

홍어 연골로부터 추출된 콘드로이틴 황산의 고순도 정제방법 개발

정갑섭
동명대학교 식품영양학과

Development of High Purity Purification Method of Chondroitin Sulfate Extracted from Skate Cartilage

Kap-Seop Jeong

Department of Food Science & Nutrition, Tongmyong University

요약 Alcalase와 protamex의 두 가지 단백질 분해효소를 사용하여 홍어연골로부터 콘드로이틴 황산을 분해추출하고, 몇 가지 물리화학적 공정을 적용하여 고순도의 콘드로이틴 황산을 얻기 위한 정제방법을 검토하였다. 2% alcalase로 홍어연골을 가수분해하고 40 °Brix로 농축한 추출물의 수율은 23.3%이었으나, 에탄올로 1회 및 2회 추가 정제한 경우 각각 8.47%, 3.37%로 얻어졌다. 1% alcalase와 1% protamex로 혼합 사용하여 추출분해하고, 40 °Brix로 농축한 다음 1회 에탄올 정제한 경우는 추출수율이 16.62%로 측정되어 단백질 분해효소를 혼합한 경우가 더 높은 수율을 보였다. 추출된 콘드로이틴 황산의 함량은 에탄올 용매비에 따라 39.88~45.08%의 범위로 측정되었으며, alcalase만 사용시에는 용매비 1:1에서 42.92%로 가장 높게 측정되었고, alcalase와 protamex를 혼합 사용한 경우에는 용매비 1:2에서 45.08%로 가장 높았으며, 에탄올에 의한 농축물의 정제시 교반 시간은 2시간이 효과적이었다. 콘드로이틴 황산의 GPC (Gel Permeation Chromatography) 측정 결과 alcalase와 protamex를 혼합 사용한 경우 에탄올 정제 횟수에 따라 콘드로이틴 황산의 분자량과 순도는 각각 11만~31만 Da.과 24.87%~49.92%의 범위로 측정되었으며, 한외여과를 통하여 분자량 약 11만 Da., 최고 순도 53.93%의 콘드로이틴 황산을 얻을 수 있었다. 콘드로이틴 황산의 냄새 강도는 에탄올 정제만으로는 33%, 활성탄 처리와 에탄올 정제를 병행한 경우 38%의 감소효과가 얻어졌으며, 활성탄 처리와 2회의 에탄올 정제시 암모니아는 52.1%, TMA (trimethylamine)는 37.89%의 탈취 효과가 있었으나, 냄새성분의 충분한 제거를 위해서는 추가적인 물리화학적 처리가 요구되었다.

Abstract A purification method was established for high-purity chondroitin sulfate from skate cartilage. Hydrolytic extraction of skate backbone cartilage was investigated with the proteases alcalase and protamex, and the extraction contents of chondroitin sulfate were measured with several physicochemical processes. The yield of extract from skate cartilage with 40° Brix concentration was 23.3% with 2% alcalase hydrolysis, which was decreased to 8.47% and 3.37% with the first and second additional ethanol purifications, respectively. The yield was 16.62% with one ethanol purification after hydrolysis with a mixture of 1% alcalase and 1% protamex. The content of chondroitin sulfate was measured as 39.88-45.08% with different ratios of ethanol solvent. The content was 42.92% at a solvent ratio of 1:1 with alcalase protease and 45.08% with a ratio of 1:2 using a protease mixture of alcalase and protamex. The molecular weight range of chondroitin sulfate was about 110-310 thousand Da, and the purity of chondroitin sulfate was 24.87-49.92% with a mixture of alcalase and protamex in GPC analysis. The maximum purity of chondroitin sulfate was 53.93% after ultrafiltration. The odor strength of chondroitin sulfate was decreased by 33% and 38% after ethanol purification and additional filtration with activated carbon, respectively. The odor concentration of ammonia and TMA from chondroitin sulfate was decreased by 52.1% and 37.89% with activated carbon filtration and two ethanol purifications, respectively, but it was necessary to eliminate the odor components efficiently using additional physicochemical processes.

Keywords : Skate Cartilage, Chondroitin sulfate, Ethanol purification, Hydrolytic extraction, Protease

이 논문은 2014학년도 동명대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었음(2014A027)

*Corresponding Author : Kap-Seop Jeong(Tongmyong University)

Tel: +82-10-3575-3424 email: ks0903@tu.ac.kr

Received March 17, 2016

Revised (1st April 4, 2016, 2nd April 8, 2016)

Accepted June 2, 2016

Published June 30, 2016

1. 서론

2013년을 기준으로 국내에서 가공되는 홍어의 어획량은 연간 약 5,100톤에 달하며[1], 홍어를 가공하고 나면 대량의 부산물로 연골, 껍질, 내장 등이 나오게 되는데 이 때 발생한 부산물은 홍어 특유의 냄새 등으로 인해 다른 용도로 사용되기 어려워 전량 폐기되고 있는 실정이다. 그 중 홍어 연골에 함유되어 있는 뮤코다당은 식품소재 중 하나로서 글루코사민과 함께 연골조직에 특히 많이 존재하여 그 중 일부는 식품과 의약품으로 개발·판매되고 있다[2].

D-glucuronic acid와 N-acetyl-D-galactosamine이 황산기와 결합되어 있는 점질성 뮤코다당인 콘드로이틴 황산은 동물의 결합조직의 기질이나 장기, 체액 등에 광범위하게 분포하고[3,4], 아미노당을 함유하는 복합다당으로서 황산기를 함유하는 것과 함유하지 않는 것이 알려져 있다[5].

또한 콘드로이틴 황산은 인체에 있어서는 연결조직에 존재하여 콜라겐과 함께 세포간의 매트릭스의 주성분이 되고[6], 신경계 및 면역에도 관계하는 물질로서 관절염과 심신장애에도 효과적이라는 연구결과가 보고되고 있다[7]. 실제 의약품에서는 신경통, 요통, 관절통 등 비교적 고령자의 많은 질병에 사용되는 사례가 많다. 향후 고령화가 진행됨에 따라 그 수요도 확대될 것으로 추측되어 식품 소재로서 개발하기에 적합할 것이다[8].

이 외에도 콘드로이틴 황산은 피부 미용효과와, 신생혈관 생성 억제에 의한 항종양 및 항암 활성, 콜레스테롤 저하와 지혈 청징 작용에 따른 동맥경화의 억제 및 예방, 항염증 및 진통효과, 트롬빈의 활성 억제를 통한 항혈액 응고작용, 각막의 투명도 유지 및 팽화 억제로 인한 각막 보호작용, 세균 감염 억제작용 등 다양한 효과가 있는 것으로 알려져 있다[9,10].

그러나 현재 국내에서 생산되고 있는 콘드로이틴 황산이나 콘드로이틴 황산이 함유된 제품들은 대부분 순도가 낮은 뮤코다당 단백질 형태로 추출되어진 그대로 사용되고 있다. 이러한 콘드로이틴 황산의 정제를 통한 고순도화 연구는 유래동물의 종류나 선별 연골부위 및 정제 방법 등에 따라 다양하게 보고되고 있으나 각 보고마다 상당한 차이를 보이고 있으며, 홍어연골로부터의 콘드로이틴 황산 고순도화 연구는 극히 일부에 지나지 않고 있다[5,11-14].

본 연구에서는 폐기되고 있는 홍어 부산물인 연골을 재이용하여 기능성 식품소재나 의료용 소재 및 상품 등으로 사용 가능한 고순도의 콘드로이틴 황산을 얻기 위한 실험적 연구의 일부로서, 홍어 연골을 효소분해하고 몇 가지 조건에서 에탄올 정제와 초음파 정제 및 한외여과 등에 따른 콘드로이틴 황산의 함량과 순도를 측정하고 분자량을 확인함으로써 고순도의 콘드로이틴 황산을 얻기 위한 방법을 검토하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 재료 및 추출분해

실험 재료용 홍어 연골 원물은 영산홍어(주)에서 홍어회 가공 중 발생한 부산물 중 연골부분을 분리하여 원료로 사용하였다. 홍어 등뼈연골을 자켓이 설치된 리본믹스에 투입하여 90℃에서 2시간 가온한 다음 연육을 완전히 제거하고, 연육이 제거된 연골을 열풍 건조기에서 24시간 건조한 후 상온에서 저장하면서 필요시 물에 약 24시간 침지시킨 후 분쇄기를 이용해 분쇄하여 실험재료로 사용하였다. 콘드로이틴 황산 제조를 위해 분쇄한 홍어 연골에 건조 원료 무게의 3배의 물을 가수하고, 단백질 가수분해 효소로 alcalase를 사용하거나 protamex를 혼합사용하여 50℃에서 4시간 동안 가수분해하였다. 정제를 위한 전처리 조작으로 75℃에서 30분간 활성탄(SA-1500, Carbonia Co., Korea)을 이용하여 교반·탈취하여 냄새를 제거하고, 95℃에서 30분간 가열·실활시킨 후 감압여과하고, 여액을 40 °Brix로 감압 농축하였다.

2.2 정제

연골 농축액을 에탄올 정제, 초음파 정제 및 한외여과 정제 등의 정제를 통하여 고순도 제품을 얻고자 하였으며, 정제 건조품 분말을 대상으로 GPC측정과 흡광도측정으로 콘드로이틴 황산의 정성정량 분석을 하였고, 활성탄 처리 후 관능평가와 기기분석으로 냄새 저감의 정도를 측정하였다.

2.2.1 에탄올 정제 및 초음파 정제

40 °Brix로 농축된 농축시료에 시료 대비 1:1 ~ 1:2.5의 비율로 에탄올(94%, SK chemicals)을 첨가하여 1~4

시간 접촉교반하여 단백질을 용해·제거하고, 콘드로이틴 황산을 응고시킨 후 응고물을 분리하여 가수, 농축 및 동결한 다음 동결건조기(SFDSM06, Samwon Co., Korea)로 동결건조한 정제 건조품을 제조하였고, 건조품 중의 콘드로이틴 황산의 함량을 측정하였다. 그리고 초음파 처리의 영향을 확인하기 위하여 앞서의 단백질 가수분해 효소 중 1% alcalase와 1% protamex를 이용하여 만든 농축물을 플라스틱 용기와 유리 용기에 각각 담아서 등량의 에탄올을 첨가하여 초음파기(BRONSON-3200)에 넣고 시료가 잠길 정도의 물을 채워 2시간 동안 초음파 처리로 정제하고, 이를 통해 응고된 각 시료를 다시 증류수에 녹여 농축하고 냉동한 후 동결건조하여 얻은 분말상태의 콘드로이틴 황산의 함량을 측정하였다.

2.2.2 한외여과 및 GPC측정

40 °Brix로추출, 농축, 정제 과정을 거쳐 분말화한 시료를 증류수에 3 °Brix의 농도로 희석하여 Fig. 1과 같이 5K Da.의 여과막(Omega membrane, PALL Co.)을 장착한 한외여과장치(EMP series, EMS Tech., Korea)를 사용하여 24시간 동안 여과하였다. 여과액을 감압농축 및 동결건조하여 분말화하고, 분말의 콘드로이틴 황산 함량을 측정하여 에탄올 정제 결과와 비교하였으며, GPC (Gel Permeation Chromatography, Tosho, HLC-8320, Japan)를 이용한 정성분석 및 분자량 측정용 시료로 사용하였다. RI detector가 부착된 GPC에 Guard+2×TSKGel GMPW×14 column을 사용하여 시료의 분해온도 40℃, pH 7.4의 완충용액으로 된 이동상을 1.0 ml/min의 유속으로 측정하여 분석하였다. 시료의 양은 100 μl로 하였다.

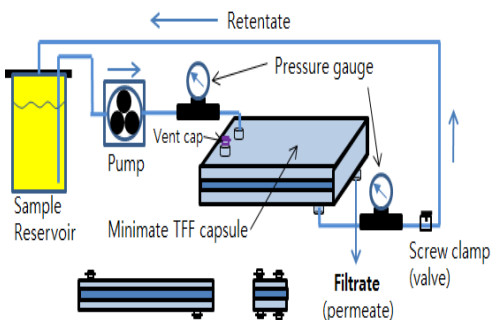


Fig. 1. Ultra filtration module for separation of chondroitin sulfate using UF membrane.

2.3 콘드로이틴 황산 정량

정제 방법에 따른 정제 건조품의 콘드로이틴 황산의 함량은 건강기능식품공전의 규정에 따라 콘드로이틴 황산 제 1법인 흡광도법으로 정량하였다[15]. 검체 시료 0.3 g에 증류수를 가해 혼합한 것을 100 mL로 정용하고, 이 용액 4 mL를 다시 증류수로 20 mL로 정용하고 여과한 것을 검액으로 하였다. 별도로 봉산나트륨황산시액 5 mL씩 취하여 얼음물로 충분히 냉각된 시험관에 각각 검액과 표준용액을 정확히 1 mL씩 분주하고 vortex mixer로 혼합한 후 100℃ 수욕상에서 10분간 가열한 후 즉시 얼음물로 냉각하였다. 그리고 각각의 시험관에 carbazole 시액 0.2 mL를 가하여 혼합한 후 100℃ 수욕상에서 10분간 가열하고 얼음물에서 실온까지 냉각하였다. 이들 액에 대해 증류수 1 mL를 사용하여 동일하게 조작한 것을 대조액으로 하여 530 nm에서 흡광도를 측정하고, 콘드로이틴 황산의 함량은 다음 식에 따라 글루쿠론산의 함량(%)×2.593의 값으로 결정하였다.

$$\text{글루쿠론산 함량(}\%) = \frac{\text{검액의 흡광도}}{\text{표준용액의 흡광도}} \times \frac{\text{표준물질 채취량(g)}}{\text{시료채취량(g)}} \times 1.1023 \times 100(\%)$$

여기서 2.0593은 글루쿠론산의 분자량에 대한 콘드로이틴 황산의 분자량 비율이고, 1.1023은 δ-글루쿠로노락톤 분자량에 대한 글루쿠론산의 분자량 비율이며, 표준용액과 carbazole 시액 등 각 용액은 각각 다음과 같이 조제하여 사용하였다. 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 정용하였다. Carbazole 시액은 carbazole 0.125 g을 무수에탄올로 용해하고 100 mL로 정용하여 냉암소에 보관하며 사용하였다. 봉산나트륨황산 시액은 봉산나트륨 1g에 황산을 가해 200 mL로 정용하여 사용하였다.

2.4 탈취실험

홍어의 주요 냄새성분은 암모니아와 trimethyl amine (TMA)이다. 이들 냄새성분은 기호도에 따라 악취의 원인이 되기도 하므로 콘드로이틴 황산의 고순도 정제를 위해서는 이들 성분의 저감이 필요하다. 콘드로이틴 황

산의 제조시 건물시료 중량 대비 0.5%의 활성탄 처리공정을 추가하여 처리하고, 처리 전후의 냄새를 관능평가 및 시료 1 g을 10 L의 폴리에스테르 봉지에 주입한 후 질소가스를 충전하고, 80℃ 오븐에서 2시간 동안 기화시킨 후 실온으로 방냉하여 시료의 냄새를 평가·분석하였다. 평가 대상 성분은 암모니아와 TMA를 대상으로 하였으며, 관능평가는 악취공정시험법에 따라 희석배수를 산정하고, 6명의 정상 후각력을 지닌 판정원을 선발하여 후각에 의한 5점 직접관능법으로 평가하였다[16]. 기기를 이용한 평가시 암모니아는 암모니아 검지관으로, TMA는 FID 검출기를 사용한 GC (Gas chromatography)로 각각 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 연골의 일반성분과 추출수율

홍어 연골시료의 일반성분을 AOAC법[17]에 따라 측정된 결과 Table 1과 같이 수분 2.1%, 회분 0.1%, 단백질 63.3%, 지방 0% 및 탄수화물이 34.5%로 측정되었으며, 이로부터 홍어 연골 중의 단백질과 탄수화물의 비율이 약 2:1을 보여 이 두 가지 성분이 전체의 97.8%로 구성되어 연골성분의 대부분을 차지하는 것으로 나타났다.

전처리한 홍어 연골에 3배 가수하고 단백질 분해효소인 alcalase와 protamex를 사용하여 2시간 동안 추출 및 농축한 결과 다음과 같이 조건에 따라 다양한 수율로 측정되었다. 즉, 2% alcalase 효소로 분해한 경우 21 °Brix 농축물은 원료 건물중량 대비 22.93%, 24 °Brix 농축물은 25.7%, 그리고 40 °Brix 농축물은 23.3%의 수율로 각각 측정되었다.

그러나 효소분해 후 에탄올 정제가 추가된 경우에는 수율이 약간 감소하였는데, 40 °Brix 농축물을 에탄올로 1회 정제한 경우에는 8.47%, 2회 정제한 경우에는 3.37%의 수율로 각각 측정되었다.

Table 1. Proximate compositions of skate cartilage

Component	Moisture	Crude lipid	Crude protein	Crude ash	Carbohydrate
Content (%)	2.1	0	63.3	0.1	34.5

이에 비하여 alcalase와 protamex를 각각 1%로 혼합한 효소로 분해한 농축물을 1회 에탄올 정제한 다음 동결건조한 최종 분말의 수율은 16.62%로 측정되었다.

3.2 에탄올 용매비별 정제비교

홍어 연골의 조성이 단백질과 탄수화물이 주를 이루고 있으므로 뮤코다당인 콘드로이틴 황산을 고순도로 얻기 위해서는 단백질 분해효소와 정제 용매의 선정이 필요하다. 본 연구에서 단백질 분해효소로서 alcalase와 protamex를 사용하여 분해하고, 정제 용매로서 에탄올을 사용하여 정제한 결과 다음과 같았다.

홍어 연골에 연골 중량 대비 alcalase를 2% 사용하거나 alcalase와 protamex를 각각 1%씩 혼합사용하여 가수분해하고 농축한 40 °Brix의 시료에 에탄올 용매비를 달리하여 2시간 추출정제한 후 정제된 콘드로이틴 황산 함량을 비교하였다. 그 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 정제조건에 따라 39.88 % ~ 45.08%의 함량 범위로 측정되었다.

Alcalase만 독립적으로 사용하여 가수분해한 시료는 에탄올과 1:1 비율로 혼합하여 정제한 시료에서 42.92%로 가장 높은 함량을 나타내었고, 1:1.5 비율로 정제한 시료가 40.68%로 가장 낮아 에탄올 용매가 많을수록 콘드로이틴 황산 함량이 낮게 측정되었다. 그러나 alcalase와 protamex를 각각 1%씩 혼합하여 가수분해 후 농축한 시료에 대해서는 2배의 에탄올을 사용하여 정제한 시료에서 45.08%로 가장 높은 함량을 나타내었고, 시료 대비 에탄올을 1:1.5 비율로 정제한 시료가 39.88%로 가장 낮았다. 두 가지 가수분해 효소를 혼합 사용한 경우에 콘드로이틴 황산 함량이 높게 나온 것은 이들 가수분해 효소를 단독으로 사용할 경우에 비해 효소간 상승작용에 의한 것으로 생각된다.

이들 결과로부터 alcalase 효소만 사용할 경우에는 1:1 비율의 에탄올 정제가, 그리고 alcalase와 protamex를 혼합사용할 경우 1:2 비율의 정제가 각각 콘드로이틴 황산의 함량을 높일 수 있는 조건으로 확인되었다. 그러나 에탄올과 효소의 사용량을 감안하면 산업적으로 대량 생산을 할 때에는 1:1 비율로 정제하는 쪽이 함량은 다소 낮아도 경제적 측면에서는 더 유리할 것으로 생각된다.

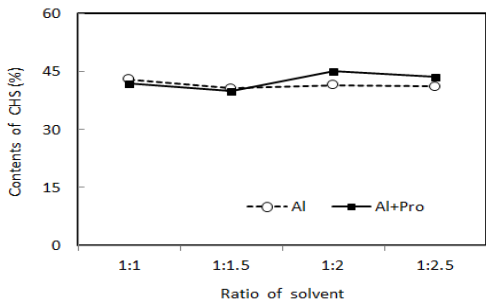


Fig. 2. Chondroitin sulfate content of skate cartilage with the dosage ratio of ethyl alcohol. (CHS: Chondroitin sulfate, Al: 2% Alcalase, Al+Pro: 1% Alcalase + 1% Protamex)

3.3 교반시간에 따른 함량비교

콘드로이틴 황산과 에탄올 용매의 접촉 교반시간은 정제과정의 한 요소로 작용하므로 높은 함량의 콘드로이틴 황산을 얻기 위한 최적의 교반시간을 검토한 결과 다음과 같았다.

앞서 3.2의 결과에서 *alcalase*와 *protamex*를 혼합사용하고, 농축 시료와 에탄올을 1:2의 비율로 정제할 때 가장 높은 콘드로이틴 황산 함량이 측정되었다. 이 조건하에서 교반시간을 달리하여 정제한 후 콘드로이틴 황산 함량을 측정하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 전체적인 실험 범위에서 *alcalase*와 *protamex*를 혼합사용하여 정제한 시료의 콘드로이틴 황산의 함량이 *alcalase*만 사용하여 정제한 경우보다 높았으며, 에탄올 정제를 위한 교반시간 2시간까지는 콘드로이틴 황산 함량이 증가하였으나 그 이후로는 교반 시간에 따른 함량차이가 크지 않았다. 따라서 에탄올을 사용한 정제시에는 2시간 정도의 교반이 가장 효과적일 것으로 생각된다.

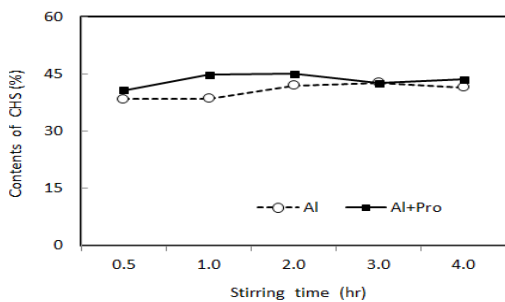


Fig. 3. Chondroitin sulfate content of skate cartilage with stirring time. (CHS: Chondroitin sulfate, Al: 2% Alcalase, Al+Pro: 1% Alcalase + 1% Protamex)

3.4 에탄올 정제 횟수에 따른 함량비교

홍어 연골을 원료로 제조한 농축 시료에 *alcalase*와 *protamex*를 각각 1%씩 혼합사용하여 가수분해하고 이를 여과, 농축한 후 에탄올과 1:2의 비율로 2시간 교반·정제 하되 에탄올 교반정제를 3회까지 반복하여 콘드로이틴 황산의 함량을 측정함으로써 에탄올정제 횟수에 따른 함량측정 결과를 Fig. 4에 비교하였다. 정제 전에는 약 30%에 달했던 함량이 1회, 2회 정제 후에 14.97%p와 14.47%p가 증가하였고, 3회 정제에서는 정제 전의 함량에 비하여 약 16.61%p의 증가를 보여 46.72%의 가장 높은 함량으로 측정되었다.

정제 전과 비교하여 3차 정제한 시료에서 콘드로이틴 황산 함량이 가장 높게 측정되었으나 에탄올 정제 횟수에 따른 콘드로이틴 황산 함량의 증가는 1회에 비하여 그다지 크지 않으므로 에탄올의 사용량을 감안한다면 콘드로이틴 황산의 정제는 1회 정제가 경제적인 것으로 생각된다. 상어 연골로부터 *isopropyl alcohol*의 함량이 10% 증가함에 따라 분별침전에 의한 콘드로이틴 황산의 함량이 19.2% 증가한다는 Kim과 Cho[5]의 보고에 비하여 홍어 연골을 대상으로 한 본 연구 결과는 다소 낮은 함량으로 측정되었다.



Fig. 4. Chondroitin sulfate content of skate cartilage with the number of ethyl alcohol purification. (CHS: Chondroitin sulfate)

3.5 초음파정제

일반적으로 초음파 처리는 화학물질 중의 미량의 불순물 제거에도 효과적이므로 콘드로이틴 황산의 정제에도 유용한 정제법이 될 수 있다. 콘드로이틴 황산의 정제에서 정제방법에 따른 함량을 비교하기 위하여 단백질 가수분해 효소 중 1% *al-calase*와 1% *protamex*를 혼합 사용하여 분해농축한 농축물을 유리 수기(reservoir)에

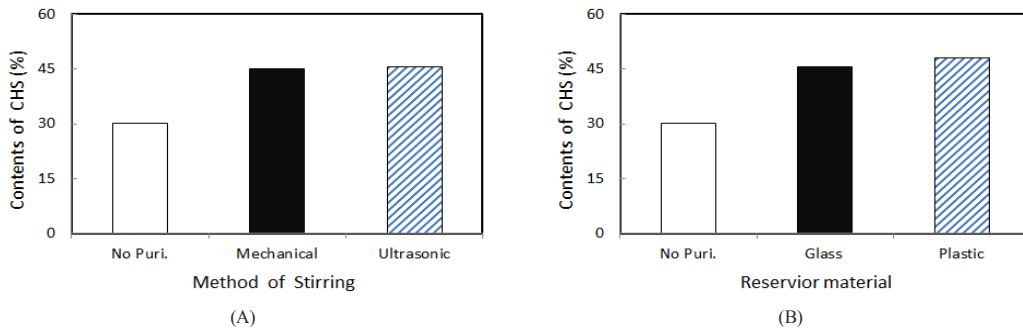


Fig. 5. Comparison of chondroitin sulfate contents with stirring method (A) and reservoir material (B) (CHS: Chondroitin sulfate, Puri.: purification)

담아 두 배의 에탄올을 주입하여 2시간 동안 초음파 처리 및 기계식 교반하며 에탄올 정제하였고, 그 결과를 Fig. 5(A)에 도시하였다. Fig. 5(A)에서 정제 전의 함량 30.11%에 비하여 기계식 교반에 의한 1회 에탄올 정제 시와 초음파 처리에 의한 에탄올 정제시의 함량이 각각 45.08%와 45.71%로 측정되어 기계식 교반과 초음파 처리에 의한 정제효과는 상당히 컸으나 초음파 처리가 기계적 교반에 의한 정제에 비하여 더욱 효과적인 방법이라고 판단할 수는 없었다.

한편 초음파 처리시 수기의 재질에 따른 정제효과를 비교하기 위해 유리 수기와 플라스틱 수기를 이용하여 처리한 결과인 Fig. 5(B)에서 45.71%의 함량을 보인 유리제 용기에 비하여 플라스틱 재질을 사용하면 2.58%의 함량 증가를 볼 수 있었다. 따라서 실험적 처리에서는 플라스틱 재질의 용기를 이용한 초음파 처리에 유리할 수 있으나 대량생산을 위한 산업적인 면에서는 교반에 의한 정제가 더욱 효과적일 것으로 생각된다.

3.6 콘드로이틴 황산 함량과 단백질 함량의 비교

Table 2는 에탄올을 이용해 조건별로 1회 정제한 시료를 대상으로 콘드로이틴 황산 제 1법에 의한 콘드로이틴 황산 함량과 Kjeldahl법에 의한 단백질함량을 측정된 결과를 비교한 것이다. 2% alcalase 효소로 분해한 농축물을 1:1의 에탄올로 정제한 결과 콘드로이틴 황산은 정제하기 전의 함량에 비하여 9.32% ~ 13.6% 증가하였고 단백질의 함량은 약 10% 정도 감소하여 에탄올 정제로부터 추출 함량과 순도가 증가함을 알 수 있다. Kim과 Cho[5]도 이소프로필 에탄올의 함량에 따라 상어 연골로부터의 콘드로이틴 황산의 함량이 증가한다고 보고하여 본 결과와 유사한 경향을 확인하였다.

그러나 2시간 분해 자료를 비교할 때 에탄올 용매비 증가에 따른 함량의 뚜렷한 증가는 볼 수 없었다. 이에 비하여 1% alcalase와 1% protamex를 혼합 사용한 농축물의 에탄올 정제 결과 2% alcalase 효소 사용시 보다

Table 2. Comparison of chondroitin sulfate content and protein content with purification treatments

Protease treatment	Purification treatment		CHS (%)	Protein (%)	CHS + Protein(%)
	Sample/alcohol	Stirring			
2% alcalase	No purification		30.11	67.57	97.68
	1:1.0*	30 min	39.43	59.21	98.64
		60 min	39.50	58.29	97.79
		120 min	42.92	51.40	94.32
		360 min	43.71	54.60	98.31
	1:1.5	120 min	40.68	55.38	96.06
	1:2.0	120 min	41.50	55.29	96.79
1:2.5	120 min	41.16	56.28	97.44	
1% Alcalase + 1% Protamex	1:1.0	120 min	41.91	55.26	98.17
	1:1.5	120 min	39.88	58.14	98.02
	1:2.0	120 min	45.08	51.77	96.85
	1:2.5	120 min	43.62	54.16	97.78

CHS: Chondroitin sulfate, *: Ratio means sample to alcohol

다소 높은 9.77% ~ 14.97%의 함량 증가를 나타내었으며, 단백질의 함량이 약 9.43% ~ 15.8%의 감소를 보여 콘드로이틴 황산의 정제 순도가 증가하였다.

이러한 결과는 에탄올로 정제할 때 콘드로이틴 황산에 결합되어 있던 단백질 중 일부가 용매에 용해되어 제거된 것을 의미한다. 이 결과로 볼 때, 에탄올을 이용한 정제는 홍어 연골에서 추출한 추출물의 콘드로이틴 황산의 함량과 순도를 높이는 데 상당한 효과가 있는 것으로 보인다.

3.7 콘드로이틴 황산의 GPC 측정결과

홍어 연골로부터 분해·정제한 시료의 콘드로이틴 황산과 한외여과한 시료의 콘드로이틴 황산 함량을 GPC로 측정, 비교하여 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 이들 값은 Table 2와 비교하여 그 수치가 조금 낮지만 정제 단계를 거치면서 그 함량이 증가하는 것은 동일하게 나타났다. 두 효소를 1%씩 혼합하여 분해·농축한 농축물의 GPC 측정 결과 14.5분에서 분자량 278,065 Da.의 peak가 검출되었고 20.0분에서 1,169 Da.의 peak가 검출되었으며, 이들이 각각 콘드로이틴 황산과 단백질로 추정되었고, GPC chromatogram의 면적으로부터 계산된 함량은 24.87%와 75.13%로 얻어졌다(측정 peak sheet 제공되지 않음). 그러나 1회 에탄올 정제를 거친 경우 306,793 Da.의 peak와 1,217 Da.의 peak가 검출되었으며, 콘드로이틴 황산과 단백질 함량은 각각 32.82%와 67.18%로 계산되었다. 또한 2회 에탄올 정제를 통하여 113,170 Da.의 peak와 1,105 Da.의 peak가 검출되었고, 2회 정제를 통하여 함량은 각각 49.92%와 50.08%로 계산되어 에탄올 정제를 통하여 콘드로이틴 황산 함량이 17.1%의 증가가 얻어졌다.

5000 Da. 이하 시료를 제외한 모든 시료에서 측정 결과값이 2가지로 분류되었는데 분자량이 큰 값은 콘드로이틴 황산, 분자량이 작은 것은 단백질로 판단된다. 정제 전에는 24.87%로 측정된 콘드로이틴 황산 함량이 1회 정제에서 32.82%, 2회 정제에서 49.92%로 나타났고, 2회 정제한 시료를 5000 Da. 여과막을 이용해 24시간 한외여과하여 여과한 시료와 여과되지 못한 시료를 구분하여 측정한 결과 여과되지 않은 시료는 59.93%로 약 10%가 상승하였다. 상어 연골을 대상으로 분획 분자량 2만 이하의 한외여과막을 사용하여 3 단계의 막분리를 행한 Kim과 Cho[5]의 결과에서 0.2~1 g/L의 함량 증가

를 보고한 결과에 비하여 본 연구 함량이 더 높게 나타났다. 이는 원어물 대상과 여과막의 선택 및 여과조작의 차이 등 여러 요인에 의한 것으로 생각된다. 한편 한외여과할 때 여과된 시료는 모두 단백질로 콘드로이틴 황산이 여과되지 않은 것으로 보아 콘드로이틴 황산 정제에 효과가 있는 것으로 보인다.

Table 3. GPC measurement of chondroitin sulfate with purification method

Treatment	Division	Mp (Da.)	Area(%)	
No purification	CHS	278,065	24.87	
	Protein	1,169	75.13	
Alcohol purification	1st	CHS	306,793	32.82
		Protein	1,217	67.18
	2nd	CHS	113,170	49.92
		Protein	1,105	50.08
Ultra-filtration	Under	CHS	0	0
	5000 Da.	Protein	1,136	100.00
		CHS	107,244	59.93
	Over	Protein	1,092	40.07

3.8 냄새탈취효과

콘드로이틴 황산의 냄새 탈취를 위하여 건조 연골 중량 대비 0.5%의 함량으로 활성탄 처리한 후 에탄올 정제된 콘드로이틴 황산의 냄새를 활성탄 처리 전후의 관능평가, 검지관 및 기기분석을 통하여 측정하고 그 결과를 Table 4에 나타내었다.

에탄올 정제를 거치지 않은 시료에 대하여 활성탄 처리 여부에 따른 관능평가 결과 냄새의 강도는 활성탄 처리로 12.5%의 감소효과가 있었으며, 1회 에탄올 정제로는 활성탄 처리로 약 11.1%의 탈취효과가 있었고, 에탄올 정제 전에 비해서는 약 25%의 탈취효과가 있었다. 2회 에탄올 정제시에는 에탄올 무정제 경우에 비해 활성탄 사용시 38% 정도의 탈취효과가 있었다. 그리고 시험원에 의한 냄새의 함량은 활성탄 사용 여부에 관계없이 단지 에탄올 정제만으로도 70%의 저감효과가 있는 것으로 반응되었다.

한편 악취의 주성분인 암모니아와 TMA의 기기분석 결과 활성탄 처리 후 2회의 에탄올 정제시의 경우 암모니아는 52.1%, TMA는 37.89%의 탈취효과가 있는 것으로 나타났다.

기기분석에 의한 측정으로부터 상당히 높은 탈취효과를 얻었으나 후각에 의한 측정에서 홍어 고유의 냄새를 제거하여야 섭취자의 기호도가 증가할 것으로 생각되며

로 냄새 성분을 더욱 미량으로 저감시킬 필요가 있을 것이며, 이를 위해 추가적인 물리화학적 처리가 수반되는 것이 좋을 것으로 생각된다.

Table 4. Determination of odor component from chondroitin sulfate with sensory test and instrumental analysis

Activated Carbon	Alcohol purification	Sensory test		Concentration (ppm)	
		Strength	Odor Contents	Ammonia	TMA
Without	No	2.4	100	1.23	7.84
	1st	1.8	30	1.50	6.59
	2nd	1.6	30	1.00	5.18
With	No	2.1	100	1.21	5.49
	1st	1.6	30	0.96	3.54
	2nd	1.3	30	0.58	3.41

4. 결론

홍어 연골의 단백질 가수분해 효소에 의한 콘드로이틴 황산의 추출분해시 고순도의 콘드로이틴 황산을 얻기 위한 정제방법을 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 홍어 연골을 2% alcalase로 추출분해하여 40 °Brix로 농축한 농축물의 수율은 23.3%이었고, 이를 에탄올로 1회 및 2회 정제한 경우 각각 8.47%, 3.37%로 얻어졌으며, 1% alcalase와 1% protamex로 혼합 사용하여 추출분해하고, 40 °Brix로 농축한 다음 1회 에탄올 정제한 경우 추출수율은 16.62%로 측정되어 단백질 분해효소를 혼합한 경우가 더 높은 수율을 보였다.
2. 콘드로이틴 황산의 함량은 에탄올 용매비에 따라 39.88~45.08%의 범위로 측정되었으며, alcalase만 사용시 용매비 1:1에서 42.92%로 가장 높게 측정되었고, 1:1.5의 비에서 40.68%로 가장 낮았다. Alcalase와 protamex를 혼합 사용한 경우에는 용매비 1:2에서 45.08%로 가장 높았으며, 1:1.5의 용매비에서 39.88%로 가장 낮게 측정되었다. 그리고 에탄올 정제시 기계식 교반과 초음파 처리에 의해 약 15%의 정제효과는 있었으나 두 방법간의 차이는 없었으며, 교반 시간은 2시간이 효과적이었다.

3. 콘드로이틴 황산의 GPC측정 결과 alcalase와 protamex를 혼합 사용한 경우 에탄올 정제 횟수에 따라 콘드로이틴 황산의 분자량과 순도는 각각 11만~31만 Da.과 24.87%~49.92%의 범위로 측정되었으며, 한외여과를 통하여 분자량 약 11만 Da., 최고 순도 53.93%의 콘드로이틴 황산을 얻을 수 있었다.
4. 콘드로이틴 황산의 냄새 강도는 에탄올 정제만으로는 33%, 활성탄 처리와 에탄올 정제를 병행한 경우 38%의 감소효과가 측정되었으며, 활성탄 처리와 2회의 에탄올 정제시 암모니아는 52.1%, TMA는 37.89%의 탈취효과가 있었으나, 냄새성분의 충분한 제거를 위해서는 추가적인 물리화학적 처리가 요구되었다.

References

- [1] S. G. Choi, "Food Balance Sheet", KREI(Korea Rural Economic Institute), pp. 166-167, 2014.
- [2] B. Y. Yu, "Manufacturing the Mucopolysaccharide-protein by Improved Method and Crude Calcium using the Residue after Extract the Gelatin from Skate Cartilage", M. S. Dissertation, Chonnam National University, Korea, 2003.
- [3] D. Y. Ishimaru, N. Z. Sugiura, H. Y. Akiyama, H. Z. Watanabe, K. Matsumoto, "Alterations in the Chondroitin Sulfate Chain in Human Osteoarthritic Cartilage of the Knee", Osteoarthritis and Cartilage, Vol.22, pp. 250-258, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2013.11.010>
- [4] H. Tim, "Chondroitin Sulfate and Joint Disease", Osteoarthritis and Cartilage, Vol.6, pp. 3-5, 1998. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1063-4584\(98\)80004-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1063-4584(98)80004-6)
- [5] Y. J. Kim, S. H. Cho, "Preparation of High Purity Chondroitin sulfate", Korea Academia-Industrial Cooperation Society, Vol.10, pp. 865-871, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.5762/KAIS.2009.10.4.865>
- [6] KNAS(Korean Nurses Academic Society), <http://terms.naver.com/entry.nhn?docId=1596864&cid=50314&categoryId=50314>, 1996.
- [7] H. Yousry, H. Hammad, R. Magid, R. Mona, M. Sobhy, "Clinical and Biochemical Study of the Comparative Efficacy of Topical versus Oral Glucosamine/Chondroitin Sulfate on Osteoarthritis of the Knee", The Egyptian Rheumatologist, Vol.37, pp. 85 - 91, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejr.2014.06.007>
- [8] FOCC(Fishery open class committee), "Advanced Marine Technology and Policy", Pukyong National University, Korea. pp. 274-281, 2002.
- [9] B. H. Kim, S. H. Ahn, B. D. Choi, S. J. Kang, Y. L.

- Kim, H. J. Lee, M. J. Oh, T. S. Jung, "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*, Vol.33, pp. 641-645, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.9799/ksfan.2014.27.4.641>
- [10] J. R. Yang, Y. H. Kim, "Studies on the Development of Chondroitin Sulfate Materials from the Meat By-products", 5; pp. 125-133, 2001.
- [11] J. H. Choi, "Isolation and Purification of Chondroitin Sulfate from Skate Cartilage", M. S. Dissertation, Pukyong National University, 2004.
- [12] B. Y. Yoo, "Manufacturing the mucopolysaccharide-protein by improved method and crude calcium using the residue after extract the gelatin from skate cartilage", M. S. Disertation, Chonnam National University, 2003.
- [13] S. Mizuta, J. H. Hwang, R. Yoshinaka, "Molecular species of collagen in pectoral fin cartilage of skate (*Raja kenoei*)", *Food chemistry*, Vol.80, pp. 1-7, 2003.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00227-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00227-3)
- [14] J. H. Choi, J. W. Woo, Y. B. Lee, S. B. Kim, "Changes in an Ammonia-like Odor and Chondroitin Sulfate Contents of Enzymatic Hydrolysates from Longnose Skate (*Rasa rhina*) Cartilage as Affected by Pretreatment Methods", *Food Sci and Biotech*, Vol.14, pp. 645-650, 2005.
- [15] KMFDS(Korea Ministry of Food and Drug safety), "Health Functional Food Revolution", pp. 9, 2012.
- [16] B. S. Son, B. K. Jang, S. K. Lee, "Determination and Analysis of Environmental Pollution", Ji-Gu Publish, pp. 178, Seoul, 2003.
- [17] H. Kenneth, "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists", 1990.

정갑섭(Kap-Seop Jeong)

[정회원]



- 1982년 2월 : 부산대학교 화학공학
학과(공학사)
- 1993년 8월 : 부산대학교 화학공학
학과(공학박사)
- 1990년 3월 ~ 2006년 2월 : 동명
대학 공업화학과/식품가공조리과
전임강사/조교수/부교수
- 2006년 3월 ~ : 동명대학교 식품
영양학과 교수

<관심분야>

광촉매 분해, 식품공정, 농수산생물 기능성