



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

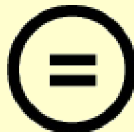
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학박사 학위논문

황다랑어 (*Thunnus albacares*) 복부 껍질로부터
젤라틴과 콜라겐의 제조 및 특성 해석



2009년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

劉 丞 栽

공학박사 학위논문

황다랑어 (*Thunnus albacares*) 복부 껍질로부터
젤라틴과 콜라겐의 제조 및 특성 해석

지도교수 김 선 봉

이 논문을 공학박사 학위논문으로 제출함

2009년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

劉 丞 栽

劉丞栽의 工學博士 學位論文을 認准함

2009년 2월



주 심 工學博士 金 東 洙



위 원 工學博士 金 仁 洙



위 원 農學博士 李 養 鳳



위 원 藥學博士 金 榮 穆



위 원 農學博士 金 善 奉



목 차

Abstract	x
서 론	1
재료 및 방법	6
1. 실험재료	6
2. 실험방법	6
2.1. Gelatin의 추출	6
2.2. Collagen의 제조	9
2.3. Gelatin 및 collagen의 정량	11
2.4. pH 측정	11
2.5. 아미노산 분석	13
2.6. SDS-PAGE 전기영동	13
2.7. 겔 강도의 측정	13
2.8. 점탄성 분석	14
2.9. 겔 형성점 및 녹는점 분석	14
2.10. 실험 계획과 자료 분석	14
2.11. 점도의 측정	20
2.12. 변성온도 (T_d)의 측정	21
2.13. FT-IR (fourier transform infrared spectroscopy) 분석	21
2.14. 통계 처리	21

결과 및 고찰	22
1. Gelatin의 추출 최적화 및 기능 특성	22
1.1. Gelatin 추출의 최적화	22
1.1.1. Gelatin 추출의 통계적 해석	22
1.1.2. Gelatin 추출의 최적화	25
1.2. 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 기능 특성	31
1.2.1. 일반성분 및 pH	31
1.2.2. 아미노산 조성	34
1.2.3. 전기영동 (SDS-PAGE) 특성	39
1.2.4. Gel 강도 및 gel 강도의 변화	39
1.2.4.1. Gel 강도	39
1.2.4.2. 농도별 겔 강도의 변화	41
1.2.4.3. 숙성 시간에 따른 겔 강도의 변화	44
1.2.4.4. 가열에 의한 겔 강도의 변화	44
1.2.4.5. 동결에 따른 겔 강도의 변화	46
1.2.5. 겔 형성점 및 녹는점	46
1.2.6. 점탄성 해석	50
2. Collagen의 최적 제조조건 및 기능 특성	56
2.1. Collagen 제조의 최적화	56
2.1.1. Collagen 제조의 통계적 해석	56
2.1.2. Collagen 제조의 최적화	60
2.2. 황다랑어 복부 껍질 collagen의 기능 특성	63
2.2.1. 아미노산의 조성	63
2.2.2. 전기영동 (SDS-PAGE) 특성	66

2.2.3. FT-IR 스펙트럼 특성	68
2.2.4. Collagen의 점도 특성	70
2.2.5. Collagen의 변성온도 (T_0)의 특성	70
요 약	74
감사의 글	80
참고문헌	81



List of Figures

Fig. 1. Photograph of <i>Thunnus albacares</i> (A) and abdominal skin (B)	7
Fig. 2. Flow chart for preparation of gelatin from abdominal skin of yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>)	8
Fig. 3. Flow chart for collagen processing from abdominal skin of yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>)	10
Fig. 4. Calibration curve for the determination of hydroxyproline content	12
Fig. 5. Response surface plots for optimization of gelatin processing from yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin	32
Fig. 6. Response surface plots for optimization of gelatin processing from yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin	33
Fig. 7. SDS-PAGE patterns of yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin, bovine and porcine skin gelatins	40
Fig. 8. Changes of the gel strength as affected by the concentration of gelatins	43
Fig. 9. Changes of the gel strength as affected by the maturation time	45

Fig. 10. Changes of the gel strength as affected by the heat treatment of 6.67% (w/v) gelatin solutions	47
Fig. 11. Changes of the gel strength as affected by the freeze treatment of 6.67% (w/v) gelatin solutions	48
Fig. 12. Evolution of the elastic modulus (G' , kPa) during cooling (A: 40°C-5°C) and heating (B: 5°C-40°C) of gelatin solutions ...	51
Fig. 13. Evolution of the loss modulus (G'' , kPa) during cooling (A: 40°C-5°C) and heating (B: 5°C-40°C) of gelatin solutions	52
Fig. 14. Evolution of the phase angle (rad) during cooling (A: 40°C-5°C) and heating (B: 5°C-40°C) of gelatin solutions	53
Fig. 15. Evolution of the elastic modulus (G' , kPa) as a function of time at constant temperature (20 and 10°C)	55
Fig. 16. Response surface plots for optimization of collagen extraction from abdominal skin of yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>)	64
Fig. 17. SDS-PAGE patterns of collagen from yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin and calf skin	67
Fig. 18. FT-IR spectra of collagen from yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin and calf skin	69
Fig. 19. Relative viscosity at different temperatures of the collagen solution of yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin	

..... 71

Fig. 20. Thermal denaturation curves determined by measuring the viscosities of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin and calf skin collagen solutions in 0.1 M acetic acid

..... 72



List of Tables

Table 1. Experimental range and values of the independent variables in the central composite design for collagen processing from yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin	16
Table 2. Central composite design and responses of the dependent variables for collagen processing from yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin to the independent variables	17
Table 3. Experimental range and values of the independent process variables in the central composite design for gelatin processing from yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin	18
Table 4. Central composite design and responses of the dependent variables for gelatin processing from yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin to the independent variables	19
Table 5. Estimated coefficients of the fitted quadratic polynomial equation for the response of Y_1 (gel strength, Bloom) based on t -statistic	23
Table 6. Estimated coefficients of the fitted quadratic polynomial equation for the response of Y_2 (gelatin content, %) based on	

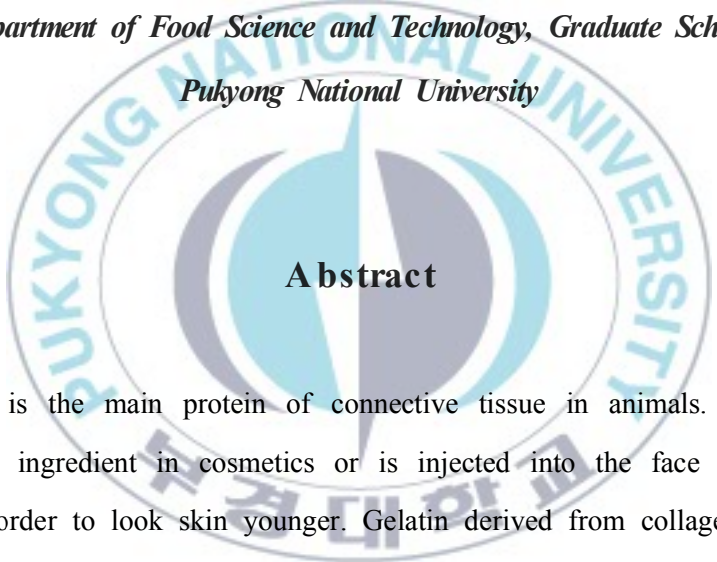
<i>t</i> -statistic	24
Table 7. Response surface model for processing conditions of gelatin from yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin	26
Table 8. Analysis of variance (ANOVA) for response of the dependent variable (Y_1 , gel strength)	27
Table 9. Analysis of variance (ANOVA) for response of the dependent variable (Y_2 , gelatin content)	28
Table 10. Optimal conditions of gelatin processing from yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin	29
Table 11. Experimental and predicted results of verification under optimized conditions	30
Table 12. Proximate composition of yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin	35
Table 13. Proximate composition and pH of yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin, bovine and porcine skin gelatins	36
Table 14. Amino acid composition of yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin, bovine and porcine skin gelatins	37
Table 15. Comparison with gel strength of yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin, bovine and porcine skin gelatins	

.....	42
Table 16. Comparison with gelling (melting) point of yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin, bovine and porcine skin gelatins	49
Table 17. Estimated coefficients of the fitted quadratic polynomial equation for the response of <i>Y</i> (yield, %) based on <i>t</i> -statistic	57
Table 18. Response surface model for processing conditions of collagen from yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin	58
Table 19. Analysis of variance (ANOVA) for response of the dependent variable (<i>Y</i> , Contents, %)	59
Table 20. Optimal conditions of collagen processing from yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin	61
Table 21. Experimental and predicted results of verification under optimized conditions	62
Table 22. Amino acid composition of collagens from yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) abdominal skin and calf skin	65

Processing Optimization and Physicochemical Properties of Gelatin and Collagen from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Abdominal Skin

Sung-Jae Yoo

*Department of Food Science and Technology, Graduate School,
Pukyong National University*



Abstract

Collagen is the main protein of connective tissue in animals. It is often used as an ingredient in cosmetics or is injected into the face in cosmetic surgery in order to look skin younger. Gelatin derived from collagen has been widely used in food, medicine and photographic industries over the years. However, gelatins from mammalian resources are limited in utility of processing in functional food, cosmetic, and pharmaceutical products because frequent occurrences of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and foot/mouth diseases (FMD) are to be serious problems for human health.

Gelatin extraction from the abdominal skin of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) was optimized by the response surface methodology and the central composite design. The values of independent variables at optimal conditions

were 1.89% NaOH concentration, 2.93 hrs NaOH treatment time, 56.6°C extraction temperature, and 4.7 hrs extraction time. The estimated gelatin content was 90.7% and the estimated gel strength was 406 Bloom under the optimal condition. The actual experimental collagen content was 90.6% and the actual gel strength was 402 Bloom. The Physicochemical characteristics of gelatin extracted from the abdominal skin of yellowfin tuna were investigated by comparing its proximate composition, pH, amino acid composition, viscoelastic properties, gel strength, and SDS-PAGE patterns with bovine and porcine gelatins. Also, the effects of gelatin concentration, maturation time, heat and freeze treatments on the gel strength of yellowfin tuna abdominal skin gelatin were studied. Amounts of α -chains, β -, and γ -components of yellowfin tuna abdominal skin gelatin were higher than those of the two mammalian gelatins. Yellowfin tuna abdominal skin gelatin had the lowest content of imino acids (proline and hydroxyproline), and was consistent with that of other fishes. However, yellowfin tuna abdominal skin gelatin had the highest levels of in glycine, alanine, and lysine. It has been known that the gel strengths of all gelatins were proportional to gelatin concentration. Among gelatins, yellowfin tuna abdominal skin gelatin exhibited the highest gel strength at each concentration. Although it required a longer maturation time to form a firm gel than the two mammalian gelatins. Using higher heating temperatures decreased the gel strength of yellowfin tuna abdominal skin gelatin more than that of the two mammalian gelatins. However freezing decreased the gel strength of bovine gelatin only slightly, whereas extended freezing times resulted in greater reductions in gel strength in the yellowfin tuna abdominal and porcine skin gelatins.

The processing of collagen from the abdominal skin of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) was optimized by the response surface methodology and the central composite design. The optimal conditions included the following independent variables: NaOH concentration, 0.5 N; NaOH treatment time, 36.2 hrs; pepsin concentration, 1:4.9 ratio (0.245% w/v), and digestion time, 48.1 hrs. The collagen content estimated under optimal conditions was 33.1%, and the actual experimental collagen content was 32.3%. The physicochemical properties of collagen from yellowfin tuna abdominal skin were investigated by amino acid analysis, SDS-PAGE, FT-IR, viscosity and denaturation temperature. The amino-acid content of the collagen was 21.0%. The SDS-PAGE pattern of the collagen indicated two different α -chains (α_1 and α_2), β -component and γ -component. The FT-IR spectrum of the collagen displayed wavenumbers at 3434, 1650, 1542 and 1235 cm^{-1} , representing the regions of amide A, I, II and III, respectively. The relative viscosity of the collagen decreased continuously on heating up to 32°C and the rate of decrease slowed down in the temperature range 35–50°C. The denaturation temperature (T_d) of the collagen solution (0.06% w/v) was 31°C and was lower than that of calf-skin collagen (35°C).

서 론

Collagen은 세포간 결합조직의 주된 구성 성분인 경단백질로서 생체 전체 단백질의 50% 이상을 차지하며 생체내 광범위하게 분포한다. 최소 19종류 (type I-XIX) 이상이 밝혀져 있고 조직이나 장기의 보호 및 생체 조절 기능을 하며 (Nakamura et al., 2003), 특히 피부, 연골, 뼈 등 결합조직의 주요한 구성 성분으로 전 collagen 량의 40%는 피부, 20%는 뼈와 연골, 그 외 혈관과 내장 등 전신에 넓게 분포하고 있다. 기본구조는 3중 나선구조를 이루고 있으며 직경 약 14-15 Å, 길이 2,800 Å, 평균 분자량 약 300 KDa이다 (Lehninger, 1975). Tropocollagen의 분자 내 또는 분자간의 가교결합으로 물리·생물학적으로 안정한 구조를 이루고 있다 (Nimni & Harkness, 1988).

Collagen으로부터 유도되는 섬유상의 수용성 단백질인 gelatin은 뼈와 조직을 구성하는 결체단백질로서 collagen의 효소가수분해 처리에 의해 제조되며, 원료의 종류에 따라 다양한 종류의 gelatin이 만들어지게 된다. 현재 collagen은 대부분 소 (bovine)나 돼지 (porcine)의 뼈와 가죽을 이용하여 생산되고 있으며, collagen은 식품, 건강보조식품, 화장품, 그리고 세포배양 등 다양한 분야에서 이용되고 있다.

일반적으로 gelatin은 돈피를 산처리하여 얻어지는 type A gelatin과 우피를 석회처리하여 얻어지는 type B gelatin으로 구분되며, 젤리강도, 점도 및 분자량과 같은 물리적 특성에 따라 많은 분야에서 사용되고 있다. 마이크로캡슐, 정제약, 지혈제 등 의약용으로 사용되기도 하며, 식품산업분야에서는 젤리로 이용될 뿐만 아니라 열가역성, 보수성, 유화성, 광택성, 점성 등을 이용하여 제과제빵, 음료, 빙과, 마요네즈 등의 식품원료로 사용되며,

coating제, 가식성 소시지필름 등 식품포장재의 원료로도 사용되고 있다. 또한 산업용 접착제, 사진용 필름, 세균실험용 배지로 사용되는 등 다양한 산업적 용도를 가지고 있다.

GME (Gelatine manufacturers of Europe, www.gelatine.org) 보고에 의하면 2005년도 전세계 gelatin 생산량은 306,800 톤이며, 그 중 72.1%가 돈피와 우피로부터 생산되고, 뼈 (소, 돼지 등) 등의 부산물로부터는 26.6%, 기타 원료를 이용한 생산량은 1.3%인 것으로 나타났으며, gelatin 생산 및 소비량은 매년 증가하는 것으로 나타나고 있다. 그러나 식용으로 사용되는 gelatin의 경우 생산량의 80%가 돈피로부터 생산되고 있으며 10%만이 우피를 이용하는 것으로 보고되었다. 우피의 사용량은 감소하고, 돈피와 기타원료의 사용량이 증가하고 있으며, 이것의 주된 원인은 광우병 (bovine spongiform encephalopathy, BSE)에 의한 것이다. 우피를 이용한 collagen 및 gelatin은 광우병 등의 인체전이 위험성이 대두되고 있기 때문이고, 돈피 또한 구제역 (foot/mouth diseases, FMD) 발생지역에 따른 지역적 제한 등으로 인해 돼지를 이용한 collagen 및 gelatin을 추출하는데 문제가 발생되고 있다 (Sadowska et al., 2003).

광우병은 4-5세 (30개월령 이상)의 소에서 주로 발생하는 전염성 뇌질환으로 그 원인은 프리온 단백질의 화학 구조상의 문제가 발생하여 질환을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 인간에게 감염되어 변형 크로츠펬트 야콥병 (variant Creutzfeldt-jakob disease, vCJD) 증세를 나타내면 대부분의 환자가 1-2년 이내에 급속한 치매의 진행으로 사망하는 것으로 알려져 있다 (Fact Sheet N°113, WHO). 1986년 영국에서 처음 발병된 광우병으로 인해 1988년 영국정부는 소에게 동물성 사료 공급을 금지하고 감염된 소를 모두 도살하기도 하였으나, 당시에는 인간전염성이 부정되었다. 그러나 1996년 영국정부가 인간전염성을 공식인정하여 사회적으로 큰 파장을 일으켰다.

또한 최근 영국 및 일본 정부가 OIE (국제수역사무국, World organisation for animal health)에 제출한 보고서에 의하면 30개월 미만의 소에서는 발병하지 않는 것으로 여겨지던 광우병이 30개월 미만인 경우에도 감염된 것으로 확인되어 더욱 큰 사회적 문제로 대두되고 있다 (BSE Report, september 2006, Which). 또한 우제류동물의 급성가축전염병인 구제역의 전염 및 발병으로 인한 돈피사용 여부에 대하여 논쟁이 벌어지기도 한다.

이와 같이 위생적 안전성에 대한 소비자의 우려가 사회적으로 대두되어 천연의 안전성이 확보된 새로운 원료소재에 대한 연구가 요구되고 있는 실정이다. 이런 이유들로 인하여 이들을 대체하기 위한 기능성 단백질의 연구가 필요하며, 해양 생물을 이용한 collagen 및 gelatin의 추출에 관한 관심이 높아지고 있다. Kittiphattanabawon et al. (2005)은 bigeye snapper의 껍질과 뼈로부터 acid-soluble collagen의 추출 특성을 밝혔으며, Sadowska et al. (2003)은 대구 (*Gadus morhua*)로부터 collagen을 추출하였다. Ikoma et al. (2003)은 참돔 (*Pagrus major*)과 tilapia (*Oreochromis niloticus*)의 비늘로부터 type I collagen을 추출하여 물리적 특성을 밝혔으며, Kolodziejska et al. (1999)은 오징어 외피로부터 collagen을 추출하여 물리적 특성을 밝혔다. 이들은 대부분 어류의 껍질이나 뼈 그리고 비늘 등 버려지는 부위를 이용하여 collagen을 추출하였다 (Kittiphattanabawon et al., 2005; Sadowska et al., 2003; Ikoma et al., 2003). 어류 가공 시 버려지는 껍질과 뼈는 대략 30%로 많은 양이 버려지고 있으며, 이들은 풍부한 collagen을 함유하고 있다 (Shahidi, 1994). 일반적으로 어류 유래의 collagen은 육상동물 유래의 collagen보다 낮은 함량의 imino acid를 가지고 있으며, 열안정성 또한 낮게 나타나 이용에 제한을 받고 있다 (Foegeding et al., 1996). 따라서 버려지는 자원을 이용하여 기존의 주된 육상 동물 유래의 collagen보다 열안정성이 뛰어나게 하거나 그들과 비슷한 특성을 가진 어류 유래 collagen 추출은 의

미가 깊다고 할 수 있다.

과거 수산물 유래 gelatin을 이용하기 위해 많은 연구가 이루어져 왔으며, 특히 수산물의 뼈, 어피 등 부산물을 이용하기 위한 많은 선행연구가 있어 왔다 (Cho et al., 2004; Kim & Cho, 1996; Montero & Comez-Guillen, 2000). 무엇보다 수산물 유래 gelatin이 식품 및 의약품 산업에서 사용되기 위해서는 두 가지 선결조건이 충족되어야 하는데, 첫 번째는 산업적 이용이 가능한 규모의 대량생산이 가능하고 지속적 공급이 가능해야 한다는 것이며, 두 번째는 목적으로 하는 물리적 성질 (겔 강도, 겔 · 졸화 온도, 분자량 등)을 가져야 한다는 것이다. 그러나 대부분의 수산물의 경우 개체의 크기가 작으며, Lumpfish (Osborne et al., 1990), Tilapia (Jamilah & Harvinder, 2002), Conger and Squid (Kim & Cho, 1996) 등의 연구에서 보듯이 물리적 성질이 다소 부족하다는 것이다. 물리적 성질을 향상시키기 위한 연구 (Kim et al., 1995)가 진행되었으며, 특히 상어를 원료로 생산된 gelatin의 경우, 육상동물 유래 gelatin 보다 월등한 물리적 성질을 나타내는 것으로 보고되고 있다 (Yoshimura et al., 2000).

최근 통계자료에 의하면 다랑어류 (tuna)는 세계적으로 어획되는 어종으로 1950년도 500,000 ton에서 2003년도 4,000,000 ton에 이르기까지 꾸준하게 어획량이 증가하고 있으며, 특히 황다랑어 (yellowfin tuna)는 다랑어 중에서 가다랑어 다음으로 많은 양이 어획되고 있어 상업적으로 경제성이 있는 어종이다. 또한 2003년도 황다랑어 어획량은 1,400,000 ton이었으며 다랑어류 총 어획량의 34%를 차지하고 있다 (2003 World Capture Production FAO Fisheries Department). 우리나라에서의 생산량은 전세계 어획량의 6%에 달하며, 우리나라 원양어업에 의한 어류 생산량 중 13%에 달한다 (2003 해양수산통계연보). 다랑어류는 대부분 통조림 또는 찌꺼기로 처리되어 유통·소비되며, 특히 황다랑어는 대부분 찌꺼기로써 -40°C 이하에서 보관

되어 껍질 및 뼈 부분을 제거하여 Loin 상태로 유통·소비되고 있다. 또한 횡감용 식품의 특성상 위생적 처리과정 (HACCP)하에서 가공·처리되어지고 있다. 따라서 황다랑어의 부산물은 식용 가능한 원료로서 위생적인 시설 및 처리과정을 거쳐 공급될 수 있으며, 냉동보관함으로 연중 생산이 가능한 원료인 것이다.

본 연구에서는 황다랑어의 복부 껍질 (abdominal skin)로부터 고기능성 단백질인 gelatin 및 collagen을 추출 및 제조하여 기능 특성을 알아보고자 하였다. 중심합성계획법에 따라 독립변수와 종속변수를 선정하고 예비실험과 반응표면 분석법을 이용하여 gelatin과 collagen의 추출 및 제조를 위한 최적 조건을 밝혔으며, 최적 조건에서 추출 및 제조된 gelatin과 collagen의 특성을 밝히기 위해 아미노산의 조성, 전기영동 (SDS-PAGE) 패턴, 겔 강도 및 겔 강도의 변화, FT-IR 스펙트럼, 겔 형성점 및 녹는점, 점도 변화 (dynamic viscoelasticity properties), 점탄성 그리고 변성온도 (denature temperature)를 측정하였으며, 현재 상업적으로 가장 많이 사용되는 육상 포유동물 유래 우피 (bovine) 및 돈피 (porcine) gelatin, 그리고 우피 (calf skin) collagen과 그 특성을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

시료로 이용된 황다랑어 (Yellowfin tuna, *Thunnus albacares*) 복부 껍질 (abdominal skin)은 (주)두영수산 (부산 602-030, 한국)으로부터 공급받았다. 황다랑어는 등 부분과 복부 부분의 껍질이 서로 상이하여 나누어서 공급 받았으며, 본 연구는 복부 부분에 해당하는 껍질을 이용하여 연구를 수행하였다 (Fig 1). 시료 껍질은 비늘을 제거한 뒤 수세하였으며, 실험 전까지 -18°C 에서 동결 보관하였다. 실험에 사용된 육상포유동물 gelatin은 우피 (bovine skin) 추출 gelatin (G 9382, 225 Bloom)과 돈피 (porcine skin) 추출 gelatin (G 2500, 300 Bloom)을 Sigma Chemical Co.로부터 구입하여 사용하였다. 또한 시료로부터 추출한 collagen의 특성을 알아보기 위해 육상동물 유래 collagen인 Sigma Chemical Co.의 우피 (calf skin) collagen (EC No 232-697-4, Collagen from calf skin)을 사용하였으며, 본 연구에 사용된 모든 시약은 연구용 특급품을 사용하였다.

2. 실험방법

2.1. Gelatin의 추출

세절된 황다랑어 복부 껍질을 8배 (v/w)의 알칼리용액 (1.89% NaOH, Hanbaek Scientific Co., Korea)을 이용하여 10°C , 200 rpm의 조건에서 2.9일 동안 진탕교반 (HB-201SF) 처리하여 non-collagen 단백질 제거 및 팽윤처리를 하였다. 알칼리 처리 후, 흐르는 물로 수세를 시켰으며, 6N HCl로 중화를 시켰다. 중화된 복부 껍질에 원료대비 6배 (v/w)의 증류수를 가해 56°C 에서 4.7 시간의 조건으로 열수 추출하였다. 열수 추출한 용액은 30°C 에서 $900\times\text{g}$ 로 원심분리하여 고형분을 분리·제거하였다. 상층액은 여과지

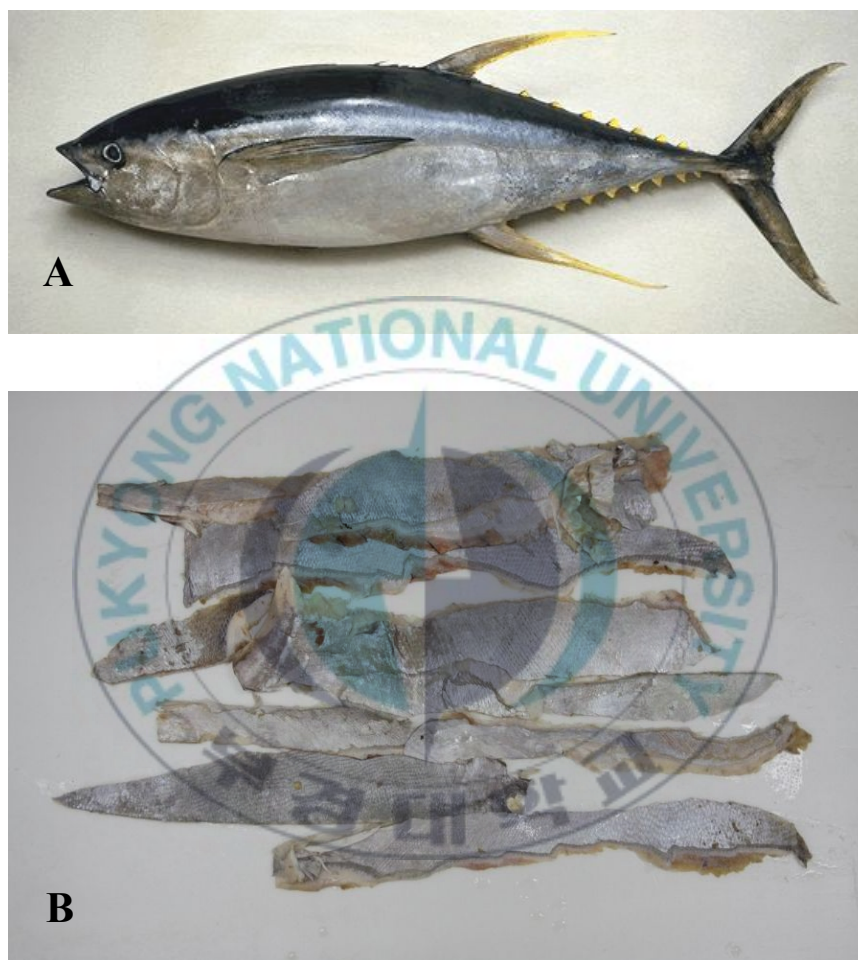


Fig. 1. Photograph of *Thunnus albacares* (A) and abdominal skin (B).

(5A 110 mm, Advantec, Japan)를 이용하여 감압 여과한 후, 여과된 gelatin 추출용액은 진공 농축기를 이용하여 60°C에서 10 brix로 농축한 다음 60°C에서 24 시간 열풍건조기 (WFO-601SD, EYELA, Japan)를 이용하여 건조한 후 이를 분말로 분쇄한 후 물리화학적 특성을 분석하기 위한 시료로 이용하였다 (Fig. 2).

2.2. Collagen의 제조

황다랑어 복부 껍질을 수세 후 마쇄하고 사용 전까지 -18°C의 동결 상태로 보관하였다. 해동된 시료 껍질에서 비 collagen 단백질의 제거 및 조직을 팽윤시키기 위해 5배 (v/w)의 0.5, 0.7, 0.9 1.1 및 1.3% 농도의 알칼리용액 (NaOH)으로 12-36시간 동안 6시간 간격으로 shaking incubator (HB-201SF, Hanbaek Scientific Co., Korea)를 이용하여 9°C, 200 rpm의 조건으로 교반하였다. 알칼리 (NaOH) 처리 후 NaOH 제거를 위해 교반기를 이용하여 수세 및 중화를 하였다. 효소 가수분해는 원료 대비 20배 (v/w)의 펩신 (EC 3. 4. 23.1; 2080 U/mg protein, Sigma, USA)을 함유한 acetic acid (pH 2.0) 용액을 이용하여 1:6, 1:8, 1:10, 1:12 및 1:14 (ratios)의 농도로 shaking incubator에서 9°C, 200 rpm의 조건으로 12, 18, 24, 30, 및 36 hrs 동안 교반하여 가수분해 시켰다. 효소 가수분해를 마친 시료는 여과포를 이용하여 추출액과 잔사를 분리하였다. 추출액은 NaCl의 최종농도가 5%가 되게 20% NaCl 용액을 이용하여 염석을 하였다. 염석 후 저온에서 원료 대비 10배 (v/w)의 증류수를 이용하여 10,000×g로 3-4회 원심분리를 하여 중화 및 수세를 하였다. 원심분리한 시료는 collagen의 열변성을 막기 위해 동결건조를 한 후 실험에 이용하였다 (Fig. 3).

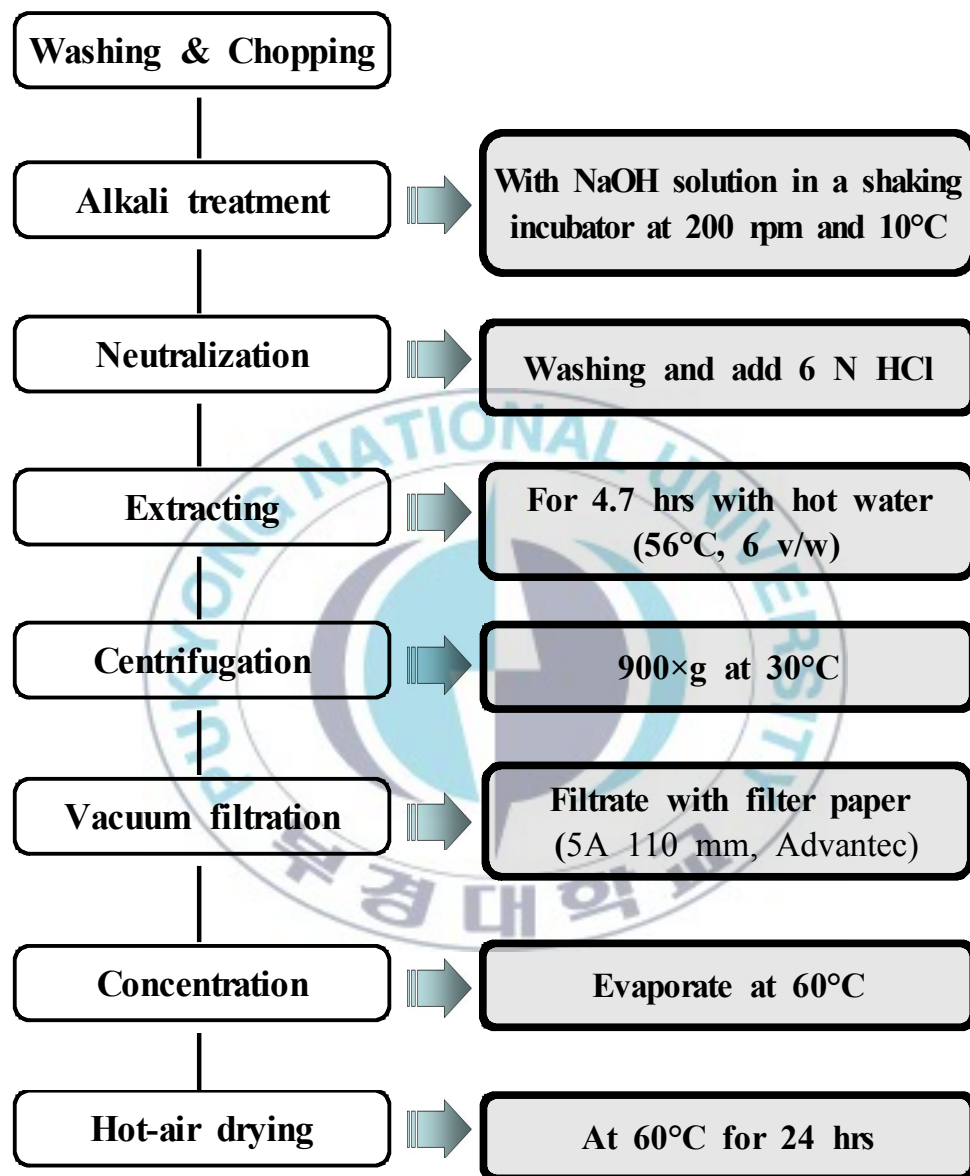


Fig. 2. Flow chart for preparation of gelatin from the abdominal skin of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*).

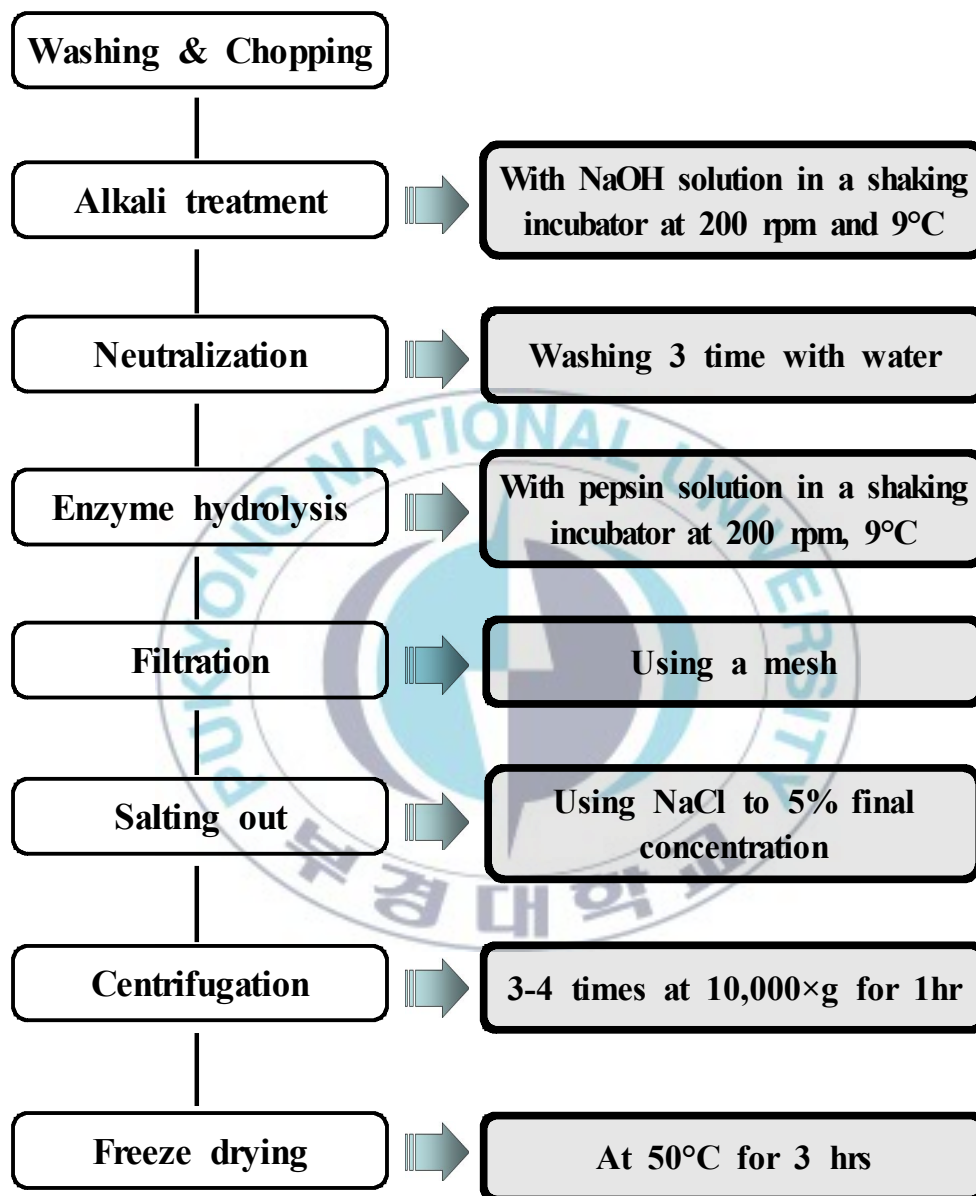


Fig. 3. Flow chart for collagen processing from the abdominal skin of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*).

2.3. Gelatin 및 collagen의 정량

Gelatin 및 collagen의 함량은 Sato et al. (1991)의 방법에 따라 분석하였으며, hydroxyproline을 정량한 다음 환산계수 (conversion factor) 11.42를 곱한 값으로 하였다.

Hydroxyproline의 함량은 ISO (1978)의 방법을 약간 수정한 방법으로 정량하였다. 건조된 분말시료 100 mg을 test tube에 담고 6 N HCl 5 mL를 넣어 dry bath에서 12시간동안 산가수분해시킨다. 가수분해가 완료된 시료용액은 6 N NaOH를 이용하여 중화시킨 후, 2 mL의 acetate/citrate buffer를 혼합하고 0.3 M NaCl용액으로 25 mL로 정용한다. 7% (w/v) chloramide T (the sodium salt of p-toluene sulfonchloramide) 와 acetate/citrate buffer를 1:4 비율로 혼합한 산화제용액(oxidant solution)을 준비하고, 정제된 test tube에 시료용액 (300 μ L), isopropanol (300 μ L) 그리고 산화제용액 (600 μ L)을 혼합하여 상온에서 4분간 방치한다. Ehrlich's reagent solution (4 mL)을 각각의 tube에 첨가하여 진탕 혼합한 후, 25분 동안 60°C에서 가열하고 용액의 흡광도를 spectrophotometer (UV-140-02, Shimadzu, Japan)를 이용하여 660 nm에서 측정하였다. Gelatin 및 collagen 시료의 hydroxyproline 함량은 Sigma Chemical Co.사로부터 구입한 hydroxyproline을 이용하여 측정된 표준검량곡선으로부터 계산하였다 (Fig. 4).

2.4. pH 측정

Gelatin의 pH는 Leach & Eastoe (1977)과 Choi & Regenstien (2000)의 방법에 의해 측정하였다. 0.1 mg의 gelatin을 60°C의 조건에서 10 mL의 증류수에 녹인 gelatin 용액을 pH meter (Accument model 15, Fisher Scientific Co., U.S.A.)를 이용하여 25°C에서 측정하였다.

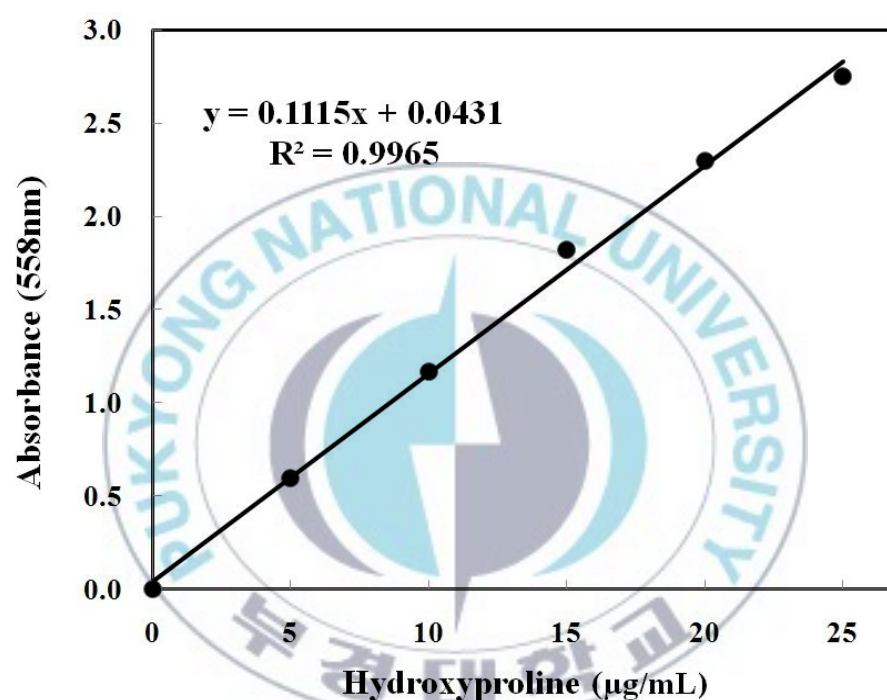


Fig. 4. Calibration curve for the determination of hydroxyproline content.

2.5. 아미노산 분석

건조된 분말시료 5 mg을 6 N HCl 용액 3 mL에 녹이고 vacuum-sealed glass tubes를 이용하여 110°C에서 24 hrs 동안 dry bath (Dry bath incubator 11-718-2, Fisher Scientific Co., U.S.A.)에서 산가수분해시켰다. 산가수분해 후, 분해액을 진공·건조하였으며 건조된 시료를 pH 2.2의 citric acid buffer (Sigma Chemical Co.)에 녹여 아미노산 자동분석기 (Amino acid analyzer S-433H, Sycam, Germany)를 이용하여 측정하였다.

2.6. SDS-PAGE 전기영동

SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)는 Laemmli (1970)의 방법에 의해 Mini-Protein 3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. Polyacrylamide gel의 농도는 4%의 stacking gel과 5%의 resolving gel을 이용하였으며, gelatin 시료와 대조군인 우피 (bovine skin)로부터 추출한 type I collagen은 5 mg/mL의 농도로 60°C에서 증류수에 녹여 시료용액으로 사용하였다. 준비된 gelatin 용액을 5% 2-mercaptoethanol, 10% SDS, 20% glycerol과 0.1%의 bromophenol blue가 함유된 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 6.8)와 섞어 90°C에서 5분동안 가열하였다. 가열처리된 시료용액은 각각의 gel에 로딩하여 slab gel에서 25 mA/gel의 조건으로 전기영동하였다. 단백질 bands의 염색은 0.25% (w/v) coomassie brilliant blue R250을 이용하여 2시간동안 실시하였다. 우피 skin으로부터 추출한 type I collagen이 α -chains, β - 와 γ - component의 maker로 사용되어졌다.

2.7. 겔 강도의 측정

겔 강도 (gel strength)측정은 AOAC (AOAC, 948.21, 2005)의 방법으로 측정하였으며, rheometer (Compac-100, Sun Scientific Co. LTD., Japan)를 이용

하였다. 6.67% (w/v) gelatin을 60°C에서 30분 동안 증류수에 완전히 녹인 상태로 17시간 동안 7°C에서 저온저장한 후 겔 강도를 측정하여 Bloom 값으로 표현하였다. 겔 강도측정은 다음의 조건에서 이루어졌다. Plunger는 12.7 mm diameter이고 penetration depth는 4 mm이었으며 penetration speed는 2 cm/min이었다.

2.8. 점탄성 분석

Gelatin의 점탄성 (viscoelastic properties)은 rheometer (Rheostress 1 RS30, HAAKE Co., Ltd., Germany)의 원통형 점도계 (concentric cylinder geometry)를 이용하여 측정하였다. 6.67% (w/v) 농도의 gelatin용액이 되도록 60°C에서 증류수에 녹인 후 frequency 1 Hz, oscillating applied stress 3 Pa, gap 4.2 mm 및 온도변화 속도 0.5°C/min의 조건에서 실험하였으며, 냉각 (Cooling)은 40°C에서 5°C까지, 가열은 5°C부터 40°C까지 측정하였다. 온도의 함수에 따른 elastic modulus (G' ; Pa), loss modulus (G'' ; Pa) 및 phase angle (rad)를 그래프로 나타내었다. 또한 시간의 영향을 알아보기 위해 점탄성을 1-3 시간까지 일정한 온도 (20°C 및 10°C)에서 측정하였다.

2.9. 겔 형성점 및 녹는점 분석

Gelatin의 겔 형성점 (gelling point)과 녹는점 (melting point)은 Gudmundsson (2002)의 방법에 의해 측정되었다. Gelatin의 겔 형성점 (gelling point)은 냉각과정에서 elastic modulus (G' , kPa)와 loss modulus (G'' , kPa)의 교점으로 부터 평가되었으며, 겔 녹는점 (melting point)은 가열과정에서 겔 형성점 (gelling point)과 같은 방법으로 측정하였다.

2.10. 실험 계획과 자료 분석

Collagen과 gelatin의 추출 및 제조조건을 최적화하기 위해 중심합성계획법 (central composite design (CCD), Box & Wilson, 1951)에 의해 실험 구간을 설정하였으며 (Table 1, Table 3), 반응표면회귀분석 (Edwards & Jutan, 1997)을 위해 SAS (statistical analysis system 8.01) program을 사용하였다. Collagen과 gelatin 모두 4종류의 독립변수가 선정되었으며, 각각의 독립변수를 5개의 범위로 정하여 실험 디자인이 되었다. 총 27개 구간에서 실험이 되었으며 (Chang et al., 2002; Cho et al., 2005), 실험계획 구성은 16개의 factorial points, 8개의 axial points ($\alpha = 2$) 그리고 중심값의 3회 반복으로 이루어져있다 (Table 2, Table 4).

Collagen의 제조공정은 두 개의 중요한 공정으로 나눌 수 있는데, 한 가지는 알칼리 (NaOH) 처리이고 다른 하나는 펩신 (pepsin)을 이용한 효소가수분해이다. 따라서 독립변수로는 NaOH의 농도 (N, X_1), NaOH 처리시간 (hrs, X_2), 펩신의 농도 (ratios, X_3)와 펩신 처리시간 (hrs, X_4)으로 정하였으며, gelatin의 추출공정의 독립변수 (independent variable)로는 NaOH의 농도 (X_1 , %), NaOH 처리시간 (X_2 , days), 열수추출온도 (X_3 , °C) 및 추출시간 (X_4 , hrs)으로 정하였다. 각각의 독립변수 ranges와 levels 를 식 (1)에 따라 5개의 구간으로 다르게 하여 나타내었다.

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (1)$$

x_i 는 독립변수의 부호값 (coded value)이며, X_i 는 독립변수의 실제 값이다. X_0 는 실제 독립변수의 중심값을 나타낸 것이며, ΔX_i 변화 범위를 나타낸 것이다. 종속변수로는 collagen의 경우 수율과 함량을 고려하였으나, 제조

Table 1. Experimental range and values of the independent variables in the central composite design for collagen processing from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin

Independent variables	Symbol	Range and levels				
		-2	-1	0	1	2
Concentration of NaOH (N)	X_1	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
Treatment time (hrs)	X_2	24	30	36	42	48
Additional ratio of pepsin (ratio)	X_3	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7
Hydrolysis time (hrs)	X_4	24	36	48	50	62

Table 2. Central composite design and responses of the dependent variables for collagen processing from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin to the independent variables

Run	Coded levels of variable				Response
No.	X_1	X_2	X_3	X_4	Y
1	-1	-1	-1	-1	21.6
2	-1	-1	-1	+1	21.3
3	-1	-1	+1	-1	20.7
4	-1	-1	+1	+1	20.0
5	-1	+1	-1	-1	22.1
6	-1	+1	-1	+1	22.4
7	-1	+1	+1	-1	21.5
8	-1	+1	+1	+1	20.1
9	+1	-1	-1	-1	23.3
10	+1	-1	-1	+1	23.6
11	+1	-1	+1	-1	23.9
12	+1	-1	+1	+1	21.7
13	+1	+1	-1	-1	22.1
14	+1	+1	-1	+1	23.2
15	+1	+1	+1	-1	21.2
16	+1	+1	+1	+1	21.7
17	-2	0	0	0	21.4
18	+2	0	0	0	21.2
19	0	-2	0	0	21.8
20	0	+2	0	0	20.3
21	0	0	-2	0	21.7
22	0	0	+2	0	21.8
23	0	0	0	-2	22.8
24	0	0	0	+2	22.8
25	0	0	0	0	33.1
26	0	0	0	0	32.9
27	0	0	0	0	33.2

X_1 , concentration of NaOH, %; X_2 , treatment time, hrs; X_3 , additional ratio of pepsin, ratio; X_4 , hydrolysis time, hrs.

Table 3. Experimental range and values of the independent process variables in the central composite design for gelatin processing from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin

Independent variables	Symbol	Range and levels				
		-2	-1	0	1	2
Concentration of NaOH (%)	X_1	1	1.5	2	2.5	3
Treatment time (days)	X_2	1	2	3	4	5
Extraction temperature (°C)	X_3	40	50	60	70	80
Extraction time (hrs)	X_4	1	3	5	7	9

Table 4. Central composite design and responses of the dependent variables for gelatin processing from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin to the independent variables

Run	Coded levels of variable				Response	
No.	X_1	X_2	X_3	X_4	Y_1	Y_2
1	-1	-1	-1	-1	248	85.7
2	-1	-1	-1	+1	258	84.6
3	-1	-1	+1	-1	216	83.3
4	-1	-1	+1	+1	119	82.4
5	-1	+1	-1	-1	209	86.1
6	-1	+1	-1	+1	219	85.2
7	-1	+1	+1	-1	169	83.1
8	-1	+1	+1	+1	104	83.7
9	+1	-1	-1	-1	187	85.3
10	+1	-1	-1	+1	199	84.3
11	+1	-1	+1	-1	153	82.7
12	+1	-1	+1	+1	94	81.5
13	+1	+1	-1	-1	143	85.3
14	+1	+1	-1	+1	154	84.1
15	+1	+1	+1	-1	109	82.5
16	+1	+1	+1	+1	94	81.3
17	-2	0	0	0	282	84.6
18	+2	0	0	0	162	82.9
19	0	-2	0	0	193	81.2
20	0	+2	0	0	122	81.0
21	0	0	-2	0	141	87.7
22	0	0	+2	0	113	81.8
23	0	0	0	-2	226	86.3
24	0	0	0	+2	179	84.0
25	0	0	0	0	398	90.3
26	0	0	0	0	400	90.5
27	0	0	0	0	394	90.1

X_1 , concentration of NaOH, % ; X_2 , treatment time, days; X_3 , extraction temperature, °C; X_4 , hydrolysis time, hrs.

조건에 따른 함량의 차이가 거의 나타나지 않았다. 따라서, 수율을 독립변수 ($Y, \%$)로 정하였으며 (Table 2), gelatin의 경우 겔 강도와 함량을 정하였다 (Table 4). 독립변수의 중심값과 그 범위는 예비실험의 결과를 토대로 정하였다 (Table 1, Table 3).

SAS system (Version 8.01, SAS Institute Inc., USA)의 RSREG procedure를 이용하여 반응표면분석 결과를 바탕으로 95%의 유의적 수준에서 적합한 반응표면 모델식 (response surface model)을 구하였다 (2).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

여기서 Y 는 종속변수로 collagen의 수율 (%), gelatin의 함량 (%) 및 겔 강도를 나타낸 것이며, β_0 는 상수, β_i , β_{ii} , β_{ij} regression coefficients 그리고 X_i , X_j 는 독립변수의 level을 나타낸 것이다. Response surface plots는 Maple software (Maple 7, Waterloo Maple Inc., Canada)를 이용하여 3차원 그래프로 나타내었으며, 두개의 독립변수들의 영향력을 나타낼 때에는 그래프에 나타나지 않은 다른 두개의 독립변수의 값을 최적조건으로 하였다.

2.11. 점도의 측정

점도 (viscosity)의 측정은 Kittiphattanabawon et al. (2005)의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. 0.1 M acetic acid 용액에 collagen을 0.03% 농도로 녹여 500 mL를 만든다. 점도의 측정은 Brookfield Synchrolectic viscometer (Model II+, Brookfield eng Labs Inc., Stoughton, MA, U.S.A)를 이용하였으며, spindle 번호 1, spindle 회전속도 100 rpm, 측정 온도 범위 15-50°C 및 온도 변화 속도 4°C/min의 조건에서 이루어졌다. 실험 전 collagen 용액을

4°C에서 30분간 유지한 뒤 실험을 하였으며, 실험은 3번 반복하여 측정 한 결과를 이용하였다. 측정값은 4°C에서의 점도값과 비교한 상대점도 (relative viscosity, %)로 표현하였다.

2.12. 변성온도 (T_d)의 측정

변성온도는 Kimura et al. (1988)의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. Collagen 용액의 점도를 20-50°C에서 2°C 간격으로 측정하여 알아보았다. 점도의 측정은 0.1 M의 acetic acid에 0.03% 농도로 녹인 collagen 용액 5 mL를 만들어 Ostwald-Fenske 점도계를 이용하였다. Collagen의 변성온도 (T_d)는 측정 한 값의 비율이 초기의 반이되는 지점으로 하였다.

2.13. FT-IR 분석

FT-IR (Fourier transform infrared) spectrophotometer (Brooker IFS 88, Germany)를 이용하여 600부터 4000 cm^{-1} 까지 2 cm^{-1} 의 data acquisition rate로 황다랑어 복부 껍질로부터 추출한 collagen과 육상동물인 우피 (calf skin) collagen의 특성을 알아보았다. Curve fitting은 peakfit software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 나타내었다.

2.14. 통계 처리

모든 실험은 3회 반복하여 행해졌으며, one-way analysis of variance에 의해서 검증하였으며, Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$)를 사용하여 유의수준 95% ($P<0.05$)에서 유의차 검증을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. Gelatin의 추출 최적화 및 기능 특성

1.1. Gelatin 추출의 최적화

1.1.1. Gelatin 추출의 통계적 해석

중심합성계획법에 의하여 독립변수 (independent variable)로는 NaOH 농도 (X_1 , %), NaOH 처리시간 (X_2 , days), 열수추출 온도 (X_3 , °C) 및 추출 시간 (X_4 , hrs)을, 종속변수 (dependent variable)로는 겔 강도 (Y_1 , Bloom) 및 gelatin 함량 (Y_2 , %)을 선택하여 최적 제조조건을 확립하였다. 겔 강도는 gelatin의 가장 대표적인 물리적 특성으로 gelatin의 품질을 좌우하는 요소이기 때문에, gelatin 함량은 순도를 알 수 있기 때문에 종속변수로서 선정되었다. 중심합성 계획법에 의한 실험 구간 및 범위를 Table 3에 나타내었다. NaOH의 농도의 구간은 1-3%까지 0.5%의 범위로 정하였으며, 처리시간은 1-5시간까지 한시간의 범위로 실험하였다. 추출온도는 40-80°C의 범위에서 10°C 구간에서 추출하였으며, 추출시간은 1-9시간의 범위에서 2시간의 간격을 두고 추출을 하였다.

이들 각각의 구간에 대한 독립변수의 조합과 이에 따른 종속변수의 반응결과의 값들을 Table 4에 나타내었다. 이러한 결과를 바탕으로 반응표면분석법 (response surface methodology)을 이용하여 gelatin 추출의 최적조건을 구하고 적합한 반응표면 모델식 (response surface model)을 구하였다 (Table 7). 모든 일차항 (X_1, X_2, X_3, X_4), 이차항 ($X_{11}, X_{22}, X_{33}, X_{44}$) 및 교차항에 관련된 모든 상수항의 유의성을 확인하기 위하여 t-statistic과 각각의 모델 추측계수를 Table 5와 6에 나타내었다. 모든 이차항은 높은 유의성 ($p < 0.01$)을 나타내었으나 Y_1 (gel strength, Bloom)의 X_3X_4 를 제외한 교차항에 대하여는

Table 5. Estimated coefficients of the fitted quadratic polynomial equation for the response of Y_1 (gel strength, Bloom) based on t -statistic

Parameter	Parameter estimate	Standard error	T - value	P - value
Intercept	397.3333	12.6076	31.52	0.0001
X_1	-27.0417	4.4575	-6.07	0.0001
X_2	-17.2917	4.4575	-3.88	0.0022
X_3	-25.6250	4.4575	-5.75	0.0001
X_4	-11.9583	4.4575	-2.68	0.0199
X_1X_1	-45.5104	4.7284	-9.63	0.0001
X_1X_2	0.4375	5.4592	0.08	0.9374
X_1X_3	5.8125	5.4592	1.06	0.3080
X_1X_4	5.6875	5.4592	1.04	0.3180
X_2X_2	-61.6354	4.7278	-13.04	0.0001
X_2X_3	3.8125	5.4592	0.70	0.4983
X_2X_4	4.6875	5.4592	0.86	0.4074
X_3X_3	-69.2604	4.7278	-14.65	0.0001
X_3X_4	-17.4375	5.4592	-3.19	0.0077
X_4X_4	-50.3854	5.7278	-10.66	0.0001

X_1 , concentration of NaOH, %; X_2 , treatment time, days; X_3 , extraction temperature, °C; X_4 , hydrolysis time, hrs.

Table 6. Estimated coefficients of the fitted quadratic polynomial equation for the response of Y_2 (gelatin content, %) based on t -statistic

Parameter	Parameter estimate	Standard error	T -value	P -value
Intercept	90.3000	0.1917	471.13	0.0001
X_1	-0.4375	0.0678	-6.46	0.0001
X_2	0.0458	0.0678	0.68	0.5116
X_3	-1.3292	0.0678	-19.61	0.0001
X_4	-0.4792	0.0678	-7.07	0.0001
X_1X_1	-1.6156	0.0719	-22.48	0.0001
X_1X_2	-0.1688	0.0830	-2.03	0.0648
X_1X_3	-0.1188	0.0830	-1.43	0.1780
X_1X_4	-0.1438	0.0830	-1.73	0.1089
X_2X_2	-2.2781	0.0719	-31.70	0.0001
X_2X_3	-0.0063	0.0830	-0.08	0.9412
X_2X_4	0.0938	0.0830	1.13	0.2807
X_3X_3	-1.3656	0.0719	-19.00	0.0001
X_3X_4	0.0938	0.0830	1.13	0.2807
X_4X_4	-1.2656	0.0719	-17.61	0.0001

X_1 , concentration of NaOH, %; X_2 , treatment time, days; X_3 , extraction temperature, °C; X_4 , hydrolysis time, hrs.

유의성 ($p > 0.05$)이 나타나지 않았다. 그리고, Y_2 (gelatin content, %)의 X_2 유의성이 인정되지 않았으며, 다른 1차항은 모두 유의성이 나타났다. 종속변수인 Y_1 및 Y_2 의 결정계수 (R^2)의 값이 모두 0.97 이상으로 매우 높게 나타났다. 또한 P -value가 0.01 보다 낮아 유의수준 99%에서 모델식이 유의성이 있는 것으로 나타났다. 이는 충분한 예비실험을 통하여 실험디자인이 체계적으로 이루어졌기 때문인 것으로 판단된다.

Analysis of variance (ANOVA)에 의해 모델식의 통계적 유의성 (statistical significance)을 평가하였다. 두 종속변수 겔 강도 (Y_1) 및 gelatin 함량 (Y_2)의 반응 모델을 ANOVA를 통해 Table 12와 13에 설명하였다. 두 종속변수 (Y_1 과 Y_2)에 모든 교차항은 95%의 수준에서 유의성 ($P = 0.1204$ 와 $P = 0.1102$)을 나타내지 않았으나, 일차항 (X_1, X_2, X_3, X_4), 이차항 ($X_{11}, X_{22}, X_{33}, X_{44}$) 그리고 모든 regression 모델은 99%의 높은 수준에서 유의성을 나타내었다.

1.1.2. Gelatin 추출의 최적화

두 종속변수 겔 강도 (Y_1) 및 gelatin 함량 (Y_2)에 대한 독립변수의 최적 조건 값을 Table 10에 나타내었다. 두 종속변수에 대한 최적조건의 값들이 거의 유사하여 gelatin의 최적 제조조건을 두 종속변수의 평균값으로 구하였다. 산출된 복부 껍질 gelatin의 최적화 조건은 NaOH 농도 (X_1) = 1.89%, NaOH 처리시간 (X_2)는 2.93 days, 열수추출 온도 (X_3)는 56.61°C, 열수추출 시간 (X_4)은 4.69 hrs 으로 나타났다. 독립변수의 최적 조건에서 예상되는 종속변수의 최대값은 겔 강도 (Y_1)는 406 Bloom, gelatin 함량 (Y_2)은 90.7%이었으며, 실제 실험을 하였을 경우 겔 강도 (Y_1)는 402 Bloom, gelatin 함량 (Y_2)은 90.6%로 예상되는 최대값과 큰 차이를 나타내지 않았다 (Table 11).

Table 7. Response surface model for processing conditions of gelatin from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin

Responses	Quadratic polynomial model	R^2	P -value
Gel strength (Bloom)	$Y_1 = 397.333 - 27.042X_1 - 17.292X_2 - 25.625X_3 - 11.958X_4 - 45.510X_1^2 - 61.635X_2^2 - 69.260X_3^2 - 50.385X_4^2 - 17.438X_3X_4$	0.9720	0.0001
Gelatin content (%)	$Y_2 = 90.300 - 0.438X_1 - 1.329X_3 - 0.479X_4 - 1.616X_1^2 - 2.278X_2^2 - 1.366X_3^2 - 1.265X_4^2$	0.9930	0.0001

X_1 , concentration of NaOH, % ; X_2 , treatment time, days; X_3 , extraction temperature, °C; X_4 , hydrolysis time, hrs.



Table 8. Analysis of variance (ANOVA) for response of the dependent variable (Y_1 , gel strength)

Sources	DF	SS	MS	F-value	P-value
Regression					
Linear	4	43,918.00	1,097.50	23.02	0.0001
Quadratic	4	148,269.00	37,067.25	77.73	0.0001
Cross-product	6	6,510.38	1,085.06	2.28	0.1063
Total model	14	198,697.00	14,192.64	29.76	0.0001
Residual					
Lack of fit	10	5,703.58	570.36	61.11	0.0162
Pure error	2	18.67	9.33	-	-
Total error	12	5,722.25	476.85	-	-
Total	26	204,419.25	14,669.49	-	-
Factors					
X_1	5	62,797.00	12,559.00	26.34	0.0001
X_2	5	88,807.00	17,761.00	37.25	0.0001
X_3	5	123,734.00	24,747.00	51.90	0.0001
X_4	5	63,325.00	12,665.00	26.56	0.0001

DF, Degrees of Freedom; SS, Sum of Square, MS, Mean Square; X_1 , concentration of NaOH, %; X_2 , treatment time, days; X_3 , extraction temperature, °C; X_4 , hydrolysis time, hrs

Table 9. Analysis of variance (ANOVA) for response of the dependent variable (Y_2 , gelatin content)

Sources	DF	SS	MS	F-value	P-value
Regression					
Linear	4	52.56	13.14	119.22	0.0001
Quadratic	4	133.47	33.37	302.76	0.0001
Cross-product	6	1.29	0.22	1.96	0.1519
Total model	14	187.32	46.73	121.40	0.0001
Residual					
Lack of fit	10	1.24	0.12	3.11	0.24
Pure error	2	0.08	0.04	-	-
Total error	12	1.32	0.11	-	-
Total	26	188.64	46.84	-	-
Factors					
X_1	5	61.29	12.26	111.23	0.0001
X_2	5	111.36	22.27	202.10	0.0001
X_3	5	82.55	16.51	149.81	0.0001
X_4	5	40.29	8.06	73.12	0.0001

DF, Degrees of Freedom; SS, Sum of Square, MS, Mean Square; X_1 , concentration of NaOH, %; X_2 , treatment time, days; X_3 , extraction temperature, °C; X_4 , hydrolysis time, hrs.

Table 10. Optimal conditions of gelatin processing from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin

Dependent variables	Independent variables	Critical value		Predicted value	Stationary point
		Coded	Uncoded		
Y ₁ (gel strength, Bloom)	X ₁	-0.317	1.84	406.0	Maximum
	X ₂	-0.151	2.85		
	X ₃	-0.188	58.12		
	X ₄	-0.111	4.78		
Y ₂ (gelatin content, %)	X ₁	-0.109	1.95	90.70	Maximum
	X ₂	0.011	3.01		
	X ₃	-0.489	55.11		
	X ₄	-0.201	4.60		
Average of Y ₁ and Y ₂	X ₁	-0.213	1.89	-	-
	X ₂	-0.070	2.93		
	X ₃	-0.339	56.61		
	X ₄	-0.156	4.69		

X₁, concentration of NaOH, %; X₂, treatment time, days; X₃, extraction temperature, °C; X₄, hydrolysis time, hrs.

Table 11. Experimental and predicted results of verification under optimized conditions

Dependent variables	Predicted value	Experimental value
Y_1 (gel strength, Bloom)	406.0	402.4±0.4
Y_2 (gelatin content, %)	90.7	90.6±0.1

Optimized conditions : 1.9% NaOH concentration, 2.9 days treatment time, 56°C extraction temperature, 4.7 hrs extraction time

Fig. 5와 6는 독립변수 (X_1, X_2, X_3, X_4)가 종속변수 (Y_1, Y_2)에 미치는 영향을 나타낸 것이다. Gelatin 추출 공정에는 알칼리 처리와 열수추출의 두 가지 중요한 공정을 필요로 한다. 알칼리 처리 시에는 X_1 (알칼리 농도)과 X_2 (처리 시간)가 주된 요인으로 작용하며, 열수추출시에는 X_3 (추출 온도)와 X_4 (추출 시간)가 주된 공정이다. 그러므로, response surface plot는 공정에서 독립변수의 상호 관계를 나타낸 것으로, 이때 다른 한 공정의 두 독립변수를 최적조건으로 하여서 나타내었다.

Fig. 5의 A와 B는 겔 강도 (Y_1 , gel strength)에 대한 독립 변수의 영향을 나타낸 것이다. 4개의 독립 변수의 부호값 (coded value)이 0에 가까워질수록 겔 강도는 커지는 것으로 나타났다. 4개의 독립변수 중 X_3 (추출 온도)가 가장 크게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 겔 강도는 추출온도가 60°C에서 75°C로 올라갈 때 크게 감소하는데, 이는 높은 추출온도가 단백질의 분해원인이 되어 겔강도 및 겔화능에 영향을 미치기 때문인 것으로 여겨진다.

Gelatin 함량 (Y_2 , contents)에서 독립변수의 영향을 살펴보면, X_3 (추출 온도)의 부호값 (coded value)이 0 (60°C)에서 1.5 (75°C)로 올라갈 때 크게 감소하였다. 이는 60°C 이상의 높은 온도에서는 단백질이 저분자화 되기 때문인 것으로 보인다. 따라서 gelatin 추출 공정시 4개의 독립 변수를 모두 고려하였을 경우 X_3 (추출 온도)가 가장 중요한 인자인 것으로 여겨진다.

1.2. 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 기능 특성

1.2.1. 일반성분 및 pH

본 연구에 사용된 황다랑어 (*Thunnus albacares*) 복부 껍질 (abdominal skin)의 일반성분은 Table 12에 나타내었으며, gelatin의 전구체인 collagen의

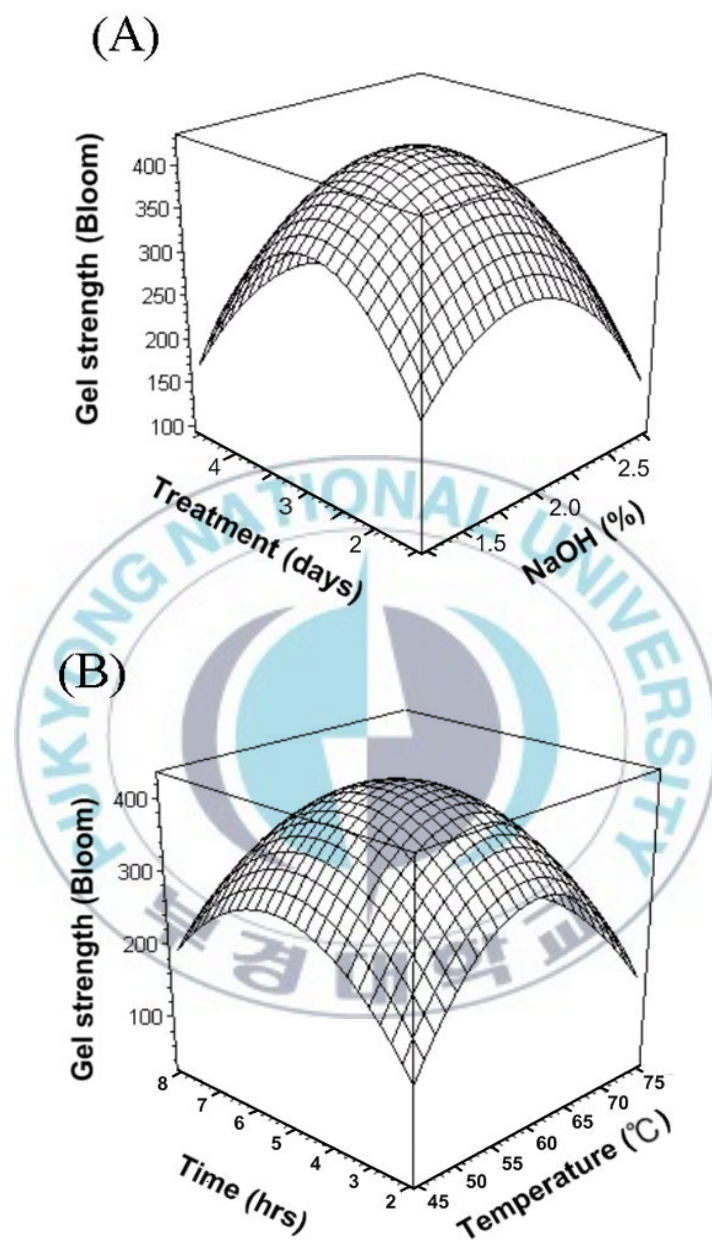
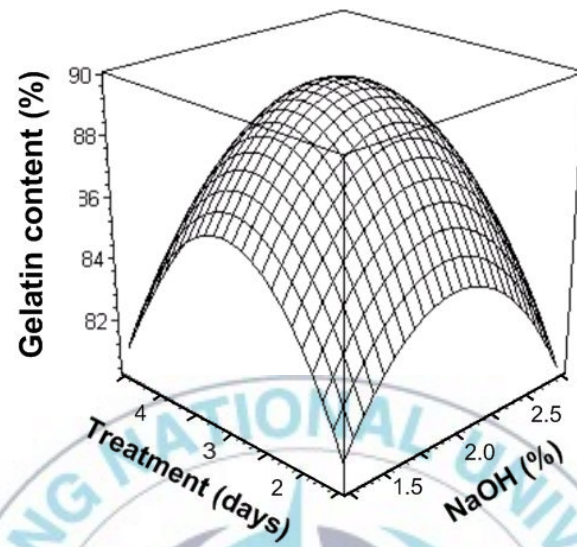


Fig. 5. Response surface plots for optimization of gelatin processing from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin.

(A)



(B)

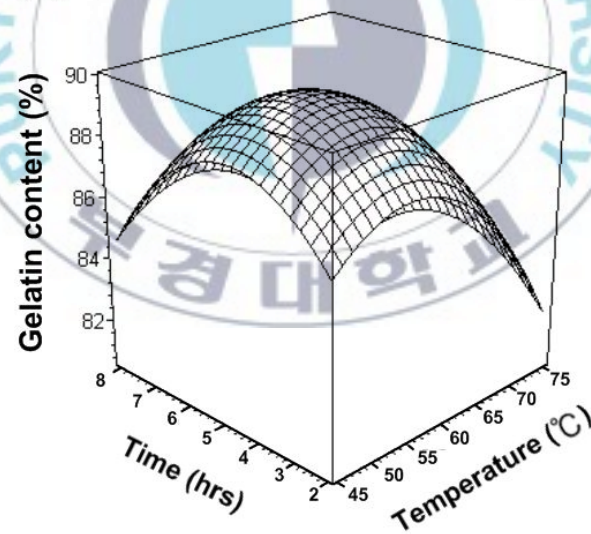


Fig. 6. Response surface plots optimization of gelatin processing from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin.

함량은 14%였다.

황다랑어 복부껍질 gelatin과 두 종류의 포유동물 gelatin의 일반성분과 pH를 비교하여 Table 13에 나타내었다. 황다랑어 복부껍질 gelatin의 수분 함량 (8%)은 우피 (bovine skin)와 돈피 (porcine skin) gelatin보다 낮게 나타났으나, 큰 차이를 보이지 않았다. 황다랑어, 우피 및 돈피의 조단백의 함량은 각각 90.4%, 90.6% 그리고 90.7%로 각각 나타났다. Gelatin의 미국 표준에 따르면, 식품 (gelatin, FCC, 1994)과 의약품 (gelatin, USP XXIII NF 18, 1994)의 최대 회분함량은 각각 3%와 2%이다. 황다랑어 복부껍질 gelatin의 회분함량은 0.83%로 이들 한계치보다 낮았다. Sigma사의 우피 gelatin (type B)의 pH 범위는 5.0-7.5, 돈피 gelatin (type A)의 pH 범위는 3.8-5.5로 명시되어 있으며, 본 연구에 나타난 우피와 돈피 gelatin의 실제 pH는 각각 5.9와 4.7이었으며, 황다랑어 복부껍질 gelatin의 pH는 7.3으로 나타났고 이는 우피 gelatin의 범위에 포함되어진다.

1.2.2. 아미노산 조성

황다랑어 복부껍질 gelatin의 아미노산 구성을 우피와 돈피 gelatin과 비교하여 Table 14에 나타내었다. 일반적으로 gelatin의 아미노산구성 및 배열은 glycine (Gly), proline (Pro) 및 hydroxyproline (Hyp)이 많은 양으로 구성되어 있으며, Gly-Pro-Hyp의 구조가 반복되는 특징을 가지고 있다. 이때 imino acid 인 proline과 hydroxyproline의 분자구조내 위치는 gelatin의 열적 안정성을 부여하므로 Gly-Pro-Hyp 구조의 총함량이 collagen의 열적 안정성에 영향을 미치는 주된 요인 중의 하나이다 (Burjandze, 2000; Ledward 1986). 또한 Ledward (1986)는 pyrrolidine 및 imino acid의 총함량이 gelatin의 안정성과 관련이 있다고 보고하였으며, Arnesen & Gildberg (2002)는 어류 (fish) gelatin은 육상 포유동물 유래 gelatin과 아미노산의 비율이 다르며, 이는

Table 12. Proximate composition of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin

Constituents	Contents (%)
	Abdominal skin of yellowfin tuna
Moisture	57.3
Crude lipid	6.9 (16.1) ^a
Crude ash	6.8 (0.7) ^a
Crude protein	33.7 (80.2) ^a
Collagen	14.8 (34.6) ^a

^a Numbers in parenthesis mean values on dry basis.

Table 13. Proximate composition and pH of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin, bovine and porcine skin gelatins

Constituents	Gelatin source		
	Yellowfin tuna	Bovine	Porcine
Moisture (%)	8.0±0.4	8.9±0.1	8.5±0.3
Crude lipid (%)	0.7±0.2	0.2±0.2	0.9±0.1
Crude ash (%)	0.2±0.3	0.9±0.2	0.5±0.2
Crude protein (%)	91.7±0.2	90.6±0.2	90.9±0.2
pH	7.3	5.9	4.7

Table 14. Amino acid composition of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin, bovine and porcine skin gelatins (%)

Amino acids	Gelatin source		
	Yellowfin tuna	Bovine	Porcine
Hydroxyproline	9.46	10.29	10.32
Aspartic acid	5.69	5.78	5.64
Threonine	3.35	1.67	1.79
Serine	3.97	3.41	3.34
Glutamic acid	11.07	10.41	10.45
Proline	13.47	15.47	15.82
Glycine	25.48	23.56	23.37
Alanine	11.14	8.92	8.97
Valine	2.29	2.23	2.29
Isoleucine	1.23	1.18	1.14
Leucine	2.76	2.88	2.85
Tyrosine	0.49	0.74	0.79
Phenylalanine	2.29	2.48	2.23
Histidine	1.23	1.27	1.24
Lysine	3.67	3.52	3.58
Arginine	9.14	7.83	7.94
Imino acids ^a	22.93	25.76	26.14

^a Imino acids mean proline and hydroxyproline.

포유동물과 다른 기능적 특성에 기인한다고 보고하였다. 일반적으로 포유동물 gelatin의 Gly 함량은 대략 24% 정도이고 어류 gelatin은 16~18%정도로 포유동물에 비해 그 함량이 낮게 나타난다 (Gilsenan & Ross-Murphy, 2000). 그러나 황다랑어 복부 껍질의 경우 25.48%로 우피 및 돈피의 gelatin보다 높게 나타났다. 따라서 황다랑어의 높은 Gly 함량이 높은 겔강도 형성에 영향을 미치는 것으로 여겨진다.

일반적으로 어류 gelatin은 포유동물 gelatin에 비해 낮은 imino acid (Pro + Hyp) 함량을 보인다. 우피와 돈피 gelatin은 imino acid 함량이 각각 25.76%와 26.14%로 나타났으며, 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 경우 22.93%로 다른 어류 gelatin처럼 그 함량이 낮았다 (Ledward, 1986; Norland, 1990; Giraud-Guille et al., 2000). Gilsenan & Ross-Murphy (2000)는 냉수성 어류는 Hyp 함량이 매우 낮으며 더불어 낮은 겔 형성점 및 녹는점 (gelling and melting point)을 가지는 것으로 보고하였다. 포유동물 gelatin의 경우에는 10% 농도로 상온 (20°C)에서 겔을 형성하는 반면, 대구 (cod) 같은 냉수성 어류의 경우 10% 농도로 2°C에 저장할 경우에 겔을 형성하는 것으로 보고하였다. 본 실험결과에 따르면 우피 및 돈피 gelatin은 20°C에서 겔이 형성되었으나, 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 경우 겔이 형성되지 않아 imino acid가 겔 형성점 및 녹는점에 주된 영향력을 미치는 요인으로 여겨진다.

또한, Gómez-Guillén et al. (2002)의 연구에 따르면, alanine은 비극성 아미노산으로 그 함량이 낮은 경우, gelatin의 겔 형성능력은 나빠지는 것으로 보고하였으며, lysine 또한 gelatin의 가교결합구조에서 chain을 형성하여 안정성에 영향을 주는 것으로 보고하였다. 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 alanine과 lysine 함량은 각각 11.14%, 3.67%로 우피나 돈피보다 높은 함량을 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 황다랑어 복부 껍질 gelatin이 높은 겔

강도를 가지는 것은 높은 함량의 glycine, alanine 그리고 lysine 때문인 것으로 볼 수 있다.

1.2.3. 전기영동 (SDS-PAGE) 특성

황다랑어 복부 껍질과 우피 및 돈피 gelatin의 단백질 분자량을 알아보고자 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였으며, 우피로부터 추출한 type I collagen과 비교하여 band의 패턴을 나타내었다 (Fig. 7). 일반적으로 gelatin의 전구체인 우피 및 어류 collagen은 α_1 -과 α_2 -chains (대략 2:1의 비율), β -component (α -chains의 crosslinked dimer) 및 γ -component (α -chains의 crosslinked trimer)로 이루어져 있다 (Giraud-Guille et al., 2000). Chang et al. (2000)의 보고에 따르면 α_1 -chain, α_2 -chain, β -component 및 γ -component의 분자량은 각각 93, 93, 186 및 279 kDa 정도이다.

본 연구에서도 type I collagen은 α_1 -chain, α_2 -chain, β -component 및 γ -component의 band 패턴을 나타내었고, 돈피 gelatin은 type I collagen과 비슷한 유형의 band 패턴을 나타내었지만 우피 gelatin은 β -component (α -chains의 crosslinked dimer) 및 γ -component (α -chains의 crosslinked trimer) 형태는 없는 것으로 나타났다. 반면 Sigma사의 bovine gelatin은 하나의 α -chain을 구성하고 있었는데, 이는 추출 공정상에서 121°C에서 15-20분 동안 멸균을 위한 가열공정 과정에서 분해되는 것으로 여겨진다. 그러므로 육상 동물 gelatin에 비해 상대적으로 높은 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 α_1 -chain, α_2 -chain, β -component 및 γ -component의 함량이 높은 겔 강도를 유도하는 중요한 요소인 것으로 판단된다.

1.2.4. Gel 강도 및 gel 강도의 변화

1.2.4.1. Gel 강도

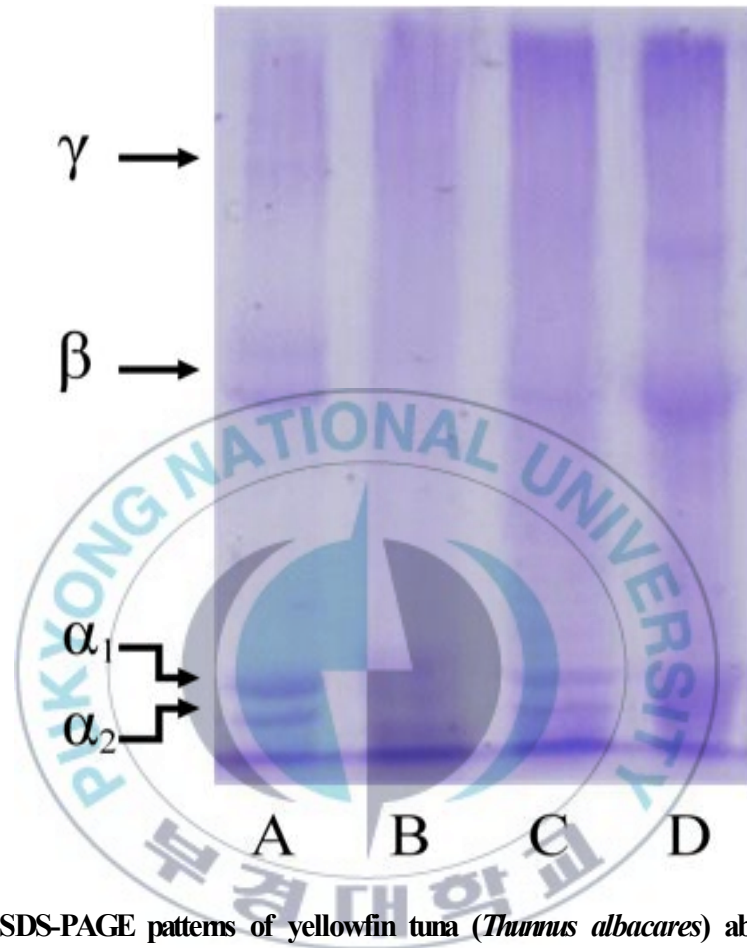


Fig. 7. SDS-PAGE patterns of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin, bovine and porcine skin gelatins. The 5 mg/mL of gelatin solution, 4% stacking gel and 5% resolving gel were used for electrophoretic analysis. In order to compare molecular weight of sample gelatins, bovine skin type I collagen was used as mobility makers of α -chains, β - and γ -components. A, type I collagen from bovine skin; B, bovine skin gelatin; C, porcine skin gelatin; D, yellowfin tuna skin gelatin.

Gelatin은 일반적으로 겔 형성제로 사용되기 때문에 겔 강도는 gelatin의 매우 중요한 물리적 성질 중의 하나이며, 일반적으로 어류 gelatin이 포유동물 gelatin에 비해 낮은 겔 강도를 가진다. 특히 gelatin의 물리적 성질에 collagen의 특성이 많은 영향을 미치는데, 이는 gelatin이 collagen으로부터 유래되기 때문이다. Gómez-Guillén et al. (2002)의 연구보고에 따르면 tilapia 같은 온대성 어류 (tropical-fish)는 gelatin 추출에 뛰어난 재료이며 대구 (cod)와 같은 냉수성 어류 (cold-water fish)의 gelatin은 좋지 않은 물성을 가지는 것으로 보고되었다 (Gudmundsson & Hafsteinsson, 1997).

황다랑어 복부 껍질로부터 추출한 gelatin의 겔 강도를 두 종의 육상포유동물의 gelatin과 비교하여 Table 15에 나타내었다. 우피와 돈피 gelatin의 겔 강도는 각각 216 Bloom, 295 Bloom으로 나타났으며, 제품에 표기된 겔 강도 (225 Bloom, 300 Bloom)와 비슷하게 나타났다. Choi & Regenstein (2000)에 의해 측정되어진 겔 강도에 따르면, 어류 gelatin은 돈피 gelatin (300 Bloom) 보다 낮은 겔 강도를 나타내었다. 본 연구에 따르면, 황다랑어 복부껍질 gelatin의 겔 강도는 402 Bloom으로 높은 겔 강도를 나타내었다. 더구나 gelatin 함량은 황다랑어 복부껍질 gelatin은 90.6%, 포유동물 gelatin은 우피 90.1%, 돈피 90.7%로 비슷한 함량을 나타내었다. 따라서 육상포유동물 gelatin에 비해 겔 형성이 낮은 온도에서 이루어지는 단점을 보완할 수 있는 연구가 이루어진다면 황다랑어 복부껍질은 높은 gelatin 함량 및 우수한 겔 강도를 갖는 우수한 gelatin 원료로 여겨진다.

1.2.4.2. 농도별 겔 강도의 변화

Gelatin의 농도가 겔 강도에 미치는 영향을 알아보기 위해 0.5~6.67% 구간에서 농도별 겔 강도를 측정하였으며, 우피 및 돈피 gelatin과 비교하였다. 7°C에서 17시간 동안 저장한 후 겔 강도를 측정하였다. 농도 변화에 따른

Table 15. Comparison with gel strength of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin, bovine and porcine skin gelatins

	Gelatin source		
	Yellowfin tuna	Bovine	Porcine
Gel strength (Bloom)	402±3.2	216±2.2	295±1.9
Gelatin content (%)	90.6±0.2	90.1±0.1	90.7±0.1

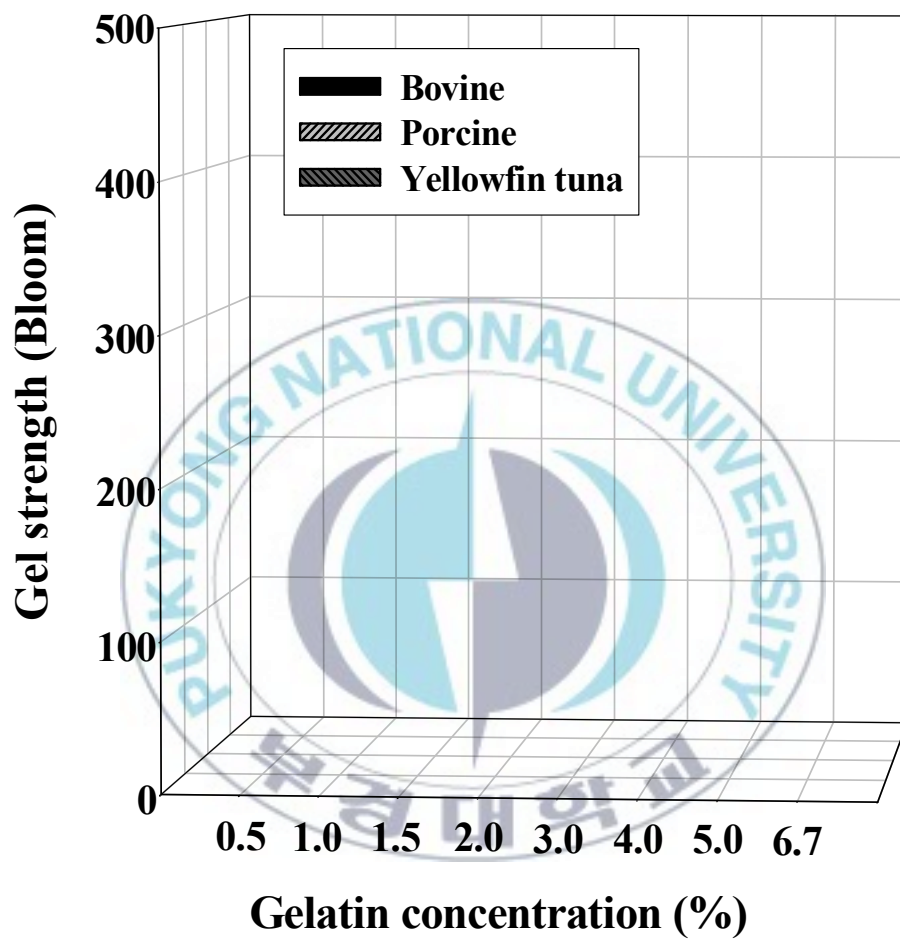


Fig. 8. Changes of gel strength as affected by the gelatin concentration. Gelatin solutions were prepared at 60°C, and gelatin gels were matured at 7°C for 17 hrs.

변화를 두 종류의 포유동물 gelatin과 비교하였으며 Fig. 8에 나타내었다.

우피와 돈피 gelatin은 농도 1%까지 rheometer를 이용하여 측정하기 힘들 정도로 매우 약한 겔을 형성하였으나 황다랑어 복부껍질 gelatin의 경우 약하지만 겔 강도를 나타내었으며, 모든 gelatin은 겔 농도가 1.5%이후부터 6.7%까지 꾸준히 겔 강도가 증가하였다.

1.2.4.3. 숙성 시간에 따른 겔 강도의 변화

Fig. 9에 숙성 시간에 따른 겔 강도의 변화를 우피와 돈피 gelatin을 비교하여 나타내었다. 숙성 시간별 겔 강도는 6.7% gelatin 농도에서 측정을 하였으며, 7°C에서 숙성하였다. 결과적으로 겔 강도는 시간이 증가할수록 증가하는 경향을 나타내었으며, 10-16 시간 사이에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 두 종류의 포유동물 gelatin은 숙성 시간이 6시간 이후부터는 거의 차이를 나타내지 않았으나 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 경우 10시간까지 겔 강도가 크게 증가한 것을 알 수 있었다. 특히, 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 경우 숙성 시간이 2시간 까지는 돈피 gelatin보다 낮은 겔 강도를 나타내는 것을 알 수 있었다. 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 elastic modulus (G')가 두 종류의 포유동물 유래 gelatin 보다 낮게 나타나는 것은 숙성 시간이 짧기 때문일 것이다.

1.2.4.4. 가열에 의한 겔 강도의 변화

식품의 보존이나 제조를 하기 위한 과정으로 재료 및 첨가물의 가열과 냉동 등의 복잡한 공정은 필수적인 요소라 할 수 있다. 가장 상업적인 gelatin의 제조는 고온에서의 살균 공정을 통해 생산되며, Sigma사의 우피 및 돈피 gelatin은 autoclave를 이용하여 121°C에서 15-20분간 살균처리하여 생산되고 있다.

가열에 따른 겔 강도의 변화를 측정하기 위해 6.7% 농도의 gelatin을 60°C에서 녹인 후 각각 다른 온도 (70-100°C)대에서 1-2시간 처리하여 겔 강도를 측정

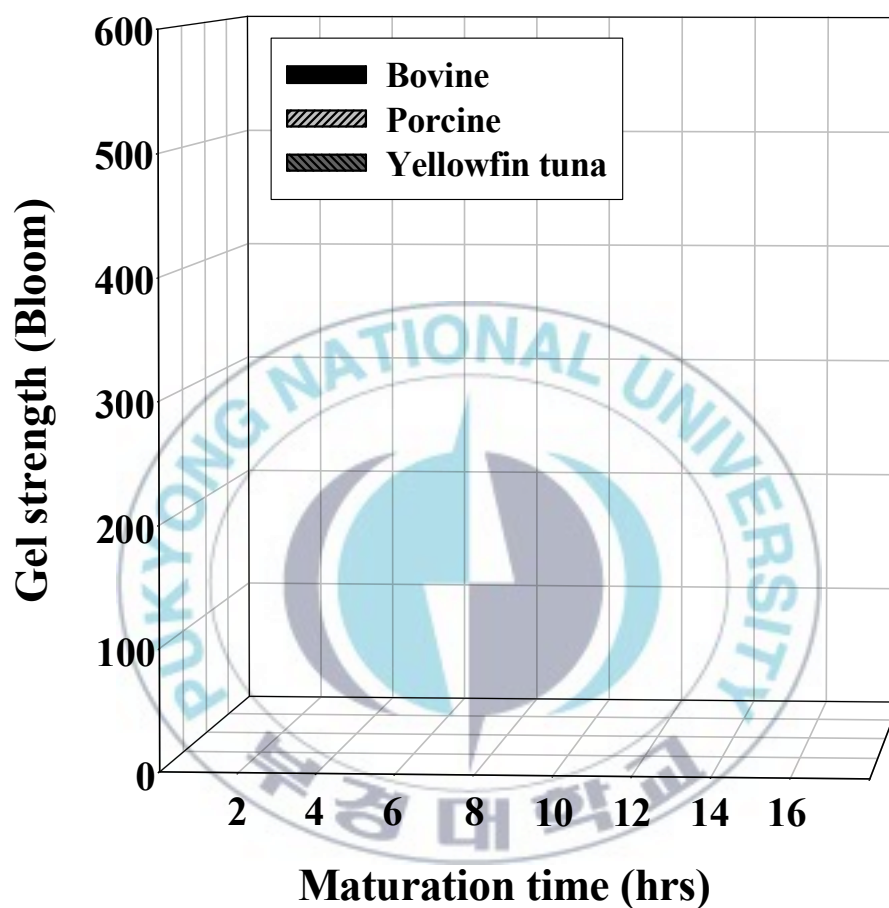


Fig. 9. Changes of the gel strength as affected by the maturation time. Gelatin solutions were prepared with 6.67% (w/v) concentration at 60°C, and gelatin gels were matured at 7°C for 2-16 hrs.

하였다. 가열처리 후 gelatin 용액을 7°C에서 17시간 숙성시켰으며, 이후 겔 강도를 측정 하였다. Fig. 10은 열처리에 따른 황다랑어 복부 껍질의 겔 강도의 변화를 육상 포유동물 gelatin과 비교하여 나타내었다. 70-100°C에서 1시간동안 처리하였을 때 황다랑어 복부 껍질 gelatin은 21%의 겔 강도 감소를 보여 우피 (12%)와 돈피 (13%)에 비교하여 높은 겔 강도 감소를 보여 우피 및 돈피의 gelatin과 비교하여 열 안정성이 약한 것으로 나타났다. 이들 포유동물 gelatin이 낮은 감소율을 보이는 것은 이미 121°C에서 15-20분간 가열이 되었기 때문인 것으로 여겨진다. 2시간의 가열처리 시에 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 겔 강도는 대략 30%가 감소하여 1시간 가열처리 시보다 그 감소가 더욱 확실하게 나타났다.

1.2.4.5. 동결에 따른 겔 강도의 변화

동결에 따른 겔 강도의 변화는 6.7% 농도의 gelatin용액을 60°C에서 녹여 -20°C에서 12시간 숙성시킨 후 측정하였다. 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 동결에 의한 겔 강도 변화를 우피와 돈피 gelatin과 비교하여 Fig. 11에 나타내었다. 동결 횟수가 증가함에 따라 모든 gelatin은 8-13%의 겔 강도의 감소율을 보였다. 특히 황다랑어 복부 껍질 gelatin과 돈피 gelatin은 대략 13%로 우피 gelatin의 8%보다 높은 감소율을 나타내었다.

1.2.5. 겔 형성점 및 녹는점

겔 형성점 (gelling point) 및 녹는점 (melting point)은 Gudmundsson (2002)의 방법에 의해 측정되었으며, 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 겔 형성점 및 녹는점을 포유동물 유래 gelatin과 비교하여 Table 16에 나타내었다. 우피와 돈피 gelatin의 겔 형성점은 23.8°C 및 25.6°C로 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 겔 형성점 18.8°C에 비하여 높은 겔 형성점 및 녹는점을 나타내

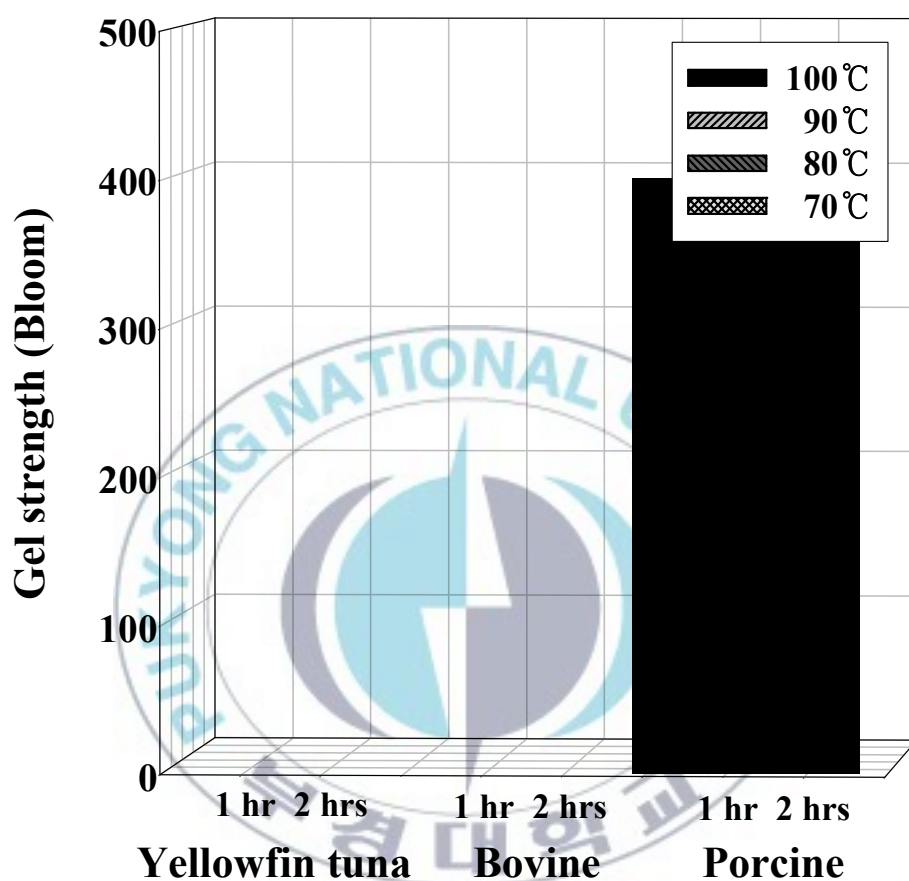


Fig. 10. Changes of gel strength as affected by heat treatment of 6.67% (w/v) gelatin solutions. Gelatin solutions were heated at 70-100°C for 1-2 hrs, and then, gelatin gels were matured at 7°C for 17 hrs.

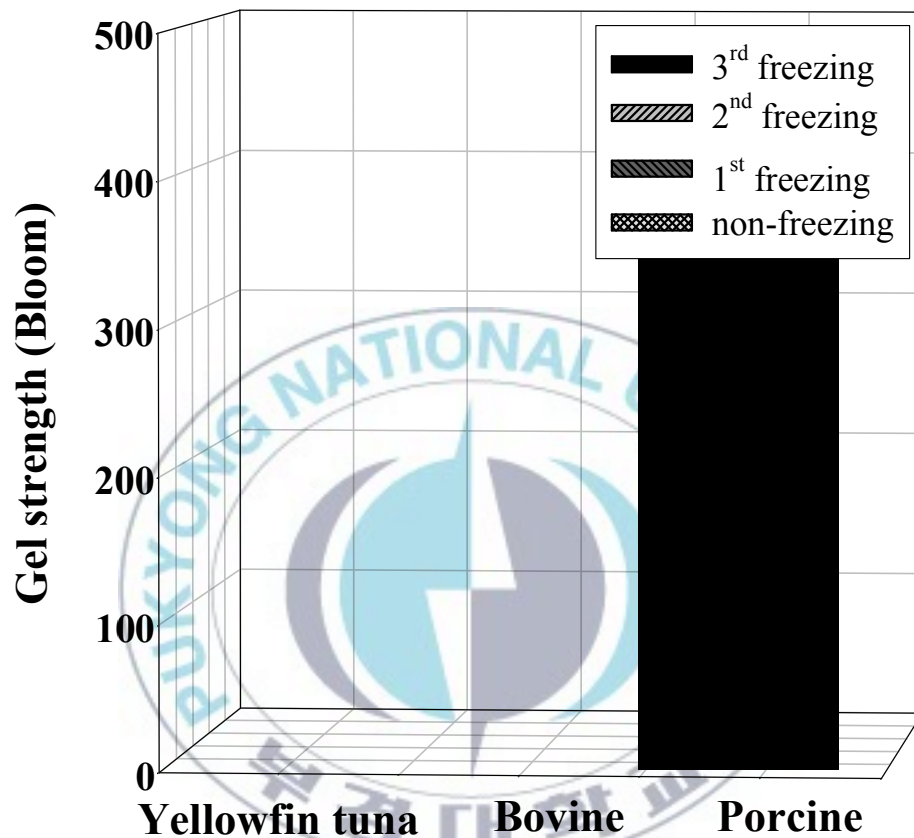


Fig. 11. Changes of gel strength as affected by freeze treatment of 6.67% (w/v) gelatin solution. Gelatin solutions were frozen at -20°C for 10 hrs, and then gelatin gels were matured at 7°C for 17 hrs. Freezing and measurement were repeated 3 times.

Table 16. Comparison with gelling (melting) point of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin, bovine and porcine skin gelatins

	Gelatin source		
	Yellowfin tuna	Bovine	Porcine
Gelling point (°C)	18.8	23.8	25.6
Melting point (°C)	24.0	33.8	36.5
Gelatin content (%)	90.6±0.2	90.1±0.1	90.7±0.1

었으며, 이는 이용범위가 넓어지는 것을 의미한다 (Gilsenan & Ross-Murphy, 2000; Choi & Regenstein, 2000; Gudmundsson, 2002). Gudmundsson (2002)의 연구에서 측정된 우피 및 돈피의 겔 형성점은 각각 22.6°C, 24.7°C로 본 연구의 결과와 비슷한 수준을 보였다. 반면에 녹는점의 경우는 우피 및 돈피가 각각 33.8°C, 36.5°C로 Gudmundsson의 연구 결과 (29.7°C 및 32.3°C)보다 높게 나타났다. 이는 본 연구에서의 가열속도가 0.5°C/min로 Gudmundsson의 0.1°C/min에 비해 높았기 때문인 것으로 여겨진다. 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 겔 형성점과 녹는점은 각각 18.8°C 및 24.0°C로 육상동물 gelatin에 비해 매우 낮게 나타났다. 이러한 경향은 다른 어류 유래 gelatin과 유사하며, 특히 온대성 어류인 tilapia와 비슷한 경향을 보이는 것으로 나타났다 (Gilsenan & Ross-Murphy, 2000; Gudmundsson, 2002). 어류 gelatin의 경우, 일반적으로 육상동물 gelatin에 비해 겔 형성점 및 녹는점이 낮는데, 이는 낮은 imino acid의 함량 때문인 것으로 판단된다 (Gilsenan & Ross-Murphy, 2000).

1.2.6. 점탄성 분석

점탄성 (viscoelastic parameter)은 냉각과정 (cooling, 40→5°C)과 가열과정 (heating, 5→40°C) 두개로 나뉘어 0.5°C/min의 속도로 온도변화를 주어 분석하였다. Fig. 12, Fig. 13 및 Fig. 14는 황다랑어 복부 껍질, 우피 및 돈피 gelatin의 elastic modulus (G' , kPa), loss modulus (G'' , kPa) 및 phase angle (rad)를 각각 나타내었다. Elastic modulus (G' , kPa)와 loss modulus (G'' , kPa)는 gelatin의 겔 형성능력을 나타내며, phase angle (rad)은 상변화를 나타낸다. 황다랑어 복부 껍질 gelatin은 가열·냉각과정 모두에서 elastic modulus (G')와 loss modulus (G'')는 두 종의 육상포유동물 gelatin보다 낮게 나타났다. 냉각과정 중 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 elastic modulus (G')는 10°C

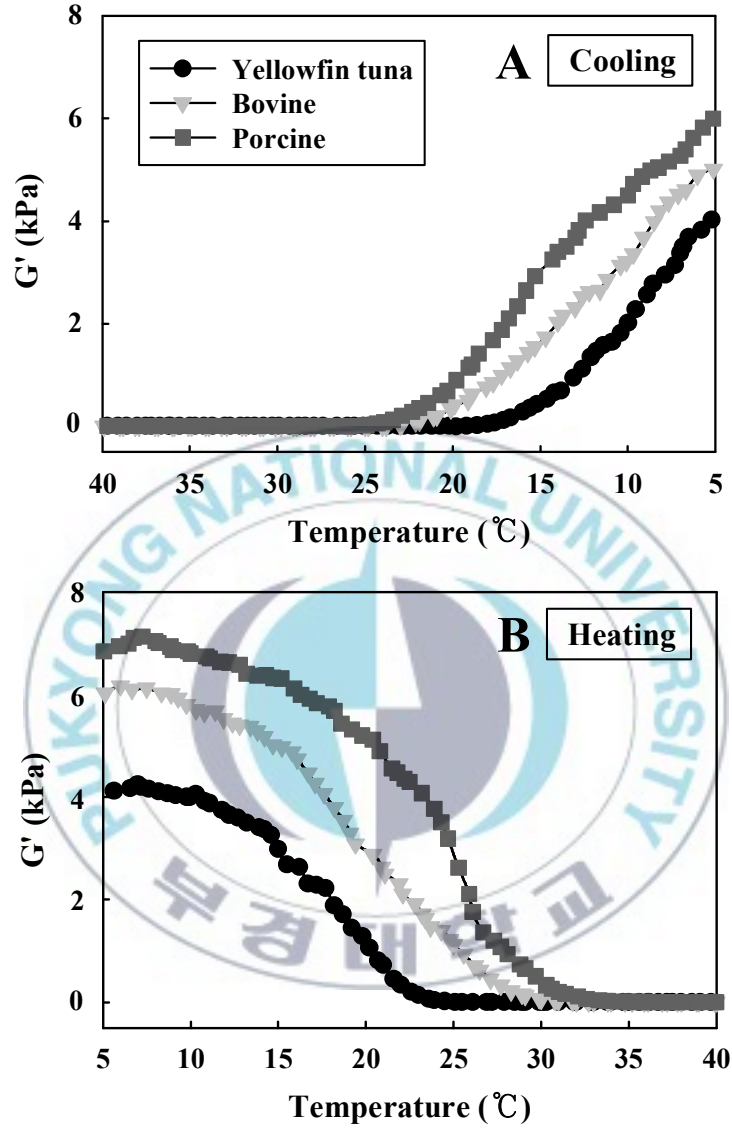


Fig. 12. Evolution of the elastic modulus (G' , kPa) during cooling (A: 40 $^{\circ}\text{C}$ -5 $^{\circ}\text{C}$) and heating (B: 5 $^{\circ}\text{C}$ -40 $^{\circ}\text{C}$) of gelatin solutions. A cooling and heating rate was 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and a 6.67% (w/v) gelatin solution was used.

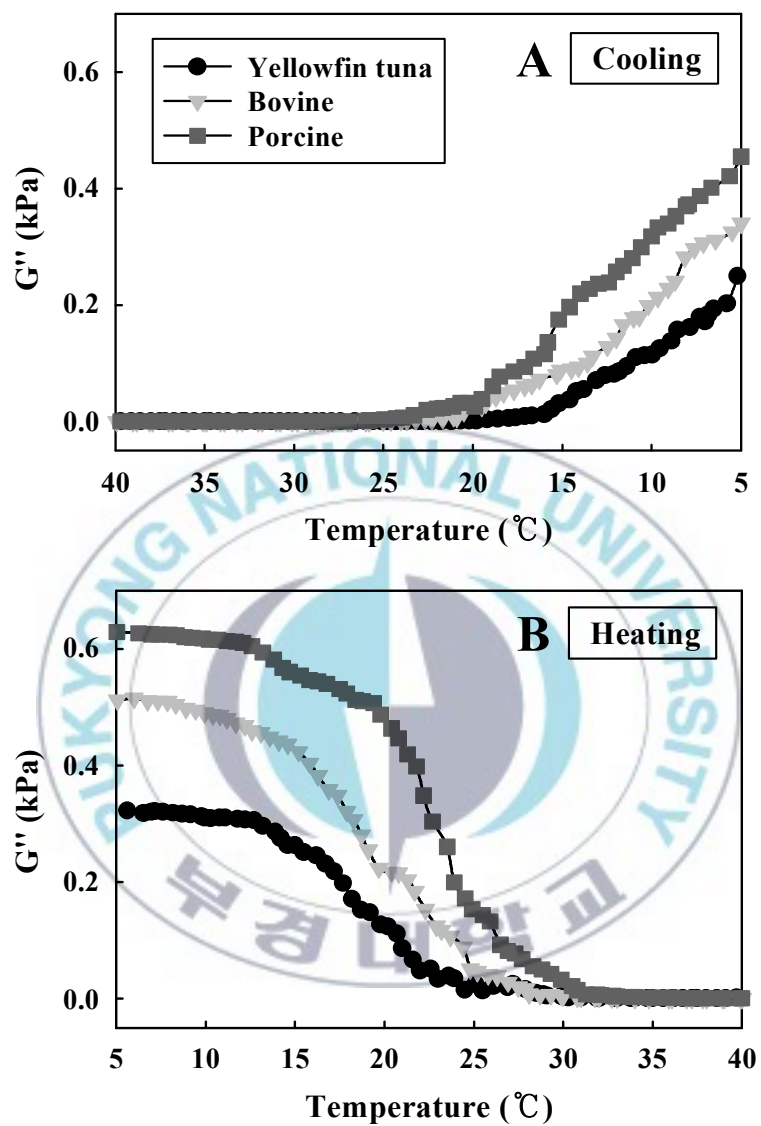


Fig. 13. Evolution of the loss modulus (G'' , kPa) during cooling (A : 40°C-5°C) and heating (B : 5°C-40°C) of gelatin solutions. A cooling and heating rate was 0.5°C/min, and a 6.67% (w/v) gelatin solution was used.

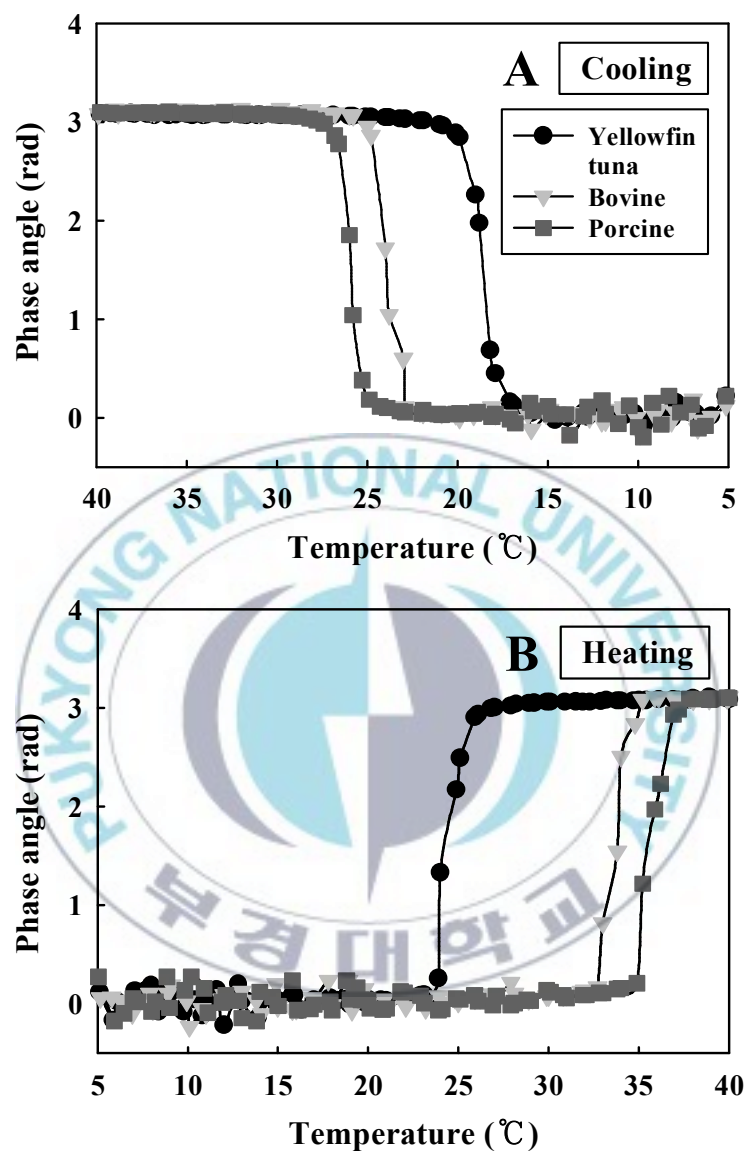


Fig. 14. Evolution of the phase angle (rad) during cooling (A: 40°C-5°C) and heating (B: 5°C-40°C) of gelatin solutions. A cooling and heating rate was 0.5°C/min, and a 6.67% (w/v) gelatin solution was used.

에서 5°C로 감소할 때 급격히 증가 하였으나 (Fig. 12 - A), loss modulus (G'')는 일정하게 증가하였다 (Fig. 13 - A). 모든 gelatin의 가열과정 중 elastic modulus (G')와 loss modulus (G'')는 냉각 (cooling) 과정이 가열 (heating) 시 보다 높게 나타났으며, 이는 가열과정 측정 전 5°C에서 안정화를 시켰기 때문으로 판단된다. 가열과정 중 elastic modulus (G')와 loss modulus (G'')는 육상포유동물 gelatin이 황다랑어 복부 껍질 gelatin보다 높게 나타났는데 (Fig. 12 - B 와 Fig. 13 - B), 이는 열안정성과 녹는점이 육상포유동물 gelatin이 높다는 것을 의미한다.

온도 (20 과 10°C)를 일정하게 하였을 경우, 점탄성의 특성을 Fig. 15에 나타내었다. 20°C에서 elastic modulus의 결과 우피와 돈피 gelatin만이 증가 하였으며, 황다랑어 복부 껍질에서는 증가하는 경향이 나타나지 않았다. 10°C 경우는 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 elastic modulus (G')도 증가하는 것으로 나타났으며, 돈피 gelatin의 증가 범위가 더욱 컸다. 결과적으로 황다랑어 복부 껍질 gelatin이 다른 두 종류의 육상동물에 비해 겔을 형성하기 위해서는 낮은 온도가 필요한 것으로 나타났다.

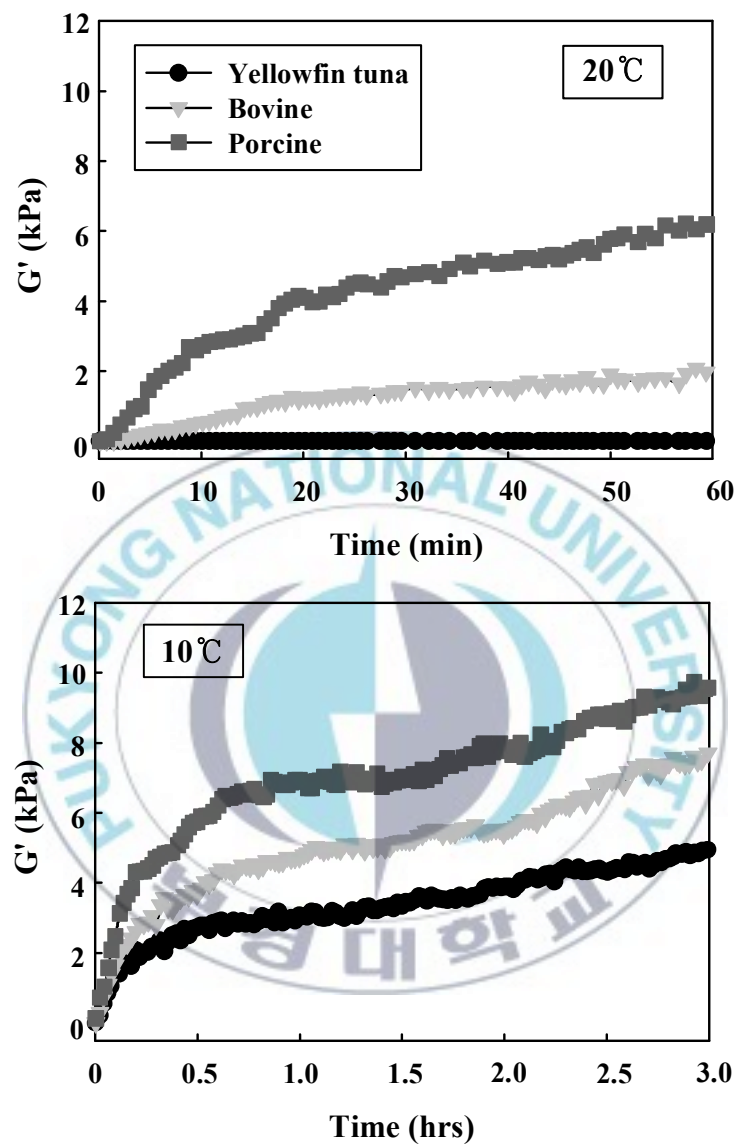


Fig. 15. Evolution of the elastic modulus (G' , kPa) as a function of time at constant temperature (20 and 10°C). A 6.67% (w/v) gelatin solution was used.

2. Collagen의 최적 제조조건 및 기능 특성

2.1. Collagen 제조의 최적화

2.1.1. Collagen 제조의 통계적 해석

전부 27개의 구간에서 실험이 행해졌으며, 각각의 구간에 따른 종속변수 (Y , %)를 Table 2에 나타내었다. 실험 결과 얻어진 data를 SAS software의 RSREG procedure를 이용하여 반응표면 분석하여 2차 다항식의 반응표면 모델식을 구하였다 (Table 18).

1차항 (X_1, X_2, X_3, X_4), 2차항 ($X_{11}, X_{22}, X_{33}, X_{44}$) 그리고 교차항과 관련되어있는 모든 상수항의 유의성을 확인하기 위하여 t-statistic과 각각의 모델 추측계수를 Table 17에 나타내었다. 1차항의 X_2 ($P = 0.2209$)와 X_3 ($P = 0.5306$)는 $P > 0.05$ 로 유의성을 나타내지 못한 반면에, X_1 ($P = 0.0146$), X_4 ($P = 0.0392$)는 $P < 0.05$ 의 수준에서 유의성을 나타냈다. 모든 2차항은 $P < 0.01$ 의 높은 level에서 유의성이 나타난 반면에, 모든 교차항은 $P > 0.05$ 로 유의성을 나타내지 못했다. 반응표면 모델식은 95% 수준에서 유의성이 인정되지 않은 8개의 단위를 제외하고 Table 18에 나타내었다.

Collagen의 독립변수의 결정계수 (R^2)는 0.9809이었고, $P = 0.0001$ 로 나타났다. 높은 결정계수 및 유의성이 나타난 것은 예비실험을 통해 중심값 및 범위를 정했기 때문인 것으로 여겨진다. Analysis of variance (ANOVA) 분석에 의해 2차 다항 모델 식의 통계적 유의성을 평가하였다. ANOVA 분석을 통해 종속변수에 따른 Y (yield,%)의 반응 모델의 유의성을 Table 19에 나타내었다. ANOVA 분석결과, 교차항 ($P = 0.2071$)을 제외한 1차항 ($X_1, X_2, X_3, X_4, P = 0.0298$)과 2차항 ($X_{11}, X_{22}, X_{33}, X_{44}, P < 0.0001$)은 95% 이상의 수준에서 유의성이 인정되었다. 그리고 회귀식은 $P < 0.01$ 로 99%의 높은 수준에서 유의성이 나타났으며, lack of fit의 결과로 종속변

Table 17. Estimated coefficients of the fitted quadratic polynomial equation for the response of Y (yield, %) based on t -statistic

Parameter	Parameter estimate	Standard error	T -value	P -value
Intercept	33.066667	0.438009	75.49	0.0001
X_1	0.441667	0.154860	2.85	0.0146
X_2	-0.200000	0.154860	-1.29	0.2209
X_3	-0.358333	0.154860	-2.31	0.0392
X_4	-0.100000	0.154860	-0.65	0.5306
X_1X_1	-2.912500	0.164253	-17.73	0.0001
X_1X_2	-0.425000	0.189663	-2.24	0.0447
X_1X_3	0.087500	0.189663	0.46	0.6528
X_1X_4	0.112500	0.189663	0.59	0.5641
X_2X_2	-2.975000	0.164253	-18.11	0.0001
X_2X_3	-0.112500	0.189663	-0.59	0.56641
X_2X_4	0.212500	0.189663	1.12	0.2845
X_3X_3	-2.800000	0.164253	-17.05	0.0001
X_3X_4	-0.325000	0.189663	-1.71	0.1123
X_4X_4	-2.537500	0.164253	-15.45	0.0001

X_1 , concentration of NaOH, % ; X_2 , treatment time, hrs; X_3 , additional ratio of pepsin, ratio; X_4 , hydrolysis time, hrs.

Table 18. Response surface model for processing conditions of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin.

Responses	Quadratic polynomial model	R^2	P-value
Collagen Yield (%)	$Y = 33.067 + 0.442X_1 - 0.358X_3 - 2.913X_1^2 - 0.425X_1X_2 - 2.975X_2^2 - 2.800X_3^2 - 2.538X_4^2$	0.9809	0.0001
X_1 , concentration of NaOH, %; X_2 , treatment time, hrs; X_3 , additional ratio of pepsin, ratio; X_4 , hydrolysis time, hrs.			

Table 19. Analysis of variance (ANOVA) for response of the dependent variable (Y , Contents, %)

Sources	DF	SS	MS	F-value	P-value
Regression					
Linear	4	8.963333	0.0248	3.89	0.0298
Quadratic	4	339.586667	0.9399	147.50	0.0001
Cross-product	6	5.830000	0.0161	1.69	0.2071
Total model	14	708.760000	0.9808	197.06	0.0001
Residual					
Lack of fit	10	6.860000	0.6860	29.40	0.0333
Pure error	2	0.046667	0.0233	-	-
Total error	12	6.906667	0.5755	-	-
Total	26	27.506668	1.2848	-	-
Factors					
X_1	5	188.86000	37.77200	65.63	<0.0001
X_2	5	193.58833	38.71767	67.27	<0.0001
X_3	5	172.35000	34.47000	59.89	<0.0001
X_4	5	140.21833	28.04367	48.72	<0.0001

DF, Degrees of Freedom; SS, Sum of Square; MS, Mean Square X_1 , concentration of NaOH, %; X_2 , treatment time, hrs; X_3 , additional ratio of pepsin, ratio; X_4 , hydrolysis time, hrs.

수 (Y)는 95%의 유의 수준에서 모델식의 유의성이 나타났다 (Table 19).

2.1.2. Collagen 제조의 최적화

황다랑어 복부껍질 collagen의 최적 제조조건을 밝히기 위해 중심합성 계획법 (CCD, Box, & Wilson, 1951)에 의해 중심값을 정하였다. NaOH의 농도 (0.9 N, X_1), NaOH의 처리시간 (24 hrs, X_2), 효소처리 농도 (1:10 ratios, X_3), 효소처리 시간 (24 hrs, X_4) 4개의 독립변수로 나타내었으며, 중심값 및 범위는 예비 실험을 통하여 정하였다 (Table 1).

반응표면분석 결과 나타난 최적 조건에서의 부호값 (coded value)과 실제 값 (uncoded value)을 Table 20에 나타내었다. SAS 프로그램의 RSREG procedure 결과에 의하면, 최적조건의 고유값 (eigen-value)들이 음수로서 정상점으로 최고치를 나타내었다. 황다랑어 복부 껍질을 이용한 collagen 제조 시 최적 조건일 때의 부호값은 $X_1 = 0.07$, $X_2 = -0.03$, $X_3 = -0.06$ 그리고 $X_4 = -0.01$ 로 나타났다. 즉 NaOH 처리 시 농도 (X_1)는 0.5 N, 처리시간 (X_2)은 36.2 hrs, 효소 처리 시 농도 (X_3)는 1:4.9 ratio (83%, w/v), 가수분해 시간 (X_4)은 48.1 hrs 일 때 최적 수율을 보이는 것으로 나타났다 (Table 20). 반응표면분석 결과 위의 조건에서 제조하였을 경우 예상되는 collagen의 수율 (Y , yield,%)은 33.09%로 나타났으며, 실제 제조한 결과는 32.3%로 예상치 보다 약 0.8% 낮게 나왔으나 큰 차이를 보이지 않았다 (Table 21).

Fig. 16는 독립변수 (X_1 , X_2 , X_3 , X_4)가 종속변수 (Y)에 미치는 영향을 Maple software (Maple 7. Waterloo Maple Inc., Canada)를 이용하여 3차원 그래프로 나타내었다. Collagen 제조 공정에 중요한 영향을 미치는 요인으로 크게 알칼리 처리와 효소 처리 두 가지로 여겨진다. 따라서 알칼리 처리에서는 NaOH의 농도 (X_1 , N), 처리시간 (X_2 , hrs)을 독립 변수로 정하였으며,

Table 20. Optimal conditions of collagen processing from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin

Dependent variable	Independent variable	Critical value		Predicted value	Stationary point
		coded	uncoded		
Y	X ₁	0.07	0.5	33.09	Maximum
	X ₂	-0.03	36.2		
	X ₃	-0.06	1:4.9		
	X ₄	-0.01	48.1		

X₁, concentration of NaOH, %; X₂, treatment time, hrs; X₃, additional ratio of pepsin, ratio; X₄, hydrolysis time, hrs.

Table 21. Experimental and predicted results of verification under optimized conditions

Dependent variables	Predicted value	Experimental value
Y (collagen content, %)	33.09	32.3±0.2

Optimized conditions : 0.5 N NaOH concentration, 36.2 hrs treatment time, 1:4.9 (83%, w/v) additional ratio of pepsin, 48.1 hrs extraction time

효소 처리 시에는 효소의 농도 (X_3 , ratios)와 처리시간 (X_4 , hrs)을 독립변수로 하였다. 그러므로 반응표면 그래프는 알칼리 처리과정의 농도와 처리시간의 상호관계와 효소 가수분해과정의 효소농도와 처리시간의 상호관계를 나타내었다 (Fig. 16). 두개의 반응표면 그래프는 모두 부호값이 0에 가까울수록 종속변수인 collagen 수율 (%)은 높아지는 것으로 나타났으며, 4개의 factor 중 X_1 (NaOH의 농도, N)이 가장 높은 영향력을 미치는 것으로 나타났다. X_3 (펩신의 농도, ratios) 또한 많은 영향을 미치는 것으로 나타났으나 부호값이 0에서 -2로 감소 할 경우 수율 (Y ,%)에 영향을 적게 미치는 것으로 나타났다. 이는 알칼리 농도 (X_1)를 적절히 조절하여 비 collagen 단백질을 제거 및 팽윤시키는 것이 collagen 제조를 위한 효소의 농도 (X_3)의 조절보다 큰 영향을 미치는 것으로 여겨진다. 따라서, collagen 제조 시 가장 중요한 요인으로 작용하는 것은 X_1 (NaOH의 농도, N)으로 나타났다.

2.2. 황다랑어 복부 껍질 collagen의 기능 특성

2.2.1. 아미노산의 조성

Collagen의 아미노산 구성은 Gly-Y-X 배열이 반복되어 있으며, 이들은 3중 나선구조를 이루고 있는데, Gly-X-Y가 Gly-Pro-Hyp일 때 hydroxylproline 잔기는 pyrrolidine ring의 hydroxyl group에 의해 collagen 3중 나선구조의 열안정성을 높여 준다 (Johnston-Banks, 1990). 또한 hydroxyproline의 함량은 collagen으로부터 유도되는 젤라틴의 중요한 기능적 특성인 유동성 (rheological properties)과 겔 강도 등에 중요한 영향을 미치며, 함량이 높을수록 좋은 특성을 가진다고 밝혀졌다 (Gilsenan & Ross-Murphy, 2000; Gómez-Guillén et al., 2002). 따라서 Imimo acid인 proline, hydroxyproline 잔기의 함량은 collagen에 있어서 매우 중요하다고 할 수 있다.

본 실험에 사용된 우피 (calf skin)와 황다랑어 복부 껍질 collagen의 아미

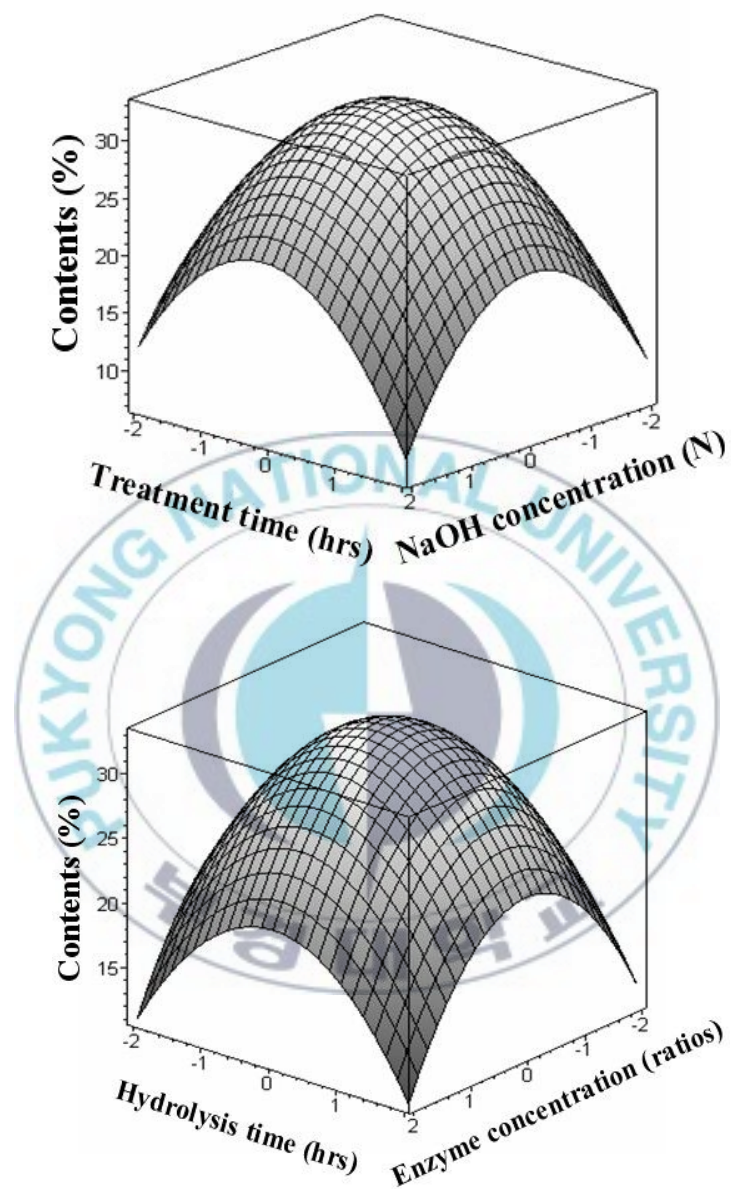


Fig. 16. Response surface plots for optimization of collagen extraction from abdominal skin of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*).

Table 22. Amino acid composition of collagens from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin and calf skin

Amino acids	Collagen Type	
	Yellowfin tuna (%)	Calf skin (%)
Hydroxyproline	8.8	9.9
Aspartic acid	6.0	6.8
Threonine	3.2	2.0
Serine	3.8	3.5
Glutamic acid	9.8	10.9
Proline	12.2	11.7
Glycine	25.3	24.1
Alanine	8.7	7.8
Valine	2.6	2.8
Isoleucine	1.0	1.7
Leucine	2.5	3.3
Tyrosine	0.3	0.6
Phenylalanine	2.1	2.4
Histidine	3.6	1.1
Lysine	1.5	4.0
Arginine	8.4	7.3
Cysteine	0.2	0.1
Imino acids ^a	21.0	21.6
Total	100.0	100.0

^{a)} Imino acids mean proline and hydroxyproline.

노산 분석결과를 Table 22에 나타내었다.

우피 (calf skin)와 황다랑어 복부 껍질 collagen의 glycine (Gly)잔기 함량은 각각 24.1%, 25.3%로 가장 높게 나타났다. Hydroxyproline 함량은 우피 (calf skin) collagen의 경우 9.9%로 나타났으며, 황다랑어 복부 껍질 collagen의 경우는 8.8%로 우피 (calf skin) collagen이 높은 함량을 나타내었다. Proline 잔기는 우피 (calf skin) collagen과 황다랑어 복부 껍질 collagen이 각각 11.7%와 12.2%로 황다랑어 복부 껍질 collagen의 함량이 조금 높게 나타났다. 우피 (calf skin)와 황다랑어 복부 껍질 collagen의 imino acid인 hydroxyproline과 proline의 함량은 각각 21.6%, 21.0%로 육상동물 유래 collagen 보다 낮게 나타나, 다른 수산 생물 유래 collagen과 같은 경향을 나타내었다 (Jongjareonrak et al., 2005; Ikoma et al., 2003).

2.2.2. 전기영동 (SDS-PAGE) 특성

SDS-PAGE를 통해 본 연구에서 제조한 황다랑어 복부 껍질 collagen (B)과 우피 (calf skin) collagen (A)의 전기영동 패턴을 Fig. 17에 비교하여 나타내었다.

우피 (calf skin)으로부터 제조한 collagen은 type I 으로서 두개의 α -chain (α_1 -과 α_2 -, 2:1의 비율), β -component 및 γ -component로 구성되어 있다 (Giraud-guille et al., 2000). 반면 본 연구에서 제조한 황다랑어 복부 껍질 collagen 역시 marker protein으로 이용된 우피 (calf skin) collagen과 같은 유형으로 두개의 α -chain (α_1 -과 α_2 -)과 β - 및 γ -components가 나타났다.

다른 수산 가공 부산물을 이용하여 제조한 collagen의 전기영동 패턴을 살펴보면, 고등어 (mackerel) collagen은 하나의 α -band를 형성했으며, 팽이 상어 (bulhead shark) 및 농어 (Japanese sea-bass)는 두 개의 α -band를 형성

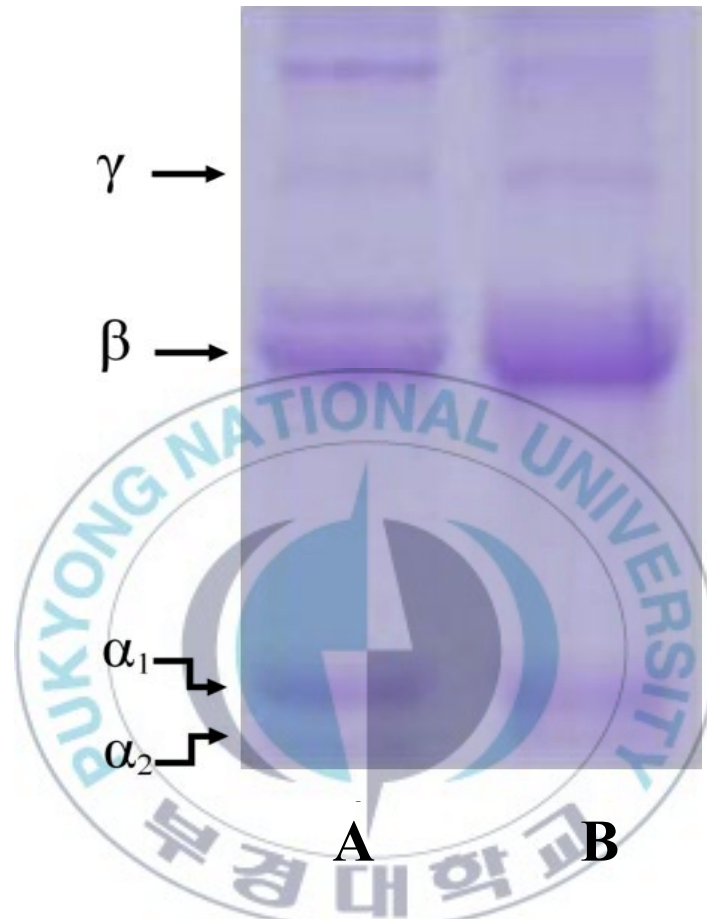


Fig. 17. SDS-PAGE patterns of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal and calf skin. The 5.0 mg/mL of sample solution, 4% stacking gel and 5% resolving gel were used for electrophoretic analysis. Calf skin type I collagen was used as mobility makers of α -chains, β and γ -components. A, type I collagen from calf skin; B, collagen from abdominal skin of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*).

했으나 α -band가 희미하게 나타났다 (Nagai & Suzuki, 2000). 그러나 Muyonga et al. (2004a)의 Nile perch에 대한 연구에 의하면 황다랑어 복부 껍질 gelatin과 마찬가지로 α -chain (α_1 과 α_2)과 β - 및 γ - components를 나타내기도 하였다.

2.2.3. FT-IR 스펙트럼 특성

황다랑어 복부 껍질 collagen과 우피 (calf skin) collagen과의 FT-IR (Fourier transform infrared) spectra를 Fig. 18에 나타내었다. Spectrum에서 나타난 amide A, I, II 및 III의 영역은 polypeptide의 형태와 직접적으로 연관이 있으며, amide B 영역의 peak는 CH₂의 stretching vibration을 나타낸다. Amide A 영역 (3200-3600 cm⁻¹)의 peak band는 N-H stretching vibration과 관련이 있다. Amide I 영역 (1600-1800 cm⁻¹)의 peak band는 peptide의 carbonyl group의 stretching vibrations와 관련이 있으며, 단백질의 2차 구조를 알아보는 데 가장 유용하게 이용된다. 또한 amide II 영역 (1300-1600 cm⁻¹)의 peak band는 N-H bending 및 C-N stretching과 관련이 있으며, amide III (600-1300 cm⁻¹)영역의 최대 peak band는 C-N stretching과 N-H에 의해서 나타나며, collagen의 3중 나선구조와 관련이 있다 (Muyonga et al., 2004b; Jakobsen et al., 1983). Muyonga et al. (2004b)의 연구에 따르면, 치어 Nile perch의 껍질 collagen의 경우 각각의 amide 영역 (A, I, II 및 III)은 3434, 1650, 1542와 1235 cm⁻¹에서 최대 peak가 나타났으며, 성어 Nile perch 껍질 collagen의 amide 영역은 각각 3458, 1654, 1555와 1238 cm⁻¹에서 각각의 peak가 나타났다. 본 연구에서 우피 (calf skin)와 황다랑어 복부 껍질 collagen의 amide A, I, II 및 III 영역의 최대 peak band는 각각 3433 cm⁻¹, 3437 cm⁻¹ (amide A), 1659 cm⁻¹, 1661 cm⁻¹ (amide I), 1549 cm⁻¹, 1550 cm⁻¹ (amide II) 그리고 1240 cm⁻¹, 1236 cm⁻¹ (amide III)로 비슷한 파장에서 peak band

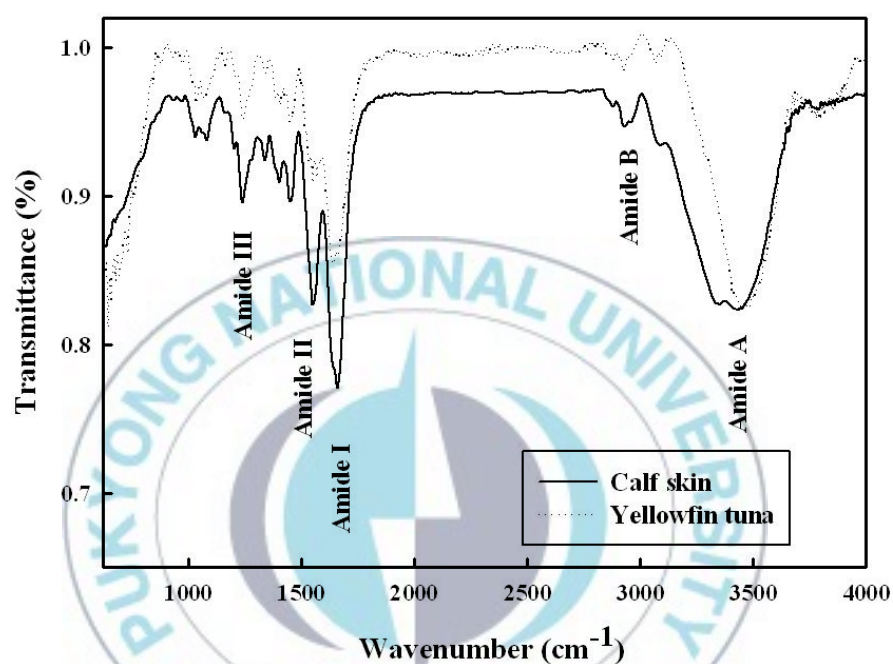


Fig. 18. FT-IR spectra of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin and calf skin. The Region was amide A ($3200\text{--}3600\text{cm}^{-1}$), amide B ($2500\text{--}3200\text{cm}^{-1}$), amide I ($1600\text{--}1800\text{cm}^{-1}$), amide II ($3200\text{--}3600\text{cm}^{-1}$) and amide III ($3200\text{--}3600\text{cm}^{-1}$).

를 나타내었다 (Fig. 18).

2.2.4. Collagen의 점도 특성

0.03% (w/v) 농도의 황다랑어 복부 껍질 collagen을 0.1 M 농도의 acetic acid 용액에 녹여 점도 (viscosity)를 측정하였다 (Fig. 19). Collagen 용액의 점도는 32°C에 이르기까지 연속적으로 감소하는 경향을 나타내었으나, 33-50°C의 범위에서는 감소율이 낮았다. 고온의 열처리에서는 collagen의 구조 중에서 수소 결합이 절단되고 (Wong, 1989), 열처리에 따른 collagen의 변성은 점도변화를 일으킨다 (Nagai et al., 1999; Nagai & Suzuki, 2000; Nagai & Suzuki, 2002). Kittiphattanabawon et al. (2005)의 보고에 따르면, bigeye snapper의 뼈 (bone)와 어피 (skin)로부터 collagen을 제조하여 용액의 점도를 측정한 결과 30°C에 이르기까지 일정하게 감소하였으며, 35-50°C의 범위에서는 감소율이 낮아지는 것으로 나타났다. 이는 본 연구의 황다랑어 복부 껍질 collagen의 점도 변화율과 비슷한 경향을 나타내었다.

2.2.5. Collagen의 변성온도 (T_d)의 특성

황다랑어 복부 껍질 collagen과 우피 (calf skin) collagen의 변성온도 (T_d)를 측정하여 Fig. 20에 나타내었다. Collagen의 열안정성은 collagen을 산업적으로 응용할 경우 중요한 특성이라 할 수 있다. 이는 열안정성에 관여하는 imino acid (proline + hydroxyproline) 함량과도 깊은 관련이 있다. 어류 collagen의 변성온도를 알아보면 연어류 (chum salmon) 19.4°C, 꽁치류 (saury) 23.0°C, 고등어류 (common mackerel) 26.9°C, 팽이상어 (bullhead shark) 25°C, 농어 (Japanese seabass) 30°C 그리고 가다랑어 (skipjack) 29.7°C로 보고되었다 (Nagai & Suzuki, 2000, Kimura et al., 1988).

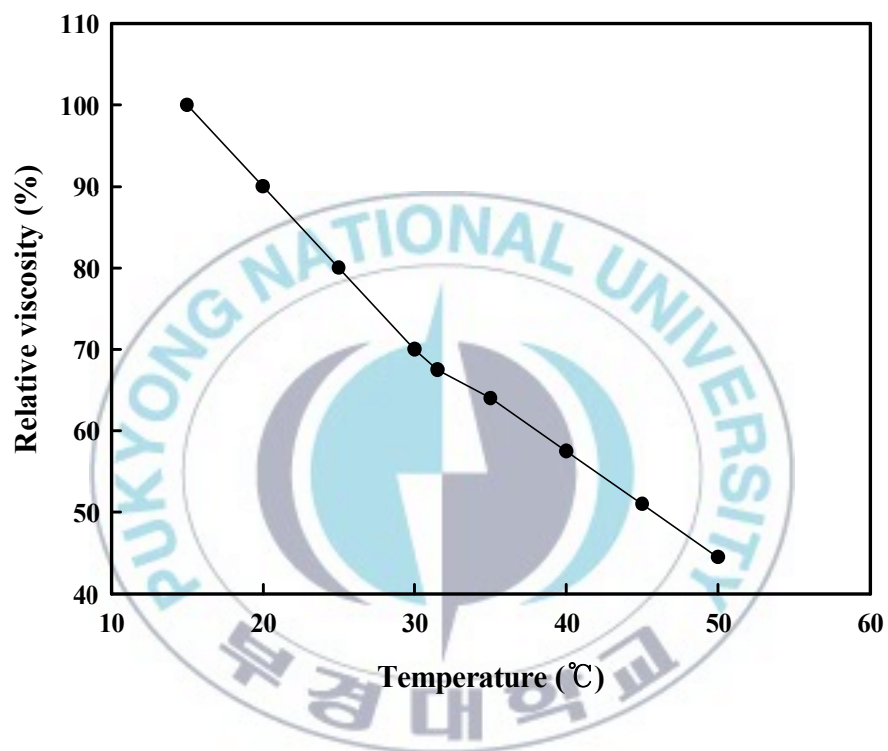


Fig. 19. Relative viscosity at different temperatures of the collagen solution of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin.

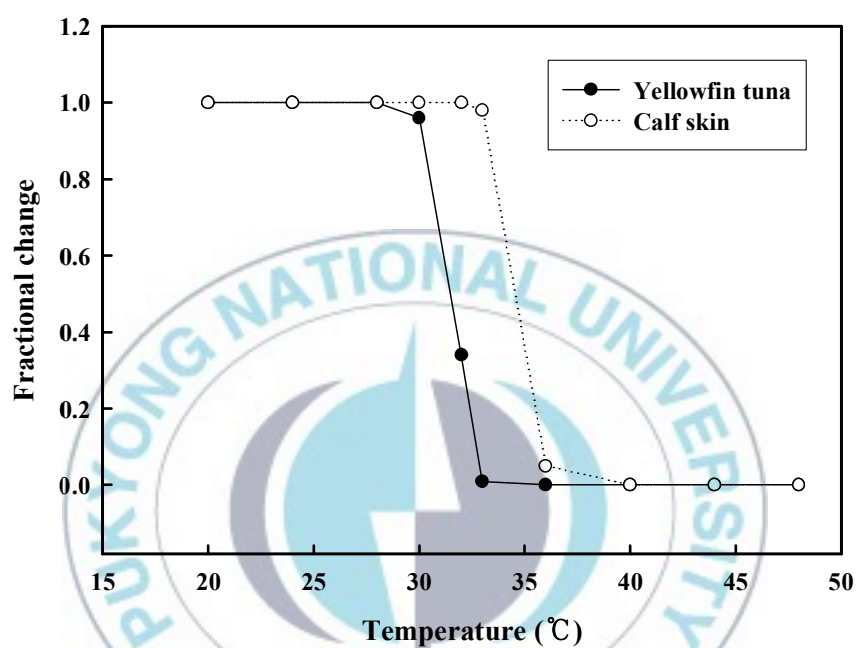


Fig. 20. Thermal denaturation curves determined by measuring the viscosities of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin and calf skin collagen solutions in 0.1 M acetic acid. The incubation time at each temperature was 4 hrs and collagen concentration was 0.06% .

본 연구에 사용된 황다랑어 복부 껍질 collagen의 변성온도는 31°C로 나타났다. Kimura et al. (1988)의 보고에 따르면, 우피 (calf skin)의 변성온도는 35°C로 황다랑어 복부 껍질 collagen의 변성온도가 4°C 가량 낮게 나타났다. 이는 황다랑어와 우피 (calf skin) collagen의 아미노산 분석 시 나타난 imino acid의 함량 (21.0%, 21.6%)과 비례하는 결과로 나타났다. 이처럼 일반적으로 어류 유래 collagen의 변성온도는 육상동물 유래의 collagen보다 낮게 나타난다. 또한, 황다랑어 collagen의 변성온도도 육상동물 collagen의 변성온도 (35°C) 보다 낮은 것으로 나타났다 (Nagai & Suzuki, 2002).



요 약

Collagen 과 gelatin은 대부분 소나 돼지의 가죽, 뼈 그리고 동물성 부산물을 이용하여 생산되어져 왔으며, 현재 식품, 건강보조식품, 화장품, 의약품 등 다양한 분야에서 사용되고 있다. 그러나 광우병 및 구제역 등으로 인하여 원료 사용에 제약을 받고 있다

본 연구에서는 미이용 자원으로서 대형어류의 부산물이며 위생적 생산이 가능한 황다랑어 (yellowfin tuna) 복부 껍질로부터 고기능성 단백질인 collagen과 gelatin을 추출 및 제조하기 위한 최적 조건을 구하고, 최적 조건에서 제조한 gelatin과 collagen을 시판되는 포유동물 gelatin (bovine gelatin, porcine gelatin) 및 collagen (calf skin collagen)의 성질과 비교·해석하여 식품 및 의약품으로서의 이용가능성을 살펴보았다.

1. 황다랑어 복부 껍질로부터 gelatin 제조의 최적조건을 구하기 위하여 중심합성계획법에 따라 4가지 독립변수 (independent variable)를 선정하고 겔 강도 (Y_1 , Bloom) 및 gelatin 함량 (Y_2 , %)을 종속변수 (dependent variable)로 선정하여 반응표면분석을 실시한 결과, 4가지 독립변수의 최적 제조조건은 NaOH 농도 (X_1) 1.89%, NaOH 처리시간 (X_2) 2.93 일, 열수추출 온도 (X_3) 56.61°C, 열수추출 시간 (X_4) 4.69 시간으로 나타났다.
2. 산출된 황다랑어 복부 껍질 gelatin 제조의 최적화 조건에서 예상되는 종속변수의 최대값은 겔 강도 (Y_1) 406 Bloom, gelatin 함량 (Y_2) 90.6%이며, 산출된 최적조건에서 실제 실험결과는 겔 강도 (Y_1) 402 Bloom, gelatin 함량 (Y_2) 90.6%로 예상되는 최대값과 실제값과는 큰 차이점이 없었다.

3. 본 실험을 통해 제조된 gelatin의 품질을 파악하기 위하여 원료인 황다랑어 복부 껍질의 일반성분을 측정한 결과는 수분 57.3%, 조단백 33.7%, 조지방 6.9%, 조회분 6.8%이었으며, gelatin의 전구체인 collagen의 함량은 14%인 것으로 나타났다. 최적조건에서 제조된 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 일반성분 및 pH를 측정한 결과는 수분 8.0%, 조단백 91.7%, 조지방 0.7%, 조회분 0.2%인 것으로 나타났다. Gelatin의 미국 표준규격에 의하면, 식품 (Gelatin, FCC, 1994)과 의약품 (Gelatin, USP XXIII NF 18, 1994)의 최대 회분함량은 각각 3%와 2%이므로, 황다랑어 복부껍질 gelatin의 회분함량 (0.83%)은 이들 한계치보다 낮았으며, 황다랑어 복부 껍질 gelatin은 pH는 7.3으로 우피 gelatin의 범위에 포함되어진다.
4. 본 실험을 통해 최적조건에서 제조된 황다랑어 복부 껍질 gelatin과 시판되는 육상 포유동물 gelatin인 우피 (bovine skin)와 돈피 (porcin skin)의 겔 강도는 각각 402 Bloom, 216 Bloom, 295 Bloom 인 것으로 나타났다. 일반적으로 어류 (fish)의 어피 (skin)에서 추출한 gelatin은 낮은 겔 강도를 나타내는데, 황다랑어 복부 껍질 gelatin은 우피 및 돈피 gelatin 보다 각각 2배, 1.4배의 강한 겔 강도를 나타내었다.
5. 황다랑어의 복부 껍질 gelatin의 강한 겔 강도의 원인과 gelatin의 특성을 분석하기 위해 아미노산 구성을 분석한 결과, 주요 아미노산의 구성은 glycine 25.48%, proline 13.47%, hydroxyproline 9.46%, alanine 11.14%, lysine 3.67% 등인 것으로 나타났다. 이와 비교하여 우피 gelatin의 아미노산 구성은 glycine 23.56%, proline 15.47%, hydroxyproline 10.29%, alanine 8.92%, lysine 3.52%로 , 돈피 gelatin의 아미노산 구성은 glycine 23.37%, proline 15.87%, hydroxyproline 10.32%, alanine 8.97%,

lysine 3.58%로 나타났다. Gelatin의 겔 강도 및 열적 안정성에 영향을 미치는 imino acid인 proline과 hydroxyproline의 함량은 포유동물 gelatin보다 황다랑어 복부 껍질 gelatin이 낮은 것으로 나타난 반면 glycine, alanine 및 lysine은 황다랑어 복부 껍질 gelatin이 높은 함량을 나타냈으므로 황다랑어 복부 껍질 gelatin이 높은 겔 강도를 가지는 것은 높은 함량의 glycine, alanine 그리고 lysine 때문인 것으로 판단된다.

6. 황다랑어 복부 껍질, 우피 및 돈피 gelatin의 단백질 분자량을 알아보고자 SDS-PAGE 분석을 하였다. 황다랑어 복부 껍질 gelatin 및 돈피 gelatin은 대조군인 우피 (calf skin)의 type I collagen과 비슷한 유형의 band 패턴을 나타내었으나 우피 gelatin은 β -component (α -chains의 crosslinked dimer) 및 γ -component (α -chains의 crosslinked trimer) 형태는 없는 것으로 나타났다.
7. 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 물리적 특성과 열안정성을 알아보기 위하여 농도, 숙성시간, 가열처리 및 동결처리에 따른 겔 강도의 변화를 살펴해보았다. Gelatin 농도별 (0.5~6.67%) 겔 강도의 변화는 우피와 돈피 gelatin의 경우 겔 농도가 1%일 때 까지 rheometer를 이용하여 측정하기 힘들 정도로 매우 약한 겔을 형성하였으나, 황다랑어 복부껍질 gelatin의 경우 겔 농도 1%에서도 겔 강도를 나타내었으며, 겔 농도가 1.5% 이후부터 6.7%까지 꾸준히 겔 강도가 증가하였다. 숙성시간별 겔 강도의 변화는 우피 및 돈피 gelatin은 숙성 6시간까지 겔 강도가 증가하였으나, 황다랑어 복부 껍질 gelatin은 10시간까지 증가하는 것으로 나타나 황다랑어 복부껍질 gelatin의 최고 겔 강도를 얻기 위해서는 오랜 숙성기간이 소요되었다. 가열에 의한 겔 강도 변화는 황다랑어 복부 껍질 gelatin이 21%의 겔 강도 감소를 나타내었고 우피 (12%)와 돈피 (13%)에 비교하여 겔 강도의 많

은 감소를 보여 두 종류의 포유동물 gelatin에 비해 열 안정성이 약한 것으로 나타났다. 동결에 따른 겔 강도변화는 동결 횟수가 증가함에 따라 황다랑어 복부 껍질 gelatin과 돈피 gelatin은 대략 13% 감소하여 우피 gelatin의 8%보다 높은 감소율을 나타내었다.

8. 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 겔 형성점과 녹는점은 각각 18.8°C 및 24.0°C로 우피와 돈피 gelatin의 겔 형성점인 23.8°C 및 25.6°C에 비해 매우 낮게 나타났으며, imino acid의 함량에 따라 겔 형성점과 녹는점이 비례하는 것을 알 수 있었다.
9. 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 겔 형성능력과 상변화를 알아보기 위하여 점탄성 (viscoelastic parameter)을 분석하였다. 황다랑어 복부 껍질 gelatin은 가열·냉각과정 모두에서 elastic modulus (G')와 loss modulus (G'')는 두 종의 육상포유동물 gelatin보다 낮게 나타났으며, 가열과정 중 elastic modulus (G')와 loss modulus (G'')는 육상포유동물 gelatin이 황다랑어 복부 껍질 gelatin보다 높게 나타났다. 이는 열안정성과 녹는점이 육상포유동물 gelatin에서 높다는 것을 의미한다. 또한 온도변화 없이 20°C에서 elastic modulus의 측정 결과 황다랑어 복부 껍질의 경우 증가하는 경향이 나타나지 않았으나, 10°C 경우에는 황다랑어 복부 껍질 gelatin의 elastic modulus (G')도 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 황다랑어 복부 껍질 gelatin이 겔을 형성하기 위해서는 우피 및 돈피 gelatin에 비해 낮은 온도가 필요한 것을 의미한다.
10. 황다랑어 복부 껍질로부터 collagen 제조의 최적조건을 구하기 위하여 중심합성계획법에 따라 4개의 독립변수와 종속변수로서 collagen의 수율 (yield,%)을 선정하여 예비 실험한 결과를 이용하여 반응표면 분석

을 실시하였다. 4가지 독립변수의 최적 제조조건은 NaOH 처리농도 0.5 N, 처리시간 36.2 시간, 효소 처리 농도비 1:4.9 (83%, w/v), 가수분해 시간 48.1 시간일 때 최적 수율을 보이는 것으로 나타났다

11. 반응표면분석을 통해 얻어진 최적 조건에서 예상되는 collagen의 수율 (Y, yield,%)은 33.09%로 나타났으며, 실제 제조한 결과는 32.3%로 예상치 보다 약 0.8% 낮게 나왔으나 큰 차이를 보이지 않았다. 4개의 독립 변수 중 X_1 (NaOH의 농도, N)이 가장 높은 영향력을 미치는 것으로 나타났다.
12. 최적 조건에서 제조된 collagen의 기능 특성을 밝히기 위해 우피 (calf skin)와 황다랑어 복부 껍질 collagen의 아미노산조성을 분석한 결과, 우피 (calf skin)와 황다랑어 복부 껍질 collagen의 glycine 잔기 함량은 각각 24.1%, 25.3%로 가장 높게 나타났다. Hydroxyproline 함량은 우피 (calf skin) collagen의 경우 9.9%로 나타났으며, 황다랑어 복부 껍질 collagen의 경우는 8.8%로 우피 (calf skin) collagen이 높은 함량을 나타내었다. Proline 잔기는 우피 (calf skin) collagen과 황다랑어 복부 껍질 collagen이 각각 11.7%와 12.2%로 황다랑어 복부 껍질 collagen의 함량이 조금 높게 나타났다.
13. 황다랑어 복부 껍질 collagen의 분자량을 알아보기 위해 SDS-PAGE 분석한 결과, 우피 (calf skin) collagen은 type I으로써 두개의 α -chain (α_1 -과 α_2 -, 2:1의 비율)과 β -component, γ -component로 구성되어 있었으며, 본 연구에서 제조한 황다랑어 복부 껍질 collagen 역시 marker protein인 우피 (calf skin) collagen과 같은 유형의 두개의 α -chain (α_1 -과 α_2 -)과 β - 및 γ -components가 나타났다.

14. 황다랑어 복부 껍질 collagen과 우피 (calf skin) collagen을 FT-IR spectra를 측정한 결과, 우피 (calf skin) collagen의 amide A, I, II 및 III 영역의 최대 peak band는 각각 3433, 1659, 1549, 및 1240 cm^{-1} 이었으며, 황다랑어 복부 껍질 collagen의 최대 peak band는 3437 cm^{-1} (amide A), 1661 cm^{-1} (amide I), 1550 cm^{-1} (amide II), 1236 cm^{-1} (amide III)로 비슷한 파장에서 peak band를 나타내었으며, N-H stretching vibration과 관련이 있는 것으로 알려진 amide A 영역인 3,200-3,600 cm^{-1} 에서 peak 유형에 차이를 나타내었다.
15. 0.03% (w/v) 농도의 황다랑어 복부 껍질 collagen을 0.1 M 농도의 acetic acid 용액에 녹여 점도를 측정한 결과, collagen 용액의 점도는 32°C에 이르기까지 연속적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 33-50°C의 범위에서는 감소율이 낮아지는 것으로 나타났다.
16. Collagen의 산업적 응용을 위한 중요한 특성인 열안정성을 알아보기 위하여 황다랑어 복부 껍질과 우피 (calf skin) collagen의 변성온도 (T_d)를 측정한 결과, 본 연구에 사용된 황다랑어 복부 껍질 collagen의 변성온도는 31°C로 나타내었으며, 우피 (calf skin)의 변성온도는 35°C로 4°C 가량 낮게 나타났다. 이는 황다랑어 복부 껍질과 우피 (calf skin) collagen의 아미노산 분석 시 나타난 imino acid의 함량 (21.0%, 21.6%)과 경향이 유사하였다.

감사의 글

2008년 무자년(戊子年)의 해가 저물어가고 2009년 기축년(己丑年)의 해가 밝아오고 있습니다. 뒤돌아보면 1989년 부산수산대학교 식품공학과에 입학하여 박영호 교수님과 김선봉 교수님 문하에 입실하여 수학(修學)한지도 20년의 세월이 흘렀습니다. 지난 20여년간 저의 스승님이셨으며 본 연구가 마무리될 수 있도록 지도와 편달을 해주신 김선봉 교수님께 누구보다 먼저 감사를 드립니다.

아울러 부족한 저의 연구논문이 제 모습을 찾을 수 있도록 면밀한 검토와 조언을 해주신 경상대학교 김인수 교수님과 이양봉 교수님께 감사드리며, 심사과정에서 다듬어 주시고, 지도해 주신 경성대학교 김동수 교수님과 김영목 교수님께 감사를 드립니다.

본 연구가 진행되는 동안 실험이 진행될 수 있도록 많은 시간과 노력을 보태준 한국식품개발연구원 조승목님과 (주)아워홈 우진욱님께 심심한 감사의 마음을 전합니다. 늦은 밤에 실험실을 찾아도 반갑게 맞아주며 따뜻한 커피 한잔으로 위로해 주던 후배 졸업생 정철균, 서정은, 윤재환, 김대용, 하봄비, 노혜진, 안주련, 한유나, 변상훈님과 재학생 김태완, 김수연, 김대욱, 성재웅, 김도영, 김주연, 홍정욱, 박정희, 명재훈, 김민지님 그리고 힘들고 어려울 때 마다 친형제보다 더 살갑게 위안이 되어준 후배 조상원님께 고마운 마음을 전합니다. 또한 식품보장학실험실에서 함께 동고동락했던 선배님, 후배님들과 이 조금만 기쁨을 함께하고자 합니다.

지난 7년간 사랑과 믿음으로 옆자리를 지켜준 사랑하는 아내와 자식 잘되기만을 바라지며 사랑과 희생으로 키워주신 부모님께 깊이 머리 숙여 감사드리며, 존경하는 부모님, 사랑하는 아내 그리고 귀염둥이 두 딸, 다영과 다은에게 이 논문을 바칩니다.

참 고 문 헌

- AOAC (2005). In W. Horwitz (Ed.), (17th ed.), Official methods of Analysis, Association of official agricultural chemists international, Gaithersburg, AOAC international, 38.1.03.
- Arnesen, J.A., & Gildberg, A. (2002). Preparation and characterisation of gelatin from the skin of harp seal (*Phoca groenlandica*). *Bioresource Technology*, **82**, 191-194.
- Box, G.E.P., & Wilson, K.B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society (Series B)*, **13**, 1-45.
- Burjandze, T.V. (2000). New analysis of the phylogenetic change of collagen thermostability. *Biopolymers*, **53**, 523-528.
- Chang, P., Kuan, S., Eberlein, G., Burke, D., & Jones, R. (2000). Characterization of bovine collagens using capillary electrophoresis an alternative to slab gel electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **22**, 957-966.
- Chang, Y.N., Huang, J.C., Lee, C.C., Shih, I.L., & Tzeng, Y.M. (2002). Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*. *Enzyme & Microbial Technology*, **30**, 889-894.
- Cho, S.M., Gu, Y.S., & Kim, S.B. (2005). Extracting optimization and

- physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, **19**, 221-229.
- Cho, S.M., Kwak, K.S., Park, D.C., Gu, Y.S., Ji, C.I., Jang, D.H., Lee, Y.B., & Kim, S.B. (2004). Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. *Food Hydrocolloids*, **18(4)**, 573-579.
- Choi, S.S., & Regenstein, J.M. (2000). Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. *Journal of Food Science*, **65**, 194-199.
- Edwards, I.M., & Jutan, A. (1997). Optimization and control using response surface methods. *Computer & Chemical Engineering*, **21**, 441-453.
- Foegeding, E., Lanier, T.C., & Hultin, H.O. (1996). Characteristics of edible muscle tissue, (3rd ed.), in *Food Chemistry* (pp. 879-942), New York: Fennema O.R. Marcel Dekker.
- Gilsenan, P.M., & Ross-Murphy, S.B. (2000). Rheological characterization of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids*, **14**, 191-195.
- Giraud-Guille, M.M., Besseau, L., Chopin, C., Durand, P., & Herbage, D. (2000). Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states. *Biomaterials*, **21**, 899-906.
- Gómez-Guillén, M.C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M.D., ulmo, N., Lizaabe, M.A., & Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species. *Food Hydrocolloids*, **16**, 25-34.

- Gudmundsson, M. (2002). Rheological properties of fish gelatins. *Journal of Food Science*, **67**, 2172-2176.
- Gudmundsson, M., & Hafsteinsson, H. (1997). gelatin from cod skins as affected by chemical treatment. *Journal of Food Science*, **62**, 37-39.
- Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., & Mann, S. (2003). Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. *Biological Macromolecules*, **32**, 199-204.
- ISO (1978). Meat and meat products - Determination of L (-)-hydroxyproline content (Reference method). International Organization for Standardization, ISO. 3496-1978.
- Jakobsen, R.L., Brown, L.L., Hutson, T.B., Fink, D.J., & Veis, A. (1983). Intermolecular interactions in collagen self-assembly as revealed by fourier transform infrared spectroscopy. *Science*, **220**, 1288-1290.
- Jamilah, B., & Harvinder, K.G. (2002). Properties of gelatins from skins of fish-black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry*, **77**, 81-84.
- Johnston-Banks, F.A. (1990). Gelatin. In P. Harris, J.R. (Ed.), in Food gels (pp. 233-289), London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilised

- collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, **93**, 475-484.
- Kim, J.S., & Cho, S.Y. (1996). Screening for raw material of modified gelatin in marine animal skins caught in coastal offshore water in Korea. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, **39**, 134-139.
- Kim, J.S., & Cho, S.Y., Ha, J.H., & Lee, E.H. (1995). Effect of additives on physical properties of yellowfin sole skin gelatin prepared by ethanol fractional precipitation. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, **38**, 330-333.
- Kimura, S., Zhu, X.P., Matsui, R., Shijoh, M., & Takamizawa, S. (1988). Characterization of fish muscle type I collagen. *Journal of Food Science*, **53**, 1315-1318.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, **89**, 363-372.
- Kolodziejaska, I., Sikorski, Z.E., & Niecikowska, C. (1999). Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illex argentinus*) skins. *Food Chemistry*, **66**, 153-157.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Leach, A.A., & Eastoe J.E. (1977). The chemical examination of gelatins. In Ward, A.G. & Courts, A. (Eds.), *The science and technology of gelatin*

- (pp. 475-506), New York: Academic Press.
- Ledward, D.A. (1986). Gelation of gelatin. In Mitchell, J.R. & Ledward, D.A. (Eds.), Functional properties of food macromolecules (pp. 171-201), London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Lehninger, A.L. (1975). Biochemistry, (2nd ed.), (pp. 145), New York: Worth Publishers Inc.
- Montero, P., & Gómez-Guillén, M.C. (2000). Extracting conditions for megrim (*Lepidorhombus boscii*) skin Collagen affect functional properties of the resulting gelatin. *Journal of Food Science*, **65**, 434-438.
- Muyonga, J.H., Cole C.G.B., & Duodu, K.G. (2004). Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, **85**, 81-89.
- Muyonga, J.H., Cole C.G.B., & Duodu, K.G. (2004). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, **87**, 325-332.
- Nagai, T., & Suzuki, N. (2002). Preparation and partial characterization of collagen from paper nautilus (*Argonauta argo*, Linnaeus) outer skin. *Food Chemistry*, **76**, 149-153.
- Nagai, T., & Suzuki, N. (2000). Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins. *Food Chemistry*, **68**, 277-281.

- Nagai, T., Ogawa, T., Nakamura, T., Ito T., Nakagawa, H., Fujiki, K., Nakao, M., & Yano, T. (1999). Collagen of edible jellyfish exumbrella. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, **79**, 855-858.
- Nakamura, Y.N., Iwamoto, H., Ono, Y., Nishimura, S., & Tabata, S. (2003). Relationship among collagen amount, distribution and architecture in the *M. Longissimus thoracis* and *M. pectoralis profundus* from pigs. *Meat Science*, **64**, 43-50.
- Nimni, M.E., Harkness, R.D., (1988). Molecular structures and functions collagen, In Nimni, M.E. (Ed), Collagen (pp. 3-789), Boca Raton: CRC Press.
- Norland, R.E. (1990). Fish gelatin: Technical aspects and applications. In S.J. Band (Ed.). Photographic gelatin (pp. 266-281). London: Royal Photographic Society.
- Osborne, K., Voight, M.N., & Hall, D.E. (1990). Utilization of lumpfish carcasses for production of gelatin, Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability (pp. 143-153). Lancaster: Pa.: Technomic Publishing Co.
- Sadowska, M., Kolodziejska, I., & Niecikowska, C. (2003). Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, **81**, 257-262.
- Sato, K., Ohashi, C., Ohtsuki, K., & Kawabata, M. (1991). Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled

storage of muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**, 1222-1225.

Shahide, F. (1994). Seafood processing by-products. In Shahidi, F. & Botta, J. R. (Eds), *Seafoods chemistry, processing, technology and quality* (pp. 320-334), Glasgow: Blackie Academic & Professional.

Wong, D.W.S. (1989). *Mechanism and theory in food chemistry*. New York: Van Nostrand Reinhold.

Yoshimura, K., Terashima, M., Hozan, D., & Shirai, K. (2000). Preparation and dynamic viscoelasticity characterization of alkali - solubilized collagen from shark skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 685-690.

