

미더덕 껍질로부터 Glycosaminoglycans의 추출

안삼환 · 정성훈 · 강석중 · ¹정태성 · †최병대
경상대학교 해양생물이용학부, 해양산업연구소, ¹수의학과
(접수 : 2003. 3. 20., 게재승인 : 2003. 6. 25.)

Extraction of Glycosaminoglycans from *Styela clava* Tunic

Sam-Hwan Ahn, Sung-Hun Jung, Seok-Joong Kang, Tae-Sung Jeong¹, and Byeong-Dae Choi†
Division of Marine Bioscience and Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

¹College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
(Received : 2003. 3. 20., Accepted : 2003. 6. 25.)

Glycosaminoglycans (GAGs) was extracted from sea squirt, *Styela clava* with sodium phosphate at 105°C for 2 hr and deproteinized with trichloroacetic acid or hydrochloride. The GAGs obtained from tunic consist 41.7% crude carbohydrates, 31.8% crude protein, and 31.2% sulfate. It was mainly constituted of galactose, glucosamine, glucose, mannose, and galactosamine. The prominent amino acid were phenylalanine, threonine, glutamic acid, and aspartic acid. Mineral contents was mainly constituted 3.0 mg% sodium, 1.6 mg% potassium, and 1.2 mg% phosphorus. Trichloroacetic acid, hydrochloride and 5-sulfosalicylic acid were used for deprotein of the GAGs. Effective volume for deprotein of crude GAGs were 5.0% trichloroacetic acid (w/v) and 10.0% HCl (v/v) treatment. The deproteinized GAGs contained 35.1%, 35.4% of protein and 22.0%, 18.5% of sulfate, respectively.

Key Words : *Styela clava*, glycosaminoglycans (GAGs), polysaccharides, deprotein

서론

Proteoglycans는 매우 큰 분자구조로 이루어진 당단백질로, 분자내 glycosaminoglycans (GAGs)라 불리는 다당류 사슬과 단백질로 결합되어 있다. GAGs 사슬은 amino당 (glucosamine 이나 galactosamine)과 uronic acid (glucuronic acid 또는 iduronic acid)가 반복되는 구조로 되어있다. 구성된 당과 uronic acid의 함량에 따라 hyaluronic acid (HA), dermatan sulfate (DS), chondroitin sulfate (CS), heparin 및 keratan sulfate (KS) 등으로 분류한다.

HA와는 달리 GAGs가 황산기를 함유하거나 고농도의 SO₄²⁻ 혹은 COO⁻를 함유하여 음전하로 하전하게 되면 수분을 끌어당기는 힘이 생겨 보습효과 및 점성을 나타내므로 관절조직의 윤활제로서 이상적인 역할을 한다. 이와 같은 생화학적 특성 때문에 연골조직에 가해진 압력을 흡수하거나 분산시켜 기계적인 손상으로부터 관절조직을 보호하게 된다.

GAGs의 원료로 상어연골(1), 포유동물의 각막(2), 관절(3-5), 대동맥(6-8), 부신피질(9) 등이 이용되어지고 있었으나, 상어는 멸종위기로 인한 포획금지, 포유동물은 광우병 확산에 따른 자원확보가 어려운 실정이다. 이러한 자원 문제의 해결을 위해서는 새로운 원료탐색과 새로운 원료로부터 GAGs의 추출 및 정제기술의 개발이 뒤따라야 한다.

미더덕은 무척추동물 미색류에 속하는 부착생물로 80년대 중반 이후 본격적인 양식으로 어민들의 소득 증대에 기여하고 있다. 진해만을 중심으로 양식되고 있으며 연중 4월부터 7월 사이에 가장 많은 생산량을 보이며 2001년에는 약 15,000 ton이 생산되었지만, 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, 껍질 폐기에 따른 환경 오염을 줄일 수 있다.

미색류 껍질을 이용한 황산다당류의 연구가 발생생물학(10), 변역화학(11) 분야에서 활발히 진행되고 있으나, 미더덕 껍질을 이용한 황산다당류에 관한 연구는 거의 없다(12). 따라서 본 연구는 미더덕 껍질로부터 황산다당류의 추출 및 정제를 위한 기초 자료를 얻어 산업적으로 이용 가능한 원료를 생산하는데 기여하고자 한다.

† Corresponding Author : Division of Marine Bioscience, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea
Tel : +82-55-640-3173, Fax : +82-55-648-2038
E-mail : bdchoi@nongae.gsnu.ac.kr

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 미더덕 (*Styela clava*) 껍질은 경남 마산시 진동면 소재 영어조합법인에서 채취한 껍질을 과쇄하여 수회 수세한 다음 -25℃에서 보관하면서 재료로 사용하였다.

일반성분의 분석

미더덕 껍질 및 껍질에서 추출한 GAGs는 AOAC법(13)에 따라 수분은 상압가열건조법, 조지방은 soxhlet 추출법, 조회분은 건식회화법, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법 (N×5.56)으로 분석하였다.

GAGs 추출 및 수율의 측정

미더덕 1000 g 씩 취하여 buffer 농도별, 추출 용매별, 추출 횟수별, 가열시간 및 가열온도에 따른 열수 추출과 효소 처리를 통해 얻어진 액을 농축하여 95% ethanol 3배를 가하고, 하루 밤 방치시킨 다음 원심분리를 통한 침전물을 동결 건조한 후 GAGs 수율로 나타내었다. 추출과정은 Fig. 1과 같다.

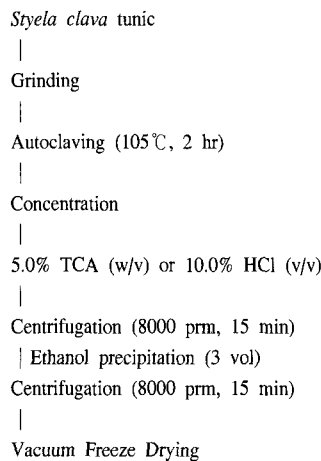


Figure 1. Preparation of glycosaminoglycans from *Styela clava* tunic.

황산비람에 의한 GAGs의 정량

105℃에서 2시간 건조된 시료 0.5 g을 100 mL 삼각플라스크에 취하고 탈이온수 30 mL를 가하여 용해하고, KClO₃ 5 g을 가한 다음, nitric acid 30 mL를 첨가하여 5 mL 남을 때까지 가열하였다. 이후 HCl 25 mL를 첨가하여 5 mL 남을 때까지 가열하여 탈이온수로 100 mL로 정용하고 일정량 취하여 다시 100 mL로 정용한 후 1 N BaCl₂·2H₂O 용액 5 mL를 첨가한 후 항온수조 내에서 2시간 동안 가열하여 실온에서 방냉하였다. 항량을 구한 유리여과기에 용액을 aspirator로 흡입여과 한 후 탈이온수 100 mL로 수세하고 Ba₂SO₄법으로 정량하였다(14).

GAGs의 조성당 분석

건조 시료(~1 mg)를 2 M trifluoroacetic acid (TFA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 400 µL에 용해하여 10 0℃에서 4시간 가수분해 후 실온에서 질소 농축하였다. 16 mM NaOH 용액으로 평형화된 CarboPac PA1 (0.45 × 25cm,

Dionex Co., Sunnyvale, CA, USA) 컬럼에 가수분해된 시료를 100 µL D.I.W.에 용해하여 유속 1.0 mL/min로 흘려보내며 PED2 (Pulsed Amperometric Detector, Dionex Co., Sunnyvale, CA, USA)로 검출하였다.

GAGs의 무기질 성분 분석

시료의 무기질 함량은 적정량의 시료를 취한 다음 습식 분해하여 20 mL로 정용하여 하룻밤 방치한 다음, 일정량을 취하여 유도결합 플라즈마 방출 분광기 (Inductively Coupled Plasma, Atornscan25, TJA Co., Franklin, MA, USA)를 사용하여 정량 분석하였다.

GAGs의 구성아미노산 분석

시료 100 mg을 6 N HCl로 24시간 가수분해 후 여과하여 citric buffer(pH 2.2)로 25 mL 정용하여 아미노산 자동분석기 (Amino Acid Analyger; Biochrom20, Uppsala, Sweden)로 정량 분석하였다.

HPLC에 의한 GAGs의 확인 실험

동결 건조된 시료 10 mg을 취하여 0.02 M phosphate buffer (pH 6.5) 25 mL에 용해 후 16,000 g에서 원심 분리하여 얻은 상등액을 HPLC 시험용액으로 사용하였다. 칼럼은 300×7.8 mm의 BIOSEP-SEC-S 2000 (Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하였고, 흡광도는 UV-Vis detector (Shimadzu SPD-10AVP, Tokyo, Japan)로 210 nm에서 측정하였다. 용매는 0.02 M phosphate buffer (pH 6.5)를 1.0 mL/min씩 흘리면서 분석하였다.

단백질 제거

제단백하지 않았을 때 GAGs의 sulfate 함량은 31.5~34.7%이며, 단백질 함량은 32.5~35.5% 나타내었다. 이 함량으로서는 화장품 규격에 적용할 수 없으므로 화장품 규격에 적합한 원료를 생산하고자 단백질 제거를 위해 trichloroacetic acid (TCA) 농도별 (w/v), HCl 농도별 (v/v), 5-sulfosalicylic acid (SSA) 농도별 (w/v), ultra filtration (~10,000 M.W.) 및 UF 처리 이후 용매에 따른 제단백을 실시하였다(15).

결과 및 고찰

미더덕 껍질의 일반성분

미더덕 껍질의 일반성분은 Table 1과 같이 수분 74.0%, 지질 0.4%, 회분 0.8%, 단백질 8.1%, 당질 16.7%이었다. 미더덕 껍질에는 단백당당이 다량 존재한다는 것을 나타내고 있다.

Table 1. Proximate compositions of *Styela clava* tunic (%)

Component	Contents
Moisture	74.0±0.1 ¹⁾
Crude Lipid	0.4±0.1
Crude Ash	0.8±0.2
Crude Protein	8.1±0.1
Total Carbohydrate ²⁾	16.7±0.2

¹⁾Mean ± S.D.

²⁾100 - (Moisture+Lipid+Ash+Protein)

GAGs 수율

미더덕 껍질로부터 얻어진 GAGs의 추출은 Anno(16)의 방법을 참고로 하였으며, 추출효율은 Table 2와 같다. Buffer 농도별 추출효율을 확인하기 위해 buffer를 첨가하지 않은 것, sodium phosphate buffer와 potassium phosphate buffer의 경우 각각 1/60 M, 1/100 M, 1/150 M, 1/200 M 농도로 사용하였다. Buffer를 사용하지 않았을 경우 3.2%이었으나 sodium phosphate buffer의 경우 각각 5.3%, 5.0%, 4.6%, 4.5% 이었으며, potassium phosphate buffer의 경우 5.1%, 4.8%, 4.5%, 4.2%로 buffer를 사용하지 않았을 때 보다 높았으며, sodium phosphate buffer가 potassium phosphate buffer 보다 0.15~0.23% 높았다.

Table 2. Yield of glycosaminoglycans with extracting conditions (%)

Extracting Conditions		Yields
D.W.		3.2±0.1 ¹⁾
Buffer (mole)	Sodium phosphate 1/60	5.3±0.1
	Sodium phosphate 1/100	5.0±0.2
	Sodium phosphate 1/150	4.6±0.1
	Sodium phosphate 1/200	4.5±0.1
Potassium phosphate	1/60	5.1±0.2
	1/100	4.8±0.1
	1/150	4.5±0.1
	1/200	4.2±0.2
Solutions	City water	4.7±0.1
	Ion water ²⁾	5.3±0.2
	D.W.	4.5±0.1
Methods ³⁾	Heat	5.3±0.1
	P	9.9±0.2
	AE	3.7±0.1
	NE	10.0±0.1
Times ⁴⁾	1st	5.3±0.2
	2nd	2.7±0.1
	3rd	1.7±0.1
Temperature (°C)	105	5.3±0.1
	120	5.3±0.1

¹⁾Mean±S.D.

²⁾Super-π ionic water (Jeun Co., Busan, Korea)

³⁾Heat ; heat extracting, P;papain (pH 5.5), AE;acid enzyme (pH 3.0), NE;neutral enzyme (pH 7.2)

⁴⁾Extracted at 105°C

추출 용매별 추출효율을 파악하기 위해 수돗물, 이온수, 증류수를 사용하였으며 각각의 효율은 4.7%, 5.3%, 4.5%로 이온수의 경우 다른 용매에 비해 추출효율이 0.6~0.8% 높았다. 열수추출과 효소추출에 따른 효율을 비교하기 위하여 Papain (EC 3.4.22.2, P, pH 5.5), 산성 단백질 분해효소 (Acid enzyme, AE, pH 3.0), 중성 단백질 분해효소 (Neutral enzyme, NE, pH 7.2)로 분해 시켰다. 각각의 효율은 5.3%, 9.9%, 3.7%, 10.0%로 약산성에서 중성 사이에서 가장 높은 추출효율을 나타내었으며, 원료 수급에 따른 문제점을 해결하기 위해 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 추

출이 1차 추출보다 반감된 것을 알 수 있으며, 효소추출의 경우 2차 추출에서도 열수추출보다 높은 효율을 나타내었다. 이것으로 열수 2차 추출 시 산업적 이용에 많은 어려움을 가 지나 효소에 의한 2차 추출로 원료수급에 따른 문제점을 해결할 수 있을 것 같다.

추출온도에 따른 추출효율을 파악하기 위하여 105°C, 120°C에서 2시간 추출하였을 때 두 조건 모두 5.3%로 같은 추출효율을 보이고 있다. 높은 온도에 따른 갈변현상과 에너지 손실을 고려할 때 105°C에서 추출하는 것이 적합한 것으로 보인다. GAGs의 추출효율을 높이기 위해서는 효소를 사용하여 하나 효소 사용에 따른 생산단가의 상승과 단백질 함량의 증가에 따른 화장품 규격을 만족시킬 수 없음으로 1/60 M sodium phosphate buffer로 105°C로 열수추출 하는 것이 가장 적절한 것으로 나타났다.

GAGs의 일반성분 분석 및 HPLC에 의한 확인

미더덕 껍질에서 추출한 GAGs의 일반 성분의 조성은 Table 3과 같다. 수분 2.8%, 지방 1.5%, 회분 22.2%, 조단백질 31.8%, 탄수화물 44.5%이다. 그리고 GAGs의 SO₄의 함량은 31.2%이다. 미더덕 껍질에서 추출한 GAGs의 지방, 단백질은 미더덕 껍질조성과 별 차이는 보이지 않고 있다. 하지만 탄수화물의 감소는 회분 함량의 상승에 따른 상대적인 감소라고 할 수 있다. 회분 함량의 상승은 추출에 사용되어진 sodium phosphate로 Na의 함량의 증가로 생각된다. 표준품 chondroitin sulfate A와 C를 이용한 HPLC 분석한 결과 머무름 시간(7.4 min)이 같아 미더덕에서 추출한 GAGs가 chondroitin sulfate를 함유할 수 있다는 것을 Fig. 2에서 나타내었다.

Table 3. Proximate compositions of glycosaminoglycans from *Styela clava* tunic (%)

Component	Contents
Moisture	2.8±0.3 ¹⁾
Crude Lipid	1.5±0.1
Crude Ash	22.2±0.1
Crude Protein	31.8±0.3
Total Carbohydrate ²⁾	41.7±0.2
SO ₄	31.2±2.3

¹⁾Mean ± S.D.

²⁾100 - (Moisture+Lipid+Ash+Protein)

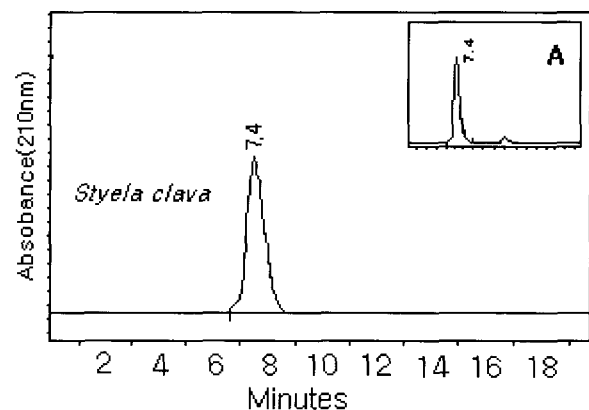


Figure 2. HPLC analysis of crude glycosaminoglycans from *Styela clava* tunic.

GAGs의 조성당 분석 및 무기질 함량

당 조성 분석결과는 Table 4와 같이 glucosamine, galactose가 주된 구성 당으로 총 당의 78.0%를 차지하고 있었으며, galactosamine (GalNAc) 5.1%, glucosamine (GlcNAc) 33.2%, galactose (Gal) 44.8%, glucose (Glc) 10.1%, mannose (Man) 6.9%로 구성되어 있었다. GAGs 사슬이 glucosamine과 galacturonic acid로 이루어진 구조를 하고 있다는 것을 알 수 있다. 미색류에 속하는 멧게껍질에서 추출한 glycosaminoglycans와 비슷한 조성비를 가지고 있고(17), 해양 세균으로부터 추출한 glycosaminoglycans의 경우 galactosamine이 높고 galactose의 함량이 낮은 서로 상반되는 조성을 가지고 있다(18).

Table 4. Sugar compositions of glycosaminoglycans from *Styela clava* tunic

Sugar composition	Concentration ¹⁾
Galactosamine	5.1±0.1
Glucosamine	33.2±0.2
Galactose	44.8±0.1
Glucose	10.1±0.2
Mannose	6.9±0.1

¹⁾Calculated from HPLC analysis, considering the total amounts under the sugar composition as 100%. Mean±S.D.

Table 5에 나타난 바와 같이 검출된 무기질은 Na, K, P, Ca, Mg로 각각 3.0 mg%, 1.6 mg%, 1.2 mg%, 0.4 mg%, 0.2 mg%이며, 이중 Na, K, P가 91.9%로 대부분을 차지하고 있으며 Ca, Mg는 소량 함유되어 있다. 총 무기질 중 Na 함유량이 47.6%로 높은 것은 GAGs 추출시 sodium phosphate buffer의 사용으로 생성된 것으로 추정된다. 이것은 Table 1과 3에서 나타난 미더덕 껍질의 회분 함량 0.8%, GAGs의 회분 함량은 22.2%로 큰 차이를 보이는 것을 뒷받침해주고 있다.

Table 5. Mineral contents of glycosaminoglycans from *Styela clava* tunic

Mineral	Contents
Na	3.0±0.1 ¹⁾
K	1.6±0.1
P	1.2±0.2
Ca	0.4±0.1
Mg	0.2±0.1

¹⁾Mean±S.D.

GAGs의 아미노산 조성

아미노산 분석결과는 Table 6과 같이 phenylalanine, threonine, glutamic acid, aspartic acid가 주요 아미노산으로 이들 4종의 아미노산이 전체 아미노산의 약 45.2%를 차지하였으며, 이에 비하여 methionine, histidine은 그 함량이 적었다. 전체 아미노산 중 필수아미노산 함량은 55.2%를 차지하여 비교적 필수아미노산의 함량이 높다 것을 알 수 있었다. 무척추동물에 속하는 가오리(19, 20)와 해삼(21)에서 추출된 glycosaminoglycans에는 glycine, serine과 threonine이 주를 이루고 있으며, 포유동물에 속하는 사슴에서 추출된

glycosaminoglycans에는 glutamic acid, glycine, aspartic acid가 주를 이루고 있어(22) 무척추동물과 포유동물의 차이점을 알 수 있다. 미더덕에서 추출한 glycosaminoglycans는 무척추동물과 포유동물에 다량 함유하고 있는 아미노산을 포괄적으로 함유하고 있었다.

Table 6. Amino acids profile of glycosaminoglycans from *Styela clava* tunic

Component	Contents
Aspartic acid	95.4
Threonine	149.9
Serine	48.7
Glutamic acid	100.9
Proline	38.4
Glycine	52.2
Alanine	38.6
Cystine	24.6
Valine	38.2
Methionine	15.2
Isoleucine	26.1
Leucine	37.1
Tyrosine	37.0
Phenylalanine	193.7
Histidine	15.9
Lysine	38.9
NH ₃	10.0
Arginine	39.3
Total EAA(E)*	551.9
E/T ratio	55.2

*EAA : Essential amino acid.

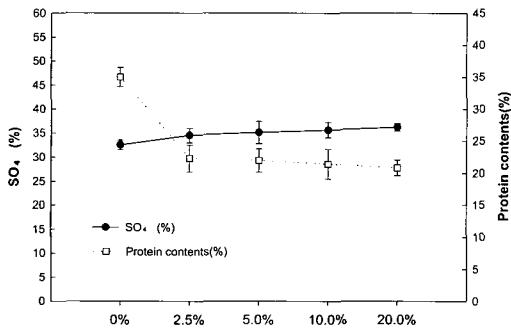
Values are expressed as residues/1000.

GAGs의 화장품 규격 및 단백질 제거

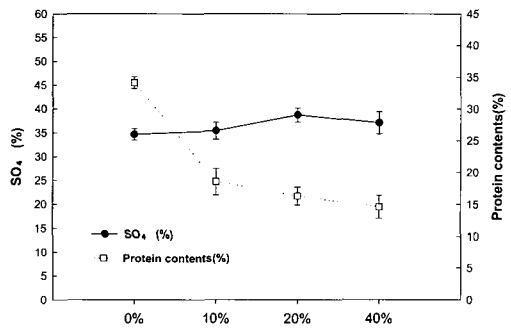
식품 공전상의 GAGs의 기준은 muco-protein의 함량이 77.0% 이상이며 단백질/sulfate의 비가 3.0~9.0, sulfate의 함량을 19.0% 이상, 단백질의 함량을 58.0% 이상이어야 하고(23), 일본의 기준은 GAGs 중 sulfate 함량은 20.0% 이상, 단백질 함량은 40.0% 이하가 되어야 한다(24). 화장품 규격과 식품 규격은 서로 다르며, GAGs를 화장품 원료로 사용할 수 있는 규격은 sulfate의 함량이 35.0~45.0%, 단백질 함량은 14.0~22.0%이다(25). 미더덕 GAGs를 화장품에 이용하기 위해서는 sulfate 함량을 35.0~45.0%, 단백질 함량을 14.0~22.0%로 유지해야 한다.

미더덕 껍질에서 추출한 GAGs의 단백질 함량은 Table 3에 나타난 바와 같이 31.8%로 GAGs의 추출 시 제단백의 필요성이 대두되고 있다. 여러 가지 제단백 방법을 사용한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. TCA 농도 (w/v)별 제단백 시험은 공시험, 2.5%, 5.0%, 10.0%, 20.0% 첨가방법으로 하였다. 이때 각각의 SO₄ 함량은 32.5%, 34.5%, 35.1%, 35.7%, 36.2%이었으며, 단백질 함량은 35.0%, 22.3%, 22.0%, 21.4%, 20.8%로 5.0%, 10.0%, 20.0% TCA로 제단백 실시하였을 때 SO₄ 함량과 단백질 함량 모두가 화장품 규정에 적합한 것으로 나타났다(Fig. 3. A). HCl 농도 (v/v)별 제단백 시험은 공시험, 10.0%, 20.0%, 40.0% 첨가방법으로 하였을 때, SO₄ 함량은 각각 34.7%, 35.4%, 38.7%, 37.1%이며, 단백질 함량은 34.1%, 18.5%, 16.3%, 14.6%로 공시험을 제외한 10%,

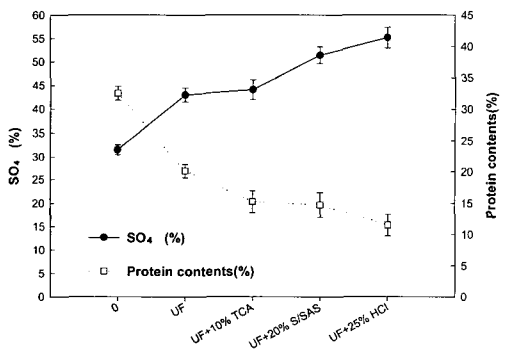
20%, 40% HCl로 제단백 실시하였을 때 SO₄ 함량과 단백질 함량 모두가 화장품 규정에 적합하였다(Fig. 3. B). 농축액을 UF 처리이후 10.0% TCA (w/v), 20.0% SSA (w/v), 25.0% HCl (v/v)처리하여 제단백한 결과로 SO₄ 함량은 각각 31.5%, 43.0%, 44.1%, 51.4%, 55.2%이며, 단백질 함량은 32.5%, 20.2%, 15.3%, 14.7%, 11.5%로 UF 처리만을 제외한 UF+10.0% TCA (w/v), UF+20.0% SSA (w/v), UF+25.0% HCl (v/v)로 제단백 하였을 때 SO₄ 함량과 단백질 함량 모두가 화장품 규정에 적합한 것으로 나타났다(Fig. 3. C).



(A)



(B)



(C)

Figure 3. Sulfate and protein contents of glycosaminoglycans by deprotein. (A) is treatment of TCA (w/v), (B) is treatment of HCl (v/v), (C) is treatment of 10% TCA (w/v), 20% SSA (w/v) and 25% HCl (v/v) after UF, respectively.

요 약

GAGs의 추출 방법 중 효소의 사용으로 추출 효율의 상승과 원료수급의 문제점을 해결할 수 있었다. 그러나 효소 사용에 따른 생산단가의 상승과 단백질 함량의 증가에 따른 화장품 규격을 만족시킬 수 없으므로, 1/60 M sodium phosphate buffer로 105℃로 열수 추출하는 것이 화장품 규격을 만족시키는 방법으로 나타났다. 이렇게 추출한 GAGs의 SO₄ 함량은 31.2%이고 회분의 함량이 22.2%로 GAGs 추출 향상을 위해 사용되어지는 sodium phosphate의 사용으로 회분 함량이 높아졌음을 알 수 있고 무기질 분석에서 Na의 함량이 3.0 mg%로 총 무기질의 47.6%를 차지하고 있었다. 시료를 HPLC로 분석하였을 때 chondroitin sulfate A, C와 동일한 분석시간을 나타내어 chondroitin sulfate의 함유 가능성을 나타내고, glucosamine과 galactose가 78.0% 존재하는 것을 당 조성 분석을 통해 확인하였다. 일반 성분, HPLC분석, 당 조성분석과 아미노산 분석결과로 glucosamine과 galacturonic acid가 주가 되어 threonine으로 연결된 구조를 하는 GAGs라는 것을 알 수 있다. 화장품 원료 기준에 맞추기 위해서는 sulfate 함량이 35.0~45.0%, 단백질 함량은 14.0~22.0%로 유지해야하므로 제단백결과 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% SSA (w/v), 25.0% HCl (v/v) 처리 결과 5.0% TCA (w/v) 및 10.0% HCl (v/v)이 화장품 기준에 적합하며 경제적이며 효율적이라는 것을 알 수 있었다.

사 사

본 연구는 보건복지부 벤처 및 중소기업기술개발지원(과제 번호 : 02-PJ1-PG11-VN02-SV05-001)에 의하여 연구 되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Holger, J. M., M. P. Torben, 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.
- Inge, A., and D. Heinegard (1975), Fractionation of proteoglycans from bovine corneal stroma, *Biochem. J.* **145**, 491-500.
- 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.
- Brown, S. A. and T. P. Anastassiades (1987), "Matrigenin" activity from bovine bone-II. Effects on the glycosaminoglycans of bovine articular cartilage in culture, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **88**, 535-540.
- Stephens, C., A., P. Craigie, and T. P. Anastassiades (1987), "Matrigenin" activity from bovine bone-III. Effects on glycosaminoglycans and proteoglycans of human synovial cells in culture, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **88**, 541-545.
- David, A. P., S. Kumar, M. J. Wang, and R. 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.
7. Bhandaru, R. N. J., and G. S. Berenson (1986), Organization of glycosaminoglycan chains in a chondroitin sulfate-dermatan sulfate proteoglycan from bovine aorta, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **882**, 85-96.
 8. Gertraud, G., H. G. Fromme, and H. Kresse (1978) Metabolism of sulfated glycosaminoglycans in cultured endothelial cells and smooth muscle cells from bovine aorta, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **544**, 514-528.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. Lee, I. H., Y. Cho, and R. I. Lehrer (1997), Styelins, Broad-Spectrum Antimicrobial Peptide from the Solitary Tunicate, *Styela clava*, *Comp. Biochem. Physiol.* **118B**, 515-521.
 13. 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.
 14. 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.
 15. Park, Y. H. (1994), Protein denaturation for processing and storage, In *Seafood Processing and Utilization*, Y. H. Park, D. S. Jang and S. B. Kim, Eds., p462, *Hyungseal Publishing*, Seoul, Korea.
 16. Anno, K., O. Kimiko, and N. Seno (1974), A chitin Sulfate-like polysaccharide from the Test of the Tunicate Halocynthia roretzi, *Biochim. Biophys. Acta.* **362**, 215-219.
 17. Rodolpho, M. A. and Paulo A. S. Mourao (1996), Isolation, Fractionation, and Preliminary Characterization of a Novel Class of Sulfated Glycans from the Tunic of *Styela plicata*, *The J. of Biological Chem.* **261**, 758-765.
 18. Suda, T. and K. Okutani (1990), Partial Structure of an Extracellular Mucopolysaccharide Produced by a Marine Bacterium, *Nippon Suisan Gakkaishi.* **56**, 2103-2107.
 19. Chatziioannidis, C. C., N. K. Karamanos, S. T. Anagnostides, and T. Tseggenidis (1999), Purification and characterisation of a minor low-sulphated dermatan sulphate-proteoglycan from ray skin, *Biochimie* **81**, 187-196.
 20. Chatziioannidis, C. C., N. K. Karamanos, and T. Tseggenidis (1999), Isolation and characterisation of a small dermatan sulphate proteoglycan from ray skin (*Raja clavata*), *Comp. Biochem. Physiology* **124B**, 15-24.
 21. Kariya, Y., S. Watabe, K. Hashimoto, and K. Yoshida (1990), Occurrence of Chondroitin Sulfate E in Glycosaminoglycan Isolated from the Body Wall of Sea Cucumber *Stichopus japonicus*, *The J. of Biological Chem.* **265**, 5081-5085.
 22. Sunwoo, H. H., T. Nakano, and J. S. Sim (1998), Isolation and characterization of proteoglycans from growing antlers of wapiti (*Cervus elaphus*), *Comp. Biochem. Physiology* **121B**, 437-442.
 23. Korea foods industry association (1997), Korea Food Code, Korea foods industry association, p435, Seoul, Korea.
 24. Tanimura, K. Y. (1999), Food Additives Code of Japan, 7th ed., pD-492, Hirokawa Publishing, Tokyo, Japan.
 25. JFDA (1999), Japan Cosmetic Ingredient Dictionary, 1st ed., p128, Yakasilbosa, Tokyo, Japan.