

공학석사 학위논문

황다랑어 등껍질로부터 콜라겐의 추출 및 물리화학적 특성

2006년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

우 진 욱

공학석사 학위논문

황다량어 등껍질로부터 콜라겐의 추출 및 물리화학적 특성

지도교수 김 선 봉

이 논문을 공학석사 학위논문으로 인준함

2006년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

우 진 욱

우진욱의 공학석사 학위논문을 인준함

2005년 12월 일

주 심 이학박사 이 양 봉 (인)

위 원 농학박사 안 동 현 (인)

위 원 농학박사 김 선 봉 (인)

목 차

Abstract	1
서론	4
재료 및 방법	7
1. 실험재료	7
1.1 재료	7
2. 실험방법	7
2.1 콜라겐의 추출	7
2.2 콜라겐의 정량	8
2.3 실험 설계와 자료 분석	10
2.4 아미노산의 분석	14
2.5 SDS - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	15
2.6 Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy	15
2.7 용해도 측정	16
2.8 Circular dichroism (CD)의 측정	17
2.9 점도의 측정	17
2.10 변성온도의 측정	18
결과 및 고찰	19
3.1 콜라겐 추출의 통계적 해석	19
3.2 콜라겐 추출의 최적화	23
3.3 콜라겐의 아미노산 조성	25
3.4 콜라겐의 전기영동 특성	28

3.5 콜라겐의 fourier transform infrared spectroscopy 특성 해석 · 30	
3.6 콜라겐의 용해도	33
3.7 콜라겐의 circular dichroism 해석	37
3.8 콜라겐의 점도	37
3.9 콜라겐의 변성온도	39
요약	43
참고문헌	46
감사의 글	53

Extraction and physicochemical properties of collagen from dorsal skin of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*)

Jin-Wook Woo

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

Abstract

Dorsal skin obtained from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) processing was used for fish collagen. Extraction optimization of collagen was investigated by using a central composite design of response surface methodology.

NaOH concentration (X_1 , N), NaOH treatment time (X_2 , hr), pepsin concentration (X_3 , ratio) and hydrolysis time (X_4 , hrs) were chosen for independent variables, and dependent variable was collagen yield (Y , %). Optimal condition was $X_1 = 0.92$ N (NaOH concentration), $X_2 = 25.4$ hr (NaOH treatment time), $X_3 = 1:9.8$ ratios (pepsin concentration) and $X_4 = 23.5$ hrs (hydrolysis time). The predicted value of collagen

yield in the optimal condition was 26.7%. Its experimental value of collagen yield was 27.1%.

In order to investigate chemical properties of the yellowfin tuna collagen, amino acid analysis, SDS-PAGE, fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, denaturation temperature (T_d), circular dichroism (CD) measurement, viscosity and solubility were experimented.

According to amino acid analysis, the yellowfin tuna collagen had 20.5% imino acid. In the electrophoretic patterns, the yellowfin tuna collagen comprised of two different α (α_1 and α_2) chains, β -component and γ -component. The yellowfin tuna collagen showed the lower contents of proline and hydroxyproline than a calf skin collagen. But, the contents of glycine and lysine of yellowfin tuna collagen were higher than those of the calf skin collagen. In the measurements of FT-IR, the regions of amide A, I, II and III were 3427, 1651, 1544 and 1240 cm^{-1} , respectively. The CD spectra of yellowfin tuna collagen showed a rotatory maximum at 221 nm and minimum at 191 nm and a consistent cross over point (zero rotation) at about 212 nm, which was characteristic of the triple helical conformation of the protein. Relative viscosity was continuously decreased on heating up 32°C. The decreasing rate was retarded in the temperature range of 32-50°C. The effects of NaCl and pH concentration on the collagen solubilities were measured. Solubilities of the yellowfin tuna collagen on NaCl concentration (1~6%) were decreased from 1% to 4%, and then, were not changed a lot to 6%.

Solubilities of the yellowfin tuna collagen on pH change (pH 2.0~9.0) were high in the range of pH 2.0~4.0 then sharply decreased up to pH 6.0 and then were not changed a lot up to pH 9.0. Denaturation temperature (31°C) of collagen from dorsal skin of yellowfin tuna was much lower than that (35°C) of such mammalian collagen as calf skin collagen.

Physicochemical properties of the collagen of yellowfin tuna dorsal skin were lower than those of mammalian collagens and higher than those of other collagens from fish by-products. Compared with such mammalian collagens as bovine and porcine collagens of the risk of BSE and foot/mouth disease, the collagen of yellowfin tuna dorsal skins with disease-free is thought to be an excellent replacement for the mammalian collagens with the additional advantage that raw materials of yellowfin tuna dorsal skin are available in large quantities from tuna food industries.

서 론

콜라겐은 가장 풍부한 동물유래 단백질이며, 상업적으로 넓은 부분에서 이용되는 젤라틴의 전구체이다. 생체 전 단백질의 30% 정도를 차지하며, 최소 19 종류 (Type I-XIX) 이상인 것으로 밝혀져 있다 (Nakamura et al., 2003). 생체에서 피부 결합조직 그리고 뼈를 구성하는 주된 단백질로 생체내의 어느 부위에서든 찾아 볼 수 있다. 콜라겐은 3중 나선구조로, 그 직경이 약 14~15 Å, 길이는 2,800 Å, 평균 분자량은 약 300 KDa이며 (Lehninger, 1975), tropocollagen의 분자 내 또는 분자간의 공유결합성 cross linkage에 의해 물리, 생물학적으로 안정한 구조를 이루고 있다 (Marcel et al., 1988).

콜라겐은 산업적으로 널리 응용되는 기능성 물질이다. 식품으로서 콜라겐은 햄, 소시지 등에 식감을 높이는 첨가제로 이용되고 양이나 돼지의 천연 장을 대신해 가식성 casing으로 될 뿐만 아니라 다른 식품에서 담체로도 현재 이용되고 있다. 의약품으로서 콜라겐은 류마티스 환자에게 경구 투여했을 경우 효과가 있는 것으로 나타났으며, 화상이나 상처에 의해 손상된 피부에 대한 치유 효과가 있는 것으로 밝혀졌다 (Jeyanthi et al., 1991). 이처럼 콜라겐은 식품, 의약품에서 뿐만 아니라 화장품 cell culture등 넓은 분야에서 다양하게 이용된다. 그리고 현재 콜라겐 산업의 발전으로 인한 수요의 증가로 더욱 많은 콜라겐이 요구되는 실정이다.

현재, 이용되는 대부분의 콜라겐은 육상동물인 소와 돼지 등의 껍질, 뼈 등에서 유래한 것으로 이들 유래의 콜라겐은 광우병

(bovine spongiform encephalopathy, BSE) 또는 구제역 (foot/mouth diseases)의 인체 전이 위험성을 가지고 있다 (FDA reports, 1997). 따라서 늘어나는 수요로 인한 콜라겐의 자원 부족 및 기존의 주된 원료인 육상동물 유래 콜라겐이 가지는 위험성이 없는 안전한 새로운 대체 자원을 찾는 것이 요구되고 있는 실정이다. 이들 대체 자원으로 수산생물의 가공과정 중에 발생하는 부산물을 이용한 연구는 일부 행해졌다. 현재까지 수산생물의 가공 부산물을 이용한 콜라겐 추출 및 연구를 보면 Muyonga et al. (2004a)는 Nile perch (*Lates niloticus*)의 치어 및 성어의 껍질로부터 콜라겐을 추출하여 특성을 비교하였으며, Yoshimura et al. (2000) 와 Nomura et al. (2000)은 great blue shark (*Prionace glauca*)의 껍질을 이용하여 콜라겐을 추출하였으며 그 특성을 밝혔다. Nagai & Suzuki (2000)는 bullhead shark (*Heterodontus japonicus*), Japanese sea-bass (*Lateolabrax japonicus*) 그리고 chub mackerel (*Scomber japonicus*)의 skin, bone 및 fin으로부터 콜라겐을 추출하여 그 특성을 비교하였다. 그 외에도 squid (*Illex argentinus*)의 껍질 (Kolodziejaska et al., 1999), edible jellyfish (*Stomolophus meleagris*) (Nagai et al., 1999), bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*)의 껍질과 뼈로부터 산 가용성 콜라겐의 추출 및 특성에 관한 연구 (Kittiphattanabawon et al., 2005) 등 콜라겐에 관한 연구가 행해졌다.

참치 (skipjack, yellowfin and bigeye)의 연간 어획량은 3,400,000 MT으로 매우 선호도가 높은 생선이다. 대부분 통조림이나 생선회로 이용되며, 상업적으로 이용되는 가장 세계적인 어종 중에 하나이다. 황다랑어는 일부 생선회로 이용되나 대부분 통조림으로 이

용되며, 어획량은 skipjack 뒤를 이어 tuna 중 두 번째로 많다 (2001 World Capture Production of FAO Fisheries Department). 황다랑어를 이용한 유용 성분의 추출은 황다랑어의 대량생산을 바탕으로 가공 부산물을 대량으로 얻을 수 있다는 장점을 가진다. 본 연구는 황다랑어 (*Thunnus albacares*)의 등껍질을 이용하여 콜라겐을 추출 하였다. 수산 가공 부산물인 황다랑어의 등껍질을 이용한 콜라겐 추출에 관한 연구는 아직 행해진 바가 없으며, 육상동물 유래의 콜라겐이 가지는 전염병의 인체 전이 위험성이 없고, 환경오염을 야기 시키는 가공부산물을 이용 하여 고기능성 물질을 추출한다는 점에서 의미가 있다고 할 수 있다.

본 연구는 크게 두 가지로 나누어 행해졌다. 먼저 황다랑어를 이용한 콜라겐 추출을 반응표면분석법 (RSM, Box & Wilson, 1951)을 이용하여 최적 추출 조건을 밝히는 것이다. RSM을 이용한 기능성 성분의 추출 및 생산 공정을 최적화하는 것은 상당히 효율적인 것으로 이에 관한 많은 보고가 있다 (Cho et al., 2004; Cho et al., 2005; Varnalis et al., 2004). RSM의 원리는 실험식을 독립변수의 조건의 차이에 따른 독립변수와의 상호 작용을 묘사한 것이다 (Edwards & Jutan, 1997). 다음으로 추출한 콜라겐의 물리화학적 특성을 알아보았다. 콜라겐 특성을 알아보기 위해 아미노산의 분석, SDS - polyacrylamide gel electrophoresis, fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, circular dichroism (CD) measurement, 점도, 용해도 그리고 변성온도 (T_d)를 측정을 하였으며, 현재 주된 콜라겐 추출원료로 이용되고 있는 육상동물 유래의 calf skin 콜라겐 (Type I collagen, Sigma Co.)과 비교 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1.1 재료

시료로 이용된 황다랑어 (*Thunnus albacares*) 껍질은 두영수산 (부산, 한국)에서 등과 배 부분으로 나누어 제공받았다. 본 연구에서는 황다랑어의 해부학적으로 등 부분에 해당하는 껍질을 이용하여 실험을 행하였으며, 실험이 행해지기 전까지 껍질은 -18°C 동결상태로 보관되어졌다. 추출한 콜라겐의 특성을 알아보기 위해 Sigma 사의 육상 동물 유래 콜라겐인 calf skin 콜라겐 (C-9791, EC No 232-697-4, type I collagen from calf skin, Sigma, U.S.A)을 사용하여 비교 하였으며, 본 연구에 사용된 모든 시약은 analytical grade이다.

2. 실험방법

2.1 콜라겐의 추출

황다랑어 껍질을 수세 후 마쇄를 하고 사용 전까지 -18°C 의 동결 상태로 보관하였다. 깨끗이 수세된 껍질을 비콜라겐 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) 처

리 후 NaOH 제거를 위해 교반기를 이용 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 함유 한 HCl (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 원료대비 10배 (v/w)의 증류수를 이용하여 10000×g로 3~4회 원심분리를 하여 중화 및 수세를 하였다. 원심분리를 마친 시료는 콜라겐의 열변성을 막기 위해 동결건조를 한 후 실험에 이용하였다 (Fig. 1).

2.2 콜라겐의 정량

콜라겐 함량은 Sato et al. (1991)의 방법을 따라서 hydroxyproline 을 정량 한 후 환산 계수를 곱한 값으로 하였다. Hydroxyproline 함량은 ISO (1978)의 방법을 약간 수정하여 정량하였다. 건조된 콜라겐 (100 mg)을 test tube에 넣고 6 N 농도의 HCl 용액 5 mL를 주입한 후 dry bath에서 12시간 동안 가수분해 하였다. 가수분해 후, sample 용액을 6 N 농도의 NaOH를 이용하여 중화하고 2 mL의 acetate/citrate buffer와 함께 0.3 M 농도의 NaCl 용액으로 25 mL 정용하였다. 정제된 test tube에 isopropanol (300 uL)과 oxidant solution (600 uL)을 첨가하고 상온에서 4분간 방치하였다. 4분간 방치 후 ehrlich's reagent 용액 4 mL를 각각의 tube에 첨가 혼합 후 25분간

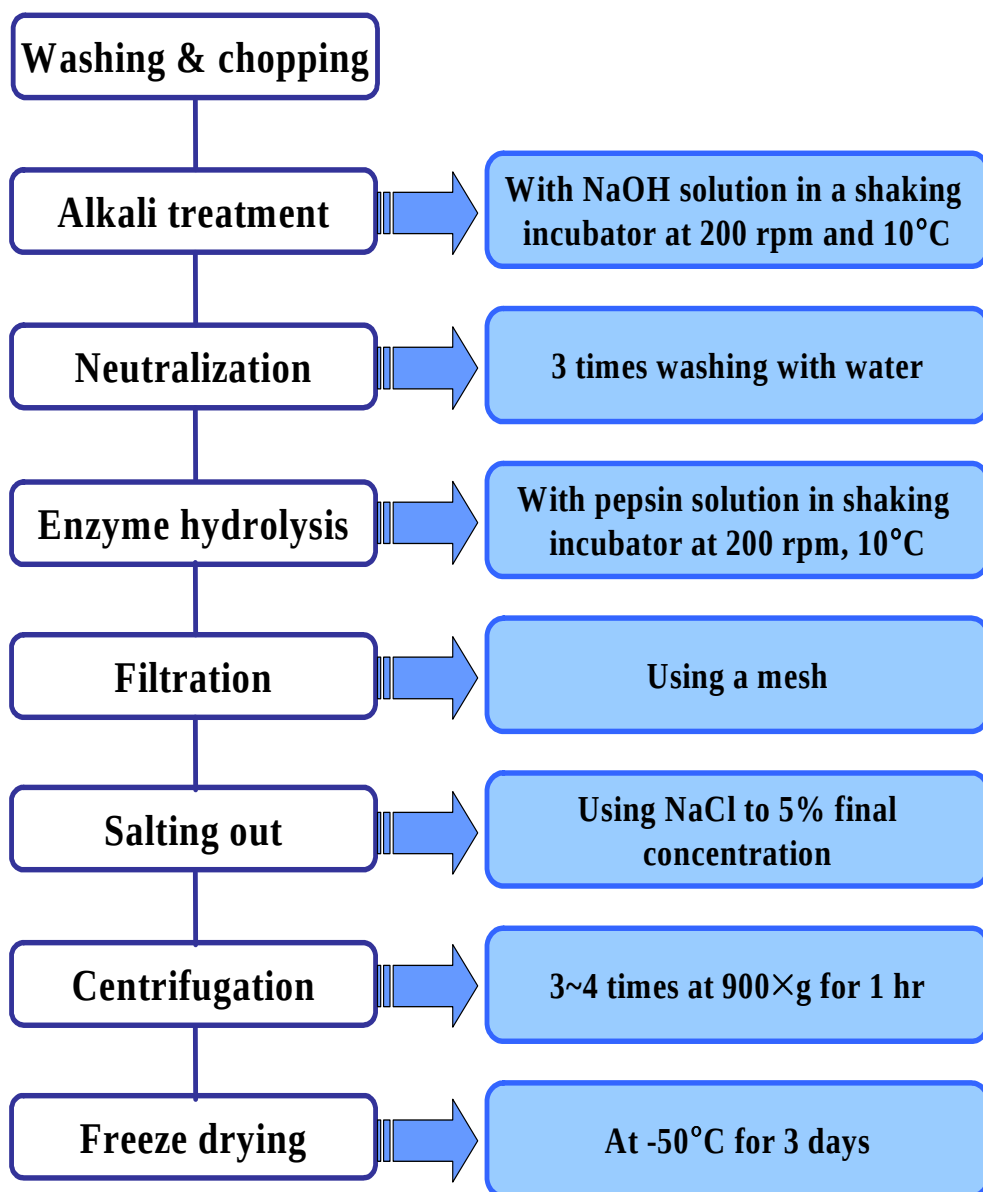


Fig. 1. Collagen processing from dorsal skin of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*).

60°C의 water bath에서 가열하였다. 용액의 흡광도는 분광광도계 (UV-140-02, Shimadzu, Japan)를 이용하여 660 nm에서 측정하였다. Hydroxyproline 함량은 sigma 사로부터 구입한 시약급 hydroxyproline을 이용하여 작성한 검량선을 이용하여 계산하였다 (Fig. 2).

2.3 실험 설계와 자료 분석

추출조건을 최적화하기 위해 중심합성계획법 (central composite design (CCD), Box & Wilson, 1951)에 의해 실험 구간을 설정하였으며 (Table. 1), 반응표면 회귀분석을 위해 SAS (statistical analysis system 8.01) program을 사용하였다. 4종류의 독립변수가 선정되었으며, 각각의 독립변수를 5개의 범위로 정하여 실험 디자인이 되었다. 총 27구간에서 실험이 되었으며 (Chang et al., 2002; Cho et al., 2005), 실험 design 구성은 16 개의 factorial points, 8개의 axial points ($\alpha = 2$) 그리고 중심값의 3번 반복으로 이루어져 있다 (Table 2). 콜라겐의 추출공정은 두 개의 중요한 공정으로 나눌 수 있는데, 한 가지는 알칼리 (NaOH) 처리이고 다른 하나는 펩신을 이용한 효소 가수분해이다. 따라서 독립변수로는 NaOH의 농도 (N, X_1), NaOH 처리시간 (hrs, X_2), 펩신의 농도 (ratios, X_3)와 펩신 처리 시간 (hrs, X_4)으로 정하였으며, 각각의 ranges와 levels 을 식 (1)에 따라 5개의 구간으로 다르게 하여 나타내었다.

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

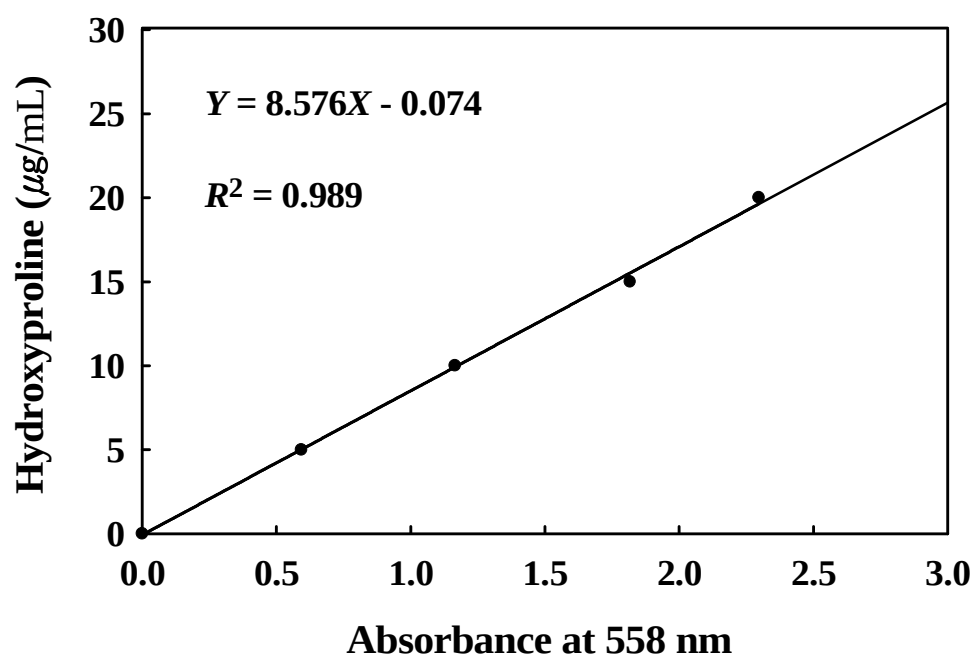


Fig. 2. Calibration curve for the determination of hydroxyproline content.

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

Independent variables	Symbol	Range and levels				
		-2	-1	0	1	2
NaOH concentration (N)	X_1	0.5	0.7	0.9	1.1	1.3
Treatment time (hrs)	X_2	12	18	24	30	36
Enzyme concentration (ratio)	X_3	1:6	1:8	1:10	1:12	1:14
Hydrolysis time (hrs)	X_4	12	18	24	30	36

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

Run	Coded levels of variable				Response	
No.	X_1	X_2	X_3	X_4	Yield (Y)	Purity (%)
1	-1	-1	-1	-1	17.4	82.3
2	-1	-1	-1	+1	17.2	81.7
3	-1	-1	+1	-1	16.7	82.2
4	-1	-1	+1	+1	16.1	81.5
5	-1	+1	-1	-1	18.6	82.4
6	-1	+1	-1	+1	18.9	81.9
7	-1	+1	+1	-1	17.3	81.4
8	-1	+1	+1	+1	16.2	82.3
9	+1	-1	-1	-1	19.6	83.1
10	+1	-1	-1	+1	19.8	82.0
11	+1	-1	+1	-1	19.3	84.5
12	+1	-1	+1	+1	17.5	80.2
13	+1	+1	-1	-1	19.4	83.0
14	+1	+1	-1	+1	19.5	81.8
15	+1	+1	+1	-1	18.7	83.2
16	+1	+1	+1	+1	17.5	81.5
17	-2	0	0	0	18.1	82.7
18	+2	0	0	0	17.9	83.1
19	0	-2	0	0	17.6	83.2
20	0	+2	0	0	16.4	81.5
21	0	0	-2	0	17.5	81.3
22	0	0	+2	0	17.6	82.5
23	0	0	0	-2	20.0	81.5
24	0	0	0	+2	18.4	82.1
25	0	0	0	0	26.7	82.0
26	0	0	0	0	26.5	81.9
27	0	0	0	0	26.8	82.5

x_i 는 독립변수의 coded 값이며, X_i 는 독립변수의 실제 값이다. X_0 는 실제독립변수의 중심값을 나타낸 것이며, X_i 변화 범위를 나타낸 것이다. 독립변수로는 콜라겐의 수율과 함량을 고려하였으나, 추출 조건에 따른 함량의 차이가 거의 나타나지 않아서, 수율을 독립변수 (Y , %)로 정하였다 (Table 2). 독립변수의 중심값과 그 범위는 예비실험의 결과를 토대로 정하였다 (Table 1).

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

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

여기서 Y 는 종속변수로 콜라겐의 수율 (%)을 나타낸 것이며, β_0 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 값은 최적조건으로 하였다.

2.4 아미노산 분석

콜라겐 시료 5 mg을 취하여 6 N 농도의 HCl용액 3 mL를 가

한 후 110°C의 dry bath에서 24시간 동안 가수분해를 하였다. 분해액을 glass filter를 이용하여 감압 여과를 한 후, 감압 건조한 뒤 pH 2.2의 citrate phosphate를 이용하여 10 mL로 정용 하였으며, 일정한 시료를 취하여 아미노산 자동분석기 (S433, Sykam co, Germany)를 이용하여 분석하였다.

2.5 SDS - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

전기영동은 Mini-Protean 3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 사용하여 Laemmli (1970)의 방법에 의해 행하였다. Polyacrylamide gel은 4% stacking gel과 5% resolving gel을 사용하였다. Sample 농도는 증류수를 이용하여 5 mg/mL로 만들고, 10% SDS를 함유하는 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 6.8), 5% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol과 0.1% bromophenol blue로 혼합시킨 뒤 90°C에서 5분간 가열한다. 가열 후 sample 용액을 겔에 주입하고 25 mA/gel의 전류로 전기영동을 한다. 전기영동이 끝난 gel의 염색은 0.25% (w/v) coomassie brilliant blue R250로 하였으며, 육상동물 유래인 calf skin 콜라겐 (Type I collagen)을 marker protein으로 사용하여 비교하였다.

2.6 Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy

FT-IR spectrophotometer (Brooker IFS 88, Germany)를 이용하여 500부터 4000 cm^{-1} 까지 2 cm^{-1} 의 data acquisition rate로 황다랑어 등껍질로부터 추출한 콜라겐과 육상동물인 calf skin 콜라겐의 특성을 알아보았다. Curve fitting은 peakfit software (SPSS Inc., Chicago,

IL, USA)를 이용하여 나타내었다.

2.7 용해도 측정

콜라겐 용해도는 약간 변형되어진 Montero et al. (1991) 의 방법에 따라 0.5 M acetic acid 용액에 콜라겐을 녹여 다양한 pH 와 NaCl 농도 조건하에서 측정하였다. 최종농도 3, 6 mg/mL 로 0.5 M acetic acid 용액에 녹인 콜라겐 시료들은 4°C에서 12시간 동안 서서히 교반하였다.

염농도에 따른 콜라겐 용해도를 측정하기 위하여, 0.5 M acetic acid 용액에 콜라겐을 6 mg/mL 농도로 녹인 콜라겐 용액 5 mL 와 acetic acid 에 NaCl을 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 및 6% (w/v) 의 농도로 녹인 용액 5 mL를 혼합하여 최종 염농도를 (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% (w/v)) 조절 하였다. 혼합액을 4°C에서 30분간 서서히 교반하고 10000×g 의 조건으로 4°C에서 30분간 원심분리 하였다. 상층액의 단백질 농도는 Lowry et al. (1951) 의 방법에 따라 측정하였고 표준물질로 bovine serum albumin (BSA)을 사용하였다. 염농도별 콜라겐 시료의 상대적 용해도는 가장 높은 용해도를 나타낸 NaCl 농도를 기준으로 하여 상대적인 용해도의 비율로 나타내어 계산하였다.

콜라겐 용해도를 pH 변화에 따라 측정하기 위해 3 mg/mL 농도의 콜라겐 용액 8 mL를 원심관에 옮긴 후 6 M NaOH 또는 6 M HCl을 사용하여 최종 pH 2에서 9까지 조절하였다. 시료 용액의 부피는 증류수를 사용하여 10 mL 로 정용하였다. 정용한 용액을 4°C에서 30분간 서서히 교반하고 10000×g 의 조건으로 4°C에서 30분

간 원심분리 하였다. 상층액의 단백질 농도는 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 측정하였고 표준물질로 bovine serum albumin (BSA)을 사용하였다. 콜라겐 용액의 용해도는 앞에서 언급한 방법과 동일하게 구하였다.

2.8 Circular dichroism (CD)의 측정

CD spectra는 JASCO model 725 spectrometer를 이용하여 측정하였다. Sample 0.04 g을 HCl (pH 3)용액에 녹인 후 path length 1 mm의 quartz cell에 주입하였다. CD spectra 측정은 250-190 nm의 파장에서 1 nm 간격으로 측정 속도는 50 nm/min로 하였다. Data는 3번에 걸쳐 모았으며, calf skin 콜라겐을 이용하여 비교하여 나타내었다.

2.9 점도의 측정

점도의 측정은 Kittiphattanabawon et al. (2005)의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. 0.1 M acetic acid 용액에 콜라겐을 0.03% 농도로 녹여 500 mL를 만든다. 점도 측정은 Brookfield Synchroelectric viscometer (Model II+, Brookfield Eng Labs Inc., Stoughton, MA, U.S.A)를 이용하여 spindle No. 1을 이용하여 100 rpm의 조건에서 측정하였으며, 측정 온도 범위는 15-50°C이고 15 °C/min의 속도로 온도 변화를 두었다. 우선적으로 콜라겐 용액을 15°C에서 30분간 유지한 뒤 실험을 하였으며, 실험은 3번 반복하여 측정한 결과를 이용하였다. 상대 점도의 계산은 15°C에서 측정 한 점도를 상대적으로 비교 계산하여 나타내었다.

2.10 변성온도

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

결과 및 고찰

3.1 콜라겐 추출의 통계적 해석

모두 27개의 구간에서 실험이 행해 졌으며, 각각의 구간에 따른 종속변수 (Y , %)을 Table 2에 나타내었다. 실험 결과 얻어진 data를 SAS software의 RSREG procedure를 이용하여 반응표면분석 한 결과를 바탕으로 적합한 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 coefficient의 X_2 ($P=0.9813$)와 X_3 ($P=0.0971$)는 $P>0.05$ 로 유의성을 나타내지 못한 반면에, X_1 ($P=0.0111$), X_4 ($P=0.0226$)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 제외하여 Table 4에 나타내었다.

콜라겐의 독립변수의 결정계수 (R^2)는 0.9621로 나타났으며, $P=0.0001$ 로 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 ($P=0.5927$)을 제외한 1차항 (X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , $P=0.0155$), 2차항 (X_{11} , X_{22} , X_{33} , X_{44} , $P<0.0001$)은 95% 이상의

Table 3. 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	26.6667	0.4911	54.29	<.0001
X_1	0.5208	0.1736	3.00	0.0111
X_2	0.0042	0.1736	0.02	0.9813
X_3	-0.4542	0.1736	-2.62	0.0226
X_4	-0.3125	0.1736	-1.80	0.0971
X_1X_1	-2.1385	0.1842	-11.61	<.0001
X_1X_2	-0.2938	0.2127	-1.38	0.1924
X_2X_2	-2.3885	0.1842	-12.97	<.0001
X_1X_3	0.0312	0.2127	0.15	0.8856
X_3X_2	-0.1438	0.2127	-0.68	0.5119
X_3X_3	-2.2510	0.1842	-12.22	<.0001
X_4X_1	-0.068	0.2127	-0.32	0.7521
X_4X_2	0.0319	0.2127	0.15	0.8856
X_3X_4	-0.3188	0.2127	-1.50	0.1598
X_4X_4	-1.8385	0.1842	-9.98	<.0001

X_1 (concentration of NaOH, N), X_2 (treatment time, hrs),
 X_3 (concentration of enzyme, ratios), X_4 (treatment time, hrs).

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

Responses	Quadratic polynomial model	R^2	P -value
Yellowfin tuna	$Y=26.667+0.521X_1-0.454X_3-2.139X_1^2-2.389X_2^2-2.251X_3^2-1.839X_4^2$	0.9621	0.0001

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

Sources	DF	SS	MS	<i>F</i> -value	<i>P</i> -value
Regression					
Linear	4	13.81	3.45	4.77	0.0155
Quadratic	4	203.25	50.81	70.21	<0.0001
Cross-product	6	3.44	0.57	0.79	0.5927
Model	14	220.49	15.74	21.76	<0.0001
Residual					
Lack of fit	10	8.64	0.86	37.02	0.02
Pure error	2	0.05	0.02	-	-
Total error	12	8.68	0.72	-	-
Total	26	229.17	8.81	-	-
Factors					
X_1	5	105.55	21.11	29.17	0.0001
X_2	5	123.44	24.69	34.11	0.0001
X_3	5	115.02	23.00	31.79	0.0001
X_4	5	76.17	15.23	21.05	0.0001

DF (degrees of freedom), SS (sum of square), MS (mean square).

X_1 (concentration of NaOH, N), X_2 (treatment time, hrs),

X_3 (concentration of enzyme, ratios), X_4 (treatment time, hrs).

수준에서 유의성이 인정되었다. 그리고 회귀식은 $P < 0.01$ 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

황다랑어 등껍질 콜라겐의 최적 추출조건을 밝히기 위해 중심 합성 계획법 (CCD, Box, & Wilson, 1951)에 의해 중심값을 정하였다. NaOH의 농도 (0.9 N, X_1), 처리시간 (24 hrs, X_2), 효소처리 농도 (1:10 ratios, X_3), 처리 시간 (24 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 음수으로써 정상점으로 최고치를 나타내었다. 황다랑어를 이용한 콜라겐 추출 시 최적 조건 일 때의 code 값은 $X_1 = 0.12$, $X_2 = 0$, $X_3 = -0.09$ 그리고 $X_4 = -0.08$ 로 나타났다. 즉 NaOH 처리 시 농도 (X_1) 0.92 N, 처리시간 (X_2) 24 hrs, 효소 처리 시 농도 (X_3) = 1:9.8 ratios 가수분해 시간 (X_4)은 23.5 hrs 일 때 최적 수율을 보이는 것으로 나타났다 (Table 6). 반응 표면 분석 결과 위의 조건에서 추출하였을 경우 예상되는 콜라겐의 수율 (Y, yield (%))은 26.7%로 나타났으며, 실제 추출 한 결과 27.1%로 예상치 보다 0.4% 높게 나왔으나 큰 차이를 보이지 않았다 (Table 6).

Fig. 3은 독립변수 (X_1 , X_2 , X_3 , X_4) 가 종속변수 (Y)에 미치는 영

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

Dependent variables	Independent variables	Critical value		predicted value	Stationary point
		coded	uncoded		
Y	X_1	0.12	0.92	26.7	Maximum
	X_2	0	24		
	X_3	-0.09	1:9.8		
	X_4	-0.08	23.5		

X_1 (concentration of NaOH, N), X_2 (treatment time, hrs),

X_3 (concentration of enzyme, ratios), X_4 (treatment time, hrs).

향을 Maple software (Maple 7. Waterloo Maple Inc., Canada)를 이용하여 3차원 그래프로 나타내었다. 콜라겐 추출 공정에 중요한 영향을 미치는 요인으로서는 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 , 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. 3). 두개의 반응표면 그래프는 모두 coded 값이 0에 가까울수록 종속변수인 콜라겐 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 coded 값이 0에서 -2로 감소 할 경우 수율 (Y, %)에 영향을 적게 미치는 것으로 나타났다. 이는 알칼리 농도 (X_1) 조절을 적절히 하여 비 콜라겐 단백질의 제거 및 팽윤을 시키는 것이 콜라겐 추출을 위한 효소의 농도 (X_3)의 조절보다 큰 영향을 미치는 것으로 여겨진다. 따라서, 콜라겐 추출 시 가장 중요한 요인으로 작용하는 것은 X_1 (NaOH의 농도, N)으로 나타났다.

3.3 콜라겐의 아미노산 조성

황다랑어 콜라겐과 calf skin 콜라겐의 아미노산 잔기의 함량을 비교하여 Table 7에 나타내었다. 콜라겐의 식품에 적용 시 중요한 특성 중 하나로 열에 대한 안정성을 들 수 있다. 콜라겐의 아미노

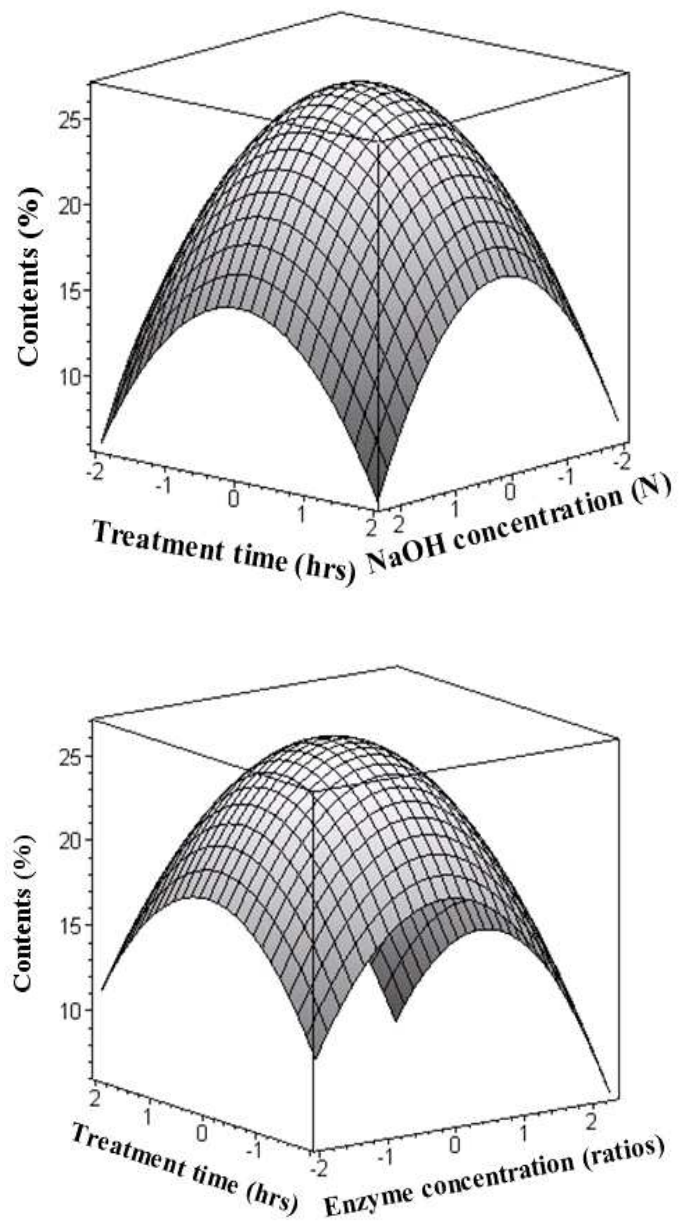


Fig. 3. Response surface plots for optimization of collagen extraction from dorsal skin of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*).

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

(%)

Amino acids		
	Yellowfin tuna	Calf skin
Hydroxyproline	8.0	9.9
Aspartic acid	6.9	6.8
Threonine	3.5	2.0
Serine	4.1	3.5
Glutamic acid	11.3	10.9
Proline	12.5	11.7
Glycine	25.1	24.1
Alanine	9.2	7.8
Valine	2.4	2.8
Isoleucine	1.1	1.7
Leucine	2.7	3.3
Tyrosine	0	0.6
Phenylalanine	1.5	2.4
Histidine	0.8	1.1
Lysine	3.2	4.0
Arginine	7.6	7.3
Cystein	0.1	1.0
Imino acids ¹⁾	20.5	21.6
Total	100.0	100.0

¹⁾ Imino acids mean proline and hydroxyproline.

산 구성은 Gly-Y-X 배열이 반복되어 있으며, 이들은 triple helical을 이루고 있는데, Gly-X-Y가 Gly-Pro-Hyp일 때 hydroxylproline 잔기는 pyrroliding ring의 hydroxyl group에 의해 콜라겐 triple helix의 열 안정성을 높여 준다 (Johnston-Banks, 1990). 또한 hydroxyproline의 함량은 콜라겐으로부터 유도되는 젤라틴의 중요한 기능적 특성인 rheological properties와 겔강도 등에 중요한 영향을 미치며, 함량이 높을수록 좋은 특성을 가진다고 밝혔다 (Gilsenan & Ross-Murphy, 2000; Gómez-Guillén et al., 2002). 따라서 proline, hydroxyproline 잔기의 함량은 콜라겐에 있어서 매우 중요한 것이라 할 수 있다. Calf skin과 황다랑어 콜라겐의 glycine 잔기는 함량은 각각 24.1%, 25.1%로 가장 높게 나타났다. Hydroxyproline 함량은 calf skin 콜라겐의 경우 9.9%로 나타났으며, 황다랑어 콜라겐의 경우는 8.0%으로 calf skin이 높은 함량을 나타내었다. Proline 잔기는 calf skin 콜라겐과 황다랑어 콜라겐이 각각 11.7%과 12.5%로 황다랑어 콜라겐의 함량이 조금 높게 나타났다. Calf skin과 황다랑어 콜라겐의 imino acids (hydroxyproline and proline)의 함량은 각각 21.6%, 20.5%로 육상동물 유래 콜라겐 보다 낮게 나타나 다른 수산 생물 유래 콜라겐과 같은 경향을 나타내었다 (Jongjareonrak et al., 2005; Ikoma et al., 2003).

3.4 콜라겐의 전기영동 특성

SDS-PAGE를 통해 본 연구에서 추출한 황다랑어 콜라겐 (B)과 calf skin 콜라겐 (A)의 전기영동 pattern을 Fig. 4에 비교하여 나타내었다. Calf skin으로부터 추출한 콜라겐은 두개의 α chain ($\alpha 1$ 과

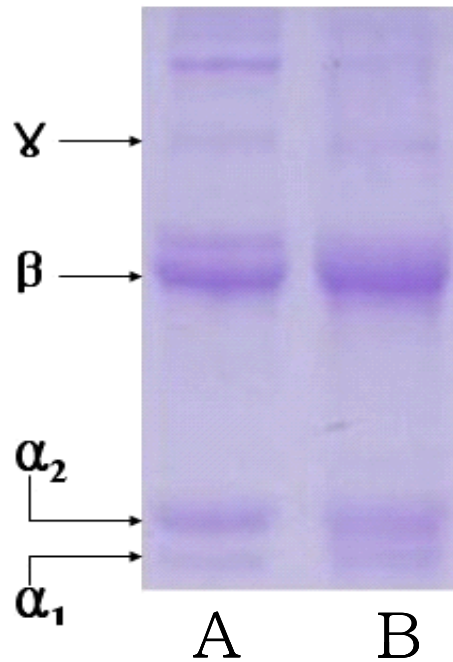


Fig. 4. SDS-PAGE patterns of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and calf skin.

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 dorsal skin of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*).

α_2 , 2:1의 비율)과 β -component, γ -component로 구성되어 있다 (Giraud-guelled et al., 2000). 본 연구에서 추출한 황다랑어 콜라겐 역시 marker protein으로 이용된 calf skin 콜라겐과 같은 유형으로 두개의 α chain (α_1 과 α_2)과 β -, γ - components가 나타났다. 다른 수산 가공 부산물을 이용하여 추출한 콜라겐의 전기영동 pattern을 살펴보면, mackerel 콜라겐은 하나의 α band를 형성했으며, bullhead shark 및 Japanese sea-bass 는 두 개의 α band를 형성했으나 α band 가 희미하게 나타났으며 (Nagai & Suzuki, 2000), Muyonga et al. (2004a)의 연구에서는 황다랑어와 마찬가지로 α chain (α_1 과 α_2)과 β -, γ - components를 보이기도 하였다.

3.5 콜라겐의 **fouriertransform infrared spectroscopy** 특성 해석

황다랑어 콜라겐과 calf skin 콜라겐과의 FT-IR spectra를 Fig. 5에 나타내었다. Spectrum 에서 나타난 amide A, I, II 및 III의 regions는 polypeptide의 형태와 직접적으로 연관이 있다. Amide A band ($3400 \sim 3440 \text{ cm}^{-1}$)는 N-H stretching vibration과 관련이 있다. Amide III band ($1600 \sim 1660 \text{ cm}^{-1}$)는 peptide의 carbonyl group 의 stretching vibrations과 관련이 있으며, 단백질의 2차 구조를 알아보는 데 가장 유용하게 이용이 된다. Amide A ($\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$)는 NH bending 와 CN stretching과 관련이 있으며, amide III ($1320 \sim 1220 \text{ cm}^{-1}$)는 CN stretching과 NH에 의해서 나타나며, 콜라겐의 triple helical 구조와 관련이 있다 (Muyonga et 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,

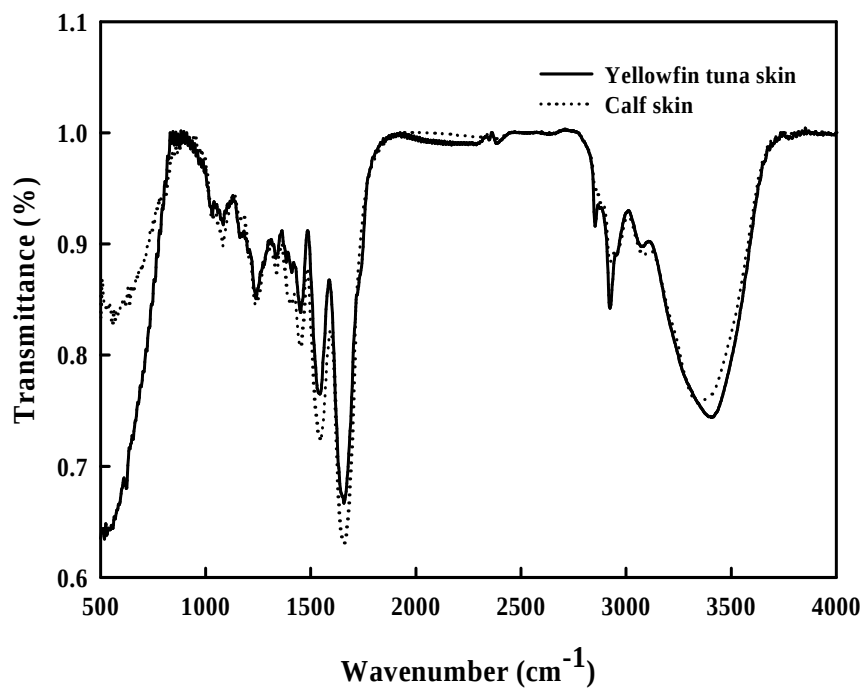


Fig. 5. Fourier transform infrared spectra of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin and calf skin.

Table 8. FT-IR spectra peak positions and assignments for collagens from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin and calf skin

Region	Peak wavenumber (cm ⁻¹)		Assignment
	Calf skin	Tuna skin	
Amide III	1240	1238	NH bend
-	1453	1457	CH ₂ bend
Amide II	1551	1555	NH bend coupled with CN stretch
Amide I	1660	1651	C=O stretch/hydrogen bonding coupled with COO ⁻
NH	3333	3427	NH stretch, coupled with hydrogen bonding

1650, 1542와 1235 cm^{-1} 일 때 peak가 나타났으며, 성어 nile perch 껍질 콜라겐의 amide region 각각 3458, 1654, 1555와 1238 cm^{-1} 에 서 각각의 peak가 나타났다. 본 연구에서 calf skin과 황다랑어 콜라겐의 amide A, I, II 및 III의 region은 각각 3333 cm^{-1} , 3427 cm^{-1} (amide A), 1660 cm^{-1} , 1651 cm^{-1} (amide I), 1551 cm^{-1} , 1555 cm^{-1} (amide II) 그리고 1240 cm^{-1} , 1238 cm^{-1} (amide III)로 비슷한 파장에서 peak를 나타내었다 (Table 8).

3.6 콜라겐의 용해도

Sodium chloride의 농도에 따른 콜라겐의 용해도 측정은 0.5 M acetic acid 용액을 이용하여 측정하였고 NaCl 농도에 따라 Fig. 6에 나타내었다. 황다랑어 콜라겐의 용해도는 NaCl 농도가 4% (w/v)에 이르기까지 천천히 감소하였으며, 4% (w/v) 이상의 농도에서는 용해도 변화가 거의 나타나지 않았다. 다른 어종으로부터 유래한 콜라겐의 NaCl 농도에 따른 용해도 변화를 살펴보면, Jongjareonrac et al. (2005)가 brownstripe red snapper로부터 추출한 펩신 가용성 콜라겐 (PSC)과 산 가용성 콜라겐 (ASC)을 이용하여 측정하였다. PSC의 용해도는 NaCl이 3% (w/v) 농도에서 급격히 감소하여 4% (w/v)이상의 농도에서는 더 이상 감소하지 않는 것으로 나타났으며, ASC의 경우 2% (w/v)에서 용해도가 감소하기 시작 하여 3% (w/v)이상 일 때는 거의 변화가 나타나지 않았다. Montero et al. (1991)은 acetic acid 중에서 송어와 메를루사 껍질의 용해도는 NaCl 농도가 증가함에 따라 감소한다고 보고하였다. 이러한 고농도의 NaCl 농도에서의 콜라겐 용해도 감소는 salting-out 현상의 영

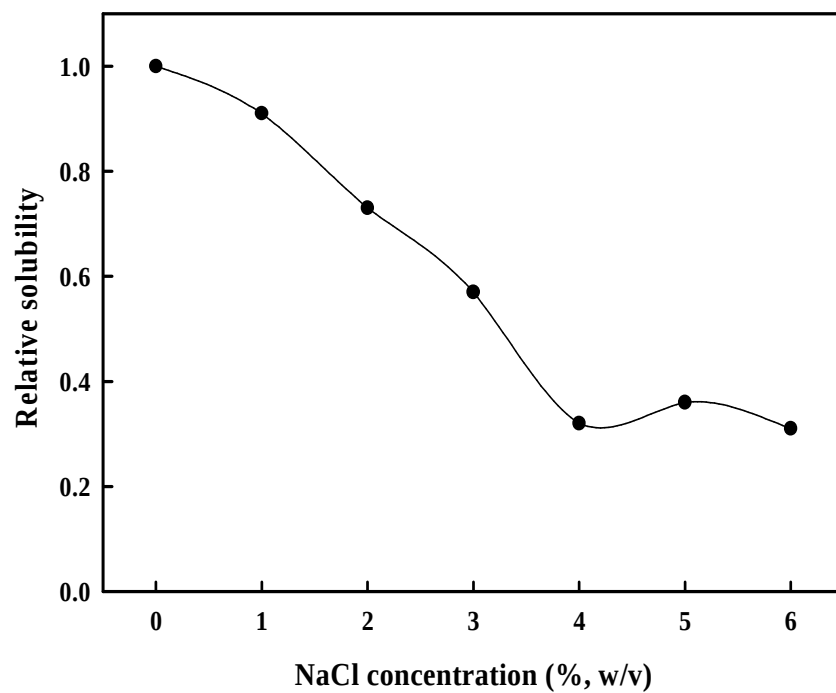


Fig. 6. Solubility in 0.5 M acetic acid on NaCl concentrations of the collagen obtained from dorsal skin of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*)

향이 클 것으로 추정할 수 있다. 이온 강도가 증가할 때, 콜라겐 용해도의 감소는 소수성기-소수성기 간의 상호결합이 강화되는 것에 기인할 수 있고, 물에 대한 염이온의 경쟁으로 인한 단백질 침전을 야기 시킨다 (Damodaran, 1996; Vojdani, 1996).

콜라겐 용해도에 대한 pH의 영향은 Fig. 7에 나타내었다. 0.5 M acetic acid 용액에서의 콜라겐 용해도는 pH 4에 이를 때까지 서서히 감소하는 것이 관찰되었다. pH 4 이상이 되면서 용해도가 급격히 감소하는 결과를 보였고 pH 5에서 9까지는 용해도가 상대적으로 완만하며 낮게 나타났다. 이는 일반적으로 콜라겐이 산성조건에서 높은 용해도를 가짐을 보여주는 것이라 할 수 있는데, 이러한 pH에 따른 단백질 용해도의 다양성은 등전점의 차이에서 기인하는 것으로 볼 수 있다. 단백질의 pH가 등전점 보다 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 등전점에서 단백질 침전과 응집이 야기 된다 (Wong, 1989). 그리고 Foegeding et al. (1996)의 연구에 따르면 콜라겐의 등전점의 범위는 pH 6-9인 것으로 나타났다. Jongjareonrak et al. (2005)은 brownstipe red snapper skin으로부터 ASC와 PSC 콜라겐을 추출하였다. 이들 두 종류의 콜라겐의 pH에 따른 용해도 측정 결과 모두 pH 7에서 가장 낮은 용해도를 나타내었다. 황다랑어 등껍질 콜라겐 역시 Jongjareonrak et al. (2005)과 같이 펩신을 이용해 콜라겐을 추출하였으나, 용해도는 pH 6일때 가장 낮게 나타나 조금 다른 결과를 보였다. 용해도에 따른 다른 결과를 보면, Kittiphattanabawon et al.

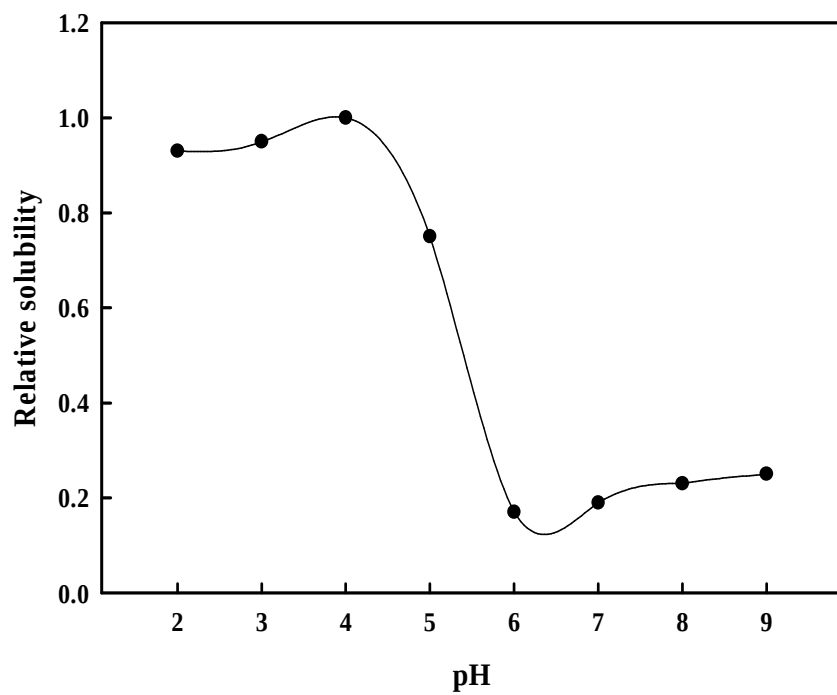


Fig. 7. Solubility in 0.5 M acetic acid on pH of the collagen solution (0.3%) of dorsal skin of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*)

(2005)은 bigeye snapper skin과 bone으로부터 추출한 콜라겐을 이용하여 pH 1-10의 범위에서 콜라겐의 용해도 측정을 하였다. 측정 결과 각각 pH 2와 5에서 가장 높은 용해도를 보였으며, pH가 5에서 6으로 넘어가면서 용해도가 급격히 감소하였다. 각각 pH 7과 8에서 최고로 낮은 용해도를 보였고 그 이상에서는 상대적으로 완만하게 나타나 본 연구결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

3.7 콜라겐의 circular dichroism 해석

황다랑어 콜라겐과 calf skin 콜라겐의 CD spectra를 Fig. 8에 나타내었다. 콜라겐은 221 nm와 191 nm에서 각각 최고와 최저의 peak를 나타내며, 212 nm에서 over point (zero)를 나타낸다. 이는 단백질의 3차 구조에 관해 알려주는 것이다 (Ikoma et al., 2003). Ikoma et al. (2003)은 *Pagrus major*, *Oreochromis niloticas* 와 porcine dermis로부터 추출한 콜라겐을 이용하여 온도대별로 측정한 CD spectra를 비교하였다. 최고 (221 nm)와 최저 (191 nm) peak의 차이가 클수록 열안정성이 높음을 밝혔으며, 어류 유래의 콜라겐보다 육상동물 유래의 콜라겐의 CD spectra가 큰 것으로 나타났다. 본 연구에서 비교한 calf skin과 황다랑어 콜라겐 역시 221 nm와 191 nm에서 각각 최고와 최저의 peak를 나타냈으며, calf skin 콜라겐이 황다랑어보다 차이가 큰 것으로 나타났다 (Fig. 8). 이는 변성온도 측정 결과와 유사한 결과를 나타낸 것이다.

3.8 콜라겐의 점도

콜라겐 0.03% (w/v) 농도를 0.1M 농도의 acetic acid 용액에 녹여

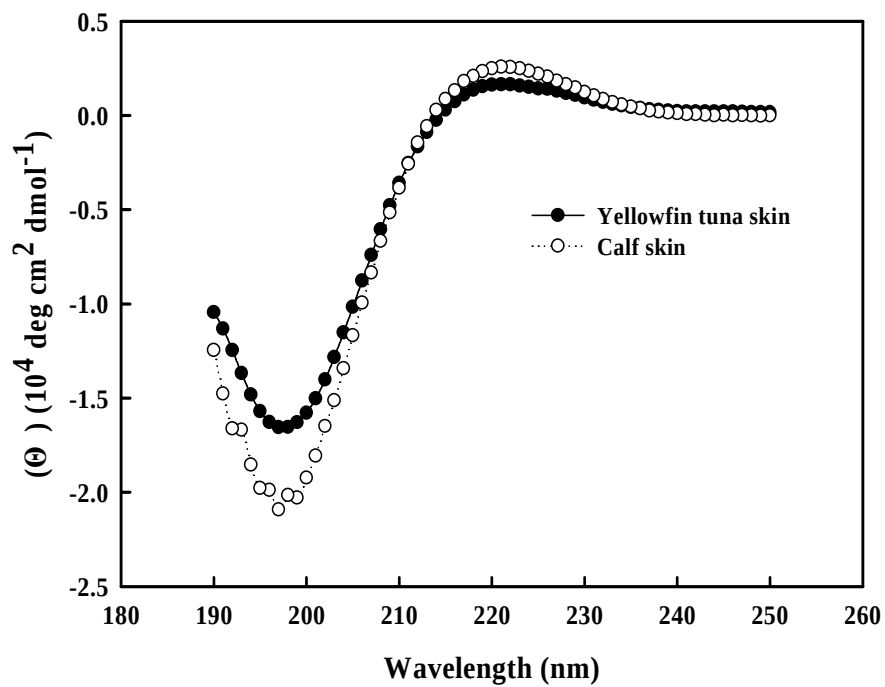


Fig. 8. Circular dichroism for collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin and calf skin.

점도 측정을 하였다 (Fig. 9). 콜라겐 용액의 점도는 32°C에 이르기까지 연속적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 33-50°C의 범위에서는 감소율이 낮아지는 것으로 나타났다. 고온의 열처리에서는 콜라겐의 구조 중에서 수소 결합이 깨진다 (Wong, 1989). 열처리에 따른 콜라겐 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 추출하였다. Bigeye snapper의 bone과 skin 콜라겐 용액의 점도는 30°C에 이르기까지 일정하게 감소하였으며, 35-50°C의 범위에서 감소율은 낮아지는 것으로 나타났다. 이는 황다랑어 등껍질 콜라겐의 점도 변화율과 비슷한 경향을 보이지만, 조금 낮은 온도에서 점도의 감소율이 낮아지는 것으로 나타났다.

3.9 콜라겐의 변성온도

황다랑어 등껍질 콜라겐과 calf skin 콜라겐의 변성온도 (T_d)를 측정하여 Fig. 10에 나타내었다. 콜라겐의 열안전성은 콜라겐을 산업적으로 응용 할 경우 중요한 특성이라 할 수 있다. 이는 열안정성에 관여하는 imino acid (proline and hydroxyproline) 함량과도 깊은 관련이 있다. 여러 어종 유래 콜라겐의 변성온도를 알아보면 chum salmon (19.4°C), saury (23.0°C), common mackerel (26.9°C), bullhead shark (25°C), Japanese seabass (30°C) 그리고 skipjack (29.7°C)로 나타났다 (Nagai & Suzuki, 2000, Kimura et al., 1988). 황다랑어 콜라겐의 변성온도는 31°C로 나타났다. Kimura et al., (1988)의 보고에

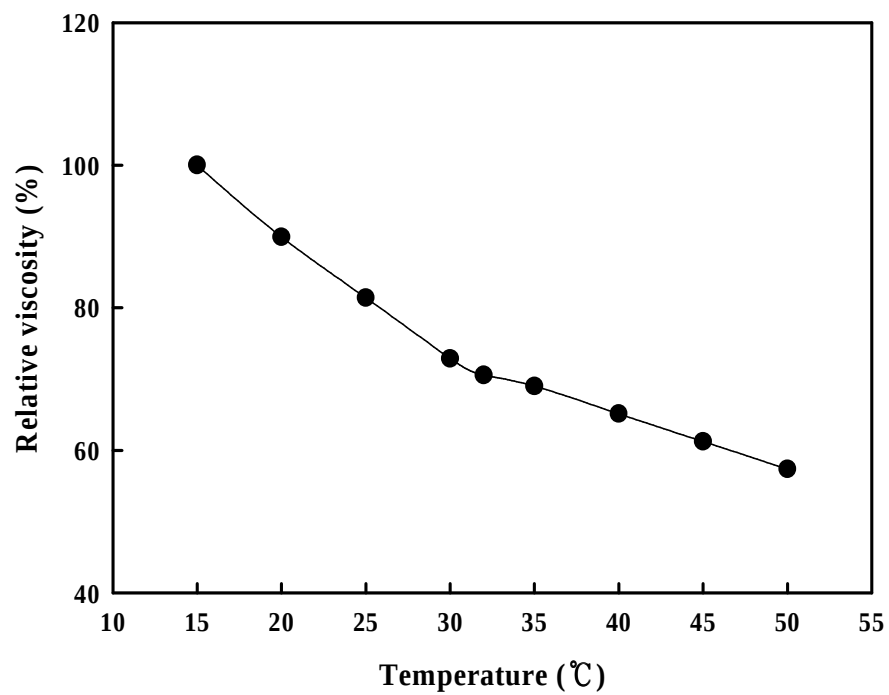


Fig. 9. Relative viscosity at different temperatures of the collagen solution of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin.

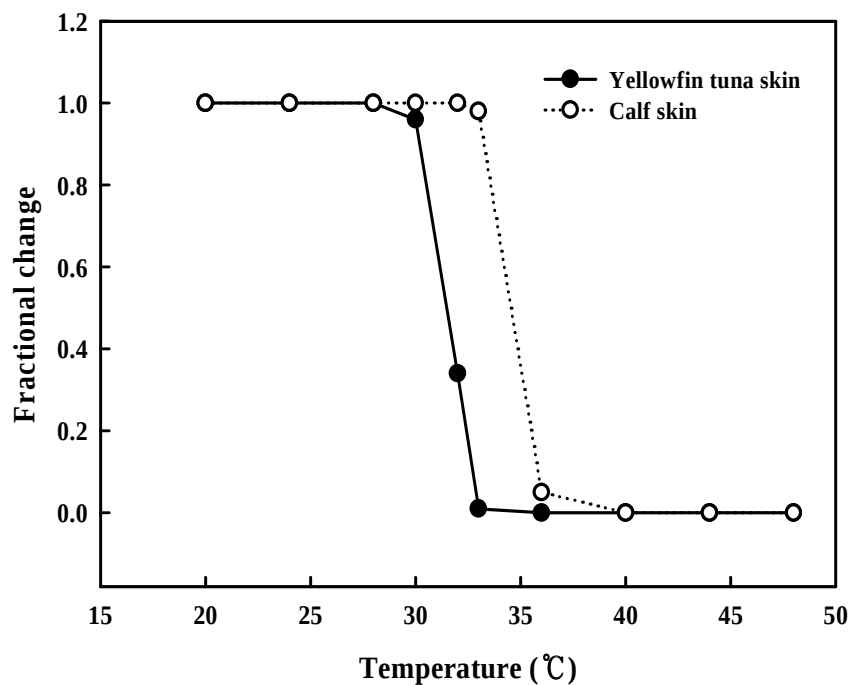


Fig. 10. Thermal denaturation curves determined by measuring the viscosities of yellowfin tuna skin and calf skin collagen solutions in 0.1 M acetic acid.

The incubation time at each temperature was 4 hrs collagen concentration was 0.06%.

따르면, calf skin의 변성온도는 35°C로 4°C 가량 낮게 나타났다. 이는 황다랑어와 calf skin 콜라겐의 아미노산 분석 시 나타난 imino acid의 함량 (20.5%, 21.6%)과 비례하는 결과를 보였으며, circular dichroism (CD) analysis의 측정결과와도 같은 유형의 결과를 나타내었다. 이처럼 일반적으로 어류 유래 콜라겐의 변성온도는 육상동물 유래의 콜라겐보다 낮게 나타난다. 또한, 황다랑어 콜라겐의 변성온도는 육상동물 콜라겐의 변성온도 (35°C) 보다 낮은 것으로 나타났다 (Nagai & Suzuki, 2002).

요 약

콜라겐은 식품, 의약품, 화장품등 넓은 범위에서 다양하게 이용되는 기능성 물질이다. 해마다 콜라겐 산업의 확대됨으로써 콜라겐의 수요가 증가하고 있다. 현재 유통되고 있는 콜라겐은 주로 소, 돼지 등 육상동물 유래의 껍질이나 뼈에서 유래 된 것이다. 하지만 이들 유래 콜라겐은 광우병이나 구제역의 인체 전이 위험성을 가지고 있어, 안정성이 확보된 새로운 원료를 찾는 것이 시급한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 수산물 가공 부산물인 황다랑어 등껍질을 이용하여 콜라겐을 추출하였다. 중심합성계획법 (central composite design)을 이용하여 실험 design을 하였으며, 반응표면분석법 (response surface methodology)을 이용하여 추출 최적조건을 밝혔다. 또한 콜라겐의 특성을 알아보기 위해 아미노산 분석, 전기영동, fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, 변성온도 (T_d), circular dichroism (CD) measurement, 점탄성 그리고 용해도를 측정을 하였으며, 육상동물 유래 콜라겐인 calf skin 유래 콜라겐과 비교하였다.

1. 황다랑어 등껍질 콜라겐의 추출 공정에서 NaOH 처리 및 효소 처리가 가장 중요한 공정이다. 따라서, 독립변수로는 NaOH의 농도 (X_1 , N), NaOH 처리시간 (X_2 , hrs), 효소 농도 (X_3 , ratio), 효소 처리시간 (X_4 , hrs)이 설정되었으며, 종속변수로는 콜라겐 함량 (Y , %)으로 정하였다. 추출 최적 조건은 $X_1 = 0.92$ (N), $X_2 = 24$ (hrs), $X_3 =$

1:9.8 (ratios), $X_4 = 23.5$ (hrs)로 나타났다. 추출 최적 조건에서 예상되는 콜라겐함량은 26.7%로 나타났으며, 실제 콜라겐 추출 시 함량은 27.1%로 큰 차이를 보이지 않았다.

2. 아미노산 분석 결과 calf skin과 황다랑어 콜라겐의 imino acids (hydroxyproline and proline)의 함량은 각각 21.6%, 20.5%로 육상동물 유래 콜라겐 보다 낮게 나타났으나, glycine의 함량은 각각 24.1%, 23.1%으로 황다랑어가 높게 나타났다.

3. 황다랑어 콜라겐의 전기영동 pattern은 calf skin과 같은 이동도를 보였다. 즉 2개의 α (α_1 과 α_2) chains과 β -component 그리고 γ -component로 구성되어 있었다.

4. FT-IR 측정 시 황다랑어 껍질과 calf skin 콜라겐의 amide A, I, II 및 III regions는 각각 3427 cm^{-1} , 3333 cm^{-1} (amide A), 1651 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} (amide I), 1555 cm^{-1} , 1551 cm^{-1} (amide II) 그리고 1238 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} (amide III)에서 나타나 비슷한 경향을 나타내었다.

5. 염농도에 따른 콜라겐의 용해도는 NaCl 농도가 4% (w/v) 농도에 이르기까지 감소하였으며 그 이상이 되면서 용해도의 변화가 거의 없는 것으로 나타났다. pH에 따른 콜라겐 용해도는 pH 2~4의 범위에서 최고치를 나타내었으며, pH 4~6 에서 급격한 용해도의 감소를 보였고 그 이상의 pH에서는 용해도가 상대적으로 완만

하며 낮게 나타났다.

6. Circular dichroism (CD) 측정을 하여 단백질의 3차 구조에 관해 알아보았다. 황다랑어 껍질 콜라겐과 calf skin 콜라겐의 측정 결과 221 nm와 191 nm에서 각각 최고와 최저의 rotatory를 나타냈으며, calf skin 콜라겐이 황다랑어 보다 차이가 큰 것으로 나타났다.

7. 콜라겐 용액의 점도는 32°C에 이르기까지 연속적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 그 이상의 온도 범위에서는 감소율이 낮아지는 것으로 나타났다.

8. 황다랑어 등껍질 콜라겐의 변성온도는 31°C로서 육상동물 유래 콜라겐의 변성온도보다 4°C 낮게 나타났으나, 일반적인 수산생물유래의 콜라겐에 비해 높게 나타났다.

참 고 문 헌

- 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.
- 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, 573-579.
- Damodaran, S. (1996). Amino acids, peptides, and proteins, 3rd Ed. in *Food Chemistry*, pp 321-429. Ed. by Fennema O.R. Marcel Dekker, New York. USA.

- 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 Ed. Fennema O.R. Marcel Dekker. New york. USA.
- 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.
- 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.

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.

Jeyanthi, R., Nagarajan, B., & Rao, K.P. (1991). Solid tumour chemotherapy using implantable collagen poly (HEMA) hydrogel containing 5-fluorouracil. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, 43, 60-62.

Johnston-Banks, F.A. (1990). Gelatin. In P. Harris J.R. (Ed.), *Food gels* pp. 233-289. London: Elsevier Applied Science Publishers.

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., 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, Munehiko. (2005). Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 89, 363-372.
- Kolodziejska, 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.
- Lehninger, A.L. (1975). *Biochemistry* 2nd ed., pp. 145 Worth Publishers Inc., New York. USA.
- 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.
- Marcel, P.E., Wiley, E.R., Bodwell, C.E., & Hornstein, I. (1971). Amino acid composition and cross-linking characteristics of collagen intra-muscular connective tissue of striated muscle (*Bos taurus*) *International Journal of Biochemistry*, 2, 121-126.

- Montero, P., Jimenez-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.
- 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.
- 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.
- 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 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.

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.

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.

Sato, K., Ohashi, C., Ohtski, K., & Kawabata, M. (1991). Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 39, 1222-1225.

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

Vojdani, F. (1996). Solubility, in *Methods of Testing Protein Functionality*, pp 11-60. Ed. by Hall GM . St Edmundsbury, Great Britain.

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

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

부족한 논문이 완성되기까지 도움을 주신 분들께 지면으로나마 감사의 인사를 올립니다. 먼저 졸업이라는 결실을 이뤄 내기에 모자랐던 저를 이끌어주시고 조언해주신 김선봉 교수님께 고개 숙여 깊은 감사의 인사를 드립니다. 또한 논문의 잘못된 부분을 고쳐 주시고 다듬어 주신 이양봉 교수님, 안동현 교수님께 진심으로 감사의 인사를 올립니다. 그리고 많은 지도 편달을 주신 이근태 교수님, 조영제 교수님, 양지영 교수님, 전병수 교수님께도 깊이 감사를 드립니다.

끊임없는 질문에 언제나 열심히 가르쳐 주시며 큰 힘이 되어주신 승목이형, 해진이형 말없이 묵묵히 자리를 지켜 주던 동기이자 친구 같던 선배 정은이에게 멀리서나마 감사의 마음을 전합니다. 게으르고 부족한 저의 뒤를 이어 대학원생으로 실장으로 고생하는 재환이, 힘든 시기 임에도 언제나 밝은 표정으로 껏꿏이 이겨내며 지내는 혜진이, 묵묵히 실험실을 지키는 주련이에게 감사드립니다. 새로이 대학원 생활을 시작하게 될 유나, 철균씨 그리고 같이 실험실에서 동고동락하며 지낸 상훈, 대용, 봄비, 태완, 준영, 경환, 수연이에게 감사의 마음을 전합니다. 바쁜신 와중에도 실험실 일이라면 자신의 일같이 여기시며 관심을 가져주시는 박영훈 선배님, 지청일 선배님, 진형수 선배님, 류영무 선배님, 강승극 선배님, 유승재 선배님, 박덕천 선배님, 김기현 선배님, 성경민 선배님, 박순형 선배님, 이영준 선배님, 윤영수 선배님, 조상원 선배님, 최주현 선배님, 박현덕 선배님 외 많은 보장실 졸업생 선배님

들께도 감사드립니다. 친구로 대학원 동기로 큰 힘이 되어준 권혁, 재희, 선미에게 감사의 마음을 전합니다. 그리고 함께 대학원 생활에서 함께 했던 호수형, 성욱이 누나, 진영, 선희, 윤주누나, 성희 누나, 소영, 윤철, 상민, 꽃봉우리, 유진, 승진, 윤철, 상민, 철윤, 등 많은 대학원 선, 후배 동기 여러분에게 감사의 마음을 전합니다.

힘들거나 기쁠 때 언제나 곁에서 큰 힘이 되어준 미경이에게 마음 깊이 감사드립니다. 술친구로 오랜 벗으로 항상 같은 자리에서 힘이 되어 주는 기용, 현주에게 감사드립니다. 오랜 친구들로 지금은 자주 함께 하지는 못하지만 항상 든든하게 힘이 되어 주는 인철, 동명, 종한, 병관, 정수, 대준, 은희, 재희, 천식이에게 감사의 마음을 전합니다.

가족의 구성원으로써 조언자로서 많은 힘이 되어준 형과 동생에게도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 끝으로 저를 이렇게 건강하게 키워주시고 끝까지 믿어주신 아버지, 어머니께 가슴 깊이 감사의 마음을 전하며 이 논문을 바칩니다.