

GOVP1199904367

636  
L293C

최 종  
연구보고서

도축폐기물인 가축혈액을 이용한 유용물질의 생산

Utilization of Animal Blood Produced from Slaughterhouse

연구기관

한 동 대 학 교

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “도축폐기물인 가축혈액을 이용한 유용물질의 생산” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 17.

주관연구기관명 : 한 동 대 학 교

총괄연구책임자 : 신 현 길

연 구 원 : 현 창 기

연 구 원 : 신 의 철

연 구 원 : 박 중 흠

연 구 원 : 이 주 운

연 구 원 : 정 석 규

연 구 원 : 김 성 배

연 구 원 : 이 미 애

# 여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

도축폐기물인 가축혈액을 이용한 유용물질의 생산

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

### 1. 연구개발의 목적

도축 폐기물인 가축혈액은 각종 단백질이 풍부하게 함유되어 있어 이용가치가 높은 원료자원임에도 불구하고 거의 대부분 폐기됨으로써 자원의 낭비는 물론 환경의 주요 오염원이 되고 있다. 본 연구에서는 이러한 가축폐혈액을 이용하여 유용물질을 얻을 수 있는 방법을 다음과 같은 세가지의 방향으로 설정하였다.

가. 사료첨가제로 이용하기 위하여 유산균 제제와 혈분이 조화된 새로운 사료첨가제의 개발

유산균 제제가 가축의 장내 균총 개선 및 질병에 대한 저항력을 강화시키기 위한 사료첨가제로서 이용되고 있으나 높은 가격으로 인해 실제 사육농가에서는 사용이 제한되어 있고, 한편으로는 가축혈액을 건조, 분말화한 혈분으로 공급되고 있는 동물성 단백질 사료첨가제가 점차 사용량이 줄어들고 있는 추세를 감안하여 이러한 기존 사료첨가제의 문제점을 보완하는 연구이다. 즉, 유산균 발효에 의해 혈분의 질을 높이고, 혈액 중의 단백질 성분을 유산균 배양의 질소원으로 이용하며 또한 혈액 성분 에 의한 유산균의 안정화 효과에 의해 경제적이며 효율적인 유산균 제제의 생산을 가능케 하는 상호보완효과를 살려 동물성 단백질 성분과 유산균이 동시에 함유되는 새로운 미생물 사료첨가제를 개발한다. 이를 위하여 혈액으로부터 간단

히 얻을 수 있는 혈장을 배지성분으로 하여 유산균을 배양함에 있어 균주선발, 배지 조성, 배양방법 및 발효조건 등이 확립하고, 얻어진 배양액의 동결건조에 의한 유산균 체계의 생산을 위해 유산균의 생존율을 극대화할 수 있는 동결건조의 최적조건을 확립한다.

나. 기능성 식품소재로의 이용을 위하여 혈액 단백질로부터의 새로운 기능성 펩타이드를 개발

혈액 단백질의 대부분을 차지하며 혈장과 혈구의 주요 구성 단백질인 알부민, 글로불린, 글로빈 등으로부터 기능성 식품소재로 이용할 수 있는 항고혈압 또는 항암활성을 나타내는 펩타이드를 개발한다. 이들 단백질을 이용하여 효소처리 등 적절한 생화학 반응을 통해 기능성 펩타이드를 얻어냄으로써 고혈압 예방식품 또는 항암식품의 소재등으로 이용하고자 한다. 이를 위하여 먼저 알부민, 글로불린, 글로빈 등의 혈액 단백질을 본 연구 목적에 맞는 순도로 경제적으로 각각 분리하는 방법을 확립하고, 분리한 단백질을 효소에 의해 분해시키는 최적반응조건을 결정한다. 효소 처리에 의해 얻어진 가수분해물에 대해 항고혈압 활성(angiotensin I converting enzyme(ACE) 저해활성)을 측정하여 항고혈압 펩타이드가 생산되는지를 확인하고 그 활성을 평가하며 또한 생산된 펩타이드 분획의 분리를 통해 그 특성을 조사한다. 또한 동일한 가수분해물에 대하여 발암원에 의한 DNA의 손상도를 측정하는 방법인 Comet assay를 통해 DNA의 손상을 방지하는 활성을 갖는 항암 펩타이드의 생산을 확인하고 그 활성과 분획의 분리 특성을 조사 평가한다.

다. 육가공품 첨가제로의 이용을 위하여 nitrite를 부분대체할 수 있는 육가공품 발색제를 개발

기존 육가공품 발색제인 nitrite의 유해성이 부각되고 있는 가운데 화학물질 발색제의 사용량을 줄이고 한편으로는 철이온의 보급효과도 병행될 수 있도록 헤모글로빈을 이용하여 발색제를 개발한다. myoglobin과 비슷한 구조를 가지고 있는 헤모글로빈에 nitrite를 포화시켜 NO-헤모글로빈의 결합을 생성시키고 이들의 용해성을

높여 nitrite 대신 NO-헤모글로빈을 첨가함으로써 육제품의 발색효과를 최대화할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 nitrite의 첨가 수준을 발색이 문제되지 않는 한계까지 낮추어서 미생물 오염에 대한 위험부담을 고려하면서 우리나라의 육제품을 소비하는 독특한 식문화(외국과는 달리 대부분 육제품을 기름에 튀겨서 소비)로 인해 발생하는 튀김조리에 의한 nitrosamine 생성의 유해를 줄일 수 있도록 한다.

## 2. 연구개발의 중요성

가축혈액은 도축장으로부터 생산되는 축산부산물로서 우리나라에서만 해도 97년 현재 연간 약 7만톤 이상의 가축혈액이 생산되어지는데 각종 단백질이 풍부하게 함유되어 있어 유용가치가 높은 원료자원으로 알려져 있다. 하지만 우리나라의 경우에는 이 가축혈액은 자원으로 이용되는 것이 아니라 거의 대부분 폐기되고 있기 때문에 자원의 낭비는 물론 환경의 주요 오염원으로 큰 사회문제가 되고 있다. 하지만 선진국에서는 이 가축혈액을 이용하여 각종 유용물질을 생산하는 연구를 계속하여 왔고 또한 몇가지는 상품화되어 제품으로 공급되고 있으며, 우리나라에서는 오히려 이들을 다량 수입하고 있는 실정이다. 현재 가축혈액이 주로 이용되고 있는 것은 동물성 단백질 농후사료로서, 도축장의 가축의 피를 모아 건조, 분말화한 혈분(blood meal)으로 공급되고 있으며, 일부분이기는 하나 혈액내의 헤모글로빈등 특정 성분을 분리해내어 기능성 식품소재, 의약품소재등으로 이용되고 있다. 다시 말해서 가축혈액의 이용은 혈액 자체를 간단한 처리만 거쳐 사료첨가제로 사용하고 있는 분야가 주를 이루고 있으며, 혈액내의 단백질 또는 그의 특정 유용성분을 개별적으로 추출해내어 이용하는 방법은 그동안 산발적으로 연구되어 왔으나 아직 본격적인 이용단계에는 이르지 못하고 있는 실정이다. 그나마 사료첨가제로의 이용도 혈분 자체의 높은 염농도와 최종 제품에 미치는 암적색 등에 의한 악영향으로 인해 그 사용량은 감소추세에 있고, 기능성 식품소재로의 이용은 앞으로 확대 성장해 나갈 전망을 보여주고 있으나 현재로서는 응용분야가 빈약하고 제조 기술이 충분히 연구되어 있지

않아 여러가지 장애물이 앞에 놓여있는 형편이다. 따라서 엄청난 양으로 끊임없이 생산되어 버려지고 있는 가축혈액을 이용하여 여러가지 고부가가치의 유용물질을 생산해낸다면, 자원 낭비의 차단은 물론 환경오염의 방지에 이르기까지 다방면으로의 성과를 기대할 수가 있다. 특히 최근에 위생적인 시설을 가진 도축장이 새롭게 설치되고 있어 위생적인 가축혈액의 수집이 가능해지고 있기 때문에 가축혈액을 이용하는 응용연구의 필요성은 절실하며 또한 시급한 시점에 이르렀다 하겠다. 본 연구의 중요성을 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.

1) 혈분이 동물성 단백질의 공급원으로 사료에 첨가되는 한편, 유산균 제제 또한 가축의 장내 세균총에 있어서 *Lactobacillus*와 같은 유산균을 증가시키고 대장균과 같은 병원성균의 농도를 낮춰줌으로써 장내의 건강을 유지하고 항생제 사용을 줄이기 위하여 첨가하는 중요한 첨가제이다. 기존의 두가지 사료첨가제로 이용되고있는 혈분 및 유산균 제제를 가축혈액을 배지로 한 유산균의 발효를 시도함으로써, 혈분은 유산균 발효에 의한 탈취등으로 질이 개선되고 유산균 제제 역시 혈액 성분 중의 각종 단백질에 의한 안정화로 제제화 공정에서 생존 생균수가 증가하는 등의 효과가 예상되므로 고급의 사료첨가제를 효율적이고 경제적으로 생산할 수 있게 된다.

2) 혈청 알부민 및 글로블린 등 혈액 단백질로부터 항고혈압 또는 항암 기능성을 가지는 펩타이드를 만들어 내어 건강식품의 새로운 소재로 이용될 수 있도록 한다.

3) 헤모글로빈의 착색활성을 이용하여 육제품의 발색을 위한 생물소재의 발색제를 개발함으로써 육제품에서 문제시되고 있는 발색제(nitrite/nitrate)의 사용량을 줄일 수 있는 방법을 모색한다.

4) 축산업에서 막대한 양의 부산물로 나와서 폐기되고 있는 가축혈액을 이용하여 고부가가치의 유용물질을 생산해 내므로 폐자원이었던 혈액을 여러형태의 소재 또는 첨가제 생산 원료로 공급하게 되어 식육생산 산업체에서는 그 처리비용을 줄이며 오히려 소득 증대원이 될 수 있다.

5) 가축혈액의 이용하여 유산균 발효와 혈분의 효과를 조화시킨 고급의 사료첨가제와 혈액 단백질로부터의 새로운 기능성 펩타이드, 육제품에 첨가할 철분 보강형 생물소재의 발색제등을 개발함으로써 가축혈액 이용분야에 있어서 세계를 선도할 수 있는 기술을 확보한다.

6) 단백질이 농축 함유되어 있어 잠재적 유용가치가 높은 가축혈액이 폐기되지 않고 자원으로 활용됨으로써 유용자원의 낭비라는 국가 경제적인 손실이 근본적으로 차단되게 된다.

7) 엄청난 양의 가축혈액이 자연으로 폐기되어 부영양화등의 심각한 환경 오염 원인으로 작용하고 있는데 이것을 유용물질 생산원료로 소비할 수 있게 되어 오염원을 상당 부분 감소시킬 수 있다. 가축혈액을 유용물질 생산원료로 공급하기 위해서 도축장등에서는 가축혈액의 위생적인 회수를 위한 노력과 장치가 자연적으로 갖추어 질 것이므로 이와 함께 도축과정 및 도체의 취급도 위생적으로 이루어져 결국 축육의 유통에 있어서 심각한 문제의 하나인 미생물 오염문제가 크게 개선될 것이다.

8) 폐자원을 유용물질 생산원료로 공급함으로써 육가공 산업체에서는 소득의 증대로 인해 그 산업이 활성화되고 재투자가 이루어져 식육산업에 대한 사회적 인식이 개선될 수 있다.



### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
<p>1. 유산균 제제와 혈분이 조화된 새로운 사료첨가제의 개발</p>	<p>가. 혈액성분을 배지로 한 유산균 발효조건 확립            1) 배지제조 및 배양방법 확립            2) 발효조건 최적화            나. 혈액 단백질의 유산균 안정화 효과 규명            1) 배양액의 동결건조방법 확립            2) 안정화 효과 규명            다. 발효 유산균제의 제제화 조건 확립            1) 동결건조 안정제의 선정            2) 동결건조조건의 최적화</p>
<p>2. 혈액단백질로부터의 새로운 기능성 펩타이드 개발</p>	<p>가. 혈액 단백질의 분리            1) immunoglobulin G와 알부민의 분리 및 확인            2) 글로빈의 분리            나. 효소처리와 펩타이드 분리            1) 효소반응조건의 확립            2) 펩타이드의 분리            다. 펩타이드의 기능성 조사            1) 펩타이드의 항고혈압 기능성 조사            2) 펩타이드의 항암 기능성 조사</p>
<p>3. Nitrite를 부분대체할 수 있는 육가공품 발색제의 개발</p>	<p>가. nitrite의 첨가량에 따른 발색도 및 가열 안정성 조사            나. nitrite혼합발색제의 동결건조에 따른 용해도 조사            다. nitrite혼합발색제의 육제품 첨가시 발색 효과</p>

#### IV. 연구개발결과

##### 1. 유산균 제제와 혈분이 조화된 새로운 사료첨가제의 개발

혈장 단백질 성분을 유산균 배양의 배지성분으로 이용하여 얻은 배양액을 동결 건조하여 유산균 제제를 생산함으로써 동물성 단백질 성분과 유산균이 동시에 함유되는 새로운 미생물 사료첨가제를 개발하기 위한 연구를 진행하였다. 본 연구에서는 산업화에 응용할 수 있는 기술을 개발하는데 가장 주안점을 두고 있으므로, 균주선발, 배지조성, 배양방법 및 동결건조방법 등이 산업화에 있어서 필요한 경제성에 부합되도록 주력하였다.

##### 가. 혈액성분을 배지로 한 유산균 배양조건 확립

우선 요구르트용 일반 유산균(*Streptococcus thermophilus* KCCM12020)에 대하여 혈액성분을 질소원으로 한 배지에서의 생육 여부와 상태를 실험한 결과 매우 양호한 생육상태를 보여주었다. 보다 구체적으로 조사된 배양조건을 토대로 본격적인 유산균 제제 생산을 위한 실험을 진행하기 위하여 균주로는 현재 국내에서 시판 중인 미생물 사료첨가제로부터 *Lactobacillus* 균주를 분리해 내어 배양한 결과, 거의 동일한 최적 배양조건을 얻을 수 있었다. 배지조성은 유산균 배양에서의 rich medium으로 알려진 MRS 배지를 기준으로 하여 그 질소원을 혈장 단백질로 대체한 modified MRS 배지에서의 생육생균수를 비교하였는데, 1차년도에 일반 유산균에 비하여 분리된 probiotics용 유산균이 모든 배지에서 2배 이상의 생육도를 나타내었으며, 최적화된 modified MRS 배지에서의 최대 생육생균수가  $5.2 \times 10^9$  cells/ml로서 MRS 배지( $7.1 \times 10^9$  cells/ml)의 73%에 이룸을 확인할 수 있어서 경제성에서 충분한 가능성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

##### 나. 혈액 단백질의 유산균 안정화 효과 규명

배양액을 동결건조하여 분말형의 유산균 사료첨가제로 제조하기 위한 공정에 있어서 유산균의 생존 생균수를 높일 수 있는 안정화 조건을 규명하였다. Modified

MRS 배지의 혈장 단백질의 가수분해물을 0.1, 0.5, 1, 2 plasma의 농도로 증가시키며 첨가함에 따라 그 배양액의 동결건조 안정화 효과가 증가함으로써 혈장 단백질 성분에 의한 안정화 효과가 입증되었다. 이와 같이 혈장 단백질이 동결건조 안정화 효과를 나타낸다는 사실은 가축폐혈액을 이용하여 미생물 사료첨가제를 생산하는 공정이 배지성분의 제조원가가 저렴하다는 장점에 덧붙여 또하나의 큰 장점으로 작용할 것으로 사료된다. 또한 MRS 및 modified MRS 배지에서 배양한 배양액을 동결건조하여 그 생존율을 비교 조사한 결과, modified MRS 배지의 혈액 단백질 성분들이 나타내는 유산균 안정화 효과는 MRS 배지의 고농도 질소원과 거의 유사한 효과를 나타내었다. 또한 modified MRS 배지에서의 유산균 생존율은 비교구인 MRS 배지보다 오히려 약간 높은 수준으로 나타나, modified MRS 배지에 잔존하는 혈장 단백질 성분의 동결건조 안정화 효과가 복합배지인 MRS 배지의 성분(yeast extract, beef extract, peptone 등)에 뒤지지 않음을 보여주었다.

#### 다. 발효 유산균체의 제제화 조건 확립

실제적인 유산균 제제의 생산실험을 위하여 동결건조에 필요한 안정제를 선정함과 동시에 최적동결건조조건을 조사하였다. 우선 동결건조전의 배양액은 기존 산업체에서 이용하는 방법과 같이 원심분리를 거쳐 10배 정도로 농축한 후 동결 및 건조하는 것이 안정화에 유리한 것으로 나타났다. 또한 동일 부피의 배양농축액을 동결할 때 동결속도가 완만할수록, 그리고 동결액의 두께가 두꺼워서 건조시간이 연장될수록 생존율이 저하되어 최고 4% 정도의 하락을 보였다. 배양액의 낮은 pH는 다시 6.2 정도로 올려줄 때 생존율이 약간 상승하는 효과가 있었다. 이러한 동결건조 조건을 바탕으로 하여 유산균의 동결건조 생존율을 더욱 향상시키기 위해 기존 유산균 제제 생산공정에서와 같이 안정제 선발 실험을 실시한 결과 sucrose와 skim milk가 우수한 안정화 효과를 나타내었는데 그 중에도 sucrose의 안정화 효과가 뛰어나 10%(w/v)의 농도에서 생존율이 48.3%에 이르도록 하는 안정화 효과를 나타내었다. Sucrose는 식품에 이용하는 가장 보편적인 감미료이면서 또한 가격도 매우 저

럼하기 때문에 우수한 안정제로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.

위에 설명한 바와 같이 본 연구에서 얻어진 조건에 의해 충분한 경제성이 입증되었기 때문에 상품화를 위한 발판이 마련되었다고 판단된다. 앞으로는 이러한 조건에 따라 시제품을 생산하고 직접 축산농가를 통하여 가축에 대한 사양시험을 거쳐 실제로 미생물 사료첨가제로의 생리적 효과를 검증하는 과정이 필요하다.

## 2. 혈액 단백질로부터의 새로운 기능성 펩타이드의 개발

혈장과 혈구의 주요 구성 단백질인 알부민, 글로블린, 글로빈 등을 이용하여 단백질분해효소의 적절한 처리에 의해 펩타이드를 얻어내고, 얻어진 펩타이드들의 항고혈압 또는 항암기능성을 확인하는 연구를 진행하였다. 우선 도축폐혈액으로부터 알부민, 글로블린, 글로빈 등의 혈액 단백질을 각각 분리하고, 또한 혈장 전체와 분리한 각 단백질에 대한 효소분해 반응조건을 조사하였다. 이들 여러 가수분해물에 대하여 한 항고혈압 활성(ACE 저해활성)을 측정하고 ACE 저해 펩타이드의 효율적 생산을 위한 조건들을 조사하였으며 아울러 Comet assay를 이용하여 항유전독성을 측정함으로써 항암활성을 갖는 펩타이드 분획을 탐색하였다.

### 가. 혈액 단백질의 분리

혈장으로부터 원심분리와 에탄올 침전분획 등의 조건을 조절하여 고순도의 알부민 분획과 비교적 순도가 낮은 IgG의 분획을 얻을 수 있었다. 또한 혈구를 용혈시킨 후 헴화합물을 분리해내어 고순도의 글로빈 분획도 얻을 수 있었다. 각각의 분리단계는 주로 원심분리, 침전분획 등 분리비용이 저렴한 공정으로 간단하게 구성하였다. 본 연구에서는 혈액 단백질로부터 얻은 펩타이드를 기능성 식품소재로 이용하고자 하는 것이므로 단일 단백질의 높은 순도보다는 분리한 혈액 단백질을 주성분으로 하는 단백질 분획으로부터 기능성 펩타이드를 얻을 때 활성 펩타이드의 생산성이 향상되는 생산공정을 확립하는 차원에서의 필요한 순도이므로 본 연구결과에서 얻어진 알부민, IgG, 글로빈 등의 순도는 적절한 것이라고 판단되었다.

#### 나. 효소처리와 펩타이드의 분리

Alcalase<sup>®</sup> 및 Neutrase<sup>®</sup> 등 산업용 단백분해효소(미생물 유래) 또는 트립신, 펩신 등 생체내에서 흡수된 펩타이드를 분해할 수 있는 효소로서 저렴한 공급이 가능한 것들을 이용하여 혈장 단백질들을 가수분해하였다. 각 가수분해물은 각 효소의 분해 특성을 조사하고 실제 공정에서의 한외여과 조건을 예측하고자 gel permeation chromatography를 통해 펩타이드 분획으로 분리하였다.

#### 다. 항고혈압 기능성 조사(ACE 저해활성의 측정)

혈장 단백질 전체에 대한 산 및 각 효소에 의한 가수분해물을 얻어 각각의 저해활성을 비교한 결과, Alcalase가 낮은 효소농도에서 짧은 시간동안 가장 효과적으로 ACE 저해 펩타이드를 생산하는 것으로 나타났다. 또한 혈액으로부터 분리해낸 albumin, globulins, globin 등 주요 단백질 분획에 대하여 가수분해시켰을 때에는 albumin 분획의 Alcalase 가수분해물이 가장 높은 활성을 나타내었다. 위와 같이 도축 폐혈액의 혈장 단백질을 이용하여 ACE 저해 펩타이드를 생산한 결과 혈액으로부터 분리해낸 albumin을 Alcalase로 분해하였을 때 IC<sub>50</sub>값이 0.5 mg/ml 인 고효율성의 펩타이드 혼합물을 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 이는 타 연구자들에 의해 발표된 각종 식품 단백질로부터의 가수분해물과 유사한 수준의 활성(1 mg/ml 이하)으로서 폐혈액 혈장 단백질의 이용 가능성이 높음을 보여주는 것이었다.

#### 라. 펩타이드의 항암 기능성 조사

혈장 전체의 가수분해물에 대한 항유전독성을 조사한 결과 pepsin과 Alcalase에 의해 얻어진 가수분해물이 활성을 나타내었고 albumin, globulins, globin 분획에 대해서는 albumin의 Alcalase 가수분해물이 가장 높은 활성을 나타내었다. 특히 이 가수분해물은 5 mg/ml의 낮은 농도에서 50%의 항유전독성을 나타냈으며 10 mg/ml 부터는 거의 완전한 손상방지효과를 보여주었다. 이와 같은 항유전독성 효과의 기작을 알아보기 위한 실험에서는 세포를 우선 가수분해물과 pre-incubation한 후 MNNG를 처리한 경우가 가장 손상이 적은 것으로 나타나, 가수분해물 중의 펩

타이드는 세포 또는 핵체와의 상호작용을 통하여 MNNG의 손상을 막고 있다는 것을 추정할 수 있었다. 위와 같이 도축 폐혈액의 혈장 단백질로부터 항유전독성 펩타이드를 얻을 수 있음이 확인되었다. 최근 된장, 간장 등의 식품 단백질로부터 항암 펩타이드에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으나 발암물질에 대한 암예방 효과를 나타내는 항유전독성 펩타이드에 대한 연구는 전혀 없다. 본 연구에서는 특히 폐혈액으로부터 간단하게 분리해낸 albumin 분획에 대하여 산업용 효소인 Alcalase를 처리하여 얻어진 가수분해물이 가장 높은 활성의 펩타이드 혼합물을 제공함을 확인함으로써, 폐혈액 단백질로부터 고부가가치의 암예방 기능성 펩타이드를 산업적으로 생산할 수 있는 실용화 가능성을 보여준 것이었다.

### 3. Nitrite를 부분대체할 수 있는 육가공품 발색제의 개발

기존 육가공품 발색제인 nitrite의 유해성이 부각되고 있는 가운데 화학물질 발색제의 사용량을 줄이고 한편으로는 철이온의 보급효과도 병행될 수 있도록 헤모글로빈을 이용한 발색제 생산 가능성을 조사하였다. 즉 myoglobin과 비슷한 구조를 가지고 있는 헤모글로빈에 nitrite를 포화시켜 NO-헤모글로빈의 결합을 생성시키고 이들의 용해성을 높여 nitrite 대신 NO-헤모글로빈을 첨가함으로써 육제품의 발색효과를 최대화하고자 하였다.

#### 가. nitrite의 첨가량에 따른 발색도 및 가열 안정성 조사

혈구 시료에 ascorbic acid를 일정량 첨가한 후 nitrite의 농도를 달리 첨가할 때 nitrite 첨가에 따라 발색도가 점차 증가하였다. 한편 첨가되는 ascorbic acid의 첨가량이 많을수록 발색도는 역시 증가하여 안정화 효과를 나타내었으며 100ppm이상에서 최고 수준의 발색도가 유지됨을 알 수 있었다.

#### 나. nitrite혼합발색제의 육제품 첨가시 발색 효과

육제품을 직접 제조하고 앞서 실험한 발색제를 첨가하여 육제품에서의 발색효과를 조사한 결과, 30 ppm 이하의 낮은 nitrite 첨가량으로도 육제품의 발색이 가능

함을 확인할 수 있었다. 최대 적색도는 12 ppm에서 나타났는데 이러한 낮은 nitrite 수준은 소세지 제조에 활용이 가능하며 일반적으로 육제품의 제조에 70-100 ppm의 nitrite가 첨가되고 있음을 감안할 때 그의 1/5 - 1/8 수준으로서 nitrite 첨가 대체효과가 큰 것으로 사료되었다. 발색제를 첨가한 소세지 제품을 진공포장하여 냉장 보관 후 7일이 경과하였을 때에도 nitrite 12 ppm에서 높은 적색도가 유지됨으로써 대체로 12 ppm의 nitrite 첨가효과가 가장 적합한 조건임을 확인할 수 있었다.

## V. 활용에 대한 건의

본 연구에서는 고농도의 단백질 용액이면서도 대부분 폐기됨으로써 자원낭비와 함께 환경오염의 문제까지 낳고 있는 도축 폐혈액의 이용방법 개발을 위하여 사료첨가제의 개발, 기능성 식품소재의 개발, 육가공품 첨가제의 개발 등 세가지의 응용분야로 나누어 연구를 추진하였다. 즉 사료첨가제 분야에 있어서는 유산균 제제와 혈액성분이 조화된 새로운 사료첨가제를 개발하는 연구를 진행하고, 기능성 식품소재 분야에서는 혈액 단백질로부터 새로운 기능성 펩타이드를 생산하며, 육가공품 첨가제 분야에서는 nitrite를 부분대체할 수 있는 육가공품 발색제를 개발하고자 하였다. 본 연구팀은 세 분야에서 중요한 연구결과와 함께 실용화 가능성을 확인할 수 있었으므로 다음과 같은 활용방안을 건의하고자 한다.

(1) 유산균 제제와 혈액이 조화된 새로운 사료첨가제는 기존의 별도로 첨가하고 있는 유산균 제제와 혈액의 두가지 사료첨가제의 효과를 동시에 만족할 수 있고 각각의 첨가제의 품질이 상호보완작용으로 보다 향상되어 사육효과가 뛰어난 고급 사료첨가제로 이용될 것으로 기대된다. 본 연구에서 산학협동으로 공동연구하는 (주)서울농산상사는 사료용 유지,육골분, 유지 파우더, 대용분유등 사료첨가제를 제조 공급하는 기업으로서, 본 연구에서 개발된 새로운 사료첨가제의 시험생산을 시행하여

시제품을 생산한 후 최근 본 연구소와 연결된 경주시 농촌지도소(기술보급과 축산  
계) 및 경주지역 축산농가의 협조하에 이 시제품을 이용한 가축 사양실험을 계획하  
고 있다. 생균제제를 투여하지 않은 가축을 대조구로 하여 기존의 생균제제로 사용  
되고 있는 상품들을 투여한 가축을 비교구로 하고 본 연구의 시제품을 투여한 가축  
에 대한 효과를 평가한다. 젖소의 경우에는 착유 원유의 체세포 함량을 측정하여 유  
방염 예방효과 등을 조사하고 육우의 경우에는 사료 섭취량을 기준하여 소화능력의  
향상정도를 판단한다.

(2) 혈액 단백질로부터의 새로운 기능성 펩타이드는 본 연구에서 그 기능이 확인  
되어 분리된 ACE 저해활성 및 항유전독성이 높은 펩타이드 분획에 대한 동물실험  
을 실시하여 생리활성을 최종 검증한다. ACE 저해활성이 높은 분획의 in vivo 혈  
압강하효과 측정은 일본 통산성 생명공학기술공업연구소의 마루야마 스스무(丸山  
進) 박사의 협조를 통해 우레탄 마취 rat을 이용한 혈압측정 방법으로 실시할 계획  
이다. 항유전독성 펩타이드 분획에 대해서는 우선 생산방법에 대한 특허 출원을 마  
친 후 in vivo Comet assay를 실시한다. 이 동물실험은 본 연구소에 Comet assay  
기술을 이전해 준 독일정부 식품영양연구소(Federal Research Center for Food and  
Nutrition, Karlsruhe, Germany)의 Pool-Zobel교수 실험실과의 협조하에 진행하고자  
한다. 동물실험에서 생리활성이 최종 검증되면 독성실험등의 자체 안전성 평가를 거  
친 후에, 그 결과를 토대로 관심있는 국내의 식품 또는 제약회사에 연결시킴으로써  
식품소재로서의 인허가 취득과 음료 또는 제제화등의 상품화를 실시하게 된다.

(3) Nitrite를 부분대체할 수 있는 새로운 육가공품 발색제는 본 연구에서 얻어진  
발색효과와 육제품 제조 실험결과가 아직 가능성의 확인 단계이므로 국내의 관심있  
는 육제품 생산업체에 연결시켜 재평가를 받아야 할 것으로 사료된다. 즉 육제품의  
발색효과 및 유해성의 감소효과를 생산업체로부터 직접 평가받고 첨가조건 등의 실험  
방법을 재확립하는 일이 선행된 후에 식품첨가제로의 인허가와 이 발색제를 사용



한 육제품의 상품화를 추진한다.

(4) 본 연구에서 개발되는 세분야의 새로운 소재들은 국내에서의 상품화와 함께 네덜란드의 Harimex사(Harimex-Ligos b.v., Kieveen 20, 7371 GD, Postbus 50, 7370 AA Loenen, The Netherlands)에 기술을 소개하여 해외시장으로의 진출을 위한 발판으로 삼게 되고, 또한 Harimex사의 제품들, 즉 혈장분(plasma powder), 헤모글로빈 powder, 글로빈 powder 등에 대해 본 연구의 기술을 접목한 새로운 제품으로의 상품화를 시도할 것이며, (주)서울농산상사와 Harimex사와의 연결로 양사간 정보 및 영업교류를 통한 시장개척을 꾀하게 될 것이다.

## S U M M A R Y

The economic and effective production of several useful materials from animal blood produced in slaughterhouse is investigated. Animal blood contains several useful proteins in high concentrations, but the utilization of the blood is limited and most of the blood is released into environment. It is necessary to develop the processes for prevention of loss of a valuable protein source and elimination of this pollution hazard. In this study, three applications have been studied to develop new utilization procedures; (1) the production of probiotics as a feed additive using bovine blood plasma-based (BBPB) medium, (2) the production of antihypertensive peptides and antigenotoxic peptides from plasma proteins, (3) the production of a colorant for meat products with reduced concentration of nitrite.

A probiotic-strain of *Lactobacillus* sp. was cultured in BBPB medium and freeze-dried to prepare a probiotic product as an animal feed additive. The cell mass produced in the medium,  $5.2 \times 10^9$  CFU/ml, was high enough to be commercialized and was 74% of that in MRS medium. The survival rate of *Lactobacillus* sp. against freeze-drying was affected by the conditions for treatment of cultured BBPB broth before freeze-drying such as pH adjustment, volume reduction and freezing rate. It was also found that the blood protein hydrolysate remaining in broth also enhanced the survival rate. Among various protective substances, sucrose showed a high stabilizing effect with 10%(w/v) addition, by which the maximum survival rate(48.3%) and viable cell

count( $3.0 \times 10^{10}$  CFU/g) were obtained. The results showed a great possibility for the utilization of animal blood proteins as economic nitrogen sources in the production of probiotics of lactic acid bacteria.

In the production of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides and antigenotoxic peptides as a material for antihypertensive-functional and cancer-preventive food, respectively, the advantageous conditions for enzymatic hydrolysis to yield a peptide fraction of the highest activity were investigated with a respect of industrial production. Bovine blood plasma proteins are hydrolyzed by several industrially usable enzymes to obtain ACE inhibitory peptides and antigenotoxic peptides and the separation steps for obtaining most active fraction are studied. The Alcalase hydrolysate of albumin showed the highest ACE inhibitory activity, 0.5 mg-protein/ml of  $IC_{50}$  value, which was almost in the same level ( $< 1$  mg/ml) with those of other food protein hydrolysate reported by other researchers. The Alcalase- and peptic hydrolysate of total plasma showed antigenotoxic activity and the Alcalase hydrolysate of albumin was most active also in antigenotoxicity. It was very encouraging results because there has been no report on antigenotoxic peptides. The possibility for the production of antihypertensive peptides and cancer-preventive peptides from animal blood plasma proteins is suggested.

In the development of a novel colorant reducing nitrite usage, it was tried to form NO-hemoglobin and maximize the coloring effect by adding the colorant to meat product. Ascorbic acid showed stabilizing effect on the coloring of hemoglobin. The coloring of sausage using NO-hemoglobin colorant was possible by adding only less than 30 ppm of nitrite, which was the significantly reduced amount of nitrite compared with that in conventional meat product production,

70-100 ppm. The optimum concentration found in the sausage preservation experiment was 12 ppm. From the results, it was found that the utilization of animal blood for a novel NO-hemoglobin colorant production has enough possibility.

# 여 백

# CONTENTS

Chapter I. Introduction .....	33
Section 1. Justification of research .....	35
Section 2. Backgrounds .....	39
Section 3. Objectives and scope of research .....	44
1. Research objectives .....	44
2. Scope of research .....	45
Chapter II. Production of probiotics as a feed additive using bovine blood plasma-based (BBPB) medium .....	47
Section 1. Introduction .....	49
Section 2. Materials and methods .....	50
1. Optimization of lactic acid bacteria fermentation using bovine blood plasma based medium .....	51
A. Blood collection and plasma separation .....	51
B. Strains and seed culture .....	51
C. Medium preparation .....	52
D. Medium optimization and culture protocols .....	53
E. Optimization of fermentation conditions .....	55
2. Optimization of freeze-drying conditions .....	55
A. Effect of culture time on survival rate .....	56
B. Effect of plasma hydrolysis on survival rate .....	56

C. Effect of plasma hydrolysate concentration on survival rate .....	56
D. Effect of culture broth concentration on survival rate .....	57
E. Effect of freezing rate and sample amount on survival rate .....	57
F. Effect of pH control on survival rate .....	57
3. Stabilizing effect of blood proteins on survival rate .....	58
4. Selection of cryoprotectant .....	58
Section 3. Results and Discussion .....	59
1. Optimization of lactic acid bacteria fermentation	
using bovine blood plasma based medium .....	59
A. Strains .....	59
B. Medium optimization .....	60
C. Medium and culture protocol optimization .....	61
D. Optimization of fermentation conditions	
using a probiotics strain .....	66
2. Optimization of freeze-drying conditions .....	66
A. Effect of culture time on survival rate .....	66
B. Effect of plasma hydrolysis on survival rate .....	71
C. Effect of plasma hydrolysate concentration on survival rate .....	71
D. Effect of culture broth concentration on survival rate .....	72
E. Effect of freezing rate and sample amount on survival rate .....	72
F. Effect of pH control on survival rate .....	73
3. Stabilizing effect of blood proteins on survival rate .....	73
A. Comparison of the stabilizing effect of MRS and	
modified MRS medium components .....	73
B. Stabilizing effect of blood proteins .....	74

4. Selection of cryoprotectant .....	75
 Chapter III. Production of antihypertensive peptides and antigenotoxic	
peptides from plasma proteins .....	77
Section 1. Introduction .....	79
Section 2. Materials and methods .....	80
1. Separation of blood proteins .....	80
A. Blood collection and plasma separation .....	80
B. Separation of plasma proteins .....	80
C. Separation of globin .....	81
2. Acid and enzymatic proteolysis .....	82
A. Acid proteolysis of total plasma .....	82
B. Optimization of enzymatic proteolysis .....	82
3. Peptide separation and ACE inhibitory activity measurement .....	83
A. Peptide separation by gel permeation chromatography .....	83
B. ACE inhibitory activity measurement .....	84
4. Antigenotoxicity measurement .....	84
A. Antigenotoxicity measurement of total plasma hydrolysate .....	84
B. Comet assay .....	85
C. Study on the mechanism of the antigenotoxicity .....	87
Section 3. Results and Discussion .....	88
1. Separation of blood proteins .....	88
A. Separation of plasma proteins .....	88
B. Separation of globin .....	88
2. Enzymatic proteolysis .....	89



A. Optimization of enzymatic proteolysis .....	89
3. Peptide separation and ACE inhibitory activity measurement .....	97
A. Peptide separation by gel permeation chromatography and ultra filtration .....	97
B. ACE inhibitory activity of total plasma hydrolysate .....	97
C. ACE inhibitory activity of albumin, globulins and globin .....	101
4. Antigenotoxicity .....	102
A. Antigenotoxicity of total plasma hydrolysate .....	102
B. Antigenotoxicity of albumin, globulins and globin .....	104
C. Mechanism of the antigenotoxicity .....	106
Chapter IV. Production of a colorant for meat products with reduced concentration of nitrite .....	109
Section 1. Introduction .....	111
Section 2. Materials and methods .....	112
1. Color development according to nitrite concentration .....	112
A. Color measurement with the nitrite addition .....	112
B. Stabilizing effect of ascorbic acid on color .....	112
2. Color development of nitrite-hemoglobin colorant in sausage product .....	112
A. Preparation of sausage .....	113
B. Preservation of sausage .....	113
Section 3. Results and Discussion .....	113
1. Color development according to nitrite concentration .....	113
A. Color development according to nitrite concentration .....	113

B. Stabilizing effect of ascorbic acid on color .....	114
2. Color development of nitrite-hemoglobin colorant in	
sausage product .....	114
A. Color development of nitrite-hemoglobin colorant in	
sausage product .....	114
B. Color changes by the preservation of sausage .....	115
References .....	117

# 여 백

## 목 차

제 1 장 서 론 .....	33
제1절 연구개발의 필요성 .....	35
제2절 연구의 배경 .....	39
제3절 연구개발 목표 및 범위 .....	44
1. 연구개발 목표 .....	44
2. 연구개발 내용 및 범위 .....	45
제 2 장 유산균 제제와 혈분이 조화된 새로운 사료첨가제의 개발 .....	47
제1절 서 설 .....	49
제2절 재료 및 방법 .....	50
1. 혈액성분을 배지로 한 유산균 발효조건외 확립 .....	51
가. 혈액시료 채취 및 혈장의 분리 .....	51
나. 균주 및 종배양 .....	51
다. 배지 제조 .....	52
라. 배지 최적화 및 배양방법의 정립 .....	53
마. 발효조건외 최적화 .....	55
2. 배양액의 동결건조방법 확립 .....	55
가. 배양시간에 따른 동결건조 후의 생존율 조사 .....	56
나. 배지에 첨가되는 혈장 단백질의 분해도에 따른 동결건조 후의 생존율 조사 .....	56
다. 배지에 첨가되는 혈장 단백질의 농도에 따른	

동결건조 후의 생존율 조사 .....	56
라. 배양액 농축에 따른 동결건조 후의 생존율 비교 .....	57
마. 동결속도와 시료의 양에 따른 동결건조 후의 생존율 비교 .....	57
바. 배양액의 pH 보정에 따른 동결건조 후의 생존율 비교 .....	57
3. 혈액 단백질의 동결건조 안정화 효과 규명 .....	58
4. 동결건조 안정제의 선정 .....	58
제3절 결과 및 고찰 .....	59
1. 혈액성분을 배지로 한 유산균 발효조건의 확립 .....	59
가. 균주의 선발 .....	59
나. 배지 최적화 .....	60
다. 배양방법의 확립 .....	61
라. Probiotics용 균주의 분리 및 배양조건 확인 .....	66
2. 배양액의 동결건조방법 확립 .....	66
가. 배양시간에 따른 동결건조 후의 생존율 조사 .....	66
나. 배지에 첨가되는 혈장 단백질의 분해도에 따른 동결건조 후의 생존율 조사 .....	71
다. 배지에 첨가되는 혈장 단백질의 농도에 따른 동결건조 후의 생존율 조사 .....	71
라. 배양액 농축에 따른 동결건조 후의 생존율 비교 .....	72
마. 동결속도와 시료의 양에 따른 동결건조 후의 생존율 비교 .....	72
바. 배양액의 pH 보정에 따른 동결건조 후의 생존율 비교 .....	73
3. 혈액 단백질의 동결건조 안정화 효과 규명 .....	73
가. MRS 및 modified MRS 배지성분의 안정화 효과 비교 .....	73
나. 혈액 단백질 성분의 안정화 효과 규명 .....	74
4. 동결건조 안정제의 선정 .....	75

제 3 장 혈액 단백질로부터의 새로운 기능성 펩타이드의 개발 .....	77
제1절 서 설 .....	79
제2절 재료 및 방법 .....	80
1. 혈액 단백질의 분리 .....	80
가. 혈액시료 채취 및 혈장의 분리 .....	80
나. 혈장 단백질의 분리 .....	80
다. 글로빈의 분리 .....	81
2. 산 및 효소처리에 의한 단백질의 분해 .....	82
가. 전(全)혈장 단백질의 산 가수분해 .....	82
나. 효소반응 조건의 확립 .....	82
3. 펩타이드의 분리 및 항고혈압 기능성 조사 .....	83
가. Gel permeation chromatography에 의한 펩타이드 분획의 분리 .....	83
나. 단백질 가수분해물 및 펩타이드 분획에 대한 ACE 저해활성 조사 .....	84
4. 펩타이드의 항암 기능성 조사 .....	84
가. 전혈장 가수분해물의 항유전독성 측정 .....	84
나. Comet assay .....	85
다. 항유전독성 효과의 기작 연구 .....	87
제3절 결과 및 고찰 .....	88
1. 혈액 단백질의 분리 .....	88
가. 혈장 단백질의 분리 .....	88
나. Globin의 분리 .....	88
2. 효소처리에 의한 단백질의 분해 .....	89
가. 효소처리 조건의 확립 .....	89

3. 펩타이드의 분리 및 항고혈압 기능성 조사 .....	97
가. Gel permeation chromatography 및 한외여과에 의한 펩타이드 분획의 분리 .....	97
나. 전혈장 단백질 가수분해물에 대한 ACE 저해활성 조사 .....	97
다. Albumin, globulins, globin에 대한 가수분해물의 ACE 저해효과 .....	101
4. 펩타이드의 항암 기능성 조사 .....	102
가. 전혈장 가수분해물의 항유전독성 측정 .....	102
나. Albumin, globulins, globin에 대한 가수분해물의 항유전독성 측정 .....	104
다. 항유전독성 효과의 기작 연구 .....	106
제 4 장 Nitrite를 부분대체할 수 있는 육가공품 발색제의 개발 .....	109
제1절 서 설 .....	111
제2절 재료 및 방법 .....	112
1. Nitrite의 첨가량에 따른 발색도 조사 .....	112
가. Nitrite의 첨가에 따른 발색도 측정 .....	112
나. Ascorbic acid의 첨가에 의한 발색도의 안정화 .....	112
2. Nitrite 혼합 발색제의 육제품 첨가시 발색효과 .....	112
가. 육제품의 제조 .....	113
나. 처리구에 따른 육제품의 저장 .....	113
제3절 결과 및 고찰 .....	113
1. Nitrite의 첨가량에 따른 발색도 조사 .....	113
가. Nitrite의 첨가에 따른 발색도 .....	113
나. Ascorbic acid의 첨가에 의한 발색도의 안정화 .....	114

2. Nitrite 혼합 발색제의 육제품 첨가시 발색효과 .....	114
가. Nitrite 혼합 발색제의 육제품 첨가시 발색효과 .....	114
나. 육제품의 저장에 따른 색도의 변화 .....	115
참고문헌 .....	117



# 여 백

## 제 1 장 서 론

# 여 백

## 제1절 연구개발의 필요성

가축혈액은 도축장으로부터 생산되는 축산부산물로서 우리나라에서만 해도 97년 현재 연간 약 7만톤 이상의 가축혈액이 생산되어지는데(1, 2) 각종 단백질이 풍부하게 함유되어 있어 유용가치가 높은 원료자원으로 알려져 있다(3). 하지만 우리나라의 경우에는 이 가축혈액은 자원으로 이용되는 것이 아니라 거의 대부분 폐기되고 있기 때문에 자원의 낭비는 물론 환경의 주요 오염원으로 큰 사회문제가 되고 있다. 하지만 선진국에서는 이 가축혈액을 이용하여 각종 유용물질을 생산하는 연구를 계속하여 왔고 또한 몇가지는 상품화되어 제품으로 공급되고 있으며, 우리나라에서는 오히려 이들을 다량 수입하고 있는 실정이다. 현재 가축혈액이 주로 이용되고 있는 것은 동물성 단백질 농후사료로서, 도축장의 가축의 피를 모아 건조, 분말화한 혈분(blood meal)으로 공급되고 있으며, 이 외에 식품공업에서의 유화제, 안정제, 착색제, 의약품 소재 또는 실험용 시약원료 등에도 부분적으로 이용되고 있고(3), 극히 일부 분이기는 하나 혈액내의 헤모글로빈등 특정 성분을 분리해내어 기능성 식품소재, 의약품소재등으로 이용되고 있다(4, 5). 다시 말해서 가축혈액의 이용은 혈액 자체를 간단한 처리만 거쳐 사료첨가제로 사용하고 있는 분야가 주를 이루고 있으며, 혈액내의 단백질 또는 그외 특정 유용성분을 개별적으로 추출해내어 이용하는 방법은 그동안 산발적으로 연구되어 왔으나 아직 본격적인 이용단계에는 이르지 못하고 있는 실정이다. 그나마 사료첨가제로의 이용도 혈분 자체의 높은 염농도와 최종 제품에 미치는 암적색 등에 의한 악영향으로 인해 그 사용량은 감소추세에 있고, 기능성 식품소재로의 이용은 앞으로 확대 성장해 나갈 전망을 보여주고 있으나 현재로서는 응용분야가 빈약하고 제조 기술이 충분히 연구되어 있지 않아 여러가지 장애물이 앞에 놓여있는 형편이다. 따라서 엄청난 양으로 끊임없이 생산되어 버려지고 있는 가축혈액을 이용하여 여러가지 고부가가치의 유용물질을 생산해낸다면, 자원 낭비의 차단은 물론 환경오염의 방지에 이르기까지 다방면으로의 성과를 기대할 수가 있다.

특히 최근에 위생적인 시설을 가진 도축장이 새롭게 설치되고 있어 위생적인 가축 혈액의 수집이 가능해지고 있기 때문에 가축혈액을 이용하는 응용연구의 필요성은 절실하며 또한 시급한 시점에 이르렀다 하겠다.

가축의 도축과정에서 부산물로 나오는 가축혈액과 내장(offals)은 높은 영양적 가치를 가진 뛰어난 단백질원으로서 잠재적인 이용 가능성이 크지만, 실제로는 이용방법의 제한으로 인해 거의 대부분 폐기되고 있어 막대한 자원의 낭비로 지적되고 있다. 특히 가축혈액은 풍부한 단백질과 철이온이 함유되어 있는 귀한 자원이지만, 선진국에서는 그 이용도가 높으나 국내에서는 거의 폐기되고 있기 때문에 환경오염으로 인해 사회적으로도 큰 문제가 되고 있는 것이다. 우리나라에서 연간 도축되는 가축의 두수는 1997년에 소가 약 1,125,000두, 돼지가 약 10,738,000두로서 그로부터 방혈되는 도축혈액은 각각 17,000여톤, 53,000여톤으로서 약 7만톤 이상의 가축혈액이 폐기되고 있다(1, 2). 뿐만 아니라 이러한 도축혈액의 폐기는 1973년을 기준할 때 1980년까지 7년간 1.1배 정도밖에 늘지 않았으나 85년에는 1.9배, 90년, 92년, 94년, 96년에는 각각 2.1배, 2.5배, 2.9배, 3.2배로 늘어나 그 증가율이 계속 상승하고 있어 상황은 더욱 심각해지고 있는 실정이다. 더욱이 선진국에서 가축혈액을 이용하여 개발 상품화된 품목들을 국내에서는 오히려 수입해 오는 현실인데 그 양도 적지 않아서 사료첨가제인 혈분(blood meal)이 월 80-100톤(1200원/kg)가량, 식품첨가제로서 혈장분말(plasma powder)은 월 50-60톤(5000원/kg)정도 수입되며, 헤모글로빈으로부터 얻어지는 철분보강 건강식품소재인 헴철은 그 양이 적지만 수톤정도가 kg당 160,000-240,000원의 고가로 수입되고 있다.

결국 가축혈액은 자원으로서의 잠재적 가치가 상당히 높고 폐기하는 것 자체가 경제적인 손실을 의미하기 때문에 반드시 이용되어야 하며, 더불어 이 자원이 이용되는 만큼 환경 오염의 문제가 해소된다는 점에서도 그 이용의 활성화는 시급한 과제라 사료된다. 뿐만 아니라 폐기되어 왔던 막대한 양의 자원을 원료로 하여 고부가가치의 유용한 생리활성물질 또는 그를 이용한 상품이 생산된다면 식육생산 산업체

에서는 폐기처리비용을 절감하고 아울러 추가적으로 소득이 증대되는 중요한 효과가 발생된다는 점도 큰 의미를 지니고 있다. 실제로 본 연구에서 중점을 두고자 하는 몇가지 응용분야를 볼 때, 가축혈액의 단백질을 이용한 기능성 펩타이드등의 신소재에 관해서는 그 연구가 세계적으로 아직 초기단계에 있고, 가축혈액의 유산균 발효를 이용한 새로운 사료첨가제 개발이라든지 가축혈액성분을 이용한 육가공품의 발색제를 개발하여 기존의 유해한 발색제의 사용량을 줄이는 시도는 지금까지 없었던 중요한 연구로서 전 세계적으로 선도해 나갈 수 있다는 점도 염두에 두어야 한다. 따라서 가축혈액을 고부가가치화할 수 있는 이 몇가지 이용분야를 집중적으로 연구하여 실제적인 가능성을 도출해내는 일이 급선무라 하겠다. 본 연구에서는 다음과 같은 필요성을 근거로 하고 있다.

#### 1) 기술적인 측면

① 혈분이 동물성 단백질의 공급원으로 사료에 첨가되는 한편, 유산균 제제 또한 가축의 장내 세균총에 있어서 *Lactobacillus*와 같은 유산균을 증가시키고 대장균과 같은 병원성균의 농도를 낮춰줌으로써 장내의 건강을 유지하고 항생제 사용을 줄이기 위하여 첨가하는 중요한 첨가제이다. 기존의 두가지 사료첨가제로 이용되고있는 혈분 및 유산균 제제를 가축혈액을 배지로 한 유산균의 발효를 시도함으로써, 혈분은 유산균 발효에 의한 탈취등으로 질이 개선되고 유산균 제제 역시 혈액 성분 중의 각종 단백질에 의한 안정화로 제제화 공정에서 생존 생균수가 증가하는 등의 효과가 예상되므로 고급의 사료첨가제를 효율적이고 경제적으로 생산할 수 있게 된다.

② 혈청 알부민 및 글로블린과 헤모글로빈등 혈액 단백질로부터 항고혈압 또는 항암 기능성을 가지는 펩타이드를 만들어 내어 건강식품의 새로운 소재로 이용될 수 있도록 한다.

③ 헤모글로빈의 착색활성을 이용하여 육제품의 발색을 위한 생물소재의 발색제를 개발함으로써 육제품에서 문제시되고 있는 발색제(nitrite/nitrate)의 사용량을

줄일 수 있는 방법을 모색한다.

## 2) 경제·산업적 측면

- ① 축산업에서 막대한 양의 부산물로 나와서 폐기되고 있는 가축혈액을 이용하여 고부가가치의 유용물질을 생산해 내므로 폐자원이었던 혈액을 여러형태의 소재 또는 첨가제 생산 원료로 공급하게 되어 식육생산 산업체에서는 그 처리비용을 줄이며 오히려 소득 증대원이 될 수 있다.
- ② 가축혈액의 이용하여 유산균 발효와 혈분의 효과를 조화시킨 고급의 사료첨가제와 혈액 단백질로부터의 새로운 기능성 펩타이드, 육제품에 첨가할 철분 보강형 생물소재의 발색제등을 개발함으로써 가축혈액 이용분야에 있어서 세계를 선도할 수 있는 기술을 확보한다.
- ③ 단백질이 농축 함유되어 있어 잠재적 유용가치가 높은 가축혈액이 폐기되지 않고 자원으로 활용됨으로써 유용자원의 낭비라는 국가 경제적인 손실이 근본적으로 차단되게 된다.
- ④ 많은 양의 가축혈액 이용제품이 수입되는 것을 막으므로 불필요한 외화유출을 막을 수 있고, 가축혈액으로부터 아직 개발되지 않은 신소재를 선도적으로 개발함으로써 선진국에 앞서 특허권이 확보됨과 동시에 신상품으로서의 수출고를 올릴 수 있다.

## 3) 사회·문화적 측면

- ① 엄청난 양의 가축혈액이 자연으로 폐기되어 부영양화등의 심각한 환경 오염원으로 작용하고 있는데 이것을 유용물질 생산원료로 소비할 수 있게 되어 오염원을 상당 부분 감소시킬 수 있다.
- ② 가축혈액을 유용물질 생산원료로 공급하기 위해서 도축장등에서는 가축혈액의 위생적인 회수를 위한 노력과 장치가 자연적으로 갖추어 질 것이므로 이와 함께 도축과정 및 도체의 취급도 위생적으로 이루어져 결국 축육의 유통에 있어서 심각한 문제의 하나인 미생물 오염문제가 크게 개선될 것이다.

③ 폐자원을 유용물질 생산원료로 공급함으로써 육가공 산업체에서는 소득의 증대로 인해 그 산업이 활성화되고 재투자가 이루어져 식육산업에 대한 사회적 인식이 개선될 수 있다.

④ 건강식품 소재가 저렴하게 생산 공급되고 육제품 발색제로서 유해물질의 사용이 줄어드는 대신에 철분보강의 생물소재 사용으로 인해 국민 건강에 기여할 수 있다.

## 제2절 연구의 배경

가축혈액은 훌륭한 단백질원으로서 혈장에 알부민(serum albumin) 및 글로브린(serum globulin)을 주로한 6-8%의 단백질과 혈구에는 글로빈이 주를 이룬 28-30%의 단백질 및 철이온을 함유하는 고농도의 단백질 용액이라 할 수 있다(3). 이 가축혈액은 여러가지 형태로 이용될 수 있으나 그 이용에 있어서 장애요소가 되는 점이라면 혈액이 methemoglobin으로 쉽게 산화되어 나오는 암적색으로 인해 식품에 첨가하거나 사료에 첨가할 때에 한계를 가지고 있는 것이라 하겠다. 이로 인해 실제 식품소재로의 응용시에 미량의 사용에 의해서도 최종 제품에 원치 않는 색상을 내어 악영향을 미치고 있다. 이러한 이유로 가축혈액의 이용을 위한 초기의 연구에서는 주로 가축혈액으로부터 단백질을 얻기위해 아세톤, 염산, 황산등을 처리하여 탈색 탈취시키는 화학적 처리방법이 주로 연구되어져 왔다(6, 7). 그 후 70년대말부터는 혈구 침전물에 단백분해효소를 처리하여 헴 화합물을 분리해내거나(8) 두차례의 효소처리후 혈장까지 혼합하여 혈액전체로부터의 단백질 회수율을 높이는 공정이 특허로 나오는 등(9), 이와 유사한 내용의 연구들이 주로 보고되었다. 특히 Delaire 등은 소의 혈액을 탈색시키기 위해 두가지 방법, 즉 낮은 pH 조건에서 아세톤을 처리하여 헴 화합물을 추출하는 화학적인 방법과 부분적인 효소 가수분해에 의해 헴



을 제거해내는 효소적 방법을 사용했을 때의 분리된 단백질의 성질을 비교한 결과, 효소적 방법이 단백질 변성이 없이 효과적으로 탈색시킬 수 있음을 밝혔다(10).

또한, 가축혈액의 이용분야에 대해서 여러 가지 연구가 되어졌는데, 미국 Iowa 주립대학의 특허로서 혈액으로부터 헤모글로빈을 분리해내어 결합된 산소를 제거한 후 헤모글로빈 분자끼리 교차결합(crosslinking)시켜서 혈액 대체제(blood substitute) 혹은 혈장의 팽창제(blood plasma expander)로 이용하는 방법이 등록되었고(11), 일본 Toyo-soda사에서는 헤모글로빈에 단백분해효소를 처리하여 얻은 분자량 3,000내지 8000정도의 폴리펩타이드가 안정제로서의 효과와 수용액에서의 거품 형성 효과가 좋음을 밝히고 화장품에의 첨가 또는 식품 유화제로서의 실용화 가능성을 제시하였으며(12), 혈구의 가수분해물을 Tetramena pyriformis라는 원생동물(protozoa)을 배양하기 위한 배지성분으로 사용한 결과를 이용하여, 혈구의 가수분해물이 미생물 배지로서 매우 일정한 성분을 가지고 재현성이 있는 배양결과를 나타내며 아미노산 조성이 통상적으로 사용되고 있는 펩톤(peptone)보다도 정확하게 안정적으로 나와서 특히 값이 싼 질소원 배지성분으로 이용될 수 있다는 가능성이 나오기도 하였다(13).

한편으로 현재 가축혈액을 산업적으로 이용하고 있는 예를 보면 우선 미국의 APC사등의 기업에서 생산하고 있는 혈분(blood meal)으로서 혈액을 건조시켜 분말화한 것인데 사료의 동물성 단백질의 사료첨가제로 사용되고 있다. 또한 네덜란드의 Harimex사등에서 생산하고 있는 혈장분(plasma powder), hemoglobin powder, globin powder, 냉동 fibrin액 및 냉동 thrombin액등이 있다. 혈장분은 혈장을 건조하여 분말화한 것으로 우수한 유화(emulsifying) 및 젤화(gelling) 특성을 지니고 있어서 국내외에서 햄, 소세지, 간제품(liver product)등의 육제품에 식품첨가제로 이용되고 있다. 헤모글로빈을 분리해내어 분무건조한 헤모글로빈 powder는 육가공업에서의 수분결합제(waterbinder) 또는 발색제, 애완동물용 사료에서의 향신료, 수분결합제, 성장촉진제등의 용도로 사용되며, 글로빈 powder는 의약 또는 사료첨가용으로

공급하고 있고, 냉동 fibrin액 및 thrombin액은 fibrinogen과 육의 collagen간의 결합을 thrombin이 촉매한다는 원리를 이용하여 결합육(joined meat)에서의 접착제로 쓰인다. 또 한편으로의 이용은 건강식품의 기능성 소재로 사용되고 있는 것인데 이것은 주로 일본의 기업들에 의해 공급되고 있다. 헤모글로빈에 적절한 단백분해효소를 처리하여 얻는 헴철은 철보급소재로서 ferroprotoporphyrin의 형태를 가지고 있기 때문에 식품중의 섬유, 탄닌등 흡수를 저해하는 물질의 영향을 받지않고 높은 흡수율을 나타내는 것으로 밝혀져, 지금까지는 주로 정제(tablet)로 상품이 나왔지만 최근에는 비스킷, 쿠키, 캔디, 후리가케(일본 고유의 조미료), 햄소세지등에 첨가하는 형태의 상품화도 이루어지고 있다(4). 이 헴철은 이찌마루(一丸), 미쯔비시카세이식품(三菱化成食品), 아사히카세이공업(旭化成工業)등의 기업에서 공급하고 있고, 이또햄(伊藤햄)에서는 돼지의 혈구를 효소처리하여 소화와 흡수율이 좋은 펩타이드 소재, 즉 글로빈펩타이드(globin peptide)를 생산 공급하고 있다.

지금까지 살펴본 바와 같이 가축혈액의 이용과 정제방법에 관해서 여러가지 방향의 연구가 진행되어 왔고 일부이나마 산업적으로도 이용되어 유용물질로 생산되고 있지만 국내에서는 그동안 가축혈액의 이용에 관련된 연구가 거의 전무하다시피 하여 불모지와 같은 상태였다가 최근에 이르러 연구의 필요성이 인식되면서 새롭게 시작하는 상황이라 할 수 있다. 1984년에 송등(14)이 가축혈액을 이용하여 육가공품 등의 물성개선을 위해 섬유소(spun fiber)를 개발하는 내용의 연구를 보고하였으나 후속되는 관련분야의 연구발표가 없는 상태에서 현재까지 이르러다가, 1996년에 도축 폐기물인 혈액 단백질을 이용한다는 목적 아래 한국축산식품학회 학술발표회에서 가축혈액의 알부민을 효율적으로 분리하여 기존의 계란 및 대두단백 등의 단백질 첨가제를 대체하고자 하는 연구결과가 발표되었다(15). 또한 가축혈액으로부터 angiotensin I converting enzyme(ACE) 저해 활성을 갖는 항고혈압 펩타이드를 생산하는 연구결과가 발표되었는데(16) 이 연구내용은 본 연구와 상당히 유사한 연구 목표를 세우고 진행되고 있는 것이 확인되기도 하였다. 최근 들어 이렇게 본 연구에

서와 같이 도축 폐기물인 가축혈액을 이용하여 유용물질을 생산하고자 하는 연구가 국내에서 활기를 띠어가고 있는 것은, 도축시 가축혈액이 거의 전량 폐기되어 자원 낭비와 환경오염의 원인이 되고있는 국내 현실을 감안할 때 상당히 고무적인 일이며 본 연구의 필요성을 더욱 절감케 하는 것이라 판단된다.

현재 가축혈액이 주로 이용되고 있는 것은 혈분(blood meal)으로서 혈액을 건조시켜 분말화한 것인데 사료의 동물성 단백질의 사료첨가제로 사용되고 있다. 그러나 혈분의 생산에 있어서 높은 염농도를 낮추고 고유의 진한 색깔과 냄새를 없애는 경제적인 공정이 아직 개발되어 있지 않기 때문에 사료첨가제로서의 사용이 제한되고 있는 실정이다. 결국 이온 불균형 혹은 착색, 이취 등의 영향으로 실제 사료에의 첨가량이 줄어들고 있는 것이다. 우리나라에서는 90년대 들어서면서 혈분을 수입하여 사료에 첨가하기 시작하였고 도입 초기에는 모든 사료업계에서 이를 사용하였지만, 현재로는 점차 그 사용이 줄어들고 있는 추세에 있어서 초기에는 5%까지도 첨가하였으나 현재는 2-3%의 수준으로 사용하고 있다. 현재 연구보고된 혈분의 탈염, 탈색방법들은 역삼투, dialysis, 한외여과와 효소처리등 고가의 공정들이어서 사료첨가제의 생산공정으로는 적합치 않은 것들이다. 따라서 본 연구에서는 사료첨가제로서 혈분의 효율적인 이용 방안으로서 유산균 제제와 조화를 이룬 새로운 형태를 고안하여 혈액 성분을 배지로 이용한 유산균의 배양 특성을 확인하고 발효조건을 최적화하고 최종적으로는 혈분의 질을 유산균 발효에 의해 개선시키고 또한 유산균 제제는 혈액 성분에 의한 생균 안정화 효과를 동시에 얻을 수 있는 새로운 사료첨가제의 개발 가능성을 연구하였다.

또 한편으로 적은 양이지만 가축혈액을 이용하여 식품첨가제, 기능성 식품소재 또는 의약품소재로 이용되고 있다. 식품첨가제는 혈액 단백질의 유화 또는 겔화특성을 이용하는 것이므로 특별한 기술이 필요없고 단순히 분리해낸 단백질을 분무건조 등의 방법으로 분말화하는 방식으로 제품이 만들어지고 있다. 그러나 기능성 식품소재로서의 응용분야는 그 가능성이 매우 큰데 반해 아직 연구가 초기 단계이고 그

사용량도 지극히 미약한 실정이다. 일본을 중심으로 수년전부터 관심을 모아온 기능성 펩타이드만 보더라도 현재 상품화된 수십가지의 펩타이드가 주로 우유 단백질인 카세인과 유청 단백질, 대두 단백질, 난백 단백질등으로부터 얻어내어 소화흡수, 칼슘흡수, 저알레르기항원, 기포 및 유화제등의 기능을 가지고 상품화되어 있는 반면, 혈액 단백질의 경우는 단 한 건뿐으로 소화흡수기능의 글로빈 펩타이드가 전부이다(17). 의약품 소재로서의 기능성 펩타이드에서도 상황은 마찬가지여서 카세인, 글루텐, 난백 알부민, 쌀 알부민등으로부터 진통, 동맥이완, 인슐린 분비촉진등의 기능을 갖는 기능성 펩타이드들을 분리해내었지만, 혈액 단백질로는 사람의 혈청 단백질로부터 동맥이완 기능의 펩타이드를 얻은 예가 보고되었을 뿐 가축혈액으로부터의 것은 거의 없는 실정이다(5, 18). 따라서 본 연구에서는 가축혈액 단백질로부터 항고혈압 기능성 식품소재로서 ACE 저해 펩타이드 분획과 암예방 기능성 식품소재로서 항유전독성 펩타이드 분획을 생산함에 있어서의 가능성을 연구하였다.

또 한편으로는 육가공품에 있어서의 발색제에 관한 기술에 취약성이 있다. nitrite/nitrate는 오래전부터 육가공에 있어 발색제와 미생물 증식 억제를 위해 사용되어 왔다. 육색을 결정하는 myoglobin과 hemoglobin은 색이 불안정하기 때문에 nitrite/nitrate의 높은 독성에도 불구하고 전 세계적으로 그 사용이 허용되어 있으나 그 사용량은 규제하고 있으며 몇몇 선진국에서는 nitrite의 단독사용을 금하고 nitrite를 NaCl에 녹여 그 NaCl을 첨가 사용하도록 규정하고 있다(19). 특히 nitrite/nitrate는 강력한 발암물질인 nitrosamine의 전구체로서, 염지중에 생성된 amine류와 nitrite가 분해되어 생성된 NO기가 기름에 튀기는 가열과정중에 결합하여 nitrosoamine이 생성된다(20). 최근에는 채소류에 다량 함유되어 있는 nitrate가 절임중에 nitrite로 환원되고 다시 발효중에 생성되거나 첨가된 amine류와 결합하여 nitrosoamine을 생성한다는 연구결과까지 보고되고 있다(21). 이와 같이 유해한 nitrite/nitrate의 육가공에서의 첨가는 우리나라의 경우 육가공 산업의 발전에 가장 큰 장애 요인이 되고 있으나 아직도 이를 대체할만한 대체물질이 발견되지 않고 있

다. 따라서 많은 나라에서 nitrite/nitrate의 첨가를 줄이고자 하는 연구가 꾸준히 계속되어 왔으나(22) 성과가 나오지 않는 상태이다. 그런데 nitrite의 발색효과를 최대한 높이기 위하여 가공 공정에서 myoglobin농도가 높은 상태에서 nitrite를 첨가하여 NO+myoglobin의 결합을 최대화하여 육제품의 색택을 안정화시키는 것이 육의 세절시 가장 중요한 기술중의 하나이다(2). 이러한 기술상황하에 본 연구에서 제시하고자 하는 새로운 가축혈액 응용기술은, myoglobin의 구조가 hemoglobin과 유사하므로 NO-hemoglobin의 결합을 미리 생성시켜 nitrite 대신 첨가함으로써 육제품의 발색효과는 최대화되고 nitrite 사용량을 줄이는 효과를 얻을 수 있다는 것이다.

### 제3절 연구개발 목표 및 범위

#### 1. 연구개발 목표

##### 가. 유산균 제제와 혈분이 조화된 새로운 사료첨가제의 개발

기존의 사료첨가제로의 이용에 있어서 문제점을 보완하는 연구이다. 유산균 발효에 의해 혈분의 질을 높이고 혈액중의 각종 성분들에 의해 유산균 제제를 안정화하는 상호보완효과를 살려 유산균 제제와 혈분이 조화된 새로운 사료첨가제를 개발한다.

##### 나. 혈액 단백질로부터의 새로운 기능성 펩타이드의 개발

혈장과 혈구로부터 기능성 식품소재를 개발하는 연구이다. 혈액에 다량 함유되어 있는 유용 단백질을 이용하여 효소처리등 적절한 생화학 반응을 통해 기능성 펩타이드를 얻어냄으로써 고혈압 예방식품 또는 항암식품의 소재등으로 이용한다.

##### 다. Nitrite를 부분대체할 수 있는 육가공품 발색제의 개발

육가공품 발색제를 개발하는 것이다. 소세지등의 육가공품의 발색을 위해 헤모글로빈을 이용함으로써 발암성 물질로 전환될 수 있는 nitrite 발색제의 사용을 부

분 대체하고 최소화할 수 있는 방법을 개발하는 것이다.

2. 연구개발 내용 및 범위

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (1996)	1. 유산균 제제와 혈분이 조화된 새로운 사료첨가제 의 개발  2. 혈액단백질로부터의 새 로운 기능성 펩타이드 개발	1) 혈액성분을 배지로 한 유산균 발효조건 확립 ①배지제조 및 배양방법 확립 ②발효조건 최적화 2) 혈액 단백질의 유산균 안정화 효과 규명 ①배양액의 동결건조방법 확립 ②안정화 효과 규명  1) 혈액단백질의 분리 ①IgG와 알부민의 분리 및 확인 ②글로빈의 분리 2) 효소처리와 펩타이드 분리 ①효소반응조건의 확립
2차 년도 (1997)	1. 유산균제제와 혈분이 조 화된 새로운 사료첨가제의 개발  2. 혈액단백질로부터의 새 로운 기능성 펩타이드 개발	1) 혈액 단백질의 유산균 안정화 효과 규명 ②안정화 효과 규명 2) 발효 유산균체의 제제화 조건 확립 ①동결건조 안정제의 선정 ②동결건조조건의 최적화  1) 효소처리와 펩타이드 분리 ②펩타이드의 분리 2) 펩타이드의 기능성 조사 ①펩타이드의 항고혈압 기능성 조사
3차 년도 (1998)	1. 혈액단백질로부터의 새 로운 기능성 펩타이드의 개 발  2. Nitrite를 부분대체할 수 있는 육가공품 발색제의 개 발	1) 펩타이드의 기능성 조사 ②펩타이드의 항암 기능성 조사  1) nitrite의 첨가량에 따른 발색도 및 가열 안정 성 조사 2) nitrite혼합발색제의 동결건조에 따른 용해도 조사 3) nitrite혼합발색제의 육제품 첨가시 발색 효과

# 여 백

## 제 2 장 유산균 제제와 혈분이 조화된 새로운 사료첨가제의 개발



# 여 백

## 제1절 서 설

도축폐기물인 가축혈액은 혈장과 혈구 부분으로 나누어 볼 때 혈장부분에는 6-8%를 차지하는 albumin 및 globulin이 존재하며, 혈구부분에는 주로 globin으로 이루어진 28% 이상의 단백질 성분이 있어 혈액 자체가 하나의 고농도 단백질 용액이라 할 수 있다(2). 그러나 이렇듯 각종 단백질이 풍부하게 함유되어 있어 유용 가치가 높은 원료자원임에도 불구하고 우리나라의 경우만 하더라도 연간 약 7만톤 이상 생산되고 있는 이 가축혈액은 거의 대부분 폐기되고 있어 자원의 낭비는 물론 환경의 주요 오염원이 되고 있는 실정이다(1). 현재 가축혈액의 일부분은 혈분(blood meal) 형태의 동물성 단백질 농후 사료첨가제, 식품공업에서의 유화제, 안정제, 착색제, 의약품 소재 또는 실험용 시약원료 등에 이용되고 있다(3). 현재까지 가축혈액의 응용을 위한 연구가 계속되고 있지만 아직 그 이용분야가 많지 않고 이용량이 극히 제한되어 있어 보다 많은 분야에 특히 대량으로 이용할 수 있는 용도를 개발해야 하는 실정이다(5, 8, 9, 13, 23). 한편 가축혈액의 혈구부분은 methemoglobin으로 쉽게 산화되어 암적색을 나타내므로 이 상태로 사료 또는 식품에 첨가하면 미량에 의해서도 최종제품에 바람직하지 않은 색상을 내어 좋지 않은 영향을 미친다. 따라서 그동안 가축혈액을 탈색시키기 위해 아세톤 등에 의한 화학적 처리와 효소적 처리 등의 많은 연구가 진행되었으나, 이러한 공정은 생산비용이 높은 단점을 가지고 있다(24, 25). 따라서 본 연구에서는 수집된 가축혈액으로부터 간단한 원심분리만으로 얻어지는 혈장성분을 대량으로 이용할 수 있는 응용분야로서가축의 장내 세균총 개선을 통해 건강을 유지하고 항생제 사용을 줄이기 위한 사료첨가용 생균제제, 즉 probiotics를 생산하고자 하였다(26-29), 즉 혈장 단백질 성분은 유산균 배양의 질소원으로 이용되는 한편, 배양액의 동결건조에 의해 생산되는 최종제품에는 유산균에 의해 이용되지 않은 단백질 가수분해물 성분이 잔여하므로 동물성 단백질의 공급원으로 동시에 사료에 첨가되는 부가효과를 기대할 수 있다. 이러한 조합에 의

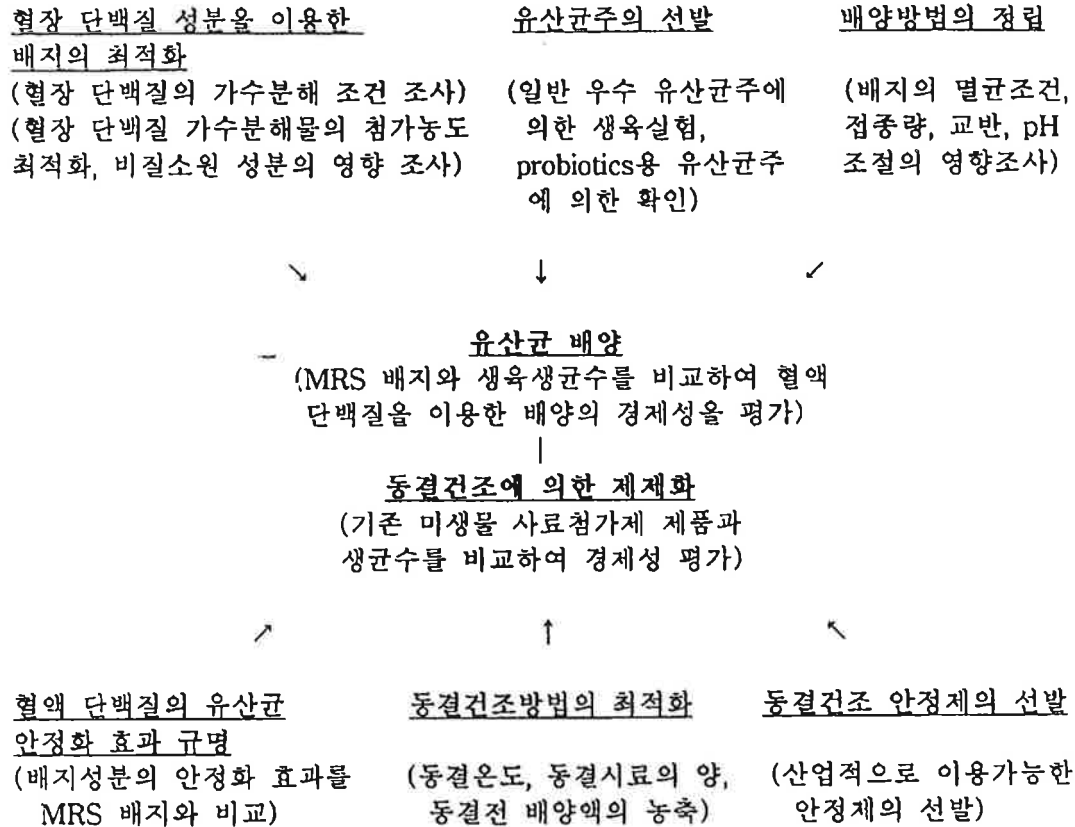
해 혈분은 유산균 발효에 의한 탈취 등으로 질이 개선되고, 유산균 제제 역시 혈분 중의 단백질 또는 펩타이드에 의한 안정화로 제제화 공정에서 생존 생균수가 증가하는 등의 효과가 예상되므로 고급의 사료첨가제를 경제적으로 생산할 수 있을 것으로 기대된다. 우선 혈장 부분을 배지 성분으로 이용하여 간단한 열처리에 의한 멸균, 배양조건의 단순화 등 probiotics의 산업적인 생산에 초점을 맞추어 실제 생산공정의 경제성과 용이성을 높일 수 있는 배지제조, 멸균, 발효의 최적 조건을 정립하는데 주력하였으며, 이어서 배양액의 동결건조에 의한 제제화를 위하여 혈장 단백질을 이용하여 배양한 배양액의 동결건조과정에서 균체의 안정성에 영향을 미치는 조건들과 혈장 단백질 성분의 안정화 효과를 조사하였다. 즉 균체의 생존율을 극대화하기 위한 최적조건을 조사하고, 경제적으로 대량생산이 가능하도록 생존생균수를 최대화할 수 있는 동결건조 안정제를 선발하였다.

## 제2절 재료 및 방법

본 세부과제에서는 동물성 단백질 성분과 유산균이 동시에 함유되는 새로운 미생물 사료첨가제를 개발하기 위해, 우선 유산균이 가장 잘 자랄 수 있는 MRS 배지를 기준으로 하여 MRS 배지의 질소원인 peptone, beef extract, yeast extract 등을 가축혈액 중에 함유되어 있는 각종 단백질로 대체하였다. 이로부터 최적화된 modified MRS 배지를 만들고 이를 이용한 배양방법도 최적화하였다. 배양된 유산균체에 대해서는 동결건조를 통해 제제화하는 과정에서 유산균의 생존율을 높여줄 수 있는 안정화 효과를 중점적으로 조사하였다. 먼저 동결건조시 배지에 잔존하는 혈액 단백질의 가수분해물 성분이 안정화 효과가 있는지 조사하여 혈액 단백질의 이용이 동결건조과정에서도 유리한지를 평가하였다. 그리고 생산단가를 낮추기 위하여 동결건조과정의 유산균 생존율을 높일 수 있는 동결건조방법을 조사하고 또한

산업화에 이용할 수 있는 동결건조 안정제를 선별하였다.

본 세부과제의 연구개발 방법을 도식화하면 다음과 같다.



1. 혈액성분을 배지로 한 유산균 발효조건 확립

가. 혈액시료 채취 및 혈장의 분리

경북 포항시 소재 (주)명신산업 도축장으로부터 도축 즉시 위생적으로 채취한 소 혈액 3L에 40% trisodium citrate용액 48ml를 첨가하여 잘 혼합함으로써 혈액의 응고를 억제시킨 상태의 혈액시료를 얻었다. 혈액시료는 6000rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액인 혈장을 분리해내었다.

나. 균주 및 종배양

유산균은 4종류의 균주(*Lactobacillus acidophilus* KCCM32820, *L. plantarum*

KCCM11322, *Streptococcus thermophilus* KCCM12020, *S. lactis* KCCM32406)를 한국종균협회(KCCM)로부터 분양받아 사용하였다. 균주들은 MRS 액체배지(Difco제품)에 agar를 넣어 제조한 MRS-agar plate를 이용하여 계대하며 보관하였고, 종배양은 250ml flask에 150ml의 MRS 액체배지를 넣고 멸균한 후 균주를 agar plate로부터 접종하여 37°C에서 24시간동안 정치배양하였다. 이 중 *L. acidophilus* KCCM32820과 *S. lactis* KCCM32406은 MRS 배지에서 잘 자라지 않았기 때문에 yeast extract-milk 배지(skim milk 10%, yeast extract 0.5%)에 동일한 조건으로 종배양하였다.

한편 본 연구에서의 연구결과를 산업적으로 이용하기 위한 발판으로서, 유산균 제제의 균주로 이용될 유산균을 현재 시판중인 제제로부터 분리해내어 배양조건을 조사하였다. 유산균을 분리해 낸 시판 생균제제는 (주)과학축산으로부터 프로세락(Procelac)이라는 상품명의 활성미생물 복합제를 공급받아 실험에 이용하였다. 일정량의 제제를 멸균 0.85% saline 용액에 현탁시킨 후 MRS 고체배지에 도말하여 30°C 및 37°C에서 배양한 후 주균주로 발생한 집락(총 집락수의 95%이상)을 순수분리해 내었다. 분리한 균주는 제품의 사양으로부터 *Lactobacillus* sp.임을 확인하였으며, 본 연구 자체적으로도 MRS 고체배지 상에서의 집락의 성장, MRS 배양액의 성장 및 pH변화, lactic acid 측정 kit(Behringer Mannheim, GmbH, Germany)에 의한 배양액 중 유산 다량생성 확인 등을 통하여 유산균임이 확인되었다. 분리된 유산균의 배양조건 확인하기 위하여 우선 MRS 배지에서의 생육 최적온도를 실험한 결과 30°C 및 37°C에서 유사한 생육속도를 나타내었으나 30°C에서의 최대 생균수가 37°C보다 높은 결과를 보임으로써 생육 최적온도는 30°C임을 확인하였다.

#### 다. 배지 제조

##### 1) 배지 제조

위의 4 균주 중 가장 생육도가 높은 균주를 선발하기 위하여 각각의 균주를 rich medium(MRS 배지 및 yeast extract-milk 배지)과 rich medium의 질소원을

혈장 단백질로 대체한 modified rich medium (modified MRS 및 modified yeast extract-milk배지)으로 나누어 37°C에서 rich medium은 24시간, modified rich medium은 48시간동안 배양하고 생균수 측정을 통하여 생육정도를 비교하였다. modified MRS 배지는 MRS 배지의 질소원인 peptone(1%, w/v), beef extract(1%), yeast extract(0.5%)를 제외한 나머지 성분들, 즉 glucose(2%), Tween 80(0.1%), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.2%), sodium acetate(0.5%), triammonium citrate(0.2%), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(0.02%), MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O(0.005%)을 2배의 농도로 용해시켜 얻은 용액에 동일 부피의 혈장액을 첨가하고 pH 6.4로 맞추어 제조하였다. 이 때 혈장액은 혈장 원액에 단백질분해효소인 Alcalase<sup>®</sup>(Novo Nordisk, Denmark)을 0.1%(v/v)의 농도로 처리하여 55°C에서 2시간 동안 반응시킨 반응액을 단백질 함량으로 총 3%가 되도록 첨가하였다. modified yeast extract-milk 배지는 단백질분해효소를 처리한 혈장 원액에 4%가 되도록 lactose를 첨가하여 제조하였다.

## 2) 생균수 측정

배양액 시료를 0.85% saline용액을 이용하여 연속희석하고 MRS-agar plate에 적절한 희석액을 20 $\mu$ l씩 smearing하였다. 각 plate를 37°C에서 30시간 배양한 후 형성된 colony의 수를 세어 생균수를 측정하였다. 각 시료에 대해서는 triplicate로 하여 결과값의 평균으로 생균수를 결정하였다.

## 라. 배지 최적화 및 배양방법의 정립

### 1) 배지의 멸균조건 조사

배지의 멸균조건을 찾기 위해 modified MRS 배지를 온도별로 각각 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C까지 단백질이 응고되어 응집되지 않도록 교반하면서 가열 처리한 후 plate count agar(Difco)에 20 $\mu$ l씩 smearing하여 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양 후 plate에 미생물 colony가 나타나지 않는 가열처리조건(90°C)을 멸균조건으로 결정하였다.

### 2) 혈장 단백질의 효소적 가수분해조건 조사

MRS 배지의 질소원인 peptone, beef extract, yeast extract를 대체하는 혈장 단백질이 유산균에 의해 잘 이용될 수 있는 형태를 조사하기 위해, 혈장 단백질을 단백질 분해 정도를 달리한 것을 첨가하였다. 우선 단백질 분해효소는 산업적으로 응용 가능한 Alcalase<sup>®</sup>(Novo Nordisk, Denmark), Neutrase<sup>®</sup>(Novo Nordisk, Denmark), Complex-2000<sup>®</sup>((주)태평양화학) 등 세가지에 대하여 단백질 분해 정도를 비교하였다. 이를 위하여 동일한 혈장 시료를 3개의 250ml flask에 나누어 각각의 pH를 7.5, 6.0, 6.2 로 맞추고 1.8%(w/v)의 agar를 넣고 교반하면서 끓여 준 후 굳기 전에 Petri dish에 옮겨 부어 agar plate를 제조하였다. 각각의 plate에 paper disc를 3개씩 배열해 놓고 효소액을 1, 3, 10 $\mu$ l씩 적셔준 후 각각을 55°C, 45°C, 50°C 항온기에서 5시간씩 두어 효소반응이 일어나도록 하였다. 이 때 효소액은 효소원액을 증류수로 100배 희석한 효소액을 제조하여 사용하였다. 효소반응 후의 plate는 disc 주변에 형성된 환형의 크기를 비교하여 효소의 단백질 분해역가를 비교하였다.

비교한 단백질 분해효소 중에서 Alcalase가 가장 우수한 단백질 분해역가를 보여 주었기 때문에(연구결과 참조) Alcalase의 농도를 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5%(v/v) 등으로 높이면서 혈장액에 55°C에서 2시간동안 처리하여 얻어진 반응액으로 각각에 대한 modified MRS 배지를 제조하여 유산균의 생육도를 비교 관찰하였다.

### 3) 혈장 단백질의 첨가농도의 영향 조사

modified MRS 배지에 첨가하는 혈장 단백질의 농도에 따른 생육 상태를 비교하기 위하여 위에서 설명한 방법으로 제조된 배지를 기준으로, 혈장 단백질 혼합 비율을 1/2, 1/4, 1/10로 낮춘 배지와 혈장에 직접 비질소원 성분들을 용해시켜 제조한 배지를 비교하였다. 혈장 단백질의 농도를 낮춘 배지의 경우는 효소반응을 거친 혈장액을 증류수로 각각 2배, 4배, 10배 희석한 후 위와 동일한 방법으로 제조하였다.

### 4) 비질소원 성분들의 영향 조사

modified MRS 배지에 있어서 비질소원 성분들의 유산균 생육에 미치는 영

향을 조사하기 위하여 modified MRS 배지 제조시 MRS 배지의 비질소원 성분들 중 glucose 이외의 모든 성분들을 첨가하지 아니하고 2% glucose 용액에 혈장액을 혼합하여 배지를 제조하고 유산균을 배양하였다.

#### 마. 발효조건의 최적화

##### 1) 접종량의 영향 조사

유산균의 접종량을 보통 수준(0.5%)과 높은 수준(3%)으로 구분하여 그 영향을 살펴보았다. 접종방법은 MRS 배지에 배양한 종배양액 일정량을 2,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 버리고 침전된 균체는 상등액과 동일 부피의 멸균한 0.85% saline용액을 넣어 현탁시킨 균현탁액을 접종하였다.

##### 2) 발효조 배양(교반배양 및 pH 조절의 영향 조사)

유산균 배양시 교반의 영향과 pH 조절의 영향을 조사하기 위하여 5L 발효조(한국발효기)를 이용하여 37°C에서 통기 없이 20rpm으로 교반하면서 배양하였다. pH 6.4에서 배양을 시작하여 pH가 각각 6.0, 5.5, 5.0, 4.5에 이르면 해당 pH를 유지하도록 4N NaOH 용액으로 조절하면서 생육상태를 관찰하였고 대조구로는 pH 조절없이 교반하면서 배양한 결과를 비교하였다.

#### 2. 배양액의 동결건조방법 확립

유산균 배양액을 동결건조할 때 동결과정과 건조과정이 유산균 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 동결속도와 시료의 양을 구분하여 건조시켜 보았다. 배양액을 2,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 침전물 일정량을 미리 칭량한 glass bottle에 넣고 다시 칭량하여 정확한 시료무게를 기록해 둔 후 액의 두께가 동일하도록 일정한 경사각으로 세워 -50°C의 deep freezer에서 3시간 동안 (또는 일반 냉장고의 -15°C 냉동실에서) 5시간동안 동결시켰다. 동결된 시료를 동결건조기(Labconco Co., USA)에 장치하여 24시간동안 건조한 후 재차 칭량하여 건조후 무게를 확인한 후 생균수를 측정하였다. 생균수 측정은 동결건조 후의 분말시료를



0.85% saline용액에 일정량 녹인 것을 시료로 하여 위에서 설명한 방법으로 측정하  
 되 48시간동안 배양한 후 형성된 colony의 수를 세어 생균수를 측정하였다. 동결건  
 조시의 안정화에 대한 기준은 동결건조 전의 생균수에 대해 건조 직후의 생균수가  
 감소된 비율로 하였다. 즉,

$$\text{동결건조시의 안정화 효과(\%)} = \frac{\text{동결건조 직후의 생균수(CFU/g)}}{\text{동결건조 전의 생균수(CFU/g)}} \times 100$$

$$(\text{단, 동결건조 전의 생균수} = \text{생균수(CFU/ml)} \times \frac{\text{동결건조 전의 부피(ml)}}{\text{동결건조 직후의 무게(g)}})$$

#### 가. 배양시간에 따른 동결건조 후의 생존율 조사

배양과정에서 생성된 다량의 유기산이 동결건조 후의 생존율에 영향을 주는  
 지 알아보기 위하여, 배양시간에 따라 16시간(mid-log phase), 20시간(late-log  
 phase), 24시간(early stationary phase), 28시간(stationary phase)째의 배양액에 대  
 하여 동일한 조건으로 동결건조시킨 후 각각의 생존율을 비교하였다.

#### 나. 배지에 첨가되는 혈장 단백질의 분해도에 따른 동결건조 후의 생존율 조사

배양조건 실험에서와 같이 배지에 첨가되는 혈장 단백질의 분해도를 달리하  
 여 생존율에 미치는 영향을 살펴보았다. Alcalase의 농도를 0.01, 0.05, 0.1, 0.25,  
 0.5%(v/v) 등으로 높이면서 혈장액에 55°C에서 2시간동안 처리하여 얻어진 반응액  
 으로 각각에 대한 modified MRS 배지를 제조하여 각각 stationary phase에 이를  
 때까지 *Lactobacillus* sp.를 배양한 다음 동일한 조건으로 동결건조하여 생존율을 비  
 교하였다.

#### 다. 배지에 첨가되는 혈장 단백질의 농도에 따른 동결건조 후의 생존율 조사

배양조건 실험에서와 같이 배지에 혈장 단백질(0.1% Alcalase로 분해)이 각각  
 0.1, 0.5, 1, 2 plasma의 농도로 첨가된 modified MRS 배지에 따라서도 동결건조 생  
 존율에 미치는 영향을 조사하였다. 이 때 혈장 단백질은 0.1% Alcalase로 분해시킨

것을 배지제조에 사용하였으며 각 배지에서의 stationary phase는 모두 24시간경에 도달하여 동시에 동결건조를 시작하였다.

#### 라. 배양액 농축에 따른 동결건조 후의 생존율 비교

*Lactobacillus* sp. 배양액을 동결건조하기 전 배양액을 농축하여 동결시간과 건조시간을 단축하는 것이 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 농축하지 않은 원래의 배양액과 농축 배양액으로 구분하여 동결건조 후의 생존율을 비교하였다. 배양액의 농축은 산업적으로 이용되고 있는 원심분리기의 농축능력에 맞추어 원래 배양액에 비하여 유산균 농도가 10배가 되도록 농축하는 조건으로 실시하였다. 배양액을 2,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액과 균체 침전물을 분리한 후 원래 배양액 부피의 1/10이 되도록 상등액으로 균체 침전물을 다시 현탁시켜 농축 배양액을 얻었다. 배양액을 미리 칭량한 conical bottle에 넣고 다시 칭량하여 정확한 시료 무게를 기록해 둔 후 액의 두께가 동일하도록 일정한 경사각으로 세워 -50°C의 deep freezer에서 3시간 동안 동결시켰다. 동결된 시료를 동결건조기에 장치하여 농축배양액은 24시간, 원래 배양액은 28시간동안 건조한 후 재차 칭량하여 건조후 무게를 확인한 후 생존수를 측정하였다.

#### 마. 동결속도와 시료의 양에 따른 동결건조 후의 생존율 비교

동결속도와 시료의 양에 따라 동결시간 및 건조시간이 달라지는 것이 생존율에 미치는 영향을 조사하였다. 동결속도는 -50°C의 deep freezer에서 3시간 동안 동결하는 것과 일반 냉장고의 -15°C 냉동실에서 5시간동안 동결하는 것으로 구분하였고, 농축 배양액 시료의 양은 약 5, 10, 20 g으로 구분하여 동결건조하였다.

#### 바. 배양액의 pH 보정에 따른 동결건조 후의 생존율 비교

동결건조 전 배양액의 pH는 3.8정도로서 다량의 유기산이 함유된 상태이므로 1N HCl용액으로 농축 배양액의 pH를 6.4로 보정한 후 동결건조하였을 때의 생존율 변화를 조사하였다.

### 3. 혈액 단백질의 동결건조 안정화 효과 규명 (MRS 및 modified MRS 배지성분의 안정화 효과 비교)

배양액을 동결건조할 때 유산균에 의해 이용되지 않고 배양액 중에 남아있는 혈액 단백질 성분에 의한 동결건조 안정화 효과를 조사하였다. modified MRS 배지에서 배양한 일정 부피의 배양액을 원심분리하여 균체 침전물로부터 상등액을 분리해낸 후 0.85% saline용액으로 침전물을 원래의 부피가 되도록 다시 현탁시켜 동결건조한 후 원래 배양액의 동결건조 결과와 비교하였다. 또한 혈액 단백질 성분의 안정화 효과를 평가하기 위하여 대조구로는 MRS 배지에 대하여 동일한 조건으로 실험하여 결과를 비교하였다.

### 4. 동결건조 안정제의 선정

배양액의 동결건조를 통한 제제화를 위하여 동결건조 후 생존율을 극대화할 수 있는 동결건조 안정제를 찾는 실험을 진행하였다. 안정화 효과를 조사한 동결건조 안정제로는 glycine, monosodium glutamate, sucrose, lactose, starch, sorbitol, skim milk, 카제인 가수분해물(casein hydrolysate), 대두 가수분해물(soybean hydrolysate) 등 동결건조 안정화 효과가 있다고 알려져 있고 산업적인 이용이 가능하며 사료에 적합한 소재들을 동결전에 0, 1, 5, 10, 20%(w/v)의 농도로 첨가하여 유산균 안정화 효과를 검증하였다. 우선 동일한 modified MRS 배지 농축 배양액을 20ml씩 5개로 나누어 안정제로 sucrose를 0, 1, 5, 10, 20%(w/v)의 농도로 첨가하여 녹인 배양액 시료들에 대하여 동결건조 후의 생존율을 비교하였다. 동일한 방법으로 나머지 안정제에 대해서도 농도에 따른 안정화 효과를 조사하였다.

### 제3절 결과 및 고찰

#### 1. 혈액성분을 배지로 한 유산균 발효조건의 확립

##### 가. 균주의 선발

본 연구에서 사용한 4 균주 중 가장 생육도가 높은 균주를 선발하기 위하여 각각의 균주를 rich medium(MRS 배지 및 yeast extract-milk 배지)과 rich medium의 질소원을 혈장 단백질로 대체한 modified rich medium (modified MRS 및 modified yeast extract-milk 배지)으로 배지의 종류를 구분하여 배양한 결과, *S. thermophilus*와 *L. plantarum*는 MRS 배지에서 좋은 생육도를 보였고 modified MRS 배지에서는 비교적 좋은 생육도를 나타내었으며, *L. acidophilus*와 *S. lactis*는 yeast extract-milk 배지에서 비교적 좋은 생육을 하였으나 MRS 배지와 modified MRS 배지 및 modified yeast extract-milk 배지에서는 잘 자라지 않았다(표 1).

Table 1. Cell growth of 4 strains of lactic acid bacteria

Lactic acid bacteria	Cell growth(CFU/ml)			
	MRS	modified MRS	yeast extract -milk	modified yeast extract-milk
<i>L. acidophilus</i> KCCM32820	$1.5 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$	$1.2 \times 10^8$	$9.7 \times 10^5$
<i>L. plantarum</i> KCCM11322	$7.9 \times 10^8$	$6.6 \times 10^7$	$3.1 \times 10^7$	$5.4 \times 10^6$
<i>S. thermophilus</i> KCCM12020	$4.7 \times 10^9$	$3.9 \times 10^8$	$7.2 \times 10^8$	$7.0 \times 10^7$
<i>S. lactis</i> KCCM32406	$3.3 \times 10^5$	$4.0 \times 10^5$	$6.2 \times 10^7$	$2.6 \times 10^5$

이상과 같은 결과로부터 *S. thermophilus*와 *L. plantarum* 균주가 MRS 배지에서 생육도가 높으며 또한 혈장 단백질을 비교적 잘 이용하는 것을 확인하고, 이 두 균주를 대상으로 MRS 배지의 질소원을 혈장 단백질로 대체한 modified MRS 배지에 대한 배지 최적화 실험을 실시함과 동시에 보다 우수한 균주를 선발하는 실험을 진행하였다.

## 나. 배지 최적화

### 1) 혈장 단백질의 효소적 가수분해 조건

MRS 배지의 질소원인 peptone, beef extract, yeast extract를 대체하는 혈장 단백질이 유산균에 의해 잘 이용될 수 있는 형태를 조사하기 위해, 혈장 단백질의 단백질분해 정도를 달리하여 첨가하였다. 우선 단백질분해효소는 선정하기 위하여 산업적으로 응용 가능한 Alcalase, Neutrase, Complex-2000 등 세가지에 대하여 단백질분해 정도를 비교한 결과, Alcalase의 역가가 가장 우수한 것으로 나타났다(그림 1).

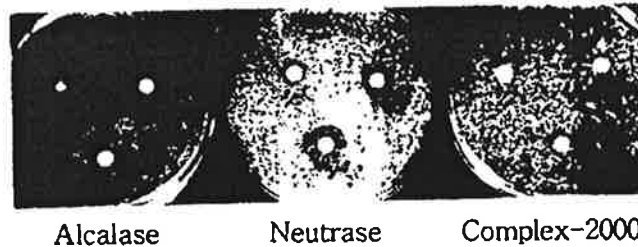


Figure 1. Comparison of proteolytic activities of 3 industrially applicable proteases on plasma proteins

따라서 Alcalase를 단백질분해효소로 선정하고 Alcalase의 농도를 0.01, 0.05, 0.1, 0.5%(v/v) 등으로 높이면서 처리하여 얻어진 반응액으로 각각에 대한 modified MRS 배지를 제조하여 *S. thermophilus*와 *L. plantarum*의 생육도를 비교 관찰하였을 때, *S. thermophilus*와 *L. plantarum* 모두 단백질 가수분해가 많이 일어난 경우에서 생육속도가 빨랐으며, 한편 *L. plantarum*은 lag time이 길게 나타나고 *S. thermophilus*에 비하여 생육정도도 낮아서 상대적으로 혈장 단백질을 이용하는 능력이 떨어짐을 알 수 있었다(그림 2). 생육정도와 생육속도를 비교할 때 Alcalase의 처리농도가 높아짐에 따라 점차 증가하다가 0.1% 이상이면 유사한 결과를 나타내었으므로 혈장 단백질의 가수분해 최적조건을 Alcalase 0.1% 처리로 정하고 이후부터는 조건을 고정 실험하였다. 또한 위의 결과로부터 혈장 단백질을 이용한 유산균 배양에 가장 적합한 균주로서 *S. thermophilus*를 선정하고 이 균주에 대하여 배지 최

적화 및 배양조건 실험을 계속 진행하였다.

## 2) 혈장 단백질의 첨가농도의 영향

Modified MRS 배지에 첨가하는 혈장 단백질의 농도에 따른 생육 상태를 비교하기 위하여, MRS 배지의 비질소원 성분들을 용해시킨 용액과 혈장액을 1:1로 혼합하여 제조된 배지를 기준으로(1 plasma), 혈장 단백질 혼합비율을 1/2, 1/10로 낮춘 배지(0.5 plasma, 0.1 plasma)와 혈장에 직접 비질소원 성분들을 용해시켜 제조한 배지(2 plasma)에 대하여 *S. thermophilus*의 생육정도를 비교하였다. 배양 결과 0.1 plasma에서 1 plasma 까지 혈장 단백질의 첨가농도가 증가함에 따라 *S. thermophilus*의 생육도도 증가하였으나 2 plasma의 경우에는 단백질의 농도가 높음으로 인하여 배지의 멸균에 의해 응고된 단백질의 응집현상이 특히 심하였기 때문에 오히려 생육이 저하되는 결과를 보여주었다(그림 3). 따라서 혈장 단백질의 첨가 조건은 1 plasma로 확정하였다.

## 3) 비질소원 성분들의 영향

Modified MRS 배지에 첨가되는 MRS 배지의 비질소원 성분들 중 glucose 이외의 모든 성분들을 첨가하지 않고 glucose만 혈장액과 혼합하여 제조된 배지에서 *S. thermophilus*를 배양한 결과, 생육도가 상당히 저하됨을 보여줌으로써(그림 4) 비질소원 성분들도 생육에 매우 중요한 영양원으로 이용되고 있음을 알 수 있었다.

## 다. 배양방법의 확립

### 1) 배지의 멸균조건

유산균 배양에 있어서는 여타의 발효에 비하여 오염의 위험이 비교적 적고 발효가 진행되면서 초기에 오염된 균들이 점차 사멸되는 현상을 보이나, 본 연구에서 이용하고 있는 혈액 원료는 도축장 등에서 여러 종류의 잡균에 의해 오염될 가능성이 높은 원료이기 때문에 멸균과정은 반드시 필요하다고 판단되었다. 또한 혈장의 높은 단백질 농도에 의한 멸균시의 응고 응집현상과 산업적 응용의 용이성 등을 고려하여, 멸균조건을 찾기 위해 modified MRS 배지를 온도별로 각각 60°C, 70°C,

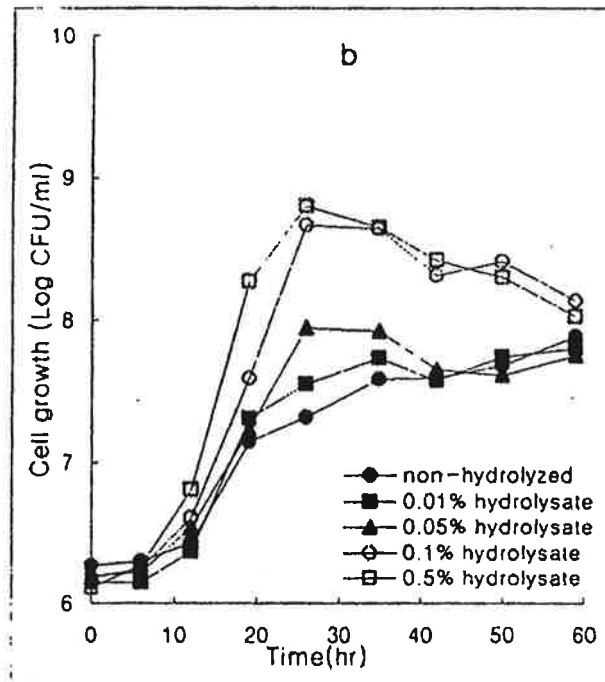
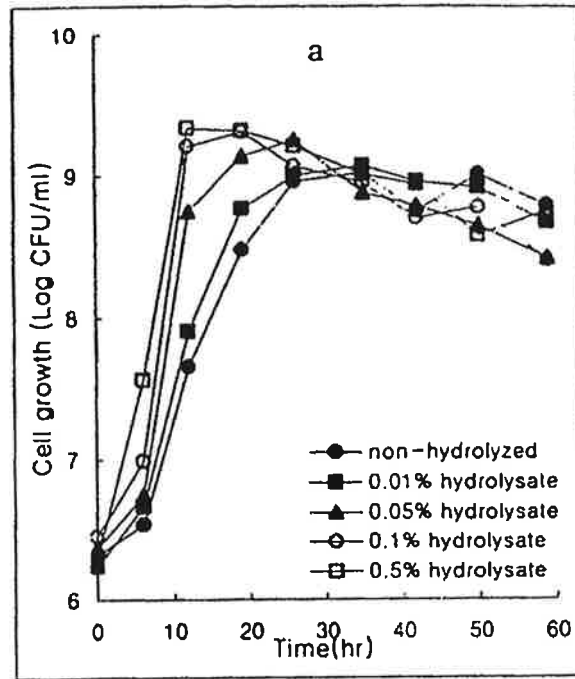


Figure 2. Comparison of cell growth in modified MRS medium (a) *S. thermophilus* KCCM12020 0.5% inoculation, (b) *L. plantarum* KCCM11322 0.5% inoculation

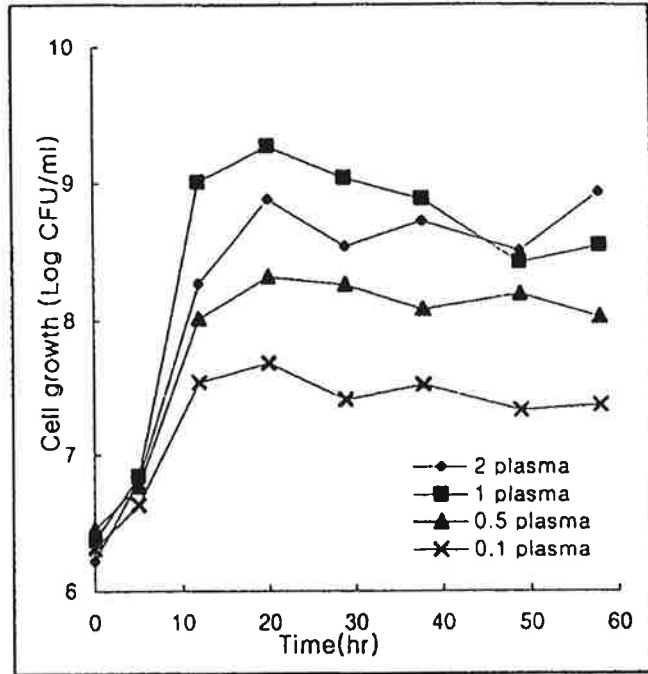


Figure 3. Effects of the concentration of plasma protein in modified MRS medium on cell growth (*S. thermophilus* KCCM12020 0.5% inoculation, 0.1% Alcalase-hydrolysate used)

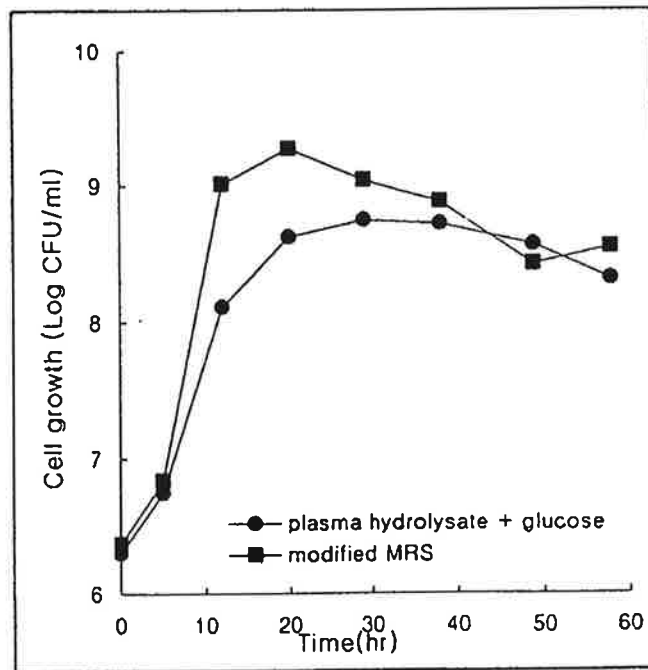


Figure 4. Effects of non-nitrogen components in modified MRS medium on cell growth (*S. thermophilus* KCCM12020 0.5% inoculation, 0.1% Alcalase-hydrolysate used)



80°C, 90°C, 100°C까지 가열처리한 후 오염균의 생존 여부를 조사한 결과, 90°C까지 가열처리했을 때 오염균이 사멸됨을 확인할 수 있었다. 또한 멸균시에는 반드시 교반하면서 가열처리하여야 단백질의 응집을 최대한 막을 수 있어서 유산균 배양이 용이하게 됨을 알 수 있었다.

## 2) 접종량의 영향

*S. thermophilus*의 접종량을 보통 수준(0.5%)과 높은 수준(3%)으로 구분하여 그 영향을 살펴본 결과, 접종량에 따른 생육정도의 큰 차이는 나타나지 않았으며 (그림 5), 오히려 (최대생육 생균수-초기 생균수)/(최대 생육도까지의 배양시간)으로 계산한 productivity는 0.5% 접종시  $1.22 \times 10^8$  cells/ml·hr이고 3% 접종시에는  $1.06 \times 10^8$  cells/ml·hr로서 접종량을 높였을 때가 더 낮음을 알 수 있었다.

## 3) pH 조절의 영향

유산균 배양시 교반의 영향과 pH 조절의 영향을 조사하기 위하여 5L 발효조(한국발효기)를 이용하여 37°C에서 통기 없이 20rpm으로 교반하면서 배양하였다. pH 6.4에서 배양을 시작하여 pH가 각각 6.0, 5.5, 5.0, 4.5에 이르면 해당 pH를 유지하도록 4N NaOH 용액으로 조절하면서 생육상태를 관찰하였고 대조구로는 pH 조절없이 교반하면서 배양한 결과를 비교하였다(그림 6). 결과에 의하면 6.0, 5.5 등 비교적 높은 pH에서 조절해 줄 경우 최대생육 생균수가 약간 높게 나왔으나 전체적으로 pH 조절에 의해서는 생육도가 큰 차이를 보이지 않음을 알 수 있었다.

## 4) MRS medium과의 생육도 비교

지금까지의 연구결과에서 얻어진 배지 및 배양방법의 최적조건을 이용하여 최종적으로 MRS medium과의 생육도 비교를 통해 혈장 단백질을 이용한 유산균 배양 가능성을 알아보기 위하여, 0.1%(v/v)의 Alcalase를 처리하여 단백질을 분해시킨 혈장액을 1 plasma의 농도로 첨가하여 제조한 modified MRS 배지와 대조구인 MRS 배지에서 *S. thermophilus* KCCM12020 균주의 종배양액을 0.5%(v/v)의 농도로 접종하여 배양한 결과를 비교하였다. 배양 결과 modified MRS 배지에서의 최

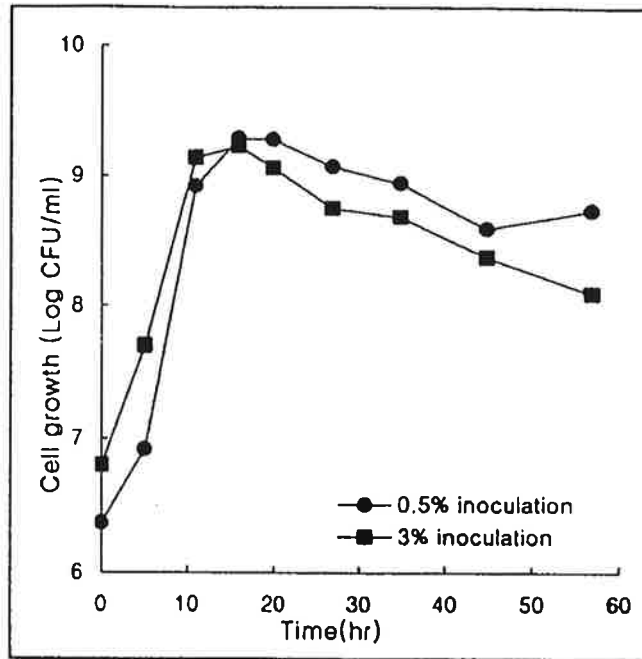


Figure 5. Effects of the concentration of inoculum on cell growth (*S. thermophilus* KCCM12020, 0.1% Alcalase-hydrolysate used)

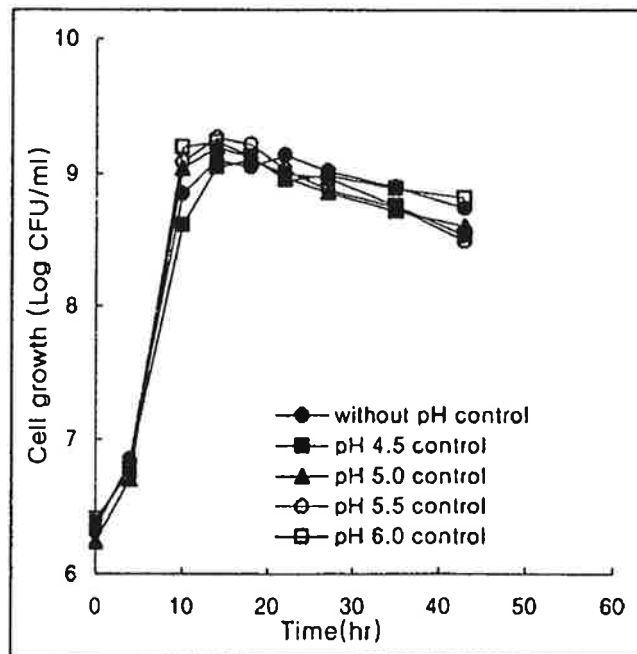


Figure 6. Effects of pH control on cell growth (*S. thermophilus* KCCM12020 0.5% inoculation, 0.1% Alcalase-hydrolysate used)

대생육 생균수는  $2.5 \times 10^9$  cells/ml로서  $3.6 \times 10^9$  cells/ml을 기록한 MRS 배지에 대하여 70% 수준의 생육도를 보임과 동시에  $1 \times 10^9$  cells/ml이상의 높은 생균수를 나타냄으로써 혈장 단백질 이용에 대한 큰 가능성을 보여주었다(그림 7).

#### 라. Probiotics용 균주의 분리 및 배양조건 확인 (사료용 생균제제로부터의 유산균 분리 및 배양)

시판중인 프로세락(Procelac)이라는 상품명인 활성미생물 복합제((주)과학축산)으로부터 분리된 probiotics용 *Lactobacillus* sp.에 대하여, modified MRS 배지에 질소원으로 첨가되는 혈장 단백질의 분해도에 따른 생육정도를 비교한 결과, 앞서의 실험에 이용된 *Streptococcus thermophilus* KCCM12020 균주와 같이, 생육정도와 생육속도를 비교할 때 Alcalase의 처리농도가 높아짐에 따라 점차 증가하다가 0.1%(v/v) 이상이면 유사한 결과를 나타내었으므로(그림 8) 혈장 단백질의 가수분해 최적조건을 Alcalase 0.1% 처리로 정하였다. 한편 배지에 첨가하는 혈장 단백질 가수분해물의 농도에 따른 생육 정도를 비교한 결과, 이 실험에서도 역시 *S. thermophilus*의 경우에서와 같이 1 plasma의 경우가 가장 좋은 생육도를 나타내었다(그림 9). 이와같은 배지조건에 의하여 제조한 modified MRS 배지와 대조구인 MRS 배지에서 *Lactobacillus* sp.의 종배양액을 0.5%(v/v)의 농도로 접종하여 배양한 결과, modified MRS 배지에서의 최대 생육생균수는  $5.2 \times 10^9$  cells/ml로서  $7.1 \times 10^9$  cells/ml을 기록한 MRS 배지에 대하여 약 73%의 생육도를 보임과 동시에  $10^9$  cells/ml이상의 높은 생균수를 나타냄으로써 혈장 단백질 이용에 대한 큰 가능성을 확인하였다(그림 10).

## 2. 배양액의 동결건조방법 확립

### 가. 배양시간에 따른 동결건조 후의 생존율 조사

Probiotics 생산에 있어 생산성을 결정하는 가장 중요한 요소는 균체의 동결건조에 대한 안정성이라 할 수 있겠다(30, 31). 동결건조과정 중의 안정화에 관한 많

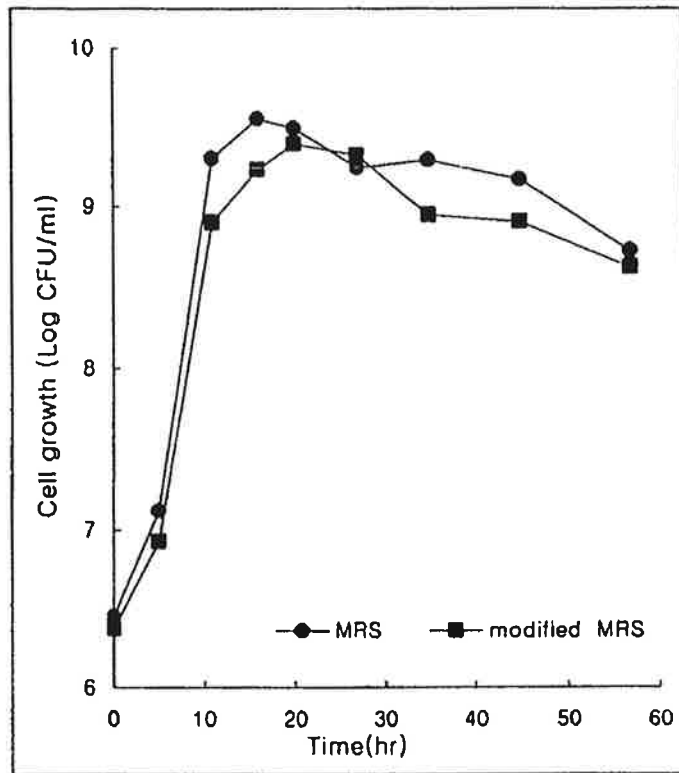


Figure 7. Comparison of the cell growth of *S. thermophilus* KCCM12020 in MRS and modified MRS medium

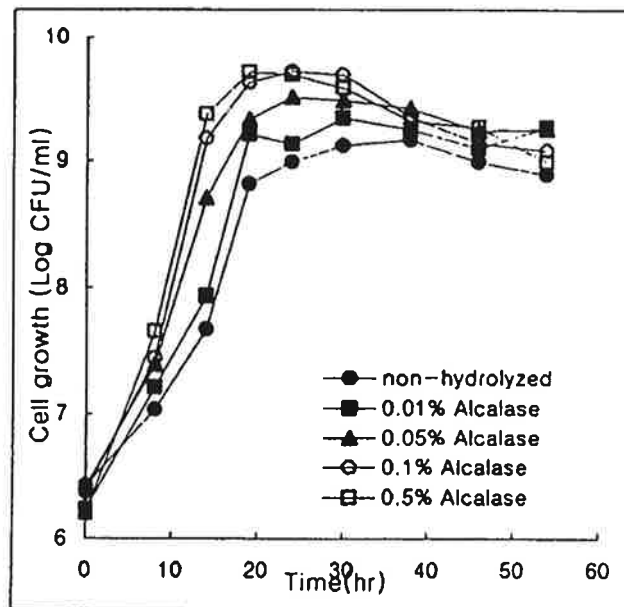


Figure 8. Effects of Alcalase concentration for the hydrolysis of plasma proteins on the cell growth of *Lactobacillus* sp. in modified MRS medium

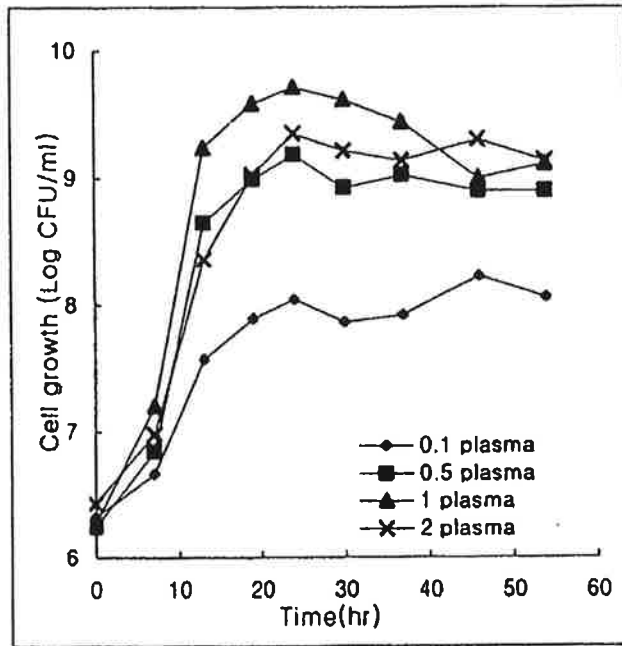


Figure 9. Effects of the concentration of enzymatic hydrolysate of blood plasma on the cell growth of *Lactobacillus* sp. in modified MRS medium

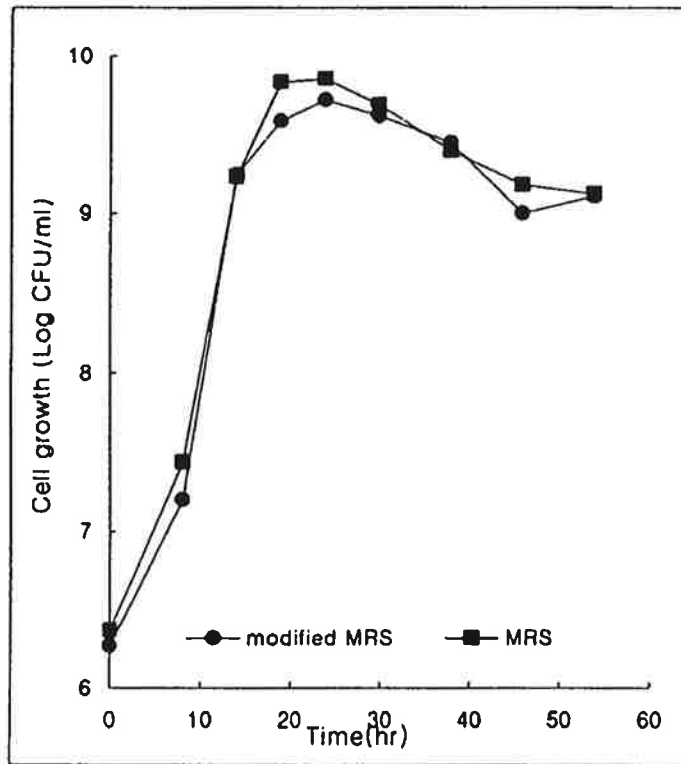


Figure 10. Comparison of the cell growth of *Lactobacillus* sp. in MRS and modified MRS medium

은 연구문헌이 있지만 실제적인 적용에 있어서는 일치되는 결과를 얻기 힘든데, 그것은 균주, 배양액 성분, pH, 배양시간, 동결건조 방법, 동결건조 보호제 등의 여러 가지 요인이 균체의 안정화에 영향을 미치기 때문이다(31, 32). 본 연구에서는 modified MRS 배양액으로 얻어진 높은 생균수를 동결건조과정에서 최대한 높게 유지해 줄 수 있는 조건을 조사하였다. 배양과정에서 생성된 다량의 유기산이 동결건조 후의 생존율에 영향을 주는지 알아보고 동시에 probiotics 생산을 위한 적정 배양시간을 결정하기 위하여 배양시간에 따라 16시간(mid-log phase), 20시간(late-log phase), 24시간(early stationary phase), 28시간(stationary phase)에서의 배양액에 대하여 동일한 조건으로 동결건조시킨 후 각각의 생존율을 비교하였다. 그 결과 16시간과 20시간에 대해서는 생존율이 큰 차이가 없었고, 24, 28시간째 배양액의 경우 약간씩 점차적으로 생존율이 떨어졌지만(실험결과 생략), 동결건조전 실제 생균수는 24시간째가 가장 높았기 때문에 동결건조를 위한 배양시간은 24시간으로 결정하였다.

나. 배지에 첨가되는 혈장 단백질의 분해도에 따른 동결건조 후의 생존율 조사

배지에 첨가되는 혈장 단백질의 분해도를 달리하여 각 배양액을 동결건조할 때 생존율의 차이를 조사하였으나 이 실험에서는 배지에 따른 생존율 차이가 유의성을 보이지 않았다(실험결과 생략).

다. 배지에 첨가되는 혈장 단백질의 농도에 따른 동결건조 후의 생존율 조사

배지에 혈장 단백질(0.1% Alcalase로 분해)이 각각 0.1, 0.5, 1, 2 plasma의 농도로 첨가된 modified MRS 배지에 따라서도 동결건조 생존율에 미치는 영향을 비교한 결과, 혈장 단백질의 첨가농도가 0.1, 0.5, 1 plasma로 높아질수록 생존율은 상승되었으며 2 plasma의 생존율은 1 plasma보다 약간 높은 수준의 생존율을 나타내었다(표 2). 이 결과로부터 배지의 질소원 성분으로 첨가한 혈액 단백질 가수분해물이 동결건조에 의한 유산균의 손상을 막아주는 동결건조 보호제로서의 역할도 하고 있음을 알 수 있었다.



Table 2. Effects of plasma protein concentration of modified MRS medium on the survival of *Lactobacillus* sp. during freeze-drying.

Plasma protein concentration	Viable cell count (CFU/g) before freeze-drying	Viable cell count (CFU/g) after freeze-drying	% Survival during freeze-drying
0.1 plasma	$7.9 \times 10^8$	$9.5 \times 10^6$	1.2
0.5 plasma	$8.2 \times 10^9$	$3.1 \times 10^8$	3.8
1 plasma	$7.1 \times 10^{10}$	$5.0 \times 10^9$	7.0
2 plasma	$9.4 \times 10^9$	$5.6 \times 10^8$	7.5

라. 배양액 농축에 따른 동결건조 후의 생존을 비교

*Lactobacillus* sp. 배양액을 동결건조하기 전 배양액을 농축하여 동결시간과 건조시간을 단축하는 것이 생존율에 미치는 영향을 조사한 결과 농축 배양액의 경우가 원래 배양액의 경우보다 높은 생존율을 보여줌으로써(표 3) 배양액의 농축에 의한 동결시간 및 건조시간의 단축이 동결 및 건조과정에 의한 유산균의 손상을 줄여주고 있음을 알 수 있었다.

Table 3. Effects of the concentrating of culture broth on the survival of *Lactobacillus* sp. during freeze-drying.

Freeze-dried sample	Viable cell count (CFU/g) before freeze-drying	Viable cell count (CFU/g) after freeze-drying	% Survival during freeze-drying
Culture broth	$6.5 \times 10^{10}$	$4.3 \times 10^9$	6.6
Concentrate of the culture broth	$6.2 \times 10^{10}$	$4.5 \times 10^9$	7.3

마. 동결속도와 시료의 양에 따른 동결건조 후의 생존을 비교

동결속도와 시료의 양에 따라 동결시간 및 건조시간이 달라지는 것이 생존율에 미치는 영향을 조사한 결과, 동결속도에 의해서 생존율의 차이가 유의성을 갖고

나타났으며 시료의 양에 의해서도 상당한 생존율의 차이를 보여주었다(표 4).

바. 배양액의 pH 보정에 따른 동결건조 후의 생존율 비교

3.8정도인 농축 배양액의 pH를 6.4로 보정한 후 동결건조하였을 때의 생존율 변화를 조사한 결과, pH 보정에 의해 생존율이 약간 상승하는 효과를 얻을 수 있었다(표 5).

Table 4. Effects of freezing temperature and sample amount on the survival of *Lactobacillus* sp. during freeze-drying.

Freezing temp.(°C)	Sample amount(g)	Viable cell count(CFU/g) after freeze-drying	% Survival
-50	19.12	3.9x10 <sup>9</sup>	6.4
-50	10.04	4.7x10 <sup>9</sup>	7.6
-50	4.98	5.6x10 <sup>9</sup>	9.1
-15	19.74	1.1x10 <sup>9</sup>	1.8
-15	9.79	2.4x10 <sup>9</sup>	3.9
-15	5.18	3.6x10 <sup>9</sup>	5.9

Table 5. Effects of pH adjustment of culture broth on the survival of *Lactobacillus* sp. during freeze-drying.

pH adjustment of culture broth	Viable cell count (CFU/g) before freeze-drying	Viable cell count (CFU/g) after freeze-drying	% Survival during freeze-drying
No adjustment (pH 3.7)	6.4x10 <sup>10</sup>	4.4x10 <sup>9</sup>	6.8
Adjust to pH 6.2	6.3x10 <sup>10</sup>	4.6x10 <sup>9</sup>	7.3

### 3. 혈액 단백질의 동결건조 안정화 효과 규명

가. MRS 및 modified MRS 배지성분의 안정화 효과 비교

배양액의 동결건조시 유산균에 의해 이용되지 않고 배양액 중에 남아있는 혈

액 단백질의 가수분해물 성분에 의한 동결건조 안정화 효과를 조사한 결과 MRS 배지 성분 및 modified MRS 배지 성분이 공히 동결건조 안정화 효과를 보여주었으며, 또한 modified MRS 배지 성분의 안정화 효과는 MRS 배지 성분의 안정화 효과와 거의 유사한 수준임을 알 수 있었다(표 6). 이러한 안정화 효과는 modified MRS 배지의 경우에는 함유되어 있는 혈장 단백질 가수분해물의 아미노산, 펩타이드 또는 단백질 성분들, MRS 배지의 경우에는 yeast extract, peptone, beef extract 등 질소원 성분들에 의한 것으로 추정되었다(30, 31, 33).

Table 6. Protective effects of the components of MRS and modified MRS medium on *Lactobacillus* sp. during freeze-drying.

Freeze-dried sample	Viable cell count (CFU/g) before freeze-drying	Viable cell count (CFU/g) after freeze-drying	% Survival during freeze-drying
Culture broth of MRS medium	$8.0 \times 10^{10}$	$5.7 \times 10^9$	7.1
0.85% saline suspension of cells grown in MRS medium	$7.8 \times 10^{10}$	$2.2 \times 10^9$	2.8
Culture broth of modified MRS medium	$6.2 \times 10^{10}$	$4.5 \times 10^9$	7.3
0.85% saline suspension of cells grown in modified MRS medium	$6.3 \times 10^{10}$	$2.0 \times 10^9$	3.2

#### 나. 혈액 단백질 성분의 안정화 효과 규명

앞의 실험에서 나타난 modified MRS 배지 성분의 동결건조 안정화 효과는 2의 다항에서 실험된 동결건조조건에 따른 안정화 효과 조사실험 중 배지에 첨가되는 혈장 단백질의 농도에 따른 영향을 조사한 결과와 함께 놓고 볼 때, modified MRS 배지의 혈액 단백질 성분에 의해 *Lactobacillus* sp.의 동결건조 안정화 효과가 나타난 것임을 확인할 수 있었다.

#### 4. 동결건조 안정제의 선정

동결건조 후 생존율을 극대화할 수 있는 동결건조 안정제를 찾기위해 glycine, monosodium glutamate, sucrose, lactose, starch, sorbitol, skim milk, 카제인 가수분해물(casein hydrolysate), 대두 가수분해물(soybean hydrolysate) 등 동결건조 안정화 효과가 있다고 알려져 있고 산업적인 이용이 가능하며 사료에 적합한 소재들에 대해 그 농도별로 안정화 효과를 조사하였다(33-36). 그 결과, sucrose와 skim milk가 각각 10 - 20%의 농도에서 우수한 동결건조 안정화 효과를 나타내었고, 그 중에서도 sucrose의 경우가 높은 안정화 효과를 보여서 10%를 첨가할 때 48.3%라는 높은 생존율을 나타내었는데 이것은 무첨가시의 생존율인 7.3%보다 6.6배가 넘는 생존율이었다(표 7). lactose와 카세인 가수분해물, 대두 가수분해물은 미약한 효과를 보여주었으며 glycine과 monosodium glutamate 등의 아미노산류와 starch 및 sorbitol은 안정화 효과를 나타내지 않았다(실험결과 생략). 따라서 본 연구에서는 sucrose가 보편적인 감미료이며 저렴한 가격 등의 장점을 가지면서 가장 안정화 효과가 좋았기 때문에 가장 적절한 동결건조 안정제로 선정할 수 있었다.

Table 7. Effects of some protective substances with several concentration on the survival of *Lactobacillus* sp. during freeze-drying.

Protective substances added	Viable cell count(CFU/g) after freeze-drying	% Survival during freeze-drying
Non-addition	$4.5 \times 10^9$	7.3
Sucrose		
1 %	$6.3 \times 10^9$	10.1
5 %	$2.1 \times 10^{10}$	33.8
10 %	$3.0 \times 10^{10}$	48.3
20 %	$2.8 \times 10^{10}$	45.2
Skim milk		
1 %	$4.8 \times 10^9$	7.7
5 %	$9.1 \times 10^9$	14.7
10 %	$1.2 \times 10^{10}$	19.3
20 %	$1.4 \times 10^{10}$	22.6

# 여 백

### 제 3 장 혈액 단백질로부터의 새로운 기능성 펩타이드의 개발

# 여 백

## 제1절 서 설

일본을 중심으로 1980년대부터 관심을 모아온 기능성 펩타이드는 현재 상품화된 수십가지의 펩타이드가 주로 우유 단백질인 casein과 유청 단백질, 대두 단백질, 난 단백질 등으로부터 얻어내어 소화흡수, 칼슘흡수, 저알레르기 항원, 기포 및 유화제 등의 기능으로 상품화되어 있는 반면, 혈액 단백질의 경우는 단 한 건 뿐으로 소화흡수기능의 글로빈 펩타이드가 전부이다(17). 의약품 소재로서의 기능성 펩타이드 연구 현황을 보더라도 casein, gluten, 난백 albumin, 쌀 albumin 등으로부터 진통, 동맥이완, 인슐린 분비촉진 등의 기능을 갖는 기능성 펩타이드들을 분리해내었지만, 혈액 단백질로부터는 사람의 혈청 단백질에서 동맥이완 기능의 펩타이드를 얻은 예가 보고되었을 뿐 특히 가축혈액으로부터 얻어지는 기능성 펩타이드로는 최근 수년간 보고되고 있는 ACE 저해 펩타이드가 전부인 실정이다(5). 혈액의 기능성 펩타이드로의 응용분야가 이렇게 제한되어 있다는 사실로부터도, 혈액이 다른 단백질원과 달리 고농도의 단백질 용액임을 감안할 때 상대적으로 혈액 단백질을 이용하는 연구가 시급한 것이며 선진국에 대한 선도기술을 확보할 수 있는 적절한 내용으로 볼 수 있는 것이다. 특히 가축 폐혈액 단백질을 이용함으로써 저렴하고 풍부한 원료 단백질을 확보하고 이로부터 기능성 식품소재로서의 기능성 펩타이드를 경제적으로 생산할 수 있는 기술을 개발하여 부가가치를 높임과 동시에 유용 폐자원의 상당량을 사용하는 새로운 용도가 개발되는 것이다.

본 연구에서는 항고혈압 기능성 식품소재로서 ACE 저해 펩타이드와 암예방 기능성 식품소재로서 항유전독성 펩타이드를 생산하기 위한 단백질 원료로 도축장에서 폐기되고 있는 폐혈액을 이용하고자 하였다. 이는 엄청난 양이 버려지고 있는 가축혈액을 이용하여 유용물질을 생산해냄으로써 유용자원 활용 및 환경오염 방지 뿐만 아니라 초기형성단계인 기능성 식품시장을 주도할 선도기술의 확보라는 다방면의 필요성을 근거로 하고있다. 연구추진방법은 우선 산업적으로 이용가능한 여러 효



소에 의해 가축혈액의 혈장 단백질을 가수분해하여 얻어지는 펩타이드의 ACE 저해 활성 및 항유전독성을 측정하는데 있어, 고효성의 펩타이드 분획을 얻기 위한 가수분해 최적조건을 정립하였다. 이를 위해서는 경제성 확보에 주안점을 두어 활성 펩타이드를 고수율로 생산할 수 있는 기질 단백질과 효소를 선정하고 효소반응조건을 조사하였다.

## 제2절 재료 및 방법

### 1. 혈액 단백질의 분리

#### 가. 혈액시료 채취 및 혈장의 분리

경북 포항시 소재 (주)명신산업 도축장에서부터 도축 즉시 위생적으로 채취한 소 혈액에 채혈 즉시 항혈액응고제(0.85% NaCl, 5% sodium citrate 용액)를 혈액부피와 동일한 양을 첨가하여 혈액응고를 방지하였다. 채혈된 혈액은 24시간 이내에 혈장과 혈구를 분리하기 위해 원심분리를 실시하였다. 원심분리는 육안에 의해 분리를 확인하여 8,000rpm/15분으로 조건을 확립하였다.

#### 나. 혈장 단백질의 분리

Albumin과 IgG의 분리를 위하여 Cohn의 cold ethanol 침전법(37)을 사용하되 예비실험을 거친 후 조건을 수정하여 방법을 확립하였다. 즉 cold ethanol의 %분획별(15, 20, 25, 30, 40, 50, 55, 60%) 침전물에 대해 전기영동을 이용하여 분리하고자 하는 각 단백질의 band를 확인함으로써 적절한 침전분획조건을 결정하였다. 전기영동의 조건은 12.5% SDS-polyacrylamide gel로서 pH 8.8에서 실시하였고, 염색은 coomassie brilliant blue R-250(Sigma)를 사용하였다. Marker로서 분리 이전의 혈장과 시판되고 있는 저분자, 고분자 marker(Sigma) 그리고 BSA(Bovine Serum Albumin, Sigma)를 사용하였다.

결정된 침전분획 조건에 따라 다음과 같은 방법으로 혈장 단백질을 분리하여 후속 실험에 이용하였다. 분리된 혈장 1ℓ를 얼음수조에 넣어 냉각하고, cold ethanol을 전체부피의 7.4%(v/v)가 되도록 첨가하여 반응시킨후 10,000rpm에서 20분간 원심분리하여 fibrinogen과 antihemophilic factor등을 제거하였다. 얻어진 상등액에 총 25%(v/v)가 되도록 cold ethanol을 첨가한후 같은 조건으로 원심분리하여 나오는 침전물, 즉 IgG를 증류수에 녹여 4℃에 보관하였다. 이때의 상등액에 총 60%(v/v)가 되도록 cold ethanol을 더 첨가하고, 같은 조건으로 원심분리하여 얻은 침전물, 즉 albumin을 증류수에 녹여 4℃에 보관하였다. 얻어진 IgG, albumin시료는 예비실험에서와 같은 조건으로 전기영동을 실시하여 각 band를 확인하였다.

#### 다. Globin의 분리

항응고제로 처리한 소혈액을 원심분리하여 얻어진 침전층(혈구)에 같은 부피의 증류수를 첨가하여 용혈(hemolysis)시킨 다음, 용혈용액 부피의 1/4량의 chloroform을 첨가하여 separation funnel에 넣어 천천히 섞은 다음 10분정도 방치후 stroma가 포함되어 있는 chloroform층을 제거하였다. Stroma를 제거한 후, heme을 제거하기 위해서 2%의 ascorbic acid용액을 시료의 2배부피를 넣어 1시간 동안 냉장실에서 magnetic stirrer로 교반하여 hemoglobin이 choleglobin으로 변화도록 해주었다. 그런 다음 1% HCl이 포함된 acetone을 시료의 4배 부피만큼 천천히 혼합한 후 5분간 격하게 stirring하고 냉장실에서 magnetic stirrer로 교반시키면서 overnight 방치해 두었다. 그 결과 헴화합물이 제거되고 단백질은 침전되었다. 원심분리(3,000rpm/15분)를 실시하여 단백질을 침전시키고, 침전물에 ether-ethanol(3:1, v/v) 적당량을 넣어 washing한 후 다시 같은 조건으로 원심분리하여 2회 이상 반복 washing을 실시하여 잔존하고 있는 헴화합물을 제거 하였다. 이렇게 얻어진 최종 침전물을 증류수에 다시 녹여 rotary evaporator를 이용하여 잔존하는 ether-ethanol을 휘발시킨후 globin용액을 얻었다. Globin 또한 혈장 단백질에서와 동일하게 전기영동을 실시, 분리된 band를 확인하였다.

## 2. 산 및 효소처리에 의한 단백질의 분해

### 가. 전(全)혈장 단백질의 산 가수분해

우선 혈장 단백질 전체와 각각의 혈장 단백질 분획을 효소에 의해 분해시키기 전에 산에 의한 가수분해를 실시하여 무작위로 분해되어 나오는 펩타이드 혼합물의 ACE 저해활성을 대조구로 참고하고자 하였다. 혈장 원액을 증류수로 2배 희석한 후 1N HCl을 이용하여 pH 2.0으로 맞추고 진공 오븐에서 150°C로 4시간 동안 가열하여 단백질을 가수분해하였다. 가수분해물은 증탕한 후 13,000rpm에서 5분간 원심분리하여 침전 단백질을 제거하고, 얻어진 상등액의 펩타이드 농도(mg protein/ml)를 bicinchoninic acid(BCA)법으로 측정함으로써 가수분해 정도를 판별하였다.

### 나. 효소반응 조건의 확립

전 혈장 단백질 및 앞 실험에서 분리된 IgG, albumin 및 globin 단백질 분획에 대하여 효소처리 및 반응조건 확립을 위한 실험을 실시하였다. 사용된 단백분해효소는 산업적으로 이용할 때 경제성을 가질 수 있는 산업용 효소들을 실험에 이용하였는데, 그 중 용해성이 낮고 효소역가도 떨어지는 Complex-2000을 제외한 Alcalase 및 Neutrase에 대하여 펩타이드 생산실험을 실시하였다. Alcalase와 Neutrase는 세계적인 효소생산회사인 Novo Nordisk사(Denmark)에서 생산해내는 대표적인 산업용 protease들로서 현재 국내 식품 산업, 사료 산업, 유가공 산업에서 가장 널리 이용되고 있는 제품들이다. 또한 이들 산업용 효소는 각각 미생물 기원의 serine protease 및 metallo protease계통이므로 동물유래의 trypsin 및 pepsin, 식물유래의 papain 등 각기 단백질을 분해하는 펩타이드 결합의 위치를 달리하는 단백질분해효소들에 대하여도 펩타이드 생산실험을 진행하였다.

기질용액으로는 전 혈장 단백질의 경우는 혈장 원액을 사용하였으며, 각각의 분리 단백질 분획의 경우는 건조분말 700 mg을 50mM PBS buffer(pH 7.4) 10 ml에

녹인 후 용해되지 않고 남은 성분들을 8,000rpm으로 20분간 원심분리하여 제거하고 얻어지는 상등액을 사용하였다. 이들 기질 용액의 단백질 농도를 측정하여 50 mg protein/ml로 일정하게 되도록 증류수로 각각 희석하였다. 기질용액 10 ml에 각 효소를 단백질 농도에 대하여 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 5%(w/w)의 농도로 각각 첨가하고 효소반응온도와 pH는 각각 Alcalase는 55°C, 7.5, Neutrase는 45°C, 6.2, pepsin과 trypsin은 37°C, 2.0 및 7.5, papain은 25°C, 6.2로 하여 매 1시간마다 시료를 채취하면서 8시간까지 반응시켰다. 효소를 처리한 반응액은 시간별로 시료를 채취한 후 증탕으로 가열하고 13,000rpm에서 5분간 원심분리하여 침전되는 미분해 단백질 성분을 제거하였다. 상등액의 펩타이드 농도를 BCA법으로 측정하여 효소반응정도를 비교하였다.

한편 단백질이 효소에 의해 분해되는 정도를 알기위한 방법으로 전기 영동을 실시하였다. 시간별로 채취한 시료 100 $\mu$ l를 전기영동용 2 $\times$  sample treatment buffer(0.125 M Tris-Cl, 4% SDS, 20% glycerol, 0.2M DTT, 0.02% bromophenol Blue, pH 6.8) 100 $\mu$ l와 잘 섞은 후 10%, 12.5%, 그리고 5-15% gradient polyacrylamide의 separating gel과 4% polyacrylamide의 stacking gel로 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기 영동 시작 후 1시간 동안 80 V를 유지하고, 이후 150 V로 전압을 상승하여 전개하였다.

### 3. 펩타이드의 분리 및 항고혈압 기능성 조사

#### 가. Gel permeation chromatography에 의한 펩타이드 분획의 분리

산 가수분해 및 여러 가지 단백분해효소들에 의하여 얻어진 가수분해물은 Sephadex G-25 gel permeation chromatography를 통해 분획을 나누었다. 가수분해물 시료를 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후 상등액 1 ml을 Sephadex G-25 column(2 $\times$ 60cm)에 loading하여 3차 증류수로 elution시켰다. 각 분획의 크기는 4.5 ml씩 하였으며 각 분획의 280nm에서의 UV 흡광도를 측정하여 단

백질 및 펩타이드가 분리되어 나온 chromatogram을 얻을 수 있었다.

#### 나. 단백질 가수분해물 및 펩타이드 분획에 대한 ACE 저해활성 조사

앞 실험에서 얻어진 전 혈장 단백질 및 각각의 분리된 albumin, IgG, globin의 가수분해물과 이들로부터 gel permeation chromatography 및 한외여과에 의해 분획하여 얻어진 펩타이드 분획들에 대하여 ACE 저해활성 조사를 실시하였다. ACE 저해활성의 측정은 Cheung 등의 방법(38)을 따라, ACE의 효소반응에 의해 hippuryl-L-histidyl-L-leucine(HHL) 펩타이드로부터 hippuric acid가 형성되는 정도가 첨가해주는 펩타이드 시료의 저해작용으로 감소되는 정도를 측정하되, 측정방법은 HPLC에 의한 측정법을 이용하였다. 즉 225 $\mu$ l의 기질용액(8.3mM HHL)에 25 $\mu$ l의 펩타이드 시료를 섞은 후 37°C에서 5분간 예열한 후 rabbit lung acetone powder로부터 추출한 ACE를 75 $\mu$ l 가하여 30분간 반응시키고 0.1% trifluoroacetic acid(TFA) 20 $\mu$ l를 가하여 반응을 정지시켰다. 생성된 hippuric acid의 HPLC에 의한 측정법은 일본 통산성 산하 공업기술원 생명공학공업기술연구소의 마루야마 스스무(丸山 進) 박사 실험실을 3주 동안 방문하여 당 실험실에서 사용하는 방법을 본 연구에 맞도록 약간 수정한 후 정립하였다(39). 즉 Novapak C8(3.9x150mm, Waters) column을 HPLC(LC-10A, Shimazu)에 연결하고 0.1% TFA 수용액을 1 ml/min의 유속으로 흘려주면서 acetonitrile을 linear gradient (0-70%/20min)로 걸어 주어 분리되어 나오는 펩타이드를 228 nm 흡광도로 측정하였다. hippuric acid를 나타내는 peak의 높이를 기준으로 50%의 저해활성을 나타내는 펩타이드 농도를 IC<sub>50</sub> 값(mg protein/ml)으로 결정하였다.

#### 4. 펩타이드의 항암 기능 조사

##### 가. 전(全)혈장 가수분해물의 항유전독성(antigenotoxicity) 측정

항고혈압 펩타이드 생산을 위해 실시한 가수분해 실험 조건에 의하여 얻어진 각 시료에 대하여 항유전독성을 조사함으로써 암예방 효과를 측정하였다. 항유전독

성을 측정하기 위한 방법으로는 Ames test법을 개량한 preincubation법(40)이 가장 보편적으로 이용되고 있으며 그 외에 SOS Chromotest법(41)을 사용하는 경우도 있다. 그러나 이 방법들은 모두 *Salmonella typhimurium* 혹은 *Escherichia coli* 등의 세균 균주를 이용하는 방법이기 때문에 동물세포에 대한 항유전독성을 측정함에 있어 미생물과 동물세포간의 유전적, 세포생물학적 특성이 다르다는 점을 감안할 때 부정확한 결과를 낼 소지가 많은 것이 사실이다. 본 연구에서의 항유전독성 측정은 직접 동물세포에서의 DNA의 변성정도를 조사하여 항암물질의 항유전독성 및 항돌연변이원성(antimutagenicity)를 알아냄으로써 항암제 소재의 스크리닝에 사용되고 있는 Comet assay를 이용하였다. Comet assay는 손상된 DNA 분자가 전기영동 상에서 손상으로 인해 생긴 가닥절편(strand break)들에 의해 혜성(comet)과 같은 모양으로 이동되는 특성을 이용하는 방법으로 single cell micro-gel electrophoresis (SCGE) 법이라고도 하는데, DNA 분자들로부터 형성된 comet image에 대한 tail length와 tail moment의 통계치로부터 손상정도를 측정하게 된다(42-44). Comet assay의 원리를 항유전독성 물질 탐색에 응용할 경우를 예로 들어 설명하면 다음과 같다. 실험순서는 DNA 손상유도물질(변이원)과 손상억제 추정물질의 세포처리, 세포의 도말(embedding), 세포 단백질 및 세포막의 용해, DNA의 unwinding, 전기영동 및 염색과 측정으로 이어진다. 변이원에 의해 손상을 입은 DNA는 알칼리 조건하에서 nucleotide간의 diester결합의 붕괴에 의해 단편을 형성하며 phosphate기를 노출시키게 된다. 이로 인한 음전하성에 의해 전기영동 상에서 DNA 단편들은 양극쪽으로 이동하게 되는데, 이때 DNA 단편의 크기가 작을수록 이동거리는 길어지게 되고 단편이 많을수록 이동상에서 단편들의 농도는 높아진다. 결국 손상을 입은 세포의 핵 모양은 형광 염색시 마치 혜성(comet)과 같은 형태가 되며 손상을 입지 않은 경우에는 세포가 위치하는 그 자리에서 이동없이 완전한 원형의 핵체를 유지하게 된다. 따라서 유전독성을 갖는 변이원들에 의해 손상을 입은 DNA 핵체의 손상정도는 핵으로부터 뺏어나간 꼬리의 길이, 즉 DNA 단편들의 이

동정도로써 측정되는 것이다. 앞에서 언급한 바와 같이 이 방법은 포유동물세포의 DNA 손상현상을 직접 관찰하여 발암의 initiation 여부를 쉽게 판단할 수 있기 때문에 이 방법에 의해 검색된 물질은 동물실험(in vivo)의 결과 일치할 확률이 높다.

#### 나. Comet assay

##### 1) Cell line

본 연구에서는 in vitro에서 normal cell line인 Chinese hamster ovary cell 을 이용하여 MNNG (N-methyl-N-nitro-nitrosoguanidine) 처리구를 positive control로 하여 펩타이드 시료를 첨가해 주었을 때의 DNA 손상도 억제정도를 기준으로 하는 antigenotoxicity를 조사하였다. 계대배양에서 confluent에 이른 normal cell을 배지를 버리고 PBS buffer로 깨끗이 씻어내었다. 여기에 0.4%의 trypsin이 함유된 0.02% EDTA용액으로 처리한 후 37°C incubator에 2분간 놓아두었다. 이어서 신속하게 배지를 첨가하여 trypsin에 의한 세포막의 파괴를 정지시킨 후 500xg에서 5분간 원심분리하고 상층액은 버리고 serum free media로 재현탁시켜 세포농도가  $2 \times 10^6$  cell/ml이 되도록 trypan blue exclusion 방법에 의해 농도를 조정하여 주었다. 이렇게 하여 분리된 세포는 6 well microtiter plate에  $2 \times 10^6$  cell/ml의 농도로 분주시키고 항암기능을 조사하고자 하는 단백질 가수분해물과 MNNG를 배지에 첨가한 후 이것을 배양처리구로 사용하였다. 15분이 지난 후에 세포를 회수하여 SCGE assay를 통하여 DNA의 손상정도를 조사하였다.

##### 2) Pre-coated agarose slide의 준비

Fully-frosted slide glass(Objekttträger, OT)의 서리가 되어 있는 면에 0.5% normal melting point agarose(NMA) 용액 35  $\mu$ l를 precoating한 후에 화염건조시키고, 다시 75  $\mu$ l의 0.5% NMA 용액을 cover glass를 이용하여 균일하게 깎 후 ice bath위에서 5 분간 방치하여 gel을 형성하였다. 이와 같이 만들어진 pre-coated agarose slide는 humidified slide box에 넣어 실험전까지 4°C에 보관하였다.

##### 3) Lysis 및 전기영동

Agarose가 깔려있는 slide glass에  $2 \times 10^5$  cells/OT의 농도로 세포를 주입시킨 후 lysis용액(2.5M NaCl, 100mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 10mM Tris base, 1% Na-lauroylsarcosinate, pH 10.0, 사용 직전에 10%의 DMSO와 1% Triton X-100 첨가)에 1시간동안 담가 놓아 세포벽과 핵주변에 있는 단백질을 용해시켰다. 그런 다음에 OT를 전기영동장치안에서 알칼리 용액에 20분간 방치하여 DNA의 두가닥의 구조가 전기영동에 민감하도록 한가닥의 구조로 풀리게 한 후 전기영동을 실시하였다(25V, 300mA, 20min). 전기영동후 OT를 neutralized buffer를 가지고 씻어주고 ethidium bromide용액으로 staining하여 cover glass를 덮고 4°C에서 하룻밤을 보관하였다.

#### 4) Comet image analysis 및 결과 분석

염색된 slide는 fluorescence microscope( $\times 250$ )으로 관찰하면서 CCD video camera를 통해서 전송된 이미지를 Comet II image analysis system이 장착된 computer상에서 image를 분석하였고, DNA 손상정도는 slide당 101개의 핵체들을 측정하였다. DNA 손상정도를 정량화하는 기준에는 tail length, percentage DNA in tail, tail moment와 tail inertia 등이 있으나, 본 연구에서는 tail length와 tail moment로서 DNA 손상정도를 수치화하였다.

#### 다. 항유전독성 효과의 기작 연구

이와 같은 항유전독성 효과가 발암원인 MNNG에 펩타이드가 결합하여 세포 내 DNA가 손상되는 것을 근본적으로 보호하는 것인지 또는 펩타이드가 세포 또는 핵체와의 상호작용을 일으켜 발암원에 대한 손상이 억제되는 것인지에 대하여 그 기작을 밝혀보기 위한 실험을 진행하였다. 즉 15분간의 반응전에 발암원인 MNNG와 가수분해물 시료를 혼합하여 15분동안 pre-incubation시킨 실험구와 가수분해물만으로 pre-incubation한 후 MNNG를 반응시키는 실험구, 그리고 MNNG로 pre-incubation한 후 가수분해물로 반응시키는 실험구를 비교하였다.



### 제3절 결과 및 고찰

#### 1. 혈액 단백질의 분리

##### 가. 혈장 단백질의 분리

Albumin과 IgG의 분리를 위해 Cohn의 cold ethanol 침전법을 이용하되 반복 실험에 의해 조건을 수정하여 분리방법을 확립하였다. 즉 cold ethanol의 %분획별 (15, 20, 25, 30, 40, 50, 55, 60%) 침전물에 대해 전기영동을 이용하여 분리하고자 하는 각 단백질의 band를 확인한 결과 분자량 66,000의 albumin(BSA) band중 가장 진하고 뚜렷하게 나타난 cold ethanol 60% 분획을 조건으로 하였다(그림 생략). 그리고 분자량 150,000의 IgG는 전기영동 시료 처리시에 첨가되는 mercaptoethanol과 SDS에 의해 두개의 heavy chain과 두개의 light chain으로 분리되어 band상 albumin아래 두개의 band로 나타났다. 이 또한 가장 진하고, 뚜렷하게 나타난 cold ethanol 25% 분획을 조건으로 하였다.

최종적으로 확립된 분리방법은 다음과 같다. 분리된 혈장을 얼음수조에 넣어 냉각하고, cold ethanol을 전체부피의 7.4%(v/v)가 되도록 첨가하여 반응시킨후 10,000rpm에서 20분간 원심분리하여 fibrinogen과 antihemophilic factor등을 제거하였다. 얻어진 상등액에 총 25%(v/v)가 되도록 cold ethanol을 첨가한후 같은 조건으로 원심분리하여 나오는 침전물, 즉 IgG를 증류수로 용해하여 얻었다. 또한 이때의 상등액에 총 60%(v/v)가 되도록 cold ethanol을 더 첨가하고, 같은 조건으로 원심분리하여 얻은 침전물, 즉 albumin을 증류수로 용해하여 얻을 수 있었다. 얻어진 albumin과 IgG를 확인하기 위해 실시한 전기영동 결과는 그림 11과 같다. Cold ethanol 침전법에 의해 단백질을 분리할 경우 albumin 분획에 비해 IgG 분획의 순도가 다소 떨어짐을 알 수 있었으나, 두 단백질 분획 모두 항고혈압 펩타이드 생산을 위한 분획으로서 높은 순도로 분리된 것으로 판단되었다.

##### 나. 글로빈의 분리

확립된 글로빈의 분리방법은 다음과 같다. 혈액을 원심분리하여 얻어진 침전층(혈구)에 같은 부피의 증류수를 첨가하여 용혈(hemolysis)시킨 다음, 용혈용액 부피의 1/4량의 chloroform을 첨가하여 stroma가 포함되어 있는 chloroform층을 제거하였다. Stroma를 제거한 후, heme을 제거하기 위해서 2%의 ascorbic acid-용액을 시료의 2배부피를 넣어 hemoglobin이 choleglobin으로 변화도록 해준 다음 1% HCl이 포함된 acetone을 시료의 4배 부피만큼 천천히 혼합한 후 5분간 격하게 stirring하고 냉장실에서 magnetic stirrer로 교반시키면서 overnight 방치해 두었다. 그 결과 헴화합물이 제거되고 단백질은 침전되었다. 원심분리(3,000rpm/15분)를 실시하여 단백질을 침전시키고, 침전물에 ether-ethanol(3:1, v/v) 적당량을 넣어 washing한 후 다시 같은 조건으로 원심분리하여 2회 이상 반복 washing을 실시하여 잔존하고 있는 헴화합물을 제거 하였다. 이렇게 얻어진 최종 침전물을 증류수에 다시 녹여 rotary evaporator를 이용하여 잔존하는 ether-ethanol을 휘발시킨후 globin용액을 얻었다. Globin의 분리를 확인하기 위해 실시한 전기영동 결과는 그림 12과 같다.

이상과 같이 분획별 구성 단백질의 함유량이 월등하게 목적하는 단백질들로 이루어진 것이 전기영동상에서 나타났기 때문에(그림 11, 12), 이들 분획을 가수분해하여 얻어지는 펩타이드 분획의 주공급원으로 역할할 수 있고 따라서 특정 펩타이드의 가능성이 확인될 경우 단백질 분획별로 펩타이드를 생산하여야 그 펩타이드의 생산성이 높아질 수 있다고 판단되어 단백질의 분리과정은 적절한 것으로 결론지었다. 이상의 결과로부터 혈액으로부터 단백질의 분리 방법 그림 13과 같이 최종확립하였다.

## 2. 산 및 효소처리에 의한 단백질의 분해

### 가. 효소처리 조건의 확립

#### 1) 전혈장 단백질에 대한 각 효소의 분해활성

실험에 이용한 6가지 효소를 혈장 원액에 처리하여 각 효소의 반응조건에

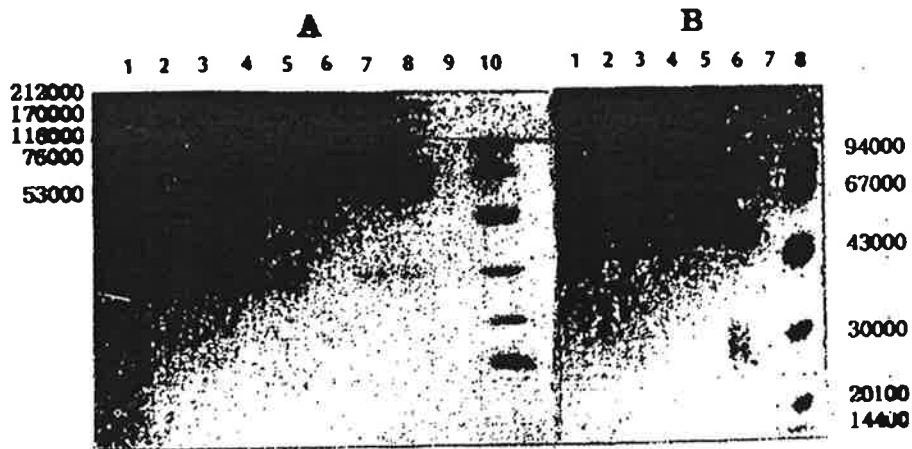


Figure 11. SDS-PAGE of IgG and albumin fraction separated from bovine blood. (A; 5-15% gradient polyacrylamide, B; 10% polyacrylamide) Lane A-1 and B-8; high molecular weight standard, lane A-3; IgG standard, lane A-4, 5 and B-4, 5; IgG fraction(25% CEF), lane A-6; BSA standard, lane A-7, 8 and B-6, 7; albumin fraction(60% CEF), lane B-3; IgG and BSA standard, lane A-10 and B-1; low molecular weight standard.



Figure 12. SDS-PAGE of globin separated from bovine blood.  
Lane 1; high molecular weight standard, lane 2 and 3; globin fraction, lane 4  
BSA standard.

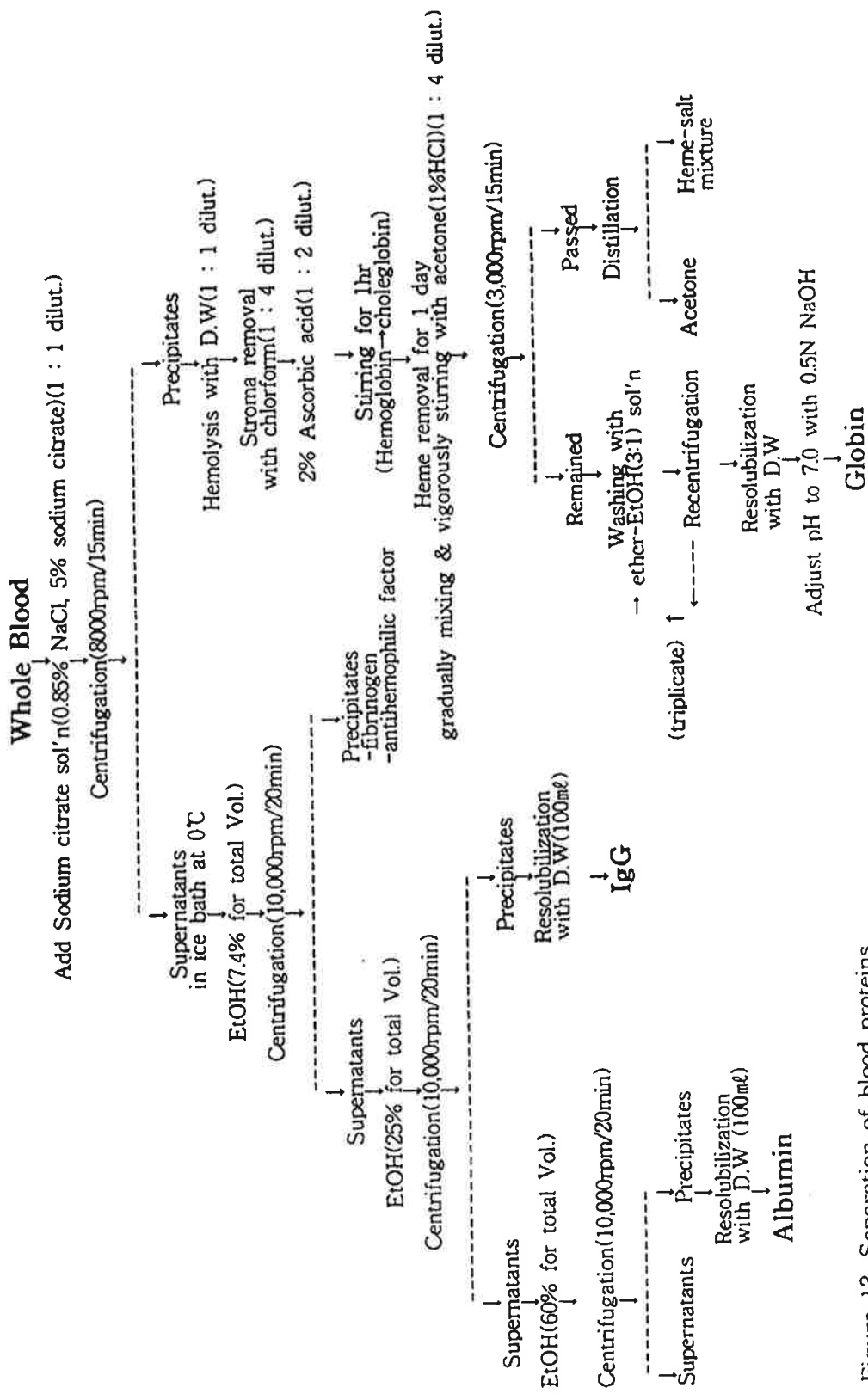


Figure 13. Separation of blood proteins

따라 혈장 단백질 전체를 가수분해하였을 때 생성되는 펩타이드 용액(가열처리, 원심분리 후의 상등액)의 농도를 측정한 결과 Alcalase > Neutrase > Complex-2000 > papain > pepsin의 순서로 펩타이드 생성이 많았으며 trypsin은 거의 분해작용을 나타내지 않았는데 이는 혈장에 포함되어 있는 각종 trypsin inhibitor에 의해 저해작용이 있었기 때문으로 판단되었다. 이러한 결과에 따라 Alcalase와 Neutrase에 대한 혈장 단백질 분해 패턴을 확인하기 위하여 전기영동을 실시하였다(그림 14). Lane 4와 5는 각각 혈장에 Alcalase를 2%(w/w)의 농도로 처리하여 1시간 및 2시간 동안 반응시킨 가수분해물로서 1시간만에 상당량의 혈장 단백질이 분해되고 2시간째는 반응이 더욱 진행되는 상태를 보여주었다. 생성되는 저분자량의 펩타이드들은 전개선 아래로 빠져나간 것으로 판단되었다. Lane 6은 Neutrase(2%, w/w)의 경우는 혈장 단백질들이 Alcalase에 비해 양호하게 분해가 이루어졌으나 저분자량의 펩타이드 분획보다는 주로 분자량 10,000 정도의 polypeptide 분획을 다량생산하는데 그치고 있는 것으로 확인되었다.

## 2) 각 분리 단백질에 대한 효소의 분해활성

60% cold ethanol fraction(CEF)으로 분리한 albumin 분획을 Neutrase, Complex-2000 및 Alcalase로 10, 30, 60, 90, 120분 동안 분해시킨 가수분해물을 전기영동하였다(그림 15). Neutrase의 경우 2시간 동안 상당히 완만한 분해속도를 나타내었으며, Complex-2000의 경우는 분자량 45,000과 14,000대의 band가 일단 형성되었다가 점차 느리게 다시 분해되는 패턴을 보여주었다. Alcalase의 분해패턴도 Complex-2000과 유사하였으나 분자량 10,000 정도의 저분자량 polypeptide가 생성되었다가 비교적 빠르게 다시 분해되는 것을 확인할 수 있었다. 25% CEF에서 분리된 IgG 분획은 앞의 세 효소에 의해 유사한 분해속도와 분해패턴을 보이며 분해되었다(그림 16). Globin 분획의 경우는 분리된 단백질 건조분말이 낮은 pH에서만 완전히 용해되는 특성이 있었기 때문에 3차 증류수에 녹여 pH 2로 맞춘 후 pepsin을 처리하여 분해패턴을 살펴보았다. 분자량 14,000대의 비교적 저분자량인 globin도

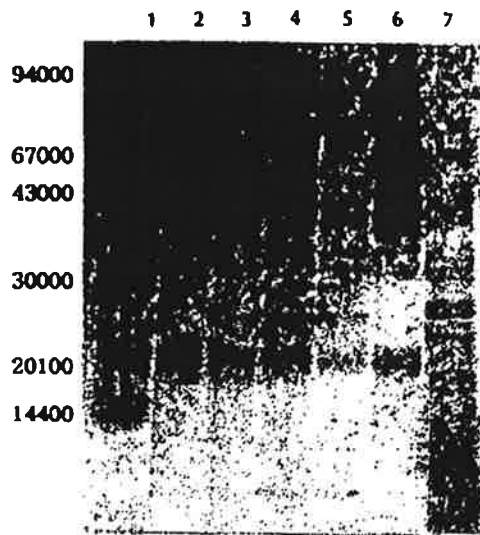


Figure 14. SDS-PAGE of bovine plasma proteins hydrolyzed by Alcalase and Neutrased.

Lane 1; Low molecular weight standard, lane 2; bovine plasma proteins, lane 3; bovine plasma proteins with Alcalase(0 h), lane 4 and 5; plasma proteins hydrolyzed by Alcalase for 1 and 2 h, respectively, lane 6; bovine plasma proteins with Neutrased(0 h), lane 7; plasma proteins hydrolyzed by Neutrased for 2 h.

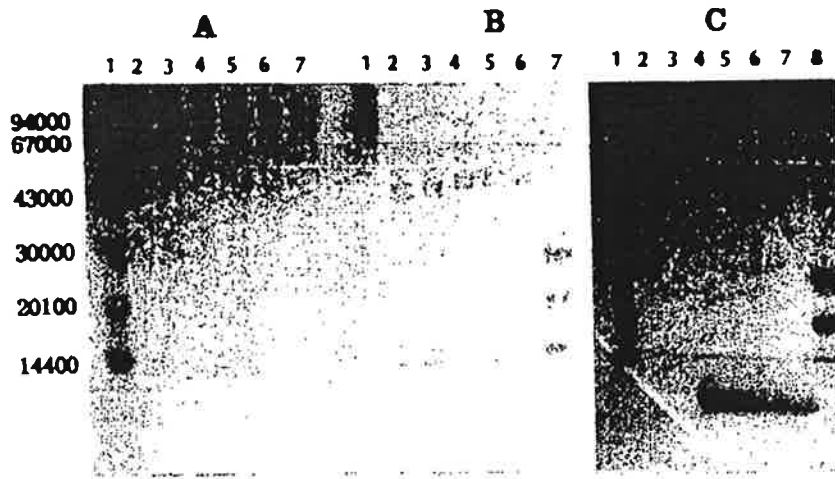


Figure 15. SDS-PAGE of albumin fraction separated from bovine plasma and hydrolyzed by Neutrase, Complex-2000 and Alcalase.

Lane A-1, B-1 and C-1; low molecular weight standard, lane A-2, 3, 4, 5, 6 and 7; albumin fraction hydrolyzed by Neutrase for 0, 10, 30, 60, 90 and 120min, respectively, lane B-2, 3, 4, 5, 6 and 7; albumin fraction hydrolyzed by Complex-2000 for 0, 10, 30, 60, 90 and 120min, respectively, lane C-2, 3, 4, 5, 6 and 7; albumin fraction hydrolyzed by Alcalase for 0, 10, 30, 60, 90 and 120min, respectively, lane C-8 molecular weight standard.



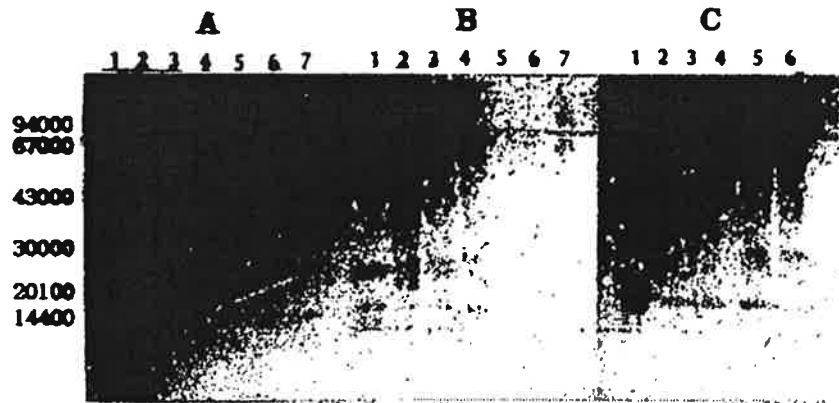


Figure 16. SDS-PAGE of IgG fraction separated from bovine plasma and hydrolyzed by Neutrase, Complex-2000 and Alcalase.

Lane A-1, B-1 and C-1; low molecular weight standard, lane A-2, 3, 4, 5, 6 and 7; albumin fraction hydrolyzed by Neutrase for 0, 10, 30, 60, 90 and 120min, respectively, lane B-2, 3, 4, 5, 6 and 7; albumin fraction hydrolyzed by Complex-2000 for 0, 10, 30, 60, 90 and 120min, respectively, lane C-2, 5 and 6; albumin fraction hydrolyzed by Alcalase for 0, 90 and 120min, respectively, lane C-3 and 4; blank.

pepsin에 의해 작은 polypeptide로 분해된 후 점차 분해가 진행됨을 보여주었다(그림 17).

### 3. 펩타이드의 분리 및 항고혈압 기능성 조사

#### 가. Gel permeation chromatography 및 한외여과에 의한 펩타이드 분획의 분리

우선 전체 혈장에 대하여 산 가수분해 및 여러 가지 단백분해효소들에 의하여 얻어진 단백분해물을 Sephadex G-25 gel permeation chromatography를 통해 7 분획을 나눈 결과, 산 가수분해에 의해 얻은 가수분해물의 chromatogram은 가수분해가 진행되면서 생성되는 펩타이드들이 peak를 나타내지 않고 분자량에 따라 연속적으로 elution되어 나오는 경향을 보였다(실험결과 생략). 각 효소의 처리에 의해 얻은 단백분해물들의 chromatogram을 앞부분의 분획에서 나오는 큰 분자량의 단백질 또는 polypeptide로 추정되는 분획이 반응이 진행되면서 작아지고 뒷부분의 비교적 작은 분자량의 펩타이드 분획으로 옮겨가는 경향을 공통적으로 보여주었다(그림 18).

#### 나. 전 혈장 단백질 가수분해물에 대한 ACE 저해활성 조사

우선 분획으로 나누기 이전의 각 가수분해물에 대하여 ACE 저해활성 조사를 실시하였다. 활성측정에서 가장 오차가 발생하기 쉬운 것으로 알려진 생성 hippuric acid의 정량을 보다 정확하고 신뢰성 있도록 하기 위하여 HPLC 측정법으로 실시하기로 하고 일본 공업기술원 생명공학공업기술연구소의 마루야마 스스무(丸山 進) 박사 실험실에서 사용하는 방법을 본 연구에 맞도록 수정한 후 정립한 결과 그림 19와 같은 HPLC chromatogram을 통해 정확한 정량이 가능하게 되었다.

전 혈장 단백질 전체에 대한 산 및 각 효소에 의한 가수분해물을 얻어 각각의 저해활성을 비교한 결과, Alcalase가 낮은 효소농도에서 짧은 시간동안 가장 효과적으로 ACE 저해 펩타이드를 생산하는 것으로 나타났다(표 8). Alcalase가 전혈장을 분해하는 경우의  $IC_{50}$ 값은 2.7 mg/ml이었다. Trypsin의 경우는 혈장을 전혀 가수분

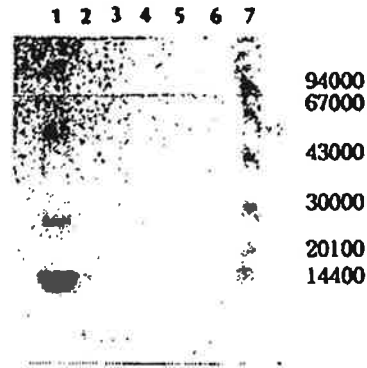


Figure 17. SDS-PAGE of globin fraction separated from bovine plasma and hydrolyzed by pepsin.

Lane 1, 2, 3, 4, 5 and 6; globin fraction hydrolyzed for 0, 10, 30, 60, 90 and 120min, respectively, lane 7; low molecular weight standard.

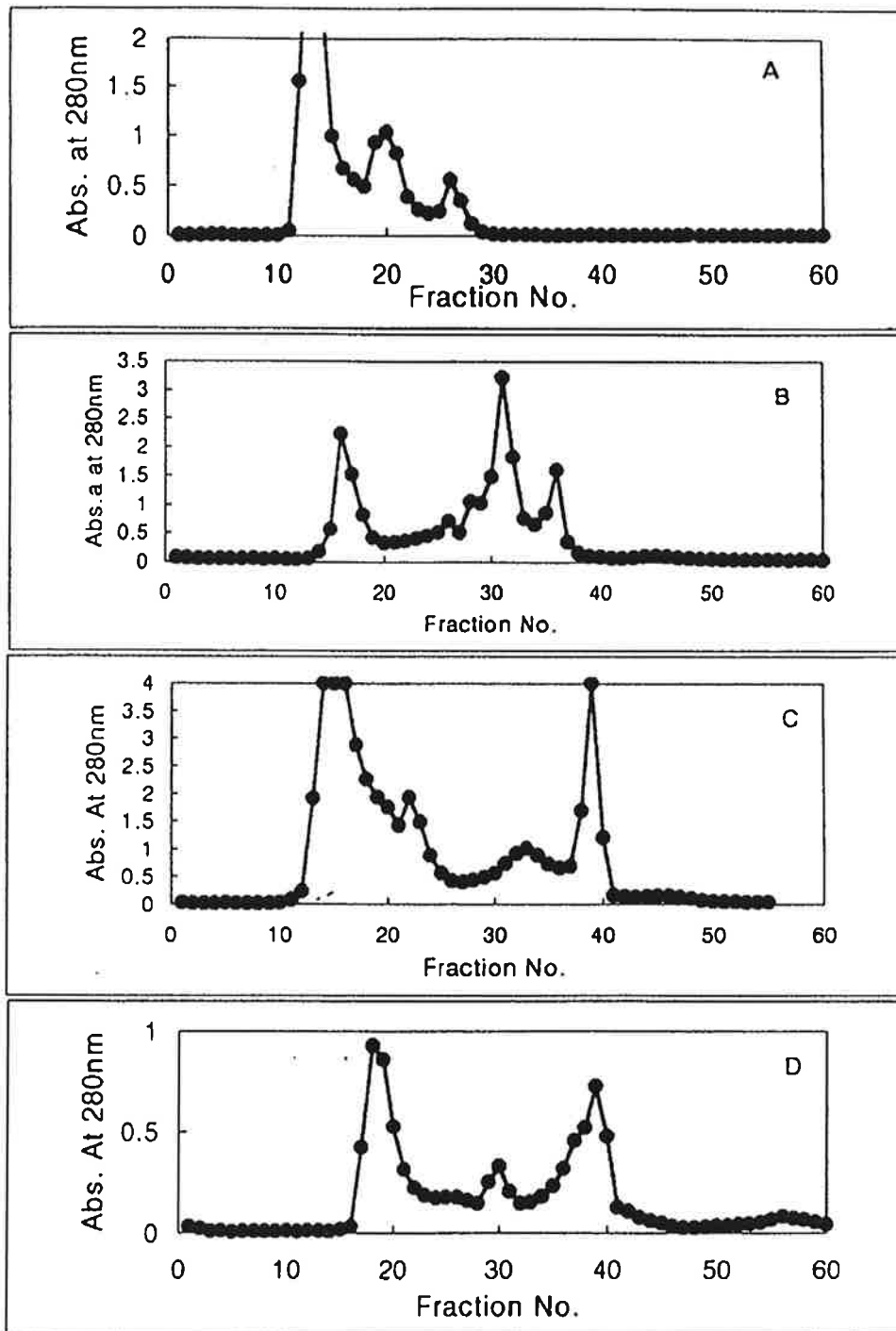


Figure 18. Sephadex G-25 gel permeation chromatograms of bovine plasma (A) and its hydrolysate prepared by hydrolyzed by Alcalase(1%, 1 h) (B), Neutrase(5%, 2 h) (C), and the Alcalase(0.05%, 12 h) hydrolysate of albumin (D).

COLUMN: Nova-pak c8  
MOBILE PHASE: 100% WATER (0.1% TFA) , ACETONITRILE (0.1% TFA)  
FLOW: 1ml/min  
DETECTOR: SPD-10A (228nm)

\*\*\* Chromatogram \*\*\*

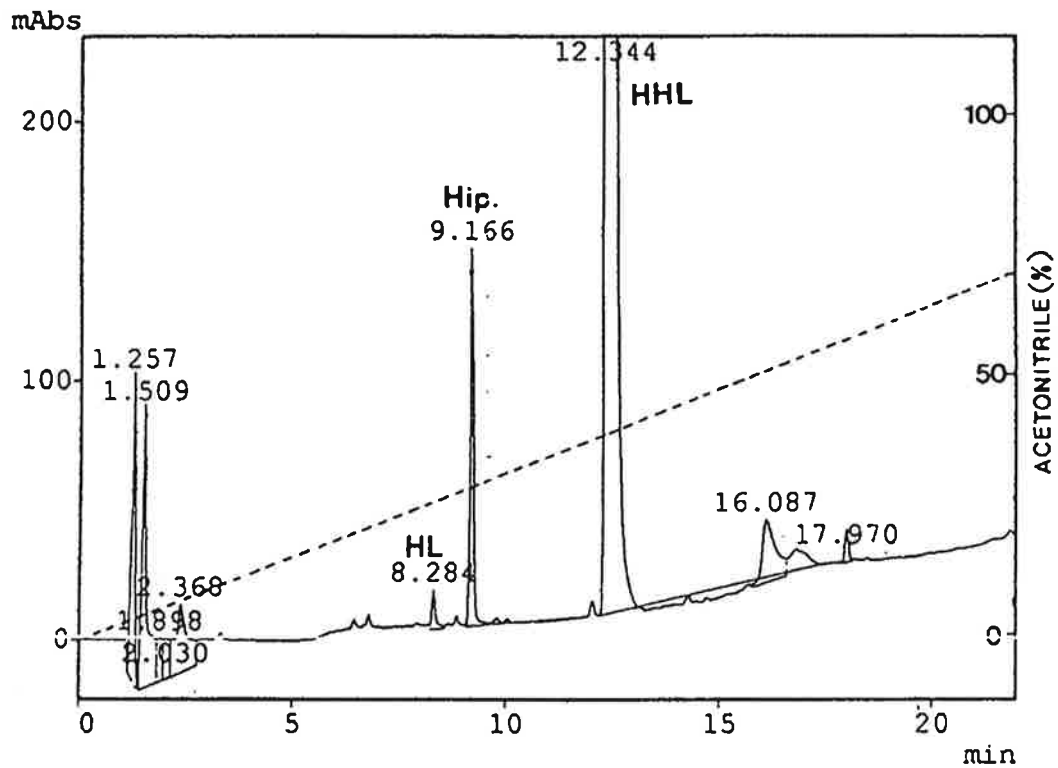


Figure 19. RP-HPLC chromatogram for assays of ACE inhibitory activity.

Table 8. ACE inhibitory activities of the proteolytic hydrolysates of blood plasma proteins prepared under various conditions

Hydrolysates	IC <sub>50</sub> values (mg protein/ml)
Acid hydrolysate	44.2
Alcalase hydrolysate (0.1% Alcalase, 1 h hydrolysis)	2.7
Neutrase hydrolysate (1.0% Neutrase, 1 h hydrolysis)	7.3
Tryptic hydrolysate	-
Peptic hydrolysate (0.25% pepsin, 8 h hydrolysis)	18.9
Papain hydrolysate (2.0% papain, 8 h hydrolysis)	23.5

해하지 못하였는데 이것은 혈장 중에 존재하는 trypsin inhibitor에 의한 저해작용 때문인 것으로 판단되었다.

다. Albumin, globulins, globin에 대한 가수분해물의 ACE 저해효과

전혈장에 대한 가수분해는 Alcalase에 의해 실시한 경우가 가장 효율적이긴 하였으나 생체내에서 흡수된 펩타이드가 trypsin 등의 효소작용으로 추가분해되어 ACE 저해활성을 잃게될 가능성이 있다. 또한 미생물 유래의 효소에 의해 생산된 펩타이드들은 식품 allergy를 유발할 가능성도 있을 것으로 판단되었다. 따라서 혈액으로부터 분리해 낸 albumin, globulins, globin 등 주요 단백질 분획에 대하여 가수분해물을 얻되, 전혈장에 대하여 가장 활성이 높은 가수분해물을 생산한 Alcalase와 전혈장에 대해서 가수분해를 일으키지 못했던 trypsin을 이용하여 가수분해하였다. 그 결과 albumin의 Alcalase 가수분해물이 가장 높은 활성을 나타내었다(표 9).

Albumin의 trypsin 가수분해물에 대하여 trypsin 농도별 및 반응시간별 ACE 저해활성을 그림 20에 정리하였다. 한편 이 가수분해물을 G-25 column chromatography에 의해 분획하여 얻어진 3 분획에 대하여 ACE 저해활성을 측정한 결과 그 중 가장 높은 활성의 분획은 가장 저분자량 분획인 세 번째 분획으로서 그 IC<sub>50</sub>값이 0.03 mg/ml으로 매우 높은 활성을 나타냄으로써 고효성의 펩타이드 분획을 용이하게 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

Table 9. ACE inhibitory activity of proteolytic hydrolysates of albumin, globulins, and globin

Samples	IC <sub>50</sub> values (mg protein/ml)
Tryptic hydrolysate of albumin	0.9
globulins	8.1
globin	15.3
Alcalase hydrolysate of albumin	0.5
globulins	7.1
globin	13.7

위와 같이 도축 폐혈액의 혈장 단백질을 이용하여 ACE 저해 펩타이드를 생산한 결과 혈장으로부터 분리해낸 albumin을 Alcalase로 분해하였을 때 IC<sub>50</sub>값이 0.5 mg/ml 인 고효성의 펩타이드 혼합물을 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 이는 타 연구 자들에 의해 발표된 각종 식품 단백질로부터의 가수분해물과 유사한 수준의 활성(1 mg/ml 이하)으로서 폐혈액 혈장 단백질의 이용 가능성이 높음을 보여주는 것이었다. 또한 이 가수분해물을 적절한 분사량 범위의 한외여파막을 이용한 1회의 한외여파만으로도 IC<sub>50</sub>값 0.1 mg/ml 이하의 고효성 펩타이드 분획을 쉽게 얻어낼 수 있음이 확인되었으므로 산업적인 생산에도 매우 유리하고 실용화 가능성이 높음을 알 수 있었다.

#### 4. 펩타이드의 항암 기능 조사

##### 가. 전(全)혈장 가수분해물의 항유전독성(antigenotoxicity) 측정

전혈장 가수분해물에 대한 항유전독성을 조사한 결과 pepsin과 Alcalase에 의해 얻어진 가수분해물이 활성을 나타내었다. Neutralse에 의한 가수분해물의 활성은 상대적으로 매우 낮았다. 표 10에 나타난 바와 같이 pepsin 가수분해물의 경우에는

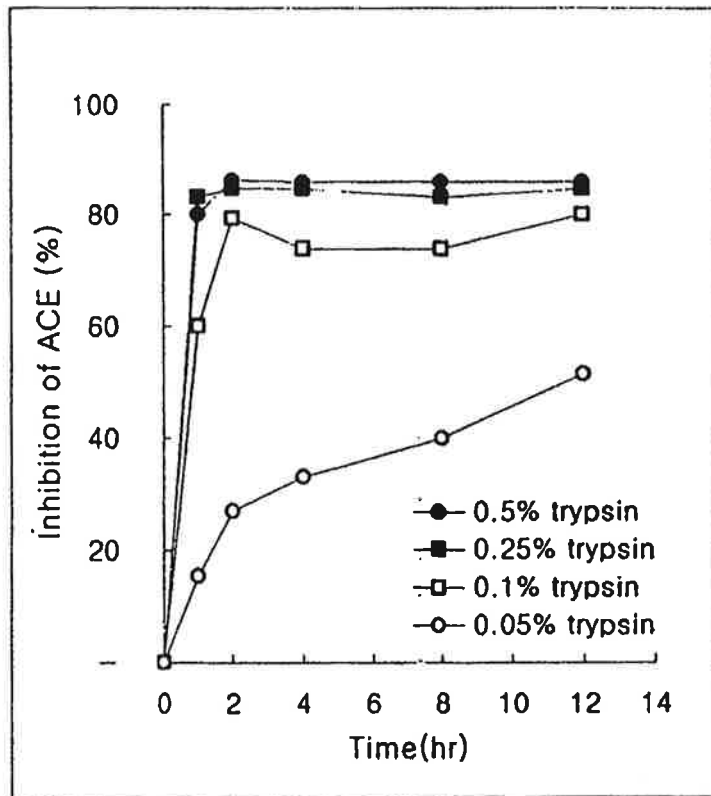


Figure 20. Effects of proteolysis time on ACE inhibitory activity of tryptic hydrolysate of albumin as a function of trypsin concentration



10 mg/ml의 농도에서부터 DNA 손상을 억제(tail length가 positive control에 비하여 감소)하기 시작하여 농도가 높아질수록 손상억제 효과가 증가되었다.

Table 10. Reduction of the Comet tail length and moment by peptide hydrolysate of bovine plasma proteins with increasing peptide concentration

Samples	Tail length	Tail moment	Relative damage index (RDI)
Positive control	56.2	10.9	1.00
Negative control	25.3	1.5	
Peptic hydrolysate of			
50 mg/ml	46.5	4.8	0.13
25 mg/ml	49.9	6.2	0.57
10 mg/ml	54.5	9.8	0.90
5 mg/ml	57.2	10.1	0.93
1 mg/ml	56.8	10.0	0.92

$$* RDI = \frac{\text{Tail moment with sample}}{\text{Tail moment of positive control}}$$

특히 Alcalase 가수분해물은 DNA 손상방지효과를 위한 최소한의 농도가 1 mg/ml 이하로서 상당히 높은 활성을 나타내었다(표 11). 50 mg/ml 이상의 농도에서는 전혀 손상을 입히지 않는 negative control의 tail length에 근사한 값을 보여주어 거의 완전한 DNA 손상방지 효과를 나타내었다.

나. Albumin, globulins, globin에 대한 가수분해물의 항유전독성(antigenotoxicity) 측정

혈액으로부터 분리해 낸 albumin, globulins, globin 분획에 대해, 전혈장에 대하여 활성이 높은 가수분해물을 생산한 Alcalase 및 pepsin과 전혈장에 대해서는 가수분해를 일으키지 못했던 trypsin을 이용하여 가수분해하였다. 그 결과 albumin의 Alcalase 가수분해물이 가장 높은 활성을 나타내었다(표 12). 특히 이 가수분해물은 5 mg/ml의 낮은 농도에서 50%의 항유전독성을 나타냈으며 10 mg/ml 부터는 거의

완전한 손상방지효과를 보여주었다.

Table 11. Reduction of the comet tail length and moment by Alcalase hydrolysate of bovine plasma proteins with increasing peptide concentration

Samples	Tail length	Tail moment	Relative damage index (RDI)
Positive control	84.0	22.3	1.00
Negative control	21.9	0.7	
Alcalase hydrolysate			
80 mg/ml	23.3	1.3	0.06
50 mg/ml	26.5	1.4	0.06
25 mg/ml	40.6	2.5	0.11
10 mg/ml	62.6	6.5	0.29
5 mg/ml	68.0	8.9	0.40
1 mg/ml	83.2	15.3	0.68

$$* \text{RDI} = \frac{\text{Tail moment with sample}}{\text{Tail moment of positive control}}$$

Table 12. Reduction of the comet tail length and moment by Alcalase hydrolysate of bovine albumin with increasing peptide concentration

Samples	Tail length	Tail moment	Relative damage index (RDI)
Positive control	95.6	26.8	1.00
Negative control	31.2	2.1	
Alcalase hydrolysate			
18 mg/ml	34.8	2.6	0.10
10 mg/ml	50.1	3.5	0.13
5 mg/ml	71.1	13.1	0.49
2 mg/ml	85.2	19.6	0.73
1 mg/ml	87.2	22.3	0.83

$$* \text{RDI} = \frac{\text{Tail moment with sample}}{\text{Tail moment of positive control}}$$

다. 항유전독성 효과의 기작 연구

이와 같은 항유전독성 효과가 발암원인 MNNG에 펩타이드가 결합하여 세포 내 DNA가 손상되는 것을 근본적으로 보호하는 것인지 또는 펩타이드가 세포 또는 핵체와의 상호작용을 일으켜 발암원에 대한 손상이 억제되는 것인지에 대하여 그 기작을 밝혀보기 위한 실험을 진행하였다. 즉 15분간의 반응전에 발암원인 MNNG와 가수분해물 시료를 혼합하여 15분동안 pre-incubation시킨 실험구와 가수분해물만으로 pre-incubation한 후 MNNG를 반응시키는 실험구, 그리고 MNNG로 pre-incubation한 후 가수분해물로 반응시키는 실험구를 비교하였다(표 13). 그 결과

Table 13. Effects of Alcalase hydrolysate of bovine plasma proteins on the prevention of DNA damage<sup>a</sup>

Samples		Tail length	Tail moment	RDI <sup>d</sup>
Pre-incubation	Incubation			
HBSS <sup>bc</sup>	HBSS	29.7	1.92	
MNNG	HBSS	69.1	19.9	1.00
HBSS	MNNG	80.9	20.3	1.00
MNNG+Hydrolysate (25 mg/ml)	HBSS	69.2	14.9	0.74
MNNG+Hydrolysate (50 mg/ml)	HBSS	67.4	12.5	0.62
Hydrolysate (25 mg/ml)	MNNG	59.7	11.2	0.56
Hydrolysate (50 mg/ml)	MNNG	59.2	9.7	0.48
MNNG	Hydrolysate (25 mg/ml)	67.6	12.4	0.62

<sup>a</sup> Positive control; Pre-incubation with MNNG / Incubation with HBSS,  
or Pre-incubation with HBSS / Incubation with MNNG

<sup>b</sup> Negative control; Pre-incubation with HBSS / Incubation with HBSS

<sup>c</sup> HBSS; Hank's Balanced Salt Solution  
(PBS(10mM, pH7.4)+HEPES(20mM)+KCl(0.4%, w/v)+glucose(1%, w/v))

<sup>d</sup> Relative damage index =  $\frac{\text{Tail moment with sample}}{\text{Tail moment of positive control}}$

세포를 우선 가수분해물과 pre-incubation한 후 MNNG를 처리한 경우가 가장 손상이 적은 것으로 나타나, 가수분해물 중의 펩타이드는 세포 또는 핵체와의 상호작용을 통하여 MNNG의 손상을 막고 있다는 것을 추정할 수 있었다.

위와 같이 도축 폐혈액의 혈장 단백질로부터 고효성의 항유전독성 펩타이드를 얻을 수 있음이 확인되었다. 최근 된장, 간장 등의 식품 단백질로부터 항암 펩타이드에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으나 발암물질에 대한 암예방 효과를 나타내는 항유전독성 펩타이드에 대한 연구는 거의 없다. 본 연구에서는 특히 폐혈액으로부터 간단하게 분리해낸 albumin 분획에 대하여 산업용 효소인 Alcalase를 처리하여 얻어진 가수분해물이 가장 높은 활성의 펩타이드 혼합물을 제공함을 확인함으로써, 폐혈액 단백질로부터 고부가가치의 암예방 기능성 펩타이드를 산업적으로 생산할 수 있는 실용화 가능성을 보여준 것이었다.

# 여 백

## 제 4 장 Nitrite를 부분대체할 수 있는 육가공품 발색제의 개발

# 여 백

## 제1절 서 설

nitrite/nitrate는 오래전부터 육가공에 있어 발색제와 미생물 증식 억제제를 위해 사용되어 왔다. 육색을 결정하는 myoglobin과 hemoglobin은 색이 불안정하기 때문에 nitrite/nitrate의 높은 독성에도 불구하고 전 세계적으로 그 사용이 허용되어 있으나 그 사용량은 규제하고 있으며 몇몇 선진국에서는 nitrite의 단독사용을 금하고 nitrite를 NaCl에 녹여 그 NaCl을 첨가 사용하도록 규정하고 있다(19). 특히 nitrite/nitrate는 강력한 발암물질인 nitrosamine의 전구체로서, 염지중에 생성된 amine류와 nitrite가 분해되어 생성된 NO기가 기름에 튀기는 가열과정중에 결합하여 nitrosoamine이 생성된다(20). 최근에는 채소류에 다량 함유되어 있는 nitrate가 절임중에 nitrite로 환원되고 다시 발효중에 생성되거나 첨가된 amine류와 결합하여 nitrosoamine을 생성한다는 연구결과까지 보고되고 있다(21). 이와 같이 유해한 nitrite/nitrate의 육가공에서의 첨가는 우리나라의 경우 육가공 산업의 발전에 가장 큰 장애 요인이 되고 있으나 아직도 이를 대체할만한 대체물질이 발견되지 않고 있다. 따라서 많은 나라에서 nitrite/nitrate의 첨가를 줄이고자 하는 연구가 꾸준히 계속되어 왔으나(22) 성과가 나오지 않는 상태이다. 그런데 nitrite의 발색효과를 최대한 높이기 위하여 가공 공정에서 myoglobin농도가 높은 상태에서 nitrite를 첨가하여 NO-myoglobin의 결합을 최대화하여 육제품의 색택을 안정화시키는 것이 육의 세절시 가장 중요한 기술중의 하나이다(2). 이러한 기술상황하에 본 연구에서 제시하고자 하는 새로운 가축혈액 응용기술은, myoglobin의 구조가 hemoglobin과 유사하므로 NO-hemoglobin의 결합을 미리 생성시켜 nitrite 대신 첨가함으로써 육제품의 발색효과는 최대화되고 nitrite 사용량을 줄이는 효과를 얻을 수 있다는 것이다. 따라서 nitrite의 첨가 수준을 발색이 문제되지 않는 한계까지 낮추어서 미생물 오염에 대한 위험부담을 고려하면서 우리나라의 육제품을 소비하는 독특한 식문화(외국과는 달리 대부분 육제품을 기름에 튀겨서 소비)로 인해 발생하는 튀김조리에 의한



nitrosamine 생성의 유해를 줄일 수 있는 가능성을 조사하였다.

## 제2절 재료 및 방법

### 1. Nitrite의 첨가량에 따른 발색도 조사

경북 포항시 소재 (주)명신산업 도축장으로부터 도축 즉시 위생적으로 채취한 소 혈액 3L에 40% trisodium citrate용액 48ml를 첨가하여 잘 혼합함으로써 혈액의 응고를 억제시킨 상태의 혈액시료를 얻었다. 혈액시료는 6000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액인 혈장을 조심스럽게 따라냄으로써 침전된 혈구부분을 분리해 내었다. 혈구 시료는 500ml씩 따로 포장한 후  $-50^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 실험에 사용하였다. 발색도는 colour difference meter(CR-300, Minolta Camera Co., Japan)로 a값(redness)을 읽어 측정하였으며 한 실험구에 대하여 triplicate로 하여 시료당 6회 반복 측정한 결과를 평균내어 발색도로 결정하였다.

#### 가. Nitrite의 첨가에 따른 발색도

혈구 시료에 ascorbic acid를 100ppm 첨가한 후 nitrite를 각각 3, 12, 21, 30, 50, 100, 200ppm 되게 첨가하여  $80^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 가열처리하였다. 열처리된 시료를 냉각한 후 발색도를 측정하였다.

#### 나. Ascorbic acid의 첨가에 의한 발색도의 안정화

우선 첨가된 nitrite가 NO-hemoglobin의 결합율을 높이기 위해서는 hemoglobin의 발색이 안정화되어야 하기 때문에 ascorbic acid의 첨가실험을 실시하였다. Ascorbic acid를 0, 50, 100, 500ppm의 농도로 첨가하여 발색도가 증가하는지 여부를 측정하였다.

### 2. Nitrite혼합 발색제의 육제품 첨가시 발색효과

앞에서 제조한 nitrite혼합 발색제의 발색효과를 조사하기 위하여 실제 육제품의 제조 실험을 실시하였다.

#### 가. 육제품의 제조

육제품의 제조는 일반적인 방법에 의하여 실시하며 유화형 타입의 소세지를 제조하여 원료의 silent cutter 에서 아래 처리구에 따라 혼합하였다. 원료의 혼합은 지방을 제거한 적육을 10 kg, 돈지방 3 kg, 그리고 얼음 2 kg을 혼합하여 육제품을 제조하였고 복합향신료 (Hagesud, Germany)를 원료육에 대하여 0.5% 첨가하였다. 발색제의 생산은 앞서의 실험과 동일하게 제조하였으며 100 ml의 혈구용액에 nitrite를 첨가하되 소세지 처리구별로 3, 12, 21, 30 ppm이 되도록 하였다. 혼합이 silent cutter에서 끝나면 충전기에서 충진을 실시하고 충전은 fibrous casingΦ 60mm(Walsrode, Germany)으로 하여 육제품의 중심온도가 75℃/30min되도록 가열한 다음 냉각한 후 그 발색상태를 colour different meter로 조사하였다.

#### 나. 처리구에 따른 육제품의 저장

앞에서 생산된 육제품의 동일한 시료를 4℃에서 저장하며 횡단면을 잘라 색도의 변화를 조사하였다.

### 제3절 결과 및 고찰

#### 1. Nitrite의 첨가량에 따른 발색도 조사

##### 가. Nitrite의 첨가에 따른 발색도

혈구 시료에 ascorbic acid를 100ppm 첨가한 후 nitrite를 각각 3, 12, 21, 30, 50, 100, 200ppm 되게 첨가하여 80℃에서 20분간 가열처리하고 열처리된 시료를 냉각한 후 발색도를 측정된 결과, nitrite 첨가에 따라 발색도가 점차 증가하였다(표 14).

Table 14. Effect of the addition of nitrate on the coloring of hemoglobin

Added nitrite (ppm)	a value (redness) of color difference meter
3	10.4
12	13.48
21	16.42
30	18.09
50	21.22
100	25.34
200	25.81

나. Ascorbic acid의 첨가에 의한 발색도의 안정화

우선 첨가된 nitrite가 NO-hemoglobin의 결합율을 높이기 위해서는 hemoglobin의 발색이 안정화되어야 하기 때문에 ascorbic acid의 첨가실험을 실시하였다. Ascorbic acid를 0, 50, 100, 500ppm의 농도로 첨가실험을 실시한 결과, ascorbic acid의 첨가량이 많을수록 발색도가 증가하였으며 100ppm이상에서는 첨가량에 따라 크게 증가하지 않고 최고 수준의 발색도를 유지하였다 (표 15).

Table 15. Effect of the addition of ascorbic acid on the stability of coloring of hemoglobin

Added ascorbic acid (ppm)	a value (redness) of color difference meter
0	13.44
50	15.24
100	21.04
500	22.02

2. Nitrite혼합 발색제의 육제품 첨가시 발색효과

가. Nitrite혼합 발색제 첨가에 따른 육제품 발색효과

육제품을 직접 제조하고 앞서 실험한 발색제를 첨가하여 육제품에서의 발색

효과를 조사하였다. 소세지 제조과정에서 처리구별로 nitrite를 3, 12, 21, 30 ppm이 되도록 첨가하여 가열처리 및 냉각 후 그 발색상태를 colour different meter로 조사한 결과 이와 같이 낮은 nitrite 첨가량으로도 육제품의 발색이 가능함을 확인할 수 있었다(표 16). 표에서 볼 수 있는 바와 같이 nitrite의 첨가 목적은 적색(redness)을 띄게 하기 위함이므로 a 값을 비교할 때 혈구성분과 함께 12 ppm의 nitrite를 첨가할 때 최대 적색도를 나타내었다. 따라서 이러한 낮은 nitrite 수준은 소세지 제조에 활용이 가능하며 일반적으로 육제품의 제조에 70-100 ppm의 nitrite가 첨가되고 있음을 감안할 때 그의 1/5 - 1/8 수준으로서 nitrite 첨가 대체효과가 큰 것으로 사료되었다.

Table 16. Effect of the addition of nitrite on the coloring of sausage by hemoglobin-NO colorant

Added nitrite (ppm)	a value (redness) of color difference meter
3	8.04
12	10.50
21	9.88
30	10.22

#### 나. 육제품의 저장에 따른 색도의 변화

발색제를 첨가한 소세지 제품을 진공포장하여 냉장 보관 후 7일이 경과하였을 때 색도의 변화를 다시 측정하였다(표 17). 표에서 나타난 바와 같이 색도는 제조 직후의 값으로부터 큰 변화를 보이지 않았다. 즉 제조 직후와 같이 nitrite 12 ppm에서 높은 a 값을 나타내었으며 30 ppm 첨가구에서는 a 값이 11.24로서 상당히 높게 유지되었다. 이러한 색도의 변화는 제조 직후 가열처리에 의하여 산소가 탈리되었으나 진공포장 후 미량의 산소가 유입되면서 산화반응에 의하여 색도의 변화가 발생된 것으로 보여졌다. 따라서 적색도를 기준으로 하여 볼 때 대체로 12 ppm의

nitrite 첨가효과가 가장 적합한 조건임을 확인할 수 있었다.

Table 17. Effect of the addition of nitrite on the color change of sausage colored by hemoglobin-NO colorant during refrigerated 7-days storage

Added nitrite (ppm)	a value (redness) of color difference meter
3	8.03
12	11.07
21	10.66
30	11.24

## 참 고 문 헌

# 여 백

## 참 고 문 헌

1. 미트저널 98년 4월호, 미트저널사, p.162-164 (1998)
2. 박형기 외 11명, 식육의 과학과 이용, 선진출판사, p.278-292 (1994)
3. Ockerman, H.W. and C.L. Hansen, Animal By-Product Processing, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. p.233-255 (1988)
4. 食品と開發, Vol 26, No. 4, 食品工業新聞社, p.35-36 (1991)
5. 千葉英雄, 吉川正明, 化學と生物, 29(7), 454-458 (1991)
6. Wilson, B. W., Process Ind. Aust., Proc. Natl. Chem. Eng. Conf., 2nd, 431-438 (1974)
7. Wilson, B.W. and J.R. Yates, Australian patent 492,555 (1978)
8. Drepper, G. and K. Drepper, Fleischwirtschaft, 59(9), 1252-1258 (1979)
9. Hald-Christensen, V., J. Adler-Nissen and H.S. Olsen, U.S. patent 4,262,022 (1979)
10. Delaitre, J. M., D. Lorient and C. Bourgeois, Sci. Aliments, 4, 245-250 (1984)
11. Univ. Iowa - Research Foundation, US patent 4,600,531 (1986)
12. Toyo-Soda, Japan patent 3,267,298 (1988)
13. Dive, D., J.M. Piot, F. Sannier, D. Guillochon, P. Charet and S. Lutrat, Enzyme Microb. Technol., 11(3), 165-169 (1989)
14. 송인상, 이신호, 강동삼, 송계원, 한국축산학회지, 26(3), 303-309 (1984)
15. 전기홍 외, 한국축산식품학회 제17차 학술발표회 초록집, p.27 (1996)
16. Park, E.H., M.S. Won, H.Y. Lee and K.B. Song, Biotech. techniques, 10(7), 479-480 (1996)
17. 食品と開發, Vol 30, No. 8, 食品工業新聞社, p.31-35 (1995)
18. 吉川正明, バイオサイエンスとインダストリー, Vol. 52, No. 4, 289-292 (1994)



19. 신현길, 한국식육연구회 10차 연구발표회 (1987)
20. 박종흠, 건국대학교 대학원 축산가공학과 석사학위 논문 (1993)
21. 박진영, 최홍식, 한국식품영양학회지, 21, 109-116 (1992)
22. Leistner, L., H. Hechelmann and F.K. Lucke, Mitteilungsblatt, BAFF, p.4591-4596 (1981)
23. Knapp, F.W., R.H. Schmidt, W.J. Mauldin and E.M. Ahmed, J. Food Protect. 41, 257-258 (1978)
24. Halasz, A., F. Mietsch, J. Feher, I. Szalma, E. Greskovits, I. Farkas, L. Fal and I. Illes, PCT Int. Appl. WO 8,403,202 (1984)
25. Tybor, P.T., C.W. Dill and W.A. Landmann, J. Food Sci., 40, 155-159 (1975)
26. Fuller, R., J. Appl. Bacteriol., 66, 365-378 (1989)
27. Hong, S.S., W.J. Kim, S.K. Cha and B.H. Lee, J. Microbiol. Biotechnol., 6, 128-131 (1996)
28. Kim, H.S., Cul. Dairy Prod. J., Aug., 6-9 (1988)
29. Technical insights, Inc., Biomarkets, Technical insights, Inc., Fort Lee. p.141-146 (1994)
30. Brennan, M., B. Wanismail and B. Ray, J. Food Prot., 46, 887-892 (1983)
31. Kim, T.H., Bioindustry News, 7, 28-35 (1994)
32. Stampf, G., M. Jelinek-Nikolics, A. Nagykaladi, M. Raskai and Z. Tobel, Acta Pharm. Hung., 56, 3-7 (1986)
33. Tsvetkov, T. and R. Brankova, Cryobiology, 20, 318-323 (1983)
34. de Valdez G.F., G.S. de Giori, H.A.P. de Ruiz and G. Oliver, Cryobiology, 20, 560-566 (1983)
35. de Valdez G.F., G.S. de Giori, H.A.P. de Ruiz and G. Oliver, Appl. Environ. Microbiol., 50, 1339-1341 (1985)

36. Yoon, S.S., H.O. Lee and J.H. Yu, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 421-426 (1986)
37. Cohn, E.J., L.E. Strong, W.L. Jr. Hughes, D.J. Mulford, J.N. Ashworth, M. Melin and H.L. Taylor, *Am Chem. Soc.* 68, 459-475 (1946)
38. Cheung, H.S. and D.W. Cushman, *Biochim. Biophys. Acta*, 293, 451-463 (1973)
39. Maruyama, M. and H. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1393-1394 (1982)
40. Maron, D.M. and B.N. Ames, *Mutation Res.*, 113, 173 (1983)
41. Quillardet, P. and M. Hofnung, *Mutation Res.*, 147, 65 (1985)
42. Pool-Zobel, B.L., B. Bertram, M. Knoll, R. Lambertz and C. Neudecker, *Nutr. Cancer.*, 20, 271 (1993)
43. Östling, O. and K.J. Johanson, *Int. J. Radiat. Bio.*, 52(5), 683 (1987)
44. Östling, O. and K.J. Johanson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123, 291 (1984)