

ORIGINAL ARTICLE

저이용 홍어 가공 부산물을 이용한 고기능성 물질의 생산기술 개발에 관한 연구(1) - 홍어연골을 이용한 콘드로이틴 황산 소재 개발

백장미 · 강건희 · 김상호 · 노정숙¹⁾ · 정갑섭^{1)*}

영산홍어(주), ¹⁾동명대학교 식품영양학과

A Study on Development of High Functional Materials Producing Technique using By-products from Skate Processing (1) - Development of Chondroitin Sulfate Materials using Skate Cartilages

Jang-Mi Baek, Keon-Hee Kang, Sang-Ho Kim, Jeong-Sook Noh¹⁾, Kap-Seop Jeong^{1)*}

Yeongsan Skate Co., Ltd., Busan 48531, Korea

¹⁾Department of Food Science & Nutrition, Tongmyong University, Busan 48520, Korea

Abstract

For the purpose of reuse the wasted by-products from the skate process to the health functional food or medicinal material, chondroitin sulfate was extracted from the skate cartilage with the method of hydrolysis with protease enzyme, and the contents of chondroitin sulfate and hydrolyzed protein were measured qualitatively and quantitatively. The effects of chondroitin sulfate on body weight or liver weight changes, hepatotoxicity elimination and anti-inflammatory actions were measured from in vivo test with feed-treated mice. From the hydrolytic extraction of skate cartilage with the mixture of 1% alcalase and 1% protease for 4 hours, the extraction yield of chondroitin sulfate was about 32.55%. The content and molecular weight of chondroitin sulfate was 26.63% and 2.85×10^5 Da., respectively and the content ratio of chondroitin sulfate to protein was measured to 1 to 2.76 with gel permeation chromatography. For the odor component, trimethylamine decreased about 30% but almost not ammonia from chondroitin sulfate with the treatment of activated carbon. From the feeding chondroitin sulfate to mice, the control effect of body and liver weights decrease was measured, anti-inflammatory action and hepatotoxicity elimination action were also measured. From these results, process operation conditions for manufacturing of chondroitin sulfate were suggested.

Key words : Skate cartilage, Chondroitin sulfate, Skate processing by-product, Nutraceutical food, Anti-inflammatory action

Received 21 January, 2016; Revised 17 April, 2016;

Accepted 22 April, 2016

*Corresponding author : Kap-Seop Jeong, Department of Food Science & Nutrition, Tongmyong University, Busan 48520, Korea
Phone: +82-51-629-1713
E-mail : ks0903@tu.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.

© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

가오리과에 속하는 홍어는 가오리와 매우 흡사한 모양이나 전체 몸길이가 1~1.5 m 가량으로 마름모꼴을 이루고 둥글고 가로로 퍼졌으며 머리가 작고 주둥이가 뾰족하며, 굵은 꼬리 윗부분에 2개의 지느러미와 가시가 2~4줄 늘어서 있다(KOSFOST, 2004).

현재 국내에서 가공되는 홍어의 어획량은 2013년을 기준으로 연간 약 5,100 톤에 달하며, 대부분은 아르헨티나, 칠레 등에서 수입하는데 그 수입량은 연간 약 9,600 톤 정도에 달한다. 국내에서 소비되는 양은 매년 약 10,000 톤 정도이지만 홍어회 가공 후 연간 약 5,000 톤의 부산물이 발생되고 있다(Choi, 2014). 이러한 홍어 부산물들은 일부가 사료로 이용되기도 하지만 특유의 냄새로 인하여 대부분 폐기되고 있으며, 이로 인해 발생하는 폐기물 처리 비용이 부담되고 환경오염의 문제 또한 무시할 수 없는 실정이다.

홍어를 가공하고 폐기되는 부산물 중의 하나인 홍어 연골은 콘드로이틴 황산 성분을 다량 함유하고 있는데, 홍어 연골에 함유되어 있는 성분으로서 아미노당을 함유하는 것의 총칭인 뮤코다당은 생체 내에서는 단백질과 결합하여 뮤코다당-단백을 형성하며 주로 결합조직에 존재한다. 콘드로이틴 황산은 대부분의 포유동물의 연골은 물론 쥐의 늑골, 발생 중에 있는 소의 태아 및 고래 연골(Vitor et al., 2012), 사람의 위와 신장조직에서도 발견된다.

이러한 콘드로이틴 황산을 섭취하여 보충해 주면 노화가 억제되고 피부에 윤기와 탄력을 주며, 특히 압축 하중에 저항하고 관절 조직의 보호 및 윤택작용(Ishimaru et al., 2014; Yue et al., 2012)이 있어 콘드로이틴 황산의 섭취에 의한 퇴행성 관절염 예방 및 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며(MOF, 1998), 항종양 및 항동맥경화 등의 생리활성 작용을 하는 것으로 보고되고 있다(Bauerova et al., 2011; Katta et al., 2009).

우리나라 뿐만 아니라 전 세계에서 이미 고령화가 진행되고 있고, 고령화에 따라 퇴행성 관절염 환자도 꾸준히 증가하고 있는 추세이므로 콘드로이틴 황산을 이용한 건강기능성 식품소재나 노화에 따른 질병예방 및 치료용 소재 관련 제품들의 수요는 지속적으로 증가할 것으로 예상되고 있다. 따라서 부산물로 발생하는 홍어 연골로

부터 콘드로이틴 황산을 추출하여 건강기능식품이나 의약품 소재로 활용할 수 있는 가능성이 높다(FOCC, 2002).

본 연구에서는 홍어 가공 공정에서 폐기되는 부산물 중 연골 부분을 선별하여 단백질 분해 효소로 분해하여 콘드로이틴 황산을 추출분해하고, 이에 따른 수율 및 특성을 파악하여 최적 추출조건을 규명하고자 하였으며, 추출한 콘드로이틴 황산 및 단백질 가수분해물의 특성 검토 및 영양성분 조성, 함량 등을 검토하고, 실험동물을 대상으로 항염증 기능성과 간의 해독작용 등을 측정함으로써 콘드로이틴 황산을 함유한 건강기능 식품이나 의약품 소재 등의 산업화 가능성을 제시하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 실험에 이용된 실험재료로서의 홍어 연골은 영산홍어(주)에서 홍어 가공 중 발생한 부산물 중 다음과 같이 연골부분만 분리하여 사용하였다. 어육과 내장 등이 부착된 부산물 홍어 연골을 가온 자켓이 설치된 리본믹서를 이용하여 95℃ 이상에서 2시간 가온하며 회전시켜 연골에 붙어 있는 살을 완전히 제거하고, 연골을 건져 열풍건조기에서 24시간 건조하였으며, 건조된 연골을 물에 약 24시간 침지시킨 후 선별하고 이를 분쇄기로 분쇄하여 사용하였다. 분쇄한 연골에 건조 연골 중량의 3배의 물을 가수하여 50℃에서 4시간 동안 alcalase와 protamex (Novozyme Co., Denmark) 등 단백질 가수분해 효소를 사용하여 가수분해 및 추출한 후 95℃에서 30분간 가열하여 효소능을 소거시키고, 감압여과 및 농도 40°Brix로 감압농축하여 콘드로이틴 황산 농축물을 제조하였다. 콘드로이틴 황산의 최종 분말 시료는 40°Brix로 감압농축한 농축물을 동결건조기 (Samwon, SFDSM06, Korea)로 -75℃에서 동결건조하고 분쇄하여 제조하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 성분분석 및 냄새저감 실험

홍어 연골의 일반성분은 AOAC법(Kenneth, 1990)에 따라 수분은 105℃ 상압가열건조법, 조단백질은 Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 회분은 550℃

직접회화법을 사용하여 측정하였다. 탄수화물은 시료의 총함량에서 수분, 단백질, 지방 및 회분 함량을 제외한 함량으로 표시하였다.

홍어 연골로부터 분해추출한 콘드로이틴 황산의 함량은 건강기능식품공전 콘드로이틴 황산 제 1법에 준하여 다음과 같이 측정하였다(KMFDS, 2012). 시료 0.3 g에 증류수로 100 mL로 정용하고, 이 용액 4 mL를 취하여 증류수로 20 mL로 정용한 다음 여과한 것을 검액으로 하였다. 별도로 붕산나트륨 1 g에 황산을 가해 200 mL로 정용하여 붕산나트륨 시액을 조제하고, 두 개의 시험관에 시액 5 mL씩을 취하여 냉각한 다음 각각 검액과 표준용액을 1 mL씩 분주하여 혼합한 후 100°C 수욕상에서 10분간 가열한 다음 즉시 냉각하였다. 그리고 카바졸 0.125 g을 무수 에탄올로 용해하고 100 mL로 정용하여 카바졸 시액을 제조하고, 냉암소에 보관하면서 카바졸 시액 0.2 mL를 각 시험관에 가하여 혼합한 후 100°C 수욕상에서 15분간 가열하고 실온까지 냉각하였다. 검액 대신 증류수 1 mL를 사용하여 동일하게 조작한 것을 대조액으로 하고, 분광광도계로 530 nm에서 각 용액의 흡광도를 측정하여 다음 식으로 콘드로이틴 황산의 함량을 계산하였다.

$$\text{콘드로이틴 황산의 함량(\%)} = \text{글루쿠론산의 함량(\%)} \times 2.593 \dots\dots\dots(1)$$

$$\begin{aligned} &\text{글루쿠론산 함량(\%)} \\ &= \frac{\text{검액의 흡광도}}{\text{표준용액의 흡광도}} \times \frac{\text{표준물질 채취량(g)}}{\text{시료 채취량(g)}} \\ &\quad \times 1.1023 \times 100 \dots\dots\dots(2) \end{aligned}$$

여기서 2.0593은 콘드로이틴 황산의 분자량/글루쿠론산의 분자량 비율이고, 1.1023은 글루쿠론산의 분자량/δ-글루쿠로노락톤의 분자량 비율이며, 표준용액은 δ-글루쿠로노락톤(δ-glucuronic lacton, Sigma Chemical Co.) 0.04 g을 증류수로 용해하여 100 mL로 정용하여 제조하고, 이 액 1 mL에 증류수를 가해 20 mL로 정용하여 표준용액으로 하였다.

홍어의 특성상 암모니아나 TMA (trimethyl amine)가 다량 함유되어 주요한 냄새성분으로 작용한다. 그러

나 콘드로이틴 황산 제품에서도 냄새가 잔존할 경우 사용자의 기호도에 따라 제품에 대한 선호도가 달라질 수 있으므로 이들 성분의 제거 혹은 저감이 필요하다. 따라서 원재료인 건조 연골 중량의 0.5%에 해당하는 활성탄을 효소분해 추출물에 혼합하고 75°C로 승온하여 30분간 교반함으로써 냄새성분이 흡착제거된 콘드로이틴 황산 분말을 제조하여 활성탄 처리 전후의 분말 시료의 냄새를 관능평가 및 기기분석을 통하여 측정하였다. 먼저 시료 1 g을 냄새가 나지 않는 폴리에스테르 재질의 10 L 봉지에 넣은 후 10 L의 질소가스를 주입하고, 냄새성분이 기화되도록 80°C 오븐에 2시간 넣은 후 실온까지 방치하여 분석을 실시하였다. 냄새의 분석은 후각에 의한 5점 관능평가와 gas chromatography (GC)로 측정하였으며, 관능평가는 악취공정시험법에 따라 희석배수를 산정하고 6명의 정상 후각력을 지닌 판정원을 선발하여 직접관능법으로 평가하였다(Son et al., 2003). 암모니아의 농도는 암모니아 검지관(Gasteckorea, 3HM, Japan)으로, TMA 농도는 FID 검출기를 사용한 GC로 각각 분석하였다.

2.2.2. GPC에 의한 분자량 측정

동결건조된 콘드로이틴 황산 분말 시료 중에는 콘드로이틴 황산과 단백질이 혼합되어 있다. 단백질로부터 콘드로이틴 황산을 분리하고 분리된 콘드로이틴 황산의 분자량 분포를 확인하기 위하여 GPC (gel permeation chromatography, Tosoh, HLC-8320, Japan) 분석을 행하였으며, 분석조건은 Table 1과 같았다. 시료의 분해온도는 40°C로 하였고, 용리제 이동상은 0.02 M 아세트산 암모늄 완충용액(pH 7.4)을 사용하였으며, 유속은 1.0 mL/min로 유지하였다.

Table 1. Analytical condition of GPC operation

Item	Analytical condition
Column	Guard+2×TSKGel GMPW×14
Eluent	Buffer pH 7.4
Flow rate	1.0 mL/min
Temperature	40°C
Sample loadinging	100 µL
Detector	RI

Table 2. Experimental treatment condition for anti-inflammatory

Experimental groups	Treatment
Normal group (n=8)	The mice were received the vehicle treatments as normal control
LPS group (n=8)	The mice were received 10 mg/kg LPS injection intraperitoneally as negative control
SCE group (n=8)	The mice were orally administrated skate cartilage extract 400 mg/kg with intraperitoneally injected LPS
CS group (n=8)	The mice were orally administrated shark chondroitin sulfate 200 mg/kg with intraperitoneally injected LPS

2.2.3. 제조된 콘드로이틴 황산의 기능성 측정

(1) 항염증 기능성 측정

제조된 콘드로이틴 황산의 항염증 기능성을 확인하기 위하여 쥐를 실험동물로 선정하여 다음과 같이 항염증 기능을 측정하였다. 체중 25~30 g 내외의 생후 5주된 수컷 ICR mouse 32마리를 제공받아 7일 동안 적응기를 거쳐 실험모델로 사용하였다. 이들 실험동물은 실험기간 동안 온도 23±2℃, 습도 50±10%로 조절된 동물실에서 사육되었으며, 물과 고형사료를 자유롭게 섭취하도록 하였고, 필요시 일정 기간 동안 규정된 함량의 식이를 거친 후 일정 수의 개체를 취하여 ether로 마취하고 희생시켜서 개복하여 해당항목 측정에 사용하였다. Table 2와 같이 적응기가 끝난 후 임의로 실험군당 8마리씩의 mice를 분류하여 4군으로 나누었다. 즉 정상군(normal group, N group), 염증유발처리(lipopolysaccharide 처리)를 한 대조군(LPS group), 홍어 연골 콘드로이틴 황산 추출물 400 mg/kg 투여군(skate cartilage extract group, SCE group)으로 분류하여 측정하였으며, 별도로 상어 연골 유래 콘드로이틴 황산 투여군(chondroitin sulfate group, CS group)을 설정하여 본 연구에서의 홍어 연골 콘드로이틴 황산과의 항염증 기능성을 비교하였다.

3일간 연속하여 일정한 시각에 홍어 연골과 상어 연골 콘드로이틴 황산 분말을 증류수에 용해하여 실험동물에 200 µL 경구투여하였고, normal군과 LPS 처리군에는 vehicle treatments로서 생리식염수 200 µL를 경구투여하였다. 샘플 처리 3일째 되는 날, 마지막 샘플 처리 1시간 후 normal군을 제외한 나머지 군에 10 mg/kg의 LPS를 복강 투여하였다. LPS 처리 6시간 이후 ether로 마취하고 희생시켜서 개복하여 간 조직을 적출하여 간에 부

착되어 있는 지방이나 근육을 깨끗이 제거한 후 차가운 생리식염수로 세척하여 혈액을 제거한 뒤 여과지로 물기를 제거하고 -70℃에서 보관하면서 분석에 사용하였다.

(2) 간독성 지표 측정

간 손상 정도는 혈청 중의 aspartate transaminase (ALT)와 alanine transaminase (AST)의 농도로부터 측정할 수 있다. 개복한 실험동물의 하대정맥으로부터 혈액을 채취하고, 300 rpm에서 20분간 원심분리하여 분리된 혈장을 -70℃에서 냉동 보관하며 분석에 사용하였다. 혈청 중의 ALT와 AST의 활성은 정량용 Transaminase CII-test kit(Wako Chemical Industries, Ltd., Japan)를 사용하여 측정하였다.

(3) 간 조직에서의 염증인자 발현 측정

10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine thanesulfonic acid) buffer용액, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid), 0.1 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid), 1 mM DTT (dithiothreitol), 0.15 % Nonidet P-40 (4-Nonylphenyl-polyethylene glycol), 50 mM b-glycerophosphate, 10 mM NaF, 5 mM Na₃VO₄, protease inhibitor cocktail 등을 사용하여 pH 7.9의 cytoplasmic buffer를 제조하고, 각 mouse의 간 조직과 이것의 5배에 해당하는 cytoplasmic buffer를 균질기에 투입하여 균질화하였다. 4℃에서 20분간 10,500×g으로 원심분리하여 cytosolic 상층액을 시료로 사용하였다. 추출된 단백질은 Protein assay kit의 방법으로 정량하여, 각 sample 당 30 µg의 단백질을 실험에 사용하였다. SDS (sodium dodecyl sulfate)

12% polyacrylamid 겔을 이용한 전기영동을 통해 단백질을 분리한 후, 분리된 단백질을 nitrocellulose 막으로 이동시켜, antibody의 비특이적인 결합을 막기 위해 TBS-T buffer로 용해한 5% skim milk를 이용하여 blocking하고, TBS-T로 15분간 3회 세척 후 1차 antibody와 2차 antibody를 차례로 incubation한 후 세척하였다. 발색제 ECL kit로 형광발색 정도를 측정하여 β -actin으로 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 홍어 연골과 제조된 콘드로이틴 황산의 특성

홍어 연골의 일반성분을 측정된 결과를 Table 3에 나타내었다. 그 결과 수분 2%, 회분 0.1%, 단백질 63.1%, 탄수화물이 34.8%로 측정되었으며, 단백질과 탄수화물이 약 1.8 : 1 비율로서 이들 두 성분이 연골의 대부분을 차지하고 있었다. 이들 값은 상어 연골의 등뼈를 기준한 일반성분과 비교하면 수분 7.2%, 단백질 40.2%, 지방 0.2%, 회분 41.5% 및 탄수화물 10.9%로 측정되어 단백질과 탄수화물의 비가 약 4 : 1인 상어 연골(Kim and Cho, 2009)에 비하여 단백질/탄수화물의 비가 약 반 정도의 값으로 측정되었다.

분쇄된 홍어 연골에 3배의 물을 가수하고, 대표적인 단백질 분해효소인 alcalase와 protamex를 사용하여 4 시간 동안 분해할 때, 각 가수분해제를 단독 또는 혼합 사용하여 분해하고, 40 °Brix로 농축한 농축물의 콘드로이틴 황산 수율 측정결과를 Fig. 1에 나타내었다.

Fig. 1에서 단백질 가수분해 효소로서 alcalase를 단독으로 사용한 경우 31.68%, protamex를 단독 사용한 경우 31.49%의 수율을 보였으나, 두 protease를 혼합 사용한 경우 32.55%의 수율로 측정되어 가수분해 효소에

따른 수율은 거의 차이가 없었다. Alcalase와 protamex를 혼합 사용하여 가수분해 하면 alcalase는 endo형 효소로서 연골의 말단 단위부터 분해하고, protamex는 exo형 효소로서 연골 조직의 부위에 관계없이 전체적으로 분해할 것이므로 두 효소를 동시에 사용할 경우 상승 효과가 기대되었으나 본 연구에서는 거의 차이가 없는 것으로 측정되었다.

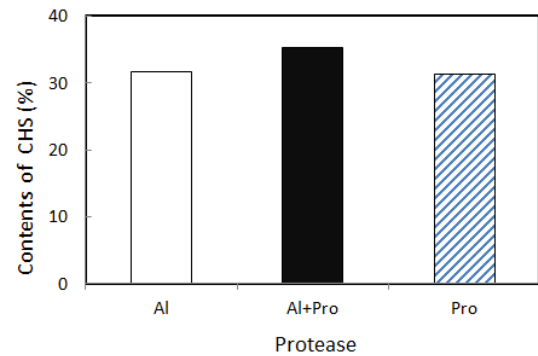


Fig. 1. Yield of chondroitin sulfate from skate cartilage with protease. (CHS: Chondroitin sulfate, Al: 2% Alcalase, Al+Pro: 1% Alcalase + 1% Protamex, Pro: 2% Protamex).

그리고 건강기능식품공전의 콘드로이틴 황산 제 1법 (KMFDS, 2012)에 준하여 단백질 분해효소별 분해물의 동결건조 분말 시료 중의 단백질 함량에 대한 콘드로이틴 황산 함량 비를 측정된 결과 Table 4와 같이 측정되었다. 콘드로이틴 황산과 단백질의 함량은 분해효소 종류에 따라 평균 23.85%와 74.42%로 측정되었고, 그 비율은 1 : 2.8 ~ 3.2의 함량비로 나타났으며, 이들 두 성분의 함량은 앞서의 수율 측정결과와 유사하게 두 효소를 혼합 사용한 경우에 다소 높은 함량을 보였다. 그러나

Table 3. Proximate compositions of skate cartilage

Component	Skat cartilage (g/100 g)	Shark back bone (g/100 g) [Kim and Cho, 2009]
Moisture	2.0	7.2
Crude lipid	0.0	0.2
Crude ash	0.1	41.5
Crude protein	63.1	40.2
Carbohydrate	34.8	10.9

Table 4. Comparison of chondroitin sulfate and protein contents extracted with protease

Protease	CHS (%)	Protein (%)	CHS+ Protein (%)
2% Al	23.45	74.75	98.20
2% Pro	22.40	76.52	98.92
1% Al + 1% Pro	25.70	71.98	97.68

CHS: Chondroitin sulfate, Al: Alcalase, Pro: Protamex

시료의 일반성분 측정결과인 Table 3에서 홍어 연골의 조성 중 탄수화물의 함량이 34.8%로 측정되었지만 효소 분해 결과 평균 함량이 더 낮은 값인 23.85%로 측정된 것은 이들 효소에 의해 단백질 성분의 분해는 용이하지만 분해되기 어려운 다른 탄수화물 성분도 존재할 수 있다는 것을 의미하는 것으로 생각된다.

홍어 연골로부터 제조한 단백질 분해효소별 4시간 분해물의 동결건조 분말 시료에 대한 GPC (gel permeation chromatography) 측정 결과를 Table 5에 나타내었다. GPC 측정 14.5분에서 분자량 284,671 Da의 peak가 검출되었고 20.0분에서 847 Da의 peak가 검출되었으며, 이들이 각각 콘드로이틴 황산과 단백질로 추정되었고, GPC chromatogram의 면적으로부터 계산된 함량은 각각 26.63%와 73.37%로 얻어졌다. Kim and Cho(2009)는 상어 연골로부터 알칼리방 법과 효소적 방법으로 콘드로이틴 황산을 추출하고, 막분리와 GPC분석에 의해 측정된 분자량이 약 27만 Da이라고 보고한 바 있어 본 연구결과인 28만 Da과 유사한 결과로서 유래 해양생물로서 상어 연골과 홍어 연골로부터 얻어진 콘드로이틴 황산의 분자량은 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

한편 가수분해 시간에 따른 함량의 변화를 살펴보기 위해 6시간 분해물의 동결건조 분말 시료에 대하여 동일한 방법으로 GPC 측정 결과 4시간 분해물과 동일한 시

간대에 각 peak가 검출되었으며, 콘드로이틴 황산과 단백질의 함량은 각각 28.0%와 72.0%로 얻어졌다. 이들 결과로부터 가수분해 시간에 따른 콘드로이틴 황산의 함량과 분자량은 그다지 큰 변화가 없는 것으로 생각된다. Table 3의 AOAC법에 따라 일반성분으로 측정된 탄수화물 함량은 34.8%인데 비하여 GPC 측정으로 분석된 콘드로이틴 황산의 평균함량은 27.32%로 더 낮은 비율로 측정되었는데, 이는 탄수화물의 형태 중 콘드로이틴 황산 이외의 성분도 포함되어 있기 때문으로 생각된다.

콘드로이틴 황산의 냄새를 저감시키기 위하여 0.5%의 활성탄 처리를 하고, 활성탄 처리 전후의 분말 냄새를 관능평가, 검지관 및 기기분석을 통하여 측정·비교한 결과 Table 6과 같이 얻어졌다. 활성탄 처리 전후의 관능평가에서는 냄새의 후각적 농도는 변화가 없으나 강도는 보통 취기의 범위에서 약간 감소한 정도의 결과로서 후각에 의한 냄새제거는 그다지 효과가 크지 않아 홍어 고유의 냄새는 일정부분 유지하는 것으로 평가되었다.

악취의 주성분인 암모니아의 검지관 분석 및 TMA의 기기분석 결과 활성탄 처리 후 암모니아는 거의 변화가 없었으나 TMA는 30% 정도의 제거가 가능한 것으로 측정되었다. 이들 결과로부터 활성탄 처리 후에도 관능평가에 따른 냄새의 강도가 거의 변함이 없는 것은 암모니아의 영향이 냄새의 주요인으로 작용하여 활성탄 처리로

Table 5. GPC result of chondroitin sulfate and protein measurement

Hydrolysis time	Division	Mw (Da.)	Area (%)
4 hr	Chondroitin sulfate	284,671	26.63
	Protein	847	73.37
6 hr	Chondroitin sulfate	287,055	28.00
	Protein	825	72.00

Table 6. Determination of odor component from chondroitin sulfate with sensory test and instrumental analysis

Treatment of activated carbon	Sensory test		Concentration (ppm)	
	Strength	Odor Contents	Ammonia	TMA
Without	2.3	100	1.21	7.81
With	2.0	100	1.20	5.46

Table 7. Changes of body weight and liver weight with feeding treatment

Group	Body weight			Liver weight (g/100 mg b.w.)
	Initial (g)	Final (g)	Change (g/7 days)	
N	38.0 ± 0.5	40.2 ± 0.6 ^{***}	1.9 ± 0.3 ^{***}	8.1 ± 0.3 ^{***}
LPS	37.8 ± 0.6	33.3 ± 0.7	-3.9 ± 0.4	5.6 ± 0.1
CS	37.7 ± 0.5	34.4 ± 0.5	-2.8 ± 0.3 [*]	7.2 ± 0.2 ^{***}
SCE	37.7 ± 0.6	35.0 ± 0.5	-3.0 ± 0.1 [*]	6.6 ± 0.4 [*]

N: normal control mice, LPS: vehicle-treated LPS mice, CS: chondroitin sulfate 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, SCE: skate cartilage extract 400 mg/kg body weight-treated LPS mice. Data are the means ± S.E.M. Significance: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. vehicle-treated LPS mice

일부 제거가 가능하여도 그 자극성이 유지되기 때문인 것으로 생각된다. 과거 국내산 콘드로이틴 황산 제품이 일부 유통된 적이 있으나 본 연구에서의 제조품 냄새의 거의 100배에 해당되는 강도를 가진 적이 있고, 현재는 국내 제조업체는 전무하여 모두 수입품에만 의존하고 있으며, 이 또한 유래생물에 관계없이 상당히 냄새를 보유하고 있는 실정이다. 그러나 충분한 혹은 완전한 냄새의 제거를 위해서는 활성탄 처리 외에 추가적인 물리화학적 처리가 필요할 것으로 생각된다.

3.2. 제조된 콘드로이틴 황산의 기능성

LPS 주사군과 LPS 주사 및 홍어 연골 추출물 또는 상어 연골 콘드로이틴 황산 투여군의 체중 변화와 간의 무게를 비교한 결과는 Table 7과 같다. LPS를 주사한 군에서 정상군에 비해 상대적으로 체중이 감소하였으며, 이러한 체중 감소는 상어 연골 콘드로이틴 황산 투여군과 홍어 연골 추출물 투여군에서 다소 완화되었다. 또한 간 무게의 변화를 살펴본 결과 LPS 대조군에서 정상군에 비해 30.9% 정도 감소하였으나, 콘드로이틴 황산 투여 혹은 LPS 대조군과 비교하면 두 군 모두에서는 상대적으로 증가하였다. 이러한 결과로부터 콘드로이틴 황산은

홍어 및 상어 연골 유래 두 경우 공히 LPS 투여에 의한 급성 염증 유발시 나타나는 체중과 간 무게의 감소 방지에 효과가 있는 것으로 생각된다.

간 손상 정도를 나타내는 지표인 ALT와 AST의 농도는 정상군과 비교하여 LPS 처리군에서 크게 증가하여 급성 간 독성이 유발되었음이 확인되었다. 그러나 Table 8의 결과에서 보듯이 홍어 연골 추출물 및 상어 연골 콘드로이틴 황산 투여군에서 LPS 처리 대조군과 비교하였을 때 정상군의 수치와 비슷하게 유의적으로 낮아져 콘드로이틴 황산은 간 독성의 해독작용을 보이는 것으로 확인되었다.

염증반응의 조절인자인 NF-κB에 의해 영향을 받는 cyclooxygenase (COX)-2와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 일반적으로 염증반응에서 그 활성이 증가되는 것으로 보고되고 있다(Park et al., 2007; Qureshi, 2011). COX는 arachidonic acid를 prostaglandin (PG)으로 전환하는 효소로 혈소판 형성, 위벽보호 및 신장 기능의 유지 등 정상적인 생리기능에 작용하는 COX-1과 염증 매개물질인 prostaglandin-E2 (PGE₂)를 생성하는 COX-2로 분류된다(Lau et al., 2009).

다수의 염증 억제 약물의 작용기전은 PG 합성을 억제

Table 8. Effects of skate cartilage extract on hepatic functional parameters

Group	Serum ALT (IU/L)	Serum AST (IU/L)
N	5.6 ± 0.5*	33.0 ± 4.6***
LPS	7.3 ± 0.9	78.7 ± 8.2
CS	4.0 ± 0.7**	37.1 ± 3.4**
SCE	4.3 ± 0.4**	40.2 ± 3.9**

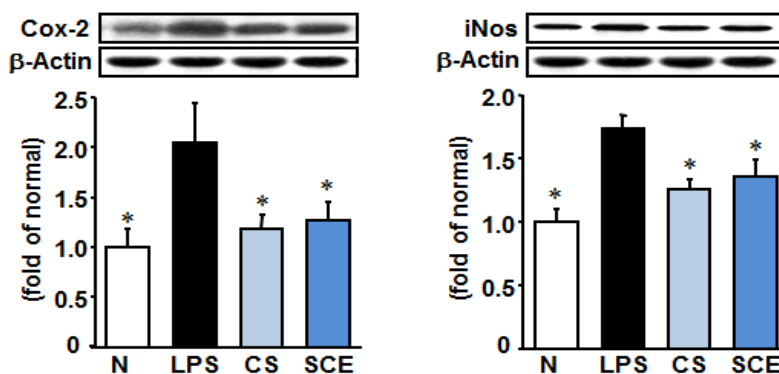
N: normal control mice, LPS: vehicle-treated LPS mice, CS: chondroitin sulfate 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, SCE: skate cartilage extract 400 mg/kg body weight-treated LPS mice. Data are the means ± S.E.M. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. vehicle-treated LPS mice

하는 작용으로 알려져 있으며, 이것은 COX-2의 활성 저해에 의한 것이다. LPS 자극에 의해 iNOS는 대식세포, 간세포, 심근세포 등에서 오랜 시간 동안 많은 양의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다(Jin et al., 2000). 특히 간 조직에서의 면역 및 염증을 담당하는 kupper cell은 LPS 의해 iNOS 유전자가 특징적으로 활성화되어 iNOS의 발현을 유도한다고 보고되고 있다(Vodovotz et al., 2012). 본 연구 결과에서도 Fig. 2에 도시하였듯이 LPS를 처리한 결과 염증성 반응 효소인 COX-2와 iNOS 발현이 2배 가까이 증가하였고, 이러한 증가반응은 콘드로이틴 황산이나 홍어 연골 추출물 투여에 의해 그 발현이 약간 억제되었다.

3.3. 제조공정 설정

홍어 연골 유래 단백질 가수분해 효소에 따른 수율추

정 결과와 콘드로이틴 황산과 단백질의 함량 비교 및 GPC 측정결과 등을 종합하여 홍어 연골로부터 콘드로이틴 황산의 추출 및 분리가 가능하고, 항염증 기능성 및 간 독성 해독 작용이 확인되어 기능성 식품소재로서의 가능성이 있는 것으로 생각되었다. 상기의 고찰결과를 토대로 제조조건으로서 건조 홍어 연골의 24시간 침지, 3배의 가수과 1%의 alcalase 및 1% protamex 혼합 효소에 의한 50°C에서의 4시간 추출 및 가수분해, 75°C에서 30분간의 활성탄에 의한 탈취, 그리고 95°C에서 30분간의 활성소거와 40 °Brix로 감압농축 및 동결건조 등으로 설정하여 분말형태의 한량 25% 내외의 콘드로이틴 황산 제품을 제조하였고, 그 공정을 Fig. 3과 같이 제시하였다. 이 중에서 홍어 고유의 냄새를 완전히 제거할 필요가 있을 경우에는 추가적인 처리가 필요할 것으로

**Fig. 2.** The effect of skate cartilage extract on inflammatory enzyme expression.

N: normal control mice, LPS: vehicle-treated LPS mice, CS: chondroitin sulfate 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, SCE: skate cartilage extract 400 mg/kg body weight-treated LPS mice. Data are the means ± S.E.M. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. vehicle-treated LPS mice.

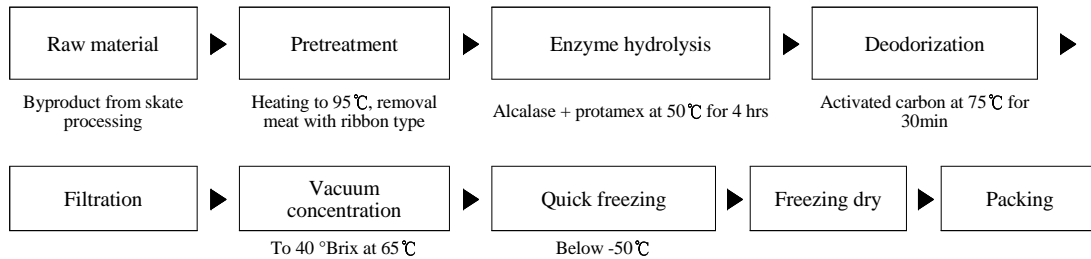


Fig. 3. Manufacturing process for mass production of chondroitin sulfate.

생각된다.

4. 결론

폐기되는 홍어 가공 부산물을 재이용하여 콘드로이틴 황산을 함유한 건강기능식품이나 의약품 소재로 산업화 하기 위하여 홍어 연골로부터 콘드로이틴 황산을 추출하고, 추출한 콘드로이틴 황산 및 단백질 가수분해물의 분포를 고찰하였으며, 실험동물에 투여하여 체중과 간중량, 간 독성 완화효과 및 항염증 기능성 등을 측정하였고, 최적의 콘드로이틴 황산 수율을 얻기 위한 산업화 공정을 확립하였다.

단백질 분해효소로 1% alcalase와 1% protamex를 혼합 사용하여 4시간 가수분해하였을 때 콘드로이틴 황산의 수율은 32.55%로 비교적 높은 값으로 얻어졌으며, GPC에 의한 콘드로이틴 황산의 함량은 26.63%, 분자량은 약 28만 Da로 측정되었고, 단백질과의 비율은 1 : 2.76의 비율로 나타났다. 콘드로이틴 황산을 활성탄 처리시 TMA는 약 30% 정도 제거되었으나 암모니아의 제거는 미미하여 냄새의 제거를 위해서는 추가적인 물리화학적 처리가 요구되었다.

실험 쥐에 콘드로이틴 황산을 투여한 결과 급성 염증 유발시 나타나는 체중과 간 무게의 감소 방지에 효과를 보였으며, 염증성 반응효소인 COX-2와 iNOS발현을 억제하여 항염증 기능성을 가지는 것으로 나타났으며, 또한 간 독성지표가 감소하여 콘드로이틴 황산은 간 해독 작용을 가지는 것으로 확인되었다. 이러한 효과와 효능들로 볼 때 폐기되는 홍어 연골로부터 재이용되는 콘드로이틴 황산이 건강기능성 식품의 소재 및 의약품 소재로 활용이 가능할 것으로 예상되었다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 중소기업청 기술혁신기술사업의 지원에 의해 수행되었으며, 이의 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bauerova, K., Ponist, S., Kuncirova, V., Mihalova, D., Paulovicova, E., Volpi, N., 2011, Chondroitin sulfate effect on induced arthritis in rats, *Osteoarthritis and Cartilage*, 19, 1373-1379.
- Choi, S. G., 2014. Food Balance Sheet, KREI (Korea Rural Economic Institute), 160-161.
- FOCC (Fishery Open Class Committee), 2002, Advanced marine technology and policy, Pukyong national university, 2nd Fishery Open Class, 274-279.
- Ishimaru, D., Sugiura, N., Akiyama, H., Watanabe, H., Matsumoto, K., 2014, Alterations in the chondroitin sulfate chain in human osteoarthritic cartilage of the knee, *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(2), 250-258.
- Jin, M., Lee, H. J., Ryu, J. H., Chung, K. S., 2000, Inhibition of LPS-induced NO production and NF- κ B activation by a sesquiterpene from *Saussurea lappa*, *Arch. Pharm. Res.*, 2, 54-58.
- Kang, K. H., Lee, M. G., Kam, S. K., Jeong, K. S., 2013a, A Study on development of protein materials using dead flatfish from fish farms(1)-Antioxidant functional properties-, *J. Environ. Sci.*, 22(11), 1465-1471.
- Kang, K. H., Lee, M. G., Kam, S. K., Jeong, K. S., 2013b, A Study on development of protein materials using dead flatfish from fish farms(2) -Industrial Process-, *J. Environ. Sci.*, 22(12), 1625-1631.
- Katta, J., Jin, Z., Ingham, E., Fisher, J., 2009,

- Chondroitin sulphate: An Effective joint lubricant, Osteoarthritis and Cartilage, 17, 1001-1008.
- Kenneth, H., 1990, Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 15th ed., AOAC, Virginia, USA, 931-938.
- Kim, B. H., Ahn, S. H., Choi, B. D., Kang, S. J., Kim, Y. L., Lee, H. J., Oh, M. J., Jung, T. S., 2004, In vivo Evaluation of chondroitin sulfate from Midduk (*Styela clava*) and Munggae tunics (*Halocynthia roretzi*) as a cosmetic material, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 33(4), 641-645.
- Kim, Y. J., Cho, S. H., 2009, Preparation of high purity chondroitin sulfate, Korea Academia-Industrial Cooperation Society, 10, 865-871.
- KMFDS (Korea Ministry of Food and Drug Safety), 2012, Health functional food revolution, 9.
- KOSFOST (Korean society of food science and technology), 2004, Encyclopedia of food science and technology, Seoul, Gwangil Press, 185.
- Lau, F. C., Joseph, J. A., McDonald, J. E., 2009, Attenuation of iNOS and COX2 by blueberry polyphenols is mediated through the suppression of NF- κ B activation, Journal of Functional Foods, 1(3), 274-283.
- MOF (Ministry of Oceans and Fisheries), 1998, Studies on the development of chondroitin sulfate materials from aquatic animals and techniques for its application to commercial products, 25-26.
- Park, H. J., Kim, I. T., Won, J. H., Jeong, S. H., Park, E. Y., Nam, J. H., Choi, J., Lee, K. T., 2007, Anti-inflammatory activities of *ent*-16 α H, 17-hydroxy-*kauran*-19-oic acid isolated from the roots of *Siegesbeckia pubescens* are due to the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via NF- κ B inactivation, European J. of Pharmacology, 558, 185-193.
- Qureshi, A. A., Tan, X., Reis, J. C., Badr, M. Z., Papasian, C. J., Morrison, D. C., Qureshi, N., 2011, Suppression of nitric oxide induction and pro-inflammatory cytokines by novel proteasome inhibitors in various experimental models, Lipids in Health and Disease, 10(1), 177-201.
- Son, B. S., Jang, B. K., Lee, S. K., 2003, Determination and analysis of environmental pollution, Ji-Gu Publish, 178.
- Vitor, H. P., Andria, A. P. A., Mariana, S. P., Paulo, A. S. M., 2012, Residual keratan sulfate in chondroitin sulfate formulations for oral administration, Carbo-hydrate Polymers, 90, 839-846.
- Vodovotz, Y., Prelich, J., Lagoa, C., Barclay, D., Zamora, R., Murase, N., Gandhi, C. R., 2012, Augmenter of liver regeneration(ALR) is a novel biomarker of hepatocellular stress/inflammation: In vitro, in vivo, and in silico studies, J of Molecular Medicine, 18, 1421-1429.
- Yue, J., Yang, M., Yi, S., Dong, B., Li, W., Yang, Z., Lu, J., Zhang, R., Yong, J., 2012, Chondroitin sulfate and/or glucosamine hydrochloride for Kashin-Beck disease: a cluster-randomized, placebo-controlled study, Osteoarthritis and Cartilage, 20(7), 622-629.