creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

공학석사 학위논문

황다랑어의 비늘로부터 콜라겐의 추출 및 물리화학적 특성 해석

2008년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

한 유 나

공학석사 학위논문

황다랑어의 비늘로부터 콜라겐의 추출 및 물리화학적 특성 해석

지도교수 김 선 봉

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함.

2008년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

한 유 나

한유나의 공학석사 학위논문을 인준함

2008년 8월

주 심 공학박사 이근태 (인)

위 원 농학박사 안동현 (인)

위 원 농학박사 김선봉 (인)

목 차

Abstract ····· iii

서론 ····· 1

재료 및 방법

1. 실험재료 ····· 4

2. 실험방법 ····· 4

2.1 콜라겐의 추출 ····· 4

2.2 실험설계 및 자료분석 ····· 5

2.3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ····· 8

2.4 아미노산 분석 ····· 9

2.5 Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy ····· 9

2.6 점도 ····· 9

2.7 용해도 ····· 10

2.8 변성온도 ····· 11

결과 및 고찰

3.1 콜라겐 추출의 통계적 해석 ····· 12

3.2 콜라겐 추출의 최적화 ····· 16

3.3 콜라겐의 SDS-PAGE ····· 18

3.4 콜라겐의 아미노산 조성 ····· 18

3.5 FT-IR ····· 22

3.6 점도 ····· 24

3.7 용해도 ····· 24
3.8 변성온도 ····· 29
요약 ····· 31
참고문헌 ····· 33
감사의 글 ····· 41

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

Processing Optimization and Physicochemical Characteristics of Collagen from Scale of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*)

Yu-Na Han

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

Abstract

Scales of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) was studied to investigate the optimum condition of collagen extraction by using surface response methodology. The four independent variables of concentration and treatment time for both alkali and enzyme treatments were used to predict a model equation for the collagen yield. The determinant coefficient (R^2) for the equation was 0.9056. The values of the independent variables for the maximum yield was 0.32 N NaOH concentration, 16.38hrs alkali treatment time, 0.18% enzyme concentration, and 31.02hrs enzyme treatment time. In the physicochemical properties of tuna scale collagen, SDS-polyacrylamide

gel electrophoresis of tuna scale collagen showed the same migration distances as that of calf skin collagen. The amide A, Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ regions of tuna scale collagen in FT-IR measurement was shown in the peaks of 3414 cm^{-1}, 1645 cm^{-1}, 1553 cm^{-1} and 1247 cm^{-1}, respectively. The amount of imino acids for tuna scale collagen was 18.97% and the collagen denaturation temperature was 33℃. The collagen solubility on NaCl concentration was decreased until 4% NaCl (w/v) and the collagen solubility on pH was high at pH 2-4 and sharply decreased from pH 4 to pH 7. Viscosity of the collagen solution was continuously decreased until 30℃ and its decreasing rate was reduced in the temperature range of 35-50°C.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

서 론

콜라겐은 척추동물의 전체 단백질 중 25-30% 정도를 차지하는 섬유상 단백질이다. 콜라겐은 피부, 연골, 뼈, 힘줄, 혈관 등 거의 모든 부위에 존재하여 조직이나 장기를 지탱하면서 체형의 유지 기능을 담당한다(Piez, 1985).

최근 각광받고 있는 기능성 소재중의 하나인 콜라겐은 예전부터 식품으로서 햄, 소시지 등에 첨가제로 사용되어 식감을 높이는 재료로 이용되었고, 가식성 casing 또는 담채로 이용되고 있다 (Pearson, 1988). 의약품으로 type Ⅱ 콜라겐은 류마티스 관절염 환자의 T-세포의 활성을 억제하여 통증을 감소시키는 효과를 나타낸다 (Li et al., 2006). 또한 콜라겐은 피부 관리 차원으로서의 효과가 입증되어 최근 바르는 화장품 또는 먹는 화장품으로서 많이 이용된다 (Li et al., 2005).

콜라겐은 어체 부위별로 어피, 비늘, 뼈뿐만 아니라 가식부의 대부분을 차지하는 근육, 또는 내장 등에 고루 존재하고 있으므로 콜라겐을 부산물인 어피, 비늘 등에서 분리하여 음식, 화장품과 생의학적으로 이용할 수 있다면 전통적으로 소와 돼지 같은 육상동물의 피부로부터 분리된 콜라겐에서 인체 전이 위험성이 있는 광우병(bovine spongiform encephalopathy, BSE) 또는 구제역(foot/mouth disease)에서 위협받지 않고 안전한 새로운 대체 자원이 될 수 있다 (Yamauchi, 2002). 또한 종교적인 제약 때문에 돼지로부터 얻어지는 콜라겐은 사용될 수 없는 문제점을 해결할 수 있으며 (Sadowska et al., 2003), 환경오염을 야기 시키는 부산물로부터 고기능성 물질을 추출하는 점에서 의미가 있다.

대부분의 콜라겐의 연구는 소, 돼지 등 육상 척추동물에 관한 것이 많고,

수산물을 이용한 것은 이에 비해 대체로 적은 실정이다.

수산물의 콜라겐에 관한 연구는 paper nautilus와 puffer fish의 표피에서 콜라겐을 분리하여 SDS-PAGE, Peptide mapping, 변성온도 등의 물리적 특성 연구와(Nagai et al., 2002), Brownstripe red snapper의 skin에서 산가용성 콜라겐을 추출하여 DSC, 용해도, 아미노산 분석 등의 연구가 보고되었다(Jongjareonrak et al., 2005). 또한 치어와 성어의 Nile perch에서 산가용성 콜라겐을 추출하여 아미노산, SDS-PAGE 등의 특성이 연구되었으며(Muyonga et al., 2004), Yoshimura et al. (2000) 와 Nomura et al. (2000)은 great blue shark (*Prionace glauca*)의 껍질을 이용하여 콜라겐을 추출하였으며 그 특성을 밝혔다.

또한 근구 해파리와 오징어의 부산물인 외피로부터 콜라겐의 분리 및 물리적 특성 연구와(Nagai et al., 2000; Nagai et al., 2001), 방어의 등뼈로부터 콜라겐의 효과적인 활용이 연구된 바 있다(Morimura et al., 2002).

어체의 비늘에 관한 연구는 잉어의 비늘에서 0.5 M의 acetic acid를 이용하여 콜라겐을 추출한 것과(Kimura et al., 1991), 정어리의 비늘에서 콜라겐을 추출한 것이 보고된 바 있다(Nomura et al., 1996). 최근에는 불돔, 정어리, 농어 비늘의 부분적인 특성의 연구와(Nagai at al., 2004), 참돔과 나일틸라피아의 비늘에서 type I 콜라겐을 추출하여 물리적 특성을 연구한 것이 있다(Ikoma et al., 2003). 또한, Ogawa et al. (2004)은 black drum과 sheepshead seavream의 어피와 비늘로부터 콜라겐을 추출하여 물리적 특성을 연구하였다.

참치 (Skipjack and Yellowfin)는 매우 선호도가 높은 생선으로 주로 참치 중 황다랑어 (Yellowfin tuna)와 가다랑어 (Skipjack tuna)가 연간 어획량 3,400,000MT에 달하는 주 어획어종으로 (2001 World Capture Production of FAO Fisheries Department), 황다랑어는 주로 횟감이나 초

밥에 쓰이고 가다랑어는 주로 통조림의 원료로 쓰인다. 그러나 이들의 가공공정 중 제거된 어피, 비늘 등의 부산물이 대량으로 발생하여 환경오염을 초래하게 된다. 따라서 황다랑어의 가공공정에서 얻어지는 부산물을 이용한 유용 성분의 추출은 효율적이고, 경제적으로 대량의 원료를 공급받을 수 있다는 장점을 가진다.

반응표면분석법은 독립변수의 조건의 차이에 따른 종속변수 사이의 상관성을 묘사한 것으로 (Edwards & Jutan, 1997), 이 방법을 이용하여 기능성 성분의 추출 및 최적조건을 찾는 것은 상당히 효율적인 것으로 많은 보고가 있다. Cho et al. (2004, 2005) 는 반응표면분석법을 이용하여 상어연골과 참치 껍질로부터 젤라틴의 추출 최적화를 연구하였고, Woo et al. (2008) 는 부산물인 황다랑어 등껍질로부터 콜라겐 추출의 최적조건 및 물리화학적 특성을 연구하였다. 그 결과 반응표면분석법은 젤라틴 및 콜라겐의 추출에 있어 최적조건을 찾는데 매우 효율적인 것으로 나타났다.

따라서 본 연구는 황다랑어 비늘로부터 콜라겐을 추출하여 반응표면분석법을 이용하여 최적 추출 조건을 밝혔으며, 추출한 콜라겐의 물리화학적 특성을 알아보았다. 물리화학적 특성은 육상동물 유래의 calf skin 콜라겐과 비교하여 아미노산 분석, SDS-PAGE, Fourier transform infrared spectroscopy, 점도, 용해도, 그리고 변성온도를 측정하였다.

실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

시료로 사용된 황다랑어 (*Thunnus albacares*) 비늘은 동원산업(부산, 한국)에서 껍질이 붙어 있는 상태로 제공받았다. 껍질을 제거하여 비늘을 실험에 이용하였으며, 실험이 행해지기 전까지 -18℃ 동결상태로 보관하였다. 황다랑어 비늘로부터 추출한 콜라겐의 물리화학적 특성을 알아보기 위해 육상동물유래 콜라겐인 calf skin 콜라겐(C-9791, EC No 232-697-4, type I collagen from calf skin, Sigma, U.S.A)을 사용하여 비교 하였다. Pepsin (EC 3. 4. 23.1; 2080 U/mg protein, Sigma, USA) 및 본 연구에 사용된 모든 시약은 analysis grade이다.

2. 실험방법

2.1 콜라겐의 추출

콜라겐을 추출하기 위해 껍질이 붙어 있는 상태로 제공받은 황다랑어 부산물의 껍질을 제거하여 비늘만을 따로 수집하였다. 수집된 비늘은 10,000 rpm에서 3분간 마쇄한 것을 사용하였다. 마쇄한 비늘은 깨끗이 수세한 후 비콜라겐 단백질의 제거 및 조직의 팽윤을 위해서 알칼리 (NaOH) 처리를 하였는데 그 농도는 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 및 0.5 N 이다. 처리시간은 6-30시간의 범위에서 6시간 간격으로 shaking incubator (HB-201SF, Hanbaek Scientific Co., Korea)를 이용하여 9℃, 200 rpm에서 처리되었다. 알칼리 (NaOH) 처리 후 알칼리 용액의 제거를 위하여 수세 및 중화를 하였다. 중

화시킨 비늘은 원료 대비 10배 (w/v)의 펩신 (EC 3. 4. 23.1; 2080 U/mg protein, Sigma, USA)을 함유한 acetic acid 용액을 이용하여 0.04, 0.12, 0.2, 0.28 및 0.36%의 농도로 18시간에서 42시간동안 6시간 간격으로 효소 가수분해하였다. 효소 가수분해는 shaking incubator에서 9℃, 200 rpm의 조건에서 행하였다. 효소 가수분해를 마친 시료는 여과포를 이용하여 추출액과 잔사를 분리하였다. 추출액은 25% NaCl용액을 이용하여 추출액의 최종농도가 5%가 되도록 염석을 하였다. 염석 후 저온에서 10배의 증류수를 이용하여 3-4회 4℃, 7000 rpm에서 원심분리를 하였다. 원심분리를 마친 시료는 진공동결건조를 하였다. 콜라겐 추출의 전 공정은 콜라겐의 열변성을 막기 위하여 저온에서 행하여 졌다.

2.2 실험설계 및 자료분석

콜라겐의 추출조건을 최적화하기 위하여 중심합성계획법(contral composite design (CCD), Box & Wilson, 1951)에 의해 실험구간을 설정하였다(Table 1). 또한 반응표면 희귀분석을 위해 SAS (statistical analysis system 9.01) program을 사용하였다. 4개의 독립변수를 선정하였으며, 각각의 독립변수를 5개의 범위로 정하여 실험이 design 되었다. 총 27개 구간에서 실험을 행하였으며, 실험 design 구성은 factorial points 16개, axial points 8개와 중심값의 3번 반복으로 구성되어 있다 (Table 2). 콜라겐의 추출공정 중 중요한 공정으로 꼽을 수 있는 알칼리 처리공정과 효소 가수분해공정의 농도 및 처리시간을 4개의 독립변수로 정하였다. 즉, 독립변수는 NaOH (N, X_1)의 농도, NaOH 처리시간 (hrs, X_2), pepsin의 농도 (%, X_3), pepsin처리 시간 (hrs, X_4)이며, 각각의 range와 levels 을 식 (1)에 따라 5개의 구간으로 다르게 하여 나타내었다.

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

Independent variables	Symbol	Range and levels				
		-2	-1	0	1	2
NaOH concentration (N)	X_1	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Treatment time (hrs)	X_2	6	12	18	24	30
Enzyme concentration (%)	X_3	0.04	0.12	0.2	0.28	0.36
Hydrolysis time (hrs)	X_4	18	24	30	36	42

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

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

Run No.	Coded levels of variable				Response
	X_1	X_2	X_3	X_4	Y (%)
1	−1	−1	−1	−1	1.84
2	−1	−1	−1	+1	4.82
3	−1	−1	+1	−1	3.93
4	−1	−1	+1	+1	2.19
5	−1	+1	−1	−1	1.77
6	−1	+1	−1	+1	2.24
7	−1	+1	+1	−1	2.16
8	−1	+1	+1	+1	1.88
9	+1	−1	−1	−1	3.53
10	+1	−1	−1	+1	3.93
11	+1	−1	+1	−1	3.53
12	+1	−1	+1	+1	3.34
13	+1	+1	−1	−1	2.04
14	+1	+1	−1	+1	2.79
15	+1	+1	+1	−1	1.57
16	+1	+1	+1	+1	2.36
17	−2	0	0	0	2.32
18	+2	0	0	0	2.36
19	0	−2	0	0	3.06
20	0	+2	0	0	1.37
21	0	0	−2	0	2.55
22	0	0	+2	0	1.45
23	0	0	0	−2	1.88
24	0	0	0	+2	3.57
25	0	0	0	0	6.95
26	0	0	0	0	6.28
27	0	0	0	0	6.59

$$Xi = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \qquad (1)$$

xi 는 독립변수의 coded 값이며, X_i는 독립변수의 실제 값이다. X_0는 실제 독립변수의 중심값을 나타낸 것이며, X_i변화 범위를 나타낸 것이다. 종속변수로는 콜라겐의 수율 (Y, %)로 정하였다 (Table 2). 독립변수의 중심값과 그 범위는 예비실험의 결과를 토대로 정하였다 (Table 1).

SAS system (Version 9.01, SAS Institute Inc.)의 RSREG procedure를 이용하여 반응표면분석을 한 결과를 바탕으로 95%의 유의적 수준에서 적합한 반응표면 모델식 (response surface model)을 구하였다 (2).

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

.

여기서 Y는 종속변수로 콜라겐의 수율 (%)을 나타낸 것이며, β_0상수, βi, βii, βij regression coefficients 그리고 X_i, X_j는 독립변수의 level을 나타낸 것이다. Response surface plots는 Maple software (Maple 7. Waterloo Maple Inc., Canada)를 이용하여 3차원 그래프로 나타내었으며, 두 개의 독립변수들의 영향력을 나타낼 때에는 그래프에 나타나지 않은 다른 두 개의 독립변수의 값은 최적조건으로 하였다.

2.3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

전기영동은 Mini-Protean 3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 사용하여 Laemmli (1970)의 방법으로 측정하였다. Polyacrylamide gel은 stacking gel과 separating gel로 각각 5%의 농도로 만들어 사용하였다. Sample은 증류수로 이용하여 10% SDS를 함유하는 0.25M Tris-HCl (pH

6.8), 5% 2-Mercaptoethanol, 20% Glycerol, 0.1%의 Bromophenol blue를 혼합하여 100℃에서 3분간 가열시킨 후 sample 용액 5 ㎕를 gel에 주입하고 20 mA/gel의 전류를 흘려보내며 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.25% (w/v) coomassie brilliant blue R250로 염색하였으며, 육상동물 유래 콜라겐인 calf skin (Type I collagen)을 marker protein으로 비교하였다.

2.4 아미노산 분석

콜라겐 시료 5 mg을 취하여 6 N HCl 용액 3 mL를 가한 후 110℃ dry bath에서 24시간 동안 가수분해 하였다. 분해액은 galss filter를 이용하여 감압여과 한 후, 감압 농축하여 pH 2.2 sodium citrate phosphate buffer를 이용하여 10 mL로 정용하였다. 아미노산의 분석은 시료의 일정량을 취하여 아미노산자동분석기 (HITACHI L-8800)를 이용하여 분석하였다.

2.5 Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy

FT-IR spectrophotometer (Brooker IFS 88, Germany)를 이용하여 황다랑어 비늘로부터 추출한 콜라겐과 육상동물 유래 콜라겐인 calf skin의 특성을 500에서 4000 cm^{-1}까지 2 cm^{-1}의 data acquisition rate로 알아보았다. Curve fitting은 peakfit software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 나타내었다.

2.6 점도

황다랑어 비늘로부터 추출한 콜라겐의 점도 측정은 Kittiphattanabawon et al. (2005)의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. 0.1 M acetic acid 용액에 콜라겐을 0.03% 농도로 500 mL를 만든 후 60℃ water bath상에서 녹

인다. Brookfield Synchorolectic viscometer (Model II+, Brookfield Eng Labs Inc., Stoughton, MA, U.S.A)를 이용하여 30 rpm의 조건에서 spindle No. 40을 사용하여 측정하였다. 측정 온도 범위는 15-50°C로 5°C/min의 속도로 온도 변화를 주었다. 콜라겐 용액은 각 온도 대에서 10분 동안 온도를 유지한 뒤 실험을 행하였으며 실험은 3번 반복하여 측정한 결과를 이용하였다. 이때 결과는 15℃에서 측정한 점도를 상대적으로 비교·계산하여 그래프로 나타내었다.

2.7 용해도

콜라겐의 용해도는 Montero et al. (1991)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 0.5 M의 acetic acid에 콜라겐의 최종농도가 6 mg/mL, 3 mg/mL이 되도록 하여 4℃에서 12 시간동안 서서히 교반하면서 녹였다. NaCl의 농도에 따른 용해도는 6 mg/mL의 농도의 콜라겐 용액 5 mL에 0.5 M acetic acid에 NaCl을 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12% (w/v)로 녹인 용액 5 mL를 첨가하여 각 용액의 NaCl 최종농도가 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%가 되도록 하였다. 위 용액은 4℃에서 30 분 동안 서서히 교반한 후 10000×g 의 조건으로 4°C에서 30 분간 원심분리 하였다. 상층액의 단백질 농도는 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 측정하였고 표준물질로 bovine serum albumin (BSA)을 사용하였다. NaCl에 따른 콜라겐 시료의 상대적인 용해도는 가장 높은 용해도를 나타낸 NaCl 농도를 기준으로 하여 상대적인 용해도의 비율로 나타내어 계산하였다.

pH에 따른 용해도는 콜라겐 농도가 3 mg/mL인 용액 8 mL에 6 N NaOH와 6 N HCl을 첨가하면서 pH를 1에서 10까지 조절하였다. 증류수를 첨가하여 최종 volume을 10 mL로 맞추었으며, 이 용액은 10000×g의 조건에서 4°C에서 30분간 원심분리 하였다. 상층액의 단백질 농도는 Lowry et

al. (1951)의 방법에 따라 측정하였고 표준물질로 bovine serum albumin (BSA)을 사용하였다. pH에 따른 콜라겐 시료의 상대적인 용해도는 위와 같은 방법으로 계산하였다.

2.8 변성온도

변성온도의 측정은 Kimura et al. (1988)을 약간 수정하여 측정하였다. 변성온도는 콜라겐 용액의 점도를 측정하여 알아보았다. 점도는 콜라겐 용액을 0.03%농도로 녹여 5 mL를 만들어 Ostwald-Fenske 점도계로 측정하였다. 콜라겐 용액은 20-50℃까지 3℃ 간격으로 측정하였으며, 이때 각 온도별 콜라겐 용액의 온도는 10 분 동안 water bath 상에서 유지시킨 후 실험을 행하였고 콜라겐의 변성온도 (T_d)는 측정한 값의 비율이 초기의 반이 되는 지점으로 하였다.

결과 및 고찰

3.1 콜라겐 추출의 통계적 해석

황다랑어 비늘로부터 콜라겐의 추출조건을 최적화하기 위해 총 27개의 구간에서 실험되었으며 각각의 구간에 따른 종속변수 (Y, %)를 Table 2에 나타내었다. 실험 결과 얻어진 data는 Statistical Analysis system software (Version 9.01, SAS Institute Inc., U.S.A)의 RSREG (response surface regression) procedure를 이용하여 반응표면분석 한 결과를 바탕으로 2차 다항식의 모델식을 구하였다. 1차항 (X_1, X_2, X_3, X_4), 2차항 (X_{11}, X_{22}, X_{33}, X_{44})그리고 교차항과 관련되어있는 모든 상수항의 유의성을 t-statistic과 각각의 모델의 추측 계수를 Table 3에 나타내었다.

Linear coefficient 를 제외한 나머지 X_1 (P=0.5074)와 X_3 (P=0.2435)그리고 X_4 (P=0.0795)는 P>0.05로 유의성을 나타내지 못한 반면에, X_2 (P=0.0018)는 P<0.05의 수준에서 유의성을 나타났다. 또한 모든 2차항은 P<0.01의 높은 level에서 유의성이 나타난 반면, 모든 교차항은 P>0.05로 유의성을 나타내지 못했다. 반응표면 모델식은 95% 수준에서 유의성이 인정되지 않은 8개의 단위를 제외하여 Table 4에 나타내었다.

콜라겐의 독립변수의 결정계수 (R^2)는 0.9056으로 나타났으며, P=0.0004로 나타났다. 높은 결정계수 및 유의성이 나타난 것은 예비실험을 통해 중심값 및 범위를 정했기 때문인 것으로 여겨진다. Analysis of variance (ANOVA)의 분석에 의해 2차 다항 모델 식의 통계적 유의성을 평가하였다. 종속변수에 따른 ANOVA 분석을 통해 Y (yield, %)의 반응 모델을 표현하여 Table 5에 나타내었다. ANOVA의 결과 교차항 (P=0.5795)을 제외한 1차항 (X_1, X_2, X_3, X_4, P=0.0101), 2차항 (X_{11}, X_{22}, X_{33}, X_{44}, P<0.0001)은 95% 이상의 수준에서 유의성이 인정되었다. 그리고 회귀식은 P<0.01

Table 3. Estimated coefficients of the fitted quadratic polynomial equation for the response of Y (yield, %) based on t-statistic

Parameter[a]	Parameter estimate	Standard error	T-value	P-value
Intercept	6.6067	0.4036	16.37	<.0001
X_1	0.0975	0.1427	0.68	0.5074
X_2	-0.5700	0.1427	-3.99	0.0018
X_3	-0.1750	0.1427	-1.23	0.2435
X_4	0.2733	0.1427	1.92	0.0795
X_1X_1	-0.9958	0.1513	-6.58	<.0001
X_1X_2	-0.0525	0.1748	-0.30	0.7690
X_2X_2	-0.0271	0.1513	-6.79	<.0001
X_1X_3	-0.0613	0.1748	-0.35	0.7320
X_3X_2	0.0163	0.1748	0.09	0.9274
X_3X_3	-0.0808	0.1513	-7.14	<.0001
X_4X_1	0.0200	0.1747	0.11	0.9108
X_4X_2	0.0175	0.1747	0.10	0.9219
X_3X_4	-0.3763	0.1747	-2.15	0.0524
X_4X_4	-0.8996	0.1513	-5.94	<.0001

[a] X_1, X_2, X_3 and X_4 mean NaOH concentration (N), alkali treatment time (hrs), enzyme concentration (%), and enzyme treatment time (hrs), respectively.

Table 4. Response surface model for processing conditions of collagen from scales of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*)

Responses	Quadratic polynomial model[a]	R^2	P-value
Yellowfin tuna	$Y=6.607-0.57X_2-0.996X_1^2-1.027X_2^2 -1.081X_3^2-0.899X_4^2$	0.9056	0.0004

[a] X_1, X_2, X_3 and X_4 mean NaOH concentration (N), alkali treatment time (hrs), enzyme concentration (%), and enzyme treatment time (hrs), respectively.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

Table 5. Analysis of variance (ANOVA) for response of the dependent variable (Y, yield(%))

Sources	DF[a]	SS[a]	MS[a]	F-value	P-value
Regression					
Linear	4	10.55	0.17	5.40	.0101
Quadratic	4	43.29	0.70	22.15	<.0001
	6	2.38	0.04	0.81	0.5795
Cross-product					
Model	14	56.23	0.91	8.22	0.0004
Residual					
Lack of fin	10	5.64	0.56	5.01	0.18
Pure error	2	0.22	0.11	-	-
Total error	12	5.86	0.49	-	-
Total	26	62.09		-	-
Factors[b]					
X_1	5	21.49	4.30	8.80	0.0010
X_2	5	30.36	6.07	12.43	0.0002
X_3	5	27.99	5.60	11.46	0.0003
X_4	5	21.33	4.27	8.73	0.0011

[a] DF, SS and MS stand for degrees of freedom, sum of square and mean square, respectively.

[b] X_1, X_2, X_3 and X_4 mean NaOH concentration (N), alkali treatment time (hrs), enzyme concentration (%), and enzyme treatment time (hrs), respectively.

로 99% 의 높은 수준에서 유의성이 나타났으며, lack of fit의 결과로 종속변수 (Y)는 95%의 유의 수준에서 모델식의 유의성이 나타났다 (Table 4).

3.2 콜라겐 추출의 최적화

황다랑어의 비늘로부터 추출한 콜라겐의 최적 추출조건을 밝히기 위해 중심합성 계획법 (CCD, Box & Wilson, 1951)에 의해 중심값을 정하였다. NaOH의 농도 (0.3 N, X_1), 처리시간 (18 hrs, X_2), 효소처리 농도 (0.2%, X_3), 처리 시간 (30 hrs, X_4) 4개의 독립변수로 나타내었으며, 중심값 및 범위는 예비 실험을 통하여 정하였다 (Table 1). 반응표면 분석 결과 나타난 최적 조건에서의 coded 값과 uncoded 값을 Table 6에 나타내었다. RSREG procedure의 결과에 의하면, eigenvalue 값들이 모두 음수로써 정상점으로 최고치를 나타내었다. 황다랑어를 이용한 콜라겐 추출 시 최적 조건 일때의 code 값은 X_1 = 0.06, X_2 = -0.27, X_3 = -0.11 그리고 X_4 = 0.17로 나타났다. 즉 NaOH 처리 시 농도 (X_1) 0.32 N, 처리시간 (X_2) 16.38 hrs, 효소 처리 시 농도 (X_3) 0.18%, 가수분해 시간 (X_4)은 31.02 hrs 일 때 최적 수율을 보이는 것으로 나타났다 (Table 6). 반응 표면 분석 결과 위의 조건에서 추출하였을 경우 예상되는 콜라겐의 수율 (Y, yield(%)) 은 6.72 %로 나타났으며, 실제 추출 한 결과 6.93%로 예상치 보다 0.21% 높게 나왔으나 큰 차이를 보이지 않았다 (Table 6).

Fig. 3은 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 나타낸 것이다. 콜라겐 추출 공정에 중요한 영향을 미치는 요인으로는 크게 알칼리 처리와 효소 처리 두 가지로 여겨진다. 따라서 알칼리 처리에서는 NaOH의 농도 (X_1, N),처리시간 (X_2, hrs)을 독립 변수로 정하였으며, 효소 처리 시에는 효소의 농도 (X_3, ratios)와 처리시간 (X_4,

Table 6. Optimal conditions of collagen processing from scale of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*)

Dependent variable	Independent variables[a]	Critical value		Predicted yield (%)	Stationary point
		Coded	Uncoded		
Y (Yield, %)	X_1	0.06	0.32	6.72%	Maximum
	X_2	-0.27	16.38		
	X_3	-0.11	0.18		
	X_4	0.17	31.02		

[a] X_1, X_2, X_3 and X_4 mean NaOH concentration (N), alkali treatment time (hrs), enzyme concentration (%), and enzyme treatment time (hrs), respectively.

hrs)을 독립 변수로 하였다. 그러므로 반응표면 그래프는 알칼리 처리 농도와 처리 시간 그리고 효소 가수분해 시 효소 농도와 처리 시간의 관계에서 상호관계를 나타내었다 (Fig. 1). 두개의 반응표면 그래프는 모두 coded 값이 0에 가까울수록 종속변수인 콜라겐 수율 (%)은 높아지는 것으로 나타났다.

3.3 콜라겐의 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE를 통해 황다랑어 비늘로부터 추출한 콜라겐과 육상동물 유래의 calf skin 콜라겐의 전기영동 pattern을 Fig. 2에 나타내었다. Calf skin 콜라겐은 두 개의 α_1과 α_2-chain, β-component (α-chains의 crosslinked dimer) 및 γ-component (α-chains의 crosslinked trimer)로 이루어져 있다 Giraud-Guille et al., (2000)의 보고에 따르면 α_1, α_2, β and γ 콜라겐의 분자량은 93, 93, 186 and 279 kDa 정도이다. 황다랑어 비늘로부터 추출한 콜라겐과 calf skin 콜라겐을 비교해 보았을 때 α_1-chain과 α_2-chain이 calf skin 콜라겐보다 희미하게 나타났으며 α_1-chain, α_2-chain, β-chain및 γ-chain로 구성되어 있음을 확인 할 수 있었다.

3-4. 콜라겐의 아미노산 조성

proline과 hydroxyproline을 imino acid라 한다. 콜라겐의 분자구조는 주로 proline과 hydroxyproline의 pyrrolidine ring에 의해 polypeptide chain의 2차 구조변화가 제한되고, hydroxyproline의 hydroxy group을 통한 수소결합에 의해 삼중나선구조의 열안정성을 증가시키기 때문에, 다량의 imino acid는 나선구조를 더 안정하게 한다 (Gustavon, 1955; Piez et al., 1960). 또한, hydroxyproline의 함량은 콜라겐으로부터 유도되는 젤라틴의 유동학적 특성과 겔강도 등에 중요한 영향을 미치며, hydroxyproline 함량이 높을

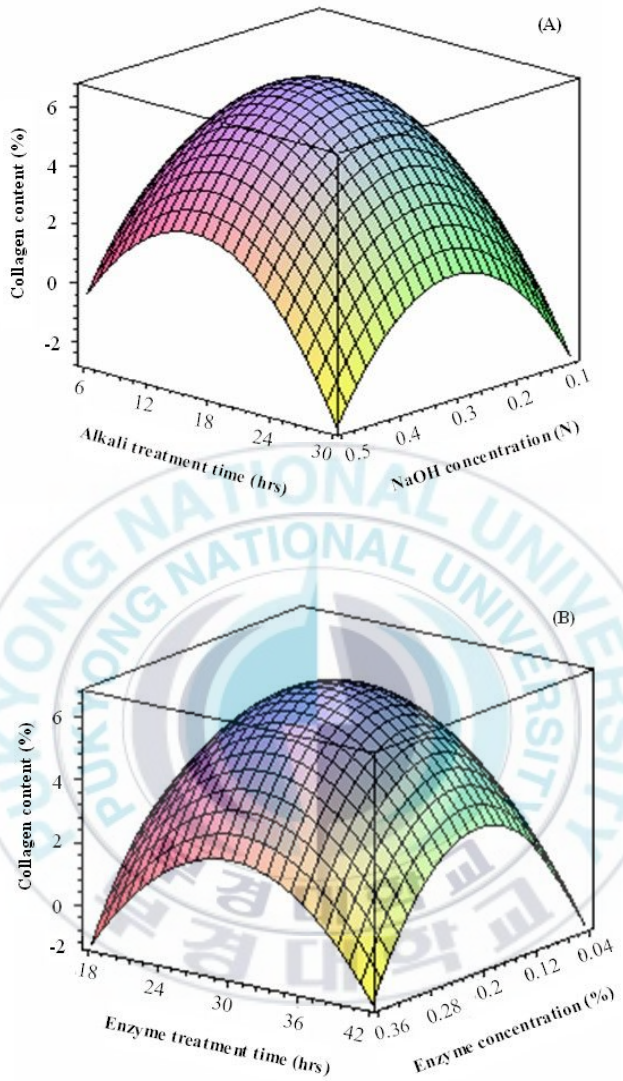

Fig. 1. Response surface plots for optimization of collagen extraction from scale of Yellowfin tuna scale. Y, X_1, X_2, X_3, and X_4 stand for collagen content (%), NaOH concentration (N), alkali treatment time (hrs), enzyme concentration (%), and enzyme treatment time (hrs), respectively.

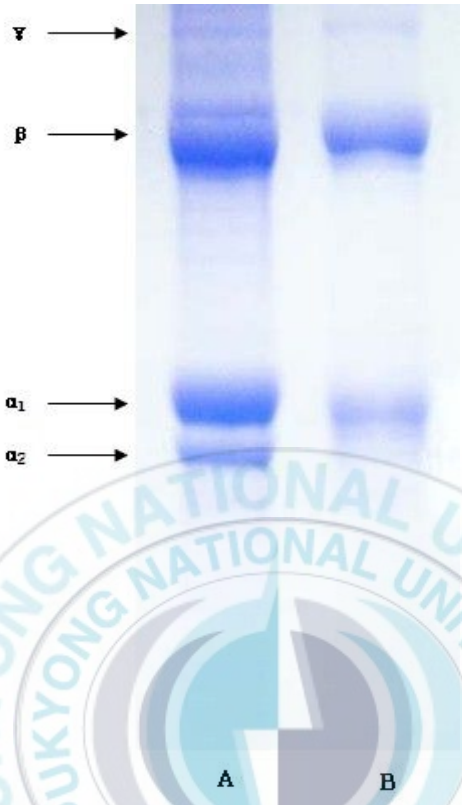

Fig. 2. SDS-PAGE patterns of collagen from scale of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and calf skin. A; collagen from calf skin, B; scale of yellowfin tuna collagen.

The 5% separating gel and 5% stacking gel were used for eletrophoretic analysis. Loading volume of sample solution is 5.0 mg/mL. Calf skin collagen was used as mobility maker of α, β and γ -chain components.

Table 7. Amino acid composition of collagens from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) scales and calf skins

(%)

Amino acids	Collagen type	
	Calf skin	Yellowfin tuna scale
Hydroxyproline	9.06	7.43
Aspartic acid	5.11	6.83
Threonine	1.85	4.4
Serine	2.85	5.45
Glutamic acid	10.69	13.2
Proline	10.88	11.54
Glycine	16.28	2.44
Alanine	8.12	10.65
Valine	2.27	3.25
Isoleucine	1.37	1.84
Leucine	2.86	3.5
Tyrosine	0.48	0.17
Phenyalanine	1.84	2.59
Lysine	0.27	0.53
Histidine	1.96	2.31
Arginine	4.19	4.91
Cystein	0.01	-
Imino acid[a]	19.93	18.97

[a] Imino acid mean proline and hydroxyproline.

수록 젤라틴에 미치는 영향은 커진다 (Gilsenan & Ross-Murphy, 2000; Gómez-Guillén et al., 2002). 따라서 proline, hydroxyproline의 함량은 콜라겐에 있어서 매우 중요한 것이라 할 수 있다. 황다랑어 비늘로부터 추출한 콜라겐 및 calf skin 콜라겐의 아미노산 분석 결과를 Table 7 에 나타내었다. 실험 결과 황다랑어 콜라겐의 경우 hydroxyproline 함량은 7.43%로 나타났으며, calf skin 콜라겐의 경우 hydroxyproline 함량은 9.06%로 황다랑어 콜라겐보다 높은 수치를 나타내었다. 그리고 황다랑어 콜라겐의 proline 함량은 11.54%로 calf skin 콜라겐의 10.88%보다 높은 수치를 나타내었다. Foegeding et al. (1996)에 의하면 어류 콜라겐의 imino acid 함량은 포유류 콜라겐보다 낮은 수치를 나타내는데, 황다랑어 콜라겐 및 calf skin 콜라겐의 imino acid 함량은 각각 18.97% 및 19.93%로 나타났다.

3-5. FT-IR

황다랑어 비늘로부터 추출한 콜라겐과 calf skin 콜라겐과의 FT-IR spectra를 Fig. 3에 나타내었다. Spectrum 에서 나타난 amide A, Ⅰ, Ⅱ 및 Ⅲ의 region은 polypeptide의 형태와 직접적으로 연관이 있다. amide A region (3400～3440 cm^{-1})은 N-H stretching vibration과 관련이 있다. amide Ⅰ region (1500～1660 cm^{-1})는 peptide의 carbonyl group 의 stretching vibrations과 관련이 있으며, 단백질의 2차 구조를 알아보는데 가장 유용하게 이용이 된다. amide Ⅰ region인 1500 cm^{-1} 주변에서 가장 강력한 amide Ⅱ의 흡수가 일어난다 (Jackson et al., 1995). Amide A (～1500 cm^{-1})는 NH bending 와 CN stretching과 관련이 있으며, amide Ⅲ (1350～1200 cm^{-1})는 CN stretching과 NH에 의해서 나타나며, 콜라겐의 triple helical 구조 및 CH_2 wagging vibration와 관련이 있다 (Muyonga et

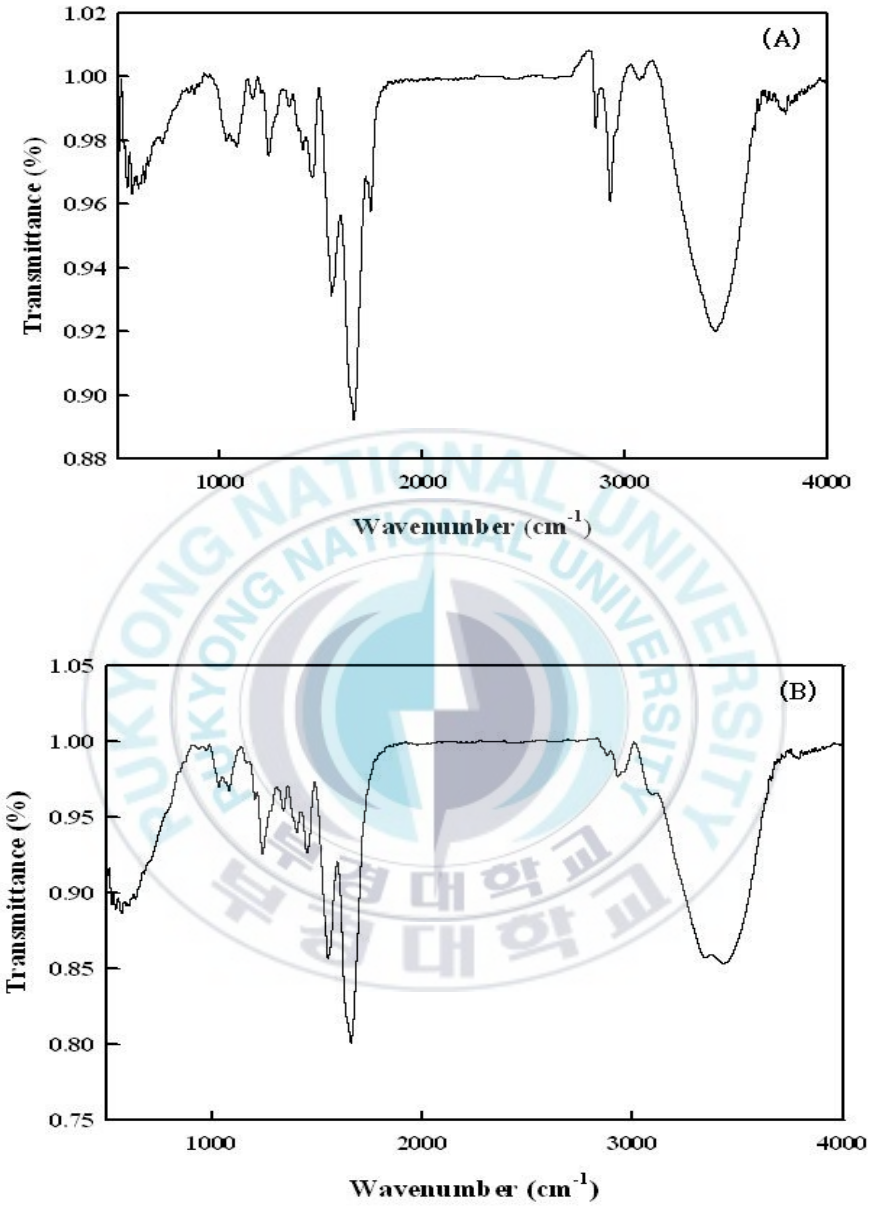

Fig. 3. Fourier transform infrared spectra of collagen from yellowfin tuna scale (A) and calf skin (B).

al., 2004b; Jakobsen et al., 1983). Muyonga et al. (2004b)의 연구에 따르면 치어 nile perch의 껍질 콜라겐의 경우 각각의 amide region (A, Ⅰ, Ⅱ 및 Ⅲ)은 3434, 1650, 1542와 1235 cm^{-1}일 때 peak가 나타났으며, 성어 nile perch 껍질 콜라겐의 amide region 각각 3458, 1654, 1555와 1238 cm^{-1}에서 peak가 나타났다. 본 연구에서 calf skin 콜라겐과 황다랑어 비늘로부터 추출한 콜라겐의 amide A, Ⅰ, Ⅱ 및 Ⅲ의 region은 각각 3435 cm^{-1}, 3414 cm^{-1} (amide A), 1652 cm^{-1}, 1645 cm^{-1} (amide Ⅰ), 1554 cm^{-1}, 1553 cm^{-1} (amide Ⅱ) 그리고 1240 cm^{-1}, 1247 cm^{-1} (amide Ⅲ)로 비슷한 파장에서 peak를 나타내었다.

3-6. 점도

젤라틴 0.04% (w/v) 농도로 증류수에 젤라틴을 녹여 점도를 측정을 하였다 (Fig. 4). 콜라겐 용액의 점도는 32°C에 이르기까지 연속적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 33-50°C의 범위에서는 감소율이 낮아지는 것으로 나타났다. 고온의 열처리에서는 젤라틴의 구조 중에서 수소 결합이 깨지며 (Wong, 1989), 열처리에 따른 젤라틴 구조의 변성은 점도변화와 관련이 있다 (Nagai et al., 1999; Nagai & Suzuki, 2000; Nagai & Suzuki, 2002). Kittiphattanabawon et al. (2005)의 보고에 따르면, bigeye snapper의 bone과 skin으로부터 콜라겐을 추출하였을 때 bigeye snapper의 bone과 skin 콜라겐 용액의 점도는 30°C에 이르기까지 일정하게 감소하였으며, 35-50°C의 범위에서 감소율은 낮아지는 것으로 나타났다. 해파리 젤라틴의 점도 변화율 또한 이와 비슷한 경향을 보였다.

3-7. 용해도

NaCl의 농도에 따른 콜라겐의 용해도 측정을 Fig. 5에 나타내었다.

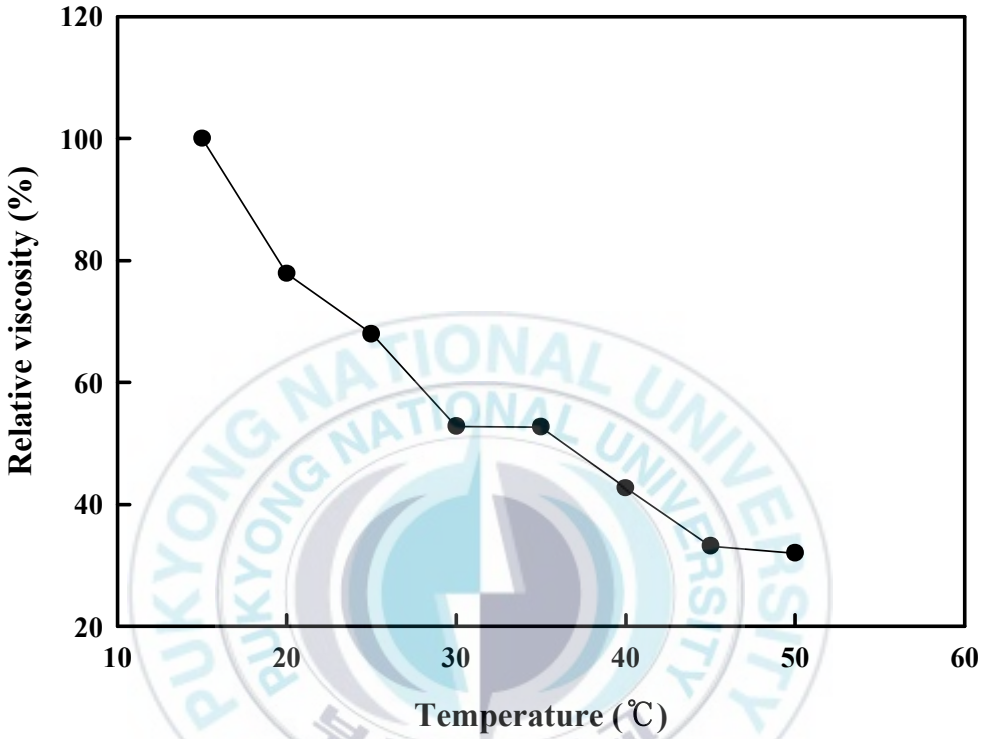

Fig. 4. Relative viscosity at different temperatures of the collagen solution of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) scales.

NaCl의 농도에 따른 용해도는 NaCl 농도가 4% (w/v)에 이르기까지 서서히 감소하였으며, 4%에서 가장 낮은 용해도를 나타내었다. NaCl의 농도가 4% (w/v)이상일 때에는 다시 조금씩 용해도가 증가하는 결과를 나타내었다. 다른 어종으로부터 유래한 콜라겐의 NaCl 농도에 따른 용해도 변화를 살펴보면, Kittiphattanabawon et al. (2005)는 bigeye snapper의 skin과 bone에서 추출한 산가용성 콜라겐은 NaCl 농도가 0-3% 까지 거의 같은 값을 유지했다.

고농도의 NaCl 농도에서의 콜라겐 용해도의 감소는 sulting out 현상이클 것으로 추정되며, NaCl의 농도가 높아지면서 용해도는 낮아지는 것이 관찰되는데, 이는 소수성기 간의 상호작용의 증가로 물에 대한 염이온의 경쟁으로 단백질이 침전된다 (vojdani, 1996).

황다랑어 비늘로부터 추출한 콜라겐의 pH에 따른 용해도는 Fig. 6. 에 나타내었다. pH 1-10까지의 범위에서 실험을 행하였는데 콜라겐의 용해도는 pH 1일 때 가장 높았으며 pH 2-6구간에서는 서서히 감소하였다가 pH 6-8 구간에서는 급격히 낮아졌으며, pH 8 구간에서 가장 낮게 나타났다. pH 9-10구간에서 콜라겐의 용해도는 다시 서서히 증가하였다. 일반적으로 콜라겐은 산성조건에서 높은 용해도를 가짐을 보여주며, pH에 따른 단백질 용해도의 다양성은 등전점의 차이에 기인한다. 단백질의 pH가 등전점보다 높거나 더 낮다면 단백질 분자의 전하를 띤 잔기 사이에 반발력이 증가하며 단백질의 용해도는 증가된다. 반대로, 소수성기-소수성기 간의 상호결합은 증가되고 단백질 분자의 총 전하가 0이 되는 등전점 에서는 단백침전과 응집이 야기 된다 (Wong, 1989).용해도에 따른 다른 결과를 보면, bigeye snapper skin과 bone으로부터 추출한 콜라겐을 이용하여 pH 1-10의 범위에서 콜라겐의 용해도 측정결과 각각 pH 2와 5에서 가장 높은 용해도를 보였으며, pH가 5에서 6으로 넘어가면서 용해도가 급격히 감소 하

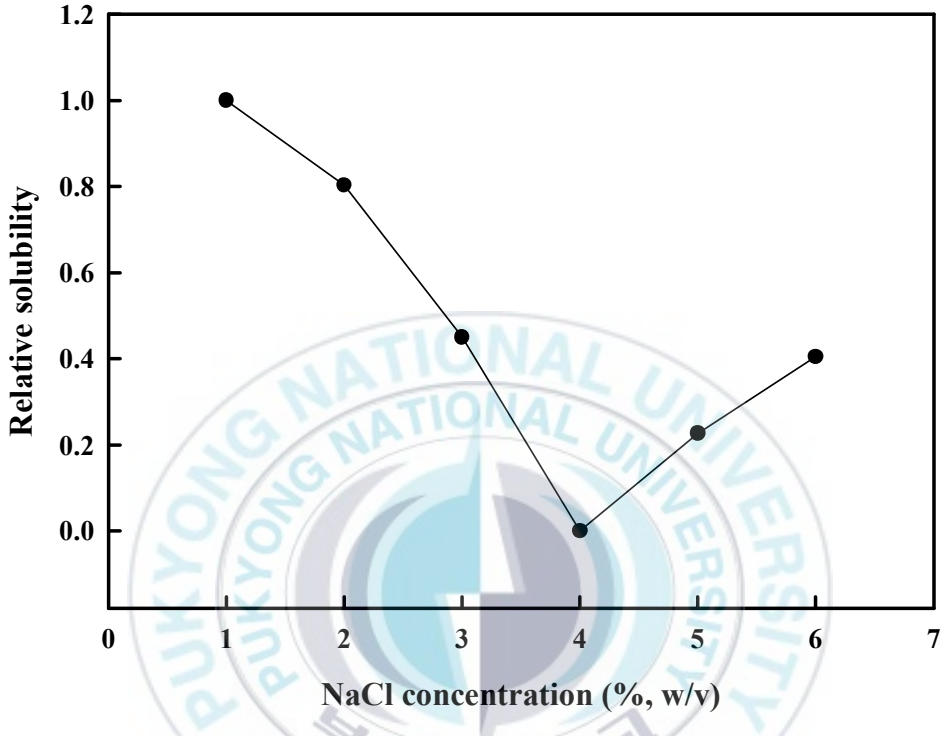

Fig. 5. Solubility in 0.5 M acetic acid on NaCl concentration of the collagen obtained from yellowfin tuna scales (*Thunnus albacares*).

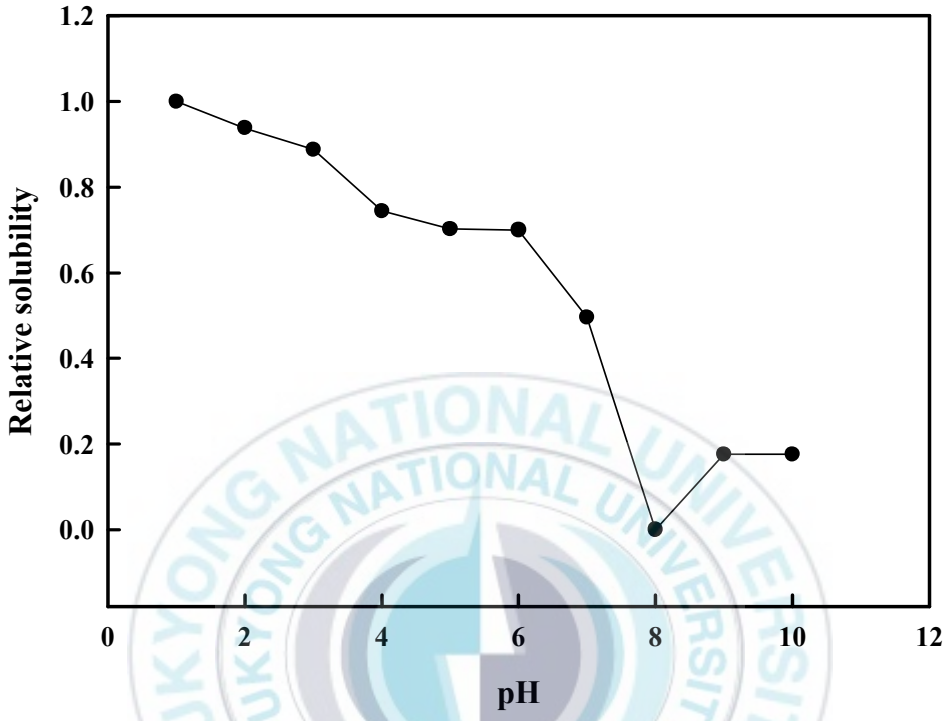

Fig. 6. Solubility in 0.5 M acetic acid on pH of the collagen solution of scales of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*).

였다. 각각 pH 7과 8에서 최고로 낮은 용해도를 보였고 그 이상에서는 상대적으로 완만하게 나타나 본 연구결과와 비슷한 경향을 나타내었다 (Kittiphattanabawon et al., 2005).

3-8. 변성온도

황다랑어 비늘 콜라겐의 변성온도 (T_d)를 측정하여 Fig. 7에 나타내었다. imino acid (proline and hydroxyproline)의 함량이 높을수록 콜라겐의 변성온도는 증가 한다 (Piez & Gross, 1960). 실험 결과 황다랑어 비늘 콜라겐의 변성온도 (T_d)는 31℃로 나타났으며 육상동물 유래 콜라겐인 calf skin 콜라겐의 변성온도(T_d)와 비교해 보았을 때 calf skin 콜라겐의 변성온도(T_d) 32℃로 황다랑어 비늘 콜라겐 보다 높은 수치를 나타내었으나 큰 차이를 나타내진 않았다. 이는 아미노산 분석결과에서도 알 수 있듯이 calf skin 콜라겐의 imino acid 함량이 황다랑어 비늘 콜라겐의 imino acid 함량보다 조금 높기 때문인 것으로 보인다. 다른 어종의 imino acid 함량과 변성온도간의 상관관계를 살펴보면 Kimura et al. (1988)의 연구결과 잉어, 뱀장어, 고등어의 근육의 변성온도 (T_d)는 32.5℃, 30.2℃, 26.9℃이며 imino acid의 함량은 각각 43.2%, 40.2%, 41.1%로 imino acid의 함량이 높을수록 변성온도가 높게 나타나는 것을 알 수 있다. 또한 콜라겐의 열 안정성은 어류의 생육환경과 관련이 있는데, 황다랑어의 생육온도는 주로 18-31℃로 이는 해수온도가 낮은 심수층에 서식하는 cod (15℃) (Rigby, 1968), Alaska pollack (16.8℃) (Kimura & Ohno, 1987) 의 변성온도와 비교해 보았을 때 높은 생육온도에서 서식하는 황다랑어로부터 추출한 콜라겐의 변성온도가 높은 수치를 나타내는 것을 확인 할 수 있다.

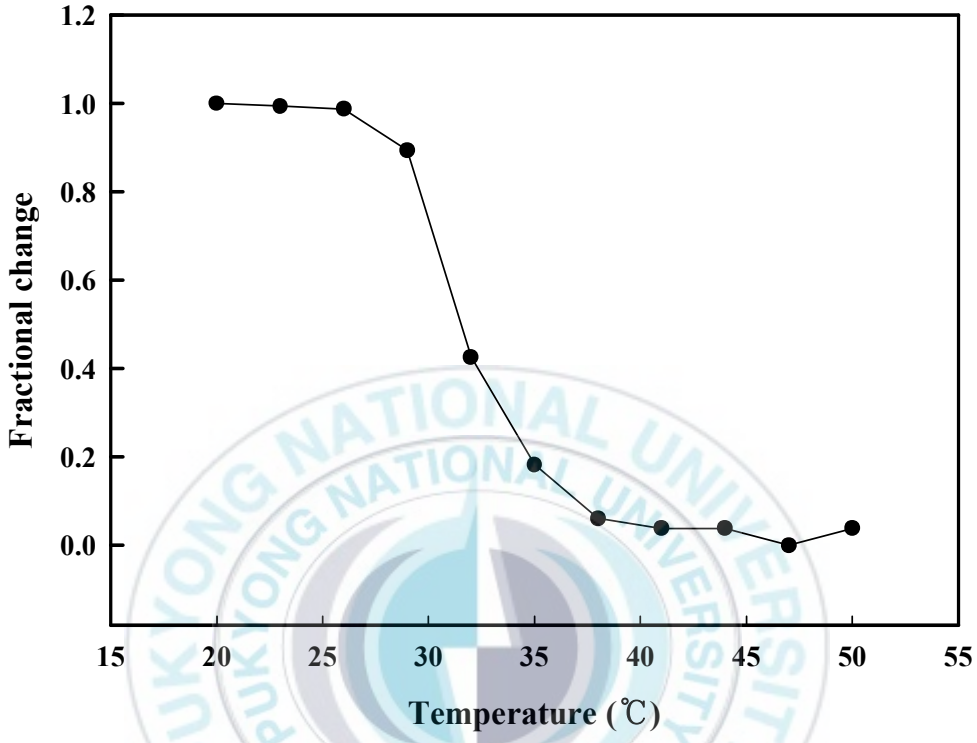

Fig. 7. Thermal denaturation curves determined by measuring the viscosity of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) scale collagen solution of 0.1 M acetic acid.

요 약

척추동물의 전체 단백질 중 25-30%정도를 차지하는 섬유상 단백질인 콜라겐은 예전부터 식품 및 담채로 이용되었다. 최근 의약품 및 피부 관리에서 효과가 입증되어 기능성 소재로 각광받고 있다. 현재 유통되고 있는 콜라겐은 소와 돼지 같은 육상동물의 피부로부터 분리된 콜라겐이 대부분이다. 이런 콜라겐은 인체 전이 위험성이 있는 광우병 또는 구제역에서 위협받지 않고 안전한 새로운 대체 자원이 될 수 있을 뿐만 아니라 종교적 제약 때문에 사용할 수 없는 문제점을 해결할 수 있다. 또한 환경오염을 야기 시키는 부산물로부터 고기능성 물질을 추출하는 점에서 의미가 있다. 따라서 본 연구는 황다랑어 비늘로부터 콜라겐을 추출하여 반응표면분석법을 이용하여 최적 추출 조건을 밝혔으며, 추출한 콜라겐의 물리화학적 특성을 알아보았다. 물리화학적 특성은 육상동물 유래의 calf skin 콜라겐과 비교하여 아미노산 분석, SDS-PAGE, Fourier transform infrared spectroscopy, 점도, 용해도, 그리고 변성온도를 측정하였다.

1. 황다랑어 비늘 콜라겐의 추출최적 조건은 NaOH 농도 0.32 N, 처리시간 16.38 hrs, 효소 가수분해 농도 0.18 %, 처리시간 31.02 hrs 으로 나타났으며 예상되는 콜라겐의 수율(Y, %)은 6.72%로 실제 추출 한 결과 6.60%와 큰 차이를 보이지 않았다.

2. 황다랑어 비늘 콜라겐의 전기영동 pattern은 calf skin 콜라겐과 같은 이동도를 나타내었는데, 2개의 α-chain과 β-component 그리고 γ-component로 구성되어 있었다.

3. 아미노산 분석 결과 황다랑어 콜라겐의 imino acid의 함량은 18.97%로 육상동물유래 콜라겐인 calf skin 콜라겐의 19.93% 보다 낮은 수치를 나타냈다.

4. FT-IR 측정 시 황다랑어 비늘 콜라겐과 calf skin 콜라겐의 amide A, Ⅰ, Ⅱ 및 Ⅲ regions는 각각 3414cm^{-1}, 3435cm^{-1} (amide A), 1645cm^{-1}, 1652cm^{-1} (amide Ⅰ), 1553cm^{-1}, 1554cm^{-1} (amide Ⅱ), 1247cm^{-1}, 1240cm^{-1} (amide Ⅲ)에서 비슷한 경향을 나타내었다.

5. 황다랑어 비늘 콜라겐 용액의 점도는 30℃에 이르기까지 연속적으로 감소하는 경향을 나타내었으며 그 이상의 온도 범위에서는 감소율이 낮아지는 것으로 나타났다.

6. 염농도에 따른 황다랑어 비늘 콜라겐의 용해도는 NaCl 농도가 4% (w/v) 농도에 이르기까지 감소하였으며, pH에 따른 용해도는 pH 2~4일때 높았으며, pH 4~7까지 급격한 감소를 보였으며 그 이상일 때에는 완만하게 상승하였다.

7. 황다랑어 비늘 콜라겐의 변성온도는 33℃로 육상동물 유래 콜라겐인 calf skin 콜라겐보다 1℃ 높게 나타났으며 다른 어류콜라겐보다 높은 온도를 나타내었다.

참고문헌

Box, G. E. P., & Wilson, K. B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society*(*SeriesB*), 13, 1 - 45.

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, 573-579.

Edwards, I. M., & Jutan, A. (1997). Optimization and control using response surface methods. *Computer & Chemical Engineering*, 21, 441-453.

Foegeding, E. A., Lamier, T. C., & Hultin, H. O. (1996). Collagen. In O. R. Fennema (Ed), Food chemisty (3rd ed., pp. 902 - 906). New York: 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.

Gustavon, K. H. (1955). The function of hydroxyproline in collagens. *Nature*, 175, 70-74.

Gómez-Guillén, M. C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M. D., Ulmo, N., Lizaebe, M. A., & Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species. *Food Hydrocolloids*, 16, 25-34.

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 niloticas. *International Journal of Biological Macromoleculer*, 32, 199-204.

Jackson, M., Choo, L. P., Watson, P. H., Halliday, W. C., Mantsch, H. H. (1995). Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. *Biochimica et Biophysics Acta*, 1270, 1-6.

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.

Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Munehiko Tanka. (2005). Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, 93, 475-484.

Kimura, S., Miyaushi, Y., & Uchida, N. (1991). Scale and bone type I collagen of carp (*Cyprinuscarpio*). *Comparative Biochemistry and physiology*, 99B, 473-476.

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.

Kimura. S., & Ohno, Y. (1987). Fish type I collagen: Tissue-specific existence of two molecular forms, (a1)2a2 and a1a2a3, in Alaska Pollack. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 88, 409-413.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Characerisation of acid-soluble collagen from skin and bond of bigeye snapper (*Priacan thustayenus*).*Food Chemistry*,89,363-372.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Li, R., Li, X., & Li, Z. (2006). Altered collagen Ⅱ peptides inhibited T-cell activation in rheumatoid arthritis. *Clinical Immunology*, 118, 317-323.

Li, Y. G., Fukunaga, S., Takenouchi, K., & Nakamura, F. (2005). Comparative study of the physiological properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate as cosmetic materials. *International Journal of Cosmetic Science*, 27, 101-106.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological & Chemistry*, 193, 256-275.

Montero, P., Jimennez-Colmenero, F., & Borderias, J. (1991). Effect of pH and the presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout (*Salmo irideus* Gibb) muscle and skin. *Journal of Science Food Agriculture*, 54, 137-146.

Morimura, S., Nagata, H., Uemura, Y., Fahmi, Y., Shigematsu, T., & Kida, K. (2002). Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. *Process Biochemistry*, 37,

1403-1412.

Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., & Duodu, K. G. (2004). Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nileperch (*Latesniloticus*). *Food Chemistry*, 85, 81-89.

Nagai, T., Izumi, M., & Ishii, M. (2004). Fish scale collagen, preparation and partial characterization. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 239-244.

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., Yamashita, E., Taniguchi, K., Kanamori, N., & Suzuki, N. (2001). Isolation and characterization of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepialycidas*). *Food Chemistry*, 72, 425-429.

Nagai, T., Worawattanamateekul, W., Susuki, N., Nakamura. T., Ito. T., Nakao. M., & Yano, T. (2000). Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jellyfish (*Rhopilema asamushi*). *Food Chemistry*, 70, 205-208.

Nagai, T., & Suzuki, N. (2000). Isolation of collagen from fish waste

material-skin, bone and fin. *Food Chemistry*, 68, 277-281

Nagai, T., Ogawa, T., Nakamura, T., Ito Tatsumi., Nakagawa, H., Fujiki, K., Nakao, M., & Yano, T. (1999). Collagen of edible jellyfish exumbrella. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 79, 855-858.

Nomura, Y., Toki, S., Ishii, Y., & Shirai, K. S. (2000). The physicochemical property of shark type I collagen gel and membrane. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, 48, 2028-2032.

Ogawa, M., Portier, R. J., Moody, M. W., bell, J., Schexnayder, M. A., & Losso, J. N. (2004). Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogoni acromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chemistry*, 88, 495-501.

Pearson, A. M. (1988). Collagen as a food: Advances in meat research: (vol. 4). An AVI Book, NewYork.

Piez, K. A. (1985). Collagen in: J.I. Kroschwitz (Ed), Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Wiley, New York, USA:699-727

Piez, K. A., & Gross, J. (1960). The amino acid composition of some fish collagens; the relation between composition and structure. *The*

Journal of Biological Chemistry, 235(4), 995-998.

Rigby, B. J. (1968). Amino-acid composition and thermal stability of the skin collagen of the Antarctic ice-fish. *Nature*, 219, 166-167.

Sadowska, M., Kolodziejska, I., & Niecikowska, C. (2003). Isolation of collagen from the skin of Balticcod (*Gadusmorhua*). *Food Chemistry*, 81, 257-262.

Vojdani, F. (1996). Solubility. In G. M. Hall (Ed), *Methods of Testing Protein Functionality* (pp11-60). Great Britain:St Edmundsbury

Wong D. W. S. (1989). *Mechanism and Theory in Food Chemistry*. New York, USA:Van Nostrand Reinhold.

Woo, J. W., Yu, S. J., Cho, S. M., Lee, Y. B., Kim, S. B. (2008). Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. *Food Hydrocolloids*, 22, 5, 879-887.

Yamauchi, K. (2002). *Bovine Spongi form Encephalopathy and People*. Tokyo, Japan:Iwanami Press.

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

Food Chemistry, 48, 685-690.

감사의 글

이 논문이 나오기까지, 대학생활 및 대학원 생활을 마무리 하면서 너무 많은 분들의 도움을 받았기에, 감사의 마음을 짧은 글로 표현하는 것에 논문을 완성하는 것만큼의 어려움을 느낍니다.

논문이라는 작은 결실이 나오기까지 학문적 기틀을 잡아주시고, 부족한 저를 이끌어 주시고 좋은 기회를 열어주신 지도교수님이신 김선봉 교수님께 진심으로 감사의 인사를 드립니다. 교수님을 만난 것은 저에게 행운 이였습니다. 또한 논문 심사과정을 통해 아낌없는 격려와 지도를 해주신 이근태 교수님과, 안동현 교수님 감사합니다. 그리고 대학원 과정동한 많은 가르침을 주진 조영재 교수님, 양지영 교수님, 김영목 교수님 감사합니다.

부족한 저를 1년동안 잘 보살펴주신 일본 동경대학교 와타베 선생님, 실험에 대해 상세히 가르쳐주시고 지도해주신 잘생긴 카네코 조교선생님, 오치아이 선생님, 오카다 선생님, 키노시타 조교선생님, 나까야 상 감사합니다. 또한 1년동안 함께 생활했던 수권생물공학실험실과 수산화학실험실의 실험실원들께도 감사의 인사를 드립니다.

대학원 동기이자 편한 오빠이자 듬직한 실장이였던 철균이오빠, 실험실 선배로써, 학과사무실 조교로써 너무 많은 도움을 준 주련이언니, 마음이 여리고 편한 언니같은 상훈오빠, 얘기를 잘 들어주고 함께 있으면 즐거운 봄비언니, 몸집만큼이나 마음도 넓으신 대용선배, 항상 열심히 하더니 지금은 어엿한 사회인이 된 동기 경환이, 실험실을 이끌어 나가고 있는 현실장 태완선배, 언제나 에너지 넘치는 수연이, 벌써 4학년이지만 나에게는 아직도 2학년 같은 귀여운 정희, 재미없는 농담을 하는 착한 대욱오빠, 보고있으면 뒷 배경이 산속 암자로 변해버리는 재웅, 웃는 얼굴이 너무 이쁜 민지, 실험실 평균 레벨을 올려주는 잘생인 주연이, 김회장 도형이, 귀여운

정욱이, 막내 재훈에게 감사의 인사를 전합니다.

또한 배움의 열정에 있어 좋은 자극제가 되는 유진언니, 말이 잘 통하는 편한 친구 냉동실의 꽃 명진이, 그 외 함께 대학원 생활을 했던 동기들에게도 감사의 인사를 드립니다.

실험실 일이라면 지원을 아끼지 않으시고 참여해주시며 좋은 말씀 해주시는 지청일 선배님, 유승재 선배님, 이영준 선배님, 조상원 선배님, 조승목 선배님, 최주현 선배님, 윤영수 선배님께도 감사의 인사를 드립니다. 또한 콜라겐 실험사수 진욱 선배님, 짧은 시간밖에 함께 하지 못했지만 재환선배, 혜진언니에게도 감사의 인사를 전합니다.

학문뿐만이 아닌 인생을 배우는 것의 중요성을 가르쳐주신 존경하는 장동석 교수님, 박미연 선생님 및 학부시절 동거동락 했던 미생물 실험실의 성준선배, 찬웅선배, 진이언니, 혜진언니, 현정언니, 진영언니, 영교언니, 윤경, 향남, 재홍, 광덕, 지혜와 미사랑 가족들께도 감사를 드립니다.

지난 1년 동안 일본생활, 일본어, 실험실생활에 너무 많은 도움을 주신 진희선배, 친언니같이 편하고 좋은 동미언니, 머리카락 빠져가며 열심히 실험하는 성돈선배, 보고 있으면 눈을 떼지 못하는 미모의 지연언니, 일본에 오기까지 정말 잘 챙겨주신 경미언니, 함께 도일하여 많이 의지되었던 미영이, 동성같이 편한 고마운 도현오빠, 구수한 충청도사나이 영우오빠께 감사의 인사를 드립니다.

학부기간 및 대학원 시절동안 항상 같은자리에 있어준, 졸업 후에도 그곳에 있을 씨사운드 가족들, 특히 혜진, 소연, 봄이, 종철, 재봉, 강은, 정보, 인환, 아라, 인정언니, 성훈오빠께 감사드립니다.

마지막으로, 딸의 결정을 믿어주시고, 아낌없이 지원해주시고, 공부시켜주신 사랑하는 엄마, 아빠, 하나뿐인 나의 씨스터에게 고개 숙여 깊은 감사의 인사를 전합니다.