오존수로 세척한 상어연골로부터 Crude Chondroitin Sulfate의 열수추출

정유경 · 신경옥 · 신종욱 · 노홍균 · 김순동*

대구가톨릭대학교 식품외식산업학부

Hot Water Extraction of Crude Chondroitin Sulfate from Shark Cartilage Treated with Ozone Water. Yoo-Kyung Jung, Kyung-Ok Shin, Jong-Wook Shin, Hong-Kyoon No and Soon-Dong Kim*. *Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyungsan 712-702*

Abstract This study was conducted to investigate the effect of ozone treatment on removal of brown color and ammonia-like odor produced from shark cartilage (SC) and to establish the optimal extraction conditions of chondroitin sulfate (CS) by NaOH and hot water. Treatment of SC with 0.3 ppm ozone water resulted in higher color L* value but lower a* and b* values compared with those of non-treated SC, without affecting its proximate compositions (moisture, protein, lipid, carbohydrate, and ash). Ozone treatment also increased the overall acceptability of SC by reducing ammonia-like odor. The optimum concentration and time for extraction of CS from SC using NaOH at 100℃ were 1 N and 120 min, respectively, with 10.02% of extraction yield. The total yield (10.01%) of CS obtained by 7 times repeated extraction with hot water at 100℃ was comparable to that of the 1 N NaOH extraction for 120 min at 100℃.

Key words : Shark cartilage, ozone treatment, alkali extraction, hot water extraction

서 론

Chondroitin sulfate(CS)는 N-acetylgalactosamine, glucouronic acid 및 황산기로 구성된 mucopoly-sacchrides로서 proteoglycan 또는 단백복합체로 존재한다 [13]. 황산기의 결합위치에 따라 여러 종류로 나누어지며 17], 기능성이 상이한 것으로 알려져 있다 [2]. CS는 골수의 주요성분이기도 하지만 세포내외에 존재하여 물질의 확산, 세포내 이동, 세포의 성장과 분화에 영향을 미친다 [5,8]. 이러한 CS의 생리화학적 특성을 이용하여 기능성 식품이나 의약품 제조에 활용하고자하는 연구들이 많이 진행되고 있으며 [18], 특히 노년기에 연골내 CS의 감소는 관절질환의 위험인자로 간주되고 있어 노년관절염 치료제로서의 활용이 기대되고 있으며[6], 생체조직에 탄력성과 복원력을 부여하는 중요한 물질이다 [16]. 최근 포유동물의 연골에서 뇌질환을 일으키는 미생물이 CS 추출시에 이행될 가능성이 밝혀짐 [3]에 따라 상어나 가오리로부터 CS를 얻고자하는 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 또한 CS가 단백질과 결합한 복합물질로 존재하기 때문에 이의 추출은 단백질을 효소 등을 이용하여 분해시킴으로써 얻을 수 있으나 고비용이 소요됨으로 의약품 등 고순도가 요구되지 않는 식품으로 활용하는 데는 단백질과 복합체로써도 충분히 가능하다.

CS가 많이 함유되어 있는 가오리나 상어에는 trimethylamine oxide(TMAO)나 urea의 함량이 타 어류에 비하여 많으며 미생물이나 효소에 의하여 쉽게 분해되어 trimethylamine(TMA)나 ammonia 또는 dimethylamine과 같은 휘발성 저분자 물질을 생성함으로서 암모니아와 유사한 냄새를 띤다 [4]. 이들 냄새성분은 CS의 추출시에 이행됨으로서 CS를 이용한 의약품, 식품 및 화장품 등의 품질을 떨어트리는 원인이 된다. 한편 오존은 강력한 살균력을 가진 물질

* Corresponding author
Phone: +82-53-850-3216, Fax: +82-53-850-3216
E-mail: kimsd@cu.ac.kr

로서 1909년 독일에서 냉동육의 보존을 위하여 사용한 것을 시작으로 하여 수질의 정화 [19,20], 식품의 살균 [21], 탈취 및 탈색 [22], 환경의 정화 [23]에 많이 활용되고 있으며 생선류와 육류 [24], 국수, 김치 및 과자 [25]등 식품의 보존성 향상을 위하여도 이용되고 있다.

본 연구에서는 상어연골에서 발생하는 냄새와 색상에 미치는 오존처리 효과를 검토하였으며 아울러 현재 상어연골로부터 CS의 추출에 활용되고 있는 알칼리 추출 [12], 효소분해법 [7]의 위생문제 및 고비용문제 등을 고려하여 CS가 함유된 복합체의 열수추출조건을 검토하였다.

재료 및 방법

재료

실험재료는 Dogfish 상어 머리 부분의 연골로 덕원수산 (대구)에서 구입하여 100 mesh 입도로 분쇄하여 사용하였다.

오존수 세척 및 건조

상어연골에서 발생하는 냄새와 변색된 색상물질을 제거하기 위하여 Ozone Generation System(KOD-002, Wonygigong Co., Inchun, Korea)을 사용하여 Fig. 1와 같이 15℃, 용존 오존농도 0.3 ppm의 오존수로 2시간동안 세척한 후 40℃에서 감압 건조하였다.

오존수 처리한 상어연골의 일반성분 분석, 색상 측정 및 관능검사

오존수 처리 전후 상어연골의 수분, 조단백, 조지질, 탄수화물 및 조회분의 함량은 AOAC법 [1]으로 측정하였다. 색상은 색차계(Chromameter, CR-200, Minolta Camera Co., Osaka, Japan)를 이용하여 Lightness(L*), Redness(a*), Yellowness(b*),를 측정하였다. 불쾌취에 대한 관능검사는 식품공학을 전공하는 대학생 및 대학원생으로 구성된 25명의 관능요원에 의하여 9점 scale법 [14]으로 평가하였다: 전혀 없다(1점), 아주 약하다 (2점), 보통 약하다(3점), 약간 약하다(4점), 약하지도 강하지도 않다(5점), 약간 강하다(6점), 보통 강하다(7점), 강하다(8점) 및 아주 강하다(9점).

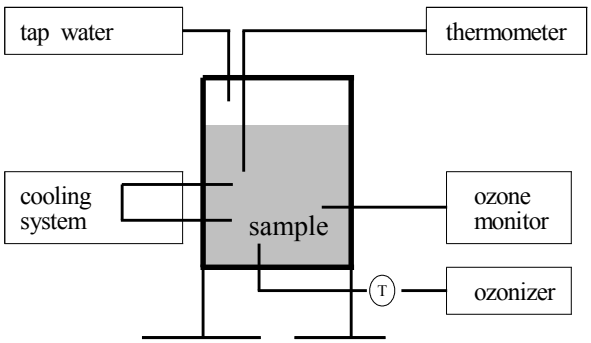

Fig. 1. Ozone treatment system for decoloration and deodorization of shark cartilage.
T: timer.

Crude Chondroitin Sulfate(CS)의 추출

Crude CS의 열수추출은 건조, 분쇄한 상어연골분말 10 g과 증류수 200 mL을 500 mL 들이 삼각플라스크에 가한 후 냉각관을 부착시켜 100℃에서 1시간동안 가열하고 여과(5C, Advantec, Tokyo, Japan)하여 잔유물을 얻고 이 잔유물에 다시 증류수 200 mL을 가하여 가열하는 조작을 7회 반복하였다. 또, 여기서 얻은 결과를 이용하여 산업적 추출을 위한 pilot 규모로 제작한 용량 75 L의 연속추출장치(지름 40cm, 깊이 60 cm)(Fig. 2)에 상어연골분말 2 kg을 넣은 후 증류수 15 L을 가하여 120℃에서 7시간동안 추출하고 그 수율을 비교하였다.

알칼리 추출은 기존의 Na_2CO_3 추출 [20]을 NaOH로 바꾸어 추출하였다. 즉, 상어연골분말 10 g씩에 0~4 N NaOH 용액 200 mL씩을 가하여 열수추출과 동일한 방법으로 100℃에서 2시간동안 가열, 추출한

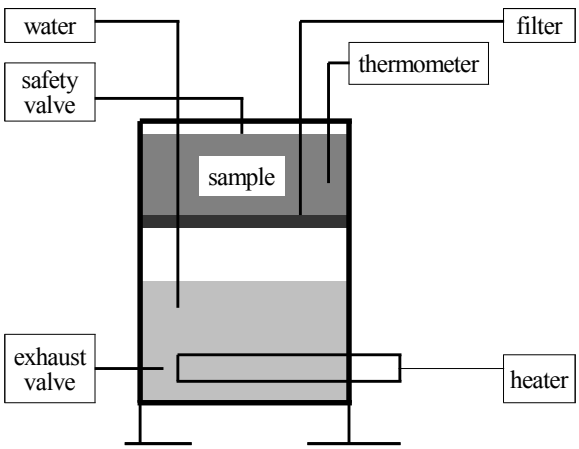

Fig. 2. Pilot-scale water extractor for extraction of chondroitin sulfate from shark cartilage.

후 miracloth(Biochem. Co., USA)로 여과하여 여액에 추출된 CS의 함량을 측정, 비교하였다.

Chondroitin Sulfate(CS)의 정량

CS의 함량은 Korean Food Code 법 [11]에 의하여 정량하였다. 즉, 추출액을 여과지(5C, Advantec, Tokyo, Japan)로 여과한 액 1 mL에 1%(w/v)의 sodium borate sulfuric acid 용액 5 mL을 가하여 ice bath상에서 충분히 혼합하여 90℃의 water bath에서 10분간 가열하고 즉시 냉각하였다. 여기에 carbazole 0.125 g을 무수 ethanol에 녹인 carbazole 시약 0.2 mL을 가하여 vortex상에서 혼합한 후 90℃에서 15분간 가열, 냉각하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음에 glucuronic acid(Sigma)의 검량선 y=0.0133x+0.0546, R^2=0.9827에 의하여 glucuronic acid의 함량을 구한 후 계산식 CS content(%)=glucuronic acid(%) x 2.593에 의하여 함량을 산출하였다.

통계처리

실험은 3회 반복으로 측정하여 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 관능검사는 관능요원 25명의 평균치와 표준편차로 나타내었다. 유의성 검증은 SPSS(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software package program을 이용하여 Duncan's multiple range test 및 t-test를 행하였다.

결과 및 고찰

오존수 처리한 상어연골의 색상 및 관능적 특성

상어연골은 홍어냄새와 같은 암모니아 유사취와 연골표면의 갈변된 성분들이 CS 추출시 추출물로 이행되어 품질에 영향을 준다. 이러한 연골분말의 갈변된 색상과 냄새성분을 제거하기 위하여 용존 오존농도 0.3 ppm의 오존수로 2시간동안 세척한 후 건조하여 색상과 관능검사를 실시한 결과는 Table 1과 같았다. 그 결과, 밝기를 나타내는 L*값은 오존수 세척에 의하여 현저하게 증가된 반면 적색도와 황색도를 나타내는 a*, b*값은 크게 감소하여 탈색되는 현상이 뚜렷하였다. 연골에서 발생하는 냄새의 경우도 오존수 세척에 의하여 7.82점에서 2.35점으로 현저하게 감소되었다.

Table 1. Effect of ozone treatment on color and sensory characteristics of shark cartilage powder

Measurement	Non-treated shark cartilage	Ozone-treated shark cartilage[1)]
Color[2)]		
L*	68.50±3.46[b]	76.09±3.25[a]
a*	0.94±0.07[a]	0.23±0.05[b]
b*	6.37±0.41[a]	4.75±0.39[b]
Sensory evaluation		
Off-flavor[3)]	7.82±0.53[a]	2.35±0.18[b]

[1)]Shark cartilage was treated with 0.3 ppm ozone water for 2 hr.
[2)]Values are mean±standard deviation of triplicate determinations.
[3)]Values are mean±standard deviation of 25 panels. Sensory scores of off-flavor were evaluated from none at all (1 point) to very strong (9 points).
[2,3)]Different superscripts within a row indicate significant differences at $p<0.05$.

식품산업에서 탈취 및 탈색에 오존을 이용한 연구사례는 매우 다양하며 특히 오존은 불포화 결합을 지닌 올레핀계 및 아세틸렌계 화합물이나 방향족환 및 축합환화합물, 탄소-질소 2중 결합 화합물, 아민 또는 황화물 등의 구핵류, 알코올, 에테르 및 알데히드 등에 작용하여 분해를 촉진하는 것으로 보고되고 있다 [26].

일반성분 함량

오존수 세척 전후 상어연골의 일반성분 함량을 비교한 결과는 Fig. 3과 같았다. 상어연골의 수분함량은 9.45~9.51%, 조단백 함량은 30.95~31.67%, 조지방 함량은 1.40%, 탄수화물 함량은 11.67~11.83%, 회분 함량은 45.98~46.19%로 오존수 세척에 따른 뚜렷한 변화를 보이지 않았다. 연골의 일반성분 함량은 어종이나 연령에 따라 상이하며 Jo 등 [19]이 발표한 상어(*Squatina oculata*) 연골의 경우는 수분 11.1%, 조단백 33.9%, 조지방 0.9%, 탄수화물 13.3%, 회분 51.9% 인 것으로 보고되고 있다.

Chondroitin Sulfate의 알칼리 추출 특성

분말화한 상어연골 10 g에 0~4 N의 NaOH 용액 200 mL을 0.5 N 간격으로 가하여 100℃에서 2시간 동안 추출한 후 그 여액의 CS 함량을 측정, 비교한 결과는 Fig. 4와 같았다. CS의 함량은 1 N NaOH용액에서 연골 100 g 당 10.02 g으로 가장 높은 추출수율

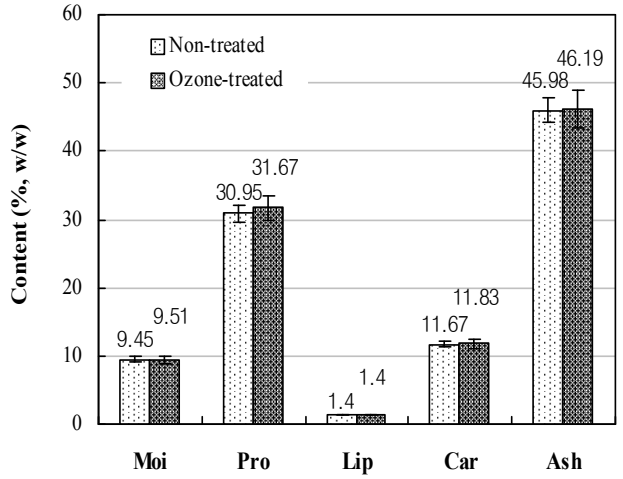

Fig. 3. Proximate composition of shark cartilage before and after treatment with 0.3 ppm ozone water for 2 hr.
Abbreviations: Moi; moisture, Pro; crude protein, Lip; crude lipid, Car; carbohydrate, Ash; crude ash. Values are mean± standard deviation of triplicate determinations.

을 나타내었으며 이보다 농도가 낮거나 높을 경우에는 추출수율이 감소하는 경향을 나타내었다. 또 추출수율이 가장 높은 1 N NaOH 용액을 사용하여 추출시간별에 따른 누적 추출수율을 조사한 결과(Fig. 4, right), 최대수율을 나타내는 추출시간은 120분이었다.

Jo 등 [7]은 상어 연골로부터 CS의 추출시 다양한 단백질 분해 효소를 사용하여 추출수율을 측정하였으며 그 추출수율은 효소의 종류에 따라 상이하나 대체적으로 30%내의 수율을 나타내는 것으로 보고하였다. Lee 등 [12]은 달팽이의 CS를 0.05M Na_2CO_3 (pH 9.2)로 추출한 후 trichloroacetic acid(TCA)로 제단백하고 ethanol을 함유하는 5% potassium acetate를 가하여 침전시키고 ethanol로 세척하는 등의 공정으로 CS를 분리하였다. 또 Kim 등[9]은 멍게와 미더덕 껍질로부터 CS를 추출할 경우 10배량의 증류수를 가하여 105℃에서 3시간동안 가열추출한 후 농축하고 TCA로 제단백한 후 3배량의 95% ethanol로 세척, 탈색하는 방법을 하였으며 이렇게 하여 추출물에 함유한 CS의 함량은 약 60%에 달한다고 하였다. 증류수로 CS를 가열 추출한 후 TCA로 제단백하고 ethanol로 세척하는 추출법은 Kim 등 [10]의 보고에서도 활용하고 있으나 거의가 1회 추출에 그치고 있다. Moon 등 [15]은 해삼으로부터 CS를 추출, 정제하기 위하여 20 mM의 sodium phosphate buffer (pH 7.0)을 사용하여 추출한 후 80% ammonium sulfate로 염석하고 완충용액으로 투석하였다.

이와 같이 연골로부터 CS의 추출은 CS의 물리화학적 성질 등을 조사하기 위한 연구가 주류를 이루고 있으며 식품가공 등에 활용하기 위한 추출에 관한 연구는 없다. CS 추출에 이용되고 있는 대부분의 추출법은 CS에 결합된 단백질을 효소를 이용하여 분해시켜 얻거나 물, 알칼리, 완충용액 등으로 추출한 후 제 단백하고 색소 등 불순물을 CS 불용성의 용매로 세척하여 얻는 방법들로 이루어져 있다.

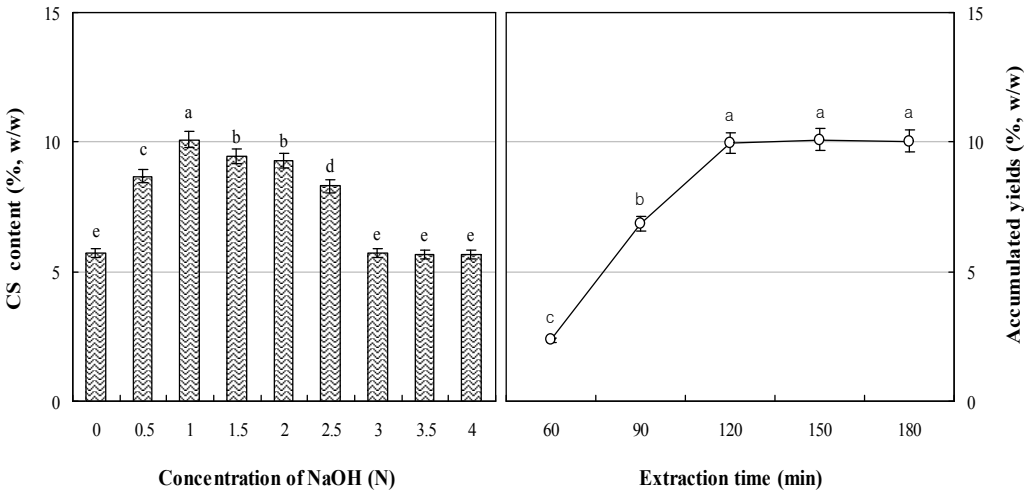

Fig. 4. Chondroitin sulfate (CS) content extracted from shark cartilage by different concentration of NaOH solution (left) and accumulated yield of CS extracted with 1 N NaOH solution (right).
Values are mean±standard deviation of triplicate determinations. Different superscripts in each figure indicate significant differences at $p<0.05$.

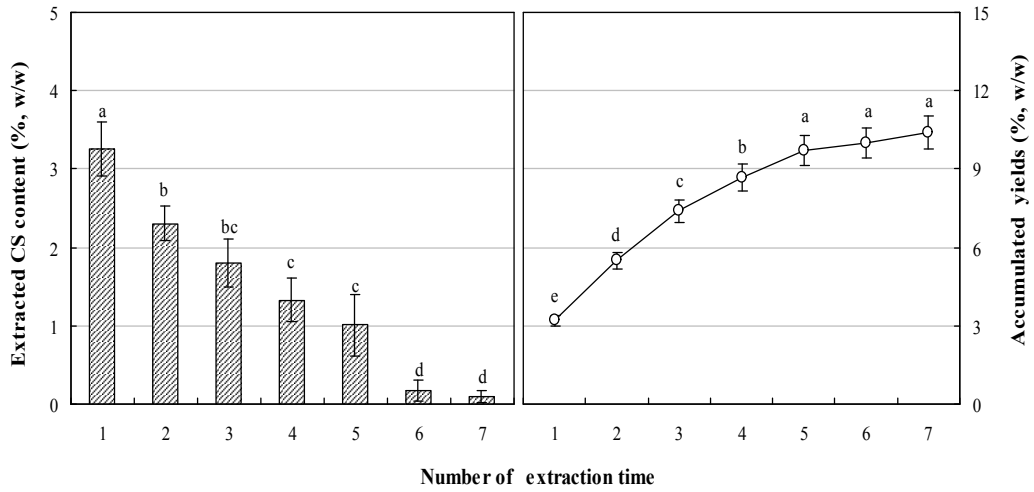

Fig. 5. Chondroitin sulfate (CS) content extracted from shark cartilage by 7 times hot water extractions (left) and accumulated yield of CS extracted with hot water (right).
Values are mean±standard deviation of triplicate determinations. Different superscripts in each figure indicate significant differences at $p<0.05$.

Chondroitin Sulfate의 열수추출 특성

알칼리 또는 완충용액을 사용하여 추출할 경우 추출용매가 CS에 잔존할 수 있는 가능성이 있으며 효소법은 비교적 고가로 추출비용이 높은 문제점들이 있다. 열수추출은 이러한 문제점들은 없으나 추출수율이 낮은 단점이 있다. 열수추출의 이러한 단점을 보완하기 위하여 반복추출에 의한 추출수율의 변화를 조사한 결과는 Fig. 5와 같았다. 그 결과, 1회 추출에서 연골 100 g으로 부터 3.24 g의 CS가 추출되었으나 2회 추출에서는 2.37 g으로 추출이 반복됨에 따라 그 수율은 비례적으로 감소되었으며 6회째의 추출량은 0.12 g이하를 나타내었다. 7회 반복 추출후의 누적 추출수율은 10.01%로 100℃에서 1시간 동안 추출한 알칼리추출 수율 10.02%와 대등하였다. 열수추출의 산업적 활용을 위하여 pilot 규모로 제작한 연속추출장치(Fig. 2)를 이용하여 120℃에서 7시간 동안 추출할 경우, 그 수율은 9.95±0.62%로 알칼리 추출수율과 대등한 결과를 나타내어 열수추출의 산업적 활용이 기대된다.

요 약

상어연골에서 발생하는 갈변과 냄새를 제거하기 위한 오존수 세척효과와 crude chondroitin sulfate의 추출특성을 조사하기 위하여 알칼리 및 열수추출 효과를 조사하였다. SC 분말을 용존 오존농도 0.3 ppm의 오존수로 세척한 결과 일반성분의 함량에는 영향을 미치지 않으면서 L*값은 증가하고 a*, b*값은 감소되어 탈색효과가 뚜렷하였다. 또한 ammonia 유사취가 크게 감소되었으며 종합적 기호도가 크게 향상되었다. NaOH에 의한 CS의 최적 추출농도는 1 N이었으며 최적 추출시간은 100℃에서 120분이었고 이때의 수율은 10.02%이었다. 100℃의 열수로 7회 반복추출 할 경우 1 N NaOH 추출수율과 대등하였다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지정 대구가톨릭대학교 해양바이오산업연구센터의 지원에 의한 것입니다.

참 고 문 헌

1. AOAC. 1990. Official methods of anlysis. 15th ed. *Associations of Official Analytical Chemists*, Washington DC. p.788.
2. Balduyck, M., Mizon, C., Loutfi, H., Rochet, C., Roussel, P. and Mizon, J. 1986. The major human urinary trypsin inhibitor is a proteoglycan. *Eur. J. Biochem.* **158**, 417-422.
3. Cho, S. M., Kwak, K. S., Park, D. C., Gu, Y. S., Ji, C. I., Jang, D. H., Lee, Y. B. and Kim, S. B. 2003. Processing optimization and functional properties of gelatin from shark(*Iaurus oxyrinchus*) cartilage. *Food Hydrocoll.* **18**, 573-579.
4. Choi, J. H., Woo, J. W., Lee, Y. B. and Kim, S. B. 2005. Changes in an ammonia-like odor and chondroitin sulfate

contents of enzymatic hydrolysates from longnose akate(*Rasa rhina*) cartilage as affected by pretreatment methods. *Food Sci. Biotechnol.* **14**, 645-650.
5. Conte, A., Volpi, N., Palmieri, L. and Lonca, G. 1995. Biochemical and pharmakokinetic aspects of oral treatment with chondroitin sulfate. *Arzneimittelfolschung* **45**, 918-925.
6. Inoue, H., Otsu, K., Suzuki, S. and Nakanishi, Y. 1986. Difference between N- acetylgalactosamine 4-sulfate-6-O-sulfotransferases from human serum and squid cartilage in specificity toward the terminal and interior portion of chondroitin sulfate. *J. Biol. Chem.* **261**, 4470-4475.
7. Jo, J. H., Do, J. R., Kim, Y. M., Kim, D. S., Lee, T. K., Kim, S. B., Cho, S. M., Kang, S. N. and Park, D. C. 2005. Optimization of shark(*Squatina oculata*) cartilage hydrolysis for preparation of chondroitin sulfate. *Food Sci. Biotechnol.* **14**, 651-655.
8. Kakimoto, K., Matsukawa, A., Yashinaga, M. and Nakamura, H. 1995. Suppressive effect of a neutrophil elastase inhibitor on the development of collagen-induced arthritis. *Cell Immunol.* **165**, 26-32.
9. Kim, B. H., Ahn, S. H., Choi, B. D., Kang, S. J., Kim, Y. L., Lee, H. J., Oh, M. J. and Jung, T. S. 2004. *In vitro* evaluation of chondroitin sulfates from Midduk (*Styele clava*) and Munggae tunics (*Halocynthia roretzi*) as a consmetic material. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 641-645.
10. Kim, Y. R., Ahn, S. H., Choi, B. D., Kang, S. J., Shin, G. W., Oh, M. J. and Jung, T. S. 2004. *In vitro* examination of chondroitin sulfates extracted from Midduk (*Styele clava*) and Munggae tunics(*Halocynthia roretzi*) as a cosmetic material. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 646-652.
11. Korean food code. 2001. Mucopolysaccharide protein food. *Korea Food Industry Association*, p. 352-355.
12. Lee, K. B., Kim, J. S., Kwak, S. T., Sim, W. B., Kwak, J. H. and Kim, Y. S. 1998. Isolation and identification of chondroitin sulfates from the mud snail. *Arch. Pharm. Res*. **21**, 555-558.
13. Medeirosan, G. F., Mendes, A., Castro, R. A. B., Bau, E. C., Nader, H.B . and Dicrich, C. P. 2003. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: Widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biophy. Acta*. **1475**, 287-294.
14. Meilgaard, M., Civille, G. V. and Carr, B. T. 1987. Sensory evaluation techniques. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA. p 39-112.
15. Moon, J. H., Ryu, H. S., You, B. J. and Moon, S. K. 1996. Physicochemical properties and dietary effect of glycoprotein from sea cucumber(*Stichopus japonicus*). *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **25**, 240-248.
16. Park, D. C. and Kim, S. B. 1998. Functional characteristics of chondroitin sulfate and progressed utilization of seafoods. *Fish. Res.* **12**, 30-39.
17. Toyoda, H., Kobayashi, S., Sakamoto, S., Toida, T. and Imanari, T. 1993. Structural analysis of a low-sulfated chondroitin sulfate chain in human urinary trypsin inhibitor. *Biol. Pharm. Bull*. **16**, 945-947.
18. Volpi, N. 2003. Oral absorption and bioavailability of ichthyic origin chondroition sulfate in healthy male volunteers. *Osteoarthritis Cartilage* **11**, 433-441.
19. 安樂辛一, 小林辛, 牧豊. 1996. オソンたよる上水處理. 用水と廢水 **28**, 504.
20. 牧豊. 1992. 用水へのオゾ゛ンの應用. 用水と廢水 **34**, 298.
21. 藥師芳信. 1983. オゾ゛ンによる食品の殺菌と保存. シ゛ヤバンフ-ドサイエンス **5**, 55.
22. 宗宮 功, 山田春美. 1989. オゾンの 水中有機物との反應. 月刊 フ-ドケミカル **8**, 37-51.
23. 內蔣茂三. 1997. 乳酸菌による食品變敗と食品工場へのオゾンの利用技術. 食品と科學 **39**, 94.
24. 淸水博則. 1984. オゾン利用による加工食品の保存技術. ジヤバンフドサイエンス **23**, 24.
25. 內蔣茂三. 1997 食品加工にわ゛けるオゾン殺菌の効果と使用メリツトと. 食品と科學 **37**, 101.
26. 宗宮 功, 山田春美. 1989. オゾンの 水中有機物との反應. 月刊 フ-ドケミカル **8**, 37-51.