

최 종
연구 보고서

저급 식육자원을 이용한 기능성
식품소재 <펩타이드, 콘드로이친>
개발연구

Study of Functional Food
Component <Peptide, Chondroitin>
Development from Low Quality Meat
Sources

연구기관
서울대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “저급 식육자원을 이용한 기능성 식품소재<펩타이드, 콘드로이친> 개발연구” 과제 (협동과제 “노폐계를 이용한 식육 펩타이드 생산기술 개발 연구”; 위탁과제 “식육부산물에서의 콘드로이친 생산기술 연구”)의 최종보고서로 제출 합니다

2003 년 7 월

주관 연구기관명 : 서울대학교

총괄 연구 책임자 : 이 무 하

연 구 원 : 장 애 라

협동 연구기관명 : 한국보건산업진흥원

협동 연구 책임자 : 김 중 승

연 구 원 : 정명섭, 조양희

김우선, 박강용

박경식, 이철수

김운성, 이연술

위탁 연구기관명 : 이화여자대학교

위탁 연구 책임자 : 김 양 하

연 구 원 : 양 정 례

요 약 문

I. 제목

저급 식육자원을 이용한 기능성 식품소재<펩타이드, 콘드로이친> 개발 연구

II. 연구 개발의 목적 및 필요성

본 연구 개발의 목적은 저급 식육 단백질내(식육부산물, 노폐계)에 존재하는 생리활성 펩타이드와 콘드로이친의 생산조건을 확립한 후 효능을 검정하고 저장, 가공시 적성을 연구하여 이를 활용한 건강 보조품의 개발 가능성 조사에 있다. 단백질 식품에서의 이러한 기능성 물질의 개발 기술 연구는 세계적으로 활발히 진행되고 있으며 이를 통해 높은 부가가치를 얻을 수 있으므로 국내의 저급 식육자원에서의 기능성 물질의 개발이 요구된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 저급 식육으로 부터의 기능성 펩타이드 생산 연구

식육부산물과 저급 식육에서 생리활성 기능성 펩타이드를 분리하기 위해 다양한 효소를 처리하여 단백질을 분해하여 펩타이드를 분리한 후 여러 가지 생리활성 기능을 스크리닝 하였고 동물실험을 통해 그 안정성과 활성을 측정하였다. 또한 이들 펩타이드의 저장기간 동안의 환경(열, pH)에 변성여부를 조사하였다.

- 가. 효소에 의한 식육 부산물의 최적 분해 조건 확립
- 나. 생산된 펩타이드의 동물실험을 통한 ACE 억제 효과의 검증
- 다. 저급식육에서 일곱가지 효소를 이용하여 분해된 ACE 억제 펩타이드의 서열 조사
- 라. 분리된 펩타이드의 ACE 억제 활성이외의 생리활성기능의 스크리닝
- 마. 분리한 펩타이드의 저장 기간과 열처리, pH변화에 따른 ACE 억제 활성 기능의 변화(가공 적성 기능 조사)

2. 노폐계를 이용한 식육 펩타이드 생산기술 개발

식육으로서 활용가치가 낮은 노폐계로부터 부가가치가 있는 기능적 특성을 갖는 펩타이드를 생산하기 위한 분리 정제의 최적조건을 조사하고, 분리 정제한 펩타이드의 기능성과 안전성을 평가하여 이를 첨가한 기능성 제품의 다양한 활용방안을 모색하였다.

가. 노폐계로부터 펩타이드 생산조건 확립

- 1) 염용성 및 수용성 단백질의 추출
- 2) 펩타이드의 분리 최적조건 탐색
- 3) 펩타이드의 정제 최적조건 탐색

나. 펩타이드의 기능적 특성조사

- 1) 동물실험을 통한 펩타이드의 피부 안전성조사
- 2) 펩타이드의 항산화능 조사

다. 펩타이드를 이용한 기능성 화장품 개발

- 1) 펩타이드(carnosine)를 주성분으로 하는 기능성(주름완화) 화장품의 임상평가

3. 식육 부산물에서의 콘드로이친의 추출기술 연구

본 연구는 저이용 식육 부산물중의 콘드로이친황산 소재의 개발 및 제품화에 관한 독자적인 기술개발과 고부가가치소재로의 유효이용방안 마

련의 면에서 소, 돼지 및 닭의 부산물을 대상으로 콘드로이친황산을 탐색하고, 액화기술을 개발하여 콘드로이친황산 소재를 제조하였다. 또한, 추출한 콘드로이친황산 소재의 생리활성 기능성을 검증하여 상품화 기술 기반을 확립하였다.

- 가. 저급 식육자원 부산물 중의 고기능성 콘드로이친황산 소재의 탐색
- 나. 콘드로이친황산 소재의 액화기술 개발
- 다. 콘드로이친황산 소재의 추출 및 기능성 검증

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 저급식육으로부터의 기능성 펩타이드 생산 연구

1) 저급 우둔의 Sarcoplasmic 단백질의 경우에는 Thermolysin + Protease A 효소를 이용하여 4시간동안 배양한 분해물 중 HPLC로 분리한 분획의 ACE 억제 활성은 53.36%이었고 IC₅₀값은 7.50 μ g/100ul이었으며, 아미노산 서열은 V-L-A-Q-Y-K 이었다.

2) 우둔에서 추출한 항고혈압성 펩타이드의 Spontaneously Hypertensive Rat에 대한 혈압저하 효과를 검증하기 위하여 kg body weight 당 200mg, 500mg, 1000mg의 우둔에서 추출한 V-L-A-Q-Y-K을 경구투여한 결과 실험동물의 혈압은 3주째에 1000mg/kg B.W를 투여한 군이 가장 낮은 혈압수치를 보여 가장 강한 혈압 저하율을 보였고 LDL 콜레스테롤 함량은 대조군보다 처리량에 따라 유의적으로(p<0.001)감소하여 대조군에서 61.3mg/100ml이었던 것이 1000mg 처리군에서는 36.4mg/100ml의 함량

으로 큰폭으로 감소하였다.

3) 저급 우둔 단백질에 일곱가지 상업용 효소인 Thermolysin+Protease A, Trypsin, Proteinase K, Tyrosinase, Pepsin, Papain, Protease을 이용하여 분리한 펩타이드의 서열은 **FHG와 GLSDGEWQ, GFHI, DFHINQ**이었으며 ACE 저해 활성은 각각 25.09, 14.64, 34.77, 31.66%를 나타내었다.

4) 아미노산 서열이 확인된 펩타이드를 다량 합성하여 항균활성을 측정할 결과 각각의 펩타이드에 따라 미약한 미생물 억제 활성을 보였으나 펩타이드 GFHI는 *E.coli*와 *P.aeruginosa*에 낮은 항균 작용을 보였으며 FHG는 *P.aeruginosa*에 낮은 억제작용을 보였다. 합성한 펩타이드의 세포독성 효과를 살펴보면 400ug/ml의 펩타이드 GFHI가 유방암 세포주에 약 20%, 위암 세포주에는 약 30%의 세포독성을 보였다. 또한 펩타이드 GLSDGEWQ는 400ug/ml의 처리 농도에서 위암 세포주에 약 80%의 독성 효과를 보였다. 폐암 세포주에는 어떠한 펩타이드도 별다른 효과를 보이지 않았다. 그러나 암 세포주에 억제 활성이 높았던 펩타이드 GFHI는 machropage 활성에 의해 생성되는 NO의 양에는 효과가 없어 면역 활성의 기능은 없는 것으로 나타났다.

5) 펩타이드는 4℃에서 두달동안 냉장 저장하면서 0.1mg/ml의 농도로 조정하여 pH의 변화를(pH6.0,6.5,7.0,7.5,8.0)주고 열처리를(60,70,80,90,100℃) 달리 하였을 때의 저장기간 후의 714, 325 펩타이드의 ACE 저해 효과는 큰 저하를 보이지 않았으나 특히 1155, 1152, 1134 펩타이드는 60℃의 온도처리 과정에서 ACE 억제 효과도 다소 떨어졌으며 HPLC 크로마토그램에서도 다른 온도처리구와 대조구의 RT와 다른 RT를 보였다.

나. 노폐물을 이용한 식육 펩타이드 생산기술 개발

1) 효소별 최적온도와 pH 조건에서 carnosine의 생산함량이 높은 효소는 수용성 추출물에서 carnosine 생산량이 높았던 효소는 alcalase, papain, flavourzyme, protamex, neutrase, protease, trypsin, carboxypeptidase A, takadiasetase, aminopeptidase 순이었으며, 염용성 추출물에서는 neutrase, papain, alcalase, flavourzyme, protease, trypsin, carboxypeptidase A, protamex, aminopeptidase, takadiasetase 순이었다. 많은 양의 목적성분을 분리하기 위해 염용성 추출물 중 생산함량이 높은 상위 3가지 효소(neutrase, papain, alcalase)를 선정하였다.

펩타이드별 생산함량은 수용성 추출물의 경우 carnosine, anserine, homocarnosine 각각 11.2~84.8, 18.0~365.2, 10.1~29.9mg/100g의 분포를 나타냈으며, 염용성 추출물의 경우 15.8~222.0, 24.1~287.5, 13.5~29.7mg/100g의 분포를 나타냈다. Dipeptides의 전반적인 함량은 염용성 추출물이 높았다.

2) 펩타이드의 지방 산화억제 효과를 조사하기 위하여 linoleic acid를 기질로 과산화물가(peroxide value), TBARS(thio-barbituric acid reactive substances), 전자공여능(Electron donating activity), 아질산염소거능(Nitrite-scavenging effect) 및 SOD 유사활성(SOD enzyme like activity)의 항산화력을 측정된 결과, 모든 첨가구는 대조구보다 지방산화가 억제되었다. 각 펩타이드는 금속종류와 측정방법에 따라 각기 다른 반응성을 나타냈으며, 펩타이드 중 가장 높은 전자공여능과 SOD활성, 아질산염 소거능을 나타낸 것은 carnosine이었다. 분리된 carnosine, anserine 및 homocarnosine에 대한 안전성 평가를 위해 실시한 단회투여독성시험, 1차 피부자극시험, 안점막자극시험 결과, 이들 시험물질의 적용으로 인한 급성독성 및 부작용 유발이 관찰되지 않았고 아무런 특이적 병변이 나타나지 않았다.

3) Carnosine을 0.1% 첨가한 시험용 화장품을 피험자 20명의 눈가 주름부위에 4주간 도포하면서 기기분석을 통해 주름개선 효능을 측정된 결과, 주름감

소울은 Placebo 도포부위보다 크게 나타났지만 통계적인 유의차는 없었다. 임상시험 종료시 실시한 설문조사에서는 7명이 시료를 도포한 부위의 주름이 더 개선된 느낌을 받았다고 응답하였으며, 나머지 13명은 시료와 Placebo간에 주름개선 정도가 비슷하다고 응답하였다. 단, 임상시험 기간 중 시료 도포로 인한 부작용은 관찰되지 않았다.

다. 식육부산물에서의 콘드로이친의 추출기술 연구

1) 저급 식육자원 단백질인 소, 돼지 및 닭의 부산물들 중의 콘드로이친 함량을 각각 측정된 결과 소 부산물의 콘드로이친함량이 돼지와 닭의 부산물보다 많았다. 소 부산물들 중에서 콘드로이친 함량은 간, 양(약 4.5%) > 식도, 연골(약 2.0%) > 심장, 대장, 천엽(약 1.5%) > 지레(약 1.0%)의 순으로 나타났으며, 돼지 부산물의 경우는 식도 > 대장 > 간의 순으로 나타났다. 따라서, 저급 식육자원인 식육 부산물중에서는 소 간, 소식도, 소양, 돼지간, 돼지식도 및 돼지대장이 콘드로이친 소재로써의 가능성을 보여주었다. 콘드로이친 함량을 측정하기 위하여 Nishino와 Nagumo에 의한 방법과 식품공전에 나와 있는 글루쿠론산 정량법을 비교 분석한 결과 글루쿠론산 정량법에 의한 분석 방법이 더 유효한 것으로 나타났다.

2) 소간, 소 식도, 소양, 돼지간, 돼지식도 및 돼지대장으로부터 다양한 액화방법과 단백질분해효소를 사용한 결과 열처리와 효소가수분해를 병행하여 추출하는 방법이 가장 효율적이었다. 콘드로이친을 추출하는 방법으로는 1시간 열처리한 후 건물대비 2%의 alcalase를 첨가하여 24시간 추출방법이 경제성, 편의성, 효율성면에서 가장 우수하였다. 개발된 추출방법으로 콘드로이친을 추출할 경우 소간이 가장 우수한 콘드로이친 소재로써 판명되었고, 소 식도와 돼지 식도에서도 50%이상의 콘드로이친이 추출되었다.

3) 소간, 소식도, 돼지간 및 돼지식도에 추출된 콘드로이친을 동결건조하여 분말화 하고 일반성분 분석을 실시한 결과, 모든 시료에서 단백질 40%이하, 회분 5%이하로써 추출된 콘드로이친은 식품첨가물의 원료로써 적합한 것으로 나타났다. 추출된 콘드로이친의 제품개발을 위한 기능성 검증으로 ACE저해활성을 측정 한 결과 1mM 농도의 모든 시료에서 62%이상의 저해효과를 나타내었으며, 소간과 돼지간에서는 각각 73%, 75%의 우수한 저해를 나타내어 고혈압 예방과 치료를 위한 제품개발의 가능성을 나타내었다. 추출된 콘드로이친의 간암(HepG2) 및 위암(SNU-16)세포에 대한 세포독성 측정 결과, 소간에서 추출된 콘드로이친이 두 암세포주 모두에서 가장 높은 세포독성을 나타내었으며 돼지식도에서 가장 낮은 세포독성을 나타내었다. 또한, 추출된 콘드로이친은 간암세포보다는 위암세포에서 보다 강한 세포독성을 나타내었다.

2. 활용에 대한 건의

저급 식육 저급 식육자원 단백질에서 ACE 억제 활성과 항산화 능력 등의 생리활성기능을 갖는 펩타이드의 추출 및 분리 정제 방법을 정립하였으며 소간, 소와 돼지의 식도, 돼지의 간 등에서 콘드로이친 추출수율을 높이는 분석방법을 개발하고 안전성을 측정하였다. 이를 바탕으로 추출된 펩타이드와 콘드로이친을 포함하는 기능성 식육제품의 생산이 가능할 것이며 이 생산 기술의 산업체 이전이 가능하여 축산농가의 부가가치를 높일 수 있을 것이며 더 나아가 국민건강에 이바지하게 될 것이다.

SUMMARY

I . Project Title

Study of Functional Food Resource<Peptide, Chondroitin> Development from Low Quality Meat Sources

II . Objectives and Importance of the Project

The objective of this project was to develop technology of physiologically active peptides production and chondroitin from low quality meat sources such as meat by-products and spent hen and identify their function and evaluate potentiality of functional food production using them. Not a few studies have been conducted and these bioactive compounds will be used as components of high value added products. Thus there is need for development of functional compounds from the low quality meat sources and production of safe functional foods

III . Contents and Scope of the Project

Section 1. The production of functional peptide from low quality meat and offal

In order to extract and separate physiologically active peptide from low quality meat and offal, various enzymes were used. The separated peptides were screened for ACE inhibition activity, cytotoxicity,

antimicrobial activity, NO(nitric oxide) production activity and determined biological safety through in vivo experiment(SHR, Spontaneously Hypertensive Rat) as well as changes of ACE inhibition activity on the basis of heat treatment(60,70,80,90,100°C) and different pH condition for 2months storage at 4°C.

1. The establishment of optimum hydrolysis condition with commercial enzymes
2. Verification of ACE inhibition activity of separated peptides from low quality meat protein by in vivo experiment
3. Identification of high ACE inhibition activity peptides sequence from low quality meat hydrolysates by 7 enzymes
4. Screening of physiologically active peptides
5. Change of ACE inhibition activity on heat treatment and various pH condition for 2months storage at 4°C

Section 2. Study of meat peptide using spent hen.

Studies were carried out to investigate optimum condition for the isolation and purification of carnosine, anserine and homocarnosine from spent layer breast muscle using various enzyme and to evaluate safety of purified carnosine, anserine and homocarnosine.

1. Evaluation of peptide separation technology from spent hen
2. Verification of peptide's function(In vitro, In vivo)
3. Production of functional cosmetics using peptides

Section 3. Development of chondroitin sulfate materials from the

meat by-products.

Meat by-products were used for screening of chondroitin sulfate materials and effective extraction methods were developed in selected samples such as liver, trachea of bovine and pork. Crude chondroitin sulfates was lyophilized and estimated functional properties such as ACE inhibition and MTT cytotoxicity to application of commercial products.

1. The screening of meat by-products for chondroitin sulfate materials.

A. Samples

1) Domestic cattles

A) Bovine B) Pork C) Chick

2) By-products

A) Liver B) Trachea C) Small Intestine

D) Large Intestine E) Stomach F) Tripe

G) Reticulum H) Gizzard I) Heart

J) Spleen K) Lung L) Cartilage

M) Kidney

B. Sample preparation

2. Development of liquefaction techniques for preparation of chondroitin sulfate materials

A. Physicochemical methods

1) Hot water extraction by autoclave

B. Enzymatic hydrolysis

1) Alcalase 2) Trypsin 3) Bromelain

- C. Establishment of optimal liquefaction parameters
 - 1) Heat treatment conditions
 - 2) Optimal enzyme selection
 - 3) Selection of optimal enzyme reaction condition

- 3. Development of techniques for preparation and estimation of functional properties of crude chondroitin sulfate
 - A. Lyophilization
 - B. General composition of extracted chondroitin sulfate
 - C. Functional properties test
 - 1) ACE inhibition 2) MTT assay

IV. results of the Project and Their Applications

1. Results of the project

Section 1. The production of functional peptides from low quality meat and offal

1. The ACE inhibition activity of peptides, hydrolyzed by enzyme thermolysin+Protease A for 4hours at 37°C was 53.36% and IC50 value was 7.50ug/100ul. Peptide sequence of this hydrolysates was V-L-A-Q-Y-K.

2. Separated peptides(VLAQYK) was orally supplemented to the SHR for 8weeks to verify ACE inhibition activity. Concentrations of the peptide was 200mg/kg B.W, 500mg/kg B.W, 1000mg/kg B.W. The

lowest blood pressure was showed on the 3rd week at 100mg/kg B.W treated group. Content of LDL-cholesterol of the SHR was dose dependently decreased.($p < 0.001$) In fact, its content of control group was 61.3mg/100ml but decreased to 36.4mg/100ml at 1000mg/100ml treatment group.

3. Seven commercial enzymes, Thermolysin+Prtease A, Trypsin, Protease K, Tyrosinase, Pepsin, Papain, Protease were used to hydrolize beef rump protein and separate peptides.

4. Separated peptides synthesized and used to determine antimicrobial activity, cytotoxic activity and machrophage stimulation activity. Peptide GFHI was shown low antimicrobial activity on E.Coli and P.aeruginosa. However, peptide FHG showed low antimicrobial activity on P. aeruginosa. In terms of cytotoxicity of synthesized peptide, 400ug/ml of peptide GFHI showed 20% cytotoxicity on breast cancer cell and ca.30% cytotoxicity on stomach cancer cell. Also, 400ug/ml of peptide GLSDGEWQ showed 80% cytotoxicity on stomach cancer cell. However, there was no peptide showed cytotoxicity activity on lung cancer cell. eptide GFHI, which showed the highest cytotoxicity on stomach cancer, didn't change nitric oxide content. It means that peptide GFHI has not immune stimulation activity but cytotoxicity of breast cancer and stomach cancer cell.

5. ACE nhibition activity of separated peptide(0.1mg/ml) stored for 2months at 4°C was evaluated on various pH level(pH 6.0,6.5,7.0,7.5,8.0) and heat treatment.(60,70,80,90,100°C) ACE inhibition activity of peptide 714, 325 during storage was not changed compare to control group.

However, ACE inhibition activity of peptide 1155,1152,1134 changed at 60°C heat treatment and showed different retention time on HPLC chromatogram from control's.

Section 2. Study of meat peptide using spent hen.

1. Sarcoplasmic protein(water soluble) and myofibrillar protein (salt soluble) of breast meat were extracted from spent layer aged more than 80 weeks. The extracts were treated with a 10 commercial enzymes under different pH, temperature, and time. Optimum conditions of enzymes for carnosine, anserine and homocarnosine production were determined depending on yield. Acute toxicity of peptides produced by selected enzymes, such as neutrase, papain, alcalase were conducted to evaluate safety with mouse and rabbits. The concentrations of carnosine, anserine and homocarnosine extracted from sarcoplasmic protein at optimum conditions of ten enzymes were ranged from 11.2 to 84.8, 18.0 to 365.2 and 10.1 to 29.9mg/100g, respectively. The concentrations of the dipeptides extracted from myofibrillar protein were higher, which were ranged from 15.8 to 222.0, 24.1 to 287.5, and 13.5 to 29.7mg/100g, respectively.

Neutrase was the best in terms of yields of three peptides following papain, alcalase, flavourzyme, protease, trypsin, carboxypeptidase A, protamex, aminopeptidase. takadiasetase.

2. There were no observed acute toxicity, side effect induction, specific induced symptoms in Single Dose General Toxicity Test, Primary Skin Irritation Test, and Eye Irritation Test.

The peroxide value, TBARS(thio barbituric acid reactive substances), electron donating activity, nitrite-scavenging effect and SOD enzyme like activity were conducted to evaluate antioxidant activity of carnosine, anserine and homocarnosine extracted from spent hen. All peptide treatment samples were more effective than the blank sample. Peptides were indicated different response depend on the analysis method and metal type. Carnosine was the best effect in terms of electron donating activity, nitrite-scavenging effect and SOD enzyme like activity.

3. The clinical assessment was conducted to evaluate wrinkle care effects of peptide using test sample cream containing 0.1% carnosine. The eye wrinkle area of 20 subjects were spread by test sample and placebo for 4 weeks. The analysis method, skin replicas of representative area of wrinkle were evaluated by using image-analysis computer software that reflects wrinkle and depth. The rate of wrinkle decrease on test area were higher than placebo area but not significantly. In the survey that ask wrinkle improvement effect, 7 subjects responded that it is effect test area than placebo, and 13 subjects were similar to placebo. There was no observed side effect in clinical assessment.

Section 3. Development of chondroitin sulfate materials from the meat by-products.

1. The screening of meat by-products for chondroitin sulfate materials.

For the screening chondroitin sulfate materials, yields and chondroitin sulfate contents were estimated in various meat

by-products such as liver, trachea, intestine, heart etc. of bovine, pork and chick. Liver, trachea, intestine of bovine and pork had higher levels of yields and chondroitin sulfates than others. They were good sources for preparation of chondroitin sulfate materials.

2. Development of liquefaction techniques for preparation of chondroitin sulfate materials.

Effective liquefaction conditions for chondroitin sulfate materials were studied from selected samples. Extraction methods included physical method using heat and pressure, and enzymatic method using various proteases. When compared those methods, 2% alcalase treatment in parallel with 1hrs autoclave was best conditions in every respects of economical, efficiency and convenience, resulted in higher levels of yields and chondroitin sulfate contents. In case of bovine liver, chondroitin sulfate contents was the highest in among selected samples.

3. Development of techniques for preparation and estimation of functional properties of crude chondroitin sulfate

Hydrolysates of selected samples were filtered by centrifuge, concentrated under vacuum, freeze dried and ground to a fine powder for preparation of crude chondroitin sulfates. From results of general composition analysis, protein and ash contents in crude chondroitin sulfates of all selected samples were < 40%, < 5% respectively, which is suggest that crude chondroitin sulfates would to be good source for food materials. Crude chondroitin sulfates of 1mM inhibited ACE activity above 60%, especially bovine liver and pork liver 70%. Furthermore, extracted chondroitin

sulfates had strong cytotoxic effect on tumor cells such as HepG2 and SNU-16 cell. Above results suggest that extracted chondroitin sulfates would be used to materials for health promoting and/or medical foods.

2. The Proposed Applications for Results

Extraction and separation method of physiologically active(ACE inhibition and anti-oxidation-like) peptide from low quality meat and meat by-products was established. Moreover, analysis methods making higher yield of chondroitin from liver and esophagus of cows and swine were developed and their safety was determined. According to this results, production of functional meat products which possess these peptides and chondroitin will be possible. This established technology may be applied for industry, which can make bulk production inducing added-value to producer and contribution to human health.

CONTENTS

I . Outlines of the Project	27
1. Objectives of th Project	27
2. Necessities of the Project	27
3. Scope of the Project	30
II. R&D Status in Domestic and Overseas	31
1. Status and Problems in Related Technology	31
2. Levels of the results and Prospects	33
III. Contents of the Project and Its results	34
Chapter 1. The production of functional peptides from low quality meat and offal	34
Section 1. The establishment of optimum hydrolysis condition with commercial enzymes	34
1. Materials	34
2. Experimental Method	34
3. Results and Discussion	40
Section 2. Verification of ACE inhibition activity of separated peptides from low quality meat protein by in vivo experiment	68
1. Preparation of experimental animals	68
2. Experimental Method	68
3. Results and Discussion	69

Section 3. Identification of high ACE inhibition activity peptide's sequence from low quality meat hydrolysates by 7 enzymes	73
1. Materials and Extraction Condition	73
2. Results and Discussion	75
Section 4. Screening of physiologically active peptides	89
1. Materials and Method	90
2. Results and Discussion	91
Section 5. Change of ACE inhibition activity on heat treatment and various pH condition for 2months storage at 4°C	104
1. Materials and Method	104
2. Results and Discussion	104
Section 6. Conclusions	109
Chapter 2. Study of meat peptide using spent hen ..	111
Section 1. Materials and Methods	111
1. Materials	111
2. Extraction of protein	111
3. Search of optimal condition for separation of peptides	112
4. Search of optimal condition for purification of peptide	115
5. Evaluation of antioxidant effect on peptides	118
6. Evaluation of safety on peptide <i>in vivo</i>	121
7. Clinical wrinkle test of functional cosmetic containing in peptide(carnosine) extracted from spent hen	132
Section 2. Results	136

1. Purification condition of peptides extracted from spent hen	136
2. Contents of peptides	138
3. Evaluation of antioxidant effect on peptides	145
4. Evaluation of safety on peptide <i>in vivo</i>	157
5. Clinical wrinkle test of functional cosmetic containing in peptide(carnosine) extracted from spent hen	160
Section 3. Conclusion	161
Chapter 3. Development of chondroitin sulfate materials from the meat by-products	163
Section 1. The screening of meat by-products for chondroitin sulfate materials	163
1. Experimental Materials	163
2. Methods	163
A. Proximate Analysis	163
B. Quantitative analysis of Chondroitin sulfate	165
C. Extraction Method of Chondroitin sulfate	166
D. Screening of chondroitin's physiological function	168
3. Results and Discussion	171
A. Proximate Content	171
B. Chondroitin Sulfate Contents	171
C. Yield of Chondroitin Sulfate depend on Enzymes	178
D. Proximate analysis of rapidly freeze-dried material	193
E. ACE(Angiotensin Converting Enzyme) inhibition activity	194
F. MTT assay	196

4. Conclusion	198
IV. Goal Accomplishment and Subsequent Contributions	199
V. Application Plan of the Results	202
VI. Overseas Information on Science and Technology during the Project Years	203
VII. References	205

목 차

제출문	1
요약문	2
SUMMARY	9
제 1 장 연구 개발 과제의 개요	27
제 1 절 연구 개발의 목적	27
제 2 절 연구 개발의 필요성	27
제 3 절 연구 개발의 범위	30
제 2 장 국내외 기술 개발 현황	31
제 1 절 국내외 관련 기술의 현황과 문제점	31
제 2 절 앞으로의 전망	33
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	34
제 1 세부 과제: 저급식육에서의 기능성 펩타이드 생산연구	34
제 1 절 효소에 의한 식육부산물의 최적 분해조건 확립 및 생 산 펩타이드 성질규명	34
1 . 실험 재료	34
2 . 실험 방법	34
가. 일반성분의 분석	34
나. 식육내 단백질의 추출방법	34
다. 선택된 효소의 종류	35
라. 효소와 단백질 추출물의 배양조건	36
마. 가수분해도의 측정 (Degree of hydrolysis)	36

마. 혈압 상승억제 활성 측정(ACE inhibition activity)	36
사. 한외여과(Ultra filtration)분리	37
아. Gel filtration 분리	37
자. RP-HPLC (Reverse phase HPLC) 분리	37
차. 아미노산 조성	38
카. SDS-PAGE를 이용한 단백질 분해 정도 판별	39
타. 펩타이드 서열분석	39
3. 결과 및 고찰	40
가. 일반성분 분석	40
나. 효소처리에 따른 우둔 단백질의 분해도	41
다. ACE 억제효과(%)	43
라. SDS-PAGE electrophoregrams를 이용한 단백질 효소 분 해도 결과	45
마. 한외여과 분리된 펩타이드의 ACE 억제 효과	47
바. Gel filtration을 이용해 분리한 분획의 크로마토그램과 각 분획의 분자량 예측	48
사. Gel filtration을 통해 분리된 분획의 ACE 억제 효과 ..	53
아. Reversed-Phase HPLC를 이용하여 분리한 분획	56
자. 순차적 분리단계를 통해 분리한 분획의 IC50 값	60
차. 소 염통과 지라의 단백질 분해물의 ACE 억제 효과	62
제 2 절 생산된 펩타이드의 동물 실험을(SHR, Spontaneously Hypertensive Rat) 통한 ACE 억제 효과의 검정	68
1. 실험 동물	68
가. 실험동물과 처리물(펩타이드) 준비	68
2. 실험 방법	68
가. 혈압측정	69
나. 혈청내 지질성분 분석 및 장기중량 측정	69
다. 통계분석	69
3. 결과 및 고찰	69
가. 실험동물의 생리적 변화	69
나. 실험동물의 혈압변화와 혈내 지질수준의 변화	71

제 3 절 일곱 가지 효소를 이용하여 식육에서 분리한 ACE 억제 활성 펩타이드	73
1. 실험 재료 및 방법	73
가. 재료 및 추출조건	73
나. Reversed-Phase Liquid Chromatography를 이용한 펩타이드의 분리	74
2. 결과 및 고찰	75
가. Ultrafiltration 과 Gel filtration을 이용한 단백질 효소분해물의 DH(Degree of Hydrolysis)와 분해 패턴	75
나. Gel filtration을 이용하여 분리한 분획의 ACE 억제 효과 ..	80
다. RP-HPLC를 이용하여 ACE 억제 활성을 지닌 분획의 분리 ..	82
라. RP-HPLC를 통해 분리한 분획의 ACE 억제 활성 결과 ..	87
제 4 절 분리된 ACE억제 펩타이드의 그 외 다른 생리 활성기능의 스크리닝	89
1. 실험 재료 및 방법	89
가. 펩타이드	89
나. 분리된 펩타이드의 항균활성 측정(디스크 법)	89
다. 펩타이드의 암세포에 대한 cytotoxicity 측정	89
라. 면역 활성 측정	90
2. 결과 및 고찰	91
가. 분리된 펩타이드의 항균 실험 결과	91
나. 분리된 펩타이드의 세포독성 효과	94
다. 분리된 펩타이드의 면역 활성 조사	102
제 5 절 분리한 펩타이드의 저장 기간과 pH 변화에 따른 ACE 억제 활성 기능의 변화	104
1. 실험 재료 및 방법	104
2. 결과 및 토론	104
가. 다양한 온도, pH 조건에서 저장기간동안 ACE 억제 활성 펩타이드의 활성 변화	105

나. 다양한 온도에서의 peptide의 RP-HPLC 크로마토그램 ...	105
제 6 절 결 론	109
제 2 세부 (협동과제) 노폐계를 이용한 식육펩타이드의 연구	111
제 1 절 노폐계를 이용한 기능성 식육펩타이드 생산 및 기능 확인	111
1. 실험재료	111
2. 실험 방법	111
가. 단백질의 추출	111
나. 펩타이드의 분리 최적조건 탐색	112
다. 효소가수분해 최적조건의 탐색	112
라. 펩타이드의 정제 최적조건 탐색	115
마. 펩타이드의 항산화능 평가	118
바. 펩타이드의 안전성 평가	121
사. 펩타이드(carnosine)를 주성분으로 하는 기능성(주름 완화)화장품의 임상평가	132
3. 결과 및 고찰	136
가. 펩타이드 분리정제 조건	136
나. 펩타이드 생산함량	138
다. 펩타이드의 항산화능 평가	145
라. 아질산염 소거능(Nitrite-scavenging effect)	153
마. SOD 유사활성(SOD like activity)	156
바. 펩타이드의 안전성 평가	157
사. 펩타이드(carnosine)를 주성분으로 하는 기능성(주름 완화)화장품의 임상평가	160
4. 결 론	161
제 3 세부 (위탁과제) : 식육부산물에서의 콘드로이친 생산기 술연구	163

제 1 절 식육 부산물에서 콘드로이친 생산기술 개발과 기능성 연구	163
1. 실험 재료	163
2. 실험 방법	163
가. 일반성분 분석	163
나. 콘드로이친황산의 정량	165
다. 콘드로이친황산 추출 방법	166
라. 콘드로이친의 기능성 검증 실험	168
3. 결과 및 고찰	171
가. 일반성분 함량	171
나. 콘드로이친황산 함량	171
다. 효소에 따른 콘드로이친 수율	178
라. 급속동결건조물의 일반성분 분석	193
마. ACE(Angiotensin I Converting Enzyme) 저해활성	194
바. MTT assay 결과	196
4. 결 론	197
제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도	199
제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획	202
제 6 장 연구 개발 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보	203
제 7 장 참고 문헌	205

제 1 장 연구 개발 과제의 개요

제 1 절 연구 개발의 목적

최근 국내 축산업의 활성화와 경쟁력 강화 측면에서 기능성 축산물 생산에 관심이 집중되어 여러 가지 기능성 축산물이 생산 판매되고 있으며 선진국에서도 이러한 기능성 식품에 대한 관심이 증대되고 있다. 그러나 아직까지는 식육에서 기능성 물질의 생산연구가 거의 이루어지고 있지 않기 때문에 본 연구는 저급 식육 단백질 내 존재하는 생리활성 펩타이드의 생산조건을 확립한 후 기능적 특성을 파악하여 효능을 검증하고 저장, 가공시 적성을 연구하여 이를 활용한 건강 보조품 및 정제 기술을 개발하는데 목적이 있다.

제 2 절 연구 개발의 필요성

1. 기술적 측면

최근 국내 축산업의 활성화와 경쟁력 강화 측면에서 기능성 축산물 생산에 관심이 집중되어 여러 가지 기능성 축산물 즉, 오메가 계란, 요오드란, 인삼란, 해초란, DHA 우유, CLA 돼지고기 및 오메가 닭고기 등이 생산 판매되고 있다. 그러나 국내에서 이루어지고 있는 가축 생산단계에서의 기능성 식육 생산은 종류도 단순하고 기능성 효과도 매우 제한적이어서 국내 축산업을 활성화 시켜 대외 경쟁력을 갖게 하기에는 미흡한 점이 너무 많다. 선진국에서는 주로 식물성 농산물 및 우유를 이용하여 여러 가지 질병을 치료하거나 특수한 건강 증진 효과를 가지는 기능성 식품을 많이 생산하고 있으나 식육에서는 거의 연구가 되어있지 않고 있으므로 식육내 존재하고 있는 기능성 성분의 확인을 위한 기술개발이 필요하다.- 이러한 기술 개발을 위해서는 단백질이 주된 구성 요소

인 저급 식육자원이 가지는 혈압 저하 기능성 펩타이드나 건강 증진 효과물질의 분리, 정제를 위한 기술개발이 요구된다. 이에 따른 펩타이드의 분리 및 정제를 위해서 적절한 효소를 이용한 단백질의 분해 조건의 개발 및 각종 부산물에 존재하는 프로티오글라이칸(콘드로이친)의 정제 기술 개발이 필요하다.

결국 21세기의 소비자는 건강에 대한 관심의 증가로 식품의 생리활성에 관한 폭넓은 지식을 가지고 있을 것이며 결국 과학적 근거가 부족한 제품은 시장에서 사라질 위험이 있기 때문에 기능성 식육 생산을 가속 생산 단계에서만 아니라 생산된 식육을 이용하여 우수한 기능성 식육 제품을 생산할 수 있다면 국민건강에 이바지할 수 있을 뿐만 아니라 축산물 수입 개방에 대비하여 국내 축산의 기반을 유지시킬 수 있는 소비 촉진 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다. 이미 선진국에서는 식육을 이용한 생리활성기능 조절성분의 연구가 활발히 진행되고 있으므로 향후 식육의 수입이 전면 개방되면 이에 대한 경쟁력을 갖추기 위해 저급 식육자원을 이용하여 기능성을 강화시킨 국내산 축육제품의 개발이 절실하다.

2. 경제·산업적 측면

현재 선진국 소비자들의 건강에 대한 관심 증가는 적육 소비량에 부정적인 영향을 끼쳐 식육의 소비감소로 인한 상대적인 과잉생산을 가져왔다. 이에 발맞추어 자국 생산자들을 보호하기 위해 수출에 적극적으로 나서고 있는 것이 선진 육류 수출국들의 실정이다. 이러한 현실속에서 2001년에 쇠고기 시장을 전면 개방하는 것을 끝으로 국내 축산물 시장은 대외적으로 완전 개방이 이루어진다. 더욱이 WTO체제하에서 관세 인하를 위한 농산물 협상은 계속되고 있어 2004년부터 확정 관세율에 의해 수입될 쇠고기, 돼지고기 및 닭고기가 국내 가축 사육기반에 미칠것으로 예상되는 타격은 엄청날 것으로 보고된다(축산신문, 1999.12.31)

국내 축산업계는 고품질 식육생산을 추구함으로써 수입개방에 대비하고 있지만 식육은 항상 고품질의 것만 생산되는 것이 아니다. 1999년도에 쇠고기는 1등급이상이 전체의 25% 안팎이며 돼지는 B등급이상이 60% 안팎이다. 따라서 저급 식육은 쇠고기에서 75%, 돼지고기에서는 30% 안팎이 될 것이다. 더욱이 이에 따른 부산물 생산량은 엄청날 것이다. 닭고기는 노계육 생산량이 연간 3만톤을 상회하고 있으므로 식육 수출 선진국에서 고급육 및 중등육이 수입될 경우 국내산 저급 식육 자원의 활용 방안이 강구되어야 할 필요가 있다.

최근 건강에 관심이 많은 소비자 동향은 1990년대의 식품 산업에 세계적으로 기능성 식품이 유행하도록 만들었다. 노령 인구의 비율이 높은 미국의 기능성 식품시장 규모는 1997년에 860억 달러 이었으며 매년 7.5%씩 성장하는 것으로 추정되고 있다.(Mazza, 1998) 따라서 현재 생산되고 있는 국내산 저급 식육 원료를 혈압저하기능을 갖는 펩타이드의 생산 원료로 삼아 고부가가치를 창출하고 각종 부산물에서 기능성 소재를 분리 정제함으로써 축산농가의 소득을 증진시킨다면 2001년 이후의 식육 시장의 완전개방으로 인한 축산농가의 위축을 고부가가치의 축육 제품 생산으로 인하여 예방할 수 있을 것이다.

수입의 개방화로 인한 외국의 기능성 식품과의 경쟁에서 값비싼 로얄티를 주고 외국산 식품의 구입보다는 국내산 원료를 기본으로 한 기능성 펩타이드를 발견하고 식품에 이용하는 것이 필요하다. 이 추출 및 정제기술이 농업에 바탕이 되어야 하는 이유는 축산부산물이 단지 약품의 추출에서 끝난다면 그로 인한 농민의 부가가치는 미미할 것이기 때문이다. 축산부산물을 바로 식품과 연결 지으며 기능성을 부여할 때 비로소 향상된 가치가 가축에 부여되고 그로 인한 이익은 농민에게 돌아가게 될 것이기 때문이다. 이것이 본 과제의 가장 중요한 점이라 할 수 있다.

3. 사회·문화적 측면

21세기를 맞이하여 식품시장에 다가올 새로운 변화를 꼽으라면 우선적으로 기능성 식품 시장의 대두를 예상할 수 있다. 음식으로 섭취할 수 있는 기능성 식육제품의 개발은 바쁜 사회 생활로 인한 불규칙한 식사 때문에 영양의 균형이 깨지기 쉬운 현대인들을 위해서는 더욱 필요하다. 더군다나 국민들의 건강에 대한 관심 증가와 더불어 평균수명의 증가는 노인인구의 증가를 의미하며 그것은 각종 성인병 및 노인병에 대한 관심의 증가를 의미한다. 이에 대한 치료법으로 의약품을 이용하지만 이로 인해 일어날 수 있는 부작용을 최소화시키고 건강을 유지시키거나 질병을 예방할 수 있는 기능성 식품의 활용이 최근 소비자들의 경향이다. 따라서 이미 남보다 뒤쳐진 상태에서 더 이상 지체하다가는 국민의 먹거리시장은 침탈될 것이고 국민의 먹거리를 생산하는 축산 농민들이 힘겨워짐을 피하려면 기능성 식육 제품 생산에 관한 연구가 필요하다.

저급 식육 자원은 축산 농가에게 경쟁력 저하의 원인을 제공할 뿐만 아니라 소비자에게 나쁜 인식을 심어 줘 장기적으로는 식육소비의 감소를 가져오게 할 위험이 있으므로 국내 축산농가에 활력을 불어 넣어줄 뿐만 아니라 국민 건강증진에 식육 자원을 활용할 수 있게 해줌으로써 장기적으로 식육의 대소비자 인식을 바꿔줄 수 있고 새로운 가치를 창출하는 기능성 식육제품을 생산할 수 있는 기술에 관한 연구가 절실하다.

제 3 절 연구 개발의 범위

저급 식육자원에서 기능성 펩타이드의 분리 및 정제를 위하여 20여 종의 효소를 이용하여 최적 온도와 pH 조건에서 저급 식육과 부산물을 분해하여 ACE 억제활성 펩타이드, 항산화 펩타이드, 콘드로이친의 분리 기술을 개발하였고 이들의 생리활성 기능을 스크리닝 하였다. ACE 억제

활성 펩타이드와 항산화 펩타이드는 동물실험을 통하여 그 기능을 검증하였다.

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

제 1 절 국내외 관련 기술의 현황과 문제점

식품내에 존재하는 생리활성조질 기능을 갖는 펩타이드에는 동물성 식품 유래의 호르몬류나 식물성 식품유래의 효소저해 물질등과 같은 현재적 생리활성 펩타이드와 소화과정이나 식품 가공과정중에 부분가수분해되어 생성되는 잠재적 생리 활성 펩타이드로 분류된다.(남희섭, 1999) 이 중에서 앞으로 주목되는 부분은 잠재적 생리활성 펩타이드라 할 수 있다. 잠재적 생리활성 펩타이드에는 그 효과에 따라 opioid 펩타이드류(Christine, 1978), 혈관 수축저해 펩타이드류(Manjusri, 1975) 콜레스테롤 흡수저해 펩타이드류(Kohji, 1999), 면역활성 펩타이드류(Jerome, 1996)등이 알려져 있다.

가까운 나라인 일본에서는 쇠고기에서 펩타이드를 추출하여 에너지대사 촉진 소재로 다이어트 식품이나 스포츠 식품에 활용되어 선풍적인 인기를 얻고 있다. 콜라겐 펩타이드는 피층 콜라겐 대사촉진 작용에 의한 미용효과가 있음이 알려져 미용식품으로의 개발이 기대되고 있다. 이외에도 참치에서 어육 단백질 유래의 혈압강하 펩타이드가 개발되어 이용되고 있는 실정이다.(남희섭, 1999)

부산물을 이용한 펩타이드의 이용면에서 보면 돈혈에서 채취한 혈청에서 Angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitors가 분리되어 이용되고 있다. ACE- inhibitor는 강력한 혈관 수축신경으로 전환되는 것을 억

제하기 때문에 항고혈압작용에 효과가 있다고 보고되고 있다.(Keizo , 1999) Hughes et. al.(1975)은 morphine과 같은 작용 즉, 세포막의 아편제 수용체와 상호작용함으로써 아편제와 같은 효과를 나타내는 천연산 펩타이드 [Met⁵] enkephalin, [Leu⁵] enkephalin을 뇌에서 발견했으며, Lox et. al(1975)은 뇌하수체로부터 [Met⁵] enkephalin과 작용이 유사한 β -lipotropin을 발견했다. 그외 다양한 식품 단백질 소재로부터 ACE 억제 인자의 분리, 추출이 이루어 졌다.(Ariyoshi, 1993)

국외에서는 기능성 펩타이드에 관한 연구가 다양하게 이루어지고 있는 반면에 국내의 기능성 식품소재의 개발은 아직도 미흡한 단계에 있다고 할 수 있다. 생리활성 펩타이드는 유제품에 CPP(칼슘 흡수 촉진 펩타이드)를 사용하는 것이 주류를 이루어 왔고 그 제품을 시장에서 볼 수가 있다. 콩에서는 혈압 강하 기능을 갖는 펩타이드가 개발되었고 라면, 요구르트, 두유 등의 식품에 사용되고 있다(남희섭, 1999). 우유단백질에서 발견되는 생리 기능성 펩타이드에는 특히 casein에서 분자량이 1000-5000 dalton 사이의 소화흡수 되기 어려운 macropeptide가 생성되는 펩타이드 분해를 섭취한 흰쥐에서 혈청 콜레스테롤농도가 낮아졌다는 보고가 있으며, 혈소판응집 저해 활성 펩타이드도 보고되고 있다.(이형주, 1998)

국내외의 펩타이드의 연구는 거의 비식육 원료를 이용하고 있고 부분적인 활성만을 개발하는 것에 이르고 있어서 소비자들의 기능적인 특성을 갖는 식품에 대한 관심이 고조됨에 따른 수요를 감당하지 못하는 실정이다. 또한 생리활성 기능을 갖는 물질을 여러 종류의 식품에서 찾아내는 기술도 아직 확실히 정립이 안된 상황이기 때문에 저급 식육 자원에서 프로티오글라이칸 및 펩타이드의 대량 생산과 더불어 그 기능을 향상시키기 위해서 정확한 추출, 정제 기술의 개발을 유도하는 것이 어려운 부분이다. 따라서 이미 밝혀진 많은 방법들 중에서 식육 원료를 이용할 때 가장 효과적일 수 있는 방법을 창출하고 수율을 증가시키며 순도가 높은 기능성 물질의 추출을 돕기 위한 방법에 대하여 심도 있는

연구가 필요한 상태이다.

제 2 절 앞으로의 전망

산업이 발달하고 소득 수준이 향상되고 식생활의 변화가 일어나면서 소비자들의 식품에 대한 생각도 변해왔다. 생명을 유지하기 위하여 생체에 영양소를 공급하는 것과 기호성외에 생체를 조정하는 인자에 대해 많은 연구가 이루어지고 있는 실정이다. 즉, 앞으로의 식품산업과 식품시장의 방향은 생체의 항상성 유지와 생리조절기능(면역증강, macrophages 활성화, 인슐린 등의 호르몬 분비 증강, 뇌신경 조절 및 진정기능, 정장기능, 항산화 기능, 노화억제 기능, 항종양기능 등)을 갖는 기능성 식품의 시대로 예측된다. 이러한 전망속에서 특히 21세기초의 국내 육류시장의 전면 개방으로 인해 수입 육류의 도입이 어쩔 수 없는 현실은 값싼 수입육과의 경쟁력을 갖추기 위해서 국산 저급 식육 자원을 생리조절기능을 갖는 식육제품으로 새롭게 디자인한 식육을 소비자들에게 공급하면 예방 의학적 차원에서 국민건강의 유지 및 증진효과 뿐만 아니라 의·식·주 중 식문화 측면에서의 삶의 질 향상, 신제품 개발에 따른 식육산업의 활성화 등 보건적, 사회문화적, 경제적 효과를 창출하게 될 것이다.

저급 식육 자원을 이용한 펩타이드 생산이나 콘드로이친 생산기술 연구는 축산농가들이 저급 식육 생산물을 통해 얻을 수 있는 이익을 증대시켜 축산농가의 경쟁력을 증가시키고 나아가는 이러한 기능성 식육 소재의 수입을 대체하고 나아가서는 수출로 연결시켜 국내 축산업 나아가서는 식육 산업을 활성화시킬 것이다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 세부 과제: 저급식육에서의 기능성 펩타이드 생산연구

제 1 절 효소에 의한 식육부산물의 최적 분해조건 확립 및 생산 펩타이드 성질규명

1. 재료

저급식육자원의 향 혈압상승 펩타이드의 생산조건을 확립하기위해 사용된 시료는 3등급에 해당하는 우둔을 농협에서 구입하였다. 분쇄기를 통하여 분쇄한 후 -20°C 에 보관하면서 실험에 이용하였다.

2. 실험 방법

가. 일반성분의 분석

일반성분분석은 A.O.A.C(1995)방법에 따라 실시하였다. 즉 수분은 오븐 건조법, 조지방은 Soxlet법, 조단백질은 Keldahl법, 회분은 건식화법으로 측정하였다.

나. 식육내 단백질의 추출방법

1) 근형질 단백질 추출방법

중등급의 우둔을 분쇄한 후 20g를 정량한다. 여기에 200ml의 20mM phosphate buffer(pH 7.4)를 첨가한 후에 3분 동안 균질화 한다. $10000\times g$ 에서 20분 동안(4°C) 원심분리한 후 상층액을 0.45um의 필터로 걸러내어 근형질 단백질의 추출물로 이용한다.

2) 근원섬유 단백질의 추출방법

근형질 단백질의 상층액을 제거한 펠렛에 200ml의 20mM phosphate buffer(pH 7.4)를 가한다. 0.1%의 Triton-X-100을 200ml 첨가한다. 2분 동안 균질화 한다. 원심분리를 10000xg로 20분 동안 4℃에서 실시하고 이 과정을 세번 반복한다. 여기에 200ml의 0.1M phosphate buffer와 1.1M KI(pH 7.4)를 첨가하고 2분 동안 균질화 한다. 여기의 상층액을 0.45um의 필터로 걸러서 근원섬유 단백질의 추출물로 이용한다.

다 . 선택된 효소의 종류

혈압상승억제 펩타이드의 생산조건을 확립하기 위해 사용된 펩타이드는 Thermolysin, Protease A, Protease type XIII fungal 이었다. 그리고 이들의 혼합시의 효과를 알아 보기위해 각각의 효소를 다음의 비율로 혼합하여 이용하였다. 각 효소에 대한 단백질 가수분해물의 양은 12ml이었다.

Table1. The names and ratio of enzymes either alone or mixed to hydrolyse protein.

효소의 종류	혼합효소의 비율
Thermolysin	60ul
Protease type XIII fungal	1500ul
Protease A	1500ul
Thermolysin+ Protease type XIII fungal	750ul + 1500ul
Protease A+ Protease type XIII fungal	1500ul + 1500ul
Thermolysin + Protease A	750ul + 1500ul

라 . 효소와 단백질 추출물의 배양조건

온도는 37℃로 하여 배양시간은 0hrs, 4hrs, 8hrs, 12hrs, 24hrs의 간격으로 조사하였다. 배양후 95℃의 물중탕에서 5분간 열처리하여 효소를 불활성화 시켰다.

마 . 가수분해도의 측정 (Degree of hydrolysis)

단백질 측정방법은 단백질 분석용 kit (Sigma. co.)를 이용하였으며 가수분해도를 측정하기 위한 효소 분해된 단백질은 다음의 방법으로 측정하였다.

- 1) 단백질 분해물 1ml를 20% TCA 용액에 가함
- 2) 실온에서 30분 동안 방치함
- 3) 2700 rpm으로 10분동안 원심분리
- 4) 상층액과 전체 단백질의 양의 비율로 가수분해도를 측정

바 . 혈압 상승억제 활성 측정(ACE inhibition activity)

- 1) 시료 100ul에 HHL을 100ul 첨가한다.
- 2) 37℃에서 5분간 배양한다.
- 3) 염산 0.5N HCL을 250ul 첨가한다.
- 4) 대조구로서 염산을 첨가한 후에 시료를 첨가한다.
- 5) ACE 효소액을 150ul 첨가한 후 1시간동안 반응이 일어나도록 37℃에서 배양 한다.
- 6) 대조구가 아닌 모든 튜브에 0.5N HCl을 250ul 가하여 반응을 정지시킨다.
- 7) Ethyl acetate 1.5ml를 첨가하여 15초 동안 섞어준다.
- 8) 2500rpm에서 10분 동안 원심 분리한다.
- 9) 원심 분리한 상등액을 0.5ml 취한다.
- 10) 위의 상등액을 120℃에서 건조시킨 후 1M의 NaCl을 3ml 가하여 228nm에서 흡광도를 측정한다.

$$\text{ACE 억제 활성(\%)} = \left(1 - \frac{S - S_c}{B - B_c}\right) \times 100$$

S : Sample의 흡광도

S_c : Sample 의 대조군 (HCL에 의한 반응정지후 효소를 넣은 군)의 흡광도

B : Blank (sample 대신 증류수를 넣은 군)의 흡광도

B_c : Blank 대조군의 흡광도

사 . 한외여과(Ultra filtration)분리

단백질 효소분해물질들의 거대 단백질의 제거를 위해서 그리고 효소액의 농축을 위해 한외여과(Amicon Co., Beverly, MA,USA) 방법을 이용하였다. 멤브레인은 MW cut off 10,000 Da 인 PM-10을 이용하였으며 4℃에서 진행하였다.

아 . Gel filtration 분리

한외여과된 단백질 가수분해물질은 0.45μm filter(Millipore membrane)로 여과시킨 후 shephadex G-25 resin이 충전된 컬럼을 통하여 분리하였다. 이용된 컬럼은 XK 2.6mm×1m (Amersham pharmacia)이었다. 20mM phosphate buffer(pH 7.0)에 미생물의 증식을 막기 위해 0.05%(w/v) sodium azide를 첨가하여 사용하였다. 유속은 1.6ml/min이었으며 분자량을 결정짓는 표준물질로는 Bovine serum albumin(68kDa), ChymotrypsinogenA(25kDa), CytochromeC(12.5kDa), Aprotinin(6.5kDa), Ristocetin A sulphate(2.5kDa), Pepstatin(686Da)이었다.

자 . RP-HPLC (Reverse phase HPLC) 분리

Sephadex G-25 column에서 얻어진 활성 획분을 HPLC를 이용하여 분리하고 정제하였다. 그 조건은 Table 2와 같다.

Table 2. Analysis conditions of reversed Phase HPLC to separate of ACE inhibition activity fraction.

Instrument	Young-Lin M930, M925 LC pump
Column& size	C18 symetry 150×2.1mm
Eluent	Sol A:0.1%TFA/DW, Sol B: 0.07%TFA/Aetonitrile
Flow rate	0.08ml/min
Gradient condition	5min-A(%):B(%)=100:0 15min-A(%):B(%)=80:20 30min-A(%):B(%)=60:40 40min-A(%):B(%)=100:0 42min-A(%):B(%)=100:0
Detector	UV absorbance (214nm)
Sample size	10 μ l

차 . 아미노산 조성

ACE 저해 활성이 가장 높은 단일 분획은 RP-HPLC로 분리되고 그 아미노산 조성의 분석을 위해 RP-HPLC를 다시 한번 이용하였다. 위에서 얻은 ACE 저해 활성이 높은 분획에 6N-HCL을 가하여 24시간 가수분해 한 후 유도화 시켜서 앞에서와 같은 HPLC 기기를 이용하였으며 Pico·Tag column(waters, 3.8×150mm)을 이용하였으며 detector의 흡광도는 254nm이었고 flow rate는 0.7ml/min이었다.

카 . SDS-PAGE를 이용한 단백질 분해 정도 판별

효소를 이용하여 분해 한 식육 단백질의 분해 정도를 알아보기 위해 Toldra et al(1992)의 방법을 이용하여 전기영동을 실시하였다. 영동젤은 12%의 polyacrylamide 젤을 이용하였으며 단백질 표준물질로는 Bovine Serum albumin(68KDa), Chymotrypsinogen A(25KDa), Cytochrome C(12.5KDa), Aprotinin(6.5KDa), Ristocetin A sulphate(2.5KDa), Pepstatin(686Da)이었다.

타 . 펩타이드 서열분석

분리된 펩타이드의 아미노산 서열 분석은 Edman degradation 방법을 이용하여 단백질/펩타이드 서열분석기를(Model 491(Perkin Elmer, USA) 이용하여 분석하였다.

3 . 결과 및 고찰

가 . 일반성분 분석

Table. 3. Chemical compositions of beef rump (%)

Moisture	C. Protein	C. Fat	C. Ash
74.3	21.67	2.20	1.0

Table 3은 중등급의 우둔을 구입하여 일반성분 측정 결과를 나타낸 표이다.

우둔 내 수분은 74.3%이었고, 조단백질은 21.67%, 조지방은 2.20%, 회분은 1.0%이었다.

나 . 효소처리에 따른 우둔 단백질의 분해도

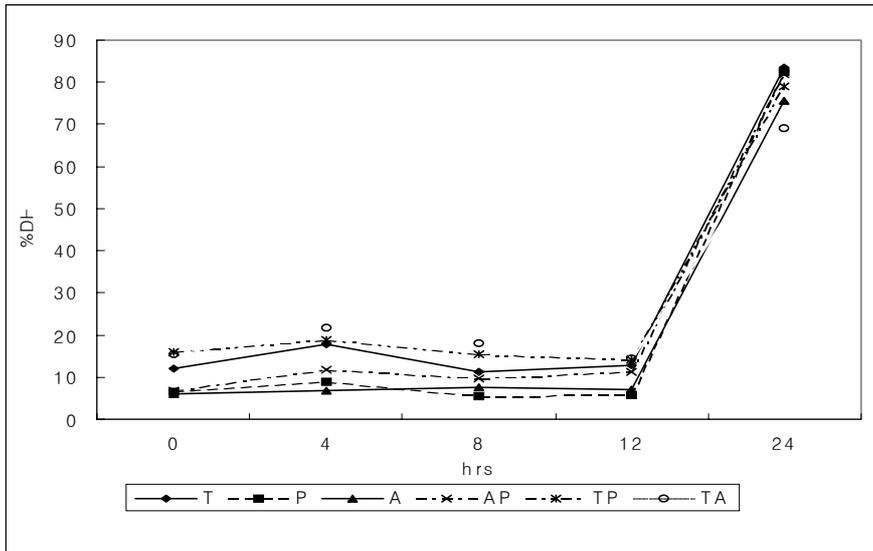


Figure. 1. Degree of hydrolysis of beef Sarcoplasmic protein during 0, 4, 8, 12, 24hrs incubation with various enzyme treatment

All values are significantly different($p < 0.001$)

T: Thermolysin , P: Protease type XIII, A: Protease A

AP: A+P, TP: T+P, TA: T+A

Figure 1은 근형질 단백질 추출물에 효소처리를 한 후 37°C에서 0, 4, 8, 12, 24hrs 의 배양시간 후에 단백질 가수분해도를 나타낸 그림이다. 모든 효소의 처리후에 가수분해도는 증가하여 24시간의 배양후에는 거의 90%의 가수분해정도를 보여주고 있다. 특히, TA의 경우 4시간 배양 후에 21.59%로 가장 높은 가수분해도를 보였으며 TP, T, AP, P, A의 순으로 가수분해 정도를 나타내고 있다. 모든 효소 처리구에서 12시간의 배양 후에 가수분해도가 감소하는 경향을 보이다가 24시간이 지난후에는 거의 2/3이 가수분해 되었다.

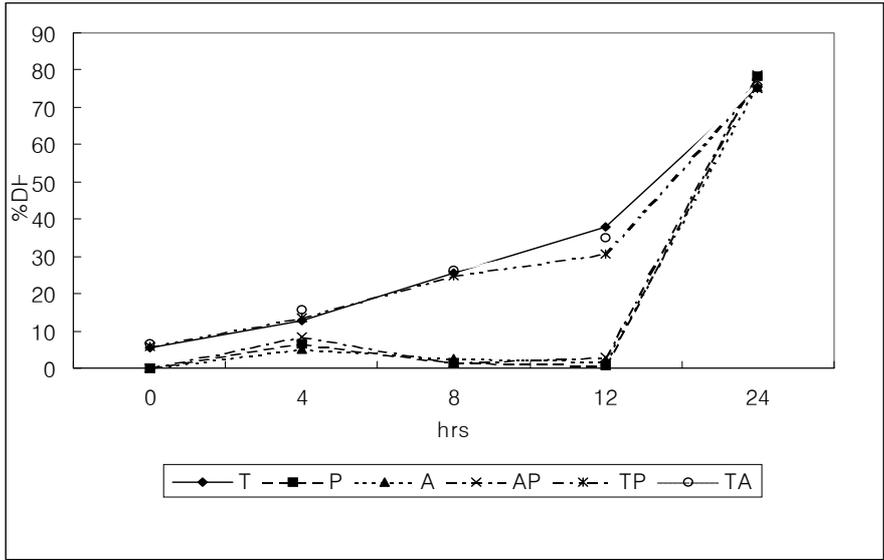


Figure 2. Degree of hydrolysis of beef Myofibrillar protein during 0, 4, 8, 12, 24hrs incubation with various enzyme treatment

All values were significantly different ($p < 0.001$)

T: Thermolysin, P: Protease type XIII, A: Proteinase A

AP: A+P, TP: T+P, TA: T+A

Figure 2는 근원섬유 단백질 추출물에 효소처리를 한 후 37°C에서 0, 4, 8, 12, 24hrs의 배양시간 후에 단백질 가수분해도를 나타낸 그림이다. T, TP, TA의 효소 처리군에서는 12시간의 배양후에 약 32%이상의 가수분해도를 보였으나, P, A, AP의 처리군에서는 가수분해 정도가 약 2%정도에 이르고 있다. 이는 Thermolysin이 근원섬유 단백질의 가수분해에 강한 효소로 작용하고 있음을 나타낸다.

다 . ACE 억제효과(%)

Table 4. ACE inhibition activity of sarcoplasmic protein hydrolysates during 0, 4, 8, 12, 24hrs incubation with various enzyme treatment (%)

hrs Treatmts	0	4	8	12	24
T	-	48.2±0.001	-	-	-
P	-	-	-	-	32.7±0.003
A	-	58.4±0.001	-	-	0.51±0.001
AP	-	66.0±0.001	-	-	-
TP	-	-	-	-	0.63±0.001
TA	-	66.4±0.001	-	-	-

- : Not detected

T: Thermolysin , P: Protease type XIII, A: Proteinase A

AP: A+P, TP: T+P, TA: T+A

Table 4는 근형질 단백질 추출물에 효소처리를 한 후 37℃에서 0, 4, 8, 12, 24hrs의 배양시간 후에 ACE 억제 활성을 나타낸 표이다. 배양 후 0 시간에는(대조구) ACE 억제 활성을 나타내지 않았지만 4시간 후에는 각각 T, A, AP, TA의 효소 처리하에서 48.2%, 58.38%, 65.96%, 66.42%의 ACE 억제 활성을 나타내었다. 그리고 그 후의 배양시간에서는 억제 효과가 없었다가 24시간의 배양 후 ACE의 억제 활성은 P효소의 경우 32.72%, A의 경우에는 0.5%, TP의 경우에는 0.63%로 4시간 배양 때 보다 더 낮은 수준의 활성을 보였다. 이는 단백질 추출물이 가수분해되어 생성되는 펩타이드의 양보다 어떻게 분해되는지가 ACE 활성억제에 중요한 역할을 하는 것을 나타낸다. 즉, 단백질이 가수분해 될 때 펩타이드의 결합의 어느 부분이 분해되는지가 ACE 억제에 기여한다고 볼 수

있다.

Table 5. ACE inhibition activity of Myofibrillar protein hydrolysates during 0, 4, 8, 12, 24hrs incubation with various enzyme treatment (%)

hrs Treatments	0	4	8	12	24
T	-	-	-	-	-
P	-	-	68.7±0.002	-	-
A	-	-	73.2±0.010	66.2±0.005	-
AP	-	26.8±0.002	-	-	-
TP	-	-	-	-	-
TA	-	-	-	-	17.3±0.001

- : Not detected

T: Thermolysin , P: Protease type XIII, A: Protease A

AP: A+P, TP: T+P, TA: T+A

Table 5는 근원섬유 단백질 추출물에 효소처리를 한 후 37℃에서 0, 4, 8, 12, 24hrs의 배양시간 후에 ACE 억제 활성을 나타낸 표이다.

AP효소 처리 4시간후에 ACE 억제 효과는 26.8%이었으나 P, A 효소처리 8시간 후에는 각각 68.6, 73.2%를 보였으며 A 효소처리 12시간 후에는 66.2%, TA 효소처리 24시간 후에는 17.3% 효과를 보였다. 근원섬유 단백질에서 가장 ACE 억제 효과가 높은 효소처리는 P와 A이었으며 8시간의 배양시간으로 보여 진다.

라 . SDS-PAGE electrophoregrams를 이용한 단백질 효소 분해도
결과

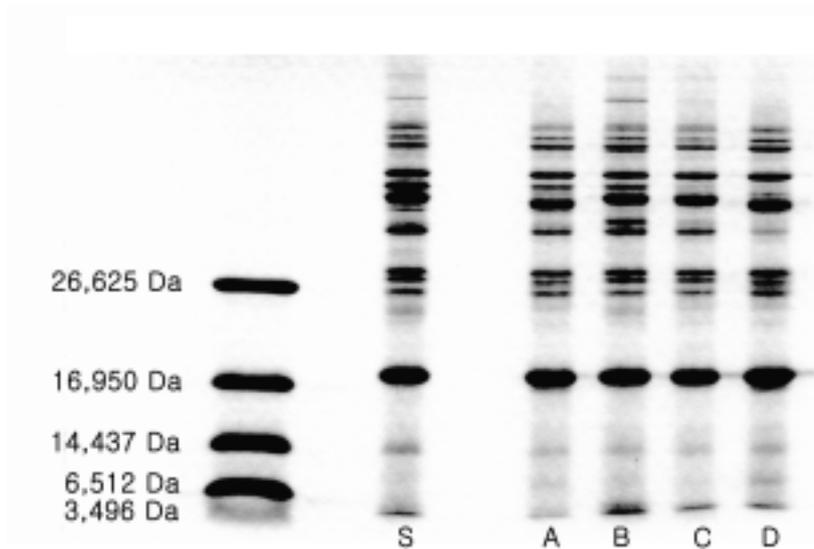


Figure. 4. SDS-PAGE electrophoregrams of sarcoplasmic proteins at 4hrs incubation of 37°C with enzymes

A; Thermolysin, B; Proteinase A, C; Proteinase A+Protease type XIII fungal. D; Thermolysin + Proteinase A, S; Sarcoplasmic protein

Figure 4는 근형질 단백질 추출물의 가수분해 정도를 알아보기 위하여 SDS-PAGE를 실시한 결과이다. 각각의 가수분해 물질은 ACE 활성이 높았던 T, A, PA, TA 처리된 분해물이다. 원래의 근형질 단백질과 비교 하였을 때, Proteinase A 효소 처리시 3,496Da 이하의 저분자량의 밴드의 농도가 높은 것으로 보아 가장 많이 분해 되었으며 그외 T, AP, TA의 처리시에도 다소 비슷한 분해 경향을 보였음을 알 수 있었다.

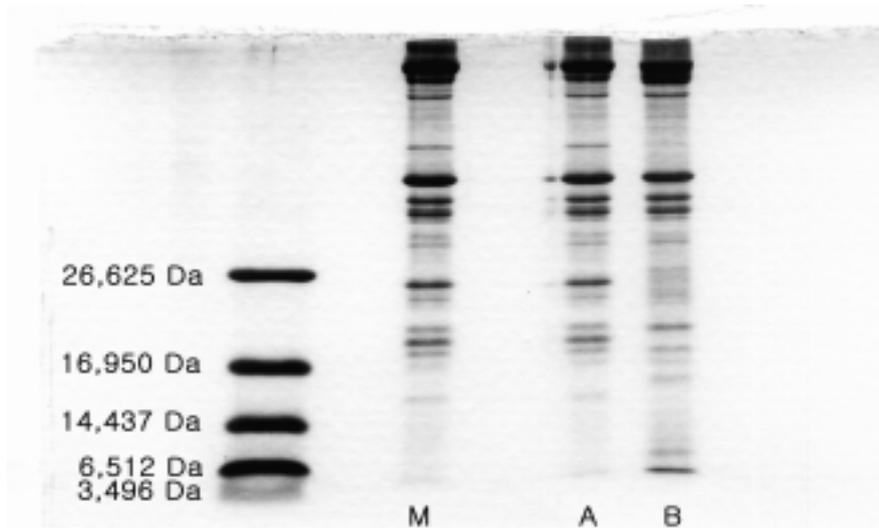


Figure 5. SDS-PAGE electrophoregrams of Myofibrillar proteins at 8h
 rs incubation of 37°C with enzymes
 A: Protease type XIII fungal, B: Protease A

Figure 5는 근원섬유 단백질 추출물의 가수분해 정도를 알아보기 위하여 SDS-PAGE를 실시한 결과이다. 선택된 가수분해 물질은 P와 A의 효소처리 후 8시간의 배양을 거친 분해물이다. 효소 처리하지 않은 근원섬유단백질과 비교하였을 때 P와 A의 효소처리후의 분해 정도는 약간의 차이가 보였다. P효소로 분해시에는 약 26kDa에 해당하는 단백질이 여전히 존재하지만 A효소 분해시에는 26kDa의 단백질이 분해되고 3,496Da 에 해당하는 저분자량의 펩타이드가 생산되었음이 분명하게 보였다. 이는 근원섬유 단백질에서 P효소보다는 A 효소의 활성이 훨씬 뛰어나음을 나타내었다.

마 . 한외여과 분리된 펩타이드의 ACE 억제 효과

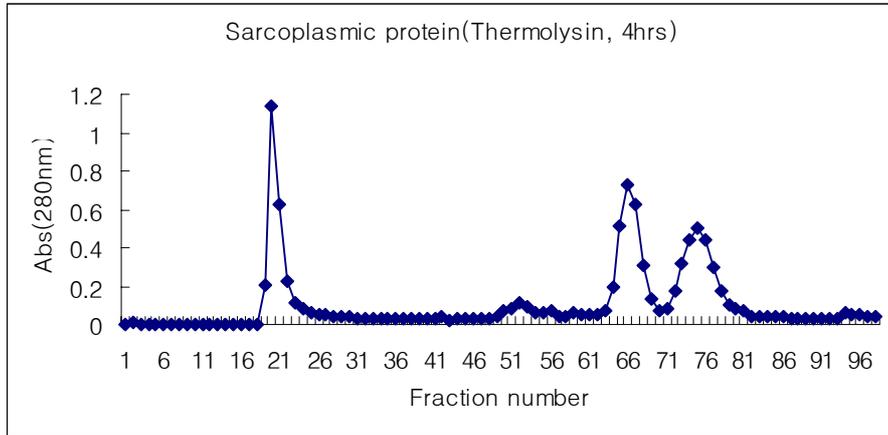
Table 6. ACE inhibitory activity of Ultra filtrated aqueous fractions of sarcoplasmic protein and Myofibrillar protein extracts.(sarcoplasmic enzyme hydrolysis extracts was incubated for 4hrs, Myofibrillar protein were incubated for 8hrs at 37℃(%))

	S41	S43	S44	S46	M82	M83
ACE inhibition activity%	3.07	32	31	69.84	65.1	37.61

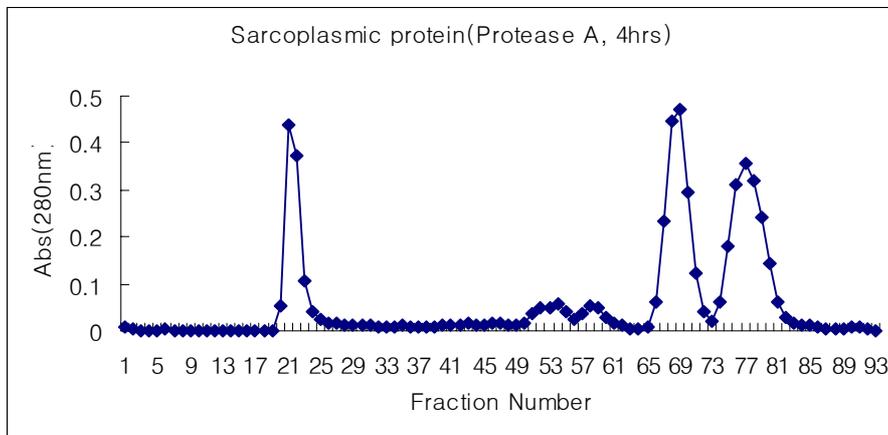
단백질 가수분해물질의 한외여과는 제한 분자량이 10,000Da 인 PM-10 membrane을 이용하였다. 각 단백질 가수분해물질들은 2시간동안 거대 단백질이 제거되었다. 이렇게 한외 여과된 단백질 가수분해물질들은 주로 분자량이 10,000Da 보다 작은 물질들이었다. Table 6은 한외 여과된 단백질 가수분해 물질들 중에서 가장 높은 활성을 보이는 가수분해 물질들의 ACE억제 활성을 나타낸 것이다. Sarcoplasmic 단백질의 경우에는 Thermolysin + Protease A 효소를 이용하여 4시간동안 배양한 것이고, myofibrillar 단백질의 경우에는 효소 Protease를 이용하여 8시간동안 배양한 것이다. 이들 단백질 가수분해물중에서 가장 높은 ACE 억제 활성을 보이는 가수분해물은, sarcoplasmic 단백질의 경우에는 S46으로서 69.84%, myofibrillar 단백질의 경우에는 M82로서 65.1%를 각각 나타내었다. 이에 반해 S41의 경우는 ACE 억제 활성이 3.07%에 그쳐서 Thermolysin 효소 단독은 큰 효과가 없는 것으로 판명되었다.

바 . Gel filtration을 이용해 분리한 분획의 크로마토그램과 각 분획의 분자량 예측

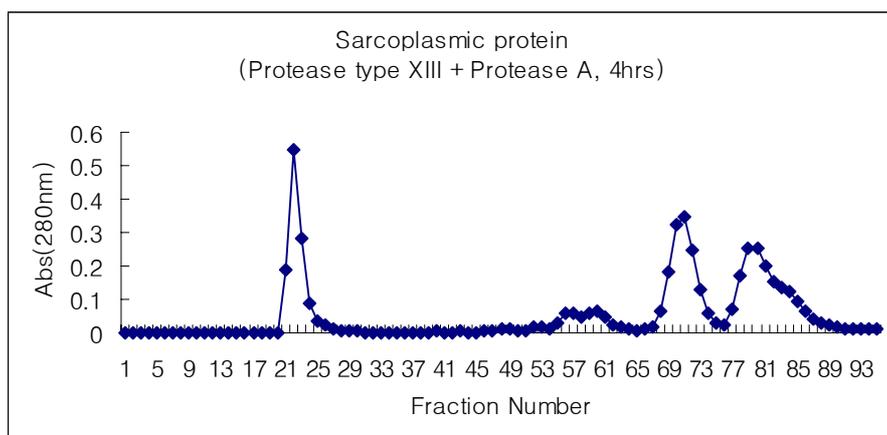
A.



B.



C.



D.

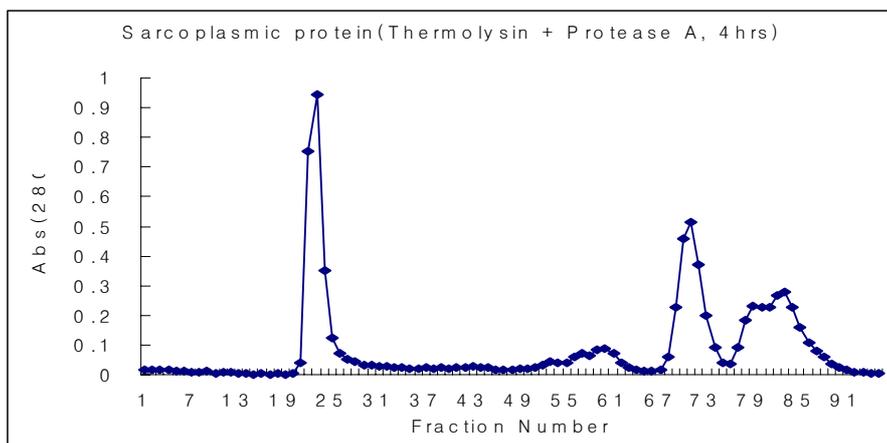
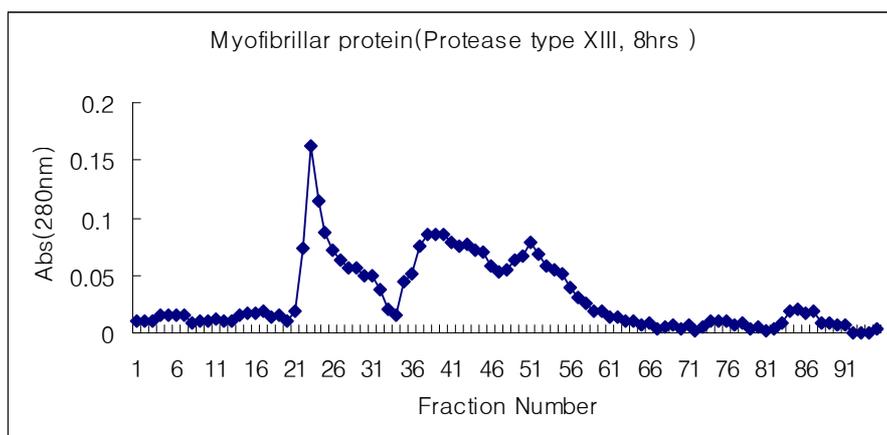


Figure 6. Chromatography and ACE inhibitory activity of fractions from sarcoplasmic protein on Sephadex G-25 column of filtrated from PM-10 membrane.

(A: S41 enzymatic protein hydrolysates, B: S43 enzymatic protein hydrolysates, C: S44 enzymatic protein hydrolysates, D: S46 enzymatic protein hydrolysates)

Sarcoplasmic 단백질을 여러 가지 효소(A,B,C,D)를 이용해 가수분해한 물질중의 한외여과된 수용액 분획은 Gel filtration column을 통해 여과하여 3,000Da 보다 작은 분자량의 펩타이드로 분리되었으며 각각의 결과가 Fig. 6에 나타나 있다. Fig 6의 A는 sarcoplasmic 단백질을 Thermolysin과 함께 4시간 동안 배양한 것이고 B는 Protease A와 4시간 배양하고 C는 효소 Protease type XIII+Protease A와 4시간 배양하고, D는 Thermolysin +Protease A와 4시간 배양한 결과이다. 각 네 개의 효소와 sarcoplasmic protein의 분획물들은 모두 비슷한 분리현상을 보였다. 약 네 개 정도의 거대 분획을 보였는데 이들 중 51~56분획이 686Da 이하의 분자량을 갖는 부분이므로 이후 2-3개의 peak는 모두 저분자량의 펩타이드라는 것을 시사하고 있다.

A



B.

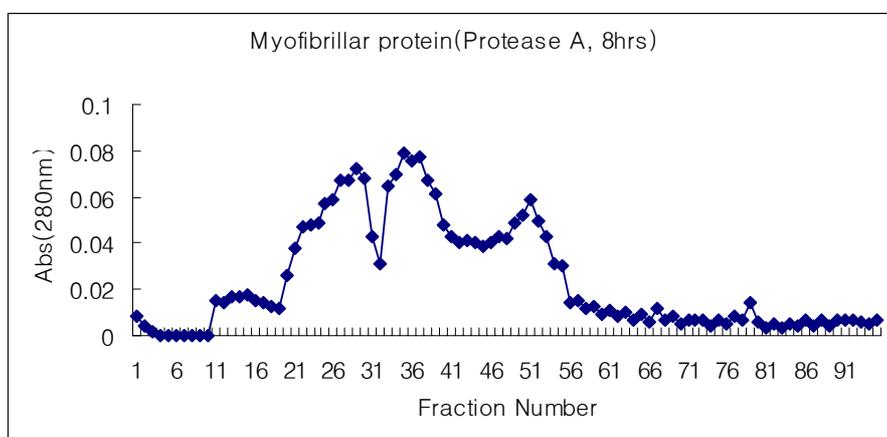


Figure 7. Chromatography and ACE inhibitory activity of fractions from sarcoplasmic protein on Sephadex G-25 column of filtrated from PM-10 membrane.

(A; M82 enzymatic protein hydrolysates, B; M83 enzymatic protein hydrolysates)

Myofibrillar proteins를 여러 가지 효소로 가수분해한 분획은 일단 한 외여과를 통해 거대 단백질(MW 10,000)을 제거하고 이후 gel filtration을 통해서 그 이하의 펩타이드를 분자량에 따라 분리하였다. Myofibrillar protein과 효소들의 분해중 가장 높은 ACE억제 활성을 보이는 효소로 분해된 단백질의 peak가 Figure 7에 나타나있다. Sarcoplasmic protein의 분해 결과와는 달리 myofibrillar protein의 효소 분해 결과는 약간의 차이를 보였다. A는 myofibrillar protein를 Protease type XII로 분해한 분획을 gel filtration으로 분리한 것이고 B는 myofibrillar protein를 Protease A로 분해액을 Sephadex G-25 column을 이용해서 분리한 것이다. 이들 두 효소가 가장 높은 ACE 억제 효과를 보였으므로 이들을 gel filtration으로 분리하기위해 선택하였다. A의 경우 37 fraction 은 2.5KDa을 의미하므로 그 이후의 peak는 그 보다 작은 분자량의 펩타이드로 판단된다. B의 경우에도 37 fraction 이후의 peak는 2.5KDa보다 작은 저분자량의 펩타이드로 판단되었다.

사 . Gel filtration을 통해 분리된 분획의 ACE 억제 효과

Table 7. ACE inhibitory activity of gel filtrated fractions from Sarcoplasmic protein on Sephadex G-25 column (%)

Enzymes Fractions	T(S41)	A(S43)	AP(S44)	TA(S46)
1	-	7.719±0.007	15.609±0.002	-
2	3.698±0.010	10.711±0.004	11.620±1.002	4.581±0.008
3	20.263±0.045	21.020±0.008	5.938±0.006	52.835±0.007
4	8.408±0.007	16.818±0.006	18.912±0.002	1.544±0.001
5	18.735±0.010	11.255±0.012	16.649±0.006	14.574±0.005
6	-	-	-	12.072±0.005
7	-	-	-	5.114±0.002

-: not detected

All values are significantly different($p < 0.001$)

T: Thermolysin , P: Protease type XIII, A: Protease A

AP: A+P, TP: T+P, TA: T+A

Sarcoplasmic protein을 여섯 종류의 효소로 분해한 결과 가장 ACE 억제 활성이 높은 효소를 찾아내고 이들 분해물을 한외 여과한 후의 용액을 sephadex G-25 column으로 분자량별로 분리해서 각각의 peak의 ACE 억제 활성을 측정한 결과는 Table 7와 같다. 각 peak의 ACE 억제 활성은 차이가 크게 나타났지만 비교적 가장 높은 활성을 보인 분획은 Thermolysin과 Protease A로 분해시킨 S46이었다. 이 peak중 가장 높은 활성은 69~79 fraction으로 52.84%의 활성을 보였다. 특히 이들 효소로 분해된 물질은 다른 효소 분해물과는 달리 저분자량을 갖는 6과 7 peak가 보이는 것으로 보아 분해가 굉장히 잘 되었음을 나타낸다. 나머지 분획들의 ACE 억제 활성은 거의 18~21%정도의 활성을 보여 S46의 세 번째 분획의 반 정도밖에 미치지 못함을 나타내었다. 따라서 S46의 세

번째 분획을 가장 활성이 높은 부분으로 판단하여 이 분획을 HPLC를 이용하여 분리하기로 결정하였다.

Table 8. ACE inhibitory activity of gel filtrated fractions from myofibrillar protein on Sephadex G-25 columnn(%)

Enzymes Fractions	P(8hrs)	A(8hrs)
1	3.163±0.017	12.971±0.005
2	18.525±0.007	13.327±0.004
3	0.190±0.008	-
4	-	0.873±0.007
5	-	12.229±0.010

-: Not Detected

All values are significantly different(p<0.001)

T: Thermolysin , P: Protease type XIII, A: Protease A

Myofibrillar protein에서 효소분해로 생성된 물질에서 가장 ACE 활성이 높은 분획을 한외여과하여 도출된 peaks의 ACE활성을 조사한 결과가 Table 8에 잘 나타나 있다. Myofibrillar protein의 경우는 sarcoplasmic protein과는 달리 혼합효소보다도 단독 효소의 활성이 높게 나타났다. Table 6에서 알 수 있듯이 myofibrillar protein에서는 다른 효소보다 Protease type XIII와 Protease A가 높은 활성을 나타내었는데 최대 ACE 억제 활성이 P 효소의 경우에는 peak 2에 해당하는 것으로 18.525%에 그치고 있다. 이 수준은 sarcoplasmic peoteins에서 TA효소(Thermolysin+Protease A)가 최대 활성인 52%를 보이는 것에 비해 myofibrillar protein 효소분해물은 이의 36%정도로 아주 낮은 수준을 보였다. 그리고 분리 과정이 굉장히 지연되고 또한 ACE억제 활성도 아주

낮아서 HPLC를 이용한 분리를 위해서는 선택되지 않았다. 분리를 하더라도 S46 분획보다 더 높은 활성율을 기대할 수 없었음도 한 이유가 되었다. 그래서 S46분획이 가장 높은 ACE 활성을 나타내므로 RP-HPLC를 이용하여 분리하였다.

아 . Reversed-Phase HPLC를 이용하여 분리한 분획

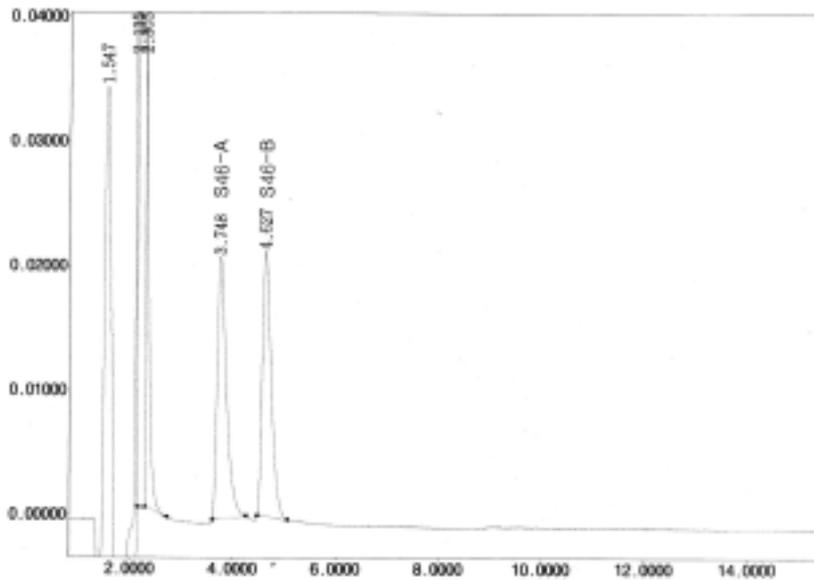


Figure. 8. Reverse-phase HPLC chromatograms of peaks from gel filtrated fractions possessing high ACE inhibition activity of protein hydrolyzates(fractions from S46)

앞의 실험에서 ACE저해 활성이 가장 높았던 Thermolysin+Protease A의 S46의 세 번째 peak를 RP-HPLC로 분리한 결과는 Figure 8.과 같았다. 세 개의 peak가 분리되었는데 각각 RT(retention time)가 2.30, 3.748, 4.627min 이었고 이들은 순수한 상태로 매우 뚜렷하게 분리되었다. 이 세 peak의 ACE 억제 효과는 Table 9에 나타나 있다.

Table 9. ACE inhibitory activity of RP-HPLC fraction has the highest ACE inhibitor like peptides, third fraction S46 protein hydrolysis

	Peak no.1	Peak no. 2	Peak no. 3
ACE inhibition activity(%)	39.24	53.36	0.15

RP-HPLC를 이용하여 분리한 S46은 세 개의 peak로 나누어졌는데 가장 높은 억제 효과는 pake 2로서 53.36%를 나타내고 peak 1이 39.24%, peak 3이 0.15%의 억제 효과를 보였다. 이 억제 효과는 RP-HPLC로 분리하기전의 S46이 52%의 억제효과와 비슷한 수준이었으므로 peak 2와 peak 1, peak 3의 성분을 아미노산 분석을 통하여 알아본 결과는 Table 10과 같다.

Table 10. Amino acid composition of ACE-inhibitor like peptides from RP-HPLC (%)

	Peak no.1	Peak no.2	Peak no.3
Asp	1.66	1.93	-
Glu	1.17	-	-
Ser	3.70	5.14	2.51
Gly	5.71	3.53	2.27
His	5.55	1.39	2.23
Arg	6.27	0.79	-
Thr	1.89	0.57	-
Ala	8.90	3.41	-
Pro	2.63	7.26	-
Tyr	5.84	1.17	1.92
Val	3.31	1.40	-
Met	7.0	1.33	2.05
Cys	6.42	0.93	-
Ile	2.8	-	-
Leu	-	-	-
Phe	7.72	-	-
Lys	26.44	70.64	81.76

RP-HPLC를 통해서 분리된 세 개의 peak의 아미노산조성은 Table 8과 같다. Table 10.에서 알 수 있듯이 가장 ACE 억제 효과가 높았던 peak 2의 주요 아미노산 성분은 Lysine 으로 70.64%를 나타내었고 나머지 두 peak의 주요 아미노산 성분도 26.44%와 81.76%로 유의적으로 높은 함량을 보였다. 특히 peak 2는 그 외에도 Pro, Ser, Gly, Ala의 순으로 높은 함량을 나타내었고 이 결과는 ACE 저해 물질이 일반적으로 저분자로 알려진 것과 동일하였다. 또한 고등어 근육 단백질 가수분해물 중 ACE 저해 펩타이드에서 Asp, Glu, Lys, Leu, Val, Ala의 함량이 높았다는 보고와도 peak 2의 아미노산 성분이 많이 일치하였다. 그리고 소라 단백질의 경우에는 ACE저해 효과를 나타내는 펩타이드를 정제하여 단일 물질

로 얻었을 때 분자량이 약 1,355인 저분자 펩타이드를 얻었고 이 펩타이드의 아미노산 조성은 phenylalanin, valin, prolin의 순으로 많았다는 보고가 있는데 본 실험결과로 추출된 펩타이드의 분자량과 거의 비슷한 크기의 펩타이드로 판단된다. 하지만 억제효과가 52%정도의 수준으로 다른 여러 가지 식물에서 추출된 펩타이드보다 ACE 저해 활성이 약간 낮으므로 효과를 증진시킬 수 있는 방법을 모색해야 할 것으로 사료된다.

자 . 순차적 분리단계를 통해 분리한 분획의 IC₅₀ 값

Table 11. Changes IC₅₀ of ACE inhibition activity of sarcoplasmic and myofibrillar protein from beef rump with purification step.: IC₅₀(ug/100ul)

A. ACE inhibition activity through step of purification

Protein hydrolysates \ S t e p s	Enzymatic hydrolyzates	UF aqueous extract	Gel filtrated fraction
S41	259.34	81.39	38.80
S43	206.60	30.36	26.64
S44	248.99	50.66	34.40
S46	163.08	37.89	9.08
M82	230.20	13.82	43.48
M83	218.46	24.91	67.52

B. Purification on RP-HPLC (ug/100ul)

	Peak no.1	Peak no.2	Peak no.3
S46	8.87	7.50	21.66

S46 : Hydrolysates with Thermolysin + Protease A for 4hrs

쇠고기 엉덩이살 단백질과 효소를 혼합하여 분해하고 ACE 저해 효과를 갖는 펩타이드를 분리하는 과정에서 ACE 저해 활성을 측정하였는데 그 IC₅₀ 수준을 나타낸 결과는 Table 11 과 같다. 각 Sarcoplasmic protein 과 Myofibrillar protein 효소분해 물질들은 한외여과와 gel filtraion,

RP-HPLC과정을 거치는 동안 IC₅₀ value가 감소함을 보였고 Gel filtration으로 분리된 S46은 IC₅₀ 9.08 μ g/100ul을 보여서 가장 낮은 농도로 50%의 ACE 저해 효과를 보였으므로 최대의 활성을 갖는 분획으로 판단되었다. 이는 앞의 실험결과에서 S46 분획이 ACE 저해 효과가 52%에 이르며 처리 중 가장 높은 수준을 보였던 결과와 일치하였다. 그리고 S46분획을 RP-HPLC로 분리하였을 때 53.36%의 저해 효과를 보이던 peak 2의 IC₅₀의 수준은 7.50 μ g/100ul으로 가장 높은 저해 효과를 나타냄을 입증하였다. 지금까지의 분리과정을 반복하여 S46 P2 펩타이드(S46분획의 peak 2)를 정제하여 감압 농축시키면 대량생산이 가능하리라고 생각된다.

Table 12.. Peptide sequence of S46-P2

	Protein sequence	IC50 value
S46-P2	VLAQYK	7.50 μ g/100ul

차 . 소 염통과 지라의 단백질 분해물의 ACE 억제 효과

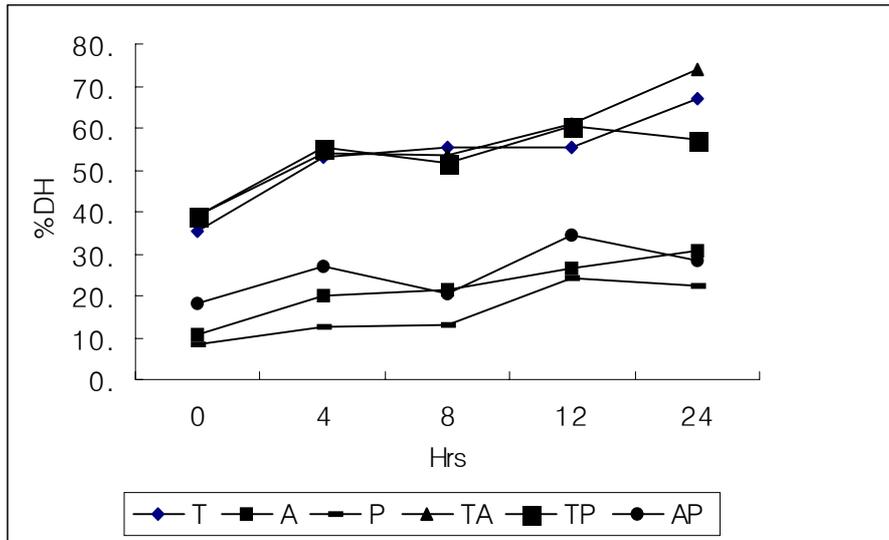


Figure 1. Degree of hydrolysis of beef heart during 0, 4, 8, 12, 24hrs incubation with various enzyme treatment

T : Thermolysin, P : Protease type XIII, A : Proteinase A, AP: A + P, TP: T + P, TA: T + A

염통 단백질은 0, 4, 8, 12, 24시간 동안 Thermolysin, Protease type XIII, Proteinase A, Thermolysin + Protease type XIII, Thermolysin + Proteinase A, Protease type XIII+Proteinase A의 효소들을 첨가하여 단백질을 가수분해하였다. Thermolysin의 단백질의 가수분해율은 단독으로 처리하였을 때 보다 Proteinase A와 함께 처리하였을때가 분해효과가 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 우둔단백질에서 효소처리하여 분리 하였을때와 비슷한 경향이였다.

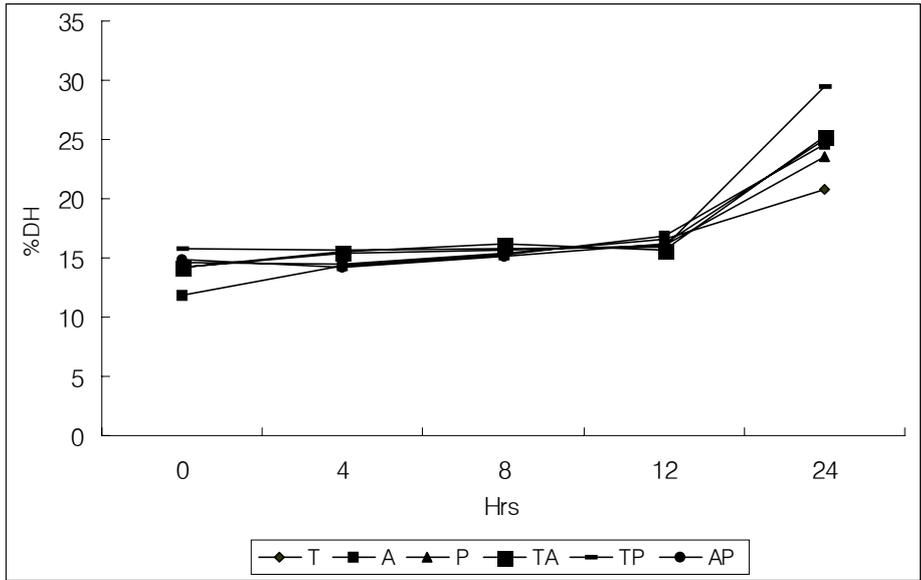


Figure 2. Degree of hydrolysis of beef spleen during 0, 4, 8, 12, 24hrs incubation with various enzyme treatment

T : Thermolysin, P : Protease type XIII, A: Proteinase A, AP: A + P, TP: T+P, TA: T + A

염통의 ACE 저해 효과는 Table 1처럼 0시간 때에는 ACE 저해 효과를 거의 볼 수가 없었다. 그러나 4시간의 배양후에는 Thermolysin, Thermolysin + Proteinase A, Thermolysin + Protease type XIII에서 54.61%, 43.30%, 42.63%의 ACE 저해 효과를 보였다. 12시간 Thermolysin + Proteinase A를 처리한 염통단백질에서 가장 좋은 ACE 저해 효과를 보여주었다.

Table 2. ACE inhibitory activity of enzymatic hydrolysates from beef spleen at different incubation hours at 37°C(%)

Treatment	hrs				
	0	4	8	12	24
T	4.84	26.78	34.41	-	22.14
A	10.97	25.63	20.09	25.63	30.28
P	22.17	34.06	31.52	35.79	19.56
TA	17.78	34.98	27.71	33.14	35.65
TP	0.8	28.63	29.79	-	39.12
AP	13.51	19.28	24.71	15.70	29.69

- : Not Detected

T: Thermolysin, P: Protease type XIII, A: Proteinase A, AP : A + P, TP : T+P, TA : T + A

지라의 ACE 저해 효과는 Table 2처럼, Thermolysin은 8시간배양, Protease type XIII 는 12 배양, Proteinase A, Thermolysin + Proteinase A, Thermolysin + Protease type XIII, Protease type XIII + Proteinase A 는 24시간 배양에서 ACE활성이 가장 좋았다. 그 중에 서도 24시간 배양 한 Thermolysin + Protease type XIII가 지라단백 질에서 가장 좋은 ACE 저해 효과를 보여주었다.

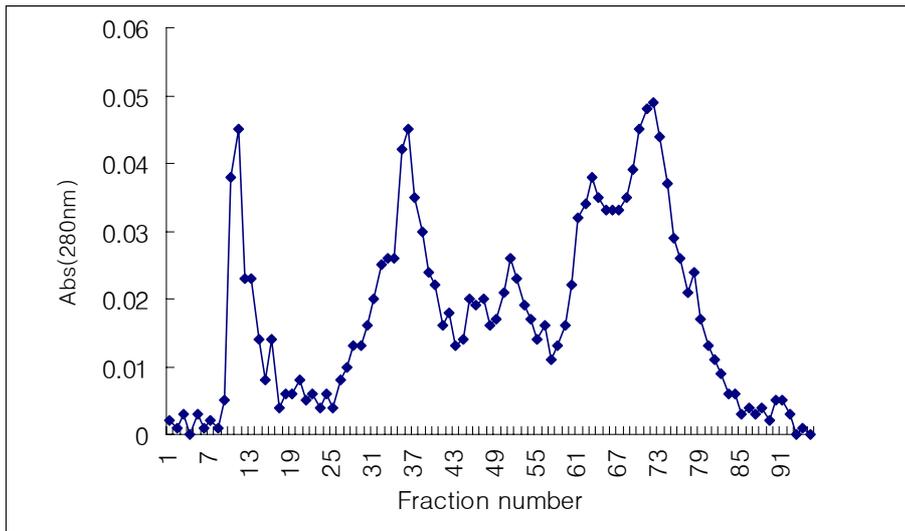


Figure 3. Sephadex G-25 gel-chromatography of the filtrates obtained by ultrafiltration of beef heart (Thermolysin + Proteinase A, 12hrs)

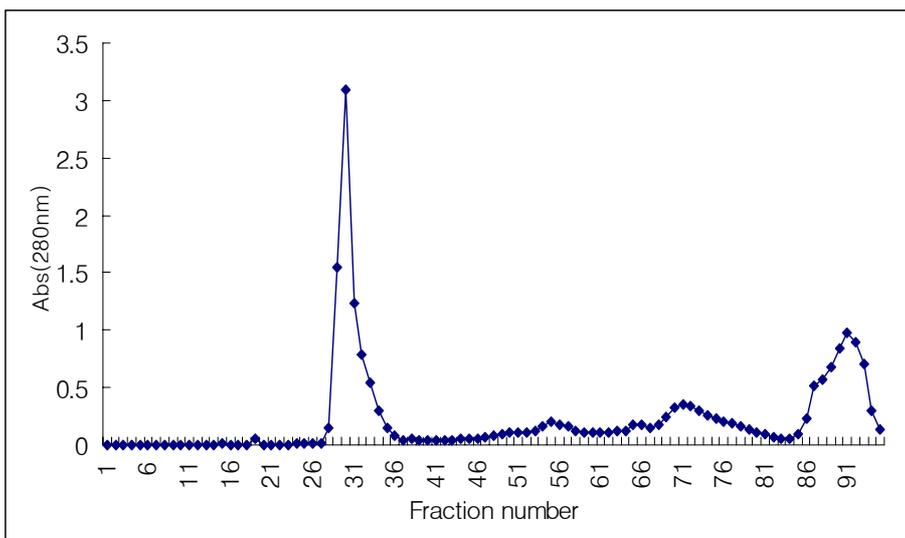


Figure 4. Sephadex G-25 gel-chromatography of the filtrates obtained by ultrafiltration of beef spleen (Thermolysin +Protease type XIII, 24hrs)

Table 3. ACE inhibitory property of each fraction obtained from RP-HPLC

Fractions	peak-1	peak-2	peak-3	peak-4
IC ₅₀ (mg/ml)	0.28	0.26	0.25	0.35

IC₅₀: Defined as the concentration which inhibitors 50% angiotension- I converting enzyme activity

Table 4. Amino acid composition of ACE inhibitor from RP-HPLC(%)

	peak-1	peak-2	peak-3	peak-4
Ser	-	-	-	1.907
Gly	73.979	4.169	-	2.524
His	-	0.114	-	0.075
Arg	0.593	-	-	0.472
Thr	0.058	1.695	-	8.794
Ala	0.765	2.908	-	19.901
Pro	0.916	17.952	58.445	6.695
Cys	9.023	28.738	19.665	8.131
Tyr	0.499	0.928	19.160	1.101
Met	10.640	36.512	2.730	24.062
Lys	1.045	1.819	-	2.137
Ile	0.124	-	-	1.075
Leu	1.513	3.781	-	21.447
Phe	0.845	1.382	-	1.680

Table 1에서 Thermolysin + Proteinase A를 12시간 효소분해 시킨 염동 가수분해물의 ACE 저해 활성이 가장 좋았는데, 이를 한외여과 시스템을 통해 10000Da이하로 여과한 다음 Gel filtration 크로마토그래프를 통해 분획한 결과를 보면(Figure 3) 5개의 큰 fraction(F11, F36, F51, F63, F72)를 얻게 되었는데 이들 fraction들의 ACE 저해 활성을 측정결과,

F72에서 IC₅₀값이 0.37mg/ml로 ACE 저해 활성이 가장 좋았다.

Figure 4는 Figure 3처럼 Table 2에서 Thermolysin + Protease type X III를 24시간 효소분해시킨 지라 가수분해물의 ACE 저해 활성이 가장 좋았는데, 이를 한외여과 시스템을 통해 10,000Da이하의 크기로 여과한 다음 Gel filtration 크로마토그래프를 통해 분획한 결과인데, 그 결과 4개의 큰 fraction(F30, F55, F71, F91)를 얻게 되었고, 이들 fraction들의 ACE 저해 활성을 측정결과, F30에서 IC₅₀값이 1.84mg/ml로 ACE 저해 활성이 가장 좋았다.

Figure 5는 여러가지 효소 처리한 염통단백질 중에서 ACE저해 활성이 가장 좋은 Thermolysin + Proteinase A를 12시간 배양한 후 이 가수 분해물을 Ultrafiltration과 Gel 여과를 통해 얻은 분획물에서, ACE 저해 활성이 가장 좋은 분획물(Fraction 72)을 가지고, RP-HPLC(peptide&protein C18 column)를 사용하여 다시 분리 및 정제하였다. 이들 피크들의 Retention Time(RT)은 2.747, 3.038, 3.300, 12.162min. 이었다. 이 피크들을 분획한 다음 각각의 분획물의 ACE저해 활성을 측정하였다

Table 3은 Figure 5에서 얻은 피크들을 분획한 다음 각각의 분획물의 ACE저해 활성을 측정하였다. peak-1, peak-2, peak-3, peak-4의 각각 IC₅₀값은 0.28, 0.26, 0.25, 0.35mg/ml값을 얻을 수 있었다. 이 4개의 peak 들 사이에서의 뚜렷한 ACE저해 억제활성이 차이는 없었다.

Table 4는 RP-HPLC(peptide&protein C18 column)통해서 얻은 분획물 (peak-1, peak-2, peak-3, peak-4)을 AccQ-Tag 방법으로, RP-HPLC(AccQ-Tag Amino Acid Analysis Column)를 사용하여 얻은 분획물의 아미노산 조성을 분석한 결과이다. 이 때 peak-1에서는 glycine(74.0%)and methionine((10.6%), peak-2는 proline (18.0%), cystine(28.7%), methionine(36.5%), peak-3는 proline (58.5%), peak-4는 alanine(19.9%), methionine(24.1%)and Leucine (24.5%)이 주요 구성 성분 아미노산이었다.

제 2 절 생산된 펩타이드의 동물 실험을(SHR, Spontaneously Hypertensive Rat) 통한 ACE 억제 효과의 검증

1 . 실험동물의 준비

가 . 실험동물과 처리물(펩타이드) 준비

SHR(7주령) 수컷을 한림 실험동물 연구소(주)에서 구입하여 1주일동안 적응기로서 시판사료(삼양사)로 사육하였다. 그 후 무작위로 군당 5마리씩 대조군, 0.2g/kg weight 투여군, 0.5g/kg weight 투여군, 1g/kg weight 투여군으로 분류하였고 각각 1ml씩 경구를 통해 존데를 이용하여 펩타이드를 8주 동안 매일 오전 10시에 급여하고 사육하였다. 사료와 음수는 자유 섭취케 하였으며 7일마다 체중, 음수량, 사료섭취량, 혈압을 측정하였다.

펩타이드는 우둔내 수용성 단백질을 Thermolysin과 ProteinaseA의 혼합 효소로 37℃에서 4시간 분해하여 한외여과(molecular cut off:10,000Da)한 후, gel filtration(molecular weight cut off: 3,000Da)에 통과시켜 가장 ACE 억제 효과가 있었던 분획을 분리하고 다시 ACE 억제 효과가 컸던 분자량 810Da의 펩타이드를 HPLC를 통해 분리하였다. 이 펩타이드를 다량 추출하여 수돗물에 녹여 전 실험기간동안 사료와 함께 경구 투여하였다.

2 . 실험 방법

가 . 혈압측정

SHR의 꼬리 동맥의 수축기 혈압을(SBP)을 tail cuff법으로 측정하였는데 SHR을 37℃로 보온이 되도록 약 5분간 가온한 후 보정기로 고정하여 수축기 혈압(SBP)을 측정하였다. 수축기 혈압은 Rat가 정지상태에

있을 때 6회 이상 측정하여 평균값을 도출하여 이용하였다. 혈압측정은 정기적으로 7일 간격으로 오전 10:00-12:00시 사이에 실시하였다.

나 . 혈청내 지질성분 분석 및 장기중량 측정

실험기간 종료 후 SHR을 희생시켜 채혈하고 주요 장기를 적출하였다. 혈액은 채혈 후 3,000rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 얻었고 산본 남천병원에서 총콜레스테롤, 중성지질, HDL-cholesterol을 측정하였고 이 측정치로부터 LDL-콜레스테롤은 Friedewald 공식을 이용하여 계산하였다. 각 주요장기조직인 간, 염통, 신장, 폐등을 적출하여 0.9%의 생리식염수로 세정 후 중량을 측정하였다.

다 . 통계분석

통계분석은 SAS(1999-2000) 프로그램을 이용하여 분산 분석을 수행하였고, 평균간 유의성 검정은 Duncan의 Multiple range test로 처리간의 결과차이를 분석하였다.

3 . 결과 및 고찰

가 . 실험동물의 생리적 변화

우둔에서 추출한 항고혈압성 펩타이드의 Spontaneously Hypertensive Rat에 대한 혈압저하 효과를 검증하기 위하여 실험을 실시하였다. 대조구는 일일 1ml의 상수도수를 경구투여 하였으며 처리구 A는 kg body weight 당 200mg을, B는 500mg, C는 1000mg의 우둔에서 추출한 antihypertensive-like peptide를 경구투여 한 후 매 1주일마다 SHR의 사육실내 적응과 생리적 변화를 관찰하기 위해 총 섭취한 사료의 무게와 음수량을 측정하였다. 총 8주의 실험기간동안 사료의 섭취량의 변화는 대조구와 처리구 사이에 크게 나타나지 않았으므로 우둔에서 추출한 혈압저하 펩타이드는 실험동물군간의 사료 섭취량의 경향에 영향을 미치지 않았던

것으로 사료된다. 음수량의 섭취도 실험기간이 지남에 따라 큰 변화가 없었던 것으로 판명되었다. 실험동물군의 체중은 실험기간이 지남에 따라 점차 증가하였는데 처리구의 실험동물들이 대조구의 실험동물보다 더 사료를 많이 섭취하는 것으로 나타났다.

전체 8주동안의 실험기간 동안 급여한 펩타이드의 생체내 독성 여부를 알아보기 위해 체내 중요 기관의 중량을 측정된 결과 대조군에 비해 간, 염통은 큰 변화가 없었으나 신장과 비장, 고환의 중량은 약간의 변이가 있었다. 신장은 200mg과 500mg 처리군에서 대조군보다 감소하였으며 (1.47g→1.36g), 비장은 대조군보다 오히려 중량이 증가하였고(0.58g→0.68g), 고환도 대조군보다 처리에 따라 중량의 증가를 보였다(1.44g→1.60g)

Table 1. Effect of antihypertensive-like peptide on the amount of feeding SHR(g)

	1wk	2wk	3wk	4wk	5wk	6wk	7wk	8wk
control	167.9±1.3 ^a	154.6±5.1 ^a	143.3±0.4 ^c	169.1±1.8 ^a	150.7±1.8 ^b	125.7±1.3 ^a	176.3±15.9 ^a	149.8±11.5 ^a
A	163.1±2.1 ^a	152.0±0.6 ^a	145.3±3.2 ^c	159.2±3.4 ^b	150.9±0.5 ^b	148.1±13.8 ^a	172.7±16.0 ^a	117.6±8.0 ^b
B	161.4±4.5 ^a	158.2±7.3 ^a	161.9±4.0 ^a	155.2±5.2 ^b	158.1±5.2 ^a	185.3±29.7 ^a	152.5±16.2 ^a	117.0±6.5 ^b
C	161.3±3.7 ^a	152.3±2.1 ^a	153.1±4.6 ^b	150.7±6.4 ^b	152.1±2.5 ^{ab}	167.6±50.3 ^a	174.5±45.8 ^a	114.5±19.3 ^b

A: 200mg/kg B.W. B: 500mg/kg B.W. C:1000mg/kg B.W.

Table 2. Effect of antihypertensive-like peptide on the amount of drinking water of SHR(g)

	1wk	2wk	3wk	4wk	5wk	6wk	7wk	8wk
control	889.0±1.4 ^a	785.0±21.2 ^a	1135.0±7.1 ^a	750.0±0.0 ^a	410.0±14.1 ^a	465.0±49.4 ^a	750.0±0.0 ^a	500.0±42.4 ^b
A	513.3±75.2 ^b	533.3±22.5 ^b	983.3±50.3 ^b	536.6±11.5 ^b	376.6±15.3 ^b	403.3±5.8 ^b	548.3±37.5 ^b	556.6±37.9 ^{ab}
B	418.3±16.1 ^c	380.0±54.1 ^c	560.0±20.0 ^d	306.7±30.6 ^c	256.7±5.8 ^d	383.3±15.3 ^b	436.6±23.1 ^c	596.7±5.8 ^a
C	405.0±5.0 ^c	446.6±70.2 ^{bc}	676.7±61.1 ^c	363.3±70.2 ^c	306.6±15.3 ^c	383.3±5.8 ^b	573.3±51.3 ^b	551.7±12.6 ^{ab}

A: 200mg/kg B.W. B: 500mg/kg B.W. C:1000mg/kg B.W.

Table 3. Effect of antihypertensive-like peptide on the body weight of SHR(g)

	1wk	2wk	3wk	4wk	5wk	6wk	7wk	8wk
control	266.5±9.2 ^a	287.0±8.5 ^b	300.0±7.07 ^b	303.0±1.4 ^b	317.0±3.5 ^a	299.0±1.4 ^b	296.5±2.1 ^b	342.5±10.6 ^b
A	278.0±2.0 ^a	297.0±2.6 ^a	307.0±2.64 ^{ab}	319.6±0.5 ^a	324.3±5.7 ^a	325.6±4.9 ^a	331.0±14.2 ^a	356.3±7.1 ^{ab}
B	279.0±6.1 ^a	298.0±2.6 ^a	311.0±6.08 ^a	318.6±6.1 ^a	320.3±16.7 ^a	329.6±2.1 ^a	338.6±5.5 ^a	362.3±6.50 ^a
C	270.6±8.5 ^a	287.6±0.6 ^b	298.3±1.5 ^b	306.3±3.2 ^b	320.3±5.7 ^a	324.3±3.5 ^a	341.3±14 ^a	355.6±3.8 ^{ab}

A: 200mg/kg B.W. B: 500mg/kg B.W. C:1000mg/kg B.W.

Table 4. Effect of antihypertensive-like peptide on the weight of organ of SHR(g)

	Liver	Heart	Kidney***	Spleen**	Testis**
Control	13.62±0.6	1.44±0.1	1.47±0.0 ^a	0.58±0.0 ^b	1.44±0.1 ^b
A	14.23±0.5	1.52±0.0	1.36±0.0 ^c	0.65±0.0 ^a	1.51±0.0 ^{ab}
B	13.58±0.5	1.47±0.0	1.36±0.0 ^c	0.65±0.0 ^a	1.51±0.0 ^{ab}
C	13.40±0.3	1.53±0.0	1.41±0.0 ^b	0.68±0.0 ^a	1.60±0.1 ^a

A: 200mg/kg B.W. B: 500mg/kg B.W. C:1000mg/kg B.W.

***: P<0.001, **: P<0.05

나 . 실험동물의 혈압변화와 혈내 지질수준의 변화

Peptide를 섭취한 실험동물의 혈압은 3주째에 1000mg/kg B.W를 투여한 군이 가장 낮은 혈압수치를 보여 가장 강한 혈압 저하율을 보였으나 그 이후로는 6주째에 200mg/kg B.W를 투여한 구가 가장 높은 혈압 저하율을 보였다. 나머지 7주와 8주 째에는 대조구와 처리구 사이의 통계적인 유의차는 보이지 않았다.

전체 실험기간 동안 사료와 함께 펩타이드를 함량별로 급여한 결과 실험종료후의 총 콜레스테롤 함량은 대조군이 처리군보다 약 30%감소하였고(P<0.001)중성지방의 함량도 유의적으로 감소하여 500mg의 급여군에서는 113.3mg/100ml이었던 중성지방이 93.6mg/100ml의 수준으로 감소함을 보였다. 반면, HDL 콜레스테롤 함량은 대조군보다 감소하는 경향을 보였으나 LDL 콜레스테롤 함량은 대조군보다 처리량에 따라 유의적으

로($p<0.001$)감소하여 대조군에서 61.3mg/100ml이었던 것이 1000mg 처리군에서는 36.4mg/100ml의 함량으로 큰폭으로 감소하였음을 나타내었다.

일반적으로 생체내에서 저밀도 지질 단백질 (low density lipoprotein, LDL)은 간에서 생합성된 콜레스테롤을 간 이외의 세포에 공급하는 역할을 하고 혈장내 LDL 콜레스테롤의 증가는 고지혈증과 깊은 관계가 있기 때문에 본 실험의 결과에서 나타난 바와같이 LDL 콜레스테롤의 수준이 감소한 것은 ACE 억제 펩타이드가 LDL콜레스테롤의 저해 효과도 있다는 것을 시사해 주고 있다.

Table 5. Effect of antihypertensive-like peptide on the change of blood pressure of SHR(mmHg)

	1wk	2wk	3wk	4wk	5wk	6wk	7wk	8wk
control	154.9±0.7 ^b	203.2±5.2 ^a	223.4±15.1 ^a	221.8±18.2 ^a	207.3±0.6 ^a	241.35±24.7 ^a	221.15±14.1 ^a	223.50±8.5 ^a
A	191.3±11.7 ^a	187.1±13.9 ^a	201.03±5.5 ^b	218.9±16.9 ^a	198.1±8.6 ^{ab}	205.2±5.4 ^b	213.6±1.9 ^a	217.9±6.1 ^a
B	193.6±23.8 ^a	203.5±2.1 ^a	198.4±1.3 ^b	217.16±4.9 ^a	192.4±5.7 ^b	232.6±12.2 ^{ab}	215.8±11.3 ^a	220.2±5.4 ^a
C	191.3±6.9 ^a	198.3±2.2 ^a	167.5±66.9 ^c	199.66±6.2 ^a	205.66±3.9 ^a	208.5±10.1 ^b	224.2±1.4 ^a	220.4±14.0 ^a

A: 200mg/kg B.W. B: 500mg/kg B.W. C:1000mg/kg B.W.

Table 6. Effect of antihypertensive-like peptide on the serum lipids of SHR(mg/100ml)

	Total Cholesterol***	Triglyceride***	HDL-Cholesterol**	LDL-Cholesterol***
Control	95.0±1.0 ^a	113.3±1.5 ^a	55.0±4.0 ^a	61.3±1.7 ^a
A	68.6±0.6 ^b	98.3±1.5 ^c	43.6±0.6 ^b	40.3±0.6 ^b
B	69.0±0.0 ^b	93.6±2.5 ^d	46.6±1.2 ^b	40.9±0.6 ^b
C	67.0±1.5 ^b	108.3±1.5 ^b	48.0±5.2 ^b	36.4±1.4 ^c

A: 200mg/kg B.W. B: 500mg/kg B.W. C:1000mg/kg B.W.

***: $P<0.001$, **: $P<0.05$

제 3 절 일곱 가지 효소를 이용하여 식육에서 분리한 ACE억제 활성 펩타이드

1 . 재료 및 방법

가 . 재료 및 추출조건

수원시내 시원도축장에서 구입한 저급 우둔에서 sarcoplasmic 단백질을 추출하여 실험에 이용할 때 까지 -40℃에서 저장하였다. 혈압상승억제 펩타이드의 생산조건을 확립하기 위해 사용된 펩타이드는 Thermolysin+Protease, Trypsin, Proteinase K, Tyrosinase, Pepsin, Papain, Protease이었다. 각 효소에 대한 단백질 가수분해물의 비율은 1:100으로 하였고 적정 pH와 온도는 Table1에 나타내었다.

Table1. The names of enzymes to hydrolyse protein.

효소의 종류	효소의 적정 pH와 온도
Thermolysin+Protease A	pH7.5, 37℃
Trypsin	pH7.6, 25℃
Proteinase K	pH7.5, 37℃
Tyrosinase	pH6.5, 25℃
Pepsin	pH3.0, 37℃
Papain	pH6.2, 25℃
Protease(alcalase)	pH7.5, 37℃

온도와 pH는 적정수준으로 설정하여 8시간의 배양 시간후 95℃의 물중탕에서 5분간 열처리하여 효소를 불활성화 시켰다.

나 . Reversed-Phase Liquid Chromatography를 이용한 펩타이드의 분리

Table 2. Analysis conditions of reversed Phase HPLC to separate of ACE inhibition activity fraction.

Instrument	Hewlet Packard 1100
Column& Size	C18 Zorbaks 150×2.1mm
Eluent	Sol A:0.1%TFA/DW Sol B: 0.08%TFA/Acetonitrile
Flow rate	1.0ml/min
Detector	UV absorbance (214nm)
Gradient condition	5min-A(%):B(%)=100:0 15min-A(%):B(%)=80:20 30min-A(%):B(%)=60:40 40min-A(%):B(%)=100:0 42min-A(%):B(%)=100:0
Sample size	10 μ l

그 외 분리 방법은 제 1절의 방법과 동일하게 실시하였다.

2 . 결과 및 고찰

가 . Ultrafiltration 과 Gel filtration을 이용한 단백질 효소분해물의 DH(Degree of Hydrolysis)와 분해 패턴

원래의 우둔의 sarcoplasmic protein의 단백질의 분자량크기와 이를 각각의 효소로 가수분해 했을 때의 분해도를 알아보기위해 ultrafiltered 되었던 가수분해물을 12%의 acrylamide gel을 이용하여 100v, 40mA에서 분리한 결과는 다음과 같다. M은 marker이고 S는 효소분해 하기 전의 sarcoplasmic protein 인데 각각의 효소로 처리된 well에서는 처리하지 않은 단백질(S)에서의 보여졌던 거대 단백질이 나타나지 않고 분자량 10,000이하의 크기에 약한 밴드가 보여 거대단백질이 제거되고 polypeptide 정도의 분획이 있는 것으로 보였다. 특히 Proteinase K와 Protease의 경우는 거의 완전히 거대 단백질도 분해 되었음을 보여주었다.

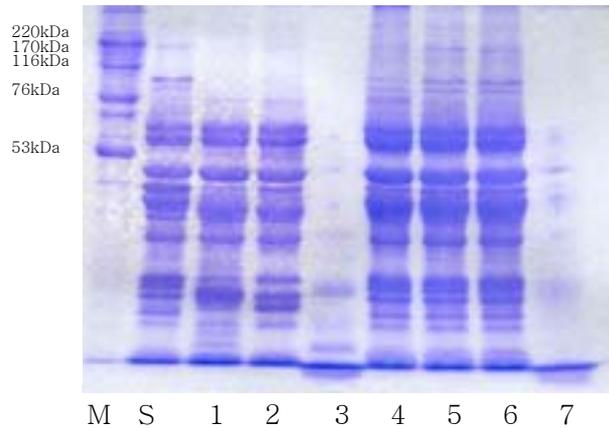


Figure 2. Protein hydrolysis pattern of beef protein with various enzymes on SDS-PAGE profile (M: marker, S: untreated protein, 1: Thermolysin+Protease, 2: Trypsin, 3: Proteinase K, 4: Tyrosinase, 5: Pepsin, 6: Papain, 7: Protease)

일곱 가지 효소에 의해 분해 시킨 단백질 가수 분해물을 이용하여 ultra filtration 과정을 거쳐 분자량의 크기를 기준으로 하여 분리하였다. 그 후, 샘플의 농축을 위하여 freeze drying을 시켰다. 그리고, 분자량 10,000Da 이하의 fraction을 분리하였다.

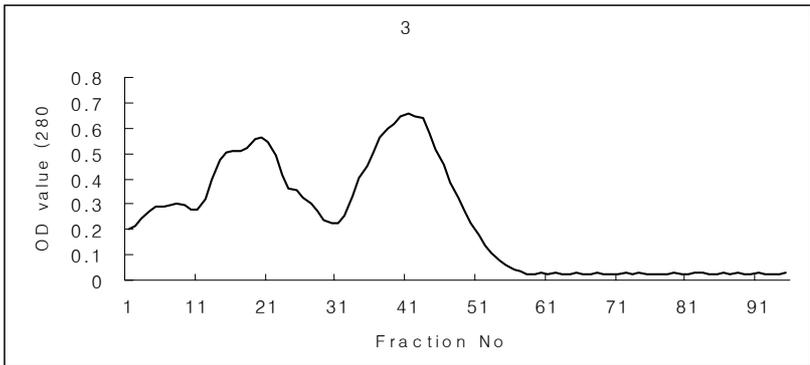
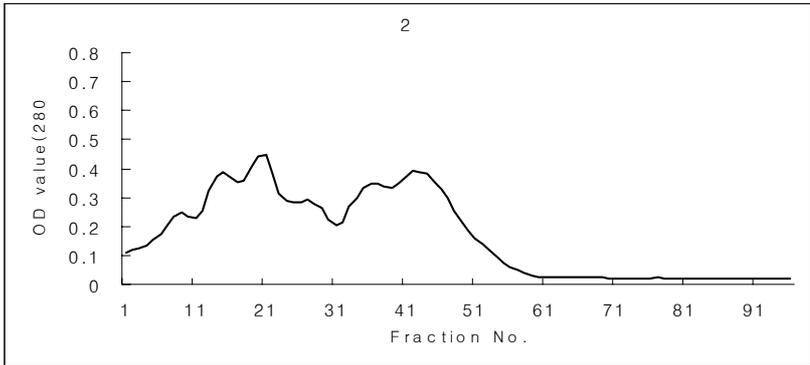
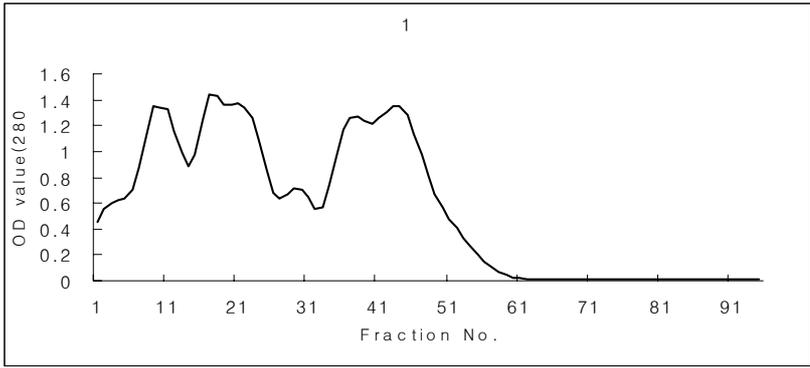
Gel filtration에 loading 할 때의 일곱 개의 샘플의 농도는 Table 3와 같다.

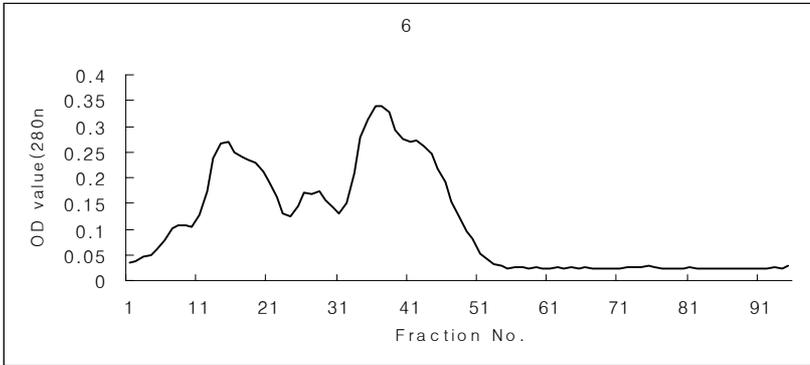
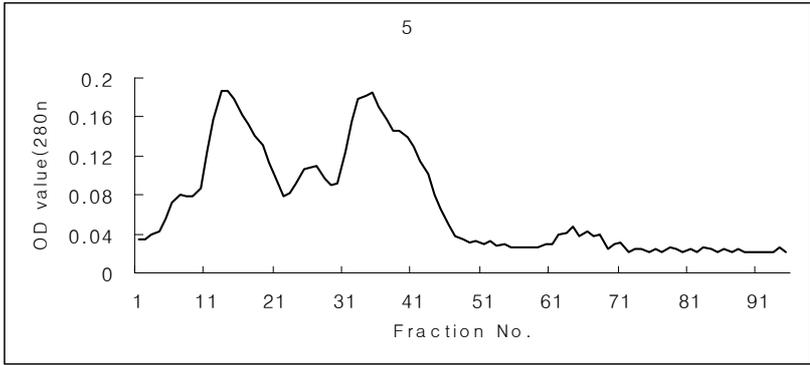
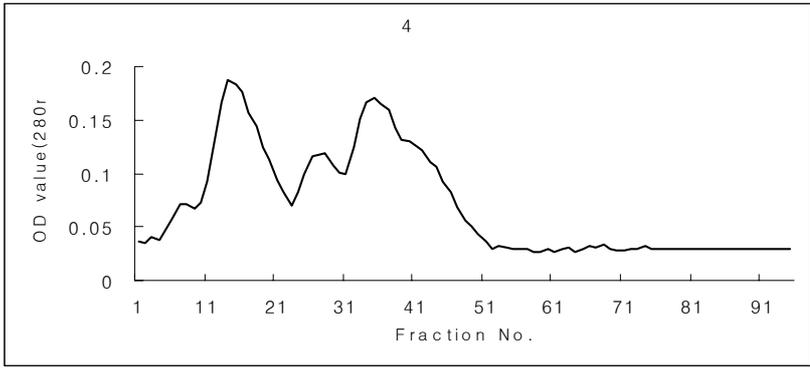
Table 3. Protein concentration of hydrolysates on Gel filtration

단백질 가수분해물	단백질 농도(mg/ml)
1	5.8
2	5.6
3	5.8
4	4.0
5	2.9
6	4.2
7	4.9

1: Thermolysin+Protease, 2: Trypsin, 3: Proteinase K, 4: Tyrosinase, 5: Pepsin, 6: Papain, 7: Protease

이들 효소분해물을 gel filtration을 통해 분자량별로 살펴본 peak의 크로마토그램은 Figure 1과 같다. 일곱 가지의 효소에 의해 각각 분해된 크로마토그램인데 모든 31-51 fraction에 동일한 peak가 보이는 것을 알 수 있었다. 이들 부분은 분자량 스탠다드 물질의 밴드와 비교하였을 때 분자량 8000이하의 부분으로 생각된다.





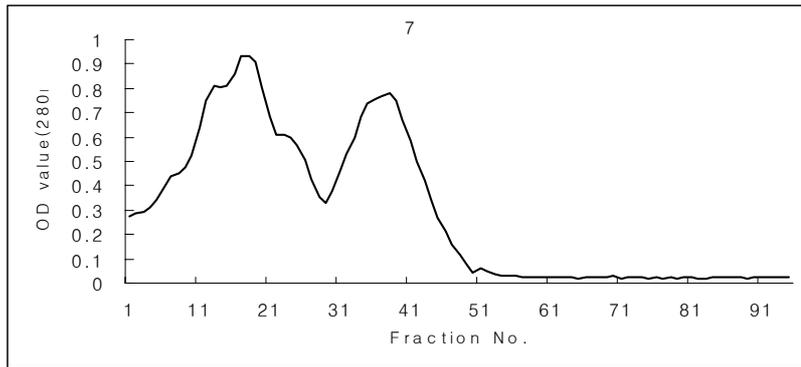


Figure 1. Gel-filtrated chromatogram of ultra filtrated hydrolysates with various enzyme (1: Thermolysin+Protease, 2: Trypsin, 3: Proteinase K, 4: Tyrosinase, 5: Pepsin, 6: Papain, 7: Protease)

나 . Gel filtraion을 이용하여 분리한 분획의 ACE 억제 효과

Table 4. ACE inhibition activity of Gel filtrated hydrolysates

Enzyme hydrolysates	Fraction No.	ACE inhibition activity(%)
Thermolysin+Protease A	9~11	82.3
	17~19	57.8
	29~30	ND
	37~38	ND
	43~44	ND
Trypsin	15~16	21.1
	20~21	8.0
	25~27	16.5
	36~38	14.8
	42~44	21.0
Protease K	16~17	10.5
	19~21	27.9
	40~42	12.2
Tyrosinase	14~16	0.8
	26~28	4.5
	34~36	ND
Pepsin	13~15	26.9
	25~27	4.7
	33~35	17.1
	39	10.6
Papain	14~16	28.8
	27~29	13.2
	36~38	21.4
	42	12.3
Protease	18~19	48.0
	38~39	21.1

일곱 가지 효소에 의해 분해시킨 단백질 가수 분해물중 gel filtrated 된 fraction을 선택하여 ACE 활성을 알아본 결과는 다음과 같다. 각 샘플은

50ul의 단백질 가수분해물질이었다. 이 결과로 비추어 볼때 RP-HPLC를 이용하여 ACE 억제 활성이 높은 펩타이드의 분리를 위해서는 Thermolysin+Protease A로 분해된 분획은 9~11과 17~19번 분획을, Trypsin분획물에서는 15~16과 42~44번 분획을, Protease K 분획물에서는 19~21번 분획을, Tyrosinase 분해물에서는 26~28번 분획을, Pepsin 분해물에서는 13~15분획을, Papain 분해물에서는 14~16과 36~38번 분획을, Protease분해물에서는 18~19과 38~39분획을 선택하였다. 이들 중 가장 ACE 억제 효과가 높았던 것은 Thermolysin+Protease A 분해물중 Gel filtration 분획번호가 9-11번에 해당하는 부분이었다. 각 효소에 의해 분해된 물질의 분리를 위해 RP-HPLC를 이용할 수 있도록 이들의 농도를 동결건조 방법을 이용하여 농축하여 사용하였다.

다 . RP-HPLC를 이용하여 ACE 억제 활성을 지닌 분획의 분리

ACE 억제 활성을 지닌 분획을 HPLC를 이용하여 분리한 결과를 Figure 1~Figure 10에 나타내었다. 각각의 단백질 분해 효소에 따라 다양한 피크들이 보였으며 이들 중 주요 피크를 분취하였다.

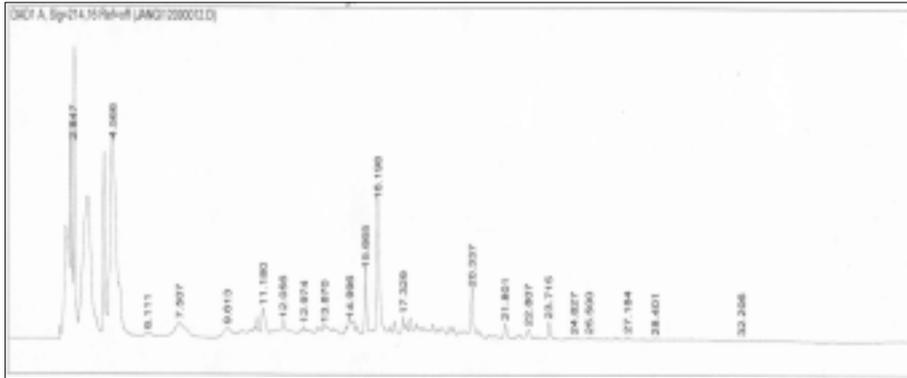


Figure 1. Chromatogram of Thermolysin+Protease A hydrolysates on HPLC(9~11 fraction of Gel filtrated hydrolysates)

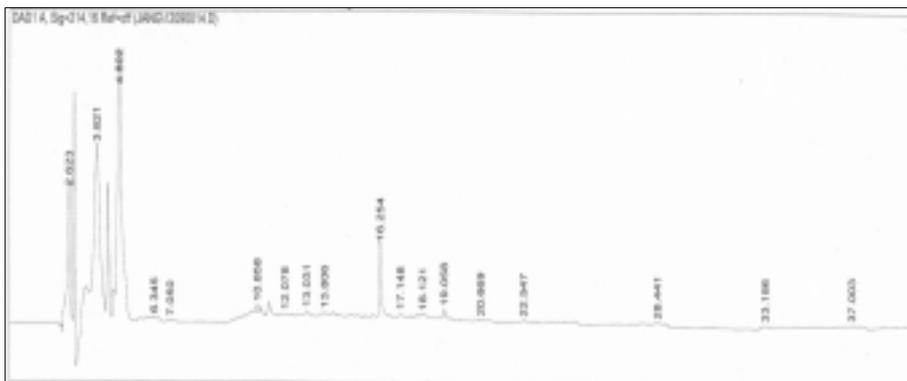


Figure 2. Chromatogram of Trypsin hydrolysates on HPLC(15~16 fraction of Gel filtrated hydrolysates)

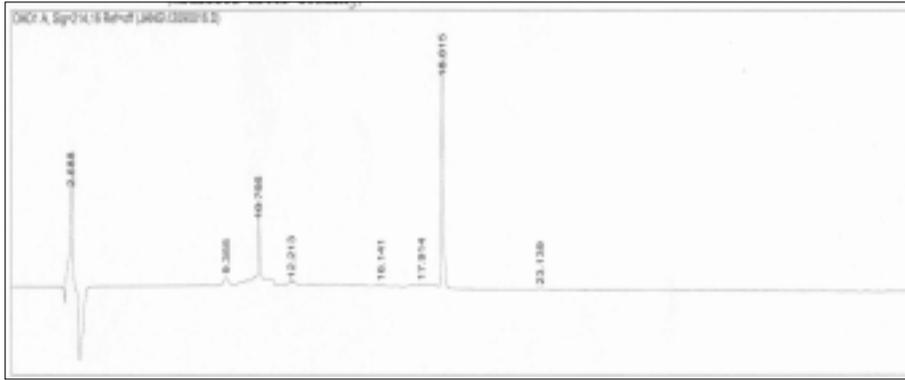


Figure 3. Chromatogram of Trypsin hydrolysates on HPLC(42~44 fraction of Gel filtrated hydrolysates)

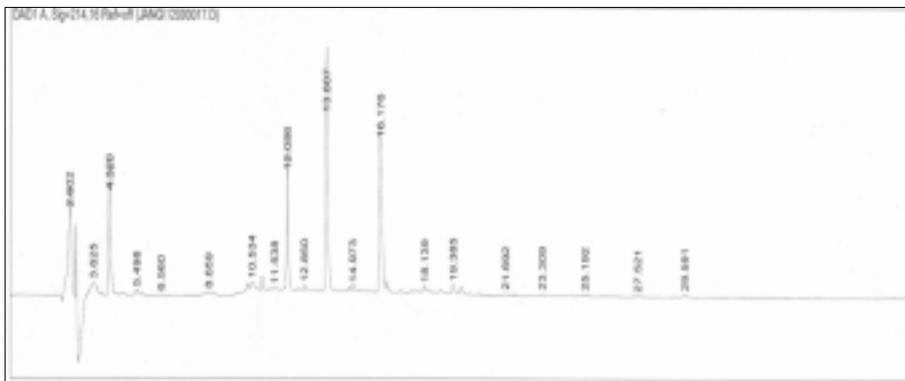


Figure 4. Chromatogram of Protease K hydrolysates on HPLC(19~21 fraction of Gel filtrated hydrolysates)



Figure 5. Chromatogram of Tyrosinase hydrolysates on HPLC(26~28 fraction of Gel filtrated hydrolysates)

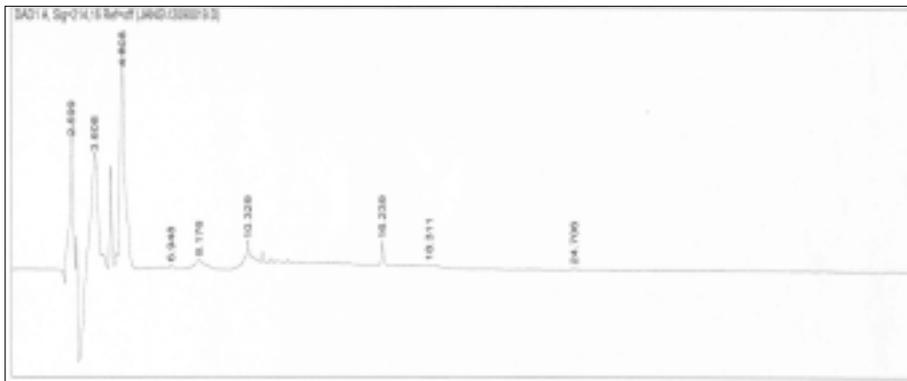


Figure 6. Chromatogram of Pepsin hydrolysates on HPLC(13~15 fraction of Gel filtrated hydrolysates)

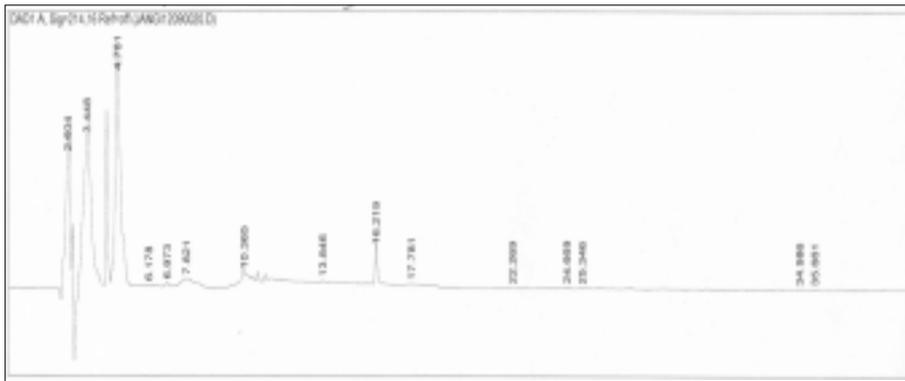


Figure 7. Chromatogram of Papain hydrolysates on HPLC(14~16 fraction of Gel filtrated hydrolysates)

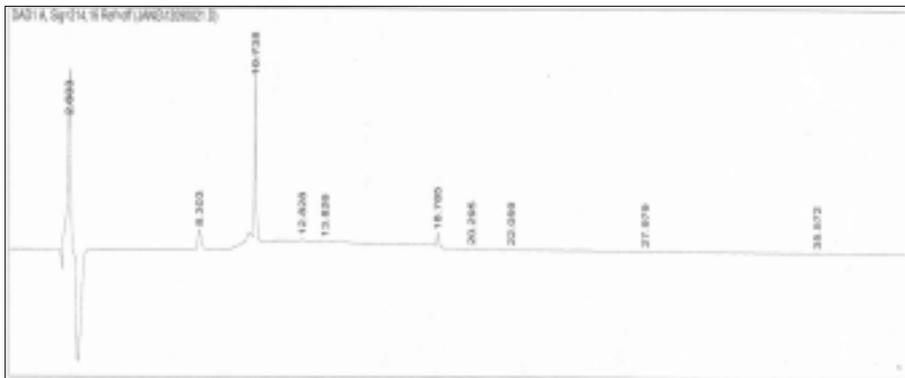


Figure 8. Chromatogram of Papain hydrolysates on HPLC(36~38 fraction of Gel filtrated hydrolysates)

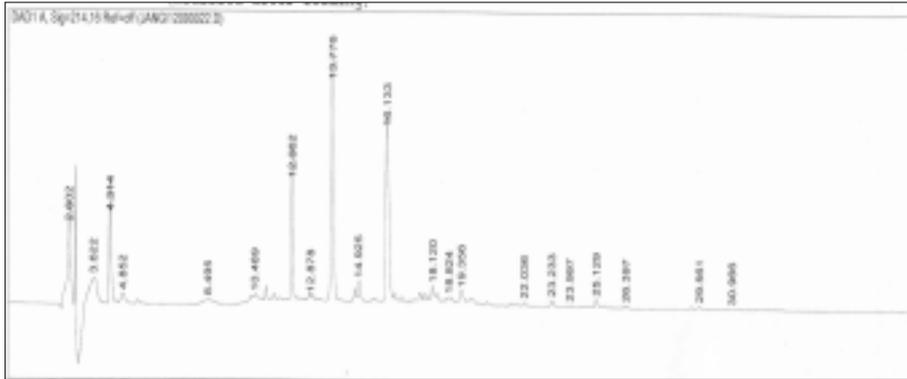


Figure 9. Chromatogram of Protease hydrolysates on HPLC(18~19 fraction of Gel filtrated hydrolysates)

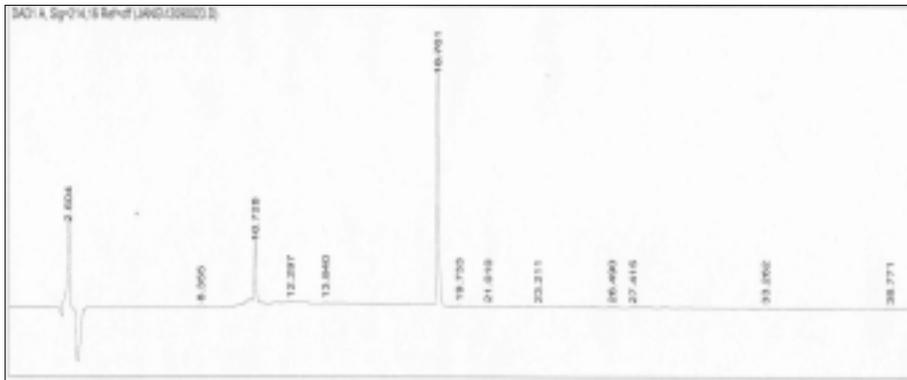


Figure 10. Chromatogram of Protease hydrolysates on HPLC(38~39 fraction of Gel filtrated hydrolysates)

라 . RP-HPLC를 통해 분리한 분획의 ACE 억제 활성 결과

Table 5. ACE inhibition activity and sequence of peptide from RP-HPLC separation(1151-1156 peaks: re-separated from peak 115)

Peak no.	ACE inhibition activity(%)	IC ₅₀ value (ug/ml)	Peak no.	ACE inhibition activity(%)	IC ₅₀ value (ug/ml)	Peptide sequence
111	0	0	1151	0.33	23.56	
112	0	0	1152	25.09	52.92	FHG
113	0.76	0	1153	11.71	126.34	
114	5.19	1445.96	1154	2.45	656.72	
115	7.31	731.64	1155	14.64	117.27	GLSDGEWQ
211	0	0	1156	0	0	
212	0	0				
213	0	0				
214	0	0				
215	0	0				
216	0	0				
221	8.47	206.30				
222	10.38	125.76				
321	9.83	128.53				
322	9.78	203.42				
323	10.39	152.59				
324	24.08	129.94				
325	34.77	64.27				GFHI
421	21.0	55.63				
422	16.80	69.54				Y
423	21.07	52.96				Y
424	17.26	62.88				F
511	4.11	274.08				
512	2.94	383.16				
611	43.77	29.10				A
612	22.31	58.66				
631	86.47	15.25				
632	74.35	20.75				
711	4.48	112.3				
712	4.68	245.1				
713	10.72	65.1				
714	31.66	50.53				DFHINQ
715	5.26	54.3				
721	8.73	315.74				
722	12.75	364.76				
723	9.42	194.31				

이들 분리된 펩타이드의 분자량은 1152번 피크가 395Da, 1255번 피크는 1135Da, 714번 피크는 862Da, 325번 피크는 526Da으로서 저분자량의 펩타이드로 밝혀졌다. 이들 펩타이드중 가장 ACE 억제 효과가 높았던 것은 325번 피크로서 526Da의 분자량을 가지면서 34.77%의 ACE 억제 효과가 있었던 것으로 나타났다. 이 펩타이드의 ACE 억제 효과이외에도 다른 생리활성 기능을 스크리닝 하기위해 이들 펩타이드를 인공적으로 합성하여 실험에 준비하였다.

제 4 절 분리된 ACE억제 펩타이드의 그 외 다른 생리 활성기능의 스크리닝

1 . 실험재료 및 방법

가 . 펩타이드

이미 분리되어 아미노산 서열이 확인된 펩타이드는 (주)펩트론에서 제작하였고 실험에 이용되기까지 milli-Q water로 용해하여 -50℃에 저장하였다. 펩타이드의 항균 효과와 세포독성 효과는 펩타이드714, 325, 1155, 1152, 1134를 이용하였고 면역증진 효과 검정을 위한 펩타이드 시료는 펩트론(주)에서 제조한 펩타이드 325를 사용하였다.

나 . 분리된 펩타이드의 항균활성 측정(디스크 법)

펩트리 디쉬는 87×15mm, 펄프디스크는 직경 8mm를 사용하였는데 펄프디스크는 사용 전에 121℃, 15분간 고압 멸균 후 충분히 건조시켜서 실험에 사용하였다. 균 영양액을 만들기 위한 증식용 배지로는 Tryptic soy agar(Difco)를 사용하였다.

항균활성에 이용된 균주는 *Salmonella typhimurium*(KFRI 00251), *E. Coli* O157(ATCC 43894), *Staphylococcus aureus*(KFRI 00188), *Pseudomonas aeruginosa*(KFRI 00100), *Bacillus cereus*(KFRI 00181), *Listeria monocytogenes*(KFRI 00719)이었다. 모든 균주는 37℃에서 배양되다가 적절한 균수로 계대 배양하여 이용하였다.

다 . 펩타이드의 암세포에 대한 cytotoxicity 측정

서울대학교 수의학과에서 배양 받은 MCF-7 cell(Breast cancer cell), LLC(Lung cancer cell), AGS cell(Advanced gastric cell)은 세포의 건강상태와 생사여부를 inverted microscope로 먼저 관찰한 후 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 배양하였다.

위 세가지 암세포들을 각각의 배양액에서 배양하다가 2×10^4 cells/well 의 밀도로 24well에 분주한다. 그 후 다섯 가지의 펩타이드를 농도별로 (12.5ug, 25ug, 50ug, 100ug, 200ug, 400ug) 처리하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 동안 배양한다. 그 후 각 well에 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide, sigma)를 50ul처리하고 4시간 추가 배양을 하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 150ul의 DMSO를 넣고 잘 섞어준다. 이를 ELISA leader를 이용해 570nm에서 측정하였다.

라 . 면역 활성 측정

Macrophage cell line은 한국식품개발연구원에서 보관중인 RAW 264.7 을 분양받아 사용하였다. Macrophage RAW 264.7 세포주를 질소탱크에서 꺼내 신속히 해동한 다음, 준비해 놓은 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 분주하여 5% CO₂ 배양기에서 37°C, 2일간 배양하였다. 3회 반복 계대배양하여 세포의 활력을 증진시켜 최종적으로 1.5×10^5 /ml 의 농도로 맞춘 다음 희석한 세포를 96 well plate에 180μl씩 분주하고, 농도별로(1mg/ml 과 300μg/ml, 100μg/ml) 희석한 펩타이드 325 를 20μl씩 분주하였다. CO₂ 배양기에서 37°C, 2일간 배양한 다음, 각 well에서 상등액을 50μl씩 취하여 같은 용량의 Griess 시약을 넣고 실온에서 10분간 반응시켰다. ELISA reader(Molecular Device, USA)로 540nm 에서의 흡광도를 측정하였고, 표준곡선을 이용하여 산화질소의 농도를 산출하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 분리된 펩타이드의 항균 실험 결과

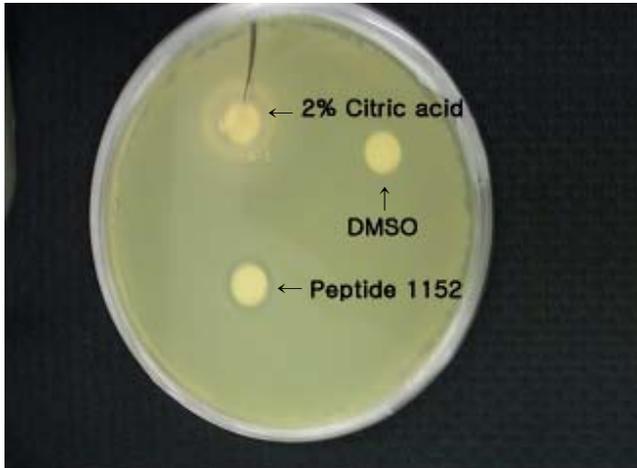


Figure 1. Antimicrobial activity of peptide 1152 on *Pseudomonas aeruginosa*

Table 1. Antimicrobial activity of peptide 1155

	<i>S.typhmuri</i> <i>um</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E.coli</i>	<i>L.monocyto</i> <i>genesis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
100 μ g	+	+	+	+	ND	ND
200 μ g	+	+	+	+	ND	ND
400 μ g	+	+	+	+	ND	ND
DMSO	ND	ND	+	+	ND	ND
2% CA*	++	+++	++	++	ND	+++

* 2% CA: 2% citric acid

+++ : 저해능 높음

++ : 저해능 낮음

+: 저해능 미약

ND: 저해능 없음

Peptide 1155: GLSDGEWQ

Table 2. Antimicrobial activity of peptide 325

	<i>S.typhmuri</i> <i>um</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E.coli</i>	<i>L.monocyto</i> <i>genesis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
100 μ g	ND	ND	+	ND	ND	++
200 μ g	ND	ND	++	ND	ND	++
400 μ g	ND	ND	++	ND	ND	++
DMSO	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2% CA*	++	++	+	ND	ND	++

* 2% CA: 2% citric acid

+++ : 저해능 높음

++ : 저해능 낮음

+: 저해능 미약

ND: 저해능 없음

Peptide 325: GFHI

Table 3. Antimicrobial activity of peptide 1152

	<i>S.typhmuri</i> <i>um</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E.coli</i>	<i>L.monocyto</i> <i>genesis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
100 μ g	ND	ND	ND	ND	ND	+
200 μ g	ND	ND	ND	ND	ND	++
400 μ g	ND	ND	ND	ND	ND	++
DMSO	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2% CA*	++	++	+	ND	ND	++

* 2% CA: 2% citric acid

+++ : 저해능 높음

++ : 저해능 낮음

+: 저해능 미약

ND: 저해능 없음

Peptide 1152: FHG

Table 4. Antimicrobial activity of peptide 714

	<i>S.typhmuri</i> <i>um</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E.coli</i>	<i>L.monocyto</i> <i>genesis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
100 μ g	ND	ND	+	ND	ND	ND
200 μ g	ND	ND	+	ND	ND	ND
400 μ g	ND	+	+	ND	ND	+
DMSO	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2% CA*	++	++	+	ND	ND	++

* 2% CA: 2% citric acid

+++ : 저해능 높음

++ : 저해능 낮음

+ : 저해능 미약

ND : 저해능 없음

Peptide 714: DFHINQ

나 . 분리한 펩타이드의 세포독성 효과

분리된 펩타이드의(1152, 1155, 325, 714, 1134) 세포독성 효과를 알아보기 위해 세가지 암세포주를(AGS, MCF-7, LLC) 준비하였다. 이들 암세포주에 대한 펩타이드의 세포독성효과는 다음과 같다.

MCF-7 cell에 대하여 독성을 가지는 펩타이드는 325로 나타났다. 처리 농도에 따라 100ug 처리시에는 10%, 400ug처리시에는 약 20%의 세포독성을 보였다.(Fig.2) 또한 펩타이드 714도 역시 세포독성이 증가하는 경향을 보였으나 10%의 저하율도 미치지 못했다.

1) Breast cancer cell(MCF-7 cell) 에 대한 효과

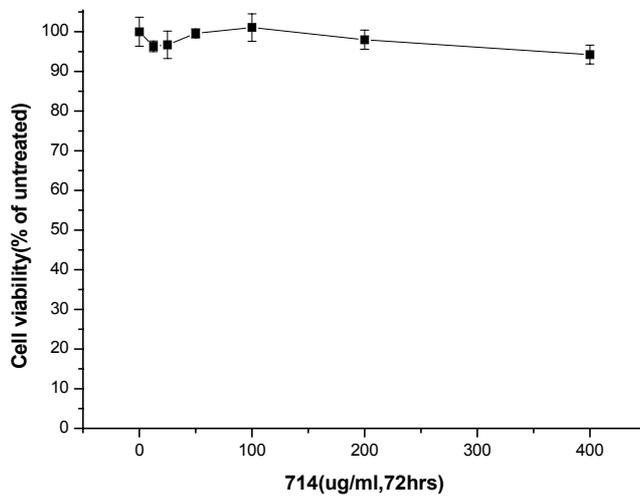


Figure 1. Cytotoxicity of peptide 714 on MCF-7 cell

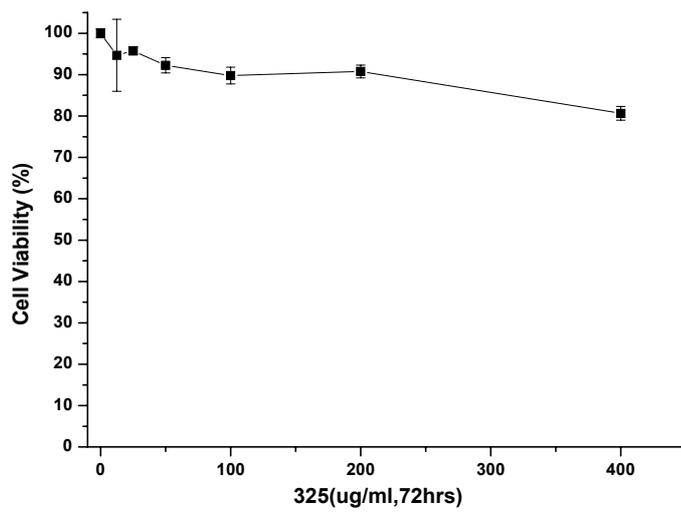


Figure 2. Cytotoxicity of peptide 325 on MCF-7 cell

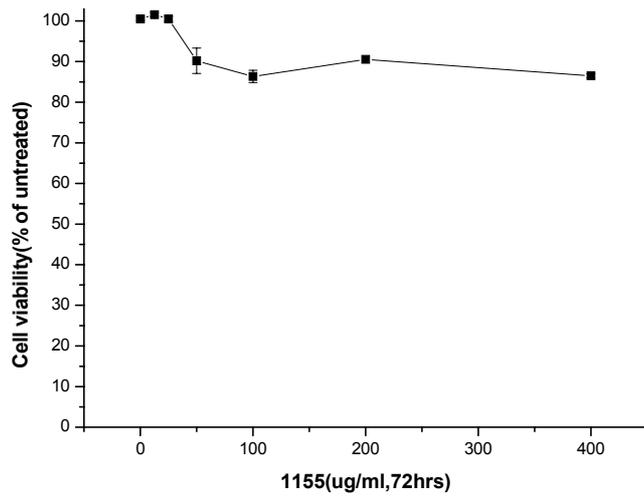


Figure 3 Cytotoxicity of peptide 1155 on MCF-7 cell

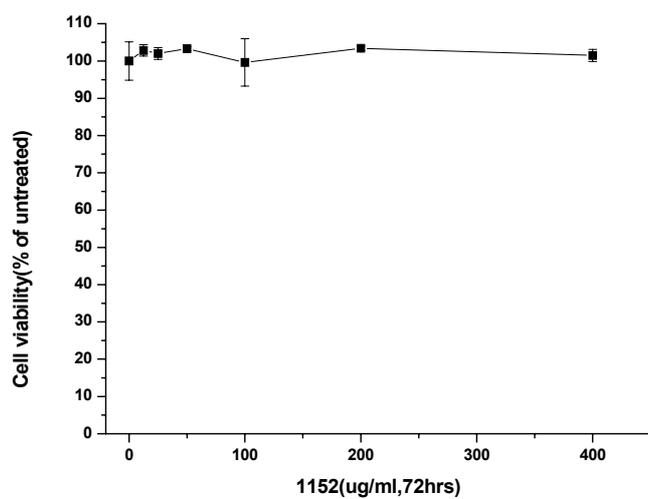


Figure 4. Cytotoxicity of petide 1152 on MCF-7 cell

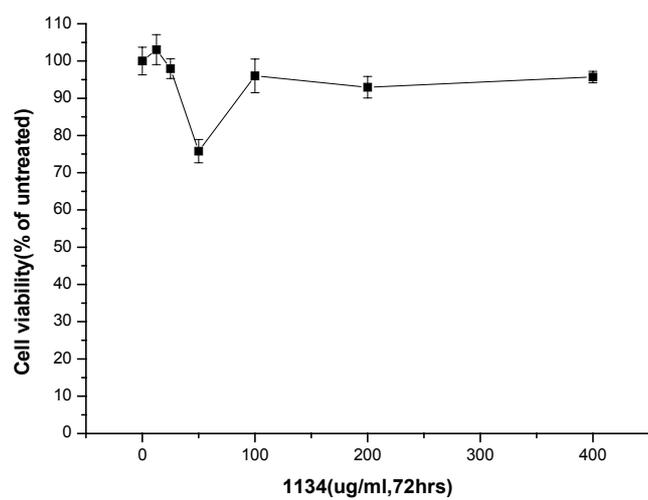


Figure 5. Cytotoxicity of petide 1134 on MCF-7 cell

2) Stomach cancer cell에 대한 세포독성 효과

펩타이드 325의 경우 펩타이드 처리농도가 증가함에 따라 AGS cell에 대한 세포독성도 증가하는 경향을 보였으며 400ug의 경우에는 28.8%의 독성을 보였고 펩타이드 1155는 77.6%의 강한 세포독성을 보여주었다.

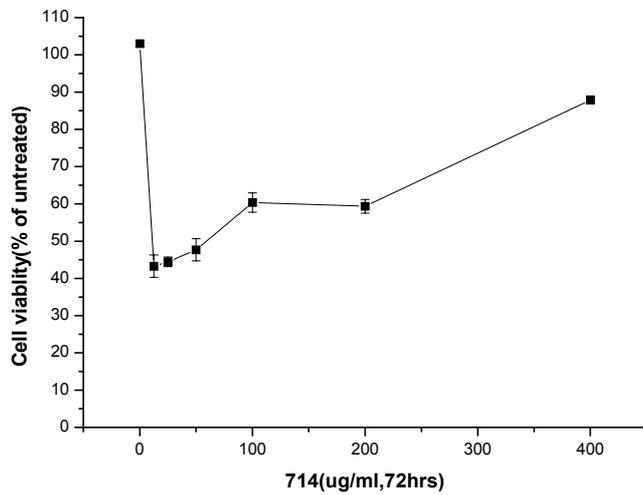


Figure 6. Cytotoxicity of peptide 714 on AGS cell

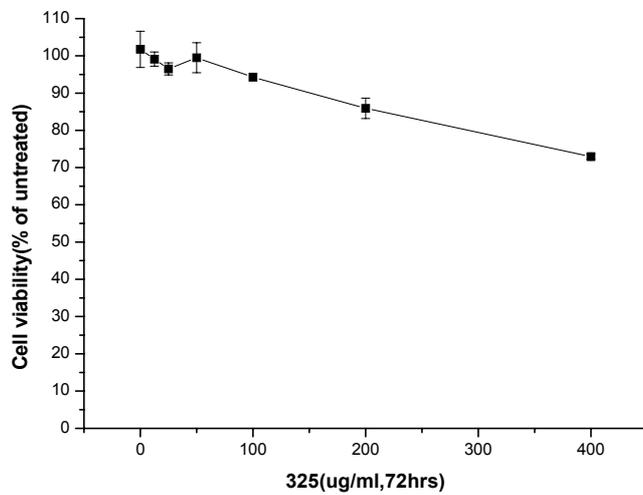


Figure 7. Cytotoxicity of peptide 325 on AGS cell

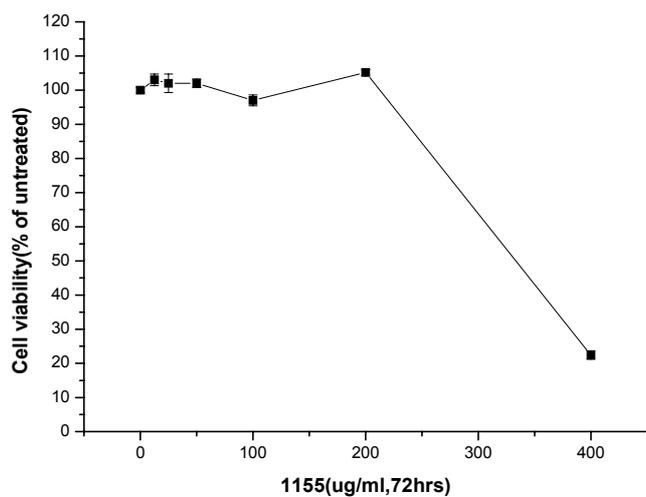


Figure 8. Cytotoxicity of peptide 1155 on AGS cell

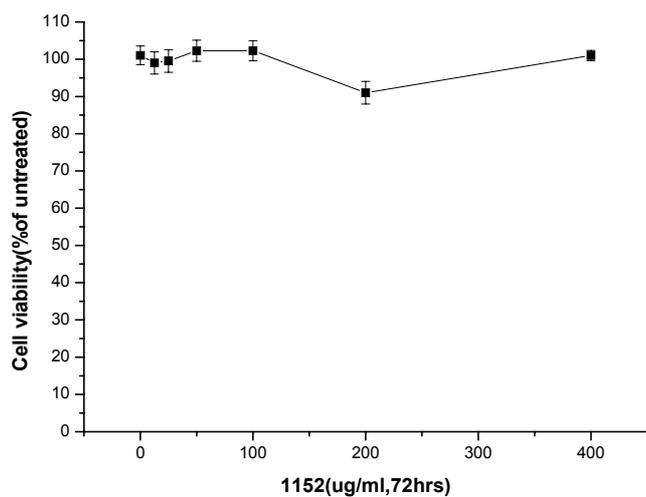


Figure 9. Cytotoxicity of peptide 1152 on AGS cell

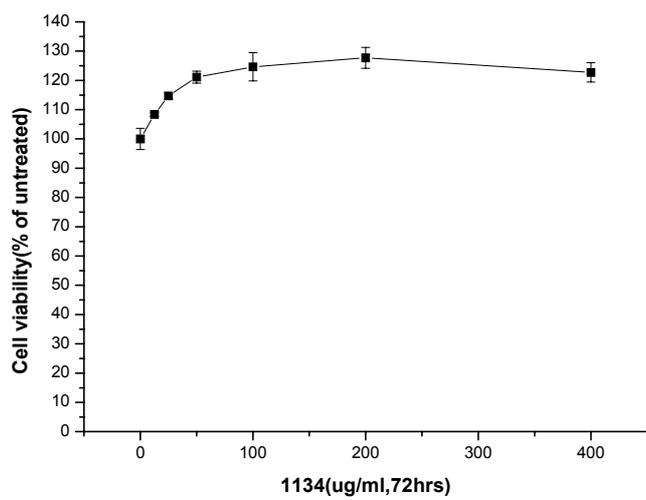


Figure 10. Cytotoxicity of peptide 1134 on AGS cell

3) 분리한 펩타이드의 Lung cancer cell에 대한 세포독성 효과

분리한 펩타이드의 Lung cancer cell에 대한 세포독성을 살펴본 결과 모든 펩타이드가 별다른 저해 효과를 보이지 않았다. 이미 MCF-7과 AGS cell에 독성을 보였던 펩타이드 325도 효과가 없었다.

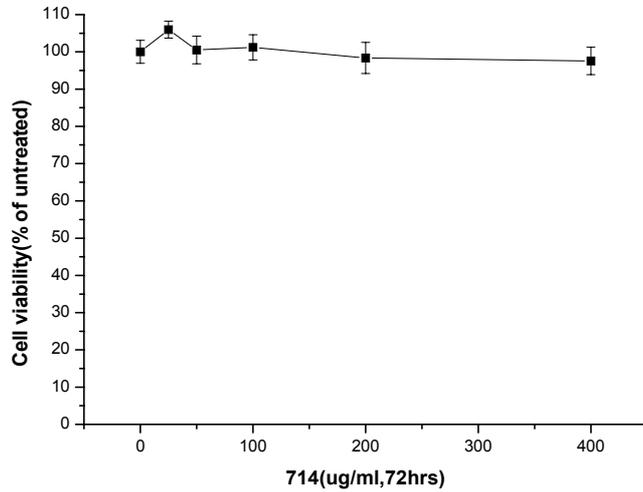


Figure 11 Cytotoxicity of petide 714 on LLC cell

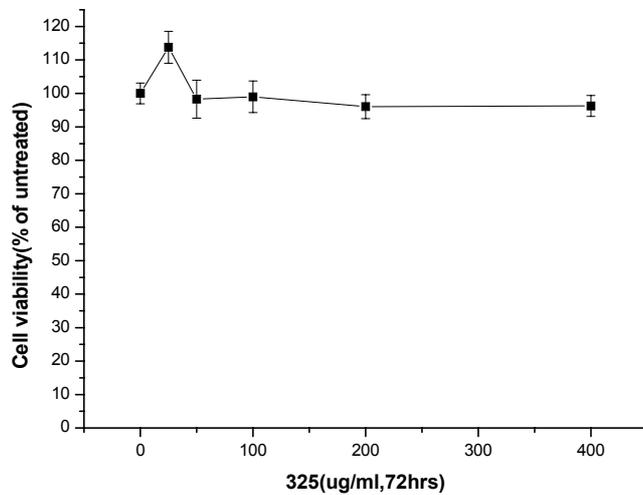


Figure 12. Cytotoxicity of petide 325 on LLC cell

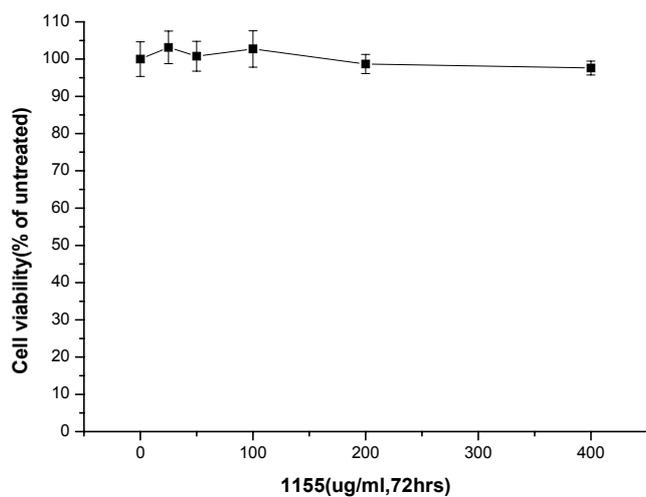


Figure 13 Cytotoxicity of peptide 1155 on LLC cell

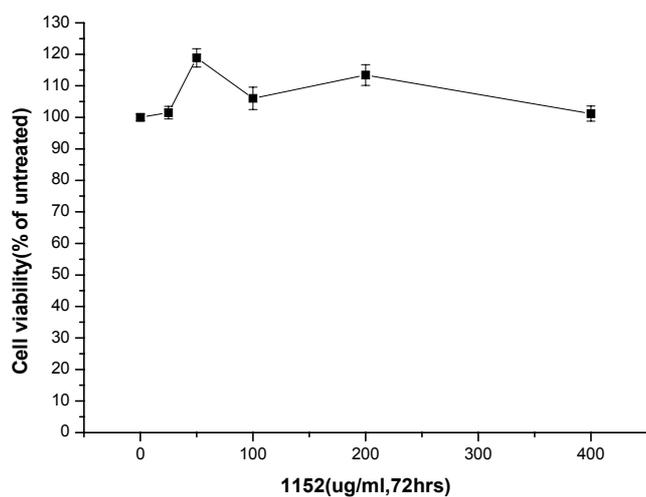


Figure 14. Cytotoxicity of peptide 1152 on LLC cell

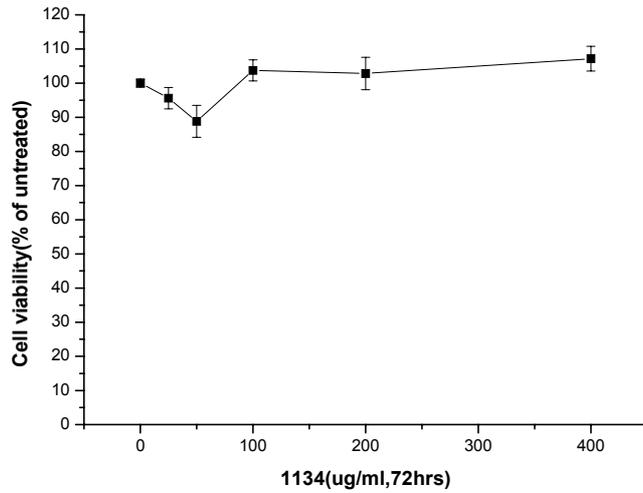


Figure 15. Cytotoxicity of peptide 1134 on LLC cell

다 . 분리한 펩타이드의 면역 활성화 조사

분리한 펩타이드의 세포독성결과를 분석한 결과 펩타이드 325번이 세 가지 암세포 주를 가장 유의적으로 저해하는 효과를 보여 이 펩타이드를 면역활성 조사의 대상으로 선정하였다.

1) 표준곡선

Sodium nitrite를 표준 시료로 하여서 희석 용액에 대한 흡광도를 540nm에서 측정하였다.

2) 펩타이드 325의 면역활성

펩타이드 325를 100, 300, 1000ug/ml로 처리하였을 때 분비되는 NO의 농도는 촉진되지 않았으며, Macrophage의 활성화에는 영향을 주지 않은 것으로 추정된다.

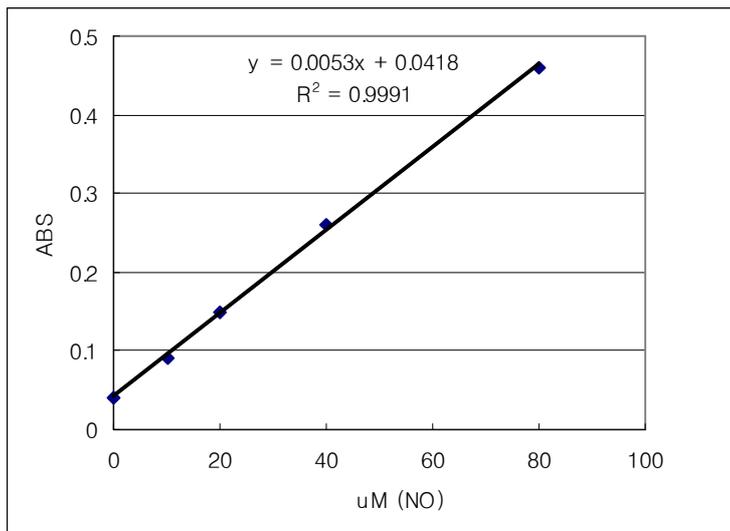


Figure 16. Standard curve of sodium nitrite concentration at 540nm

Table. 5 NO(Nitric Oxide) concentration induced from peptide 325 on macrophage activation

Sample Conc.($\mu\text{g/ml}$)	0	100	300	1,000
ABS	0.06	0.05	0.05	0.06
NO conc.	3.4 μM	1.5 μM	1.5 μM	3.4 μM

Peptide 325: GFHI

제 5 절 분리한 펩타이드의 저장 기간과 pH 변화에 따른 ACE 억제 활성 기능의 변화

1 . 재료 및 방법

펩타이드는 4℃에서 냉장 저장하면서 0.1mg/ml의 농도로 조정하여 pH의 변화를(pH6.0,6.5,7.0,7.5,8.0)주고 열처리를(60,70,80,90,100℃) 달리하였을 때의 ACE 저해 효과능의 변화에 대해 조사하였다. pH는 0.5M의 염산용액으로 조정하였으며 열처리는 각각의 온도에서 20분 동안 처리하여 환경의 변화를 주었고 냉장온도에서 두달 동안 저장하면서 ACE억제 활성을 측정하였다. 그 외 RP-HPLC와 ACE 억제 효과의 측정은 위에서 언급한 방법과 동일하게 진행하였다.

2 . 결과 및 토론

가 . 다양한 온도, pH 조건에서 저장기간동안(℃) ACE 억제 활성펩타이드의 활성 변화

Table 1. ACE inhibition activity of peptides on various pH condition after 2 months storage at 4℃(%)

peptide pH	714	325	1155	1152	1134
6.0	31.4±0.7	34.0±0.0	14.3±0.2	25.9±0.8	52.9±0.0
6.5	31.3±0.3	34.0±0.4	14.3±0.2	25.2±0.4	53.5±0.4
7.0	30.7±0.4	33.6±0.6	13.9±0.5	25.0±0.3	53.2±0.4
7.5	30.9±0.3	34.5±0.4	14.0±0.1	25.2±0.1	53.5±0.5
8.0	31.2±0.2	34.1±0.4	14.2±0.3	25.0±0.3	53.5±0.5

Table 2. ACE inhibition activity of peptides on various temperature condition after 2months storage at 4°C(%)

peptide °C	714	325	1155	1152***	1134***
60	31.5±1.1	34.5±0.5	15.5±1.2	18.2±0.4	37.1±0.4
70	32.4±0.8	34.2±0.8	14.2±0.5	24.6±1.3	53.4±0.6
80	31.2±1.2	35.2±1.5	14.8±0.6	25.4±1.4	53.7±1.5
90	31.2±0.6	34.8±1.7	14.6±0.4	24.6±0.6	53.9±0.6
100	30.9±0.4	34.5±1.0	15.7±1.7	24.8±0.8	53.5±0.4

***; p<0.001

나 . 다양한 온도에서의 peptide의 RP-HPLC 크로마토그램

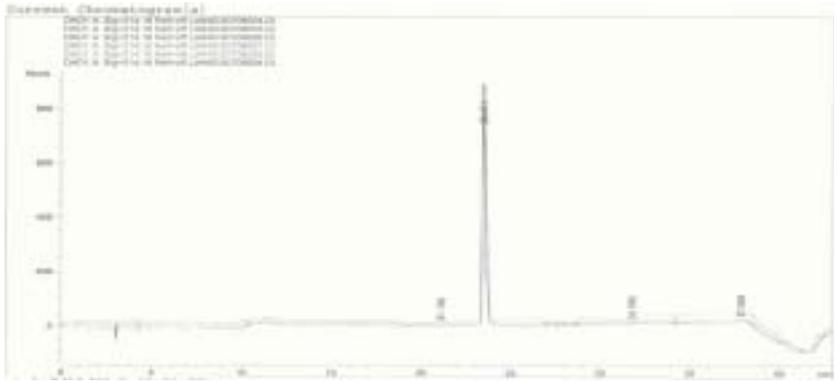


Figure 1. Chromatogram of peptides 325 after heating treatment at 60,70,80,90,100°C

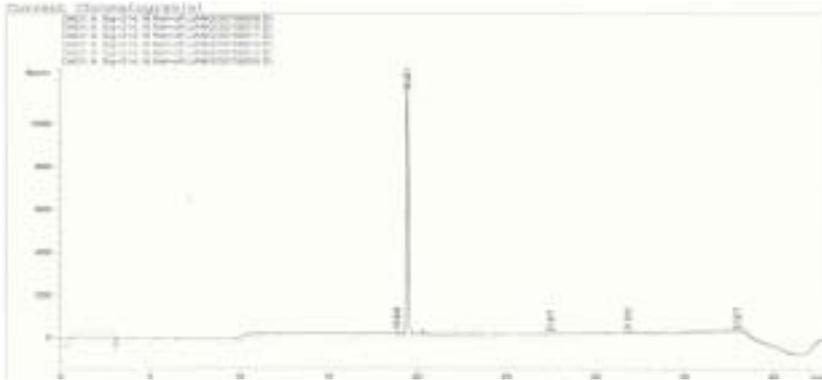


Figure 2. Chromatogram of peptides 7143 after heating treatment at 60,70,80,90,100°C

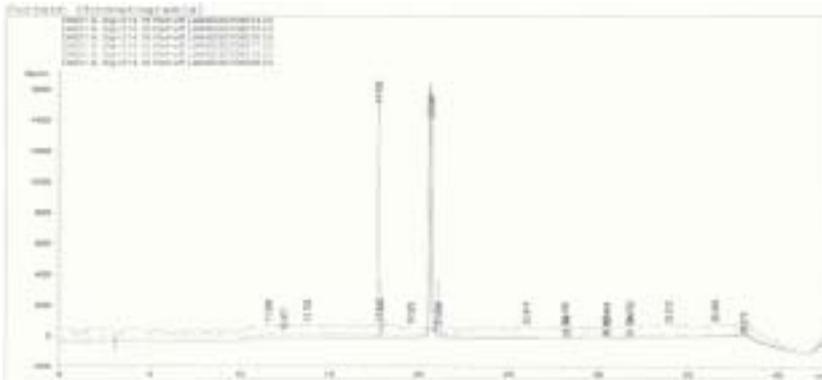


Figure 3. Chromatogram of peptides 1155 after heating treatment at 60,70,80,90,100°C

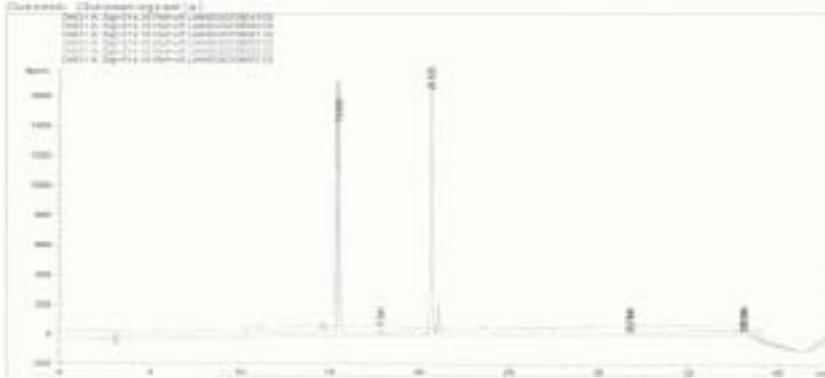


Figure 4. Chromatogram of peptides 1152 after heating treatment at 60,70,80,90,100°C

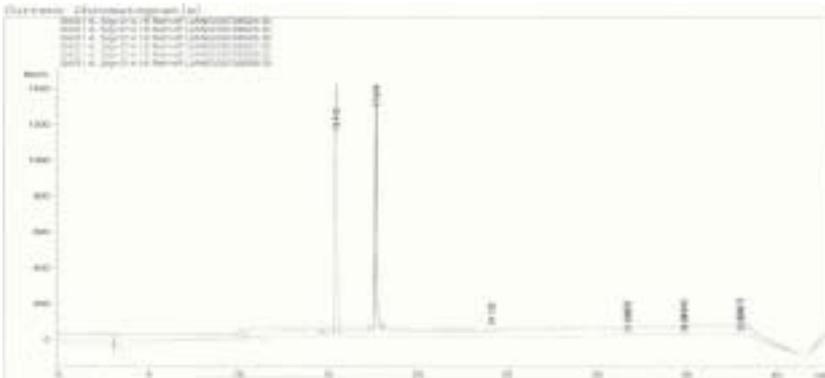


Figure 5. Chromatogram of peptides 1134 after heating treatment at 60,70,80,90,100°C

합성된 펩타이드를 60,70,80,90,100°C의 온도에서 20min동안 열처리를 하고 RP-HPLC를 통하여 이들의 성분의 변화를 측정하였다. 펩타이드 325, 714는 60, 70, 80, 90,100°C의 모든 열처리 과정에서는 열처리 하지 않은 대조구에 비교하여 모두 변화가 없었다. 하지만 1155, 1152, 1134 펩타이드는 를 특히 60°C에서만 변성이 되어 retention time의 차이를 보였다. 즉 1155,1152,1134 펩타이드는 70,80,90,100°C처리를 해주었을 때 각각 20.640min, 15.469min, 17.674min의 동일한 RT를 보였으나 유독 6

0°C에서만 각각 17.702min, 20626min, 15.412min의 RT를 보여 특이성을 나타내었다. 이들 열처리에 따라 변성된 세 펩타이드는 모두 thermolysin 과 proteinase A의 혼합효소 분해물인 공통점이 있으나 정확한 변성원인은 아직 밝혀지지 않았다. 후에 이에 대한 연구가 더 필요하다고 생각된다.

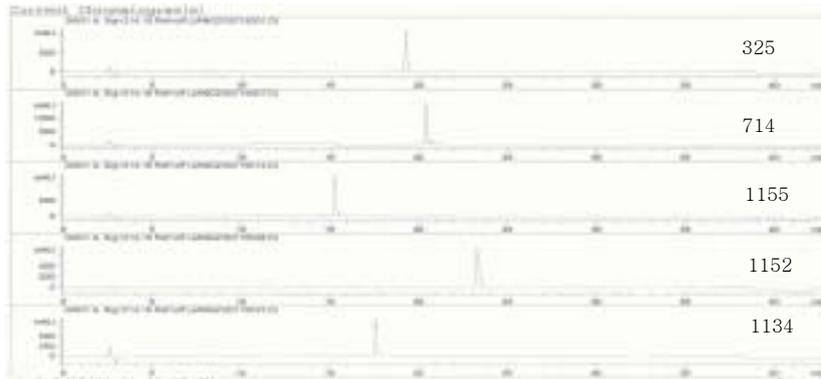


Figure 6. Chromatogram of peptides without treatment

합성된 펩타이드에 어떠한 가공 처리도 하지 않고 RP-HPLC의 분리 크로마토그램을(Figure 6) 보면 각각의 retention time을 나타내어 성질이 다른 각각의 펩타이드 형태를 나타내고 있으나 이들을 pH6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0에 환경을 맞추어도 retention time이 동일하여 같은 물질 즉 변성이 되지 않았음을 나타내었다.(Data not shown) 이것은 이들 펩타이드의 잔기가 짧아 더 이상 pH 조건의 변화에 영향을 받지 않는 것으로 보이며 이로 인해 위의 언급한 pH 범위내의 가공조건에서 변성으로 인한 ACE억제 기능성의 상실은 거의 없을 것으로 생각된다.

제 6 절 결론

1. 저급 우둔의 Sarcoplasmic 단백질의 경우에는 Thermolysin + Protease A 효소를 이용하여 4시간동안 배양한 분해물 중 HPLC로 분리한 분획의 ACE 억제 활성은 53.36%이었고 IC₅₀값은 7.50 μ g/100ul이었으며, 아미노산 서열은 **V-L-A-Q-Y-K** 이었다.

2. 우둔에서 추출한 항고혈압성 펩타이드의 Spontaneously Hypertensive Rat에 대한 혈압저하 효과를 검증하기 위하여 kg body weight 당 200mg, 500mg, 1000mg의 우둔에서 추출한 V-L-A-Q-Y-K을 경구투여한 결과 실험동물의 혈압은 3주째에 1000mg/kg B.W를 투여한 군이 가장 낮은 혈압수치를 보여 가장 강한 혈압 저하율을 보였고 LDL 콜레스테롤 함량은 대조군보다 처리량에 따라 유의적으로(p<0.001)감소하여 대조군에서 61.3mg/100ml이었던 것이 1000mg 처리군에서는 36.4mg/100ml의 함량으로 큰폭으로 감소하였다.

3. 저급 우둔 단백질에 일곱가지 상업용 효소인 Thermolysin+Protease, Trypsin, Proteinase K, Tyrosinase, Pepsin, Papain, Protease을 이용하여 분리한 펩타이드의 서열은 **FHG와 GLSDGEWQ, GFHI, DFHINQ**이었으며 ACE 저해 활성은 각각 25.09, 14.64, 34.77, 31.66%를 나타내었다.

4. 아미노산 서열이 확인된 펩타이드를 다량 합성하여 항균활성을 측정한 결과 각각의 펩타이드에 따라 미약한 미생물 억제 활성을 보였으나 펩타이드 GFHI는 *E.coli*와 *P.aeruginosa*에 낮은 항균 작용을 보였으며 FHG는 *P.aeruginosa*에 낮은 억제작용을 보였다. 합성한 펩타이드의 세포독성 효과를 살펴보면 400ug/ml의 펩타이드 GFHI가 유방암 세포주에 약 20%, 위암 세포주에는 약 30%의 세포독성을 보였다. 또한 펩타이드 GLSDGEWQ는 400ug/ml의 처리 농도에서 약 80%의 독성 효과를 보였다. 또한 폐암 세포주에

는 어떠한 펩타이드도 별다른 효과를 보이지 않았다. 그러나 암 세포주에 억제 활성이 높았던 펩타이드 GFHI는 machropage 활성에 의해 생성되는 NO의 양에는 효과가 없어 면역 활성의 기능은 없는 것으로 나타났다.

5. 펩타이드는 4℃에서 두달동안 냉장 저장하면서 0.1mg/ml의 농도로 조정하여 pH의 변화를(pH6.0,6.5,7.0,7.5,8.0)주고 열처리를(60,70,80,90,100℃) 달리 하였을 때의 저장기간 후의 714, 325 펩타이드의 ACE 저해 효과는 큰 저하를 보이지 않았으나 특히 1155, 1152, 1134 펩타이드는 60℃의 온도처리 과정에서 ACE 억제 효과도 다소 떨어졌으며 HPLC 크로마토그램에서도 대조구의 RT와 다른 RT를 보였다.

제 2 세 부 (협동과제) 노폐계를 이용한 식육 펩타이드의 연구

제 1 절 노폐계를 이용한 기능성 식육펩타이드 생산 및 기능확인

1 . 실험재료

원료육은 대전 축산기술연구소에서 80주령 이상의 산란계 통닭을 구입한 후 깨끗이 씻어 4℃ 냉장고에 넣고 가슴살을 실험에 사용하였다. Alcalase, neutrase, flavourzyme, protamex는 Novo enzyme(Bagsvaerd, Denmark)에서 trypsin, carboxypeptidase A, protease, aminopeptidase는 Sigma chemical(St. Louis, MO, USA)에서 takadiastase는 Fluka chemical(Switzerland)에서 papain은 Merck chemical(Darmstadt, Germany)에서 구입하였으며, carnosine, anserine 및 homocarnosine의 표준품은 Sigma chemical(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 실험의 전반적인 절차는 그림 1에 요약하여 도식화하였다.

2 . 실험 방법

가 . 단백질의 추출

수용성 단백질 추출은 닭의 가슴살 약 100g을 잘게 썰어 2배의 증류수를 가한 다음 blender에서 30초씩 2회 갈은 후 homogenizer(AM-11, Nihonseiki Kaisha, Japan)를 이용하여 100rpm에서 30초간 2회 균질화하고, Refrigerated superspeed centrifuge(Dupont, USA)에서 10℃, 7,000×g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 4N-HCl 또는

4N-NaOH를 이용하여 각 효소의 최적 pH로 조절한 다음 효소를 0.5(w/w)% 가하고 최적온도조건에서 1, 2, 3, 4시간동안 가수분해하였다. 가수분해 후 85℃에서 10분간 효소를 불활성화시키고 다시 10℃, 7000×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취해 검액으로 하였다. 염용성 단백질을 추출은 증류수 대신 0.9% NaCl을 사용하였으며, 이후 과정은 수용성 단백질 추출조건과 동일하게 처리하였다.

나 . 펩타이드의 분리 최적조건 탐색

1) 효소선정

펩타이드 분리·정제방법 중 효소에 의한 분리·정제과정에 주로 사용하는 효소의 종류는 다음 표 3과 같다. 이들 중 본 연구의 목표물질인 dipeptide carnosine(β -Ala-L-His)과 anserine(β -Ala-L-1-methyl-His)을 얻기 위해서 알려진 효소의 특이성 중 Ala-His bond에 기질특이성을 갖지 않는 trypsin, carboxypeptidase A, protease, takadiastase, neutrase, alcalase를 적용하여 가수분해물을 얻기로 결정하였다. 또한 현재 단백질 분해효소로 시판되고 있는 flavourzyme, protamex, aminopeptidase, papain도 함께 검토하였다.

다 . 효소가수분해 최적조건의 탐색

Carnosine, anserine 및 hormocarnosine의 생산함량이 높은 효소를 선정하기 위하여 문헌자료(표 1 참조)130,131)를 기초로 표 2와 3의 조건을 적용하여 조사하였다.

Table 1 . List of proteases for protein hydrolysis

Type of proteases	Common name	Typical Temp. (°C)	Typical pH range	A p p l i e d enzymes in this study
Serine protease	Trypsin	25	7.0~9.0	○
Serine protease	Chymotrypsin	37	8.0~9.0	-
Aspartic protease	Pepsin, pepsin A	37	1.0~4.0	-
Mixture of trypsin, chymotrypsin, elastase, carboxypeptidase A,B	Pancreatin	25	7.0~9.0	-
Peptidyl-L-amino acid hydrolase	Carboxypeptidase A, Carboxypeptidase B	25	7.0~8.5	○ -
Aspartic protease with some carboxypeptidase	Protease	37	2.0~5.0	○
Aspartic protease	Rennilase	37	3.0~6.0	-
Aspartic protease	Emporase	37	3.0~6.0	-
Metalloprotease	Neutrase	45~55	6.0~8.0	○
Metalloprotease	Thermolysin	55	7.0~9.0	-
Serine protease	Subtilisin carlsberg, Alcalase	55~70	6.5~8.5	○
Serine protease	Esperase, Savinase	60	7.0~12.0	-
Mixture of alkaline, neutral protease, aminopeptidase, carboxypeptidase	Pronase	37	7.0~9.0	-
Mixture of protease, metalloprotease, serine protease, carboxypeptidase	Takadiastase, Fungal protease	37	7.0~8.5	○
Aspartic protease, mixed with carboxypeptidase	Aspergillopeptidase A	40	2.5~5.0	-
Cysteine protease	Papain	55	5.0~7.0	○
Cysteine protease	Bromelain	55	5.0~8.0	-
Cysteine protease	Ficin	55	5.0~8.0	-
Mixture of protease with endo-proteases, exo-peptidases	Flavourzyme	35~60	4.0~6.0	○
Mixture of protease with endo-proteases	Protamex	35~60	5.0~7.0	○
Mixture of protease	Aminopeptidase	30~50	7.0~9.0	○

Table 2. Temperature hydrolysis condition of chicken breast muscle protein by different enzyme at recommended optimal pH condition

Enzyme system	Hydrolysis condition	
	Temperature(°C)	Recommended optimal pH
Alcalase	30, 50, 70	7.0
Neutrase	30, 50, 70	6.0
Flavourzyme	30, 50, 70	6.0
Protamex	30, 50, 70	6.0
Carboxypeptidase A	30, 40, 50	7.0
Protease	30, 40, 50	4.0
Takadiastase	30, 40, 50	7.0
Aminopeptidase	30, 40, 50	8.0
Papain	30, 40, 50	6.0
Trypsin	30, 40, 50	8.0

Inactivation condition : 85°C 10min

Reaction time : 4hr

Enzyme concentration for substrate : 0.5(w/w)%

Table 3. Hydrolysis pH condition of chicken breast muscle protein by different enzyme at optimal temperature condition

Enzyme system	Hydrolysis condition	
	Optimal temperature(°C)	pH
Alcalase	70	6.0, 8.0
Neutrase	50	5.0, 7.0
Flavourzyme	50	5.0, 7.0
Protamex	50	5.0, 7.0
Carboxypeptidase A	30	6.0, 8.0
Protease	40	3.0, 5.0
Takadiastase	40	6.0, 8.0
Aminopeptidase	40	7.0 9.0
Papain	40	5.0 7.0
Trypsin	30	7.0, 9.0

Inactivation condition : 85°C 10min

Reaction time : 4hr

Enzyme concentration for substrate : 0.5(w/w)%

라 . 펩타이드의 정제 최적조건 탐색

1) 액체크로마토그래피 분취

효소반응으로 얻은 가수분해물로부터 gel permeation chromatography (GPC)를 사용하여 분취하였다. 컬럼은 superdex peptide HR 10/30(10×300mm, Pharmacia Biotech Co., Ltd.)을 사용였으며, 용매는 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.0), 유속은 2ml/min이었다.

2) HPLC에 의한 분리

GPC로부터 얻은 펩타이드 분획의 분리를 위하여 표 4의 분석조건으로 reverse phase chromatography(RPC)가 수행되었다. 표준품과 동일한 유지시간의 분획물을 2회 반복하여 수집한 후 농축하여 동결건조하였다.

Table 4. The gradient condition for HPLC analysis of peptides

·HPLC system	Model Waters TM 600pump (Waters, Millipore, USA)
·Injector	Model 7725 (Rheodyne, Cotati, California, USA)
·Column	Jupiter C ₁₈ (4.6×250mm, 5 μ m)(phenomenex)
·Detector	Model Waters TM 996 Photodiode array detector UV at 214nm (Waters, Millipore, USA)
·Mobile Phase	A-0.1% TFA in water : Acetonitrile = 95 : 5 B-0.1% TFA in water : Acetonitrile = 25 : 75
Gradientcondition	0 min - A(%) : B(%) = 95 : 5 60 min - A(%) : B(%) = 70 : 30 70 min - A(%) : B(%) = 95 : 5
·Flow rate	1.0ml/min

3) LC/MS에 의한 정제물질의 확인

HPLC를 통해 최종 정제한 물질을 LC/MS(Agilent 1100 Series LC/MSD Alient, Co, Ltd.)를 이용하여 분자량을 확인하였다. 이동상은 Water/ACN/MeOH=35/30/35(4mM AF, pH 2.6)를 사용하였고, 컬럼은 Symmetry(150×3.9mm, 5 μ m, 1ml/min)를 이용하였다.

이상의 내용을 간략히 도식화하면 다음 Figure. 1과 같다.

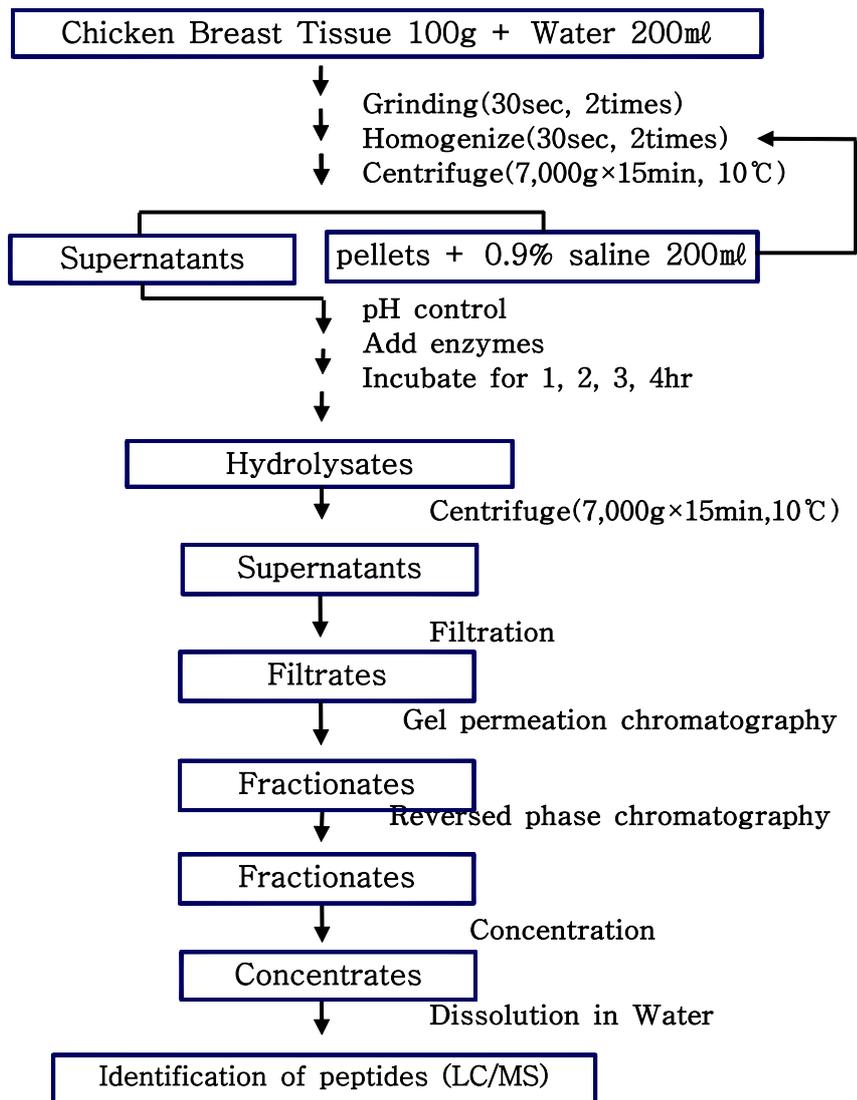


Figure 1. Flow chart of purification and identification of dipeptides from spent hen protein

마 . 펩타이드의 항산화능 평가

분리된 dipeptides의 지방에 대한 항산화효과를 확인하기 위하여 linoleic acid(Fluka chemical, Switzerland)를 기질로 분리한 dipeptides를 0.01%(w/v)의 농도가 되도록 첨가한 후 50°C에서 7일간 저장하면서 과산화물가(peroxide value)와 TBARS(thiobarbituric acid reactive substance)생성 억제에 경시적인 변화를 측정하였다. 또한 분리한 dipeptides 농도에 따른 전자공여능(Electron donating activity), SOD유사활성(SOD like activity), 농도와 pH조건에 따른 아질산염 소거능(Nitrite-scavenging effect)을 측정하였으며, 기존 항산화제와의 효과를 비교하기 위하여 합성 항산화제인 BHT(Buthylated hydroxytoluene), L-ascorbic acid 및 erythorbic acid와 천연 항산화제인 α -tocopherol를 사용하였고, 지질의 자동산화를 촉진시키는 금속이온에 대한 차단효과를 조사하기 위하여 2ppm 농도의 Fe^{3+} ($FeCl_3$), Fe^{2+} ($FeCl_2$), Cu^{2+} ($CuCl_2$), Zn^{2+} ($ZnCl_2$)를 첨가한 후 이에 따른 영향을 조사하였다.

1) 과산화물가(Peroxide value)

Linoleic acid를 기질로 하여 지방 산화의 중간생성물인 과산화물가를 AOCS법132)에 따라 측정하였다. 50ml test tube에 linoleic acid 1g, 에탄올 20ml, 0.2M 인산완충액 2.5ml를 넣은 액에 분리된 3가지 dipeptides와 4가지 비교 항산화제를 0.01%(w/v)의 농도로 첨가한 액을 시험용액으로 하였다. 산화를 촉진하기 위하여 50°C에서 7일간 저장하면서 2일 간격으로 과산화물 생성의 경시적인 변화를 측정하였다. 시험용액에 클로로포름 : 빙초산(2:3) 용액 25ml를 가하여 용해한 후 포화 KI용액 1ml를 가하고 5분간 방치한 다음 증류수 30ml를 가해 혼합하고, 1% 전분용액 1ml를 지시약으로 하여 0.01N $Na_2S_2O_3$ 용액으로 적정하였다. 따로 공시험을 하여 보정하고 다음 식에 따라 과산화물가를 산출하였다.

$$\text{과산화물가(meq/kg)} = \frac{(a-b) \times f \times 10}{\text{검체의 채취량(g)}}$$

a: 0.01N Na₂S₂O₃ 용액의 소비량(ml)

b: 공시험의 0.01N-치오황산나트륨 용액의 소비량(ml)

f: 0.01N Na₂S₂O₃ 용액의 역가

2) Thiobarbitubic reactive substances(TBARS) 생성 억제능

TBARS는 Mitsuda¹³³⁾와 Sidwell의 방법¹³⁴⁾에 따라 측정하였다. 0.03M의 linoleic acid를 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)와 ethanol의 혼합용매(4:1, v/v)로 기질용액을 조제하였다. Test tube에 기질용액 20ml와 0.1M phosphate buffer 19.2ml, 시험용액 0.8ml(0.01% w/v)를 혼합한 뒤 50℃에서 7일간 저장한 후 지방산화의 경시적인 변화를 측정하였다. 검액 2ml에 35% TCA (trichloroacetic acid)용액 1.0ml와 0.75% TBA(Thiobarbitubic acid)시약 2.0ml를 가하여 혼합한 후 90℃에서 40분간 반응시킨 다음 냉각시키고, acetic acid 1.0ml, chloroform 2.0ml를 가한 뒤, 3000×g에서 3분간 원심분리하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 따로 물로 공시험하여 보정하고, 시료를 첨가하지 않은 용액을 대조구로 하여 다음 식에 따라 대조구에 대한 TBARS 생성 억제능력(%)을 산출하였다.

A

$$\text{Inhibition of TBARS(\%)} = \left[1 - \frac{A}{B} \right] \times 100$$

B

A : 시험구의 흡광도

B : 대조구의 흡광도

3) 전자공여능(Electron donating activity)

전자공여능은 Takao135)와 Moon136) 등의 방법으로 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA)를 사용하여 측정하였다. 시험용액은 3가지 dipeptides와 4가지 항산화제를 비교구로 하여 각각 20, 50, 150, 250, 500 μ g/ml로 조제하였다. Test tube에 각각의 시험용액 100 μ l와 DPPH(100 μ M, 44mg/l 에탄올) 900 μ l를 넣고 vortex mixer로 혼합한 다음, 암소에서 10분간 반응시킨 후 517nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정된 dose-response으로부터 50%의 DPPH 자유라디칼 소거능(50% scavenging concentration; SC50)을 구하였다. 따로 시험용액 대신 물로 공시험하여 보정하고, 시료를 첨가하지 않은 용액을 대조구로 하여 다음 계산식에 따라 전자공여능 (EDA)(%)를 산출하였다.

A

$$\text{EDA}(\%) = [1 - \frac{A}{B}] \times 100$$

B

A : 시험구의 흡광도

B : 대조구의 흡광도

4) 아질산염 소거능(Nitrite-scavenging effect)

Gray와 Dugan137)의 방법으로 수행하였다. 시험용액은 3가지 dipeptides와 4가지 항산화제를 비교구로 하여 각각 50, 100, 250, 500 μ g/ml로 조제하였다. Test tube에 각각의 시험용액 2ml와 1mM NaNO₂ 1ml를 넣고 0.1N- HCl과 0.2M 구연산 완충용액(pH 6.0)으로 반응용액을 pH 1,2, 4,2, 6.0으로 조절한 다음 최종부피를 10ml로 하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 다음 시험용액 1ml에 2% acetic acid용액 5ml, Griss시약(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1:1 in 30% acetic acid) 0.4ml를 가한 후 실온에서 15분간 반응시키고 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 따로 시험용액 대신 물을 첨가한 액을 대조구로 하여 다음 계산식에 따라 아질산염 소거능(NSE)(%)을 산출하였다.

A-C

$$\text{NSE}(\%) = \left[1 - \frac{\text{A}-\text{C}}{\text{B}} \right] \times 100$$

B

A : 시험구의 흡광도

B : 대조구의 흡광도

C : 시험구 자체의 흡광도

5) SOD 유사활성(SOD like activity)

SOD 유사활성물질 측정은 Marklund와 Marklund(1938)의 방법에 따라 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도별 각 시료 0.2ml에 tris-HCl buffer(50mM tris+ 10mM EDTA, pH 8.5) 3.0ml와 7.2 $\times 10^{-3}\text{M}$ pyrogallol 0.2ml를 가하고 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 방치한 후 1N-HCl 1.0ml로 반응을 정지시킨 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 따로 시험용액 대신 물을 첨가한 액을 대조구로 하여 다음 계산식에 따라 SOD 유사활성(%)을 산출하였다.

A

$$\text{SOD 유사활성}(\%) = \left[1 - \frac{\text{A}}{\text{B}} \right] \times 100$$

B

A : 시험구의 흡광도

B : 대조구의 흡광도

6) 통계처리

모든 자료의 통계처리는 SAS통계 프로그램(1993)을 이용한 일원분산분석(one-way ANOVA)으로 하였으며, 통계적으로 유의성을 나타낸 값에 대한 검증은 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 분석하였다.

바 . 펩타이드의 안전성 평가

노폐계 근육으로부터 분리·정제된 carnosine, anserine 및 homocarnosine에 대한 안전성 평가를 위하여 동물실험을 통한 급성독성시험을 실시하였다. 본 실험은 급성독성실험에 해당되는 단회투여독성시험, 1차피부자극시험, 안점막자극시험 등으로 구성되었으며, “기능성화장품 등의 심사에 관한 규정”(식품의약품안전청고시 제2001-60호)140)과 “의약품 등의 독성시험 기준”(식품의약품안전청고시 제1999-61호)141)을 준용하여 실시하였다.

1) 시험물질과 대조물질

시험물질은 노폐계 근육에서 분리·정제하여 동결건조된 carnosine, anserine 및 homocarnosine의 분말을 사용하였다.

2) 단회투여독성시험(Single Dose General Toxicity Dose)

① 시험계

② 종 및 계통

Mouse(Slc : ICR)

③ 공급원

(주)중앙실험동물(서울시 서초구 우면동 13-8)

④ 시험계의 선택 이유

본 시험에 사용된 마우스 계통은 단회 및 반복투여독성시험 등의 안전성시험에 가장 널리 사용되고 있으며 비교할 많은 기초자료가 축적되어 있어 선택하였다.

⑤ 사용동물수 및 주령

수컷 20마리, 5주령

⑥ 순화 및 검역

동물 입수 후 약 1주일간 동물실에서 순화시켰다. 순화기간 중 일반상태를 관찰하여 체중감소가 없는 건강한 동물만을 골라 실험동물로 사용하였다.

⑦ 사육환경

a. 환경조건

본 시험은 온도 $23\pm 2(^{\circ}\text{C})$, 상대습도 $50\pm 10(\%)$, 환기횟수 10-12(회/시간), 조명시간(08:00-17:30), 조도 150-300(lux)으로 설정된 동물실험실에서 실시되었다.

b. 사육상자, 사육밀도

순화기간 및 시험기간 중 마우스는 Polycarbonate 사육상자 (26W×42L×18H(cm), 명진기기)에 5마리씩 사육하였다.

c. 사료 및 음수의 급여법

사료는 마우스용 고형사료(퓨리나사료(주))를 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 음수는 상수도수를 자유로이 섭취시켰다.

⑧ 투여량 설정 및 시험군의 구성

a. 투여량 설정

시험물질 2,000mg/kg body wt.을 경구로 투여하여 시험물질과 관련된 사망이 나타나지 않는다면 용량단계를 설정할 필요가 없으므로 154) 랫드에 경구투여할 용량을 2,000mg/kg body wt.으로 설정하였다.

b. 시험군의 구성

시험군의 구성은 다음 표 5와 같다. 이 때 동물의 개체식별은 유성 매직으로 하였다.

Table 5. 단회투여독성시험의 시험군 구성

시험군	성별	동물수	동물번호
Control 군	Male	5	1 ~ 5
Carnosine 투여군	Male	5	6 ~ 10
Anserine 투여군	Male	5	11 ~ 15
Homocarnosine 투여군	Male	5	16 ~ 20

⑨ 관찰 및 검사항목

⑩ 일반상태 및 사망의 관찰

투여 당일은 8시간까지 매시간 일반상태를 관찰하고, 투여 다음날부터 14일까지는 매일 1회씩 일반상태의 변화, 중독증상, 운동성, 외관, 자율신경 및 사망동물의 유무를 주의 깊게 관찰하였다.

⑪ 체중변화

모든 동물에 대하여 투여직전과 투여 7일째 및 14일째에 체중을 측정하여 기록하였다.

⑫ 자료의 통계학적 해석방법

반수치사량 (LD50)의 산출을 위하여 Computer program pharmacologic calculation system(ver. 4.1)을 이용하여 Litchfield-Wilcoxon법에 의하여 계산하였다¹⁴²⁾. 체중에 대한 유의성 검정으로 one-way analysis of variance (ANOVA)에서 유의차가 인정되는 F값이 관찰된 때는 대조군과 시험물질 투여군을 비교하기 위하여 Dunnett's t-test를 하였다.

3) 1차 피부자극시험(Primary Skin Irritation)

① 시험계

a. 종 및 계통

New Zealand White Rabbit

② 공급원

(주)중앙실험동물(서울시 서초구 우면동 13-8)

③ 시험계의 선택 이유

본 계통은 국소피부자극시험에 일반적으로 많이 사용되는 종으로서, 본 계통에 관하여서는 비교적 풍부한 기초실험 성적이 축적되어 있어서 시험결과의 해석, 비교 및 평가에 유용하기에 선택하였다.

④ 사용동물수 및 주령

수컷 12마리, 3~4개월령

⑤ 순화 및 검역

동물 입수 후 약 1주일간 동물실에서 순화시켰다. 순화기간 중 일반상태를 관찰하여 건강한 동물만을 선발한 후에 경배부의 털을 깎아 피부의 이상 유무를 확인하고 이상이 없는 동물만을 시험에 사용하였다.

⑥ 사육환경

a. 환경조건

본 시험은 온도 $23\pm 2(^{\circ}\text{C})$, 상대습도 $50\pm 10(\%)$, 환기횟수 10-12(회/시간), 조명시간(08:00-17:30), 조도 150-300(lux)으로 설정된 동물실험실에서 실시되었다.

⑦ 사육상자, 사육밀도

순화기간 및 시험기간 중 토끼는 3단 사육상자대에 배열된 스테인레스 사육상자 (42W×50L×31H(cm), 명진기기)에 개체별로 사육하였다.

⑧ 사료 및 음수의 급여법

사료는 토끼용 고형사료 (퓨리나사료(주))를 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 음수는 상수도수를 자유로이 섭취시켰다.

⑨ 투여량 설정 및 시험군의 구성

a. 투여량 설정

“의약품 등의 독성시험기준”¹⁴¹⁾에 따라 반고체 0.5g을 경배부의 털을 깎은 피부부위에 도포하였다.

b. 군 분리 및 동물식별

토끼는 순화기간 중에 건강하다고 판단된 동물만을 골라 체중을 측정 한 후 이개부에 유성매직으로 번호를 표시하여 개체를 구별하되, 개체번호 1-3번은 대조군으로, 4-6번은 carnosine처리군으로, 7-9번은 anserine처리군으로, 10-12번은 homocarnosine처리군으로 하였다.

⑩ 시험물질의 투여

a. 투여액의 조제

Carnosine, anserine 및 homocarnosine의 분말을 증류수에 용해하여 사용하였다.

⑪ 투여방법

시험물질의 적용 24시간 전에 경배부의 털을 깎고 피부를 좌우로 나누어 좌를 투여구획, 우를 대조구획 또는 좌를 대조구획, 우를 투여구획으로 하고, 투여구획과 대조구획의 비찰과피부 또는 찰과피부가 서로 대각선으로 분포되도록 구분하였다. 2.5×2.5cm의 비찰과피부 2개소와 찰과피부 2개소로 나누어 모두 4개소의 피부에 도포하였다. 찰과피부는 microtome knife의 날이 없는 반대면을 이용하여 표피는 손상되나 진피는 손상되지 않고 피가 나지 않을 정도로 찰과상을 만들었다. 투여방법은 시험물질을 동물 1마리당 원액 1g(0.5g/site) 투여부위에 1회 도포하였으며, 무처치 대조구획에는 멸균생리식염주사액을 도포하였다. 도포 후 거즈로 덮은 후에 비자극성 테이프로 잘 고정하여 24시간 적용하였다.

⑫ 관찰 및 검사항목

a. 임상증상 관찰

시험물질 투여 후 7일까지 매일 임상증상을 관찰하였다.

b. 체중변화

모든 동물에 대하여 투여직전과 투여 72시간째에 체중을 측정하여 기록하였다.

c. 피부반응의 평가 및 자극성의 판정

피부반응의 평가는 “의약품 등의 독성시험기준”¹⁴¹⁾을 이용하여 표 6의 내용으로 판정하였다. 피부에 대한 자극성 정도의 판정은 일반적으로 많이 이용되는 표 7의 Draize의 Primary Irritation Index(P.I.I.) 산출방법¹⁴²⁻¹⁴⁴⁾을 따랐다.

Table 6. 피부반응 평가표

홍반 형성	등급
홍반이 전혀 없음	0
육안으로 겨우 식별할 정도의 아주 가벼운 홍반	1
분명한 홍반	2
약간 심한 홍반	3
심한 홍반과 가벼운 정도의 가피형성	4
부종 형성	등급
부종이 전혀 없음	0
육안으로 겨우 식별할 정도의 아주 가벼운 부종	1
변연부가 분명히 구별되는 가벼운 부종	2
약 1mm 정도 부어오르는 보통의 부종	3
1mm 이상 부어오른 심한 부종	4

위의 결과로부터 P.I.I. 를 다음과 같이 평가하였다.

$$A + B + C + D + E + F + G + H$$

$$P.I.I = \frac{\quad}{\quad}$$

4

홍반과 가피

A : 24시간째 정상피부의 점수 B : 72시간째 정상피부의 점수
 C : 24시간째 손상피부의 점수 D : 72시간째 손상피부의 점수

부종

E : 24시간째 정상피부의 점수 F : 72시간째 정상피부의 점수
 G : 24시간째 손상피부의 점수 H : 72시간째 손상피부의 점수

Table 7. 피부자극성 판정표

Primary Irritation Index	구 분
0.0-0.5	비자극물질
0.6-2.0	약한자극물질
2.1-5.0	중등도자극물질
5.1이상	강한자극물질

4) 안점막자극시험(Eye irritation test)

① 시험계

- 종 및 계통: New Zealand White Rabbit

② 공급원: (주)중앙실험동물(서울시 서초구 우면동 13-8)

③ 시험계의 선택 이유

본 계통은 안점막자극시험에 일반적으로 많이 사용되는 종으로서, 본 계통에 관해서는 비교적 풍부한 기초실험 성적이 축적되어 있어서 시험결과 의 해석, 비교 및 평가에 유용하기에 선택하였다.

④ 사용동물 수 및 주령: 수컷 12마리, 3-4개월령

⑤ 순화 및 검역

동물 입수 후 약 1 주일간 동물실에서 순화시켰다. 순화기간 중 일반상태를 관찰하고 시험 24시간 전에는 안구검사를 실시하여 양쪽 안구에 안구손상 등 각막의 손상이 없는 건강한 동물만을 선발하여 사용하였다.

⑥ 안구검사법

육안적인 검사로 불충분한 상태라고 판단될 경우에는 확대경 또는 slit lamp등으로 검사하거나 0.5% sodium fluorescence용액을 검안하여 건강한 좌우 양안을 갖는 토끼를 시험에 사용하였다.

⑦ 사육환경

a. 환경조건

본 시험은 온도 23±2(°C), 상대습도 50±10(%), 환기횟수 10-12(회/시간), 조명시간(08:00-17:30), 조도 150-300(lux)으로 설정된 동물실험실에서 실

시되었다.

b. 사육상자, 사육밀도

순화기간 및 시험기간 중 토끼는 3단 사육상자대에 배열된 스테인레스 사육상자 (42W×50L×31H (cm), 명진기기)에 개체별로 사육하였다.

⑧ 사료 및 음수의 급여법

사료는 토끼용 고품사료 (퓨리나사료(주))를 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 음수는 상수도수를 자유로이 섭취시켰다.

⑨ 투여량 설정 및 시험군의 구성

a. 투여량 설정

“의약품 등의 독성시험기준”155)에 따라 한쪽 안구에 0.1g씩을 각 개체마다 점안하였다. 대조군에는 멸균생리식염수를 0.1ml씩 한쪽 눈에 점안하였다.

b. 군 분리 및 동물식별

토끼는 순화기간 중에 건강하다고 판단된 동물만을 골라 체중을 측정 한 후 귀에 유성매직으로 번호를 표시하여 개체를 구별하되, 개체번호 1-3번은 대조군으로, 4-6번은 carnosine처리군으로, 7-9번은 anserine 처리군으로, 10-12번은 homocarnosine처리군으로 하였다.

⑩ 시험물질의 투여

a. 투여액의 조제

Carnosine, anserine, homocarnosine의 분말을 원료 그대로 사용하였다.

b. 투여방법

시험물질을 토끼 한쪽 눈(우안)에 주사기를 이용하여 개체당 0.1g씩 점안하였다. 이 때 각 동물의 하안검을 안구로부터 멀리 당겨 컵모양을 형성시키고 이 결막낭에 시험물질을 0.1g 점안하고 약 1초간 눈을 감은 상태로 유지시켜서 시험물질의 손실을 방지하였다.

⑪ 관찰 및 검사항목

a. 임상증상 관찰

시험물질 투여 후 매일 외관, 사료섭취, 음수 섭취상태 등을 관찰하였다.

b. 체중변화

모든 동물에 대하여 시험물질 점안개시 직전 및 점안 후 7일째 체중을 측정하였다.

⑫ 적용부위의 관찰

시험물질을 투여하지 않은 다른 쪽 눈을 대조로 하여 시험물질 투여 후 1, 2, 3, 4 및 7일째에 각막의 혼탁 및 혼탁된 각막의 범위, 홍채의 반응, 결막의 발적, 부종 및 배출물의 유무 등의 변화를 관찰하거나 확대경 및 손전등을 이용하여 관찰하였다.

⑬ 안구병변의 판정방법

안구병변의 판정은 “의약품 등의 독성시험기준”155)의 제 9조 국소 독성시험의 안구병변 등급표 및 “기능성화장품 등의 심사에 관한 규정”154)에 따라 각 항목의 점수를 부여하였다. 안구병변의 판정은 표 8과 같이 각막, 홍채 및 결막을 관찰하여 평점한 후 안점막자극평가지수를 산출하여 Table 9로 판정하였다.

Table 8. 안구병변 관찰표

1. 각막 $A \times B \times 5$ 최대치=80	
A. 혼탁 : 안구의 농후한 정도 (가장 농후한 지점을 관찰함)	등급
화농이나 혼탁이 없음	0
혼탁이 있으나 홍채의 말단이 명확히 관찰됨	1
반투명한 부분이 쉽게 관찰되고 홍채의 말단이 약간 불명확함	2
진주 색깔을 나타내며 홍채의 말단이 관찰안됨	3
각막이 불투명하며 혼탁 때문에 홍채가 관찰안됨	4
B. 혼탁된 각막의 범위	등급
1/4 이하	1
1/4 이상 1/2 미만	2
1/4 이상 3/4 미만	3
1/4 이상 1 까지	4
2. 홍채 $A \times 5$ 최대치=10	
A. 반응치	등급
정상	0
각막 주위에 중등도의 충혈, 홍채는 빛에 대해 반응함	1
빛에 대해 반응 없음, 출혈	2
3. 결막 $(A + B + C) \times 2$ 최대치=20	
A. 결막 충혈	등급
충혈 없음	0
선홍색 색조가 관찰되나 혈관을 쉽게 관찰할 수 있음	1
넓은 선홍색 색조가 관찰되며 혈관을 관찰하기 어려움	2
넓은 선홍색 색조를 띠	3
B. 결막 부종	등급
부풀지 않음	0
정상보다 약간 종창	1
안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창	2
눈이 반쯤 감길 정도의 안검의 종창	3
눈이 반 이상 감길 정도의 안검의 종창	4
C. 배출물	등급
배출물 없음	0
약간의 배출물	1
속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물	2
눈주위의 상당 부위의 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물	3

Table 9. 안점막 자극표

평가구분	I.A.O.I	M.I.O.I
무자극물	0-5	0 (48시간 후)
경도자극물	5-15	≤5 (48시간 후)
자극물	15-30	≤5 (4일 후)
중등도자극물	30-60	≤20 (7일 후)
중강도자극물	60-80	≤40 (7일 후)
강도자극물	80-110	

사 . 펩타이드(carnosine)를 주성분으로 하는 기능성(주름완화)화장품의 임상평가

노폐계의 근육으로부터 분리·정제한 dipeptides 중 항산화능이 가장 좋은 것으로 평가된 carnosine을 첨가하여 제조한 화장품을 잔주름이 많이 생기는 부위인 눈가에 바르고 총 4주에 걸쳐 주름개선 효과를 관찰하여 과학적으로 그 효능을 평가하였다.

1) 임상 피험자 선정

임상시험을 위한 피험자를 아래와 같은 선정기준 및 제외기준에 의하여 총 20명 발하였다.

가) 선정 기준

나) 20-50세 사이의 여성

다) 전신상태는 건강

라) 동의서 작성

2) 제외 기준

가) 현재 온몸 질환이 있는 경우 (당뇨, 고혈압, 결핵, 간염, 암, AIDS 등)

- 나) 현재 임신중인 경우
- 다) 현재 얼굴에 피부질환이 있는 경우 (지루성 피부염, 심한 여드름, 건선, 화상등)
- 라) 기존의 화장품에 대한 접촉성 피부염을 경험한 경우
- 마) 최근 6개월 이내에 얼굴부위에 박피술이나 주름살 제거를 위한 기타의 시술을 받은 적이 있는 경우

선정된 임상 피험자 20명의 연령분포 및 직업분포는 표 10, 표 11에 나타나 있다. 이들 임상 피험자 20명은 전원 임상시험을 완료하였다.

Table 10. 임상 피험자의 연령분포

연령	20-24	25 - 29	30 - 34	35 - 39	40 - 44	45 - 50	
수 (명)	2	5	6	5	2	0	총 20 명

Table 11. 임상 피험자의 직업분포

직업	연구직	사무직	주부	학생	
수 (명)	12	5	2	1	총 20 명

3) 평가방법

가) 시료의 조제

노폐계의 근육으로부터 분리·정제한 dipeptides(carnosine) 0.1% 농도를 포함하는 시료 및 dipeptides가 제외된 기제(Placebo)를 사용하였으며, 화장품의 제조는 한국화장품(주)의 협조를 얻어 수행하였다.

나) 시료의 도포

먼저 깨끗하게 세안을 하고 화장수와 로션을 바른 후 시료를 손바닥에 3ml 정도를 뿔브로 토출하여 한쪽 눈가의 주름부위에 바르고 Placebo도 시료와 같은 방법으로 반대 쪽 눈가의 주름부위에 1일 2회(아침, 저녁) 도포하였다. 이 때, 임상 피험자들이 시료 및 Placebo 를 구분하지 못하도록 하였다.

4) 피부 주름 측정

가) 화상분석법 (Image Analysis)

시료도포전(임상시험시작일)과 시료 도포 후 4주째에 Skin Visiometer SV 500 (C+K, Germany) 과 Image Analysis System (software : Image Pro Plus ver. 4.1, France)을 이용하여 주름을 Silicone Replica로 복제하고 여기에 일정한 각도로 빛을 비추어 나온 그림자의 깊이를 구하여 간접적으로 주름의 깊이를 측정하였다.

Image analysis software를 이용하여 피부주름이 이루는 전체 peak 수, peak 사이의 평균깊이, peak 사이의 평균넓이 등을 계산할 수 있는데, 본 연구에서는 피부주름이 이루는 peak 사이의 평균 깊이를 피부 주름 측정의 지표값으로 정하고 이를 측정하였다.

5) 통계분석 및 효능판정

시료도포전에 측정된 주름 깊이와 시료 도포 후 4주째 측정된 주름 깊이간 차이를 최초측정일의 주름 깊이에 대한 상대적인 비율로 하여 다음 공식을 이용하여 주름감소율로 나타내었다.

$$\text{주름감소율(\%)} = \frac{\text{시료도포전에 측정된 주름 깊이} - \text{시료도포 후 4주째 측정된 주름 깊이}}{\text{시료도포전에 측정된 주름 깊이}} \times 100$$

시료 도포 후 4주째에 시료와 Placebo의 도포부위에서 얻어진 주름 감소율을 Paired t-test를 통하여 비교하고 신뢰도 95% 수준에서 통계적 유의차(p < 0.05) 검정하여 dipeptides(carnosine) 성분의 주름개선 효능을 판정하였다.

6) 설문조사

임상시험 종료시에 피험자 전원을 대상으로 설문조사(양식 : 별첨 1)를 실시하여 주관적 느낌을 조사하였다.

3 . 연구수행 결과

가 . 펩타이드 분리정제 조건

Carnosine 생산함량이 높은 효소를 선정하기 위해 표 4에 제시된 조건으로 예비실험을 실시한 결과는 표 12와 같다. 온도조건에 따른 각 효소의 carnosine 생산량은 carboxypeptidase A, trypsin는 30℃, takadiastase, protease, aminopeptidase, papain은 40℃에서, neutrase, flavourzyme, protamex는 50℃에서, alcalase는 70℃에서 최대 생산량을 나타냈으며, carnosine 생산별로는 papain, neutrase, protamex, protease, flavourzyme, trypsin, takadiastase, carboxypeptidase A, alcalase, aminopeptidase 순이었다. 한편, 표 12로부터 얻은 최적 온도조건에서 pH 조건을 달리하여 예비실험을 실시한 결과는 표 13과 같다. pH 조건에 따른 각 효소의 carnosine 생산량은 protease는 pH 5.0에서, neutrase, flavourzyme, protamex, takadiastase, papain은 pH 6.0에서, trypsin, carboxypeptidase A는 pH 7.0에서, alcalase, aminopeptidase는 pH 8.0에서 최대 생산량을 나타냈다. Protease, takadiastase, alcalase, trypsin의 경우 제조사의 권장 pH인 4.0, 7.0, 7.0, 8.0 보다 5.0, 6.0, 8.0, 7.0일 때 생산량이 높게 나타났으며, carnosine 생산별로는 표 12의 결과와 동일하였다. 단백질로부터 펩타이드를 분리하는데 적용된 효소의 종류는 원료와 사용목적에 따라 매우 다양하다. 그 중 기능성 펩타이드나 가수분해물 추출시 적용된 사례가 많고 우수성이 높았던 효소는 alcalase(145-148)였으며, 가공적성을 개선할 목적으로 사용된 예는 papain, flavourzyme이 대표적이었다.

Table 12. Contents of carnosine concentration produced from chicken muscle protein by different enzyme under different temperature condition at recommended optimal pH condition

Enzyme system	Contents of Carnosine (mg/100g)							
	pH	Temperature (°C)						
		20	30	40	50	60	70	80
Alcalase	7.0	-	-	-	-	108.0 ^c	177.6 ^a	118.4 ^b
Neutrase	6.0	-	-	230.1 ^c	329.1 ^a	250.8 ^b	-	-
Flavourzyme	6.0	-	-	148.5 ^c	268.2 ^a	173.3 ^b	-	-
Protamex	6.0	-	-	128.0 ^c	323.7 ^a	251.4 ^b	-	-
Carboxypeptidase A	7.0	141.1 ^c	213.8 ^a	159.6 ^b	-	-	-	-
Papain	6.0	-	210.5 ^c	331.1 ^a	290.4 ^b	-	-	-
Aminopeptidase	8.0	-	5.2 ^c	18.9 ^a	8.8 ^b	-	-	-
Protease	4.0	-	175.2 ^c	279.5 ^a	201.5 ^b	-	-	-
Takadiastase	7.0	-	151.5 ^c	216.8 ^a	170.9 ^b	-	-	-
Trypsin	8.0	122.2 ^c	252.8 ^a	195.2 ^b	-	-	-	-

a,b,c Means(n=3) in the same row with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 13. Contents of carnosine concentration produced from chicken muscle protein by different enzyme under different pH condition at recommended optimal temperature condition

Enzyme system	Contents of Carnosine (mg/100g)							
	Temp. (°C)	pH						
		3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
Alcalase	70	-	-	-	125.8c	177.6*b	185.5a	-
Neutrase	50	-	-	220.1c	329.1*a	280.8b	-	-
Flavourzyme	50	-	-	198.8c	268.2*a	250.5b	-	-
Protamex	50	-	-	230.2c	323.7*a	295.4b	-	-
Carboxypeptidase A	30	-	-	-	208.9b	213.8*a	207.5c	-
Papain	40	-	-	195.4b	331.1*a	188.4c	-	-
Protease	40	185.2c	279.5b*	285.5a	-	-	-	-
takadiastase	40	-	-	-	235.9a	216.8*b	199.1c	-
Aminopeptidase	40	-	-	-	-	10.1c	18.9*a	11.2b
Trypsin	30	-	-	-	-	262.9a	252.8*b	200.1c

* Data was obtained from table 12

a,b,c Means(n=3) in the same row with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

나 . 펩타이드 생산함량

각 효소별 최적 pH와 온도 조건에서 반응시간에 따라 노폐계의 수용성 추출물과 염용성 추출물에 대해 carnosine, anserine 및 homocarnosine의 생산량을 검토한 결과는 표 14, 15와 같다. 가수분해 1시간 경과시 최대 생산량을 나타낸 것은 alcalase, aminopeptidase, papain, protamex, protease였으며, 2시간째에는 carboxypeptidase A, neutrase, trypsin, takadiastase, 3시간째에는 flavourzyme, 4시간째에는 모든 효소의 생산량이 감소하는 경향을 나타냈다. 염용성 추출물의 경우 가수분해 1시간 경과시 최대 생산량을 나타낸 것은 aminopeptidase, neutrase, papain, protamex, takadiastase였으며, 2시간째에는 flavourzyme, 3시간째에는 carboxypeptidase A, alcalase, protease, trypsin, 4시간째에는 모든 효소의 생산량이 감소하는 경향을 나타냈다.

수용성 추출물에서 carnosine 생산량이 높았던 효소는 alcalase, papain, flavourzyme, , protamex, neutrase, protease, trypsin, carboxypeptidase A, takadiasetase, aminopeptidase 순이었으며, 염용성 추출물에서는 neutrase, papain, alcalase, flavourzyme, protease, trypsin, carboxypeptidase A, protamex, , aminopeptidase takadiasetase 순이었다.

펩타이드별 생산함량은 수용성 추출물의 경우 carnosine, anserine, homocarnosine 각각 11.2~84.8, 18.0~365.2, 10.1~29.9mg/100g의 분포를 나타냈으며, 염용성 추출물의 경우 15.8~222.0, 24.1~287.5, 13.5~29.7mg/100g의 분포를 나타냈다. Dipeptides의 전반적인 함량은 염용성 추출물이 높았다.

분리한 물질을 LC/MS로 확인한 결과는 그림 2, 3, 4에 나타내었다. Total ion chromatogram(TIC)과 extracted ion chromatogram(EIC) 및 분자량이 확인되었다.

Table 14. Concentrations of anserine, carnosine and homocarnosine extracted from water soluble protein of chicken breast muscle by different enzyme under different reaction time condition at optimal temperature and pH condition

Enzyme system (Optimal temp(°C)/pH)	Reaction time(hr)	Concentrations(mg/100g)			Ratio of Carnosine/ Anserine
		Anserine	Carnosine	Homocarnosine	
Carboxypeptidase A (30/7.0)	1	75.8	20.9	16.5	0.28
	2	90.5	32.1	21.4	0.35
	3	69.3	18.2	23.3	0.26
	4	59.2	23.3	22.2	0.39
Trypsin (30/7.0)	1	74.5	49.9	13.6	0.67
	2	94.1	57.8	20.8	0.61
	3	75.2	57.5	16.3	0.76
	4	70.1	54.5	12.3	0.78
Takadiastase (30/6.0)	1	85.2	13.7	16.3	0.16
	2	91.6	25.4	20.6	0.28
	3	81.3	17.9	20.4	0.22
	4	65.6	18.6	27.0	0.28
Protease (40/4.0)	1	169.9	61.6	29.5	0.36
	2	160.0	39.1	24.4	0.24
	3	152.8	27.1	22.3	0.18
	4	84.5	25.6	20.2	0.30
Aminopeptidase (40/8.0)	1	43.6	19.5	18.0	0.45
	2	18.7	17.6	23.3	0.94
	3	18.2	15.0	25.9	0.82
	4	18.0	12.0	10.1	0.67
Papain (40/6.0)	1	273.8	81.2	18.0	0.30
	2	213.5	75.8	19.1	0.36
	3	187.1	71.5	18.8	0.38
	4	143.9	65.4	13.9	0.45
Neutrase (50/6.0)	1	104.9	61.5	15.3	0.59
	2	365.2	62.4	24.2	0.71
	3	234.8	55.1	22.6	0.23
	4	250.1	48.8	24.9	0.20
Flavourzyme (50/6.0)	1	72.9	50.1	25.4	0.69
	2	98.3	68.3	24.3	0.69
	3	174.9	78.9	29.6	0.45
	4	57.7	70.7	29.0	0.82
Protamex (50/6.0)	1	192.9	76.0	29.9	0.39
	2	82.7	11.2	18.1	0.14
	3	68.8	18.5	22.6	0.27
	4	52.5	26.2	24.6	0.50
Alcalase (70/8.0)	1	198.8	84.8	26.3	0.43
	2	177.2	73.6	26.7	0.42
	3	183.0	79.9	19.8	0.44
	4	81.6	74.1	18.6	0.91

Inactivation condition : 85°C 10min

Enzyme concentration for substrate : 0.5(w/w)%

Table 15. Concentrations of anserine, carnosine and homocarnosine extracted from salt soluble protein of chicken breast muscle by different enzyme under different reaction time condition at optimal temperature and pH condition

Enzyme system (Optimal temp(°C)/pH)	Reaction time(hr)	Concentrations(mg/100g)			Ratio of Carnosine/Anserine
		Anserine	Carnosine	Homocarnosine	
Carboxypeptidase A (30/7.0)	1	93.7	24.4	22.4	0.26
	2	99.4	20.1	22.3	0.20
	3	107.0	25.9	26.1	0.24
	4	99.8	24.8	13.5	0.25
Trypsin (30/7.0)	1	94.5	74.7	23.9	0.79
	2	108.6	65.4	21.9	0.60
	3	168.8	87.7	24.0	0.52
	4	107.5	76.8	23.7	0.71
Takadiastase (30/6.0)	1	166.2	22.2	27.2	0.13
	2	110.7	18.6	25.6	0.17
	3	144.8	16.1	20.2	0.11
	4	140.2	15.8	19.2	0.11
Protease (40/4.0)	1	133.1	69.5	26.0	0.52
	2	160.8	93.0	19.8	0.58
	3	185.3	118.8	27.0	0.64
	4	84.6	35.1	26.9	0.41
Aminopeptidase (40/8.0)	1	100.1	22.4	24.8	0.22
	2	87.5	22.1	20.5	0.25
	3	25.0	17.5	21.6	0.70
	4	24.1	18.0	17.4	0.75
Papain (40/6.0)	1	281.8	178.4	26.9	0.63
	2	244.6	177.4	26.5	0.73
	3	238.6	161.4	21.9	0.68
	4	127.4	97.0	25.6	0.76
Neutrase (50/6.0)	1	244.8	222.0	27.8	0.91
	2	241.9	161.6	22.5	0.67
	3	197.5	125.9	22.2	0.64
	4	191.0	88.8	27.4	0.46
Flavourzyme (50/6.0)	1	141.4	109.2	27.3	0.77
	2	170.3	132.6	28.6	0.78
	3	157.8	87.5	28.0	0.55
	4	80.4	75.0	23.1	0.93
Protamex (50/6.0)	1	112.2	23.2	25.8	0.21
	2	55.5	20.8	20.1	0.37
	3	60.0	18.5	24.8	0.31
	4	74.4	18.1	22.7	0.24
Alcalase (70/8.0)	1	164.7	129.0	26.2	0.78
	2	199.7	69.5	26.0	0.35
	3	287.5	132.7	29.7	0.46
	4	175.5	128.9	27.0	0.73

Inactivation condition : 85°C 10min

Enzyme concentration for substrate : 0.5(w/w)%

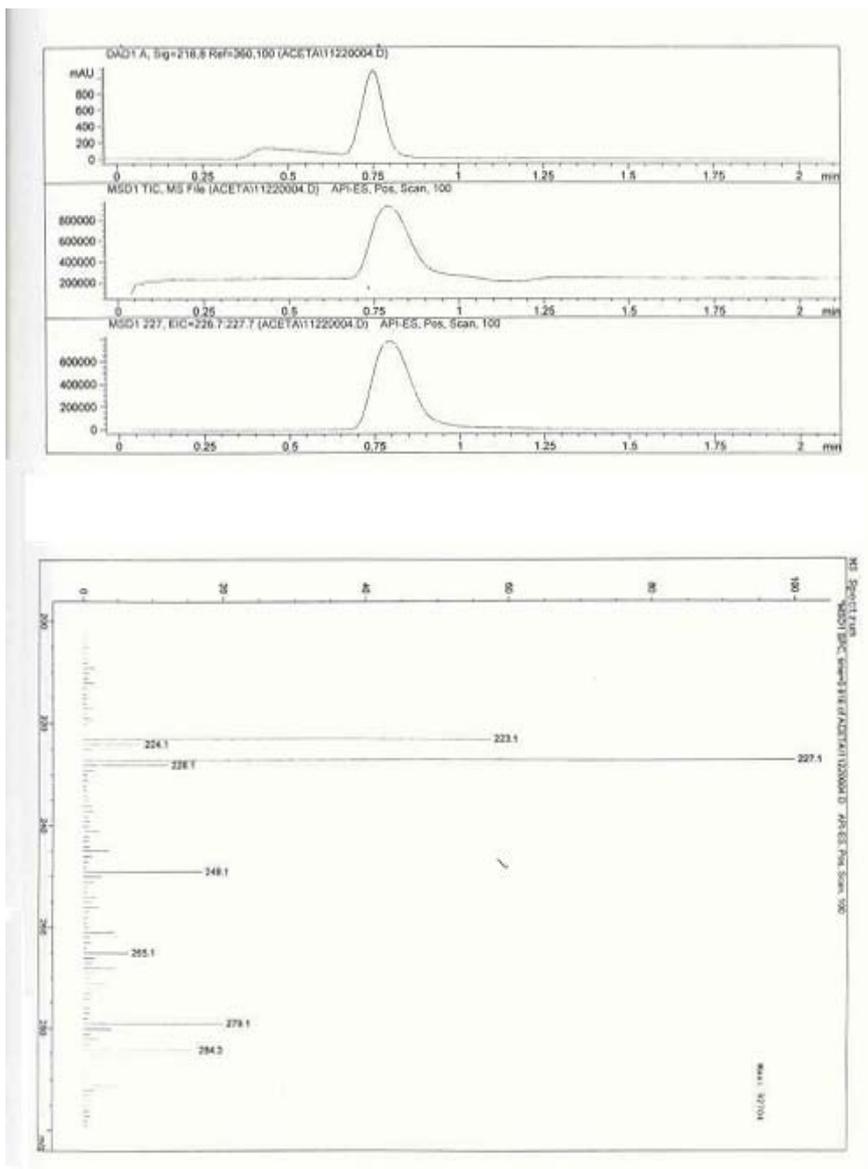


Figure 2. LC/MS chromatogram of carnosine purified from spent hen

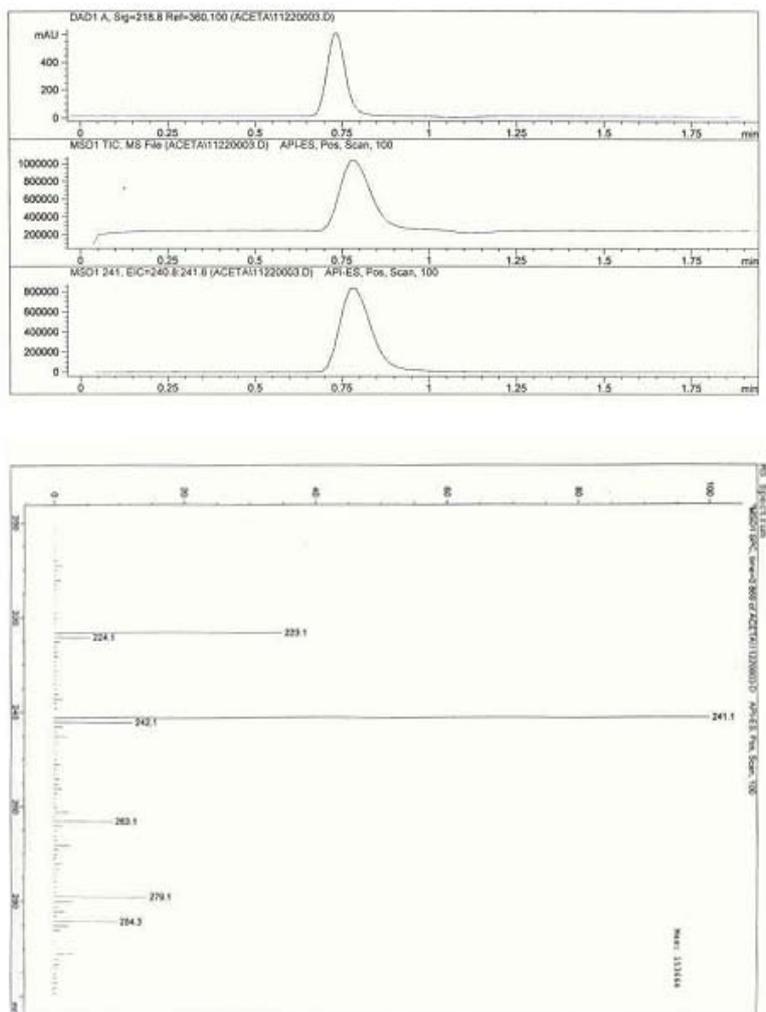


Figure 3. LC/MS chromatogram of anserine purified from spent hen

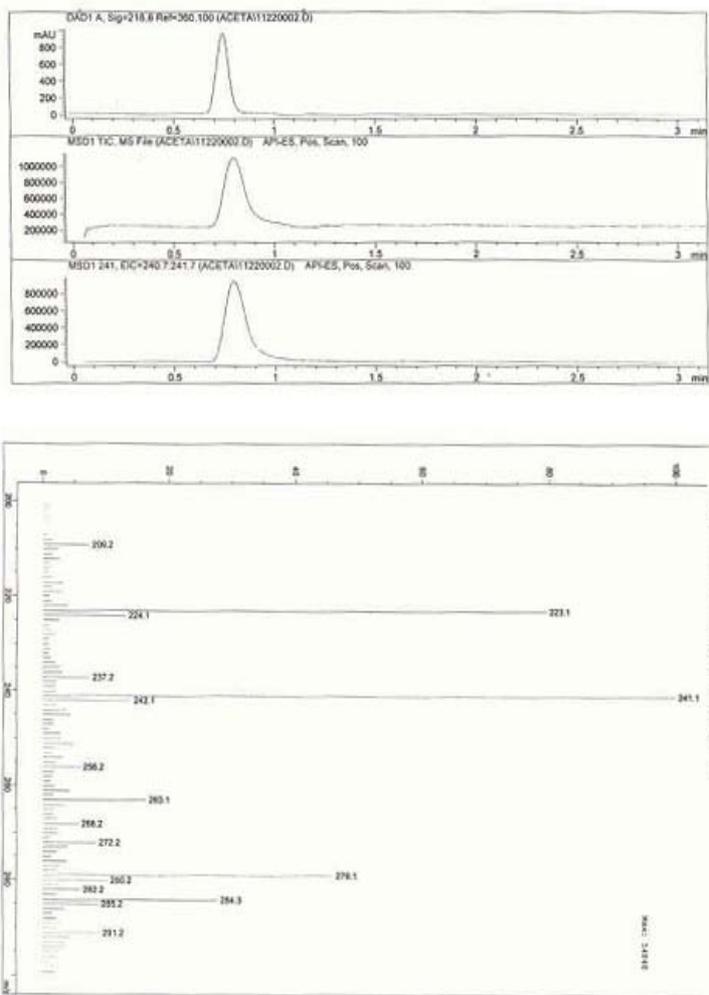


Figure 4. LC/MS chromatogram of homocarnosine purified from spent hen

다 . 펩타이드의 항산화능 평가

1) 과산화물가(Peroxide value)

3가지 펩타이드와 4가지 비교 항산화제를 첨가한 linoleic acid의 과산화물가의 변화를 그림 7에 나타내었다. 저장 7일 동안 linoleic acid에 대한 대조구의 과산화물가는 저장 초기값의 34배로 증가한 반면, BHT, α -토코페롤, 아스코르빈산 및 에리스로빈산의 4가지 비교구는 2~7.5배 정도의 상승으로 비교적 안정한 항산화력을 나타냈다. 분리한 3가지 펩타이드의 경우도 저장 3일째까지 초기값의 3.3-3.8배의 증가로 비교적 낮은 증가를 나타냈으나 저장 7일째에는 크게 상승하여 초기값의 27~28배로 증가하였다. 이는 대조구보다는 낮은 값에 해당하지만, 비교구에 비해서는 시간경과에 따른 항산화 지속성이 낮은 것으로 나타났다.

지질의 자동산화를 촉진시키는 금속이온에 대한 dipeptides의 차단효과는 표 16에 나타내었다. Fe(III) 첨가구는 대조구보다 모두 낮은 값을 나타내 차단효과가 있는 것으로 나타났다. 4가지 비교구는 3가지 펩타이드보다 모두 우세한($p < 0.05$) 효과를 나타냈으며, 3가지 펩타이드간에는 anserine의 차단효과가 가장 낮았으나 유의적인 차이는 없었다. Fe(II) 첨가구의 경우 BHT를 제외한 나머지 실험구 모두 대조구와 유의차가 없거나 효과가 없는 것으로 나타났으며, Cu(II)에 대해서는 4가지 비교구 모두 금속이온 차단효과를 나타냈으나($p < 0.05$), 3가지 펩타이드는 대조구와 유의차가 없는 것으로 나타났다. 그러나 Zn(II)에 대해서는 anserine을 제외한 모든 첨가구에서 차단효과가 나타났다. 이상의 결과로부터 펩타이드별 금속이온과의 반응성을 추정한다면, 3가지 펩타이드는 Fe(III), Zn(II)에 대해서는 모두 반응했지만, Fe(II)와는 모두 반응하지 않았고, Cu(II)에 대해서는 carnosine만이 반응성을 나타낸 것으로 사료된다. 또한 펩타이드의 금속이온 차단효과는 펩타이드가 금속이온 공존하에서 유지의 자동산화에 관여하는 금속이온과 상호반응하여 산화반응을 억제하기 때문이라 사료되며, 금속이온의 종류에 따라 다르게 작용함을 알 수 있었다.

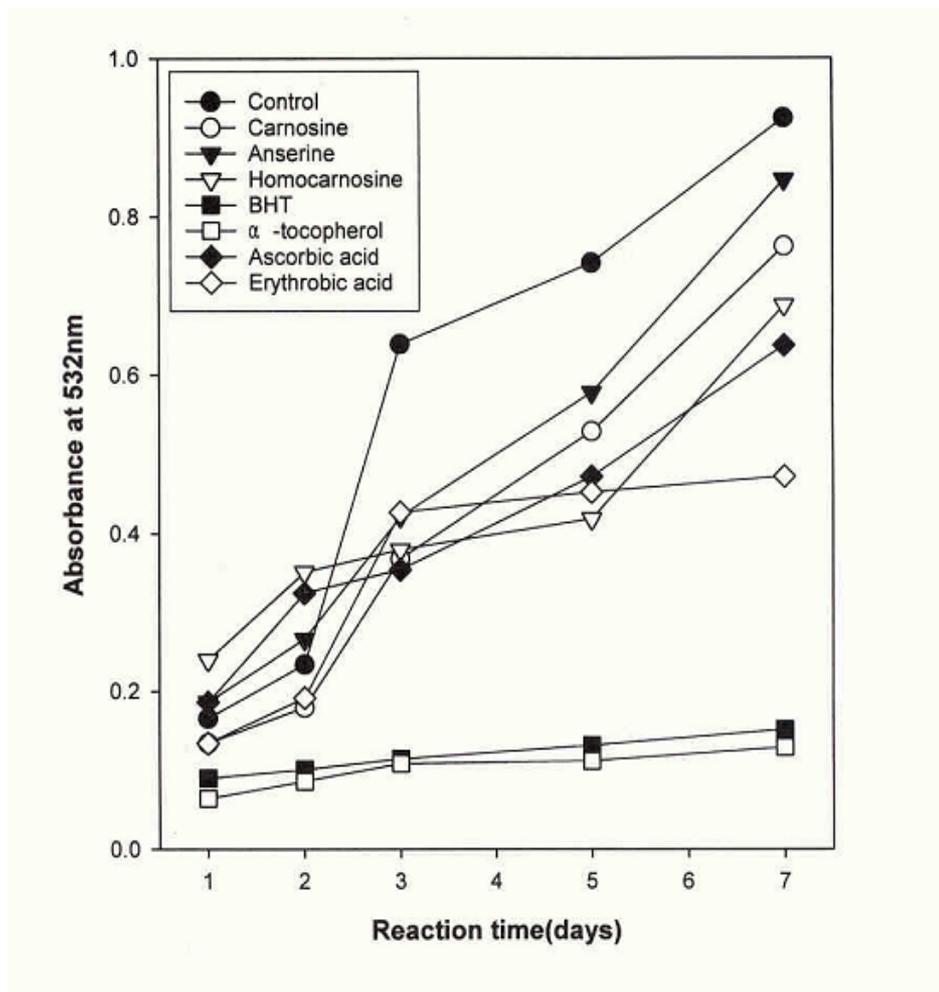


Figure 5. Comparison of peroxide value of carnosine, anserine and homocarnosine with various antioxidants in linoleic acid stored at 50°C for 7 days

Table 16. Comparison of peroxide value of carnosine, anserine and homocarnosine with various antioxidants on 2ppm Fe(III), Fe(II), Cu (II), Zn(II) ion-catalyzed peroxidation of linoleic acid incubated at 5 0°C for 7 days

Ions	Control	Peroxide value(meq/kg)						
		Carnosine	Anserine	Homo-carnosine	BHT	α -Tocopherol	Ascorbic acid	Erythorbic acid
Fe(III)	0.7±0.01 ^{1k}	0.4±0.01 ^{cd}	0.55±0.01 ^{de}	0.35±0.01 ^{cb}	0.1±0.01 ^a	0.1±0.01 ^a	0.1±0.01 ^a	0.25±0.01 ^a
Fe(II)	1.0±0.01 ^b	2.7±0.01 ^c	1.35±0.01 ^b	1.7±0.01 ^{bc}	0.15±0.01 ^a	1.2±0.01 ^b	2.4±0.01 ^c	2.1±0.01 ^c
Cu(II)	1.4±0.01 ^b	1.0±0.01 ^b	3.0±0.01 ^c	3.3±0.01 ^d	0.05±0.01 ^a	0.1±0.01 ^a	0.2±0.01 ^a	0.25±0.01 ^a
Zn(II)	1.4±0.01 ^e	0.75±0.01 ^d	1.35±0.01 ^e	0.85±0.01 ^d	0.1±0.01 ^b	0.2±0.01 ^{cb}	0.2±0.01 ^{cb}	0.4±0.01 ^c

¹⁾ Mean±SD

^{a-e} Mean value(n=3) with the different letters in a row are significantly different by Duncan's multiple range test(p<0.05)

2) Thiobarbitubic reactive substances(TBARS) 생성 억제능

3가지 펩타이드와 4가지 비교 항산화제를 첨가한 linoleic acid의 TBARS 생성변화를 그림 6에 나타내었다. TBARS 생성은 저장기간에 따라 모두 점차 증가하는 경향을 나타냈다. 가장 낮은 증가를 나타낸 것은 α -토코페롤과 BHT이었으며, 펩타이드 중에서는 homocarnosine, carnosine, anserine의 순으로 아스코르빈산 및 에리스로빈산과 유사한 경향을 나타냈다.

대조구에 대한 상대적인 TBARS 생성억제력(%)의 변화는 표 17에 나타내었다. 처리구 모두 TBARS 생성 억제능력을 나타내었다. 4가지 비교구 중 가장 높은 산화 억제능력을 나타낸 것은 α -토코페롤, BHT, 에리스로빈산, 아스코르빈산이었으며, 3가지 펩타이드 중에서는 homocarnosine, carnosine, anserine 순으로(p<0.05), BHT, α -토코페롤, 에리스로빈산보다는 억제능력이 낮았으나, homocarnosine과 carnosine은

아스코르빈산과 유사한 경향을 나타냈다. 또한 α -토코페롤을 제외한 모든 처리구의 TBARS 생성 억제력이 저장 3일째까지는 상승하다가 5일째부터 감소하는 경향을 나타냈는데, 이러한 현상에 대해 Laleye 등¹⁴⁶⁾은 저장 초기에 지방산화에 의해 malonaldehyde (MA)가 다량 생성되지만, 일정 시간 경과 후에는 MA생성이 감소되거나 분해 또는 histidine 등의 아미노산과 결합하여 TBARS값이 감소한다고 보고한 바 있으며, Gokalp 등¹⁴⁷⁾도 반응성이 강한 MA가 카르보닐 화합물 아미노산, 요소 등과 반응하여 TBARS값이 감소한다고 보고한 바 있다.

지질의 자동산화를 촉진시키는 금속이온에 대한 dipeptides의 산화억제 효과를 TBARS(%)로 측정한 결과는 표 18에 나타내었다. Fe(III) 첨가구의 경우 hormocarnosine이 아스코르빈산과 유사한 산화억제능력을 나타냈으며, Fe(II) 첨가구의 경우 모든 항산화제의 억제능력이 높았다. Cu(II)와 Zn(II)에 대해서는 일정한 경향을 보이지는 않았으나, 펩타이드 중에서는 carnosine이 4가지 비교구 중에서는 BHT의 산화억제력이 높게 나타났다. 이상의 결과로부터 펩타이드별 금속이온과의 반응성을 추정하면, 3가지 펩타이드는 모두 Fe(II)와의 반응성이 가장 높고, 그 다음은 Fe(III), Zn(II), Cu(II)의 순서인 것으로 예측된다. 이와 같은 결과는 Fe(II)에 대한 반응성이 가장 낮게 나타난 과산화물가 측정 결과와는 상이함을 나타냈는데, 이는 항산화활성 측정방법에 따른 차이인 것으로 여겨진다.

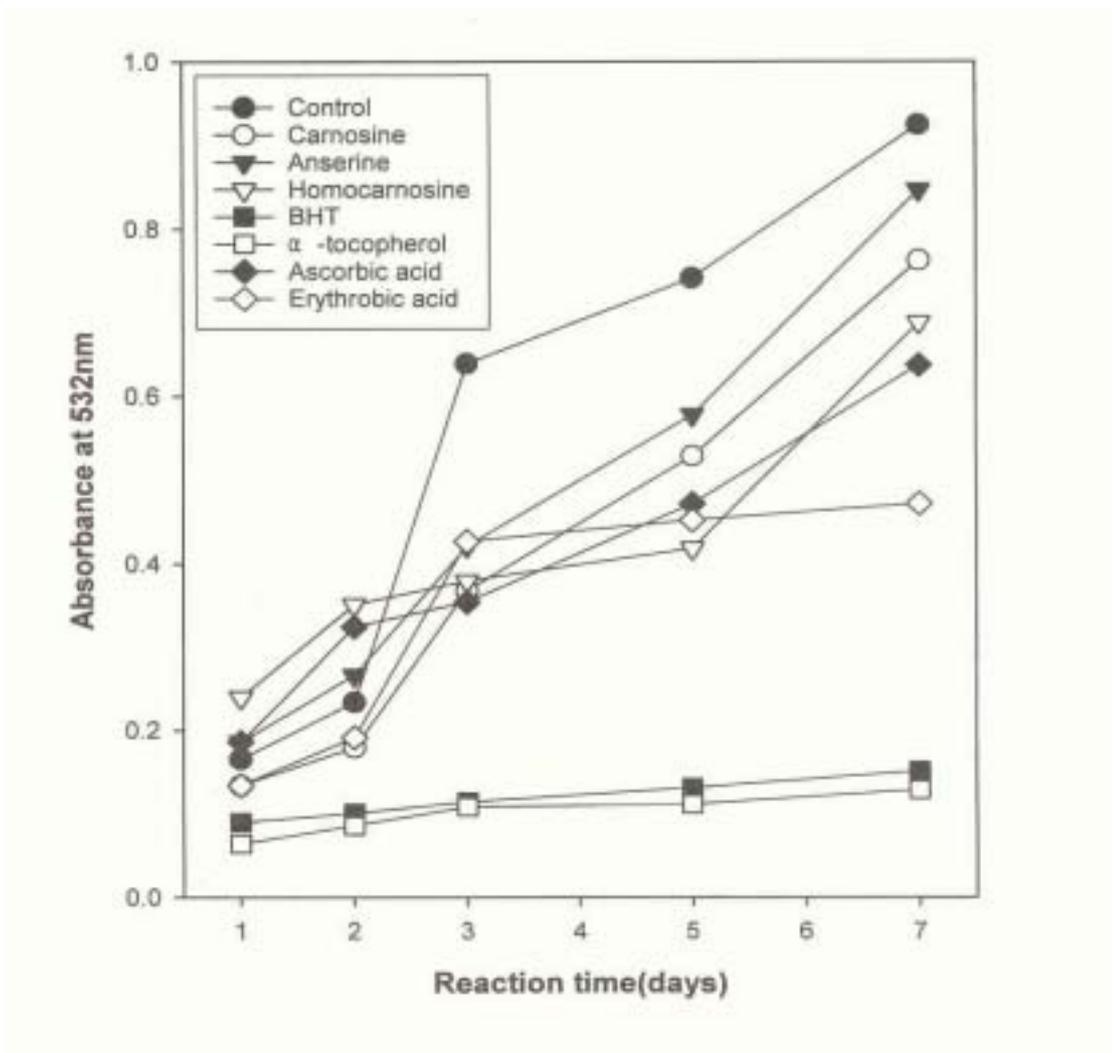


Figure 6. TBARS(absorbance) of the carnosine, anserine and homocarnosine with various antioxidants in linoleic acid stored at 50°C for 7 days

Table 17. Comparison of inhibition of TBARS(%) for carnosine, anserine and homocarnosine with various antioxidants in linoleic acid stored at 50°C for 7 days

Days	Inhibition of TBARS(%)						
	Carnosine	Anserine	Homo -carnosine	BHT	α - Tocopherol	Ascorbic acid	Erythorbi c acid
1	18.98±0.55 ^d	12.61±0.15 ^e	45.25±0.25 ^b	45.58±1.00 ^b	48.00±0.30 ^a	21.10±0.60 ^c	9.51±0.65 ^f
2	23.65±1.35 ^e	13.66±0.20 ^e	49.70±0.50 ^c	56.99±1.00 ^b	72.68±0.80 ^a	38.42±0.20 ^d	18.37±0.50 ^f
3	42.36±1.50 ^e	33.98±1.20 ^f	44.84±0.10 ^d	82.11±0.20 ^b	83.01±0.30 ^a	44.50±0.40 ^d	66.80±0.80 ^c
5	34.25±0.55 ^e	16.09±0.35 ^f	34.52±0.30 ^e	80.98±0.50 ^b	83.79±0.30 ^a	38.20±0.40 ^d	40.77±0.20 ^c
7	30.70±0.45 ^d	11.02±0.20 ^e	9.78±0.15 ^f	45.27±0.60 ^b	83.12±0.30 ^a	7.46±0.50 ^g	31.53±0.30 ^c

¹⁾ Mean±SD

^{a-g} Mean value(n=3) with the different letters in a row are significantly different by Duncan's multiple range test(p<0.05)

Table 18. Antioxidative effect of carnosine, anserine and homocarnosine with various antioxidants on 2ppm Fe(III), Fe(II), Cu(II), Zn(II) ion-catalyzed peroxidation of linoleic acid incubated at 50°C for 7 days

Ions	Inhibition of TBARS(%)						
	Carnosine	Anserine	Homo -carnosine	BHT	α - Tocophero l	Ascorbic acid	Erythorbi c acid
Fe(III)	29.58±0.30 ^{db}	30.75±0.10 ^c	56.82±0.10 ^e	29.62±0.20 ^b	23.03±0.10 ^a	58.18±0.40 ^f	38.07±0.10 ^b
Fe(II)	46.71±0.20 ^a	53.32±0.10 ^c	51.51±0.10 ^b	83.23±0.20 ^f	71.58±0.08 ^e	71.50±0.08 ^{de}	71.45±0.10 ^d
Cu(II)	30.67±0.20 ^e	17.32±0.08 ^b	22.68±0.08 ^c	59.78±0.20 ^g	8.85±0.10 ^a	44.76±0.30 ^f	25.69±0.10 ^d
Zn(II)	27.49±0.08 ^c	22.17±0.40 ^b	5.58±0.10 ^a	71.82±0.20 ^g	40.57±0.20 ^d	69.15±0.10 ^f	53.18±0.08 ^a

¹⁾ Mean±SD

^{a-g} Mean value(n=3) with the different letters in a row are significantly different by Duncan's multiple range test(p<0.05)

3) 전자공여능(Electron donating activity)

3가지 펩타이드와 4가지 비교 항산화제의 농도별 대조구에 대한 전자공여능을 측정한 결과는 표 19와 같다. 모든 처리구의 전자공여능은 농도 증가에 따라 증가하였다. 4가지 비교구의 경우 농도 증가에 따라 BHT, 아스코르빈산, 에리스로빈산, α -토코페롤 각각 13.0~99.1%, 28.8~95.4%, 18.2~95.4%, 9.8~71.6%로 증가하였으며, carnosine, anserine, homocarnosine은 각각 4.5~21.4%, 1.1~3.2%, 0.3~2.4%의 범위를 나타냈다. 500 μ g/ml의 농도에서 50% DPPH 자유라디칼 소거농도(50% scavenging concentration; SC₅₀)를 산출한 결과는 carnosine, anserine, homocarnosine 각각 1,170, 7,861, 10,504 μ g/ml이었으며, BHT, 아스코르빈산, 에리스로빈산, α -토코페롤은 252, 262, 262, 349 μ g/ml이었다. Carnosine의 전자공여능을 4가지 비교항산화제와 SC₅₀으로 비교하면 약 21.5~29.8%에 해당한다.

Table 19. Comparison of electron donating activity of the carnosine, anserine and homocarnosine with various antioxidants on different concentrations

Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Electron Donating Activity(%)						
	Carnosine	Anserine	Homo -carnosine	BHT	α - tocopherol	Ascorbic acid	Erythorbic acid
25	4.54 \pm 0.50 ¹⁾ e	1.14 \pm 0.2 0 ^f	0.33 \pm 0.25 g	12.96 \pm 0.3 0 ^c	9.76 \pm 0.35 d	28.80 \pm 0.4 0 ^a	18.23 \pm 0.4 0 ^b
50	4.93 \pm 0.50 e	1.48 \pm 0.5 0 ^f	0.48 \pm 0.20 g	29.33 \pm 0.2 0 ^c	14.60 \pm 0.2 0 ^d	58.49 \pm 0.4 0 ^a	52.74 \pm 0.2 0 ^b
100	12.34 \pm 0.35 e	1.98 \pm 0.3 5 ^f	0.56 \pm 0.45 g	56.45 \pm 2.0 0 ^c	24.36 \pm 0.0 8 ^d	90.74 \pm 0.3 0 ^a	89.42 \pm 0.5 5 ^b
250	15.03 \pm 0.60 e	3.07 \pm 0.1 0 ^f	1.05 \pm 0.40 g	98.29 \pm 0.4 0 ^a	48.20 \pm 0.4 5 ^d	95.02 \pm 0.2 5 ^b	94.87 \pm 0.1 5 ^c
500	21.36 \pm 0.30 e	3.18 \pm 0.3 5 ^f	2.38 \pm 0.35 g	99.12 \pm 0.0 1 ^a	71.58 \pm 0.9 0 ^d	95.42 \pm 0.3 0 ^b	95.38 \pm 0.1 5 ^c

¹⁾ Mean \pm SD

^{a-g} Mean value(n=3) with the different letters in a row are significantly different by Duncan's multiple range test(p<0.05)

라 . 아질산염 소거능(Nitrite-scavenging effect)

3가지 펩타이드와 4가지 비교 항산화제의 농도별 pH 변화에 따른 아질산염 소거능을 측정된 결과는 표 20, 21, 22와 같다. pH 1.2 조건하에서 carnosine, anserine, homocarnosine의 아질산염 소거능은 농도 증가에 따라 각각 15.7%~59.0%, 15.2~23.1%, 14.0~21.0%로 증가하였으나, BHT, α -토코페롤, 아스코르빈산은 소거능을 나타내지 않았고, 에리소르빈산은 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 5.9, 9.8%의 소거능을 나타냈다. pH 4.2에서는 농도 증가에 따라 carnosine, anserine, homocarnosine 각각 9.0~23.2%, 8.8~22.8%, 12.3~18.2%의 수준을 나타냈으나, pH 1.2인 경우 보다 42.6~60.6%, 1.4~42.2%, 12.5~13.6% 감소된 수준이었으며, BHT, α -토코페롤, 아스코르빈산은 소거능을 나타내지 않았고, 에리소르빈산은 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 1.87, 4.61%의 소거능을 나타냈다. pH 6.0에서는 carnosine이 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 1.8, 5.1%를 나타낸 것을 제외한 모든 성분에서 소거작용이 나타나지 않았다.

pH와 농도에 따른 3가지 분리 펩타이드의 아질산염 소거효과는 그림 7에 나타내었다.

Table 20. Comparison of nitrite scavenging effect of the carnosine, anserine and homocarnosine with various antioxidants with 2ml of pH 1.2 1mM sodium nitrite at 37°C for 1hr under different concentrations

Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Nitrite scavenging effect(%)						
	Carnosine	Anserine	Homo -carnosine	BHT	α - Tocopher ol	Ascorbi c acid	Erythorbic acid
50	15.68 \pm 0.30 ^{1)a}	15.24 \pm 0.15 ^b	14.01 \pm 0.10 ^c	-	-	-	-
100	23.04 \pm 0.15 ^a	16.84 \pm 0.15 ^b	16.76 \pm 0.05 ^b	-	-	-	-
250	47.08 \pm 0.40 ^a	18.68 \pm 0.05 ^b	18.28 \pm 0.20 ^b	-	-	-	5.91 \pm 0.15 ^d
500	58.90 \pm 0.30 ^a	23.11 \pm 0.20 ^b	21.03 \pm 0.20 ^c	-	-	-	9.81 \pm 0.10 ^d

¹⁾ Mean \pm SD

^{a-d} Mean value(n=3) with the different letters in a row are significantly different by Duncan's multiple range test(p<0.05)

Table 21. Comparison of nitrite scavenging effect of the carnosine, anserine and homocarnosine with various antioxidants with 2ml of pH 4.2 1mM sodium nitrite at 37°C for 1hr under different concentrations

Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Nitrite Scavenging Effect(%)						
	Carnosine	Anserine	Homo -carnosine	BHT	α - Tocopher ol	Ascorbi c acid	Erythorbic acid
50	8.99 \pm 0.20 ^{1)b}	8.81 \pm 0.25 ^c	12.26 \pm 0.30 ^a	-	-	-	-
100	11.84 \pm 0.10 ^b	12.82 \pm 0.20 ^c	15.25 \pm 0.15 ^a	-	-	-	-
250	15.89 \pm 0.05 ^c	16.95 \pm 0.20 ^b	17.17 \pm 0.20 ^a	-	-	-	1.87 \pm 0.35 ^d
500	23.23 \pm 0.01 ^a	22.79 \pm 0.20 ^b	18.18 \pm 0.25 ^c	-	-	-	4.61 \pm 0.10 ^d

¹⁾ Mean \pm SD

^{a-d} Mean value(n=3) with the different letters in a row are significantly different by Duncan's multiple range test(p<0.05)

Table 22. Comparison of nitrite scavenging effect of the carnosine, anserine and homocarnosine with various antioxidants with 2ml of pH 6.0 1mM sodium nitrite at 37°C for 1hr under different concentrations

Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Nitrite Scavenging Effect(%)						
	Carnosine	Anserine	Homo -carnosine	BHT	α - Tocopherol	Ascorbic acid	Erythor bic acid
50	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-
250	1.80 \pm 0.20 ¹⁾	-	-	-	-	-	-
500	5.14 \pm 0.40	-	-	-	-	-	-

¹⁾ Mean \pm SD

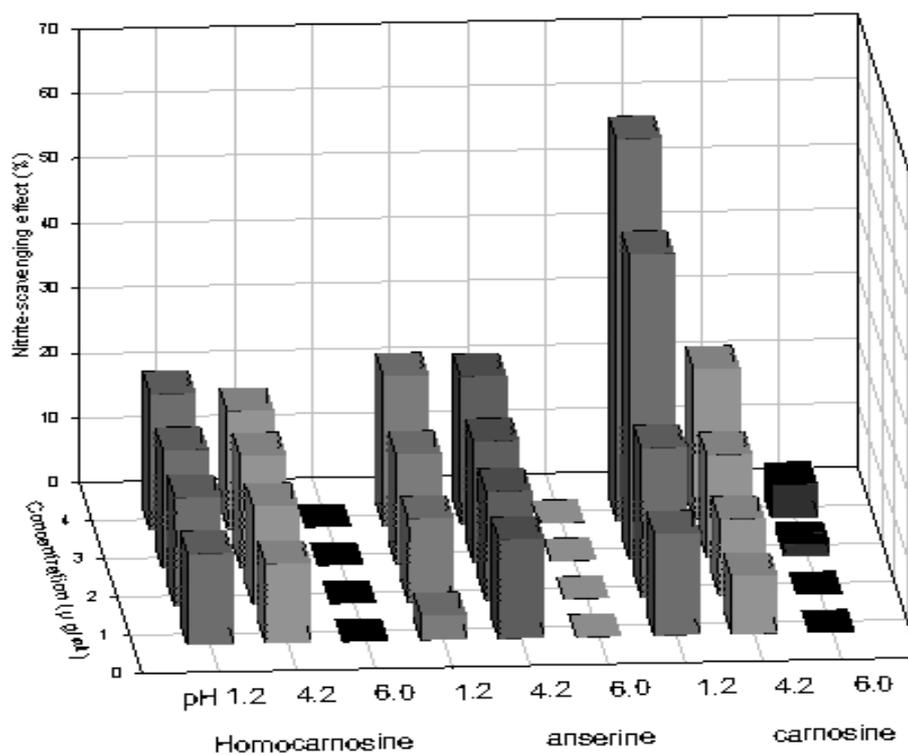


Figure 7. Nitrite-scavenging effect of carnosine, anserine and homocarnosine with various antioxidants under different condition

마 . SOD 유사활성(SOD like activity)

3가지 펩타이드와 4가지 비교구를 대상으로 농도별 SOD 유사활성을 조사한 결과는 표 23과 같다. 4가지 비교구의 경우 가장 높은 활성을 나타낸 것은 아스코르빈산, BHT, 에리스로빈산, α-토코페롤의 순으로 각각 26.2~79.3, 14.6~79.7, 2.3~14.3, 1.0~2.8%의 범위를 나타냈으며, carnosine, anserine, homocarnosine은 14.2~25.3%, 8.9~18.1%, 10.8~33.4%의 활성을 나타냈다. 모든 농도에서 carnosine, anserine, homocarnosine은 BHT, 아스코르빈산보다는 낮은 활성을 나타냈으나, α-토코페롤, 에리스로빈산보다는 높은 활성을 나타냈다. 특히, carnosine은 농도별로 α-토코페롤의 9.1~14.0배, 에리스로빈산의 1.8~6.3배 높은 활성을 나타냈다.

Table 23. Comparison of SOD like activity of the carnosine, anserine and homocarnosine with various antioxidants under different concentrations

Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	SOD like activity(%)						
	Carnosine	Anserine	Homo- carnosine	BHT	α - Tocopherol	Ascorbic acid	Erythorbic acid
50	14.17 \pm 0.15 ^{1k}	8.89 \pm 0.30 ^e	10.75 \pm 0.35 ^d	14.59 \pm 0.25 ^b	1.01 \pm 0.25 ^g	26.19 \pm 0.45 ^a	2.28 \pm 0.20 ^f
100	16.99 \pm 0.30 ^d	11.26 \pm 0.20 ^e	17.41 \pm 0.15 ^c	19.44 \pm 0.20 ^b	1.30 \pm 0.45 ^g	29.82 \pm 0.30 ^a	11.51 \pm 0.25 ^f
250	23.96 \pm 0.30 ^b	15.77 \pm 0.20 ^e	17.76 \pm 0.30 ^d	21.72 \pm 0.05 ^c	1.47 \pm 0.25 ^g	62.42 \pm 0.20 ^a	12.82 \pm 0.25 ^f
500	25.26 \pm 0.35 ^d	18.13 \pm 0.50 ^e	33.40 \pm 0.65 ^c	79.71 \pm 1.95 ^b	2.78 \pm 0.05 ^g	79.33 \pm 0.25 ^a	14.26 \pm 0.30 ^f

¹⁾ Mean \pm SD

^{a-g} Mean value(n=3) with the different letters in a row are significantly different by Duncan's multiple range test(p<0.05)

바 . 펩타이드의 안전성 평가

1) 단회투여독성시험(Single dose general toxicity dose)

가) 사망률

시험 전기간을 통하여 시험물질의 경구투여로 인한 사망 예는 전혀 관찰되지 않았다.

나) 임상증상

시험 전기간을 통하여 시험물질의 경구투여로 인한 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다.

다) 체중변화

시험 전기간을 통하여 시험물질의 경구투여로 인한 각 군간의 유의성있는 체중 변화는 관찰되지 않았다(표 24참조).

Table 24. 단회투여독성시험기간 중의 각 군별 체중변화

Days after application	Control 군	Carnosine 투여군	Anserine 투여군	Homocarnosine 투여군
0	28.2±0.98 ¹⁾	27.8±0.78	28.2±1.11	27.9±0.82
7	30.5±1.03	30.4±1.12	29.8±1.08	30.0±1.11
14	34.2±1.78	35.0±1.21	34.0±1.90	33.6±1.43

¹⁾ Mean±SD(n=5)

2) 1차 피부자극시험(Primary Skin Irritation)

가) 사망률

시험 전기간을 통하여 실험동물의 사망 예는 전혀 관찰되지 않았다.

나) 임상증상

시험 전기간을 통하여 실험동물의 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다.

다) 체중변화

시험 전기간을 통하여 실험동물 각 군간의 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다(표 25참조).

Table 25. 1차 피부자극시험 중의 각 군별 체중변화

Days after application	Control 군	Carnosine 투여군	Anserine 투여군	Homocarnosine 투여군
0	2231.8±57.4 ¹⁾	2246.2±63.5	2254.5±52.2	2247.1±70.2
3	2305.5±66.4	2308.7±70.4	2315.6±63.5	2305.2±72.1

¹⁾ Mean±SD(n=3)

라) 도포부위의 관찰

Carnosine, anserine, homocarnosine 도포부위에서 홍반 및 가피, 부종 등의 피부자극반응을 관찰하여 계산된 피부자극율(P.I.I)이 carnosine 과 anserine 0.5, homocarnosine 0.25로 나타났다(표 26참조). 이는 3가지 시험물질 모두가 비자극 물질임을 의미하는 것이다.

Table 26. 각 군별 피부자극율

Groups	Erythma and Eschar				Edema				Total	P.I.I
	Intact Site		Abraded Site		Intact Site		Abraded Site			
	24hr	72hr	24hr	72hr	24hr	72hr	24hr	72hr		
Control(n=3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Carnosine(n=3)	0	0	2	2	0	0	1	1	6	0.5
Anserine(n=3)	0	0	2	2	0	0	1	1	6	0.5
Homocarnosine (n=3)	0	0	1	1	0	0	0	1	3	0.25

3) 안점막자극시험(Eye irritation test)

가) 사망률

시험 전기간을 통하여 실험동물의 사망 예는 전혀 관찰되지 않았다.

나) 임상증상

시험 전기간을 통하여 실험동물의 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다.

다) 체중변화

시험 전기간을 통하여 실험동물 각 군간의 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다(표 27참조).

Table 27. 안점막자극시험 중의 각 군별 체중변화

Days after application	Control군	Carnosine 투여군	Anserine 투여군	Homocarnosine 투여군
0	2238.7±64.7 ¹⁾	2234.2±67.5	2241.2±62.2	2252.1±69.2
3	2321.5±73.2	2326.7±70.9	2333.6±73.1	2308.3±78.2

¹⁾ Mean±SD(n=3)

라) 점안부위의 관찰

Carnosine, anserine, homocarnosine 점안부위에서 홍채, 결막에 대한 안구병변 등급을 점수로 표시한 것을 표 28에 나타내었으며, 대조군과 비교할 때 시험물질의 점안으로 인한 특기할만한 이상은 전혀 관찰되지 않았다.

Table 28. 각 군별 안점막자극율

Group	Tissue Inspected	Days after application				
		1	2	3	4	7
Control(n=3)	Cornea	0	0	0	0	0
	Iris	0	0	0	0	0
	Conjunctiva	0	0	0	0	0
Carnosine(n=3)	Cornea	0	0	0	0	0
	Iris	0	0	0	0	0
	Conjunctiva	0	0	0	0	0
Anserine(n=3)	Cornea	0	0	0	0	0
	Iris	0	0	0	0	0
	Conjunctiva	0	0	0	0	0
Homocarnosine (n=3)	Cornea	0	0	0	0	0
	Iris	0	0	0	0	0
	Conjunctiva	0	0	0	0	0

사 . 펩타이드(carnosine)를 주성분으로 하는 기능성(주름완화)화장품의 임상평가

1) 피부 주름 깊이의 변화

시료 도포 후 4주째에 시료와 Placebo 도포부위에서 계산된 주름감소율을 평균 ±표준오차로 표시하면 표 29와 같다.

Table 29. 시료와 Placebo 도포부위에서의 주름감소율 (%)

시료의 종류	도포기간
	4 주
시료	0.11 ± 6.90
Placebo	-4.65 ± 8.13

No statistically significant difference (p>0.05)
임상피험자 수(n=20)

시료 도포 후 4주째 까지 시료 도포부위에서의 주름감소율이 Placebo 도포부위에서보다 크게 나타났지만 통계적 유의차를 나타내지는 않았다 ($P > 0.05$). 이는 노폐계의 근육에서 분리·추출한 dipeptides의 주름개선 효능이 4주간의 임상시험에서는 통계적으로는 입증되지 못한 것이라 하겠다.

2) 설문결과

20명의 임상피험자 전원을 대상으로 임상시험 종료시에 실시한 설문조사에서는 7명이 시료를 도포한 부위에서 주름이 더 개선된 것 같은 느낌을 받았다고 응답하였으며, 나머지 13명은 시료 및 Placebo를 도포한 부위의 주름개선 정도가 비슷하였다고 답하였다.

3) 부작용

20명의 모든 임상피험자가 시료 도포로 인한 부작용을 보고하지 않았으며, 연구자의 관찰에서도 어떠한 시료 도포로 인한 부작용이 관찰되지 않았다.

4. 결론

임상 피험자 20명을 대상으로 노폐계의 근육에서 분리·추출한 dipeptides를 눈가의 주름부위에 4주간 도포하면서 기기분석을 실시하여 주름개선 효능을 측정된 결과 dipeptides 성분의 주름개선 효능이 통계적으로는 입증되지 않았다. 또한, 임상피험자 전원을 대상으로 임상시험 종료시에 실시한 설문조사에서는 7명이 시료를 도포한 부위에서 주름이 더 개선된 것 같은 느낌을 받았다고 응답하였으며, 나머지 13명은 시료 및 Placebo를 도포한 부위의 주름개선 정도가 비슷하였다고 답하였다. 한편, 임상시험 기간 중 시료의 도포로 인한 부작용은 관찰되지 않았다.

(별첨 1) 피험자 주관적 만족도 평가

피험자 성명 :

피험자 서명 :

1. 유효성 평가 (도포 4 주후)

1) 어느 부위의 주름이 보다 편평해졌나요 ?

오른쪽 눈가 왼쪽 눈가 비슷하다 (택 1)

2. 부작용을 포함한 안정성의 평가 (도포 4주후)

Items	4
Day	weeks
1. 피부가 화끈거리는 증상이 있습니까? Burning	
2. 피부가 가려운가요? Itching	
3. 피부가 따끔거리는 증상이 있습니까? Stinging	
4. 피부가 붉어지나요? Redness	
5. 피부가 벗겨지는 증상이 있습니까? Peeling	
6. 피부가 건조해지나요? Dryness	
7. 피부의 색조가 얼룩덜룩하게 변하지는 않나요? Discoloration	
8. 피부에 반점이 생겼나요? Rash	

기타 부작용 증상이 있으면 기록해 주세요.

제 3 세부 (위탁과제):식육부산물에서의 콘드로이친 생산기술연구

제 1 절 식육 부산물에서 콘드로이친 생산기술 개발과 기능성 연구

1 . 실험재료

콘드로이친황산 소재 탐색에 사용한 시료는 소 부산물(식도, 심장, 간, 소장, 대장, 신장, 지레, 양, 연골, 허파 및 천엽), 돼지 부산물(식도, 심장, 간, 소장, 대장 및 허파) 및 닭 부산물(간, 심장, 소장, 대장, 비장, 허파, 모래주머니)을 사용하였다. 시료들은 도축장에서 도축후 냉장 운반하여 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 모든 시료는 13,500rpm/min으로 균질화(JANKE & KUNKEL IKA-Labortechnik, Germany)한 후 분석에 사용하였다.

2 . 실험 방법

가 . 일반성분분석

식품의 일반성분인 수분, 조지방, 조단백질 및 회분의 정량은 상법(1)에 따라 다음과 같이 측정하였다.

1) 수분함량 측정

105 ~ 110℃로 조절한 건조기에 칭량용기를 넣고 1 ~ 2시간 가열한 후, 데시케이터로 옮겨 30분간 방냉시킨 다음 0.1mg까지 측정하여 함량

을 구한다[W₀]. 적량의 시료를 칭량용기에 취하여[W₁] 건조기에 넣고 2시간 동안 건조시킨다(이때 반드시 뚜껑을 벗기고 뚜껑과 함께 건조기안에 넣는다). 건조가 끝나면 칭량용기의 뚜껑을 닫고 데시케이터안으로 옮겨 30분간 방냉하고 칭량한다. 다시 1시간 동안 건조기 안에서 반복 건조한 다음 데시케이터에 옮겨 30분간 방냉하고 칭량하는 조작을 반복하여 함량을 구한다[W₂]

$$\text{수분량 (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

2) 지방 정량

시료의 지방 정량은 Soxhlet 법(1)을 이용한 쾌속지방추출장치를 사용하였다. 즉, 원통여지(28×30mm)를 적당한 길이(28 ~ 40mm)로 잘라 밑 하부에 탈지면을 조금 막는다. 시료 2 ~ 3g을 정확히 칭량[W₁]하고 원통여지에 넣은 후 건조기에 넣어 1시간 건조시킨 후 5분간 방냉하고 칭량[W₂]한다. 원통여지내의 시료위에 탈지면을 막고 쾌속추출장치의 rod holder에 끼운다. 플라스크를 건조시켜 비석(glass bead)과 같이 칭량[W₃]하고 약 70ml의 ether를 가한다. 냉각기의 joint부분에 플라스크를 끼우고 냉각수를 흐르게 한 후 heater를 플라스크 밑에 놓는다. Heater의 온도를 ether가 비등할 때까지 올린다. 원통여지는 시료에 따라 최초의 20 ~ 40분간 ether중에 직접 담가 끓이고 그 후 rod holder를 올리고 원통여지를 끓고 있는 ether 표면 위에 올려 놓아 40 ~ 50분간 ether에 의한 환류추출을 행한다. 이때 냉각기에서 떨어지는 ether 방울이 원통여지의 상부에 떨어지도록 하여 잔류 지방추출에 주력한다. Heater의 스위치를 끄고 후방으로 밀어 놓은 후 플라스크를 빼서 ether 회수장치에 끼우고 ether를 회수시키거나 heater에서 모두 증발시킨다. 플라스크를 실온까지 내려 칭량[W₄]한다.

$$\text{조지방량 (\%)} = \frac{W_4 - W_3}{W_1} \times 100$$

3) 단백질 정량

시료의 단백질 정량은 변형한 Lowry 법(2)에 따라 실시하였다. 즉, 일정하게 희석한 시료 10 μ l와 Lowry 시약 3ml을 혼합하고 실온에서 10~60분간 발색시켰다. 이후 0.3ml의 1N Folin Ciocalteu 시약을 혼합하고 실온에서 45분간 발색시켰다. 이를 600nm에서 시약을 대조로 하여 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 bovine serum albumin을 사용하여 작성한 표준곡선에 외삽하여 단백질량으로 계산하였다. Lowry시약은 A시약 [2% sodium carbonate + 0.4% NaOH + 0.16% potassium sodium tartarate + 1% SDS]과 4% CuSO₄ 용액을 100 : 1의 비율로 혼합하여 사용하였다.

4) 무기질 정량

회화용기를 약 500~600 $^{\circ}$ C의 회화로에서 2시간 가열한 후 30분간 방냉하고 칭량하여 회화용기의 항량을 구한다[W₀]. 항량을 구하여 둔 회화용기에 정확히 칭량한 시료를 담고 150 ~ 200 $^{\circ}$ C로 연기가 나지 않을 때까지 가열한 후 300 ~ 400 $^{\circ}$ C로 몇시간 가열하고 마지막으로 550 $^{\circ}$ C에서 1 ~ 2시간 회화시킨다. 시료가 모두 회백색으로 되면 용기의 항량을 구할 때와 같은 요령으로 데시케이터에서 방냉, 칭량하고 항량[W₁]을 구한다.

$$\text{회분량 (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{\text{시료량}} \times 100$$

나 . 콘드로이친황산의 정량

별도 2개의 시험관에 붕산나트륨황산 시약[sodium borate 1.0g/sulfuric acid 200ml] 5ml씩을 취하여 얼음물로 충분히 냉각시켰다. 각각에 검액

과 표준용액(농도별로 조제한 글루쿠론산 용액)을 정확히 1ml 씩을 취해 시액 위에 주의하여 가하고 냉각하면서 혼화하고 수욕상에서 10분간 가열한 후, 즉시 얼음물로 냉각시켰다. 각각에 카바졸시액 0.2 ml을 정확히 가하여 혼화하고 수욕상에서 15분간 가열하고 얼음물로 실온까지 냉각시켰다. 이들의 액에 대하여 물 1 ml을 사용하여 동일하게 조작한 것을 대조액으로 하여 530 nm에서의 흡광도를 분광광도계로 측정하였다. 흡광도 수치를 글루쿠론산 표준곡선에 외삽하여 시료의 글루쿠론산의 양을 구한 후 콘드로이친황산 함량(%)은 다음 식에 대입하여 구하였다

$$\text{콘드로이친황산 함량(\%)} = (\text{시료의 글루쿠론산의 양} / \text{시료의 양}) \times 2.593 \times 100$$

2.593 : Chondroitin Sulfate M.W./Glucuronic acid M.W.

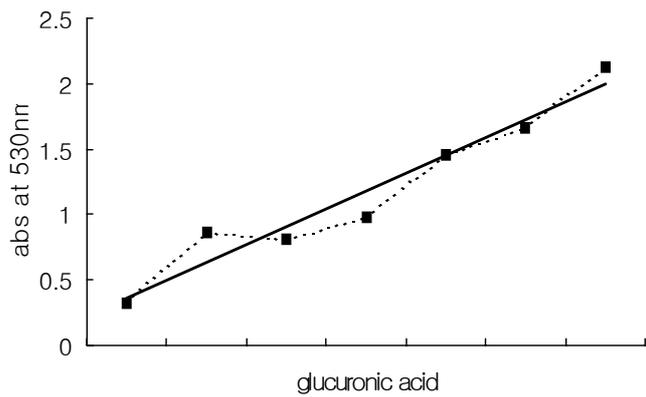


Fig. 1. Standard curve of glucuronic

다 . 콘드로이친황산 추출 방법

- 1) 효소가수분해

시료의 액화 조건으로 단백분해효소를 이용하였다. 작용 최적 pH와 온도가 각기 다른 세 protease로써 alcalase 0.6L(Novo Nordisk-Denmark, pH 9.0, 55°C), trypsin(Sigma Co., pH 7.5, 25°C) 및 bromelain(Sigma Co., pH 4.5, 45°C)을 선정하였다. 액화할 시료에 효소 2%(w/w, dry basis)와 10배(w/v)의 효소별 최적 buffer를 가한 후, 미리 최적온도로 setting된 항온기에서 shaking incubation하였다. 시간대별로 시료를 꺼내어 비등수 중에서 반응을 중지시키고, 원심분리(1,400×g, 30min)하여 수집된 상등액을 콘드로이친 황산 분석을 위한 시료로 사용하였다.

2) 열수추출 및 효소가수분해 병행법

액화조건을 향상시키기 위해서 열수추출 및 효소가수분해를 병행하였다. 균질화된 시료에 10배(w/v)의 효소별 최적 buffer를 첨가하고 고압멸균기(120°C, 1.5mmHg)를 이용하여 1hrs 동안 autoclave를 하였다. 방냉한 시료에 효소 2%(w/w, dry basis)를 첨가하고 각 효소의 최적온도에서 24시간 incubation한 다음, 비등수 중에서 반응을 중지시키고, 원심분리(1,400×g, 30min)하여 수집된 상등액을 콘드로이친 황산 분석을 위한 시료로 사용하였다.

3) 수율측정

각 시료의 수율은 처음 시료의 양에서 추출되지 않고 남은 불용분을 뺀 양을 처음 시료량에 대한 백분율로 나타내었다. 즉, 열수 추출한 후 원심분리(1,400×g, 30min)하여 얻어진 불용 잔사와 처음 시료의 무게 차를 구함으로써 추출물의 양을 구하고, 추출 전·후 시료의 무게 백분율로써 추출물의 수율을 나타내었다.

4) 동결건조

각 시료로부터 추출한 콘드로이친은 동결건조하여 분말화하였다.

라 . 콘드로이친의 기능성 검증 실험

1) ACE 저해활성 측정(4)

가) 0.4M Borate-NaCl 제조

0.2M H₃BO₃와 0.05M Na₂B₄O₇ 용액을 5.5 : 4.5의 비율로 혼합한 후 pH를 8.3으로 조정한다. 이 용액으로 0.4M NaCl을 제조하여 0.4M borate-NaCl buffer를 완성하였다.

나) 기질 제조

0.4M borate-NaCl buffer에 Hippuryl-His-Leu를 12.5mM되게 용해시키고 pH를 8.3으로 조정하였다.

다) ACE 효소액 제조

Rabbit lung acetone powder 1g당 10ml의 0.4M borate-NaCl buffer를 첨가하여 4℃에서 24시간 교반하였다. 이후 12,000rpm에서 30분간 원심분리 하여 상등액을 분리하고 분석시까지 냉동보관하였다.

라) ACE 저해 활성 측정

동결건조한 시료를 일정하게 희석하여 0.05ml을 취하고[A](공실험의 경우 시료 대신 증류수를 0.05ml가한다[B]) 0.1ml의 12.5mM Hippuryl-His-Leu와 혼합한 후 37℃에서 30분간 방치하였다. 여기에 ACE 효소액을 0.15ml 가하여 다시 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 0.25ml의 0.5N HCl을 가하여 반응을 중지시켰다[C](대조구의 경우 ACE 효소액을 가하기전에 HCl을 먼저 첨가한다[D]). 1.5ml의 ethyl acetate (Sigma Co.)를 첨가한다. 15초간 vortexing하고 2,500rpm에서 10분간 원심분리시켜 상등액을 0.5ml 취한다. 취한 상등액을 120℃의 oil bath나 water bath에서 15분간 완전히 건조시킨 후 1M의 NaCl을 3ml가하여 용해시켰다. 이것을 228nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{ACE Inhibition (\%)} = \left\{ 1 - \frac{\text{AC 흡광도} - \text{AD 흡광도}}{\text{BC 흡광도} - \text{BD 흡광도}} \right\} \times 100$$

2) MTT assay

가) 시약

RPMI 1640, fetal bovine serum 등의 동물세포 배양을 위한 시약은 Life Technologies Inc.(USA)에서 구입하였으며, 세포독성 측정을 위한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) Sigma Co.(USA)에서 구입하였다.

나) 동물세포

세포독성 측정을 위해 사용한 동물세포주는 한국세포주은행에서 구입한 HepPG2 (Hepatocellular carcinoma, human, ATCC HB-8065) 및 SNU-16(Stomach carcinoma, human, KCLB 00016)이었다.

다) 동물세포 배양

동물세포는 56°C에서 30분간 열처리한 fetal bovine serum(FBS)을 10% 첨가한 RPMI 1640 배지에 100units/ml의 penicillin/streptomycin과 20mM HEPES buffer를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

라) 세포독성 측정

동물세포에 대한 콘드로이친의 세포독성을 측정하기 위하여 Carmichael 등(6)의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 즉 시험 세포를 96 well plates에 1×10^4 cells/well이 되게 180 μ l 분주하고 시료를 일정농도로 제조하여 20 μ l 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 96시간 배양하였다. PBS에 5mg/ml 농도로 MTT를 용해시킨 후 무균 여과(0.22 μ m)시키고, 각 well에 MTT 용액 20 μ l를 가한(1×10^4 cells/100 μ l/well) 후 CO₂ incubator에서 37°C, 5hrs incubation 하였다. 주사기로 media를 제거하고, 각 well에 DMSO 200 μ l를 가한 후 pipetting하여 결정을 녹였다. 이를 37°C, 5min 간 incubation 한 후 ELISA reader(Molecular Device Co.)에 옮긴 후 570nm에서 흡광도를 측정하여 성장억제효과(growth inhibitory effect[%])=[대조구의 흡광도-시료처리구의 흡광도]×100/대조구의 흡광도)

를 구하여 세포독성 활성의 지표로 하였다.

3 . 실험결과 및 토론

가 . 일반성분 함량

소의 부산물들의 일반성분을 분석한 결과는 분석하여 Table 1과 같다. 수분 함량은 47 ~ 82%였다. 천엽이 82.2%로 가장 높았으며, 그 다음으로 채식 80.3%, 소장 79.1%의 순 이었다. 간, 심장, 허파 및 신장 등에서 단백질 함량이 15% 내외로 검출되었으며 그 밖의 부산물에서는 5 ~ 10% 정도로 검출되었다. 지방의 함량은 특히 연골(20.2%), 대장(30.2%)등에서 많은 양이 검출되었으나 그 밖의 부산물에서 지방의 함량은 2% 내외로 검출되었다. 회분 함량은 소장, 식도 및 허파에서 5% 정도였으며 그 밖의 부산물에서 1 ~ 2%로 낮게 나타났다.

돼지의 부산물들의 일반성분을 분석한 결과는 분석하여 Table 2와 같다. 수분 함량은 소장, 심장 및 허파에서는 약 80%, 간에서는 72%가 검출되었다. 단백질 함량이 9 ~ 15% 내외로 비슷하게 검출되었다. 회분의 함량도 식도에서의 6%를 제외하고는 1 ~ 2%로 비슷하게 검출되었다. 지방의 함량은 식도에서 2.2%로 가장 높았으며 허파에서는 0.5%의 낮은 지방 함량이 검출되었다. 탄수화물은 간 및 심장에서 9% 정도로 검출되었으며 소장과 허파에서는 낮은 함량이 검출되었다.

닭의 부산물들의 일반성분을 분석한 결과는 분석하여 Table 3과 같다. 수분 함량은 각 장기 비슷하게 70 ~ 80% 정도를 함유하고 있었다. 단백질 함량도 10 ~ 15% 내외로 비슷하게 검출되었다. 회분의 함량도 1 ~ 2%로 비슷하게 검출되었다. 지방의 함량은 대장의 12% 정도를 제외하고는 2 ~ 5% 정도로 비슷하게 검출되었다. 탄수화물은 심장에서 10% 정도로 검출되었으며 소장에서는 낮은 함량이 검출되었다.

나 . 콘드로이친황산 함량

1) 소의 부산물

생체 시료중에 있는 콘드로이친황산 함량을 측정하기 위하여 Nishino와 Nagumo에 의한 방법(7)과 식품공전에 나와 있는 글루쿠론산 정량법(3)에 의한 분석을 실시하여 비교하였는데 소량의 콘드로이친황산 함량을 측정하기 위하여는 글루쿠론산 정량법에 의한 분석 방법이 더 유효한 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 글루쿠론산 정량법을 사용하여 각 식육 부산물을 직접 분석하였다. 본 연구에서 사용된 식소, 돼지 및 닭 부산물중에서는 소 부산물중에 콘드로이친황산 함량이 제일 많은 경향을 보여주었다.

소의 부산물내에 함유되어 있는 콘드로이친황산 함량은 Table 4에 나타내었다. 본 실험의 결과는 소의 부산물 시료로 직접 분석한 결과이다. 소 부산물 생체 시료중 콘드로이친황산 함량은 간, 양 (약 4.5%) > 식도, 연골 (약 2.0%) > 심장, 대장, 천엽 (약 1.5%) > 지레 (약 1.0%)의 순으로 나타났고, 신장, 소장, 허파에서는 없는 것으로 나타났다. 이 값을 건물 시료당 콘드로이친황산 함량으로 계산해 보면 양 (약 22%) > 간 (약 14%) > 식도, 천엽 (약 8.0%) > 심장, 연골 (약 6.5%) > 대장, 지레 (약 4.0%)의 순으로 나타났다. 식도의 경우 시료 부위에 따라 콘드로이친황산 함량 차이가 컸는데, 뼈가 있는 부분은 $3.38 \pm 0.07\%$, 뼈가 없는 부분은 $1.71 \pm 0.29\%$ 의 콘드로이친황산이 분포하는 것으로 나타났다.

이와 같은 결과는 소의 부산물 중 간, 양, 식도, 연골 등이 콘드로이친황산 추출을 위한 소재로서의 가능성을 보여준다. 선행 연구 결과에서 포유동물에서 보고된 바로는 사람의 연골 및 대부분의 포유동물의 연골, 쥐의 늑골, 발생 중에 있는 소의 태아 및 사람의 위와 신장 조직 등에서 콘드로이친이 분포하고 있는 것으로 보고되었다. 이 밖에 닭의 태아의 각막 상피조직 등에서도 발견되어 포유동물 이외에서도 고루 분포하고 있음이 보고되었다. 그러나 포유동물을 소재로 한 콘드로이친 연구보다는 무척추동물에서 콘드로이친황산의 분포를 보고 이어서 이

의 분리에 대한 연구가 보다 활발하게 진행되고 있다. 현재 시판되고 있는 콘드로이친황산 정제물은 돼지의 늑골, 연골, 상어 지느러미와 연골 및 달팽이로부터 정제된 것이 시판되고 있다.

수산물로부터 콘드로이친황산 함량을 분석한 김 등(8)의 보고에서 해삼이 약 15%, 보라골뱅이가 25% 내외, 유령 멧게가 25 ~ 30%, 상어연골에서 23%의 콘드로이친황산 함량이 있는 것으로 나타났다. 그러나 김 등의 분석에서는 시료를 물 속에서 가열한 열수 추출물을 농축, 건조한 열수 추출물중의 콘드로이친황산 함량을 분석한 결과이므로 본 연구에서와 같이 생체 시료를 분석한 결과와는 직접적으로 비교하기가 어렵다. 소의 부산물은 함량이 매우 크므로 콘드로이친이 부산물내에 콘드로이친황산으로 소량 있어도 추출 방법을 개발하여 콘드로이친을 추출할 수 있다면 많은 양의 콘드로이친을 생산할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 현재까지 콘드로이친의 소재로 많이 이용되어 오고 있는 원료에 비하여 식육 부산물의 경우 가격이 저렴하므로 경제적인 측면에서도 콘드로이친 소재 제조용 원료로 적합할 것으로 사료된다.

2) 돼지의 부산물

돼지의 부산물내에 함유되어 있는 콘드로이친황산 함량은 Table 5에 나타내었다. 본 실험의 결과는 돼지의 부산물 시료로 직접 분석한 결과이다. 콘드로이친황산 함량은 식도> 대장> 간, 심장의 순으로 나타났다. 췌장, 소장 및 허파에서는 콘드로이친황산이 없는 것으로 나타났다. 소 부산물에 비하여 돼지의 경우는 돼지의 식도를 제외하고는 콘드로이친황산 추출을 위한 소재로서의 가능성을 보여주는 부산물이 없었다. 현재 돼지의 늑골로부터 추출된 콘드로이친이 시판되고 있으나 돼지의 식도도 콘드로이친 소재 제조용 원료로 적합할 것으로 사료된다.

3) 닭의 부산물

닭의 부산물내에 함유되어 있는 콘드로이친황산 함량은 Table 6에

나타내었다. 본 실험의 결과는 닭의 부산물 시료로 직접 분석한 결과이다. 콘드로이친황산 함량은 간의 경우 약 1.8%를 함유하고 있었으나 그 외의 부산물에서는 모두 1% 이하의 적은 양을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 소나 돼지와는 달리 닭의 부산물은 양이 소량이므로 닭에서 추출할 수 있는 콘드로이친 함량이 소나 돼지 부산물 경우에 비하여 적을 것으로 기대된다. 그러나 닭의 경우 도계 수가 많으므로 콘드로이친 소재 원료로 닭의 간을 고려시에는 도계시 간을 적출하는데 드는 비용을 고려하여야 할 것이다.

Table 1. Proximate compositions of *beef* by-products(%)

	Moisture	Protein	Lipid	Ash	Carbohydrate ^a
Trachea	55.58 ± 0.27 ^b	8.66 ± 0.17	8.26 ± 1.66	6.38 ± 0.21	21.12
L a r g e Intestine	65.93 ± 0.61	10.29 ± 0.18	2.14 ± 0.59	0.83 ± 0.01	30.81
Liver	71.86 ± 0.26	14.69 ± 0.40	1.70 ± 0.40	1.80 ± 0.05	9.95
Pancreas	60.49 ± 0.47	7.31 ± 0.20	1.23 ± 0.12	1.13 ± 0.01	29.84
Heart	78.35 ± 0.23	9.07 ± 1.50	2.22 ± 0.31	1.11 ± 0.09	9.25
S m a l l Intestine	83.75 ± 0.30	12.63 ± 0.61	1.06 ± 0.07	1.13 ± 0.12	1.43
Lung	80.41 ± 0.84	15.38 ± 1.07	0.50 ± 0.26	1.01 ± 0.02	2.7

^aCarbohydrate = 100 -[moisture + protein + lipid + mineral]^bMean ± S. D.Table 2. Proximate compositions of *pork* by-products(%)

	Moisture	Protein	Lipid	Ash	Carbohydrate ^a
Trachea	62.22 ± 0.53 ^b	6.93 ± 0.20	8.55 ± 0.33	5.93 ± 0.01	16.37
Kidney	47.46 ± 0.45	15.24 ± 0.33	1.54 ± 0.19	1.35 ± 0.05	34.41
Liver	69.77 ± 0.01	16.86 ± 2.24	1.48 ± 0.13	1.56 ± 0.05	10.33
Heart	77.79 ± 0.33	14.55 ± 0.70	2.45 ± 0.19	1.55 ± 0.12	3.66
Spleen	77.70 ± 0.32	13.69 ± 3.88	0.53 ± 0.03	1.39 ± 0.03	6.69
Tripe	80.28 ± 1.14	9.16 ± 0.44	2.93 ± 0.08	1.29 ± 0.02	6.34
Cartilage	67.96 ± 0.36	5.63 ± 0.24	20.20 ± 0.89	2.57 ± 0.24	3.64
Large Intestine	55.86 ± 1.00	5.83 ± 0.85	30.23 ± 0.95	0.49 ± 0.02	7.59
Small Intestine	79.17 ± 0.13	13.21 ± 0.48	2.20 ± 0.32	4.94 ± 0.46	0.49
Lung	73.81 ± 0.21	17.28 ± 0.42	3.80 ± 0.32	4.54 ± 0.03	0.57
Reticulum	82.23 ± 0.23	12.32 ± 1.09	0.48 ± 0.10	1.19 ± 0.65	3.78

^aCarbohydrate = 100 -[moisture + protein + lipid + mineral]^bMean ± S. D.

Table 3. Proximate compositions of *chick* by-products(%)

	Moisture	Protein	Lipid	Ash	Carbohydrate ^a
Liver	74.93 ± 0.06 ^b	17.86 ± 0.38	1.54 ± 0.10	1.51 ± 0.25	4.16
Spleen	77.65 ± 0.19	13.38 ± 1.17	2.47 ± 0.59	1.51 ± 0.07	4.99
Lung	76.94 ± 0.58	10.54 ± 0.13	2.64 ± 0.38	1.12 ± 0.04	8.76
Gizzard	80.75 ± 3.8	14.38 ± 0.33	0.94 ± 0.27	1.18 ± 0.06	3.75
Small Intestine	80.03 ± 0.27	12.55 ± 0.35	3.98 ± 0.57	1.46 ± 0.06	1.98
Large Intestine	70.49 ± 0.35	11.94 ± 1.07	12.74 ± 0.26	1.12 ± 0.04	3.71
Heart	70.65 ± 1.07	11.96 ± 0.18	5.55 ± 0.14	1.34 ± 0.05	10.5

^aCarbohydrate = 100 - [moisture + protein + lipid + mineral]

^bMean ± S. D.

Table 4. Chondroitin sulfate(ChS) contents of *beef* by-products(%)

	ChS ^a	Moisture	ChS [Dry basis] ^b
Trachea	1.86 ± 1.04 ^c	62.22 ± 0.53	4.92 ± 0.89
Kidney	0	47.46 ± 0.45	0
Liver	4.37 ± 0.01	69.77 ± 0.01	13.83 ± 0.01
Heart	1.43 ± 0.17	77.79 ± 0.33	6.44 ± 0.25
Spleen	0.97 ± 0.02	77.70 ± 0.32	4.35 ± 0.17
Tripe	4.45 ± 0.53	80.28 ± 1.14	22.57 ± 0.84
Cartilage	2.21 ± 0.003	67.96 ± 0.36	6.90 ± 0.09
Large Intestine	1.55 ± 0.09	55.86 ± 1.00	3.51 ± 0.56
Small Intestine	0	79.17 ± 0.13	0
Lung	0	73.81 ± 0.21	0
Reticulum	1.49 ± 0.13	82.23 ± 0.23	8.38 ± 0.18

^aChondroitin sulfate contents(%) of wet weight of sample

^bChondroitin sulfate contents(%) of dry weight of sample

^cMean ± S. D.

Table 5. Chondroitin sulfate(ChS) contents of *pork* by-product(%)

	ChS ^a	Moisture	ChS [Dry basis] ^b
Trachea	1.86 ± 1.04 ^c	62.22 ± 0.53	4.92 ± 0.89
Kidney	0	47.46 ± 0.45	0
Liver	4.37 ± 0.01	69.77 ± 0.01	13.83 ± 0.01
Heart	1.43 ± 0.17	77.79 ± 0.33	6.44 ± 0.25
Spleen	0.97 ± 0.02	77.70 ± 0.32	4.35 ± 0.17
Tripe	4.45 ± 0.53	80.28 ± 1.14	22.57 ± 0.84
Cartilage	2.21 ± 0.003	67.96 ± 0.36	6.90 ± 0.09
Large Intestine	1.55 ± 0.09	55.86 ± 1.00	3.51 ± 0.56
Small Intestine	0	79.17 ± 0.13	0
Lung	0	73.81 ± 0.21	0
Reticulum	1.49 ± 0.13	82.23 ± 0.23	8.38 ± 0.18

^aChondroitin sulfate contents(%) of wet weight of sample

^bChondroitin sulfate contents(%) of dry weight of sample

^cMean ± S. D.

Table 6. Chondroitin sulfate(ChS) contents of *chick* by-product(%)

	ChS ^a	Moisture	ChS [Dry basis] ^b
Trachea	9.7 ± 0.21 ^c	55.58 ± 0.27	21.8 ± 0.29
Large Intestine	1.22 ± 0.002	65.93 ± 0.61	3.58 ± 0.40
Liver	0.73 ± 0.08	71.86 ± 0.26	2.59 ± 0.31
Spleen	0	60.49 ± 0.47	0
Heart	0.62 ± 0.05	78.35 ± 0.23	2.86 ± 0.19
Small Intestine	0	83.75 ± 0.30	0
Lung	0	80.41 ± 0.84	0

^aChondroitin sulfate contents(%) of wet weight of sample

^bChondroitin sulfate contents(%) of dry weight of sample

^cMean ± S. D.

다 . 효소에 따른 콘드로이친 수율

1) Alcalase 0.6L에 의한 효소가수분해

식육부산물(소간, 소식도, 소양, 돼지간, 돼지식도 및 돼지대장)을 2% alcalase 0.6L로 액화시킨 결과 최대 수율과 콘드로이친 함량을 나타내는 시간은 Table 7과 같다. 반응 시간이 길어짐에 따라 모든 시료의 수율과 콘드로이친 함량은 증가하는 경향을 보여, 반응 24~48시간 범위에서 최대량을 보였다(Fig. 2~7). 식육 부산물 중에서 소간은 반응시간에 따른 증가의 폭은 적었으나 반응 24시간 기준에서의 수율(86.5%)과 콘드로이친 함량(16.8%)이 가장 높았으며(Fig. 2), 그 다음으로 소식도(12.7%)(Fig. 4), 돼지간(7.3%)(Fig. 5) 순이었다.

2) Bromelain에 의한 효소가수분해

식육부산물(소간, 소식도, 소양, 돼지간, 돼지식도 및 돼지대장)을 2% bromelain으로 48시간동안 액화시킨 결과는 Table 7 및 Fig. 8~13와 같다. 소양, 소식도 및 돼지식도는 반응시간이 길어질수록 수율과 콘드로이친 함량이 증가하였으나, 나머지 시료에서는 12시간까지 증가했다가 다시 감소하였다. 효소반응 12시간째에 소간의 콘드로이친 함량이 16.8%로 가장 높게 나타났으며(Fig. 8), 돼지간은 반응 6시간째에 13.9%를(Fig. 11), 소식도는 반응 24시간에서 11.6%를 나타내었다(Fig. 10). 또한, 소간과 돼지간은 모든 반응시간에서의 수율이 80%이상을 보임으로써, 식물성 단백질분해효소인 bromelain이 alcalase처리시 보다 콘드로이친 추출이 신속히 진행되는 경향을 보였다.

3) Trypsin에 의한 효소가수분해

식육부산물(소간, 소식도, 소양, 돼지간, 돼지식도 및 돼지대장)을 소화효소의 일종인 trypsin(2%, w/w, dry basis)으로 액화시킨 결과는 Table 7 및 Fig. 14~19와 같다. 소간, 소식도 및 돼지식도에서 효소반응이 길어질수록 수율과 콘드로이친 함량의 지속적인 증가를 보였다. 효소

반응 24시간 기준에서의 콘드로이친 함량은 소간(14.4%), 돼지간(9.4%), 소식도(8.5%)의 순으로 나타나 alcalase나 bromelain 처리시와 순서는 같았으나 추출된 콘드로이친 함량은 낮았다.

4) 30분간 열처리 후 효소가수분해

시료조직을 연화시킴으로써 보다 효율적인 콘드로이친 추출을 위해 고압멸균기로 30분간 열처리한 후, 24시간동안 효소반응을 시킨 결과는 Table 8과 같다. 열처리한 후 효소가수분해방법은 효소가수분해 단독 처리시 보다 2배에서 많게는 6배 이상의 콘드로이친 추출효율이 증가하였으며, 부위별로는 소간과 돼지간에서 전반적으로 높은 콘드로이친 함량(28.8 ~ 53.7%)을 나타내었다. 또한 단백분해효소의 종류로는 alcalase 처리시 전반적으로 모든 시료에서의 효율이 높았다.

5) 마. 1시간 열처리 후 효소가수분해

콘드로이친 추출을 더욱 효율적으로 하기 위하여, 고압멸균기에서의 열처리시간을 1시간으로 연장한 후, 24시간동안 효소반응을 시킨 결과는 Table 9와 같다. 소간(bromelain, 81.9%) > 소간(trypsin, 70.5%) > 소간(alcalase, 66.9%) > 돼지식도(alcalase, 56.5%) > 소식도(alcalase, 51.9%) > 돼지간(bromelain, 46.4%) > 돼지간(alcalase, 42.3%) > 돼지위장(alcalase, 41.5%)순으로 콘드로이친 함량이 높았다. 이처럼 열처리시간을 30분에서 1시간으로 연장했을 때 추출효율이 증가하는 폭이 부위별, 효소별로 다르게 나타났으며, 부위별로는 모든 효소의 소간에서 추출효율이 증가하였으며, 효소로는 alcalase 처리시 소위를 제외하고 모든 시료에서 열처리 시간 연장의 효과가 나타났다. 이와 같은 결과는 소간, 돼지간, 소식도가 콘드로이친 추출 소재로써 손색이 없으며, 추출에 사용되는 단백분해효소는 가격대비 alcalase가 가장 효율적임을 시사하였다.

6) 2시간 열처리 후 효소가수분해

고압멸균기로 2시간 열처리한 후, 24시간 동안 효소반응을 시킨 결과는 Table 10과 같다. 열처리 시간을 2시간까지 연장했을 때의 콘드로이친 추출 효율은 더 이상 증가하지 않았으므로 시료의 가열처리시간은 경제성, 편의성 및 수율면에서 1시간 이하의 열처리가 적당한 것으로 사려되었다. 세 효소 모두 소간에서 콘드로이친 함량이 가장 높았으며(66.9 ~ 69.5%), 그 다음으로 소식도(alcalase, 50.6%) > 돼지간(bromelain, 48.0%) > 돼지간(alcalase, 47.7%)의 순으로 나타나 소간, 소식도 및 돼지간이 콘드로이친 추출 소재로써 적합한 것을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

7) 1시간 열처리 후 6% 효소가수분해

시료를 1시간 열처리한 후 단백질분해효소를 3배 증가한 양인 6%되게 첨가한 후 24시간 반응시킨 결과는 Table 11과 같다. 세 단백질분해효소로 가수분해했을 때 소간에서 역시 가장 높은 콘드로이친 함량(62.8 ~ 79.9%)을 나타내었으나, 효소량을 증가시키는데 따른 수율 및 콘드로이친 함량 증가는 나타나지 않았으므로 최적의 효소량은 2%임을 알 수 있었다.

Table 7. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of meat by-products by 2% proteases (%)

Protease		Yield	ChS [Max. time, hrs]	Enzyme Price
Alcalase 0.6L	BL ¹⁾	86.54	16.80 [24]	8.6\$/kg
	BT ²⁾	85.96	12.71 [48]	
	BS ³⁾	89.21	3.89 [48]	
	PL ⁴⁾	83.00	7.34 [12]	
	PT ⁵⁾	89.74	4.85 [48]	
	PLI ⁶⁾	68.05	4.05 [24]	
Bromelain	BL	84.13	16.80 [12]	441.5\$/kg
	BT	65.32	11.56 [24]	
	BS	74.07	3.71 [24]	
	PL	87.06	13.92 [6]	
	PT	71.43	4.85 [48]	
	PLI	66.56	4.64 [6]	
Trypsin	BL	84.13	14.42 [24]	542.4\$/10g
	BT	65.32	8.53 [48]	
	BS	68.44	1.94 [12]	
	PL	84.66	9.41 [24]	
	PT	67.46	4.56 [24]	
	PLI	70.52	3.03 [24]	

¹⁾BL-beef liver, ²⁾BT-beef trachea, ³⁾BS-beef stomach, ⁴⁾PL-pork liver, ⁵⁾PT-pork trachea, ⁶⁾PLI-pork large intestine. []: Incubation Time(hrs.)

Table 8. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents in hydrolysates of meat by-products by 2% proteases after 30min autoclaving (%)

		Alcalase	Bromelain	Trypsin
		Yeild [ChS]	Yeild [ChS]	Yeild [ChS]
	Liver	75.8 [53.68]	73.4 [44.34]	67.4 [48.23]
Beef	Trachea	68.3 [35.01]	70.9 [39.41]	62.8 [27.75]
	Stomach	71.4 [9.33]	69.1 [16.08]	68.5 [6.74]
	Liver	77.8 [42.27]	78.8 [47.45]	75.5 [28.78]
Pork	Trachea	71.3 [32.41]	60.1 [27.23]	63.2 [27.75]
	Stomach	63.3 [28.26]	65.5 [33.71]	60.2 [24.63]

Table 9. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents in hydrolysates of meat by-products by 2% proteases after 1hrs autoclaving (%)

		Alcalase	Bromelain	Trypsin
		Yeild [ChS]	Yeild [ChS]	Yeild [ChS]
	Liver	69.1 [66.90]	69.1 [81.94]	67.3 [70.53]
Beef	Trachea	76.4 [51.86]	67.3 [37.34]	61.8 [27.75]
	Stomach	71.8 [10.89]	66.4 [27.49]	65.5 [3.11]
	Liver	76.4 [42.27]	71.8 [46.41]	76.4 [28.78]
Pork	Trachea	81.8 [56.53]	50.9 [25.41]	68.2 [25.15]
	Stomach	59.1 [41.49]	65.5 [28.52]	58.2 [19.45]

Table 10. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents in hydrolysates of meat by-products by 2% proteases after 2hrs autoclaving(%)

		Alcalase	Bromelain	Trypsin
		Yeild [ChS]	Yeild [ChS]	Yeild [ChS]
	Liver	77.7 [69.49]	74.2 [66.90]	69.8 [68.71]
Beef	Trachea	85.3 [50.56]	63.9 [39.93]	64.4 [29.04]
	Stomach	69.7 [6.74]	64.2 [29.04]	61.0 [7.78]
	Liver	78.4 [47.71]	70.5 [47.97]	74.8 [32.15]
Pork	Trachea	79.6 [41.23]	60.2 [25.67]	70.1 [23.08]
	Stomach	63.1 [24.89]	64.9 [29.56]	60.3 [17.11]

Table 11. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents in hydrolysates of meat by-products by 6% proteases after 1hrs autoclaving(%)

		Alcalase	Bromelain	Trypsin
		Yeild [ChS]	Yeild [ChS]	Yeild [ChS]
	Liver	72.7 [79.86]	69.1 [68.20]	67.3 [62.75]
Beef	Trachea	86.4 [32.67]	67.3 [37.34]	61.8 [27.75]
	Stomach	86.4 [16.60]	66.4 [27.49]	65.5 [3.11]
	Liver	61.8 [26.71]	71.8 [46.41]	76.4 [28.78]
Pork	Trachea	81.8 [42.27]	50.9 [25.41]	68.2 [25.15]
	Stomach	68.2 [46.41]	65.5 [28.52]	58.2 [19.45]

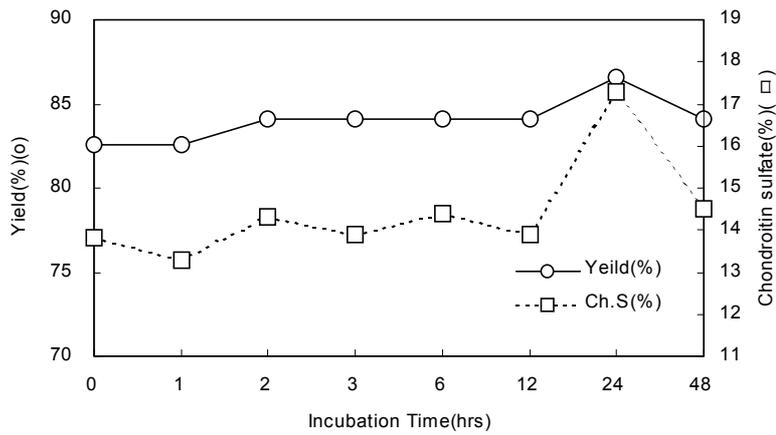


Fig. 2. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of beef liver by alcalase. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 9.0) contained 2%(dry basis) alcalase 0.6L for 48hrs at 55°C.

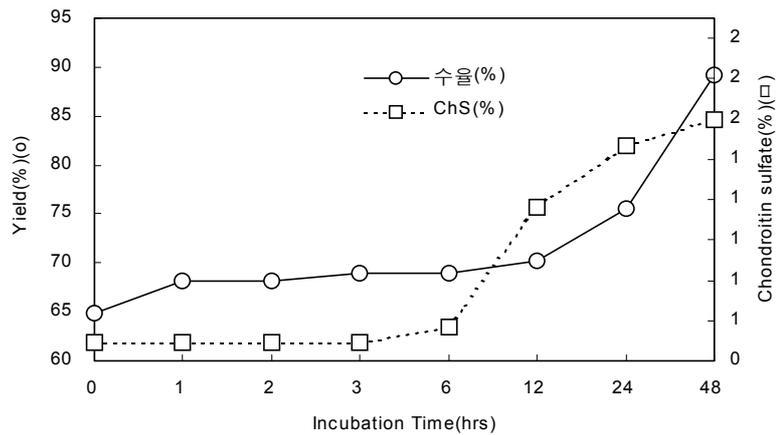


Fig. 3. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of beef stomach by alcalase. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 9.0) contained 2%(dry basis) alcalase 0.6L for 48hrs at 55°C.

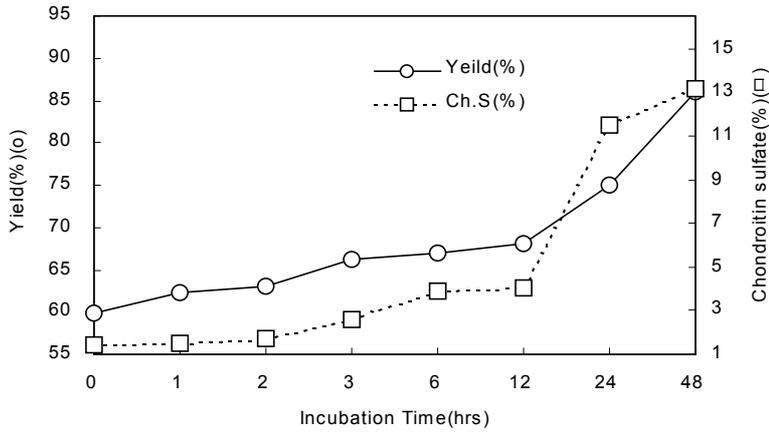


Fig. 4. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of beef trachea by alcalase. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 9.0) contained 2%(dry basis) alcalase 0.6L for 48hrs at 55°C.

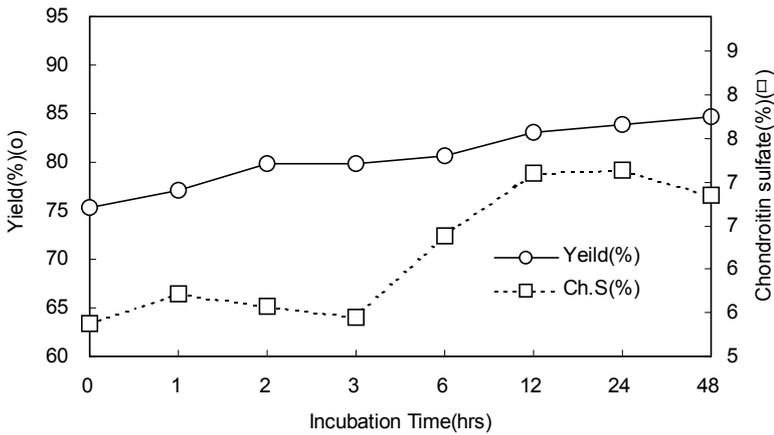


Fig. 5. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of pork liver by alcalase. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 9.0) contained 2% (dry basis) alcalase 0.6L for 48hrs at 55°C.

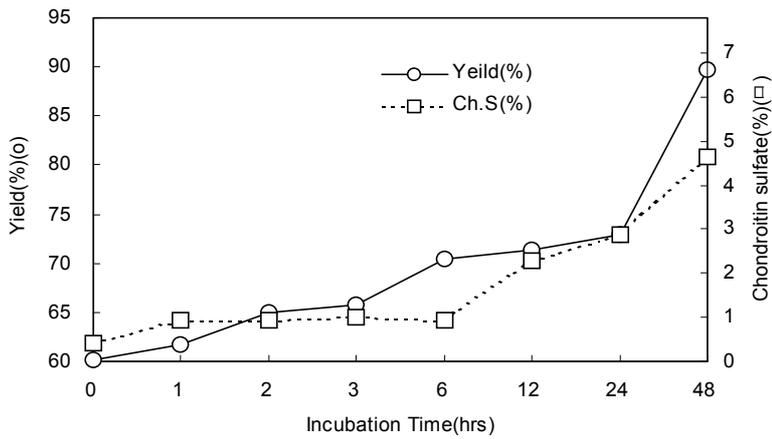


Fig. 6. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of pork trachea by alcalase. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 9.0) contained 2%(dry basis) alcalase 0.6L for 48hrs at 55°C.

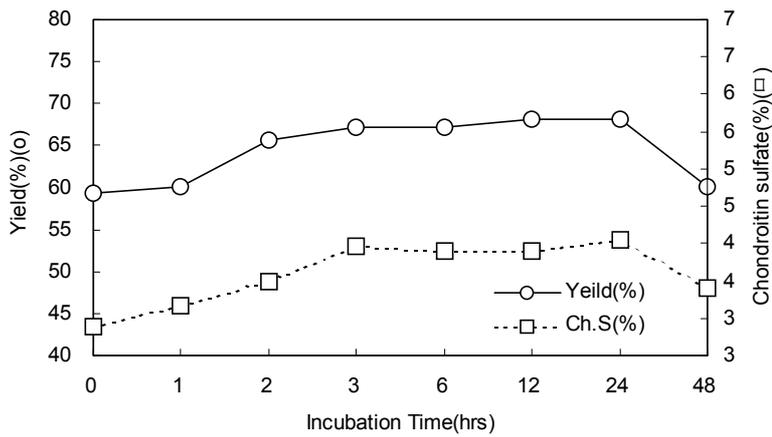


Fig. 7. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of pork large intestine by alcalase. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 9.0) contained 2%(dry basis) alcalase 0.6L for 48hrs at 55°C.

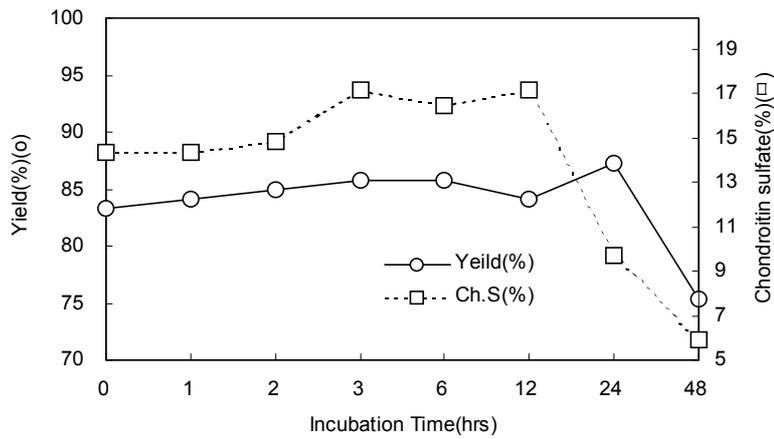


Fig. 8. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of beef liver by bromelain. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 4.5) contained 2%(dry basis) bromelain for 48hrs at 45°C

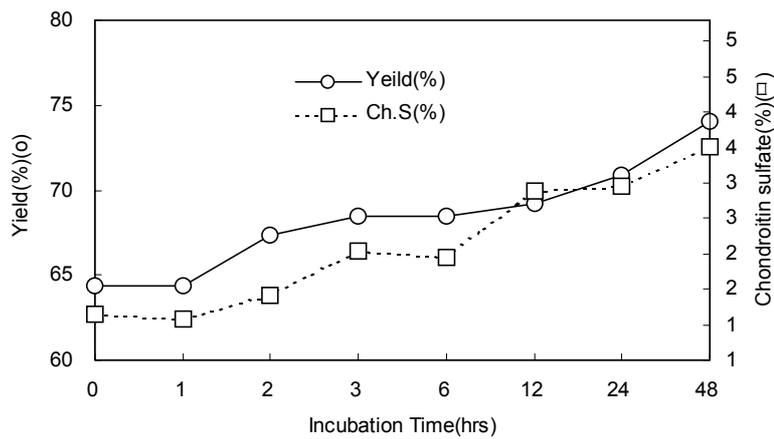


Fig. 9. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of beef stomach by bromelain. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 4.5) contained 2%(dry basis) bromelain for 48hrs at 45°C.

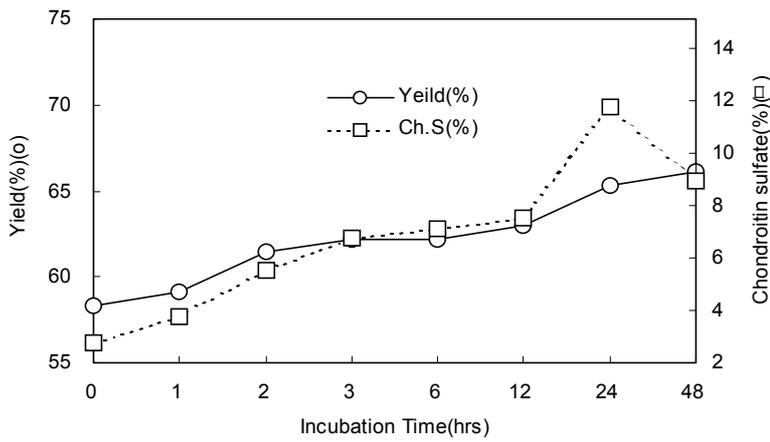


Fig. 10. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of beef trachea by bromelain. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 4.5) contained 2%(dry basis) bromelain for 48hrs at 45°C.

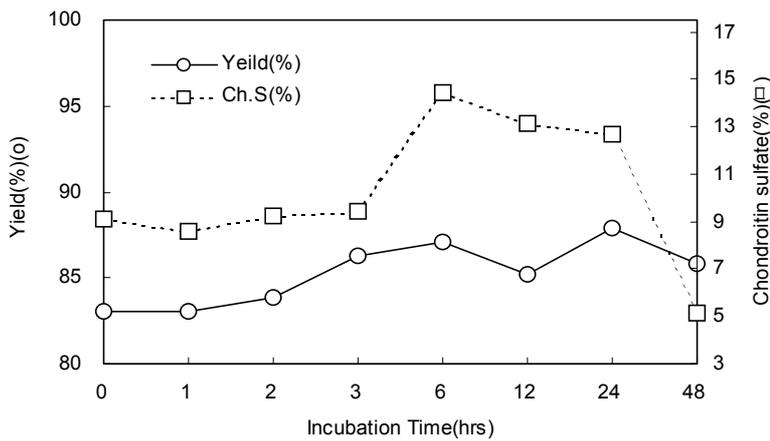


Fig. 11. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of pork liver by bromelain. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 4.5) contained 2%(dry basis) bromelain for 48hrs at 45°C.

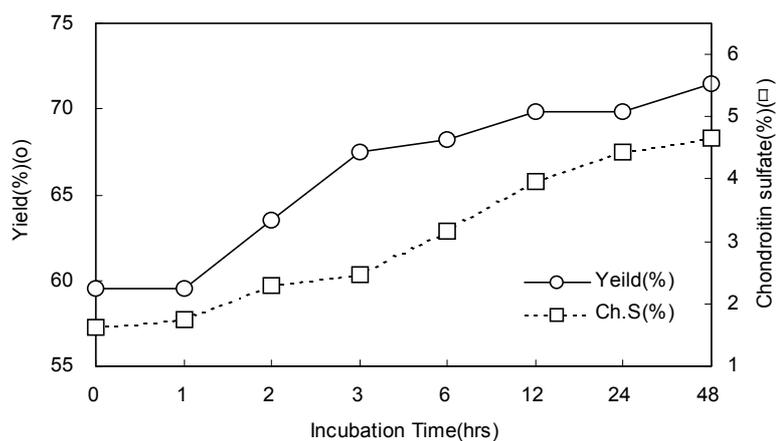


Fig. 12. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of pork trachea by bromelain. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 4.5) contained 2%(dry basis) bromelain for 48hrs at 45°C.

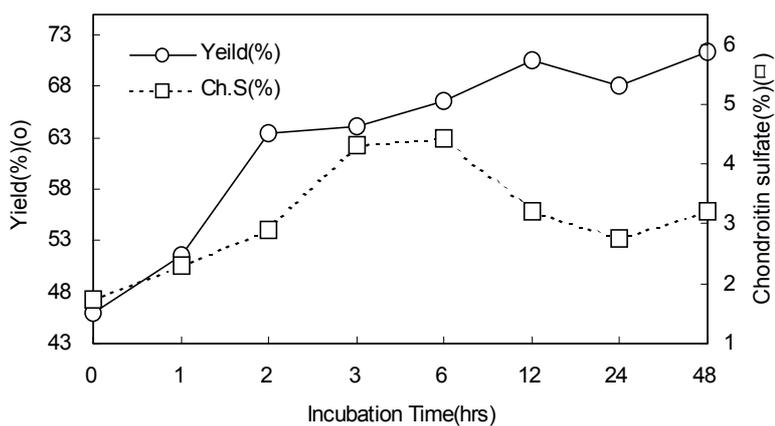


Fig. 13. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of pork large intestine by bromelain. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 4.5) contained 2%(dry basis) bromelain for 48hrs at 45°C.

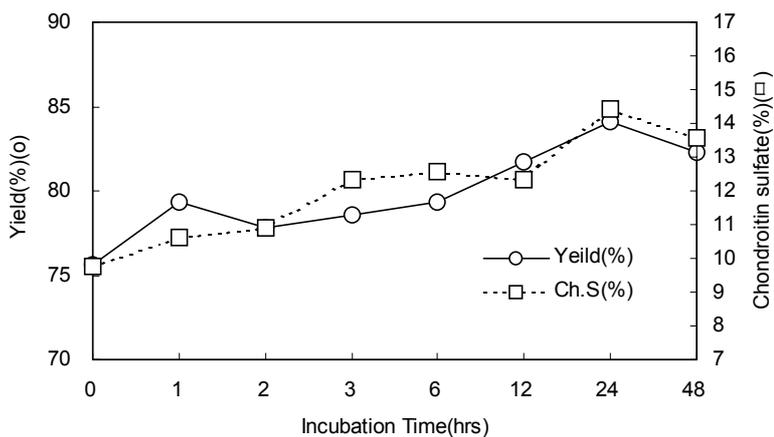


Fig. 14. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of beef liver by trypsin. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 7.5) contained 2%(dry basis) trypsin for 48hrs at 25°C.

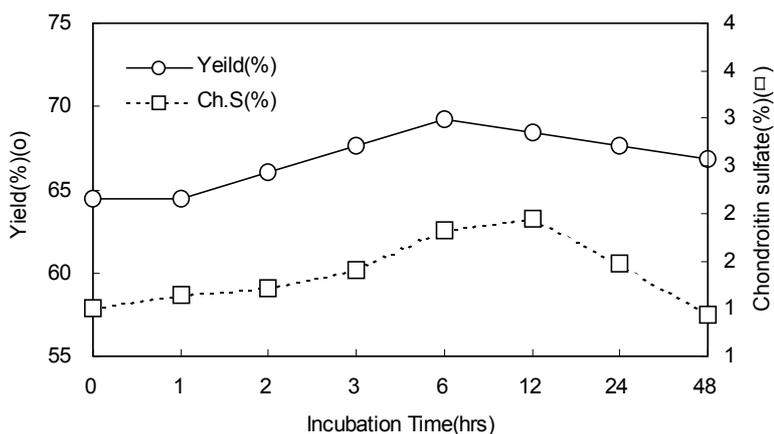


Fig. 15. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of beef stomach by trypsin. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 7.5) contained 2%(dry basis) trypsin for 48hrs at 25°C.

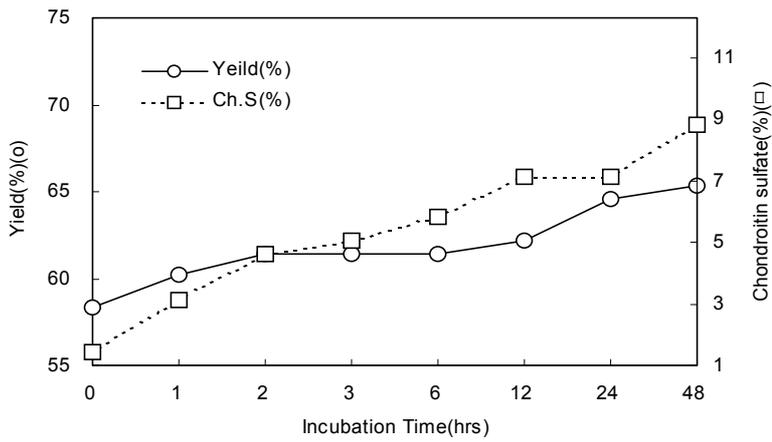


Fig. 16. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of beef trachea by trypsin. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 7.5) contained 2%(dry basis) trypsin for 48hrs at 25°C

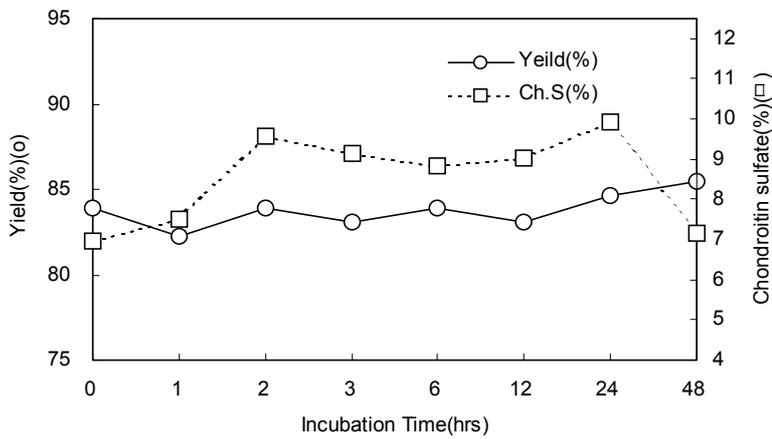


Fig. 17. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of pork liver by trypsin. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 7.5) contained 2%(dry basis) trypsin for 48hrs at 25°C.

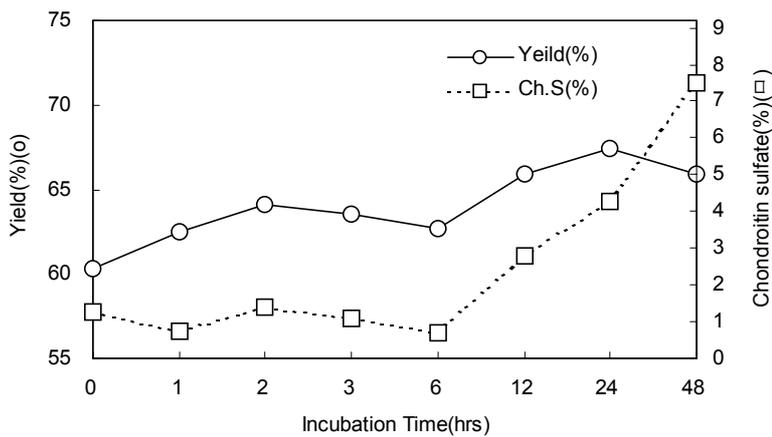


Fig. 18. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of pork trachea by trypsin. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 7.5) contained 2%(dry basis) trypsin for 48hrs at 25°C.

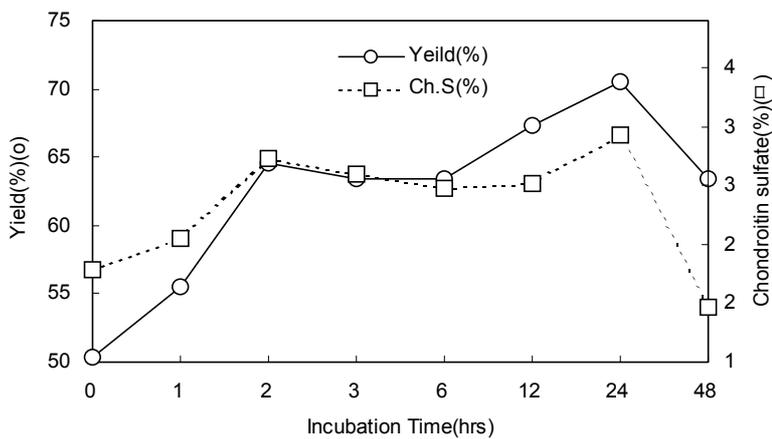


Fig. 19. Yields and chondroitin sulfate(ChS) contents of hydrolysates of pork large intestine by trypsin. Tissue homogenates were hydrolysed in 10 volumes(v/w) of buffer(pH 7.5) contained 2%(dry basis) trypsin for 48hrs at 25°C

라 . 급속동결건조물의 일반성분 분석

1, 2차년도 연구결과 콘드로이친의 우수한 소재로 판명된 소간, 소식도, 돼지간 및 돼지식도를 선정하여 1시간 열처리 후 2% alcalase 효소를 첨가하여 24시간 콘드로이친을 추출하였다. 추출된 콘드로이친은 급속동결건조하여 분말형태로 가공한 다음 식품첨가물이나 의약품 및 화장품 원료의 기준에 부합하는지의 여부를 알아보기 위하여 단백질 및 회분 정량을 실시하였다. 그 결과는 Table 12와 같다. 동결건조후의 수율은 소식도(3.2%) > 소간(2.9%) > 돼지간(2.5%) > 돼지식도(2.0%)의 순으로 나타났으며, 수분함량은 소간(18.5%) > 돼지간(11.2%) > 돼지식도(7.2%) > 소식도(3.2%)의 순으로 크게 나타났다. 단백질 함량은 소식도에서 39.2%로 가장 높았으며 소간에서 31.0%로 가장 낮은 값을 보였다. 회분 함량 역시 소식도에서 4.8%로 가장 높은 값을, 소간에서 4.1%로 가장 낮은 값을 나타내었다. 현재 의약품 및 화장품의 원료로 적합한 단백질, 회분 함량 기준은 단백질 20%이하, 회분 30%이하이며, 식품첨가물의 원료 기준은 단백질 40%이하, 회분 5%이하로서 본 실험에서 사용된 모든 식육 부산물의 동결건조 분말의 단백질과 회분 함량은 식품첨가물의 원료로 적합한 것으로 나타났다.

Table 12. Yeild, moisture, protein and ash contents in lyophilized powder of enzyme hydrolysate of meat by-products(%)

	Yeild	Moisture	Protein	Ash
Beef Liver	2.9	18.5	31.0	4.1
Beef Trachea	3.2	3.2	39.2	4.8
Pork Liver	2.5	11.2	33.7	4.2
Pork Trachea	2.0	7.2	34.4	4.3

마 . ACE(angiotensin I converting enzyme) 저해활성

고혈압은 주로 레닌-안지오텐신계에 의한 생리 생화학적 기전으로 설명되고 있으며 고혈압의 직접적인 억제를 위하여 안지오텐신 전환효소의 활성을 억제할 수 있는 물질에 초점이 맞추어져 있다. 식품관련 분야에서의 ACE 저해제로서는 우유(9-11), 대두(12), 옥수수(13), 정어리(14), 참치 등의 단백질 가수분해물(15), 돼지혈장(16)에서 분리된 peptide 등의 주로 C말단에 proline을 가지는 peptide류, 감귤 및 과실류의 flavonoid 배당체류(17), 차성분의 카테킨류(18) 등을 들 수 있다. 그러나 이들 성분은 천연물이라는 측면에서 안전성이 높지만 ACE 저해에 대한 역가가 Captopril보다 최소한 20배 이상 낮아 강력한 ACE 저해능을 가지는 천연물질에 대한 탐색이 지속적으로 이루어지고 있다. 한편 ACE 활성기작을 기초로 aminosugar로 널리 알려진 콘드로이친의 구조 및 화학적인 특성이 ACE inhibitor로서 작용할 수 있을 것으로 예상되고 있으나 이에 관한 보고는 거의 없다.

따라서 1, 2차년도 연구결과에서 콘드로이친의 우수한 소재로 판명된 소간, 소식도, 돼지간 및 돼지식도로부터 가장 효율적인 방법으로 선정된 열처리-효소 병행법으로 콘드로이친을 추출하고 ACE 저해활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 20에서와 같이 비교적 우수한 저해활성을 나타내었다. 즉 저해제 1mM 농도에서 소식도와 돼지식도에서 62%, 65%의 저해를 나타내었으며, 소간과 돼지간에서는 73%, 75%의 저해를 나타내어 소식도와 돼지식도보다 우수한 저해효과를 나타내었다($p < 0.05$).

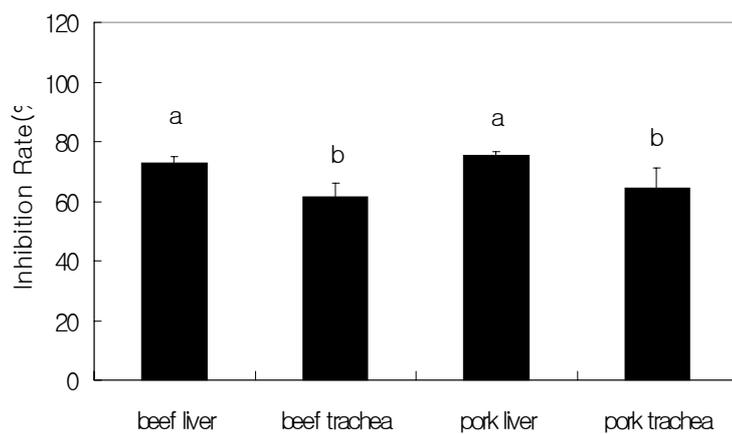


Fig. 20. Inhibition of ACE by chondroitin sulfate(ChS) extracts¹⁾ from meat by-products. ¹⁾The concentration of the extracts was 1mM.

바 . MTT assay 결과

소간, 소식도, 돼지간 및 돼지식도로부터 추출된 콘드로이친의 세포독성을 HepG2 및 SNU-16 cell을 이용하여 측정한 결과는 Table 13에 나타내었다. HepG2 cell에 대한 소간, 소식도, 돼지간 및 돼지식도 콘드로이친의 세포독성은 각각 31.5%, 29.4%, 28.6%, 21%로 나타났으며, SNU-16 cell에 대한 세포독성은 각각 44.6%, 36.4%, 33.2%, 27.7%로 나타났다. 소간의 콘드로이친은 두 암세포주 모두에서 가장 높은 세포독성을 나타내었으며 돼지식도에서 가장 낮은 세포독성을 보였다. 한편, 식육부산물로부터 추출한 콘드로이친은 간암세포인 HepG2 보다는 위암세포인 SNU-16 cell에서 보다 강한 세포독성을 나타내었다. 최근 문 등(19)은 해삼에서 추출한 당단백질과 황산콘드로이친이 human colon carcinoma cell(HT-29)과 human gastric cell(AZ-521)의 성장에 미치는 저해효과를 검토한 보고에서 해삼의 종류와 분획방법에 관계없이 5%까지 농도증가에 따라 결장암세포인 HT-29의 성장을 89 ~ 95%까지 저해시키는 항암효과를 나타내었고, AZ-521의 위암세포는 82 ~ 92%까지 성장을 억제시켰다고 보고하였다. 본 연구에서의 저해효과를 소재, 추출방법 및 정제도가 다른 문 등의 결과와 직접 비교하기는 어려우나 식육부산물로부터 추출된 콘드로이친의 암세포에 대한 독성효과를 확인하였으므로 소간, 소식도, 돼지간 및 돼지식도로부터 추출된 콘드로이친은 향후 의약품 개발로 이어질 수 있는 가능성을 제시하였다.

Table 13. Comparison of inhibitory effect of extracts from meat by-products on the growth of HepG2 and SNU-16 cells using MTT assay

Extracts ¹⁾	Growth Inhibition Rate (%)	
	HepG2	SNU-16
Beef Liver	31.5	44.6
Beef Trachea	29.4	36.4
Pork Liver	28.6	33.2
Pork Trachea	21.0	27.7

¹⁾The concentration of the extracts was 500 μ g/ml

4 . 결론

1) 저급 식육자원 단백질인 소, 돼지 및 닭의 부산물들 중의 콘드로이친 함량을 각각 측정된 결과 소 부산물의 콘드로이친함량이 돼지와 닭의 부산물보다 많았다. 소 부산물들 중에서 콘드로이친 함량은 간, 양(약 4.5%) > 식도, 연골(약 2.0%) > 심장, 대장, 천엽(약 1.5%) > 지레(약 1.0%)의 순으로 나타났으며, 돼지 부산물의 경우는 식도 > 대장 > 간의 순으로 나타났다. 따라서, 저급 식육자원인 식육 부산물중에서는 소 간, 소식도, 소양, 돼지간, 돼지식도 및 돼지대장이 콘드로이친 소재로써의 가능성을 보여주었다. 콘드로이친 함량을 측정하기 위하여 Nishino와 Nagumo에 의한 방법과 식품공전에 나와 있는 글루쿠론산 정량법을 비교 분석한 결과 글루쿠론산 정량법에 의한 분석 방법이 더 유효한 것으로 나타났다.

2) 소간, 소 식도, 소양, 돼지간, 돼지식도 및 돼지대장으로부터 다양한 액화방법과 단백질분해효소를 사용한 결과 열처리와 효소가수분해를 병행하여 추출하는 방법이 가장 효율적이었다. 콘드로이친을 추출하는 방법으로는 1시간 열처리한 후 건물대비 2%의 alcalase를 첨가하여 24시간

추출방법이 경제성, 편의성, 효율성면에서 가장 우수하였다. 개발된 추출 방법으로 콘드로이친을 추출할 경우 소간이 가장 우수한 콘드로이친 소재로써 판명되었고, 소 식도와 돼지 식도에서도 50%이상의 콘드로이친이 추출되었다.

3) 소간, 소식도, 돼지간 및 돼지식도에 추출된 콘드로이친을 동결건조하여 분말화 하고 일반성분 분석을 실시한 결과, 모든 시료에서 단백질 40%이하, 회분 5%이하로써 추출된 콘드로이친은 식품첨가물의 원료로써 적합한 것으로 나타났다. 추출된 콘드로이친의 제품개발을 위한 기능성 검증으로 ACE저해활성을 측정된 결과 1mM 농도의 모든 시료에서 62%이상의 저해효과를 나타내었으며, 소간과 돼지간에서는 각각 73%, 75%의 우수한 저해를 나타내어 고혈압 예방과 치료를 위한 제품개발의 가능성을 나타내었다. 추출된 콘드로이친의 간암(HepG2) 및 위암(SNU-16)세포에 대한 세포독성 측정 결과, 소간에서 추출된 콘드로이친이 두 암세포주 모두에서 가장 높은 세포독성을 나타내었으며 돼지식도에서 가장 낮은 세포독성을 나타내었다. 또한, 추출된 콘드로이친은 간암세포보다는 위암세포에서 보다 강한 세포독성을 나타내었다.

제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

구분	연구 개발 목표	달성도 및 기여도(ƒ)
2차년도 (2001)	○ 펩타이드 효능검정 (혈압저하 효과 검정)	In vitro 실험으로 효과가 검증된 펩타이드의 SHR(Spontaneously Hypertensive Rat)을 통한 임상 실험으로 ACE 억제 펩타이드의 기능 조사 (ƒ) 분리된 펩타이드의 ACE 억제 기능을 동물실험을 통하여 확인
	○ 노폐계육 펩타이드의 생리활성 기능적 특성조사	원료 펩타이드의 동물실험을 통한 피부기능성 및 안전성(항산화, 주름 개선 등)조사, 평가 (ƒ) 항산화 펩타이드의 기능을 동물실험을 통하여 확인하고 안정성 평가
	○ 콘드로이친의 추출 및 정제기술 개발	콘드로이친 추출 및 정제 기술 연구(효소종류를 변경, 열처리 조건의 변경, 정제시 편이성 고려) (ƒ) 콘드로이친의 추출과 정제 기술의 개발

구분	연구개발목표	달성도 및 기여도(<i>f</i>)
1차년도 (2000)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 효소를 이용하여 저급 식육 단백질 분해조건 확립 ○ 펩타이드의 성질 규명 	<p>여러 가지 상업용 효소중에서 최적의 단백질 분해능을 갖는 효소의 규명 (최적의 분해 온도 설정, 적절한 pH 조절)</p> <p>펩타이드의 사이즈와 서열을 조사하고 펩타이드의 아미노산 조성 조사</p> <p>(<i>f</i>) ACE 억제 효과를 갖는 펩타이드의 분리 및 서열확인</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 노폐계육으로부터의 펩타이드 생산조건 확립 및 특성 파악 	<p>노폐계육으로부터 펩타이드 생산효소 선정과 펩타이드 생산 조건 확립(효소 선정, 온도등의 조건 확립)</p> <p>다양한 펩타이드분리 및 동정</p> <p>(<i>f</i>) 노폐계육을 효소 분리하여 향산화 펩타이드 분리 조건의 확립</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식육부산물에서의 콘드로이친의 함량 분석 	<p>콘드로이친 분포 실태 조사</p> <p>돼지 및 소의 각종 부산물 종류별 콘드로이친 함량 분석</p> <p>(<i>f</i>) 식육 부산물내의 콘드로이친 함량 확인</p>

구분	연구개발목표	달성도 및 기여도(%)
3차년도 (2002)	○ 저급 식육의 생리활성 펩타이드의 저장가공 적성 연구	추출된 펩타이드의 저장조건에(열처리, pH, 저장기간) 따른 안정성 조사 (%) 저장 기간동안 변성은 없었으나 변성이 될 수 있는 온도조건 확립
	○ 노폐계 펩타이드를 활용한 건강보조식품 및 부원료 개발	노폐계 펩타이드 및 유사화학구조 화합물을 주성분으로 하는 기능성(피부노화 방지)화장품의 개발 (%) 기능성화장품의 개발
	○ 기능성 제품을 위한 콘드로이친의 적용기술 개발	추출된 콘드로이친을 식품에 적용하기 위한 액체상, 분말형태 가공 적성 연구 (%) 콘드로이친의 식품적용을 위한 가공 조건 확립

제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획

1. 식육부산물로부터 ACE 억제 기능을 갖는 펩타이드의 생산조건 확립과 저장 기간 동안의 안정성
2. 노폐계로부터 항산화기능을 갖는 펩타이드 생산조건
3. 식육 부산물로부터 콘드로이친의 추출방법과 수율을 증가시키는 방법

이상의 결과들은 식육의 부산물에서 부가가치가 높은 기능성 물질의 생산기술의 개발에 기여했다고 판단된다. 즉, 식육부산물을 효소로 분해시켜 혈압상승 억제 펩타이드의 분리가 가능하고 이 펩타이드의 그 외 다른 생체조절 기능의 스크리닝을 통한 기능성의 개발을 통해서 기능성 제품의 개발이 가능하고 또한 노폐계에서는 효소분해된 단백질에서 항산화기능을 갖는 펩타이드를 분리하여 이를 이용한 화장품의 개발이 가능하도록 조건을 설립하였다. 콘드로이친의 경우도 국내산 원료에서 직접 콘드로이친을 추출하고 정제하여 건강보조식품, 화장품 및 의약품업계의 콘드로이친 원료에 대한 수요 충족과 대외 수출로써 고부가가치를 창출할 수 있는 가능성이 크다고 생각된다. 또한 이들 펩타이드의 특허출원을 통한 지적재산의 효과도 있다.

그러나 이 모든 결과를 산업체에 이전하여 대량 생산 기술의 개발에 들어가 실용화하기 전에 그동안의 연구결과와 국외의 선진기술을 종합하여 정밀한 검증이 선행되어야 한다고 판단된다.

제 6 장 연구 개발 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

1. Matsui Toshiro, Yukiyooshi Akiko, Doi Shima, Sugimoto Hiroyuki, Yamada Hideo, Matsumoto Kiyoshi. 2002. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *J. Nutritional Biochemistry* 13
2. Byun, Hee-Guk and Se-Kwon Kim. 2002. Structure and activity of Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from Alaskan pollack skin. *J. Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 35, No. 2, 239-243
3. Vermeirssen Vanessa, Jhon Van Camp, Verstraete Willy. 2002. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J. Biochem.Biophys. Methods* 51, 75-87
4. Campbell Duncan J. Molecules in focus: The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *The International journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1402. 1-8
5. Katayama K., et al., Peptide inhibitor of angiotensin I-converting enzyme derived from porcine troponin C, 48th International Congress of Meat Science and Technology, 2002 , Vol 2,994-995
6. Nishimura T et al., Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a chicken breast muscle extract. 48th International Congress of Meat Science and Technology, 2002, Vol 2, 1014-1015
7. Boreskov V.G.-MSUAB Enzymatic hydrolysis of Protein of meat at use new bio-of a Drug. 46th International Congress of Meat Science and Technology 2000. vol 1. 278-279
8. Arihara K., Nakashima Y., Ishikawa S., and Itoh, M..

Antihypertensive peptides from enzymatic hydrolysates of porcine myosin. 46th International Congress of Meat Science and Technology 2000. vol 2. 490-491

제 7 장 참고문헌

1. Mazza. G. Functional Food. 1998. Technomic publishing Co., Inc.
2. POOLE A. Robin . Proteoglycans in health and disease: structures and functions. Biochem. J. 1986 v236. 1-14.
3. Abdallah A. A. Magboul, Patrick F. Fox and Paul L. H. McSweeney . 1997. Purification and Characterization of a Proteinase from *Lactobacillus plantarum* DPC 2739. Int. Dairy Journal 7 693-700
4. Amhar, A. Tadao, S. Haruki, K. Yasushi, K. Takatoshi, I. 1998. Structural Analysis of New Antihypertensive Peptides derived from Cheese Whey Protein by Proteinase K Digestion. J. Dairy. Sci. 81 : 3131-3138
5. Lee, B, J, . D, G, Hendricks. 1997. Antioxidant Effects of L-Carnosine on Liposomes and Beef Homogenates. J. Food. Sci. V.62, No. 5
6. Yang, B. R. , A. Okitani, M. Fujimaki. 1970. Studies on Myofibrils from the Stored Muscle . Agr. Biol. Chem., Vol. 34. 1765-1772
7. Beate F. Hagen, Jean-louis berdague, Askild L. Holck, Helga Naes, and Hans Blom. 1996. Bacterial Proteinase Reduces Maturation Time of Dry fermented Sausages. J. Food. Sci. V. 61(5) P. 1024-1029
8. Benjamin K. Simpson and Norman F. Haard. 1987. Trypsin and a Trypsin-Like Enzyme from the Stomachless Cunner. Catalytic and Other Physical Characteristics. J. Agric. Food Chem. 1987. 35. 652-656
9. Zioudrou Christine , Richard A. Streaty, Werner .A. Klee. 1978 . Opioid Peptides Drived from Food Proteins. J. Biol Chem. Vol. 254. No. 7. April 10. pp. 2446-2449
10. Carrino David A. , Arnold I. Caplan 1982. Isolation and preliminary characterization of proteoglycans synthesized by skeletal muscle. J. Biol. Chem. 10, 14145-14154.
11. Morimatsu F. M. Ito. S. Budijanto. I. Watanabe. Y. Furukawa. 1996. Plasma Cholesterol- Suppressing Effect of Papain-Hydrolyzed Pork Meat in Rats fed Hypercholesterolmic Diet. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 42. 145-153
12. Slattery H. and R. J. Fitzgerald. 1998. Funtional Properties and

- Bitterness of Sodium Caseinate Hydrolysate prepared with a Bacillus Proteinase. V 63.No. 3. 418-422
13. Hau J. , D. Cazes, L. B. Fay. 1997. Comprehensive Study of the “ Beefy Meaty Peptide” .J. Agric. Food. Chem. 45. 1351-1355
 14. Lagocka J. , M. Sadowska & J. Synowiecki. 1997. Separation and characteristics of different mucopolysaccharides from bovine trachea cartilage. Food Chemistry v60(4) 533-536.
 15. Jerome C. Pekas. 1996. Immunogenicity of Choecystokinin Octapeptide-Conjugated Antigens in Pig. J. Anim. Sci. 74 : 1953-195
 16. Synowiecki Jozef & Fereidoon Shahidi. 1994. Isolation of mucopolysaccharides from processing discards of seal and beef. Food Chemistry v51 89-93.
 17. Chan K. M. , E. A. Decker, and W. J. Means. 1993. Extraction and Activity of Carnosine, a Naturally Occurring Antioxidant in Beef Muscle. J. Food. Sci. V. 58.No. 1. pp.1-4
 18. Sentandreu M, A, . F, Toldra. 1998. Biochemical Properties of Dipeptidyl Peptidase III Purified from Porcine Skeletal Muscle. Agric. Food. Chem. Vol. 46. No. 10
 19. Froetschel M. A. . 1996. Bioactive Peptides in Digesta that Regulate Gastrointestinal Function and Intake. J. Anim. Sci. 74:2500-2508
 20. Silvestre M. P. C. . 1997. Review of Methods for the Analysis of Protein Hydrolysates. Food Chem, Vol. 60. No. 2 , pp. 263-271
 21. Michael J. Brennan, Ake Oldberg, Michael D. Pierschbacher, Erkki Ruoslahi
 22. Hung N. D., Vas, E, Cseke, G. Szabolcsi 1984. Reactive Tryptic Digestion Rates of Food Proteins. J. Food. Sci. V. 49. pp. 1535-1542
 23. Rajesh KAPOOR, Charles F. PHELPS, Lars COSTER, Lars-Ake FRANSSON. 1981. Bovine aortic chondroitin sulphate- and dermatan sulphate-containing proteoglycans. Biochem. J. 197:259-268.
 24. Maruyama, S. , T. Ohmori, T. Nakagami. 1996. Proylendopeptidase Inhibitory Activity of a Glial Fibrillary Acidic Protein Fragment and Other Proline-rich Peptides. Biosci. Biotech. Biochem., 60(2). 358-359
 25. Sandra G. Velleman, Ruthi A. Patterson, Karl E. Nestor. 1997.

- Identification of decorin and chondroitin sulfates proteoglycans in turkey skeletal muscle. Poultry Science 76:506-510.
26. Shridhar P. Damle, Lars Coster, John D. Gregory. 1982. Proteodermatan Sulfate Isolated from pig skin. J. Biol. Chem. v257(10) 5523-5527.
 27. William J. Lahl and Steven D. Braun. 1994. Enzymatic Production of Protein Hydrolysates for Food Use. Food Tech. October. pp. 68-71
 28. Han X-Q . S. Damodaran. 1998. Purification and Characterization of Protease Q: A Detergent- and Urea-stable Serine Endopeptidase from Bacillus Pumilus. J. Agric. Food .Chem .46. 3596-3603
 29. Nakai Y. T. Nishimura, M. Shimizu. S.Nrai . 1995. Effects of Freezing on the Proteolysis of Beef during Storage at 4°C. Biosci. Botech. Biochem. 59. (12) 2255-2258
 30. 축산 신문. 1999. 12 .31
 31. 남희섭. 1999. 생리활성 펩타이드의 개발 및 시장동향. 식품산업과 영양 4(2). 17-19
 32. 문정혜등. 1998. 해삼 극피동물중의 당단백질의 특성과 이용. 한국식품영양과학회지 v27(2), 350-358.
 33. 신재익. 1997. 대두식품으로부터 유래된 혈압강하 펩티드의 특성 및 생산공정 최적화. 서울대학교 대학원 박사학위논문
 34. 이영근, 강정미. 1994. Spectrophotometer 및 HPLC에 의한 식용달팽이의 황산 콘드로이틴 분석. 한국영양식량학회지 23(6), 945-949.
 35. 이형주. 1998. 유제품의 기능성 펩타이드. 한국 유가공 기술 과학회, 우유 및 유제품의 기능성. 22-29
 36. 전기홍. 1999. 가축혈액으로부터 면역단백질의 분리연구. 식품기술 Vol. 12(1) pp. 43-68
 37. 차용준. 김은정. 김훈. 1996. 참치가공부산물로부터 단백질 분해효소를 이용한 기능성 천연조미료 제제의 개발. 한국식품영양과학회지 25(4), 627-631
 38. 한문희. 1998. 도축부산물로부터 항균성 펩타이드 탐색 및 추출방법 개발. 농림부농림수산기술관리센터pp.100
 39. 홍운호. 1997. 우유로부터 생리활성물질의 분리및정제 . 농림기술관리센터.pp.196
 40. 황은영. 류홍수. 1997. 양식어육 단백질 가수분해물의 영양학적 품질평가. 식품산업과 영양. Vol.2(1) p.56-101

(협동과제)

1. 농림수산부: 농림수산주요통계, p. 330 (2001)
2. 파이낸셜뉴스: 2002. 10. 6.
3. 한국보건산업진흥원: 건강기능식품 실태조사 및 분석, pp. 41-43 (2002)
4. 손동화: 건강기능성 식품 펩타이드 및 그 응용, 식품과학과 산업, 30(1), pp. 22-29 (1997)
5. 남희섭: 생리활성 펩타이드의 개발 및 시장동향, 식품산업과 영양 4(2), pp. 17-19 (1999)
6. 한성일: 기능성 축산물의 생산과제와 전망, 식품유통연구, 17(1), pp. 163-176 (2000)
7. 농수축산신문: 2001. 2. 5.
8. Kondaih, N., and Panda, B.: Physicochemical and functional properties of spent hen components. *J. Food Sci. and Technol.*, 24, p. 267 (1987)
9. 한국계육협회: 육계시세, 2002. 12.
10. Kleinkauf, H., and Von-Doehren, H.: Peptide antibiotics, beta-lactams and related compounds. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 8, pp. 1-32 (1988)
11. Stiles, M. E., and Hastings, J. W.: Bacteriocin production by lactic acid bacteria. Potential for use in meat preservation. *Trends Food Sci. Technol.*, 3, pp. 247-251 (1991)
12. Barnby-Smith, F. M.: Bacteriocins: Application in food preservation. *Trends Food Sci. Technol.*, 2, pp. 133-136 (1992)
13. Snyder, S. H., and Lnnis, R. B.: Peptide neurotransmitters. *Ann. Rev. Biochem.*, 48, pp. 755-782 (1979)
14. Snyder, S. H.: Brain peptides as Neurotransmitters. *Science*, 209(29), pp. 976-983 (1980)
15. Lewis, M. E., Khaehaturian, H., and Walker, J. M.: Endogenous opioids-Biological functions. *Ann. Rev. Neurosci.*, 7, pp. 223-255 (1984)
16. Meise, H., and Schlimme, E.: Milk proteins. precursors of bioactive peptides. *Trend. Food Sci. Technol.*, 2, pp. 41-43 (1990)
17. Ariyoshi, Y.: Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived

- from food proteins. *Trends Food Sci. Technol.*, 4, pp. 139-144 (1993)
18. Maruyama, S., and Suzuki, H.: A peptide inhibitor of an angiotensin I-converting enzyme in the tryptic hydrolyzate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, 46, p. 1393 (1982)
 19. Maruyama, S., Nikagomi, K., Tomizuka, N., and Suzuki, H.: Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolyzate of casein(II). Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.*, 49, p. 1405 (1985)
 20. Maruyama, S., Mitachi, H., Tanaka, H., Tomizuka, N., and Suzuki, H.: Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from casein. *Agric. Biol. Chem.*, 51, p. 1581 (1987)
 21. Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N., and Suzuki, H.: Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide derived from casein. *Agric. Biol. Chem.*, 51, p. 2557 (1987)
 22. Kohmura, M., Nio, N., and Ariyoshi, Y.: Inhibition of angiotensin converting enzyme by synthetic peptide fragment of human κ -casein. *Agric. Biol. Chem.*, 54, pp. 835-836 (1990)
 23. Maeno, M., Yamamoto, N., Takano, T., : Identification of an antihypertensive peptide casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus*. cp790, *J. Dairy Sci.*, 79, p. 1316 (1996)
 24. Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H., and Maruyama, S.: Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an α -zein hydrolyzate. *Agric. Biol. Chem.*, 55, p. 1313 (1991)
 25. Miyoshi, S., Kaneko, T., Yoshizawa, Y., Fukui, F., Tanaka, H., and Maruyama, S.: Hypertensive activity of enzymatic α -zein hydrolyzate. *Agric. Biol. Chem.*, 55, p. 1407 (1991)
 26. 原征彦, 松崎妙子, 鈴木健夫: 茶成分のアンジオテンシン変換酵素について、日農化誌, 61, pp. 803-808 (1989)
 27. Miyoshi, S., Ishikawa, H., Tanaka, H.: Angiotensin converting

- enzyme inhibitors derived from *Ficus carica*. *Agric. Biol. Chem.*, 53, pp. 2763-2767 (1989)
28. 齊泰義辛, 中村圭子, 川戸章嗣, 今安聰: 清酒および副産物中のアンジオテンシン變換酵素にういて、日農化誌, 66, pp. 1081-1087 (1992)
 29. Kawamura, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Teramoto, T., Okabe, M., and Mimura, T.: Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commum.*, 155, p. 332 (1988)
 30. 未總那男, 箆島克裕, イワツおよびタチオ筋肉由來鹽基性ペプチのアンジオテンシン變換酵素にういて、日水誌, 52, pp. 1981-1984 (1986)
 31. 염동민, 이태기, 변한석, 김선봉, 박영효: 효소에 의한 고등어 근육단백질 가수분해물의 angiotensin I 전환효소저해작용, 한국수산학회지, 25, pp. 229-235 (1992)
 32. Suh, H. J., Suh, D. B., Chung, S. H., Whang, J. H., Sung, H. J., and Yang, H. C.: Purification of ACE inhibitor from soybean paste(in Korean). *Agric. Chem. Biotechnol.*, 37, pp. 441-446 (1994)
 33. Shin, Z. I., Ahn, C. W., Nam, H. S., Lee, H. J., Lee, H. J., and Moon, T. H.: Fraction of angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from soybean paste(Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27, pp. 230-234 (1995)
 34. 김승호, 이윤진, 권대영: 전통된장으로부터 angiotensin converting enzyme 저해물질의 분리, 한국식품과학회지, 31(3), pp. 848-858 (1999)
 35. 김순희, 조영제, 박경숙, 차원섭, 천성숙, 최용규, 복수경, 김명옥: 납두 발효과정 중 angiotensin converting enzyme 저해물질의 생성 및 분리, 한국식품영양과학회지, 29(4), pp. 737-742 (2000)
 36. 박정룡, 차명화: 간장으로부터 angiotensin converting enzyme 활성 저해물질 생성 균주의 분리 동정, 한국식품영양과학회지, 30(4), pp. 594-599 (2001)
 37. 박영호, 김선봉, 변한석, 염동민, 박영범, 이태기, 김외경: 수산발효식품 중의 Angiotensin- I 전환효소 저해제의 특성- 1. 멸치젓갈 중의 Angiotensin- I 전환효소 저해제의 특성, 한국수산학회지, 26(4), pp. 321-329 (1993)
 38. Tager, H. S., and Steiner, D. F.: Peptide hormones. *Ann. Rev. Biochem.*, 45, pp. 510-538 (1974)

39. Aas, K: What makes an allergen. *Allergy*, 33, pp. 3-14 (1978)
40. Mills, E. N. C., Alcoer, M. J. C., and Morgam, M. R. A.: Biochemical interaction of food-derived peptides. *Trends food Sci. Technol.*, 3, pp. 64-68 (1992)

(위탁과제)

1. 주현규, 조현기, 박충균, 조규성, 채수규, 마상조. 식품분석법. 유림문화사(1992)
2. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-269(1951)
3. 한국식품공업협회, 식품공전, p352-355(1999)
4. 류일환, 신용서: 알로에 아세틸만난의 ACE(Angiotensin Converting Enzyme) 저해효과 및 동력학적 분석. *한국식품영양과학회지* 29(6):1269-74(1997)
5. 정건섭, 윤기도, 권동진, 홍석산, 최신양: 대두발효식품의 암세포주에 대한 세포독성 조사. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 25(5):477-82(1997)
6. Charmichael J, Degarff WG, Gazdar AF, Minna JD and Michell JB: Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47:936(1987)
7. Nishimo T and Nagumo T, The sulfate-content dependence of the anticoagulant activity of fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. 1991, *Carbohydrate Res.* 314:193
8. 김선봉, 수산물을 이용한 고기능성 콘드로이틴 황산 소재의 개발 및 제품화기술 연구, 수산특정연구과제 최종보고서, 1998
9. Maruyama S, Mitachi H, Tankata H, Tomizuka N, and Suzuki H: Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agric Biol Chem* 51(6):1581-86(1987)
10. Maruyama S, Nakagomi K, Tomizuka N, and Suzuki H: Angiotensin converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. *Agric Biol Chem* 49(5):1405(1985)
11. Maruyama S, Mitachi H, Awaya J, Kurono M, Tomizuka N, and

- Suzuki H: Angiotensin I converting enzyme inhibitor activity of the C-terminal hexapeptide of α -casein. *Agric Biol Chem* 51(9);2557-61(1987)
12. Kinoshita E, Yamakoshi J, and Kikachi M: Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci Biotech Biochem* 57(7);1107-10(1993)
 13. Miyoshi S, Ishikawa H, Kaneko T, Fukui F, Tanaka H, and Maruyama S: Structures and activity of angiotensin converting enzyme inhibitors in an α -zein hydrolysate. *Agric Biol Chem* 55(5);1313-18(1991)
 14. Seki E, Osajima K, Matsui T, and Osajima Y: Separation and purification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from heated sardine meat by treatment with alkaline protease. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 40(11);783-791(1993)
 15. Kohama Y: Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 155(1);332-6(1988)
 16. Hazato T and Kase R: Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from porcine plasma. *Biochem Biophys Res Commun*, 139(1);52-55(1986)
 17. Ohara T, Ohinata H, Muramatsu N, Oike T, and Matsubara T: Enzymatic degradation of rutin in processing of buckwheat noodles. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 36(2);121(1989)
 18. Hara Y, Matsuzaki T, and Suzuki T: Angiotensin I converting enzyme inhibiting activity of tea components. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 61(7);803-8(1987)
 19. 문정혜, 류홍수, 양훈석, 서재수: 해산 극피동물 중의 당단백질의 특성과 이용; II. 해삼당단백질과 황산콘드로이친의 항돌연변이 및 항암효과. *한국식품영양과학회지* 27(2);350-358(1998)