

미더덕 껍질로부터 Glycosaminoglycans의 추출

안삼환 · 정성훈 · 강석중 · 정태성¹ · 최병대
경상대학교 해양생물이용학부, 경상대학교 수의학과¹
TEL (055) 640-3173, FAX (055) 640-3170 (안삼환)

Abstract

Glycosaminoglycans(GAGs) from sea squirt, *Styela clava* was extracted with sodium phosphate at 105°C for 2 hr and deprotein with trichloroacetic acid or hydrochloride. This GAGs was mainly constituted of galactose, glucosamine, glucose, mannose and galactosamine, and was phenylalanine, threonine, glutamic acid and aspartic acid. Mineral contents was mainly constituted 3.0mg% sodium, 1.6mg% potassium and 1.2mg% phosphorus and heavy metal was not detected. At pharmaceutical and cosmetic code of GAGs, protein and sulfate contents should included each range 14.0~22.0%, 35.0~45.0%. After 5.0% trichloroacetic acid(w/v) and 10.0% HCl(v/v) treatment, protein and sulfate contents of GAGs was contained each 35.1%, 35.4% and each 22.0%, 18.5%.

서 론

Proteoglycans는 매우 큰 분자구조로 이루어진 당단백질로, 분자내 GAGs라고 불리는 다당류 사슬과 단백질로 결합되어 있다. GAGs 사슬은 amino당과 uronic acid가 반복되는 구조로 되어있으며, HA와는 달리 GAGs는 황산기를 함유하거나 고농도의 SO₄⁻ 혹은 COO⁻를 함유하여 음전하로 하전하여 수분을 끌어당기는 힘이 생겨 보습효과 및 점성을 나타내므로 관절조직의 윤활제로서 이상적인 역할 때문에 연골조직에 가해진 압력을 흡수하거나 분산시켜 기계적인 손상으로부터 관절조직을 보호하게 된다. 이런 GAGs의 원료로 상어연골¹, 포유동물의 각막², 관절³, 대동맥⁴, 부신피질⁵ 등이 이용되어지고 있었으나, 상어는 멸종위기로 인한 포획금지, 포유동물은 광우병 확산에 따른 자원확보가 어려운 실정을 해결하기위해 새로운 원료탐색및 GAGs의 추출 및 정제기술의 개발이 뒤따라야 한다. 미더덕은 80년대 중반 이후 본격적인 양식으로 어민들의 소득 증대에 기여하고 있어 2001년에는 약 15,000 ton이 생산되었다. 하지만, 생산량 증가에 따른 미더덕 껍질의 처리에 따른 많은 어려움을 겪고 있다. 폐기되는 미더덕 껍질로부터 GAGs를 추출할 수 있다면 원료 수급에 따른 문제점을 해결할 수 있을

뿐만 아니라, 환경오염을 줄일 수 있다. 미색류 껍질을 이용한 황산다당류의 연구가 발생생물학⁶, 면역화학⁷ 분야에서 활발히 진행되고 있으나, 미더덕 껍질을 이용한 황산다당류에 관한 연구는 거의 없다⁸. 따라서 본 연구는 미더덕 껍질로부터 황산다당류의 추출 및 정제를 위한 기초 자료를 얻어 산업적으로 이용 가능한 원료를 생산하는데 기여하고자 한다.

재료 및 방법

미더덕(*Styela clava*) 껍질은 경남 마산시 진동면 소재 영농조합법인에서 채취하였다. 일반성분 분석은 미더덕 껍질과 GAGs를 AOAC법⁹에 따라 실시하였고, 조단백질의 질소계수를 5.56으로 하였다. GAGs의 추출은 buffer 농도별, 추출 용매별, 추출 횟수별, 가열시간 및 가열온도에 따른 열수 추출과 효소 처리를 통해 추출 효율을 확인하였다. 황산기 정량은 건조 시료 0.5 g 취하여 KClO₃ 5 g을 가한 후 Nitric acid으로 농축 후 다시 HCl로 농축한 것을 탈이온수로 100 mL로 정용하여 1 N BaCl₂·2H₂O 용액 5 mL를 첨가 후 끓는 물에서 2시간 동안 반응 후 방냉한 것을 Ba₂SO₄법으로 정량하였다¹⁰. 조성당 분석은 건조 시료(~1 mg)를 2 M trifluoro acetic acid(TFA, Sigma Co., St. Louis, USA) 400 μ L에 용해하여 100°C에서 4시간 가수분해된 시료를 100 μ L D.I.W에 용해하여 CarboPac PA1(0.45×25cm, Dionex Co., Titan, USA) 컬럼에서 흘러면서 PED2(Pulsed Amperometric Detector, Dionex Co., Sunnyvale, USA)로 검출하였다. 무기질 함량은 습식 분해한 시료를 적정량 정용후 하룻밤 방치한 것을 유도결합플라즈마 방출분광기(ICP Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer, TJA, USA)를 사용하여 정량 분석하였다. 아미노산 분석은 시료를 6 N HCl로 24시간 가수분해 후 citric buffer(pH 2.2)로 25 mL 정용하여 아미노산 자동분석기(Amino Acid Analyser 415 α , LKB Co., England)로 정량 분석하였다. 건조된 시료 10 mg을 0.02 M Phosphate buffer(pH 6.5) 25 mL에 용해 후 HPLC 시험용액으로 사용하였다. 칼럼은 300×7.8 mm의 BIOSEP-SEC-S 2000(Phenomenex, CA, USA)을 사용하였고, 흡광도는 UV-Vis detector(Shimadzu SPD-10AVP, Tokyo, Japan)로 210 nm에서 측정하였다. 화장품 규격에 적합한 원료를 생산하고자 trichloroacetic acid(TCA) 농도별(w/v), HCl 농도별(v/v), Ultra filtration(UF, ~10,000) 및 UF처리 이후 용매에 따른 제단백을 실시하였다.

결과 및 고찰

미더덕 껍질의 일반성분은 수분 74.0%, 지질 1.4%, 회분 3.1%, 단백질 31.1%, 당질 64.2%이고 SO₄ 함량은 14.9%이었다. 미더덕 껍질은 단백질 다량 함유하고 있는 당질

이 존재한다는 것을 나타낸다. GAGs의 추출효율 확인결과, Buffer 농도별 추출효율은 무첨가, sodium phosphate buffer와 potassium phosphate buffer의 경우 각각 1/60 M, 1/100 M, 1/150 M, 1/200 M 농도로 사용하였으며, Buffer 무첨가의 경우 3.2%, sodium phosphate buffer의 경우 농도별 각각 5.3%, 5.0%, 4.6%, 4.5% 이고, potassium phosphate buffer의 경우 5.1%, 4.8%, 4.5%, 4.2%로 buffer 무첨가 하였을 때 보다 높았으며, sodium phosphate buffer가 potassium phosphate buffer보다 0.15~0.23% 높았다. 추출 용매별 추출효율은 수돗물, 이온수, 증류수를 사용하였으며 각각의 효율은 4.7%, 5.3%, 4.5%로 이온수의 경우 다른 용매에 비해 추출효율이 0.6~0.8% 높았다. 추출온도별 효율은 105℃, 120℃에서 2시간 추출하였을 때 두 조건 모두 5.3%로 같은 추출효율을 보이고 있어 갈변과 에너지 손실을 고려할 때 105℃에서 추출하는 것이 적합한 것으로 보인다. 열수추출과 효소추출에 따른 효율을 비교하기 위해 Papain(EC 3.4.22.2, P, pH 5.5), 산성 단백질 분해효소(pH 3.0), 중성 단백질 분해효소(NE, pH 7.2)로 분해 시켰다. 각각의 효율은 5.3%, 9.9%, 3.7%, 10.0%로 약산성에서 중성사이에서 가장 높은 추출효율을 나타내었으며, 이것을 다시 추출 횟수에 따른 추출효율을 측정하였을 때 열수추출은 1차에서 3차까지, 효소추출은 1차, 2차로 추출하였다. 열수추출 횟수에 따른 각각의 효율은 5.3%, 2.7%, 1.7%이며, 효소추출은 각각 10.0%, 7.2%이다. 열수추출의 경우 2차 추출이 1차 추출보다 반감된 것을 알 수 있으며, 효소추출의 경우 2차 추출에서도 열수추출보다 높은 효율을 나타내고 있어 열수 2차 추출은 산업적으로 어려우나 효소에 의한 2차 추출 시 원료수급에 따른 문제점을 해결할 수 있을 것 같다. 하지만, 효소의 사용에 따른 생산단가의 상승과 단백질 함량의 증가에 따른 화장품 규격을 만족시킬 수 없음으로 1/60 M sodium phosphate buffer로 105℃로 열수추출 하는 것이 가장 경제적이다. 이렇게 얻은 GAGs의 일반 성분의 조성은 수분 2.8%, 지방 1.5%, 회분 22.2%, 조단백질 31.8%, 탄수화물 44.5%이며, SO₄의 함량은 31.2%이다. 껍질의 조성과의 비교시 회분 함량의 상승과 이에 따라 탄수화물의 상대적인 감소를 나타내었다. 표준품 chondroitin sulfate A와 C와 미더덕에서 추출한 GAGs를 HPLC로 분석한 결과 머무름 시간(7.4min)이 같아 chondroitin sulfate를 함유할 수 있다는 것을 나타내고 있다. 당 조성 분석결과 galactosamine(GalNAc) 5.1%, glucosamine(GlcNAc) 33.2%, galactose(Gal) 44.8%, glucose(Glc) 10.1%, mannose(Man) 6.9%로 glucosamine과 galacturonic acid로 이루어진 구조를 하고 있다는 것을 알 수 있다. 검출된 무기질은 Na, K, P, Ca, Mg로 각각 3.0mg%, 1.6mg%, 1.2mg%, 0.4mg%, 0.2mg%이며, 총 무기질 중 Na 함유량이 47.6%로 높은 것은 GAGs 추출시 sodium phosphate buffer의 사용으로 생성된 것으로 추정된다. 이것은 미더덕 껍질의 회분과 큰 차이를 보이는 것을 뒷받

침해주고 있다. 아미노산 분석 확인 결과 phenylalanine, threonine, glutamic acid, aspartic acid가 총 아미노산의 약 45.2%를 차지하고 있다. 다당류 사슬을 연결하는 serine과 threonine중 threonine으로 연결된 당단백질이라는 것을 알 수 있다. GAGs의 일본과 한국 화장품 규격은 sulfate 함량이 35.0~45.0%이며, 단백질 함량이 14.0~22.0%로 유지해야한다. 하지만 미더덕 껍질에서 추출한 GAGs의 단백질 함량이 31.8%로 제단백의 필요성을 가지며, 그 결과로 TCA 농도(w/v)별 제단백 시험은 공시험, 2.5%, 5.0%, 10.0%, 20.0% 처리하였을 때 SO₄ 함량은 각각 32.5%, 34.5%, 35.1%, 35.7%, 36.2%이며, 단백질 함량은 35.0%, 22.3%, 22.0%, 21.4%, 20.8%이며, HCl 농도(v/v)별 제단백 시험은 공시험, 10.0%, 20.0%, 40.0% 처리하였을 때 SO₄ 함량은 각각 34.7%, 35.4%, 38.7%, 37.1%이며, 단백질 함량은 34.1%, 18.5%, 16.3%, 14.6%이다. 그리고 농축액을 UF 처리후 10.0% TCA(w/v), 20.0% S-SAS(w/v), 25.0% HCl(v/v) 처리하였을 때 SO₄ 함량은 각각 31.5%, 43.0%, 44.1%, 51.4%, 55.2%이며, 단백질 함량은 32.5%, 20.2%, 15.3%, 14.7%, 11.5%로 나타내고 있다. 따라서 화장품 규격에 적합한 제단백은 5.0%, 10.0%, 20.0% TCA 처리와 10%, 20%, 40% HCl 처리 UF+10.0% TCA(w/v), UF+20.0% S-SAS(w/v), UF+25.0% HCl(v/v) 처리로 나타났다.

요 약

미더덕으로부터 GAGs는 1/60 M sodium phosphate buffer로 105℃로 열수 추출하는 것이 가장 경제적인 것으로 나타났다. 이렇게 추출한 GAGs의 SO₄ 함량은 31.2%, 회분 함량은 22.2%이다. 회분 함량의 증가는 sodium phosphate의 사용으로 추정되며, 이것은 무기질 분석에서 Na의 함량이 총 무기질의 47.6%를 차지하고 있다는 것으로 뒷받침한다. 일반 성분, HPLC 분석, 당 분석, 아미노산 분석의 결과로 GAGs의 주된 구조는 glucosamine과 galacturonic acid로 결합되어 있으며, 당과 단백질은 threonine으로 연결되어 있다는 것을 알 수 있다. 화장품 원료 규격에 적합한 제단백은 5.0%, 10.0%, 20.0% TCA(w/v) 처리, 10.0%, 20.0%, 40.0% HCl(v/v) 처리, UF(ultra filtration)를 포함한 10.0% TCA(w/v), 20.0% S-SAS(w/v), 25.0% HCl(v/v) 처리가 가능하며, 이중 5.0% TCA(w/v) 및 10.0% HCl(v/v)의 처리가 가장 경제적이며 효율적이라는 것을 알 수 있었다.

References

1. Holger J. M., Torben M-P., T. E. Damsgaard, and J. H. Poulsen (1995), Demonstration of immunogenic keratan sulphate in commercial chondroitin 6-sulphate from shark

- cartilage. Implications for ELISA assays, *Clinica Chimica Acta.* **236**, 195-204.
2. INGE, A., and D. HEINEGARD (1975), Fractionation of Proteoglycans from Bovine Corneal Stroma, *Biochem. J.* **145**, 491-500.
 3. Shannon, E. M., M. Z. Ilic, and C. J. Handley (2002), Highly sulfated glycosaminoglycans inhibit aggrecanase degradation of aggrecan by bovine articular cartilage explant cultures, *Matrix Biology.* **21**, 429-440.
 4. David, A. P., S. Kumar, M. J. Wang, and Robin D. Hunter (1994), Irradiation of bovine aortic endothelial cells enhances the synthesis and secretion of sulphated glycosaminoglycans, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* **1220**, 266-276.
 5. Feige, J. J., F. Pirollet, B. Polak, and E. M. Chambaz (1982), Control of glycosaminoglycan metabolism by ACTH in bovine adrenocortical cells in primary culture, *Molecular and Cellular Endocrinology.* **28**, 645-655.
 6. Luebbering, B., T. Nishikata, and G. Goffinet (1992), Initial Stages of tunic Morphogenesis in the Ascidian *Halocynthia*, A fine Structure study, *Tissue-Cell.* **24**, 121-130.
 7. Ohtsuka, Y., H. Nakae, H. Abe, and T. Obinata (1994), Immunochemical studies of an actin-binding Protein in Ascidian Body Wall Smooth Muscle, *Zool.-Sci.* **11**, 409-412.
 8. Lee, I. H., Y. Cho and Robert I. Lehrer (1997), Styelins, Broad-Spectrum Antimicrobial Peptide from the Solitary Tunicate, *Styela clava*, *Comp. Biochem. Physiol.* **118B**, 515-521.
 9. A.O.A.C (1990), Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th ed., Assoc. of Official Analytical Chemists, Washington, DC., **237**.
 10. Dodgson, K. S. (1961), Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters, *Biochem. J.* **78**, 312.