

발간등록번호

11-1541000-001498-01

보안과제(), 일반과제(✓) 과제번호 109201-3

전복 소화분해시스템을 활용한 천연 항알러지 제품 개발
(Development of a natural anti-allergic product using
abalone-gastrointestinal digestion system)

조선대학교 해양생명과학과
(조선대학교 산학협력단)

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 수산실용화기술개발사업 “전북 소화분해시스템을 활용한 천연 항알러지 제품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 5 월 31 일

주관연구기관명 : 조선대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 정 원 교

참 여 연 구 자 : 최 일 환

천 충 길

이 다 영

전 진

외 17 명

참 여 기 업 명 : 골드온누리영어조합법인

요 약 문

I. 제 목 : 전복 소화분해시스템을 활용한 천연 항알러지 제품 개발 (Development of a natural anti-allergic product using abalone-gastrointestinal digestion system)

II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 전국 최대의 해양생태공간, 즉 해안선, 도서, 갯벌의 약 50%, 60%, 44%를 차지하고 있는 전라남도는 국내 최대 수산생물자원이 서식, 생산되는 해양수산생물산업 전초기지임. 그러나 해당 지역 수산산업은 소규모 가공업체 (약 724 개 업체)와 어민들이 주도하는 어업, 양식, 유통, 단순가공품 판매형태의 단순 영세한 구조를 가지고 있음.

○ 지역 해양생물 산업을 미래성장동력 산업으로 육성하기 위해서는 현 시점을 기준으로 쉽게 접근할 수 있고 고부가가치 및 첨단산업으로 육성할 수 있는 비전을 마련해야하며 지역의 전통수산자원을 첨단해양바이오산업에 활용하기 위한 인프라구축, 기술개발, 우수인력양성, 고급기술의 사업화, 벤처기업 창업을 유치 촉진함으로써 해양생물소재의 고부가가치 기술개발과 산업구조 다변화를 통한 지역산업구조의 취약성을 극복해야함.

○ 아울러 이러한 노력을 통해 다양한 고차가공식품과 건강기능성 LOHAS 제품 등 고부가가치 기능성 제품을 개발하고 전복 최대 소비국인 중국과 일본, 대만, 동남아, 미국, 유럽 등 세계시장을 대상으로 국내외 판매시장을 확대해야 함.

○ 전복과 해조류는 완도를 비롯한 전남지역의 대표적 수산자원으로써 전국 총 생산량 96.5%와 80%을 각각 담당하고 있음. 최근 들어 생산량 급증에 따른 가격하락과 상품성이 낮은 저질 및 폐사전복 (전체 생산량 30% 이상)에 대한활용 대책, 그리고 가공 후 미활용 자원으로 대량

발생되는 내장의 활용 방안이 절실히 요구되는 시점임.

○ 지금까지 전복을 소재로 한 가공제품은 통조림, 죽, 장조림, 내장 젓갈, 어묵 등의 일부 가공식품들이 있지만 타 수산가공품에 비해 소비자 선호도 및 인지도가 낮아 전복 산업의 위기를 타결할 방안이 절실한 상황임. 따라서 국내 전복시장 활성화와 어민 보호를 위해 전복의 영양학적 기능학적 체내 유용성과 우수성을 입증할 자료가 필요하며 이를 기반으로 기능성을 부여한 제품 다양화 및 고부가가치화 기술개발이 필요함.

○ 최근 완도 현지 가공공장에서 발생하는 전복 가공부산물인 자숙액, 내장 및 해조류 뿌리, 줄기, 포자엽 등의 활용기술은 환경 문제와 더불어 시급히 연구되어야할 과제이다. 하지만 관련 부산물 발생현황 및 활용가치에 대한 기초자료와 R&D가 거의 전무한 상황임. 따라서 부산물 활용기술 개발과 고부가가치화 방안에 대한 전반적인 노력이 요구됨.

○ 국내외 논문 및 특허를 포함한 최근 R&D 자료에 따르면 전복에 대한 기능성 연구는 유전체 연구 (genomics) 위주에 국한되어 있는 실정이며 이들이 함유한 활성물질의 이화학적 특성, 안전성, 독성, 효능 검증을 포함한 과학적 자료는 거의 전무한 실정임.

○ 다시마, 미역 등 해조류 성분을 주로 섭취하는 전복 내장에는 저분자 천연물, 고분자 다당류, 지질 및 단백질 등을 소화분해시키는 50 여종의 다양한 기능성 단백질체 (효소군)를 함유하고 있으며, 이들 효소로부터 소화 분해된 가수분해물은 체내 소화흡수에 유리하며 기능성도 출되기 쉬운 저분자 형태의 펩타이드, 올리고당, 불포화지방산 및 먹이 해조류로부터 유래한 phlorotannins 등의 고기능성 저분자 유기물을 함유할 것으로 사료됨.

○ 면역 질환의 일종인 알러지 (Allergy)는 외부환경에서 식품, 식품 첨가물, 꽃가루, 세균, 화학소재, 및 약물 등이 항원으로 작용함에 따라 체내 면역반응이 과도하게 반응하여 오히려 인체에 해를 주게 되는 증상임.

○ 알러지 질환은 발병형태에 따라 크게 아토피 (Atopy), 아나필락시스 (Anaphylaxis), 알러지성 비염 (Allergic rhinitis), 기관지 천식 (Asthma) 등으로 구분되며 최근 주거 환경의 변화와 식습관의 서구화 등으로 인해 급증하고 있으며 사회적, 경제적으로 삶의 질을 저하시키는 요인으로 작용하고 있음.

○ 알러지 환자는 선진화된 국가일수록 많은 것으로 나타나며 미국의 경우 인구의 약 20%가 알러지 증상으로 고통 받고 있고 알러지 치료를 위한 직접 의료비용만 50억 달러 이상인 것으

로 추산되며, 영국의 경우 알러지 질환자가 인구의 30%에 이르는 실정임.

○ 최근 국내 면역 및 알러지 질환의 유병률을 살펴보면 천식의 경우 19세 이상 전체 성인인구 중 5.4%로 나타났으며 2005년 2.1%에 비해 두 배 이상으로 급증한 것으로 나타남. 알러지성 비염은 6.2%의 유병률을 보이고 있으며, 가장 높은 비율을 보이는 아토피피부염의 경우 전체 인구의 10%, 특히 만 1-11세에서 20.6%를 차지하고 있으며, 질환자의 대다수가 영유아이며 유병률 또한 매년 급증하는 추세임.

○ 최근 알러지 관련 시장현황을 살펴보면 국내외 우수 제약회사 및 기능성 관련 업체를 중심으로 천식, 아토피, 알러지성 비염 등의 알러지 질환 치료제 및 예방완화 차원의 기능성 제품을 개발하고 있으며 전 세계적으로 약 20조원 이상의 막대한 시장을 이루고 있음.

○ 국내의 경우 아토피 시장 규모만 약 6,000억 원 이상에 이르며 첨단 바이오산업을 주도하는 제약회사와 바이오벤처를 주축으로 신약과 기능성 제품 개발에 박차를 가하고 있지만 알러지 치료제로 개발된 순수 국산신약은 전무하며 일부 아토피성 피부질환 개선제가 출시되고 있음.

○ 전반적으로 의약 및 기능성 소재 산업에서 나타나는 높은 수입의존도를 감안할 때 정부 및 산학연 차원의 공동 대응을 통한 신규 기술 및 제품 개발이 시급한 실정임.

○ 따라서 본 연구에서는 국내 최대 수산물 생산기지인 전남지역의 수산특산자원인 전복과 해조류의 첨단 바이오산업 활용과 고부가가치화를 위해, 전복 육과 내장의 식품영양학적 및 생리기능성에 대한 학술적 기초자료를 확립함.

○ 경제성 및 활용도가 낮은 전복 내장의 기능성 단백질을 활용하여 천연 생리활성소재를 확보함과 동시에, 딱이 생물인 해조류에 함유한 난분해성 생체고분자를 대상으로 생리활성 저분자 천연물 확보 및 생산 공정을 개발하고자 함.

○ 해당 연구를 통해 전복 및 해조류 유래의 신규 천연 면역 활성 소재를 확보하며 기능성을 포함한 가공 제품을 개발하고자 함.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 주요 목표 및 범위

가. 전복 식품영양학적 성분 분석 및 생리기능성 검토

- (1) 전복 식품영양학적 성분분석
- (2) 전복 내장 가수분해물 면역 활성 검토 및 활성획분 선별
- (3) 전복 내장 기능성 단백질체 추출 및 최적 활성 조건 검토

나. 생산 공정 조건 확립 및 전복 유래 기능성 활성물질 최종 확보

- (1) 전복 유래 저분자 천연 생리활성소재 생산
- (2) 활성물질 분리 및 이화학적 특성 검토
- (3) 면역세포 내 효능 및 약리기전 검토
- (4) 활성물질 표준화 및 안전성 조사

다. 시제품 생산 / 전임상 효능 및 안전성 검토

- (1) 활성물질 함유 조성물의 전임상 효능 및 안전성 검토
- (2) 기능성 함유 시제품 제조
- (3) 관능검사 및 기호성 검토
- (4) 대량공정 개발 및 경제성 검토

2. 년차별 목표 및 범위

연구년차	연구개발 내용 및 범위
1 차년도 (2009)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 샘플 확보 및 주요성분 분석 ■ Lab-scale 위장관가수분해시스템을 활용한 전복 내장 가수분해물 제조 ■ 전복 가공부산물 (내장 및 자숙액)의 분자량별 주요 생리활성 검토 ■ 전복 내장 기능성 단백질체 (proteome) 추출 및 최적 가수분해 활성 검토
2 차년도 (2010)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 전복 천연 가수분해물 제조 및 분자량별 획분 생산 ■ 분자량별 가수분해물 물성 및 수율 검토 ■ 전복 가수분해 샘플에 대한 면역활성 스크리닝 및 우수 획분 최종 선별 ■ 면역세포 (대식세포 및 비만세포) 내 항염증 및 항알러지 효능 및 작용기전 규명 ■ 소재 표준화를 위한 활성물질 분리 및 구조 확인 ■ 효능별 시제품 제작 및 동물실험 계획 수립
3 차년도 (2011)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 기능성 함유 시제품 제조 ■ 알러지 전임상 효능 검토 ■ 기호성 평가, 공정개발 및 경제성 검토

IV. 연구개발결과

<1 차년도>

연구 목표	연구 내용	주요 연구 결과
<p>■ 전복샘플 확보 및 주요 성분분석에 따른 식품영양학적 가치 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 부위별 계절별 샘플 확보 ○ 일반성분 분석 ○ 아미노산 조성 분석 ○ 지방산 조성 분석 ○ 미네랄 및 비타민 분석 ○ 기타 기능성성분 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 완도산 참전복 (<i>H. discus hannai</i>) 계절별 샘플 확보 - 육 및 내장 부위별 샘플 분리 및 확보 - 계절별 부위별 전복 일반성분 분석 및 비교 평가 - 구성 / 유리 아미노산 함량 분석 - 포화 및 불포화지방산 함량 분석 - 주요 미네랄 및 비타민 함량 미량 분석 - 항산화 및 항염증 생리활성을 포함한 기능성 성분 분석
<p>■ Lab-scale 위장관 가수분해시스템을 활용한 전복 기능성 가수분해물 제조</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최적 시스템 조건 검토 ○ In vitro 위장관 소화가수분해 시스템에 이용한 전복 내장 저분자 가수분해물 제조 	<ul style="list-style-type: none"> - In vitro 위장관 소화가수분해시스템 내 전복 내장 최적 가수분해 조건 확보 - In vitro 위장관 소화가수분해를 통한 전복 내장 저분자 가수분해물 제조
<p>■ 전복 가공부산물 유래 저분자 생리활성 소재의 주요 효능 검토</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전복가공부산물들의 한외여과막시스템을 이용한 분자량별 희분 확보 ○ 항산화활성 및 활성산소종 (ROS) 소거 효능 검토 ○ 면역 및 항염증 활성 검토 	<ul style="list-style-type: none"> - 한외여과막시스템을 활용한 전복 내장 가수분해물 및 자숙 샘플 확보 - 면역세포 내 항산화 및 ROS 소거 활성 측정 - 대식세포 RAW264.7 내 주요 면역활성 및 항염증 인자에 대한 효능 검토
<p>■ 전복 내장 기능성 단백질체 (proteome) 추출 및 최적 활성 조건 검토</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전복내장 proteome 추출 및 분석 ○ 전복 내장 조효소의 해조류 가수분해 활성 측정 ○ 최적 활성 조건 검토 	<ul style="list-style-type: none"> - 전복 내장으로부터 주요 단백질체 추출 - 2D SDS-PAGE를 통한 기능성 proteome 분석 - 해조류 당 및 단백질 기질에 대한 전복 내장 조효소 가수분해 활성 측정 - 전복 내장 조효소의 최적 가수분해 조건 확보

<2 차년도>

연구 목표	연구 내용	주요 연구 결과
<p>■ 전복 유래 저분자 생리활성 소재 생산 및 특성 검토</p>	<p>○ 전복 유래 저분자 가수분해물 분자량별 획분 생산</p>	<p>- 위장관소화가수분해 (Gastro-Intestine digestion) 및 한외 여과막 (Ultra-filtration, UF) 시스템을 통한 전복 유래 천연 기능성 펩타이드 획분 확보</p>
	<p>○ 전복 기능성 가수분해물들에 대한 주요 특성 검토</p>	<p>- 전복 가수분해 획분 수율 및 성분 검토</p>
<p>■ 우수 면역 활성 샘플 최종 선정 및 활성 물질 분리 / 효능 및 작용기전 규명</p>	<p>○ 전복 가수분해 샘플에 대한 면역활성 스크리닝 및 우수 획분 최종 선별</p>	<p>- 산화적 스트레스 억제(항산화효능)를 통한 면역(대식)세포 보호효능 확인 및 우수 획분 최종 선별 - NO 및 iNOS 저해 효능 스크리닝을 통한 우수 면역활성 샘플 최종 선별</p>
	<p>○ 선별된 우수 샘플들에 대한 면역세포 (대식세포 및 비만세포) 내 활성기전 규명</p>	<p>- 대식세포 내 cytokine 등 면역조절인자 및 주요 면역활성 pathway 규명 - 항히스타민, IgE 레벨 측정 등 항알러지 효능 측정</p>
	<p>○ 소재 표준화를 위한 활성 물질 분리 및 구조 확인</p>	<p>- 항염증 및 항알러지 우수 획분 (AIGID)부터 활성물질 분리 - 활성물질 분자량 및 아미노산 서열 결정</p>
<p>■ 활성성분 함유 시제품 제작 및 동물실험 계획 수립</p>	<p>○ 효능에 따른 제형별 시제품 제작 및 동물실험 수행 계획 및 항목 설정</p>	<p>- 면역활성을 함유한 피부 알러지 질환 개선 및 예방 시제품 제조 계획 수립 - 동물실험을 통한 효능 검증 계획 수립 (기능성 인증 항목 검토)</p>

<3 차년도>

연구 목표	연구 내용	주요 연구 결과
<p>■ 전임상 실험을 통한 알러지 효능 검토</p>	<p>○ 전복 기능성 펩타이드의 전임상 아토피 효능 검토</p>	<p>- 전복 내장 펩타이드 (AIGID)의 아토피 피부염에 대한 유의적 효능 검증</p>
<p>■ 활성소재 대량 공정 설계 및 경제성 검토</p>	<p>○ 생산공정 설계 및 제조단가 산정 등 경제성 검토</p> <p>○ 대용량 공정 내 최종 수율 및 활성성분 함량 등 표준화 검토</p>	<p>- 대량공정 단가 및 제조원가 산정을 통한 경제성 확보</p> <p>- 대량공정 시험 가동을 통한 수율 및 활성성분 함량 최종 확인</p>
<p>■ 기능성 함유 시제품 제조 및 기호성 평가</p>	<p>○ 효능에 따른 제형개발 및 기능성 함유 시제품 제작</p>	<p>- 항산화 및 면역활성을 함유한 피부 알러지 질환 개선 및 예방 시제품 제조 (해양한방아토피 크림 개발)</p> <p>- 청국 발효 추출물을 포함한 기능성 함유 식품 제조 (전복청국환 개발)</p>

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 실용화 산업화 계획

국내 및 국외 시장 분석결과, 전복은 대부분 활전복 형태로 판매되며 일부 업체를 통해 통조림, 죽, 젓갈, 조미식품 등 단순 가공식품 형태로 생산 및 유통되고 있음. 국내외 시장에서도 레토르트 및 죽 형태의 일부 제품만이 수요가 있을 뿐, 전복 가공산업은 높은 원가, 공급 및 가격 불안정, 판매 부진 등으로 현재 불안한 상황임.

따라서 현재 1조 시장을 형성하고 있는 홍삼 제품과 같이 영양학적 기능학적 가치를 바탕으로 다양한 가공제품, 즉 음료, 제과, 병과, 화장품, 고부가가치 건강기능소재 및 식품 등의 형태의 개발과 웰빙을 강조한 마케팅 및 판매가 절실히 필요함. 이를 위해 본 연구에서 도출한 국내산 참전복의 식품영양학적 우수성과 신규 규명한 항산화, 면역활성에 대한 기능성을 바탕으로 식품 및 화장품 등에 적용 가능한 소재로의 가능성을 확인하기 위하여 응용제품을 개발하였으며, 이 소재에 대한 결과를 근거로 대기업 및 중소기업에 홍보하여 기업에서 요구하는 기준에 적합한 소재의 안정성을 기업과 협의하여 추후 각종 인허가를 획득할 계획임.

2. 특허, 논문 등 지식재산권 확보계획

본 연구개발을 통해 확보한 주요 연구결과, 즉 “전복 성분 분석 및 식품영양학적 가치 규명”, “체내 소화가수분해 생물공정을 응용한 전복 유래 저분자 펩타이드 생산”, “전복 함유 항산화 및 면역활성에 관한 대식세포 및 비만세포 내 효능”, “아토피 전임상 모델 내 전복 기능성 소재의 면역조절 효능”, “해조류 추출물의 항산화 및 면역활성 조절 효능”에 대한 유의한 결과를 바탕으로 아래와 같이 논문과 특허 출원을 준비 혹은 진행 중임. 본 지식재산권 자료는 전복 상품적 가치 제고와 기업 기술이전 및 기능성인허가를 위한 기초 자료로써 활용할 것임.

<현재 진행 중인 지식재산권 목록>

구 분	내 용	계재지	비 고
특허	Composition for the treatment and the prevention of inflammatory diseases in immune system containing Abalone gastrointestinal digests (전복 소화 가수분해물을 함유하는 면역계 염증성 질환 예방 및 치료용 조성물)	Korean patent 10-2010-0049866	출원 중
특허	Abalone intestine gastro-intestinal digests having effects of inhibiting MMP activity and a pharmaceutical composition containing the same as an active ingredient (MMP활성 억제 효과를 갖는 전복 내장 위장관 소화가수분해물 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물)	Korean patent 10-2011-0092951	출원 중

특허	Boiled Abalone By-products for antioxidant and Angiotensin I converting enzyme inhibition effects and functional compositions containing the same (항산화 및 안지오텐신전환효소 억제 효과를 갖는 전복 추출물 및 이를 함유하는 기능성 조성물)	Korean patent 10-2011-0092952	출원 중
특허	전복 펩타이드 조성물의 아토피 질환에 대한 효능	Korean patent	준비 중
특허	전복 펩타이드 조성물의 비만세포 내 히스타민 저해를 통한 면역활성 조절 효능	Korean patent	준비 중
저서	Chap. 17. Immune regulatory effects of phlorotannins derived from marine brown algae (<i>Phaeophyta</i>)	<i>Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology</i> , UK, John Wiley & Sons Publishers (Nov., 2011)	출간
논문	Protective effects of in vitro gastrointestinal digests of abalone (<i>Haliotis discus hannai</i>) intestines against oxidative stress in RAW 264.7 macrophage cells	<i>Fisheries & Aquatic Sciences</i> 10, 216-223 (Aug, 2010)	게재
논문	Abalone (<i>Haliotis discus hannai</i>) intestine digests with different molecular weights inhibit MMP-2 and MMP-9 expression in human fibrosarcoma cells.	<i>Fisheries & Aquatic Sciences</i> (Jun., 2012)	게재
논문	Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Abalone Intestine Digest, <i>Haliotis discus hannai</i> in RAW 264.7 Macrophages	<i>Biotechnology and Bioprocess Engineering</i> (Jun., 2012)	게재
논문	Beneficial Effect of Gastrointestinal Digest of Abalone (<i>Haliotis discus hannai</i>) Intestine on Osteoblastic MG-63 Cell Differentiation	<i>Journal of Aquatic Food Product Technology</i>	심사 중
논문	Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibition Effects of a novel peptide from Boiled Abalone, <i>Haliotis discus hannai</i> -Products	<i>Process Biochem.</i>	투고 중
논문	Effects of Abalone Intestine Gastro-Intestinal Digests, <i>Haliotis discus hannai</i> on mast cell-mediated allergic reaction	<i>Food Chem Toxicol</i>	투고 중
논문	Abalone Intestine Gastro-Intestinal Digests attenuates house dust mite allergen-induced atopis dermatitis in Nc/Nga mice	<i>Food Chem Toxicol</i>	투고 중
논문	<i>Callophyllis japonica</i> attenuates airway inflammation in a murine model of ovalbumin-induced asthma	<i>Journal of Aquatic Food Product Technology</i>	투고 중

* 향후 추가 성과는 매년 조사-분석-평가를 통해 update 할 예정입니다.

3. 기술확산 및 추가연구, 타연구 활용계획

해당 연구개발 결과를 연계하여 타 연구사업 혹은 대기업 및 중소기업 등과 공동연구를 통해 전임상 독성 및 임상 효능에 대한 기능성 인허가 자료를 확보할 계획이며, 도출된 연구개발 자료는 학술발표, 논문, 특허를 통한 학술적 기술 확산 및 홍보를 진행할 것임. 아울러 식품영양학적 및 기능학적 data는 전북 유통 및 가공업체의 마케팅 자료로 제공될 예정임.

본 연구를 통해 개발된 전북 기능성 펩타이드 함유 시제품의 경우, 지식경제부 완도전북가공산업활성화 RIS 사업단 참여기업 혹은 관련기업과 연계하여 산업화할 것이며, 전북 레토르트 과정에서 발생하는 자숙액 및 내장 등 부산물 활용 기술 또한 조선대학교 완도 해양생물연구교육센터에서 운영하는 한국수산벤처대학 컬리큘럼을 통해 참여 학생 및 완도 가공업체를 대상으로 기술 및 활용교육을 통해 기술 확산 예정임.

Development of a natural anti-allergic product using abalone–gastrointestinal digestion system

Summary

- ◆ Abalone is a marine gastropod and an important fishery and food industrial resource that is massively maricultured in Asia, Africa, Australia, and America. Pacific abalone, *H.discus hannai* has been massively maricultured from the 1990s in the southwestern coast of South Korea. To meet the increasing demand of the Asian market, abalone mariculture has been expanding in land- and sea-based systems in S. Korea and the total yield was estimated at 7,580 tons of abalone in 2009 (The Korea Marine Institute). In addition, manufacturing products of abalone (dried, steamed, spiced abalone, and so on) have also been significantly increased. It is currently agreed that that marine organisms possess various bioactive natural components with many nutraceutical and pharmaceutical activities-related physiological functions such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-allergic, antitumor, antimicrobial, antihypertension, anticoagulation, anti-cardiovascular disease, and etc. However, the health beneficial effects of abalone have rarely been reported, although a number of studies have been performed on the biological and physiological properties of abalones, considering pathology, genetics, and aquaculture technology.
- ◆ Abalone intestine gastro-intestinal digests (AIGIDs) containing AIGID I (100-10 kDa), AIGID II (10-5 kDa) and AIGID III (5-1 kDa) were isolated from abalone gastro-intestinal digestion by an ultrafiltration membrane system. *In vitro* gastro-intestinal digestion which is consisted of two phase: gastric digestion (phase I) corresponding to a pepsin-hydrolysis, and intestinal digestion (phase II) corresponding to proteolysis by two enzymes (trypsin and alpha-chymotrypsin), was used for breakdown proteins into amino acids or oligopeptides with functional and nutritional properties. After treatment with proteases, hydrolysates were composed of individual amino acids and low molecular mass peptides. Advantageously, these products can withstand the conditions of physiological digestion and arrive at the blood stream to employ their bioactive effects after oral intake.

- ◆ First, we examined that antioxidant and anti-inflammatory effects of abalone *Haliotis discus hannai* in macrophage cells. The results exhibited that abalone intestine digest (AID) has higher antioxidant activities against lipid peroxidation, ROS stress and DNA damage in H₂O₂-treated RAW264.7 macrophages. In the lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophages, AID suppresses LPS-induced production of nitric oxide (NO) via inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in a dose-dependent manner. It also significantly reduced the generation of proinflammatory cytokines, such as interleukin (IL-1 β), tumor necrosis factor (TNF)- α , and IL-6. Furthermore, AID significantly suppresses phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as ERK, JNK, and p38. These results indicated that AID inhibits oxidative damage by ROS and LPS-induced inflammatory response via blocking of MAPK signaling pathway in murine macrophages. Therefore, potent antioxidant and anti-inflammatory effects of abalone intestine as byproducts from fishery manufacturing might suggest possibility for high valuable utilization and application as nutraceutical and therapeutic substances.

- ◆ To evaluate beneficial effects of *H. discus hannai*, an anti-inflammatory peptide (AAIP, abalone anti-inflammatory peptide) was purified from abalone intestines using consecutive HPLC purification system. In tandem MS analysis, the fragmentation results illustrate that the AAIP responsible for the nitric oxide (NO) inhibitory activity (IC₅₀=55.8 μ M) has amino acid sequence as Pro-Phe-Asn-Glu-Gly-Thr-Phe-Ala-Ser (1175.2Da). To investigate anti-inflammatory effect of AAIP on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages and elucidated the molecular mechanism. The results show that the AAIP peptide suppresses LPS-induced production of nitricoxide (NO) via inducible nitricoxide synthase (iNOS) expression in a dose-dependent manner. It also significantly reduced the gene transcription of proinflammatory cytokines, such as interleukin(IL-1 β), tumor necrosis factor (TNF- α), and IL-6. Furthermore, AAIP significantly suppresses phosphorylation of mitogen-activated proteinkinases (MAPKs) such as p-p38 and p-JNK. These results indicated that abalone intestine-derived anti-inflammatory peptide, A AIP inhibits LPS-induced inflammatory response via blocking of MAPK pathway in murine macrophages.

- ◆ Allergic diseases, such as asthma, atopic dermatitis, allergic rhinitis and food allergies, are typified by an undesirable reaction to harmless environmental allergens. Allergic diseases are characterized by infiltration and accumulation of lymphocytes, basophils, eosinophils, and mast cells to the inflamed site of lesions. Mast cells are one of the critical effector cells in the pathogenesis of hypersensitivity and allergic responses, but

also play important roles in host defense against parasites. Mast cells are commonly found at sites exposed to the external environment, namely the skin, the airways and the gastrointestinal tract. Mast cells are recognized as granular cells of the connective tissue and key cells in autoimmune disorders, and key players in the establishment of innate immunity as well as modulators of adoptive immune responses. The aim of the present study was to examine whether abalone modulates inflammatory response, as well as to elucidate its mechanism of action in stimulated human mast cell line (HMC-1). Cells were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate plus calcium ionophore A23187 (PMACI) in the presence or absence of AIGIDs. Abalone attenuated the PMACI-stimulated gene expression and production of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-6, and histamine releases in HMC-1 cells. In activated HMC-1 cells, phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) decreased after pretreatment with AIGIDs. In addition, AIGIDs suppressed PMACI-induced I κ B- α phosphorylation and degradation, leading to inhibition of nuclear factor (NF)- κ B activation. AIGIDs suppressed the production of TNF- α , IL-6, histamine and through a decrease in the intracellular levels of JNK, as well as activation of NF- κ B. These results indicated that AIGIDs has a modulatory effect on mast cell-mediated inflammatory allergic diseases.

- ◆ In addition, this study was to determine whether treatment with AIGID III (including AAIP, abalone anti-inflammatory peptide) results in significant effects in atopy dermatitis NC/Nga mouse model. In this study, we investigated the anti-atopy activity of AIGID III on the mice. This finding suggests that AIGID III might be useful candidate in treating atopy dermatitis.

Contents

Chapter 1. Abstract of research and development subject

Section 1. The subject of research and development, necessity and extent

1. The purpose of research and development
 - A. Overview of research and development
 - B. Object
2. Necessity of research and development
 - A. Social economy and scientific technology importance of research and development
 - (1) Socio-economical importance
 - (2) Scientific technology importance

Chapter 2. Domestic and foreign technical development present condition

Section 1. Domestic and foreign related technology present condition

1. The outline of domestic and foreign related technology
 - A. Abalone objective research synopsis
 - B. Allergy objective research synopsis
2. Domestic and foreign technical development present condition
 - A. Domestic technique trend
 - (1) Abalone related technology trend
 - (2) Allergy related technology trend
 - B. Foreign technical trend
 - (1) Abalone related technology trend
 - (2) Allergy related technology trend
3. Related product and market present condition
 - A. Domestic product production and market present condition
 - B. Foreign product production and market present condition

Chapter 3. Research and development contents and results

Section 1. Research contents

1. Sample collection
2. Component analysis

- A. Proximate composition
 - B. Amino acids composition
 - (1) Compositional amino acids
 - (2) Free amino acid composition
 - C. Fatty acid composition
 - D. Mineral contents
 - E. Vitamin contents
 - F. Polyphenol
 - G. Reducing sugar
 - H. Protein contents
3. Manufacturing of hydrolysis product for low molecule weight and high absorption by gastrointestinal digests system
- A. Gastrointestinal digests system
 - B. Manufacturing of ow molecular hydrolysis product and optimal condition examine with the lab-scale astrointestinal digests system
 - (1) Manufacturing of abalone hydrolysis product fraction
 - (2) Manufacturing of marine algae hydrolysis product and organic solvent extract fraction
 - 1) Extract of abalone intestine proteins
 - 2) Analysis and identification of abalone intestine proteins
 - 3) Coenzyme of abalone intestine
 - ① Hydrolysis activity with marine algae by-product substrate
 - ② Review of optimal condition
 - (3) Manufacturing of organic solvent extracts
 - C. Different molecular weight fractionated using ultrafiltration membrane bioreactor systems
4. Biological effect review of low molecular hydrolysates from from abalone and marine algae in immune cell
- A. Antioxidant activity by inhibition of lipid peroxidation
 - B. Free radical scavenging effects
 - C. Free radical scavenging effects and cell protection effects in immune cell
 - D. DNA damage protection effect of AID by oxidative stress in macrophage
 - E. Inhibitory effects on inflammatory related factors in immune cell
 - (1) Selected immune activity fraction with NO and iNOS expression inhibitory effects

- (2) Inhibitory activity of iNOS expression
- 5. Purification of biological activity substance
 - A. Purification active substance from anti inflammatory and anti allergy superior fractions
- 6. Investigation of molecular and cellular level pathway of anti-inflammation and anti-allergy activity in Immunomodulatory cell
 - A. Investigation of immunomodulatory factors related immune activation pathway and cytokine in macrophage cell
 - (1) Investigation of immunomodulatory mechanism with cytokine and MARK pathway
 - B. Anti allergy effects with anti histamine and IgE, in mast cell line
 - (1) Investigation of cell cytotoxicity in human mast cell line
 - (2) Inhibitory effect of histamine secretion
 - (3) Inhibitory effect of cytokine secretion
 - (4) Investigation of anti allergy mechanism
- 7. Preclinical research with atopy animal model
 - A. Laboratory animals
 - B. Materials
 - C. Atopy induction
 - D. Evaluate of skin lesions
 - E. The number of times measurement which scratches
 - F. Blood gathering and measurement of immunoglobulin E and histamine
 - G. RT-PCR measurement of TARC, MDC, RANTES, IL-4, Eotaxin, TSLP expression in skin tissue
 - (1) RNA isolation from dorsal tissue
 - (2) Reverse transcriptase polymerase chain reaction
 - (3) RT-PCR
 - (4) Analysis of biopsy
- 8. Production yield rate and economic efficiency examination
- 9. Development and evaluation of application product
 - A. Investigation of formulation containing active substance and make prototype
 - (1) Development of atopic lotion containing natural peptide
 - (2) Development of abalone seaweed fermented soybeans pill prototype

Chapter 4. Research and development results

Section 1. Abalone ingredient analysis and evaluate food nutritional value

1. Component analysis of abalone

A. Proximate composition analysis

B. Amino acid composition and content analysis

C. Fatty acid content analysis

D. Mineral content analysis

E. Vitamin content analysis

F. Other functional components analysis

(1) Polyphenolic compounds content analysis

(2) Chondroitin sulfate analysis in mucopolysaccharide

Section 2. Production and procurement of functional materials from abalone and seaweed

1. Security of abalone and marine algae

A. Security of abalone

B. Security of marine algae

2. Low molecular bioactivity fraction production and security

A. Abalone hydrolysis product

(1) Abalone hydrolysis efficiency by gastrointestinal digestive system(GI system)

(2) Investigation of hydrolysis optimal condition by the GI system

1) Hydrolysis effect by substrate concentration

2) Hydrolysis effect by substrate versus enzyme ratio

3) The effect of reaction time for hydrolysis

(3) Security of abalone hydrolysates

B. Production and security of low molecular weight algae hydrolysates

(1) Extract and analysis of abalone intestine coenzyme(AICE)

(2) Investigation of activity of abalone intestine coenzyme(AICE)

1) Investigation of optimal pH

2) Investigation of optimal temperature

3) Investigation of optimal substrate concentration

4) Investigation of optimal substrate versus enzyme ratio

5) Investigation of reaction time

C. Selected superior activity fraction

D. Different molecular weight fractions by using ultrafiltration system

(1) Production of abalone intestine digestion for different molecular weight

(2) Comparison analysis of amino acid of AIGID and BAB

3. Select of superior fraction of abalone intestine hydrolysate

- A. Protective effect of immune cell(macrophage) by oxidative stress(anti-oxidant)
 - (1) Protective effects of AIGID by oxidation stress in cell
 - 1) Investigation of free radicals scavenging active by AIGID
 - 2) Investigation of sample cytotoxicity in immune cell(macrophage)
 - 3) Radical scavenging effect of AIGID in macrophage cell
 - 4) Investigation of DNA oxidation protective effect of AIGID in macrophage cell
 - (2) Antioxidant activity of boiled abalone by-product(BABs)
 - 1) Investigation of reactive oxygen species inhibitory effect by BABs
 - 2) Investigation of cytotoxicity by BABs
 - 3) Radical scavenging and cell protection effect of BABs in Raw264.7 cell
 - 4) DNA oxidation protection effect by BABs
- B. Selection of superior immune activity fraction with NO and iNOS inhibitory effect in macrophage
 - (1) Inhibitory activity of NO production
 - (2) Inhibitory activity of iNOS expression
- 4. Investigation of pharmacological effect and mechanism of selected candidated substrates in macrophage cell
 - A. Investigation of immune regulatory fractor, cytokine and immune activity pathway in macrophage
 - (1) Investigation of cytokine(IL-6, IL-1 β , TNF- α)
 - (2) Regulatory mechanism activity on MAPK pathway
 - (3) Inhibitory effect and translocation in nuclear by nuclear transcription factor, NF- κ B and activity inhibition by AIGIDs
 - B. Investigation of anti-allergy effect by anti-histamine and IgE level in mast cell
 - (1) Efficiencies of AIGID in mast cell line
 - 1) Cytotoxicity(surviving rate) of AIGID in HMC-1 cell
 - 2) Secretion suppression efficacy of histamine by AIGID
 - 3) Secretion suppression efficacy of cytokine by AIGID
 - 4) Mechanism research on efficacy of anti allergy of AIGID
 - (2) Efficiencies of AIGID II in mast cell line
 - 1) Cytotoxicity(surviving rate) of AIGID II in HMC-1 cell
 - 2) Secretion suppression efficacy of histamine by AIGID II
 - 3) Secretion suppression efficacy of cytokine by AIGID II
 - 4) Mechanism research on efficacy of anti allergy of AIGID II
 - (3) Efficiencies of AIGID III in mast cell line

- 1) Cytotoxicity(surviving rate) of AIGID III in HMC-1 cell
- 2) Secretion suppression efficacy of histamine by AIGID III
- 3) Secretion suppression efficacy of cytokine by AIGID III
- 4) Mechanism research on efficacy of anti allergy of AIGID III
5. Isolation and characteristics of activity fraction for immune activity efficacy
 - A. A immune activity material isolated from the hydrolysate of abalone intestine
 - B. Investigation of amino acid sequence of active materials
6. Animal efficacy investigation of activity fraction through preclinical test
 - A. Inhibitory effect of AIGID3(III) in the dorsal skin of NC/Nga mouse
 - B. Measurement of immunoglobulin E and histamine from serum
 - C. Result of TARC, MDC, RNATES, IL-4, Eotaxin, TALP from mouse dorsal tissue
 - D. Analysis of mouse skin tissue
7. Manufacturing process and economic efficiency examination
 - A. Manufacturing process design
 - (1) Sampling
 - (2) Washing
 - (3) Grinding
 - (4) In vitro gastro-intestinal digestion
 - (5) Centrifuge
 - (6) Filtration
 - (7) Fractionation, desalinization and concentration
 - (8) Drying(spray drying or Freeze drying)
 - (9) Powder packing
 - B. Production yield rate
 - C. Manufacturing process plan (3tons)
 - D. Production equipment unit cost
 - E. Manufacturing cost
 - F. Economic analysis
8. Development of application product
 - A. Development of marine herbal atopic cream
 - (1) Formulation development
 - (2) Product effective evaluation
 - 1) COX-2 anti-inflammatory activity by the concentration
 - 2) NO activity by the concentration
 - 3) Cytotoxicity by the concentration

- 4) Comparison of anti-inflammatory activity with a commercially available product
- 5) Moisture assessment
- B. Abalone-fermented soybean pill product specifications and features
 - (1) Abalone-fermented soybean pill manufacturing process
 - (2) Ingredient creation and formulation development
 - (3) Evaluation of palatability and salability through survey
 - 1) Color
 - 2) Flavor
 - 3) Texture
 - 4) Incense
 - 5) Purchase intention
 - 6) The final evaluation

Chapter 5. Tagret achievement contribution about related field

- 1. Research and development target and achievement
 - A. Research and development object for this year
 - B. Research and development object and attainment for year
- 2. Contribution of the various fields
 - A. Academic and technical contribution
 - B. Social and cultural contribution

Chapter 6. Research and development in result and practical use plan

- 1. Plans of industrialization and commercialization
- 2. Plans of intellectual property obtainment of patent, paper, etc
- 3. Utilization plans of other researches, further research and technology diffusion

Chapter 7. Foreign Scientific & Technologic Information collected in research and development process

- 1. Related this research comparison of skill level in domestic and foreign
 - A. Patent
 - (1) Analysis in range of patent
 - (2) Relation of research pursuant to analysis in range of patent
 - B. Paper

- (1) Analysis in range of paper
- (2) Relation of research pursuant to analysis in range of paper
- C. Analysis of product and market
 - (1) The present state of production and market
 - 1) Domestic the present state of production and market
 - 2) Foreign the present state of production and market
 - 2. Future outlook pursuant to technology analysis
 - 3. Conclusion of analysis to technical trend in domestic and foreign

Reference

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 30

제 1 절 연구개발의 목적, 필요성 및 범위	30
1. 연구개발의 목적	30
가. 연구개발 개요	30
나. 최종 목표	30
2. 연구개발 필요성.....	30
가. 연구개발의 사회경제 및 과학기술 중요성	30
(1) 사회경제적 중요성	31
(2) 과학기술적 중요성	34

제 2 장 국내외 기술개발 현황 39

제 1 절 국내 및 국외 관련기술 현황	39
1. 국내 및 국외 관련 기술 개요	39
가. 전복 대상 연구 개요	39
나. 알러지 대상 연구 개요	39
2. 국내외 기술개발 현황	40
가. 국내기술 동향	40
(1) 전복 관련 기술 동향	40
(2) 알러지 관련 개발 동향	41
나. 국외기술 동향	41
(1) 전복 관련 기술 동향	41
(2) 알러지 관련 개발 동향	41
3. 관련 제품 및 시장현황	41
가. 국내 제품생산 및 시장 현황	41
나. 국외 제품생산 및 시장 현황	42

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 43

제 1 절 연구내용	43
1. 시료확보	43
2. 성분분석	44

가. 일반성분 분석	44
나. 아미노산 조성 분석	44
(1) 구성 아미노산 분석	44
(2) 유리 아미노산 분석	44
다. 지방산 조성 분석	44
라. 무기질(미네랄) 함량 분석	45
마. 비타민 함량 분석	45
바. 폴리페놀 분석	45
사. 환원당 분석	45
아. 단백질 농도 분석	46
3. 소화가수분해시스템을 활용한 저분자-고흡수 가수분해물 제조	46
가. 위장관소화가수분해시스템	46
나. Lab-scale 소화가수분해시스템을 활용한 저분자 가수분해물 제조 및 최적조건 검토	47
(1) 전복 가수분해물 획분제조	47
(2) 해조류 가수분해물 및 유기용매 추출 획분 제조	48
(가) 전복 내장 단백질체 추출	48
(나) 전복 내장 단백질체 분석 및 동정	48
(다) 전복 내장 조효소	49
① 해조류 부산물 기질에 대한 가수분해 활성측정	49
② 최적 활성 조건 검토	49
(라) 유기용매 추출물 제조	50
다. 한외여과막시스템을 활용한 저분자 가수분해물의 분자량별 분획.....	50
4. 전복 및 해조류 유래 저분자 생리활성 소재 면역세포 내 효능 검토	50
가. 지질 과산화억제를 통한 항산화활성 검토	50
나. 활성산소종 라디칼 억제 활성 검토	50
다. 면역세포 내 라디칼 소거 및 세포보호 효능	52
라. AID의 대식세포 내 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 보호효과 검토	53
마. 면역세포 내 주요 염증 관련 인자에 대한 억제효능 검토	54
(1) NO 및 iNOS 저해 효능 검토를 통한 우수 면역활성 획분 선별	54
(2) iNOS (inducible NO synthase)발현 저해활성	55
5. 우수 활성물질의 분리 정제	55
가. 항염증 및 항알러지 우수 획분으로부터 활성물질 분리	55
6. 면역조절 세포 내 분자세포수준 항염증 및 항알러지 약리활성 및 기전규명	56
가. 대식세포 내 cytokine 등 면역조절인자 및 주요 면역활성 pathway 규명	56
(1) Cytokine변화 검토 및 MARK pathway 경우 면역조절기전 검토	56

나. 비만세포주를 활용한 항 히스타민, IgE 레벨 측정 등 항알러지 효능 측정	57
(1) 인간 비만세포주 내 세포독성 조사	57
(2) 히스타민 분비억제 효능	57
(3) 사이토카인 분비억제 효능	58
(4) 항알러지 효능 기전 연구	58
7. 아토피 동물모델을 이용한 전임상 효능 연구	58
가. 실험동물	59
나. 실험재료	59
다. 아토피 유도	59
라. 피부 병변 평가	60
마. 긁는 횟수 측정	60
바. 혈액 채혈 및 immunoglobulin E, histamine 측정	60
사. 피부조직에서 TARC, MDC, RANTES, IL-4, Eotaxin, TSLP 발현 RT-PCR 측정	60
(1) 등조직에서 RNA 분리	60
(2) 역전사종합효소 연쇄반응	61
(3) RT-PCR	61
(4) 조직 검사 분석	61
8. 생산수율과 경제성 검토	62
9. 응용제품의 개발 및 평가	62
가. 활성물질을 함유한 제형 검토 및 시제품 제작	62
(1) 천연 펩타이드 함유 아토피로션 개발	63
(2) 전복해조청국환 시제품 개발	65

제 4 장 연구개발 결과 **67**

제 1 절 전복 성분분석 및 식품영양학적 가치 평가	67
1. 전복 주요 성분분석	67
가. 일반성분 분석	67
나. 아미노산 조성 및 함량 분석	69
다. 지방산 함량 분석	73
라. 무기질 함량분석	75
마. 비타민 함량분석	77
바. 전복 기타 기능성 성분 분석	77
(1) 전복 내 폴리페놀성 화합물 함량 분석	78
(2) 전복 점액성 다당류 내 콘드로이친황산 분석	80
제 2 절 전복 및 해조류 유래 천연 기능성 소재 생산 및 확보	82

1. 전복 및 해조류 원료 확보	82
가. 전복 원료 확보	82
나. 해조류 원료 확보	83
2. 저분자 생리활성 획분 생산 및 확보	84
가. 전복 가수분해물 제조	84
(1) 위장관 소화가수분해 (GI) 시스템을 활용한 전복 가수분해 효율 검토	84
(2) GI 시스템을 이용한 전복 가수분해물 제조 최적조건 검토	85
(가) 기질농도에 따른 가수분해 효과	85
(나) 기질 대 효소비에 따른 가수분해 효과	85
(다) 가수분해에 대한 반응시간의 효과	85
(3) 전복 소화가수분해물 최종 확보	90
나. 해조류 저분자 가수분해물 획분 생산 및 확보	90
(1) 전복 내장 조효소 (AICE) 추출 및 분석	90
(2) 전복 내장 조효소 (AICE) 최적 활성 검토	92
(가) 최적 PH검토	93
(나) 최적 온도 검토	93
(다) 최적 기질농도 검토	93
(라) 최적 기질 대 효소비 검토	93
(마) 반응시간 검토	93
다. 효능검토를 통한 우수 활성 획분 선별	97
라. 한외여과막 시스템을 활용한 분자량별 분획 생산	98
(1) 분자량별 전복 내장 소화가수분해물 획분 생산	98
(2) 전복 소화가수분해물 (AIGIDs) 및 자숙부산물 (BAB) 아미노산 조성 비교 분석	100
3. 전복 내장 추출물 및 가수분해물의 효능 스크리닝 및 우수획분 최종선별	102
가. 산화적 스트레스 억제(항산화효능)를 통한 면역(대식)세포 보호효능 확인	102
(1) AIGID에 대한 산화적 스트레스 억제 및 세포보호 효능	105
(가) AIGID에 대한 자유 라디칼 제거활성 검토	105
(나) 면역세포 (대식세포 RAW264.7) 내 샘플 세포독성 검토	106
(다) AIGID의 대식세포 내 라디칼 제거효과	107
(라) AIGID의 대식세포 내 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 보호효과 검토	108
(2) 전복 자숙가공부산물 (BABs : boiled abalone by-products)의 항산화활성	108
(가) 자숙가공부산물 (BABs)의 활성산소종 라디칼 억제 활성 검토	108
(나) 자숙가공부산물 (BABs)에 대한 세포 독성 검토	109
(다) RAW 264.7 세포에 대한 자숙가공부산물 (BABs)의 라디칼 제거 및 세포보호 효능	109
(라) 자숙가공부산물 (BABs)의 처리에 따른 DNA oxidation 보호효과	110

나. 대식세포 내 NO 및 iNOS 저해 효능 검토를 통한 우수 면역활성 획득 선별	111
(1) NO 생성 저해 활성	111
(2) iNOS (inducible NO synthase) 발현 저해활성	112
4. 최종 선별된 후보소재들에 대한 면역세포 내 약리효능 및 활성화기전 규명	115
가. 대식세포 내 cytokine 등 면역조절인자 및 주요 면역활성 pathway 규명	115
(1) Cytokine (IL-6, IL-1 β 와 TNF- α)변화 검토	115
(2) MARK pathway 상의 조절기전 활성	117
(3) 전복 내장 가수분해물의 핵 전사인자인 NF- κ B의 핵 내로의 전이 및 활성 저해 효능	119
나. 비만세포주를 활용한 항 히스타민, IgE 레벨 측정 등 항알러지 효능 측정	121
(1) AIGID 샘플에 대한 비만세포주 내 효능 검토	121
(가) AIGID에 대한 인간 비만세포주 (HMC-1) 내 세포독성 (생존률) 조사	121
(나) AIGID의 히스타민 분비억제 효능	121
(다) AIGID의 사이토카인 분비억제 효능	122
(라) AIGID의 항알러지 효능 기전 연구	123
(2) AIGID II 에 대한 비만세포주 내 효능 검토	125
(가) AIGID II 에 대한 인간 비만세포주 (HMC-1) 생존률 조사	125
(나) AIGID II의 히스타민 분비억제 효능	125
(다) AIGID II의 사이토카인 분비억제 효능	126
(라) AIGID II의 항알러지 효능 기전 연구	127
(3) AIGID III에 대한 비만세포주 내 효능 검토	129
(가) AIGID III에 대한 인간 비만세포주 (HMC-1) 생존률 조사	129
(나) AIGID III의 히스타민 분비억제 효능	129
(다) AIGID III의 사이토카인 분비억제 효능	130
(라) AIGID III의 항알러지 효능 기전 연구	131
5. 우수 면역활성효능 획득 내 활성화물질 분리 및 특성 검토	133
가. 전복 내장 가수분해물 유래 면역활성물질 분리 및 정제	133
나. 활성화물질 아미노산 서열결정 및 동정	135
6. 전임상 실험을 통한 활성소재 함유 획득의 동물효능 검토	136
가. NC/Nga 마우스의 등피부에서의 AIGID3(III)의 억제효과	136
나. 혈청에서부터의 Immunoglobulin E와 Histamine 측정	137
다. 마우스 등 조직 TARC, MDC, RANTES, IL-4, Eotaxin, TSLP 발현 결과	140
라. 마우스 피부조직 분석	142
7. 생산공정 및 경제성 검토	145
가. 전체 생산공정 설계	145
(1) 시료수집 (Sampling) 단계	145

(2) 세척 (Washing)	145
(3) 분쇄 (Grinding)	145
(4) 효소 가수분해 (in vitro gastro-intestinal digestion)	145
(5) 원심분리 (Centrifuge)	145
(6) 여과 (Filtration)	145
(7) 분획, 탈염 및 농축 (Fractionation / Concentration)	145
(8) 건조 (분무건조 Spray drying 혹은 동결건조 Freeze drying)	145
(9) 분말포장(Powder packing)	145
나. 생산수율 검토	146
다. 생산공정 설계도 (3톤 규모)	147
라. 생산설비단가	148
마. 제조원가 (전복 내장 3 ton/일 처리기준)	151
바. 경제성 분석	151
8. 응용제품의 개발.....	152
가. 해양한방 아토피 크림 개발	153
(1) 제형개발	153
(2) 시제품 효능 평가	155
(가) 농도별 COX-2 항염증활성	155
(나) 농도별 NO활성	155
(다) 농도별 세포독성	156
(라) 시판중인 제품과의 항염증활성비교	156
(마) 보습력 평가	157
나. 전복 청국환 제품사양 및 특징	157
(1) 전복 청국환 제조공정	158
(2) 성분 조성 및 제형개발	158
(3) 설문을 통한 기호성 상품성 평가	159
(가) 색상	159
(나) 맛	159
(다) 식감	159
(라) 향	160
(마) 구매 의향	160
(바) 최종평가	160

제 5 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여161

1. 연구개발 목표 및 달성도	161
------------------------	-----

가. 당해 연도 연구개발 목표	161
나. 연도 연구개발 목표 및 달성도	161
2.분야별 기여도.....	162
가. 학문적 기술적 기여	162
나. 사회 문화적 기여	162

제 6 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 163

1. 실용화 산업화 계획	163
2. 특허, 논문 등 지식재산권 확보 계획	163
3. 기술확산 및 추가연구, 타연구 활용계획	165

제 7 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 166

1. 본 연구관련 국내의 기술수준 비교	166
가. 특허분석	166
(1) 특허분석 범위	166
(2) 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성	166
나. 논문분석	167
(1) 논문분석 범위	167
(2) 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성	167
다. 제품 및 시장 분석	168
(1) 생산 및 시장현황	168
(가) 국내 제품생산 및 시장 현황	168
(나) 국외 제품생산 및 시장 현황	169
2. 기술 분석에 따른 향후 전망	169
3. 국내외 기술동향 분석 결론	169

제 8 장 참고문헌 171

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적, 필요성 및 범위

1. 연구개발의 목적

가. 연구개발 개요

전복과 해조류는 완도를 비롯한 전남지역의 대표적 수산자원으로써 전국 총 생산량 96.5%와 80%를 각각 담당하고 있다. 최근 들어 생산량 급증에 따른 가격하락과 상품성이 낮은 저질 및 폐사전복 (전체 생산량 30% 이상)에 대한 활용 대책, 그리고 가공 후 미활용 자원으로 대량 발생되는 내장의 활용 방안이 절실히 요구되는 시점이다 (KMI, *해양수산동향*, 1241호, 2007).

따라서 본 연구에서는 전복의 식품영양학적 기초 자료와 생리 기능성 및 체내 유용성에 대한 과학적 기초 data 확립하고, 건강식품 및 의약품 등 고부가가치 첨단 해양바이오 기술개발을 위해 전복 자체의 기능성을 탐색하고자 한다. 아울러 난분해성 해조류 소화-흡수 능력을 보유한 전복 내장을 활용하여 기능성 소재개발과 생물공정에 적용하고자 한다. 이를 통해 전통수산자원으로부터 고부가가치 기능성 제품을 개발하고 양식 위주의 지역 산업을 고차원화 함으로써 제품 다양화, 어민소득 증대, 지역바이오산업 경쟁력 강화, 국가미래성장동력산업 발전에 기여하고자 한다.

나. 최종 목표

본 연구에서는 국내 최대 수산물 생산기지인 전남지역의 수산특산자원인 전복과 해조류의 첨단 바이오산업 활용과 고부가가치화를 위해, 전복 육과 내장의 식품영양학적 및 생리기능성에 대한 학술적 기초자료를 확립하고 경제성 및 활용도가 낮은 전복 내장의 기능성 단백질체를 활용하여 천연 생리활성소재를 확보함과 동시에, 딱이 생물인 해조류에 함유한 난분해성 생체고분자를 대상으로 생리활성 천연물 확보 및 신규 펩타이드화 공정을 개발한다. 해당 연구를 통해 전복 및 해조류 유래의 신규 천연 면역활성 소재를 확보하며 기능성을 포함한 가공제품을 개발하고자 한다.

2. 연구개발 필요성

가. 연구개발의 사회경제 및 과학기술 중요성

(1) 사회경제적 중요성

전복(abalone)은 다시마, 미역, 매생이 등의 해조류와 함께 완도를 중심으로 한 전남지역의 대표적 수산특산자원으로서 주로 참전복 (*Haliotis discus hannai*)과 까막전복 (*Haliotis discus*)을 중심으로 양식되고 있다. 먹이는 유생, 치패, 성패로 나뉘는 성장 시기별로 각 규조류, 해조류 및 단백질 함유 사료, 그리고 다시마, 미역 등 해조류가 되며 서식 특성에 따라 조류 (潮流)가 약하며 수온이 10~23℃ 정도의 한-난류 지역에서 생산된다.

최근 양식 기술의 발달에 따라 생산량이 급증하고 있으며 2006 년 기준, 국내 전복 총 생산량 3,166 톤 중, 92.5%에 해당하는 2,930 톤이 노화, 소안, 보길, 금일, 청산 등으로 이뤄진 완도 지역에서 출하되었다 [Fig. 1]. 최근 개별조사에 따르면 2008년 한해 생산량은 약 6000 톤에 이르며 활전복 기준 판매가격은 크기와 품질별에 따라 패각을 포함한 kg 당 30,000 - 45,000 원으로 연간 생산량과 소비자 판매가격을 기준으로 볼 때 약 2조 원에 달하는 막대한 규모의 시장임을 알 수 있다. 따라서 해당 지역의 어민 수입은 절대적으로 전복 양식, 유통 및 사료산업에 의존하고 있는 실정이다 (KMI, 해양수산동향, 1241호, 2007).

또한 전남지역에서는 해조류 가공식품 및 사료용으로 미역과 다시마가 대량 양식되며 전국 생산량의 80% 이상을 차지 할 만큼 절대적이다 [Fig. 2]. 그러나 미역 다시마 엽체 부위를 수확한 후 대량 발생하는 뿌리, 줄기, 포자엽 부위에 대한 산업적 활용분야가 전무한 상태이다. 아울러 부영양화 등 해양생태환경을 위해 이들 미활용 부위는 분리 수거 후 폐기처리되어야 하지만 노동력 및 수거 비용 등의 문제로 대부분 양식장 주위에 방류되고 있는 실정이다. 따라서 양식어민들을 대상으로 이들의 부가가치 및 구체적 활용방안을 제시함으로써 대량 수거 처리할 수 있는 동기부여 및 정책적 활용방안이 절실히 요구되고 있다.



Fig. 1. 전국 전복 생산량 동향 (이하 국토해양부 통계자료)

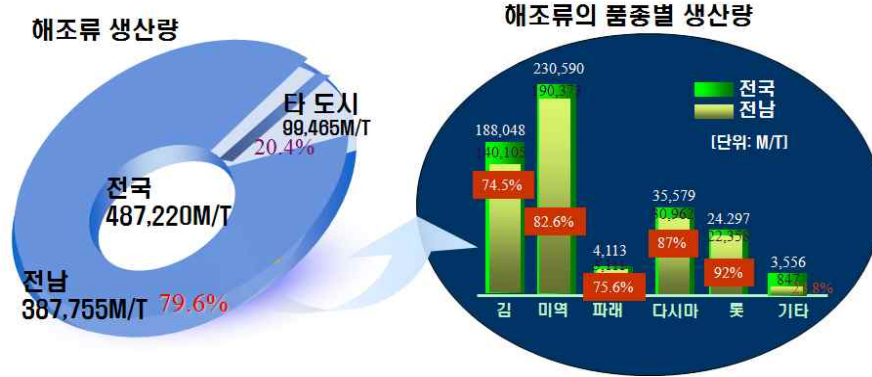


Fig. 2. 전국 해조류 생산량 동향

국내 전북 양식기술 발달과 가두리양식 면허제도 시행에 따라 2003년 이후 국내 전북 생산량은 급증하고 있지만 [Fig. 3], 여전히 활전복 양식 유통 위주의 1차 산업에 의존하고 있으며 급증하는 생산량에 비해 단순한 판매형태와 낮은 소비 수준에 따라 가격하락 및 생산-수요 간 불균형의 심화되고 있는 실정이며 생산-유통과정에서 폐사되는 전복과 전체 생산량 30%에 해당하는 상품성이 낮아 판매가 힘든 저질 전복에 대한 문제로 인하여 전북 시장의 침체와 양식-유통업자 간의 갈등을 초래하고 있다. 아울러 국내외 시장에서 상대적으로 가격이 저렴한 호주, 뉴질랜드산 전복 유통량이 증가하면서 수출경쟁력이 약화되고 있으며 일본 등 주요 전복 수출 대상국의 국민건강 및 자국민 보호를 위한 수입수산물 이력표기 및 위생검사강화 요구에 따라 국내 전복산업이 심각한 위기를 맞고 있다.

따라서 다양한 전복제품 및 보관 유통에 유리한 가공상품 개발을 통해 당면한 문제점을 해결하고 가공공정에서 발생하는 부산물에 대한 산업적 활용기술 개발이 동시에 진행되어야 한다. 또한 우수한 기능성 성분, 즉 황산화 다당류 (푸코이단) 등 이 다량 함유되어 있으나 여전히 폐기 방류되는 미이용 해조류의 활용 방안도 시급히 마련되어야 한다.

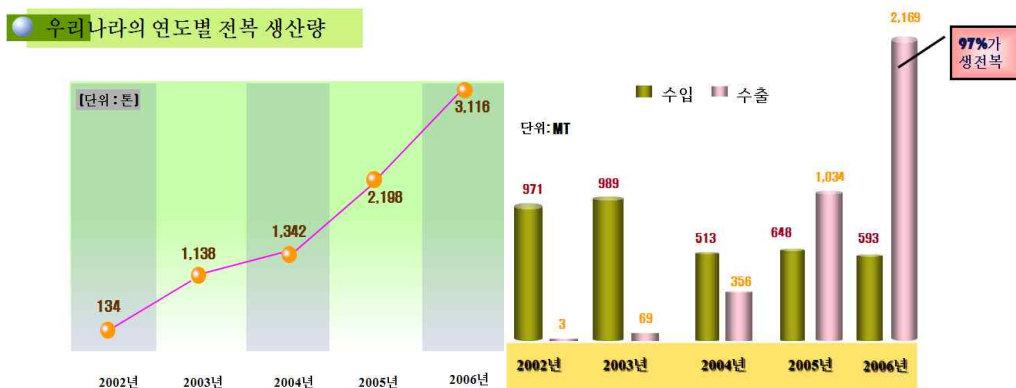


Fig. 3. 국내 전복 생산량 변화 추이

전국의 해양공간자원, 즉 해안선, 도서, 갯벌의 약 50%, 60%, 44%를 차지하고 있는 전라남도

는 국내 최대량의 해양생물자원을 생산하는 최적의 해양생물산업 인프라를 확보하고 있지만, 해당 지역 산업은 소규모 가공업체 (약 724 개 업체)와 어민들이 주도하는 어업, 양식, 유통, 단순가공품 판매형태의 단순 영세한 구조를 가지고 있다. 해당지역의 해양생물 산업을 미래성장동력 산업으로 육성하기 위해서는 현 시점을 기준으로 쉽게 접근할 수 있고 고부가가치 및 첨단산업으로 육성할 수 있는 비전을 마련해야하며 지역의 전통수산자원을 첨단해양바이오산업에 활용하기 위한 인프라구축, 기술개발, 우수인력양성, 고급기술의 사업화, 벤처기업 창업을 유치 촉진함으로써 해양생물소재의 고부가가치 기술개발과 산업구조 다변화를 통한 지역산업 구조의 취약성을 보장하여야 한다. 아울러 이러한 노력을 통해 다양한 고차가공식품과 건강기능성 LOHAS 제품 등 고부가가치 기능성 제품을 개발하고 전복 최대 소비국인 중국과 일본, 대만, 동남아, 미국, 유럽 등 세계시장을 대상으로 국내외 판매시장을 확대해야 할 것이다.

면역 질환의 일종인 알러지 (Allergy)는 외부환경에서 식품, 식품 첨가물, 꽃가루, 세균, 화학소재, 및 약물 등이 항원으로 작용함에 따라 체내 면역반응이 과도하게 반응하여 오히려 인체에 해를 주게 되는 증상들을 말한다. 알러지 질환은 발병형태에 따라 크게 아토피 (Atopy), 아나필락시스 (Anaphylaxis), 알러지성 비염 (Allergic rhinitis), 기관지 천식 (Asthma) 등으로 구분되며 최근 주거 환경의 변화와 식습관의 서구화 등으로 인해 급증하고 있으며 사회적, 경제적으로 삶의 질을 저하시키는 요인으로 작용하고 있다. 알러지 환자는 선진화된 국가일수록 많은 것으로 나타나며 미국의 경우 인구의 약 20%가 알러지 증상으로 고통 받고 있고 알러지 치료를 위한 직접 의료비용만 50억 달러 이상인 것으로 추산된다. 영국의 경우 알러지 질환자가 인구의 30%에 이르는 실정이다.

국내 면역 및 알러지 질환의 유병률을 살펴보면 천식의 경우 19세 이상 전체 성인인구 중 5.4%로 나타났으며 2005년 2.1%에 비해 두 배 이상으로 급증한 것으로 나타났다 [Fig. 4]. 알러지성 비염은 6.2%의 유병률을 보이고 있으며 [Fig. 5], 가장 높은 비율을 보이는 아토피피부염의 경우 전체 인구의 10%, 특히 만 1-11세에서 20.6%를 차지하고 있으며, 질환자의 대다수가 영유아이며 유병률 또한 매년 급증하는 추세이다 [table 1].

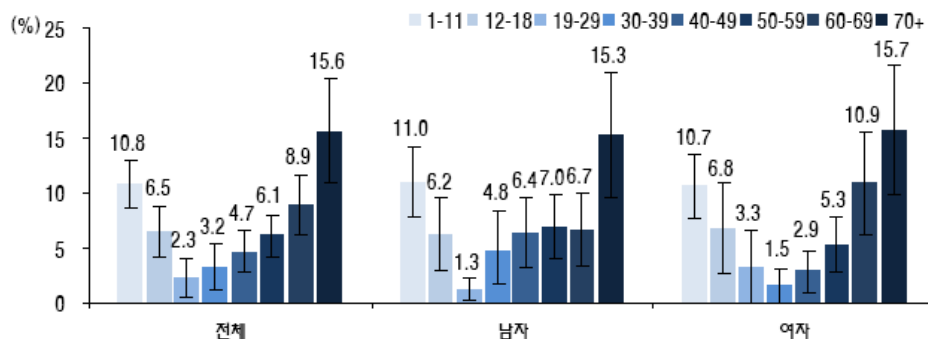


Fig. 4. 국내 천식 유병률 현황 [보건복지가족부, 제4기 1차 국민건강영양조사]

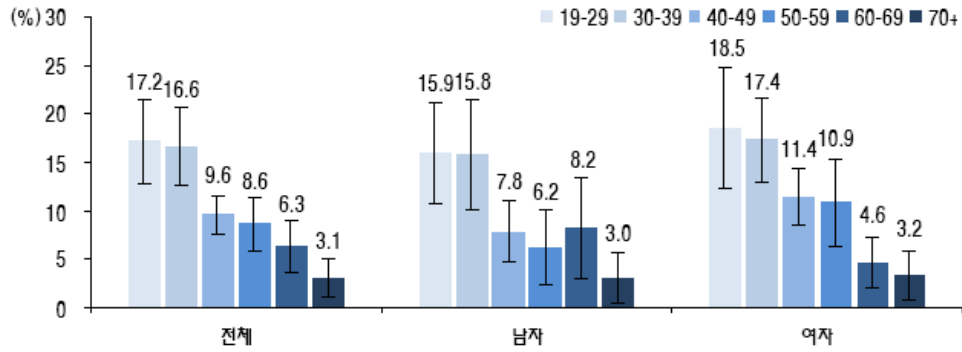


Fig. 5. 국내 알러지성 비염 유병률 현황

Table 1. 아토피피부염 유병률 연령별 현황 [보건복지가족부, 제4기 1차 국민건강영양조사]

(단위 : %)

구분	전체		남자		여자	
	N	분율 (표준오차)	N	분율 (표준오차)	N	분율 (표준오차)
연령(세)						
1-11	719	20.6(2.2)	382	18.8(2.6)	337	22.3(2.9)
12-18	351	11.7(1.8)	188	9.8(2.0)	163	14.0(2.3)
19-29	338	5.7(1.5)	140	4.4(1.7)	198	7.0(1.9)
30-39	635	1.6(0.5)	247	1.8(0.8)	388	1.3(0.5)
40-49	565	1.5(0.6)	248	1.2(0.9)	317	1.9(0.9)
50-59	505	1.0(0.6)	205	1.9(1.2)	300	0.2(0.2)
60-69	490	1.6(0.6)	217	2.5(1.2)	273	0.8(0.6)
70+	449	0.8(0.4)	184	1.5(0.8)	265	0.4(0.4)

최근 알러지 관련 시장현황을 살펴보면 국내외 우수 제약회사 및 기능성 관련 업체를 중심으로 천식, 아토피, 알러지성 비염 등의 알러지 질환 치료제 및 예방완화 차원의 기능성 제품을 개발하고 있으며 전 세계적으로 약 20조원 이상의 막대한 시장을 이루고 있다. 국내의 경우 아토피 시장 규모만 약 6,000억원 이상에 이르며 첨단 바이오산업을 주도하는 제약회사와 바이오 벤처를 주축으로 신약과 기능성 제품 개발에 박차를 가하고 있지만 알러지 치료제로 개발된 순수 국산신약은 전무하며 일부 아토피성 피부질환 개선제가 출시되고 있다. 전반적으로 의약 및 기능성 소재 산업에서 나타나는 높은 수입의존도와 시장규모에 비해 화장품, 건강식품 등 상용 기능성 제품이 많이 부족한 점을 감안할 때 정부 및 산학연 차원의 공동 대응을 통한 신규 기술 및 제품 개발이 시급한 실정이다.

(2) 과학기술적 중요성

지금까지 전복을 소재로 한 가공제품은 통조림, 죽, 장조림, 내장 젓갈, 어묵 등의 일부 가공

식품들이 있지만 타 수산가공품에 비해 소비자 선호도 및 인지도가 낮아 전복 산업의 위기를 타결할 방안이 절실한 상황이다. 따라서 국내 전복시장 활성화와 어민 보호를 위해 전복의 영양학적 기능학적 체내 유용성과 우수성을 입증할 자료가 필요하며 이를 기반으로 기능성을 부여한 제품 다양화 및 고부가가치화 기술개발이 필요하다.

또한 지금까지 수산 부산물로 알려져 있지 않은 해조류 뿌리, 줄기, 포자엽 등의 활용기술과 최근 완도 현지 가공공장에서 발생하는 전복 가공부산물인 자숙액, 내장 등의 활용기술은 환경 문제와 더불어 시급히 연구되어야 할 과제이다. 하지만 관련 부산물 발생현황에 대한 기초자료와 R&D은 지금까지 파악되거나 수행된 적이 없으므로 부산물 활용에 대한 전반적인 연구 개발이 요구된다.(참조: 전복 가공부산물 현황 - 2009년 완도 현지 전복가공업체 자료)

주요 가공 제품 및 발생 부산물 현황				
전복가공상품	제품 명칭	부산물 발생 가공공정	발생 부산물	개발 가능 분야
전복혼합어육가공품 [맛살류]	전복골드맛살 전복치즈맛살 전복녹차맛살	내장제거 / 미체 / 지숙	내장 / 육진사 / 지숙액	기능성 산입합소 기능성 식품 소재 기능성 화장품 천연의약품 소재
전복조미가공품 [조림/조미류]	간장전복 불고기양념전복 고추장전복	내장제거 / 지숙	내장 / 지숙액	[기능성 천연물, 올리고 당, 펩타이드, 아미노산, 불포화지방산 등]
미트지숙가공품 [지숙/훈제류]	지숙 훈제 지숙오븐	내장제거 / 지숙	내장 / 지숙액	

전복 가공 시 (가)식부 기준
내장 20-25 w% / 육진사 5-8 w% / 지숙액 1,500 L (100 kg 당)
대량 발생 → 부산물 활용

국내외 논문 및 특허를 포함한 최근 R&D 자료에 따르면 전복에 대한 기능성 연구는 유전체 연구 (genomics) 위주에 국한되어 있는 실정이며 이들이 함유한 활성물질의 이화학적 특성, 안전성, 독성, 효능 검증을 포함한 과학적 자료는 거의 전무한 실정이다.

다시마, 미역 등 해조류 성분을 주로 섭취하는 전복 내장에는 저분자 천연물, 고분자 다당류, 지질 및 단백질 등을 소화분해시키는 50 여종의 다양한 기능성 단백질체 (효소군)를 함유하고 있으며 (Garcia, 2006), 이들 효소로부터 소화 분해된 가수분해물은 체내 소화흡수에 유리하며 기능성이 도출되기 쉬운 저분자 형태의 펩타이드, 올리고당, 불포화지방산 및 먹이 해조류로부터 유래한 phlorotannins 등의 고기능성 저분자 유기물을 함유할 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 기능성 저분자 생리활성 물질을 생산하기 위한 효율적 생물공정으로 전복의 해

조류 성분 소화분해 대사기전을 모방한 위장관 소화가수분해시스템 (gastrointestinal digestion system)의 최적 조건과 활용성을 검토하고자 한다.[Fig. 6] 아울러 해당 생물공정은 당화 및 펩타이드화에 적합한 시스템으로써 제 3세대 바이오 에탄올 소재로 알려진 해조류 당화기술에 접목할 수 있을 것으로 사료된다.

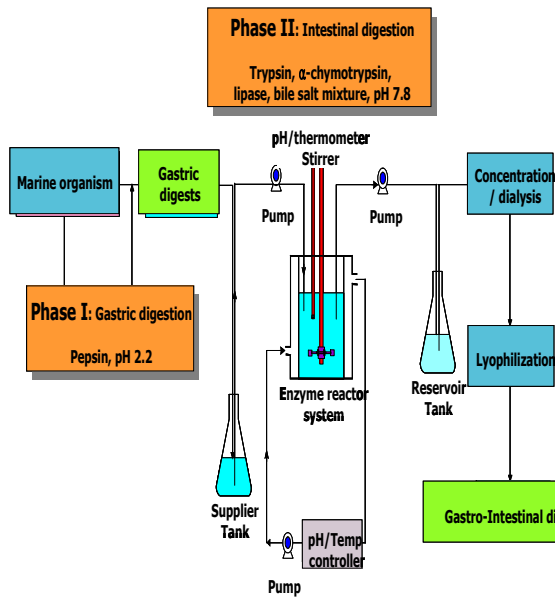


Fig. 6. 인체 위장관 소화가수분해 시스템 및 생산 공정도

면역질환의 일종인 알러지 질환은 전세계 인구의 10~20%에 달하며, 최근 환경문제, 식습관 등의 외부요인에 의해 뚜렷한 증가 추세에 있다. 알러지 질환이 급증하는 주요 원인은 주거환경의 서구화로 옥내의 유해환경물질 및 집 먼지 진드기 같은 알레르기 원인물질에 많은 노출, 모유수유가 줄어들어 알레르기 질환에 대한 저항의 감소, 인스턴트 식품섭취 증가 등의 식생활 변화, 의학의 발달과 예방접종의 증가 및 생활환경이 좋아져 세균 등 미생물에 대한 노출기회 감소, 그리고 해외교류가 많아지면서 외국으로부터 새로운 알러지 물질에 노출될 기회 증가 등이 알레르기 질환의 급증 원인이 될 수 있다.

알러지 반응 (allergic reaction)은 항원 (allergen)의 노출로 형질세포 (plasma cell)로부터 항체 (Ig E)가 생성되고, 이 항체가 비만세포 (mast cell) 표면에 결합한 후, 동일한 항원에 재 노출 되면 항체에 항원이 교차 결합한다. 수분 내에 비만세포로부터 여러 가지 매개물질들 (vasoactive amines)이 유리되어 여러 가지 임상증상들이 나타나며, 심한 경우 국소적으로 염증 세포들 (eosinophil, neutrophil 등)의 침윤이 일어나는 염증반응이며 제1형 과민반응에 속한다

[Fig. 7]. 이러한 질환들로는 크게 기관지 천식 (asthma), 알러지성 비염, 알러지성 결막염, 아토피 (atopy)성 피부염, 접촉성 피부염, 직업성 알러지 질환, 식품 및 약물 알러지 등이 있다.

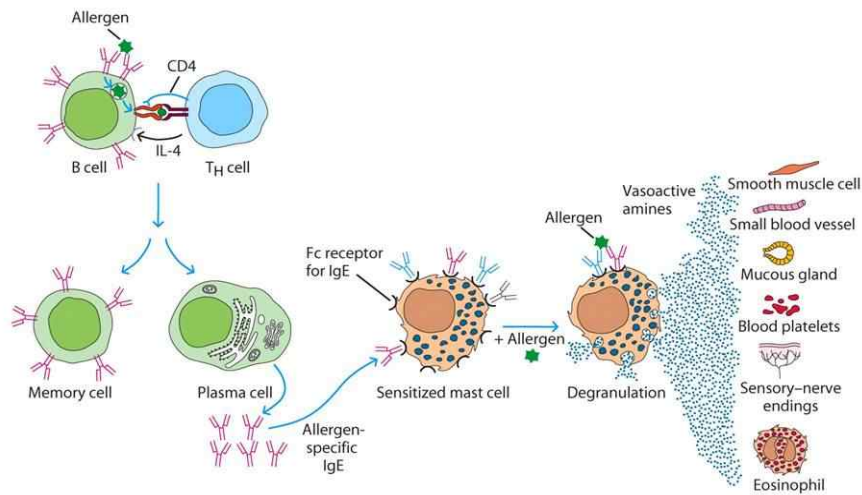


Fig. 7. 알러지 반응 기전

지금까지 개발된 알러지 관련 치료제를 살펴보면 웨링푸라우 社의 '클라리틴'과 화이자 社의 '지르텍'이 전체 시장의 절반 정도를 차지하는 대표적인 의약품이다. 효능별로는 항히스타민과 beta2-효능제 약물의 비중이 가장 높으며 methylxanthin류, 스테로이드성 약물 등이 나머지를 차지하고 있다. 기능성 제품의 경우에도 치료제 성분의 함량을 조절 첨가하거나 보습을 위한 아토피 개선 완화 스킨케어 제품이 대부분이다. 그러나 현재까지 나온 스테로이드, 항히스타민제, 기관지 확장제 그리고 leukotrienes 길항제 등과 같은 치료제로는 이들 질환의 증상들은 호전시킬 수 있으나 반복적으로 재발하지 않도록 완전히 근절시킬 수는 없으며, 특히 스테로이드성 약물은 심각한 부작용을 야기하고 있기 때문에 천연물 유래의 항알러지성 소재를 탐색하는데 관심을 기울이고 있다. 최근 국내 기업을 포함한 다국적 제약사들은 이러한 문제점을 해결하기 위해 천연소재의 약리물질 확보에 총력을 다하고 있으며 치료제 개발의 전반적인 방향은 알러지 발생기전 연구결과를 치료에 응용하려는 추세이다. 예를 들면 염증과 관련된 전사조절 인자인 NF-kB, 인터루킨 (interleukines; ILs), 사이토카인 (cytokines) 혹은 활성산소 (Reactive Oxygen Species: ROS)나 Ca^{2+} 를 타겟으로 하는 천연물 유래 조절물질 개발에 많은 노력을 기울이고 있다.

해당 연구와 관련하여 본 연구자는 우수한 생리활성을 가지는 해양생물 유래 생리활성소재 라이브리리를 구축해왔으며, 특히 해조류 유래 후보물질들 중 우수한 면역활성활성물질을 선별하기 위하여 면역세포 및 알러지 질환 모델 동물실험을 통해 천식, 과민성출혈증후군 (아나필락

시스)에 대한 억제 및 조절 활성화에 대한 근거자료를 최근 확보하였다. 이들 해양 생리활성 소재들은 독성이 없으며 특히 면역관련 인자들 중 앞서 설명한 NF-kB 및 ILs, cytokines 등에 대한 조절 기능을 나타내는 것으로 보인다. 또한 예비실험을 통해 알러지 질환 동물의 알러지성 천식 완화 효능을 일부 검토하였기에 해당 연구를 통해 해양수산자원이 가지는 과학적 효능과 기전연구가 수행되어야 할 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 및 국외 관련기술 동향

1. 국내 및 국외 관련기술 개요

가. 전복 대상 연구개요

지금까지 전복에 관한 연구는 양식기술 및 육종개발 차원에서 주로 수행되어져 왔으며, 최근 들어 내장 (intestine)으로부터 효소 및 렉틴(lectin)과 같은 기능성 소재 분리 등의 연구가 일부 진행되고 있다. 환경생물학적 차원에서 전복 cDNA를 활용한 환경영양평가 연구와 패각 조직의 구조형성 및 발생과정을 밝히는 생물학적 기초연구가 체계적으로 진행 중이다.

반면 전복에 대한 생리활성연구는 육 (meat)과 내장 (intestine)의 조추출물에 대한 항산화 (antioxidative), 항고혈압 (antihypertensive) 관련 연구가 부분적으로 진행되어 왔지만, 물질의 구조 및 작용기전 등을 포함한 생리활성 소재 연구에 대한 과학적인 자료와 체내 유용성 등의 연구결과는 미비한 상태이다. 특히 또한 전복 양식기술 및 가공식품 개발에 관한 것이 대부분이며 생리활성 및 기능성 관련은 미비하다. 이는 전복 자체가 고가이며 패각을 제외한 거의 모든 부위가 식품으로 활용되기 때문에 양식 및 식품산업 외 응용연구가 거의 수행되지 않은 것으로 사료된다. 최근 개발된 전복 가공 제품은 육 통조림, 죽, 장조림, 내장 젓갈, 어묵 등이 있지만 아직까지 소비자 선호도 및 인지도가 낮아 적극적인 시장개척과 판매전략이 요구된다. 따라서 국내 전복시장 활성화와 어민 보호를 위해 전복의 영양학적 기능학적 체내 유용성과 우수성을 입증할 자료가 필요하며 이를 기반으로 기능성을 부여한 다양한 제품과 고부가치화 기술개발이 필요하다.

나. 알러지 대상 연구개요

알러지 관련 연구는 식품알러지 위주로 활발히 진행되고 있다. 알러지 예방을 위한 최선의 방법은 원인식품을 원료로 한 가공식품을 섭취하지 않는 것이지만 실제로 완전한 제한은 어렵고, 제한식사와 약물치료를 병행하는 요법이 시행되고 있지만 지속적인 효과가 없고 부작용도 우려된다. 이런 문제점을 해결하기 위해 다양한 면역요법 (anti-IgE 항체 주사치료, 변성알레르겐, ODN, 펩타이드 등)이 시도되고 있는데 대부분의 메카니즘이 Th2 반응 억제 및 Th1 반응으로 진행시키는데 관심을 두고 있다.

면역요법 외에 알러지 반응을 야기하는 에피토프 (epitope)를 제거 및 변형한 저알러지성 식품개발이 국내외적으로 이루어지고 있다. 이는 효소처리, 유전자변형, 물리적인 방법을 이용해 식품 내 알레르겐의 구조적 변화 및 파괴로 저알러지원성 제품을 만들 수 있다. 또 유전자 변형방법으로 알러지원성을 감소시킬 수 있지만 비용 때문에 제한성을 가진다. 이외에도 과일, 샐러리, 커피 등은 가열 및 고압처리로 알러지원성을 감소시킬 수 있지만 우유, 계란, 새우 등은 부분적으로 감소하거나 변화가 없는 것으로 나타

나 원인식품에 대한 가열 및 고압처리법은 한계가 있는 것으로 알려져 있다.

현재 상용되는 대표적인 알러지 치료제 및 기능성 제품은 항히스타민과 beta2-효능제, methylxanthin류, 스테로이드성 소재로 구성되며 다국적 기업으로부터 원료수입이나 generic 약물 개발을 통해 국내 시장에서 판매되고 있다. 그 예로는 삼아약품의 Atock, 한국유씨비의 Zirtec, 부광약품의 Azeptin과 Primalan, 영진약품의 Plokon, 유한양행의 Pheniramen, Banbec, 보령제약의 Ebastel 등이 있으며 아토피 피부질환 개선효과를 가지는 기능성 화장품의 경우 네오팜의 아토팜, 보령메디앙스의 닥터 아토피스, 동성제약의 아토클리어 (피부연고제 및 화장품) 및 스테로이드 무첨가 제품인 바이오스펙트럼의 노스테 등이 있다. 이 외에도 유럽 아토피 화장품 제품인 보습형 아더마는 유한양행에 의해 약국에서 판매 중에 있다. 국내 천연물 유래의 항알러지 약물 개발 상황을 살펴보면 (주)켄온에서 알러지 및 관절염 치료제 개발, (주)유젠바이오에서는 비만세포 안정화 소재 및 기술 개발을 진행중이며, 건강식품의 경우에도 원가가 높은 홍삼, 인삼, 프로폴리스 등 일부 제품에 대한 면역활성 관련 기능성 제품이 출시되고 있다. 그러나 기능성 식품에서 의약품을 통틀어 스피루라나가 면역활성 건강식품 소재로 활용되는 것 외에는 해양 천연물 유래 면역활성소재와 관련 기술 개발은 거의 전무한 상태다.

의약품과는 달리 면역활성기능성 제품은 많은 벤처기업들에 의해 기술개발이 가능하며 현재 국내시장의 수요 증가와 외국 기업과의 기술 경쟁력 격차가 크지 않다는 점을 감안해 볼 때 해당 소재 및 기술 개발은 매우 중요하다. 하지만 식약청 기준 기능성 화장품의 효능으로 분류되어있지 않기 때문에 개발, 유통 과정 상 제약이 있다. 따라서 효능과 제품 표준화에 대한 과학적 근거 제시와 기능성 인증획득을 통해 관련 소재와 기술 개발에 노력이 요구되는 시점이다.

2. 국내외 기술 현황

가. 국내기술동향

(1) 전복 관련 기술 동향

(가) 전복 내장 및 육 유래 항균, 항생, 간질환예방, 혈전분해, 항혈액응고 펩타이드 연구
(조선대학교 단백질소재연구센터)

(나) 전복 기초 생리활성 연구: 항산화, 항고혈압, 항혈전 관련 (목포대학교 식품공학과)

(다) 육, 내장 부위 활용: Lectin 및 항산화효소 등 신규 생리활성 소재
(제주대학교 해양생명공학부)

(라) 전복가공식품개발: 육 통조림, 죽, 장조림, 내장 젓갈, 어묵 등 (완도 소재 기업)

(마) 전복 cDNA 활용: 환경영향평가 bio-marker 개발 관련 (한국해양연구원)

(바) 육종 및 양식기술개발 연구(국립수산과학원 생명공학연구단)

(사) 기타: 폐각 활용: 폐각분말의 향장류 소재 활용 / 자개 공업 소재 활용

(2) 알러지 관련 개발 동향

- (가) (주)캠온의 2005년 천연물을 이용한 알러지, 관절염 치료제의 제품화연구
- (나) (주)유젠바이오는 비만세포를 안정화시킴으로써 알러지 반응을 억제하는 천연물 유래 비만세포 안정화물질(MSC:Mast cell Stabilizing Compound)을 최근 개발
- (다) 아토피 피부질환 개선효과를 가지는 기능성 화장품의 경우 네오팜의 아토팜, 보령메디앙스의 닥터 아토피스, 동성제약의 아토클리어 (피부연고제 및 화장품) 및 스테로이드 무첨가 제품인 바이오스펙트럼의 노스테 등 상용

나. 국외기술동향

(1) 전복 관련 기술 동향

- (가) 소화효소 및 항산화효소 연구 (미국 스크립스 연구소/일본 홋카이도 대학 등)
- (나) 항알러지 관련 소재 연구 (미국 네브라스카 대학)
- (다) 전복 바이오 매스 활용, 환경영향평가 관련 Bio-marker 개발 (호주 멜버른 대학)
- (라) 전복 패각 및 주요기관 발생관련 연구 (미국 캘리포니아 주립대학)
- (마) 전복 육종 및 항산화 관련 유전체 연구

(2) 알러지 관련 기술 동향

- (가) 유럽 전체 성인 인구의 25%가 식품 알러지 질환보유, 스페인 국립 생명 공학 센터(Centro Nacional de Biotecnologia) 임비오시스(Imbiosis: Grupo Genetrix)社가 설립 3년 만에 식품 속의 글루텐 분석 시장의 25%를 장악.
- (나) 알러지 관련, 임비오시스社가 글루텐 성분 분석을 넘어 신규 연구 라인을 개시했으며, 본 신규 연구 라인에는 내년 제품 판매의 20%, 회사 예산의 3%에 달하는 R&D 투자, 인적 자원의 약 25%가 투입될 예정임. 2001년 3월에 신시내티 아동병원의 Marc E. Rothenberg박사의 연구팀은 음식물 알러지가 호산구(eosinophil)라는 혈액 세포에 연관되어 있다는 사실을 발견하였음. 또한 주요 알러지 유발 물질과 알러지 반응을 일으키는 결정 부분인 에피토프(epitope)가 면역 글로블린 E(immunoglobulin E, IgE)라 불리는 항체와 반응하는 사실을 규명
- (다) 2004년 11월 미국 스탠포드 의과대학 연구팀이 개를 대상으로 한 알러지 면역 백신 개발
- (라) 유럽 항알러지 스킨케어 제품 아더마 등이 있으며 의약품은 웨링푸라우 社의 '클라리틴'과 화이자 社의 '지르텍' 등 개발됨.

3. 관련 제품 및 시장현황

가. 국내 제품생산 및 시장 현황 (국내특허, 식약청 및 업체 현황 DB 검색)

- 전복 관련 제품은 죽, 젓갈 등 단순가공제품에 한정

- 전복을 활용한 기능성 제품 시장은 전무
- 위장관 소화가수분해시스템 공정 미활용
- 한약재 및 육상식물 소재 기능성 향장류 제품 출시
- 해양생물 유래 면역활성기능성 제품 無 (클로렐라 및 스피루리나 외)

나. 국외 제품생산 및 시장 현황 (WIPO 특허 및 Google DB 검색)

- 전복 식품소재 한정
- 전복 단백질 원 다이어트 아미노산 소재로 일부 활용
- 고흡수성 동물사료 및 영양제를 위해 위장관 소화가수분해시스템 공정 활용
- 녹색홍합 및 해조류 폴리페놀 혼합물 등 해양생물 유래 면역활성소재 상용화 검토

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 내용

1. 시료 확보

본 실험에 사용된 참전복 (영명: abalone, 학명: *H. discus hannai*) 시료 [Fig. 8]는 완도 노화 지역에서 해상 양식수조 입식 3년차를 대상으로 계절별로 확보하여 상세 해부도 [Fig. 9]에 따라 육 (muscle) 및 내장 (intestine) 부위별로 분리한 후 보관하였으며, 성분분석 및 가수분해물 제조 등 사용 전까지 -80℃에 보관하였다. 완도 소재 전북가공공장에서부터 가공부산물인 전복 자숙액을 회수하여 탈염, 동결건조를 통해 자숙액 파우더를 확보하였다.



- 영명: Abalone Shell
- 학명: *Haliotis discus hannai*
- 서식지: 중국, 일본, 동남아시아, 뉴질랜드, 미국, 호주, 남아프리카, 칠레 등
국내 (전남 / 제주 지역 일부) 등
- 먹이: 미역, 다시마, 대황, 감태, 갈파래, 구멍갈파래 등
- 이용분야: 식품, 향장류, 자개공업 소재 등
- 주요물질: 기능성 아미노산, 항산화 효소, 타우린, 미네랄 등
- 구전약리: (명의별록/규합총서) 시력 정력 보강 (해양본론) 간기능 및 내장기능 치료 → 자양강장 및 정력보강
- 한방효능: 병후회복, 간염, 결막염 백내장 치료 등

Fig. 8. 대상 시료 (완도산 참전복) 및 자료 검색

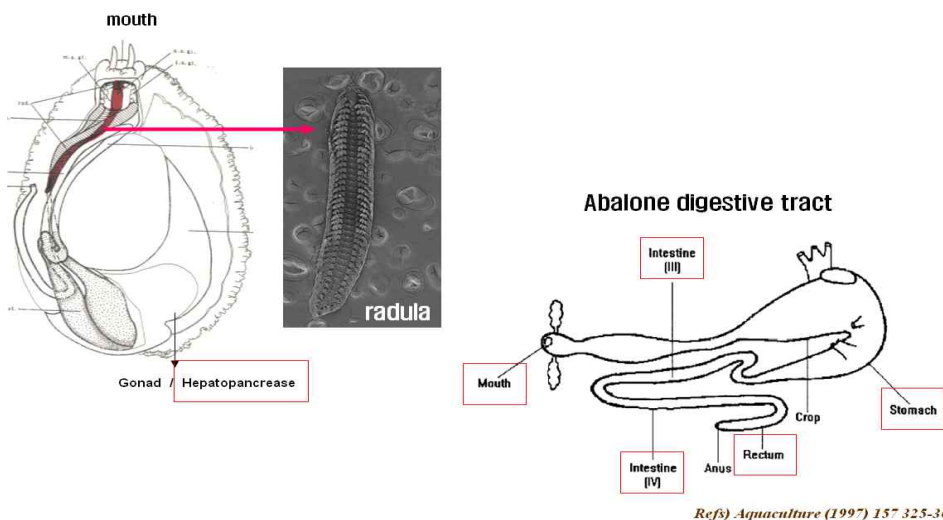


Fig. 9. 전복 해부도 및 소화가수분해 기관

아울러 다시마 줄기, 뿌리, 포자엽 및 미역 뿌리, 줄기 등 양식 부산물로 대량 발생하는 해조류 부산물은 참여기업 및 완도 지역 양식장에서 직접 확보하여 세척, 건조 후 파우더 샘플로 제조하여 사용하였다.

2. 성분분석

가. 일반성분 분석

확보된 샘플은 동결건조하여 마쇄한 후, 식약청 식품공전 일반성분 분석법 (2010) 에 따라 수분, 조단백질, 조지방, 당질 및 조회분 등 일반성분을 분석하였다. 즉 수분은 105°C 상압가열 건조법, 조단백질은 자동 질소중류장치 (Kjeltec 2200 analyzer, FOSS Co., Slangerupgade, Hillerod, Denmark)를 이용한 semimicro-Kjeldahl 질소정량법, 조지방은 자동 조지방 추출기 (Soxhlet Avanti 2050, FOSS Co., Slangerupgade, Hillerod, Denmark)를 이용한 Soxhlet's 추출법, 당질은 phenol-sulfuric acid 법, 조회분은 600°C 직접 회화법으로 각각 정량하였다. 각 실험은 3회 반복하여 얻은 평균값으로 나타내었다.

나. 아미노산 조성 분석

아미노산 조성은 다음과 방법에 따라 샘플을 처리하여 자동아미노산 분석계 (Amino Acid Analyzer, L-8900, Hitachi, Japan)를 이용하여 유리아미노산과 구성아미노산을 각각 분석하였다.

(1) 구성 아미노산 분석

전복의 구성 아미노산 분석은 시료에 6 N HCl 10 ml를 혼합하여 110°C에서 22시간 가수분해하여 진공 농축후 0.02 N HCl 10 ml로 녹여 10배 희석시킨 액을 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 분석용 시료로 사용하였다.

(2) 유리 아미노산 분석

전복의 유리 아미노산 분석은 시료에 2% TCA 0.6 ml (2배 희석)를 가하여 원심분리 후 상등액 0.5 ml에 0.02N HCl 1 ml (3배 희석)를 혼합한 다음 증류수로 5배 희석시켜 0.45 μ m membrane filter로 여과한 것을 분석용 시료로 사용하였다.

다. 지방산 조성 분석

지방산 분석은 지질 1 g을 0.5M NaOH/MeOH 용액에 넣어 100°C에서 15분 동안 가열하여 가수분해시킨 후, Triacylglycerol과 phospholipid는 0.5 M NaOH/MeOH 용액에 넣어 100°C에서 30초 동안 에스테르 교환반응을 시켰다. 그리고 지방산은 14% BF₃/MeOH 용액으로 100°C

에서 20초 동안 메틸화 (methylation) 시켰다. 지방산 조성분석은 실리카 모세관 칼럼 (Supelcowas 30 m × 0.25 mm)이 장착된 Gas chromatography (GC)로 측정하였다.

라. 무기질 (미네랄) 함량 분석

시료 내 무기질 함량은 Microwave system (Ethos Touch, Milestone, Italy)에서 샘플을 분해하여 검액으로 만든 후, 유도결합플라즈마 분광기 (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy, ICP-AES, model OPTIMA 5300 DV, Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA)를 이용하여 분석하였다. 즉, 시료 약 100 mg 정도를 채취하여 0.1% 중성세제와 0.1 M EDTA를 이용하여 세척한 후, 질산과 이온제거수를 넣고 microwave system으로 분해하여 검액으로 만든 뒤 ICP를 이용하여 무기질 함량을 측정하였다.

마. 비타민 함량 분석

비타민은 식품공전에 따라 고성능액체크로마토그래피 (HPLC)를 이용하여 분석하였다.

Vit. A 는 역상 C18 column을 장착한 HPLC를 이용하여 이동상 EtOH:H₂O=95:5 / flow rate=0.5 ml/min / 형광 detector 파장 340 nm, 측정파장 460 nm 조건에서 분석되었다.

Vit. B₁ 은 PGMA (polyglycerylmethacrylate) column 내에서 이동상 0.1 M sodium phosphate / flow rate=0.7 ml/min / 반응액 페르시아 칼륨 · 수산화 나트륨 flow rate 0.7 ml/min, 형광 detector를 이용하여 여기파장 375 nm, 측정파장 450 nm 조건에서 분석되었다.

Vit. B₂ 는 역상 C18 column을 장착한 HPLC에서 이동상 Me-OH:10 mM NaH₂PO₄:acetonitrile = 60:40, flow rate 01 ml/min / UV detector를 이용하여 254 nm 파장에서 측정하였다. Vit. E 는 순상 column을 이용하여 이동상으로 hexane :iso-propanol = 98:2, flow rate 0.5 ml/ml 형광 detector 여기파장 298 nm, 측정파장 325 nm에서 측정하였다.

바. 폴리페놀 (polyphenols) 분석

항산화활성, 면역활성, 항암활성, 항비만 활성 등 다양한 활성이 보고되고 있는 폴리 페놀성 화합물의 분석은 Folin-Ciocalteu 발색법에 따라 실시하였다. 즉, 시료 20 µl을 96 well plate에 넣고 1 N Folin-Ciocalteu 시약 100 µl를 가한 후, 3 분 동안 실온에 방치하였다. 7.5% Na₂CO₃ 용액 80 µl을 가한 후 90 분간 암실 조건에서 반응시킨 후 원심분리 (1600×g, 8 분)한 상층액의 흡광도 (측정파장 = 765 nm)를 측정하여 표준시약인 phloroglucinol에 대한 표준농도곡선과 상응하는 농도를 비교 결정하였다.

사. 환원당 분석

환원당 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)와 Rochelle염으로 발색하여 575 nm에서 흡광도를 측정하는 당 정량법이다. 2 M NaOH를 준비하고 디니트로살리실산 (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)와 Sodium Potassium tartrate를 함께 녹여 DNS시약을 준비하였다. 환원당에 의하여 디

니트로살리실산 (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)이 환원되어 생성된 3-아미노-5-니트로살리실산 (3-amino-5-nitrosalicylic acid)의 흡광도를 측정하는데 3-아미노-5-니트로살리실산 (3-amino-5-nitrosalicylic acid)을 안정화 하기위하여 DNS 시약에 NaOH, Rochelle염, 페놀 및 Na₂S₂O₅를 첨가하였다. standard 용액은 전분을 사용하였고 본 연구팀에서 당 정량할 샘플을 DNS 시약을 처리하여 heating blok 을 사용해 90~95℃를 10 분 동안 유지하였다. 그 후에 열을 식힌 뒤 ELISA Reader 를 사용해 580 nm에서 흡광도를 측정하였다.

아. 단백질 농도 분석

Bradford Assay를 이용하여 단백질의 농도를 측정한다. 산성용액에서 Coomassie brilliant blue 염료는 단백질과 결합하게 되고, 이로 인해 염료의 최대흡광도 (λ max)는 465 nm에서 595 nm로 이동하게 된다. 595 nm에서의 흡광도는 단백질의 농도와 비례하므로 정량이 가능하게 된다. 이를 바탕으로 표준 정량곡선을 준비 ($R^2 > 0.995$)하고, 샘플과 Bradford시약을 10:1로 처리하였다. 그 후에 37℃에 30 분간 방치하고, 신속하게 vortexing 한 후에 ELISA Reader로 595 nm파장에서 측정하였다.

3. 소화가수분해시스템(in vitro digestion system)을 활용한 저분자-고흡수 가수분해물 제조

가. 위장관소화가수분해시스템 (in vitro gastro-intestinal digestion) 개념

사람의 소화대사과정은 식이 섭취 후 소화분해효소에 의해 가수분해된 저분자 물질들이 위 소장 점막을 통해 흡수되어 혈액을 통해 체내로 공급되는 일련의 과정이다. 이러한 효소의 수식 과정을 통해 식이원에 함유된 생체고분자, 즉 단백질, 다당류, 지방 등의 고분자 물질들로부터 체내 필수 영양소와 항상성 유지를 돕는 다양한 형태의 펩타이드, 올리고당, 지방산과 같은 고흡수 고기능성의 물질들이 도출된다(Jung et al. 2007). 본 연구에서는 완도산 참전복 (*Haliotis discus hannai*)이 가지는 생리활성물질을 탐색하고 체내 흡수율이 높은 흡수 직전 형태의 가수분해물을 도출함으로써 보다 높은 체내유용성 (bioavailability)을 보유한 건강 기능성 (nutraceuticals) 및 의약품 (pharmaceuticals) 소재를 개발하고자 체내 소화가수분해시스템을 도입하였으며, 전복 내장 위장관소화가수분해물은 정 등의 방법 (Jung et al. 2007; 대한민국특허등록 10-0680066, 2007)에 따라 확보하였다.

아울러 해양초식성 동물인 전복은 주요 먹이원인 해조류를 섭취한 후 위-장관 내 포함된 다양한 소화분해효소를 활용하여 난용성 당, 단백질, 지질 등을 소화-흡수한다. 이는 해조류에 존재하는 복잡한 당결합 구조를 가수분해할 수 있는 독특한 시스템을 가지기 때문이며, 본 연구에서는 전복의 소화분해 단백질체를 활용함으로써 해조류 유래 기능성 저분자 소재를 확보하고자 한다.

나. Lab-scale 소화가수분해시스템을 활용한 저분자 가수분해물 제조 및 최적 조건 검토

(1) 전복 가수분해물 희분 제조

전복 소화가수분해물 제조를 위한 가수분해 공정 [Fig. 10]은 정 등의 방법 (Jung et al. 2007; 대한민국특허등록 10-0680066, 2007)에 따라 도입되었으며, 해당 소화가수분해시스템은 인체의 위-소장에서 일어나는 대사과정, 즉 소화가수분해과정을 모방하여 실험실 조건에서 위와 소장 접막을 통해 흡수되기 직전의 고흡수 저분자 가수분해소재를 제조하기 위해 구성된 공정 시스템이며, 주요 구성은 다음과 같다.

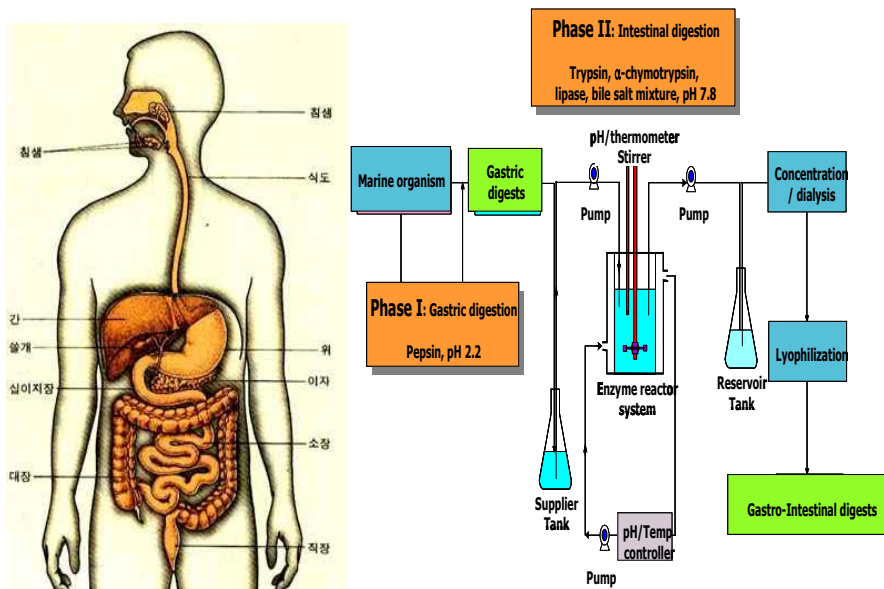


Fig. 10. In vitro gastro-intestinal digestion (GI) system

전복의 육과 내장을 분리하여 생리 식염수로 수차례 세척한 후 균질화 (20,000 rpm, 30 분, 4℃)한 시료 2,000 g에 증류수 10 L을 가하고, 위 (胃) 소화조건과 동일한 pH 1.8~2.2의 1차 기질용액에 대하여, 펩신 (Pepsin, EC 3.4.23.1)을 250:1, 온도 35~40℃, 반응시간 1시간 30분~2시간으로 위 (胃) 조건과 유사한 환경에서 1차 가수분해 (Phase I), 소장 조건에서 2차 가수분해 시켰다 (Phase II).

- **Phase I:** 위(胃) 소화조건과 동일한 pH 1.8-2.2으로 맞춘 1차 기질에 대하여, Pepsin (EC 3.4.23.1)을 기질 대 효소비 250:1, 온도 35~40℃, 반응시간 1시간 30분~2시간으로 위 소화 (gastric digestion) 조건 하에서 가수분해 시켰다.

- **Phase II:** 1차 가수분해물에 bile salts mixture (0.125 M taurocholate, 0.125 M glycodeoxycholic acid), 1 M CaCl₂, 0.25M Bistris (pH 6.5), 0.1%(w/v) porcine pancreatic lipase (EC 3.1.1.3)들과 함께 섞은 후, pH 7.8-8.0하에서 가수분해물들을 trypsin (EC 3.4.21.4)과 α-chymotrypsin (EC 3.4.21.1)을 이용하여 기질 대 효소비 250:1, 온도 35~40°C, 반응시간 2시간~3시간으로 소장 (intestinal digestion) 조건 하에서 2차 가수분해 시켰다.

2차 가수분해 후, 원심분리 (10,000×g, 15분, 4°C)하여 상층액 만 회수한 다음, 100 Da 이하 분자량 투과막을 장치한 전기투석장치 (electrodialyzer, Micro Acilyzer model G3, Asahi, Japan)를 이용하여 투석한 다음 동결 건조하여 위-소장 소화분해 시스템을 거친 가수분해물로 사용하였다.

시스템의 최적 조건은 전복 내장 유래 조효소의 최적 활성 검토와 동일한 방법에 준하여 다양한 반응시간, pH, 온도, 기질농도, 및 기질 대 효소비 등을 적용하여 최고 소화분해 활성을 나타내는 조건을 결정하였다.

(2) 해조류 가수분해물 및 유기용매 추출 획분 제조

(가) 전복 내장 단백질체 (proteome) 추출

전복 내장 단백질체 추출의 모든 과정은 4°C에서 실시되었으며, 전복 내장에 대하여 완충용액 (50 mM phosphate buffer containing 5 mM CaCl₂, pH 7.2)을 2배 가량 첨가하여 균질기로 12,000 rpm에서 2분 동안 2회 반복하여 균질화시켰다. 균질물을 cheese-cloth로 일차 필터한 후, 40°C 항온수조에서 3시간 동안 활성화시키고, 원심분리 (9,500×g)하여 얻어진 상층액에 약 80% 농도까지 황산암모늄을 첨가하여 2°C 냉장실에서 6시간 동안 방치하여 두고 침전물을 얻었다. 회수된 단백질에서 불용성 단백질 부분을 제거하기 위하여 동량의 증류수를 첨가하여 원심분리 (9,500×g, 10 min)하였다. 상층액을 100, 10, 1 kDa 한외여과막으로 분획 및 탈염한 다음, 1 kDa 이상 획분을 동결건조하여 사용 전까지 -80°C에 저장하였다.

(나) 전복 내장 단백질체 분석 및 동정

전복 내장 단백질체는 2-dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE)에 의한 단백질체 2차원 분석과 질량분석 (tandem mass spectroscopy analysis)을 통한 아미노산 서열 분석 및 MASCOT database에 의한 단백질 동정에 의해 분석 및 동정되었다. 즉, 육 및 내장의 단백질 패턴을 확인하기위해 균질화 된 육 내장 샘플을 초음파 분쇄기로 분쇄하여 lysis buffer를 처리한 후 원심분리 (4°C, 12,000 rpm, 30min)하여 2차 정제된 단백질 샘플을 확보한다. 해당 샘플은 IPGphor strip에 약 25~40 µg 들어갈 수 있게 정량되며 2D-clean up kit에 의해 탈염 및 정제되었다. 정제를 끝낸 단백질은 250 µl의 rehydration용액에 녹인 후, 원심분리한 상층액을 모아 pH 4~7 인 strip gel을 올린다. Strip gel이 건조되는 것을 방지하기 위하여 Dry strip cover 용액 150 µl를 가한 후, 1차 Isoelectric focusing을 진행한다. 2차 분자량 분리를 위

해 Isoelectric focusing을 끝낸 IPG sample strip은 polyacrylamide gel (12.5%)을 사용하여 실시하였다. 전기영동 조건은 60 V에서 4 hr, 150 V에서 4 hr, 300 V에서 2 hr ~ 4 hr으로 전압을 점차 올려주면서 진행하였다. 1, 2차 전기영동이 끝난 gel을 대상으로 coomassie staining을 실시하여 최종 단백질 spot을 확인하였으며, 각 spot들에 대해 in gel digestion, 질량분석 및 MASCOT 검색을 통해 전복 내장에 함유된 기능성 단백질체 (효소군)를 동정을 실시하였다.

(다) 전복내장 조효소 (abalone intestine crude enzyme, AICE) 활성 측정 및 최적조건 검토

① 해조류 부산물 기질에 대한 가수분해 (proteolysis & carbohydrolysis) 활성 측정

전복 내장 단백질체에는 당과 단백질 가수분해 효소들이 다량 포함되어 있으며, 이들 전복 내장 조효소 (AICE)를 이용하여 단백질 및 당 기질에 대한 가수분해도 (degree of hydrolysis: DH)를 측정하였다. 즉, 기질 1 g을 완충용액 100 ml에 분산시켜 1% 기질용액으로 하여 기질 대 효소비가 100: 1이 되도록 한 후 40℃에서 1시간 반응시켰다. 반응이 종료되면 원심분리 후 반응물 상층액 2 ml를 취하고 고속원심 분리된 상층액에 유리된 저분자 환원당을 DNS 환원당 측정법에 따라 측정하여 그 가수분해도를 계산하였다.

$$\text{가수분해도 DH \%} = \frac{\text{가수분해 후 저분자 환원당 함량}}{\text{총 다당류 함량}} \times 100$$

② 최적 활성 조건 검토 (optimal condition)

최적 pH 조건: 기질에 대한 가수분해 시, 최적 pH 조건은 0.1 M glycine-HCl buffer (pH 3.0-4.0), 0.1 M sodium acetate-acetic acid buffer (pH 5.0-6.0), 0.1 M disodium hydrogenphosphate-sodium dihydrogen phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0-9.0) 및 0.1 M sodium carbonate-sodium bicarbonate buffer (pH 10.0-12.0)를 각각 완충용액으로 하여 pH 효과를 검토하였다.

최적 온도: 해당 기질 가수분해도에 대한 최적 pH 조건하에서 온도를 30-70℃까지 변화시키면서 이들의 최적 온도조건을 검토하였다.

최적 기질농도: 최적 pH 및 온도 조건하에서 기질농도를 0.2-3%까지 변화시키면서 가수분해에 대한 최적의 기질농도 효과를 검토하였다.

최적 기질 대 효소비: 최적 pH, 온도 및 기질농도 조건하에서 기질 대 효소비를 변화시키면서 그 가수분해도를 검토하였다.

반응시간에 대한 효과: 최적 pH, 온도, 기질 농도 및 기질 대 효소비 조건하에서 반응시간을 1, 4, 8, 12 및 24시간 동안 반응시킨 후 그들의 가수분해도를 검토하였다.

(라) 유기용매 추출물 제조

해조류 효소 가수분해물 제조 후, 남은 침전물에 포함되어 있는 소수성 기능성 물질을 추출하기 위하여 70% 에탄올 (EtOH)을 처리하였다. 즉, 고형물:EtOH = 1:9 로 처리 후, 3일간 40°C에서 서서히 교반하여 처리한 다음 상층액을 취하여 염석, 진공농축 및 건조과정을 통해 해조류 EtOH 추출물 파우더를 확보하였다.

다. 한외여과막시스템을 활용한 저분자 가수분해물의 분자량별 분획

체내 항상성을 유지하는 다양한 효소 및 조절인자 등은 다양한 분자들과의 상호작용에 따라 생리활성을 도출하며, 이러한 상호작용을 결정하는 주요 요인 중에서 반응물질의 분자량 및 크기가 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 따라서 전복 및 해조류 유래 가수분해물들을 대상으로 한외여과막 장치 (ultrafiltration membrane system)를 이용하여 분자량 한계 (molecular weight cut-off : MWCO) 범위가 각각 100, 10, 5, 1 kDa인 막을 차례로 통과시켜 분자량별로 분획하여 다양한 분자량 범위의 저분자 고흡수 활성획분을 확보하였다.

4. 전복 및 해조류 유래 저분자 생리활성 소재 면역세포 내 효능 검토

가. 지질 과산화억제를 통한 항산화활성 검토 (Ferric thiocyanate method)

유지의 자동산화에 의해 형성된 과산화물이 ferrous thiocyanate를 ferric thiocyanate로 산화시키는 정도를 비색법으로 측정하는 것으로, linoleic acid model system은 TBA 법에 의한 측정에서 사용한 방법과 동일하게 사용하였다. 즉, 40°C에서 보관한 반응혼합물 100 µl에 75% ethanol 4.7 ml, 30% ammonium thiocyanate 0.1 mM, 3.5% HCl에 녹인 20 mM ferrous chloride 용액 0.1 ml을 넣고 혼합한 후, 실온에서 3분간 반응시켜 발색정도를 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. FTC 결과는 24시간 간격으로 7일 동안 측정하였으며 시료 대신 증류수를 넣은 대조구와 비교하여 나타내었으며 Vit. C와 α-tocopherol을 양성 대조구로 하여 시료의 항산화활성을 비교하였다.

나. 활성산소종 라디칼 억제 활성 검토 (Reactive Oxygen Species radical scavenging activity)

체내에서 대사과정 및 스트레스, 흡연 등의 외부요인으로 주로 발생하는 자유라디칼들은 높은 반응성에 기인하여 생체 내 단백질, 지질, 유전자 등을 공격함으로써 노화, 면역질환, 암 및 주요 퇴행성 질병 등을 야기시킨다. 체내 발생하는 주요 라디칼 활성산소종 (Radical Reactive Oxygen Species)인 슈퍼옥사이드 라디칼 (Superoxide radical), 하이드록시 라디칼 (Hydroxyl radical), 퍼옥시 라디칼 (Peroxy radical)에 대한 억제효능을 전자스핀공명 분광광도계(electron

spin resonance spectroscopy)를 이용하여 측정하였으며 [Fig. 11], 각 라디칼 소거능에 대한 방법과 활성농도 백분율의 계산은 다음과 같다.

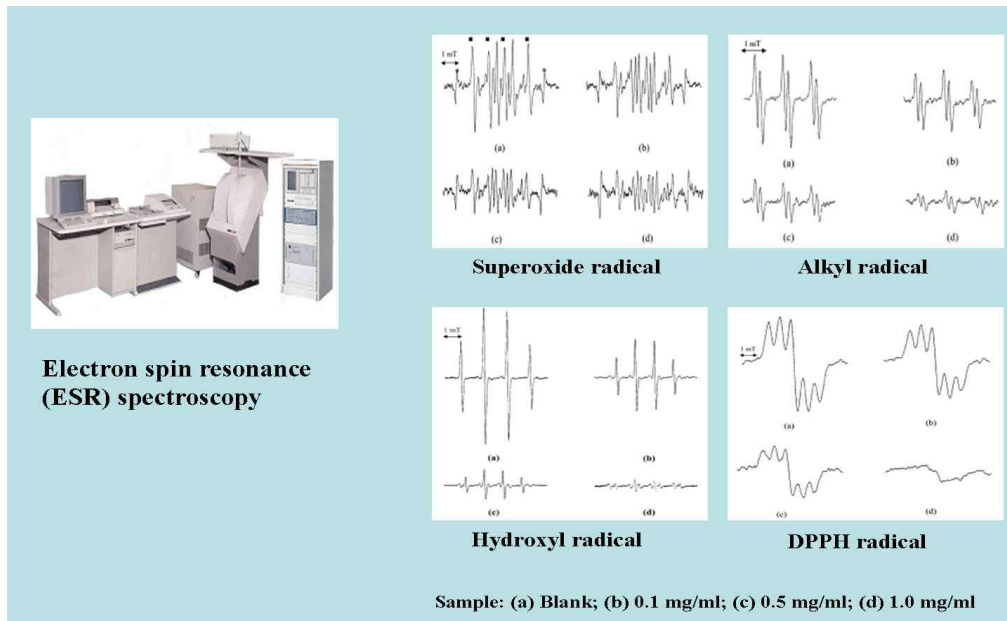


Fig. 11. ESR spectroscopy를 활용한 라디칼 소거활성 측정

DPPH 라디칼(radical) 소거활성은 Nanjo 등 (1996)의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 60 uM DPPH 에탄올 용액 60 μ l 와 60 μ l 가수분해물 용액을 혼합한 후, 혼합한 용액을 quartz capillary tube에 옮긴 후 2분 후에 전자스핀공명 분광광도계(electron spin resonance spectroscopy)로 측정하였다. 스펙트럼은 전기장 (field): 336.5 ± 5 mT, 파워 (power): 5 mW, 진폭(amplitude): 1×1000 , 변조너비 (modulation width): 0.8 mT, 일소너비 (sweep width): 10 mT, 일소시간 (sweep time: 30s)의 조건으로 기록하였다. 아래의 식을 이용하여 DPPH 라디칼 소거능력을 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거능력, % =

$$[100 - (\text{샘플처리시 전자스핀공명시그널 면적} / \text{샘플무처리시 전자스핀공명시그널 면적})] \times 100$$

슈퍼옥사이드 라디칼 (Superoxide radical) 소거능력은 Guo 등 (1999)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 0.3 mM 리보플라빈 (riboflavin) 20 μ l, 5.0 mM EDTA 20 μ l, 0.1 M DMPO 20 μ l 와 가수분해물 용액 20 μ l 혼합한 후, 365 nm의 UV 램프로 1분간 쬐이고, 쬐인 용액을 석영모세관 (quartz capillary tube)에 옮긴 후, 2분 후에 전자스핀공명 분광광도계 (electron spin resonance spectroscopy)로 측정하였다. 스펙트럼은 field: 336.5 ± 5 mT, power: 10 mW, amplitude: 1×1000 , scan width: 10 mT, sweep time: 30s의 조건으로 기록하였다. 아래의 식을 이용하여 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능력 (superoxide radical scavenging activity)를 계산하

였다.

슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, % =

$$[100 - (\text{샘플처리시 전자스핀공명시그널 면적} / \text{샘플무처리시 전자스핀공명시그널 면적})] \times 100$$

과산화수소 라디칼 (Hydroxyl radical) 소거활성은 Rosen (1984)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 가수분해물 용액 0.2 ml에 0.3M 5,5-디메틸-1-피롤린 N-옥사이드 0.2 ml (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide; DMPO) 0.2ml 10 mM 황산철(FeSO₄)를 0.2 ml, 10 mM H₂O₂ 0.2 ml 혼합한 다음 실온에서 2.5분 방치한 후에 quartz capillary tube에 옮겨 전자스핀 공명 분광광도계(electron spin resonance spectroscopy) 로 측정하였다. 스펙트럼은 field: 336.5 ± 5 mT, power: 1 mW, amplitude: 1 × 200, modulation width: 0.1 mT. sweep width: 10 mT, sweep time: 30s의 조건으로 기록하였다. 아래의 식을 이용하여 과산화수소라디칼의 소거능 (hydroxyl radical scavenging activity)를 계산하였다.

과산화수소 라디칼 소거능 =

$$[100 - (\text{샘플처리시 전자스핀공명시그널 면적} / \text{샘플무처리시 전자스핀공명시그널 면적})] \times 100$$

퍼옥시 라디칼 (peroxyl radical) 소거능은 Hiramoto 등 (1993)의 방법에 따라 측정되었다. 즉, 20 µl의 40 mM 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)를 20 µl의 phosphate buffered-saline (PBS)에 녹인 후, 20 µl의 40 mM α-(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron (4-POBN)와 20 µl 농도별 가수분해 용액을 가하였다. 37 °C에서 30 분간 배양한 후 즉시 quartz capillary tube에 옮겨 전자스핀공명 분광광도계 (electron spin resonance spectroscopy) 로 측정하였다. ESR 스펙트럼은 modulation frequency, 100 kHz; microwave power, 10 mW; microwave frequency, 9441 MHz; magnetic field, 336.5 ± 5 mT and sweep time, 30 s의 조건에서 기록되었다. 아래의 식을 이용하여 퍼옥시라디칼의 소거능 (peroxyl radical scavenging activity)를 계산하였다.

퍼옥시 라디칼 소거능 =

$$[100 - (\text{샘플처리시 전자스핀공명시그널 면적} / \text{샘플무처리시 전자스핀공명시그널 면적})] \times 100$$

다. 면역세포 내 라디칼 소거 및 세포보호 효능

체내 면역시스템을 구성하는 대식세포 (macrophage)의 일종인 mouse 조직에서 유래한 RAW 264.7 세포주를 대상으로 항염증활성 등 주요 면역활성을 측정하기위해 macrophage 세포수를 측정하여 petri dish에 옮긴 후 10% FBS가 포함된 RPMI1640 배지를 가하여 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 해당 세포에 인위적으로 H₂O₂를 처리하여 세포 내 활성산소 농도를

과량으로 유도한 다음, 샘플을 농도별로 처리하여 세포 내 발생된 자유라디칼의 농도를 DCFH-DA 시약을 활용하여 측정하였다. 즉, 세포 내 라디칼 소거능력은 산화 민감 시약인 Oxidation-sensitive dye 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)을 활용한 Engelmann 등 (2005)의 방법에 따라 측정하였다 [Fig. 12]. 즉 96-well plate에서 배양된 RAW 264.7 세포를 암실에서 30 분 동안 20 μ M DCFH-DA (HBSS, Hanks balanced salt solution 용매)와 반응시켰다. 다양한 농도의 샘플을 처리한 후 1시간 동안 배양하고 PBS로 3회 세척한 다음 500 μ M H_2O_2 를 가하였다. H_2O_2 처리에 따라 유도된 세포 내 라디칼에 의해 산화된 DCFH의 산화물인 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)의 흡수 형광 시그널 강도를 GENios fluorescence microplate reader (TECAN, Männedorf, Switzerland)로 해당 파장조건 (λ excitation = 485 nm, λ emission = 528 nm)에서 측정하였다. 이후 MTT assay 방법에 따라 세포생존을 측정을 위해 각 well의 세포는 중화되었다.

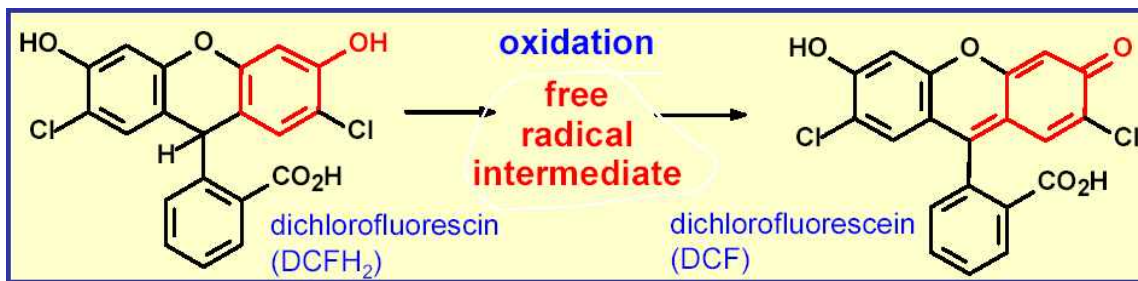


Fig. 12. 세포 내 활성 라디칼 소거능력 측정 시약 및 반응 원리
(Oxidation-sensitive dye 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)

세포 내 H_2O_2 에 의해 유도된 라디칼 독성에 대한 소화가수분해물의 세포보호 효과를 평가하기 위해 Hansen 등 (1989)에 의한 방법에 따라 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 통해 세포 생존율을 측정하였다. 세포 내 라디칼 소거활성 측정을 위해 소화가수분해물과 H_2O_2 이 처리된 세포를 대상으로 100 μ l MTT (1 mg/ml)를 가한 다음 4 시간 동안 배양한 후 DMSO (150 μ l)를 처리하여 생성된 formazan 염을 녹인다. 이후 540 nm 파장에서 측정하여 세포생존율을 측정하였다.

라. AID의 대식세포 내 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 보호효과 검토

Milne 등 (1993)의 방법을 변형하여 DNA Oxidation 보호효과를 측정하였다. RAW 264.7 cell의 DNA 5 μ l에 샘플을 농도별 100, 500 과 1000 μ g/ml 각각 5 μ l씩 추가한다. 100 μ M $FeSO_4$ 14 μ l와 100 μ M H_2O_2 를 첨가하고 vortex한 후 30분간 반응을 시킨다. 130 mM EDTA 5 μ l를 추가한 후 Total양에서 20 μ l와 DNA loding buffer 4 μ l를 혼합하여 agarose 겔에서 30분간 100 V 전기 영동한다. Agarose gel은 EtBr (ethidium bromide)에 30분간 염색시킨다. 보통 Fenton 반응에서 hydroxy radical에 노출된 DNA는 깨지는데 그 효과를 AlphaEase[®] gel

image analysis soft (Alpha Innotech, CA, USA)로 겔을 확인한다.

마. 면역세포 내 주요 염증 관련 인자에 대한 억제효능 검토

전복 및 해조류 가수분해물들이 가지는 면역활성 효능을 규명하기 위해 RAW 264.7 cell을 배양하여 염증유발인자인 LPS (lipopolysaccharide)를 처리하였다. 샘플을 농도별로 처리한 다음 이들 인자들에 대한 영향을 분자세포수준에서 확인하기 위하여 주요 면역조절인자인 NO (nitric oxide) 및 iNOS (inducible nitric oxide synthase)에 대한 발현 및 활성 정도를 평가하기 위해 RT-PCR과 western blotting을 수행하였다.

(1) NO 및 iNOS 저해 효능 검토를 통한 우수 면역활성 획득 선별

대식세포의 기능에는 비특이적 식작용 및 세포흡수작용, Fc 수용체 및 보체 수용체에 의해서 증가되는 opsonin작용을 받은 미생물에 대한 특이적 식작용, 섭취된 미생물의 살해, T 및 B 림프구에 대한 항원의 출현, lysozyme, collagenase, elastase, acid hydrolase 등의 많은 효소, 몇 개의 보체성분 및 응고인자, prostaglandin, leukotriene 및 몇 개의 조절분자 (interferon, interleukin-1)를 포함한 여러 가지 산물의 분비 등이 있다. 또 대식세포는 iNOS 및 다양한 cytokines와 매개하여 면역 활성화에 관여하며, lymphokine의 일종인 interferon γ (대식세포 활성화인자)에 의해 활성화된다. 우리 대식세포에는 폐포 대식세포, 복막 대식세포, 과립 대식세포, 림프 등의 조직 대식세포가 있으며 결합 대식세포에는 간의 성세포 (Kupffer's cell), 림프조직 결합성 대식세포, 기타의 조직결합성 대식세포가 있다. NO는 내피세포에서 발생하는 가장 중요한 물질로서 각광을 받고 있다. Nitric oxide (NO)는 혈압조절, 신경전달, 혈소판 응집억제, 면역기능 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NO를 생성하는 효소인 NO synthase (NOS)는 arginine의 guanidino nitrogen을 산화시켜 citrulline과 NO를 생성하게 된다. NOS는 endothelial (ecNOS, type III NOS), neuronal NOS (ncNOS, type I NOS) 및 inducible NOS (iNOS, type II)로 크게 나뉘는데, ecNOS와 ncNOS가 constitutive form으로 적은 기저 생성물을 가지고 있고, calcium/calmodulin에 의존적이다. 반면에 iNOS는 inducible form으로 자극에 의해 많은 양의 NO를 생성하고, calcium에 비의존적이다. iNOS는 대식세포 외에도 췌장베타세포, 내피세포, 혈관평활근세포, mesangial cell등에도 분포하고 있다. iNOS는 평상시 세포에서는 활성 및 발현이 거의 없으나, LPS, IFN- γ , IL-1과 TNF- α 등의 자극에 의해 활성화되어 장시간동안 다량의 NO를 생성하여 병원균을 죽이거나 세포 독성을 나타낼 수 있다. 그러나 NO가 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다.

전복 및 해조류 샘플들이 가지는 면역활성 효능을 규명하기 위해 RAW 264.7 cell을 배양하여 염증유발인자인 LPS (lipopolysaccharide)를 처리하였다. 샘플을 농도별로 처리한 다음 이들 인자들에 대한 영향을 분자세포수준에서 확인하기 위하여 주요 면역조절인자인 NO (nitric oxide) 및 iNOS (inducible nitric oxide synthase)에 대한 발현 및 활성 정도를 평가하기 위해

RT-PCR과 western blotting을 수행하였다.

(2) iNOS (inducible NO synthase)발현 저해활성

NO 생성 효소인 inducible NO synthase (iNOS) 발현 저해활성을 western blot 방법과 RT-PCR 방법을 Jung 등 (2009)의 방법을 변형하여 단백질 및 유전자 레벨에서 저해활성을 검토하였다.

Western blot는 세포에 샘플을 24 시간동안 처치한 후 cell lysate를 laemmli sample buffer 로 3분간 끓이고 30 µg protein을 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)에 loading하여 iNOS의 발현정도를 분석한다. SDS-PAGE 후 protein을 polyvinylidene difluoride membranes에 transfer하고, 30분간 PBS containing 0.1% tween 20 (PBS-T) and 5% (w/v) dry skim milk powder로 30분간 blocking한다. Primary antibody로는 anti-SOD 및 anti-GSH (Santa Cruz Biotechnologies, Inc.) 등의 polyclonal 또는 monoclonal antibody를 사용하며, secondary antibody로는 HRP-conjugated-anti-rabbit 또는 anti-mouse antibody를 사용한다. Immunoreactive한 단백질은ECL Plus Western blotting analysis system (Amersham)으로 발색하여 Autoradiography film에 노출시켜 검출한다. RT-PCR 분석은 LPS에 발현된 iNOS mRNA 발현을 분석한다. 분석 시 내부 control 물질로써 GAPDH을 사용하며 해당 RNA는 Trizol reagent로 extraction하한다. 2 µg total RNA는 AMV reverse transcriptase에 의해 cDNA로 역전사된다. 각 PCR 수행 시 사용되는 oligonucleotide, 즉 primer를 예를들면, human iNOS mRNA의 PCR을 위한 primer로써는 5' -TTTGCCACGGACGAGACGGAT-3' (forward primer), 5' -GCCACTGACACTTCGCACAAA-3' (reverse primer)가 사용되며 human GAPDH 5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (forward primer) 및 5' -TCCACCACCCTGTTGCTTGTA-3' (reverse primers)가 있다.

5. 우수 활성물질의 분리 정제

가. 항염증 및 항알러지 우수 획분으로부터 활성물질 분리

면역활성에 대한 가장 우수한 활성을 보유한 획분을 대상으로 활성물질 (oligopeptide)을 분리 정제하였다. Fig. 13에서 나타난 것과 같이, 연속적 액체크로마토그래피와 미세질량분석 장비, 즉 FPLC를 응용한 음이온교환 분리 단계, ODS, GPC 컬럼을 사용한 HPLC/Recycling HPLC 단계, nano-LC/ESI-Q-TOF를 사용한 활성 펩타이드 Sequence 확인 과정을 거쳤다.

최종 분리 정제된 활성물질은 ESI-QTOF를 이용한 de nove 서열결정을 통해 최종 구조분석을 실시하였다.

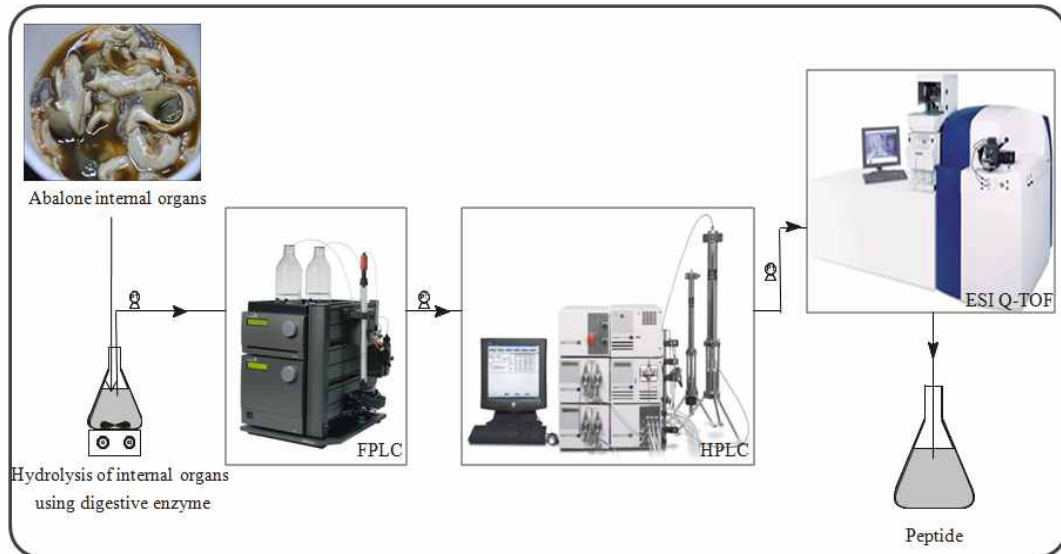


Fig. 13. 전복 가수분해물의 분리 정제 전 과정

6. 면역조절 세포 (대식세포 및 비만세포) 내 분자세포수준 항염증 및 항알러지 약리활성 및 기전 규명

가. 대식세포 내 cytokine 등 면역조절인자 및 주요 면역활성 pathway 규명

(1) Cytokine (IL-6, IL-1 β 와 TNF- α)변화 검토 및 MARK pathway 경유 면역조절기전 검토

IL-6, IL-1 β 와 TNF- α 등 Cytokine 변화를 측정하였다. 일반적으로 염증반응은 우리 몸의 여러 기능을 조절하며 최근에는 암, 당뇨 등 많은 질환에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 염증반응을 조절하는 중요한 인자는 cytokine들로 알려져 있다.

이들 사이토카인들은 여러 면역세포들에서 발현되며 우리 몸의 중요한 기능을 조절하는 중요한 단백질들이며 이들 중 IL-1은 가장 먼저 밝혀진 염증 사이토카인으로 가장 중요한 염증조절 인자다. IL-1은 활성화된 단핵식균세포, 상피세포 (epithelial cells), 혈관내피세포 (endothelial cell)등에 의해 만들어져 염증반응을 매개하는 cytokine이다. IL-6는 주로 대식세포나 T-임파구, 섬유모세포 등에서 분비되는 전구염증성 cytokine으로 B-임파구에서 면역글로블린의 생성을 유도하고, T-임파구의 증식과 세포독성 T-세포로 분화시키는 역할을 한다. 뿐만 아니라 감염에 대한 급성 반응에 관여하는 주된 cytokine 중 한 가지이다. 감염 및 전신적 염증과 관련된 생리학적 반응의 심한 정도와 밀접하게 관련되어있는 IL-6는 패혈증 환자에서 1000배 이상 증가된다.

TNF- α 는 그람음성세균 감염에 의해서 만들어지는데, 세균의 세포막에 있는 내독소 (bacterial endotoxin)인 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 활성화된 림프구에 의해서 만들어진 다. LPS의 양이 적은 경우는 TNF- α 가 적은 양 생성되어, 백혈구나 혈관세포에 작용하여 국소

적인 염증반응이 나타나 항원이 제거된다. 낮은 양의 TNF- α 는 염증반응에서 백혈구들이 혈관 내피세포에 부착하는 것을 촉진하며, 염증세포들의 미생물 살해능력을 증가시키며, mononuclear phagocytes에 작용하여 여러 가지 염증반응에 관여하는 cytokine을 생산하게 만들어 염증반응을 촉진한다.

세포내 신호 전달에 중요한 작용을 갖는 것으로 알려진 MAPK는 ERK, p38, JNK 등의 세 가지 그룹으로 분류된다. 일반적으로 ERK는 integrin 세포 성장 수용체, 이온 채널, 타이로신 수용체들의 활성을 통해서 영향을 받는 것으로 알려져 있다. ERK는 MAPK 중에서 다양한 수용체들에 의해서 활성을 나타내 세포 자극 물질들에 따라 여러 가지 전사 조절인자들을 활성화시켜 세포 성장, 분화 등에 관련된 유전자 발현을 유도하는 것으로 보고되고 있다. p38 MAPK는 UV, 사이토카인들, 성장 인자 등 여러 가지 물질들에 의해서 활성화되어 세포사멸 (apoptosis), 사이토카인 생성 등에 영향을 주는 유전자 발현을 유도하는 것으로 보고되고 있다. JNK는 UV, 성장인자, 사이토카인, GPCR 길항제 등에 의해서 활성을 갖게 된다. 세포내 활성화된 JNK는 세포성장, 분화, 사멸, 생존에 관여하는 유전자 발현을 유도하는 것으로 보고되어 있다. 대표적인 JNK는 p38 MAPK과 유사한 신호 전달에 의해서 세포내 유전자 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다.

Heo 등 (2010)의 방법을 변형하여 활성물질이 세포에서 IL-6, IL-1 β 와 TNF- α 등 Cytokine 함량에 대한 영향을 측정된 결과이다. 세포를 24-well plate로 104 세포 밀도로 2 일 동안 배양한 후, 배지를 10% FBS를 함유한 DMEM으로 대체하였다. 이어서, 세포를 상이한 농도의 AID으로 1 시간 동안 예비처리하고 LPS로 처리하였다. 24 시간 후, 배양 배지 중의 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 함량을 효소 면역분석 키트 (Amersham Biosciences, Sweden)를 이용하여 측정하였다. 또한 활성소재의 ERK/p-ERK, p38/pp38, JNK/pJNK 에 대한 영향은 Western blot방법으로 확인하였다.

나. 비만세포주를 활용한 항 히스타민, IgE 레벨 측정 등 항알러지 효능 측정

(1) 인간 비만세포주 (HMC-1) 내 세포독성 (생존률) 조사

샘플 처리 후 비만세포 (HMC-1)에 대한 시료의 농도 의존적 세포독성을 상기 설명한 방법을 통해 확인하였다.

(2) 히스타민 분비억제 효능

히스타민은 비만세포 및 호염기세포로부터 유리되는 화학매개체로 알레르기 질환에서 매우 중요한 역할을 한다. IgE가 감작된 후 항원에 의해 자극을 받거나 비특이적으로 자극 시, 히스타민을 포함하는 여러 가지 화학매개체가 비만세포 및 호염기세포에서 유리되며 특히 히스타

민에 의해서 혈관확장과 혈장성분의 삼출이 일어나고, 또한 구심성 신경이 자극되어 기도의 평활근이 수축되면 점액분비가 항진되어 기관지천식, 알레르기성 비염, 결막염 등을 일으키고, 피부 말초혈관의 확장 등으로 두드러기, 아토피성 피부염 등의 증상을 일으킨다.

HNC-1 세포주를 샘플로 전처리를 한 후 비만세포 자극제로 알려진 PMA+A23187로 자극하여 HPLC를 이용하여 비만세포에서 분비되는 히스타민량을 측정하였다.

(3) 사이토카인 분비억제 효능

알러지 반응의 개념인 알러지성 염증반응은 히스타민이나 류코트리엔 과 같은 화학매체의 작용만으로는 설명하기 어렵다. 이전 많은 연구 결과에서 만성염증성 반응이 알러지 반응에서 공통적으로 발견 되었고, 특히 6 시간 전후에 나타나는 후기 반응의 기전이 염증반응으로 이해 되기 때문에 비만세포로부터 유리되는 화학매체외에 염증성 사이토카인인 종양괴사인자 알파 (TNF-a), 인터루킨-1 (IL-1)과 인터루킨-6 (IL-6)이 이러한 알레르기성 염증반응의 유도에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

따라서, 먼저 사이토카인의 유전자 발현 수준에서 샘플의 사이토카인 발현 억제 효능을 조사하였다. 다음 실험으로는 실제적으로 단백질 수준에서 사이토카인의 분비를 억제하는지를 연구하였다. 먼저 TNF-a 와 IL-6의 분비 억제효능을 조사하였다.

(4) 항알러지 효능 기전 연구

MAPK 기전은 세포 면역반응의 염증성 인자들의 조절에 매우 중요한 역할을 한다. 이전의 많은 연구에서, PMA+A23187은 HMC-1 세포주에서 MAPK의 세가지 타입인 p38, JNK, 그리고 ERK를 활성화 시킨다고 알려져 있다. 본 연구에서, 샘플의 항알러지 효능의 기전을 밝히기 위하여 MAPK의 인산화 유무를 western blotting analysis를 하였다.

다음은, 샘플의 TNF-a 와 IL-6와 같은 염증성 사이토카인의 생성 억제 효능 기전을 알아보기 위하여 핵 전사인자인 NF-kB의 활성화를 알아보았다. TNF-a와 IL-6 생성은 전사인자인 NF-kB의 활성화에 의존한다. NF-kB의 활성화는 억제단백질인 IκB-a의 인산화와 단백질 분해가 선행되어 이루어진다. PMA+A23187에 의해서 자극된 비만세포주에서 NF-kB의 활성화에 대한 샘플 처리에 의한 농도 의존적 효능을 확인하고자 하였다.

7. 아토피 동물모델을 이용한 전임상 효능 연구

대식세포에서의 항염증 효능과 비만세포에서의 항알러지 효능을 확인한 후, 이를 근거로 실질적으로 아토피피부염에 대한 염증 억제효과를 확인하기 위해서 아토피피부염 모델인 NC/Nga mice를 이용한 동물모델 실험을 진행하여 그 효과를 확인 하였다.

NC/Nga 마우스는 1957년에 일본의 애완 쥐에서 동종 교배종으로 확립되었고, 보통의 환경

(conventional circumstance) 에서 사육시에 특별한 항원 접촉 없이도 아토피피부염과 유사한 피부 병변이 발생하며 혈청 IgE의 생성도 증가됨이 보고되었다 (Matsuda et al., 1996; Watanabe et al., 2002). 그러나 NC/Nga 마우스는 무균 환경(specific-pathogen-free, SPF)에서는 자연적인 피부 병변이 발생하지 않는다 (Matsuda et al., 1996). 또한 BALB/c 마우스 등 다른 종의 쥐에서는 NC/Nga 마우스와 같이 사육해도 피부 병변이 발생하지 않는 것으로 미루어 피부 병변의 발생에 유전적인 소인이 관여함을 알 수 있다.

아토피 피부염을 치료하기 위하여, 종래 세라마이드, 리놀레산, 식물유 또는 광물성 오일 등의 성분들, 하이드로코티손 (hydrocortisone) 등의 스테로이드 (steroid) 제제 또는 이들에 항균 및 항염 기능을 강화한 물질, 자외선 요법을 통한 DNA 합성 억제제, 세포 과증식 억제제, 염증 및 가려움증 억제제 등이 제안된 바 있다. 그러나, 상기 스테로이드 제제는 표피의 성장억제나 부작용 등의 역효과를 유발할 수 있으며, 우레아 퍼록사이드 등은 피부의 과다 자극을 야기할 수 있고, 항히스타민제 등의 항생물질은 균의 내성 및 광과민 등의 부작용을 유발할 가능성이 높은 문제점이 있다. 이에 최근에는 아토피 피부염에 효과를 갖는 천연물질을 탐색하는데 초점을 맞추고 있다.

가. 실험동물

실험에 사용된 동물은 수컷 4주령의 NC/Nga mouse로 중앙실험동물(주)(Seoul, Korea)로부터 구입하여 12-h light/12-h dark cycle, 22±2°C의 온도, 50±10%의 습도로 유지되는 동물실에서 사육되어졌다. 마우스들은 동물실험실의 SPF 환경 하에서 일주일동안 적응한 후 실험에 사용하였다.

나. 실험재료

아토피 유도에 사용한 시약으로는 Dermatophagoides farinae crude extract (mite antigen, lyophilized)를 진드기 항원으로 제조된 것으로 진드기 항원에 0.5% tween 20이 포함된 ointment base로 제작된 것을 사용하였다 (Biostar Hiroshima, Japan). IgE ELISA kit는 BDbioscience사 (CA, USA) 에서 구입하였다.

다. 아토피 유도

생쥐는 케타민:럼폰:PBS를 2 : 2 : 7 로 희석한 마취제로 마취하고 귀와 등쪽 목 부위를 깨끗하게 제모제로 제모한 후, 100 mg의 Biostar-AD 연고를 균일하게 도포한다. 두 번째 처리부터는 마취한 후, 150uL의 4% SDS를 분무하고 완전히 건조시킨 뒤 100 mg의 Biostar-AD연고를 균일하게 도포한다. Biostar-AD연고 도포는 주 2회로 3주간 총 6회 실시하였다. 아토피 유발완화 효과를 확인하기 위한 샘플 50 mg/Kg/day, 1 mg/Kg/day로 AD연고 도포하기 일주일 전부터인 5주부터 9주까지 매일 경구투여 하였다.



Fig. 14. 아토피 유도 동물모델 NC/Nga mouse

라. 피부 병변 평가

실험쥐에 나타난 피부 병변의 정도 측정은 기존에 보고된 SCORAD (Scoring of Atopic Dermatitis) score를 변형한 modified SCORAD score를 이용하여 매주 측정하였다. SCORAD score는 아토피피부염의 임상적인 경과를 평가하기 위하여 현재까지 개발된 등급 체계 중에서 가장 객관적이고 널리 사용되는 임상평가의 방법이다. Modified SCORAD score는 홍반/출혈 (erythema/hemorrhage), 부종(edema), 인설/건조(scaling/dryness), 찰과상/미란 (excoriation/erosion)의 총 4가지 항목에 대해 관찰자가 육안적으로 관찰하여 등급을 매기는 방법으로, 각 항목 별로 0 (변화 없음), 1 (약한 변화), 2 (중등도 변화), 3 (심한 변화)로 판정한다. 각 항목별 점수의 총합을 최종 등급으로 정하며, 최소는 0에서 최대 12까지이다.

마. 긁는 횟수 측정

9주까지 실험한 NC/Nga 마우스를 희생시키기 하루 전날, 아토피 피부의 증상인 가려움증을 확인하기 위해 마우스가 긁는 횟수를 세었다. 마우스 케이지에 한 마리씩 넣고 환경변화에 적응시킨 후, 10분 동안 귀와 등을 긁는 횟수를 관찰하였다.

바. 혈액 채혈 및 immunoglobulin E, histamine 측정

9주에 복강내 대정맥을 절단하여 채혈하고 7,000rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 얻어지는 혈청을 -70°C 에 냉동 보관하였다. 혈청 내의 IgE의 농도는 ELISA kit (BD science, USA), histamine은 histamine ELISA kit(Cayman, USA)을 사용하여 측정하였다. 흡광도는 microplate reader(EL800®, BIO-TEK Instruments, Winoosik, VT, USA)를 사용하여 측정하였다.

사. 피부조직에서 TARC, MDC, RANTES, IL-4, Eotaxin, TSLP 발현 RT-PCR 측정

(1) 등조직에서 RNA 분리

마우스의 등으로부터 피부를 적출하여 각각 Trizol 1 mL를 넣고 homogenizer로 분쇄하였

다. 이 혼합액에 chloroform 200 uL를 첨가한 후 15초 동안 다시 혼합하였다. 이를 실온에서 3분 반응 후 4°C, 13,000 rpm에서 10분 원심분리하고 약 400 uL의 상층액을 회수하였다. 여기에 동량의 isopropyl alcohol를 혼합 후 실온에서 10분 반응시킨 후, 다시 4°C, 13,000 rpm에서 10분 원심분리 하였다. 얻어진 pellet을 75% EtOH로 수세하고 실온에서 건조하여 RNA를 얻었다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC) water를 처리하여 cDNA 합성에 사용하였다.

(2) 역전사중합효소 연쇄반응

역전사반응은 total RNA 2 ug을 1 uL oligo dT (10 pmole)과 함께 70°C heating block에서 5분 동안 변성시킨 후, 얼음에서 2분 식힌다. 여기에 5 uL dNTP (10 mM dNTP mix), 1 uL MMLV (200 u/uL), 0.5 uL RNase inhibitor (40u/uL), 5 uL 5× RT buffer (250 mM Tris-HCl (pH8.3), 375 mM KCL, 15 mM MgCl₂)를 가한 후 DEPC water로 최종 부피가 25 uL 가 되게 하였다. 이 혼합액을 42°C heat block에 1시간 반응시킨 후, 70°C heat block에서 10분 반응시켜 불활성화 하였다.

(3) RT-PCR

합성이 완료된 1 uL cDNA를 PCR premix (Bioneer, Korea) 에 넣고 증류수로 20 uL 최종 볼륨을 맞추어 PCR합성 하였다. PCR 기계는 Applied Biosystems 2720 thermal cycler (Applied Biosystems, USA)을 사용하였으며 반응조건으로는 predenaturation은 94°C 5분, denaturation 은 94°C 30초, annealing은 57°C 30초, extention은 72°C 1분으로 30cycle로 수행 하였다. 사용한 primer sequence로는 다음과 같다. TARC (forward) 5'-CAG GAA GTT GGT GAG CTG GTA TA-3' (reverse) 5'-TTG TGT TCG CCT GTA GTG CAT A-3', MDC (forward) 5'-TCT GAT GCA GGT CCC TAT GGT-3' (reverse) 5'-TTA TGG AGT AGC TTC TTC AC-3', RANTES (forward) 5'-ATC ATC CTC ACT GCA GCC GC-3' (reverse) 5'-CAC ACT TGG CGG TTC CTT CG-3', IL-4 (forward) 5'-TCA TCG GCA TTT TGA ACG AGG T-3' (reverse) 5'-GCA TCG AAA AGC CCG AAA GAG-3, Eotaxin (forward) 5'-CCA AGG ACT TGG CTT CAT GTA G-3' (reverse) 5'-ATT CTG GCT TGG CAT GGT AGC-3', TSLP (forward) 5'-CTG TAC TGT TAA TGA CCA GC-3' (reverse) 5'-TCG TAG ATG TGC AAG GCT CT-3' ACTIN (forward) 5'-TTG GCA ATG AGC GGT TCC-3' (reverse) 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC-3'

(4) 조직 검사 분석

마우스의 등 조직을 적출하여 10% paraform-aldehyde에서 24시간 동안 고정한 후, 파라핀으로 포매 하였고, 5 um 두께로 section하였다. 자른 조직들은 hematoxylin 과 eosin solution으로 염색하였다. 피부표피에서 피부 지방층까지의 mast cell 은 toluidine solution으로 염색하

여 counting하였다. 조직학적 변화와 세포관찰은 Nonzoomer digital pathology(Hamamatsu, Japan)로 확인하였다.

8. 생산수율과 경제성 검토

소화가수분해 최적조건 등 Lab scale 생산표준화 공정에서 확보한 자료를 근거로 대용량 (3 ton) 추출, 농축, 분자량 분획 및 건조 Pilot 장비를 활용하여 시제품을 생산한 후 제조원가 및 경제성분석을 실시한다. 확립된 저분자 가공기술법과 추출, 분리정제 공정을 연계하여, 원료에서 부터 가공에 이르기까지 가장 합리적인 생산 공정을 검토하고, 저 비용 고 효율적 생산설비를 구성하기 위한 체계적인 data를 검증한다. 그리고 전복 및 해조류 등 원료수급에 대한 단가를 산정하고 경제성 평가를 한다. 아울러 현재 시판되고 있는 항알러지 및 면역활성 제품과 약리 효능 평가를 실시하여 생산단가 대비 가격 경쟁력이 가장 높은 제품을 출시한다.

9. 응용제품의 개발 및 평가

항염증과 알러지 개선 및 억제에 대한 우수한 효능을 보이는 천연 저분자 펩타이드를 함유한 전복 내장 유래 가수분해물을 대상 소재로 최종 선정하여 이를 함유한 응용 시제품 개발을 실시한다.

전복 및 해조류 유래 천연물로써 체내 독성이 없으며, 또한 면역작용 과정에서 세포 및 전임상 수준의 약리효능과 이화학적 구조분석이 규명된 천연 소재로써 면역활성 개선 및 면역질환 예방 활성을 함유한 기능성 식품과 피부 질환 개선 및 예방 조성물로 적용 가능하다.

따라서 “효능에 적합한 제형별 시제품 개발”을 위해 본 연구팀은 다음과 같은 시제품 제작과 상품성 평가 계획 초안을 수립하였다.

가. 활성물질을 함유한 제형 검토 및 시제품 제작

최근 기능성 식품 및 주요 조성제품 시장 동향을 검토한 결과, 천연 펩타이드 함유 기능성 식품 및 음료 등 식품산업과 기능성 펩타이드 화장품 산업 분야에 높은 시장 경쟁력을 확보하고 있으며, 특히 기능성 펩타이드 화장품의 경우, 먹는 화장품 (V-Food) 등 신규 브랜드 소재로써 높은 기호성을 평가받고 있다.

기존의 전복에 대한 인지도와 상품성을 마케팅 포인트로 하여, 고부가가치 천연 펩타이드와 해조류 유래 천연활성소재를 융합한 항아토피 화장품 조성물과 천식, 아토피 등 면역질환 고유 병를 세대인 어린이 및 노약자 대상의 기능성 식품을 개발하는 것이 바람직한 것으로 판단된다. 따라서 한방소재 배합, 소비자 기호성(관능평가), 및 성분 구성 등을 고려하여 다음과 같은 시제품 개발 초안을 최종 수립하였다.

(1) 천연 펩타이드 함유 아토피로션 개발

전복가수분해물과 해조류 추출물을 활용한 아토피 로션 제형개발 연구를 실시한다. 화장품에 있어서 베이스 원료의 개발은 향후 제품의 사용감과 유통기한에 따른 안정성을 결정하는 중요한 요소로서 제품의 질적 향상을 위한 필수적인 요소이다. 따라서 제품의 피부친화력과 흡수력, 그리고 아토피성 피부질환에 효과가 있는 제품을 위해 베이스 및 전복가수분해 추출물이 가지고 있는 특성을 고려한 한약추출물의 배합 연구를 통한 제형의 안정성과 제품의 효과를 검증한다.

- 제품컨셉 : 무알코올, 파라벤 free, 항염증 및 아토피 개선 효능 함유 해양한방천연화장품
- 용 도 : 아토피성 피부질환에 의한 악건성 피부
- 보 습 력 : <45%
- 보습지속시간 : 12 시간
- 전복 가수분해 추출물의 농도 : <0.5 %(w/v)
- 기타 한약추출물 : 1%(v/v)

제품안정성 평가는 온도(4℃, 25℃, 45℃) 및 보관기간(2개월)에 따른 물성 안정성을 고려하여 평가하고, 보습력 지속시간(0, 2, 4, 6, 8, 10, 12h), 타사 제품과의 항염증 효과에 대해서는 미국 Cayman사에서 제작 판매중인 COX-2(Cyclooxygenase-2) kit를 사용하여 저해활성을 측정한다. 실험방법은 96 well plate의 2 well 에 10 μ l heme, 10 μ l assay buffer(100 mM Tris-HCl, pH 8.0) 그리고 10 μ l solvent (inhibitor를 녹였던 용매)를 첨가한다. Background well에는 2 well 에 10 μ l heme, 10 μ l assay buffer 그리고 10 μ l의 solvent를 첨가하고, 100% initial activity 측정을 위해 2 well 에 10 μ l heme, 10 μ l 효소(COX-2) 그리고 10 μ l의 solvent를 첨가한다. Sample(inhibitor)의 COX 저해활성측정을 위해 2 well에 10 μ l heme, 10 μ l 효소 (COX-2) 그리고 10 μ l의 sample을 첨가한다. Standard inhibitor로는 Indomethacin을 dimethyl sulfoxide 에 녹여 처리하고, Sample은 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)에 녹여 농도별로 처리하며, 모든 well에 200 μ l의 assay buffer를 첨가하여 실온에서 반응시킨 후, Luminometer(SpectraMax L, Molecular devices, USA)에 부착되어 있는 2개의 dispenser를 이용하여 하나의 dispenser로 모든 well에 10 μ l의 chemiluminescent substrate를 첨가하고, 즉시 다른 하나의 dispenser를 이용하여 50 μ l 의 arachidonic acid를 첨가한 후 Relative Luminescent Units (RLU)를 Luminometer로 측정한다.

⑦ 편안하다 ⑧ 산뜻하다 ⑨ 부드럽다 ⑩ 기타()

11. 샘플 사용 후 피부에서의 느낌은 어떤가? (해당하는 것 모두 표시해 주십시오)

- ① 매끄럽다 ② 끈적인다 ③ 번들거린다 ④ 당긴다 ⑤ 답답하다 ⑥ 촉촉하다
⑦ 무겁다 ⑧ 가볍다 ⑨ 건조하다 ⑩ 윤기가 난다 ⑪ 영양감 있다
⑫ 영양감 없다 ⑬ 부드럽다 ⑭ 산뜻하다 ⑮ 미끈거린다
⑯ 기타()

12. 샘플 사용 후 종합적인 사용감은 어떤가?

- ① 아주 좋다 ② 좋다 ③ 보통이다 ④ 나쁘다 ⑤ 아주 나쁘다

13. 이 샘플이 제품화 되어 판매된다면 구입하시겠습니까?

- ① 꼭 구입하고 싶다 ② 아마 구입할 것이다 ③ 그저 그렇다
④ 아마 구입하지 않을 것이다 ⑤ 구입하고 싶지 않다

14. 사용한 제품의 개선할 점이 있다면 자세히 적어주세요.

(2) 전복해조청국환 시제품 개발

전복과 해조류를 *Bacillus subtilis*로 발효할 경우, 해산물 및 청국장의 특유의 냄새가 사라져 어린이 간식으로 이용이 가능하고, 칼슘 등을 첨가함으로써 청국장의 정장기능과 더불어 어린이 성장 및 노약자 건강에 도움을 주는 제품으로 개발이 가능 할 뿐만 아니라 총명탕과 칼슘 소재를 배합한 수험생용 총명청국환의 조제가 가능하다.

전복해조청국환의 제조과정은 다음과 같이 계획하고자한다.

- ① 좋은 국산 콩을 잘 선별하여 깨끗이 씻어준다
- ② 24시간 동안 콩과 전복가수분해물/해조류 분말을 10%(w/v)를 첨가한 액을 1:5의 비율로 담궈서 불린다.
- ③ 콩을 불린 그 물을 그대로 사용하여 콩과 물이 1:2 비율이 되도록 조절하여 반응기에서 100℃로 30분간 끓인 후 약불에서 수분이 증발할 때 까지 삶고 37℃까지 식힌다.
- ④ *Bacillus subtilis* 종균배양액을 삶은 콩에 골고루 섞은 후 37℃에서 48시간 동안 발효시킨다.
- ⑤ 완성된 청국 발효물은 72시간 동안 동결건조한다.
- ⑥ 동결건조된 청국발효물에 회전코팅기에 올리고당으로 1차 코팅한 후 다시 전복가수분해 추출물 분말과 콩가루 분말을 2:8로 혼합한 후 2차 코팅을 한다.

⑦ 코팅된 청국환은 열풍건조기를 사용하여 45℃에서 24시간 건조한 후 포장한다.

개발한 전복가수분해 추출물분말소재를 청국장 특유의 냄새를 제거한 제조공정에 첨가하여 전복 청국환을 제조한 후 제품제형과 맛에 대한 관능평가를 실시한다. 관능평가는 색상, 맛, 식감, 향, 구매의향에 대한 5가지 항목으로 설문조사를 통해 실시한다.

전복해조 청국환 설문조사 양식

1. 귀하의 성별은?

- ① 남 ② 여

2. 귀하의 나이는?

- ① 10-20대 ② 30-40대 ③ 50-60대 ④ 70대이상

3. 귀하의 직업은?

- ① 중·고등학생 ② 대학생 ③ 직장인 ④ 주부 ⑤ 무직

4. 제품에 관한 만족도 질문

설문항목	1	2	3	4	5
1. 내용물 색상의 느낌은 좋은가?					
2. 제품의 맛은 ?					
3. 먹었을 때 식감은 좋은가?					
4. 제품의 향은?					

1. 아주 나쁘다, 2. 나쁘다, 3. 보통이다, 4. 좋다, 5. 아주좋다

5. 전복 청국환 제품에 대한 구매의향에 관한질문?

- ① 구매의향 없다 ② 잘 모르겠다 ③ 고려해보겠다 ④ 구매의향이 있다 ⑤ 반드시 구매하겠다.

6. 개선할 점이 있다면 간단히 적어주세요.

제 4 장 연구개발 결과

제 1 절 전복 성분분석 및 식품영양학적 가치 평가

1. 전복 주요 성분분석

가. 일반성분 분석

국내산(완도) 참전복의 계절별 및 부위별로 단백질, 지방, 탄수화물, 회분, 수분 등 일반성분 함량을 조사하였다. 일반적으로 해양생물은 부위, 서식지, 계절, 성장 시기별로 크기, 형태, 생체 특성의 변화와 함께 체내 성분의 변화가 발생하며 [Fig. 15], 계절에 따라서도 뚜렷한 함량 변화를 보인다.

본 연구에서는 일반성분 분석을 통해 국내 전복생산량 약 90%를 담당하는 전복산업특구 완도 지역의 참전복 내 주요 생체성분에 대한 생화학적 영양학적 기초자료를 확보하고, 계절별 부위별 체내 성분 함량 변화를 검토함으로써 목적하는 생체성분에 대한 소재 표준화 자료를 확보하고자 하였다.



Fig. 15. 참전복 성장 기간별 전복 크기변화

먼저 국내에서 대량생산되는 패류에 대한 일반성분을 분석 및 비교해 본 결과, 전복의 경우 단백질 함량 (약 20%)과 조회분 함량 (약 5%)이 현저히 높은 것으로 나타났으며, 탄수화물의 경우에도 굴 다음으로 높은 함량 (약 6%)을 나타내었다. 상대적으로 수분의 함량은 약 70% 정도로 육상생물의 평균값과 유사하며, 일반 해양생물의 평균 수분함량 (약 80% 이상)에 비해 매우 낮은 수치를 보였다 [Table 2].

Table 2. Comparison of proximate composition in various shellfishes (%)

	Moisture	Protein	Lipid	Carbohydrate	Ash
Abalone	70.4	19.6	1.0	5.5	4.5
Oyster	76.8	10.9	3.8	6.7	1.8
Mussel	81.0	12.8	0.9	3.9	1.4
Comb pen	86.8	8.1	1.0	1.2	2.9
Cockle	81.3	14.8	0.8	2.1	1.0
Baby clam	78.9	12.4	1.2	4.8	2.7

부위별로 전복 육 (muscle) 및 내장 (intestine)에 함유된 주요성분 차이를 검토한 결과, 내장 부위가 육에 비해 지방 및 회분에 대하여 유의적으로 높은 함량을 보였으며, 탄수화물의 경우 육 보다 내장 부위에 보다 많이 포함되어 있었다. 이 외 수분과 단백질에 대해서는 유의적인 차이가 없음을 확인하였다 [Table 3].

Table 3. Comparison of proximate composition in abalone shell (%)

	Moisture	Protein	Lipid	Sugar	Ash
Muscle	70.40	19.14	0.93	4.71	4.82
Intestine	70.14	19.19	1.20	4.01	5.46

계절에 따른 육과 내장 부위별로 일반성분 함량은 Table 4, 5에 나타내었다. 전복 육의 경우 여름에 단백질 함량이 높고 지방 함량이 낮았으며, 내장의 경우에는 반대 경향을 보였다. 이러한 성분변화는 계절별로 나타나는 해양생물들의 수정 및 산란 등 생식시기에 따른 일반적 체내 성분변화와 거의 일치하는 상관관계이다. 참전복의 경우 봄, 겨울에 내장 지방을 축적하여 산란을 준비하며, 하절기 수온이 20 °C 내외일 때 산란한다. 산란기에는 수심이 얕은 곳으로

모여드는 경향이 있으며 산란시각은 일몰이후, 체외수정으로 수컷의 정충방출이 먼저 일어난 후 암컷의 방란이 일어나는 것으로 알려져 있다. 암컷의 생식소는 짙은 녹색이며 수컷의 경우 담황색의 생식소를 가지고 있으며, 산란에 관여하는 호르몬성 물질로는 해조류에도 다량 함유되어있는 GABA (γ -ABA) 성분으로 밝혀져 있다.

Table. 4. Seasonal variation of proximate composition in abalone muscle (%)

Season	Moisture	Protein	Lipid	Sugar	Ash
Spring	70.2	19.0	1.0	5.5	4.6
Summer	70.5	19.3	0.8	5.6	4.4
Fall	71.6	18.2	0.9	4.3	3.9
Winter	71.9	17.6	1.1	4.9	4.8

Table. 5. Seasonal variation of proximate composition in abalone intestine (%)

Season	Moisture	Protein	Lipid	Sugar	Ash
Spring	70.0	22.4	1.4	3.6	3.4
Summer	71.6	21.4	0.9	3.9	3.8
Fall	70.3	20.2	1.0	4.2	4.1
Winter	70.5	23.1	1.3	3.2	3.1

나. 아미노산 조성 및 함량 분석

완도산 참전복의 부위별 (육과 내장) 구성 아미노산 함량을 분석하여 그 결과를 Table 6에 나타내었다. 전복 육과 내장에 대한 총 구성 아미노산 함량은 내장이 육에 비해 약 37 % (58.3 mg/g) 정도 작은 값을 보였다. 육과 내장에 함유된 구성 아미노산 별 비율 (%)은 유사한 경향을 나타냈으며, 총 구성 아미노산 함량은 육과 내장 각각 158.1 2 mg/g과 129.8 mg/g 으로 분석되었다. 육에 함유된 구성 아미노산 성분 중에서는 글루타민 Gln/u 26.1 mg/g > 아르기닌 Arg 19.3 mg/g > 아스파라긴 Asn/p 14.8 mg/g > 글라이신 Gly 12.3 mg/g > 류신 Leu 11.5 mg/g > 라이신 Lys 11.0 mg/g 순으로 높은 함량이 포함되어 있으며, 내장의 경우는

Gln/u 16.2 mg/g > Asn/p 11.6 mg/g > Gly 8.6 mg/g > Lys 7.1 > Leu 6.1 mg/g 순으로 다른 아미노산에 비하여 상대적 높은 함량을 보였다.

특히 참전복의 육과 내장에는 사람의 대사과정에서 합성되지 않아 필수적으로 식이로부터 섭취해야 아미노산, 즉 필수 아미노산 (essential amino acids)인 류신 (Leu), 라이신 (Lys), 발린 (Val), 트레오닌 (Thr), 이소류신 (Ile), 페닐알라닌 (Phe) 등의 함량이 높아 영양학적으로 양질의 단백질원으로 판단되며, 운동선수, 노약자, 환자 및 산모 등에 대한 기능성 식품으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 면역력 증가에 도움을 주고 상처치유에 필수적인 글루타민 (Gln/u)의 함량이 높게 나타나며 숙취해소 등에 효능이 있는 아스파라긴 (Asn/p) 등 함량이 높아 기능성 아미노산 제품 등 다양한 기능성 식의약 산업에 활용될 수 있을 거라 사료된다.

전복 내 유리 아미노산의 경우, 총 유리 아미노산의 함량은 육과 내장에서 각각 19.4 mg/g 및 32.9 mg/g으로 내장에서 높은 함량을 보였으며, 유리 아미노산 함량 중에는 타우린 (Tau)이 육과 내장 모두 전체 유리 아미노산의 절반가량으로 가장 높은 수치를 보였다 (육: 7.2 mg/g 및 내장: 17.0 mg/g). 두 번째로 많은 함량을 보이는 아미노산은 아르기닌 (Arg)으로 육과 내장에서 각각 3.1 및 2.2 mg/g 으로 측정되었으며, Ala, Gly, Glu 함량도 비교적 높게 나타났다. 필수 아미노산들의 대부분이 전복 육과 내장에 모두 포함되어 있었다 [Table 7].

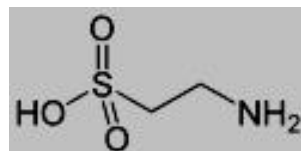


Fig. 15. Taurine (2-aminoethanesulfonic acid)의 분자 구조

전복 육과 내장에서 높은 함량을 보이는 타우린 Tau (Fig. 15)은 유리 상태로 동식물조직에 널리 분포하며, 해양생물 중에는 전복과 오징어 (평균 약 11 mg/g)에 특히 많이 포함되어있는 것으로 알려져 있다. 타우린은 피로회복을 돕는 것으로 알려져 있으며 간의 해독작용을 도와주는 것으로 알려져 있다. 타우린은 소의 담즙에서 처음 발견 되었으며 담즙산과 결합해 타우로콜린산의 형태로 존재한다. 이 밖에 간과 근육에서도 담즙산과 결합한 형태로 존재한다. 정상적인 사람은 오줌과 함께 하루에 약 200 mg을 타우린은 체내에서 합성되지만 그 양이 매우 적으므로 체내에 타우린이 부족할 때 동물성 단백질이나 어류의 단백질을 섭취하도록 권장한다. 타우린의 효능은 첫째, 혈중 콜레스테롤을 낮추는 효과가 인정된다. 또 혈압을 정상상태로 유지하는 작용도 있으며 과도한 신경전달을 억제하는 효과도 있어서 간질병에서 진정제로 역할을 한다. 타우린이 인슐린 분비를 촉진하는데다가 고지혈증과 고혈압이 당뇨병의 원인이 될 수 있기 때문에 타우린은 간접적으로 당뇨병의 증상개선에 도움이 될 수 있다. 타우린은 모유에 함유되어 있고 어린이의 생육에 필수 불가결한 영양원이므로 어린이의 신경과 뇌의 발달에

영향을 주며 DHA와 함께 뇌인지 기능성 식품으로 사료된다. 또한 백내장을 예방하고 눈의 망막기능을 향상시키는 역할도 보고되고 있다. 일반 성인 기준으로 하루에 음식을 통하여 40~400 mg의 타우린을 섭취하며, 채소와 과일과 같은 식물성 식이에는 타우린이 거의 없다.

Table 6. Contents of compositional amino acids in abalone shell (mg/g)

Amino acids	Muscle	Intestine
Asp/n	14.8	11.6
Thr*	7.5	5.6
Ser	9.1	5.8
Glu/n	26.1	46.2
Gly	12.3	8.6
Ala	9.6	5.3
Cys	0.4	1.9
Val*	9.3	5.1
Met*	3.2	2.2
Ile*	5.6	3.4
Leu*	11.5	6.1
Tyr	4.1	4.0
Phe*	4.8	4.1
Lys*	11.0	7.1
Trp*	0.6	0.2
His	2.1	3.1
Arg	19.3	5.4
Pro	6.8	4.1
Total	158.1	129.8

* Essential amino acids

Asp/n: aspartic acid + asparagine

Glu/n: glutamic acid + glutamine

Table 7. Contents of free amino acids in abalone shell (mg/g)

Amino acids	Muscle	Intestine
p-Ser	0.1	0.4
Tau	7.2	17.0
Asp/n	0.2	1.6
Thr*	0.4	0.6
Ser	0.4	1.0
Sar	ND	ND
Glu/n	0.7	2.5
α -AAA	ND	0.1
Gly	0.9	1.9
Cit	ND	1.1
Ala*	1.0	0.1
α -ABA	ND	ND
Val*	0.3	0.7
Cys	ND	0.1
Met*	0.3	0.1
Cysthi	0.3	ND
Ile*	0.4	0.4
Leu*	0.4	0.1
Tyr	0.5	0.7
Phe*	0.3	0.2
β -Ala	0.1	ND
γ -ABA	0.1	0.2
Hylys	0.2	ND
Orn	0.1	0.1
Lys*	0.5	1.1
His	0.2	0.2
Ans	ND	0.1
Car	1.2	ND
Arg	3.1	2.2
Pro	0.5	0.4
Total	19.4	32.9

* Essential amino acids

ND: no detection / p-Ser: phosphoserine / γ -ABA: GABA /

Orn: ornithine

다. 지방산 함량 분석

전복의 부위별 지방산 함량 분석결과는 Table 8에 나타내었다. 지방산 분석 결과는 계절별 평균값으로 표현하였고, 크게 포화지방산 (saturated fatty acid, saturates), 단일 불포화지방산 (mono-unsaturated fatty acid, monoenes), 다중 불포화지방산 (poly-unsaturated fatty acid, PUFAs), 기타 지방산 (unknown)으로 구분하였다. 해당 항목의 백분율 비의 합은 총 지방산 함량 (total content) 100%로 구성되어있으며, 각 세부 항목은 지방산 체인의 길이와 불포화 (이중결합) 수 및 부위에 따라 상세 구분하여 조성비 %로 나타내었다.

먼저 완도산 참전복 육과 내장에 함유된 총 지방산 함량 평균치를 비교해보면, 포화지방산 > 다중불포화지방산 > 단일불포화지방산 순으로 높은 조성비를 나타내었다. 부위별 지방산 조성비는 일반성분 내 조지방 함량과 유사한 경향을 보였다. 지방산 항목별로 살펴보면 전복 육과 내장에 함유된 포화지방산 함량은 각각 31.58% 및 29.10%로 육에 조금 더 높은 수치를 보였으며, 단일 불포화 지방산의 경우 내장 (23.18%) 내 함량이 육 함량 (15.03%) 보다 8%이상 높은 값을 나타내었다. DHA와 EPA 등 omega-3 (오메가-3) 지방산으로 대표되는 다중 불포화 지방산들 (PUFAs)의 함량이 육과 내장에서 각각 24.17% 및 24.57%로 모두 높은 수치를 보였다. 포화지방산 중에서는 palmitic acid (hexadecanoic acid, 16:0)의 함량이 육과 내장 모두 15.80% 및 16.69%로 모든 지방산류 중에서 가장 높았고, 단일 불포화지방산의 경우 육질에서는 cis-11-octadecenoic acid (18:1 11-cis)의 함량이 가장 높았으며 내장의 경우 oleic acid (cis-9 octadecenoic acid, 18:1)의 함량이 9.30%로 가장 높았다. 다중 불포화지방산들 (PUFAs) 중에는 육과 내장 모두 arachidonic acid (*all-cis*-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid)의 함량이 가장 높았으며 다양한 생리기능성을 함유한 오메가-3 지방산으로 잘 알려진 eicosapentaenoic acid (EPA) 또한 육과 내장 모두 6% 이상의 높은 조성비를 나타내었다. Arachidonic acid는 전복의 먹이 원인 해조류에 다량 함유된 지방산으로 알려져 있으며 (약 10% 함유), 전복 내 지방산 함량과 유의한 연관성을 보이는 것으로 판단된다.

Table 8. Percent ratio of fatty acids in abalone shell (%)

Fatty acids	Muscle	Intestine
12:0	0.06	0.14
14:0	4.00	6.24
16:0	15.80	16.69
18:0	4.05	2.56
20:0	0.13	0.17
24:0	7.37	3.13
26:0	0.17	0.29
Saturates*	31.58	29.10
14:1	0.07	0.27
16:1	1.09	3.15
18:1	5.57	9.30
18:1(11-cis)	7.01	7.92
20:1	1.29	2.53
Monoenes*	15.03	23.18
18:2	1.81	2.78
18:2(9-11-cis)	0.52	2.13
18:2(10-12-cis)	2.17	0.21
18:3	1.25	2.89
20:2	0.51	0.94
20:3	0.23	0.29
20:4	10.80	8.83
20:5	6.60	6.29
22:6	0.27	0.19
PUFAs*	24.17	24.57
unknown*	29.22	23.15
Total contents (%)	100	100

* saturates: saturated fatty acid, monoenes: mono-unsaturated fatty acid, PUFAs: poly-unsaturated fatty acid

계절별 전복 육과 내장에 함유된 각 지방산들의 조성비를 조사한 결과 [Table 9, 10], 전복 육의 경우, 가을에 포화지방산 함량이 높게 나타났으며, 불포화지방산 함량은 겨울철에 높은 조성비를 보였다. 내장의 경우 포화지방산의 함량은 가을철에 높은 조성비를 나타내었으나, 불포화지방산의 함량은 산란을 준비하는 시기인 봄철에 가장 높은 값을 보였다. 이러한 결과는 전복 양식의 계절별 식이공급 (여름 절식)과 산란시기에 밀접한 연관성을 가지는 것으로 사료된다.

Table 9. Seasonal variation of fatty acids in abalone muscle (%)

Fatty acid	spring	summer	fall	winter
Saturates	31.96	31.43	32.08	30.84
Unsaturates	39.69	37.64	38.25	41.2
Unknown	28.35	30.93	29.67	27.96

Table 10. Seasonal variation of fatty acids in abalone intestine (%)

Fatty acid	spring	summer	fall	winter
Saturates	25.83	30.36	33.08	27.12
Unsaturates	50.77	46.25	45.46	48.48
Unknown	23.4	23.39	21.46	24.4

라. 무기질 (mineral) 함량 분석

전복의 무기질 (미네랄) 함량 분석은 계절별로 유의성을 거의 없었으며, 전체 평균값으로 결과를 나타내었다 [Table 11].

먼저 전복 내 전체 무기질 총량을 살펴보면 Na (981.6 mg/g) > K (265.6 mg/g) > P (252.1 mg/g) > Mg (132.1 mg/g) > Ca (92.7 mg/g) > Fe (27.8 mg/g) > Zn (2.5 mg/g) > Cu (2.4 mg/g) 순으로 나타났으며, 육과 내장에 포함된 미네랄 함량비 경향은 유사하였다. 육에 함유된 칼륨 (K 149.1 mg/g)이 유일하게 내장에 비해 높은 수치를 나타낸 것을 제외하고는, 내장에 함유된 미네랄 함량이 육에 비해서 전체적으로 높은 수치를 나타내었다 (미네랄 총량: 육 746.1 mg/g, 내장 1,010.7 mg/g). 내장에 다량 함유되어 있는 무기질 중, Fe는 약 5배, Zn

는 3배 정도 많은 양을 보이고 있으며 Mg, Ca 및 Cu의 경우는 약 2배 이상 많이 함유되어 있었다.

체내 무기질은 생리학 영양학적으로 크게 영양무기질, 미량무기질, 독성무기질로 나눌 수 있으며, 영양 미네랄은 Ca, Mg, K, Na, S, P, Cl 등으로 1일 평균 100 mg 이상 섭취가 필요하다. 미량 미네랄은 Fe, Zn, Cu, Se, Cr, Mn, Co, I, B, F, N, Mo 등으로 1일 평균 100mg 이하 섭취량이 필요한 것을 말한다. 인체에 유해한 미네랄은 독성 미네랄이라고 하며 Ag, Hg, Al, Cd, Pb, As, Sb 등과 같은 주요 중금속류가 대부분이다. 체내의 생리학적 항상성 (homeostasis) 유지를 위해 미네랄은 효소 보인자 (cofactors)로써 대단히 중요한 역할을 한다. 중요 미네랄의 기능을 살펴보면 칼슘 (calcium, Ca)은 뼈 대사과정 내 주요 역할 및 혈액응고, 신경자극의 전달, 근육의 수축 및 이완 조절, 세포내 대사과정 조절 등의 다양한 기능을 갖고 있다. 칼슘이 많이 들어있는 식품으로는 우유 및 유제품이 대표적이고, 뼈째 먹는 생선류, 해조류, 녹색채소 등에도 많은 양의 칼슘이 들어있다. 결핍되면 뼈에서 칼슘이 녹아나와 구멍이 생기게 되는데 이를 골다공증 (osteoporosis)이라고 한다. 그 외에도 칼슘부족 시 근육경련 증상을 일으키는 테타니병도 유발된다. 마그네슘 (magnesium, Mg)은 골격, 치아구성, 효소의 구성성분, 신경자극전달, 근육의 긴장 및 이완조절에 필요한 물질로 견과류, 대두, 전곡, 녹황색채소 등에 많이 들어있다. 결핍증이 흔하지는 않지만 신경이나 근육에 심한 경련, 심부전, 심장마비, 근육통, 발작, 허약, 구토, 설사 등의 증세가 나타날 수 있다. 나트륨(sodium, Na)은 혈압의 원인물질이므로 가급적 일일 섭취량 이하로 섭취하는 것이 좋다. 나트륨의 체내 역할은 세포 내 삼투압 유지, 산-염기 평형유지, 근육의 흥분유지 등이다. 장기간 과량 섭취하면 고혈압의 원인이 되며, 일시적으로 부종을 유발한다. 하지만 땀을 많이 흘린 상태에서 적절한 수분과 나트륨의 공급이 이루어지지 않은 경우에는 나트륨 결핍으로 설사, 두통, 메스꺼움, 근육경련, 식욕부진 등이 나타나는 것으로 알려져 있다. 칼륨(potassium, K)은 체액의 삼투압과 수분평형 유지, 산-염기 평형조절, 신경, 근육의 흥분, 수축 조절, 자극 전달, 글리코겐 저장에 관여하는데 혈압 조절에 있어서 나트륨과는 반대 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 철분(iron, Fe)은 적혈구의 헤모글로빈 형성에 필요한 물질이기 때문에 부족 시 빈혈을 유발하게 된다. 육류, 어패류, 가금류, 곡류, 두류, 녹색채소 등에 많이 들어있는데 동물성 식품에 들어있는 철분의 형태가 식물성 식품의 철분보다 훨씬 흡수가 잘 되기 때문에 더 우수한 급원이라고 할 수 있다. 구리 (copper, Cu)는 철분 흡수를 촉진하고, 골격형성, 결합조직 구성, 신경전달물질 형성에 관여한다. 결핍 시 빈혈, 백혈구 감소, 뼈의 손실, 성장 장애, 심장 질환 등이 나타난다. 아연 (Zinc, Zn)은 무려 200여 효소의 보인자로써 성장, 면역, 알코올 대사 등 다양한 대사과정에 관여하고, 생체막 구조와 기능의 정상유지, 핵산 합성 등에도 필요하다. 결핍 시 식욕부진, 미각 및 후각 감퇴, 성장지연, 면역기능저하, 상처회복 지연, 피부염 등이 나타나는 것으로 잘 알려져 있다.

Table 11. Contents of minerals in abalone shell (mg/100 g)

	Na	K	P	Mg	Ca	Fe	Cu	Zn	Total
Muscle	412.5	149.1	96.5	49.5	31.9	5.2	0.8	0.6	746.1
Intestine	569.1	116.5	155.6	82.6	60.8	22.6	1.6	1.9	1,010.7
Total	981.6	265.6	252.1	132.1	92.7	27.8	2.4	2.5	1,756.8

마. 비타민 함량 분석

완도산 참전복 내 비타민 함량은 주요 비타민 분석을 통해 나타내었다 [Table 12]. 비타민은 체내 대사 등 생리활동에 필수적인 요소로써 크게 화학적 성질에 따라 수용성 및 지용성 비타민으로 구분된다. 전복 내 함유된 수용성 비타민으로는 비타민 B1 (thiamine 0.39 mg/100g), 비타민 B2 (riboflavin 0.29 mg/100g), 비타민 B3 (niacin 4.81 mg/100g), 및 비타민 C (ascorbate 2.59 mg/100g)으로 분석되었으며, 지용성 비타민으로는 비타민 A 전구체인 carotene 만이 0.27 mg/100g 함유되어 있는 것으로 밝혀졌다.

국내에서 대량생산되는 패류 중 고 영양가 함유 수산식품으로 잘 알려진 굴과 비교해보면 carotene의 경우 굴의 포함된 평균치 0.05 g/100g에 비해 높은 함량을 보였으며, Vit. B1, B2, Niacin 및 Vit. C는 굴과 유사한 수준을 보였다.

Table 12. Content of vitamins in abalone shell (mg/100 g)

	Vit. A					
	Vit. A	precursor	Vit.B ₁	Vit. B ₂	Vit. B ₃	Vit. C
	(Carotene)					
Contents	ND	0.27	0.39	0.29	4.81	2.59

바. 전복 기타 기능성 성분 분석

전복의 일반성분 외 항산화 및 면역활성에 기여하는 기능성 생리활성 성분을 검토하기 위하여 최근까지 해양생물 유래 항산화 및 면역활성을 보유한 천연물을 위주로 함량 분석을 실시하였다.

(1) 전복 내 폴리페놀성 화합물 함량 분석

육상 생물에 비해 특이한 생태환경에서 서식하며 지구 전체 생물종의 80%를 차지하는 해양 생물체가 가지는 기능성 천연물 소재는 접근성 등에 기인하여 극히 제한적으로 연구되어왔다. 공기로 구성된 대기환경과 달리 물이라는 매질로 구성된 특수 환경 (수압, 염분, 온도 등)에 서식하는 해양미생물, 해조류, 해양무척추동물 등은 태양으로부터 전달되는 빛 에너지와 파장 영역이 상대적으로 다른 조건에 노출되어있다. 따라서 해양생물체에는 기본적으로 육상생물에서 밝혀진 대사물질과는 상이한 이화학적 특성과 생리학적 기능을 가지는 chemical들이 다수 포함되어 있다. 최근까지 밝혀진 해양 항산화성 천연물은 약 150 여종이며 주로 녹조류 (Chlorophyta), 갈조류 (Phaeophyta), 홍조류 (Rhodophyta), 해면류 (sponges), 연산호 (soft corals) 등에서 생산되는 이차 대사산물들 (secondary metabolites)이다. 이들 해양 천연 chemical들을 살펴보면 주로 알카로이드 alkaloids (aplysinopsins, araguspongins, 1Hbenzo[*d*]1,6-naphthyridines, bromopyrroles, bromotyrosines, brominated indole alkaloids, makaluvamines), 리포펩타이드 lipopeptides (cyclic and linear, malyngamides, microcolins), furocoumarins, oxylipins (eicosanoids, prostanoids, carbocyclic and heterocyclic), 펩타이드 peptides (simple and cyclic depsipeptides), 페놀성 화합물 phenolics (simple, polyphenolics, polyhalogenated, styrylchromones, quinones and hydroquinones), 테페노이드 terpenoids (oxygenated C10-C30, polyhalogenated C10-C20, cyclic, linear, cembranoids, steroids, terpene quinones) 등이 보고되고 있으며, 특히 이들 중에는 기존 천연 항산화제로 잘 알려져 있는 vit C, E (tocopherol) 보다 우수한 항산화효능 및 라디칼 소거능을 나타내는 구조적 특이성을 지닌 물질 (예 Cymopol) 도 다수 보고되고 있다 (Takamatsu et al., 2003).

이러한 해양생물 유래 항산화소재는 항산화효능과 함께 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되고 있으며 (Anti-plasmin inhibiting activity, Antimutagenic activity, Bactericidal activity, Anti-skin aging activities, Elastase and matrix metalloproteinase inhibitory activities, Hyaluronidase inhibitory activity, Phospholipase A₂S, lipoxygenases and cyclooxygenase inhibitory activity, Antiallergic activity, HIV-1 reverse transcriptase and protease inhibiting activity, Glycosidase inhibitory activity, Diabetic complication inhibitory activity, Protective effect against vascular risk factors), 이들 해양천연물 중에는 지구상의 전체 생물종을 통틀어 오직 갈조류 (brown algae, Phaeophyta)에만 존재하는 polyphenols 화합물이 존재한다. 특히 일본, 대만 등 일부 동남아시아에서만 국부적으로 서식하는 감태 (*Ecklonia cava*)에는 Tannin 성분의 일종인 플로로탄닌 (phlorotannins)이라는 특이한 구조의 폴리페놀성 화합물이 함유되어 있으며, 지구 전체 phytoorganism 중에서 오직 갈조류에서만 보이는 특이한 구조의 polyphenolic compound이다. 이러한 이유로 지난 수십 년 동안 phlorotannin에 대한 이화학적 연구와 생리효능에 대한 연구는 매우 제한적이었으며, 2000년도에 들어서 해당 물질에 대한 화학적 구조, 유기합성법, 독성, 분포종, 체내 생물학적 기능 및 역할, 의약학적 효능 등에 대한

과학적 연구가 시작되었다. 이들은 해조류 내에서의 생리학적 기능은 방오작용 (anti-fouling), 삼투압 조절 (osmoregulatory), 세포벽 구성 정도로 일부 알려져 있으며 (Arnold and Targett, 2002; Amsler and Fairhead, 2006), 식품학적 측면으로는 촉촉하고 수렴한 풍미를 제공하며 산화-환원 (Redox) 능력에 기인한 항산화 (방부) 효과를 가질 것으로 예측되고 있다. Phlorotannins의 화학적 구분 (classification)은 기본 단위체인 phloroglucinol의 화학적 결합방식에 따라 구분되며 주요 종에는 fuhalols 및 phlorethols (ether 결합), fucols (phenyl 결합), fucophloroethols (ether & phenyl 결합), 그리고 eckols 및 carmalols (dioxin 결합)가 있다. 이들은 갈조류 내에 약 15% (dry weight) 가량 함유되어있으며 약 10 - 100 kDa 분자량 범위를 가진다 (Targett & Arnold, 1998). 갈조류 체내에서의 전체 생합성 과정은 아직 밝혀지지 않고 있으며, 단지 합성과정 내에서 polyketide synthase 효소 복합체에 의해 acetate-malonate pathway가 관여한다는 사실만이 알려져 있으며 전체 유기 합성법은 보고된 바 없다 (Arnold and Targett, 2002; Amsler and Fairhead, 2006).

최근 들어 phlorotannins의 화학적 구조와 분리방법, 성분 분석방법 등이 체계적으로 정리되기 시작하면서, 이들의 이화학적 효능과 생리활성에 대한 연구가 진행되고 있으며, 최근까지 밝혀진 연구보고에 따르면 폴리페놀성 물질의 고유한 항산화효능과 ROS 억제능에 기인하는 항염증, 항암, 항노화 등 (Antiplasmin inhibiting activity, Antimutagenic activity, Bactericidal activity, Anti-skin aging activities, Elastase and matrix metalloproteinase inhibitory activities, Hyaluronidase inhibitory activity, Phospholipase A₂S, lipoxygenases and cyclooxygenase inhibitory activity, Antiallergic activity, HIV-1 reverse transcriptase and protease inhibiting activity, Glycosidase inhibitory activity, Diabetic complication inhibitory activity, Protective effect against vascular risk factors)의 주요 활성이 보고되고 있다. 하지만 전복과 같은 갈조류를 주식으로 하는 관련 해양 동물에 대한 함량과 역할에 대해서는 거의 밝혀진 바 없다.

따라서 다시마, 미역, 감태, 대황, 갈파래와 같은 해조류를 주식으로 하는 전복의 육과 내장에 폴리페놀성 화합물에 대한 정성 및 정량분석을 실시하였으며 결과는 Fig. 16에 나타내었다. 플로로탄닌과 같은 폴리페놀성 화합물은 수용성과 지용성 중간 성질을 나타내는 천연물로서 전복 육과 내장을 동결건조한 분말시료를 대상으로 80% EtOH 유기용매 추출물을 대상으로 분석하였다. 분석 결과와 같이 전복 육 추출물에서는 거의 폴리페놀성 물질의 함량이 나타나지 않았으며, 내장에는 약 46.38 mg/g의 함량을 나타내었다. 이러한 결과를 통해 해조류 섭취 이후 폴리페놀성 성분의 체내 대사과정이 내장을 통해 진행되며 축적됨을 보여준다. 해당 결과는 ROS 소거활성과 면역활성에 대해 우수한 효능을 나타내는 천연 폴리페놀성 생리활성 성분을 전복 내장으로부터 확보할 가능성을 확인하였다.

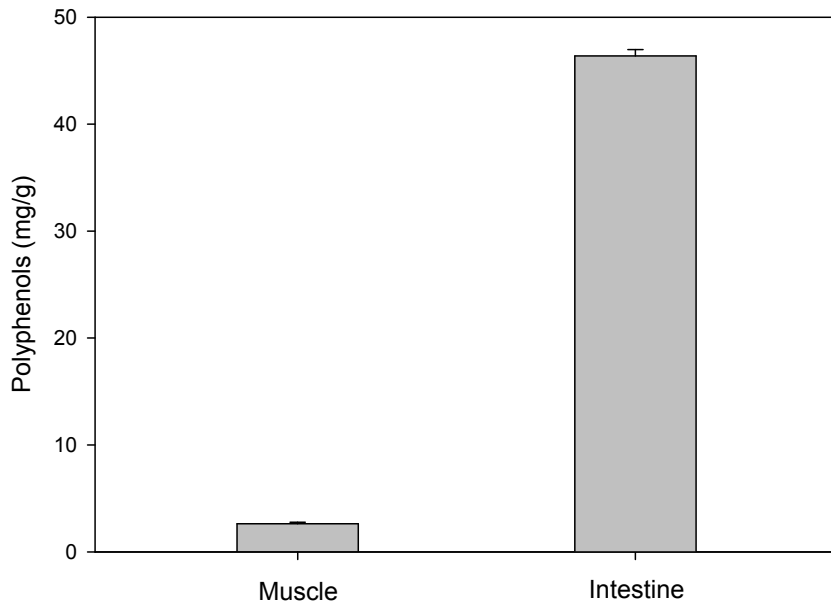


Fig. 16. Contents of polyphenolic compounds in abalone shell

(2) 전복 점액성 다당류 내 콘드로이친황산 분석

콘드로이친황산 (chondrochin sulfate)은 체내 연골 및 점액성 성분으로부터 주로 발견되는 뮤코 (MUCO) 다당체이며 끈적끈적한 고유의 점성을 가지는 물리적 성질이 있다. 인체에서 뮤코 다당체는 60 조 가량의 세포를 연결하는 결합조직 내 다량 함유되어 있으며, 콘드로이친황산은 녹용, 해구신, 식용달팽이 등에 풍부하게 함유되어 있다. 콘드로이친이란 말은 그리스어 “콘드로스 (연골)”에서 기원되었으며, 피부, 혈관벽, 관절, 인대, 각막, 점액, 각 장기 등 전신에 골고루 분포 되어 있는 세포간 물질이다. 또한 연골동물의 연골 등에 다량 존재하는 물질로 관절속의 유액이 연골에 머물도록 도와주는 역할을 한다. 유액은 연골에 영양을 공급할 뿐만 아니라 충격을 완화 시켜준다. 콘드로이친은 연골 파괴효소와 연골로 이동하는 영양분을 원활히 공급하도록 도움으로써 관절의 기능을 향상시켜 주고 관절을 유지하는데 중요한 하며, 새로운 연골을 만드는데 필요한 피로테오글리칸, 클라이코사이노글리칸 (GAGs), 콜라겐의 생성을 촉진한다. 이들 물질의 주요 생리활성으로는 동맥경화를 예방하고, 간기능 향상, 신장질환 등에 탁월한 효능을 나타내는 것으로 밝혀져 있다. 또한 키토산 단위체인 글루코사민과 유사한 구조를 가지고 있으며 류마티스 등 면역질환에 대한 유효한 성분이다.

전복에 함유되어 있는 콘드로이친황산 (Chondroitin sulfate)을 조사하기 위해 전복 분말시료로부터 열수 추출하였으며, 기타 연골어류 및 무척추동물과 함량 분석 및 비교에 대한 data는 다음과 같다. 먼저 전복 내에는 분말시료에 대한 약 14.6%의 콘드로이친황산을 함유하고 있었

으며, 이러한 수치는 굴, 홍합, 가리비 등 기타 패류에 비해 월등히 높은 수치를 나타내었다. 연골어류로 잘 알려진 홍어는 약 17%, 무척추동물인 해삼의 경우 약 25%로 알려져 있다 [Fig. 17].

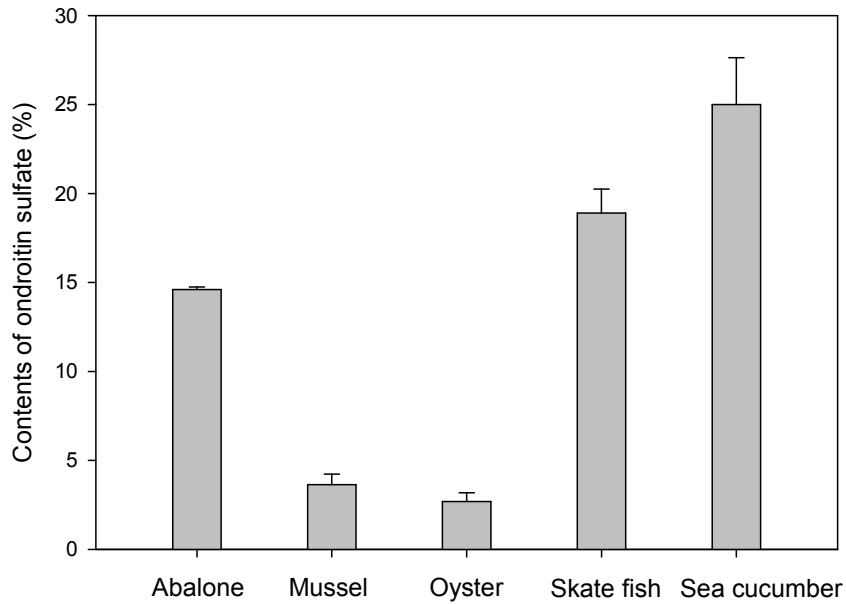


Fig. 17. Contents of chondroitin sulfate in abalone shell

제 2 절 전복 및 해조류 유래 천연 기능성 소재 생산 및 확보

1. 전복 및 해조류 원료 확보

본 연구에서는 국내 최대 수산물 생산기지인 전남지역의 수산특산자원인 전복과 해조류의 첨단 바이오산업 활용과 고부가가치화를 위해, 참전복 (영명: abalone, 학명: *H. discus hannai*) 육과 내장의 영양학적 가치와 생리기능성에 대한 학술적 기초자료를 확립하고 경제성 및 활용도가 낮은 전복 내장의 기능성 단백질을 활용하여 고부가가치 기능성 소재를 확보하고자 하였다. 또한 전복 먹이생물인 해조류가 함유한 난분해성 생체고분자를 전복 내장의 기능성 효소로 가수분해하여 저분자화 함으로써, 전복 및 해조류 가공 부산물 유래의 신규 천연 면역활성 소재 및 건강 기능성 제품을 개발하고자 하였다.

가. 전복 원료 확보

전복 가공공정을 살펴보면, 세척과 탈각 이후 대부분 전복 육의 자숙 (boiling)과 증숙 (steaming) 과정을 거쳐 최종 레토르트, 통조림 형태로 제조되고 있다. 특히 전복 자숙과정 [Fig. 18] 동안 대량 발생하는 가공부산물인 자숙액 (boiled abalone by-products, BABs) 내에는 잠재적 생리활성 소재인 아미노산, 펩타이드, 지방산, 당 등이 포함되어 있지만 전량 폐기되어지고 있는 실정이다 (전복 내장 발생량: 전체 처리량 약 20-25 w%, 자숙액 발생량: 약 1.8 brix/1,000 L/100 kg 전복). 참전복 육과 내장은 완도 전복 집하장으로부터 구입하였으며, 내장의 경우 대량 확보를 위해 가공공장에서부터 직접 수거하여 사용하였다. 전복 자숙 부산물은 전복 제조 과정에서 곧바로 확보하여 탈염, 건조하여 사용하였다.



Fig. 18. Massive processing of boiled abalones in a manufacturing plant

아래에서 요약된 바와 같이 [Table 13], 전복 내장과 자숙액은 다음과 같은 주요 생물공정 (BT processing)을 활용하여 각 목적에 따라 활용되었다.

Table 13. Utilization scheme and BT processing of abalone by-products

Sources (abalone by-products)	BT processing	Utilization
Intestine	<ul style="list-style-type: none"> - Extraction of crude enzyme - GI digestion - UF membrane filtration (desalting / concentration / fractionation) 	<ul style="list-style-type: none"> - AICEs: crude enzymes - AIGIDs: bioactive oligopeptide
boiled water	<ul style="list-style-type: none"> - UF membrane filtration (desalting / concentration / fractionation) 	<ul style="list-style-type: none"> - BABs: bioactive oligopeptide

나. 해조류 원료 확보

서남해역 다시마의 포자엽 및 뿌리 부위는 해조류 양식장에서 수확 후 부산물로 대량발생되며, 많은 양이 해상 양식장 방치 및 방류에 의해 해양환경 부영양화를 유발하는 요인으로 파악되고 있다. 반면 다시마 포자엽 및 뿌리에는 fucoidan, GABA, polyphenols 등과 같은 고기능성 천연소재를 다량 함유하고 있어 그 활용방안 모색이 시급한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 서남해역에서 채집한 50여종 해조류 및 완도산 다시마 부산물을 아래와 같이 확보하였으며, 이들 원료로부터 에탄올 유기용매 추출물과 함께 전복 내장 조효소를 이용한 해조류 저분자가수분해물을 확보하였다 (Fig. 19).



Fig. 19 Sea tangle by-products

2. 저분자 생리활성 펩티드 생산 및 확보

가. 전복 가수분해물 제조

(1) 위장관 소화가수분해 (GI) 시스템을 활용한 전복 가수분해 효율 검토

전복(내장)에 대한 위장관 소화가수분해 시스템 적용 후 가수분해도 및 분자량 분포에 대한 결과는 Fig. 20 및 Table 15 에 나타내었다.

먼저 전복 내장 추출물을 위장 소화가수분해 (phage I: pepsin, pH 2.0)한 결과, 가수분해도는 약 53%를 보였으며, 가수분해 후 분자량은 70 kDa 이하로 분포되었음을 알 수 있었다. 내장 추출물의 분자량 분포가 200 kDa 이상까지 넓게 분포된 것에 비해 위장 가수분해에 의해 상당히 저분자화 되었음을 확인하였다. 아울러 소장 소화가수분해 (phage II: trypsin / α -chymotrypsin / lipase / bile salts, pH 7.0 - 8.0)에 의해 대부분의 고분자 단백질은 약 30 kDa 이하로 저분자화 되었으며, 10 kDa 가량의 분자량을 가지는 올리고 펩타이드화 되었음을 확인하였다. 해당 공정 이후, 가수분해도를 측정한 결과 약 83%로 확인하였으며, 위소장 소화 가수분해 공정을 통해 전복 내장이 효과적으로 저분자화 되었음을 최종 규명하였다.

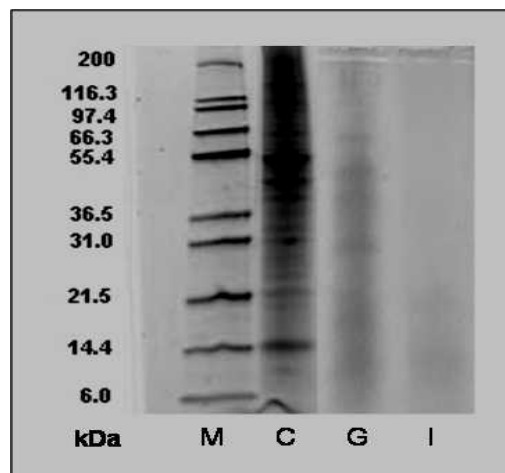


Fig. 20. SDS-PAGE patterns of abalone intestine gastro-intestinal digests.
M: molecular marker, C: crude extracts, G: gastric digests, I: intestinal digests

Table 15. Degree of hydrolysis and MW range for abalone intestine gastro-intestinal digests

GI system	Abalone Intestine Gastro-Intestinal Digests	
	Degree of Hydrolysis (%)	MW range (kDa)
Gastric digestion (Phase 1)	52.9	8 ~ 70
Intestinal digestion (Phase 2)	83.6	< 30

(2) GI 시스템을 이용한 전복 가수분해물 제조 최적조건 검토

GI 시스템의 최적 조건을 확립하기 위하여 다양한 반응시간, 기질농도, 및 기질 대 효소비 등을 적용하여 최고 소화분해 활성을 나타내는 조건을 결정하였다. 해당 조건을 바탕으로 전복 내장으로부터 체내 흡수 직전의 저분자 위장관 소화가수분해물을 확보하였다.

(가) 기질농도에 따른 가수분해 효과

가수분해에서의 기질농도 효과는 Fig. 21 에서와 같이 phase I에서는 약 2%의 기질농도, 그리고 phase II에서는 4%에서 가장 효율이 높은 것으로 나타났다. 가수분해도에는 1차 가수분해에서 약 65%, 2차 가수분해에서는 80%로 확인되었으며, 이러한 결과는 효소가 기질과 반응할 때 중요한 인자로 작용하는 기질의 분자량에 기인하는 차이로 설명된다. 즉 1차 가수분해에 의해 저분자화 된 가수분해물들이 효소 반응부위에 보다 쉽게 상호작용함으로써 2차 반응 시 보다 높은 가수분해율을 나타내었다. 일반적으로 고분자 단백질의 가수분해반응에서의 기질농도는 1~5% 정도인데, 본 실험에서도 기질농도에 대한 최적효과는 위 가수분해과정에서 2%이며, 소장 가수분해조건에서는 4%로 확인하였으며, 기질농도가 낮을수록 가수분해율은 떨어지는 경향을 나타내었다.

(나) 기질 대 효소비에 따른 가수분해 효과

기질 대 효소비에 대한 가수분해 효과는 Fig. 22 와 같이 기질 대 효소비가 500:1에서부터 증가하여 10:1에서 거의 최고 효율을 나타내었다. 가수분해물의 효율, 생산성과 경제성 모두를 고려하여 효소:기질 비를 처음 조건과 같이 250:1로 결정하였다.

(다) 가수분해에 대한 반응시간의 효과

결정된 기질 농도와 기질 대 효소 비 조건에서 다양한 반응시간 (1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 hr)에 따

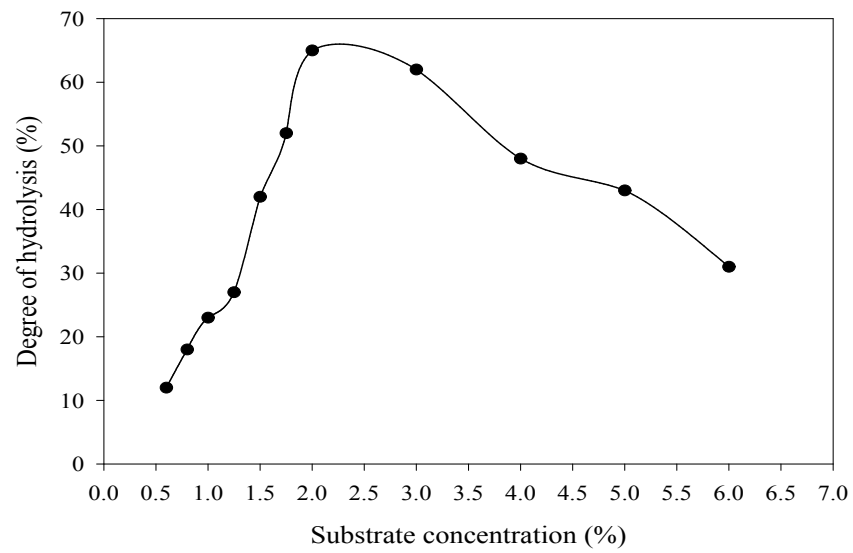
른 가수분해를 검토한 결과를 Fig. 23에 나타내었다. 전복 내장에 대한 위 소화가수분해 단계에서는 가수분해도가 반응시간 12 시간까지 뚜렷하게 증가하다가 그 이후로는 완만한 상승곡선을 나타내었으며, 2 단계 소장 가수분해에서는 8 시간까지 약 86%의 최고 가수분해도를 나타내는 것으로 확인하였다. Ramakrishna 등 (1987)은 chymotrypsin을 시간경과에 따른 활성을 비교한 실험에서, collagen 기질을 사용하여 35°C에서 8시간 반응시켰을 경우와 어류의 불용성 단백질부분을 기질로 사용하여 37°C에서 5시간 반응시켰을 경우 최적 활성이 도출됨을 보고하였다.

본 결과에서 도출된 전복 내장 소화가수분해물 (AIGIDs)의 GI system 내 생산 최적조건은 아래와 같이 정리하였다 [Table 16].

Table 16. The optimal conditions for AIGIDs production on GI system

GI digestion steps	Optimal conditions			
	Conc. substrate (%)	E:S ratio	Incubation time (hr)	Degree of Hydrolysis (%)
Gastric digestion (Phase 1)	2	1:250	12	74
Intestinal digestion (Phase 2)	4	1:250	8	92

(a)



(b)

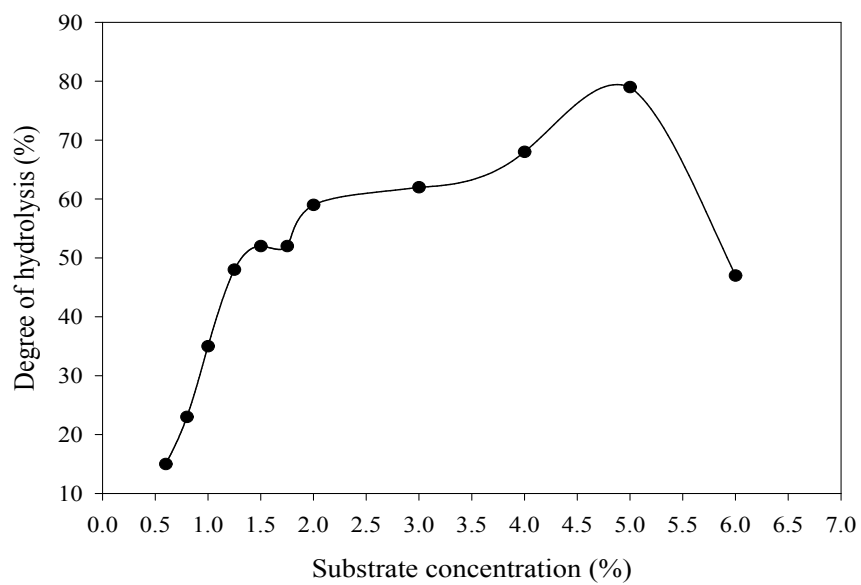
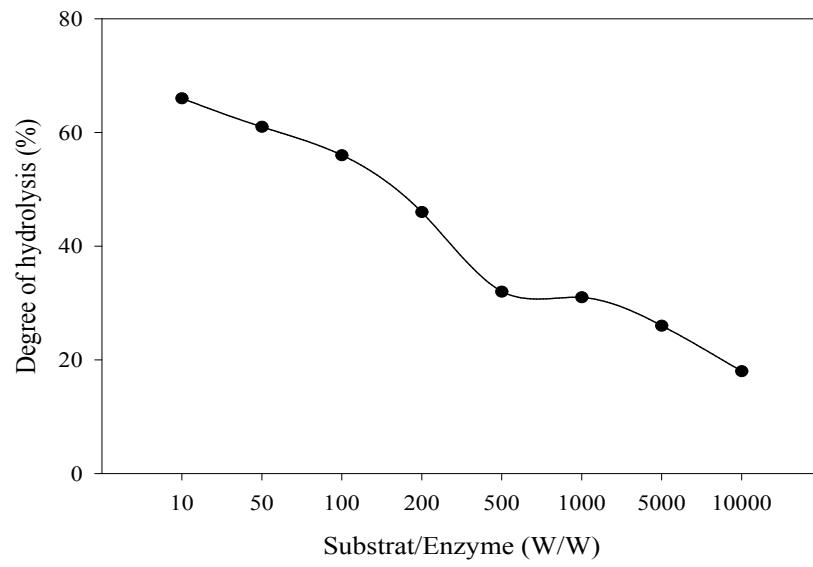


Fig. 21. Effect of substrate concentration on the degree of hydrolysis of Abalone Intestine. (a) phase I (b) phase II

(a)



(b)

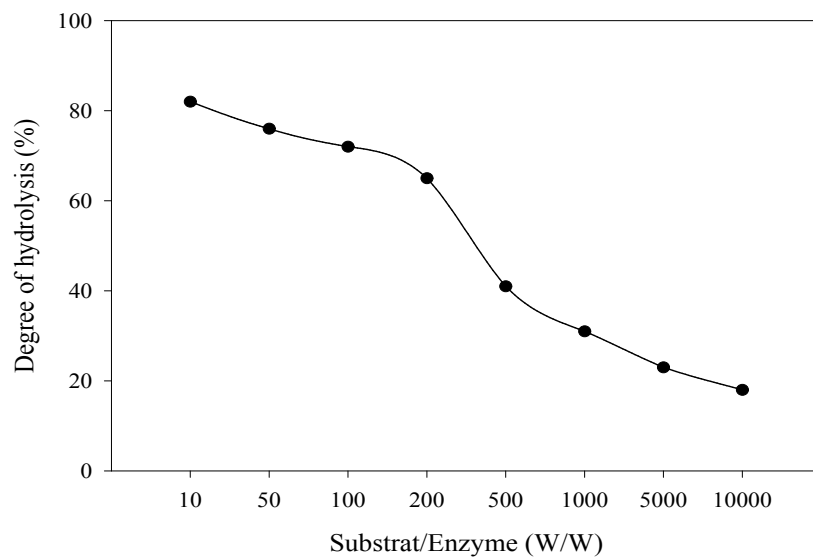
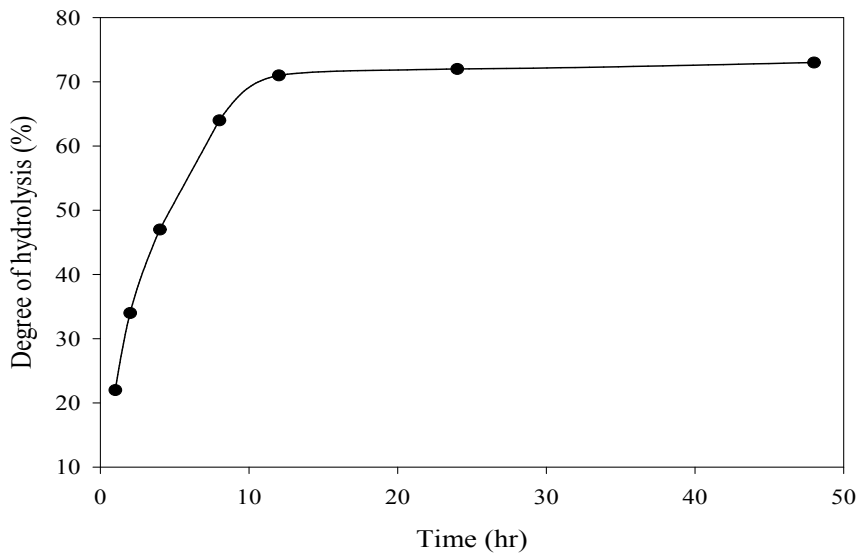


Fig. 22. Effect of substrate/enzyme ratio on the degree of hydrolysis of Abalone Intestine. (a) phase I (b) phase II

(a)



(b)

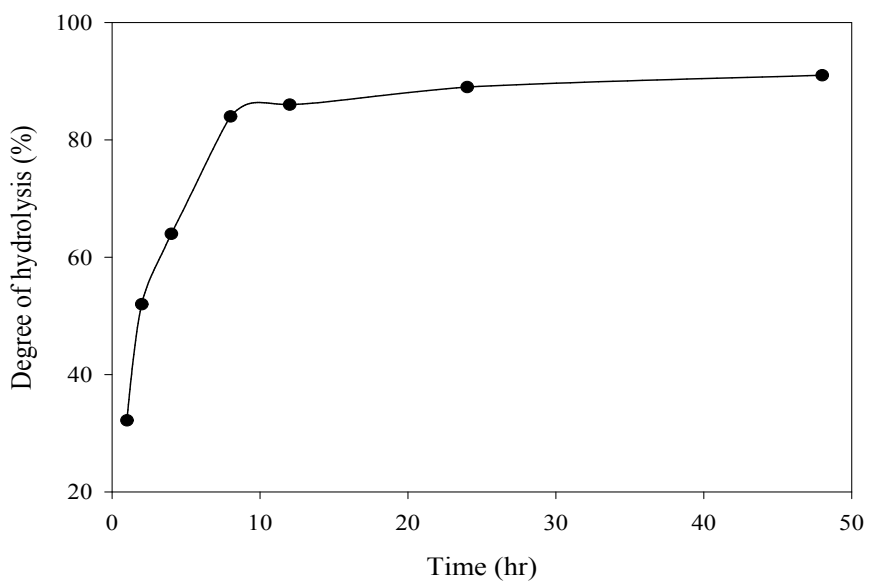


Fig. 23. Effect of incubation time on the degree of hydrolysis of Abalone Intestine. (a) phage I (b) phage II

(3) 전복 소화가수분해물 최종 확보

전복 육과 내장 3 kg을 증류수로 세척한 후 호모게나이저로 균질화시켜 염석 (salting-out)한 2% 기질 용액을 제조한 다음, GI system 내 최적 가수분해 조건에 따라 AIGIDs 를 제조하였다. 가수분해물의 최종 수율은 반응에 사용된 전체 전복 내장의 약 25% (250 g/kg)을 확보할 수 있었으며, 분획, 및 농축 과정을 거쳐 **전복내장 소화가수분해물 (AIGIDs)**에 대한 생리기능성 후보물질로써의 효능 검토를 실시하였다.

전복 육의 최적조건은 내장의 경우와 거의 동일하였으나, 내장보다 상대적으로 높은 단백질 함량에 기인하여 최적 기질농도는 Phase I, II에 각 1.5 및 3.0%로 결정되었다. **전복 육 가수분해물 (AMGIDs)**의 최종 가수분해도는 87%, 최종 수율은 약 32% (320 g/kg)으로 확인되었다.

나. 해조류 저분자 가수분해물 획분 생산 및 확보

(1) 전복 내장 조효소 (AICE) 추출 및 분석

전복의 주요 먹이인 해조류를 소화 분해시키는 주요 기관이자, 전복 가공시 대량발생되는 내장에 함유된 기능성 단백질체 (proteome)의 조성을 분석하고, 이들이 함유한 효소군을 확보하여 해조류 유래 난분해성 물질을 당화 공정에 최종 활용하고자 하였다.

요컨대 분리한 전복 소화기관 (내장) [Fig. 24]을 대상으로, 균질화 및 염석과정을 거쳐 단백질체를 추출한 다음 (2절 구체적 방법 참조), 2D-SDS PAGE 및 아미노산서열 비교분석을 통해 함유된 기능성 proteome을 분석하였다. 이들 **전복 내장 유래 조효소 (Abalone Intestine Crude Enzymes, AICE)**의 당 및 단백질 기질에 대한 최적 가수분해 조건 (온도, pH, 반응비, 반응시간 등)을 검토함으로써 차기년도에서 실시될 난분해성 해조류 당화 공정에 활용하고자 하였다.

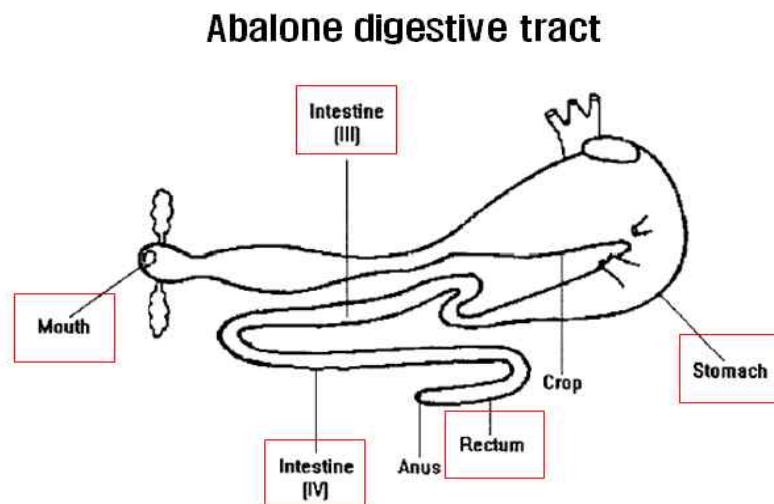


Fig. 24. Anatomy of abalone digestive organs (intestine)

전복 내장의 단백질을 추출하여 2D-SDS-PAGE를 진행한 결과 [Fig. 25], 염색된 spot들의 수만큼 다양한 단백질을 함유하고 있었으며 (각 spot), 이차원적으로 분리된 단백질의 등전점 (PI) 및 분자량 (MW) 정보를 바탕으로 기능성 효소군에 해당하는 spot (단백질체)들을 선별하여, in-gel digestion 및 LC tandem MS 분석을 수행함으로써 전복 내장에 함유된 다양한 효소군을 파악할 수 있었다.

MASCOT 분석을 통해 전복 내장에서 규명된 효소들에 대한 정보는 Table 17에 정리하여 나타내었다. 검토된 효소들은 대부분 기존학술문헌에 의해 보고된 종들이며, 전복 내장 자체발현 효소와 공생 미생물에 의해 발현된 효소들로 구성되어 있음을 확인하였다.

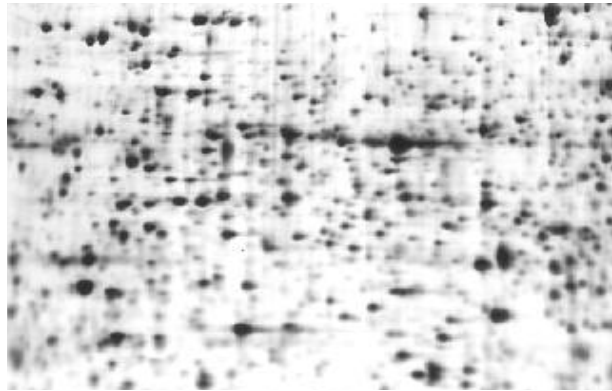


Fig. 25. 2D-PAGE pattern of abalone intestine crude enzymes (AICE)

Table 17. Specific enzymes of abalone intestine enzymes (AICE)

Class	Specific enzyme
Carbohydrases	alginate lyase, laminarase, xylanase, mannosidase, mannase, galactosidase, glucuronidase, glucosidase, fucosidase, N-acetyl-β-glucosaminidase * un-identified as endo-/exo- or α-/β- anomers
Proteinases	pepsin, trypsin, α-chymotrypsin, leucine aminopeptidase (AP), Valine AP, Cystine AP
Lipases	esterase, esterase lipase
Misc.	catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, thioredoxin peroxidase, thioredoxin, alkaline phosphatase, acid phosphatase, naphthol-phosphohydrolase

(2) 전복 내장 조효소 (AICE) 최적 활성 검토

전복 내장 유래 조효소 (AICE)를 이용한 가수분해도 (degree of hydrolysis: DH)는 다시마 가공부산물 powder를 기질로 활용하였으며, 초기 기준 조건은 pH 7.0, 1% 기질용액, 기질 대 효소비 100: 1이 되도록 한 후 38°C에서 8시간 반응시켰다.

반응 종료 후 원심분리한 상층액 2 ml를 취하여 해조류 주 구성성분인 단백질 및 다당류가 가수분해되어 유리되는 저분자펩타이드 및 환원당 함량비를 Lowry 및 DNS 법에 따라 측정하여 계산하였다.

$$\text{가수분해도 DH \%} = \frac{\text{가수분해 후 저분자 환원당 or 펩타이드 함량}}{\text{기질 내 총 당 or 단백질 함량}} \times 100$$

해당 조건에서 AICE의 해조류 기질에 대한 가수분해 활성은 상용효소인 Viscozyme L, Celluclast 1.5L FG, AMG 300L, Ultraflo L (Novozyme Co.)와 유사한 수준의 가수분해도를 나타내었다 [Fig. 26].

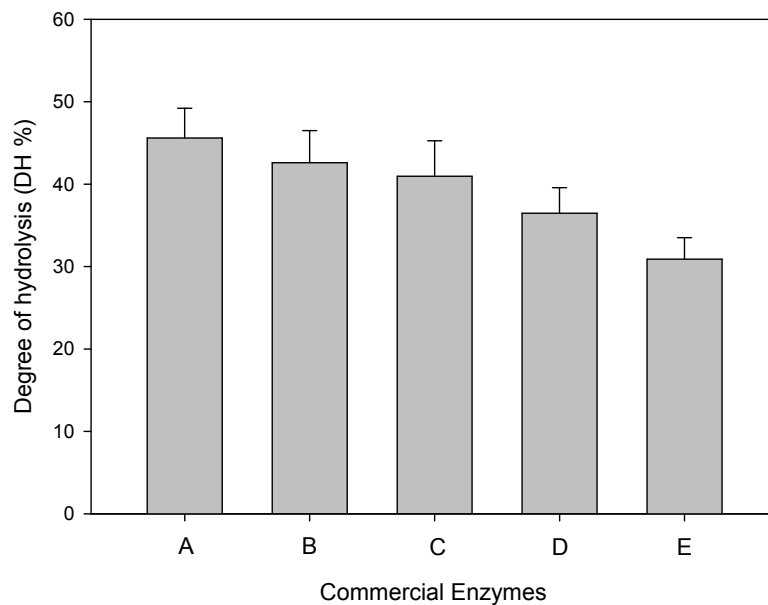


Fig. 26. Comparison of enzymatic activity between commercial enzymes and AICE. Substrate (sea tangle by-products) conc.: 1%(w/v), S/E: 100/1(w/w), incubation time: 8 h. A: AICE, B: Viscozyme L, C: Celluclast 1.5L FG, D: AMG 300L, E: Ultraflo L

(가) 최적 pH 검토

기질에 대한 AICE 가수분해의 최적 pH 조건을 검토한 결과 [Fig. 27], pH 7.5 - 8.0 부근에서 가장 높은 활성을 보였다. 최적 pH 조건에서는 초기 조건의 가수분해도 약 45%에 비해 높은 수치를 나타내었다 (약 50%). Suzuki 등 (2006)의 보고에 따르면 *H. discus hannai*에서 분리한 oligoalginatase가 pH 7.1 부근에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

(나) 최적 온도 검토

다시마 부산물 (sea tangle by-products), 즉 식용 및 양식사료로 가공되는 옆체 부위를 제외한 뿌리, 줄기, 포자엽 건조분말에 대한 AICE 최적온도는 Fig. 28에서와 같이 50°C에서 최대활성을 나타내었으며, 그 이후부터 서서히 감소하는 것을 알 수 있었다. 50°C 이후 완만한 활성변화는 온도에 따른 해조류의 물리적 분해로 사료되며 해당 조건에서의 가수분해율은 약 55%로 상승하였다. Suzuki 등 (2006)의 보고에 따르면 *H. discus hannai*에서 분리한 oligoalginatase가 pH 42°C 부근에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

(다) 최적 기질농도 검토

최적 기질농도는 3%의 기질농도에서 가장 효율이 높은 것으로 나타났다 [Fig. 29].

(라) 최적 기질 대 효소비 검토

기질 대 효소비에 대한 가수분해 효과는 Fig. 30와 같이 기질 대 효소비가 10:1에서 최고 효율을 나타내었지만, 효소첨가량에 따른 가수분해물의 생산성을 감안해 본 결과, 최적의 기질 대 효소비를 50:1로 결정하였다.

(마) 반응시간 검토

다양한 반응시간에 따른 가수분해도를 측정한 결과, 가수분해도가 반응시간이 12시간까지 뚜렷하게 증가하다가 그 이후로는 완만한 상승곡선을 나타내었다 [Fig. 31].

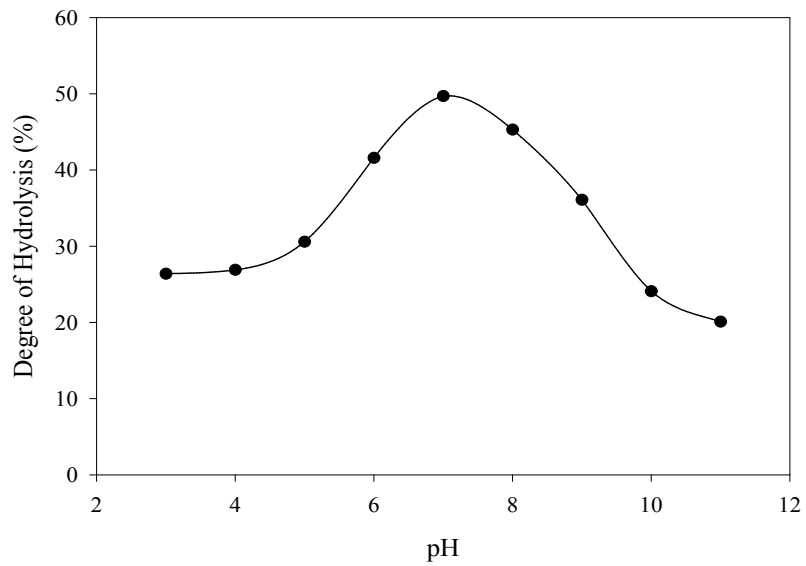


Fig. 27. Effect of pHs on the hydrolysis of sea tangle by-products by AICE.

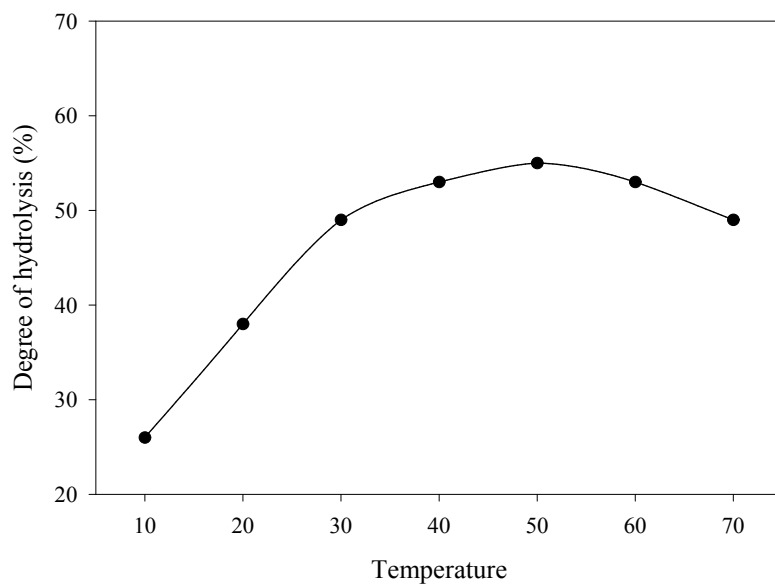


Fig. 28. Effect of temperature on the hydrolysis of sea tangle by-products by AICE.

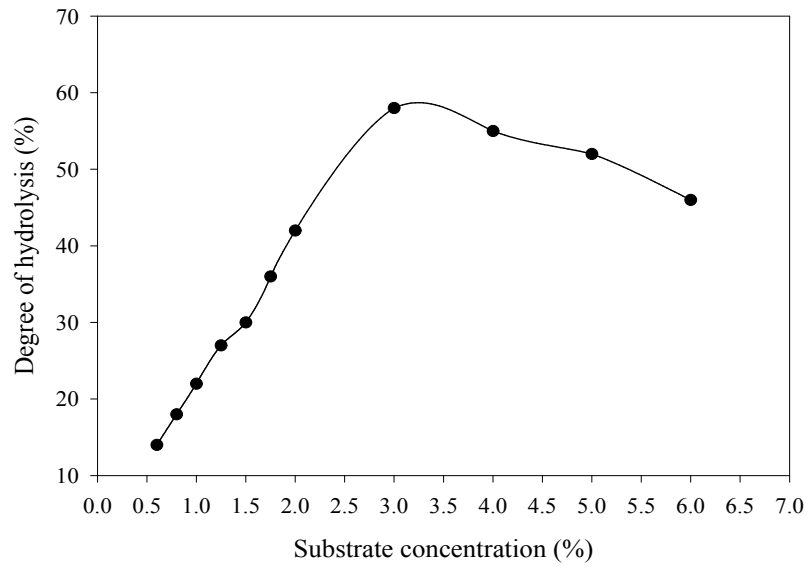


Fig. 29. Effect of substrate concentration on the hydrolysis of sea tangle by-products by AICE.

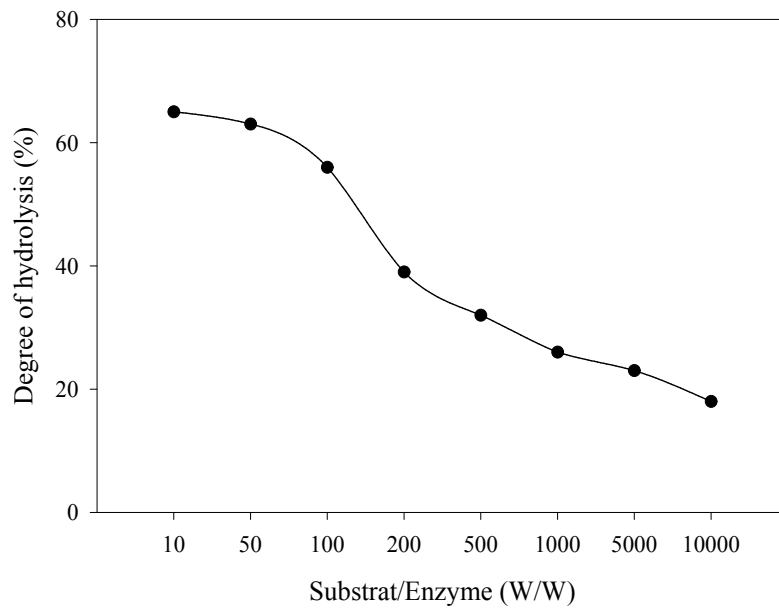


Fig. 30. Effect of substrate/enzyme ratio on the hydrolysis of sea tangle by-products by AICE.

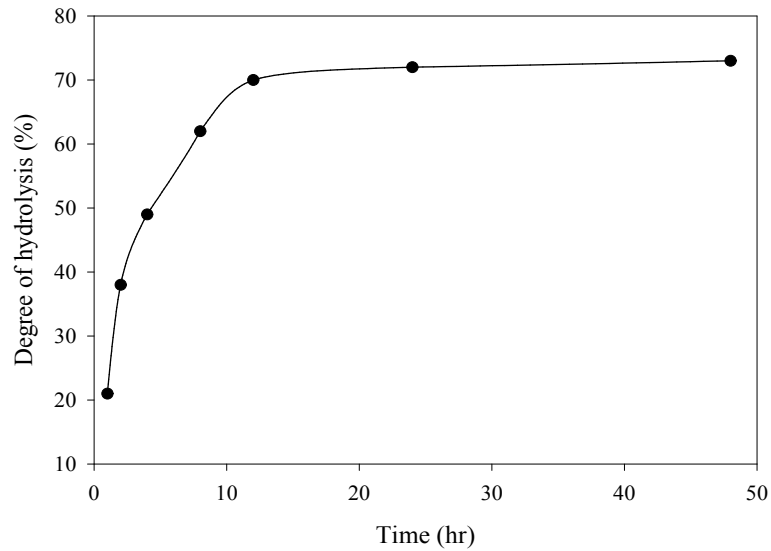


Fig. 31. Effect of incubation time on the hydrolysis of sea tangle by-products by AICE.

최적조건 상에서 다시마 부산물 파우더 1 kg으로부터 AICE에 의한 저분자 가수분해물을 최종 약 560 g을 확보할 수 있었다. 즉 최대 수율은 56%로 확인되었다.

다시마 부산물 기질에 대한 전복 내장 조효소 (AICE)의 최적 활성은 다음과 같이 최종 요약하였다 [Table 18].

Table 18. The optimal conditions for algae by-products hydrolysis by AICE

Enzyme vs. Substrate	Optimal conditions					
	pH	Temp (°C)	Conc. substrate (%)	E:S ratio	Incubation time (hr)	Degree of Hydrolysis (%)
AICE vs. Sea tangle by-products	7.5	50	3	1:50	12	66

다. 효능검토를 통한 우수 활성 획분 선별

전복 부위별, 즉 육과 내장 위장관 소화가수분해물 (각 AMGID 및 AIGID, dose 0.5 mg/ml) 을 각각 대상으로 지질과산화 및 NO 저해능을 측정 비교한 결과, 내장 가수분해물의 지방과 산화 억제 활성 약 88.2%, NO의 경우 로 유의적으로 높음을 알 수 있었다 [Table 19]. 결과와 같이 전복 내장 유래의 가수분해물은 지방의 산화에 의해 세포 및 조직 내 주요 생체성분의 화학적 변성을 유발하는 지질과산화를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.

본 결과를 바탕으로 전복 내장 위장관가수분해물 (AIGIDs)을 항산화 및 면역활성 후보 소재 로 선정하여 해당 분자량별 가수분해물들을 대상으로 활성산소 제거 활성 등 추가실험을 계속 진행하였다.

해조류 추출물의 경우, 해조류 가수분해물에 비해 에탄올추출물에서 높은 NO 활성을 나타 냈으며, 감태, 대황, 패, 뱃붉은잎, 가는개도박, 톳 에탄올 추출물에서 유의적인 NO 저해활성을 보였다. 이들 중 가장 높은 활성을 보인 감태 EtOH 추출물을 우수 활성 획분으로 선별하였다.

이후 한외여과막 시스템을 통한 분자량별 분획 및 효능 연구는 우수 활성을 도출한 전복 내 장 가수분해물 (AIGIDs)를 대상으로 실시하였다.

Table 19. Inhibitory effects of abalone muscle and intestine GI digests (0.5 mg/ml) against lipid peroxidation and NO production

GI digests	Lipid peroxidation inhibition <i>Relative % (Blank 0%)</i>		NO Inhibition <i>Relative % (Blank 0%)</i>	
	Muscle (AMGIDs)	Intestine* (AIGIDs)	Muscle (AMGIDs)	Intestine* (AIGIDs)
Gastric digests (Phase 1)	56.3±4.8	69.8±5.7*	21.6±1.8	42.4±3.4*
Intestine digests (Phase 2)	72.5±6.1	88.2±7.2*	36.1±2.1	68.2±5.5*

라. 한외여과막 시스템 (UF membrane filtration system)을 활용한 분자량별 분획 생산

(1) 분자량별 전복 내장 소화가수분해물 획분 생산

앞서 설명한 바와 같이 전복 내장은 각각 위장관 소화가수분해시스템 (GI system)을 이용하여 효소 수식을 통해 저분자 가수분해물 (AIGIDs) 을 생산할 수 있었다. 다양한 분자량 배제범위를 가지는 한외여과막 (MWCO 100 kDa, 10 kDa, 1 kDa)을 장착한 한외여과 시스템 (Ultra-filtration membrane system, Fig. 33)을 활용하여 해당 샘플들에 대한 분자량별 분획 (fractionation), 탈염 (de-salting), 및 농축 (concentration)을 수행하였다.



Fig. 32. Fractionation of the boiled abalone by-products by ultra-filtration membrane system with various UF membranes of MWCO 100 kDa, 10 kDa, and 1 kDa

전복 내장 위장관가수분해물 (AIGIDs)은 한외여과막 시스템 내에서 다양한 분자량 별로 분획, 농축, 탈염되었으며, 각 전복 내장 위장관가수분해물들은 분자량 별로 AIGID I (> 100 kDa), AIGID II (100 - 10 kDa), 및 AIGID III (10 - 1 kDa)로 명칭하였다.

또한 전복 자숙과정에서 발생하는 전복 자숙액 시료 (boiled-abalone byproducts, BABs > 1 kDa) 의 경우, Whatman 여지로 1차 pre-filter 한 후 1 kDa 한외여과막을 통해 탈염, 농축하여 확보하였다.

해당 공정들을 통해 확보된 전복 내장 및 자숙액 유래의 획분들에 대한 분자량 및 수율에 대한 정보는 다음과 같이 요약하였으며 [Table 20] 및 해당 샘플을 Fig. 33과 같이 나타내었다.

Table 1. Bioactive fractions prepared from abalone intestine and boiled water

Sample Name	Specification	MW range	Yield (%)
-AIGIDs	Abalone intestine GI digests	> 1 kDa	39.7 %/dry
-AIGID I	(Phase I digest, AIG &	> 100 kDa	16.4 %/dry
-AIGID II	Phase I / II digests, AIGIDs)	100 - 10 kDa	12.8 %/dry
-AIGID III		10 - 1 kDa	10.5 %/dry
-BAB	Boiled-abalone byproducts	> 1 kDa	0.98 g/L

(a)



(b)



Fig. 33. Images of bioactive substances produced from abalone by-products.

(a) Various MW fractions of abalone intestine gastro-intestinal digests (AIGIDs). AIGIDs; AIGID I > 100 kDa; AIGID II 100 - 10 kDa; AIGID III: 10 - 1 kDa (from the left side)

(b) The concentrated BABs (boiled abalone by-products) with MW > 1 kDa

(2) 전복 소화가수분해물 (AIGIDs) 및 자숙부산물 (BAB) 아미노산 조성 비교 분석

전복 내장 가수분해물(AIGIDs)과 전복 자숙부산물 (BAB)의 아미노산 조성을 검토하였으며, 특히 전복 자숙부산물 (BABs)에 대한 구성 아미노산 함량을 분석하여 % 함량으로 결과, 자숙 가공부산물의 총 구성 아미노산 함량 2.169 mg/g으로 육과 내장에 비해 현저히 낮은 아미노산 함량을 확인 할 수 있었다.(Table. 21) 자숙가공부산물의 아미노산 별 비율 (%)은 육과 내장의 아미노산 비율과 대부분 유사한 경향을 보였으나 자숙가공부산물의 구성아미노산 함량 중 가장 많은 비율을 차지하고 있는 히스티딘은 전복 육과 내장에서는 낮은 비율을 형성하고 있는 것으로 분석되었다. 자숙가공부산물에 함유된 구성 아미노산 성분 중에서는 히스티딘 His 0.414 mg/g > 아스파라긴 Asn/p 0.263 mg/g > 글루타민 Gln/u 0.170 mg/g > 타이로신 Thr 0.147 mg/g > 세린 Ser 0.123 mg/g > 프롤린 Pro 0.111 mg/g 순으로 히스티딘이 다른 아미노산에 비하여 상대적 높은 함량을 보였다.(Table. 22) 히스티딘은 영양적으로는 필수 아미노산과 비 필수 아미노산의 중간에 위치하고 성인에서는 비 필수, 유아에서는 필수, 쥐에서는 불가결. 여러 가지 단백질의 구성아미노산으로 함유되며 헤모글로빈, 물고기의 정액(이리)의 단백질에 특히 많다. 또한 물고기의 혈합육의 엑기스 중에 많고 엑기스 중의 카르노신(carnosine)의 구성성분이기도 하다.

Table 21. Amino acids composition of AIGIDs

Amio acids	Abalone intestine digests (mg/g in sample)		
	AIGID I	AIGID II	AIGID III
Asp.	8.93	6.95	5.96
Thr.	4.46	4.07	4.65
Ser.	4.47	1.75	2.38
Glu.	15.59	13.57	16.17
Pro.	13.16	12.77	14.04
Gly.	6.63	2.97	5.68
Ala	14.08	11.35	10.55
Cys	1.46	5.45	4.40
Val.	3.93	3.20	4.58
Met	1.69	1.85	0.50
Ile.	2.62	2.25	3.54
Leu.	4.70	4.83	6.99
Tyr.	3.08	2.83	2.66
Phe.	3.16	3.28	3.79
Trp	0.15	2.94	1.76
His.	2.39	9.78	4.97
Lys.	5.47	8.70	4.90
Arg.	4.16	1.64	2.50
Total	100.00	100.00	100.00

Table 22. Amino acids composition of BAB

Amino acids	BAB (mg/g)	BAB % (AA/100 g-AA)
Asp/n	0.263	12.125
Thr	0.147	6.7643
Ser	0.123	5.6870
Glu/n	0.170	7.8542
Gly	0.080	3.6912
Ala	0.086	3.9809
cys	0.354	16.339
Val	0.051	2.3543
Met	0.010	0.4603
Ile	0.036	1.6735
Leu	0.074	3.4146
Tyr	0.053	2.4429
Phe	0.045	2.0776
Lys	0.084	3.8717
Trp	0.001	0.0253
His	0.414	19.103
Arg	0.065	3.0129
Pro	0.111	5.1224
Total	2.167	100.0000

3. 전복 내장 추출물 및 가수분해물의 효능 스크리닝 및 우수획분 최종 선별

전복 내장 추출물 및 가수분해 샘플들 (AID: 전복근질화추출물, AIG: 전복 위 소화가수분해물, AIGIDs: 전복 위-소장 소화가수분해물, AIGID I, AIGID II, AIGID III, BAB)에 대한 면역 활성 효능을 다음과 같이 검토하였으며, 최종 결과를 Table 23에서 요약하였다.

아래 Table 23에서 나타난 바와 같이, 산화적 스트레스로부터 면역세포를 보호하는 항산화효능 (antioxidant) 의 경우 AID, AIGID, AIGID III, BAB 획분에서 우수한 활성을 보였으며, AID, AIGID, AIGID III, AIGID II에서 우수한 항염증 (anti-inflammation) 활성을, 그리고 AIGID, AIGID II, AIGID III에서 우수한 항알러지 (anti-allergy) 효능을 확인할 수 있었다. 이후 각 활성에 대한 우수 획분들, 즉 AID, AIGID, AIGID의 구체적인 약리효능과 작용기전에 대한 세부연구 수행을 통해 검증하였다.

Table 23. Summary of target sample selection and bioactivities

Sample Name	Activity		
	Antioxidant	Anti-inflammation	Anti-allergy
AID	++	++	-
AIG	++	+	+
AIGIDs*	++	++	+++
AIGID I	-	-	-
AIGID II	-	+	++
AIGID III*	++	++	+++
BAB	++	-	-

가. 산화적 스트레스 억제(항산화효능)를 통한 면역(대식)세포 보호효능 확인

체내의 산화과정에서 발생하는 자유라디칼 종은 노화, 면역질환 및 주요 퇴행성 질병을 야기시키며, 체내에 생성되는 주요 활성산소종 (Radical Reactive Oxygen Species)인 슈퍼옥사이드 라디칼 (Superoxide radical), 하이드록시 라디칼 (Hydroxyl radical), 퍼옥시 라디칼 (Peroxy radical)을 전자스핀공명 분광광도계 (electron spin resonance ESR spectroscopy)를 이용하여

측정하였다

항산화제란 산화를 방지하는 물질을 통칭하는 것으로 그 작용기작 [Fig. 34]에 따라 자동산화의 연쇄반응을 제어하는 자유라디칼 소거제 (scavenger), 과산화물을 비라디칼로 분해하여 불활성화시키는 과산화물 분해제, 미량금속의 산화 촉진작용을 불활성화하는 금속 불활성화제, 자동산화에 있어서 라디칼 저해제와 공존시 항산화작용을 증가시키는 상승제 및 각종 활성산소계를 소거하는 singlet oxygen quencher 등으로 분류된다. 항산화제는 다시 크게 두 그룹으로 분류되는데, primary 또는 chain-breaking antioxidants로서 지질라디칼과 반응하여 더욱 안정한 생산물로 바꾸는 그룹과 secondary 또는 preventive antioxidants로서 다른 메카니즘에 의해 자동산화를 지연시키는 그룹으로 분류된다.

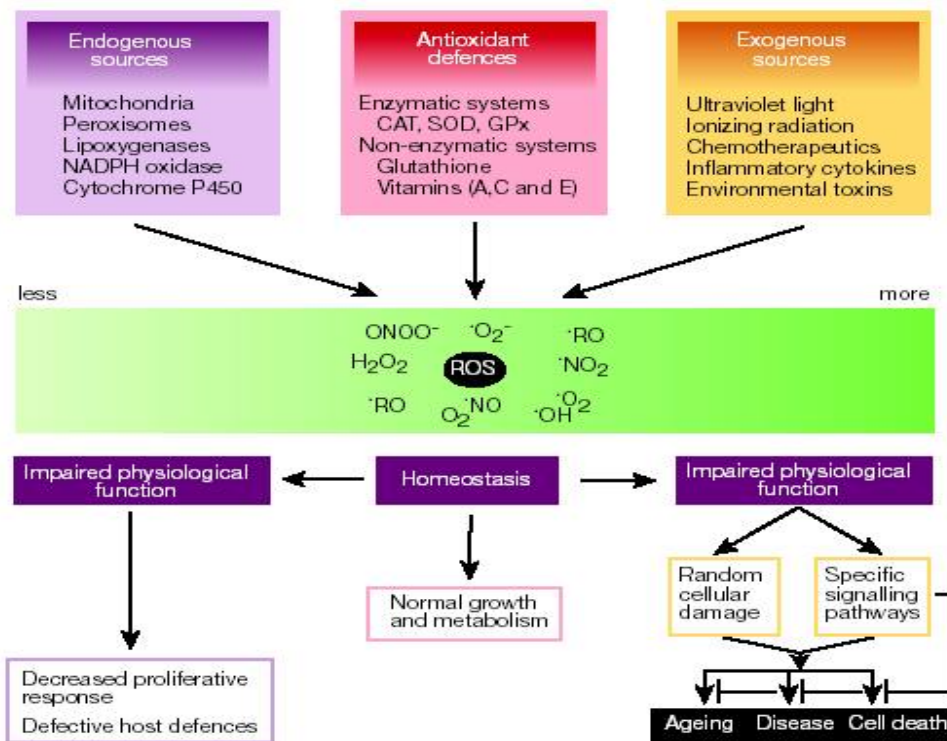


Fig. 34. 활성산소종 (ROS)의 생성과 체내 영향

Primary antioxidant는 상대적으로 안정한 라디칼을 만들기 위해 지질 유리라디칼에 수소원자를 제공함으로써 연쇄반응의 연장을 저지하여 자동산화를 막는다. 이러한 형태의 항산화제는 대부분 페놀화합물로서 α -tocopherol, gallic acid와 그 유도체, quercetin, rhamnetin, kampferol, rutin, quercitrin 및 caffeic acid 등의 flavonoid계가 알려져 있다. Secondary

antioxidant는 순수한 지질에서 항산화 효과를 나타내지 않지만 primary antioxidant의 효과를 증대시키거나 prooxidant의 효과를 저해시킨다. 이러한 형태의 항산화제는 α -tocopherol과 같은 primary antioxidant와 상승작용을 나타내는 인지질과 prooxidant 금속이온과 킬레이트 되는 citric acid 및 ascorbic acid 등이 있다.

대표적인 산화반응인 지질의 산패는 주로 높은 온도나 빛에 의해 생성된 지질 라디칼이나 $^1\text{O}_2$ 에 의해 과산화물의 생성과 분해가 연쇄적으로 일어나는 반응으로 이들 페놀성 항산화제가 존재할 경우, 페놀성 OH기가 유지의 유리기 수용체로서 작용하여 유지산패의 초기 단계에서 생성된 유리기들이 안정한 공명 혼성체를 형성하도록 하여 산화 억제 작용을 하게 된다. 이러한 항산화제는 각종 식물 추출물, 향료, 발효생산물 등의 flavonoid 또는 페놀계 화합물로 존재한다 (Halliwell, 2008; Sachdev & Davies, 2008; Packer et al., 2008).

또한 동식물의 단백질을 산이나 각종 효소를 이용하여 가수분해시켜 생산한 올리고펩타이드도 항산화활성을 나타낸다고 보고되고 있다. 또한 이들 각종 단백질 가수분해물들은 저항원, 칼슘흡수 촉진작용 및 항콜레스테롤작용 등의 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 대표적인 단백질 가수분해물로부터 얻어지는 펩타이드로는 milk casein 펩타이드, 난 (卵)단백질 펩타이드, 어육단백질 펩타이드, 대두단백질 펩타이드 및 소맥단백질 펩타이드 등이 알려져 있다 (Engelmann et al., 2005; Hansen et al., 1989). 이와 대별하여 합성 항산화제로는 입체장해를 나타내는 큰 치환기를 가져 안정한 라디칼을 형성하여 항산화성을 나타내는 페놀계 화합물과 sulfur계 화합물, 구연산과 그 유도체들, 인산과 그 유도체들 등이 알려져 있다. 동물실험의 결과, 합성 항산화제가 각종 효소군 등에 영향을 끼침으로써 부작용을 일으키며, 특히 BHT는 기형발생 또는 암 발생에 관여하는 것으로 보고되어 뛰어난 항산화효과에도 불구하고 부작용으로 인해 문제시 되고 있는 반면, 천연 항산화제는 부작용이 거의 없어 식품첨가물 또는 약품으로 현재 널리 이용되고 있다. 그러나 천연 항산화제 중 가장 널리 이용되는 α -tocopherol의 경우 비싼 가격과 지용성이라는 이용상의 제약으로 대체 천연 항산화제의 개발이 요망되고 있다. 이와 같이 단백질 가수분해물이 갖는 생리활성 작용에 관한 연구는 최근에 큰 관심의 대상이 되고 있고, 영양원으로서 수산물 단백질에 의한 의존도가 높음에도 불구하고 이들의 생리활성 특히, 고혈압의 억제 및 항산화 효과와 관련이 있는 연구는 미흡한 실정이다 (Jung et al., 2006)

따라서 본 연구에서는 전복 내장 소화가수분해물 (AIGIDs) 및 자숙액 (BABs)을 대상으로 지질 과산화억제능과 주요 항산화물질인 활성산소 (ROS) 소거능력을 검토하였으며, 활성산소의 산화적 스트레스로부터 면역세포 보호효능을 확인하였다.

먼저 전복 내장 가수분해물 및 자숙액을 대상으로 산화적 스트레스를 통한 면역조절 이상을

야기하는 ROSs 소거활성을 대해 스크리닝한 결과, 아래와 같이 AIGID와 AIGID III에서 가장 높은 활성을 도출하였다. (Table 24.)

Table 24. ROSs scavenging activity of AIGIDs and BABs

Samples (1 mg/ml)	Radical scavenging activity (%)			
	DPPH	Hydroxyl	Superoxide	Peroxyl
AIGID *	86.9	80.7	78.2	69.8
AIGID I	86.2	68.6	70.8	60.8
AIGID II	75.3	70.6	69.4	56.2
AIGID III *	84.3	81.9	72.6	60.9
BABs	70.9	64.3	55.7	40.9

본 연구의 주요샘플인 AIGID와 BABs에 대한 산화적 스트레스 및 면역세포 보호효능에 대한 결과를 아래와 같이 예시하여 요약하였다.

(1) AIGID에 대한 산화적 스트레스 억제 및 세포보호 효능

(가) AIGID에 대한 자유 라디칼 제거활성 검토

우수한 지질과산화 억제를 통한 항산화 효능을 보이는 AIGID를 대상으로 자유라디칼 제거 효능을 추가 검토하였다.

자유 라디칼 제거 효과는 Electron Spin Resonance (ESR) Spectrophotometer에 의한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, Hydroxyl radical, superoxide radical, alkyl radical의 소거능을 측정하였다.

Fig. 35에서와 같이 AIGID는 1 mg/ml에서 83%의 DPPH radical, 71%의 Hydroxyl radical, 78%의 Superoxide radical, 59%의 Peroxyl radical 우수한 라디칼 소거 효능을 나타내었다. 이러한 활성은 AIGID에 포함된 펩타이드 및 당이 가지는 수소 (전자) 및 파이전자에 의한 공여효과에 의한 것으로 추정된다.

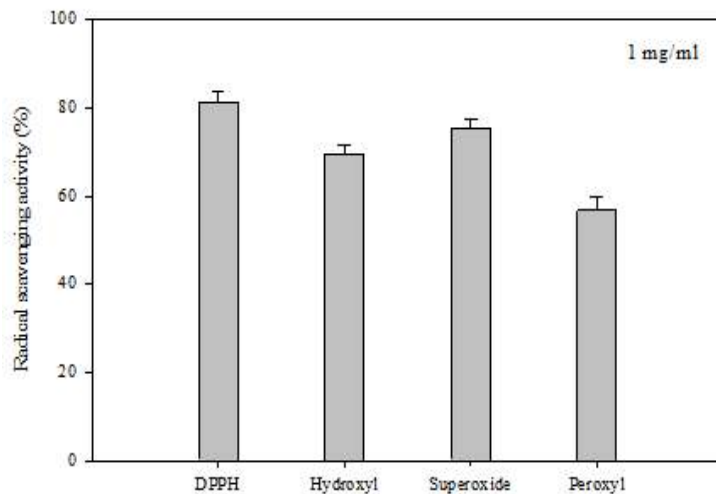


Fig. 35. 전복 내장 분해물 (AIGID)의 자유 라디칼 제거 효능

본 결과를 통해 확인된 바와 같이, 전복 내장 추출물 (AIGID)은 우수한 항산화효과를 바탕으로 활성산소종 (ROS) 등에 의한 산화적 스트레스로부터 대식세포를 효과적으로 보호하는 것으로 나타났다.

(나) 면역세포 (대식세포 RAW264.7) 내 샘플 세포독성 검토

Hansen 등 (1989)에 의한 방법에 따라 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 통해 세포 생존율을 측정하였다. 체내 면역시스템을 구성하는 대식세포 (macrophage)의 일종인 mouse 조직에서 유래한 RAW 264.7 세포주를 대상으로 항염증활성 등 주요 면역 활성을 측정하기 위해 macrophage 세포수를 측정하여 petri dish에 옮긴 후 10% FBS가 포함된 RPMI1640 배지를 가하여 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 샘플 처리 후 세포 생존율을 검토하기 위하여 대식세포 (RAW 264.7)를 96 well plate로 분주한 후 샘플 농도별로 각 well에 처리한다. 100 µl MTT (1 mg/ml)를 가한 다음 4 시간 동안 배양한 후 DMSO (150 µl)를 처리하여 생성된 formazan 염을 녹인다. 이후 540 nm 파장에서 측정하여 세포생존율을 측정하였다.

세포가 들어 있는 96 well plate에 AIGID를 50 - 1000 µg/ml 을 24 시간동안 처리한 후 MTT (5 mg/ml in phosphate buffered saline (PBS), 10 mM KCl, 138 mM NaCl, pH 7.4)를 10 µl 첨가하여 연한갈색으로 변할 때까지 37°C에서 4 시간 정도를 배양한다. 그 다음 Dimethyl sulfoxide를 100 µl 첨가하여 Formazan을 용해시킨 후 540 nm 에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 나타낸다. AIGID를 첨가하지 않은 것의 세포 생존율을 100 % 볼 때 AIGIDs 첨가군에서는 90% 이상으로 생존율을 나타냈으며 이는 AIGID는 RAW264.7 세포에 어떠한 독성도 나타나지 않아 안정한 것을 확인하였다 [Fig. 36].

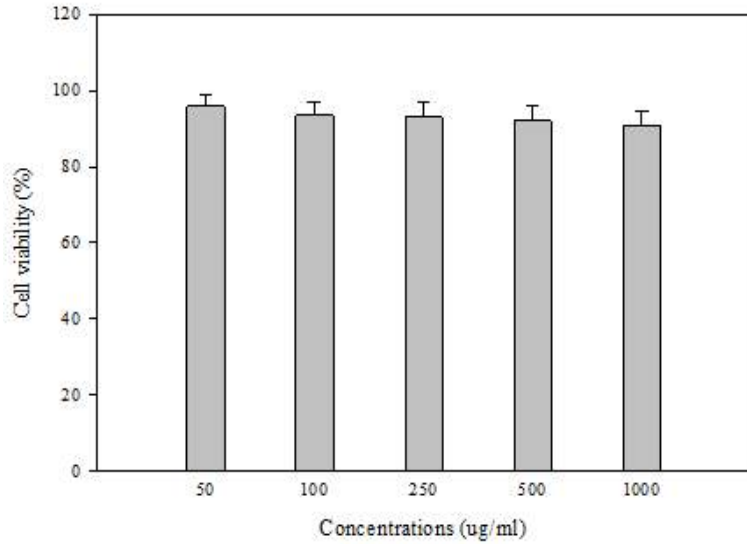


Fig. 36. AIGID의 RAW264.7에서의 세포독성

(다) AIGID의 대식세포 내 라디칼 제거효과

Oxidation-sensitive dya 2',7'-dichlorofluorescien diacetate (DCFH-DA)을 활용한 Engelmann 등 (2005)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 96-well plate에서 배양된 세포를 암실에서 30 min 동안 20 μ M DCFH-DA (HBSS, Hanks balanced salt solution 용매)와 반응시켰다. 다양한 농도의 샘플을 처리한 후 1시간 동안 배양하고 PBS로 3회 세척한 다음 500 μ M H_2O_2 처리에 따라 유도된 세포 내 라디칼에 의해 산화된 DCFH의 산화물인 DCF의 흡수 형광시그널 강도를 GENios fluorescence microplate reader (TECAN, Männedorf, Switzerland)로 해당 파장조건 ($\lambda_{excitation} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{emission} = 528 \text{ nm}$)에서 측정하였다. Fig. 37에서 AIGID을 농도 100-1000 μ g/ml의 다양한 농도에서 우수한 라디칼 제거활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

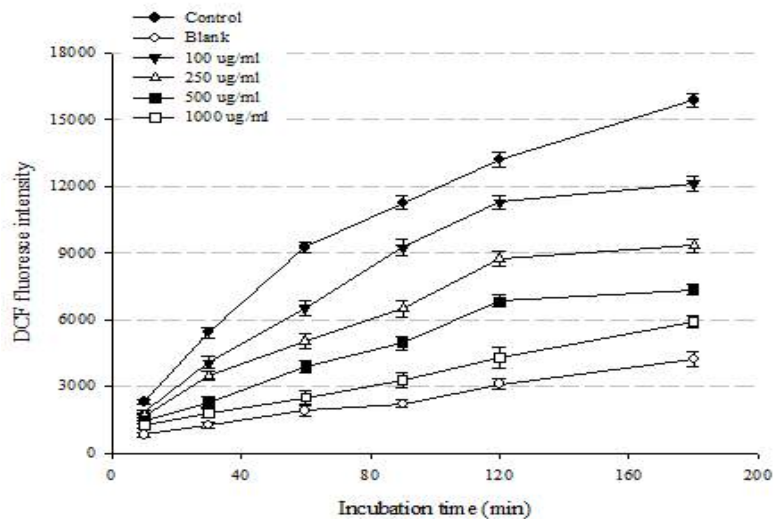


Fig. 37. RAW264.7에서 AIGID에 의한 ROS 제거 활성

(라) AIGID의 대식세포 내 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 보호효과 검토

Milne 등 (1993)의 방법을 변형하여 DNA Oxidation 보호효과를 측정하였다. RAW 264.7 cell의 DNA 5 μ l에 AIGID를 농도별 100, 500 과 1000 μ g/ml 각각 5 μ l씩 추가한다. 100 μ M FeSO₄ 14 μ l와 100 μ M H₂O₂를 첨가하고 vortex한 후 30분간 반응을 시킨다. 130 mM EDTA 5 μ l를 추가한 후 Total양에서 20 μ l와 DNA loding buffer 4 μ l를 혼합하여 agarose 겔에서 30분간 100 V 전기 영동한다. Agarose gel은 EtBR (ethidium bromide)에 30분간 염색시킨다. UV를 이용한 AlphaEase[®] gel image analysis soft (Alpha Innotech, CA, USA)로 겔을 확인한다. 보통 Fenton 반응에서 hydroxy radical에 노출 된 DNA는 깨지는데 그 효과를 Fig. 38에서 확인할 수 있다. 결과 100-1000 μ g/ml 농도 범위 내 AIGIDs로 처리된 DNA는 hydroxy radical에 의한 DNA손상 (Lanes 3-5)을 효과적으로 보호하였다. 이는 AIGID가 충분히 항산화 활성을 가지고 있다는 것을 증명하였다.

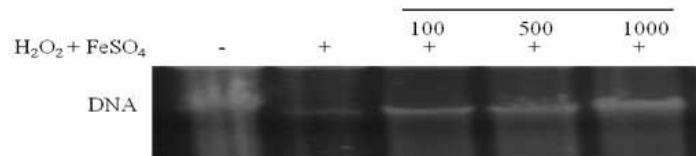


Fig. 38. AIGID의 자유 라디칼에 의한 DNA 손상 보호효과

(2) 전복 자숙가공부산물 (BABs : boiled abalone by-products)의 항산화활성

(가) 자숙가공부산물 (BABs)의 활성산소종 라디칼 억제 활성 검토

자숙가공부산물 (BABs)에 대한 농도별 ROSs (DPPH, Hydroxyl, Superoxide, Peroxyl)제거 효능을 검토한 결과, 농도 의존적으로 활성이 증가함을 확인할 수 있었으며, 체내 발생 ROSs 중에서 높은 독성을 나타내는 hydroxyl radical에 대한 제거 효능이 1000 μ g/ml 에서 약 90% 로 가장 높은 수치를 나타내었다 [Fig. 39].

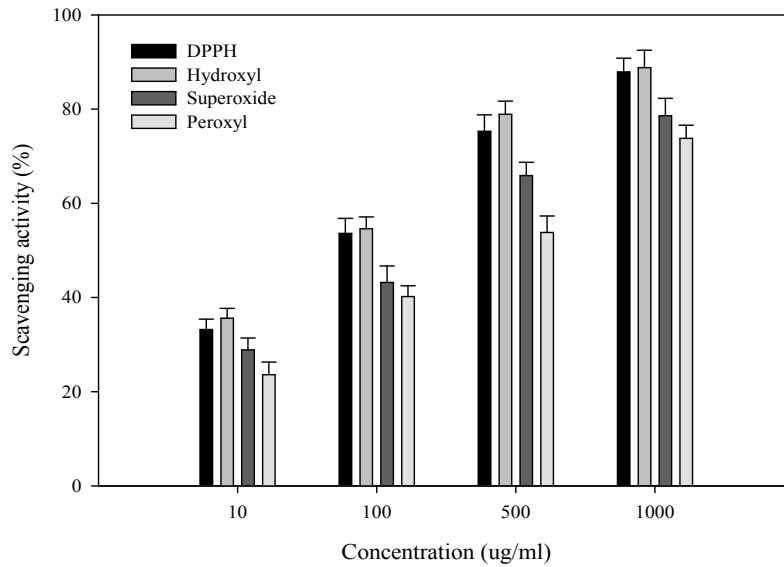


Fig. 39. 자숙가공부산물 (BABs)의 ROSs 제거 활성

(나) 자숙가공부산물 (BABs)에 대한 세포 독성 검토

Fig. 40에서 보는 바와 같이 자숙가공부산물 (BABs)을 100, 250, 500 그리고 1000 µg/ml를 처리 후 면역세포 (macrophage RAW 264.7)에 대한 시료의 세포독성을 확인한 결과, cell viability (%)는 각 농도에서 100%에 가까운 생존율을 보였다.

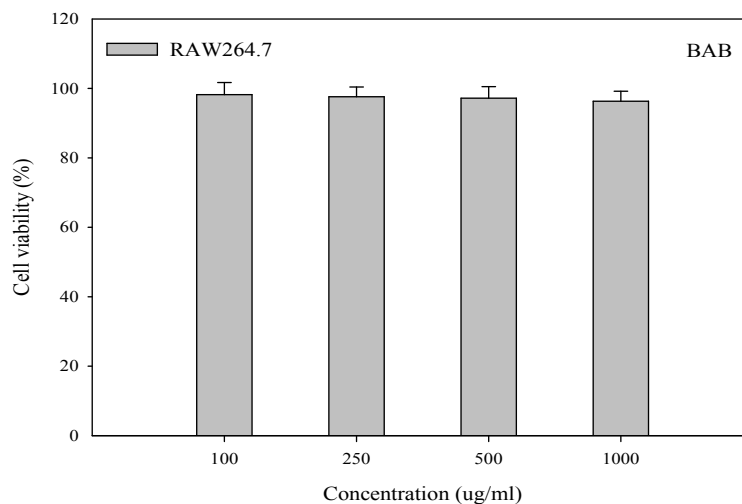


Fig. 40. 자숙가공부산물 (BABs)의 농도별 처리에 따른 RAW 264.7 cell의 생존율

(다) RAW 264.7 세포에 대한 자숙가공부산물 (BABs)의 라디칼 제거 및 세포보호 효능

BABs (자숙가공부산물)을 100, 500 그리고 1000 µg/ml를 농도별로 처리하였을 경우, 농도

비례적으로 세포 내 독성 라디칼 농도를 효과적으로 소거하는 것을 알 수 있었다.

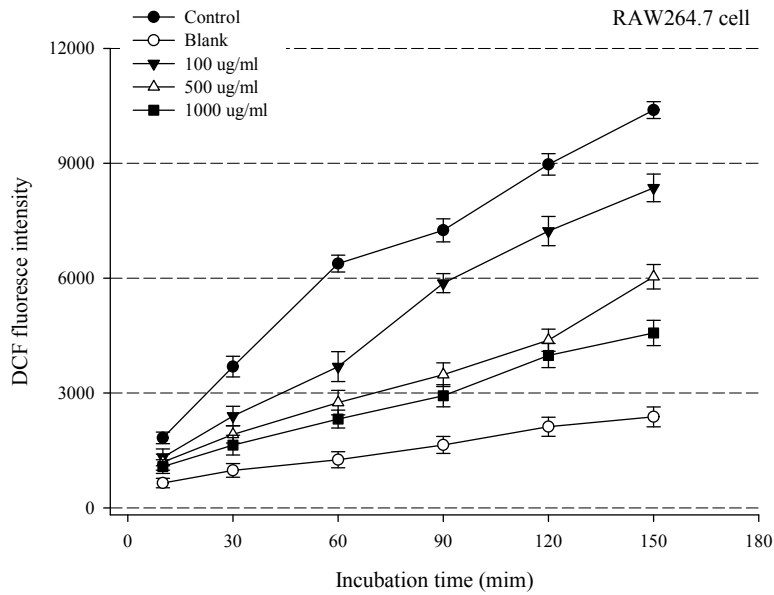


Fig. 41. 대식세포 (RAW 264.7 Cell) 내 자숙가공부산물 (BABs)의 라디칼 제거 효능 검토

(라) 자숙가공부산물 (BABs)의 처리에 따른 DNA oxidation 보호효과

Milne 등 (1993)의 방법을 변형하여 DNA Oxidation 보호효과를 측정하였다. RAW 264.7 cell의 DNA 5 μ l에 자숙가공부산물을 농도별 50, 500 그리고 1000 μ g/ml 각각 5 μ l씩 추가한다. 100 μ M FeSO₄ 14 μ l와 100 μ M H₂O₂를 첨가하고 vortex한 후 30분간 반응을 시킨다. 130mM EDTA 5 μ l를 추가한 후 Total양에서 20 μ l와 DNA loading buffer 4 μ l를 혼합하여 agarose 겔에서 30분간 100V 전기영동한다. 아가로스 겔은 EtBR (ethidium bromide)에 30분간 염색시킨다. UV를 이용한 AlphaEase[®] gel image analysis soft (Alpha Innotech, CA, USA)로 겔을 확인하였다.

자숙가공부산물 (BABs)을 250, 500 그리고 1000 μ g/ml로 처리한 결과 농도 의존적으로 DNA를 hydroxy radical에 의한 DNA손상을 효과적으로 보호하였다. 이는 자숙가공부산물이 항산화 활성을 가지고 있다는 것을 증명하였다 [Fig. 42].

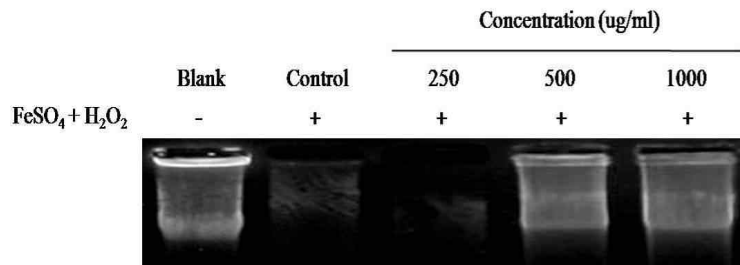


Fig. 42. DNA oxidative protection by BABs (boiled abalone by-products)

나. 대식세포 내 NO 및 iNOS 저해 효능 검토를 통한 우수 면역활성 획득 선별

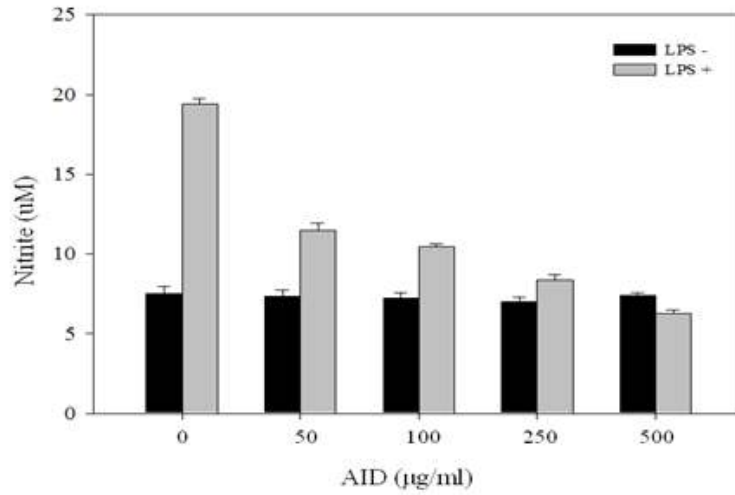
대식세포의 기능에는 비특이적 식작용 및 세포흡수작용, Fc 수용체 및 보체 수용체에 의해 증대되는 opsonin작용을 받은 미생물에 대한 특이적 식작용, 섭취된 미생물의 살해, T 및 B 림프구에 대한 항원의 출현, lysozyme, collagenase, elastase, acid hydrolase 등의 많은 효소, 몇 개의 보체성분 및 응고인자, prostaglandin, leukotriene 및 몇 개의 조절분자 (interferon, interleukin-1)를 포함한 여러 가지 산물의 분비 등이 있다. 또 대식세포는 iNOS 및 다양한 cytokines와 매개하여 면역 활성화에 관여하며, lymphokine의 일종인 interferon γ (대식세포 활성화인자)에 의해 활성화된다. 유리 대식세포에는 폐포 대식세포, 복막 대식세포, 과립 대식세포, 림프 등의 조직 대식세포가 있으며 결합 대식세포에는 간의 성세포 (Kupffer's cell), 림프조직 결합성 대식세포, 기타의 조직결합성 대식세포가 있다. NO는 내피세포에서 발생하는 가장 중요한 물질로서 각광을 받고 있다. Nitric oxide (NO)는 혈압조절, 신경전달, 혈소판 응집억제, 면역기능 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NO를 생성하는 효소인 NO synthase (NOS)는 arginine의 guanidino nitrogen을 산화시켜 citrulline과 NO를 생성하게 된다. NOS는 endothelial (ecNOS, type III NOS), neuronal NOS (ncNOS, type I NOS) 및 inducible NOS (iNOS, type II)로 크게 나뉘는데, ecNOS와 ncNOS가 constitutive form으로 적은 기저 생성량을 가지고 있고, calcium/calmodulin에 의존적이다. 반면에 iNOS는 inducible form으로 자극에 의해 많은 양의 NO를 생성하고, calcium에 비의존적이다. iNOS는 대식세포 외에도 췌장베타세포, 내피세포, 혈관평활근세포, mesangial cell등에도 분포하고 있다. iNOS는 평상시 세포에서는 활성화 및 발현이 거의 없으나, LPS, IFN- γ , IL-1과 TNF- α 등의 자극에 의해 활성화되어 장시간동안 다량의 NO를 생성하여 병원균을 죽이거나 세포 독성을 나타낼 수 있다. 그러나 NO가 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다.

주요 샘플들이 가지는 면역활성 효능을 규명하기 위해 RAW 264.7 cell을 배양하여 염증유발인자인 LPS (lipopolysaccharide)를 처리하였다. 샘플을 농도별로 처리한 다음 이들 인자들에 대한 영향을 분자세포수준에서 확인하기 위하여 주요 면역조절인자인 NO (nitric oxide) 및 iNOS (inducible nitric oxide synthase)에 대한 발현 및 활성화 정도를 평가하기 위해 RT-PCR과 western blotting을 수행하였다.

(1) NO 생성 저해 활성화

LPS로 염증반응이 유도된 RAW 264.7 대식세포에 농도별로 전복 내장 가수분해물(AID, AIG, AIGID)을 처리하여 NO 생성능을 측정함으로써 염증반응 억제 효과를 판단할 수 있었다. Fig. 43에서의 결과 AID는 농도 50-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, AIG, AIGID는 농도 10-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 우수한 NO 생성 저해활성을 나타냄으로써 항염증 샘플로서의 가능성을 나타내었다.

(A)



(B)

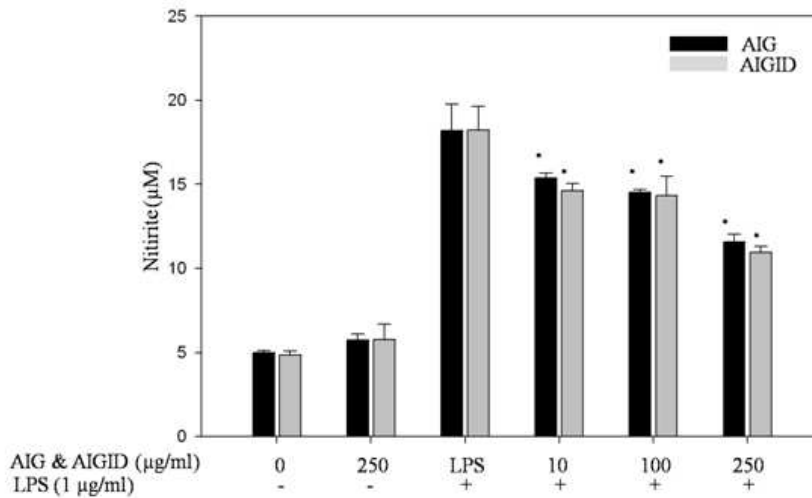


Fig. 43. 대식세포에서 AID (A), AIG, AIGID (B) 에 의한 NO 생성 저해 효능

(2) iNOS (inducible NO synthase) 발현 저해활성

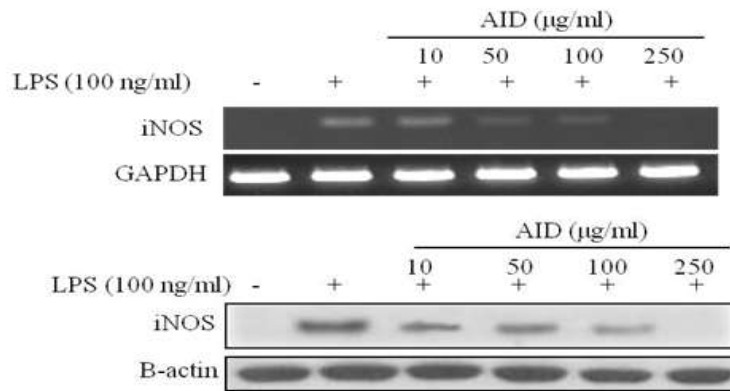
NO 생성 효소인 inducible NO synthase (iNOS) 발현 저해활성을 western blot 방법과 RT-PCR 방법을 Jung 등 (2009)의 방법을 변형하여 단백질 및 유전자 레벨에서 저해활성을 검토하였다.

Western blot는 세포에 AID, AIG, AIGID 를 24 시간동안 처치한 후 cell lysate를 laemmli sample buffer로 3분간 끓이고 30 µg protein을 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)에 loading하여 iNOS의 발현정도를 분석한다. SDS-PAGE 후 protein을 polyvinylidene difluoride membranes에 transfer하고, 30분간 PBS containing 0.1% tween 20 (PBS-T) and 5% (w/v) dry skim milk powder로 30분간 blocking한다. Primary antibody로는 anti-SOD 및

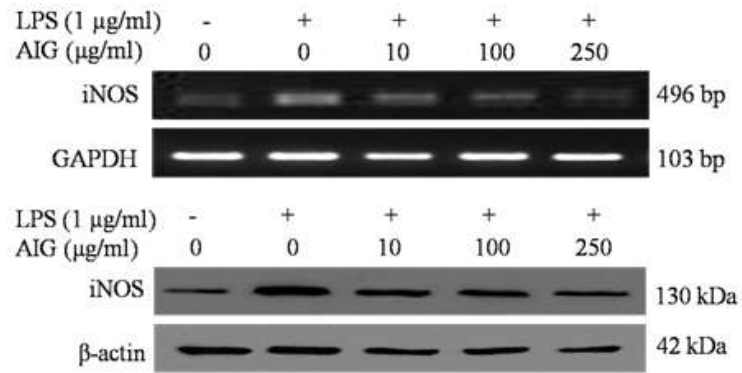
anti-GSH (Santa Cruz Biotechnologies, Inc.) 등의 polyclonal 또는 monoclonal antibody를 사용하며, secondary antibody로는 HRP-conjugated-anti-rabbit 또는 anti-mouse antibody를 사용한다. Immunoreactive한 단백질은 ECL Plus Western blotting analysis system (Amersham)으로 발색하여 Autoradiography film에 노출시켜 검출한다. RT-PCR 분석은 LPS에 발현된 iNOS mRNA 발현을 분석한다. 분석 시 내부 control 물질로써 GAPDH을 사용하며 해당 RNA는 Trizol reagent로 extraction한다. 2 µg total RNA는 AMV reverse transcriptase에 의해 cDNA로 역전사된다. 각 PCR 수행 시 사용되는 oligonucleotide, 즉 primer를 예를들면, human iNOS mRNA의 PCR을 위한 primer로써는 5' -TTTGCCACGGACGAGACGGAT-3' (forward primer), 5' -GCCACTGACACTTCGCACAAA-3' (reverse primer)가 사용되며 human GAPDH 5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (forward primer) 및 5' -TCCACCACCCTGTTGCTTGTA-3' (reverse primers)가 있다.

Fig. 44 A, B, C 는 전복 내장 가수분해물 (AID, AIG, AIGID)에 대한 주요 면역조절인자 iNOS에 대한 영향을 분자수준에서 Western blot 및 RT-PCR로 분석한 결과이다. 그 결과 iNOS (inducible nitric oxide synthase)에 대한 유전자 및 단백질의 발현을 유의적으로 억제함으로써 뛰어난 염증 저해 효능을 가지는 것으로 나타났다.

(A)



(B)



(C)

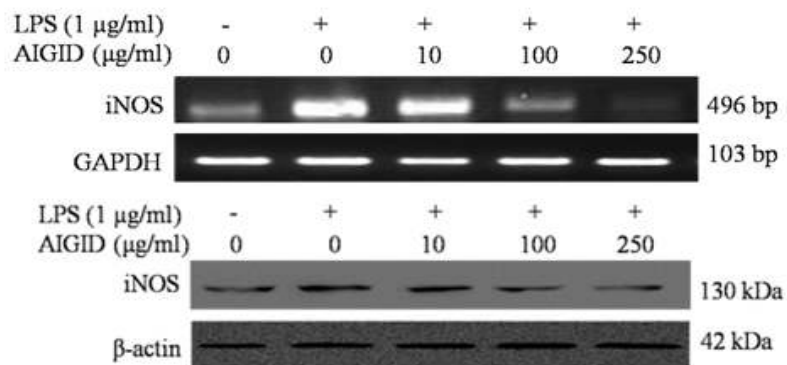


Fig. 44. 대식세포에서의 AID, AIG, AIGID에 의한 iNOS mRNA 및 단백질 발현 저해 활성

4. 최종 선별된 후보소재들에 대한 면역세포 내 약리효능 및 활성화기전 규명

가. 대식세포 내 cytokine 등 면역조절인자 및 주요 면역활성 pathway 규명

(1) Cytokine (IL-6, IL-1 β 와 TNF- α)변화 검토

IL-6, IL-1 β 와 TNF- α 등 Cytokine 변화를 측정하였다. 일반적으로 염증반응은 우리 몸의 여러 기능을 조절하며 최근에는 암, 당뇨 등 많은 질환에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 염증반응을 조절하는 중요한 인자는 cytokine들로 알려져 있다.

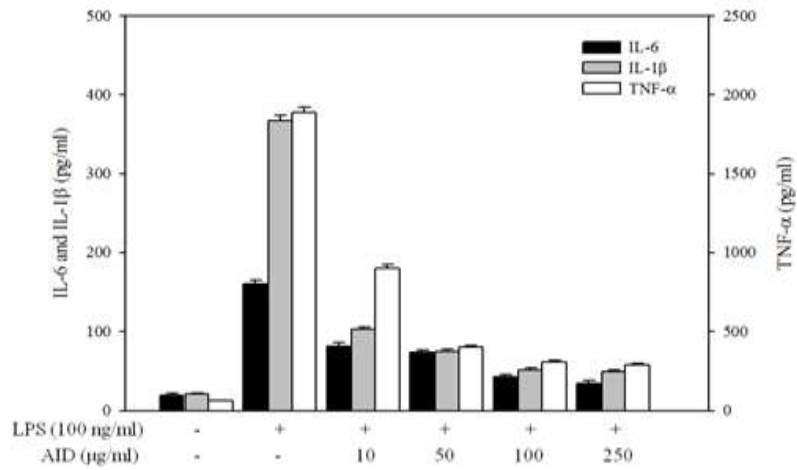
이들 사이토카인들은 여러 면역세포들에서 발현되며 우리 몸의 중요한 기능을 조절하는 중요한 단백질들이며 이들 중 IL-1은 가장 먼저 밝혀진 염증 사이토카인으로 가장 중요한 염증조절 인자다. IL-1은 활성화된 단핵식균세포, 상피세포 (epithelial cells), 혈관내피세포 (endothelial cell)등에 의해 만들어져 염증반응을 매개하는 cytokine이다. IL-6는 주로 대식세포나 T-림파구, 섬유모세포 등에서 분비되는 전구염증성 cytokine으로 B-림파구에서 면역글로블린의 생성을 유도하고, T-림파구의 증식과 세포독성 T-세포로 분화시키는 역할을 한다. 뿐만 아니라 감염에 대한 급성 반응에 관여하는 주된 cytokine 중 한 가지이다. 감염 및 전신적 염증과 관련된 생리학적 반응의 심한 정도와 밀접하게 관련되어있는 IL-6는 패혈증 환자에서 1000배 이상 증가된다.

TNF- α 는 그람음성세균 감염에 의해서 만들어지는 데, 세균의 세포막에 있는 내독소 (bacterial endotoxin)인 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 활성화된 림프구에 의해서 만들어진 다. LPS의 양이 적은 경우는 TNF- α 가 적은 양 생성되어, 백혈구나 혈관세포에 작용하여 국소적인 염증반응이 나타나 항원이 제거된다. 낮은 양의 TNF- α 는 염증반응에서 백혈구들이 혈관내피세포에 부착하는 것을 촉진하며, 염증세포들의 미생물 살해능력을 증가시키며, mononuclear phagocytes에 작용하여 여러 가지 염증반응에 관여하는 cytokine을 생산하게 만들어 염증반응을 촉진한다.

Fig. 45A는 Heo 등 (2010)의 방법을 변형하여 AID가 세포에서 IL-6, IL-1 β 와 TNF- α 등 Cytokine 함량에 대한 영향을 측정한 결과이다. 세포를 24-well plate로 104 세포 밀도로 2 일 동안 배양한 후, 배지를 10% FBS를 함유한 DMEM으로 대체하였다. 이어서, 세포를 상이한 농도의 AID으로 1 시간 동안 예비처리하고 LPS로 처리하였다. 24 시간 후, 배양 배지 중의 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 함량을 효소 면역분석 키트 (Amersham Biosciences, Sweden)를 이용하여 측정하였다. 그 결과 AID는 농도 의존적으로 염증 관련인자의 함량을 감소시키는 것으로 나타내었다. Fig. 45B는 각 Cytokine 유전자 수준에서 AID에 의해 농도 의존적으로 그 발현이 저해되는 것을 확인 할 수 있었다.

AIG와 AIGID도 각 Cytokine 유전자의 발현을 RT-PCR 방법으로 검토하였다. 그 결과 Fig. 46 A, B에서 농도 의존적으로 유전자 발현을 저해 되는 것을 확인하였다.

(A)



(B)

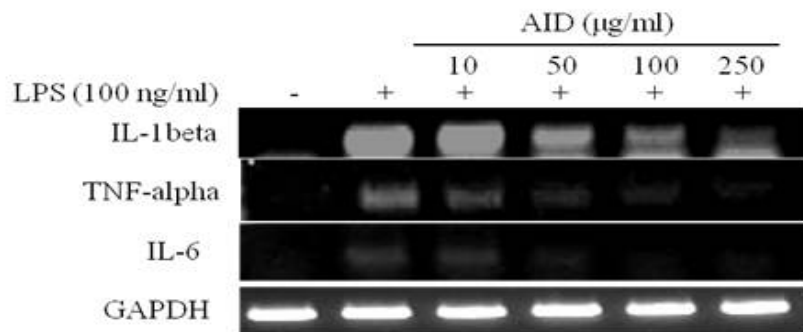
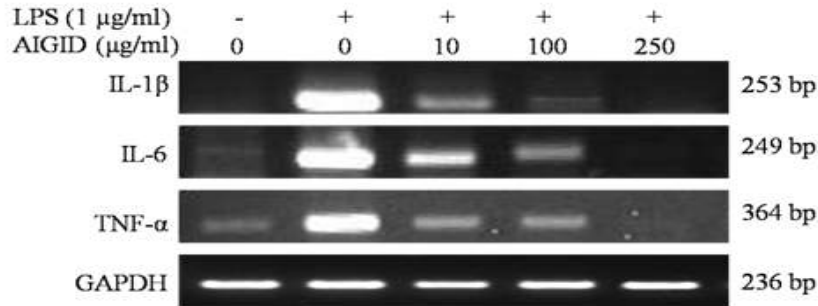


Fig. 45. AID에 의한 IL-6, IL-1β와 TNF-α 등 Cytokine의 영향

(A)



(B)

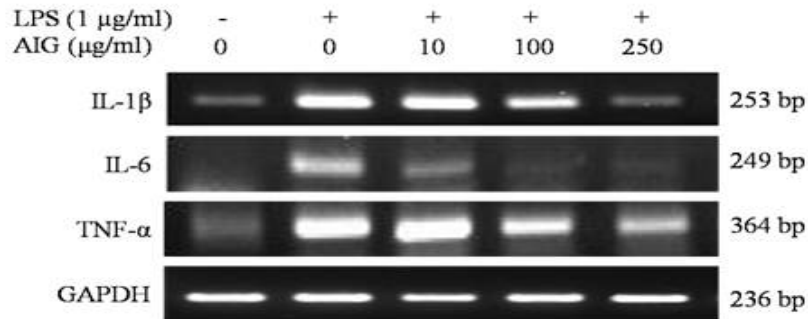
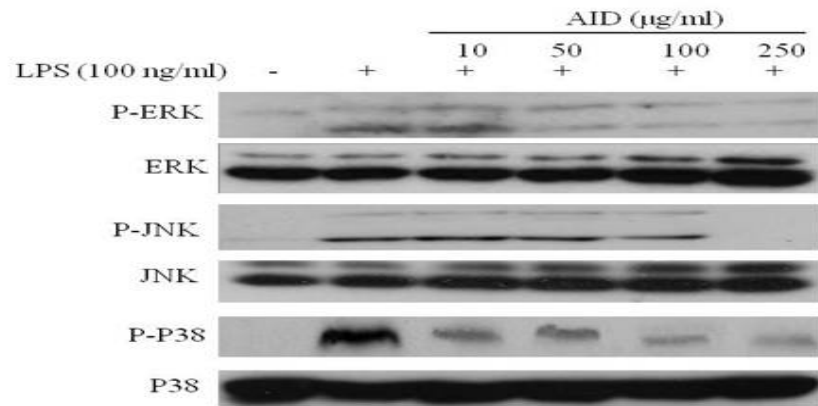


Fig. 46. AIG와 AIGID에 의한 IL-6, IL-1 β 와 TNF- α 등 Cytokine 유전자의 영향

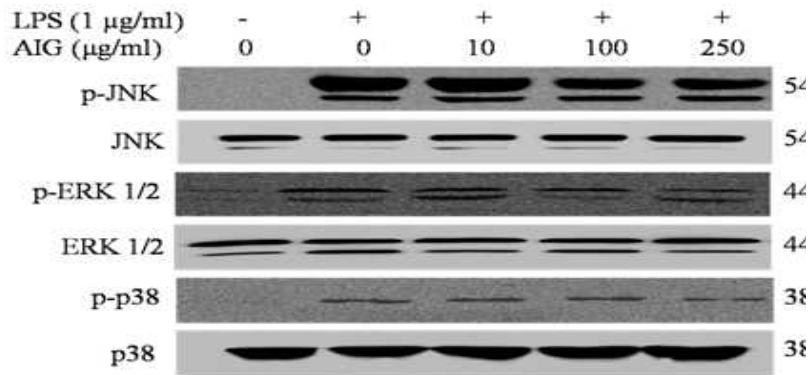
(2) MARK pathway 상의 조절기전 활성화

사이토카인의 영향은 분자 수준에서 어떤 경로를 통해 진행 되었는가를 확인하기 위하여 MAPK 경로를 Western blot방법으로 확인하였다. 세포내 신호 전달에 중요한 작용을 갖는 것으로 알려진 MAPK는 ERK, p38, JNK 등의 세 가지 그룹으로 분류된다. 일반적으로 ERK는 integrin 세포 성장 수용체, 이온 채널, 타이로신 수용체들의 활성을 통해서 영향을 받는 것으로 알려져 있다. ERK는 MAPK 중에서 다양한 수용체들에 의해서 활성을 나타내 세포 자극 물질들에 따라 여러가지 전사 조절인자들을 활성화시켜 세포 성장, 분화 등에 관련된 유전자 발현을 유도하는 것으로 보고되고 있다. p38 MAPK는 UV, 사이토카인들, 성장 인자 등 여러 가지 물질들에 의해서 활성화되어 세포사멸 (apoptosis), 사이토카인 생성 등에 영향을 주는 유전자 발현을 유도하는 것으로 보고되고 있다. JNK는 UV, 성장인자, 사이토카인, GPCR 길항제 등에 의해서 활성을 갖게 된다. 세포내 활성화된 JNK는 세포성장, 분화, 사멸, 생존에 관여하는 유전자 발현을 유도하는 것으로 보고되어 있다. 대표적인JNK는 p38 MAPK과 유사한 신호 전달에 의해서 세포내 유전자 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다.

(A)



(B)



(C)

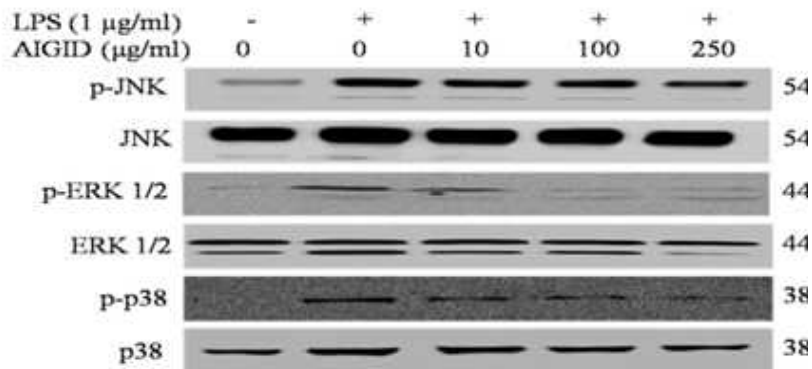


Fig. 47. AID, AIG, AIGID에 의한 MAPK 경로 탐색

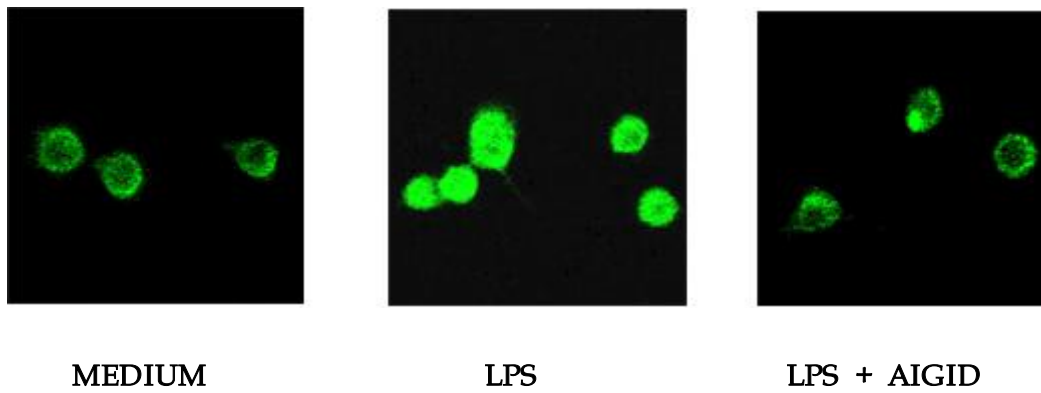
Fig. 47에서 보여준 결과 AID는 MAPK 경로에서 인산화 된 ERK1/2, p38, 및 JNK 단백질의 발현을 저해함으로써 항염증 활성을 나타내었다. 또한, AIG는 RAW264.7 세포에 인산화 된 ERK 1/2 단백질 키나아제 발현을 감소하여 항염증 효과를 나타내는 것을 보여주었다. 그리고 AIGID는 RAW264.7 세포에서 인산화 된 ERK 1/2 및 p38 단백질 키나아제 발현을 저해함으로써 항염증 효과를 나타내는 것을 보여주었다. 이러한 결과는 전복 내장에서 얻은 AID, AIG, AIGID는 항염증 효과를 나타냄으로써 항염증제 후보물질로서의 가능성을 보여주었다.

(3) 전복 내장 가수분해물의 핵 전사인자인 NF- κ B의 핵 내로의 전이 및 활성 저해 효능
염증 관련 세포 (RAW 264.7)를 대상으로 실시한 핵 전사인자인 NF- κ B의 핵 내로의 전이 및 활성에 대한 전복 내장 가수분해물의 영향을 관찰하였다. **Fig. 48**와 같이 AIGID는 염증 관련 분자들의 발현 억제를 핵전사인자의 조절 수준을 통하여 억제됨을 알 수 있었다.

Nuclear factor- κ B (NF- κ B)는 전사인자의 Rel family에 속하는 heterodimer 단백질로 NF- κ B는 정상적으로 세포질에 I κ Bs라는 억제 단백질과 결합되어 불활성상태로 존재한다. NF- κ B 활성을 유도한다고 알려진 TNF- α , IL-1, mitogens, LPS 및 virus 감염등 여러 자극에 의하여 I κ Bs가 인산화 되면 NF- κ B가 I κ Bs로부터 떨어져 나와 핵으로 이동한다. 핵으로 이동한 NF- κ B는 주로 염증 및 면역반응에 관여하는 여러가지 유전자의 promoter부위에 결합하여 이들 유전자를 발현시키는데, NF- κ B에 의해 조절되는 염증 및 면역반응 조절물질에는 interleukin (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon- γ , granular macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), class I 및 II MHC, vascular endothelial growth factor (VEGF), 그리고 여러가지 adhesion molecules 등 매우 다양하다.

NF- κ B는 염증에 관여하는 pro-inflammatory cytokines 및 adhesion molecules의 유전자를 발현시키기 때문에 초기 염증 반응 조절에 중요한 전사인자로 알려져 있다. 아울러 NF- κ B는 패혈증의 시작과 진행과정에도 염증관련 분자의 발현을 조절하는 역할을 하는 것으로 밝혀져 있어, 염증반응에 의한 다양한 질환의 치료의 표적 물질으로써 NF- κ B는 그 중요성이 강조되고 있다.

(a)



(b)

LPS (1 mg/ml)	-	+	+	+
AIGID (1 mg/ml)	-	-	+	-
NF-κB Ab	-	-	-	+

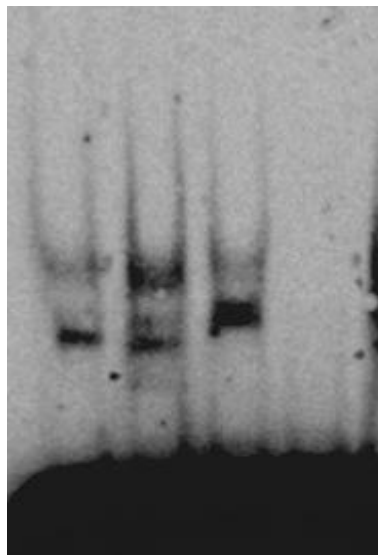


Fig. 48. Effect of AIGID on NF- κ B activity in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage. (a) NF- κ B localization in nucleus using confocal scanning microscopy (b) DNA binding activity of NF- κ B by EMSA assay

나. 비만세포주를 활용한 항 히스타민, IgE 레벨 측정 등 항알러지 효능 측정

(1) AIGID 샘플에 대한 비만세포주 내 효능 검토

(가) AIGID에 대한 인간 비만세포주 (HMC-1) 내 세포독성 (생존률) 조사

전복 내장 가수분해물 (AIGID) 처리 후 비만세포 (HMC-1)에 대한 시료의 농도 의존적 세포독성을 확인한 결과, 300 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지는 무처리 군의 세포 생존률 (blank: 100% cell viability)과 거의 비슷한 값을 보였다. 그러나 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 50% 이하의 생존률을 보였기 때문에 이후 연구는 최대 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 사용하였다 [Fig. 49].

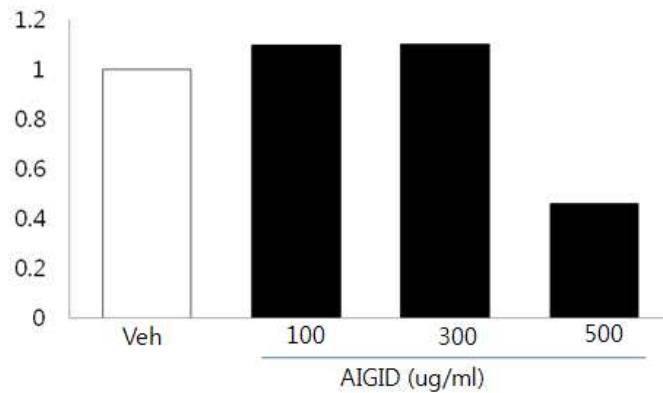


Fig. 49. AIGID의 농도별 처리에 따른 비만세포 (HMC-1)의 생존률

(나) AIGID의 히스타민 분비억제 효능

히스타민은 비만세포 및 호염기세포로부터 유리되는 화학매개체로 알레르기 질환에서 매우 중요한 역할을 한다. IgE가 감작된 후 항원에 의해 자극을 받거나 비특이적으로 자극 시, 히스타민을 포함하는 여러 가지 화학매개체가 비만세포 및 호염기세포에서 유리되며 특히 히스타민에 의해서 혈관확장과 혈장성분의 삼출이 일어나고, 또한 구심성 신경이 자극되어 기도의 평활근이 수축되면 점액분비가 항진되어 기관지천식, 알레르기성 비염, 결막염 등을 일으키고, 피부 말초혈관의 확장 등으로 두드러기, 아토피성 피부염 등의 증상을 일으킨다.

HNC-1 세포주를 AIGID로 전처리를 한 후 비만세포 자극제로 알려진 PMA+A23187로 자극하여 HPLC를 이용하여 비만세포에서 분비되는 히스타민량을 측정하였다. Fig. 50에서와 같이 200 $\mu\text{g/ml}$ 과 300 $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의하게 히스타민 분비를 억제하였다.

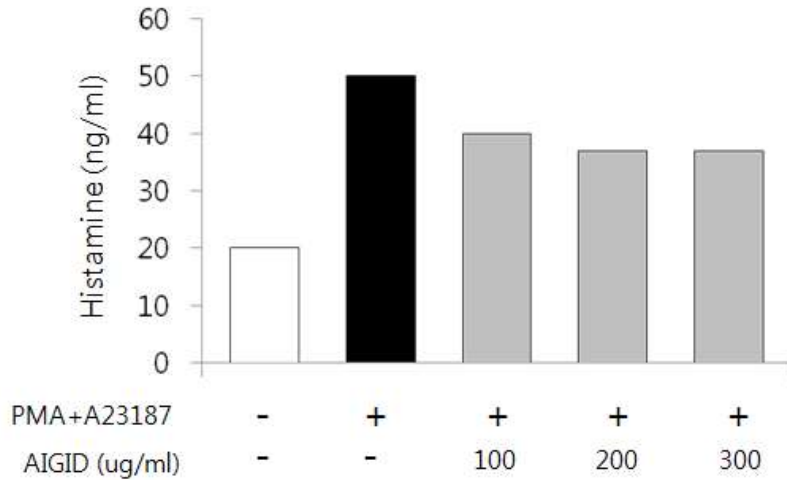


Fig. 50. PMA+A23187로 자극한 비만세포에서 AIGID의 농도별 처리에 따른 히스타민 억제작용.

(다) AIGID의 사이토카인 분비억제 효능

알러지 반응의 개념인 알러지성 염증반응은 히스타민이나 류코트리엔 과 같은 화학매체의 작용만으로는 설명하기 어렵다. 이전 많은 연구 결과에서 만성염증성 반응이 알러지 반응에서 공통적으로 발견 되었고, 특히 6 시간 전후에 나타나는 후기 반응의 기전이 염증반응으로 이해 되기 때문에 비만세포로부터 유리되는 화학매체외에 염증성 사이토카인인 종양괴사인자 알파 (TNF-a), 인터루킨-1 (IL-1)과 인터루킨-6 (IL-6)이 이러한 알레르기성 염증반응의 유도에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

따라서, 먼저 사이토카인의 유전자 발현 수준에서 AIGID의 사이토카인 발현 억제 효능을 조사하였다 [Fig. 51]. 그림에서와 같이 농도 의존적으로 염증성 사이토카인 TNF-a와 IL-6를 유전자 및 단백질 발현에 대해 유의하게 억제 효능을 보였다 [Fig. 52 & Fig. 53].

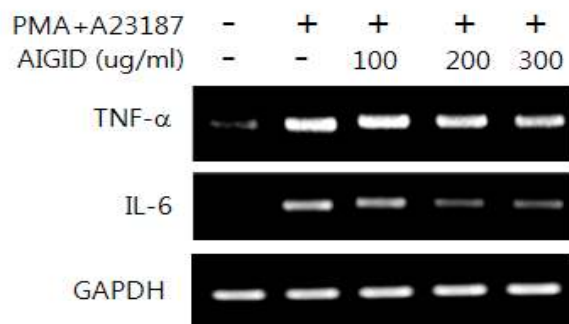


Fig. 51. PMA+A23187로 자극한 비만세포에서 AIGID 농도별 Cytokines 유전자 억제작용.

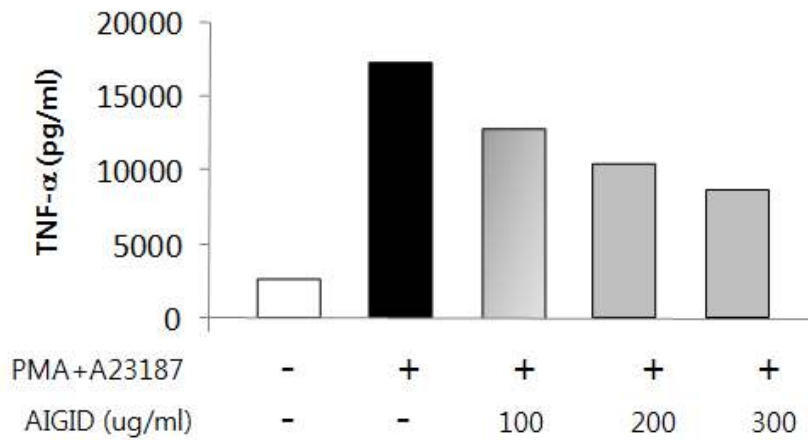


Fig. 52. PMA+A23187로 자극한 비만세포에서 AIGID의 농도별 처리에 따른 TNF-a 발현 억제 작용.

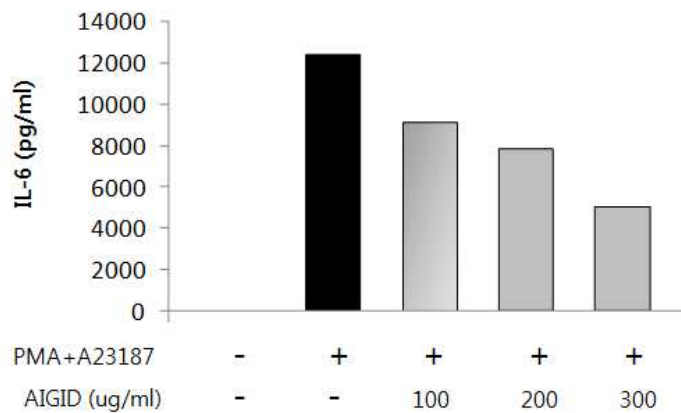


Fig. 53. PMA+A23187로 자극한 비만세포에서 AIGID의 농도별 처리에 따른 IL-6 발현 억제 작용.

(라) AIGID의 항알러지 효능 기전 연구

MAPK 기전은 세포 면역반응의 염증성 인자들의 조절에 매우 중요한 역할을 한다. 이전의 많은 연구에서, PMA+A23187은 HMC-1 세포주에서 MAPK의 세가지 타입인 p38, JNK, 그리고 ERK를 활성화 시킨다고 알려져 있다. 본 연구에서, AIGID의 항알러지 효능의 기전을 밝히기 위하여 MAPK의 인산화 유무를 western blotting analysis를 하였다. Fig. 54에서 처럼 AIGID는 ERK와 SAPK/JNK의 인산화를 유도하였으나 p38의 인산화는 영향을 주지 않았다. 따라서, 본 실험결과에 의하면 AIGID는 ERK와 SAPK/JNK의 세포내 신호경로를 통하여 항알러지 효능을 나타냄을 알 수 있었다.

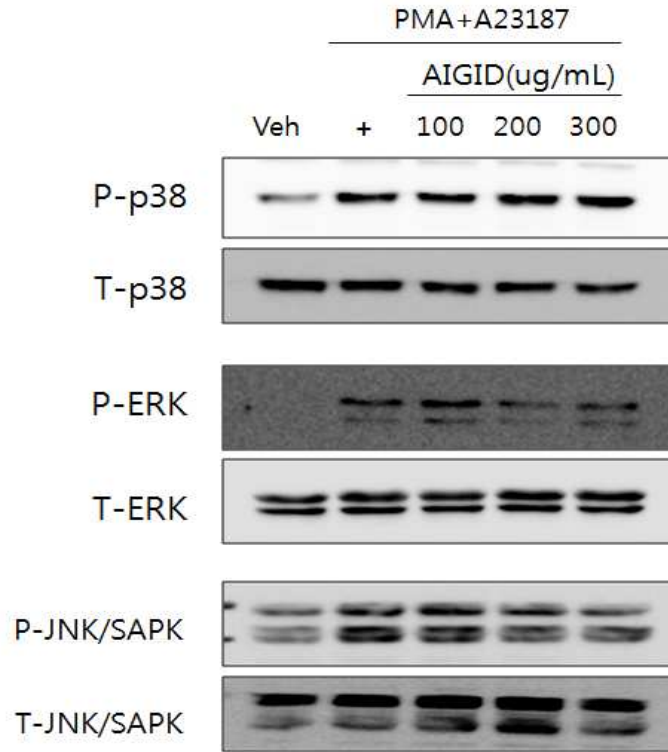


Fig. 54. 비만세포에서 AIGID에 의한 MAPK 경로 탐색

다음은, AIGID의 TNF-a 와 IL-6와 같은 염증성 사이토카인의 생성 억제 효능 기전을 알아보기 위하여 핵 전사인자인 NF-kB의 활성화를 알아보았다. TNF-a와 IL-6 생성은 전사인자인 NF-kB의 활성화에 의존한다. NF-kB의 활성화는 억제단백질인 Ikb-a의 인산화와 단백질 분해가 선행되어 이루어진다. PMA+A23187에 의해서 자극된 비만세포주에서 NF-kB의 활성화는 AIGID 처리에 의하여 농도 의존적으로 감소하였다 [Fig. 55]. 이러한 결과는 AIGID에 의해서 NF-kB의 활성화를 억제함으로써 염증성 사이토카인을 조절한다는 것을 의미한다.

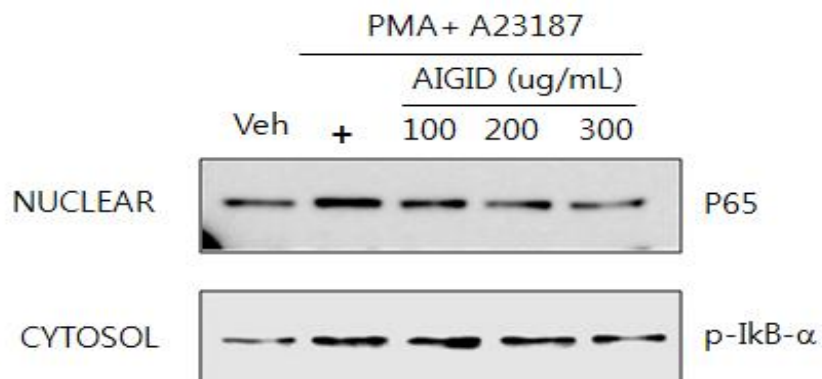


Fig. 55. 비만세포에서 AIGID에 의한 NF-kB 발현.

(2) AIGID II 에 대한 비만세포주 내 효능 검토

(가) AIGID II 에 대한 인간 비만세포주 (HMC-1) 생존률 조사

AIGID II 처리 후 비만세포 (HMC-1)에 대한 시료의 농도 의존적 세포독성을 확인한 결과, 무처리 군의 세포 생존률 (blank: 100% cell viability)과 거의 비슷한 값을 보였다. 따라서, 이후 연구는 최대 500 µg/ml의 농도를 사용하였다 [Fig. 56].

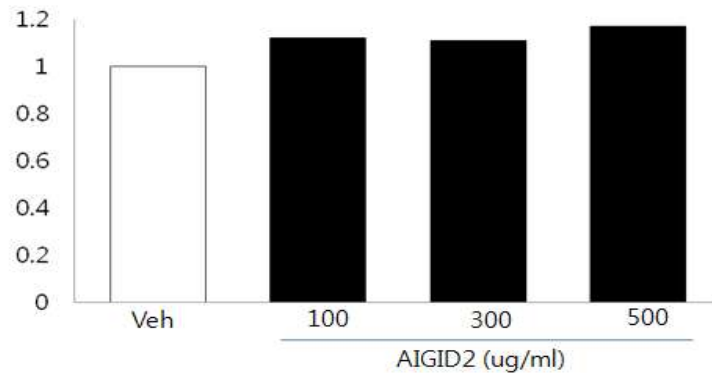


Fig. 56. AIGID II의 농도별 처리에 따른 비만주 세포 (HMC-1)의 생존률

(나) AIGID II의 히스타민 분비억제 효능

HMC-1 세포주를 AIGID II로 전처리를 한 후 비만세포 자극제로 알려진PMA+A23187로 자극하여 HPLC를 이용하여 비만세포에서 분비되는 히스타민량을 측정하였다. Fig. 57에서와 같이 농도 의존적으로 유의하게 히스타민 분비를 억제하였다.

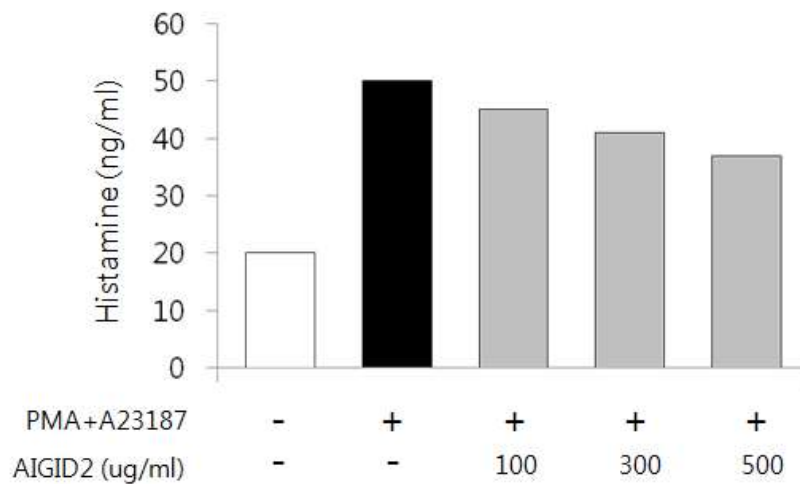


Fig. 57. PMA+A23187로 자극한 비만세포에서 AIGID II의 농도별 처리에 따른 히스타민 억제작용..

(다) AIGID II의 사이토카인 분비억제 효능

먼저 사이토카인의 유전자 발현 수준에서 AIGID의 사이토카인 발현 억제 효능을 조사하였다 [Fig. 58]. 그림에서와 같이 농도 의존적으로 염증성 사이토카인 TNF-a, IL-6 그리고 IL-1b를 유전자 수준에서 농도 의존적으로 유의하게 억제 효능을 보였다.

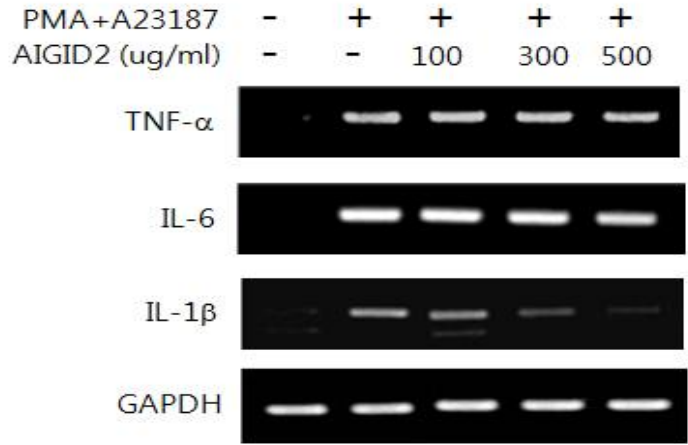


Fig. 58. PMA+A23187로 자극한 비만세포에서 AIGID II의 농도별 처리에 따른 Cytokines 유전자 억제작용.

다음 실험으로는 단백질 수준에서 사이토카인의 분비를 억제하는지를 연구하였다. 먼저 TNF-a, IL-6 그리고 IL-1b의 분비 억제효능을 조사하였다 [Fig. 59-61]

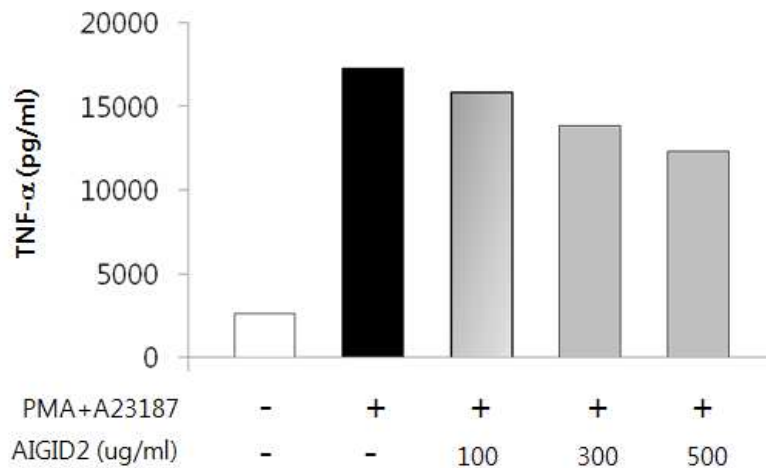


Fig. 59. PMA+A23187로 자극한 비만세포에서 AIGID II 농도별 TNF-a 발현 억제 효능

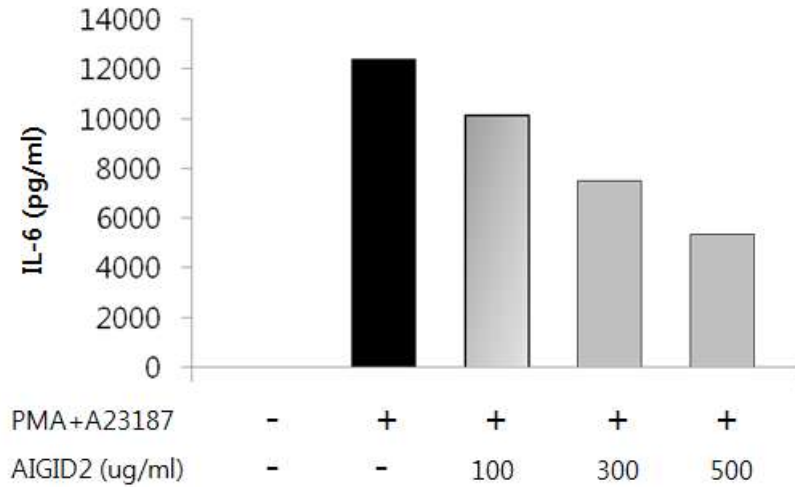


Fig. 60. PMA+A23187로 자극한 비만세포에서 AIGID II의 농도별 처리에 따른 IL-6 발현 억제 작용.

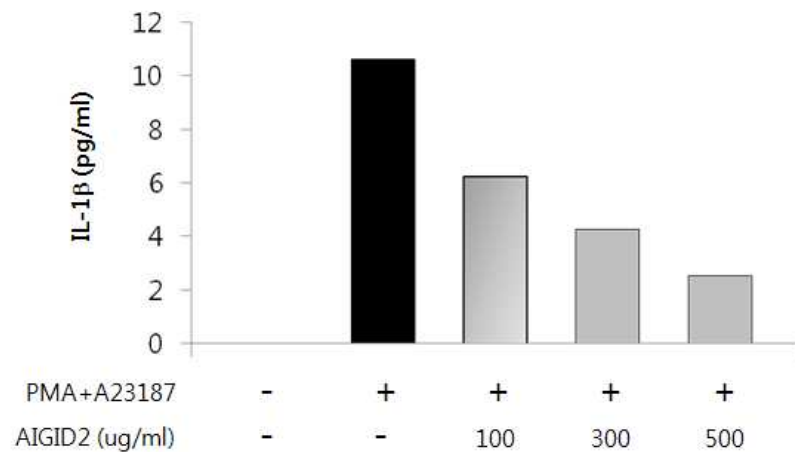


Fig. 61. PMA+A23187로 자극한 비만세포에서 AIGID II의 농도별 처리에 따른 IL-1β 발현 억제 작용

(라) AIGID II의 항알러지 효능 기전 연구

MAPK 기전은 세포 면역반응의 염증성 인자들의 조절에 매우 중요한 역할을 한다. 이전의 많은 연구에서, PMA+A23187은 HMC-1 세포주에서 MAPK의 세가지 타입인 p38, JNK, 그리고 ERK를 활성화 시킨다고 알려져 있다. 본 연구에서, AIGID II의 항알러지 효능의 기전을 밝히기 위하여 MAPK의 인산화 유무를 western blotting analysis를 하였다. Fig. 62에서 처럼 AIGID II는 p38와 SAPK/JNK의 인산화를 유도하였으나 ERK의 인산화는 영향을 주지 않았다.

따라서, 본 실험결과에 의하면 AIGID II는 p38와 SAPK/JNK의 세포내 신호경로를 통하여 항알러지 효능을 나타냄을 알 수 있었다.

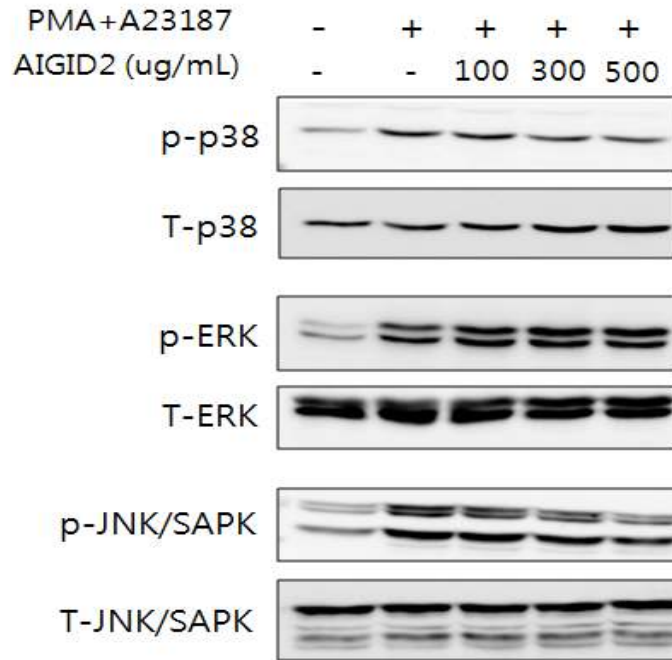


Fig. 62. 비만세포에서 AIGID II에 의한 MAPK 경로 탐색

다음은, AIGID II의 TNF-a, IL-6 그리고 IL-1b와 같은 염증성 사이토카인의 생성 억제 효능 기전을 알아보기 위하여 핵 전사인자인 NF-kB의 활성화를 알아보았다. 사이토카인의 생성은 전사인자인 NF-kB의 활성화에 의존한다. NF-kB의 활성화는 억제단백질인 Ikb-a의 인산화와 단백질 분해가 선행되어 이루어진다. PMA+A23187에 의해서 자극된 비만세포주에서 NF-kB의 활성화는 AIGID II 처리에 의하여 농도 의존적으로 감소하였다. 이러한 결과는 AIGID II에 의해서 NF-kB의 활성화를 억제함으로써 염증성 사이토카인을 조절한다는 것을 의미한다 [Fig. 63].

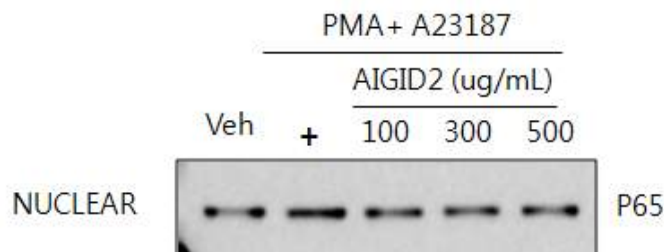


Fig. 63. 비만세포에서 AIGID II에 의한 NF-kB 발현.

(3) AIGID III에 대한 비만세포주 내 효능 검토

(가) AIGID III에 대한 인간 비만세포주 (HMC-1) 생존률 조사

AIGID III 처리 후 비만세포 (HMC-1)에 대한 시료의 농도 의존적 세포독성을 확인한 결과, 무처리 군의 세포 생존률 (blank: 100% cell viability)과 거의 비슷한 값을 보였다. 따라서, 이후 연구는 최대 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 사용하였다 [Fig. 64].

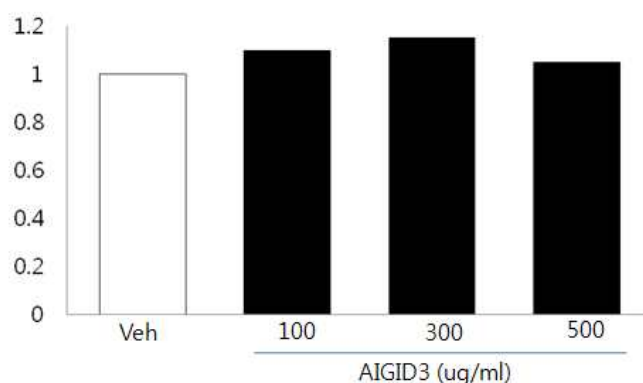


Fig. 64. AIGID III의 농도별 처리에 따른 비만주 세포 (HMC-1)의 생존률.

(나) AIGID III의 히스타민 분비억제 효능

HMC-1 세포주를 AIGID II로 전처리를 한 후 비만세포 자극제로 알려진 PMA+A23187로 자극하여 HPLC를 이용하여 비만세포에서 분비되는 히스타민량을 측정하였다. Fig. 65에서와 같이 농도 의존적으로 유의하게 히스타민 분비를 억제하였다.

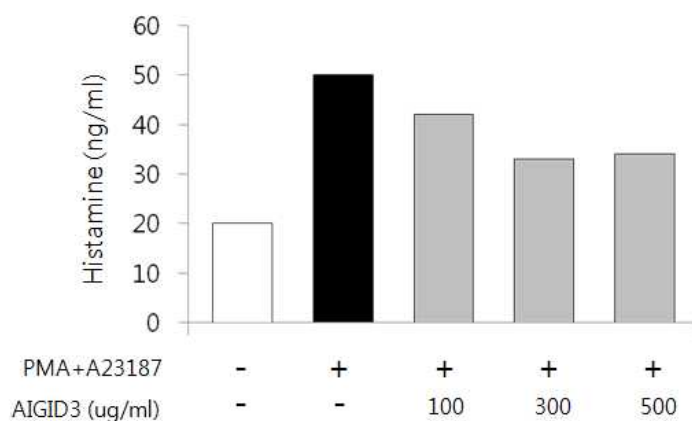


Fig. 65. PMA+A23187로 자극한 비만세포에서 AIGID III의 농도별 처리에 따른 히스타민 억제작용.

(다) AIGID III의 사이토카인 분비억제 효능

먼저 사이토카인의 유전자 발현 수준에서 AIGID III의 사이토카인 발현 억제 효능을 조사하였다 [Fig. 66]. 그림에서와 같이 농도 의존적으로 염증성 사이토카인 TNF-a, IL-6 그리고 IL-1b를 유전자 수준에서 농도 의존적으로 유의하게 억제 효능을 보였다.

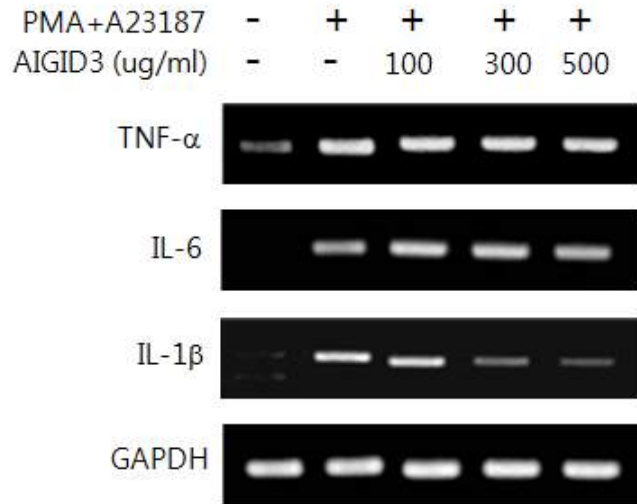


Fig. 66. PMA+A23187로 자극한 비만세포에서 AIGID III의 농도별 처리에 따른 Cytokines 유전자 억제작용.

다음 실험으로는 AIGID III가 단백질 수준에서 사이토카인의 분비를 억제하는지를 연구하였다. 먼저 TNF-a, IL-6 그리고 IL-1b의 분비 억제효능을 조사하였다 [Fig. 67 - 69].

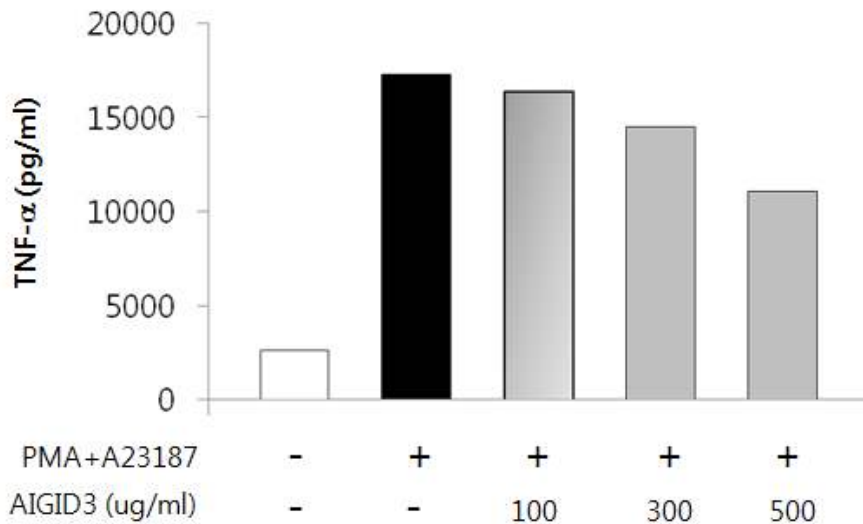


Fig. 67. PMA+A23187로 자극한 비만세포에서 AIGID III의 농도별 처리에 따른 TNF-a 발현 억제 작용.

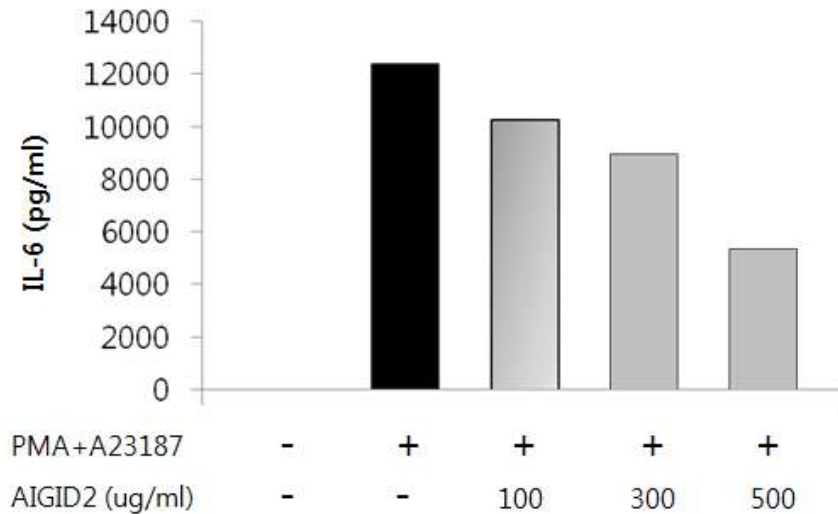


Fig. 68. PMA+A23187로 자극한 비만세포에서 AIGID III의 농도별 처리에 따른 IL-6 발현 억제 작용.

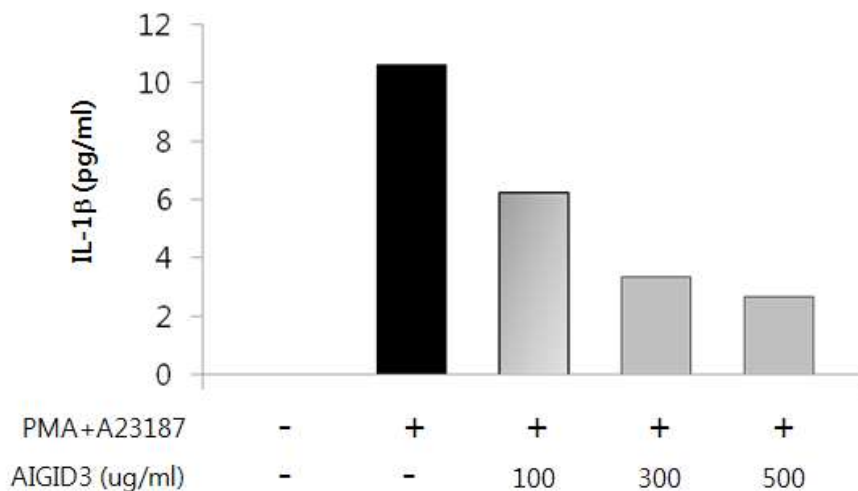


Fig. 69. PMA+A23187로 자극한 비만세포에서 AIGID III의 농도별 처리에 따른 IL-1β 발현 억제 작용.

(라) AIGID III의 항알러지 효능 기전 연구

MAPK 기전은 세포 면역반응의 염증성 인자들의 조절에 매우 중요한 역할을 한다. 이전의 많은 연구에서, PMA+A23187은 HMC-1 세포주에서 MAPK의 세가지 타입인 p38, JNK, 그리고 ERK를 활성화 시킨다고 알려져 있다. 본 연구에서, AIGID III의 항알러지 효능의 기전을 밝히기 위하여 MAPK의 인산화 유무를 western blotting analysis를 하였다. Fig. 70에서처럼 AIGID III는 p38와 SAPK/JNK의 인산화를 유도하였으나 ERK의 인산화는 영향을 주지 않았

다. 따라서, 본 실험결과에 의하면 AIGID III는 p38와 SAPK/JNK의 세포내 신호경로를 통하여 항알러지 효능을 나타냄을 알 수 있었다.

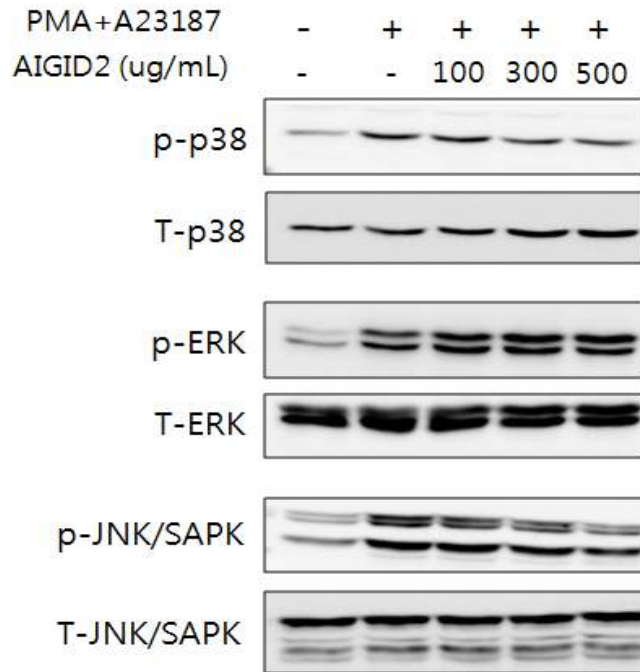


Fig. 70. 비만세포에서 AIGID III에 의한 MAPK 경로 탐색.

다음은, AIGID III의 TNF- α , IL-6 그리고 IL-1 β 와 같은 염증성 사이토카인의 생성 억제 효능 기전을 알아보기 위하여 핵 전사인자인 NF-kB의 활성화를 알아보았다. 사이토카인의 생성은 전사인자인 NF-kB의 활성화에 의존한다. NF-kB의 활성화는 억제단백질인 I κ B-a의 인산화와 단백질 분해가 선행되어 이루어진다. PMA+A23187에 의해서 자극된 비만세포주에서 NF-kB의 활성화는 AIGID III 처리에 의하여 농도 의존적으로 감소하였다 [Fig. 71]. 이러한 결과는 AIGID III에 의해서 NF-kB의 활성화를 억제함으로써 염증성 사이토카인을 조절한다는 것을 의미한다.

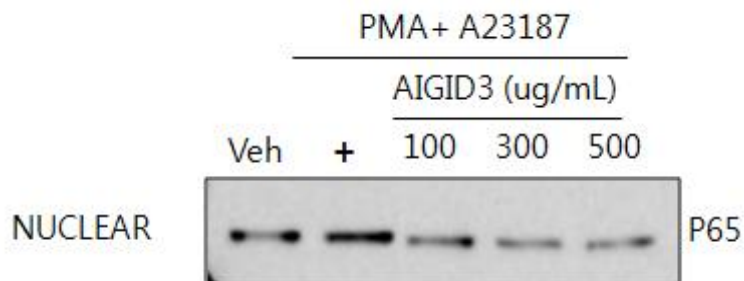


Fig. 71. 비만세포에서 AIGID III에 의한 NF-kB 발현.

5. 우수 면역활성효능 획분 내 활성물질 분리 및 특성 검토

가. 전복 내장 가수분해물 유래 면역활성물질 분리 및 정제

앞서 수행한 연구결과를 바탕으로, 면역활성 (항염증 및 항알러지)에 대한 가장 우수한 활성을 보유한 획분 AIGID III를 대상으로 활성물질을 분리 정제하였다.

즉 Fig. 72에서 나타난 것과 같이, FPLC를 응용한 음이온 컬럼 분리, ODS 컬럼을 사용한 HPLC, ESI-Q-TOF를 사용한 펩타이드 Sequence 확인 과정을 거쳤다. 즉 가수분해물 1 g을 20 ml의 물에 녹여 DEAE 음이온 교환수지가 들어있는 column이 장착된 FPLC (fast performance liquid chromatography)에 2 mL를 용리한 후, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)와 2 M NaCl용액을 사용하여 직선상 농도구배법에 의해 NaCl 농도를 2 M까지 서서히 높여가며 용출시켰다. Fig. 73 에서와 같이 280 nm에서 흡광도로 측정된 각 4개의 획분은 전기투석기로 탈염시켜 동결건조한 후, 생리활성을 측정하였다.

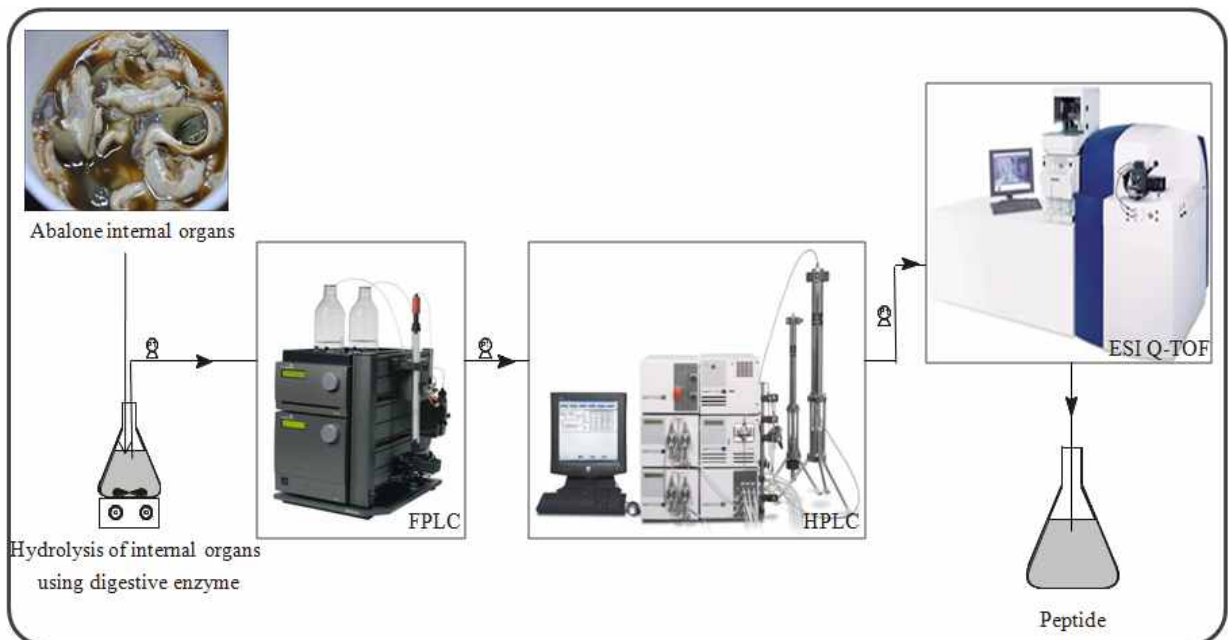


Fig. 72. 전복 내장 가수분해물(AIGID III)의 활성물질 분리 정제 과정

각 획분의 수율은 음이온 수지의 흡착 부분인 Fr IV 획분 15.2%으로 가장 많은 수율을 나타내었는데 대량생산에 용이함을 위하여 본 획분을 다시 HPLC로 분리 정제를 진행하였다.

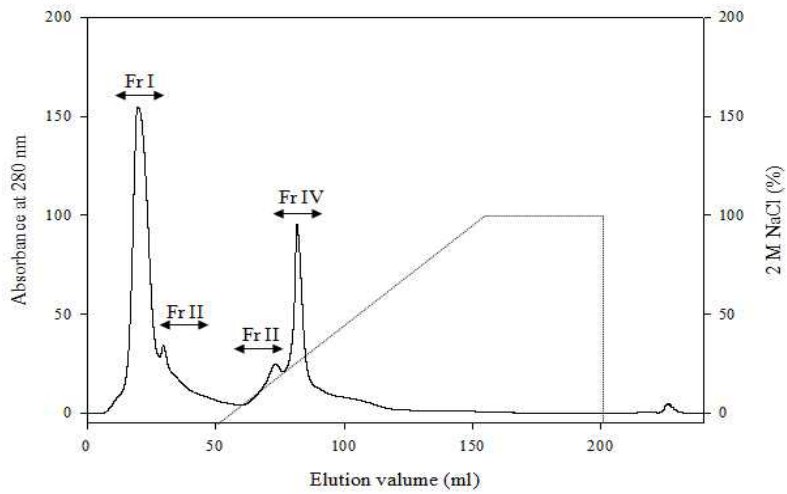


Fig. 73. FPLC를 사용한 AIGID III 분리 정제

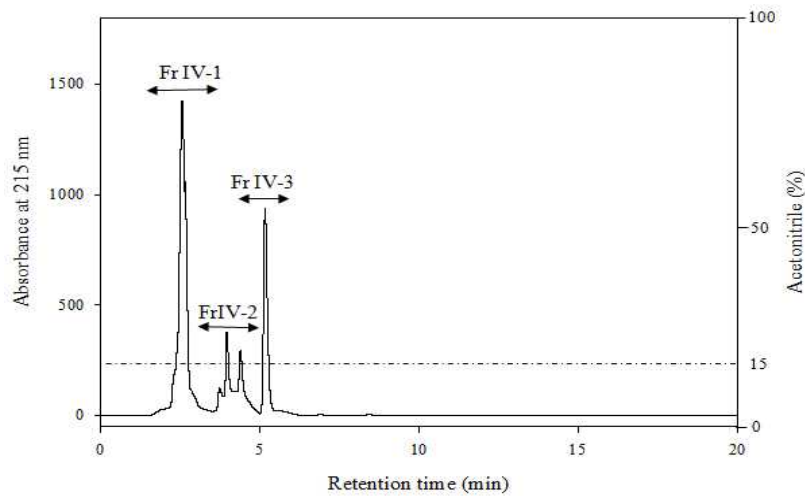


Fig. 74. FrIV 를 HPLC를 사용하여 분리 정제

FPLC 획분 중에서 가장 수율과 활성이 우수한 FrIV은 다시 HPLC 분리하여 3개의 획분으로 분리되었다 [Fig. 74].

획분을 농축한 후 fraction IV-3 단일피크를 얻었다. 해당 피크는 성분분석을 통해 저분자 oligopeptide 로 확인되었다. 해당 peptide 획분의 최종 활성을 최종 검토하였으며 (NO 저해 활성 $IC_{50} = 44.25 \mu M$), ESI-QTOF를 이용한 de nove 서열결정을 통해 최종 구조분석을 실시하였다.

나. 활성물질 아미노산 서열결정 및 동정

펩타이드의 아미노산 서열을 분석한 결과 [Fig. 75], Pro-Phe-Asn-Glu-Gly-Thr-Phe-Ala-Ser (1175.2 Da)의 9개 아미노산 잔기로 구성되어 있었다. NCBI Blast 분석을 통해 단백질 동정한 결과, 척추 및 무척추 동물의 선천성 면역 시스템에서 pathogen을 인지하는 ficolins 단백질과 약 50%의 상동성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

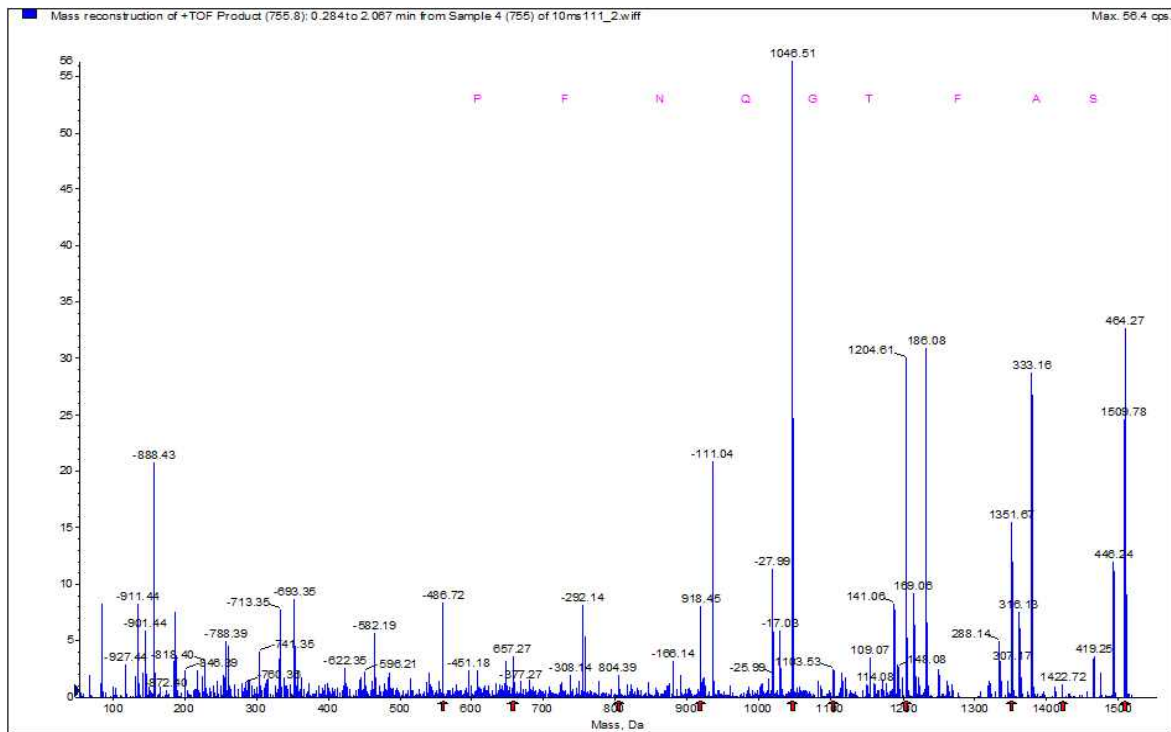


Fig. 75. 전북 내장 유래 항알러지 소재 (FrIV-3)의 아미노산 서열

6. 전임상 실험을 통한 활성소재 함유 희분의 동물효능 검토

HMC-1을 사용하여 전복 분해 물질 series인 AIGID, AIGID2, AIGID3로 항알러지 효과를 확인하였다. AIGID3를 사용한 이유는 그중에서 분자량이 제일 작은 물질이고, 생체실험을 할 경우에 더 흡수가 잘 될 수 있을 것이라는 기대에서 선택하게 되었다. 농도를 결정한 이유는 AIGID3의 in vitro 실험 시 적용했던 농도가 100, 300 500 μ g/mL 였는데, 100 μ g/mL에서도 충분한 억제 효과를 확인하였다. 마우스에 적용할 농도를 선택할 때, 100 μ g/mL의 볼륨당 농도를 감안하여, 100mg/Kg와 50mg/Kg로 실험을 시작하였으나, 100mg/Kg의 결과보다 50mg/Kg의 결과가 효과가 있어서 50mg/Kg로 선택하게 되었다.

가. NC/Nga 마우스의 등피부에서의 AIGID3(III)의 억제효과

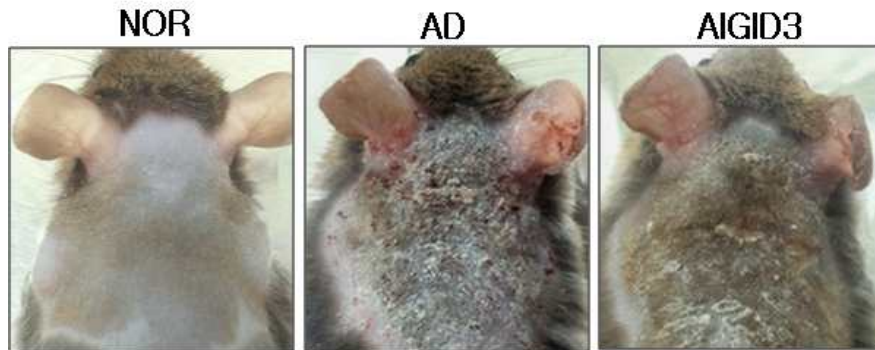
아토피 피부발진을 일으킨 NC/Nga 마우스에 AIGID3를 투여하였을 때, 등 피부에서의 병변 효과를 확인하고, 피부를 긁는 횟수에 효과가 있는지 확인하였다. (Fig. 76A - C)

(A) 피부 병변을 확인 하였다. 아토피성 피부염은 피부 건조 화 뿐만 아니라 표피 과증식, 홍반, 부종, 심한 소양증, 삼출과 부스럼 딱지를 특징으로 하고 급성기에는 피부에 비후가 생기는 피부염증 등과 같은 여러 증상을 같이 수반하는 피부질환이다 (Cooper, 1994; Hanifin and Chan, 1996). Biostar-AD연고를 도포하지 않은 그룹(NOR)과 AIGID3를 50 mg/Kg/day로 투여한 그룹 (AIGID3) 사이의 임상차이를 나타내었다. Biostar-AD 연고로 자극을 받은 마우스군에서 아토피피부염과 유사한 피부 발진이 발생하였다. 피부 병변의 형태는 홍반, 부종, 인설뿐만 아니라 소양증으로 외부 마찰에 의해 발생한 찰과상도 관찰되었다. 그러나, AIGID3를 투여한 그룹에서는 위와 같은 피부 병변이 억제됨을 관찰하였다.

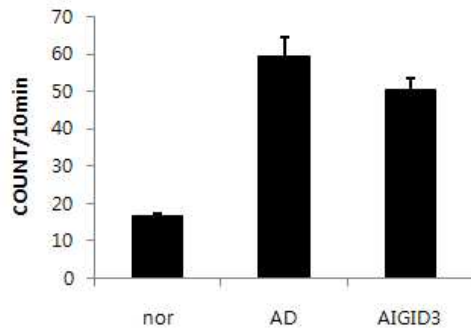
(B) 아토피 피부발진의 증상인 erythema/hemorrhage, scarring/dryness, edema 그리고 excoriation/erosion에서 각각의 합을 더한 clinical skin score를 나타낸 것이다. 즉, 아토피 증상이 심할수록 높은 수치로 평가된다. AD연고를 도포하지 않은 그룹(NOR)과 AIGID3를 50 mg/Kg/day로 Biostar-AD연고를 도포하기 일주일 전인 5주부터 9주까지 투여한 그룹 (AIGID3)의 score를 Biostar-AD연고를 도포한 날을 0으로 하여 일주일에 한번 씩 확인하였다. 이 결과는 그룹 당 5마리의 생쥐로 mean \pm S.D를 나타내고 있으며, 유의성을 보여주는 값으로는 $* < 0.05$ 를 나타내고 있다. 이를 근거로 AIGID3는 아토피 개선에 도움을 준다고 판단할 수 있었다.

(C) AIGID3를 9주까지 50 mg/Kg/day로 투여한 후, sacrifice하기 하루 전 날, 마우스가 귀와 등을 긁는 횟수를 관찰한 결과이다. 아토피성 피부염의 대표적인 증상인 염증부위를 긁는 행동의 횟수를 관찰한 결과, 긁는 횟수가 감소하는 경향을 보이지만, 유의성은 나타나지 않았다.

(A)



(B)



(C)

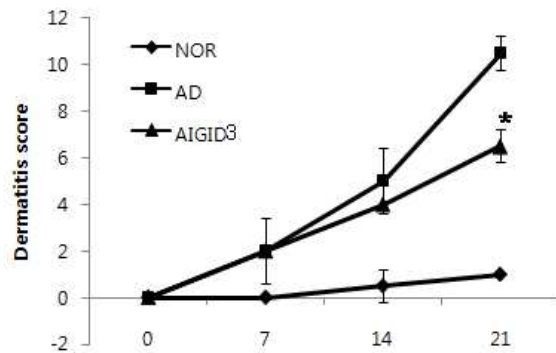


Fig. 76. Atopy dermatitis를 유도한 NC/Nga 마우스 등피부에서의 AIGID3(III) 억제효과

나. 혈청에서부터의 Immunoglobulin E와 Histamine 측정

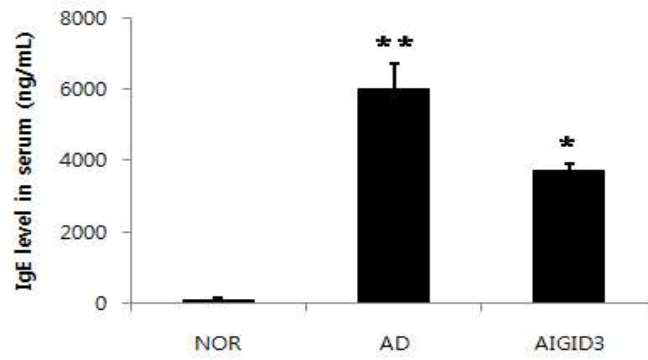
NC/Nga 마우스에서 AIGID3 투여에 대한 혈청내의 (A) total IgE 와 (B) Histamine level 을 확인한 결과이다.

(A) IgE는 체액에 존재하는 면역단백질의 일종이다. 비만세포와 호염기세포의 세포막에 있는 수용체와 결합하는 항체이다. 주로 알레르기와 관련되어 올라가고 면역질환, 기생충 감염과 관련되어 올라갈 수 있다. 알레르기 질환에서는 혈액내 총 IgE 레벨이 증가되어 있는 경우가 아주 많다. 특히 아토피 피부염에서는 혈액내 총 IgE 레벨과 증상과의 상관관계가 있어서 총 IgE 레벨이 높을수록 증상이 심한 경우가 많아 진단과 관찰에 도움을 준다. 아토피 피부염 환자의 80%는 총 IgE 증가 경향이 있는 것으로 알려져 있다. 알레르기를 일으키는 물질이 들어오면

IgE가 결합하면서 세포내로 신호를 전달하여 비만세포와 호염기세포 내의 과립들이 터져 세포 밖으로 배출 시키는데, 이로 인해 알레르기 증상이 유발된다 (Yang et al., 2012; Moghtaderi et al., 2012; Shaheen et al., 2011). Millennium criteria와 미국 피부과 학회 국제진단기준에서는 IgE 항체의 존재를 하나의 진단기준으로 내세웠다. AIGID3는 50 mg/Kg/day로 AD 연고를 도포하기 일주일 전인 5주부터 9주까지 매일 경구투여 하였다. ** $P<0.01$ 은 normal 그룹에 비교해서 나타냈으며, * $P<0.05$ 는 AD그룹에 대한 약물투여 그룹의 값을 나타낸 것이다. 혈청 내의 IgE는 AIGID3를 투여한 그룹에서 유의하게 감소되는 결과를 보였다. 따라서 AIGID3는 아토피 개선에 도움을 준다고 판단할 수 있었다.

(B) Histamine은 비만세포와 호염기세포에서 분비되어 즉시형 과민반응과 소양감을 유발하는 주요 물질로서 작용하는데 두드러기, 천식, 알레르기성 비염등의 알레르기 질환에서 중요한 역할을 하며 실제로 이들 환자의 혈액 또는 조직에서 histamine 농도 증가가 관찰된다 (Song et al., 2011; Kang and Shin, 2012; Buddenkotter et al., 2010). 본 실험에서는, histamine의 수치에서는 정상대조군, AD 연고를 도포한 그룹과 약물투여 그룹간의 차이점이 나타나지 않았다. 본 실험에서 이러한 결과는 histamine이 본 연구의 아토피피부염 동물모델에 histamine이 적합한 매개체가 아니거나, AIGID3가 histamine에 관련이 없을 수도 있다. 이러한 결과는 Amon등이 (Amon et al., 1994) 제시한 것처럼, histamine이 피부에서만 활성화되어 작용하거나 histamine 이외의 다른 혈관작용성 매개체들이 아토피피부염에 관여될 것이라고 주장을 뒷받침하는 소견이다. 이처럼, 아토피피부염에서 histamine의 관련성에 대해서는 다소 이견이 있다.

(A)



(B)

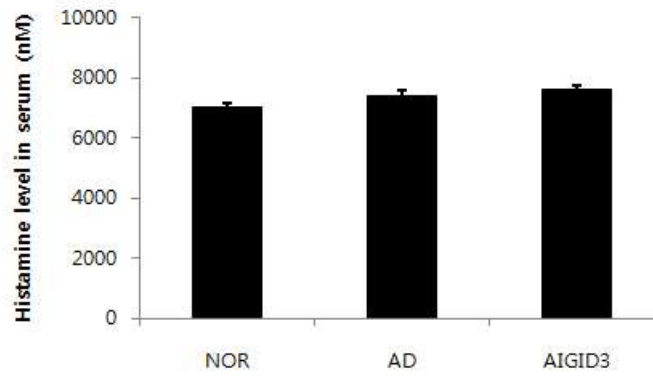
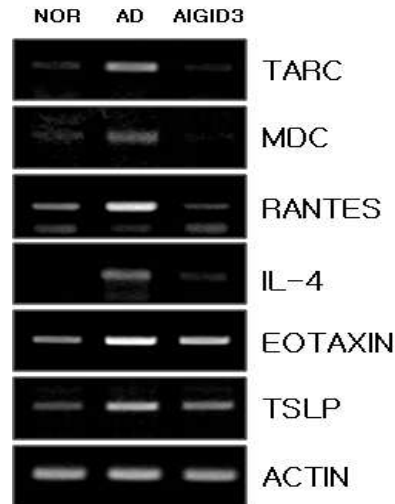


Fig.77 Atopy dermatitis를 유도한 NC/Nga 마우스 혈청 내 Ig E 및 Histamine에 대한 AIGID3 억제 효능

다. 마우스 등 조직 TARC, MDC, RANTES, IL-4, Eotaxin, TSLP 발현 결과

NC/Nga의 마우스에서 AIGID3를 투여하였을 때의 등 피부조직에서부터의 chemokine과 cytokine의 발현을 확인한 결과이다. AIGID3는 50 mg/Kg/day로 AD 연고를 도포하기 일주일 전인 5주부터 9주까지 매일 경구투여 하였다.

(A)



(B)

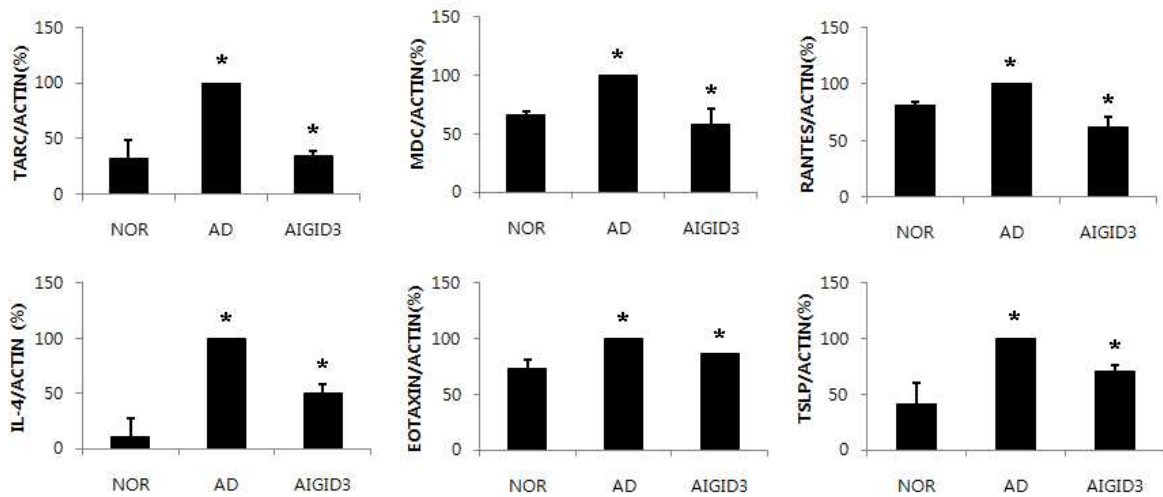


Fig. 78. AIGID3 처리 후 Atopy dermatitis를 유도한 NC/Nga 마우스 피부조직에서 chemokine과 cytokine 발현 억제 효능

(A) 경구투여한 마우스의 등조직에서 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 통해 TARC, MDC, RANTES, IL-4, EOTAXIN, TSLP의 mRNA 발현을 나타내었다. Thymus and Activation-Regulated Chemokine (TARC)는 내피세포, 수지상세포, 각질세포 등 다양한 세포에서 생성된다. 최근에는 아토피피부염 환자의 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포도 TARC mRNA를 발현한다는 보고가 있다. 아토피피부염에서의 TARC의 작용에 대해서는 TARC가 integrin 의존성 adhesion과 T 세포가 내피세포를 통과하여 이동하도록 유도하여 T 세포가 내피세포를 통과하여 이동하도록 유도하여 T 세포를 모으는 첫 단계에서 작용하여, 결국 표피에 침착된 T 세포가 각질세포의 세포자사를 유도하고 아토피 피부염의 조직학적 특징인 해면화 (spongiosis)를 야기한다고 알려져 있다. 최근 연구에서 IgE 매개성 아토피피부염 환자에서 혈청 TARC의 농도는 정상대조군에 비하여 유의하게 높음을 확인하여, 아토피피부염에서 진단과 중증도의 평가를 위해 TARC의 농도를 측정하는 것이 유용하다는 것을 제시하였다 (Miyahara et al, 2011; Jung et al., 2010). 아토피피부염의 원인은 명확히 밝혀지지 않았으나 면역학적 이상이 관여한다고 생각되고 있으며 Th1과 Th2 사이토카인의 불균형이 병변의 발생에 중요한 병인이 된다고 알려져 있다. 아토피피부염 환자의 말초혈액내 단핵구를 특정 항원에 의해 자극 시 주로 Th2형이 우세하게 반응한다고 보고되었다. 또한 아토피피부염 병변 내에서 IL-4/IFN- γ mRNA 발현 비율이 현저히 증가하였고 말초 혈액내 IL-4, IL-5의 농도가 증가되어 있어 아토피피부염에서 Th2 세포가 우세하며 이로 인해 혈청 IgE가 증가한다고 생각되었다. IL-4는 아토피피부염의 주요한 사이토카인이며, IgE의 생성과 비만세포의 활성화에 중요한 역할을 한다. 아토피피부염의 급성기에 IL-4가 증가하는데, IL-4는 IFN- γ 의 합성을 억제하고 B 림프구를 자극하여 IgE를 합성한다 (Bao et al., 2012; Brandt and Sivaprasad, 2011). 또한, 아토피피부염 환자의 각질형성 세포에는 고농도의 TSLP와 MDC (macrophage-derived chemokine)가 존재한다. TSLP는 CD11c+ 수지상세포를 자극해서 TARC와 MDC 생성을 증가 시킨다. 이러한 cytokine의 농도는 아토피피부염의 증상과 밀접한 연관성을 가지고 있다. 케모카인(chemokine)은 6-15kD의 분자량을 갖고 각종 세포 예컨대 마크로파지, 단구, 호산구, 호중구, 선유아세포, 혈관내피세포, 평활근세포 및 비만세포에 의해 염증 부위에서 생산되는 일군의 염증/면역제어 폴리펩티드의 총칭이다. 케모카인은 4개가 보존된 시스테인(cys) 잔기의 위치의 공통성 및 케모카인을 코딩하는 유전자의 염색체 위치의 상이함에 따라 CXC 케모카인(또는 α 케모카인)과 CC 케모카인(또는 β 케모카인)의 2개의 큰 서브그룹으로 분류된다. CXC 케모카인의 최초 2개의 시스테인은 1개의 아미노산으로 떨어져 있지만, CC 케모카인의 경우 동 시스테인은 인접한다. 예컨대 IL-8 등은 CXC 케모카인인 한편, MIP-1 α/β (macrophage inflammatory protein-1 α/β 의 약칭), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1의 약칭), RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted의 약칭) 등과 본 발명의 대상이 되는 MDC(macrophage-derived chemokine) 및 TARC(Thymus and activation regulated chemokine)는 CC 케모카인에 해당된다. 케모카인은 세포 유주를 촉진시키고 인테그린(integrin) 등과 같은 세포 접착 분자의 발현 증가를 통한 세포 접착 증강 작용을 갖고 있어 염증조직 등의 병변부

위에 대한 백혈구 등의 접착 및 침윤에 밀접한 관련을 갖는 단백질 인자로 여겨진다. (Takai, 2012; Hener et al., 2011; Han et al., 2012). 한편, MDC (macrophage-derived chemokine)는 인간 B 세포에서 합성되며 분비되는 케모카인으로, CCR4 리셉터와 의 상호작용을 통해 선택적 혹은 만성적으로 림포구(lymphocyte)들을 활성화시킨다. CCR4 리셉터는 MDC 이외에도 TARC (Thymus and activation regulated chemokine)와도 결합하는 것으로 알려져 있으며, 상기 CC 케모카인들의 생성량은 T 세포와 B 세포의 상호작용에 중요한 역할을 한다. 특히 혈청 내의 TARC 및 MDC의 레벨은 아토피피부염 환자들에게서 매우 높게 유지된다고 알려져 있으며, 그 증증도에 비례하여 TARC 및 MDC의 레벨도 증가한다. 또한, 인간 B 세포에서 생성된 TARC와 MDC는 알레르기 질병의 발병과정 및 T-B 세포 상호작용을 통한 특정한 항원 특이적 IgE의 생성에 중요한 역할을 한다고 보고된 바 있다 (Lin et al., 2003) 따라서 MDC 및 TARC의 생성정도는 아토피피부염의 질병활성 및 질병의 증증도와 긴밀한 관계가 있으므로, 본 발명자들은 아토피피부염 환자들에게서 과다 발현되고있는 MDC 및 TARC를 아토피피부염 질환을 예방 또는 치료하고 그 증상을 완화시킬 수 있는 단백질 타겟으로 삼고 연구를 진행하였다.

(B) PCR 밴드의 intensity를 Multi Gauge V2.2 program을 통해 분석한 결과이다. 유의성을 보여주는 값은 $*P<0.05$ 를 나타내고 있다. AD 그룹에서 증가된 chemokine과 cytokine이 AIGID3를 투여한 그룹에서 유의하게 감소하는 결과를 보여주고 있다. 따라서, 본 연구 결과를 통하여 전복 추출물 펩타이드는 아토피피부염을 유발하며 그 증상을 악화시킨다고 알려진 chemokines인 MDC와 TARC 뿐 아니라 아토피피부염과 관련된 다른 cytokines의 생성을 동시에 억제하는 작용이 있음을 알 수 있었고, 이러한 작용을 통해 전복 추출물 펩타이드가 아토피피부염의 예방 및 치료에 사용 가능성을 제시하였다.

라. 마우스 피부조직 분석

NC/Nga의 마우스에 AIGID3를 투여하였을 때의 등 피부조직에 미치는 영향을 확인하기 위해 등 피부를 적출한 후,

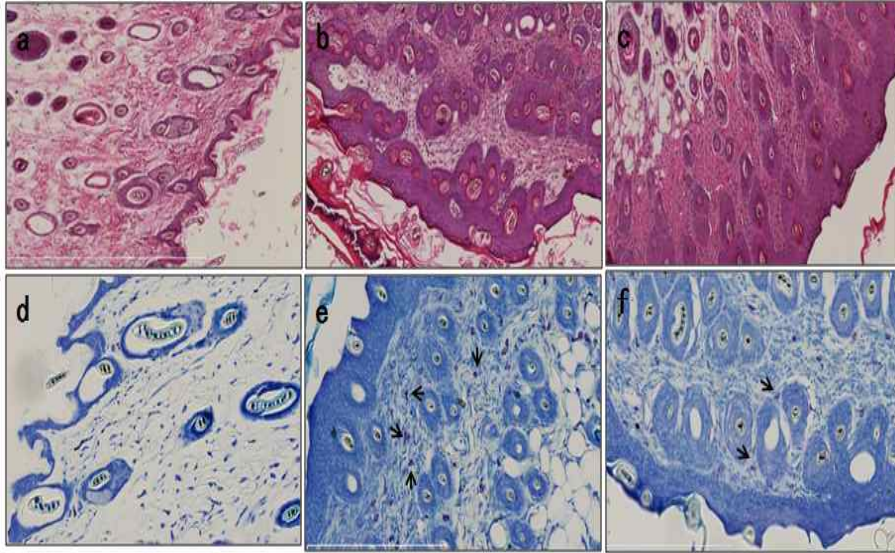
(A) H&E염색(a, b, c)과 dermis에 침윤된 비만세포 (mast cell)를 관찰하기 위하여 Toluidine blue 염색(d,e,f)을 한 결과이다. 조직 사진은 Nonozoomer digital pathology를 사용하여 H&E 염색은 100x, Toluidine blue 염색은 200x로 관찰하였다. H&E 염색법으로 확인한 결과, 정상군에 비해 대조군의 epidermis와 dermis가 부종으로 현저하게 확장되었었다. 이에 비하여 AIGID3을 경구 투여한 실험군은 대조군과 비교하였을 때, epidermis와 dermis의 두께가 상대적으로 얇아지고 전체적으로 부종이 감소하였다.

(B) 비만세포 (mast cell)의 수를 센 결과이다. 아토피 피부염의 피부 병변에서 비만세포 (mast cell)가 관찰된다. 비만세포는 세포 표면에 IgE 수용체를 가지고 있지만 아토피 피부염에

서 어떤 역할을 하는지는 확실하지 않다. 비만세포는 IgE 수용체에 의해 활성화되며, 활성화된 세포는 탈과립 과정을 거친다. 탈과립 과정에서 염증과 관련된 다양한 물질이 방출된다. 비만세포의 활성화 후에 초기에 방출되는 물질은 헤파린 (heparin), 히스타민 (histamine), 세로토닌 (serotonin), 미즙분해효소 (chymase), 트립신분해효소 (tryptase), 종양 괴사 인자- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)가 있다. 또한 류코트리엔 (leukotrienes), 프로스타글란딘 (prostaglandin), 사이토카인 (cytokine), IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, GM-SCF를 합성하여 방출한다. 이러한 생물학적 활성 물질은 염증 반응을 촉진시키고 피부로 더 많은 염증세포가 유입되도록 한다 (Hira et al., 2001; Hide, 1997).

200x로 관찰한 조직을 랜덤으로 3곳을 선점하여 수를 세었다. 유의성을 보여주는 값은 $*P<0.05$ 를 나타내고 있다. (A)의 a와 d는 정상 마우스의 피부 조직으로 epidermis가 얇고 비만세포가 거의 관찰이 되지 않는 것을 확인할 수 있다. 그러나 (A)b와 (A)e는 아토피를 유도한 대조군으로 epidermis의 두께가 현저하게 확장되고, 주변에 침윤된 면역 세포와 비만세포들이 증가하는 것을 확인할 수 있다. (A)c와 (A)f는 AIGID3를 경구투여한 마우스의 조직으로 epidermis의 두께는 크게 차이가 없으나 면역세포의 침윤정도, 그리고 비만세포의 수에서는 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과들은 전복펩타이드를 이용해 아토피성피부염을 치료할 수 있는 천연 물질로 개발할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

(A)



(B)

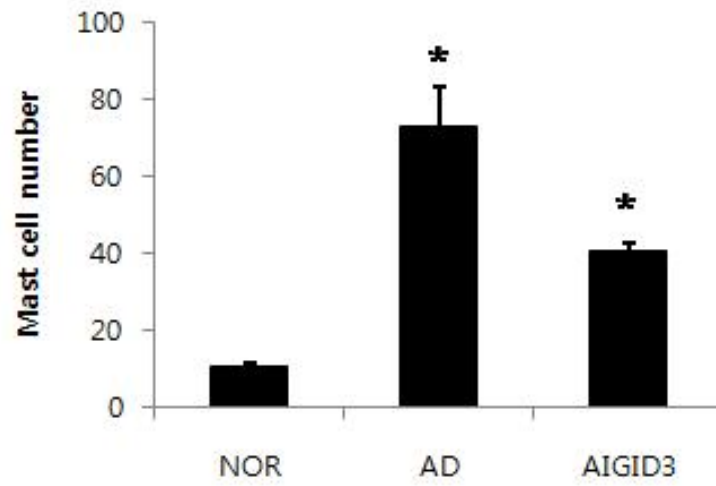


Fig. 79. AIGID3 투여 시 Atopy dermatitis 유도 NC/Nga 마우스 등 피부조직에 대한 효능 검토

7. 생산공정 및 경제성 검토

가. 전체 생산공정 설계

(1) 시료수집 (Sampling) 단계

- 전남 완도, 진도, 거금도, 제주도 등 각 지역별 계절별로 수집한다.

(2) 세척 (Washing)

- 수집 후 원료는 탈각 후 내장과 육을 분리하여 염분 및 이물질을 제거한다.

(3) 분쇄 (Grinding)

- 가수분해반응 효율을 높이기 위해 분쇄한다.

(4) 효소 가수분해 (in vitro gastro-intestinal digestion)

- 최적조건, 즉 최적 반응온도, 시간, pH, 기질비 등 하에서 가수분해한다.

(5) 원심분리 (Centrifuge)

- 연속 원심분리기를 사용하여 3,000 rpm으로 연속하여 분리한다.

(6) 여과 (Filtration)

- Filter press를 사용하여 상등액인 용매추출물을 여과한다.

(7) 분획, 탈염 및 농축 (Fractionation / Concentration)

- 한외여과시스템을 활용하여 1-10 kDa 분자량 획분을 확보하여 동일 시스템에서 1 kDa 이하 염 및 수분을 제거하여 탈염 및 농축한다.

(8) 건조 (분무건조 Spray drying 혹은 동결건조 Freeze drying)

- 회수된 농축액은 40-50℃에서 분무건조를 시킨다 (수분함량 5% 이하). 또한 고분자 획분을 대상으로는 동결 건조를 통해 분말화한다.

(9) 분말포장(Powder packing)

- 건조된 분말은 곱게 분쇄한 후 포장기에 포장한다.

나. 생산수율 검토

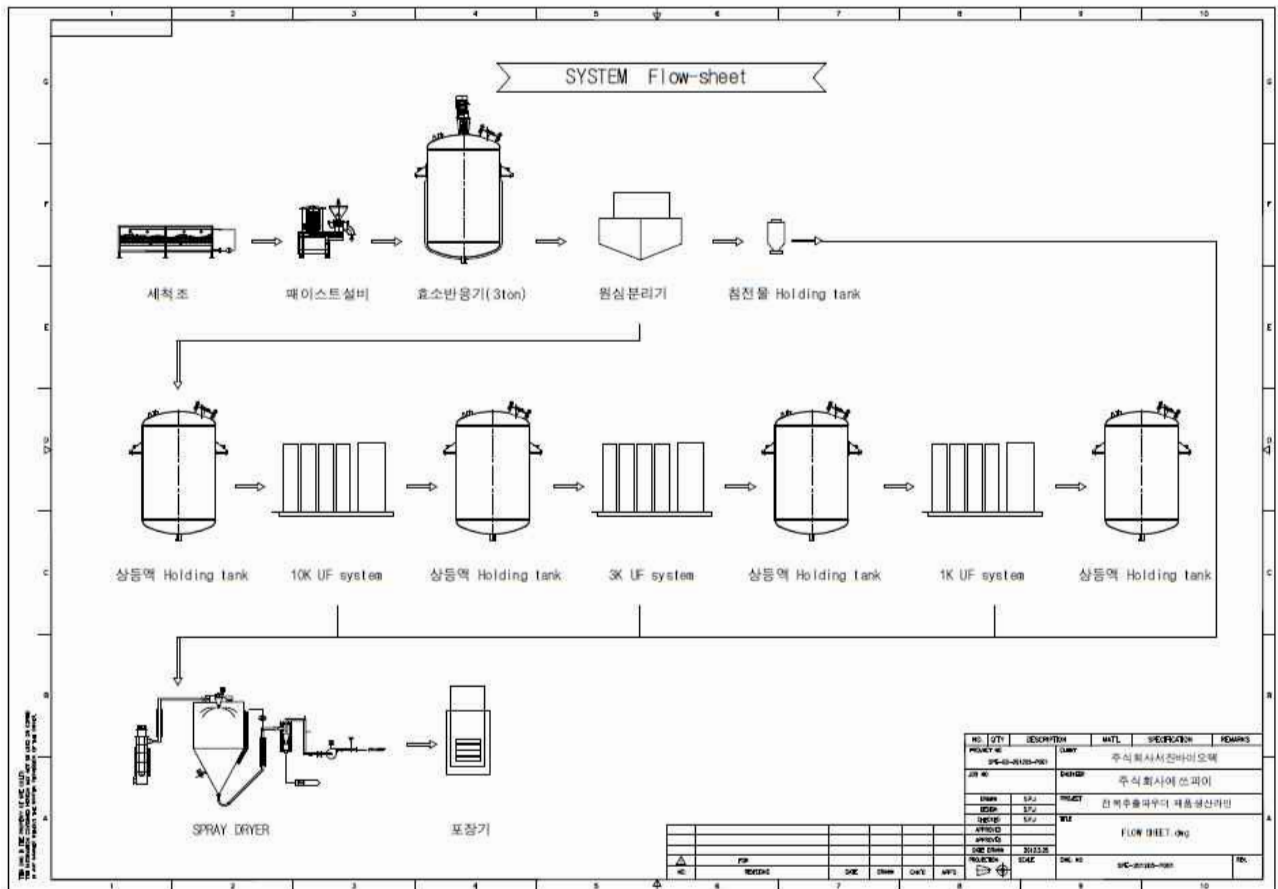
산지에서 수집한 시료는 생물 상태로 가져와 이물질을 제거한 후 세척하여 분쇄된 시료를 기준으로 단백질 함량을 측정된 후 1차, 2차 가수분해반응의 최적 조건 하 (esp. 기질대 효소비)에서 저분자 펩타이드획분을 제조하였다. 연속 원심분리 후 상층액을 분자량 10 kDa 및 1 kDa 한외여과막을 통해 분획, 농축하여 분무건조기를 통해 최종 파우더를 확보하였다. 최종 수율을 검토한 결과 전복 내장 10 kg (wet weight)을 처리하였을 경우, 최종 건조분말 (AIGID III)은 약 1.4±0.4 kg의 파우더 시료를 확보할 수 있었으며, HPLC를 통해 AIGID III 내 활성펩타이드 함량을 확인한 결과 약 8.80±0.11 mg/g AIGID III로 나타났다. 최종 생산량과 수율에 대해서 아래 표와 같이 정리하였다.(table. 25)

Table 25. Total yield and content of bioactive oligopeptide from abalone intestine

Material	Abalone intestine	AIGID III	Bioactive oligopeptide
Contents	10 wet wt (kg)	1.4±0.4 dry wt (kg)	88.0±1.09 dry wt (g)
Yields % (w/w abalone intestine)	100	14	0.8

* Data are expressed as mean ± SD of duplicate determinations.

다. 생산공정 설계도 (3톤 규모)



라. 생산설비단가

견 적 (Offer Spec.)

공 급 내 역	수량	단가 (원)	비 고
전복분말제조시스템			
1. 전복 세척조	1	25,000,000	
2. 효소반응기	1	180,000,000	
3. 전복 패이스트 설비	1	98,000,000	
4. Highspeed Centrifugel(alfalval)	1	140,000,000	
5. Holding tank	1	23,000,000	
6. 침전물 holding tank	1	6,500,000	
7. Ultrafiltration(millipore)	1	637,600,000	
8. Spray dryer(수분증발량 50kg/hr)	1	285,000,000	
9. 스틱포장기	1	65,000,000	
10. STRUCTURE	1	45,000,000	
소 계		1,505,100,000	
10. 일반관리비 및 경비	3	45,153,000	
11.기업이윤	10	155,025,300	
※. 특기사항			
1. 인허가사항제외			
2. 작업대 포함			
3. 현장 배관 및 시운전 포함			
4. 운전 교육 포함.			
합 계 (Total amount)		1,705,278,300	

세부 내역

공 급 내 역	수 량	단가 (원)	비 고
1. 전복 세척조 1) capacity 2) Material 3) Utility -. 고압 circulstion pump -. Nozzle -. 타공판 -. 세척박스		25,000,000	
2. 효소반응기 1) Capacity 2) Working volume 3) Temperature (2중 Jacket 간접가열) 4) Meterial 5) Utility -. Agitation system -. pH control system -. Temperature Control system -. 이송 pump -. Steam boiler system -. Product line -. Control panel		180,000,000	
3. 전복 파이스트 설비 1) 1차 조분쇄기 2) Micro mill -. Rotate cutter -. Liner mesh housing -. Control panel		98,000,000	
4. Highspeed Centrifugel(alfalval) 1) Clara80 2) Seperator 3) Control panel 4) CIP module 5) 납품 후 - supervising, 시운전, training		140,000,000	
5. Holding tank 1) Capacity 2) Working volume		23,000,000	

3) Material			
4) Utility			
- 이송 pump			
- Product line			
- Control panel			
6. 침전물 holding tank			6,500,000
1) Capacity			
2) Working volume			
3) Material			
4) Utility			
- 이송 pump			
- Product line			
- Control panel			
7. Ultrafiltration(millipore)			637,600,000
7-1. Process scale pellicon manual system			186,000,000
7-2. IQOQ Validation			
7-3. Pellicone 2UF Modules 1K 0.5m ² /PK P2PL ACC 05	PK		140,400,000
7-4. Pellicone 2UF Modules 3K 0.5m ² /PK P2PL BCC 05	PK		140,400,000
7-5. Pellicone 2UF Modules 10K 0.5m ² /PK P2BO 10A 05(PK-60)	PK		118,800,000
7-6. Holding Tank	set		38,000,000
7-7. Utility	set		14,000,000
8. Spray dryer(수분증발량 50kg/hr)			285,000,000
8-1. OPERATING CONDITION			
1) 원료 투입량			
2) 분말 배출량			
3) 건조 증발량			
4) 제품 체류시간			
9. 스틱포장기			65,000,000
1) Capacity			
10. STRUCTURE			45,000,000

다. 제조원가 (전복 내장 3 ton/일 처리기준)

항 목		산 정 내 역		단 위(천원)	비 고
재료비	원 료 구입비	직접재료비	원료구입비(60,000천원/일)	60,000	300일/년
			기타원료구입비(10,000천원/일)	10,000	
			원료가공비(2,000천원/일)	2,000	
	간접재료비	직접재료비(21,000천원)×10%	2,100	300일/년	
노무비		직접노무비	30,000천원/년×4명=400천원/일	400	300일/년
		간접노무비	직접노무비(400천원/일)×10%	40	
경 비		전력비	2,000천원/일	2,000	300일/년
		연료비	3,000천원/일	3,000	
		운전비	1,000천원/일	1,000	
		수도비	100천원/일	100	
		소모품비	100천원/일	100	
		수선비	200천원/일	200	
		기기감가상각비	600천원/일	600	
		연구개발비	150천원/일	150	
		기타경비	20천원/일	20	
		보험료	20천원/일	20	
일반관리비	영업비	(재료비+노무비+경비)×10%	921.9	300일/년	
이 윤	제조생산이윤	(노무비+경비×일반관리비)×15%	2,565.57	300일/년	
제조원가		3 ton/일 처리수율 14% = 420 kg	85,217.47		
제조원가/kg			202.90		

바. 경제성 분석

서론에서 설명한 바와 같이 전복 내장은 국내 전복 생산량의 90% 이상을 담당하는 완도 소재 전복 가공공장에서부터 저가에 공급받을 수 있는 원료이다. 전복은 불과 2003년 이후부터 생산량이 1,000 톤 규모를 초과하기 시작하였으며 최근 들어 6,000 톤 규모의 생산량을 확보하

기 시작하였다. 가파른 생산량 증가로 지금까지 내수시장에서 활전복 형태로 공급되었던 것과는 달리 레토르트, 죽, 스테이크, 간장 등 조미식품, 그리고 전복엑기스 등 여러 형태의 가공식품으로 개발과 판매가 시도되고 있다. 하지만 전복의 희귀성에 대한 상품적 가치 외 식품영양학적 및 생리기능학적 가치에 대한 학술적 연구 자료가 제시되고 있지 않아, 이들의 생리활성에 대한 과학적 연구 data 없이는 홍삼, 불포화지방산 등과 같은 고부가가치 제품으로 활용되기는 힘들 것으로 사료된다.

따라서 식품영양학적으로 우수한 육은 일반식품 형태로 활용하고 가공과정에서 필수적으로 발생하는 내장을 건강기능성 소재로 활용하는 것은 부산물 활용 등 경제적 측면에서도 바람직하다. 아울러 향후 중화권 국가 및 일본을 대상으로 향산화, 면역활성 등 건강기능을 강조한 웰빙 전복 상품을 수출전략화한다면 막대한 경제적 가치를 확보할 수 있다.

현재까지의 결과를 근거로 볼 때 전복 내장 펩타이드 조성물을 이용한 면역 기능성 식품 및 향장류 개발 가능성과 경제적 가치는 매우 높다고 판단되며, 향후 전복가공을 통해 대량발생될 내장 부산물 처리에 대한 문제점도 해결할 수 있어 가격 경쟁력은 충분히 확보가능할 것으로 판단된다.

앞서 언급한 전복 펩타이드 함유물 (AIGID III)의 경우 일일 3톤 처리 시 수율 14%(w/w)이며, 하루에 420 kg의 원료를 생산한다고 가정할 경우, kg당 단가는 202,900 원이다. 1 g으로 환산했을 때 202원으로 30일에 6,060원의 원료원가가 발생된다. 따라서 기초 제형비, 포장비, 기타 첨가물 비용 등을 합해도 10,000원 이하로 판매될 수 있어 정상적인 원료공급이 이루어질 경우 경제성은 충분히 있는 것으로 판단된다.

8. 응용제품의 개발

시제품 개발을 위한 주요 컨셉은 고급 수산원인 “전복의 가치와 효능” 과 기능성 처방이 가미된 “한방 레서피”가 융합된 해양한방 향장류 및 식품이다. 전복이 가지고 있는 “귀함”과 한방 소재가 가지는 “웰빙”의 개념을 통해 청정하고 건강한 바다의 이미지와 고귀함을 마케팅 포인트로 설정할 수 있기 위함이다.

전복으로부터 추출한 향산화, 면역활성 (항염증 및 항알러지) 효능을 보유한 천연 올리고펩타이드 소재와 피부탄력, 생기, 영양, 보습을 도울 수 있는 한방 처방을 복합한 레서피를 적용함으로써 건강하고 고귀한 컨셉의 해양 한방 천연 화장품 및 식품 제형을 개발하고자 하였다.

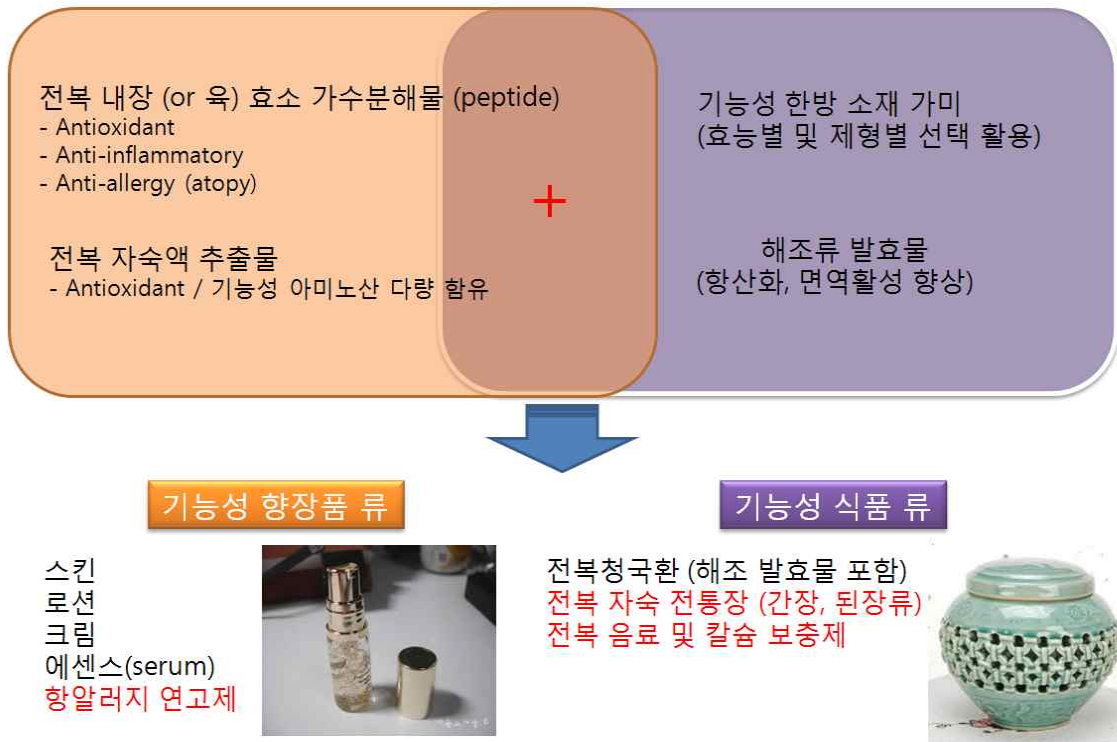


Fig. 80. Plan for natural proto-type products by Marine-Oriental herb combinational recipe

가. 해양한방 아토피 크림 개발

(1) 제형 개발

전복 활성 펩타이드가 함유된 AIGID III이 가지는 항산화기능, 항염증 및 항알러지 효능과 함께 피부탄력, 생기, 보습 효능이 있는 한약재 추출물을 가미함으로써 시너지 효과를 도출할 수 있는 레서피를 개발하였다.

한방 추출물은 신경해표약인 국화와 청열해독기능의 포공영, 토복령, 진피, 청열화염약인 천화분, 이수삼습의 백복령, 택사, 방항화습약인 후박, 창출을 구성균으로 에탄올 추출 후 농축하여 사용하였으며, 파라벤계 방부제는 사용하지 않았고, 연꽃잎추출물, 자몽종자씨 추출물로 대신하여 사용하였다.

향후 판매와 관련된 측면에서 놓고 볼 때 화장품베이스의 선택이 그 만큼 중요할 수밖에 없다. 따라서 화장품 레서피의 개발은 향후 제품의 시장진입을 결정짓는 중요한 요인으로 작용하기 때문에 화장품 베이스 개발은 필수적인 요소이다. 사용촉감, 향, 보습력, 안정성 등이 최적화된 고품질의 천연 화장품 제형을 개발하기 위해서 전복, 한약소재와 베이스 소재의 최적

배합비율과 배합 후 안전성, 안정성 및 효능 등을 결정하였다 (참조: 식품의약품안전청 기능성 화장품의 유효성 평가 가이드라인, 2005).

일반적으로 화장품베이스 제형과 혼합하여 제품을 만들 때 베이스원료와 혼합하는 과정에서 항염증 효과가 떨어지는 문제점이 종종 발생하는데, 본 제형에서 그러한 문제점이 발생하는지 확인하기 위해 제품완성 후 항염증활성을 평가하였다. 그리고 완성된 처방으로 만들어진 제품에 대해 타사 제품과의 항염증활성 비교 및 제품 사용 후 보습과 사용감에 대한 평가함으로써 최종 레시피를 결정하였다.

Table. 26 List of ingredient for proto-type products

ICID	Ingredient(%)
Water	70.33
Grapefruit Seed Extract	0.50
Disodium EDTA	0.02
Dipotassium Glycyrrhizate	0.05
Carbomer(Carbopol 940)	0.12
Carbomer(Carbopol 941)	0.03
Stearic Acid	1.00
Cetearyl Alcohol	1.50
Cerasynt 945	0.30
Sorbitan Stearate and Sucrose Cocoate	2.00
Polysorbate 60	0.35
Sorbitan Stearate	0.25
Glycerin	7.00
Isohexadecane	7.00
Trioctanoin	1.50
Dimethicone	1.00
Tocopheryl Acetate	0.10
Butylparaben	0.05
Propylparaben	0.10
Triethanolamine	0.20
Nelumbo Nucifera Leaf Extract	0.50
Sodium Hyaluronate	1.00
Fragrance	0.10
Ceramide	1.00
Abalone extracts	1.00
Herb extracter	3.00
Total	100

(2) 시제품 효능 평가

(가) 농도별 COX-2 항염증활성

Atopy lotion제품의 경우에 base 에서는 18.92% 의 저해율을 나타내었으며 농도가 1 ~ 100 μ l 로 증가함에 따라 26.08%, 47.70% 및 82.19% 로 base 와 비교할 때 COX-2 저해율이 농도 의존적으로 증가하였다.

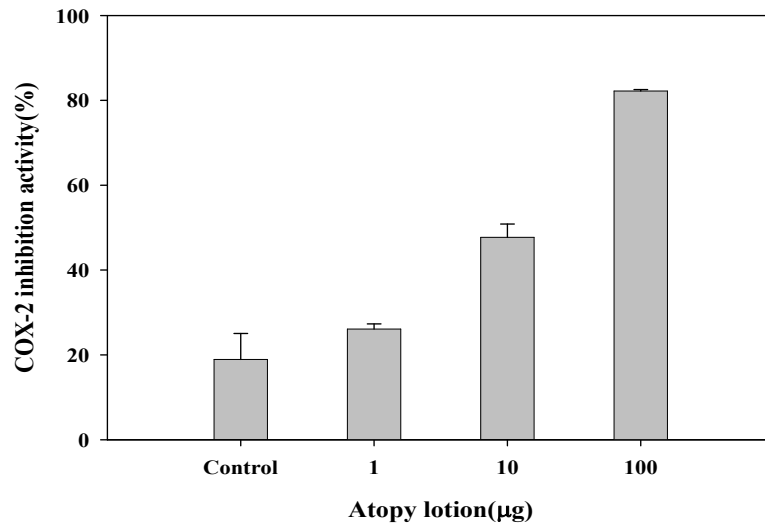


Fig. 81. COX-2 inhibitory activity of proto-type products. All experimental data were mean \pm SD of triplicate determinations.

(나) 농도별 NO활성

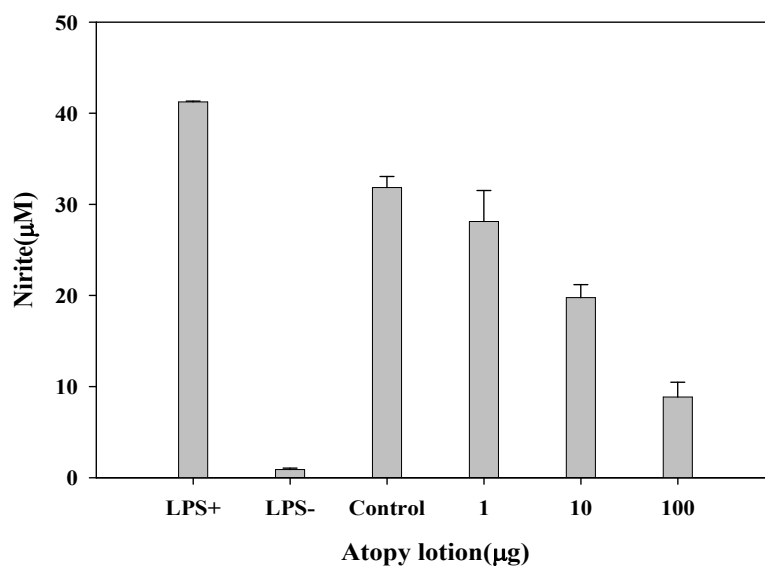


Fig. 82. NO inhibitory activity of proto-type products. All experimental data were mean \pm SD of triplicate determinations.

Atopy lotion extracts 군에서는 base control에서는 약 31.8 μ M의 NO생성량이 억제되었으며, 아토피로션 1 μ g, 10 μ g, 100 μ g에서 각각 28.12 μ M, 19.76 μ M, 8.85 μ M로 농도의존적으로 NO 생성이 억제 됨을 알 수 있었다.

(다) 농도별 세포독성 : 기준 농도 내 유의한 세포독성은 확인되지 않았음.

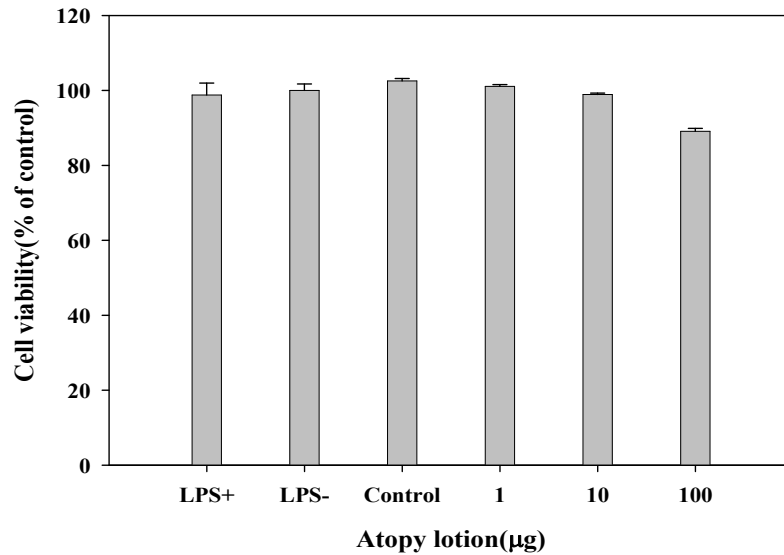


Fig. 83. Cell viability effects of proto-type products. All experimental data were mean \pm SD of triplicate determinations.

(라) 시판중인 제품과의 항염증활성비교

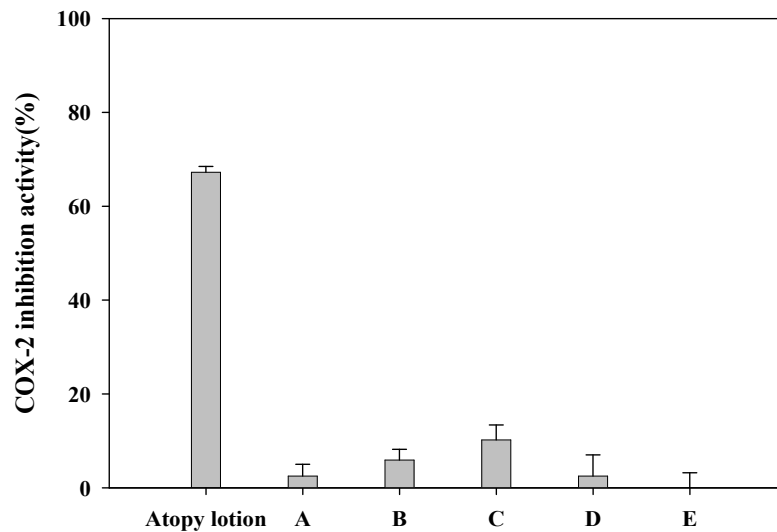


Fig. 84. Comparison test between COX-2 inhibitory activity of proto-type products and those of other commercial products.

아토피로션과 다른 유명회사의 제품(A ~ E)들과 비교평가를 실시하였다. 다른 유명회사의 제품(A ~ E)은 염증억제효능이 낮거나 거의 없었으나, 개발한 아토피로션의 경우 약 67% 이상의 염증억제효능이 나타났다. 본 실험에는 각 제품별로 50 μ g씩 사용하였으며, atopy lotion의 경우 우수한 염증억제효능을 가지는 것으로 확인되었다.

(마) 보습력 평가

제품에 대한 보습효과는 피부보습측정기를 사용하여 5회 반복적으로 측정하여 평균치를 계산하였다. test전 피부수분은 평균 21.25% 였으며, 피부 표면에 제품을 골고루 도포한 후 도포 후 1시간부터 12시간 까지 측정한 결과 피부 수분이 40%이상인 상태로 12시간 지속되는 것으로 확인되었다.

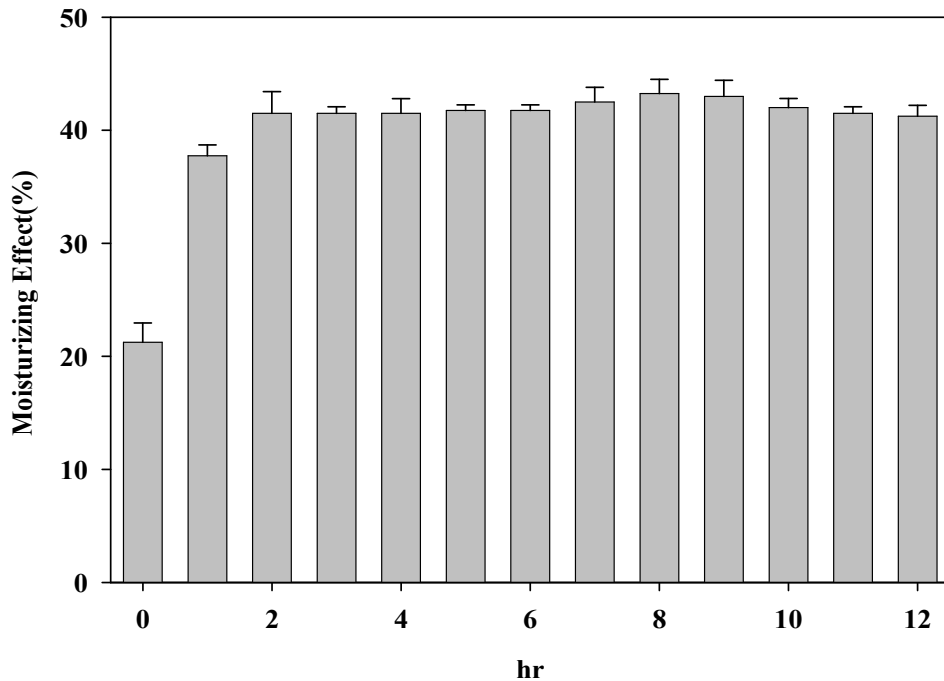


Fig. 85. Moisturizing effects of proto-type products for 12 hr

나. 전복 청국환 제품사양 및 특징

전복의 특유한 냄새를 제거하고 가공과정 내에서 저분자 펩타이드를 따로 효소첨가 없이 생산할 수 있는 *Bacillus subtilis*를 이용하여 제조과정이 간단하고 저렴한 유산균 발효공정을 활용하였다. 항산화 및 면역활성을 보유한 전복 펩타이드와 칼슘, 청국장 성분 등 다양한 기능성을 함유 전복 청국환은 발효과정에서 청국장의 특유의 냄새가 사라져 어린이 간식으로 이용이

가능하고, 칼슘 등을 첨가함으로써 청국장장의 정장기능과 더불어 어린이 성장에 도움을 주는 제품으로 개발이 가능 할 뿐만 아니라 총명당과 칼슘을 이용한 수험생용 총명청국환의 조제가 가능하다. 특히 어린이 및 노약자들의 면역력과 칼슘 공급은 물론 성인에게도 골다공증 예방 및 정장기능에 좋은 제품으로 제품화할 경우 다양한 제품군과 많은 수익이 예상된다.

(1) 전북 청국환 제조공정

- ① 좋은 국산 콩을 잘 선별하여 깨끗이 씻어준다
- ② 24시간 동안 콩과 전복가수분해물 분말을 10%(w/v)를 첨가한 액을 1:5의 비율로 담귀서 불린다.
- ③ 콩을 불린 그 물을 그대로 사용하여 콩과 물이 1:2 비율이 되도록 조절하여 반응기에서 100℃로 30분간 끓인후 약불에서 수분이 증발할때까지 삶고 37℃까지 식힌다.
- ④ Bacillus subtilis 종균배양액을 삶은 콩에 골고루 섞은 후 37℃에서 48시간 동안 발효시킨다.
- ⑤ 완성된 청국 발효물은 72시간 동안 동결건조한다.
- ⑥ 동결건조된 청국발효물에 회전코팅기에 올리고당으로 1차 코팅한 후 다시 전복가수분해 추출물 분말과 콩가루 분말을 2:8로 혼합한 후 2차코팅을 한다.
- ⑦ 코팅된 청국환은 열풍건조기를 사용하여 45℃에서 24시간 건조한 후 포장한다.

(2) 성분 조성 및 제형 개발

항 목		기 준	비 고
성 상		얇은 갈색 분말	
성분	수분	10% 이하	
	국내산 콩	70% 이하	
	전복(내장포함)	1.0% 이하	
	국내산 콩가루	5.0% 이하	
	올리고당	20% 이하	
중금속	수 은	3 ppm 이하	
	납	1 ppm 이하	
	카드뮴	1 ppm 이하	
미생물	일반세균수 (cfu/g)	≤1,000	
	대장균수 (cfu/g)	(-)	

* 제품보관 ; 실온 / 유통기간 ; 1 년

(3) 설문을 통한 기호성 상품성 평가

각 연령대별 30씩 총 120명의 인원을 대상으로 색상, 맛, 식감, 향 그리고 구매의향에 관한 설문조사를 실시하였다.

(가) 색상

대 상	조사결과					합 계
	아주나쁘다	나쁘다	보통이다	좋다	아주좋다	
10-20대	0	2	16	12	0	30
30-40대	0	1	6	20	3	30
50-60대	0	0	3	16	11	30
70대이상	0	0	1	13	16	30
소 계	0	3	26	61	30	120

(나) 맛

대 상	조사결과					합 계
	아주나쁘다	나쁘다	보통이다	좋다	아주좋다	
10-20대	0	0	5	16	9	30
30-40대	0	0	3	15	12	30
50-60대	0	0	1	16	13	30
70대이상	0	0	1	12	17	30
소 계	0	0	10	59	51	120

(다) 식감

대 상	조사결과					합 계
	아주나쁘다	나쁘다	보통이다	좋다	아주좋다	
10-20대	0	0	3	16	11	30
30-40대	0	0	2	13	15	30
50-60대	0	0	0	13	17	30
70대이상	0	0	0	11	19	30
소 계	0	0	5	53	62	120

(라) 향

대 상	조사결과					합 계
	아주나쁘다	나쁘다	보통이다	좋다	아주좋다	
10-20대	1	2	12	13	2	30
30-40대	0	1	4	13	12	30
50-60대	0	0	1	14	15	30
70대이상	0	0	0	16	14	31
소 계	1	3	17	56	44	121

(마) 구매의향

대 상	조사결과					합 계
	구매의향 없다	잘 모르겠다	고려해 보겠다	구매의향 이 있다	반드시 구매하겠 다	
10-20대	1	1	3	17	8	30
30-40대	0	1	2	13	14	30
50-60대	0	0	1	16	13	30
70대이상	0	0	1	16	15	32
소 계	1	2	7	62	50	122

(바) 최종 평가

각 연령대별 조사 대상 120명중 78명이 여성이고, 42명이 남성이었으며, 구매의향이 있다는 응답자중 여성이 63%, 남성이 37%로 여성이 남성보다 높게 나타났으며, 연령대가 높아질수록 제품에 대한 평가가 좋은 것으로 확인되었다. 부정적인 의견을 제시한 사람의 경우 발효과정 중에 발생하는 청국장 특유취에 대한 거부감은 약간 있었으나 대체적으로 만족한 결과를 얻어냈다.



Fig. 86. 전복 기능성 펩타이드 함유 시제품 개발 이미지

제 5 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발 목표 및 달성도

가. 당해 연도 연구개발 목표

본 연구에서는 국내 최대 수산물 생산기지인 전남지역의 수산특산자원인 전복과 해조류의 첨단 바이오산업 활용과 고부가가치화를 위해, 전복 육과 내장의 식품영양학적 및 생리기능성에 대한 학술적 기초자료를 확립하고 경제성 및 활용도가 낮은 전복 내장의 기능성 단백질을 활용하여 천연 생리활성소재를 확보함과 동시에, 먹이 생물인 해조류에 함유한 난분해성 생체고분자를 대상으로 생리활성 천연물 확보 및 신규 펩타이드화 공정을 개발한다. 해당 연구를 통해 전복 및 해조류 유래의 신규 천연 면역활성 소재를 확보하며 기능성을 포함한 가공제품을 개발하고자 한다.

나. 연구개발 목표 및 달성도

구분	주요 연구개발 목표	달성도(%)	비고
1차년도	전복샘플 및 식품영양학적 성분분석 주요 data 확보	100	
	위장관가수분해 시스템 조건 확립 및 전복 기능성 가수분해물 제조	100	
	전복 내장 유래 기능성 단백질체 분석 및 전복 내장 가수분해물 주요 효능 검토	100	
2차년도	우수 활성획분 최종 선별	100	
	우수 활성획분으로부터 활성물질 분리 및 이화학적 특성 규명	100	
	대식세포 및 비만세포 내 활성물질 효능 및 작용기전 최종 규명	100	
3차년도	전임상 실험을 통한 알러지 효능 검토	100	
	활성소재 대량공정 설계 및 경제성 검토	100	
	기능성 함유 시제품 제조 및 기호성 평가	100	

2. 분야별 기여도

가. 학문적 기술적 기여

- 전복 및 해조류 유래 고흡수 고기능 천연 항알러지제 개발
- 전복 생리활성 연구 및 학술적 기초 data 구축
- 전통 수산식품의 고부가가치 첨단 소재화 방안 마련
- 전복 위장관 소화분해시스템을 통한 당화 및 펩타이드화 신규 생물공정 개발
- 위장관 소화분해물의 면역학적 효능 자료 확보
- 무독성 고흡수성 천연 면역활성원료 및 생산 공정 개발
- 화장품, 건강식품 및 의약품 소재 등 신 기능성 소재 확보
- 수해양관련 응용생명공학기술 발전에 기여

나. 사회 문화적 기여

- 전복 홍수출하 및 유통과정 상 폐사에 따른 문제점 해결
- 활전복 위주의 단순 생산 유통 문제점 극복 및 전복산업 활성화 방안 마련
- 전복 제품 다양화 및 국내외 시장 확대
- 전복 신기능성 부여에 따른 경제적 가치 향상과 어민 소득 증대 및 지역경제 발전
- 해조류 유래 신규 천연 면역활성 소재 개발에 따른 경제력 및 국민 건강보건 이바지
- 미이용 해양생물 소재의 다양한 활용성 부여
- 수산물 소비활성화 및 선호도 증대
- 학술논문 및 지적재산권 획득을 통한 해양바이오 산업 활성화 및 분야 국가위상제고

제 6 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화 산업화 계획

국내 및 국외 시장 분석결과, 전복은 대부분 활전복 형태로 판매되며 일부 업체를 통해 통조림, 죽, 젓갈, 조미식품 등 단순 가공식품 형태로 생산 및 유통되고 있음. 국내외 시장에서도 레토르트 및 죽 형태의 일부 제품만이 수요가 있을 뿐, 전복 가공산업은 높은 원가, 공급 및 가격 불안정, 판매 부진 등으로 현재 불안한 상황임.

따라서 현재 1조 시장을 형성하고 있는 홍삼 제품과 같이 영양학적 기능학적 가치를 바탕으로 다양한 가공제품, 즉 음료, 제과, 병과, 화장품, 고부가가치 건강기능소재 및 식품 등의 형태로의 개발과 웰빙을 강조한 마케팅 및 판매가 절실히 필요함. 이를 위해 본 연구에서 도출한 국내산 참전복의 식품영양학적 우수성과 신규 규명한 항산화, 면역활성에 대한 기능성을 바탕으로 식품 및 화장품 등 응용제품에 활용함. 아울러 기업 기술이전과 산학 연계를 통한 식약청 기능성 인허가 인증 사업을 계획 중에 있음.

2. 특허, 논문 등 지식재산권 확보계획

본 연구개발을 통해 확보한 주요 연구결과, 즉 “전복 성분 분석 및 식품영양학적 가치 규명”, “체내 소화가수분해 생물공정을 응용한 전복 유래 저분자 펩타이드 생산”, “전복 함유 항산화 및 면역활성에 관한 대식세포 및 비만세포 내 효능”, “아토피 전임상 모델 내 전복 기능성 소재의 면역조절 효능”, “해조류 추출물의 항산화 및 면역활성 조절 효능”에 대한 유의한 결과를 바탕으로 아래와 같이 논문과 특허 출원을 준비 혹은 진행 중임. 본 지식재산권 자료는 전복 상품적 가치 제고와 기업 기술이전 및 기능성인허가를 위한 기초 자료로써 활용할 것임.

<현재 진행 중인 논문 및 지식재산권 목록>

구 분	내 용	게재지	비 고
특허	Composition for the treatment and the prevention of inflammatory diseases in immune system containing Abalone gastrointestinal digests (전복 소화 가수분해물을 함유하는 면역계 염증성 질환 예방 및 치료용 조성물)	Korean patent 10-2010-0049866	출원 중
특허	Abalone intestine gastro-intestinal digests having effects of inhibiting MMP activity and a pharmaceutical composition containing the same as an active ingredient (MMP활성 억제 효과를 갖는 전복 내장 위장관 소화가수분해물 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물)	Korean patent 10-2011-0092951	출원 중

특허	Boiled Abalone By-products for antioxidant and Angiotensin I converting enzyme inhibition effects and functional compositions containing the same (항산화 및 안지오텐신전환효소 억제 효과를 갖는 전복 추출물 및 이를 함유하는 기능성 조성물)	Korean patent 10-2011-0092952	출원 중
특허	전복 펩타이드 조성물의 아토피 질환에 대한 효능	Korean patent	준비 중
특허	전복 펩타이드 조성물의 비만세포 내 히스타민 저해를 통한 면역활성 조절 효능	Korean patent	준비 중
저서	Immune regulatory effects of phlorotannins derived from marine brown algae (<i>Phaeophyta</i>)	<i>Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology</i> , UK, John Wiley & Sons Publishers (Nov., 2011)	출판
논문	Protective effects of in vitro gastrointestinal digests of abalone (<i>Haliotis discus hannai</i>) intestines against oxidative stress in RAW 264.7 macrophage cells	<i>Fisheries & Aquatic Sciences</i> 10, 216-223 (Aug, 2010)	게재
논문	Abalone (<i>Haliotis discus hannai</i>) intestine digests with different molecular weights inhibit MMP-2 and MMP-9 expression in human fibrosarcoma cells.	<i>Fisheries & Aquatic Sciences</i> (Jun., 2012)	게재
논문	Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Abalone Intestine Digest, <i>Haliotis discus hannai</i> in RAW 264.7 Macrophages	<i>Biotechnology and Bioprocess Engineering</i> (Jun., 2012)	게재
논문	Beneficial Effect of Gastrointestinal Digest of Abalone (<i>Haliotis discus hannai</i>) Intestine on Osteoblastic MG-63 Cell Differentiation	<i>Journal of Aquatic Food Product Technology</i>	심사 중
논문	Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibition Effects of a novel peptide from Boiled Abalone, <i>Haliotis discus hannai</i> -Products	<i>Process Biochem.</i>	투고 중
논문	Effects of Abalone Intestine Gastro-Intestinal Digests, <i>Haliotis discus hannai</i> on mast cell-mediated allergic reaction	<i>Food Chem Toxicol</i>	투고 중
논문	Abalone Intestine Gastro-Intestinal Digests attenuates house dust mite allergen-induced atopis dermatitis in Nc/Nga mice	<i>Food Chem Toxicol</i>	투고 중
논문	<i>Callophyllis japonica</i> attenuates airway inflammation in a murine model of ovalbumin-induced asthma	<i>Journal of Aquatic Food Product Technology</i>	투고 중

* 향후 추가 성과는 매년 조사-분석-평가를 통해 update 할 예정입니다.

3. 기술확산 및 추가연구, 타연구 활용계획

해당 연구개발 결과를 연계하여 전임상 독성 및 임상 효능에 대한 기능성 인허가 자료를 확보할 예정이며, 도출된 연구개발 자료는 학술발표, 논문, 특허를 통한 학술적 기술 확산 및 홍보를 진행할 것임. 아울러 식품영양학적 및 기능학적 data는 전북 유통 및 가공업체의 마케팅 자료로 제공될 예정임.

본 연구를 통해 개발된 전북 기능성 펩타이드 함유 시제품의 경우, 지식경제부 완도전북가공산업활성화 RIS 사업단 참여기업과 연계하여 산업화할 것이며, 전북 레토르트 과정에서 발생하는 자숙액 및 내장 등 부산물 활용 기술 또한 조선대학교 완도 해양생물연구교육센터에서 운영하는 한국수산벤처대학 컬리큘럼을 통해 참여학생 및 완도 가공업체를 대상으로 기술 및 활용교육을 통해 기술 확산 예정임.

제 7 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		비고
		우리나라	연구신청팀	
전복 유래 기능성 소재 개발	일본	70	70	
위장관 가수분해 시스템의 생물공정 적용 및 당화기술 개발	미국	70	60	
해양생물 유래 면역활성제품 개발	미국	70	60	의약소재 외

- ※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

가. 특허분석

(1) 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽 등 포괄 세계지적재산권 기구 등록 국가)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), WIPO DB (www.wipo.int/pctdb/en)
검색기간	1980 년 이후 전체
검색범위	제목 및 초록

(2) 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	전복 유래 기능성 소재 개발	위장관 가수분해 시스템의 생물공정 적용 및 당화기술 개발	해양생물 유래 면역활성제품 개발	
Keyword	abalone	gastrointestinal digestion	marine allergy	
검색건수	11	국내 2 / 해외 10	11	
유효특허건수	국내 2 / 해외 4	국내 1 / 해외 4	국내 1 / 해외 1	
핵심특허 및 관련성	특허명	EXTRACTION METHOD OF ABALONE POLYSACCHARIDE	위-소장 소화분해 시스 템을 이용한 가수분해 물로부터 홍합항산화 펩타이드 분리방법	
	ANTHONY INFLAMMATOR Y COMPOSITION AND USE THEREOF			
	보유국	중국	대한민국	미국
	등록년도	2007	2007	2008
	관련성(%)	30	70	30
	유사점	전복 기능성 다당류 추 출	위장관 가수분해시스템 활용 펩타이드 제조	해양생물 유래 기능성 지질의 알러지 예방 효 과
차이점	- 전복 단백질을 포함 한 효소활성 및 기타 생리활성 미검토	- 전복 소화분해시스템 미적용 - 당화기술 미포함	- 알러지 질환에 대한 명확한 효능 부재 - 해양생물 유래 펩타 이드, 당 기능성 부재	

- ※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

나. 논문분석

(1) 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽을 포함한 전 국가
논문 DB	google 학술 DB (scholar.google.com)을 통한 Sciencedirect, pubmed 등 주요 학술검색사이트 통합검색 / 국내외 KISTI NDSL (scholar.ndsl.kr) 검색
검색기간	전체
검색범위	제목, 초록, 키워드 및 본문

(2) 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	전복 유래 기능성 소재 개발	위장관 가수분해 시스템의 생물공정 적용 및 당화기술 개발	해양생물 유래 면역활성제품 개발	
Keyword	abalone Haliotis bioactive, enzyme, polysaccharide, protein	gastrointestinal digestion system, hydrolysis, oligosaccharide, peptide	marine, algae, anti-allergy, atopy, asthma	
검색건수	17	13	33	
유효논문건수	국내 4 / 국제 9	국내 0 / 국제 6	국내 7 / 국제 12	
핵심논문 및 관련성	논문명	Activity of digestive enzymes along the gut of juvenile red abalone, <i>Haliotis rufescens</i> , fed natural and balanced diets	Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide isolated from in vitro gastrointestinal digests of <i>Mytilus coruscus</i>	Anti-asthmatic effect of marine red alga (<i>Laurencia undulatus</i>) extracts in a murine model of asthma
	학술지명	Aquaculture	<i>J. Medicinal Food</i>	<i>Food and Chemical Toxicology</i>
	저자	Garcia-Esquivel & Felbeck	Jung 등	Jung 등
	게재년도	2006	2007	2009
	관련성(%)	50	70	50
	유사점	전복 내장 효소종 검토토	위장관 가수분해시스템 활용 펩타이드 제조	해조류 추출물의 천식예방 효과
	차이점	- 전복 효소활성 외 기타 생리활성 미검토토	- 전복 소화분해시스템 미 적용 - 당화기술 미포함	- 알러지 질환 중 천식한정 - 해조류 저분자 가수분해 추출물이 아닌 에탄올 추출물

- ※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

다. 제품 및 시장 분석

(1) 생산 및 시장현황

(가) 국내 제품생산 및 시장 현황 (국내특허, 식약청 및 업체 현황 DB 검색)

- 전복 관련 제품은 죽, 젓갈, 통조림, 레토르트 등 단순가공제품에 한정
- 전복을 활용한 기능성 함유 제품은 전복엑기스, 전복패각 석결명, 화장품 제품 일부
- 전복을 활용한 기능성 인증 제품은 전무
- 위장관 소화가수분해시스템 공정 미활용
- 한약재 및 육상식물 소재 기능성 향장류 제품 출시
- 해양생물 유래 면역활성기능성 제품 無 (클로렐라 및 스피루리나 외)

(나) 국외 제품생산 및 시장 현황 (WIPO 특허 및 Google DB 검색)

- 건전복, 레토르트, 전복 스테이크 등 일반 가공식품 한정
- 전복 단백질 원 다이어트 아미노산 소재로 일부 활용
- 고흡수성 동물사료 및 영양제를 위해 위장관 소화기수분해시스템 공정 활용
- 녹색홍합 및 해조류 폴리페놀 혼합물 등 해양생물 유래 면역활성소재 상용화 검토

2. 기술 분석에 따른 향후 전망

- 전복의 생산량 급증 및 유통판매 구조를 미루어 볼 때 언제까지 활전복 양식 판매에 의존할 수 없으며, 또한 WTO와 같은 국제규약 및 이상기온 등과 같은 변수에 의해 향후 전복 양식산업의 경제적 가치 및 긍정적 전망을 낙관할 순 없음.
- 따라서 상품의 다양화 및 상품가치 향상을 통해 수출시장 확대 및 고부가가치화를 모색해야 함.
- 웰빙(well-being) 문화의 확산에 따라 의약품 보다는 평소 체내 항상성을 유지하여 좋은 건강상태를 지키고자 하는 노력의 일환으로 다양하고 효과적인 기능성 식품들을 찾고 있으며, 이에 따라 기능성 식품 시장 또한 빠르게 팽창하고 있음.
- 최근에는 즉시형 과민반응에 중요하게 관여하는 세포들을 활성화시키는 인자들과 억제하는 인자들에 대한 연구, 이 세포들로부터 분비되는 화학매개물질들의 역할에 대한 연구 및 실험동물에서 알러지성 질환을 일으키는 다양한 실험모델을 만들어 내는 연구들을 통하여 알러지성 질환의 발병 기전을 밝히고 이를 방지할 수 있는 적합한 새로운 약물을 개발하는 것이 많은 학자들의 관심의 대상이 됨.
- 현재까지 나온 스테로이드, 항히스타민제, 기관지 확장제 그리고 leukotrienes 길항제 등과 같은 치료제로는 이들 질환의 증상들은 호전시킬 수 있으나 반복적으로 재발하지 않도록 완전히 근절시킬 수는 없는 실정이어서 보다 효과적이고 근본적인 치료방법의 개발이 절실히 요구되고 있는 상황임.
- 최근 전복 생산자 유통자 조합법인 및 관련 지자체의 적극적인 노력과 의지가 있으므로 관련 정부기관의 지속적인 투자와 관심을 쏟는다면 해당지역의 낙후된 해양생명공학 및 어민 경제에 활력을 불어넣을 것으로 사료됨.
- 향후 지속적 연구를 통한 알러지 치료의 근본적인 대책마련 함께, 평상시 체내 면역학적 항상성 유지를 통하여 알러지를 예방 억제할 수 있는 건강식품 및 화장품 소재 개발은 국민보건에 크게 이바지할 것으로 사료됨.

3. 국내외 기술동향 분석 결론

- 현재까지 국내 식품안전의약청에 고시된 알러지 치료 및 예방 효능을 가지는 물질은 없으나 홍삼, 프

로폴리스, 키토산 등 면역증강 작용에 대한 기능성 고시를 획득한 물질 및 기술이 개발됨.

- 알러지와 관련된 제품에는 연고 타입의 상품이 있지만 부작용이 심한 스테로이드성 제제로 분류되고 있으며, 최근 제 1형 알러지의 일종인 아토피 예방 및 억제 기능성 효능이 화장품의 신 기능성으로 고시될 수 있다는 전망. 외국의 경우 미국, 유럽, 일본을 중심으로 아토피 및 접촉성 피부염에 대한 기능성 화장품이 생산되고 있음.
- 비록 국내에서 알러지에 대한 기능성 및 효능이 일부 의약품에 한정되어있지만, 체계적인 면역기전과 효능 실험을 통해 아토피 천식 등 알러지 질환에 대한 유효성을 증명한다면 건강식품과 화장품 군에서 신기능성 고시 항목으로 인정받을 수 있을 것으로 사료.
- 이러한 현황을 살펴볼 때 해양생물 유래 천연 면역활성제품 개발은 건강식품 및 화장품 분야에서 가능하며 의약품 소재 적용을 위한 기초 기술로 활용 가능할 것이다. 특히 홍삼, 프로폴리스, 스피루리나, 키토산 등과 달리 원료 수급이 용이하고 원가가 저렴한 전남지역 전복 및 해조류 부산물을 활용한다면 가격 경쟁력이 높을 것으로 판단되며 면역활성제품 국내외 시장의 확대와 수요급증에 따라 실용적 가치가 높을 것으로 판단됨.

제 8 장 참고문헌

- Amon U, Menz U, Wolff HH.(1994) Investigations on plasma levels of mast cell mediators in acute atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* Feb;7(1), 63-67.
- Amsler, C.D. & V.A. Fairhead. (2006) Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Advances in Botanical Research* 43: 1-91.
- Arnold, T.M. and N.M. Targett. (2002) Marine tannins: The importance of a mechanistic framework for predicting ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 28:1919-1934.
- Bao L, Shi VY, Chan LS.(2012) L-4 regulates chemokine CCL26 in keratinocytes through the Jak1, 2/Stat6 signal transduction pathway: Implication for atopic dermatitis. *Mol Immunol.* Feb;50(1-2), 91-97.
- Brandt EB, Sivaprasad U. Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis.(2011) *J Clin Cell Immunol.* Aug 10;2(3), 110.
- Buddenkotte J, Maurer M, Steinhoff M.(2010) Histamine and Antihistamines in Atopic Dermatitis. *Adv Exp Med Biol.* 709, 73-80.
- Cooper KD.(1994) Atopic dermatitis:recent trends in pathogenesis and therapy. *J Invest Dermatol* 102, 28-137.
- Engelmann, J., Volk, J., Leyhausen, G., & Geurtsen, W. (2005). *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 75B, 272-276.
- Garcia-Esquivel (2006) Activity of digestive enzymes along the gut of juvenile red abalone, *Haliotis rufescens*, fed natural and balanced diets. *Aquaculture*, 261, 615-625
- Guo, Q.; Zhao, B.; Shen, S.; Hou, J.; Hu, J.; Xin, W. (1999) *Biochem. Biophys. Acta*, 1427, 13.
- Halliwell, B. (2008) *Free Radical Biol. Med.* (doi:10.1016/j.freeradbiomed).
- Han H, Xu W, Headley MB, Jessup HK, Lee KS, Omori M, Comeau MR, Marshak-Rothstein A, Ziegler SF.(2012) Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-mediated dermal inflammation aggravates experimental asthma. *Mucosal Immunol.* May;5(3), 342-351.
- Hanifin J, Chan SC.(1996) Diagnosis and treatment of atopic dermatitis. *Dermatol Ther* 1, 9-18.
- Hansen et al., 1989. M.B. Hansen, S.E. Nielsen and K. Berg. (1989) *J. Immunol. Methods* 119 203
- Hansen MB, Nielsen SE, Berg K (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods*, 119, 203-210.
- Hener P, Friedmann L, Metzger D, Chambon P, Li M.(2011) Aggravated TSLP-induced

- atopic dermatitis in mice lacking Dicer in adult skin keratinocytes. *J Invest Dermatol.* Nov;131(11), 2324-2327.
- Heo, S.J. and Jeon, Y.J. (2009) Evaluation of diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae* for radical scavenging activity and its protective effect against H₂O₂-induced cell damage. *Proc. Biochem*, 44, 412 - 418.
- Hide DW.(1997) Early intervention for the prevention of atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol.* Feb;8(1), 7-10.
- Hira K, Mitsuishi K, Kawamoto K, Suto H, Nakao A, Ra C, Ogawa H.(2001) Establishment and characterization of a murine mast cell line derived from NC/Nga mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 125 Suppl 1:67-70.
- Hiramoto K., Johkoh H., Sako K. and Kikugawa K. 1993. DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH). *Free Radic. Res. Commun.* 19: 323-332.
- Jung MK, Hur DY, Song SB, Park Y, Kim TS, Bang SI, Kim S, Song HK, Park H, Cho DH.(2010) Tannic acid and quercetin display a therapeutic effect in atopic dermatitis via suppression of angiogenesis and TARC expression in Nc/Nga mice. *J Invest Dermatol.* May;130(5), 1459-1463.
- Jung, W.K., Choi, I., Oh, S., *et al.* (2009) Anti-asthmatic effect of marine red alga (*Laurencia undulata*) polyphenolic extracts in a murine model of asthma. *Food Chem. Toxicol.*, 47, 293 - 297.
- Jung, W.K., Lee, B.J., Kim, S.K. (2006) *British Journal of Nutrition*, 95, 124 - 128.
- Jung, W.K., Qian, Z.J., Lee, S.H., Choi, S.Y., Sung, N.J., Byun, H.G., Kim, S.K., Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide isolated from in vitro gastrointestinal digests of *Mytilus coruscus*. *J. Medicinal Food* 10(1), 197-202 (Mar. 2007).
- Kang YH, Shin HM.(2012) Inhibitory effects of *Schizandra chinensis* extract on atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* Apr;34(2) 292-298.
- KMI, 해양수산동향, 1241호, 2007
- Lin L, Nonoyama S, Oshiba A, Kabasawa Y, Mizutani S.(2003) TARC and MDC are produced by CD40 activated human B cells and are elevated in the sera of infantile atopic dermatitis patients. *J Med Dent Sci.* Mar;50(1), 27-33.
- Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, et al.(1996) Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol* 3, 461-466.
- Milne L, Nicotera P, Orrenius S, Burkitt M (1993) Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: pro-oxidant and antioxidant properties of

glutathione. *Arch Biochem Biophys* 304:102-109

- Miyahara H, Okazaki N, Nagakura T, Korematsu S, Izumi T.(2011) Elevated umbilical cord serum TARC/CCL17 levels predict the development of atopic dermatitis in infancy. *Clin Exp Allergy*. Feb;41(2), 186-191.
- Moghtaderi M, Farjadian S, Kashef S, Tavakoli M, Alyasin S, Afrasiab M, Orooj M.(2012) Specific IgE to Common Food Allergens in Children with Atopic Dermatitis. *Iran J Immunol*. Mar;9(1), 32-38.
- Nanjo, F., K. Goto, R. Seto, M. Suzuki, M. Sakai and Y. Hara, 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic. Biol. Med*, 21: 895-902.
- Ramakrishna, M., Hultin, H. O., & Racicot, W. F. (1987). Some kinetic properties of dogfish chymotrypsin. *Comparative Biochemistry and Physiology B - Biochemistry and Molecular Biology*, 87, 25 - 30.
- Rosen, G. M.; Rauckman, E. J.; Packer, L.(1984) In: Academic Press: Orlando, FL, Vol. 105, p 198.
- Sachdev, S.; Davies, K. J. A. (2008) *Free Radical Biol. Med.* 44, 215.
- Shaheen MA, Attia EA, Louka ML, Bareedy N.(2011) STUDY OF THE ROLE OF SERUM FOLIC ACID IN ATOPIC DERMATITIS: A CORRELATION WITH SERUM IgE AND DISEASE SEVERITY. *Indian J Dermatol*. Nov;56(6), 673-677.
- Song WJ, Kim DI, Kim MH, Yang MS, Kim YJ, Kim SH, Cho SH, Min KU, Chang YS.(2011) Human seminal plasma allergy: successful pregnancy after prophylactic anti-histamine treatment. *Asia Pac Allergy*. Oct;1(3), 168-171
- Suzuki H, Suzuki K, Inoue A, Ojima T (2006) A novel oligoalginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*, that releases disaccharide from alginate polymer in an exolytic manner. *Carbohydr Res* 341:1809 - 1819
- Takai T.(2012) TSLP expression: cellular sources, triggers, and regulatory mechanisms. *Allergol Int*. Mar;61(1), 3-17.
- Takamatsu S., Hodges T. W., Rajbhandari I., Gerwick W. H., Hamann M. T., and Nagle D. G. (2003b), Marine natural products as novel antioxidant prototypes. *J. Nat. Prod* 66, 605-608.
- Watanabe N, Tomimori Y, Saito K, Miura K, Wada A, Tsudzuki M, et al.(2002) Chymase inhibitor improves dermatitis in NC/Nga mice. *Int Arch Allergy Immunol* 128, 29-234.
- Yang G, Lee K, An DG, Lee MH, Ham IH, Choi HY.(2012) Effect of *Chrysanthemi borealis* flos on atopic dermatitis induced by 1-chloro 2,4-dinitrobenzene in NC/Nga mouse. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. Jun;34(3), 413-418.
- 대한민국 특허등록 (10-0680066, 등록일 2007.02.01) 위-소장 소화분해 시스템을 이용한 가수분

해물로부터 홍합항산화 펩타이드 분리방법 (Isolation of antioxidative peptide from mussel digests hydrolyzed in gastrointestinal digestion system)

보건복지가족부, 제4기 1차 국민건강영양조사

식품의약품안전청 ‘기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인’(2005)

식품의약품안전청, “제10. 일반성분시험법 10-3-1” 식품공전 제2권(2010)

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 수산실용화기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 수산실용화기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.