최 종
연구보고서

계란 가공부산물인
난각막과 알끈의 유효 이용기술 개발

Development of Effective Utilization Technology
for Hen Egg Processing Byproducts,
Egg Shell Membrane and Chalaza

연세대학교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “계란 가공부산물인 난각막과 알끈의 유효 이용기술 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002. 11. 29.

주관연구기관명 : 연세대학교
총괄연구책임자 : 황 재 관
연 구 원 : 최 문 정
연 구 원 : 최 은 미
연 구 원 : 심 재 석
연 구 원 : 이 선 희
연 구 원 : 김 미 옥
연 구 원 : 박 경 민
연 구 원 : 이 혜 림
연 구 원 : 임 태 수
협동연구기관명 : 뉴트리산업
협동연구책임자 : 김 성 일
연 구 원 : 정 희 철

요 약 문

Ⅰ. 제 목

계란 가공부산물인 난각막과 알끈의 유효 이용기술 개발에 관한 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 계란을 가공하는 과정에는 난각이외에 난각막(egg shell membrane)과 알끈(chalaza)이 생산된다. 이들은 각각 단백질, 펩타이드, 올리고당 등 매우 유용한 생리활성 성분을 다량 함유하고 있으나 국내에서는 이들의 활용에 대한 체계적인 연구가 거의 이루어진 바 없다.

○ 식품 가공부산물을 재활용할 때 최종 제품의 부가가치가 낮은 경우에는 재활용 공정의 자체비용 때문에 실질적으로 재활용화되는 예가 많지 않다. 그러나 난각막과 알끈의 경우에는 고기능의 펩타이드와 시알릴올리고당(sialyl-oligosaccharides)이 다량 포함되어 있어, 재활용에 따른 공정비용을 감안하더라도 최종 제품의 부가가치가 훨씬 높기 때문에 기능성 소재화를 위한 세부적인 연구는 매우 가치가 있다. 특히, 이러한 재활용 연구가 성공적으로 이루어질 경우 계란 생산 및 가공농가의 상품 경쟁력을 제고시키고, 경영여건을 개선하는데 크게 기여할 것으로 기대된다.

○ 계란가공산업의 경쟁력을 제고하기 위해서는 고기능성의 다양한 제품을 생산하는 것과 더불어 가공과정중에 발생하는 부산물로부터 고부가가치의 기능성 소재를 개발하여야 한다. 난각막과 알끈을 단순부산물로 처리하는 경우 건조비용과 폐기에 따른 부대비용이 발생하지만, 이를 이용하여 식품 및 생물소재를 개발하면 매우 높은 경제적 이익을 제공할 수 있다.

○ 따라서 본 연구에서는 계란 가공부산물인 난각막과 알끈으로부터 기능성 단백질 소재 및 sialyloligo saccharides를 분리정제하는 기술을 개발하여 산업화하는 것을 목적으로 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 난각막 및 알끈의 물리화학적 전처리 공정개발

가. 알칼리 처리에 의한 단백질 수용화의 최적화
- 공정변수 : NaOH 농도, 처리시간, 처리온도
- Target parameter : 수용성 단백질의 수율
- 최적화 : 반응표면법(RSM)

나. 현장 생산공정별 난각막 및 알끈의 생산
- 분쇄, 세척, 압착 등 단위공정별 수율

2. 난각막 및 알끈 유래 단백질의 특성연구

가. 기능성 : 유화성, 용해도 등 식품활성

나. 수분친화성 : 보습성(moisturizing function)

다. 물성 : 분자량(GPC), 고유점도 등

3. 생산 단백질에 대한 Protease의 가수분해 활성

가. 시판 단백질 분해효소(protease)의 활성연구
- 기질 : 난각막 및 알끈 단백질

나. 수용화를 위한 최적 protease 선정
- 기준 : 활성, 안정성, 적용성, 경제성 등

4. 난각막 펩타이드의 최적 생산공정 개발

가. 최적생산공정(NaOH 처리)
- 처리조건 확립
- 한외여과(UF)를 이용한 분자량 분획 기술 개발

나. 생산 펩타이드의 특성연구
- 수율, 분자량(GPC), 고유점도 등

다. 난각막 펩타이드의 유효성분 및 분자구조 확인
- 아미노산 조성 : 필수아미노산

5. 알끈의 시알릴올리고당 최적생산공정

가. 최적 가수분해 처리 공정개발

나. 생산 올리고당의 분석 및 특성연구
- 수율, 분자량(GPC), 고유점도 등

다. 유효성분 검색
- Sialyloligosaccharides & sialic acid 정량

- 품질관리인자를 활용을 위한 정량법 확립

6. 난각막 및 알끈 생리활성 성분의 대량 생산기술

가. 알끈 시알릴올리고당의 분리정제기술 및 scale-up 연구

- 알끈 분해 최적 protease 시스템 선정
- Recycled-HPLC를 이용한 대량 분획기술
- 분획별 성분 분석: 시알릴산, 구성당 등

나. 난각막 펩타이드의 분자량 분획기술 scale-up 연구

- 한외여과법(UF)에 의한 분자량별 수거기술
- 분획별 아미노산 조성 및 분포도
- 분획별 분자량 및 분포도

Ⅳ. 연구개발 결과

제 1 절. 난각막 및 알끈의 유효성분 생산공정 및 기능성 연구

난각막과 알끈의 알카리 및 효소처리에 의한 수용화 현상과 생산된 단백질의 물리화학적 특성을 연구하였다. 알카리 처리는 NaOH 농도 0.1-2N, 에탄올 40-80%, 교반시간 6-18시간의 조건에서 가수분해하여 수용화 수율을 측정하였다. 난각막에 대한 알카리 처리의 경우 수용화 수율이 처리 조건에 따라 24.9%-73.6%를 나타내었다. 이 때 NaOH 농도 1.25N, 에탄올 70%, 교반시간 12시간에서 가장 높은 73.6%의 수율을 보였다. 일반적으로 NaOH 농도와 교반시간이 증가할수록 수율이 증가하였으나, off-flavor의 발생도 함께 증가하므로 이를 고려한 최적 공정의 선정이 필요하다. 반면에 알끈의 경우에는 0.1N NaOH 용액으로 2시간 정도 가열하였을 때 완전히 수용화 하는 현상을 보였다. 난각막은 상업적으로 판매하고 있는 단백질 가수분해효소(proteases)를 가했을 때 매우 낮은 수용화 수율을 나타내었다. 따라서 앞으로 보다 효율적인 난각막 가수분해 효소 시스템의 개발이 요구된다. 수용화된 난각막 및 알끈 단백질의 용해도는 93-98%로서 대부분 수용화 되었다. 분자량은 NaOH의 농도가 증가할수록 감소하는 현상을 보였다.

제 2 절. 계란 알끈을 이용한 시알릴올리고당의 생산기술에 관한 연구

시알릴올리고당(Sialyloligosaccharides)은 면역활성화 기능, 항바이러스, 항균, 항암제 등의 다양한 식품 기능성 및 생물활성을 보유하고 있어 현재 산업적으로 광범위하게 사용되고 있다.

본 연구에서 알끈의 단백질을 상업용 단백질 가수분해 효소로 가수분해함으로써 시알릴올리고당을 효율적으로 생산하는 공정을 개발하고자 하였다. 알끈은 6개의 상업용 단백질 가수분해효소 즉, Alcalase, Collupulin, Protamex, Flavourzyme, Maxazyme, Neutrase를 이용하여 가수분해 한 결과 가수분해 수율(hydrolysis yield)은 각각 98.9%, 81.4%, 68.9%, 45.0%, 35.9%, 35.6%로, 효소의 specific activity는 Alcalase 2.24 unit/㎍, Collupulin 0.58 unit/㎍, Protamax 0.24 unit/㎍, Flavourzyme 0.93 unit/㎍, Maxazyme 0.51 unit/㎍, Neutrase 0.35 unit/㎍로 결정되었다. 따라서 본 연구에서 알끈의 가수분해 수율과 효소 활성을 종합적으로 고려하여 Alcalase를 최적 효소로 선정하였다.

알끈에 대하여 Alcalase를 처리한 결과 sialyloligosaccahride에 peptide가 상당부분 결합된 sialylglycopeptide가 생산되었다. 따라서 peptide를 제거하기 위하여

상업용 peptide 가수분해 효소인 Kojizyme, Peptidase, Protease K를 적용하였다. 그 결과 효소의 활성과 산업적인 응용성을 고려할 때 Kojizyme가 sialylglycopeptide로부터 peptide 잔기를 제거하는데 가장 바람직한 것으로 나타났다.

Alcalase와 Kojizyme을 병행처리하여 제조된 sialyloligosacchride를 Recycle Prep HPLC로 분획한 결과 두 개의 뚜렷하게 구별되는 peak를 발견할 수 있었다. 한 peak는 sialic acid 28.8%, hexose 27.9%, hexosamine 43.3%로 구성되어 있으며, 다른 한 peak는 sialic aicd 1.9%, hexose 42.6%, hexosamine 55%로 구성되어 있었다. 즉, Recycled HPLC에 의해 sialic acid의 함량이 보다 증가된 sialyloligosaccharides 분획으로 농축할 수 있었다.

본 연구는 알끈에 대해 상업적으로 쉽게 구할 수 있는 protease와 peptide의 복합적 처리 공정에 의해 기능성 식품생물소재인 sialyloligosacchrides를 효율적으로 제조할 수 있음을 보여주었다. 이러한 공정은 앞으로 알끈로부터 sialyloligosacchrides를 산업적 대규모 공정으로 생산하는데 기초자료로서 활용될 것으로 기대된다.

제 3 절. 효소 가수분해 계란 알끈 펩타이드의 혈전용해활성

본 연구에서는 계란 알끈(chalaza)을 단백질 가수분해 효소로 처리하여 제조한 알끈 펩타이드의 혈전용해활성을 규명함으로써 새로운 식품 유래 펩타이드 소재로서의 가능성을 제시하고자 하였다. 기존의 혈전용해제의 대부분은 fibrinolytic enzyme으로써 인체내 존재하는 여러 효소들에 의해 가수분해 됨으로써 정작 인체내에서는 활성을 나타내지 못 할 수 있으며, 고분자 화합물이기 때문에 생체 allogenic reaction을 야기시킬 가능성이 높다. 따라서 보다 안정하며, 인체내 흡수면에서도 뛰어난 펩타이드 제제로의 개발은 중요한 의미를 갖는다. 따라서 본 실험에서는 혈전용해활성 알끈 펩타이드의 분리·정제 및 특성 규명을 통해 새로운 혈전용해제로의 가능성을 제시하고자 하였다.

단단한 구조의 불용성 알끈을 수용화하기 위하여 Alcalase, Collupulin, Flavourzyme, Kojizyme, Maxazyme, Neutrase, Protamex, Pescalase의 8종의 상업용 단백질 가수분해효소로 처리한 결과 Protamex 및 Collupulin의 가수분해율이 비교적 우수하였다. 특히 Protamex의 처리가 가수분해율 및 혈전용해 활성에도 가장 유리한 조건임을 확인할 수 있었으나 보다 우수한 가수분해 조건 및 활성 증가 조건을 탐색하기 위해 복합효소 처리를 시도했다. 그 중 Protamex 및 Kojizyme의 복합효소로 처리한 경우 가수분해율이 70.2%로 Protamex 단독 처리시 보다 13% 가량 상승하였으며, 혈전용해 활성도 Protamex 단독 처리시의

2.9%보다 약 3.3배 증가한 9.5%의 활성을 나타내었다.

혈전용해활성의 알끈 펩타이드는 ultrafiltration을 이용하여 500~10,000 사이의 분자량 범위에서 1차적으로 분획한 다음, prep-HPLC를 이용하여 혈전용해활성을 나타내는 알끈 펩타이드를 분리하였다. MALDI mass를 이용하여 분자량을 측정한 결과 5,713 Da으로 확인되었으며, 아미노산 분석 결과 glycine의 함량이 매우 높은편이며, 그 외 serine, alanine, aspartic acid, lysine 순으로 높게 나타났다. 혈전용해활성 알끈 펩타이드(10 ㎎/㎖)는 인체내 혈전용해 물질인 plasmin (1.0 unit/㎖)과 비교하여 111.3%의 혈전용해활성을 나타내었으며, fibrinogen 용해활성도 110.3%로 유사한 결과를 나타내었다. 혈전용해활성 알끈 펩타이드의 fibrinogen degradation pattern 조사 결과 α-chain은 5분만에 완전히 분해되었고, β-chain은 1시간내에 거의 분해된 것을 확인할 수 있었다. 반면 γ-chain은 12시간 이상 반응시켜도 안정하게 존재함을 확인할 수 있었다. 혈전 내 혈전용해 기작의 간접적인 규명을 위해 혈전용해 효소인 plasmin의 전구체인 plasminogen 유무에 따른 혈전용해활성을 측정해본 결과 plasminogen free한 fibrin plate에서보다 plasminogen rich fibrin plate에서의 혈전용해 활성이 우수한 것으로 보아 알끈 펩타이드의 혈전용해 활성은 plasminogen을 경유하는 plasminogen activator로의 기작을 예상할 수 있었다. 알끈으로부터 분리한 fibrinolytic peptide는 기존의 혈전용해제와 유사한 활성을 보임과 동시에 인체 내 흡수성 및 안정성을 고려할 때 기존의 혈전용해 효소들에 비해 그 이용성 면에서 우수할 것으로 예상된다.

Ⅴ. 연구개발 결과의 활용계획

○ 개발된 관련기술을 기술이전하여 난각막 단백질, 난각막 펩타이드, 올리고당 등 각종 기능성 소재의 산업적 생산기반을 구축함.

○ 개발된 기능성 소재의 산업적 활용도와 파급효과를 높이기 위하여 산업적 활용성 연구를 지속적으로 추진하므로써, 개발된 생산기술과 소재가 사장되지 않도록 산업체에 대한 기술지도를 지속적으로 추진함.

○ 생산소재의 고순도화와 고기능화를 효율적으로 추진할 수 있는 산학연 공동연구시스템을 구축하며, 필요할 경우 활성물질에 대한 임상연구를 수행할 수 있는 프로그램을 도출함.

○ 개발된 관련기술 가운데 지적 재산권의 확보가 필요한 핵심기술을 선별하여 국내외 기술 및 용도 특허를 획득함.

○ 본 과제의 수행을 통하여 얻어진 난각막 및 알끈으로부터 생리활성 물질을 추출하는 기술의 산업적 적용.

○ 난각막 및 알끈의 생리활성 물질을 포함하는 제품 개발.

S U M M A R Y

I. Title

Development of using effective technical of shell membrane and chalaza by processing production of hen egg

II. Objectives and Significance

Egg shell membrance and chalaza, occurring as major byproducts of hen egg processing, is being scarcely utilized although they contains large amount of physiologically useful components. The objectives of this research is (1) to develop the separation and purification technology of proteins, peptides and sialyloligosaccharides from egg shell membrane and chalaza, (2) to investigate their physicochemical and physiological properties, and (3) to conduct the scale-up studies for industrial applications and manufacturing optimization. This research can contribute to manufacturing value-added products from egg processing wastes.

III. Contents and Scope of Research

1. Physicochemical processing technology of egg shell membrance and chalaza
   a. Processing variables : NaOH concentration, treatment time, treatment temperature
   b. Target parameters : yield of soluble proteins and peptides
   c. Optimization : response surface methodology(RSM)

2. Properties of proteins from egg shell membrance and chalaza
   a. Functions : emulsification, solubility
   b. Water holding capacity
   c. Physical properties : molecular weight, intrinsic viscosity
   d. Amino acid composition of peptide

3. Production of sialyloligosaccharides from chalaza
   a. Optimum protease treatment conditions
   b. Chemical analysis and properties
   c. Processing yield

4. Large scale production of physiological substances from chalaza
   a. Selection of optimum proteases
   b. Large scale separation by Recycling Prep HPLC
   c. Compositional analysis : sialic acid, sugars
   d. Fibrinolytic acitivity of chalaza peptides

IV. Results of Research

Section 1. Production and Function of Egg Shell Membrane and Chalaza Proteins

The egg shell membrane and chalaza in hen eggs were solubilized by either alkaline or protease treatments, and the soluble proteins were studied in terms of yield, solubility, molecular weights, emulsifications, etc. The alkaline treatments were conducted in the range of NaOH 0.1-2.0N, ethanol 40-80% and incubation time 6-18 hr. The solubilization yield for egg shell membrane by alkaline treatments ranged 24.9-73.6% and the maximum yield was obtained at 1.25N NaOH, 70% ethanol and 12hr incubation. In general, increasing the NaOH concentration and incubation time resulted in increasing the solubilization yield. On the other hand, the chalaza was completely solubilized at 0.1N NaOH and 2 hr incubation. However, the egg shell membrane was scarecely solubilized by the commercial protease treatments, which suggests the research demand for protease hydrolyzing egg shell membrane. The soluble egg shell membrane and chalaza proteins showed 93-98% solubility, and the molecular weight was decreased with increasing NaOH concentration.

Section 2. A manufacturing method of sialyloligosaccharides from the chalaza in hen's egg

Sialyloligosaccharides have been employed as functional food ingredients and biomedical agents due to its various biological activities, including immunostimulating, antivirus, antibacterial, cancer metastasis activity, etc.

In this study sialyloligosaccharides were isolated from hen's egg chalaza by using edible commercial proteases. Chalaza was hydrolyzed using six proteases such as Alcalase, Collupulin, Protamaex, Flavourzyme, Maxazyme and Neutrase, in which the hydrolysis yields were 98.9%, 81.4%, 68.9%,

45.0%, 35.9% and 35.6%, respectively. The specific activities of enzymes were determined as follows: Alcalase 2.24 unit/㎍, Collupulin 0.58 unit/㎍, Protamax 0.24 unit/㎍, Flavourzyme 0.93 unit/㎍, Maxazyme 0.51 unit/㎍, Neutrase 0.35 unit/㎍.

Alcalase was the most appropriate to hydrolyze chalaza in considering hydrolysis yield and enzyme specific activity. Alcalase hydrolysates of chalaze was further treated with peptidases such as Kojizyme, Peptidase and Protease K to get rid of the peptide residues connected to sialyloligosaccharides. In this research, considering enzymatic activity and commercial applicability, Kojizyme was selected to remove peptide from sialylglycopeptide.

The enzyme hydrolysates of chalaza were further separated by recycled prep HPLC, in which two distinct sialyloligosaccahrides were obtained. When analyzd for the composition of sialyloligosaccharides, the first fraction contained sialic acid 28.8 %, hexose 27.9% and hexosamine 43.3%, while the second fraction contained sialic aicd 1.9 %, hexose 42.6 % and hexosamine 55 %.

This research demonstrated that sialyyoligosaccahrides could be successfully isolated from chalaza by the combined treatment of commercial protease and peptidase. It is anticipated this process could be applied for industrial large-scale production of sialyloligosaccharides from chalaza.

Section 3. Fibrinolytic activity of egg chalaza peptide prepared by enzymatic hydrolysis

This study was carried out to find fibrinolytic activity from enzymatic hydrolysates of chalaza in hen eggs and to characterize biochemical properties of fibrinolytic peptide.

Chalaza was hydrolyzed using commercial protease mixtures of Protamex and Kojizyme, which were the most appropriate to solubilize chalaza in considering hydrolysis ratio and fibrinolytic activity. Chalaza hydrolysate was fractionated by ultrafiltrator and significant fibrinolytic activity was detected in the molecular weight cut-off of 500-10,000. The fibrinolytic peptide was isolated consecutively by prep-HPLC. Fibrinolytic activity was measured by the fibrin plate method.

The purified peptide showed a single band in tricine SDS-PAGE and a single spot in TLC. The elution pattern of the peptide on reverse

phase-HPLC showed a single peak. Molecular weight of chalaza peptide was measured to be 5,713 Da by MALDI mass spectrometry. Amino acid analysis showed that glycine, serine, alanine, aspartic acid and lysine were the major amino acids in the fibrinolytic peptide.

The fibrinolytic peptide (10 ㎎/㎖) showed 111.3% fibrinolytic activity compared to plasmin (1 unit/㎖) and the yield of the active compound was 0.016%. The fibrinolytic activity of chalaza peptide showed concentration dependent. Chalaza peptide fraction preferentially cleaved the α-chain and relatively slowly the β-chain of fibrinogen, while γ-chain was unaffected. Fibrinolytic activity increased more significantly in plasminogen rich fibrin plate than plasminogen free fibrin plate, indicatively chalaza peptide acted as a plasminogen activator.

These results suggest that chalaza peptide could be employed as a natural thrombolytic agent in functional foods and nutraceuticals.

C O N T E N T S

Chapter 1. Outline of Research ····· 23
1. Technical Aspects ····· 23
2. Economic & Industrial Aspects ····· 24
3. Social & Cultural Aspects ····· 25

Chapter 2. Trends in International and National R&D ····· 27
1. Trend in International Research ····· 27
2. Trend in National Research ····· 31
3. Research Rationale ····· 32

Chapter 3. Contents and Results of Research ····· 33
Section 1. Production and Function of Egg Shell Membrane and Chalaza Proteins ····· 33
1. Material and Methods ····· 33
a. Materials ····· 33
b. Optimum solubilization of egg shell membrane and chalaza protein by alkali treatment ····· 33
c. Function of egg shell membrane and chalaza proteins ····· 33
(1) Solubility of egg shell membrane and chalaza proteins ····· 33
(2) Emulsification of egg shell membrane and chalaza proteins ····· 33
(3) Water affinity of egg shell membrane and chalaza proteins ····· 34
(4) Intrinsic viscosity of egg shell membrane and chalaza protein ····· 34
(5) Measurement of molecular weight of soluble egg shell membrane and chalaza proteins ····· 34
d. Protease activity ····· 35
(1) Hydrolyzing activi쇼 of commercial proteases ····· 35
2. Result and Discussion ····· 35
a. Optimum solubilization of egg shell membrane and chalaza proteins by alkali treatment ····· 35
(1) Optimum solubilization of egg shell membrane proteins ····· 35
(2) Optimum solubilization of chalaza protein ····· 38

b. Functions of egg shell membrane and chalaza proteins ····· 38
(1) Solubility of egg shell membrane and chalaza proteins ····· 38
(2) Emulsification of egg shell membrane and chalaza proteins ····· 38
(3) Water affinity of egg shell membrane and chalaza proteins ····· 39
(4) Intrinsic viscosity of egg shell membrane and chalaza proteins ····· 39
(5) Measurement of molecular weight of soluble egg shell membrane and chalaza proteins ····· 39
c. Hydrolyzing activition of commercial proteases ····· 39
3. Production of egg shell membrane chalaza in processing factory ····· 43
a. Egg shell membrana ····· 43
b. chalaza ····· 45

Section 2. Manufacturing Technology of Sialyloligosaccharide from Hen Egg Chalaza ····· 47
1. Introduction ····· 47
2. Materials and Methods ····· 50
a. Hen egg chalaza ····· 50
b. Treatment of protease for hen egg chalaza ····· 51
c. Measurement of hydrolysis ratio of chalaza by proteases ····· 52
d. Activity of proteases ····· 52
e. Production of sialylglycopeptide ····· 52
f. Production of sialyloligosaccharide ····· 52
g. Separation and purification of sialyloligosaccharide by Recycle HPLC ·· 53
h. Composition of sialyloligosaccharide ····· 53
3. Result and Discussion ····· 60
a. Activity of commercial protease ····· 60
b. Hydrolysis ratio of chalaza by commercial protease ····· 60
c. Production of sialylglycopeptide ····· 61
d. Production of sialyloligosaccharide ····· 65
e. Separation and purification of sialyloligosaccharide by Recycle HPLC ·· 69
f. Composition of sialyloligosaccharide ····· 69
4. Conclusions ····· 73

Section 3. Fibrinolytic Activity of Egg Chalaza Peptide Prepared by Enzymatic Hydrolysis ····· 74
1. Introduction ····· 74

2. Materials and Methods ····· 80
a. Hen egg chalaza ····· 80
b. Production of chalaza protein hydrolysates ····· 80
(1) Hydrolysis of chalaza by proteases ····· 80
(2) Hydrolysis by proteases mixtures ····· 81
(3) Measurement of hydrolysis ratio by proteases ····· 81
c. Measurement of fibrinolytic activity ····· 81
(1) Measurement of fibrinolytic activity by fibrin plate method ····· 81
(2) Measurement of fibrinogenolytic activity ····· 81
(3) Fibrinogen degradation pattern ····· 81
d. Separation and purification of fibrinolytic chalaza peptide ····· 82
(1) Separation by ultrafiltration ····· 82
(2) Separation and purification by Recycle HPLC ····· 82
e. Purity measurement in fibrinolytic peptide ····· 82
(1) Purity measurement by Tricine SDS-PAGE ····· 82
(2) Purity measurement by thin layer chromatography ····· 83
(3) Purity measurement by Reverse Phase-HPLC ····· 83
f. Analysis of amino acid composition ····· 83
(1) Acid hydrolysis of samples ····· 83
(2) Derivatization and analysis by HPLC ····· 84
g. Measurement of molecular weigh by MALDI mass ····· 85
h. Measurement of fibrinolytic activity by plasminogen ····· 85
3. Result and Discussion ····· 86
a. Selection of chalaza hydrolysis enzymes ····· 86
b. Hydrolysis ratio and fibrinolytic activity of enzyme mixtures ····· 87
c. Separation and purification of fibrinolytic chalaza hydrolysates ····· 88
(1) Separation by ultrafiltration and fibrinolytic activity ····· 88
(2) Separation by Prep-HPLC and fibrinolytic activity ····· 90
d. Purity measurement and characteristics of fibrinolytic peptide ····· 93
(1) Purity measurement by Tricine SDS-PAGE ····· 93
(2) Purity measurement of separated peptide by thin layer chromatography ····· 97
(3) Purity measurement by Reverse Phase-HPLC ····· 99
e. Amino acid composition ····· 99
f. Molecular weight of fibrinolytic peptide ····· 99
g. Characteristics of chalaza peptide by fibrinolytic activity ····· 99

(1) Concentration dependent fibrinolytic activity ····· 99
(2) Fibrinolytic activity ····· 100
(3) Examination of fibrinogen degradation pattern ····· 100
(4) Fibrinolytic activity by plasminogen ····· 104
4. Conclusions ····· 107

Chapter 4. Research Accomplishments and Contribution to the Related Area ·· 109
1. Research Accomplishment ····· 109
2. Contribution to the Related Area ····· 110

Chapter 5. Application Plans of Research Results ····· 111

Chapter 6. International Technology Information ····· 113

Chapter 7. References ····· 115
Section 1. Production and Function of Egg Shell Membrane and Chalaza Proteins ····· 115
Section 2. A manufacturing method of sialyloligosaccharides from the chalaza in hen's egg ····· 116
Section 3. Fibrinolytic activity of egg chalaza peptide prepared by enzymatic hydrolysis ····· 119

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ····· 23
1. 기술적 측면 ····· 23
2. 경제・산업적 측면 ····· 24
3. 사회・문화적 측면 ····· 25

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ····· 27
1. 국외 연구현황 ····· 27
2. 국내 연구현황 ····· 31
3. 현재까지 연구의 문제점 ····· 32

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ····· 33
제 1 절. 난각막 및 알끈의 유효성분 생산공정 및 기능성 연구 ····· 33
1. 실험 재료 및 방법 ····· 33
가. 실험재료 ····· 33
나. 알칼리 처리에 의한 난각막 및 알끈 단백질의 수용화의 최적화 ····· 33
다. 난각막 및 알끈 단백질의 기능성 연구 ····· 33
(1) 난각막 및 알끈 단백질의 용해도 ····· 33
(2) 난각막 및 알끈 단백질의 유화성 ····· 33
(3) 난각막 및 알끈 단백질의 수분친화성 ····· 34
(4) 난각막 단백질의 고유점도 ····· 34
(5) 수용화된 난각막 및 알끈 단백질의 분자량 측정 ····· 34
라. 생산 단백질에 대한 가수분해 효소 활성 연구 ····· 35
(1) 시판 단백질 분해효소의 활성연구 ····· 35
2. 결과 및 고찰 ····· 35
가. 알칼리 처리에 의한 난각막 및 알끈 단백질의 수용화의 최적화 ····· 35
(1) 난각막 단백질 수용화의 최적화 ····· 35
(2) 알끈 단백질 수용화의 최적화 ····· 38
나. 난각막 및 알끈 단백질의 기능성 연구 ····· 38
(1) 난각막 및 알끈 단백질의 용해도 ····· 38
(2) 난각막 및 알끈 단백질의 유화성 ····· 38
(3) 난각막 및 알끈 단백질의 수분친화성 ····· 39

(4) 난각막 단백질의 고유점도 ····· 39
(5) 수용화된 난각막 및 알끈 단백질의 분자량 측정 ····· 39
다. 생산 단백질에 대한 가수분해 효소 활성 연구 ····· 39
3. 난각막 및 알끈의 현장 생산 ····· 43
가. 난각막의 공정별 수율 ····· 43
나. 알끈의 공정별 수율 ····· 45

제 2 절. 계란 알끈을 이용한 시알릴올리고당의 생산기술에 관한 연구 ··· 47
1. 서 론 ····· 47
2. 실험 재료 및 방법 ····· 50
가. 계란 알끈 시료 ····· 50
나. 계란 알끈에 대한 단백질 가수분해 효소 처리 ····· 51
다. Proteases에 의한 알끈 가수분해율 측정 ····· 52
라. Proteases의 효소활성 ····· 52
마. Sialylglycopeptide의 제조 ····· 52
바. Sialyloligosaccharide의 제조 ····· 52
사. Recycle HPLC에 의한 sialyloligosaccharide 분리정제 ····· 53
아. Sialyloligosaccharide의 구성성분 분석 ····· 53
3. 결과 및 고찰 ····· 60
가. 상업용 Proteases의 효소활성 ····· 60
나. 상업용 Proteases의 알끈 가수분해율 ····· 60
다. Sialylglycopeptide의 제조 ····· 61
라. Sialyloligosaccharide의 제조 ····· 65
마. Recycle HPLC에 의한 sialyloligosaccharide의 분리정제 ····· 69
바. Sialyloligosaccharide의 구성성분 분석 ····· 69
4. 결 론 ····· 73

제 3 절. 효소 가수분해한 계란 알끈 펩타이드의 혈전용해활성 ····· 74
1. 서 론 ····· 74
2. 실험 재료 및 방법 ····· 80
가. 계란 알끈 시료 ····· 80
나. 알끈 단백질 가수분해물의 제조 ····· 80
(1) 효소별 알끈 가수분해 ····· 80
(2) Enzyme mixture에 의한 가수분해 ····· 81
(3) 효소별 알끈 가수분해율의 측정 ····· 81
다. 혈전용해 활성 측정 ····· 81

(1) Fibrin plate를 이용한 혈전용해 활성 측정 ····· 81
(2) Fibrinogen 용해 활성 측정 ····· 81
(3) Fibrinogen 분해 pattern ····· 81
라. 혈전용해활성 알끈 peptide의 분리·정제 ····· 82
(1) Ultrafiltration에 의한 분리 ····· 82
(2) Prep-HPLC에의한 분리·정제 ····· 82
마. Fibrinolytic peptide의 순도 확인 ····· 82
(1) Tricine SDS-PAGE에 의한 순도 확인 ····· 82
(2) Thin layer chromatography에 의한 순도 확인 ····· 83
(3) Reverse phase-HPLC에 의한 순도 확인 ····· 83
바. 아미노산 조성 분석 ····· 83
(1) 시료의 산 가수분해 ····· 83
(2) 시료 유도체화 및 HPLC를 이용한 분석 ····· 84
사. MALDI mass에의한 분자량 측정 ····· 85
아. Plasmininogen의 의한 혈전용해 활성 측정 ····· 85
3. 결과 및 고찰 ····· 86
가. 알끈 가수분해 효소의 선정 ····· 86
나. 복합효소 처리에 따른 가수분해율 및 혈전용해 활성 ····· 87
다. 혈전용해활성 알끈 가수분해물의 분리·정제 ····· 88
(1) Ultrafiltration에 의한 분리 및 혈전용해 활성 ····· 88
(2) Prep-HPLC에 의한 분리 및 혈전용해 활성 ····· 90
라. Fibrinolytic peptide의 순도확인 및 특성 ····· 93
(1) Tricine SDS-PAGE에 의한 순도 확인 ····· 93
(2) TLC에 의한 펩타이드 분획물의 순도 확인 ····· 97
(3) Reverse phase-HPLC에 의한 순도 확인 ····· 99
마. 아미노산 조성 ····· 99
바. Fibrinolytic peptide의 분자량 확인 ····· 99
사. 혈전용해활성 알끈 펩타이드의 특징 ····· 99
(1) 농도별 혈전용해 활성 ····· 99
(2) Fibrinogen 용해 활성 ····· 100
(3) Fibrinogen degradation pattern ····· 100
(4) Plasminogen의 의한 혈전용해 활성 ····· 104
4. 결 론 ····· 107

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 109
1. 목표달성도 ····· 109

2. 관련분야에의 기여도 ····· 110

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ····· 111

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 113

제 7 장 참고문헌 ····· 115
제 1 절. 난각막 및 알끈의 유효성분 생산공정 및 기능성 연구 ····· 115
제 2 절. 계란 알끈을 이용한 시알릴올리고당의 생산기술에 관한 연구 · 116
제 3 절. 효소 가수분해 계란 알끈 펩타이드의 혈전용해활성 ····· 119

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 기술적 측면

○ 계란은 인체에 필요한 각종 영양성분이 고루 풍부하게 포함되어 있어 완전식품으로 알려져 있으며, 영양적인 가치에 비해 비교적 가격이 저렴하여 소비자들에게 매우 친숙한 식품원료이다. 계란은 영양학적인 측면이외에 각종 생물활성을 갖는 유용 물질들이 다수 포함되어 산업적으로 식품 및 생물소재의 생산에 많이 이용되고 있다.

○ 국내에서 생산되는 계란은 대부분 알란의 상태로 소비자들에게 전달되고 있다. 본 연구의 초기단계에 참여한 (주)가농바이오는 국내 최대의 위생란 생산설비를 보유하고 있으며, 자체적인 유통망과 (주)풀무원 등 국내 대표적인 식품관련 회사를 통하여 소비자에게 위생란을 공급하고 있다. (주)가농바이오는 위생란의 공급을 위하여 초고속 세척기, 위생검사 시스템 구축, 위생란의 유통시스템 개발 등 고품질의 계란을 소비자에게 공급하기 위한 많은 설비투자와 노력을 기울이고 있다.

○ 계란을 가공하는 과정에는 난각이외에 난각막(egg shell membrane)과 알끈(chalaza)이 생산된다. 이들은 각각 단백질, 펩타이드, 올리고당 등 매우 유용한 생리활성 성분을 다량 함유하고 있으나 국내에서는 이들에 대한 체계적인 연구가 거의 이루어 진 바 없다. 이는 연구의 필요성이 낮은 것이 아니라 지금까지 계란을 대규모로 가공한다는 개념 자체가 이루어져 있지 않았고, 결과적으로 난각막과 알끈이 산업적으로 활용할 수준으로 부산물로서 발생한 예가 없었기 때문이다.

○ 식품 가공부산물을 재활용할 때 최종 제품의 부가가치가 낮은 경우에는 재활용 공정의 자체비용 때문에 실질적으로 재활용화 되는 예가 많지 않다. 그러나 난각막과 알끈의 경우에는 고기능의 펩타이드와 올리고당(sialyl-oligosaccharides)이 다량 포함되어 있어, 재활용에 따른 공정비용을 감안하더라도 최종 제품의 부가가치가 훨씬 높기 때문에 기능성 소재화를 위한 세부적인 연구는 매우 가치가 있다. 특히, 이러한 재활용 연구가 성공적으로 이루어질 경우 계란 생산 및 가공농가의 상품 경쟁력을 제고시키고, 경영여건을 개선하는데 크게 기여할 것으로 기대된다.

○ 본 연구진은 계란 가공부산물인 난각막과 알끈을 효율적으로 활용하여 고부가가치의 식품 및 생물소재를 생산하기 위한 노력의 일환으로서 기술적인 측면에서 다음 4가지 분야의 연구필요성을 제시하고자 한다.

가) 계란 가공부산물(난각막 및 알끈)의 전처리기술

난각막 및 알끈은 단백질과 기능성 탄수화물 등 공정조건에 민감한 성분을 포함하고 있어 이들로부터 생리활성 소재를 효율적으로 분리하기 위해서는 원료의 전처리공정 및 생체조직의 구조변환기술이 선행되어야 한다.

나) 난각막 및 알끈의 생리활성 성분의 분리정제기술개발

난각막이나 알끈으로부터 유용성분을 분리하기 위해서는 최적 효소처리 공정, 경제적 활성물질의 분리정제기술, 활성성분의 고정밀 분석확인 등의 기술을 개발하여야 한다.

다) 생산소재의 구조-기능 상관성(structure-activity relation) 연구

목적하는 기능성(Target properties)을 보유하는 소재를 생산하기 위해서는 정확한 bioassay system을 구축하여야 하며, 이를 토대로 소재의 구조와 기능간의 상관관계를 연구하므로써 소재의 기능성확보를 위한 기초자료로서 활용할 필요가 있다.

라) 난각막 및 알끈의 생리활성 성분의 생산최적화(process optimization) 연구

본 연구에서는 최종적으로 기능성 성분의 효율적인 생산공정을 개발하여 산업화하는 것을 목적으로 한다. 따라서 전처리 공정으로부터 고순도의 최종제품 생산공정까지를 종합적으로 고려한 최적화 연구를 수행할 필요가 있다.

2. 경제・산업적 측면

○ 현재 국내의 양계업계는 치열한 생산원가 경쟁에 놓여 있으며, 상당부분 저가의 생산원가에 초점을 맞추는 과정에서 위생적이고 품질이 우수한 제품을 공급하는데 많은 한계를 보여왔다. 이와 같은 문제점을 극복하기 위한 방법의 하나는 계란을 단순히 알란상태로 공급하던 기존의 방식을 지양하여, 이를 가공화하므로써 보다 편의적이고 부가가치가 높은 제품을 생산하려는 노력일 것이다.

○ 이와 같은 노력이 결실을 맺기 위해서는 고기능성의 다양한 제품을 생산하는 것과 더불어 가공과정중에 발생하는 부산물로부터 고부가가치의 기능성 소재를 개발하므로써 계란가공산업의 경쟁력을 제고하는 것이다. 난각막과 알끈을 단순부산물로 처리하는 경우 건조비용과 폐기에 따른 부대비용이 발생하지만, 이를 이용하여 식품 및 생물소재를 개발하면 매우 높은 경제적 이익을 제공할 수 있다.

3. 사회·문화적 측면

○ 현대사회는 고기능성의 식품 및 생물활성 소재에 대한 수요를 갖는다. 난각막과 알끈은 천연소재로서 이를 이용하여 생산되는 기능성 소재는 소비자들의 요구를 충족시킬 수 있을 것이다. 또한 이들 소재는 식품, 미용제품, 의약품 등 매우 다양한 적용가능성을 갖고 있어 사회적인 활용성이 매우 높다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국외 연구현황

가. 난각막의 구조적 특성

○ 달걀껍질은 얇은 표피층(cuticle), 탄산칼슘층(calcium carbonate layer) 그리고 두 개의 난각막(shell membrane)으로 구성되어 있다. 난각막은 두께가 각각 15㎛와 50㎛인 내부막(inner membrane)과 외부막(outer membrane)으로 분리되며, 두 섬유단백질은 albumen과 shell의 안쪽표면사이에 존재한다. 망사구조를 갖는 난각막은 미생물과 결합하므로써 미생물이 내부로 침투하는 것을 방어하는 역할을 한다(Li-Chang et al., 1996; Tung and Richard, 1972).

○ 난각막은 70%의 유기물, 10%의 무기물, 20%의 수분으로 구성되어 있다. 주요 유기 구성분은 단백질과 소량의 지방과 탄수화물이다. 난각막은 수많은 망사구조를 가진 불용성 단백질 섬유로, 난각막 단백질은 arginine, glutamic acid, cysteine, proline이 많이 함유되어 있으며, 상대적으로 glycine 함량이 적으며 cysteine 함량은 표피층(cuticle)보다 약 2배 정도 함유하고 있다 (Okubo et al., 1996).

○ Candlish 등(1969)은 난각막의 산가수분해물에 L-5-hydroxylysine(1～2 moles/105 g 단백질)이 분포하기 때문에 상당부분의 collagen을 함유하고 있다고 제안하였다. 한편, Wong 등(1984)은 collagen Ⅰ와 Ⅴ가 존재하고 있다고 보고하였으며, Arias 등(1991)은 면역화학 분석방법으로 난각막에는 Type X collagen이 함유되어 있다는 것을 밝혀냈다. 또한 desmosine, isodesmosine 그리고 nonelastin 등의 단백질이 발견되었는데, 이는 난각막에 cross-linking 아미노산이 있다는 것을 제시하는 것이다. 따라서 난각막 단백질은 구조적인 측면에서 보면 keratin, collagen 또는 elastin이라는 것을 의미한다.

○ Suyama 등(1977)은 난각막의 지방함량은 1.35%이며 중성지방과 복합지방의 비율은 86:14라고 보고하였으며, sphingomyelin(63%)과 phophatidylcholine (12%)이 주요 복합지방(complex lipids)을 구성하는 것으로 연구되었다.

○ 난각막에 대한 연구는 위에서 설명한 바와 같이 대부분 1980년대 이전에 기본적인 구성성분, 분자 미세구조, 외부 미생물의 침투에 대한 난각막의 보호효과 등 매우 단편적인 연구결과만이 보고되어 있다. 그러나 최근에는 난각막 단백질의 가수분해 펩타이드의 생리활성이 밝혀지면서 기능성 신소재로서 새로이 부각되고 있다.

나. 알끈의 구조적 특성

○ 알끈은 두꺼운 알부민(albumen)과 유사한 조성을 갖는 끈 모양의 구조로서, 난황을 달걀의 중앙에 고정시키고 껍질(shell) 내부에 대한 충격으로부터 난황(yolk)과 배(embryo)를 보호하는 역할을 한다.

○ Juneja 등(1991)은 달걀의 부위별 sialic acid의 함량을 조사하여서 달걀부위 가운데 알끈(2.40%)과 yolk membrane(1.80%)에 비교적 많은 양의 sialic acid가 분포한다고 보였다. 또한, HPLC, IR, 13C-NMR 등을 이용한 성분분석 결과 달걀에 분포하는 sialic acid는 모두 N-acetylneuraminic acid (NANA)로 구성되어 있는 것으로 밝혀졌다.

○ Sialic acid는 당의 유도체로써 산성당(acidic sugar)에 속한다. 즉, 기본적인 당의 구조에서 -OH기 대신에 NH2기가 존재한다. 산성당의 특징은 중성 pH에서 음전하를 띄게 되고, 생체내의 세포막과 세포 표면에서 당단백질(glycoprotein)과 당지질(glycolipid)의 형태로 존재한다. sialic acid는 36종류가 분리되었다고 보고 되어있으며 N-acetylneuraminic acid(NANA)가 가장 많이 존재하며, N-glycolylneuraminic acid(NGNA)도 다수 존재한다. 앞에서 언급하였듯이 알끈에서는 오직 NANA만이 존재한다(Itoh et al., 1987; Juneja et al., 1991).

○ Sim (1995)은 한개의 달걀(평균 60 g)에서 순수한 sialic acid 70 mg을 얻을 수 있으며, 이의 판매가격은 약 20 달러에 해당한다고 보고한 바 있다. 현재 달걀 가공과정에서 발생하는 알끈은 대부분 폐기처분되고 있는데 알끈에는 sialic acid가 다량 함유되어 있기 때문에 알끈을 이용하여 고부가가치의 식품・의약용 sialic acid를 생산하는 것은 매우 중요한 연구과제이다.

○ 알끈은 특별한 종류의 구조 단백질인 mucin fiber로 구성되어 있으며, 탄수화물이 적은 α-component(α1+α2)와 탄수화물이 많은 β-component로 나눌 수 있다. α-component에는 glutamine, asparagine, cysteine과 같은 산성아미노산(acidic amino acid)을 많이 포함되어 있으며, 탄수화물의 함량은 상대적으로 적은 편이다. 반면에 β-component에는 threonine, serine과 같은 hydroxy amino acid가 많으며, β-component의 탄수화물의 조성은 α-component와 거의 유사하지만 전체 함량이 훨씬 높은데 특히 sialic acid가 많이 존재한다(Itoh et al., 1987)

다. 난각막 및 시알릴올리고당(sialyloligosaccahrides)의 생리활성

○ 난각막은 계란껍질의 내부에 위치하면서 외부로부터 미생물의 침투억제, 외부충격으로부터의 완충작용, 내부로부터의 수분증발억제, 자외선 차단작용 등 다양한 생리학적 기능을 갖는다. 따라서 난각막의 유효성분을 분리정제하여 산업적으로 생산하면, 식품, 화장품, 의약품 등 각종 관련제품에 기능성 신소재로서 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

○ 1995년에 Kakoki 등(6)은 가수분해된 난각막(hydrolyzed shell membrane: HSM)을 이용하여 피부노화를 방지하는 화장품을 개발하였다. 지방의 산화에 의해서 생성되는 지방 과산화물(lipid peroxide: LP)은 인체에서 세포를 파괴하는 cytotoxic effect 부작용을 일으키므로 그 형성을 억제시킬 필요가 있다. 특히, 항상 외부에 노출되어 있는 피부의 경우 나이가 들면서 LP의 양이 증가하므로 젊은 피부를 유지하기 위해서는 피부에서 LP의 형성을 줄이는 것이 중요하다. 화장품에 이용되는 토코페롤은 지방의 산화과정 중에 생성되는 라디칼을 제거시키지만 이미 존재하는 LP를 제거하지는 못한다. 하지만, 토코페롤과 HSM을 함께 사용하면 LP을 억제함과 동시에 제거시킬 수 있다는 것이 밝혀졌다. 이는 로션, 크림, 연고 등 피부외용제의 제조에 HSM가 효과적으로 응용될 수 있는 가능성을 제시하는 것이다.

○ 생물체계에서 sialic acid는 생리적 과정에 대한 조절작용과 함께 약리학적인 특성을 나타낸다. 위장장애(gastrointestinal disturbances)를 막고, 독성 물질을 중화시키며, 가래를 제거하고, 세포 증식을 조절하며, 약리학적인 이용을 위해 생화학적 유도체로 만들어지기도 한다. 또한, 세포막을 통하여 이온(ions), 아미노산, 바이러스(viruses)의 이동에도 중요한 역할을 한다(Schauer, 1982).

○ 생체내 세포막에서 sialic acid를 포함하는 당지질은 박테리아 독성 물질에 대한 수용체로써의 기능을 한다. 즉, 하나 이상의 시알릴산을 포함하는 갱글리오사이드(ganglioside)는 전체적으로 음전하를 띠게되고, 콜레라 독성물질은 이런 갱글리오사이드를 포함하는 세포막에 잘 결합하여 세포내로 유입하며, 세포내 cyclic AMP를 증가시켜 Na+과 물을 밖으로 내보내며, 결국 설사를 일으키게 된다. Bruce 등(1994)은 sialic acid를 이용한 올리고당(oligosaccharides)이 이런 독성 물질을 저해하여 콜레라에 의한 설사를 막을 수 있다고 보고하였다.

○ 백혈구의 세포막에는 sialic acid를 포함하는 당지질이 있다. 만약 세포가 감염

이 되면, 감염된 세포의 렉틴(lectin)은 시알릭산을 포함하는 당지질을 인식하여 백혈구와 결합하게 되고, 이런 결합에 의해 정상적인 면역 기능을 하게 된다. 이와 같이 시알릭산을 포함하는 당지질, 당단백질이 생체내에서 여러 가지 대사에 필요한 물질의 이동 및 면역 기능에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Ichikawa et al., 1992).

○ 시알릭산을 포함하는 물질이 항바이러스제, 설사치료제, 항궤양제, 항염제, 항알러지제 등으로 이용되며, 아울러 비피도박테리아(bifidobacteria)의 증식을 촉진하는 기능을 하는 것으로 보고되어 있다(Hasegawa et al., 1994; Mochalova et al., 1994; Pegg, 1994; Ebina et al., 1990; Spiki et al., 1988). 특히, 시알릭산의 인플루엔자 바이러스(influenza virus) 수용체로써의 기능 및 병원성 E. coli와 결합하는 기능은 잘 알려져 있다(Paulson, 1984; Mroschhauser et al., 1990). 또한, 달걀 난황의 시알릴올리고당이 유아의 학습능력을 향상시킬 수 있을 것이라는 보고도 있다(Koketsu et al., 1995). 이같은 시알릴올리고당의 다양한 생리활성 때문에 기능성 식품 및 생물소재로서의 이용가능성이 매우 높다.

라. 난각막 및 알끈의 유효성분 분리

○ 난각막과 알끈의 주성분은 단백질로 구성되어 있기 때문에 이들로부터 유효성분을 얻기 위해서는 단백질 성분을 효율적으로 조절한 필요성이 있다. 그러나 난각막의 경우는 최종 제품이 대개 펩타이드이기 때문에 단백질을 목적하는 정도로 가수분해하는 기술을 필요로 한다. 반면에 알끈의 경우에는 목표물질이 sialic acid이므로 단백질을 가능한 제거할수록 순도가 높은 제품을 얻을 수 있다. 이를 요약하면 난각막의 경우에는 적절한 가수분해 기술이, 알끈의 경우에는 효율적인 제거기술이 필요하다.

○ 단백질 및 펩타이드의 기능성은 실제적으로 분자량 및 분자량 분포에 따라 많은 영향을 받는다. 따라서 현재 상업화되어 있는 단순한 저분자 펩타이드는 적용성의 용이함은 있으나 실제적으로 다양한 생리기능별로 specific하게 적용하는 데는 문제점이 있다. 따라서 보다 효율적으로 난각막을 이용하기 위해서는 생리활성별로 단백질의 분자량을 효율적으로 조절할 수 있는 난각막 전처리 및 효소처리 시스템의 개발이 필요하다.

○ Sialic acid의 화학적 합성은 대단히 복잡하고 비싸기 때문에 천연 원료에서 얻는 것이 바람직하다. 알끈은 sialic acid 제조를 위한 훌륭한 원료이며, 대량

제조를 위해 이용될 수 있는 가장 바람직한 방법이라고 생각된다. Juneja 등(1991)은 알끈을 산처리하여 알끈을 가수분해한 후 여과와 단계적 정제과정을 거쳐 sialic acid를 분리하였다. 연구결과에 의하면 건조되지 않은 800 kg의 난황막과 알끈원료로부터 약 300 g의 sialic acid를 분리하였는데, 이는 약 0.4%의 수율에 해당된다. 분리된 sialic acid를 HPLC, IR, 13C-NMR 등을 이용하여 분석한 결과 N-acetylneuraminic acid로 구조가 결정되었다.

○ 그러나 이러한 화학적 처리방법은 목적하는 sialic acid 소재의 화학적 구조를 변화시킬 뿐만 아니라, 궁극적으로는 최종 제품의 순도를 저하시킨다. 또한 산처리 반응에 따른 용기부식현상, 중화공정의 추가, 다량의 폐수발생 등 현장 적용성에도 많은 문제점을 내포하고 있다. 따라서 보다 환경친화적인 방법으로서 단백질 가수분해 효소를 이용한 알끈 단백질의 효율적인 제거방법과 sialic acid의 분리정제기술을 세부적으로 연구할 필요가 있다.

2. 국내 연구현황

○ 국내에서는 난각막의 칼슘을 분리하여 라면, 제빵 등에 대한 식품 첨가물이나 칼슘제제의 생산에 활용하기 위한 산업적인 난각막 가공공정이 구축되어 있다.

○ 난각칼슘을 생산하기 위해서는 난각과 난각막의 분리공정을 필요로 한다. 손 등(1995)은 3% 이상의 알칼리 용액을 처리한 후 가열하여 난각막을 가수분해하므로써 난각으로부터 난각막을 완전히 제거하는 방법을 제시하였다. 그런에 이러한 공정은 난각막의 제거에 주안점을 둔 매우 강한 반응조건으로서 제거된 난각막을 식품 및 생물소재로서 재활용하는 것은 어렵다.

○ 그밖에 국내에서 농림특정 연구사업의 일환으로서 난각막 두께를 증가시켜 파손율을 저하시키는 연구, 불용성 난각막 칼슘의 수용화를 높여 흡수율을 높이는 연구 등 대개 난각에 주안점을 두고 연구가 진행된 바 있다.

3. 현재까지 연구의 문제점

○ 앞에서도 언급한 바와 같이 난각막이나 알끈을 이용한 생리활성 소재의 개발은 국내외적으로 활발히 진행되지 않은 편이다. 이는 무엇보다 난각막이나 알끈이 소재화 산업에 응용될 수 있을 정도로 산업현장에서 충분히 생산되지 않은 것이 주원인으로 판단된다. 지금까지 난각막과 알끈의 소재화 산업에 관련하여 국내외에서 수행된 연구결과를 토대로 관련연구의 문제점과 개선방안을 아래에 정리하였다.

현재 관련기술의 문제점 및 개선방안

현 기술의 문제점	본 연구에서의 개선안
1. 난각막 및 알끈의 분자구조(molecular structure) 변환기술에 대한 연구 미흡 - 난각막과 알끈은 구성성분이 서로 강하게 결합되어 불용성의 조직체계로 구성되어있으나 현재 결합구조를 조절하는 구체적 기술개발이 매우 미흡함. 2. 난각막 및 알끈으로부터 단백질, 펩타이드, 올리고당 등 생리활성 유용성분의 분리정제 및 산업적 생산기술에 대한 연구가 미흡 - 단순히 수용화시킨 제품이 주이며, 기능별 유용성분 생산기술에 대한 연구가 부족함. 3. 소재생산기술의 산업화 연구 - 현재까지 국내에서 난각막 및 알끈의 기능성을 구명하고 이를 식품 및 생물산업용으로 소재화 하여 이를 산업적으로 생산하거나 제품에 활용한 구체적 연구사례가 보고된 바 없음	1. 물리화학적 전처리 및 효소처리 공정 - 물리화학적 전처리 공정에 의해 강한 결합구조를 이완시키고, 저분자화하기 위한 최적 가수분해 적용 시스템 개발 2. 유용성분 최적 분리정제공정 개발 - 유용성분의 생산수율을 최대한 증가시킬 수 있는 분리정제 공정 개발 - 기능별 생산소재의 제조공정 확립 3. 난각막 및 알끈 생산업체와의 유기적인 협력체제에 의한 산학공동연구 추진 - 소재생산기술, 기능성 구명 등의 기초연구가 산업현장에 즉시 적용될 수 있도록 산업체와의 공동연구체제를 연구초기부터 구축하여 실행함

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 난각막 및 알끈의 유효성분 생산공정 및 기능성 연구

1. 재료 및 방법

가. 실험재료

본 실험에서는 (주)가농에서 제공한 일광건조한 난각막과 동결건조한 알끈을 사용하였으며 시약급 시약을 사용하였다.

나. 알칼리 처리에 의한 난각막 및 알끈 단백질의 수용화의 최적화

난각막 및 알끈을 1~5% 농도로 NaOH/Ethanol 및 NaOH 수용액에 첨가하여 교반하여 단백질을 수용화하였다. 단백질의 수용화 정도는 280nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 교반한 용액을 원심분리하여(7000rpm, 10분) 상등액을 취하고 NaOH/Ethanol 용액에서 수용화한 난각막의 경우 진공회전농축기에서 에탄올을 제거하였다. 단백질 수용액에 염산을 첨가하여 pH 7로 중화한 후 한외여과(mwco 3,000)를 실시하여 염을 제거하고 (염도 약 0. 5~1.0) 동결건조하였다. 난각막 단백질의 적절한 수용화 조건을 결정하기 위하여 NaOH 농도를 0.75, 1.00, 1.25N로, 에탄올 농도를 50, 60, 70%로, 교반시간을 6, 9, 12시간으로 달리하여 교반하였다. Fractional factorial design을 사용하여 가능한 27개의 실험조건 중에서 15개를 실시하였으며 StatView SE+ Graphics Software를 사용하여 stepwise regression analysis를 실행하여 최적 수용화 조건을 결정하였다.

다. 난각막 및 알끈 단백질의 기능성 연구

(1) 난각막 및 알끈 단백질의 용해도

난각막 및 알끈 단백질을 1%로 pH 7 buffer에 넣은 후 1시간 동안 수화시켰다. 수화된 단백질 용액을 원심분리한 후(12,000rpm, 10분) 상등액과 원액의 단백질 농도를 Bradford법을 이용하여 측정하였다. 총단백질 농도에 대한 상등액의 단백질 농도의 %비율을 단백질의 용해도로 결정하였다.

(2) 난각막 및 알끈 단백질의 유화성

Kinsella 등의 방법을 사용하여 유화능(emulsion activity: EA)와 유화안정성(emulsion stability: ES)를 측정하였다. 0.1%의 단백질 용액(pH 7) 3㎖에 옥수수기름 1㎖를 첨가하여 13,500rpm에서 1분간 homogenize한 후(Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Germany) 100㎕를 취하여 5㎖의 0.1% sodium dodecyl sulfate와 혼합한 다음 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 초기의

흡광도를 EA로 결정하였으며 흡광도가 초기의 ½로 줄어드는데 걸리는 시간을 ES로 결정하였다. 카제인(Sigma C-8654)의 EA와 ES를 측정하여 난각막 및 알끈 단백질의 EA, ES와 비교하였다.

(3) 난각막 및 알끈 단백질의 수분친화성

일광건조한 난각막과 동결건조한 알끈의 수분친화성을 rehydration index로 측정하였다. 1g의 시료를 50㎖의 증류수에 1분동안 수화시킨 후 glass filter를 이용하여 여과하여여분의 물을 제거하고 filter cake의 무게를 측정하였다. 다음 식을 이용하여 rehydration index, R를 결정하였다.

$$R = \frac{\text{수화된 후의 시료의 무게}}{\text{수화되기 전의 건조 시료의 중량}}$$

(4) 난각막 단백질의 고유점도

일정량의 단백질 시료를 50 mM sodium acetate buffer(pH 7.0)에 넣고 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 이를 0.45㎛ Millipore filter에서 여과한 후 10㎖의 단백질 용액을 Cannon-Fenske 모세점도관(size 100)에 넣고 25±0.1oC에서 점도를 측정한다. 고유점도([η])는 다음 식을 이용하여 결정하였다.

$$[\eta] = \lim_{c \to 0} (\eta - \eta s)/\eta s C$$

여기서 η은 용액의 점도, ηs는 용매의 점도, C는 용액의 농도이다.

(5) 수용화된 난각막 및 알끈 단백질의 분자량 측정

SDS-PAGE와 GPC를 이용하여 난각막 및 알끈 단백질의 분자량을 측정하였다. Tris-HCl buffer를 사용하여 15% gel에서 전기영동을 행하였으며 Coomassi blue 염색을 하여 band를 확인하였다. GPC는 Waters Alliance 2690 Separations Module을 이용하였는데 조건은 표 1과 같으며, standard로는 angiotensin(m.w. 1,046), nisin(m.w. 3,354), aprotenin(m.w. 6,500), ribonuclease (m.w. 13,700), ovalbumin(m.w. 43,000)을 사용하였다.

표 1. 난각막 펩타이드의 GPD 분석조건

Column	Ultrahydrogel Linear(7.8×300㎜) + Ultrahydrogel 250(7.8×300㎜)
Detector	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector (280㎚)
Solvent	0.1M sodium phosphate buffer (pH 7)
Flow rate	0.8㎖/min
Injection vol.	100㎕

라. 생산 단백질에 대한 가수분해 효소 활성 연구

(1) 시판 단백질 분해효소의 활성연구

11종의 상업용 단백질 분해효소를 사용하여 난각막 단백질의 분해여부를 조사하였다. 효소로는 Alcalase, Collupulin, Flavourzyme, Maxazyme NMP, Peptidase, Pescalase, Protease NP, Protamex, Papain, Sumyzyme, Neutrase를 사용하였다. pH 7의 0.05M sodium phosphate buffer에 난각막 단백질을 2% 첨가하고 효소를 0.2% 첨가한 후 30, 50 또는 60℃에서 5시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후 100℃에서 10분 가열하여 효소의 활성을 중지시켰다. GPC를 이용하여 수용화된 난각막 단백질이 상업용 효소에 의해 분해 되는지를 알아보았다.

2. 결과 및 고찰

가. 알칼리 처리에 의한 난각막 및 알끈 단백질의 수용화의 최적화

(1) 난각막 단백질 수용화의 최적화

수용화에 영향을 주는 조건들과 그 조건들의 범위를 결정하기 위하여 난각막을 5%로 첨가하고 0.1~2N NaOH, 40~80% 에탄올, 교반시간 6~18시간, 교반온도 20~80℃로 달리하여 예비실험을 행하였다. 그 결과가 다음의 Fig. 1과 같다. 예비실험 결과와 산업화 가능성을 고려하여 Table 1의 조건의 NaOH/에탄올 용액에 난각막을 5% 첨가하여 20℃에서 교반하였다. 각 조건에서의 수용화율은 Table 1에 나타나 있다. Stepwise regression analysis를 이용하여 수용화조건들과 수용화율 사이의 관계를 알아보았다. 그림 2에서와 같이 수용화조건들 중에서 단지 NaOH 농도만이 수용화율과 유의적으로 상관관계가 있었다 (R2=0.755, P=0.0001).

Fig. 2에 나타난 바와 같이 NaOH 농도가 증가하면 난각막 단백질의 수용화율이 증가하는 것을 알 수 있다. 그러나 산업체에서 실용화할 때에는 NaOH 농도를 최적 수용화율을 얻을 때까지 높이는 것은 바람직하지 않으므로 적정 수용화율을 얻는 적절한 조건을 결정하여야 할 것이다.

Table 1의 결과에서 수용화율이 가장 높은 조건과 가장 낮은 조건인 1.25N NaOH, 70% 에탄올과 0.75N NaOH, 50% 에탄올의 용매조건에서 난각막을 처리하여 수용성 난각막 단백질을 얻은 후 다음 실험을 진행하였다.

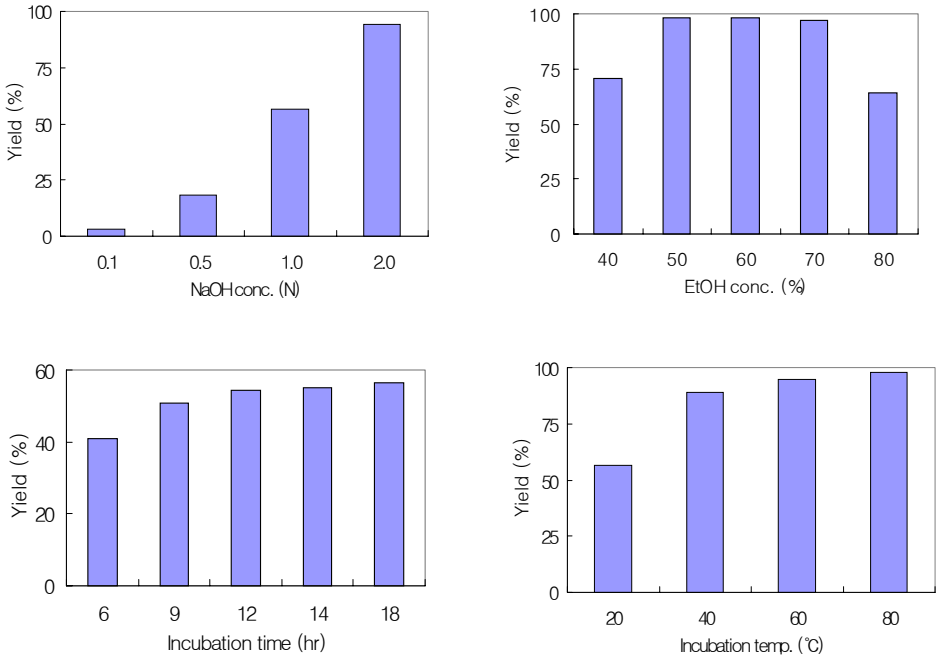

Fig. 1. NaOH 농도, 에탄올 농도, 교반시간, 교반온도에 따른 난각막 단백질의 수용화율

Table 1. 15개의 실험조건에서의 수용화율

조건	NaOH (N)	에탄올 (%)	교반시간 (시간)	수용화율 (%)
1	1.25	50	12	60.7
2	0.75	50	12	29.4
3	1.00	50	9	32.3
4	1.25	50	6	43.7
5	0.75	50	6	21.1
6	1.00	60	12	48.9
7	1.25	60	9	54.2
8	1.00	60	9	37.1
9	0.75	60	9	24.9
10	1.00	60	6	39.9
11	1.25	70	12	73.6
12	0.75	70	12	34.2
13	1.00	70	9	40.8
14	1.25	70	6	54.9
15	0.75	70	6	26.3

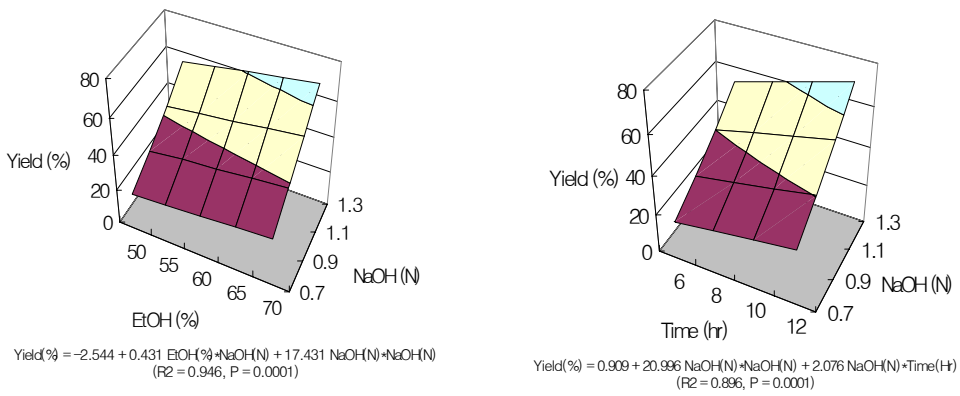

Fig. 2. 수용화조건들과 수용화율과의 관계

(2) 알끈 단백질 수용화의 최적화

알끈의 경우에는 난각막과는 달리 0.1N NaOH용액에서 2시간 정도 교반했을 때 완전히 수용화됨을 알 수 있었다.

나. 난각막 및 알끈 단백질의 기능성 연구

(1) 난각막 및 알끈 단백질의 용해도

Table 2에 난각막 및 알끈 단백질의 용해도를 나타내었다. 난각막의 경우 수용화 용매의 조성에 관계없이 난각막 단백질은 90% 이상의 우수한 용해도를 보여주었다. 또한 알끈단백질의 용해도도 98%로 우수하였다.

표 2. 난각막 단백질과 알끈 단백질의 용해도

Sample	용해도 (%)
난각막 단백질 (1.25N NaOH, 70% 에탄올)	93.8
난각막 단백질 (0.75N NaOH, 50% 에탄올)	98.6
알끈 단백질	98.6

(2) 난각막 및 알끈 단백질의 유화성

카제인과 난각막 및 알끈 단백질의 유화성을 측정한 결과가 Table 3이다. 0.75N NaOH/50% 에탄올로 수용화하여 얻어진 난각막 단백질이 1.25N NaOH/70% 에탄올을 사용하였을 때의 난각막 단백질보다 1.6배, 그리고 카제인보다 1.7배의 유화안정성을 보여주 었다. 카제인을 식품에서 유화성 단백질로 사용하는 것을 고려할 때 알칼리 처리로 얻은 난각막 단백질은 식품에서 유화성을 발휘할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 3. 난각막 및 알끈 단백질의 유화성

	난각막 단백질 (1.25N NaOH, 70% 에탄올)	난각막 단백질 (0.75N NaOH, 50% 에탄올)	알끈 단백질	카제인
EA	1.062	1.136	0.6922	0.927
ES (분)	1.8	2.9	1.9	1.7

(3) 난각막 및 알끈 단백질의 수분친화성

알칼리 처리를 하여 얻은 수용화된 난각막 및 알끈 단백질은 용해도가 우수하여 1분 안에 물에 용해되므로 rehydration index(R)를 측정할 수 없었다. 일광건조한 난각막과 동결 건조한 알끈의 R값은 각각 2.82와 18.76 이었다.

(4) 난각막 단백질의 고유점도

고유점도란 단위질량당 차지하는 hydrodynamic volume을 측정하는 값으로 단백질의 분자구조와 관련되어 있다. Table 4에 나타난 바와 같이 처리조건이 다른, 즉 수용화효율이 다른 2종류의 난각막 단백질의 고유점도는 거의 유사하였다.

Table 4. 난각막 단백질의 고유점도

Sample	고유점도 (dℓ/g)
난각막 단백질 (1.25N NaOH, 70% 에탄올)	0.0415
난각막 단백질 (0.75N NaOH, 50% 에탄올)	0.0533

(5) 수용화된 난각막 및 알끈 단백질의 분자량 측정

SDS-PAGE를 이용하여 난각막 단백질의 분자량을 알아보았다 (Fig. 3.). Fig. 3의 A의 band (a)와 (b)에 나타난 바와 같이 알칼리 처리에 의해서 얻어진 수용성 난각막 단백질은 분자량이 20,000 dalton 이하인 단백질의 혼합물임을 알 수 있었다. GPC를 이용하여 측정한 난각막 및 알끈 단백질의 분자량은 Table 5와 같으며 Fig. 4는 chromatogram을 나타낸다. SDS-PAGE에서 예상한 대로 난각막 단백질의 분자량은 20,000 dalton 이하였으며, 알끈단백질은 40,000 dlaton 이상의 분자량 분포를 나타내었다. Fig. 4의 chromatogram에서 알 수 있듯이 다른 처리조건에서 얻은 2종류의 난각막 단백질의 분자량 profile은 거의 유사하였다. 이 결과로 보아 두 종류의 조건의 수용화효율은 차이가 나지만 비슷한 분자량 분포를 갖는 단백질로 분해되는 것으로 생각된다.

다. 생산 단백질에 대한 가수분해 효소 활성 연구

11종의 상업용 단백질 가수분해 효소로 수용화된 난각막 단백질을 가수분해한 후 GPC를 이용하여 가수분해되는지를 알아보았다. Flavourzyme, Maxazyme NMP, Peptidase FP, Sumyzyme에서 분해물 peak를 확인할 수 있었으나 가수분해정도는 미미하였다. 효소처리 후의 난각막 단백질(1.25N NaOH, 70% 에탄올)의 GPC profile은 Fig. 5와 같다.

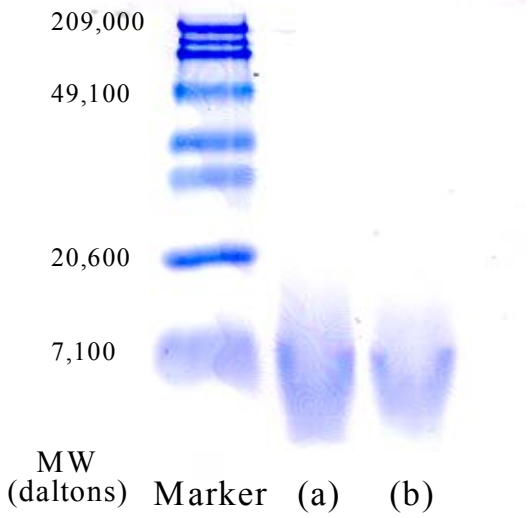

Fig. 3. 난각막 단백질의 SDS-PAGE 분석
(a) 1.25N NaOH, 70% 에탄올
(b) 0.75N NaOH, 50% 에탄올

Table 5. GPC로 측정한 난각막 및 알끈 단백질의 분자량

Sample	분자량(D)
난각막 단백질 (1.25N NaOH, 70% 에탄올)	18,640
난각막 단백질 (0.75N NaOH, 50% 에탄올)	18,683
알끈 단백질	44,999

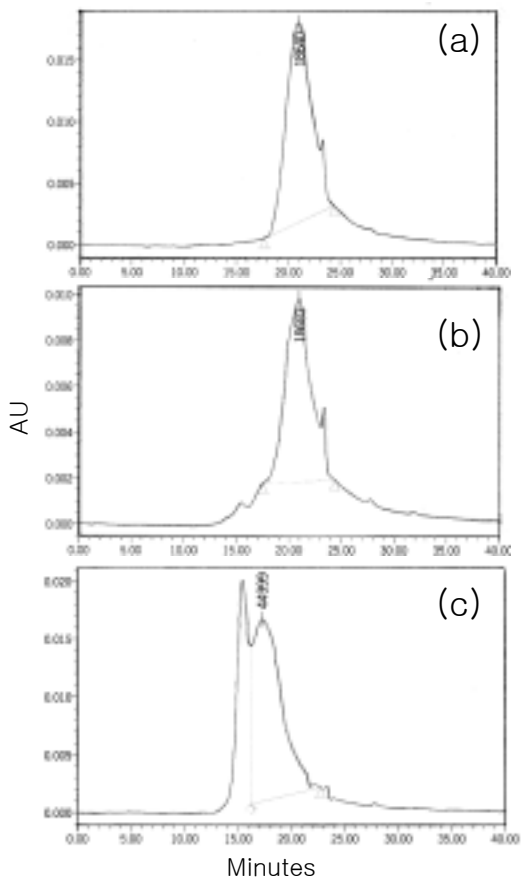

Fig. 4. 난각막 단백질과 알끈단백질의 GPC 분석
(a) 난각막(1.25N NaOH, 70% 에탄올)
(b) 난각막(0.75N NaOH, 50% 에탄올)
(c) 알끈

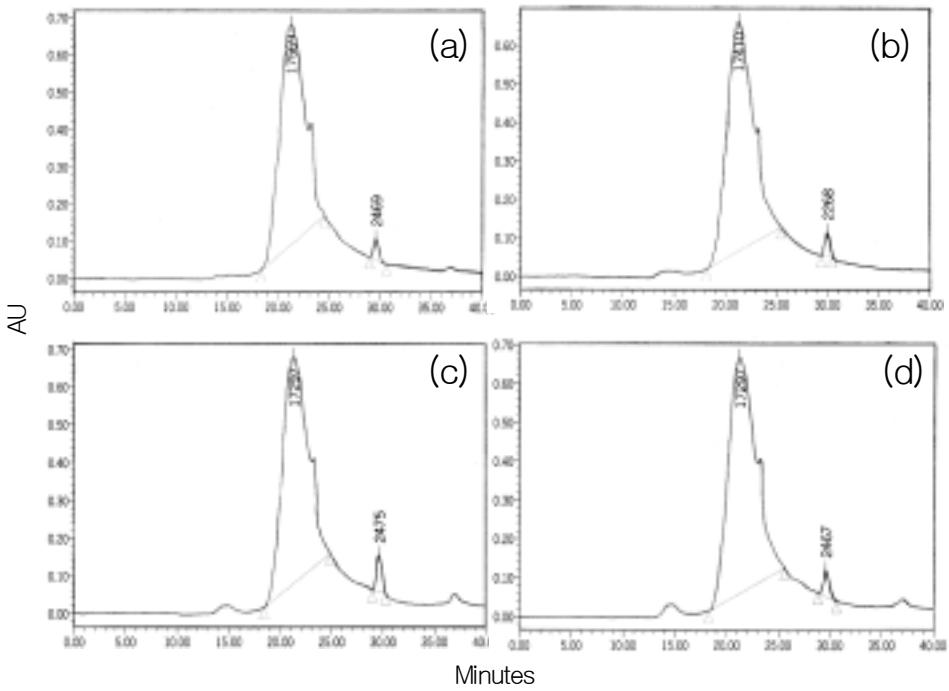

Fig. 5. 효소처리 후의 난각막 단백질의 GPC profile
(a) Flavourzyme, (b) Maxazyme NMP, (c) Peptidase FP, (d) Sumyzyme

3. 난각막 및 알끈의 현장 생산

현재 (주)가농바이오의 생산현장에서는 난각막과 알끈이 계란을 가공하는 과정에서 다량의 부산물로서 발생하고 있다. 다음은 (주)가농바이오의 난각막 및 알끈의 연간 생산현황을 요약한 것이다.<기준 : 계란 1개 평균무게 60g>

○ 연간 계란생산량 : 146백만개
○ 연간 계란 가공량 : 73백만개(연간 생산량의 약 50%) → 4,380 ton

○ 계란 1개 가공시 : 난각막 0.4g, 알끈 0.15g 발생
○ 연간 난각막 생산량 : 27,000㎏ (dry weight)
○ 연간 알끈 생산량 : 9,600㎏ (dry weight)

가. 난각막(Egg Shell Membrane : ESM)의 공정별 수율

Egg
↓
Washing & rinsing
↓
Egg breaking
↓
1st Separation of liquid egg from egg shell
↓
Isolation of egg shell
↓
2nd Separation of liquid egg from egg shell
↓
1st Isolation of ESM from egg shell
↓
1st Separation of ESM from egg shell
↓
2nd Isolation of ESM from egg shell
↓
2nd Separation of ESM from egg shell
↓
Egg Shell Membrane(ESM)

Scheme. 1 Isolation procedure of egg shell membrane

Washing & rinsing stage

Egg shell 표면에 건조된 이물질에 수분함량을 증가시켜 brushing전에 washing 효율을 증가시킬 목적으로 soaking 방식을 채택하고 soaking 시간은 계란 한 개당 약 2~4분을 설정한다. Soaking이 끝난 후 belt conveyor에 의하여 soaking된 계란은 brush로 이동되어진다. 이동되어진 계란은 1차, 2차에 걸쳐 brush에 의한 washing이 이루어지는데 이때에 brush의 강도는 egg shell 표면에 무리한 pressure를 주지 않아야 한다. 이때에 egg shell cuticle은 brush의 pressure에 의하여 제거

되어진다. 위의 과정을 거친 후 rinsing nozzle을 통하여 액화된 이물질을 제거하게 된다.

Egg breaking(30,000EA/h)

Rinse가 끝난 후 breaking 과정을 위하여 breaker holder로 투입되기전 holder 위의 계란의 position의 정확도를 높이기 위하여 정열 conveyor를 사용하게 된다. 정렬된 계란은 파손을 최대한 줄이기 위하여 할란 원반의 center가 아닌 운동방향의 역방향으로 운동분력을 감안하여 원반투입구의 position을 정하게 된다. 이때에 할란 최대속도를 감안한 운동분력으로 계산하여야 한다.

1st seperation of liquid egg from egg shell

난각으로부터 액란을 효율적으로 제거하기 위하여 할란후 breaker holder는 egg shell이 열려져서 아래방향으로 open된 상태로 10초이상을 유지하게 된다. 이과정을 통하여 1차로 액란은 egg shell로부터 효율적으로 제거된다.

Isolation of egg shell

Egg shell을 collection하기 위하여 고압의 air를 사용하여 egg shell을 holder로부터 이송conveyor로 불어서 운반하게 된다.

2nd seperation of liquid egg from egg shell

완벽하게 liquid egg를 egg shell로부터 제거하기 위하여 원심분리의 개념을 사용하여 liquid egg를 분리시킨다. 이때 egg shell은 약 1㎠의 크기로 일정하게 파쇄되며 액란은 90% 이상의 효율로 제거된다.

1st Isolation of ESM from egg shell

1㎠의 크기로 파쇄된 egg shell은 약 0.01㎠의 크기로 재파쇄되는데 이때에 isolation의 효과를 높이기 위하여 hammer의 원리를 이용하여 충격을 가하게 된다.

1st seperation of ESM from egg shell

난각의 난각막은 그 비중이 작고 난각의 칼슘부분은 그 비중이 크므로 바로 전단계의 과정을 거쳐 isolated된 난각막을 비중의 차이를 이용하여 난각으로부터 분리한다.

2nd Isolation of ESM from egg shell

1차분리된 난각막이외의 잔사물은 다시 한 번 hammer의 원리를 이용하여 충격을

가하여 난각막을 난각으로부터 분리한다.

2nd seperation of ESM from egg shell

1차분리 방법과 같은 비중을 이용하여 난각막을 분리한다.

현재 난각막의 생산에 있어서 최종 분리되어 회수되는 난각막의 양은 원란의 약 80% 수준으로 조사되었다. 이는 위의 scheme 1.에서 보듯이 각 공정을 거치면서 20%의 손실(loss)을 나타낸다.

손실량(20%)을 공정별로 보면 다음과 같다.

㉠ Egg breaking stage	2%
㉡ 1st seperation of liquid egg from egg shell	2%
㉢ 2nd seperation of liquid egg from egg shell	2%
㉣ 1st seperation of ESM from egg shell	8%
㉤ 2nd seperation of ESM from egg shell	6%

나. 알끈(chalazae)의 공정별 수율

Egg
↓
Washing & rinsing
↓
Egg breaking(30,000EA/h)
↓
Seperation of egg white & egg yolk
↓
Seperation of chalazae from egg white

Scheme. 2 Isolation procedure of chalazae

위의 Scheme. 2의 알끈의 전처리공정 중 개선되어져야 할 부분은 난백분리후 filtering의 과정과 건조과정이다.

현재의 filtering과정은 할란후 난백을 수집하는 과정에서 난각 및 알끈이 filter에 여과되는데 혼합되어진(뭉치어진) 난각과 알끈에서 알끈만을 분리하기가 어렵고 filtering되어지는 수율이 10%밖에 되지 않는 단점이 있다. 또한 건조방식도 난각막과 마찬가지로 가열을 하지 않는 동결건조의 방식 등이 연구되어져야 할 것이다.

제 2 절. 계란 알끈을 이용한 시알릴올리고당의 생산기술에 관한 연구

1. 서 론

계란(Hen eggs)은 인체에 필요한 각종 영양성분이 고루 풍부하게 포함되어 있어 완전식품으로 알려져 있으며, 영양학적인 측면 이외에 각종 생물활성을 갖는 유용 물질들이 다수 포함되어 있어 산업적으로 다양한 식품 및 생물소재의 생산에 많이 이용되고 있다[1].

계란을 가공하여 난백과 난황을 분리하는 과정에 알끈(chalaza)이 가공 부산물로서 발생한다. 알끈은 두꺼운 알부민(albumen)과 유사한 조성을 갖는 끈 모양의 구조로서, 난황을 달걀의 중앙에 고정시키고 껍질(shell) 내부에 대한 충격으로부터 난황(yolk)과 배(embryo)를 보호하는 역할을 한다 (Fig. 1).

알끈의 시알릭산(sialic acid) 함량은 건량기준으로 2.40%로서 계란의 다른 부위에 비하여 가장 높다(Table 1). 시알릭산의 HPLC, IR, 13C-NMR 등을 이용한 구조분석 결과에 의하면 Fig. 2의 N-acetylneuraminic acid (NANA)로 구성되어 있는 것으로 보고되었다[5,6].

생물체계에서 시알릭산(sialic acid)은 생리적 과정에 대한 조절작용과 함께 약리학적인 특성을 나타낸다. 위장장애(Gastrointestinal disturbances)를 막고, 독성물질을 중화시키며, 가래를 제거하고, 세포 증식을 조절하며, 약리학적인 이용을 위해 생화학적 유도체로 만들어지기도 한다. 또한, 세포막을 통하여 이온(ions), 아미노산, 바이러스(viruses)의 이동에도 중요한 역할을 한다[7].

생체내 세포막에서 시알릭산(sialic acid)을 포함하는 당지질은 박테리아 독성물질에 대한 수용체로써의 기능을 한다[8,9]. 즉, 하나 이상의 sialic acid를 포함하는 ganglioside는 전체적으로 음전하를 띠게 되고, 콜레라 독성물질은 이런 ganglioside를 포함하는 세포막에 잘 결합하여 세포내로 유입하며, 세포내 cyclic AMP를 증가시켜 Na^+과 물을 밖으로 내보내 결국 설사를 일으키게 된다[10]. 시알릭산을 포함한 시알릴올리고당(sialyloligosaccaharides)은 이런 독성 물질과 결합하여 콜레라에 의한 설사를 막을 수 있다. 백혈구의 세포막에는 시알릭산을 포함하는 당지질이 있다. 만약 세포가 감염되면, 감염된 세포의 렉틴(lectin)은 시알릭산을 포함하는 당지질을 인식하여 백혈구와 결합함으로써 정상적인 면역 기능을 하게 된다.

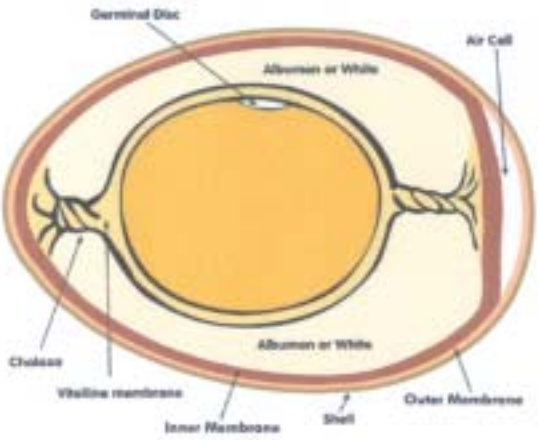

Fig. 1. Structure of the hen egg[2].

Table 1. Sialic acid content in several fractions of hen egg[3,4]

Fractions	Qty.	Sialic acid	
	(kg/ton egg wet wt. basis)	yield (g)	yield (% as dry matter)
Eggshell	104.8	2.98	0.004
Shell membrane	6.2	1.22	0.07
Egg white	603.5	60.35	0.10
Egg yolk	281.0	267.0	0.19
Egg yolk membrane	2.3	3.52	1.80
Chalaza	2.2	3.96	2.40

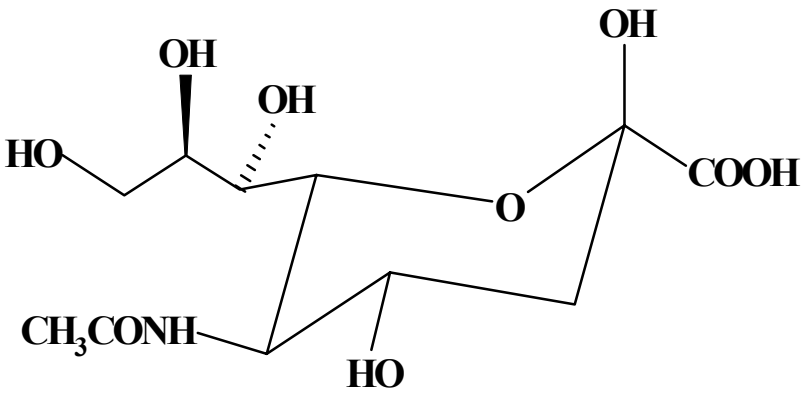

Fig. 2. Structure of N-acetylneuraminic acid[5].

이와 같이 시알릭산을 포함하는 당지질, 당단백질은 생체내에서 여러 가지 대사에 필요한 물질의 이동 및 면역 기능에 중요한 역할을 한다[11]. 현재 시알릭산을 포함하는 물질이 항바이러스제, 설사치료제, 항궤양제, 항염제, 항알러지제 등으로 이용되고 있으며, 아울러 비피도박테리아(Bifidobacteria)의 증식도 촉진하는 기능이 있는 것으로 보고되어 있다[12~14].

생체내에서 시알릭산은 단독으로 존재하기 보다는 대부분 당·혹은 펩타이드(peptide)화 결합된 상태 즉, 시알릴올리고당(sialyloligosaccharide)이나 시알릴글라이코펩타이드(sialylglycopeptide)의 형태로 존재한다. Fig. 3은 계란내에서 발견되는 대표적인 시알릴올리고당을 나타내는 것이다. 이러한 시알릴올리고당내의 시알릭산에 결합되는 당의 종류와 결합 방식은 분포위치에 따라 각각 상이하게 나타난다.

시알릴올리고당은 계란내의 난황, 난백, 알끈 등에 골고루 분포하고 있으며, 이 가운데 알끈에 분포밀도(distribution density)가 가장 높다. 계란의 시알릴올리고당은 학습능력과 면역기능을 향상시키는 작용이 있어 유아 식품에 많이 활용되고 있으며, 다양한 생리활성 때문에 기능성 식품 및 생물 소재로서의 이용가능성이 매우 높다[16].

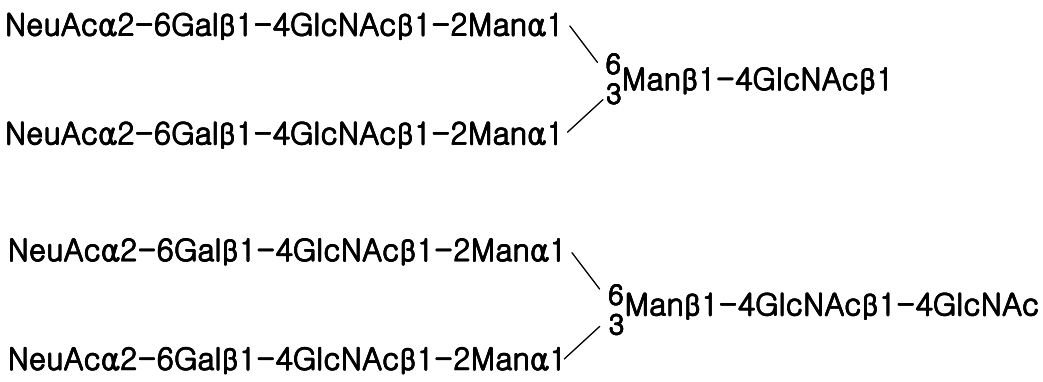

Fig. 3. Structure of sialyloligosaccharide in hen's egg[15].

계란의 알끈에는 다량의 시알릴올리고당이 분포하고 있으나, 현재까지는 알끈으로부터 시알릴올리고당을 효율적으로 생산하는 기술이 보고된 바 없다. 따라서 시알릴올리고당의 식품 및 생리학적인 기능성을 고려 할 때 알끈으로부터 시알릴올리고당을 생산하는 기술의 개발이 산업적으로 요구되고 있다.

따라서 본 연구는 계란가공부산물로서 발생하는 알끈으로부터 생리활성 식품 생물소재로 주목을 받고 있는 시알릴올리고당의 분석 기술을 확립하고 효율적 생산기술을 개발하는 것을 목적으로 하였다.

2. 실험 재료 및 방법

가. 계란 알끈 시료

본 실험에서는 시중에서 판매되는 계란을 구입하여 수작업을 통해 알끈을 회수하였다. 계란 알끈에 부착되어 있는 난백을 제거하기 위하여 알끈을 2% KCl 용액에 넣고 교반한 후 50 mesh 체로 여과하였다. 이 과정을 수 차례 반복한 다음 증류수로 세척하여 난백이 완전히 제거된 알끈을 회수하였다. 순수 분리된 알끈은 동결건조하여 건조중량을 구하였고, 이를 분쇄하여 50 mesh 체에 사용하여 균일한 입자의 알끈 시료 분말을 제조하였다[17].

나. 계란 알끈에 대한 단백질 가수분해 효소 처리

계란 알끈의 단백질을 가수분해하기 위하여 상업적으로 판매되는 식용 가능한 단백질 가수분해 효소(proteases) 6종을 사용하였다(Table 2). 그 가운데

Alcalase, Neutrase, Protamex, Flavourzyme는 Novo Nordisk사(Denmark)로부터, Collupulin, Maxazyme은 Gist-brocades사(France)로부터 구입하여 추가적인 정제과정 없이 가수분해 공정에 사용하였다.

알끈 단백질을 가수분해 하기 위해 10 mM potassium phosphate buffer 100 ml에 알끈 시료 0.2 g과 각각의 protease 0.02 g을 넣은 후 30분 동안 반응하였다. 이때 Alcalase는 온도 60℃, pH 8.0에서, Neutrase, Protamex, Maxazyme는 온도 50℃, pH 6.0에서, Flavourzyme는 온도 50℃, pH에서 7.0, 그리고 Collupulin의 경우는, 온도 60℃, pH 6.0에서 가수분해하였다. 가수분해 반응이 끝난 후 효소를 불활성화 시키기 위해 100℃에서 20분간 가열하였다.

Table 2. Characteristics of commercial proteases

Enzymes	Sources	Optimal pH	Optimal Temp(℃)	Manufacturers
Alcalase	*Bacillus licheniformis*	6.5 ~ 8.5	55 ~ 70	Novo Nordisk Co. (Denmark)
Neutrase	*Bacillus amyloliquefaciens*	5.5 ~ 7.5	45 ~ 55	
Protamex	*Bacillus* protease complex	5.5 ~ 7.5	35 ~ 60	
Flavourzyme	fungal protease /peptidase complex	7.0	50	
Collupulin	*Carica papaya* (plant)	5.0 ~ 7.5	50 ~ 70	Gist-brocades Co. (France)
Maxazyme	*Bacillus subtillus*	6.5 ~ 7.5	45 ~ 50	

다. Proteases에 의한 알끈 가수분해율 측정

각 protease의 알끈 가수분해율을 측정하기 위해 2.2의 효소조건에 따라 가수분해한 후 여과지(Advantec No. 2)를 이용하여 여과하였다. 여과지에 남아있는

가수분해가 안된 알끈 시료는 여과지에 거른 후 80℃ dry oven에서 4시간 동안 건조한 다음, desiccator에 30분간 방치한 후 중량을 측정하였다. 여과지에 남아 있는 건조된 알끈시료의 중량에서 여과지의 중량을 뺀 값을 초기 알끈 시료에 대한 중량비로 환산하여 효소별 가수분해율(%)을 측정하였다.

라. Proteases의 효소활성

상업용 효소 6종에 대한 알끈 가수분해 시료를 여과한 후 얻어진 여과액으로부터 protease의 specific activity를 측정하였다. 각 효소액의 총 protein 함량은 Bradford 법[18]으로 측정하였으며, 계란 알끈을 효소처리 하여 얻어진 amino acid 함량은 Ninhydrin 법[19]으로 측정하였다. 이때, 알끈을 효소반응 처리후 1 분당 aspartic acid 1 ㎍을 생성하는 것을 1 unit로 정의하였다. Protease의 효소활성과 알끈의 가수분해율을 종합적으로 고려하여 알끈의 가수분해에 가장 적절한 protease를 선정하였다.

마. Sialylglycopeptide의 제조

알끈을 가수분해 하기 위해 10 mM potassium phosphate buffer(pH 8.0) 100 ml에 알끈 시료 2 g과 Alcalase 0.2 g을 넣은 후 60℃에서 60분간 반응하였다. 효소반응이 끝난 후 100℃에서 20분간 가열하여 효소를 불활성화 하였다. 알끈 가수분해 시료는 한외여과기(Amicon TCF-10; Amicon Co., USA)를 이용하여 분자량에 따라 10,000 이상, 3000～10,000, 1,000～3,000, 1,000 이하로 분획하였다. 각 분자량별로 얻어진 시료는 동결건조하여 수율을 계산하였다.

분자량 10,000 이상의 분획에 존재하고 있는 sialylglycopeptide를 분리하기 위해 Sepadex G-50 superfine(Sigma Co., USA)을 1.5x30 cm 컬럼(column)에 충전한 뒤 겔여과(gel filtration) 하였다[20]. 이 때의 분획물은 0.1 M NaCl을 이용하여 0.3 ㎖/min의 속도로 용출 하였으며, fraction collector를 이용하여 각 tube에 3 ml씩 분취하였다. 각 분획의 sialic acid는 periodate-resorcinol법[21], hexose는 phenol-sulfuric법[22], protein은 UV 280 nm[23]에서 측정하였다.

바. Sialyloligosaccharide의 제조

위에서 서술한 sialylglycopeptides에 존재하는 상당량의 peptides를 제거하기 위해 상업용 peptidase를 병행하여 처리하였다. 우선 알끈 단백질을 가수분해 하기 위해 10 mM potassium phosphate buffer(pH 8.0) 100 ml에 알끈 시료 1 g과 Alcalase 0.1 g을 넣은 후 60℃에서 60분간 반응하였다. 여기에 peptidase인 Kojizyme(Novo Nordisk Co.), Peptidase(Gist-brocades Co.) 혹은 Protease K(Sigma Chemical Co.)를 각각 0.1 g을 가하여 12시간 동안 가수분해한 후 100℃에서 20분간 가열하여 효소를 불활성화 하였다. 다음 효소 반응액을 6,000

rpm에서 30분간 원심분리를 한 후 상등액을 회수[15]하였다. 상등액은 한외여과기(Amicon TCF-10)를 이용하여 분자량에 따라 분자량 1,000~10,000으로 분획한 후 동결건조 하였다.

다음 sialyloligosccharides를 분리하기 위해 Sepadex G-50 superfine(Sigma Co., USA)을 1.5x30 cm 컬럼(column)에 충전한 뒤 겔여과하였다20). 이 때의 분획물은 0.1 M NaCl을 이용하여 0.3 ㎖/min의 속도로 용출 하였으며, fraction collector를 이용하여 각 tube에 3 ml씩 분취하였다. 각 분획의 sialic acid는 periodate-resorcinol법[20], hexose는 phenol-sulfuric법[21], protein은 UV 280 nm[22]에서 측정하였다.

사. Recycle HPLC에 의한 sialyloligosaccharide 분리정제

Alcalase와 Kojizyme으로 가수분해한 후 한외여과에 의하여 분획된 성분을 분리정제하기 위해서 Recycle HPLC LC-918(Analtycal Industry Co., Japan)을 이용[24]하였다(Table 3). 분자량별 분획에 사용된 GPC column은 GS-310이며, guard column으로는 GS-P를 사용하였다. 이 때 시료의 농도는 1%로 하였고 2 ml를 투입하였다. 용출액은 증류수를 이용하였으며, 용출속도는 5 ml/min로 하였다. Sialyloligosaccharide는 RI detector에서 확인한 후 분취하였다.

아. Sialyloligosaccharide의 구성성분 분석

단일 성분으로 분리 정제된 sialyloligosaccharide의 주요 구성성분인 시알릭산과 구성당은 high performance anion exchange chromatography- pulsed amperometry detector (HPAEC-PAD; Dionex-500 Bio-LC, USA)를 사용하여 측정[25,26]하였다.

시알릭산은 Jeffrey 등[27]의 방법에 의해 측정하였다. 시료 2 mg에 0.1 N HCl 400 ㎕를 넣고 80℃에서 1시간 동안 가수분해하였다. 가수분해가 끝난 후 N2 gas를 이용하여 0.1 N HCl를 제거한 다음, 시료를 1 ㎖의 증류수로 녹인 후 Table 4와 같은 조건으로 분석하였다. 이 때 시알릭산 분석용 컬럼은 Carbopac PA1(Dionex Co., USA)을 사용하였다. 용출액은100 mM NaOH이며 flow rate는 1 ㎖/min로 하였다.

Table 3. Recycle HPLC conditions for sialyloligosaccharide analysis

Model	LC 918 system
Column	JAIGEL GS-310 JAIGEL GS-P Guard
Detector	RI X 2000
Eluent	Distilled water
Flow rate	5 ㎖/min

Table 4. HPAEC-PAD conditions for sialic acid analysis

Model	Dionex-500 Bio-LC system
Column	Carbopac PA1 Carbopac PA1 Guard
Detector	Pulsed amperometry
Eluent	100 mM NaOH
Flow rate	1 ㎖/min

Fig. 4는 HPAEC-PAD를 이용하여 sialic acid를 농도별로 분리한 chromatogram을 나타낸 것이며, Fig. 5는 본 연구에서 사용한 대표적인 sialic acid의 표준곡선을 나타낸 것이다. 그림에서 HPAEC-PAD에 의해 sialic acid가 농도별로 매우 잘 분리되는 것을 알 수 있다.

Sialylologosaccharide의 구성당인 hexoses와 N-acetylhexosamine은 Niclas 등 28)의 방법에 의해 측정하였다. 시료 5 ㎎에 4 M TFA(trifluoroacetic acid) 0.25 ml를 넣고 100 ℃에서 4시간 동안 가수분해한 후 N2 gas를 이용하여 4 M TFA를 제거하였다. 이 때 가수분해 과정에서 N-acetylglucosamine(GlcNAC)과 N-acetylgalactosamine(GlaNAC)의 아세틸기가 탈아세틸화 되기 때문에 re-N-acetylation을 하기 위해 1 M sodium bicarbonate 4.8 ml과 acetic acid anhydride 0.2 ml을 넣고 25분 동안 진탕하였다. 이 때 사용된 column은 Carbopac MA1 (Dionex Co., Sunnyvale, CA)이며 gradient A eluted buffer는 1 M NaOH 48 %, gradient B eluted buffer는 DW 52 %로서 flow rate는 0.4 ㎖/min로 하여 Table 5의 조건에 따라 분석하였다.

Fig. 6은 HPAEC-PAD를 이용하여 galactose, glucose, mannose,

N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine의 분리를 농도별로 나타낸 것이다. 그림에서 5개의 표준당이 매우 뚜렷하게 분리되는 것을 알 수 있는데, 이는 N-acetylglucosamine과 hexose가 동시에 분리측정될 수 있음을 의미한다. Fig. 7은 5개의 표준당에 대한 대표적인 standard curve를 나타낸 것으로 농도에 대해 모두 직선관계를 나타내었다.

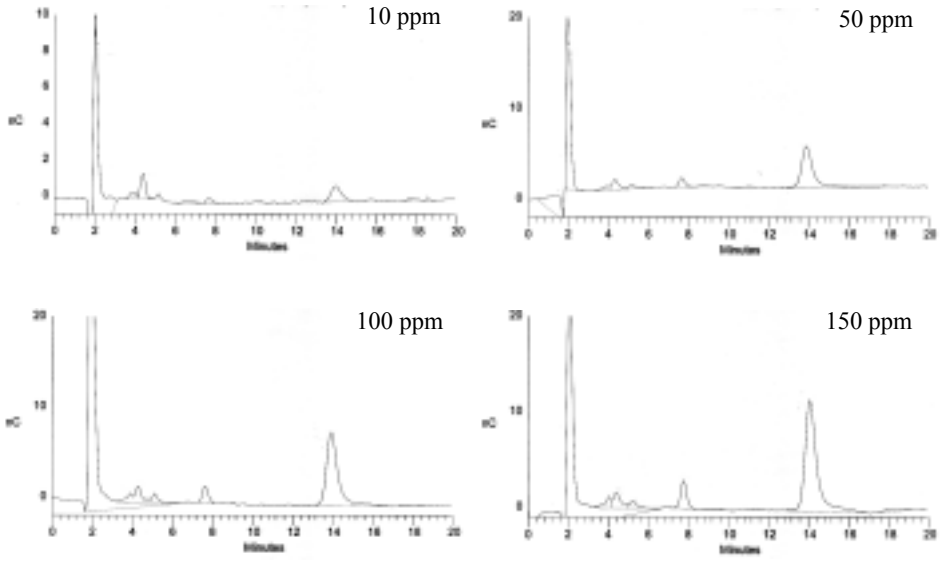

Fig. 4. Separation of sialic acid by HPAEC-PAD.

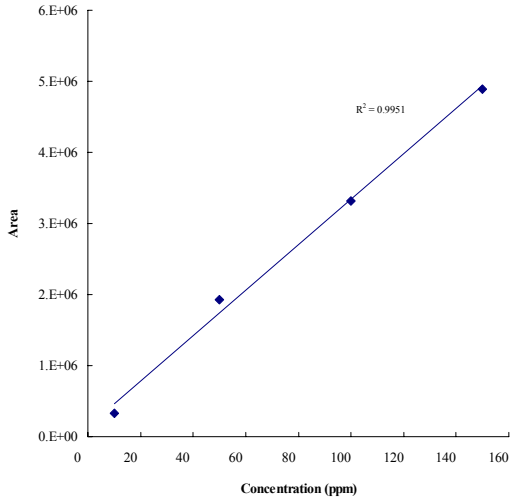

Fig. 5. A typical standard curve for sialic acid.

Table 5. HPAEC-PAD conditions for hexose and N-acetylhexosamine analysis

Model	Dionex-500 Bio-LC system
Column	Carbopac MA1 Carbopac MA1 Guard
Detector	Pulsed amperometry
Eluent	A eluent : 1 M NaOH 48% B eluent : Water 52%
Flow rate	0.4 ㎖/min

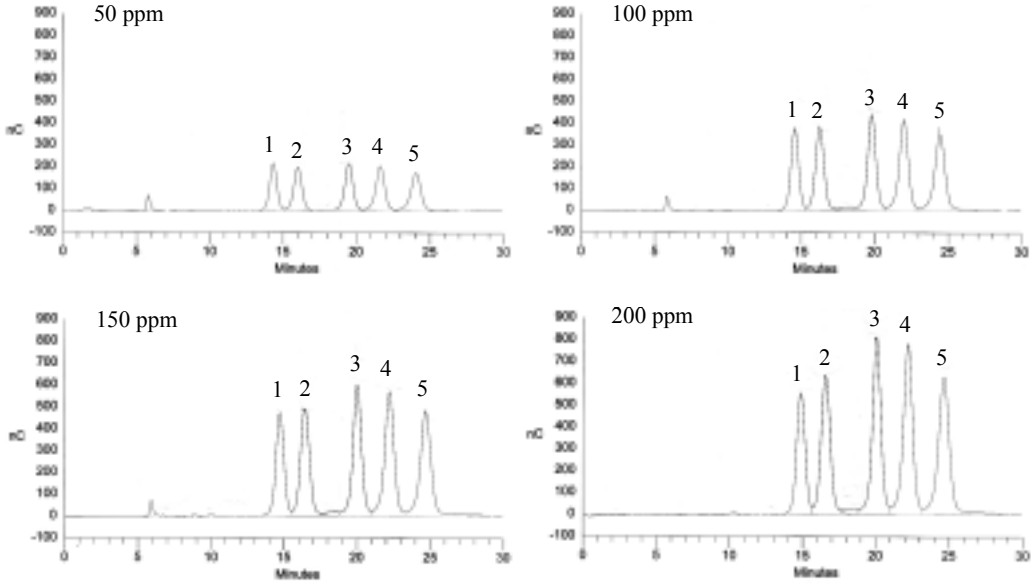

Fig. 6. Separation of hexose and N-acetylhexosamin by HPAEC-PAD.
1 : GlcNAC, 2 : GalNAC, 3 : Mannose, 4 : Glucose,
5 : Galactose

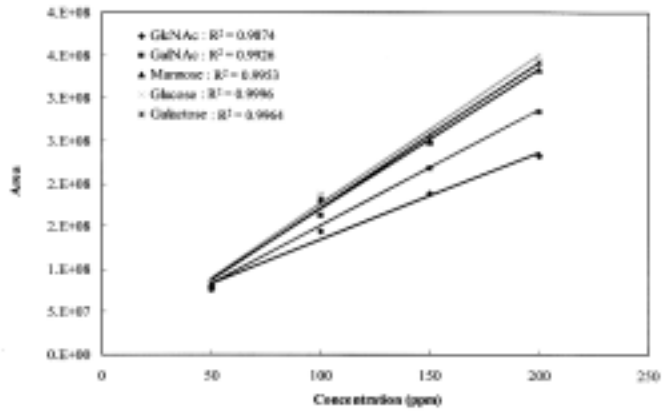

Fig. 7. A typical standard curve for hexose and N-acetyl hexosamine by HPAEC-PAD.

3. 결과 및 고찰

가. 상업용 Proteases의 효소활성

알끈에 대해 상업용 효소의 활성을 알아보기 위하여, 알끈 단백질을 각 효소를 이용하여 가수분해한 후 protease의 specific activity를 구하였다(Table 6). 표에 나타난 바와 같이 효소의 specific activity는 Alcalase가 2.24 unit/㎍으로 다른 효소에 비해 월등히 우수했으며, 다음으로는 Flavourzyme 0.93 unit/㎍, Collupulin 0.58 unit/㎍, Maxazyme 0.51 unit/㎍, Neutrase 0.35 unit/㎍, Protamex 0.24 unit/㎍ 의 순으로 나타났다.

나. 상업용 proteases의 알끈 가수분해율

본 연구에서는 불용성 단백질로 구성되어 있는 알끈을 단백질 가수분해 효소(protease)를 사용해서 가수분해함으로써 알끈내에 존재하는 sialyloligosaccharide를 용이하게 생산하고자 하였다. 이러한 목적으로 상업용으로 판매하고 있는 protease 가운데 식품에 사용이 가능한 6종의 효소를 선정하였다(Table 2).

알끈에 대하여 6종의 proteases를 처리하였을 때의 가수분해율을 Table 7에 나타내었다. 알끈 가수분해물은 Alcalase 98.8%, Collupulin 81.4%, Protamex 68.9%, Flavourzyme 45.0%, Maxazyme 35.9%, Neutrase 35.6%의 순으로 나타났다. 즉, 본 연구에서 사용한 효소 가운데 알끈에 대한 가수분해율은 Alcalase가 가장 우수하였다.

위의 실험결과를 토대로 알끈 단백질에 대한 가수분해율과 specific activity가 가장 높은 Alcalase를 최적 가수분해 효소로서 선정하였다.

Table 6. Specific activity of commercial proteases

Enzyme	Protein (㎍/㎖)	Activity (Unit/㎖)	Specific activity (Unit/㎍)
Alcalase	29	65.0	2.24
Neutrase	26	9.0	0.35
Protamex	49	11.9	0.24
Flavourzyme	37	34.4	0.93
Collupulin	52	30.1	0.58
Maxazyme	12	6.1	0.51

Table 7. Hydrolysis yield of commercial proteases on chalaza

Enzyme	Hydrolysis Yield (%)
Alcalase	98.8
Neutrase	35.6
Protamex	68.9
Flavourzyme	45.0
Collupulin	81.4
Maxazyme	35.9

다. Sialylglycopeptide의 제조

효소활성이 가장 뛰어난 Alcalase로 알끈을 가수 분해 한 후 한외여과에 의해 분자량별로 분리한 결과를 Table 8에 나타내었다. MWCO>10,000 분획의 수율은 22%, sialic acid 함량 23.0%, hexose 함량 32.0%, amino acid 함량 45.0%로 측정되었다. 특히 대부분의 시알릭산이 MWCO>10,000에서 분획되었으며, 시알릭산 이외에 당성분과 아미노산 성분이 함께 검출되어 sialylglycopeptide로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

MWCO 3,000~10,000에서의 yield는 16%, sialic acid 함량은 1.7%, hexose 함량은 11.0%, amino acid 함량은 87.3%로 나타내었다. MW 1,000~3,000에서의 yield는 58%, sialic acid 함량은 0%, hexose 함량은 9.1%, amino acid 함량은 90.9%로 나타났으며, MW <1,000의 yield는 4%, sialic acid와 hexose 함량은 0%, amino acid 함량은 100%로 확인하였다. 따라서 MWCO<10,000의 분획에서는 상대적으로 미량의 시알릭산만이 발견되었다.

이러한 결과는 알끈을 상업용 단백질 가수분해 효소(Alcalase)로 처리한 후 MWCO>10,000의 한외여과 공정에 의해 총 시알릭산의 93.1 %가 회수된 것을 의미한다. 이러한 공정은 상당히 단순하면서도 경제적인 처리공정으로서 향후에 산업적인 응용성이 기대된다.

알끈의 Alcalase 가수분해물 가운데 MW>10,000이상의 분획을 gel filtration column chromatography(Sephadex G-50 superfine)를 사용20)하여 분리한 결과 peptides가 상당히 많이 존재하는 sialylglycopeptide임을 알 수 있었다(Fig. 8). 이러한 결과는 전체적으로 Table 8에서 나타낸 구성성분의 분포와 일치한다. Sialylglycopeptide의 전기적 특성을 고려하여 DEAE Sephadex A-25를 이용하여 분리29,30)한 ion exchange chromatography의 결과 Fig. 9에 나타낸 바와 같이

세 종류의 sialylglycopeptide로 뚜렷하게 분리되었다. 분리된 3 종류의 fraction에서 sialic acid, 당류, peptide가 공통적으로 발견되어 모두 sialyglycopeptide로 밝혀졌다.

Table 8. Yield and chemical composition of chalaza hydrolysates fractionated by ultrafiltration

Fractions	MW	Yield (%)	Composition (% w/w)		
			Sialic acid	Hexose	Amino acid
Ⅰ	>10,000	22	23.0	32.0	45.0
Ⅱ	3,000~10,000	16	1.7	11.0	87.3
Ⅲ	1,000~3,000	58	0	9.1	90.9
Ⅳ	<1,000	4*	0	0	100.0

* by difference

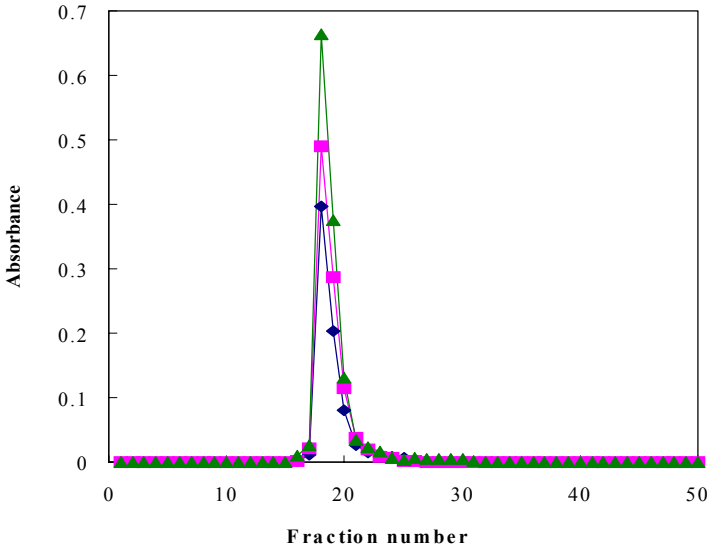

Fig. 8. Gel filtration column chromatogrphy of chalaza hydrolysates (MW〉 10,000) treated with Alcalase.

◆ ; Sialic acid (periodate-resorcinol method at 630 nm)

■ ; Hexose (phenol-sulfuric acid method at 490 nm)

▲ ; Protein (absorbance at 280 nm)

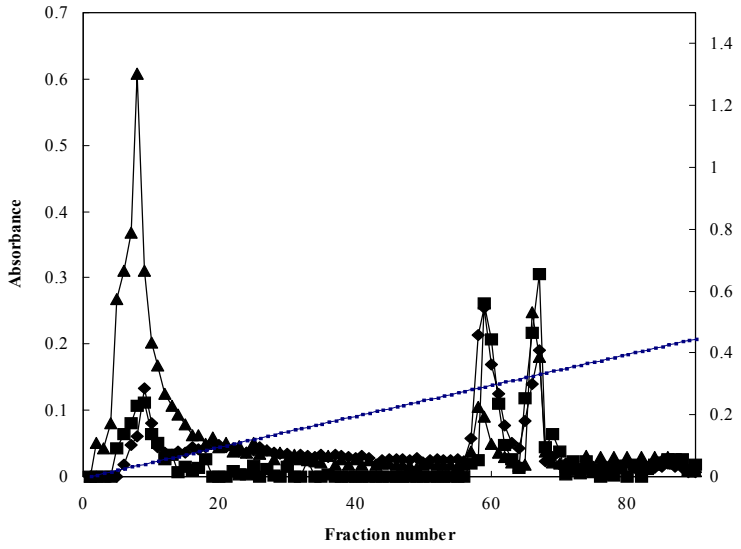

Fig. 9. Ion-exchange column chromatography of chalaza hydrolysates (MW〉 10,000) treated with Alcalase.

◆ ; Sialic acid (periodate-resorcinol method at 630 nm)
■ ; Hexose (phenol-sulfuric acid method at 490 nm)
▲ ; Protein (absorbance at 280 nm)

라. Sialyloligosaccharides의 제조

앞의 연구결과에서 나타난 바와 같이 알끈에 Alcalase을 처리한 경우에는 상당량의 peptide가 결합되어 있는 sialylglycopeptide가 제조되었다. 본 연구에서는 sialylglycopeptide로부터 peptide 성분을 가수분해 하기 위하여 Alkalase 처리후에 peptide 가수분해 효소를 병행하여 처리함으로써 peptide를 제거[31]하였다.

본 연구에서는 펩타이드 가수분해 효소로서 상업용인 Peptidase와 Kojizyme, 그리고 시약용으로서 Protease K를 Alcalase와 병행처리한 후 MWCO 1,000~10,000의 분획으로 수거한 후 gel filtration 하였다. 우선, 시약용 Protease K를 처리한 경우 sialylglycopeptide의 peptide가 거의 제거된 것을 알 수 있다(Fig. 10). Kojizyme의 경우 Protease K에 비해서 약간의 peptide가 잔류하였다(Fig. 11). 반면에, Peptidase의 경우에는 Kojizyme 보다는 상당량의 peptide가 잔류하는 것을 알 수 있었다(Fig. 12). 전체적으로 본 연구에서 사용된 peptide 가수분해 효소는 모두 sialylglycopeptide의 peptide fraction을 가수분해하는데 효율적이다. 그러나 Protease K의 경우 시약용으로서 산업적인 응용성이 없는 것을 고려하여 Kojizyme의 처리가 가장 바람직할 것으로 판단된다.

Sialyloligosaccharides를 분리 정제하기 위해 시약용 효소 또는 유기용매를 사용하는 것으로 보고된 바 있다[14,22,32]. 그러나 본 연구에서는 인체에 무해한 상업용 protease와 peptidase 효소를 사용함으로써 sialyloligosaccharides를 효율적으로 생산할 수 있다는 결과를 보였으며, 이는 충분히 산업적인 응용가능성을 제시하는 것이다.

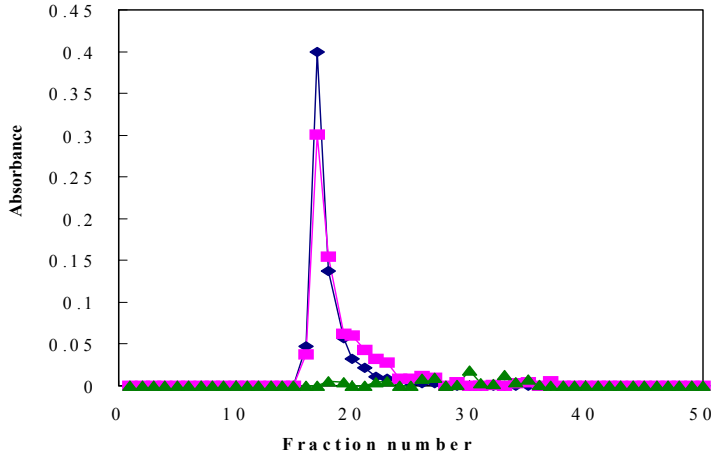

Fig. 10. Gel filtration column chromatogrphy of Protease K treated sialyloligosaccharide.

◆ ; Sialic acid (periodate-resorcinol method at 630 nm)
■ ; Hexose (phenol-sulfuric acid method at 490 nm)
▲ ; Protein (absorbance at 280 nm)

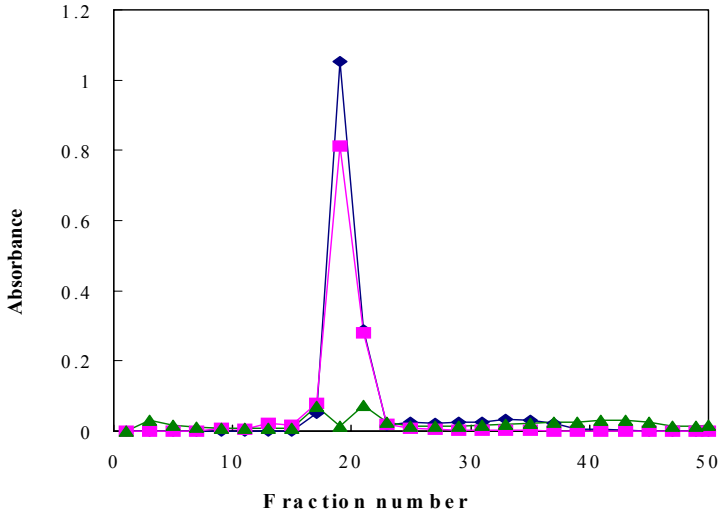

Fig. 11. Gel filtration column chromatogrphy of Kojizyme treated sialyloligosaccharide.

◆ ; Sialic acid (periodate-resorcinol method at 630 nm)
■ ; Hexose (phenol-sulfuric acid method at 490 nm)
▲ ; Protein (absorbance at 280 nm)

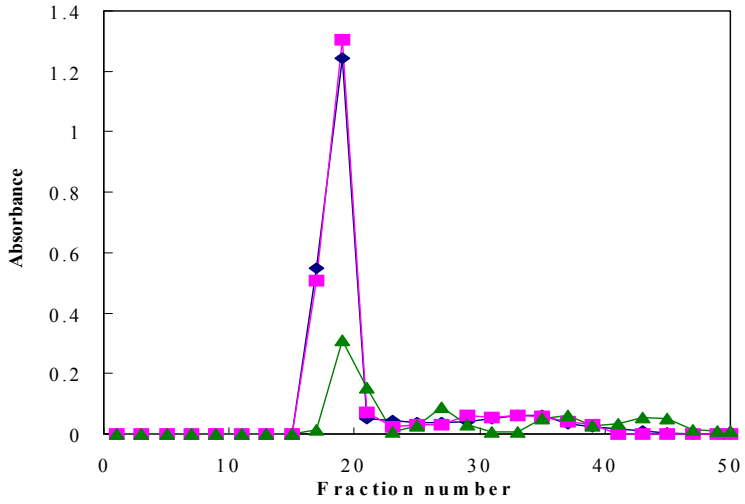

Fig. 12. Gel filtration column chromatogrphy of Peptidase treated sialyloligosaccharide.

◆ ; Sialic acid (periodate-resorcinol method at 630 nm)
■ ; Hexose (phenol-sulfuric acid method at 490 nm)
▲ ; Protein (absorbance at 280 nm)

마. Recycle HPLC에 의한 sialyloligosaccharide의 분리정제

본 연구에서는 보다 순수한 sialyloligosacharide의 분리를 위해 GS-310 column을 장착한 Recycle Prep HPLC LC-918(Analtycal Industry Co., Japan)을 사용하였다. 그 결과 Fig. 13에 나타낸 바와 같이 두 개의 뚜렷한 분획을 얻을 수 있었다.

바. Sialyloligosaccharide의 구성성분 분석

일반적으로 sialyloligosaccharide에 존재하는 당의 분석은 당의 휘발성 유도체

의 제조 후에 gas chromatography(GC)를 이용하여 분석33)하였으며, 당성분 중에 N-acetylglucosamine(GlcNAC)과 N-acetylgalactosamine(GlaNAC)의 경우는 amine기를 포함하고 있어서 amino acid analyzer를 이용34)하여 두 단계를 거쳐서 sialyloligosaccharide에 존재하는 당의 구성성분을 분석하였다. 본 연구에서는 분석상의 이러한 단점을 보완하기 위해 high-performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometry detector(HPAEC-PAD) 기기를 사용함으로써 hexose와 acetylglucosamine을 한 과정에서 성공적으로 분석할 수 있었다.

Recycle HPLC LC-918(Analtycal Industry Co., Japan)를 사용하여 분리정제된 fraction Ⅰ과 Ⅱ의 hexose 및 hexosamine의 분석 chromatogram을 각각 Fig. 14와 Fig 15에 나타내었다. Table 9는 Recycle HPLC에 의해 분리된 fraction I과 II의 sialic acid와 당조성을 나타낸 것이다. 우선 sialic acid의 경우 fraction I은 28.8%인데 비하여 fraction II는 1.9%로서 훨씬 낮게 나타났다. 이는 fraction I에 sialyloligosaccharide가 집 중적으로 분포되어 있음을 의미한다. 이러한 결과는 Recycle HPLC에 의해 보다 정제도가 높은 sialyloligosaccharide의 분리가 가능하다는 것을 의미한다.

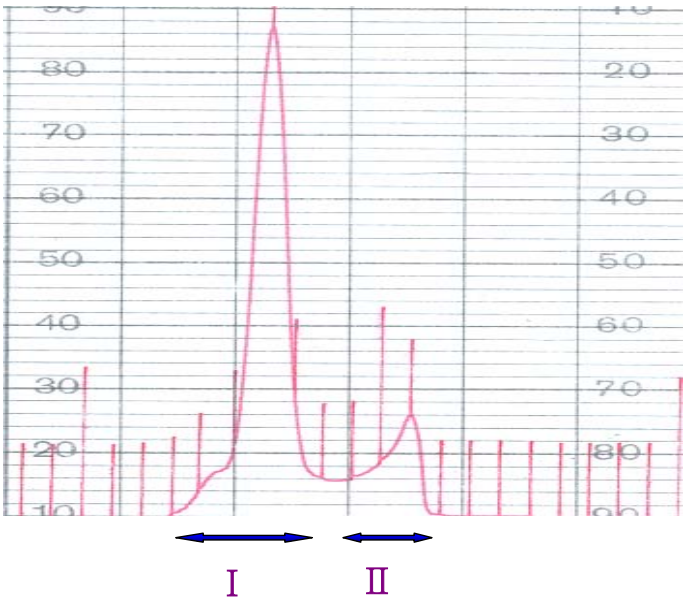

Fig. 13. Recycle HPLC of Kojizyme treated sialyloligosaccharide.

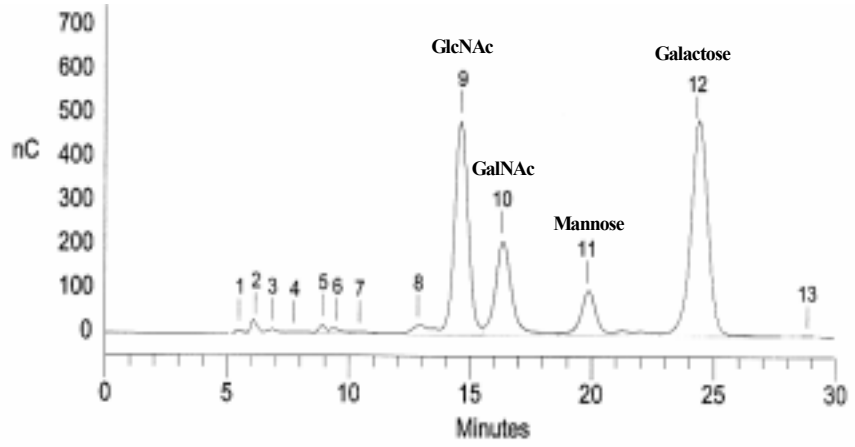

Fig. 14. HPAEC-PAD of hexose and N-acetylhexosamine in fraction I .

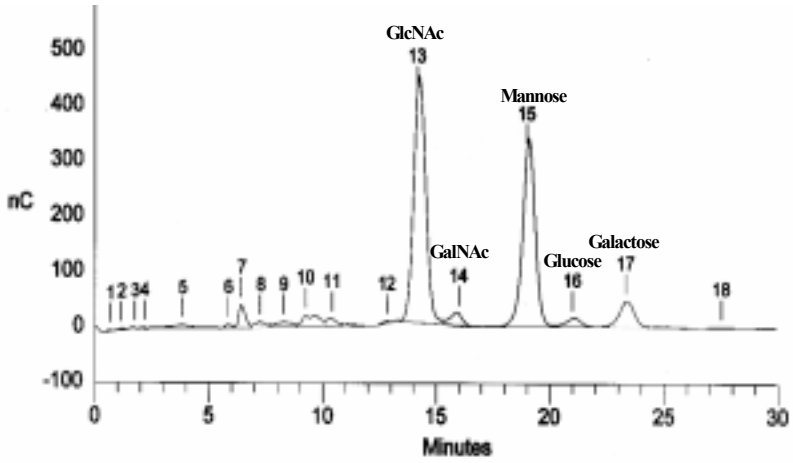

Fig. 15. HPAEC-PAD of hexose and N-acetylhexosamine in fraction Ⅱ.

Table 9. Chemical composition of sialyloligosaccharide in hen's egg chalaza

Fractions	Content (g/100 g dry matters)					
	Sialic acid	GlcNAc	GalNAc	Man	Glc	Gal
Ⅰ	28.8	28.8	14.6	4.50	0	23.3
Ⅱ	1.90	53.2	2.30	2.70	1.90	38.0

4. 결 론

계란의 알끈에는 기능성 생리활성 소재로서 알려진 sialyloligosaccharides가 다량 분포하고 있으나 현재까지 알끈으로부터 시알릴올리고당을 효율적으로 생산하는 기술이 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 계란 가공부산물인 알끈으로부터 시알릴올리고당의 효율적 생산기술을 개발하고자 하였다.

알끈의 대부분을 구성하는 단백질 matrix로부터 sialyloligosaccharides을 분리하기 위해서는 단백질 network의 가수분해가 필수적으로 요구된다. 본 연구에서는 산업적인 적용가능성을 극대화하기 위해 상업용으로 구입이 가능한 Alcalase를 알끈 단백질에 대한 최적 protease로서 발굴하였다. 또한 단순한 protease의 처리에 의해서는 상당한 양의 peptide 잔존하기 때문에 이들을 제거하기 위해 Kojizyme을 병행하여 적용하였다. 즉, Alcalase와 Kojizyme의 복합적 사용은 알끈으로부터 sialyloligosaccharides가 용이하게 제조될 수 있음을 보였다.

생물소재의 생리적인 기능성은 기본적으로 생물소재의 구조적인 특징에 의하여 결정된다. Sialyloligosaccharides의 경우 일반적인 식품생물활성에 대해서는 비교적 많은 연구결과가 보고된 바 있으나, 아직 알끈 유래의 sialyloligosaccharides에 대한 생리활성 연구는 매우 미흡하다. 따라서 알끈으로부터 분리한 sialyloligosaccharides의 생리활성에 대한 정확한 기작 연구가 충실히 이루어진다면 본 연구에서 개발된 sialyloligosaccharides의 제조기술은 산업적 생산을 위한 기초 기반기술로서 활용될 것이다.

제 3 절. 효소 가수분해한 계란 알끈 펩타이드의 혈전용해활성

1. 서 론

인체는 혈액응고계와 섬유소 용해계가 균형을 이룸으로써 지혈체계(hemostasis system)를 유지한다[1](Fig. 1). 상처 복구시 혈액응고계에서는 intrinsic pathway와 extrinsic pathway를 통해 factor X를 활성화시키고, Xa에 의해 활성화된 thrombin이 혈전을 형성한다. Thombin에 의한 fibrinogen의 활성화로 fibrinopeptides A, B를 유리시키면서 fibrin monomer를 형성하고, 이어서 비효소적으로 fibrin polymer는 혈소판과 endotherial cell에 결합하며, factor Ⅷ에 의해 cross-linked fibrin polymer를 형성하면서 영구적인 혈전을 생성한다. 응고기전의 결과로 형성된 견고한 혈전형성으로 더 이상의 출혈 위험성은 소실되었지만, 새로운 혈관벽이 다시 재생되게 되면 더 이상 혈전의 필요성은 없어질 뿐 아니라, 정상적인 혈관 내관을 복구하여 혈액순환의 필요성이 대두되기 때문에 생리적으로 혈전용해의 혈전제거 작용이 곧 시작되게 된다[2].

혈전용해계에서는 plasminogen activator(PA)를 통해 plasminogen을 plasmin으로 활성화시킨다. Plasminogen의 560번 arginine과 561번 valine(Arg560-Val561) 사이의 결합을 절단하여, N-terminal 쪽의 A-chain과 C-terminal쪽의 B-chain으로 구성된 plasmin으로 전환시킴으로써 섬유소를 용해시킨다[3]. 이때 pasmin의 효소 활성은 B-chain에 기인하는 것이다. Plasmin은 serine protease로 간에서 합성되어 불활성 형태인 plasminogen으로 존재하며, PA와 plasminogen activator inhibitor(PAI) 그리고 antiplasmin에 의해 조절된다.

정상적인 지혈체계의 균형이 여러 요인들로 인해 깨어지게 되면, 정상지혈(normal hemostasis) 기전의 병리적 현상으로 나타나는 것이 혈전증(thrombosis)이다. 이러한 혈전은 혈류를 감소시키거나, 혈관을 막아 조직 이나 장기에 허혈성 손상을 일으키거나, 혈전이 부착된 혈관에서 떨어져 나와 혈관을 폐색시킴으로써 경색(infarct) 및 허혈성 괴사(ischemic mecrosis)등의 심각한 문제가 발생된다[4]. 따라서 이미 형성된 혈전을 신속하게 용해 시킬 수 있는 혈전용해제에 대한 많은 관심과 연구가 진행되고 있다.

현재 세계적으로 가장 많이 사용되고 있는 물질로는 streptokinase 와 urokinase가 있으며, 유전자 재조합 기술로 개발된 t-PA(tissue-type plasminogen), APSAC(Anisoylated plasminogen streptokinase activator complex) 등이 보편적으로 사용되고 있다[5,6]. 이러한 혈전용해제의 종류를 개발순서에 따라 streptokinase나 urokinase와 같은 제 1세대 약물, t-PA, APSAC, suc-PA(single chain urokinase plasminogen activator)등의 제 2세대 약물로 구분되며, t-PA, PA의 재조합 및 융합 등에 의한 약물은 제 3세대 약물로 분류된다7)(Table 1).

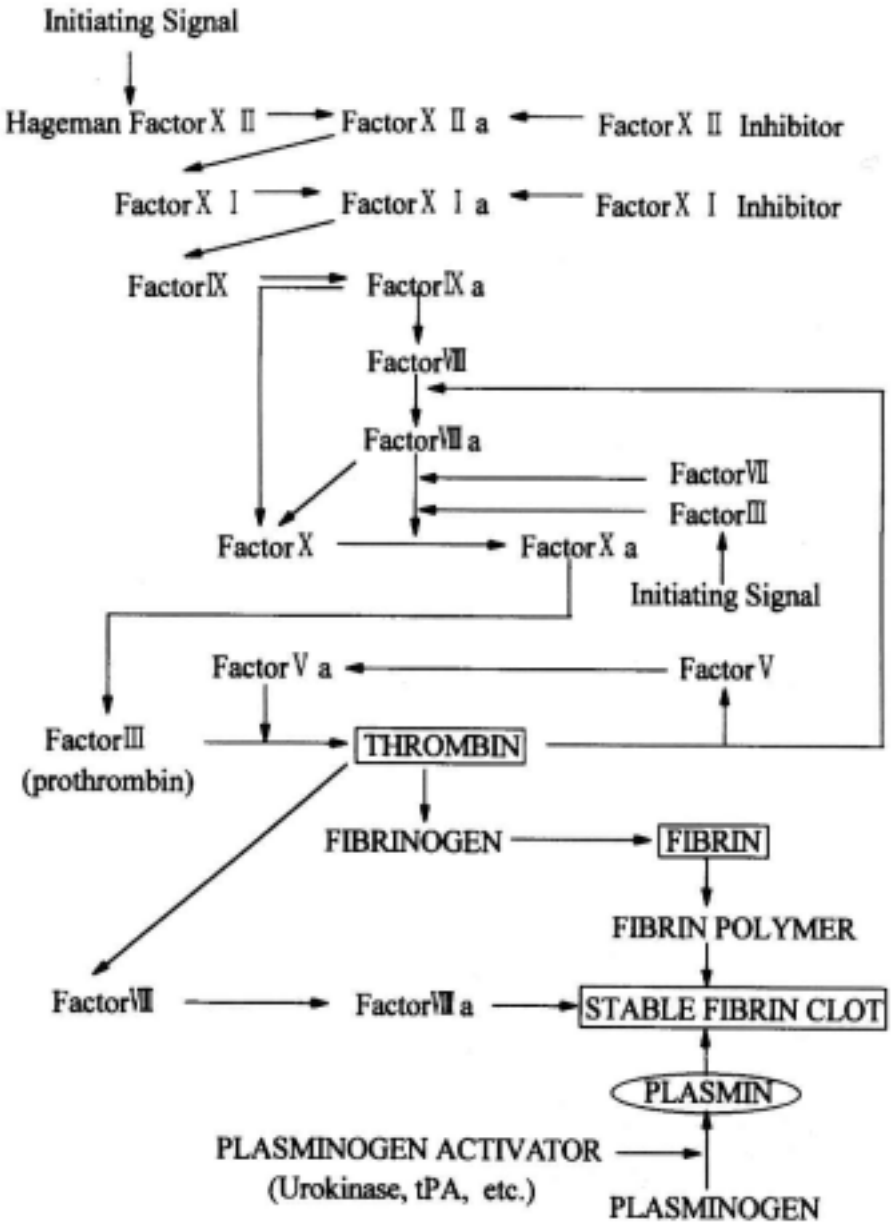

Fig. 1. Coagulation and fibrinolysis[1].

그러나 이러한 기존의 혈전용해제들은 혈전에 대한 특이성이 없으므로 치료동안에 전신출혈(systemic haemorrhage)등의 부작용을 나타내며, 혈액 내 반감기가 짧고, 가격이 비싸다는 단점을 가지고 있다. 따라서 이러한 혈전용해제의 단점을 극복하는 좀 더 나은 혈전용해제를 제공하기 위한 시도가 매우 활발히 이루어져 왔다. 그 대표적인 것으로 혈전용해 활성이 강한 새로운 변이형 활성 인자의 개발이나, 자연물질로부터 보다 우수한 혈전용해능을 가지는 동물, 식물 또는 미생물 유래의 새로운 혈전용해제를 개발하는 것이다[8].

자연계에 광범위하게 존재하고 있는 혈전용해물질의 개발을 위한 수많은 시도가 이루어져 왔으며, snake venom에서 추출한 혈전용해제[9,10] 지렁이로부터 분리한 lumbrokinase[11,12], 거머리에서 분리된 hementin[13]과 같은 동물의 독성분으로부터 분리한 혈전용해제에 대한 연구가 대부분이다. 식물의 경우 TFPI(tissued factor pathway inhibitor)[14]에 대한 많은 연구가 보고되어 있다. 미생물에서도 여러 가지 혈전용해 물질이 확인되었다. 가장 대표적인것으로 Staphylococcus에 존재하는 staphylokinase[15], Aspergillus oryzae에서 발견된 CA-7 Brinolase[16]등이 있으며, 그 외에도 Fusarium pallidoroseum[17], Katsuwonus pelamis18) 등의 여러 미생물로부터 혈전용해물질을 분리한 바 있다. 또한 일본의 전통발효 식품인 natto로부터 분리한 nattokinase19)에 관한 연구가 이루어져왔으며, 우리나라에서도 청국장[20] 및 된장[21]으로부터 분리한 혈전용해제에 관한 연구가 활발히 진행되어왔다. 기존 혈전용해제의 대부분은 fibrinolytic enzyme으로써 인체 내 존재하는 여러 효소들에 의해 가수분해됨으로써 정작 인체 내 에서는 활성을 나타내지 못 할 수 있으며, 고분자 화합물이기 때문에 생체 allergic reaction을 야기시킬 가능성이 높다[22]. 따라서 보다 안정하며, 인체 내 흡수면에서도 뛰어난 펩타이드제제로의 개발은 중요한 의미를 갖는다.

Table 1. Advances in thrombolytic agents[7]

First generation	Streptokinase(SK)
	Urokinase(UK)
Second generation	Tissue-type plasminogen activator(t-PA)
	Anisoylated plasminogen streptokinase activator complex(APSAC)
Third generation	Synergic combinations, such as t-PA+PA
	t-PA mutant
	u-PA mutant
	Chimeric plasminogen activators

혈전용해활성 펩타이드에 관한 연구로는 Streptomyces의 대사 산물인

Complestatin[23]이 있으며, 이는 plasminogen과 결합하여 endothelial cell 이나 fibrin에 plasminogen 결합 능력을 증가시킴으로서 결국 혈전용해 활성을 증가시킨다. 그 이성질체인 Cholopeptic Ⅰ[24]도 Complestatin과 유사한 mechanism에 의한 혈전용해활성을 가지고 있는 펩타이드 물질이다. 또한 곰팡이 균사체로부터 추출한 Plactin A, B, C, D[25]는 cyclic pentapeptide 구조의 plasminogen activator 물질이다. 그러나 plasminogen과 결합하지 못하므로 Complestatin과는 다른 mechanism에 의한 혈전용해활성을 가지는 것으로 예상되고 있다. 혈전용해활성을 나타내는 plasminogen activator의 작용은 매우 다양하여, 그 기전이 아직 명확하게 밝혀지지 못한 상태이다. 최근에는 Indian King Cobra로부터 분리한 novel fibrinolytic peptide인 Hannahpep에 관한 연구도 이루어진바 있다[26]. 그 외 인체 내 midkine으로부터 유도된 plasminogen activator 활성 synthetic peptide[27]및 이러한 물질의 아미노산 일부를 mutation 시키거나, 기존 혈전용해제들의 recombinant를 이용한 fibrinolytic peptide에 관한 연구가 일부 이루어진바 있으며, 이러한 방법들을 통해 기존 물질보다 2~3배의 활성이 증가됨을 확인하였다[28](Table 2). 따라서 기존 자연물질로부터 새로운 혈전용해활성을 증가시킬 수 있는 fibrinolytic peptide 탐색 및 유전자조작을 통해 보다 우수한 혈전용해제의 개발이 가능할 것으로 보여진다. 이에 본 실험에서는 계란 알끈 가수분해물로부터 혈전용해활성을 확인하고, 활성물질의 분리·정제 및 특성 규명을 통해 새로운 혈전용해제로서의 가능성을 제시하고자 하였다.

계란 알끈은 계란 가공시 난백과 난황을 분리하는 과정에서 발생되는 부산물로, 국내에서는 대규모 계란가공 공장에서 연간 약 1 ton가량의 알끈이 발생된다. 알끈은 아주 단단한 불용성 물질로, 난황을 계란의 중앙에 고정시켜 난황(egg yolk)과 배(embryo)를 보호하는 역할을 한다. 그 조성은 난백(egg white, albumen)과 유사한 조성을 갖는 끈모양의 구조를 가진 것으로, 80~90% 가량이 단백질을 함유하고 있어 새로운 단백질 소재로서의 개발가능성을 시사한다(Fig. 2).

알끈에 관한 연구는 sialic acid 및 sialyloligosaccharide, sialylglycopeptide에 관한 연구가 일부 이루어진바 있으나 미비한 수준이다[30,31]. 또한 알끈으로부터 sialyloligosaccharide를 분리하는 과정에서 다량의 알끈 peptide가 발생되지만 이의 기능성에 관한 연구는 보고된 바 없다.

펩타이드는 생체조절 기능을 갖는 식품성분으로 항암, 혈청콜레스테롤 강하, 면역증강, 칼슘흡수 촉진 등의 광범위한 생리활성을 나타내는 것으로보고된바 있다[32-34]. 그리고 혈관질환과 관련된 생리활성 펩타이드에 관한 연구로는 항혈전과 관련된 혈소판 응집 저해 활성[35], 혈압강하에 관여하는 ACE(angiotensin converting enzyme) inhibitor[36-38]등에 관한 연구가 이루어진바 있으나, 혈전용해활성에 관한 연구는 극히 미비한 실정이다. 이러한 다양한 생리활성을 갖는 식품

유래 펩타이드 소재로는 유청단백질 유래 펩타이드, 카제인 유래 펩타이드, 콩단백질 유래 펩타이드, 옥수수 단백질 유래 펩타이드, 축육단백질 유래 펩타이드, 어육단백질 유래 펩타이드 등의 다양한 소재로부터 생리활성 펩타이드에 관한 연구가 이루어져왔다[39].

본 연구에서는 알끈으로부터 혈전용해 활성 물질의 탐색을 통한 새로운 식품 유래 펩타이드 소재로서의 가능성을 제시하고, 이에 따른 알끈의 수용화 및 혈전용해물질 분리를 위한 효소 system의 개발과 혈전용해 활성 물질의 분리, 구조 및 특성 규명을 목적으로 하였다.

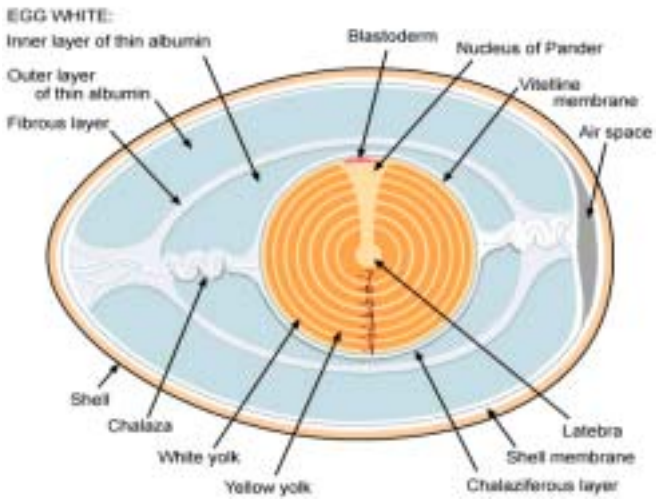

Fig. 2. Structure of the hen egg[29].

Table 2. Literature review on fibrinolytic peptides

Peptides	M.W (Da)	Sources	Mechanism	Reference
Complestatin	1,325	Metabolite of a *streptomyces*	Increases capacity of plasminogen binding	23
Chloropeptic I	1,325	Isomer of complestatin	Simiar to complestatin	24
Plactin A, B, C, D	654(A, B) 629(C, D)	Mycelium extract of *Agonomucetales*	Stimulation of fibrinolysis to be different from that of complestatin	25
Hannahpep	610	Venom of the Indian King Cobra	-	26
Pleiotrophin	43 amino acid (≒ 4,700)	Synthetic peptide derived from human midkine	Enhencement of plasminogen activator level and suppression of its inhibitor level	27

2. 실험 재료 및 방법

가. 계란 알끈 시료

본 실험에 사용된 계란은 K사의 안산 양계장으로부터 구입하여 사용하였으며, 수작업을 통해 알끈을 회수하였다. 알끈은 4℃ 저온실에서 2% KCl 용액에 하루 밤 동안 교반한 후 50 mesh 통과시켜 난백을 제거하였다. 다시 증류수로 여러번 세척하여 잔류 난백 및 KCl을 제거하였다. 난백으로부터 분리된 알끈은 동결건조하여 사용하였으며, 이를 분쇄하여 50 mesh 체를 이용하여 균일한 입자의 알끈 시료 분말을 제조하였다[40].

나. 알끈 단백질 가수분해물의 제조 및 가수분해율 측정

(1) 효소별 알끈 가수분해

불용성 계란 알끈 단백질의 수용화를 위해 protease type별로 8종을 선발하여 사용하였다(Table 3). Serine protease 계열의 Alcalase, Protamex, Maxazyme, Pescalase 4종을 선발하였고, cystein protease 계열의 Collupulin, aspartic protease 계열의 Flavourzyme, Kojizyme, metallo protease 계열의 Neutrase를 각각 선발하여 처리하였다. 상기 protease들은 차 후 경구용 혈전용해제의 개발 가능성을 고려하여, 식품에 사용 가능한 것들만을 선발하였다.

효소 처리는 각 조건에 따라 다양한 pH의 10 mM potassium phosphate buffer 또는 tris-HCl buffer 5 ㎖에 건조 알끈 시료 0.1 g과 각각의 protease를 기질대비 100분의 1로 처리하였다. 항온수조에서 각 효소별 최적 온도를 유지하고 진탕시키면서 12시간 반응시킨 후 100℃에서 20 분간 가열하여 불활성화 시킴으로써 알끈에 처리한 효소들이 혈전을 용해시킬 수 있을 가능성을 완전히 배제 시켰다.

Table 3. Characteristics of commercial proteases

Enzymes	Sources	Optimal pH	Optimal Temp(℃)
Alcalase	*Bacillus licheniformis*	6.5~8.5	55~70
Collupulin	*Carica papaya* (plant)	5.0~7.5	50~70
Flavourzyme	*Aspergillus oryzae*	7.0	50
Kojizyme	*Aspergillus oryzae*	5.5~6.5	30
Maxazyme	*Bacillus subtillus*	6.5~7.5	45~50
Neutrase	*Bacillus amyloliquefaciens*	5.5~7.5	45~55
Protamex	*Bacillus* protease complex	5.5~7.5	35~60
Pescalase	*Bacillus licheniformis*	10~11	45~50

(2) Enzyme mixture에 의한 가수분해

알끈 가수분해율 및 활성을 증가시키기 위해 각 protease type별로 2종씩을 혼합하여 알끈에 처리하였다. 각 효소별 알끈 가수분해율이 다소 우수했던 효소들을 대상으로 각각 혼합하여 가수분해율 및 혈전용해 활성을 측정하였다.

(3) 효소별 알끈 가수분해율의 측정

효소별 알끈 가수분해율을 측정하기 위해 알끈 가수분해물을 8000×rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 혈전용해 활성을 확인하였으며, 각 효소별로 가수분해되지 않고 남아있는 불용성 알끈을 취하여 가수분해율을 구하였다. 80℃ dry oven에서 12시간정도 건조한 후 desicator에서 30분간 방치하여 중량을 측정하였고, 항량이 될 때까지 완전히 건조하여 중량을 측정하였다. 건조 후 남아 있는 시료의 중량을 초기 알끈 시료에 대한 중량비로 환산하여 효소별 알끈 가수분해율(%)을 측정하였다.

다. 혈전용해 활성 측정

(1) Fibrin plate를 이용한 혈전용해 활성 측정

Astup과 Mullertz41)의 fibrin plate법을 변형하여 fibrinogen을 0.5%(w/v)가 되도록 10mM potassium phosphate buffer(pH 8.0)에 녹인 뒤, 10 ㎖의 fibrinogen 용액을 100 ㎕의 thrombin(100 NIH units/㎖)과 신속하게 petri dish(지름 9 ㎝)에서 혼합한다. 상온에서 30분간 방치하여 fibrin막이 형성되면 지름 8 mm의 paper disc를 fibrin plate에 올려놓고, 50 ㎕의 시료를 점적하여 습기가 유지되는 37℃ incubator에서 12~20시간 방치한 후 용해되어 나타나는 원의 면적을 측정하였다. 대조구로서는 정제된 혈전용해 효소인 plasmin(1 unit/㎖)을 사용하였으며, 시료의 혈전용해활성은 대조구의 용해 면적에 대한 시료의 용해 면적을 상대적인 비율로 환산하여 산출하였다.

(2) Fibrinogen 용해 활성 측정

Maenon와 Mitsuhashi42)의 변형된 방법에 따라 0.1 ㎖의 시료와 0.9 ㎖의 0.4% human fibrinogen을 잘 섞은 다음 37℃에서 20분간 반응시킨 후 0.1 ㎖의 100% trichloroacetic acid(TCA)를 첨가하여 반응을 정지 시켰다. 반응액을 12,000×rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물을 제거한 다음 상등액만을 취하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 plasmin을 연속희석하여 같은 방법으로 구하였다.

(3) Fibrinogen 분해 pattern 조사

Fibrinogen의 분해 pattern을 조사하기 위하여 2 ㎎/㎖ 농도의 fibrinogen과 시료를 37℃에서 반응시키면서 반응시간별로 반응액의 일부를 취하여 SDS-PAGE

로 분석하였다[43,44].

라. 혈전용해 활성 알끈 peptide의 분리·정제

(1) Ultrafiltration에 의한 분리

알끈 가수분해 시료는 한외여과기(Amicon TCF-10; Amicon Co., USA)를 이용하여 분자량에 따라 10,000 이상, 500~10,000, 500이하로 분획하였으며, 각 분자량별로 얻어진 시료는 동결건조하여 수율을 계산하였다.

(2) Prep-HPLC에 의한 분리·정제

알끈 peptide를 분리하기 위하여 prep-HPLC(Analytical Industry Co., Japan)를 이용하였다(Table 4). Column은 polymeric gelfiltraion column의 GS-310(21.5 ㎜×500 ㎜)과 W-252(21.5 ㎜×500 ㎜) column을 사용하였으며, 각 column의 분리 가능 분자량 범위는 각각 40,000이하, 6,000이하의 펩타이드 분리에 적합한 분자량 범위의 것을 사용하였다. Eluent는 10 mM potassium phosphate(pH 8.0)및 3차 증류수를 사용하였고, 유속은 3 ㎖/min으로 하였다. 또한 detector는 220 nm UV detector를 사용하였다. 시료는 3%를 넘지 않는 범위로 3 ㎖을 주입하였다.

마. Fibrinolytic peptide의 순도 확인

(1) Tricine SDS-PAGE에 의한 순도 확인

Schagger와 Von jagow45)의 tricine SDS-PAGE 방법을 변형하여 16.5% separating gel 과 10% spacer, 4% stacking gel을 이용하여 정제된 fibrinolytic peptide의 순도를 확인하였다. 20% SDS, 2% mercaptoethanol, 10% brillant blue G가 포함된 sample buffer를 이용하여 tricine SDS-PAGE를 수행하였다. Molecular weight marker로는 myosin (200,000), β-galactosidase (116,250), phosphorylase b(97,400), serumalbumin(66,200), ovalbumin(45,000), carbonic anhydrase(31,000), trypsin inhibitor(21,500), lysozyme(14,400), aprotinin(6,500)의 broad range의 marker와 polypeptide를 포함하는 marker로 triosephosphate isomerase(26,625), myoglobin(16,950), α-lactoalbumin (14,437), aprotinin (6,512)의 혼합물을 사용하였다.

Table 4. Isolation of fibrinolytic peptide by prep-HPLC

Model	LC 918 system
Column	JAIGEL GS-310 / W-252
Detector	UV (220 nm)
Eluent	water / 10 mM potassium phosphate buffer
Flow rate	3 ㎖/min

(2) Thin layer chromatography에 의한 순도 확인

펩타이드 분획의 순도를 확인하기 위해 thin layer chromatography를 행하였다. 혈전용해활성 측정을 통해 확인된 활성 분획물을 소정의 농도가 되게 증류수로 녹인 후 silica gel plate(silica gel 60, layer thickness 0.22 mm)에 점적하였다. 전개용매로 사용되는 butanol : acetic acid : water(4 : 1 : 1)로 포화시킨 전개조에 점적한 TLC판을 넣고 약 30분 정도 동일 전개 용매로 전개하였다. 약 6 ㎝ 까지 전개시킨 후 TLC판을 전개조에서 꺼내어 110℃에서 5분간 건조하였으며, 먼저 UV램프에 의해 단백질의 위치를 확인한 다음 단백질 반응을 위해 발색시약으로 ninhydrin 용액을 분무하여 재건조하였다. Ninhydrin 용액은 ninhydrin : butanol : acetate = 300 : 100 : 3의 비율로 제조하여 사용하였다[46].

(3) Reverse phase-HPLC에 의한 순도 확인

활성물질의 분리 및 순도를 확인하기 위해 RP-HPLC(reverse phase-high perormance liquid chromatography) 분석을 하였다47). 분석에 사용된 column으로 μBondapakTM C18의 RP-HPLC column(39 ㎜×300 ㎜, Waters, USA)을 사용하였으며, eluent로는 water : ACN = 95 : 5 비율로 isocratic elution 하였다. 또한 detector는 220 nm UV detector를 사용 하 였고, 시료는 500 ppm의 농도로 30 ㎕를 주입하였다(Table 5).

바. 아미노산 조성 분석

(1) 시료의 산 가수분해 및 전처리

시료 1.26 ㎎을 증류수 1 ㎖에 현탁시킨 후 20 ㎕ 취하여 Waters Pico-Tag Workstaion에서 완전히 건조시켰다. 건조 후 반응 시험관의 바닥에 1% phenol(v/v)이 함유된 6N HCl용액 200 ㎕를 넣어 110℃에서 24시간 가수분해하였다. 가수분해 후 남은 6N HCl을 완전히 제거하기 위해 재건조 시약

(MeOH : sodium acetate : TFA = 2 : 2 : 1 (V/V)) 10 ㎕를 넣어 가볍게 흔들어 준 후 재 건조하였다.

(2) 시료 유도체화 및 HPLC를 이용한 분석

건조된 시료를 PITC(phenylisothiocyanate)로 유도체화 시킨다. Methanol : water : triethylamine : phenylisothiocynate = 7 : 1 : 1 : 1(v/v) 로 혼합하여 유도체 시약을 만든 뒤 건조 시료에 유도체 시약 20 ㎕를 첨가하고 상온에서 20분간 방치시켜 PICT(phenylisothiocyanate) amino acid 유도체로 만들었다. 다시 시료를 완전히 말린 후 sample diluent 200 ㎕(Waters)에 녹인다. Microcentrifuge 시킨 후 상층액만을 취하여 다시 0.45 ㎛ filter에 filtering한 후 HPLC autosampler에 안치하여 Table 6과 같은 조건으로 분석하였다. 표준물질은 4 ㎕, 시료용액은 10 ㎕를 HPLC(PH 1100 Series)에 주입하여 아미노산을 분석하였으며, 표준물질의 크로마토그램을 얻어 피크면적을 계산하고, retention time을 비교하여 시료의 각 아미노산 함량을 구하였다[48].

Table 5. Identification of fibrinolytic peptide by RP-HPLC

Model	HPLC(Yonglin instrument, Korea)
Column	μBondapak^{TM} C_{18} column
Detector	UV (220 nm)
Eluent	water : ACN = 95 : 5
Flow rate	1 ㎖/min

Table 6. Conditions of HPLC for amino acid analysis of chalaza peptide

Column	Pico-Tag 3.9 × 300 mm column
Column oven temp.	46℃
HPLC pump	HP 1100 Series, Binary Pump
HPLC injector	HP 1100 Series, Autosampler
Variable wavelength detector	HP 1100 Series, 254 nm
Solvent	A) 1.4 mM NaHAc, 0.1% TEA, 6% CH_3CN in H_2O, pH 6.1 B) 60% CH_3CN in H_2O
Elution	Linear gradient of solvent B (0-100%)
Flow rate	1.0 ㎖/min
Run time	10 min
Equilibrium time	10 min

사. MALDI mass에 의한 분자량 측정

혈전용해활성 펩타이드의 분자량을 측정하기 위해 MALDI(Matrix- assisted laser desorption/ionization) mass spectrometry(Voyager-DE STR, Applied Biosystems, USA)를 이용하였다. Prep-HPLC에 의하여 분리된 fibrinolytic peptide의 분자량을 측정하기 위해 시료를 10 ㎪ 정도로 희석시킨 다음, 5 ㎕의 양을 laser plate에 주입한 후 진공 desiccator에서 5분간 건조하였다. 건조된 시료 plate를 voyager(Voyager-DE Biospectrometry)에 집어놓고 Table 7과 같은 조건으로 분석하였다49).

아. Plasminogen 유·무에 따른 혈전용해 활성 측정

Human fibrinogen을 이용하여 plasminogen을 첨가한 경우(plasminogen rich)와 plasminogen이 없는(plasminogen free) fibrin plate를 각각 제조하여 fibrinolytic peptide의 fibrin에 대한 직·간접적인 영향을 살펴보았다50). 1.2% human fibrinogen(plasminogen free, Sigma) 용액 2.5 ㎖에 100NIH thrombin 100 ㎕ 및 1% agarose(low melting agrarose) 7.4 ㎖을 조심스럽게 부은 후 신속히 섞어 plasminogen free plate를 제조하였다. Plasminogen rich plate를 제조하기 위해 1.5% fibrinogen 용액 2 ㎖에 10 unit/㎖ 0.5 ㎖, thrombin(100 NIH unit/㎖) 100 ㎕, 1% agarose 7.4 ㎖과 섞어 fibrin plate를 제조하였다. 각각의 plate

에 시료를 점적하여 fibrin plate의 용해 면적을 측정하였다. 대조구로는 fibrin에 직접 작용하여 fibrin을 용해시키는 plasmin과 plasminogen activator로 알려진 urokinase를 사용하였다.

Table 7. Operating conditions of MALDI mass spectrometry for chalaza peptide

Accelerating voltage	25,000 V
Grid voltage	93%
Guid wire voltage	0.1%
Laser intensity	2661
Pressure	3.01e-007

3. 결과 및 고찰

가. 알끈 가수분해 효소의 선정

불용성 알끈의 수용화를 위해서 protease type별로 8종의 상업용 효소를 처리하였으며, 각 효소별 가수분해율 및 가수분해물 상태에서의 혈전용해 활성을 확인하였다(Fig. 3). 효소적 처리 방법은 산이나 알칼리 처리 또는 용매 추출법에 비해 아미노산 파괴가 적고, 단백질의 기능성을 향상시키는데 더욱 효과적인 방법이다[51]. 따라서 각 최적 조건에 따른 8종의 protease 처리 결과 Protamex와 Coullupulin의 가수분해율이 각각 57.3%, 54.0%로 비교적 우수한 편이었다. 또한 각 가수분해물들의 fibrin plate test 결과 역시 Protamex 처리 알끈 가수분해물(10 ㎎/㎖)로부터 2.9%의 혈전용해 활성을 확인할 수 있었으며, Coullupulin에서도 다소 활성이 나타나기는 했으나 미비하였다. 따라서 8종의 protease들 중 Protamex 처리가 알끈 수용화에 유리한 효소처리 조건임을 확인할 수 있었다. 한편 혈전용해 활성은 plasmin 1 unit/㎖이 나타내는 fibrin plate 용해면적에 대한 상대적인 비율로 나타내었으며, plasmin 1 unit/㎖은 469.04 ㎟의 혈전용해 활성을 나타내었다.

나. 복합효소 처리에 따른 가수분해율 및 혈전용해활성

8종의 상업적 효소처리 결과 Protamex 처리가 알끈 가수분해율 및 가수분해

물의 혈전용해 활성에도 가장 유리한 조건임을 확인할 수 있었으나, 보다 우수한 가수분해 조건 및 활성 증가 조건을 탐색하기 위해 복합효소 처리를 시도했다. 앞써 각 효소별 알끈 가수분해율을 감안하여, 가수분해율이 가장 우수하였던 Protamex 및 Collupulin을 혼합 처리하였고, 두 효소를 위주로 하여, 기타 다른 효소들과 복합처리 하였다. 그 결과 Protamex 및 Collupulin의 복합 처리는 가수분해율 및 활성에 전혀 도움이 되지 못했으나, Kojizyme을 복합 처리함으로써 가수분해율 및 활성이 다소 증가하는 경향을 보였다. 따라서 Protamex와 Collupulin에 각각 Kojizyme을 혼합하여 처리하였다. 그 중 Protamex 및 Kojizyme의 복합효소 처리로 가수분해율이 70.2%로 Protamex 단독 처리시 보다 13% 가량 상승하였으며, 혈전용해 활성도 단독 처리시의 2.9%보다 약 3.3배 증가한 9.5%의 활성을 나타내었다. Kojizyme은 exo-peptidase 및 endo-protease 복합물의 상업적 효소로 알끈으로부터 sialyloligosaccharide 생산 과정에서 sialyloligosaccharide 말단에 붙어있는 peptide를 제거할 목적으로 사용되었던 것이나, 다른 protease와 함께 적정시간 혼합 처리함으로써 저분자 peptide를 만드는데 더 유리한 것으로 생각되어졌다(Table 8).

Table 8. Hydrolysis and fibrinolytic activity of chalaza by commercial protease mixtures

Enzyme mixtures*	Degree of hydrolysis(%)	Fibrinolytic activity (%)
Protamex + Collupulin	51.4	3.1
Protamex + Kojizyme	70.2	9.5
Collupulin + Kojizyme	54.7	4.5

* enzyme ratio = 1 : 1 (w/w)

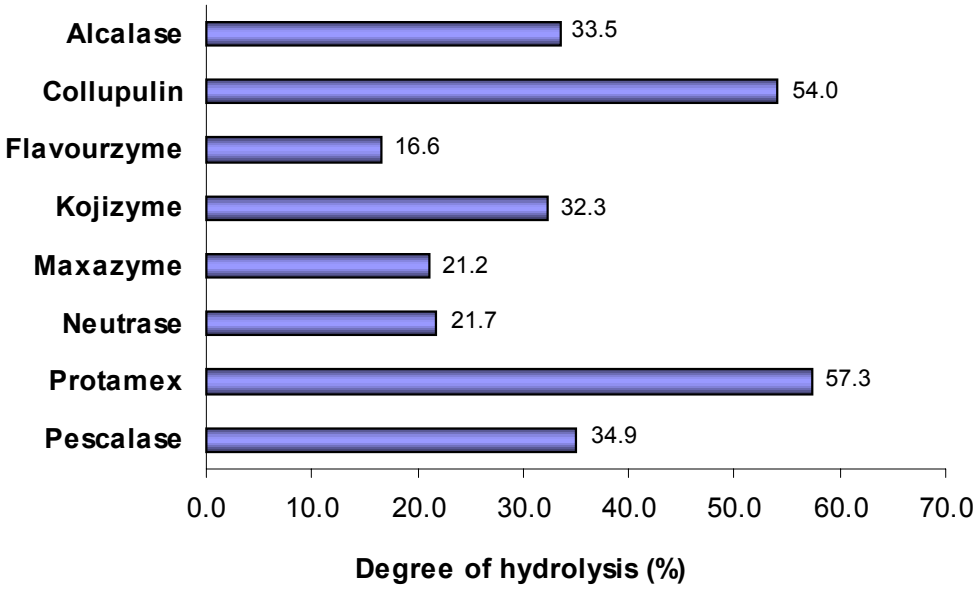

Fig. 3. Degree of hydrolysis of chalaza by commercial proteases.

다. 혈전용해활성 알끈 가수분해물의 분리·정제

(1) Ultrafiltraion에 의한 분리 및 혈전용해활성

Protamex 및 Kojizyme의 복합효소 처리 후 혈전용해활성 물질을 분리하기 위해 ultrafiltrator(Amicon TCF-10; Amicon Co., USA)를 이용하여 분자량에 따라 10,000 이상의 protein 분획과 10,000~500의 peptide 분획, 500이하의 저분자 펩타이드 및 아미노산 분획으로 분리하였으며, 혈전용해활성은 fibrin plate 방법을 통해 plasmin 1 unit이 나타내는 활성과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다. MWCO(molecular weight cut off) 10,000이상이 55.3%의 수율을 나타내었으며, 혈전용해활성은 나타나지 않았다. MWCO 500~10,000에서의 수율은 6.1%로 상대적으로 낮은 편이었으나, 혈전용해활성은 37.5%로 뚜렸한 활성을 확인할 수 있었다. MWCO 500이하에서는 38.6%의 수율을 나타내었고, 2.9%의 혈전용해활성을 확인할 수 있었다(Table 9). 분자량 10,000이상의 단백질 수준의 분획물은 혈전용해활성을 전혀 나타내지 못했으며, MWCO 500~10,000 사이의 분획물에서 혈전용해 활성이 뚜렸하게 나타났으므로, 알끈 가수분해물의 peptide 수준의 물질이 혈전용해 활성을 나타낼 것으로 예상되어졌다.

Fig. 4에 나타낸바와 같이 각 분자량별 분획물의 SDS-PAGE에 의한 fibrinogen 분해 pattern을 조사한 결과 MWCO 10,000이상에서는 fibrinogen의 α, β, γ-chain에 거의 영향을 주지 못했으며, MWCO 500~10,000에서는 α-chain은 30분내에 완전히 가수분해되었으며, β-chain은 2시간 내에 완전히 분해되었다. 또한 γ-chain은 10시간 이상 처리하여도 영향을 미치지 못했다. MWCO 500이하에서는 α-chain을 2시간 내에, β-chain은 10시간 반응으로 거의 분해되었다. 한편, 실험에 사용된 buffer는 fibrinogen에 전혀 영향을 미치지 못했으며, standard 물질인 plasmin은 처리량에 따라 차이는 있겠으나 plasmin(1 unit/㎖) 12㎕ 처리로 5분내에 α-chain이, 10분내에 β, γ-chain까지 거의 분해되었다(Fig. 5). MWCO 10,000이상의 물질에서는 fibrin plate 결과와 마찬가지로 fibrinogen에도 전혀 영향을 미치지 못했으며, 혈전용해활성을 나타내었던 MWCO 500~10,000 사이, MWCO 500이하의 분획물들은 fibrinogen의 α-chain을 먼저 가수분해한 후 β-chain을 분해하는 경향을 나타내었으며, γ-chain에는 거의 영향을 미치지 못했다. 또한 MWCO 500~10,000 사이 분획물은 fibrinogen의 α, β-chain에 대한 빠른 가수분해 경향을 나타냈으므로, 가장 우수한 혈전용해 활성을 나타내는 분획임을 확인할 수 있었다.

Table 9. Yield and fibrinolytic activity of chalaza hydrolysates fractioned by ultrafiltration

MWCO*	Yield (%)	Fibrinolytic activity (%)
> 10,000	55.3	N.D
10,000~500	6.1	37.5
< 500	38.6	2.9

* molecular weight cut off

(2) Prep-HPLC에 의한 분리·정제 및 혈전용해활성

MWCO 500~10,000 사이의 혈전용해활성 물질을 분리하기 위하여 prep-HPLC를 사용하였다. 분자량 40,000 Da이하 범위의 분리에 적합한 GS-310 column을 장착하여, 10 mM potassium phosphate buffer를 eluent로 분리하였다 (Fig. 6). 분리 결과 Fr. A, B, C, D의 4개의 peak으로 분리하였다. Fr. A, B, C, D의 혈전용해활성 실험 결과 Fr. C에서 41.8%의 혈전용해활성을 나타내었다 (Table 10). Fr. C의 분리·정제 및 초기 buffer 사용으로 인한 다량의 salt를 제거할 목적으로 증류수를 eluent로 하여 동일조건으로 재 분리하였다. Fr. C의 재분리 결과 Fr. Ⅰ, Ⅱ의 두 물질로 분리 되었고, Fr. Ⅰ 혈전용해활성이 두드러지게 나타났다(Fig. 7). Fr. Ⅰ의 혈전용해활성은 93.1%의 혈전용해활성을 나타냈다 (Table 11). 보다 정제된 fibrinolytic peptide를 분리하기 위해 GS-310 column과 더불어 분자량 6,000 Da이하 범위의 분리에 적합한 W-252 column의 두 개의 column이 장착된 prep-HPLC를 이용하여 재차 분리하였고, GS-310 column 단독 사용시 거의 분리되지 않았던 Fr. Ⅰ이 3개의 peak으로 분리되었다. 이를 Fr. Ⅰ-a, Fr. Ⅰ-b, Fr. Ⅰ-c로 명명하였다(Fig. 8). Fr. Ⅰ-a, Fr. Ⅰ-b, Fr. Ⅰ-c의 혈전용해 활성 측정 결과 Fr. Ⅰ-c에서 약간의 활성이 나타나기는 했으나 Fr. Ⅰ-b에서 111.3%의 활성을 나타내었으므로 Fr. Ⅰ-b를 다시 recycling하여 보다 순수한 Fr. Ⅰ-b를 얻을 수 있었다(Table 12)(Fig. 9). 각 분리 단계별 활성 분획의 수율 및 혈전용해활성은 Table 13과 같다.

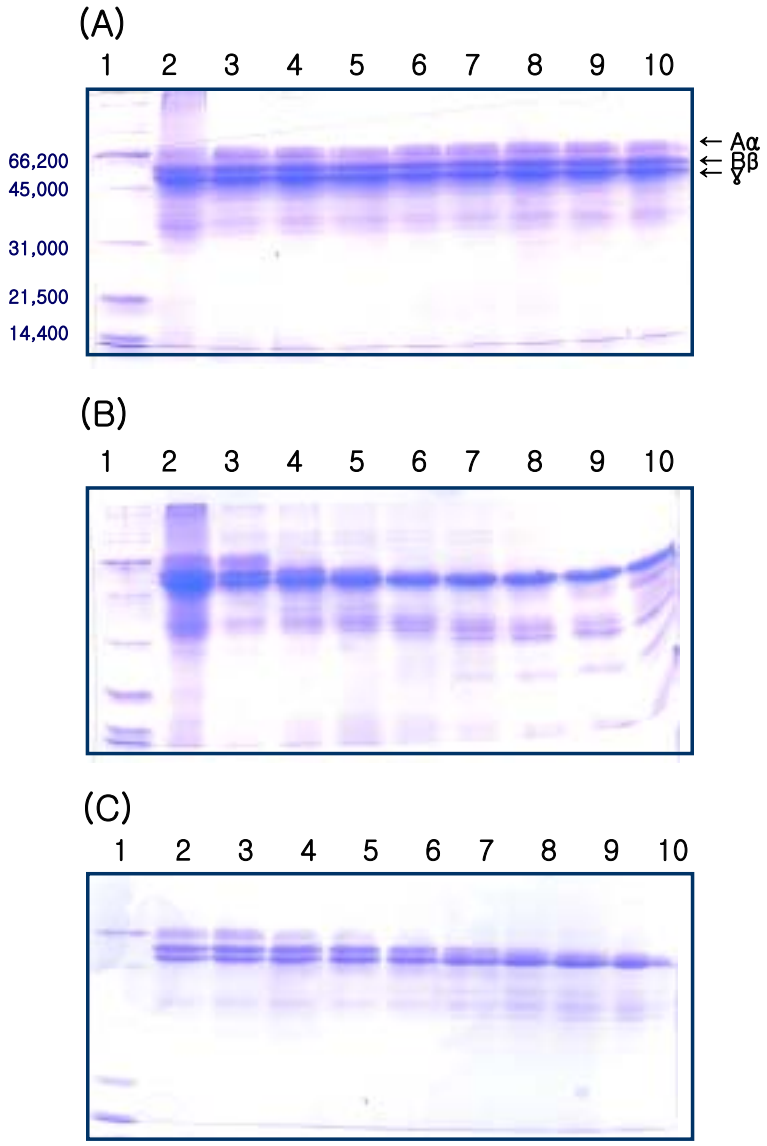

Fig. 4. The pattern of fibrinogen hydrolysis by chalaza hydrolysates. (A) 10,000< (B) 500~10,000 (C) 500>; lane 1, molecular weight marker; lane 2, fibrinogen control; lane 3-10, the incubation products of fibrinogen and each fraction after 0, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, and 10 hours incubation, respectively.

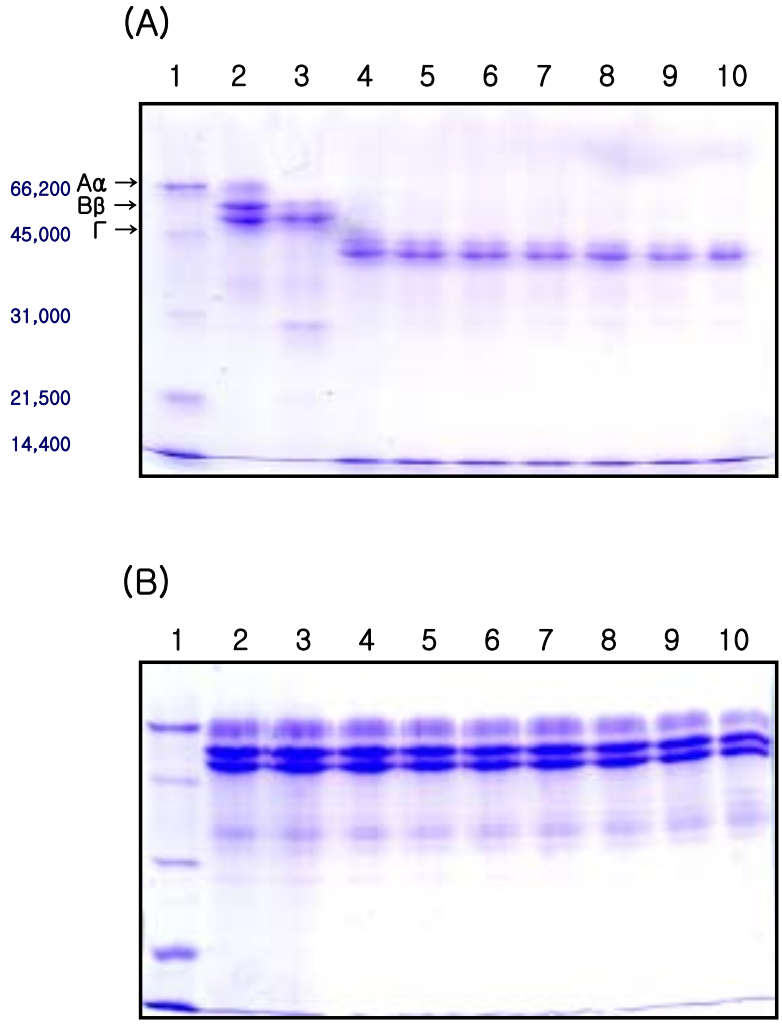

Fig. 5. The pattern of fibrinogen hydrolysis by plasmin and buffer. (A) plasmin (B) 10 mM potassium phosphate buffer; lane 1, molecular weight marker; lane 2, fibrinogen control; ane 3-10, the incubation products of fibrinogen or plasmin after 0, 30 minute, 1, 2, 4, 6, 8, and 10 hours, respectively.

라. Fibrinolytic peptide의 순도확인 및 특성

(1) Tricine SDS-PAGE에 의한 순도 확인

Prep-HPLC에 의하여 분리된 알끈 펩타이드의 물질 확인을 위하여 16.5% tricine SDS-PAGE gel을 이용한 전기영동법을 수행하였다. 그 결과 분자량 6,500이하의 band를 확인할 수 있었다(Fig. 10).

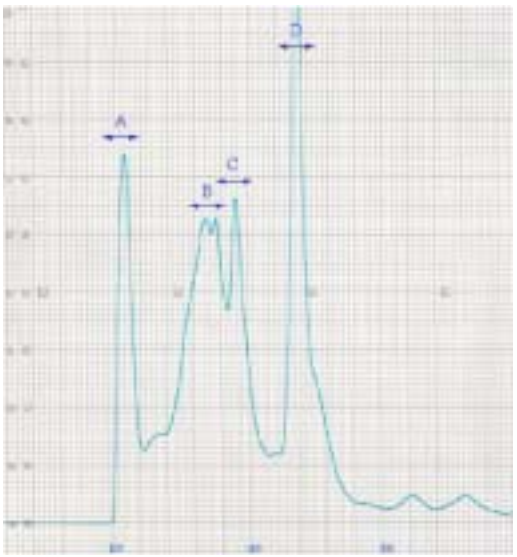

Fig. 6. Isolation of fibrinolytic Fr. C by prep-HPLC.

Table 10. Fibrinolytic activty of fractions obtained from prep-HPLC of molecular weight cut-off(MWCO) 500-10,000 chalaza hydrolysates

Fractions	Fibrinolytic activity (%)
Fr. A	N.D
Fr. B	1.1
Fr. C	41.8
Fr. D	N.D

* N.D, not detected

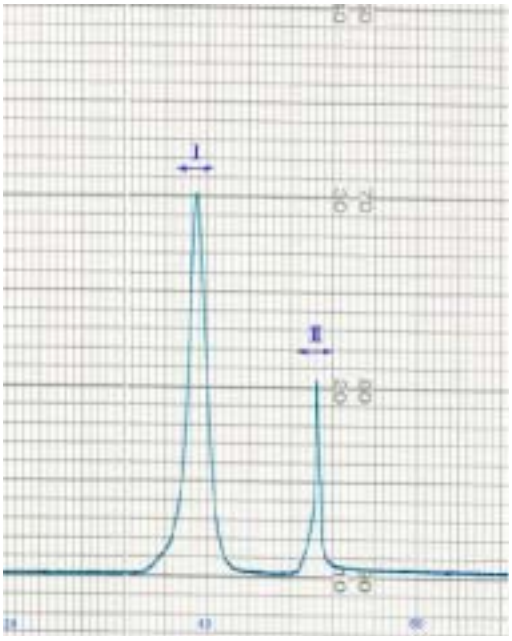

Fig. 7. Isolation of fibrinolytic Fr. I by prep-HPLC.

Table 11. Fibrinolytic activity of fractions obtained from prep-HPLC of Fr. C

Fractions	Fibrinolytic activity (%)
Fr. Ⅰ	93.1
Fr. Ⅱ	N.D

* N.D, not detected

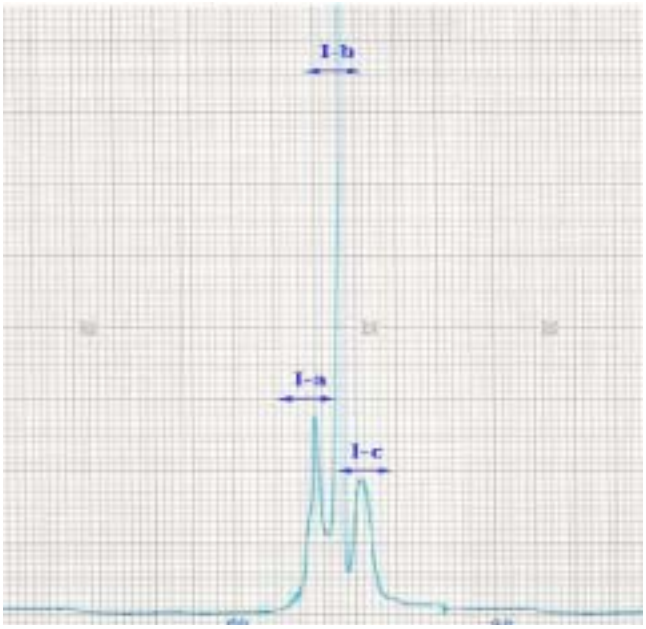

Fig. 8. Isolation of fibrinolytic Fr. I -b by prep-HPLC.

Table 12. Fibrinolytic activity of fractions obtained from prep-HPLC of Fr. I

Fractions	Fibrinolytic activity (%)
Fr. I - a	N.D
Fr. I - b	111.3
Fr. I - c	N.D

* N.D, not detected

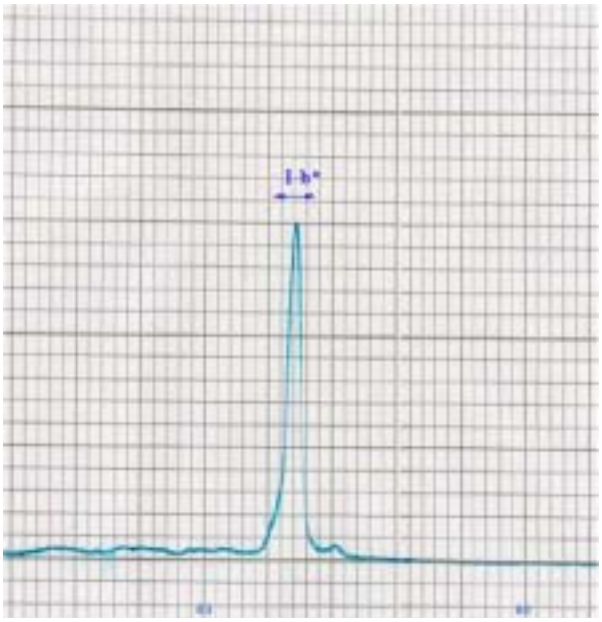

Fig. 9. Purification of fibrinolytic Fr. I -b by prep-HPLC.

Table 13. Fibrinolytic activity of each purification step

Purification step	Yield(%)	Fibrinolytic activity(%)
Hydrolysates	70.2	9.5
Ultrafiltraion (500~10,000)	4.3	37.5
Fr. C	1.7	41.8
Fr. I	0.03	93.1
Fr. I-b	0.016	111.3

(2) TLC에 의한 펩타이드 분획물의 순도 확인

Tricine SDS-PAGE에 의하여 1차 확인된 펩타이드 분획물로부터 다른 물질의 혼입 여부를 확인하기 위하여 TLC에 의한 펩타이드의 순도를 확인하였다. Silicagel plate에 시료를 점적하여 펩타이드 분리에 적합한 butanol : acetic acid : water(BAW)= 4 : 1 : 1의 전개 용매를 이용하여 분리한 결과 Rf 0.14의 단일 spot을 확인할 수 있었다(Fig. 11).

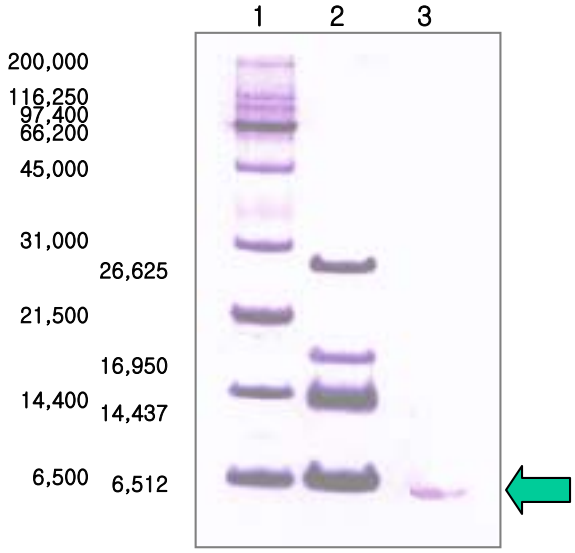

Fig. 10. Tricine SDS-PAGE analysis of purified chalaza peptide. lane 1, 2 moleculare weight marker. lane 1, mixture of protein marker, myosine(200,000), β-galactosidase(116,250), phosphorylase b(97,400), serum albumin (66,200), ovalbumin(45,000), carbonic anhydrase(31,000), trypsin inhibitor(21,500), lysozyme (14,400), aprotinin(6,500); lane 2, mixture of polypeptide marker, triosephosphate isomerase(26,625), myoglobin(16,950), α-lactoalbumin(14,437), aprotinin(6,512); lane 3, purified chalaza peptide

Fig. 11. Thin layer chromatogram of compound isolated from Fr Ⅰ-b. developing solvent, BuOH : Acetic acid : H2O = 4 : 1 : 1

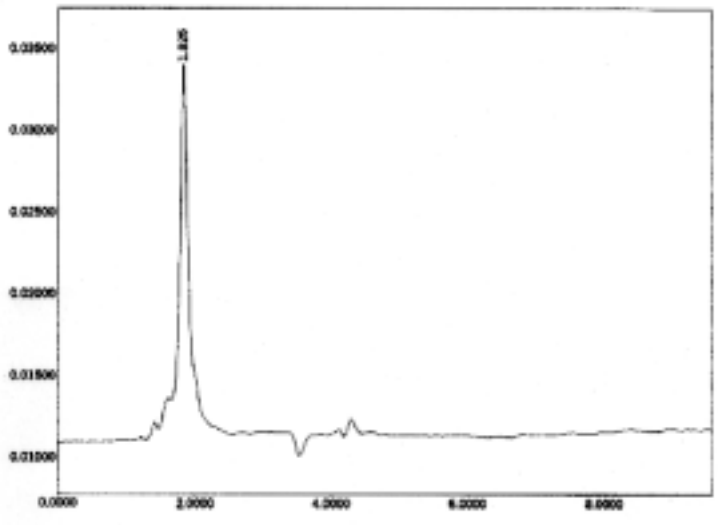

Fig. 12. HPLC purification of chalaza peptide on reverse-phase C18 column. The column was eluted by an isocratic gradient of water and acetonitril(95:5, v/v).

(3) Reverse phase-HPLC에 의한 순도 확인

보다 정확한 물질의 순도를 확인하기 위해 reverse-phase HPLC를 수행하였다. 분리한 알끈 펩타이드는 극성의 water 비율을 증가시키므로써 resolution이 향상되었고 water : ACN = 95 : 5 비율로 elution 하는 것이 가장 적절하였다. 따라서 최종 정제물을 C18 column을 이용한 RP-HPLC 분석결과 retention time 1.83분에서 거의 한 개의 peak을 확인할 수 있었다(Fig. 12).

마. 아미노산 조성

정제된 알끈 펩타이드 Fr. Ⅰ-b 및 계란 알끈을 포함한 egg white 및 egg yolk의 아미노산 조성을 비교 분석하였다[52]. 알끈은 aspartic acid 및 serine, leucine등이 풍부한 아미노산 조성을 가지고 있으며, 이것은 egg albumen 및 egg yolk의 주요 아미노산 조성과 유사한 것이다. 그러나 혈전용해활성 분획인 Fr. Ⅰ-b의 아미노산 조성은 glycine의 함량이 매우 높은 편이었으며, 그 외 serine, alanine, asparic acid, lysine 순으로 높게 나타났다(Table 14).

바. Fibrinolytic peptide의 분자량 확인

최근들어 MALDI(Matrix-assisted laser desroption/ionization) mass spectrometry는 단백질이나 펩타이드 연구에 적합한 도구로 이용되고 있다. MALDI는 분석하는데 걸리는 시간이 비교적 짧으며, 아주 적은양(<10～15 pmol)의 펩타이드 물질의 검출이 가능하면서 분할이 거의 일어나지 않아 비교적 그 물질의 정확한 질량을 측정할 수 있다[53]. 따라서 prep-HPLC에 의하여 분리된 알끈 펩타이드의 분자량 측정을 위해 MALDI mass를 이용하였다. 그 결과 분자량 5,713 Da의 펩타이드 물질임을 확인할 수 있었다(Fig. 13). 이는 앞써 설명되어진 혈전용해 활성 펩타이드[23-27]에 비해 분자량이 다소 큰 편이었다.

사. 혈전용해활성 알끈 펩타이드의 특징

(1) 농도별 혈전용해 활성

분리·정제된 알끈 펩타이드의 혈전용해활성을 측정하기 위해 시료를 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0%의 각 농도별로 10 mM potassium phosphate buffer(pH 8.0)에 녹이고, paper disc에 점적하여 fibrin plate법에 의한 혈전용해 활성을 측정하였다. 0.2% chalaza peptide는 53.38 ㎟의 투명환을 형성하였으며, 0.4% chalaza peptide는 269.98 ㎟, 0.6% chalaza peptide는 426.41 ㎟, 0.8% chalaza peptide는 470.22 ㎟, 1% chalaza peptide는 522.03㎟의 투명환을 형성하였다(Fig. 14). 따라서 알끈 펩타이드는 농도 의존적으로 혈전용해활성이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.

(2) Fibrinogen 용해 활성

Fibrnogen 용액을 이용한 fibrinogenolytic activity 측정을 시도하였다. Fibrinolytic activity test와 마찬가지로 plasmin을 대조구로하여 plasmin(1 unit/㎖)이 fibrinogen을 용해하여 생성된 fibrinogen degradative product (FDP)양을 기준으로 활성을 비교하였다(Fig. 15). Chalaza peptide의 fibrinogenolytic activity 측정 결과 plasmin이 생성한 FDP의 110.77%의 활성을 나타내었으며, fibrinolytic activity 측정 결과와 유사한 활성을 나타내었다. 또한 정제 단계별로 fibrinogen의 용해활성도 증가하는지 확인해본 결과 fibrin 용해 활성과 거의 유사한 활성 증가도를 보였다(Table 15).

(3) Fibrinogen degradation pattern

알끈 펩타이드의 fibrnogen 분해 pattern 조사 결과 α-chain은 5분내에 완전히 분해되었고, β-chain은 1시간내 거의 사라졌다. 또한 γ-chain은 2시간 이상 반응해도 전혀 분해되지 않았다. 즉 chalaza peptide는 α-chain을 수분내 빠르게 분해하고, 연속적으로 β-chain을 분해하였으나, γ-chain에는 전혀 영향을 미치지 못했다. 또한 ultrafiltration을 통한 부분 분획물 보다 α-chain은 30분, β-chain은 1시간 가량 단축된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 16). 이것은 Lee[54]와 Liang[10]이 보고한 혈전용해물질들의 fibrinogen 분해 pattern과 유사한 경향을 갖는 것이다.

Table 14. Comparison of amino acid contents in hen egg with Fr. Ⅰ-b(mol%)

Amino acid	Fr. Ⅰ-b	Chalaza	Egg albumen[52)]	Egg yolk[52)]
Alanine	7.07	7.87	6.14	4.95
Arginine	3.59	4.60	5.57	6.83
Aspartic acid	6.38	9.26	8.46	8.25
Cystein	3.25	6.21	2.37	1.77
Glutamic acid	4.35	5.00	13.34	12.07
Glycine	14.46	6.77	3.57	2.97
Histidine	2.43	1.68	2.17	2.37
Isoleucine	3.34	4.65	5.83	5.66
Leucine	6.10	8.13	8.32	8.39
Lysine	6.38	5.70	7.14	7.08
Methionine	5.82	2.90	3.71	6.05
Phenlyalanine	3.40	4.26	6.00	4.28
Proline	3.69	4.12	3.60	4.10
Serine	8.53	8.55	7.06	8.17
Threonine	4.49	6.37	4.26	5.34
Tryptophan	4.84	1.07	1.46	1.45
Tyrosine	6.71	6.40	3.83	4.25
Valine	5.17	6.48	7.17	6.02

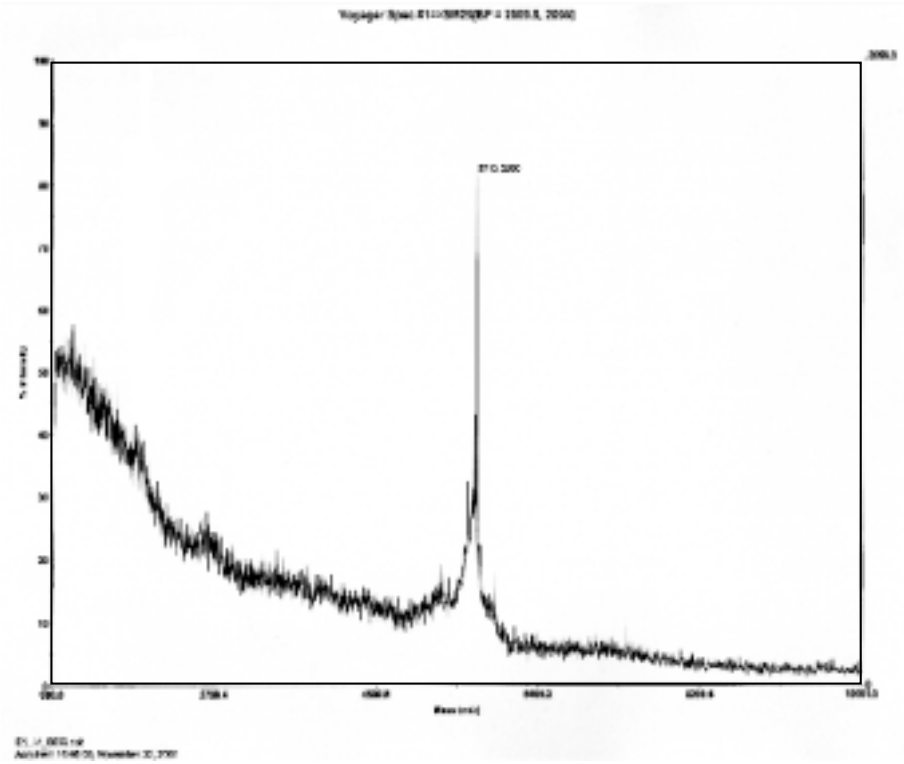

Fig. 13. MALDI mass sperctrometry of Fr. I -b.

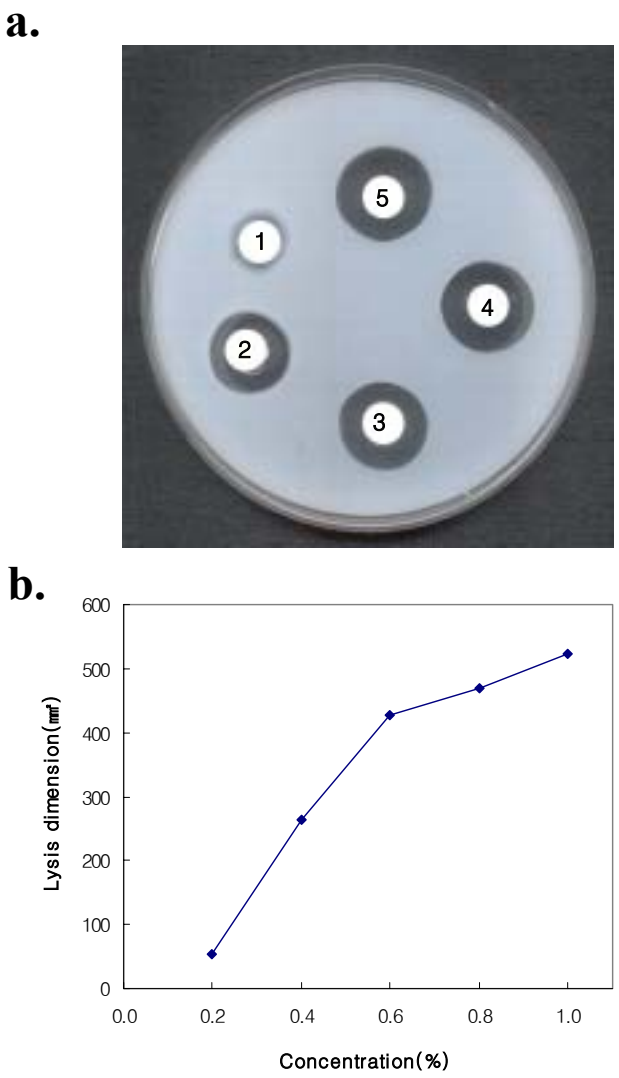

Fig 14. Fibrinolytic activity of purified chalaza peptide.
(a) Each of 50 ㎕ chalaza peptide at different concentration was dropped onto a fibrin plate and incubated for 12hr at 37℃; 1. 0.2%, 2. 0.4%, 3. 0.6%, 4. 0.8%, 5. 1.0% (b) Fibrin lysis curve

(4) Plasminogen 유·무에 따른 혈전용해활성

Plasminogen이 존재하지 않는 fibrin plate(plasminogen free fibrin plate)와 plasminogen을 임으로 첨가한 fibrin plate(plasminogen rich fibrin plate)를 제조

하여, 알끈 peptide의 plasminogen 유·무에 따른 혈전 용해 활성을 측정하였다. 대조구로는 plasmin외에 plasminogen activator로 알려진 urokinase를 사용하였다. 그 결과 알끈 peptide는 plasminogen free fibrin plate에서 보다 plasminogen rich fibrin plate에서의 활성이 월등히 우수하였다(Table 16). 즉, 알끈 peptide는 plasminogen을 경유하는 mechanism에 의한 혈전용해 활성을 나타낼 것으로 예상되어졌다. 이것은 앞써 설명된 바와 같이 기존의 혈전용해 활성을 나타낸다고 보고된 peptide들이 plasminogne activator로서의 역할을 한다는 보고에 부합하는 결과이다. Plasminogen activator에 의한 fibrinolysis는 fibrin에 부착되어 있는 plasminogenogen에만 선택적으로 작용하므로 fibrin에 대해서만 국소적으로 작용한다는 면에서 유리하다[55]. 따라서 보다 구체적이고 명확한 plasmininogen activator로서의 역할 규명이 이루어진다면 새로운 혈전용해제로의 개발 가능성이 있을 것으로 예상되어진다.

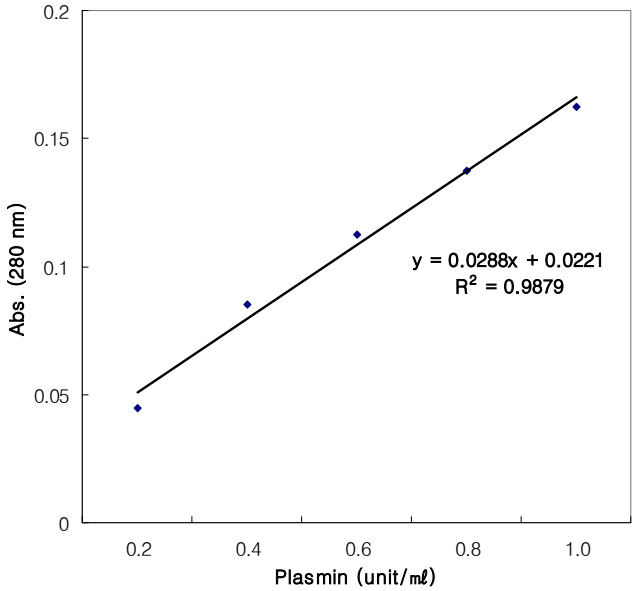

Fig. 15. Standard curve of fibrinogenolytic activity by plasmin.

Table 15. Fibrinogenolytic activity of chalaza peptide fractions

Purification step	Yield(%)	Fibrinogenolytic activity(%)
Hydrolysates	70.2	7.6
Ultrafiltraion (500～10,000)	4.3	37.1
Fr. I-b	0.016	110.8

Table 16. Fibrinolytic activity of plasminogen free and plasminogen rich fibrin plate

	Lysis dimension (㎟)		
	Plasmin	Urokinase	Fr. I-b
Plasminogen free fibrin plate	82.4	460.0	58.1
Plasminogen rich fibrin plate	103.6	911.4	287.7

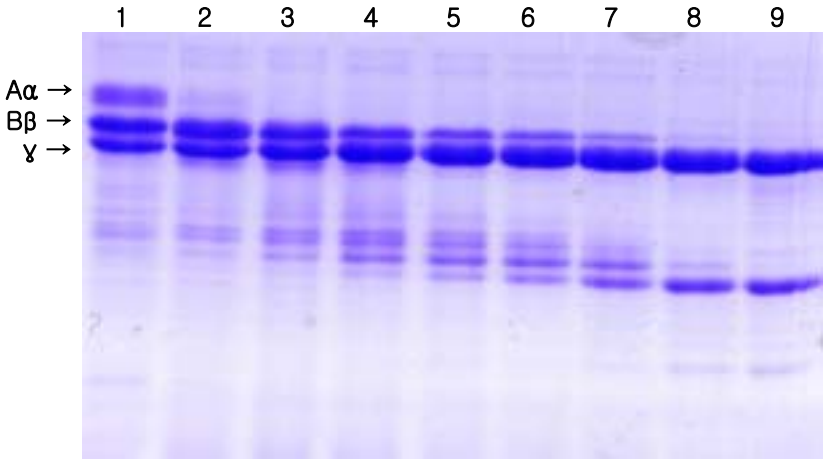

Fig. 16. The pattern of fibrinogen hydrolysis by Fr. Ⅰ-b.
Lane 1-9; 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, and 120 minites incubation, respectively.

4. 결 론

계란 가공시 부산물로 발생되는 계란 알끈으로부터 유용생리 활성 물질을 분리하기 위한 불용성 알끈의 수용화 방안 및 혈전용해 활성을 탐색하였다. 알끈 수용화를 위한 효소 처리 및 분리·정제를 통한 혈전용해 활성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 불용성 알끈의 수용화를 위해 8종의 상업용 효소를 처리하였으며, 그 중 Protamex 및 Kojizyme의 복합효소 처리가 알끈 수용화 및 혈전용해 활성에 가장 유리한 효소 조건임을 알 수 있었다. 또한 식품에 사용 가능한 효소들만을 처리하였으므로, 경구용 혈전용해제로의 개발 가능성을 고려할 수 있다.

2. U.F 및 prep-HPLC 방법을 통해 혈전용해 활성 펩타이드를 보다 용이하게 분리 할 수 있었다. 또한 MALDI mass에 의한 분자량 측정 결과 5,713 Da의 펩타이드 물질임을 확인할 수 있었으며, 아미노산 분석결과 glycine의 함량이 높은편이었다. 이를 토대로 활성 펩타이드의 보다 순수한 물질 분리를 통한 구조 규명이 이루어진다면, 여러 분자생물학적 기술 및 펩타이드 합성 기술을 통해 보다 향상된 혈전용해활성 펩타이드 물질로의 개발 및 대량생산이 가능할 것으로 예상된다.

3. 알끈 펩타이드는 농도 의존적으로 혈전용해 활성이 증가하였으며, fibrinogen 분해 pattern 조사 결과 α, β-chain만을 분해하였고, γ-chain에는 거의 영향을 미치지 못했다. 또한 plasminogen 유·무에 따 른 혈전용해활성 측정 시 plasminogen rich fibrin plate에서의 혈전용해 활성이 plasminogen free fibrin plate에서의 혈전용해활성보다 월등히 우수하였으므로, plasminogen을 경유하는 plasminogen activator로서 의 기작을 예상할 수 있었다.

결론적으로 계란 알끈으로부터 plasminogen activator로서의 기작이 예상되는 알끈 펩타이드를 분리하였고, 혈전용해활성을 확인하였다. 따라서 혈전용해활성 이외의 혈압강하, 혈청콜레스테롤 강하, 칼슘흡수 촉진, 항균, 항암, 면역증강 등의 다양한 펩타이드의 생리활성 탐색을 통해 알끈 펩타이드의 신규 생리활성 소재로서의 가능성을 기대할 수 있다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 목표달성도

No	연 구 개 발 목 표	연 구 개 발 목 표 달 성 도	달성도 (%)
1	난각막 및 알끈의 수용화 공정개발	1) 난각막 및 알끈의 불용성 단백질 matrix의 화학적 최적 수용화 공정 개발 2) 상업용 proteases를 이용한 난각막 및 알끈의 단백질 matrix의 최적 가수분해 공정 개발 3) 수용화 단백질의 이화학적 특성 규명 4) 난각막 및 알끈의 생산 최적화 공정분석 및 기계설비 최적화(공장규모)	100
2	난각막 및 알끈 유래 생리활성 성분의 추출정제 기술개발	1) 난각막 펩타이드의 산업적 생산기술 개발 (알카리 처리 및 한외여과 공정) 2) 알끈의 효율적 가수분해를 위한 최적 protease 선정 및 처리공정 개발 3) 알끈 시알릴올리고당 최적 가수분해 공정 개발(상업용 protease mixture 발굴) 4) 시알릴올리고당 정밀분석기술 확립 - 시알릭산(sialic acid) - 당성분 : 중성당 & uronic acid	100
3	난각막 및 알끈의 생리활성 성분의 대량 생산기술개발 및 적용성 연구	1) 알끈 시알릴올리고당의 대량 생산공정 확립(protease 처리 및 한외여과의 복합공정 적용기술) 2) 한외여과 및 recycling Prep HPLC에 의한 난각막 및 알끈 유래 생리활성 소재의 대량 분취기술 개발 3) 알끈 펩타이드의 혈전 용해활성 규명 - Fibrin plate법에 의한 활성규명 - 활성분획의 이화학적 특성 규명 4) 알끈의 시알릴올리고당 및 혈전용해 펩타이드의 산업적 생산기술 특허출원	100

2. 관련분야에의 기여도

○ 단백질과 펩타이드의 일반적인 식품 기능성이나 생리활성은 매우 광범위한 연구가 진행되어 이미 다양한 원료로부터 제품이 생산되어 산업적으로 적용되고 있다. 따라서 통상적인 생리활성으로는 기존의 저렴한 단백질 소재와의 경쟁력에서 우월성을 제시하는 것이 용이하지 않다.

○ 계란의 경우 산업적으로 매우 저렴하게 생산되는 축산물로서 부가가치가 낮은 편으로 가격경쟁이 현장에서는 매우 치열하게 일어나고 있다. 따라서 최근에는 계란을 가공하여 부가가치를 높이고자 하는 노력이 산업체를 중심으로 많이 진행되고 있다. 대표적인 것이 면역특성(IG-Y)을 부가한 계란으로서 상당한 시장 점유율을 나타내고 있으며, 또한 특수란 형태의 계란제품도 생산되고 있다.

○ 이같은 노력의 일환으로서 계란 가공업체에서는 계란 가공부산물인 난각막과 알끈을 이용한 신규 생리활성 물질의 개발에 주목하고 있다. 국내에서는 아직 난각막과 알끈의 활용기술 개발이 매우 미흡한 편이며, 생리활성에 대한 연구는 거의 보고된 바 없다.

○ 본 연구에서는 산업적인 실용화에 주안점을 두고 알끈으로부터 시알릴올리고당을 효소처리와 한외여과을 이용하여 산편하고도 경제적으로 생산할 수 있는 기술의 개발에 성공하였다. 특히 알끈 펩타이드가 혈전용해 활성이 있다는 결과는 본 연구진의 문헌검색에 의하면 세계에서 최초로 규명된 것으로 과학적인 의미뿐만 아니라 산업적으로도 매우 유용한 결과로서 판단된다.

○ 현재까지 본 연구진이 수집한 정보에 의하면 국내외를 비롯하여 알끈을 대량생산하여 원료로서 공급하는 산업체를 파악되지 않았다. 본 연구결과에서 나타난 바와 같이 알끈에 다량의 시알릴올리고당이 존재함에도 산업체에서 알끈을 생산하지 않는 것은 현재 시알릴당이 계란의 지질을 제조하고 난 후에 부산물로서 발생하는 난황 단백질로부터 생산이 가능하기 때문이다.

○ 그러나 본 연구에서 세계에서 최초로 규명한 바와 같이 알근 펩타이드가 뛰어난 혈전 용해활성을 나타내는 신규한 생물활성이 규명됨에 따라 알끈을 활용하려는 산업체의 노력이 활발해 질 것으로 예상된다. 본 연구의 결과는 특허로 출원되어 지적재산권을 확보하였으며, 앞으로 알끈의 활용이 활성화될 경우 국내 계란 가공업체의 국제경쟁력 강화에 기여할 것으로 예상된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

○ 개발된 관련기술을 기술이전하여 난각막 및 알끈 유래의 단백질, 펩타이드, 올리고당 등 각종 기능성 소재의 산업적 생산기반을 구축할 예정

○ 개발된 기능성 소재의 산업적 활용도와 파급효과를 높이기 위하여 산업적 활용성 연구를 지속적으로 추진하므로써, 개발된 생산기술과 소재가 사장되지 않도록 산업체에 대한 기술지도를 지속적으로 추진함

○ 생산소재의 고순도화와 고기능화를 효율적으로 추진할 수 있는 산학연 공동연구시스템을 구축하며, 필요할 경우 활성물질에 대한 임상연구를 수행할 수 있는 프로그램을 도출함

○ 개발된 관련기술 가운데 지적 재산권의 확보가 필요한 핵심기술을 선별하여 국내외 기술 및 용도 특허를 획득함

○ 본 과제의 수행을 통하여 얻어진 난각막 및 알끈으로부터 생리활성 물질을 추출하는 기술의 산업적 적용

○ 난각막 및 알끈의 생리활성 물질을 포함하는 제품 개발 예정

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 난각막 단백질의 신규 생리활성

2002년 미국 Anaheim에서 거행된 IFT(Institute of Food Technologists)에서 캐나다의 Univeristy of Guelph, Department of Food Science의 Wichittra Daengprok, Prithy Rupa and Yoshinori Mine은 "Hen Eggshell Matrix Proteins Enhance Calcium Transport in the Human Intestinal Epithelial Cells" 제목의 논문을 발표하였다. 이 연구에서는 난각막에서 분리된 15, 36, 66 kDa의 단백질 분획물이 칼슘의 흡수를 촉진하는 작용이 있다는 매우 흥미로운 결과를 제시하였다. 이러한 연구결과는 난각막 단백질의 칼슘흡수 생리활성을 발표함으로써 식의약품(nutraceuticals)으로서의 산업적인 개발 가능성을 제시한 것이다. 그러나 난각막 단백질의 분자량이 칼슘 흡수에 미치는 영향과 저분자량의 난각막 펩타이드의 적용가능성에 대해서는 세부적인 연구결과를 제시하지 않아 추가적인 연구를 필요로 한다.

2. 영국의 난각막 응용현황

영국에서는 난각막에 약 10% 함유되어 있는 일반적인 Type 1 collagen과 매우 특이적인 Type 10 collagen의 산업적 활용성에 주목하고 있다. 현재 의약용 collagen은 g당 $1,000일는 매우 고가에 판매되고 있다. 의약용 collagen은 skin grafts, dental implants, angioplasty sleeves, cornea repair, plastic surgery, 골다공증 치료 등에 고부가가치 물질로서 이용되고 있다. 대량 발생된 난각막이 사료나 degradable plastic 등의 산업용 소재로서 이용되고 있으나 의약용 소재로의 개발이 부가가치 면에서 보면 보다 바람직하다.

(관련자료 http://www.defra.gov.uk/foodrin/poultry/utilisation.htm).

3. 미국의 난각막 이용 컨소시엄

미국 Queen's Univeristy Belfast에서 spin-off한 벤처기업인 Carapacics Ltd.와 필라델피아 소재 계란 가공회사인 Ovogen LLC는 계란가공 부산물로부터 고부가가치의 제품을 상품화하기 위한 협력사업을 개시하였다. 주요한 사업영역은 난각막으로부터 의약용 및 화장품용 collagen의 생산, 항감염 효과의 sialic acid 제조기술을 핵심으로 하고 있다. 위의 영국의 경향과 마찬가지로 난각막을 이용한 고가의 산업용 소재의 생산에 주안점을 두고 있다.

제 7 장 참고문헌

제 1 절. 난각막 및 알끈의 유효성분 생산공정 및 기능성 연구

1. Cutler Dairy Products, Inc. home page http://www.cutleregg.com/shells.htm
2. Ebina, T., Tsukada, K., Umezu, K., Nose, M., Tsuda, K., Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T. : Gastroenteris in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin(IgY) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation(PSK), Microbiol. Immunol. 34: 617-629 (1990)
3. Ichikawa, Y., Look, G.C. and Wong, C.H.: Enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis, Anal. Biochem. 202: 215-238 (1992)
4. Itoh, T., Miyazaki, J., Sugawara, H. and Adachi, S. : Studies on the characterization of ovomucin and chalaza of the hen's egg, J. Food Sci. 52: 1518-1521 (1987)
5. Juneja, L.R., Koketsu, M., Nishimoto, K., Kim, M., Yamamoto, T. and Itoh, T. : Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membrane, Carbohydr. Res. 214: 179-186 (1991)
6. Kakoki, H., Kono, Y., Funatsu, S. and Komatsu, M. : Anti-peroxide external preparation for skin. United States Patent No. 5,415,875, Date of patent: May (1995)
7. Koketsu, M., Juneja, L.R. and Hiroshi Kawanami : Preparation of N-acetylneuraminic acid from delipadated egg yolk, Glyconjugate J. 9: 70-74 (1992)
8. Koketsu, M., Nakata, K., Juneja, L.R., Kim, M. and Yamamoto, T. : Learning performance of egg yolk sialyloligosaccharide fraction, 応用糖質科學. 42: 15-18 (1995)
9. Li-Chan, E.C.Y., Powrie, W.D. and Nakai, S. : Chapt. 6. The chemistry of eggs and egg products. In "Egg Science and Technology:, Stadelman, W.J. and Cotterill, O.J. (eds.), 105-175 (1996)
10. Morschhauser, J., Hoschutzky, H., Jann, K. and Hacker, J. : Functional analysis of the sialic acid-binding adhesion SfaS of pathogenic Escherichia coli by site-specific mutagenesis, Infect. Immn. 58: 2133-2138 (1990)
11. Nesse, N. and Rustad, T. : Heat treatment and drying of capelin mince. Effect of water binding and soluble protein, J. Food Sci. 48: 1320-1322, 1347 (1983)

12. Okubo, T., Akachi, S. and Hatta, H. : Chapt. 1. Structure of hen eggs and physiology of egg laying. In "Hen Eggs: Their basic and applied science". Yamamoto, T., Juneja, L.R., Hatta, H. and Kim, M. (eds.), 1-12 (1996)
13. Paulson, J.C., Rogers, G.N., Carroll, S.M., Higa, H.H., Priechstt, T., Milks, G. and Sabesan, S. : Selection of influenza virus variants based on sialyloligosaccharide receptor specificity, Pure & Appl. Chem. 56: 797-805 (1984)
14. Pearce, K. M. and Kinsella, J. E. : Emulsion stabilizing properties of proteins: evaluation of a turbidimeric technique. J. Agric. Food Chem. 26: 716-723 (1978)
15. Pegg, M.S. and von Itzstein, M. : Slow-binding inhibition of sialidase from influenza virus, Biochem. & Molecular Biology International. 32: 851-858 (1994)
16. Schauer, R. : Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids, Adv.Carbohydr. Chem. Biochem. 40: 131-234 (1982)
17. Sim, J.S. : Development of sialic acid production technology from egg.
18. http://www.agric.gov.ab.ca/research/ari/matching/92-93/92m439.html (1995)
19. Someya, K., Totsuka, Y., Murakoshi, M., Kitano, H. and Miyazawa, T. : The antioxidant effect of palm fruit carotene on skin lipid peroxidation in guinea pigs as estimated by chemiluminescence-HPLC method. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 40: 315-324 (1994)
20. Suyama, K., Nakamura, H., Ishida, M. and Adachi, S. : Lipids in the exterior structures of the hen egg. J. Agric. Food Chem. 25: 799-803 (1977)
21. Tung, M.A. and Richards, J.F. : Ultrastructure of the hen's egg shell membranes by electron microscopy. J. Food Sci. 37: 277-281 (1972)

제 2 절. 계란 알끈을 이용한 시알릴올리고당의 생산기술에 관한 연구

1. William J. and Owen, J. Egg Science and Technology, Food Products Press, pp. 39-41 (1996)
2. http://ext.msstate.edu/anr/poultry/poultrypapers/twsconts.htm.
3. Lekh, R. J., Mamoru, K., Katsuya, N., Mujo, K., Takehiko, Y. and Takatoshi, I. Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membrane. Carbohydr. Res., 214, 179-186 (1991)
4. Takehiko, Y., Lekh, R. J., Hajime, H., Mujo, K. Hen eggs. pp 105-111, (1997)
5. http://www.tcp-ip.or.jp/~aiie-k-n/taiyo-43.htm

6. Koketsu, M., Juneja, L. R., Kawanami, H., Kim, M. and Yamanoto, T., Preparation of N-acetylneuraminic acid from delipidated egg yolk, Carbohydrates., 214, 179 (1991)
7. Schauer, R. Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acid. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 40, 131-234 (1982)
8. Mamoru, K., Teruhiko, N., Lekh, R. J., Mujo, K., Naoki, K. and Takehiko, Y. Sialyloligosaccharides from egg yolk as an inhibitior of rotaviral infection. J. Agric. Food Chem., 43, 858-861 (1995)
9. Akiko, T., Katsuyuki, O., Naofumi, T., Kiyotaka, T., Akihiro, Y., Koichi, Z., Akira, H. and Reiji, K. Adhesion of human cancer cell to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, Sialyl Lewis A1. Biochem. Biophys. Res. Commun., 179, 713-719 (1991)
10. Bruce, A. and Dennis, B. Molecular biology of the cell(3rd eds.), 4 483-484, (1994)
11. Ebina, T., Taukada, K., Umezu, K., Nose, M., Tsuda, K., Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T. Gastroenteris in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin(Ig Y) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation(PSK). Microbiol. Immunol., 34, 617-629 (1990)
12. Hasegawa, K., Motsuchi, W., Tanaka, S. and Dosako, S. Inhibition with lactoferrin of in vitro infection with human herpes virus. Jpn. J. Med. Sci. Biology., 47, 73-85 (1994)
13. Mochalova, L. V., Tuzikov, A.B., Marinina V.P., Gambaryan, A.S., Byramova, N.E., Bovin, N.V. and Matrosovich, M.N. Synthetic polymeric inhibitors of influenza virus receptor-binding activity suppress virus replication. Antiviral Res., 23, 179-190 (1994)
14. Paulson, J.C., Rogers, G.N., Carroll, S.M., Higa, H.H., Priechstt, T., Milks, G. and Sabesan, S. Selection of influenza virus variants based on sialyloligosaccharide receptor specificity. Pure Appl. Chem., 56, 797-805 (1984)
15. Akira, S., Mamoru, K., Masakazu, N., Yuko, E., Hisham, R. I., Lekh, R. J., Mujo, K. and Takehiko. Y. Occurrence of a sialylglycopeptide and free sialylgycans in hen's egg yolk. Biochimica et Biophysica Acta., 1335, 23-32 (1997)
16. Simon, P. M., Goode, P. L., Mobasseri, A. and Zopf, D. Inhibition of helicobacteria pylori binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic

acid-containing oligosaccharides. Ameciacn Soci. Micobiology, 65, 750-757 (1997)
17. Akio, K., Yoshiharu, M., Masataka, S. and Kunihiko K. Separation and characterization of sulfated glycopeptides from ovomucin, chalazae and yolk membrane in chicken eggs. Agric. Biology Chem., 46, 1285-1290 (1982)
18. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254 (1976)
19. Hwang, M., and Ederer, G. M. Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B sterptococci. J. Clin. Microbiol., 1, 114-119, (1975)
20 Mei-Gang, Y., Christopher C.Q.C. and Finn, W. The covalent structure of individual N-linked glycopeptides from ovomucoid and asialofetuin. J. Biological Chem., 263, 111-117 (1988)
21. George, W., Lawrence, D., and Saul, Roseman. The sialic acid. J. of Biological. Chem., 246, 430-435 (1971)
22. Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. Carbohydrate Analysis. pp2-3
23. Takatoshi, I., Junko, M., Hiroshi, S. and Susumu, A. Studies on the characterization of ovomucin and chalaza of the hen's egg. J. Food Sci., 52, 1518-1521 (1987)
24. Mamoru, K., Akira, S., Lekh, R. J., Mujo, K., Naoki, K. and Takehiko, Y. An efficient preparation and structural characterization of sialyloligosaccharides from protease treated egg yolk. J. Carbohydr. Chem., 14, 833-841 (1995)
25. Weitong, W., Karin, E., Frank, L., Torgny, L. and David, Z. High-performance liquid chromatography of sialic acid-containing oligosaccharides and acidic monosaccharides. Anal. Biochem., 190, 182-187 (1990)
26. Mark, R. H., Dale, A., C., Jeremy, P. C. and Brad, B. Separation of branched sialylated oligosaccharides using high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Anal. Biochem., 182, 1-8 (1989)
27. Jeffrey, S. and R. Reid Townsend. Identification, quantification, and characterization of glycopeptides in reversed-phase HPLC separations of glycoprotein proteolytic digests, Anal. Biochem. 211, 72-80 (1993)
28. Niclas, G. K. and Gunnar, C. H. Analysis of monosaccharide composition

of mucin oligosaccharide alditols by high-performance anion-exchange chromatography, Anal. Biochem. 224, 538-541 (1995)
29. Sakako, I., Mariko, I., Koji, I., Ken, K. and Yasuo, I. Isolation and structures of glycoprotein-derived free sialooligosaccahrides from the unfertilized egges of tribolodon hakonensis, a dace. J. Biological Chem., 264, 18520-18526 (1989)
30. Jaakko, P. and Jukka, F. Isolation and structural characterization of five major sialyloligosaccharides and a sialyloligosaccharide from normal human urine. Eur. J. Biochem., 136, 355-361 (1983)
H hgihara, B. Method of enzyme vol Ⅱ. Asachoushoten. Tokyo. Japan, Vol. 2, pp. 237-246 (1956)
31. Alfornso, C. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. Trends Food Sci. Technology., 11, 254-262 (2000)
32. Mamoru, K., Lekh, R. J., Mujo, K., Masaya, O., Fumito, M. and Takehiko, Y. Sialyloligosaccharides of delipidated egg yolk fraction. J. Food Sci., 58, 743-747 (1993)
33. Branko, K., Blanka, R. and Pavao, M. N-acetylation of amino sugar methyl glycosides for gas-liquid chromatographic analysis. Anal. Biochem., 94, 36-39 (1979)
34. Akio, K. and Yasushi, S. The release of carbohydrate rich component from ovomucin gel during storage. Agr. Biol. Chem., 36, 831-836 (1972)

제 3 절. 효소 가수분해한 계란 알끈 펩타이드의 혈전용해활성

1. Francis, J. L.: Fibrinogen, Fibrin Stabilisation, and Fibrinolysis. Ellis horwood Ltd, pp. 326-353 (1998)
2. 김길영: 임상지혈혈전학. 군자출판사, pp. 12-21 (1998)
3. Sottrup, J., Claeys, H., Zaidal, M., Peterson, T. and Magnusson, S.: The primary structure of human plasminogen; Isolation of two lysine-binding fragments and one mini-plasminogen(MW, 38,000) by elastase-catalyzed -specific limited proteolysis. Raven Press, NY, 3, pp. 191-209 (1978)
4. Collen, D. and Lijnen, H. R.: Recent developments in thrombolytic theraphy. Fibrinol. Proteol., 14, 66-72 (2000)
5. Collen, D., Lijnen, H. and Gold, H.: Toward better thrombolytic therapy. Prog. Cardiovasc. Dis., 34, 101-112 (1991)
6. Verstraete, M., Lijnen, H. and Collen, D.: Thombolytic agents in development. Drugs, 50, 29-42 (1991)

7. 신용회: 혈전 치료제의 최근 동향. 의약정보, 1, 59-62 (1995)
8. 김승호: 된장의 기능성에 대한 새로운 연구방향(혈전용해능에 관하여). Korea Soybean Digest, 15, 8-15 (1996)
9. Siigur, E., Siigur. J.: Purification and characterization of lebetase, a fibrinolytic enzyme from Viper lebetina(snake) venom. Biochem. Biophy. Acta, 1074, 223-229 (1991)
10. Liang, X., Chen, J. and Zhou, Y.: Purification and biochemical characterization of F Ⅱa, a fibrinolytic enzyme from Agkistrodon acutus venom. Toxicon, 39, 1133-1139 (2001)
11. Mihara, H., Sumi, H. and Yoneta, T.: A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, Lumbricus rubellus. Jpn. J. Physiol., 41, 461-472 (1991)
12. Nakajima, N. H., Mihara, H. and Sumi, H.: Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, Lumbricus rubellus. Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1726-1730 (1993)
13. Swadesh, J. K. and Huang, I. Y. and Budzynski, A. Z.: Purification and characterization of hementin, a fibrinolytic protease from the leech haementeria ghilianii. J. Chromatogr., 502, 359-369 (1990)
14. Li, A. and Wun, T.: Proteolysis of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) by plasmin; Effect on TFPI activity. Thromb. Haemost., 80, 423-427 (1998)
15. Helft, G., Lebrazai, J. and Beygui, F.: Staphylokinase. Ann. Cardiovasc. Angiol., 47, 582-588 (1998)
16. Roschlau, W. and Lves, D. A.: Review of the biochemistry and coagulation physiology of brinolase(Fibrinolytc enzyme from Aspergillus oryzae). Folia Haematologica, 101, 22-37 (1974)
17. Samy, A.: Production and properties of fibrinolytic enzyme in solid state cultures of Fusarium pallidoroseum. Biotech. Lett., 17, 943-948 (1995)
18. Nakajima, N., Taya, N. and Sumi, H.: Potent fibrinolytic enzyme from the lysate of Katsuwonus pelamis digestive tract(shiokara); purification and characterization. Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1604-1605 (1993)
19. Mitsugu, F., Keiichi, N., Kyongsu, H. and Yae, I.: Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme(Nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a popular soybean fermented food in japan. Biochem. Biophy. Res. Communi., 197, 1340-1347 (1993)
20. Kim, W. K., Choi, K. H. and Kim, Y. T.: Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced from Bacillus sp. strain CK 11-4 screened

from chungkook-jang. Appl. Enciro. Micro., 62, 2482-2488 (1996)
21. Kim, S. H., and Choi, N. S.: Purification and characterization of subtillisin DJ-4 secreted by Bacillus sp. strain DJ-4 screened from doen-jang. Biosci. Biotechol. Biochem., 64, 1722-1725 (2000)
22. Holvoet, P.: Thrombolytic profiles of clot-targeted plasminogen activators, Circulations, 87, 1007-1016 (1993)
23. Toshi, I., Keiji, H., Tohur, K. and Akira, E.: Enhancement of plasminogen binding to U937 cells and fibrin by complestatin. Thromb. Haemost., 77, 137-142 (1995)
24. Toshi, I., Keiji, H., Tohur, K. and Akira, E.: Enhancement of plasminogen binding and fibrinolysis by chloropeptin I. Thromb. Haemost., 87, 571-576 (1997)
25. Kiyoshi, T., Keiji, H., Tohur, K. and Akira, E.: Isolation of Plactins A, B, C, D, novel cyclic pentapeptides that stimulate cellular fibrinolytic activity. J. Antibiot., 49, 45-49 (1995)
26. Gomes, A. and Pallabi, D.: Hannahpep; A novel fibrinolytic peptide from the indian King Cobra(Ophiophagus hannah) veonm. Biochem.Biophysi. Res. Communi., 266, 488-491 (1999)
27. Soichi, K., Tatsuya, I. and Terutoshi, K.: Synthetic peptides derived from midkine enhance plasminogen activator in bovine aortic endothelial cells. Biochem. Biophysi. Res. Commmuni., 206, 468-473 (1995)
28. Hua, Z. C., Chen, X. C., and Chen, D.: Characterization of a recombinant chimeric plasminogen activator composed of Gly-Pro-Arg-Pro tetrapeptide and truncated urokinase-type plasminogen activator expressed in Escherichia coli. Biochem. Biophy.Res. Communi., 22, 576-583 (1996)
29.http://chickscope.beckman.uiuc.edu/explore/embryology/day01/the_albumen.html
30. Akio, K., Yoshiharu, M., Masataka, S. and Kunihiko, K.: Separation and characterization of sulfated glycopeptides from ovomucin, chalazae and yolk membrane in chicken eggs. Agric. Biolo. Chem., 64, 1285-1290 (1982)
31. 이선희: 효소가수분해에 의한 시알릴올리고당의 분리기술에 관한 연구. 연세대학교 석사학위논문 (2001)
32. Clare, E. N., Alcocer, M. J. C. and Morgan, M. R. A.: Biochemical interactions of food-derived peptides. Trends Food Sci. Technol. 3, 64-68 (1992)
33. Fiat, A. M., Migliore, S. D. and Jolles, P.: Biologically active peptides

from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. J. Dairy Sci., 76,301-310 (1993)
34. Kitts, D. D. and Yuan, Y. V.: Caseinophoshosphopeptides and calcium bioavailavbility. Trends Food Sci. Technol. 3, 31-35 (1992)
35. Zwierzina, W. D. and Kunz, F.: A method of testing platelet aggregation in native whole blood. Thromb. Res., 38, 91-97 (1985)
36. Shin, J. I., Ahn, S. W. and Nam, H. S.: Angiotensin I converting enzyme inhibitor derived from fermented soybean paste and enzymatic soybean hydrolyzed. Proceedings of IUFost 96 Reginonal Syposium, 265 (1996)
37. Suzuki, T., Ishikawa, N. and Meguro, H.: Angiotensin-I converting enzyme inhibiting activity in foods. Nipp. Nogei. Kai., 57, 1143-1147 (1983)
38. Sweet, C. C. and Stone, C. A.: A new class of angiotensin converting enzyme inhibitors. Nature, 228, 280-283 (1980)
39. 남희섭: 생리활성 펩타이드의 개발 및 시장동향. 식품산업과 영양, 4, 17-19 (1999)
40. Takatoshi, I., Junko, M., Hiroshi, S. and Susumu, A.: Studies on the characterization of ovomucin and chalaza of the hen's egg. J. Food Sci., 52, 1518-1521 (1987)
41. Astrup, T. and Mullerz, S.: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch. Biochem. Biophys., 40, 346-351 (1952)
42. 정광회: 한국산 살모사(Agkistrodon halys)등의 fibrinolytic enzyme에 관한 연구. 연세대학교 박사학위논문 (1993)
43. Retzios, A. D., and Markland, F. S.: A direct-acting fibrinolytic enzyme from the venom of Agkistrodon contorix contortrix; effects on various components of the human blood coagulation and fibrinolysis system. Thrmob. Res., 52, 541-552 (1988)
44. Laemmi, U. K.: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685 (1970)
45. Schagger, H. and Fagow, F.: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. Anal. Biochem., 166, 368-379 (1987)
46. Momburg, F. Roelse, J., Hammerling, G. J. and Neefjes, J. J.: Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. J. Exp. Med., 179, 1613-1623 (1994)
47. Herraiz, T.: Sample preparation and reversed phase-high performance

liquid chromatography analysis of food-derived peptides. Anal. Chim. Acta, 352, 119-139 (1997)
48. Elkin, R. W. and Gryffith, J. E.: Hydrolysate preparation for analysis of amino acids in sorghum grains: effect of oxidative pretreatment. J. Assoc. Anal. Chem., 68, 1117-1121 (1985)
49. Hillenkamp, F. and Capriolo, R. M.: Matrix-assisted laser desorption/ ionization (MALDI). Biological mass spectrometry. John wily and Sons Ltd., chapter 24, pp. 101-118 (1994)
50. Deogny, L., Weidenbach, A.: Improved fibrin plate method for fibrinolytic activity measurements; Use of bentonite precipitation and agar solidification. Clin. Chim. Acta, 60, 85-89 (1975)
51. Rahama, E. H. and Narasinga, M. S.: Effect of acetylation and succinylation of cottonseed flour on its funtional properties. J. Agric. Food Chem., 31, 352-357 (1983)
52. Takehiko, Y., Lekh, R., Hajime, H. and Mujo, K.: Hen eggs; Their basic and applied science. CRC press, Inc, pp. 25-35 (1997)
53. Kaufmann, R.: Matrix-assisted laser desorption ionization(MALDI) mass spectrometry; a novel analytical tool in molecular biology and biotechology. J. Biotechnol., 41, 155-160 (1995)
54. Lee, J. W., Seu, J. H., Rhee, I. K. and Jin, I.: Purification and characterization of brevinase, a heterogeneous twp-chain fibrinolytic enzyme from the venom of korean snake, Agkistrodon blomhoffii brevicaudus. Bichem. Biophy. Res. Communi., 260, 665-570 (1999)
55. Carl, Y., Hsingchi, L. Antonino, P.: Regulation of urokinase plasminogen activator(u-PA) activity by E-cadherin and hormones in mammary epithelial cells. J. Cell. Physiol., 181, 1-13 (1999)

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.