

鷄內金에서 추출한 protease를 이용한 鹿茸 추출 특성 연구

박재호, 김도완*

중원대학교 한방산업학부

A study on the extracting characteristics of velvet antlers using *Kyenegum* protease

Jae Ho Park, Do-Wan Kim *

Faculty of Herb Industry, Jungwon University, Goesan, 367-805, Korea

ABSTRACT

Objective : *Kyenegum* has been frequently used for characterizing digestive symptoms in the traditional and oriental medicines. This study was conducted to investigate the characteristics of extracts from velvet antlers using the 4 different kinds of extracting methods.

Methods : The extracts of velvet antlers were extracted using a 65°C DW (9hrs), a *Kyenegum* crude enzyme, a 121°C DW (2hrs), and a *Kyenegum* protease. To evaluate the characteristic of velvet antler extracts, we examined the brix, soluble solid, amino acid, mineral composition, and collagen protein.

Results : As a result of the comparisons of velvet antlers extracted by the traditional extraction and the crude enzyme of *Kyenegum*, the brix and soluble solid showed the higher contents for *Kyenegum* enzymes. Also, mineral contents of the extracted velvet antlers were higher, particularly in Ca and P for those. The contents of collagen protein, hydroxyproline and hydroxylysine, were found to be more than twice in *Kyenegum* protease compared with other extracting methods.

Conclusion : These results indicated that the *Kyenegum* crude enzyme and protease are very effective to extract of velvet antlers.

Key words : *Kyenegum*, velvet antlers, amino acid, collagen protein, mineral

서론

최근 경제 수준의 향상으로 건강에 대한 관심이 증대되면서 천연물이나 한약재가 식품과 화장품, 효소 생산 등 다양한 산업의 원료로 이용되고 있다. 특히 효소는 고도의 초 정밀성, 특이성, 선택성 및 고 효율성의 특성을 가짐으로 다양한 산업에 널리 이용되고 있다¹⁾.

효소의 산업적 이용은 송아지의 위에서 치즈 제조시 사용되던 응유 효소인 rennet을 제조하는데 기인되었으며, 전분 당화 효소를 식품 제조에 사용하다가 근래에는 의약품 제조, 정밀 화학품 제조, 특수 용도의 식품의약품 및 화학용품을 제조하는데 사용되면서 그 사용 범위가 확대되고 있다²⁾.

현재 세계 효소제 시장의 60%를 차지하고 있는 protease는 단백질 가수 분해 과정을 활성화하는 것으로 조미료 제조³⁻⁵⁾, 농축어류 단백질의 정미 증진 및 쓴맛 제거제^{5,6)}, 세균 세포의

용해에 이용되는 lytic proteinase⁷⁾, 세제⁸⁻¹⁰⁾, 상처 치료제¹¹⁾, 사료 공장 폐수처리¹²⁾ 외에 식육 연화제, 맥주, 청주 혼탁 방지제, 치즈 숙성, 피혁가공^{13,14)} 등 광범위하게 이용되고 있다.

Protease는 식물, 동물, 미생물 등에 다양하게 존재하고 있으며, 여러 종류의 protease가 산업적으로 이용되고 있다. 식물로부터 유래된 protease는 papain, bromeliain, keratinase 등이 있고, 동물에서 유래된 protease는 trypsin, chymotrypsin, pepsin, rennin 등이 있다¹⁵⁾. 현재 산업적으로 널리 이용되는 protease는 주로 미생물로부터 많이 얻고 있으나, 다양한 산업적 수요와 대량 생산을 위해서는 동물성 유래 효소에 대한 연구가 필요한 실정이다.

계내금(鷄內金)은 닭 모래주머니 각질 내벽을 건조한 것으로 한방에서 소화제로 사용하는 한약재이다. 조류인 닭의 소화기관 중 위는 일반 포유동물과 달리 소낭, 선위 및 근위로

*교신저자 : 김도완. 충청북도 괴산군 괴산을 동부리 5 중원대학교 한방산업학부.
· Tel : 043-830-8612, · E-mail : dwkim1126@jwu.ac.kr.
· 접수 : 2011년 11월 10일 · 수정 : 2011년 11월 28일 · 채택 : 2011년 12월 16일

구성되어 있으며, 평활근으로 구성된 근위는 섭취된 사료와 선위에서 분비된 소화액을 혼합하며 사료를 기계적으로 마쇄하는 작용을 한다¹⁶⁾. 계내금은 체내에 흡수되면 위벽의 신경근을 흥분시켜 위액의 분비량을 증가시키므로 소화를 촉진시킬 수 있으며, 위를 튼튼하게 만들어 준다¹⁷⁾. 일반적으로 조류는 포유동물에 비해 치아가 약하기 때문에 닭의 소화기관인 모래주머니 내에는 강력한 단백질 분해 효소와 유사한 기능의 효소가 잔존할 것으로 사료된다.

녹용(鹿茸)은 사슴의 각질화 되지 않은 어린 뿔을 건조한 것으로 우리나라를 비롯한 동북아 지역에서 약용 및 식용으로 널리 이용되고 있다¹⁸⁾. 한의학의 고전인 동의보감에서 녹용은 강장작용, 생장 발육 촉진 작용, 조혈 작용, 신경 쇠약 치료 작용, 심부전증 치료 작용, 오장육부의 기능 항진 작용 등 다양한 효능이 있는 것으로 기록되어 있다¹⁹⁻²¹⁾. 녹용의 효능에 관한 현대학적 연구는 흰쥐의 성장 촉진 작용, 조혈 작용, 혈청 콜레스테롤 저하 작용, 단백질 합성 촉진 작용, 노화 방지 작용, 흰쥐의 척추신경 효소 활성 증가 효과, 진통 작용, 항피로 효과, 면역 활성 증가 작용 및 진정 작용 등이 보고되고 있다^{22,23)}.

민간에서 녹용을 추출할 때 계내금을 사용하여 수율을 높이고자 하는 비방이 전수되고 있으며, 이때 사용된 계내금의 효소 작용인 온도, 시간, 농도 등의 조건 규명은 전통식품의 과학화를 위해 절실히 요구된다. 또한 녹용 연구의 대부분은 녹용의 유효성분과 식품학적 분석 및 성분 함량 측정, 이화학적 특성 규명 등이 활발히 진행되고 있으나, 비교적 가격이 높은 한약재인 녹용의 최적 추출 조건에 대한 연구는 미진한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 열수추출 외 뚜렷한 추출방법이 확립되지 않은 녹용 추출에 계내금 조효소를 활용할 수 있는 방안을 모색하기 위해, 물과 계내금 조효소, 계내금 정제효소 그리고 전통적인 방법으로 녹용을 추출하여 추출물의 특성을 비교함으로써 녹용 추출에 계내금 조효소를 활용할 수 있는 방안을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 조효소액 제조

1) 재료

본 연구에 사용한 계내금과 녹용은 풍산제약사(경북 안동시)에서 구입하였다.

2) 계내금 조효소의 조제

계내금 조효소의 제조는 계내금을 60°C 건조기에서 4시간 건조시킨 분말 25 g과 식초 500 mL(pH 2.42)을 균질기(HF-93S, SMT Co., Japan)를 사용해 250 rpm에서 10분 교반하여 추출하였다. 40°C Water bath(HB-21, Han bak Co., Korea)에서 150 rpm으로 9시간 동안 진탕하면서, 효소를 추출한 후, 여과지(Whatman No. 1)로 감압 여과(Circulating aspirator, WJ-15, Sibata Co., Japan)한 여액을 조효소로 사용하였다.

3) 계내금 효소의 분리 및 정제

계내금 효소의 정제는 상기에서 획득한 계내금 조효소액으

로부터 김 등²⁴⁾의 방법에 의해 SP-Sepharose를 이용한 open column을 이용하여 정제하였다.

2. 방법

1) 녹용 추출 방법

계내금 조효소를 이용한 녹용의 추출 실험방법은 65°C 증류수에서 9시간 추출한 조건(DW), 65°C 계내금 조효소액에서 9시간 추출한 조건(CK), 전통적인 녹용 추출방법인 121°C, 2시간 추출한 조건(TM), 정제된 계내금 protease를 용매로 65°C, 9시간 녹용을 추출한 조건(PK)으로 구분하였다. 모든 추출조건에서 용질은 녹용 분말 6 g을 사용하였으며, 용매량은 150 mL로 하였다. 다양한 조건으로 녹용을 추출한 후 가용성 고형분 함량과 녹용 추출물의 색도, 단백질 함량 등을 조사하였다.

2) 유리 아미노산

유리 아미노산은 시료에 75%(v/v) 에탄올 용액을 가하여 80°C 수욕조에서 1시간 환류 냉각시키면서 유리 아미노산을 추출하였다. 추출액을 냉각, 여과, 감압 농축시켜 증류수로 100 mL 되게 정용한 후 이중 50 mL를 취하고, 여기에 25% trichloroacetic acid(TCA) 용액을 동량 가하여 1시간 동안 냉장 보관하면서 단백질을 침전시킨 다음 원심분리(3,000 rpm, 20 min)하였다. 상등액을 감압하에서 농축 건조시킨 다음 lithium citrate buffer(pH 2.2)에 용해시키고 0.22 µm membrane filter로 여과하여 아미노산 분석기(Sykam Amino Acid Analyzer)로 UV 570 nm, 440 nm조건하에서 검출하였다.

3) 무기질 함량

계내금 효소를 이용하여 녹용 추출물의 무기질 함량 측정은 2 g의 시료를 도가니에 넣은 후 600°C 전기로에서 2시간 회화한 회화분량을 중량법에 따라 정량하였다(건식분해). 회화분을 250 mL 용량 플라스크에 옮기고 1:1 염산용액 10 mL를 가하여 후드 상에서 가열분해 하였다(습식분해). 분해액을 방냉시킨 후 250 mL 플라스크에 증류수로 표선을 맞추었다. 시료액 일정량을 10 mL volumetric flask에 취한 후 증류수로 표선까지 희석하여 유도결합 플라즈마 분석기(Jobin-Yvon JY38S)를 이용해 분석 하였다.

4) 콜라겐 함량

계내금 조효소가 콜라겐에 대해 높은 기질 특이성을 보인다 예비실험을 바탕으로 계내금 조효소를 이용한 녹용 추출액의 콜라겐 함량을 측정하였다. 시료 0.08 g을 시험관에 넣고, 6 N-HCl 1 mL를 혼합한 후 9 mL로 시험관 벽을 씻어 내리면서 가한 후, 시험관에 질소 가스로 purge하고, 뚜껑을 단단히 막은 후 110°C에서 22시간 방치하였다. 방냉 후 500 mL 농축 플라스크에 분해액을 넣고, 증류수로 수차례 세척 후 60°C 감압 농축기에서 감압 후 증류수를 가해 다시 3회 농축하였다. 건조물을 희석 완충용액에 넣어 완전히 녹이고, 0.45 µm membrane filter로 여과한 후 아미노산 분석기를 이용하여 분석하였다. 표준액은 hydroxyproline과 hydroxylysine 일정량을 sample dilution buffer(pH 2.2) 10 mL를 포함한 증류수 50 mL에 녹여 표준곡선을 작성한 후 정량하였다.

결 과

1. 가용성 고형분, 색도, 단백질 함량

녹용의 추출 조건에 따른 품질 변화를 보기 위하여 4가지 조건으로 실험한 후 추출 전 후의 계내금 조효소 활성도와 단백질

함량, 가용성 고형분, 색도 등을 조사한 결과(Table 1), 계내금 효소가 첨가된 추출조건(CK, TM)에 비해 계내금 효소가 첨가되지 않은 추출조건(DE, TM)에서는 가용성 고형분, 당도, 색도 값이 거의 나타나지 않았으나, 계내금 조효소를 이용하여 녹용을 추출한 경우 전통적인 열수 추출방법에 비해 가용성 고형분, 당도 값이 각각 3.47배, 6.31배 증가하는 것으로 나타났다.

Table1. Experimental data after velvet antler extraction

Sample	Activity(units)		Protein(ug/mL)		Soluble solid (%)	Brix	Hunter's color
	before	after	before	after			
DE ¹⁾	-	-	-	-	1.71	0.8	L : 7.49 a : 3.78 b : 4.55 ΔE : 92.62
CK ²⁾	298,554	36,457	2,425	171.1	7.74	10.1	L : 81.14 a : -4.05 b : 27.56 ΔE : 34.87
TM ³⁾	-	-	-	-	2.23	1.6	L : 9.63 a : 7.32 b : 6.31 ΔE : 91.54
PK ⁴⁾	4,221	3,145	57.99	3,899	4.87	4.9	L : 84.12 a : -1.9288 b : 16.45 ΔE : 26.57

¹⁾ Distilled water extract, ²⁾ Crude *kyenegum* protease, ³⁾ Traditional method, ⁴⁾ Purified *kyenegum* protease

2. 아미노산 함량

서로 다른 4가지 조건으로 추출한 녹용 추출물의 총 아미노산 함량을 조사한 결과(Table 2), 총 아미노산의 함량은 CK, PK, TM, DW 순으로 높았으며, 그중 필수 아미노산의 함량은 CK, PK, DW, TM 순으로 높았다. 아미노산 중에서

histidine이 각각의 조건에서 가장 높은 함량을 나타내었고, 그 외에 glutamic acid, proline, alanine 등이 추출되었다. 특히, 계내금 조효소를 이용하여 녹용을 추출한 경우, 전통적인 열수 추출방법에 비해 4.7배, 정제 효소 보다는 2.4배 총 아미노산 함량이 높게 나타났다.

Table 2. Contents of total amino acid in the velvet antler extracts

Sample	(mg/dL)			
	DW ¹⁾	CK ²⁾	TM ³⁾	PK ⁴⁾
Tatol amino acid				
Aspartic acid	0.127	3.052	0.33	2.032
Threonine	0.044	2.312	0.206	2.372
Serine	0.039	2.237	0.008	2.077
Glutamic acid	0.566	9.263	3.602	7.029
Proline	0.279	9.545	0.132	2.183
Glycine	2.376	2.737	1.479	2.803
Alanine	2.046	5.966	3.106	5.992
Valine	1.327	3.372	1.442	4.460
Isoleucine	ND	1.106	ND	0.355
Leucine	1.538	4.392	ND	0.355
Tyrosine	ND	ND	1.009	7.035
Phenylalanine	1.143	3.041	0.723	4.913
Histidine	3.104	102.116	19.827	32.491
Lysine	2.050	2.080	0.426	2.840
Arginine	0.519	1.089	ND	1.739
Cystine	0.220	0.951	0.51	0.304
Methionine	ND ⁵⁾	ND	ND	ND
Tryptophan	0.284	0.953	0.792	2.690
Total	15.38	153.268	32.924	78.943
EA ⁶⁾	6.104	16.302	2.796	15.301

¹⁾ Distilled water extract, ²⁾ Crude *kyenegum* protease, ³⁾ Traditional method, ⁴⁾ Purified *kyenegum* protease, ⁵⁾ Not detected, ⁶⁾ Essential amino acid(Thr+Val+Met+Ile+Leu+Phe+Lys+Trp).

또한 추출방법에 따른 유리 아미노산 함량 결과는 Table 3에 나타내었다. 계내금 조효소가 계내금 정제 효소에 비해 2.2

배 이상 유리 아미노산 함량이 높았으며, 일반적인 녹용 추출 방법인 열수 추출방법보다는 5배 이상 높은 것으로 나타났다.

Table 3. Contents of free amino acid in the velvet antler extracts

Free amino acid	Sample	(mg/dL)			
		DW ¹⁾	CK ²⁾	TM ³⁾	PK ⁴⁾
Aspartic acid		0.12	5.39	0.61	1.21
Threonine		ND	ND	0.60	0.77
Serine		ND	ND	0.12	0.99
Glutamic acid		0.48	6.05	3.84	3.74
Proline		ND	4.07	1.32	0.17
Glycine		0.12	2.42	1.92	1.65
Alanine		ND	6.38	2.52	2.97
Valine		0.18	3.30	0.96	1.32
Isoleucine		ND	1.98	ND	0.22
Leucine		0.12	3.85	ND	2.97
Tyrosine		ND	ND	0.72	2.86
Phenylalanine		0.24	2.53	0.60	1.98
Histidine		1.56	63.14	3.72	19.03
Lysine		0.36	2.64	1.44	1.32
Arginine		0.12	1.87	ND	1.11
Cystine		0.60	1.65	1.68	1.65
Methionine		ND ⁵⁾	ND	ND	ND
Total		10.28	109.45	21.85	43.96
EA ⁶⁾		0.92	14.30	4.56	11.44

¹⁾ Distilled water extract, ²⁾ Crude *kyenegum* protease,

³⁾ Traditional method, ⁴⁾ Purified *kyenegum* protease,

⁵⁾ Not detected, ⁶⁾ Essential amino acid(Thr+Val+Met+Ile+Leu+Phe+Lys+Trp).

3. 무기질 함량

실험 조건별로 녹용에서 추출한 무기질 함량을 분석한 결과(Table 4), 계내금 조효소액으로 추출한 경우 Ca의 함량이 다른 실험군에 비해 10.7배 ~ 161.7배 높았다. 그리고

정제 효소의 실험군은 Na의 함량이 다른 대조군에 비해 3.6배 ~ 44.3배 높았다. 총 무기질 함량은 정제효소, 조효소, 전통적 추출, 열수추출 순으로 높았으며, 특히 정제효소는 조효소 실험군에 비해 2.6배 높은 총 무기질 함량을 나타내었다.

Table 4. Mineral composition of velvet antler extracts

Mineral	Sample	(mg/dL)			
		DW ¹⁾	CK ²⁾	TM ³⁾	PK ⁴⁾
Ca		4.20	368.76	2.28	34.32
Mg		0.48	9.84	0.24	4.62
Fe		0.48	0.24	0.36	0.33
Cu		3.48	6.36	1.68	0.02
Zn		0.02	0.12	0.04	0.03
Mn		1.08	3.48	0.84	0.01
Na		26.40	48.40	320.40	1168.53
P		4.08	35.87	5.52	20.57
Total		40.22	473.06	331.36	1228.44

¹⁾ Distilled water extract, ²⁾ Crude *kyenegum* protease,

³⁾ Traditional method, ⁴⁾ Purified *kyenegum* protease.

4. 콜라겐 함량

서로 다른 방법으로 녹용을 추출한 후 추출액에서 콜라겐 단백질 함량의 기준 아미노산인 hydroxyproline과 hydroxylysine 함량을 조사한 결과(Table 5), Hydroxyproline

의 함량은 계내금 조효소액 추출 실험군에서 129.5 mg/dL로 가장 높았으며, 계내금 무처리와 정제효소 처리군에서 각각 32.4, 67.5 mg/dL를 보여 큰 차이는 없었다. Hydroxylysine 함량은 계내금 조효소액 처리군이 다른 처리군에 비해 가장 높았다.

Table 5. Collagen contents of velvet antler extracts

Collagen content	Sample	Experimental condition			
		DW ¹⁾	CK ²⁾	TM ³⁾	PK ⁴⁾
Hydroxyproline		32.4	129.5	56.2	67.5
Hydroxylysine		9.8	14.5	6.3	7.3
Total		42.2	144.0	62.5	74.8

¹⁾ Distilled water extract, ²⁾ Crude *kyenegum* protease, ³⁾ Traditional method, ⁴⁾ Purified *kyenegum* protease.

고찰

본 연구에서는 계내금으로부터 추출한 조효소액의 녹용 추출 특성을 조사하기 위해 4가지 조건으로 실험한 후 추출물의 가용성 고형분, 색도, 단백질 함량, 아미노산 함량, 무기질 함량, 콜라겐 함량을 비교 분석하였다. 선행된 실험에서 얻은 녹용 최적 추출 조건인 65℃, 100 rpm에서 9시간 실험을 실시하였으며, 녹용을 증류수에서 추출한 조건(sample DW), 계내금 조효소액으로 추출한 조건(sample CK), 전통적인 열수 추출방법인 121℃에서 2시간 추출한 조건(sample TM), 계내금 정제 효소로 녹용을 추출한 조건(sample PK) 등 4가지 방법으로 진행하였다.

계내금 효소가 첨가되지 않은 경우 가용성 고형분, 당도, 색도 값이 거의 나타나지 않았으나, 계내금 조효소를 이용하여 녹용을 추출한 경우 가용성 고형분, 당도 값이 각각 3.47배, 6.31배 증가하는 것으로 보아 계내금 조효소가 녹용 추출 능력이 뛰어난 것으로 나타났다(Table 1).

아미노산 중에서 histidine이 각각의 조건에서 가장 높은 함량을 나타내었고, 그 외에 glutamic acid, proline, alanine 등이 추출되었다. 계내금 조효소를 이용하여 녹용을 추출한 경우 전통적인 열수 추출방법에 비해 5배 이상 총 아미노산 함량이 높게 나타났으며, 정제 효소 보다는 2배 이상 높은 것으로 보아 계내금 조효소액이 녹용에서 아미노산 추출 능력이 뛰어난 것으로 나타났다. 그러나, 필수 아미노산의 함량을 조사한 결과 계내금 조효소 실험군과 정제 효소 실험군에서 뚜렷한 차이점이 없는 것으로 보아 계내금 정제 효소액의 경제적인 대량 생산 방법이 확립될 경우 산업화 가능성이 높은 것으로 판단된다.

녹용의 velvet 층에서 methionine, lysine, threonine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine 등 필수 아미노산과 준필수 아미노산인 histidine, arginine 그리고 aspartic acid, serine, glutamic acid, proline, glycine, tyrosine 등 비필수 아미노산 및 ammonia, citric acid 등을 함유하고 있다는 연구 결과²⁵⁾와 일치하는 아미노산 조성이 계내금 protease에서도 추출됨을 알 수 있었다.

무기질 함량을 비교한 결과, 계내금 정제 효소에서 무기질 함량이 높은 것으로 나타났으나, 계내금 효소를 처리하지 않은 실험군에 비해 3배 이상 함량이 높게 나타나 계내금 protease가 녹용에서 무기질 성분을 잘 추출하는 것으로 나타났다.

녹용 velvet 층에서 Ca, P, Mg, Na, Fe, Zn, Cu 등을 확인하였으나 Mn은 확인하지 못하였다는 보고²⁶⁾가 있었으나, 본 연구에서는 계내금 조효소 처리 시 3.48 mg/dL의 Mn이 검출되었다.

수용성 콜라겐이 피부의 탄력을 유지시키고, 잔주름을 예방하며, 특히 피부의 수분 보유력을 높이는 기능이 있어 화장품 기초 재료로써 널리 사용되고 있으며, 특히 천연에서 추출

한 콜라겐은 생체 접합 시 면역학적 문제가 적어 의료용으로 널리 사용되고 있다^{27~32)}. 현재 널리 사용되고 있는 수용성 콜라겐은 주로 송아지나 돼지 껍질에서 얻어지고 있는데, acid soluble의 양은 신선한 가죽 1 kg에서 12 g밖에 얻을 수 없으며, 동물이 도살된 후 전 처리 과정이 복잡하여 콜라겐 추출 비용이 높으며, 신선한 콜라겐을 얻기 위해서는 100 시간 이상의 많은 시간이 소요되는 단점이 있다. 이상의 결과를 볼 때 계내금에서 추출한 protease가 수용성 콜라겐의 분해 능력이 뛰어나며, 이를 이용하여 생산한 콜라겐은 추출 시간과 비용을 줄일 수 있으므로 효율적인 콜라겐 생산 효소로 이용될 것으로 판단된다.

결론

전통적인 녹용 추출방법인 열수추출과 계내금 조효소액, 계내금 정제 효소를 이용하여 각각 추출한 녹용 추출액의 품질 특성을 비교한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 계내금 조효소액 처리군에서 가용성 고형분 함량과 당도가 높은 것으로 나타났으며, 유리 아미노산 함량의 경우 계내금 효소 처리시 5배 이상 높은 것으로 나타났다.
2. 계내금 protease를 이용하여 녹용을 추출한 경우, 계내금 효소 무처리군에 비해 무기질 함량이 3배 이상 높았으며, Ca의 경우 최고 100배 이상 함량이 높았다.
3. 녹용에서 추출한 콜라겐 함량은 계내금 효소 처리의 경우 다른 실험군에 비해 2배 이상 높은 것으로 나타나 계내금 protease가 녹용에서 콜라겐 성분을 추출하는데 유용한 효소인 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문(또는 저서)은 2006년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2006-353-F00004).

참고문헌

1. Lee JM, Lee SH, and Kim HM. Use of oriental herbs medical food. J Food Industry & Nutr, 2000 ; 5(1) : 50-56.
2. Korean Intellectual Property Office. New technology trends survey report(2000), Enzymes, Chemicals, Drugs, 2001 : 5

3. Koo JH, Choi IJ, Nam HS, Lee HJ, Shin ZI and Oh TK. Medium optimization for production of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* NS 70. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol*, 1997 ; 25 : 207–211.
4. Choi C, Choi KS, Kim S, Lee SH, Son JH, Choi HG, Lee SS and An BJ. Characteristics and action pattern of protease from *Scopulariopsis brevicaulis* in korean traditional meju. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol*, 1997 ; 25 : 56–61.
5. Noguchi M, Yamashita M, Arai S and Fujimaki M. On the bitter mashita activity of a glutamic acid rich oligopeptide fraction. *J Food Sci*, 1975 ; 40 : 367–370.
6. Umetsu H and Ichishima E. Mechanism of digestion of bitter peptide from a fish protein concentration by wheat carboxy peptidase. *Nippon Shokuhin Kogyo Gollaiishi*, 1985 ; 32 : 281–287.
7. Nakagawa, T, Nagayama F and Hories S. Properties of the extracellular lytic proteinase of *Pseudomonas* sp. *Bull, Japan Soc Sci Fish*, 1985 ; 51 : 75–78.
8. Ahn JS, Chung YC, Park YH and Park KH. Partial purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus* sp. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol*, 1990 ; 18 : 344–351.
9. Roh JS, Chung YC, Park SK and Sung NK. Isolation of alkalo psychrotrophic protease—production *Pseudomonas* sp. RP-222 and properties of its crude enzyme. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol*, 1991 ; 19 : 383–389.
10. Lee CH, Kwon TJ, Kang SM, Suh HH, Kwon GS, Oh HM and Yoon BD. Production and characterization of an alkaline protease from an isolate, *xanthomonas* sp. YL-37. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol*, 1994 ; 22 : 515–521.
11. Christie RB. Topics in enzyme and fermentation biotechnology. 4th ed. Wiseman, Ellis Horwood, 1980 : 25~83.
12. Shin SW, Jung KJ, Kim SW and Park SH. Identification of the protease producing bacteria to use fish meal wastewater and the producing conditions for fish enzyme. *Kor Fish Soc* 1989 ; 22 : 138–146
13. Choi C, Chung JG, Sung SK, Choi KS, Lee JS, Cho YJ and Kwon OJ. Production and purification of alkaline protease from *Streptomyces* sp. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol*, 1992 ; 20 : 169–177.
14. Choi C, Chung JG, Sung SK, Choi KS, Lee JS, Cho YJ and Chun SS. Characteristics and action pattern of alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol*, 1992 ; 10 : 295–301.
15. Godfrey T and West S. *Industrial enzymology* 2nd, Mac millian Publishers Inc, 1996 : 3.
16. *Dictionary of Chinese medicine*. Shanghai Science Publishers, 1998 : 1036.
17. Kim SG. *physiology of domestic animal* Academi, Academy Publishers, 1996 : 206–208.
18. Won DH, Yeon TB, Jo JH, Hong ND, Hue JD. Studies on the Quality Control Method of Crude Drug Preparations (Ⅲ). *National Institutes of Health* 1985 ; 22 : 359–362.
19. Shin KH, Lee EB, Kim JH, Chung MS, and Cho SI. Pharmacological studies on powdered whole part of unossified antler. *Kor J Pharmacogn*, 1989 ; 20(3) : 180–187.
20. Yong JI. The effect of deer horn on the experimental anemia of rabbits. *J Pharmaceutical Society of Korea* 19964 ; 8 : 6–11.
21. Wang B, Zhao X, Yang Q, Kaneko X and Nomura Y. Stimulating effect of deer antler extract on protein synthesis in senescence accelerated mice in Vivo. *Chem Pharm Bull*, 1998 ; 36 : 2593–2598.
22. Wang B, Zhao X, Yang Q, Kaneko X and Nomura Y. Effect of repeated administration of deer antler extract on biochemical changes related to aging in senescence accelerated mice. *Chem Pharm Bull*, 1998 ; 36 : 2587–2592.
23. Haw K, Choi SH, Lee HB, Chung KC, Ko DH. Studies on Antler (II)Effect of antler on the growth of Experimental Rat. *J Pharmaceutical Society of Korea* . 1960 ; 5 : 10–15.
24. Kim DW, Jo HS, Jeong YJ, Kim GS. Purification and characterization of Protase from *Kyenegeum*. *The Korea Journal of Herbology*, 2007 ; 22(4) : 21–28.
25. 배대식 : Studies on the Effects of Velvet on Growth of Animals (I). Collection of dissertations of Chungbuk University 1975 ; 10 : 202.
26. Kang CK and Kim SW. A study on the biochemical and nutritional Inquiry of antler. *Korean J Food & Nutr*. 1989 ; 2(2) : 65–71.
27. Jung MS, Yoon BS and Lim HJ. Syudy on the soluble collagen extraction from the remain after fillet. *Journal of KOWREC*, 1997 : 89–100.
28. Piez KA. Collagen. The physiology and biochemistry of muscle as a food. Univ. of Wisconsin Press, Madison, 1996 ; 1 : 315–332.
29. Komanowsky M, Sinnamon HI, Elisa S, Heiland WH and Arceto NC. Production of committee collagen for noval applications. *J Am Leather Chem Assn*, 1974 ; 69 : 410–418.
30. Turkot VA, Komanowsky M and Shinnamon HI. Committee collagen, estimated costs of commercial production. *Food Technol*, 1978 ; 32(4) : 48.
31. Cole CGB and McGill AEJ. Effect of animal age and conditioning method on the conversion bovine hide into gelatine. *Inter J Food Sci Technol*, 1998 ; 23 : 525.
32. Leuenberger BL. Investigation of viscosity and gelation properties of different mammalian and fish gelatins. *Food Hydrocolloids*, 1991 ; 5 : 353.