

당가자미 껍질로부터 수용성콜라겐 제조 및 이화학적 특성

장부식 · 이미진* · 정노희†

충북대학교 공업화학과, *씨엔에이바이오텍(주)
(2013년 5월 24일 접수; 2013년 6월 25일 수정; 2013년 6월 26일 채택)

A Physicochemical Characteristics and Manufacture of Solubility Collagen Peptide from Flatfish Skin

Boo-Sik Jang · Mi-Jin Lee · Noh-Hee Jeong†

Dept. of Eng. Chem., Chungbuk Nat. Univ. Cheongju 361-763 Korea
*CNA Biotech., Co., Ltd.

(Received May 24, 2013 ; Revised June 25, 2013 ; Accepted June 26, 2013)

Abstract ; In this research we extracted water-soluble collagen peptide from flatfish skin and compared it with commercially available collagen peptide extracted from Tilapia scale currently placed on the market in the aspect of physicochemical property. The physical property and nutritional components of FSCP appeared almost similarly to those of TSCP, and also in calorie, FSCP marking 3.82 Kcal showed no differences from TSCP marking 3.84 Kcal. As for forming amino acids, in aspartic acid, serine, histidine, tyrosine, methionine, FSCP had higher content than TSCP, but in OH-proline, proline and alanine FSCP had lower content than TSCP. Especially the content of essential amino acids of FSCP marked 22.74% with a higher content compared with 13.64% of TSCP. In the distribution of molecular weight FSCP with 1,000 Da showed comparatively low compared with TSCP, and in emulsion property and stability FSCP and TSCP showed similar excellent trend.

Keywords ; collagen, collagen peptide, flatfish, amino acid

1. 서론

콜라겐은 동물의 결합조직의 주요 단백질로서 생체 전 단백질의 약 30% 이상을 차지하고 있으며, 주로 조직이나 장기를 지탱하면서 체표를 둘러싸고 있어 체형을 유지시키는 역할을 하며 진

피조직에는 건조 중량의 90% 이상을 차지하고 있다[1]. 콜라겐은 산업적으로 이용된 다른 단백질과 같이 그의 물리화학, 생화학 및 생물학적 연구가 1950년 이후 활발하게 되었다. 그 결과 가용성 콜라겐 펩타이드 발견에 의하여 콜라겐의 연구가 급진전을 보게 되었고, 의약품 건강기능식품 및 화장품 등의 개발에 있어 콜라겐은 중요한 소재가 되고 있다[2]. 즉, 식품으로서의 콜라겐은 햄, 소시지 등에 식감을 높이는 첨가제로 이용되

†Corresponding author
(E-mail : nhjeong@cbnu.ac.kr)

고, 양이나 돼지의 장을 대신해 가식성 식품포장재로 이용될 뿐만 아니라 여러 식품소재로서 광범위하게 이용되고 있다. 의약품으로서 콜라겐은 류마티스 환자에게 경구 투여했을 경우 효과가 있는 것으로 나타났으며, 화상이나 상처에 의해 손상된 피부에 대한 치료효과가 있는 것으로 밝혀져 의료용 고분자 재료로서 외과 수술용 봉합사, 인공투석막, 인공모세관 및 인공장기 등의 용도로 이용되고 있다[3,4]. 이처럼 콜라겐은 식품 및 의약품에서 뿐만 아니라 화장품, 섬유산업 등 넓은 분야에서 다양하게 이용된다. 그리고 현재 콜라겐 산업의 발전으로 인한 수요의 증가로 더욱 많은 콜라겐이 요구되고 있는 실정이며, 동물을 이용한 콜라겐이 지니고 있는 인체 전이 위험성을 배제한 수산물을 이용한 연구가 진행되고 있다[5,6].

현재까지 해양 수산 생물의 가공 부산물을 이용한 콜라겐 추출 및 연구는 bigeye snapper(*Priacanthus*)[7], nile perch(*lates niloticus*)[8], great blue shark(*Prionace glyca*)[9], bullhead shark(*Heleodontus japonicus*)와 chub mackerel(*Scomber japonicus*)[10], squid(*Illex argentinus*)[11], 황다랑어[12] 등의 껍질이나 비늘 및 뼈 등에서 추출하여 특성을 밝혔다. 이와 같이 수산물의 가공 공정 중에 발생하는 부산물을 이용한 콜라겐 추출이 주를 이루고 있으며, 이들에 대한 기능성에 관한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 그러나 최근에는 각종 해양 수산물의 부산물로부터 추출된 어류 콜라겐에 대해서 그 구조와 특성이 밝혀지고 있으나, 어류 콜라겐의 산업적 응용은 어류 비늘에서 추출한 콜라겐이 대부분 이용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 어류 가공과정 중에 발생하는 부산물 중의 하나인 가자미의 껍질에서 수용성의 가자미껍질 콜라겐펩타이드(Flatfish Skin Collagen Peptide Powder, 이하 FSCP로 명함)를 제조한 후 현재 식품 및 화장품 원료 등 여러 분야에 다양한 용도로 시판되고 있는 씨엔에이바이오텍(주)의 어류비늘인 Tilapia scale에서 추출한 Tilapia scale 콜라겐펩타이드(Tilapia Scale Collagen Peptide Powder, 이하 TSCP로 명함)를 비교군으로 하여 물리화학적 특성을 비교 검토하였다.

2. 실험방법

2.1. 실험재료 및 가수분해 효소

본 실험에서 사용된 재료로는 가자미 껍질은 포항의 (주)유창수산에서 구입하여 사용하였고, 어류비늘 콜라겐은 베트남산의 Tilapia scale을 구입하여 사용하였다. 그리고 본 실험에 사용된 단백질 가수분해용 효소는 *alcalase*(Subtilisin EC 3.4.21.62 from *Bacillus licheniformis* 2.4 AU/mg), *neutrase*(EC 3.4.24.28 from *Bacillus amyloliquefaciens*, 0.8 AU/mg)는 덴마크 Novozyme 사의 제품을 구입 사용하였다.

2.2. 콜라겐 펩타이드의 제조

가자미 껍질에서 FSCP를 제조하기 위한 방법은 씨엔에이바이오텍(주)의 제조방법[13]에 따라 Fig. 1과 같은 제조 공정에 의하여 제조하였다. FSCP의 원재료인 가자미 껍질의 조직을 팽윤시키기 위하여 정제수를 이용하여 1:4의 비율로 침지시키고 shaking incubator에서 55~60°C, 200 rpm으로 30분간 교반하였다. 여기에 5% NaOH를 사용하여 pH 7에 맞추고 원재료의 원료대비 0.06%의 *alcalase* 첨가하여 30분간 교반하면서 1차 가수분해시키고, 원료 대비 0.06%의 *neutrase*를 첨가하여 30분간 교반하여 2차 가수분해시켰다. 효소를 이용한 가수분해를 마친 시료는 200 mesh 체를 사용하여 1차 여과 즉 추출액과 잔여물을 분리하였다. 1차 여과된 여액을 감압 하에서 cotton filter(10 μ m)를 사용하여 2차 여과하여 불순물을 제거한 후 여액을 85°C에서 30분 동안 가열하여 남아 있는 효소를 불활성화시키고 콜라겐 펩타이드 용액을 얻는다. 이렇게 하여 얻은 추출액에 액량의 중량대비 0.7%의 활성탄을 첨가하여 shaking incubator에서 50°C, 200 rpm의 조건으로 30분 동안 교반하면서 탈색·탈취시켰다. 1차 정제된 콜라겐 펩타이드 추출액을 이온교환수지를 이용하여 추출액에 포함되어 있는 유리아미노산이나 그의 염을 제거하는 2차 정제 즉, 탈이온처리를 하였다. 그리고 추출액을 1 μ m의 membrane filter를 사용하여 감압 여과함으로써 난용성 불순물을 제거한 뒤 spray dryer를 이용하여 분무 건조함으로써 순수한 수용성 FSCP를 제조하였다.

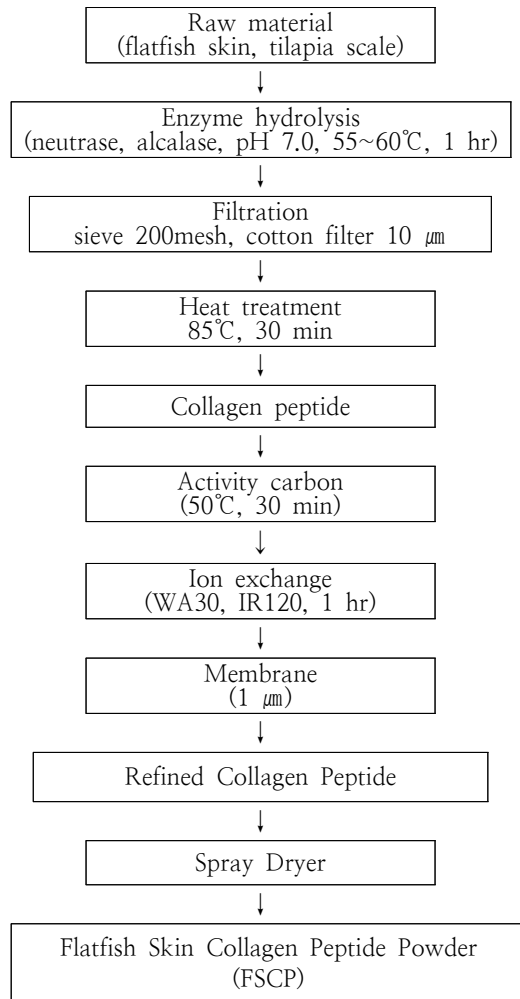


Fig. 1. Production process of collagen peptide from Flatfish Skin.

2.3. Flatfish Skin Collagen Peptide의 특성 분석

2.3.1. 물리적 특성

추출 정제하여 얻은 FSCP에 대한 색상, 맛 및 냄새 등에 대한 관능평가를 실시하였고, pH, 비중 및 점도 등을 측정하여 TSCP와 비교 검토하였다.

2.3.2. 영양성분 및 열량

FSCP에 대한 영양성분 분석은 식품 공전 시험법[14]에 준하여 실시하였고, 조단백 분석은 세미마이크로칼달법으로, 조지방 함량은 에테르 추출

법으로 그리고 탄수화물 분석은 벨트란 법으로 분석하였다. 열량 분석은 에크워터계수를 사용하여 계산하였으며 영양성분을 분석한 결과에 의하여 콜라겐 펩타이드 중 가자미 껍질에서 추출한 FSCP와 어류 비늘에서 추출한 TSCP에는 측정된 조단백질 함량에 4.0의 에너지 환산계수를 곱하여 열량계산을 하였고, 그 외 조지방 및 탄수화물 함량에 8.37 및 3.57의 각각의 에너지 환산계수를 곱하여 그 합을 총열량으로 환산하였다.

2.3.3. 아미노산 조성분석

FSCP에 대한 아미노산 조성 분석은 PITC 라벨링 한 후에 Automated Amino Acid Analyzer에 의해 Waters 510 HPLC을 이용해서 행하였고, 추출 및 전처리 방법은 시료 중 1000 μ l를 취하여 PICO-tag 방법을 이용하여 가수분해 및 PITC 라벨링을 한 후 시료 400 μ l중에서 20 μ l를 취하여 HPLC에 로딩하여 크로마토그램을 얻었다. 분석조건은 Table 1과 같다.

2.3.4. 분자량 분석

FSCP에 대한 분자량 측정은 MALDI-TOF Mass Spectrometer(Voyager-DETMSTR Spectrometer, Perceptive Biosystems, USA)를 사용하여 분석하였다.

2.3.5. 유화성 및 유화안정성 측정

FSCP에 대한 유화성 및 유화안정성 측정은 Wang가 Kinslla의 방법[15]에 의해 각 시료 2.0 g에 증류수 10 ml씩을 가하여 균질기(Ace homogenizer AM-8)로 5,000rpm에서 1분간 분산시킨 후, 대두유 10 ml 가하여 15,000 rpm에서 5분간 균질화 하였다. 이와 같이 생성된 유화액을 절반씩 원심관(12 × 100 mm)에 나누어 넣고 2,500rpm에서 5분간 원심분리하여 다음의 식에 의해 유화성을 측정하였다.

$$\text{유화성} = \frac{\text{유화된 층의 높이}}{\text{시험관내 총 내용물의 부피}} \times 100$$

유화안정성은 유화액을 80°C water bath에서 30분간 가열한 후, 15°C로 냉각한 다음 2,500 rpm에서 5분간 원심분리한 후 유화성 측정과 같은 방법으로 측정하였다.

Table 1. Operating Condition for Amino Acid Analysis

| Items | Conditions |
|----------------------|--|
| Model | Waters 310 HPLC pump Waters Gradient Controller Waters 717 Automatic sampler |
| Column | Waters Pico-tag column(3.9300mm, 4 μ m) |
| Detector | Waters 996 photodiode array(PDA) detector, 254nm |
| Data analysis | Millenium 32 chromatography manager |
| Reacion amount | 100 μ l or mg |
| Injection volume | 50 μ l |
| PITC-labeling volume | 400 μ l |
| Injection amount | 12.5 μ l or mg |

3. 실험 결과 및 고찰

3.1. 물리적 특성

FSCP는 비교군인 TSCP와 동일한 농도로 비교 시 두 가지 모두 가용성 콜라겐펩타이드로 무색 또는 미황색이었고, 약간의 특이취가 있으나 강하지 않았으며, 담백한 맛을 나타내었다. Table 2에서 보는 바와 같이 FSCP와 TSCP의 pH, 비중 및 점도는 거의 유사하게 나타났다.

3.2. 영양성분 및 열량

Table 3에 나타난바와 같이 FSCP를 본 논문 2.3.2의 방법으로 탄수화물, 조단백, 조지방, 회분 및 수분 등의 영양성분과 열량분석 결과 수분을 제거하고 wet basis로 살펴볼 때 조 단백질인 경우 100%에 가깝게 나타났으며, 탄수화물, 조지방

분은 거의 나타나지 않았다. 따라서 열량에 있어서도 FSCP와 TSCP는 3.82, 3.84 kcal로 거의 차이가 없는 것으로 나타났다.

3.3. 아미노산의 조성

FSCP의 아미노산의 조성은 Table 4와 같다. Table 4에서 보는 바와 같이 FSCP의 아미노산 조성은 glycine이 20.54%로 가장 높았으며 glutamic acid, arginin, proline이 10.29%, 9.87%, 9.44%이었으나, Cystine-2, Trptophan, Cystine은 함량이 매우 낮았다. FSCP의 필수아미노산 함량은 22.74로 TSCP의 13.64 보다 높았다. 그리고 FSCP와 TSCP의 아미노산 조성을 보면 aspartic acid, serine, histidine, tyrosine, methionine은 FSCP가 TSCP에 비해 그 함량이 높았으나, OH-proline, proline, alanine은 오히

Table 2. Physical Characteristic of Collagen Peptide from Flatfish Skin and Tilapia Scale

| ITEM | pH | Viscosity (mpa.s) | Speccific gravity |
|------|-----|-------------------|-------------------|
| FSCP | 5.7 | 5.9 | 1.000 |
| TSCP | 5.9 | 6.1 | 1.001 |

Table 3. Nutritional elements and Calorie of Collagen Peptide from Flatfish Skin and Tilapia Scale (%)

| ITEM | Calorie (kcal/g) | Crude protein | Crude Fat | Carbohydra te | Moisture | Ash |
|------|------------------|---------------|-----------|---------------|----------|-----|
| FSCP | 3.82 | 95.5 | 0.0 | 0.0 | 4.0 | 0.5 |
| TSCP | 3.84 | 95.9 | 0.0 | 0.0 | 4.0 | 0.1 |

Table 4. Amino Acid Compositions of Collagen Peptides from Flatfish Skin and Tilapia Scale(%)

| Amino acid | Collagen peptide | | Amino acid | Collagen peptide | |
|---------------|------------------|-------|----------------|------------------|------|
| | FSCP | TSCP | | FSCP | TSCP |
| Cystine | 0.21 | 0.20 | Tyrosine | 1.00 | 0.11 |
| Aspartic acid | 7.89 | 3.02 | *Valine | 2.68 | 1.80 |
| Glutamic acid | 10.29 | 8.89 | *Methionine | 2.29 | 0.25 |
| OH-Proline | 6.91 | 15.79 | Cystine-2 | 0.52 | 0.14 |
| Serine | 4.20 | 2.68 | *Leucine | 3.24 | 2.70 |
| Glycine | 20.54 | 21.03 | *Phenylalanine | 2.00 | 1.87 |
| *Histidine | 2.20 | 0.81 | Trptophan | 0.27 | 0.05 |
| Arginin | 9.87 | 8.31 | *Lysine | 5.38 | 2.93 |
| *Threonine | 3.16 | 2.16 | Alanine | 6.12 | 9.03 |
| Proline | 9.44 | 16.91 | *Isoleucine | 1.79 | 1.12 |

* Essential amino acid in children

려 TSCP가 FSCP에 비해 그 함량이 높았다. 피부의 보습역할을 하는 주된 인자 중의 하나인 hydroxyproline의 함량은 FSCP에서는 6.91%, TSCP에서는 15.79%로 나타났으며, Glycine의 함량에 있어서는 FSCP에서 21.03% TSCP에서는 32.5%를 보였고, Serine의 함량에서는 FSCP에서 4.20% TSCP에서는 2.68%를 지니고 있는 것으로 나타났다. 즉, FSCP에서도 TSCP 못지않게 피부의 탄력과 관계되는 피부 조직의 수복 작용의 역할을 하는 아미노산을 함유함으로써 화장품 소재로서의 기능을 갖추고 있는 것을 알 수 있다.

3.4 분자량 측정

제조된 FSCP와 TSCP에 대한 분자량 측정결과를 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다. 분자량 분포는

Fig. 2와 Fig. 3에서 보는 바와 같이 FSCP는 1,000 Da 이하의 비교적 낮은 분자량 분포를 보이고 있고, TSCP는 1,800 Da 이하의 분자량 분포로서 두 가지 모두 평균분자량이 약 1,000정도를 보이고 있다. 일반적으로 피부에 흡수 가능한 분자량을 3,000 Da으로 보고 한 바에 따르면 화장품 소재로 이용할 경우 일부는 피부로 흡수되고 일부는 잔존하겠지만 대부분이 흡수가 됨으로서 피부의 보습 및 코팅효과가 있을 것으로 사료된다.

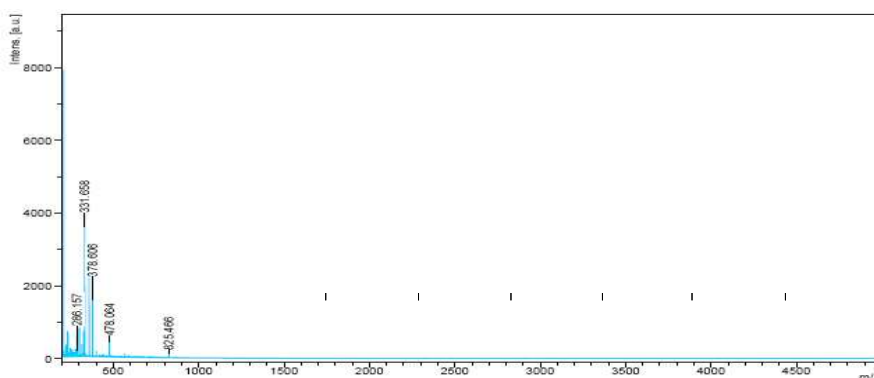


Fig. 2. Distribution of molecular weight on collagen peptide from Flatfish Skin.

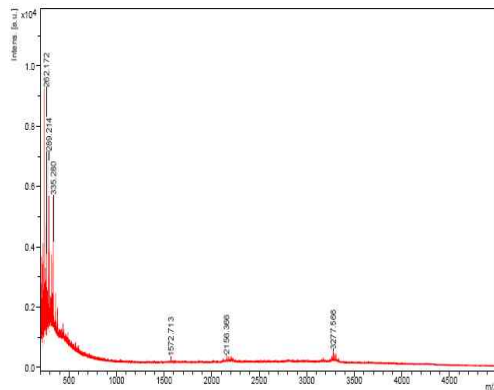


Fig. 3. Distribution of molecular weight on collagen peptide from Tilapia Scale.

3.5 유화성 및 유화안정성 측정

FSCP에 대한 유화성 및 유화안정성을 측정하는 결과는 Fig. 4와 Fig. 5에 나타난 바와 같이 FSCP와 TSCP가 유사한 경향을 보였으며, pH 4에서 pH 8 범위에서 유화성 및 유화안정성이 우수한 결과를 나타냈다. Aoki[16] 등은 단백질의 등전점에서 유화력이 불안정하다고 하였고, Crenwelge[17] 등은 단백질이 등전점 영역을 벗어나게 되면 emulsion의 pH에 따라 유화력은 증가한다고 하였다. FSCP와 TSCP 또한 등전점인 pH 8에서 pH 9 범위에서 유화력이 낮아짐을 알 수 있었다. 동물기원 단백질인 myosin, actin, tropomyosin 등 단백질의 유화력에 대하여 많은 연구보고가 있지만[18], 콜라겐펩타이드의 유화력에 대해서는 보고되어 있지 않은 바 앞으로 콜라겐펩타이드의 기능성 개선을 위해 유화제로서의 응용성도 가치가 있을 것으로 사료된다.

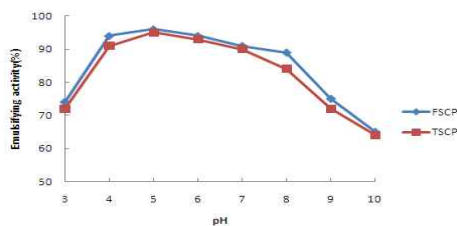


Fig. 4. Emulsifying activity of Collagen Peptide from Flatfish Skin and Tilapia Scale.

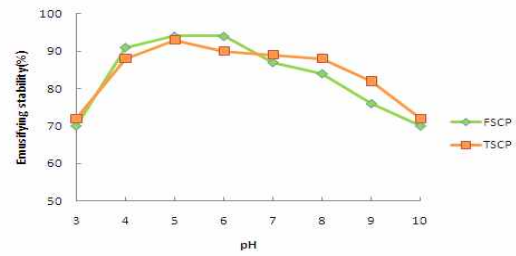


Fig. 5. Emulsifying stability of Collagen Peptide from Flatfish Skin and Tilapia Scale.

4. 결 론

어류 가공과정 중에 발생하는 부산물 중 하나인 가자미 껍질로부터 수용성의 FSCP를 제조하여 현재 화장품 및 식품 재료로 시판 중인 TSCP와 물리적인 특성을 비교한 결과는 다음과 같다.

1. FSCP에 대한 물리적 특성은 무색 또는 미황색의 원재료 특유의 약간의 냄새를 지니고 있으며, 담백한 맛을 보이는 것이 TSCP와 비슷한 경향을 나타내었고, 영양성분에 있어서도 회분과 수분을 제외하면 모두 단백질로 구성되어 있으며, 열량에 있어서도 FSCP의 경우 3.82 kcal TSCP의 경우 3.84 kcal로 거의 유사한 결과를 나타냈다.
2. 분자량 측정결과 FSCP가 TSCP에 비하여 비교적 낮은 1,000 Da 이하의 분자량 분포를 나타냈다.
3. 아미노산 조성에서는 피부의 보습과 탄력에 영향을 주는 아미노산 성분으로서 hydroxyproline, glycine, serine의 함량은 FSCP에서 TSCP보다는 조금 낮은 함량을 보였지만 FSCP도 TSCP 못지 않게 피부의 탄력과 관계되는 피부 조직의 수복 작용의 역할을 할 수 있는 화장품 소재로서의 기능을 갖추고 있었다.
4. 유화성과 유화안정성에 있어 FSCP와 TSCP가 유사한 경향을 보였으며, pH 4에서 pH 8 범위에서 유화성 및 유화안정성이 우수한 결과를 나타냈다.

REFERENCES

1. A.K. Piez, "Encyclopedia of Polymer Science and Engineering". Collagen, in : J. I. Koroschwitz(ED.), New york, 699-727 (1985).
2. T. Miyata, Basic properties of collagen., *Fragrance Journal*, **17**, 90-96(1989).
3. R. Jeyanthi, B. Nagarayan and K.P.Rao, Solid tumour chemothraphy using implantable collagen poly (HEMA) hydrogel containing 5-fluorouracil. *Journal of Pharmarcy & Phamacology*, **43**, 60-62(1991).
4. S.K. Kim, Use of the high technology shell fish: fish skin gelatin extraction and purification methods used., *Fisheries Association* **42**, 57-65(1993).
5. M. Sadowska, I. Kolodziejska and C. Niecikowska, Isolation of collagen from skins of Baltic cod (gadus morhua). *Food Chem.*, **81**:257~262(2003).
6. C.H. Park, Functional Properties and Utilization of Collagen and Gelatin from Surimi Byproducts, Refiner Discharge, *Gyeongsang National University* (2006).
7. P. Kittiphattanabawon, S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai and T. Munehiko., Charactersation of acid-soluble collagen from skin and of bigeye snapper (Priacanthus tayenus)., *Food Chemistry*, **89**, 363-372 (2005).
8. J. H. Muyonga, C.G.B. Cole and K. G. Duodu, Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (Lates niloticus)., *Food Chemistry*, **85**, 81-89 (2004).
9. K. Yoshimura, M. Terashima, D. Hozan and K. Shirai, Preparation and dynamic viscoelasticity charaterization of alkali-solubilized collagen from shark skin., *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, **48**, 685-690(2000).
10. T. Nagai and N. Suzuki, Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fines., *Food Chemistry*, **76**, 277-281(2000).
11. I. Kolodziejska, Z.E. Sikorski, and C. Niecikowska, Parameters affecting the isolation of collagen from aquid (Illex argentinus) skins., *Food Chemistry*, **66**, 153-157(1999).
12. J.W. Woo, Extraction and Physicochemical Properties of Collagen from Dorsal Skin of Yellowfin Tuna, *Pukyong National University* (2006)
13. B.S. Jang, M.J. Lee, A method of vegiterble and marin collagen peptide, *Korea patent No. 0488913*, (2003).
14. KFIA, Krean Food Standards Codex, Seoul *Moonyongsa* (2003).
15. J.C. Wang., J.E. Kinella, *J. Food Sci.*, **41**:286(1976).
16. H. Aoki, O. Taneyama, M. Inami, Emulsifying properties of soy protein: Characteristics of 7S and 11S proteins., *J. Food Sci.*, **45** : 535(1980).
17. D.D. Crenwelge, C.W. Dill, P.T. Tybor, W.A. Landmann, A comparson of the emulsification capacities of some protein concentrates., *J. Food Sci.*, **39**, 175(1974).
18. A. Dawood, Ph. D. Thesis, Michigan State University, East Lansing(1980).