

## 항독성 소간추출물의 생산을 위한 효소분해의 최적화

김현정 · 권도형<sup>1</sup> · 손동화\*  
한국식품연구원, <sup>1</sup>한서제약 중앙연구소

### Optimization of Enzymatic Hydrolysis for the Production of Antitoxic Bovine Hepatic Extract

Hyun-Jung Kim, Do-Hyeong Kwon<sup>1</sup>, and Dong-Hwa Shon\*

Korea Food Research Institute  
<sup>1</sup>HanSeo Pharm. Cental Research Center

**Abstract** Bovine hepatic extract is recognized as possessing detoxifying activity against various liver diseases. In order to develop a process for its mass production, various enzymatic hydrolysis conditions were tested, and bovine hepatic extracts were prepared. These extracts were then examined for composition, microorganism levels, and vitamin B<sub>12</sub> content. Among the enzymes tested, papain was selected based on yields for dry residue and amino nitrogen. The other enzymes tested included bromelain, ficin, pancreatin, and protease NP. The optimal hydrolysis conditions were established at 65°C for 24 hr, with an addition of 1%(w/w) papain to the beef liver. The prepared spray-dried bovine hepatic extract showed an 11% recovery yield on a raw beef liver basis, with 95% dry residue and 11.8% total nitrogen content. Microorganisms were not detected in the dried extract, and its vitamin B<sub>12</sub> content was 4.1 µg/g. In summary, the conditions established in this study could be applied for the high yield mass production of bovine hepatic extract.

**Key words:** bovine hepatic extract, papain, hydrolysis, optimization

## 서 론

소나 돼지의 간장을 가수분해하여 얻어지는 추출물은 간질환의 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며(1,2), Lanzani 등(3)은 사염화탄소에 의한 급만성적 손상에 대해서 간장 추출물의 항독성 효과를 보고한 바 있다. 현재 소의 간을 효소로 가수분해하여 제조한 항독성 간장추출물(liver extract antitoxic fraction)은 의약품원료로 사용되고 있으나, 최근 광우병 파동으로 유럽에서 만든 항독성 간장추출물을 사용할 수 없어 문제가 되고 있다.

한국에서는 그동안 광우병이 발생하지 않음으로 한국산 소의 간장을 원료로 한 항독성 간장추출물을 생산하여 기존의 유럽제품을 대체할 필요성이 커졌다. 기존의 항독성 소간추출물 제조를 위한 세부적인 제조공정은 공개되어 있지 않으며, 그 수율이 원료 간 대비 2% 정도로 매우 낮은 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 국내산 소간을 원료로 사용한 항독성 소간추출물의 상업적 생산에 필요한 효소의 선발 및 처리 등 제반 조건과 수율의 극대화 방안을 검토하고 시제품 생산을 통하여 최적 효소분해의 조건을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 소간은 성남소재 정육점에서 한우우래의 신선한 것을 구입하여 사용하였고, bromelain, papain, ficin, pancreatin은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며, protease NP<sup>®</sup> 2종은 태평양화학의 제품을 사용하였다. 상업적 papain은 Gist-brocades사(Montreal, Quebec, Canada)의 Collupulin<sup>®</sup> 사용하였고 비타민 B<sub>12</sub> 정량용 *Lactobacillus leichamannii* ATCC 7830은 (주)부광약품으로부터 분양받아 사용하였다. 상업적인 외국산 항독성 소간추출물은 (주)한서제약으로부터 제공받아 사용하였다.

### 항독성 소간추출물의 제조

가수분해 조건의 검토: 분쇄기로 같은 소간 10 g에 물 10 mL을 가하고 기질대비 1%의 효소(bromelain, papain, ficin, pancreatin, protease NP fungal, protease NP bacterial)를 첨가하였다. Table 1과 같이 각 효소의 최적 pH로 65°C에서 24시간 동안 가수분해 후 원심분리하여 상정액을 대상으로 건물량과 아미노태질소량을 분석하였다. 일차로 선발된 효소인 papain의 처리를 위한 세부 조건을 확립하고자 기질대비 0.05-4%로 첨가하였고 효소분해시간은 0-24시간 동안 실시하였고 반응 초기 pH는 4.0-8.0으로 반응온도는 35°C-75°C에서 가수분해를 실시하였다.

In-house 항독성 소간추출물의 제조: 소간 1 kg을 분쇄기를 이용하여 곱게 간 다음 1 L의 물을 가하고 pH 5.0으로 조정한다 음 papain을 기질대비 1% 첨가하였다. 65°C에서 24시간 동안 교

\*Corresponding author: Dong-Hwa Shon, Korea Food Research Institute, 516 Baekhyun-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 463-746, Korea  
Tel: 82-31-780-9133  
Fax: 82-31-709-9876  
E-mail: dhs95@kfri.re.kr  
Received January 3, 2008; accepted February 11, 2008

**Table 1. Enzymes and optimal pH used for the preparation of bovine hepatic extracts<sup>1)</sup>**

Source	Enzyme	pH
Botanical protease	Bromelain	4.5
	Papain	6.2
	Ficin	7.0
Animal protease	Pancreatin	7.5
Microbial protease	Protease NP fungal	7.0
	Protease NP bacterial	7.0

<sup>1)</sup>Beef liver was hydrolyzed with 1%(w/w) of each enzyme at 65°C for 24 hr.

반하면서 효소반응을 시키면서 3시간에 한번씩 시료를 10 mL 채 취하였다. 반응정지를 위해서 95°C에서 10분간 열처리하고 불용성 가수분해물 제거를 위해서 여과지로 여과하였다. 이를 다시 10 kDa 막을 이용하여 한외여과하고 분무건조하여 시제품 분말을 생산하였다. 매 단계별로 건물량과 아미노태 질소량을 확인하였다.

**성분분석**

일반 성분분석: 일반성분분석은 AOAC법(4)에 의하여 수분함량은 105°C에서 상압건조하여 측정하였고, 조단백 함량은 Kjeldahl 법으로 측정하였으며 질소계수 6.25를 사용하여 환산하였다. 회분함량은 550°C에서 직접 회화법을 사용하여 측정하였다. 각 실험은 3회 반복하여 얻은 평균값을 사용하였다.

아미노태 질소의 정량: 시료를 취하여 증류수를 가한 후 잘 섞고 여기에 페놀프탈레인 지시약을 가한 다음 0.1 N 수산화나트륨 용액을 한 방울씩 떨어뜨려 pH를 8.4로 맞추어 중화시켰다. 여기에 중성 포르말린액을 가하여, 다시 pH가 8.4가 될 때까지 0.1 N 수산화나트륨 용액으로 적정하고 환산식으로 계산하였다(5).

비타민 B<sub>12</sub>의 정량: 미생물을 이용한 분석방법으로 *Lactobacillus leichamannii* ATCC7830을 이용하여 Capps 등의 방법(6)에 따라 실시하였다. 시료에서 cyanocobalamine의 추출을 위하여 검체를 추출용액(disodium phosphate buffer, pH 6.8)에 잘 현탁시키고 불용성성분은 원심분리를 통하여 제거하였다. 이를 121°C에서 10분간 멸균시키고 적절한 배율로 희석하여 분석하였다. 표준용액은 적당한 농도로 희석하여 사용하였다. 활성화된 균체를 basal medium stock solution(Bacto B<sub>12</sub> Culture Agar, Difco, Detroit, Michigan, USA)에 일정 비율로 희석하고 여기에 시료를 첨가하여 37°C에서 20시간 배양한 후 80°C에서 5분간 가열하여 균체 성장을 정지시켰다. 이어서 530 nm에서의 투과도를 측정하고 그 표준곡선으로부터 시료 중 비타민 B<sub>12</sub>의 농도를 구하였다.

**미생물실험**

대장균군: 검체를 43-45°C로 유지한 desoxycholate lactose agar (Difco)에 분주하여 잘 섞고 냉각 응고시킨 다음, 35±1°C에서 24-48시간 배양하였다. 배양 후 즉시 집락 계산기(colony counter, Changshin, Seoul, Korea)를 사용하여 1 평판 당 30-300개의 집락을 생성한 평판을 택하여 집락수를 계산하였다.

살모넬라균(*Salmonella*): 검체를 취하여 Selenite F Broth(Difco)에 가한 후 35°C에서 24시간 증균시킨 배양액을 MacConkey Agar(Difco)에 이식하여 35°C에서 24시간 배양하였다. 의심되는 집락 및 유당 비분해균만 선택하여 Nutrient Agar(Difco)에 이식하고 35°C에서 18-24시간 배양한 균을 TSI(triple sugar iron) 한천 배지(Difco)에 천자이식하고 35°C에서 18-24시간 배양한 후 생물

학적 성상을 검사하였다.

포도상구균(*Staphylococcus aureus*): 검체를 취하고 10% NaCl을 첨가한 Tryptic Soy Broth(Difco)에 접종하여 35-37°C에서 16시간 증균시킨 배양액을 Mannitol Salt-Egg Yolk Agar(Difco)에 도말하여 37°C에서 16-24시간 배양하였다. 배양결과 황색 불투명 집락을 나타내고 집락주변에 혼탁한 백색환이 있는 집락은 Nutrient Agar(Difco)에 옮겨 37°C에서 18-24시간 배양한 후 그람염색을 실시하여 포도상의 배열을 갖는 그람양성 구균을 확인하였다. 포도상의 배열을 갖는 그람양성 구균이 확인된 것은 coagulase test를 실시하여 응고 또는 섬유소(fibrin)가 석출된 것을 황색포도상구균 양성으로 판정하였다.

효모 및 곰팡이: 시험용액과 각 단계 희석액을 Sabbi nutrient (Petrifilm™, 3M Microbiology Products, St. Paul, Minnesota, USA) 배지에 접종하였다. 이를 20-25°C에서 3일 동안 배양하여 확인하였다.

**결과 및 고찰**

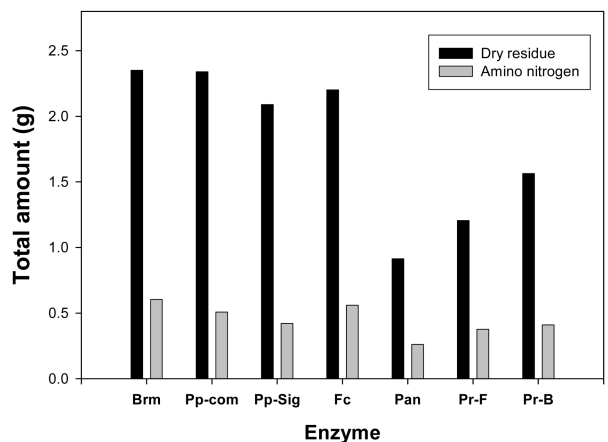
**효소의 선별**

각 효소 분해물의 상징액 중 수율은 최종적으로 회수된 총 건물량과 아미노태 질소량으로 분석하였고 이를 서로 비교하였다 (Fig. 1). 그 결과 회수된 총 질소량은 bromelain, papain, 그리고 ficin의 순으로 높았으며, 회수된 총 아미노태 질소량은 bromelain, ficin, 그리고 papain의 순으로 높았다. 한편, 실험에 사용한 동물성 및 미생물성 효소의 경우는 각각 이보다 낮은 수치를 보였다. 그러므로 회수된 총 건물량을 기준으로 하여 1차로 bromelain과 papain을 적합한 효소로서 우선 선별하였다.

한편, 상업적으로 생산되는 효소의 단가를 서로 비교하였을 때 bromelain은 kg당 11.6만원, papain은 3.2만원으로서 경제성을 고려하여 후자를 소간 분해물의 생산에 적합한 효소로 최종 선별하였다. 따라서 이후의 실험에서는 papain을 이용한 분해의 최적화를 시도하였다.

**Papain의 가수분해 최적화 검토**

첫째로 papain 첨가농도를 검토하기 위해서 papain의 첨가농도

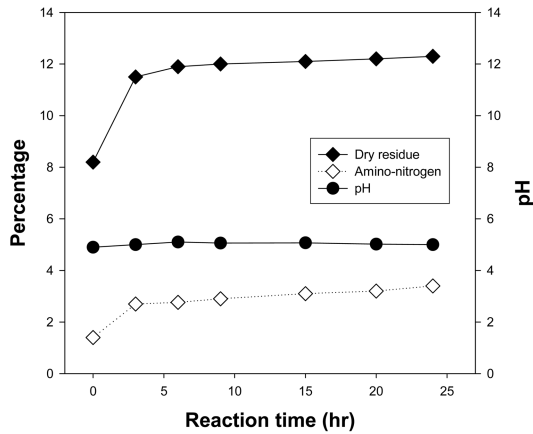


**Fig. 1. Total amount of dry residue and amino nitrogen of bovine hepatic extracts.** Ten grams of bovine liver were digested by 1%(w/w) of enzymes. Brm, bromelain; Pp-com, papain (commercial); Pp-Sig, papain(Sigma); Fc, ficin; Pan, pancreatin; Pr-F, protease NP (fungal); Pr-B, protease NP(bacterial).

**Table 2. The effect of papain concentration on the yield of bovine hepatic extracts**

Papain added (%)	Dry residue (%)	Amino nitrogen (%)
0.05	7.67±0.23 <sup>1)</sup>	1.96±0.66
0.1	8.34±0.06	2.03±0.03
0.2	8.78±0.13	2.11±0.52
0.5	9.38±0.28	2.21±0.01
1.0	10.28±0.59	2.27±0.92
2.0	11.47±0.19	2.35±0.76

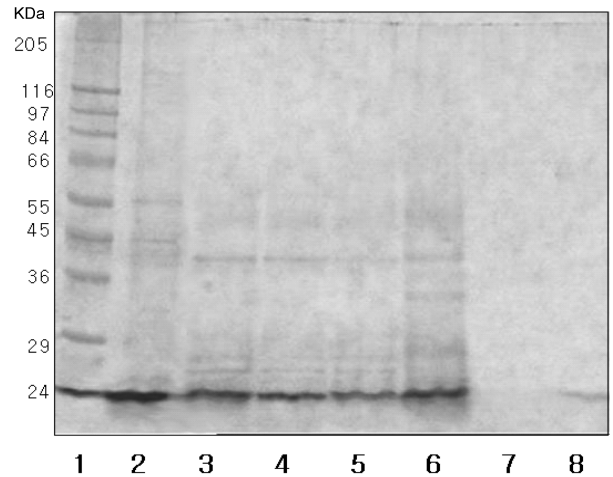
<sup>1)</sup>Mean of interassay(n=3)±SD.



**Fig. 2. Time-course of dry residue, amino nitrogen, and pH in bovine hepatic extracts hydrolyzed with papain for 24 hr.**

를 달리하여 소간 분해에 사용한 결과, 효소 첨가비율이 높을수록 분해가 촉진되었다(Table 2). 효소 1% 첨가 시 상징액 중 건물량과 아미노태 질소의 비율이 10.28±0.59% 및 2.27±0.92%로 나타났다. 1%의 첨가수준을 넘어서면 효소의 첨가량 대비 효율이 충분히 증가하지 않아서 1%의 효소첨가가 적합한 것으로 판단하였다.

두 번째로 효소의 반응시간을 검토하였다. 그 결과 건물량과 아미노태 질소량은 반응 3시간 이후에는 매우 완만한 증가를 나타내었다(Fig. 2). 또한 전기영동으로 분해정도를 확인한 결과 분해 시간이 경과할수록 단백질 band가 점차적으로 감소하여 24시간 반응 후에는 대부분이 분해되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

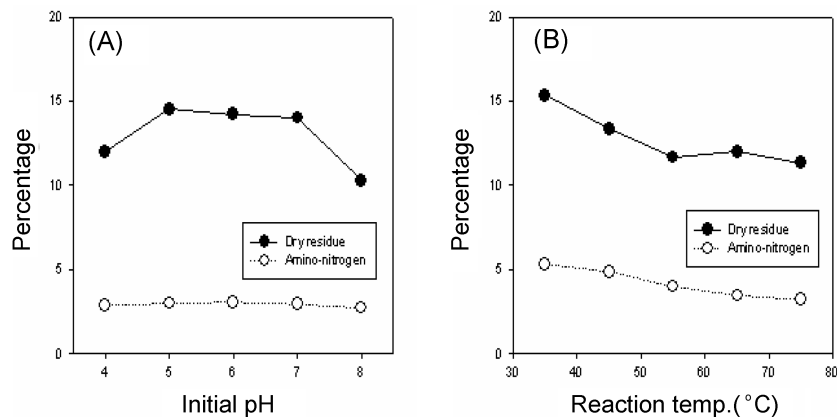


**Fig. 3. SDS-PAGE patterns of bovine hepatic extracts hydrolyzed with papain at various reaction times.** Lanes were 1, molecular weight marker; 2, 0 hr; 3, 6 hr; 4, 12 hr; 5, 24 hr; 6, ultrafiltration remnant; 7, ultrafiltration permeate; 8, commercial product.

따라서 본 연구에서는 분해시간을 24시간이 적합하다고 판단하였다.

세 번째로 초기 pH와 단백질의 분해정도를 조사하기 위하여 pH를 4.0-8.0으로 보정하여 가수분해를 실시하였다. Fig. 4A와 같이 건물량은 pH 5.0-7.0에서 비슷한 값을 보였으며 그 중, pH 5.0에서 건물량의 비율이 최대치를 나타내었다. 아미노태 질소량은 모든 pH값에서 거의 비슷한 값을 나타내었다. 이러한 결과로부터 소간의 가수분해를 위한 초기 보정 pH 중 건물량의 비율과 회수되는 가용성 부분의 전체적인 양을 감안하였을 때 pH 5.0에서 수율이 가장 높았고 따라서 반응 초기에 pH를 5.0으로 보정하여 가수분해를 실시하였다.

마지막으로 papain을 처리하여 소간 분해 시 최적반응 온도를 조사하기 위하여 온도를 35-75°C로 변화시키면서 가수분해하였다(Fig. 4B). 35°C에서 분해물의 상징액 중 가장 높은 건물량 비율과 아미노태 질소함량을 나타내었으며, 이 조건에서 각각의 총 회수율도 가장 높게 나타났다. 그러나, 효소처리 시 세균의 오염에 의한 위생문제를 방지하기 위해서는 초기 생균수의 저감화가 필요하기 때문에 저온장시간 살균(low temperature long time, LTLT) 할 때의 온도인 65°C로 처리함이 바람직한 것으로 판단되



**Fig. 4. The effect of pH (A) and temperature (B) on the yield of bovine hepatic extracts hydrolyzed with papain.**

**Table 3. Proximate composition, microorganism analysis and vitamin B<sub>12</sub> content of in-house bovine hepatic extract prepared from 1 kg of beef liver**

	In-house product	Commercial product <sup>1)</sup>	Standard guideline <sup>2)</sup>
Dry residue (%)	95	95	>95
Ash (%)	3.8	5.1	<3.0
Total nitrogen (%)	11.8	11.1	11.8-14.4
Amino nitrogen (%)	3.6	3.5	6-7.5
pH	5.1	5.1	5-6
<i>E. coli</i> (CFU/g)	N.D. <sup>3)</sup>	N.D.	N.D.
<i>S. aureus</i> (CFU/g)	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Salmonella</i> (CFU/g)	N.D.	N.D.	N.D.
Mold & yeast (CFU/g)	N.D.	N.D.	<100
Vitamin B <sub>12</sub> (µg/g)	4.1	13.7	10

<sup>1)</sup>Commercial product is offered by HanSeo Pham. Co. Ltd.

<sup>2)</sup>Standard guideline is referred to the Korean pharmacopeia.

<sup>3)</sup>N.D., not detected.

어 65°C를 최적조건으로 설정하였다.

**시제품의 평가**

소간 1 kg을 효소분해하여 얻은 소간 추출물의 수율과 성분분석 결과를 조사하고 이를 기준치와 비교하였다(Table 3). 최종적으로 약 110 g(원료중량 대비 11%)의 건조물을 얻었는데 기존 수입품의 수율인 2%에 비하여 5배 이상으로 높게 나타났다. 건조물량은 95%로 나타났고 pH 5.1로 기준규격에 합당하였다. 그러나 회분의 경우는 3.8%를 나타내어 기준규격보다 약간 높은 수치를 보였으나 상업적 제품보다는 양호하였다. 총 질소 함량은 11.8%로 기준규격에 합당하였으나 아미노태 질소는 3.6%로 나타나 국내 기준치에는 미달하였지만 상업적 제품과는 유사한 수치를 보였다.

시제품의 병원성미생물(*Escherichia coli*, *S. aureus*, *Salmonella*), 곰팡이, 효모는 모두 음성으로 나타났다. 또한 비타민 B<sub>12</sub>의 함량은 4.1 µg/g로써 기준치인 10 µg/g의 절반정도에 해당하였다. 일반적으로 소간 속의 비타민 B<sub>12</sub> 함량은 14 - 152 µg/100g(7)인데 본 연구에서 사용한 원료에 존재하는 B<sub>12</sub> 함량이 50 µg/100g이었던 점을 감안하면 최종 시제품 중에는 최대 5 µg/g가량의 B<sub>12</sub>

가 존재하게 됨을 뜻한다. 그러므로 B<sub>12</sub> 기준에 부합되는 소간추출물을 만들기 위해서는 처음부터 B<sub>12</sub>의 함량이 높은(120 µg/100g 이상) 소간을 원료로 사용해야 함이 시사되었다.

이상과 같이 본 연구에서 확립한 조건을 잘 활용한다면, 수율이 높고 광우병이나 병원성 미생물의 문제가 없는 안전한 항독성 소간추출물의 공장생산이 가능할 것으로 생각한다.

**요 약**

소간추출물은 각종 간질환에 해독효과를 가진 것으로 알려져 있다. 항독성 소간추출물의 대량생산 공정을 개발하고자 효소의 선발 및 가수분해의 최적조건을 탐색하였고, 확립된 분해조건으로 항독성 소간추출물의 시제품을 제조하여 일반성분, 미생물, 그리고 비타민 B<sub>12</sub> 함량을 분석하였다. Bromelain, papain, ficin, pancreatin, 그리고 protease NP등의 효소 중 추출물의 건조물량과 아미노태 질소의 수율이 양호하고 경제성이 뛰어난 papain을 최적효소로 선발하였다. Papain(1%)을 소간 분쇄물에 첨가하여 65°C에서 24시간 동안 가수분해하는 조건을 확립하였다. 분무건조한 항독성 소간추출물의 시제품은 원료 간 대비 11%의 수율을 보였고 건조물량은 95%, 총질소 함량은 11.8%이었다. 또한 병원성 미생물은 검출되지 않았고 비타민 B<sub>12</sub> 함량은 4.1 µg/g이었다. 본 연구에서 확립한 가수분해조건은 높은 수율의 항독성 소간추출물 생산에 적용할 수 있을 것으로 생각한다.

**참고문헌**

1. Stille G. Antitoxic effect of liver extracts. *Arzeimittelforschung* 3: 127-129 (1953)
2. Balazs M, Ban I, Magyar I, Richter R, Vecsei A. A study on the effect of aqueous liver extract and liver hydrolysate on chronic liver damage induced by carbon. *Orv. Hetil.* 24: 342-344 (1963)
3. Mascioli-Coriandoli E, Lanzani P. Antitoxic and liver-protective activities of liver extracts in carbon tetrachloride poisoning. *Boll. Chim. Farm.* 101: 698-714 (1962)
4. AOAC. Official Method of Analysis, 15<sup>th</sup> ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA (1990)
5. KIS. KS H 2120. Korea Industrial Standards, Seoul, Korea (1988)
6. Capps B, Hobbs N, Fox S. A method for the microbiological assay of vitamin B<sub>12</sub>. *J. Biol. Chem.* 178: 517-518 (1949)
7. Lee SL, Shin HS. Vitamins. p. 251. In: *Recent Food Chemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. Shin-Gwang Publishing Co. Seoul, Korea. (1994)