-428.
- Cassaró CMF, Dietrich CP. 1997. Distribution of sulfated mucopolysaccharide in invertebrates. *J Biol Sci* 252: 2254-2261.

- Cerny C. 2007. Origin of carbons in sulfur-containing aroma compounds from the Maillard reaction of xylose, cysteine and thiamine. *LWT* 40: 1309-1315.
- Cha YJ, Baek HH, Hsieh TCY. 1993. Volatile components in flavor concentrates from crayfish processing waste. *J Sci Food Agric* 58: 239-243.
- Cha YJ, Cadwallader KR, Baek HH. 1993. Volatile flavor components in snow crab cooker effluent and effluent concentrates. *J Food Sci* 58: 525-529.
- Cha YJ, Baek HH. 1995. Quantitative analysis of alkylpyrazines in snow crab cooker effluents. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 454-458.
- Chien YH, Jeng SC. 1992. Pigmentation of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. *Aquaculture* 102: 333-346.
- Cho KS, Min EY, Kang JC. 2002. Changes of hematological constituents in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to HCB and PCBs. *J Korean Fish Soc* 35: 110-114.
- Choi BD, Ho CT. 1995. Volatile compounds of ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J Korean Fish Soc* 28: 761-769.
- Choi HS, Park SR, Jung CG. 2002. Biochemical analysis of blood serum from wintering seabream with green liver syndrome. *J Fish Pathol* 15: 43-48.
- Constantinides SM, Karakoltsidis PA, Zotos A. 1995. Composition of the commercially important Mediterranean finfish, crustaceans, and mollusks. *J Food Comp Anal* 8: 258-273.
- Chun KS, Keum YS, Han SS, Song YS, Kim SH, Surh YJ. 2003. Curcumin inhibits phorbol ester-induced expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through suppression of extracellular signal-regulated kinase activity and NF- κ B activation. *Carcinogenesis* 24: 1515-1524.
- Chun YH, Kim CK, Kim WJ. 1986. Effect of temperature, pH and sugars on kinetic property of Maillard reaction. *Korean J Food Sci Technol* 18: 55-60.

- Chung HY, Cadwallader KR. 1994. Aroma extract dilution analysis of blue crab claw meat volatiles. *J Agric Food Chem* 42: 2867-2870.
- Chung SK, Osawa T, Kawakishi S. 1997. Hydroxyl radical scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard(*Brassica nigra*). *Biosci Biotech Biochem* 61: 118-123.
- Constantinides SM, Karakoltsidis PA, Zotos A. 1995. Composition of the commercially important Mediterranean finfish, crustaceans, and molluscs. *J Food Comp Anal* 8: 258-273.
- Cripps JG, Crespo FA, Romanovskis P, Spatola AF, Fernandez-Botrn R. 2005. Modulation of acute inflammation by targeting glycosaminoglycan-cytokine interactions. *Int Immunopharmacol* 5: 1622-1632.
- Crispino A, DeGiulio S, DeRosa S, DeStefano A, Zavodnik N. 1994. A sulfated normonoterpenoid from the ascidian *Polycitor adriaticus*. *J Nat Prod* 57: 1575-1577.
- Dietrich CP, Dietrich SMC. 1976. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem* 70: 645-647.
- Duval B, Shetty K, Thomas WH. 1999. Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas invalida* after exposure to UV light. *J Appl Phycol* 11: 559-566.
- Ermak TH. 1975. Cell proliferation in the digestive tract of *Styela clava* (Urochordata: Ascidiacea) as revealed by autoradiography with tritiated thymidine. *J Exp Zool* 194: 449-465.
- Evers WJ, Heisohn Jr. HH, Mayers BJ, Sanderson A. 1976. Furans substituted in the three position with sulfur. In: Phenolic, Sulfur and Nitrogen Compounds in Food Flavours. Katz I, Charalambous G(eds.), ACS Symposium series 26, Washington D.C., pp. 184-196.
- FAO/WHO/UNU. 1985. Energy and protein requirements. Technical Report Series 724. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Faulkner DJ. 1984. Marine natural products In: metabolites of marine algae and herbivorous marine mollusks. *Nat Prod Rep* 1: 251-280.
- Faulkner DJ. 1986. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 3: 1-33.
- Ferro DR, Provasoli A, Ragazzi M, Casu B, Torri G, Bossennec V, Perly B,

- Sinaÿ P, Petitou M, Choay J. 1990. Conformer populations of L-iduronic acid residues in glycosaminoglycan sequences. *Carbohydrate Research* 195: 157-167.
- FNB. 2004. Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate. The National Academies Press, Washington, D.C., USA.
- Fujimoto K, Moyayama Y, Kaneda T. 1982. Mechanism of the formation of ascidian flavor in *Halocynthia roretzi*. *Bull Japan Soc Sci Fish* 48: 1323-1326.
- Fukuzawa T, Privett OS, Takahashi Y. 1971. Effect of essential fatty acid deficiency on lipid transport from liver. *Lipids* 6:388-393.
- Gabriel UU, Ezeri GNO, Opabunmi OO. 2004. Influence of sex, source, health status and acclimation on the haematology of *Clarias gariepinus* (Burch, 1822). *Afr J Biotechnol* 3: 463-467.
- Gamez-Meza N, Higuera-Ciapara L, Calderon DLB, A.M., Vazquez-Moreno L, Noriega-Rodriguez J, Angulo-Guerrero O. 1999. Seasonal variation in the fatty acid composition and quality of sardine oil from *Sardinops sagax caeruleus* of the Gulf of California. *Lipids* 34: 639-642.
- Gandra M, Cavalcante M.C.M. Pavao M.S.G. 2000. Anticoagulant sulfated glycosaminoglycans in the tissues of the primitive chordate *Styela plicata* (Tunicate). *Glycobiology* 10: 1333-1340.
- Gopakumar K, Nair NM. 1975. Lipid composition of five species of Indian prawn. *J Sci Food Agric* 26: 319-325.
- Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344: 721-724.
- Hata RI, Nagai Y. 1978. A low-sulfated chondroitin sulfate in human blood and urine. *Biochim Biophys Acta* 543: 156-166.
- Hirano T, Yamazawa S, Suyama M. 1978. Chemical composition of gonad extract of sea-urchin, *Strongylocentrotus nudus*. *Bull Japan Soc Sci Fish* 44: 1037-1042.
- Hoffman P, Linker A, Meyer K. 1958. The acid mucopolysaccharides of connective tissues. III. The sulphate linkage. *Biochem Biophys Acta*, 30:

184-185.

- Hodge JE. 1953. Chemistry of browning reactions in model systems. *J Agric Food Chem* 1: 928-932.
- Hsieh TCY, Vejaphan W, Williams SS, Matiella JE. 1989. Volatile flavor components in thermally processed Louisiana red swamp crayfish and blue crab. In: Thermal Generation of Aromas. Parliment TH, McGorin RJ, Ho CT(eds.), ACS Symposium series 409, Washington D.C., pp. 386-395.
- Hwang DM, Kundu JK, Shin JW, Lee JC, Lee HJ, Surh YJ. 2007. cis-9, trans-11 conjugate linoleic acid down regulates phorbol ester induced NF- κ B activation and subsequent COX-2 expression in hairless mouse skin by targeting I κ B kinase and PI3K-Akt. *Carcinogenesis* 28: 363-371.
- Jang SI, Jo YJ, Lee JS. 1992. Effects of vitamins and glycyrrhizin added to oxidized diets on the growth and on the resistance to Edwardsiella infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J Aquacult* 5: 143-155.
- Jiang AL, Liu XM, Wang CH. 2005. Growth status and nutrition analysis of *Styela clava* in Yantai maritime space. *Mar Sci Bull* 24: 13-16.
- JMP. 2002. Statistics and graphics guide. Version 5.0. SAS Institute, Cary, NC. pp. 179-209.
- Josephson DB, Lindsay RC. 1986. Enzymic generation of volatile aroma compounds from fresh fish. In: Biogenesis of Aroma. Parliment TH, Croteau R(eds.), ACS Symposium series 317, Washington D.C., pp. 201-219.
- Josephson DB, Lindsay RC. 1985. Retro-aldol degradation of unsaturated aldehydes: Role in the formation of c4-heptenal from t2,c6-nonadienal in fish, oyster, and other favours. *JAOCs* 64: 132-138.
- Jung ES, Kim JY, Park EJ, Park HR, Lee SC. 2006. Cytotoxic effects from *Styela clava* against human cancer cell lines. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 823-827.
- Jyonouchi H, Sun S, Gross M. 1995. Effect of carotenoids on in vitro immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells: astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, enhances in

- vitro immunoglobulin production in response to a T-dependent stimulant and antigen. *Nutrition Cancer* 23: 171-183.
- Kamiya H, Endo Y, Uchida A, Raj U. 1987. Antitumor activity of the macromolecular fraction from a Fihan tunicate *Didemnum carians*. *Nippon Suisan Gokkaishi* 53: 267-273.
- Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. 1999. Induction of NF- κ B by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 9: 601-604.
- Kaoru A, Hideyoshi Y, Shin-ichi I. 1990. Halocyamines: novel antimicrobial tetrapeptide-like substances isolated from the hemocytes of solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. *Biochem* 29: 159-165.
- Karahadian C, Lindsay RC. 1989. Flavor chemistry: trends and developments. Teranishi R, BATTERY RG, Shahidi F(eds.), ACS Symposium series 388, Washington D.C., pp. 60-78.
- Karin M. 1999. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase(IKK) complex. *Oncogene* 18: 6867-6874.
- Karin M, Greten FR. 2005. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 5: 749-759.
- Kawai Y, Seno N, Anno K. 1966. Chondroitin polysulfate of squid cartilage. *J Biochem* 60: 317-321.
- Kelly KL, Cooper EL, Raftos DA. 1992. Purification and characterization of a humoral opsonin from the solitary urochordate *Styela clava*. *Comp Biochem Physiol Part B* 103: 749-753.
- Kim CT, Kang BC, Jee HK, Choi AJ, Kim CJ, Cho YJ, Hahn HG, Nam KD. 2005. Effect of chitosan-based feed additive on the growth and quality of cultured Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Chitin Chitosan* 10: 121-127.
- Kim DS, Kim JH, Jong CH, Lee SY, Lee SM, Moon YB. 1998. Utilization of obosan(dietary herbs) I. Effects on survival, growth, feed conversion ratio and condition factor in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Fish Pathol* 11: 213-221.
- Kim JJ, Kim SJ, Kim SH, Park HR, Lee SC. 2005. Antioxidant and anticancer activities of extracts from *Styela plicata*. *J Korean Soc Food Sci*

- Nutr* 34: 937-941.
- Kim JJ, Kim SJ, Kim SH, Park HR, Lee SC. 2006. Antioxidant and anticancer activities of extracts from *Styela clava* according to the processing methods and solvents. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 278-283.
- Kim JY, Choi MS. 1996. Effect of dietary *Enteromorpha compressa* on growth and blood properties in Israeli strain of common carp(*Cyprinus carpio*). *J Aquacult* 9: 151-157.
- Kim KS, Lee EH, Oh KS, Lee TH, Ahn CH, Chung YH. 1985. Lipid components of sea squirt, *Halocynthia roretzi*, and Mideuduck, *Styela clava*. *Korean J Food Sci Technol* 17: 289-295.
- Kim KW, Park KY, Lim YS, Kim TW, Yang JH, Park HW, Bai SC. 2003. Effects of dietary energy and protein levels on growth, respiration and growth efficiency of juvenile rockfish(*Sebastes schlegeli*). *J Aquacult* 16: 88-93.
- King CY, Shim MJ, Choi EC, Lee YN, Kim BK. 1981. Studies on antitumor components of Korean Basidiomycetes. Mycelial culture and antitumor components of *Ganoderma lucidum*. *Korean Biochem J* 14: 100-109.
- Ko SN, Yoon SH, Yoon SK, Kim WJ. 1997. Development of meat-like flavor by Maillard reaction of model system with amino acids and sugars. *Korean J Food Sci Technol* 29: 827-838.
- Krinsky NI. 1992. Mechanism of action of biological systems. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 200: 248-254.
- Krinsky NI. 1993. Actions of carotenoids in biological systems. *Ann Review Nutri* 13: 561-587.
- Krinsky NI. 1994. The biological properties of carotenoids. *Pure Appl Chem* 66: 1003-1010.
- Kumar V, Rani A, Solanki S, Hussain SM. 2006. Influence of growing environment on the biochemical composition and physical characteristics of soybean seed. *J Food Comp Anal* 19: 188-195.
- Kusakabe T. 1995. Expression of larval-type muscle actin encoding genes

- in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Gene* 153: 215-218.
- Kusaka H, Narita H, Iwata K, Ohta S. 1983. Gas liquid chromatographic determination of flavor component from ascidian. *Bull Japan Soc Sci Fish* 49: 617-620.
- Kwon MK, Kim YC, Shon YC, Park SI. 1999. The dietary supplementing effects of Kugija, *Lycium chinense*, on immune responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, to *Edwardsiella tarda*. *J Fish Pathol* 12: 73-81.
- Kwon TW, Menzel DB, Olcott HS. 1965. Reactivity of malonaldehyde with food constituents. *J Food Sci* 30: 808-809.
- Lee EH, Chung SY, Ha JH, Sung NJ, Cho KO. 1975. Free amino acid content in the extract of Mideuduck, *Styela clava*. *Bull Korean Fish Soc* 8: 177-180.
- Lee JH, Han KW. 1989. The amino-carbonyl reaction in the fructose-glycine mixture system. *Korean J Food Sci Technol* 21: 351-359.
- Lee KH, Choi BD, Kang SJ, Choi YJ, Youm MG. 1994. Utilization of ascidian(*Halocynthia roretzi*) tunic. 3. Carotenoid composition of ascidian tunic. *Bull Korean Fish Soc* 27: 344-350.
- Lee KH, Ki GM, Hong BI, Jung BC, Lee DH, Park CH. 1995. Seasonal variations in the taste components of warty sea squirt(*Styela clava*). *J Korean Soc Food Nutr* 24: 274-279.
- Lee SM, Lee JY, Hur SB. 1994. Essentiality of dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. *J Korean Fish Soc* 27: 721-726.
- Lee SM, Kim DJ, Kim JK, Hur SB, Lee JK, Lim HK. 2000. Effects of *Kluyveromyces fragilis*, *Candida utilis* and brewer's yeast as an additive in the diet on the growth and body composition of juvenile Korean rockfish(*Sebastes schlegeli*). *J Korean Fish Soc* 33: 463-468.
- Lee SM, Lee JY, Jeon IG. 2000. Dietary squid oil and soybean oil ratio on growth and body composition of Korean rockfish *Sebastes schlegeli*. *J Aquacult* 13: 207-213.
- Lehrer RI, Lorenzo PM, Lee IH, Sjostrand B. 2002. Immunolocalization of clavanins in *Styela clava* hemocytes. *Develop Comp Immunol* 26: 505-515.

- Leu SS, Jhaver SN, Karakoltsidis PA, Constantinides SM. 1981. Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*, L/): Seasonal variation in proximate composition and distribution of chemical nutrients. *J Food Sci* 46: 1635-1638.
- Li Q, Withoff S, Verma IM. 2005. Inflammation-associated cancer: NF- κ B is the lynchpin. *Trends Immunol* 26: 318-325.
- Lin WN, Luo SF, Lee CW, Wang CC, Wang JS, Yang CM. 2007. Involvement of MAPKs and NF- κ B in human tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal* 19: 1258-1267.
- Loda MN, Lee JS, Kang SJ, Choi BD. 2006. Seasonal variation in the nutritional content of Mideodeok *Styela clava*. *J Fish Sci Technol* 9: 49-56.
- Lorenzo LM, Arbones B, Tilstone GH, Figueiras FG. 2005. Across-shelf variability of phytoplankton composition, photosynthetic parameters and primary production in the NW Iberian upwelling system. *J Marine Sys* 54: 157-173.
- Lorian V. 1991. Significance of medical microbiology in the case of patients. In: Antibiotics laboratory medicine. Williams & Wilkins, Baltimore, ML, pp. 17-105.
- Mauro SGP, Mourao PAS, Barbara M, Douglas MT. 1995. A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycans from ascidian. *J Biol Chem* 270: 31027-31036.
- Mauro SGP, Aiello KRM, Werneck CC, Silva LCF, Valentines AP, Mully B, Colwell NS, Tollefsen DM, Mourao PAS. 1998. Highly sulfated dermatan sulfates from ascidians. *J Biol Chem* 273: 27848-27857.
- Matsumoto G, Namekawa J, Muta M, Nakamura T, Bando H, Tohyama, K, Toi, M, Umezawa, K. 2005. Targeting of NF- κ B pathways by DHMEQ, a novel inhibitor of breast carcinomas: anti-tumor and anti-angiogenic activity *in vivo*, *Clin. Cancer Res* 11: 1287-1293.
- Matsuno T, Ookubo M, Komori T. 1985. Carotenoids of tunicates. III. The structural elucidation of two new marine carotenoids, amarouciaxanthin A and B. *J Nat Prod* 48: 606-613.
- Matsuno T, Tsushima M. 1995. Comparative biochemical studies of carotenoids in sea cucumbers. *Comp Biochem Physiol Part B* 111: 597-605.

- Matuso K, Miyazono I. 1993. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 1377-1379.
- Mayer AMS, Hamann MT. 2002. Marine pharmacology in 1999: compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities; affecting the cardiovascular, endocrine, immune, and nervous system and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol Part C* 132: 315-339.
- McBeth TW. 1972. Carotenoids from nudibranchs. *Comp Biochem Physiol* 41B: 55-68.
- Mega JA. 1975. The role of sulfur compounds in food flavor. Par II. Thiophenes. *Crit Rev Food Sci Nutr* 6: 241-270.
- Menzel LP, Lee IH, Sjostrand B, Lehrer RI. 2002. Immunolocalization of clavanins in *Styela clava* hemocytes. *Develop Comp Immunol* 26: 505-515.
- Mitchell AE, Asami DK, Hong YJ, Barrett DM. 2003. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J Agric Food Chem* 51: 1237-1241.
- MOMAF. 2005. Fishery Production Survey. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, Korea.
- Mourao PAS, Dietrich CP. 1979. Chondroitin sulfates of the epiphysial cartilages of different mammals. *Comp Biochem Physiol B* 62: 115-117.
- Nadanaka S, Sugahara K. 1997. The unusual tetrasaccharide sequence GlcA beta 1-3GalNAc(4-sulfate) beta 1-4GlcA(2-sulfate) beta 1-3GalNAc (6-sulfate) found in the hexasaccharides prepared by testicular hyaluronidase digestion of shark cartilage chondroitin sulfate D, *Glycobiology* 7: 253-263.
- Nakagawa HS, Kasahara E, Uuo T, Minami T, Akira K. 1981. Effect of *Chlorella* extract supplement in diet on resisting power against disease of culture ayu. *Aquaculture* 29: 109-116.
- Nakagawa H. 1985. Usefulness of *Chlorella*-extract for improvement of the physiological condition of cultured ayu, *Plecoglossus altivelis*(pisces).

- Tethys* 11: 328-334.
- Nam N. 2006. Naturally occurring NF- κ B inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 6: 945-951.
- Naik GH, Priyadarsini KI, Satav JG, Banavalikar MM, Sohoni PP, Biyani MK, Mohan H. 2003. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. *Phytochemistry* 63: 97-104.
- NFRDI. 2005. Korea Marine Environment Data. National Fisheries Research Development Institute, Korea.
- Nikerson GB, Likens ST. 1996. Gas chromatographic evidence for occurrence of hop oil components in beer. *J Chromatography* 21: 1-5.
- Nisizawa K. 1978. Marine algae from a viewpoint of pharmaceutical studies. *Jap J Phycol* 26: 73-78.
- Nursten HE. Aroma compounds from the Maillard reaction. In: *Developments in Food Flavours*. Birch GG, Lindley MG(eds.), Elsevier Science Publishing Co., pp. 173-186.
- Oehlenschlager J. 1991. Chemical composition of the flesh and other tissues of Antarctic fish species of the families Chaninchthyidae and Nototheniidae. *Food Chem* 40: 159-167.
- Oh KS, Kim JS, Heu MS. 1997. Food constituents of edible ascidians *Halocynthia roretzi* and *Pyura michaelsoni*. *Korean J Food Sci Technol* 29: 955-962.
- Oh KS, Kang ST, Ho CT. 2001. Flavor constituents in enzyme hydrolysates from shore swimming crab and spotted shrimp. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 787-795.
- Oh SJ. 2004. Development and application of functional feed. *Feed Journal*, 7: 62-67.
- Okada S, Nur-E-Borhan SA, Yamguchi K. 1994. Carotenoid composition in the commercial black tiger prawns. *Fisheries Sci* 60: 213-215.
- Okuzumi J, Takahashi T, Yamane T, Kitao Y, Inagake M, Ohya K, Nishino H, Tanaka Y. 1993 Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mouse

- duodenal carcinogenesis. *Cancer Lett* 68: 159-168.
- Orban E, Lena GD, Navigato T, Casini I, Marzetti A, Caproni R. 2002. Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels(*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different italian sites. *Food Chemistry* 77: 57-65.
- Osakabe N, Takano H, Sanbongi C, Yasuda A, Yanagisawa R, Inoue K, Yoshikawa T. 2004. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis(SAR) and its mechanism. *Bio Factors* 21: 127-131.
- Osawa T, Namiki M. 1981. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. *J Agricul Food Chem* 45: 735-739.
- Park SM, Lee BB, Hwang YM, Lee SC. 2006. Quality properties of fish paste containing *Styela clava*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 908-911.
- Park SU, Kwon MG, Lee YH, Kim KD, Shin IS, Lee SM. 2003. Effects of supplemental *Undaria*, obosan and wasabi in the experimental diets on growth, body composition, blood chemistry and non-specific immune response of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*, *J Aquacult* 16: 210-215.
- Pedersen SA, Ribergaard MH, Simonsen CS. 2005. Micro- and mesozooplankton in Southwest Greenland waters in relation to environmental factors. *J Marine Sys* 56: 85-112.
- Pham CB, Cheftel JC. 1990. Influence of salts, amino acids and urea on the non-enzymatic browning of the protein-sugar system. *Food Chem* 37: 251-260.
- Popov S, Slantchev K, Yalcin F, Ersoz T, Nechev J, Calis I, Stefanov K. 2002. Composition of lipophylic extracts from two tunicates, *Styela* sp. and *Phallusia* sp., from the eastern Mediterranean. *Z Naturforsch* 57: 534-540.
- Qian PY, Thiyagarajan V. 2003. Effect of temperature, salinity and delayed attachment on development of the solitary ascidian *Styela plicata* (Lesueur). *J Exp Marine Bio Eco* 290: 133-146.
- Qian SY, Buettner GR. 1999. Iron and dioxygen chemistry is an important

- route to initiation of biological free radical oxidations: An electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radic Biol Med* 26: 1447-1456.
- Rebachuk NM, Maksimov OB, Boguslavskaya LS, Fedoreev SA. 1985. Carotenoids of the ascidian *Halocynthia aurantium*. *Chem Natural Comp* 20: 407-409.
- Reineccius G. 2006a. Off-Flavors and taints in foods. In: Flavor Chemistry and Technology. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 161-200.
- Reineccius G. 2006b. Changes in food flavor due to processing. In: Flavor Chemistry and Technology. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 103-137.
- Richard WF, David JB, Alan JB. 1986. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 883: 173-177.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. 1995. The relative antioxidant activity of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 22: 375-383.
- Richmond A. 1998. Spirulina. In: Micro-Algal Biotechnology. Borowitz MA, Borowitzka LJ(eds.), Cambridge University Press, Cambridge pp. 85-121.
- Romashkova JA, Makarov SS. 1999. NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signaling. *Nature* 401: 86-90.
- Rogie A, Skinner ER. 1985. The roles of the intestine and liver in the biosynthesis of plasma lipoproteins in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Comp Biochem Physiol* 81B: 285-289.
- Saito H, Kotani Y, Keriko JM, Xue C, Taki K, Ishihara K, Ueda T, Miyata S. 2002. High levels of n-3 polyunsaturated fatty acids in *Euphausia pacifica* and its role as a source of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids for higher trophic levels. *Marine Chem* 78: 9-28.
- Sampaio LO, Dietrich CP. 1981. Changes of sulfated mucopolysaccharides and mucopolysaccharides during fetal development. *J Biol Chem* 256: 9205-9210.
- Sanina NM, Kostetsky EY. 2002. Thermotropic behavior of major

- phospholipids from marine invertebrates: changes with warm-acclimation and seasonal acclimatization. *Comp Biochem Physiol Part B* 133: 143-153.
- Satho KI, Nakagawa H, Kasahara S. 1987. Effect of *Ulva* meal supplementation on disease resistance of red sea bream. *Nippon Susan Gakkaishi* 53: 1115-1120.
- Sekino T, Murata K, Saito Y, Tsubura K. 1977. A study of acidic glycosaminoglycans in human gastric tissue. *Digestion* 16: 28-29.
- Seo BY, Jung ES, Kim JY, Park EJ, Park HR, Lee SC, Park EJ. 2006. Effect of acetone extract from *Styela clava* on oxidative DNA damage and anticancer activity. *J Korean SocAppl Biol Chem* 49: 227-232.
- Shiau SY, Yu YP. 1999. Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture* 179: 439-446.
- Slinkard K, Singleton VL. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *America J Enol Viticul* 28: 49-55.
- Smith MJ, Dehnel PA. 1971. The composition of tunic from four species of ascidians. *Comp Biochem Physiol Part B* 40: 615-622.
- Socal G, Aubry FB, Berton A, Bastianini M, Acri F. 2004. Phytoplankton succession in a coastal area of the NW Adriatic, over a 10-year sampling period(1990-1999). *Continental Shelf Res* 24: 97-115.
- Song PS, Chichester CO, Stadman FH. 1966. Kinetic behavior and mechanism of inhibition in the Maillard reaction: Kinetic behavior of the reaction between D-glucose and glycine. *J Food Sci* 31: 906-913.
- Song YB, Moon SW, Kim SJ, Lee YD. 2002. Effect of fermented orange in commercial diet on growth of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Aquacult* 15: 103-110.
- Socal G, Bernardi-Aubry F, Berton A, Bastianini M, Acri F. 2004. Phytoplankton succession in a coastal area of the NW Adriatic, over a 10-year sampling period(1990 - 1999). *Continental Shelf Res* 24: 97-115.
- Stamp JA, Labuza TP. 1983. Kinetics of the Maillard reaction between aspartame and glucose in solution at high temperatures. *J Food Sci* 49:

543-547.

- Surai AP, Surai PF, Steinberg W, Wakeman WG, Speake BK, Sparks NHC. 2003. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. *British Poult Sci* 44: 612-619.
- Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemical: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat Res* 480-481: 243-268.
- Surh, YJ. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 3: 768-780.
- Tan TT, Coussens LM. 2007. Humoral immunity, inflammation and cancer. *Curr Opin Immunol* 19: 209-216.
- Tanchotikul U, Hsieh TC-Y. 1989. Volatile flavor components from crayfish waste. *J Food Sci* 54: 1515-1520.
- Totter JR. 1980. Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1763-1767.
- Turrin NP, Plata-Salaman CR. 2000. Cytokine-cytokine interactions and the brain. *Brain Res Bull* 51: 3-9.
- Vairappan CS, Kawamoto T, Miwa H, Suzuki M. 2004. Potent antibacterial activity of halogenated compounds against antibiotic resistant bacteria. *Planta Med* 70: 1087-1090.
- Valentine RC, Valentine DL. 2004. Omega-3 fatty acids in cellular membranes: a unified concept. *Prog Lipid Res* 43: 383-402.
- Varki A, Freeze HH, Manzi AE. 1993. Preparation and analysis of glycoconjugate. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. Frederik MA, et al.(ed.), John Wiley & Sons Inc., New York, pp. 17.9-17.13B.
- Vieira RP, Mulloy B, Mourao PAS. 1991. Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. *J Biol Chem* 266: 3530-3536.
- Vlieg P, Body DR. 1988. Lipid contents and fatty acids composition of some New Zealand freshwater finfish and marine finfish, shellfish, and roes. *New Zealand J Marine Freshwater Res* 22: 151-162.

- Wink DA, Nims RW, Saavedra JE, Utermahlen WE, Ford Jr. PC. 1994. The fenton oxidation mechanism: reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6604-6608.
- Winston GW, Lemaire DGE, Lee RF. 2004. Antioxidants and total oxyradical scavenging capacity during grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryogenesis. *Comp Biochem Physiol C* 139: 281-288.
- Wright RK, Cooper EL. 1984. Protochordate immunity II. Diverse hemolymph lectins in the solitary tunicate *Styela clava*. *Comp Biochem Physiol Part B* 79: 269-277.
- Xu N, Fan X, Yan X, Li X, Niu R, Tseng CK. 2003. Antibacterial bromophenols from the marine red alga *Rhodomela confervoides*. *Phytochemistry* 62: 1221-1224.
- Yan X, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T. 1999 Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci Biotech Biochem* 63: 605-607.
- Yanar Y, Çelik M, Yanar M. 2004. Seasonal changes in total carotenoid contents of wild marine shrimps (*Penaeus semisulcatus* and *Metapenaeus monoceros*) inhabiting the eastern Mediterranean. *Food Chemistry* 88: 267-269.
- Yonekura H, Oguri K, Nakazawa K, Shimizu S, Nakanish Y, Okayama M. 1982. Isolation and partial characterization of sulfated glycoproteins synthesized by corneal epithelium. *J Biol Chem* 257: 11166-11175.
- Yoon SH, Lee JK, Nam HS, Lee HJ. 1994. Formation of meatlike flavors by Maillard reaction using hydrolyzed vegetable protein (HVP). *Korean J Food Sci Technol* 26: 781-786.
- Youn HS, Lee JY, Fitzgerald KA, Young HA, Akira S, Hwang DH. 2005. Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: Molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *J Immunol* 175: 3339-3346.
- Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Kang KW, Choi YJ, Hwang DH. 2006. Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol

- component of green tea. *Biochem Pharmacol* 72: 850-859.
- Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. 2003. Nuclear factor-kappa B as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med* 31: S105-S111.
- 中内光昭. 1986. ホヤの生物學. 東京大學出版會, UP Biology, pp 6-51.
- 佐藤 寛. 1993. 海藻成分の機能性. 海藻の科學. 大石圭一編, 朝倉書店, 東京, 日本, p 160-181.