

오징어 및 명태껍질 유래 콜라겐의 추출 및 물리화학적 특성

양수진 · 홍주현[†]

대구가톨릭대학교 식품가공학전공

Extraction and Physicochemical Properties of Collagen from Squid (*Todarodes pacificus*) skin and Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin

Su Jin Yang and Joo-Heon Hong[†]

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

Abstract

The collagens from squid (*Todarodes pacificus*) skin and Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin were extracted and their physicochemical properties were investigated. The yield was improved with the increase of NaOH concentration and was increased Neutrase than Alcalase in enzymatic hydrolysates. Protein and collagen contents from Alaska pollack skin were 38.3~62.7% and 13.1~28.9%, respectively. All enzymatic hydrolysates also showed high antioxidant activities as NaOH concentration decrease. Composition of their amino acids was mainly glycine and proline. The spectrum of FT-IR of the collagen showed wavenumber at 1,631 cm⁻¹, 1,549 cm⁻¹, 1,234 cm⁻¹ and 3,322 cm⁻¹ representing the regions of amide I, amide II, amide III and amide A, respectively. The decomposition temperature for the collagen was in the range of 300°C and showed relatively good enough for their thermal stabilities.

Key words : squid skin, Alaska pollack skin, collagen, extraction condition, physicochemical properties

1. 서론

콜라겐은 동물성 기원의 풍부한 섬유상 구조단백질로 척추 및 무척추 동물 유래 총 단백질의 30%를 차지하고 3중 나선 구조를 이루며 여러 가지 형태로 주로 피부, 뼈, 치아 유기물질의 대부분을 형성하는 역할을 하고 특히 뼈와 피부(진피)에 함량이 높다(Jerome SP 등 1998). 콜라겐을 이루는 기본단위는 tropocollagen으로 분자 내 또는 분자간 공유결합성 가교 결합을 이룸으로서 물리적 또는 생물학적 안정성을 가지며(Kim SK 등 1991), 콜라겐을 이루는 아미노산의 조성은 그 type에 따라 다소 차이가 있으나 보통 glycine이 전체의 1/3 정도이며, proline이 1/4, hydroxyproline이 1/7 정도 차지하고

있다(Kim JW 등 2010). 콜라겐을 구성하는 아미노산인 hydroxyproline은 hydroxylysine과 함께 일정비율(12.5~14%)을 구성함으로써 콜라겐을 정량하는 지표성분으로 활용되고 있으며(Weiss JB와 Ayad S 1982), 콜라겐의 구성 비율은 생물의 종류와 연령에 따라 차이가 있는 것으로 알려져 있다(McCormick RJ 1994).

어류 가공 부산물로 얻어지는 껍질과 뼈는 대략 30% 이상으로 그 양이 많을 뿐만 아니라 콜라겐을 다량 함유하고 있으므로 수산가공 부산물을 이용하여 육상동물 유래 콜라겐을 대체할 수 있는 어류 콜라겐의 제조는 그 의미가 클 것으로 사료된다. 콜라겐은 의약품, 화장품 및 식품분야에서 다양하게 이용되어 왔으며 최근에는 항 피부노화 및 피부 탄력개선, 관절염 예방 등으로 확대되고 있다(Ashley W 등 2008, Kwon MC 등 2008). 현재 유통되고 있는 콜라겐 제품은 주로 소, 돼지 등 육상동물에서 유래한 것으로 최근 광우병 및 구제역 발생으로 인해 안정성을 확보하기 위하여 동물 이외의 해양 생물 자원으로부터 제조된 콜라겐의 수요가 증가되고 있다. Yoo SJ 등(2008)은 황다랑어 복부 껍질을 이용하여 콜라겐을 제조하였으며, Kim SK 등(1993)은 말쥐치피의 콜라겐에 대한

[†]Corresponding author : Joo-Heon Hong, Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Geumnakro 5, Gyeongsansi, Gyeongbuk, 712-702, Korea
Tel: +82-53-850-3218
Fax: +82-53-850-3217
E-mail: jhhong@cu.ac.kr

물리화학적 특성을 조사하였고, Kwon MC 등(2008)은 오징어 껍질 콜라겐의 UV 보호능 및 미백효과에 대해 연구하였다. 콜라겐의 급원이 부족한 상황에서 많은 수산물을 소비하고 있는 우리나라는 어패류 가공 처리 시 배출되는 어류가공잔사가 증가하고 있다. 명태는 소비량이 약 40만 톤이며 그 중 껍질이 8~10%로 상당량의 부산물이 배출되고 있으나 대부분 이용도가 낮아 폐기되어 자원 낭비는 물론 환경오염의 원인이 되기도 한다. 오징어는 연간 어획량이 약 10만 톤으로 이중 오징어 껍질의 콜라겐 함량은 15% 이상으로 오징어 가공 시 발생하는 부산물을 이용할 필요성이 대두되고 있으며 이러한 부산물로 콜라겐을 산업적 소재로 이용할 수 있다면 그 의미는 매우 클 것으로 생각된다. 일반적으로 단백질에서 콜라겐을 추출하기 위해 많이 사용되고 있는 산 가수분해 방법은 tryptophan, cysteine 등의 필수아미노산의 손실을 가져오는 단점이 있으며(Narayana K와 Narasinga MS 1991), 또한 산 가수분해의 경우 중화공정과정에서 생기는 염을 조절할 필요가 있지만 효소분해에서는 이러한 공정이 필요 없기 때문에 제분화 단계에서 염의 조정이 쉽다. 산에 의한 단백질 분해는 보통 아미노산 말단까지 분해되지만 효소분해는 단백질을 한정 분해시키므로 그 분해물 중에는 아미노산과 저분자 펩타이드 등 유용성분의 증가를 가져올 수 있다.

따라서 본 연구에서는 어류 부산물인 오징어 및 명태껍질 유래 콜라겐을 효율적으로 추출하기 위해서 효소분해 방법을 이용하여 추출하였으며 추출된 콜라겐의 식품가공에 따른 활용 가능성을 확인하기 위하여 다양한 물리화학적 특성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 사용한 오징어껍질과 명태껍질은 대구소재 (주)바다누리에서 제공 받았으며 -70℃ deep freezer에 저장하면서 실험재료로 사용하였다. 콜라겐 표준품은 Sigma-Aldrich(St Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 동, 식물성 소재의 단백질 분해효소로 상업적으로 많이 사용되고 있는 Alcalase와 Neutrase는 (주)바이오시스에서 제공 받아 실험에 사용하였다. 사용된 효소의 특징으로는 Alcalase(2.4 AU/g)의 경우 *Bacillus licheniformis*에 의해 생산되었으며 최적조건은 온도 55~70℃, pH 6.5~8.5 이며, Neutrase(0.8 AU/g)의 경우 *Bacillus amyloliquefaciens*로부터 생산되었으며 온도 45~55℃, pH 5.5~7.5에서 최적조건을 나타낸다.

2. 콜라겐의 추출

명태와 오징어 껍질로부터 콜라겐의 추출은 Kim JW 등(2010)의 방법에 따라 알칼리 처리하였으며 효소 가수분해는 상업적으로 많이 사용되고 있는 Alcalase와 Neutrase를 이용하여 2단계 공정으로 실시하였다. 먼저 콜라겐 추출시료인 명태

와 오징어껍질을 수세하여 이물질을 제거하고 알칼리 처리 공정은 비콜라겐성 단백질을 제거를 목적으로 실시되었고, 효소가수분해는 알칼리 처리한 원료에서 콜라겐의 추출을 용이하게 하기 위해 수행하였다. 즉, 오징어껍질의 알칼리 처리는 시료 300 g에 0.1 N, 0.2 N, 0.3 N NaOH 용액을 시료 대비 5배(v/w) 가한 다음 4℃에서 24시간 동안 비 콜라겐성 물질을 제거하였고 잔존하는 NaOH를 제거하기 위하여 수세 하였다. 효소가수분해 공정에서는 세척한 시료에 10배 량의 증류수를 투입하고 0.1%(v/v)의 Alcalase와 Neutrase를 가한 다음 24시간 동안 55℃에서 교반하여 효소분해를 한 다음 여과하여 85℃에서 20분 동안 가열하여 효소를 불활성화 하였다. 명태껍질의 알칼리 처리는 시료 150 g에 0.1 N, 0.3 N, 0.5 N NaOH 용액을 원료대비 5배(v/w) 가하였고 이후 공정은 오징어껍질에서와 동일하게 처리 후 동결건조하여 총 12개의 시료를 얻었으며 이들을 이용하여 물리화학적 특성을 조사하였다.

3. 수율 측정

추출 수율은 콜라겐을 함유하는 추출액을 감압 농축(Rotavapor R-123, Buchi, Switzerland)한 다음 건조오븐(Forced convection oven, Jeico Tech, Korea)을 이용하여 105℃ 상압 가열건조법(AOAC 1990)으로 항량이 될 때까지 건조한 후 원료 건물량에 대한 고형분 수율(% , d.b.)로 나타내었다.

4. 단백질 함량 측정

단백질 함량은 Lowry OH 등(1951)의 방법으로 측정하였으며 BSA(bovine serum albumin, Sigma Chem, Co., St Louis, MO, USA)를 표준품으로 한 표준곡선에 의하여 함량을 계산하였다.

5. 콜라겐 함량 측정

콜라겐 함량은 Bergaman I와 Loxley R(1963)의 방법을 수정하여 측정하였다. 즉, 알칼리처리 후 수세한 다음 효소처리하여 동결건조한 콜라겐 300 mg에 6 N HCl 3 mL를 가한 후 발생하는 가스를 흔들어 제거한 다음 110℃에서 24시간 가수분해 한 후 50 mL로 정용하여 측정용 시료로 하였다. 이 용액 0.3 mL에 0.6 mL의 isopropanol을 가한 후 7% chloramine T용액과 0.25 M sodium acetate, 0.13 M trisodium citrate, 0.03 M citric acid 및 0.3% isopropanol 1:4(v/v)의 비율로 혼합한 용액 0.3 mL를 가하여 상온에서 4분 동안 산화시켰다. 여기에 Ehrlich 시약과 isopropanol을 3:13(v/v)의 비율로 혼합한 용액 4 mL를 가하고 60℃의 water bath에서 25분간 반응시킨 후 558 nm에서 흡광도를 측정하였고 hydroxyproline(Sigma Co., St Louis, MO, USA)을 표준품으로 한 표준곡선에 의하여 아래의 계산식으로 콜라겐 함량을 계산하였다.

$$\text{Collagen in protein (\%)} = (\text{hydroxyproline mg} \times 9.75 / \text{protein mg}) \times 100$$

6. 아미노산조성 분석

아미노산 조성은 콜라겐 시료 100 mg을 glass tube에 넣고 6 N HCl 용액 3 mL에 녹인 후 110°C에서 24시간 동안 열풍 건조기에서 산 가수분해 시켰다. 이 후 콜라겐 시료를 감압 건조 하여 HCl을 제거한 다음 sodium citrate buffer(pH 2.2)를 사용하여 20 mL로 정용한 후 아미노산 자동분석기(Biochrom 30, Biochrom Co., Cambridge, UK)로 다음과 같은 조건으로 분석하였다. 사용된 컬럼은 peek column(sodium column 4.6 mm × 200 mm)이었고 0.2 M sodium citrate buffer(pH 3.20), 0.2 M sodium citrate buffer(pH 4.25), 1.2 M sodium citrate buffer(pH 6.45), 0.4 M sodium hydroxide(pH 14)를 이동상으로 사용하였다. 이동상의 유속은 시간당 20 mL이었고 분석시간은 65분으로 하였다.

7. 전자공여능(Electron donating ability, EDA) 측정

전자공여능은 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)의 환원력을 이용하여 측정하였다(Lee EJ 등 2008). 즉, 콜라겐 시료 100 mg을 1 mL에 용해한 다음 4×10^{-4} M DPPH용액(99.9% ethyl alcohol에 용해) 1 mL 가하여 총액의 부피가 2 mL가 되도록 하였다. 이 반응액을 약 10초간 혼합하고 실온에 30분 방치한 후 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co., Buckinghamshire, Sweden)를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여효과는 추출물의 첨가 전·후의 차이를 백분율로 나타내었다.

$$EDA(\%) = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

A : 시료 첨가구의 흡광도
B : 시료 무첨가구의 흡광도

8. Superoxide dismutase(SOD)유사활성 측정

SOD 유사활성의 측정은 Marklund G와 Marklund S(1975)의 방법을 이용하여 실시하였다. 즉, 콜라겐 시료에 tris-HCl buffer(50 mM tris[hydroxymethyl]amino-methane+10 mM EDTA, pH 8.5)를 이용하여 pH 8.5로 조절된 시료액을 만들었다. 각 시료 0.2 mL에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50 mM tris[hydroxymethyl]amino-methane+10 mM EDTA) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하고 25°C에서 10분간 방치 후 1 N HCl 1 mL로 반응을 정지시킨 후 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co., Sweden)를 이용하여 420 nm에서의 흡광도를 측정하여 시료 첨가 및 무 첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$SOD \text{ 유사활성}(\%) = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도
B : 추출물 무첨가구의 흡광도
단, A, B는 대조구의 흡광도를 제외한 수치임.

9. pH 및 염도 측정

pH와 염도는 시료 0.5 g을 증류수 10 mL에 용해시킨 후 상온에서 pH의 경우 pH meter(Mettler-Toledo, 8603, Schwarzenbach, Switzerland)로, 염도의 경우 염도계(HDS1024, DYS, Korea)를 이용하여 각각 3회 반복 측정하였다.

10. FT-IR 분석

콜라겐의 FT-IR(Fourier transform infrared spectroscopy) 분석은 FT-IR spectrophotometer(JASCO FT/IR-4100, JASCO Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 600~4,000 cm^{-1} 까지의 데이터 포착 속도로 분석하였다. FT-IR 분석 곡선은 Jasco Spectra Manager Version 2를 이용하여 나타내었다.

11. 열분해성 측정

오징어 및 멧돼지피질 유래 콜라겐의 식품가공용 소재로의 열적 안정성과 열분해 온도를 조사하기 위하여 thermogravimetric analyzer(Q600, TA instruments, Twin Lakes, WI, USA)를 이용하여 온도에 따른 무게감량을 측정하였다. 이때 가열속도는 10°C/min 온도는 25~700°C까지로 질소기류(50 mL/min) 하에서 측정하였다.

12. 통계 처리

실험결과는 SPSS 12.0 package로 통계처리 하였으며, 각 시료에 대한 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료에 대한 유의성 검정은 분산분석을 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test에 따라 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 수율, 단백질 함량 및 콜라겐 함량

오징어 및 멧돼지피질로부터 추출하여 얻은 시료의 수율, 단백질함량 및 콜라겐 함량을 조사한 결과는 Table 1과 같다. Kim JW 등(2010)은 상어껍질과 육 조직으로부터 콜라겐의 추출 시 비 콜라겐성의 단백질을 세척, 제거하기 위하여 0.05~0.5 N NaOH 용액을 농도별로 처리하였는데 알칼리 농도가 높은 구간에서 비 콜라겐성 단백질뿐만 아니라 콜라겐도 용출되어 소실되는데, 적정 NaOH 농도는 0.3 N이라고 보고하였다. 오징어 껍질에서 추출한 시료의 수율은 3.09~4.23%로 멧돼지피질의 15.67~21.19%보다 낮음을 알 수 있었다. 효소 종류에 따른 추출 수율은 오징어 및 멧돼지피질 모두에서 Neutrase가 Alcalase보다 분해효과가 우수하였고 NaOH처리의 경우 0.1 N 보다 높은 농도에서 추출수율은 향상됨을 확인하였다.

Table 1. Yield, protein and collagen contents in enzymatic hydrolysates from squid skin and Alaska pollack skin

Fish skin	Enzyme	NaOH conc. (N)	Yield (%)	Protein content (%)	Collagen content (%)
Squid	Alcalase	0.1	3.09	36.2±0.25 ^f	16.1±0.12 ^{fg}
		0.2	3.43	30.3±0.74 ^h	11.3±0.08 ⁱ
		0.3	3.44	32.3±0.18 ^g	12.7±0.11 ⁱ
	Neutrase	0.1	4.03	38.2±0.42 ^e	26.6±1.15 ^b
		0.2	4.23	35.3±0.48 ^f	21.8±0.42 ^d
		0.3	4.12	36.8±0.02 ^f	22.5±0.38 ^d
Alaska pollack	Alcalase	0.1	15.67	42.8±0.91 ^c	18.2±0.97 ^c
		0.3	21.19	38.3±1.07 ^e	14.8±0.64 ^{gh}
		0.5	17.62	40.1±0.10 ^d	13.1±1.02 ^{hi}
	Neutrase	0.1	17.93	62.7±1.56 ^a	28.9±0.64 ^a
		0.3	19.34	57.3±1.16 ^b	24.6±1.03 ^c
		0.5	21.18	38.9±1.35 ^c	17.9±0.07 ^{ef}

The values are means±SD of three experimental data.

^{a-i} Means with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

단백질 함량을 측정된 결과 오징어껍질이 30.3~38.2% 이었고 명태껍질이 38.3~62.7%로 나타나 명태껍질에서의 함량이 높음을 알 수 있었고, Alcalase보다는 Neutrase를 사용한 구간의 함량이 우수하였다. 또한 NaOH농도에 따른 단백질 함량은 전반적으로 농도가 낮을수록 증가됨을 확인하였다. Hydroxyproline으로 산출한 콜라겐 함량은 오징어껍질에서 11.3~26.6%, 명태껍질에서는 13.1~28.9%로 나타나 명태껍질에서의 콜라겐 함량이 높음을 확인하였다. 효소처리 조건에 따른 콜라겐 함량은 Neutrase처리구가 Alcalase처리구보다 높았으며 NaOH 농도에 따른 영향은 오징어 명태껍질 모두 0.1 N NaOH에서 함량이 높았다. Chung IK 등(2006)은 굴을 효소 분해하여 가수분해물을 제조 한 결과 기질특이성이 높은 pepsin이나 trypsin과 같은 소화 효소보다 Alcalase와 Neutrase가 가수분해율이 높았다고 보고하였다.

2. 아미노산 조성

콜라겐의 아미노산 조성은 Gly-X-Y 배열이 반복되는 특징을 가지고 있다. 일반적으로 Gly-X-Y가 glycine-proline-hydroxyproline일 때 hydroxylproline 잔기는 콜라겐 triple helix의 열 안정성을 높여 준다(Johnston-Banks FA 1990). 또한 hydroxyproline의 함량은 콜라겐으로부터 유도되는 젤라틴의 중요한 기능적 특성인 겔 강도와 같은 물리적 특성에 중요한 영향을 미치며, 함량이 높을수록 좋은 물리적 특성을 가진다고 알려져 있다(Gilsenan PM과 Ross-Murphy SB 2000). 따라서 imino acid인 proline, hydroxyproline 잔기의 함량은 콜라겐에 있어서 매우 중요하다고 알려져 있다. 오징어 껍질 및 명태껍질에서 추출한 콜라겐의 아미노산조성은 Table 2와 같다. 시료 모두에서 glycine이 아미노산조성 중 가장 많이 함유되어 있었는데, 오징어 껍질이 13.36~16.27 g/100g이었고

명태껍질이 17.02~21.19 g/100g로 분석되었다. NaOH 농도에 따른 아미노산조성을 분석한 결과, 오징어 껍질의 경우 glycine은 0.1 N NaOH, Alcalase 및 Neutrase 를 처리한 구간에서 각각 14.58 g/100g, 16.27 g/100g으로 가장 높게 나타났으며 명태껍질은 0.1 N NaOH, Alcalase 처리구가 21.19 g/100g으로 함량이 가장 높았다. Proline은 오징어 및 명태껍질 모두 NaOH 농도가 낮을수록 높았으며 Neutrase 처리구가 Alcalase 처리구에 비해 높음을 확인하였다. 콜라겐의 주요 구성성분인 hydroxyproline은 오징어껍질의 경우 0.1 N NaOH, Alcalase 및 Neutrase 처리에서 각각 4.45 g/100g, 5.92 g/100g으로 분석되어 NaOH 농도가 낮을수록 증가하였다. 명태껍질의 경우, hydroxyproline 함량은 Alcalase 처리에서 3.27~5.18 g/100g, Neutrase 처리에서 4.53~5.75 g/100 g로 분석되어 Neutrase를 처리한 구간이 높았으며 NaOH농도가 낮을수록 높음을 알 수 있었다. Lee MJ와 Jeong NH(2009)은 어류비늘에 Alcalase와 Neutrase를 2단계 효소 처리하여 제조한 콜라겐 펩타이드와 돈피 콜라겐 펩타이드를 비교한 연구에서 어류비늘 유래 콜라겐의 수율이 우수하였으며 hydroxyproline 함량도 높았다고 보고하였다.

3. 전자공여능과 Superoxide dismutase 유사활성

오징어 및 명태껍질에서 추출한 콜라겐의 항산화능은 Table 3과 같다. 전자공여능은 오징어 껍질 유래 콜라겐이 13.26~14.68%로 명태껍질의 10.20~12.93%보다 높았다. 추출조건에 따른 전자공여능은 오징어 및 명태껍질 모두 Neutrase가 Alcalase 처리구에 비해 높았으며 NaOH 농도가 낮을수록 높아짐을 확인하였다. 콜라겐 함량과 비교할 경우 콜라겐 함량이 높게 나타난 구간에서 전자공여능도 높게 나타남을 알 수

Table 2. Amino acid composition in enzymatic hydrolysates from squid skin and Alaska pollack skin

(g/100g)

Amino acids	Squid skin					
	Alcalase			Neutrase		
	0,1 N NaOH	0,2 N NaOH	0,3 N NaOH	0,1 N NaOH	0,2 N NaOH	0,3 N NaOH
L-Aspartic Acid	5,32 ^b	5,14 ^d	6,97 ^a	4,59 ^f	4,83 ^e	5,29 ^c
L-Threonine	1,97 ^a	1,63 ^b	1,51 ^c	1,54 ^c	1,27 ^d	1,26 ^d
L-Serine	2,86 ^a	2,34 ^b	2,28 ^c	2,31 ^{bc}	1,89 ^d	1,83 ^c
L-Glutamic Acid	7,75 ^a	6,12 ^c	5,76 ^d	6,62 ^b	5,42 ^e	5,29 ^f
L-Proline	6,13 ^c	5,89 ^f	6,75 ^d	9,05 ^a	8,55 ^b	8,04 ^c
Glycine	14,58 ^b	13,95 ^c	13,36 ^c	16,27 ^a	13,68 ^d	13,65 ^d
L-Alanine	4,64 ^b	4,78 ^a	4,57 ^c	4,22 ^f	4,29 ^e	4,35 ^d
L-Valine	1,76 ^b	1,80 ^{ab}	1,86 ^a	1,75 ^b	1,52 ^c	1,48
L-Methionine	0,88 ^c	0,92 ^c	0,57 ^e	1,34 ^a	1,11 ^b	0,78 ^d
L-Isoleucine	2,10 ^a	1,3 ^{d1}	1,67 ^b	1,72 ^b	1,48 ^c	1,46 ^c
L-Leucine	2,90 ^a	2,14 ^c	2,15 ^c	2,29 ^b	1,87 ^d	1,85 ^d
L-Tyrosine	0,91 ^a	0,80 ^b	0,64 ^d	0,74 ^c	0,63 ^d	0,59 ^e
L-Phenylalanine	1,68 ^a	1,39 ^b	1,26 ^c	1,36 ^b	1,16 ^d	0,99 ^e
L-Histidine	1,06 ^a	0,85 ^c	0,85 ^c	0,96 ^b	0,78 ^d	0,83 ^c
L-Lysine	1,56 ^a	1,22 ^c	1,23 ^c	1,36 ^b	1,11 ^e	1,18 ^d
Ammonium chloride	2,72 ^a	2,12 ^c	1,90 ^e	2,30 ^b	1,88 ^e	1,97 ^d
L-Arginine	3,72 ^f	4,21 ^b	4,01 ^d	3,86 ^e	4,12 ^c	4,42 ^a
L-Hydroxyproline	4,45 ^c	4,08 ^d	3,40 ^e	5,92 ^a	5,08 ^b	4,12 ^d
Total	66,99	60,68	60,74	68,2	60,67	59,38

Amino acids	Alaska pollack skin					
	Alcalase			Neutrase		
	0,1 N NaOH	0,3 N NaOH	0,5 N NaOH	0,1 N NaOH	0,3 N NaOH	0,5 N NaOH
L-Aspartic Acid	7,10 ^a	6,73 ^b	5,60 ^c	6,43 ^c	5,91 ^d	5,64 ^e
L-Threonine	3,59 ^a	3,39 ^b	3,04 ^c	3,00	2,84 ^d	2,58 ^e
L-Serine	3,26 ^a	2,43 ^c	2,05 ^e	2,59 ^b	2,28 ^d	1,80 ^f
L-Glutamic Acid	7,93 ^a	7,00 ^c	6,55 ^d	7,42 ^b	6,13 ^f	6,24 ^e
L-Proline	9,05 ^d	8,14 ^e	9,28 ^b	10,93 ^a	8,76 ^f	9,14 ^c
Glycine	21,19 ^a	18,88 ^c	17,62 ^d	20,10 ^b	17,39 ^e	17,02 ^f
L-Alanine	7,26 ^b	6,80 ^d	6,49 ^e	7,45 ^a	7,12 ^c	7,16 ^c
L-Valine	3,27 ^a	2,97 ^b	2,89 ^c	2,92 ^{bc}	2,62 ^d	2,58 ^e
L-Methionine	2,84 ^a	1,80 ^c	2,35 ^c	2,49 ^b	2,16 ^d	2,13 ^d
L-Isoleucine	2,44 ^a	2,25 ^b	2,17 ^c	2,25 ^b	2,03 ^d	1,95 ^e
L-Leucine	4,18 ^a	3,72 ^b	3,66 ^c	3,57 ^d	3,23 ^f	3,31 ^e
L-Tyrosine	1,29 ^a	1,03 ^c	1,13 ^b	1,09 ^{bc}	0,93 ^d	0,94 ^d
L-Phenylalanine	1,73 ^a	1,49 ^b	1,45 ^c	1,44 ^c	0,98 ^d	0,24 ^e
L-Histidine	1,58 ^d	1,43 ^e	1,48 ^e	2,17 ^a	1,88 ^c	1,92 ^b
L-Lysine	2,64 ^a	2,15 ^c	1,93 ^d	2,51 ^b	1,83 ^f	1,88 ^e
Ammonium chloride	3,56 ^b	3,40 ^c	2,52 ^e	3,64 ^a	2,71 ^d	2,51 ^e
L-Arginine	8,28 ^a	7,28 ^c	6,76 ^d	7,56 ^b	6,88 ^e	6,75 ^d
L-Hydroxyproline	5,18 ^b	4,27 ^c	3,27 ^f	5,75 ^a	4,66 ^c	4,53 ^d
Total	96,37	85,16	80,24	93,31	80,34	78,32

^{a-f} Means with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0,05$.

Table 3. Electron donating ability and SOD-like activities in enzymatic hydrolysates from squid skin and Alaska pollack skin

Fish skin	Enzyme	NaOH conc. (N)	Electron donating activity (%)	SOD-like activity (%)
Squid	Alcalase	0.1	14.05±0.37 ^a	18.71±1.00 ^d
		0.2	13.42±0.21 ^b	16.82±1.00 ^b
		0.3	13.26±0.40 ^b	14.64±0.50 ^c
	Neutrased	0.1	14.68±0.69 ^a	22.76±1.10 ^a
		0.2	14.15±0.61 ^a	20.01±0.87 ^b
		0.3	13.30±0.19 ^b	18.42±1.57 ^c
Alaska pollack	Alcalase	0.1	11.81±0.25 ^c	14.47±0.44 ^c
		0.3	10.75±0.06 ^c	14.21±1.23 ^c
		0.5	10.20±0.12 ^c	12.34±2.55 ^d
	Neutrased	0.1	12.93±0.49 ^b	21.74±0.87 ^{ab}
		0.3	12.30±0.53 ^b	20.89±1.15 ^b
		0.5	11.26±0.40 ^c	13.60±0.75 ^d

The values are means±SD of three experimental data.

^{a-d} Means with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

Table 4. pH and salt content in enzymatic hydrolysates from squid skin and Alaska pollack skin

Fish skin	Enzyme	NaOH conc. (N)	pH	Salt (%)
Squid	Alcalase	0.1	6.75±0.01 ^g	0.03±0.01 ^{de}
		0.2	6.96±0.01 ^c	0.03±0.01 ^{de}
		0.3	7.33±0.02 ^b	0.04±0.01 ^{cd}
	Neutrased	0.1	6.86±0.02 ^f	0.05±0.02 ^{ab}
		0.2	7.22±0.01 ^c	0.06±0.01 ^b
		0.3	7.48±0.01 ^a	0.06±0.02 ^a
Alaska pollack	Alcalase	0.1	6.59±0.02 ^h	0.02±0.01 ^e
		0.3	6.75±0.02 ^g	0.03±0.01 ^{de}
		0.5	7.11±0.01 ^d	0.04±0.01 ^{cd}
	Neutrased	0.1	6.59±0.01 ^h	0.02±0.01 ^e
		0.3	6.88±0.02 ^f	0.03±0.01 ^{de}
		0.5	7.20±0.01 ^c	0.05±0.01 ^{bc}

The values are means±SD of three experimental data.

^{a-h} Means with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

있었다. 전자공여능은 free radical을 환원 시키는 정도로 그 값이 높을수록 항산화 활성이 높음을 나타내며, 생체의 노화를 억제하는 척도가 된다(Torel J 등 1986). SOD 유사활성은 오징어 껍질의 경우 14.64~22.76%로 명태껍질의 12.34~21.74% 보다 높았으며 처리 조건에 따른 영향은 오징어 및 명태껍질 모두에서 Alcalase에 비해 Neutrased를 처리한 구간이 SOD 유사활성이 높았다. NaOH농도에 따른 영향은 농도가 낮을수록 SOD 유사활성이 증가하였다(Table 3). 따라서 처리조건별 항산화능은 0.1 N NaOH로 처리하고 Neutrased로 추출한 구간이 가장 우수하였다. Heu MS 등(2007)은 Alcalase, Neutrased를 이용한 연어 유래 콜라겐 추출 연구에서

Neutrased 처리 시 angiotensin converting enzyme 저해능이 우수하였고 항산화능이 높게 나타나 콜라겐 추출시 적합한 효소라고 보고하였다. SOD는 체내 항산화제 효소의 하나로 superoxide anion radical을 hydrogen peroxide로 전환하는데 관여하나 SOD 유사활성은 이러한 반응성을 억제함으로써 생체를 보호하는 역할을 한다(Shin SR 등 2006).

4. pH 및 염도

오징어 및 명태껍질로부터 추출된 콜라겐의 pH 및 염도를 측정된 결과는 Table 4와 같다. 오징어껍질 유래 콜라겐의

pH는 Alcalase에서 6.75~7.33이었고 Neutrase에서 6.86~7.48로 나타났으며 콜라겐 추출시 전 처리 공정에서 사용한 NaOH의 농도가 높아짐에 따라 점차 증가하는 경향이였다. 명태껍질 유래 콜라겐은 Alcalase에서 6.59~7.11이었고 Neutrase에서 6.59~7.20으로 나타나 오징어 유래 콜라겐과 유사한 경향이였으며 효소 간 pH 차이는 크게 나타나지 않았고 전반적으로 NaOH 농도가 증가함에 따라 유의적으로 증가함을 알 수 있었다. 오징어 및 명태껍질 유래 콜라겐의 염도를 측정된 결과 NaOH 농도 및 효소처리 구간에 따른 염도의 차이는 뚜렷하게 나타나지 않았는데 이는 콜라겐 추출 전처리 과정에서 충분히 수세 및 NaOH 처리를 거친 관계로 조직이 팽윤되어 염분이 빠져 나간 것으로 사료된다.

5. FT-IR 스펙트럼 특성

콜라겐 함량 및 항산화 활성에 따른 결과를 종합할 때 가장 효과적인 추출조건으로 선정된 0.1 N NaOH 처리 후 Neutrase로 효소분해 한 오징어 및 명태껍질 유래 콜라겐 펩타이드의 FT-IR 스펙트럼 특성을 콜라겐 표준품과 비교분석하였다(Fig. 1). 콜라겐의 아미노산 구성은 glycine-proline-hydroxyproline로 이루어져 있으며 콜라겐 펩타이드의 분자구조는 glycine의 -NH amino group과 polypeptide chain의 carbonyl group인 C=O로 이루어져 있다(Bella J 등 1995). 본 실험에서 FT-IR 스펙트럼은 콜라겐 표준품과 유사하였는데 최대 peak band는 $1,631\text{ cm}^{-1}$ 과 $1,549\text{ cm}^{-1}$, $1,234\text{ cm}^{-1}$ 및 $3,322\text{ cm}^{-1}$ 로 각각 amide I, amide II, amide III와 amide A의 peak band를 나타내었다. Amide I, II와 A 영역은 polypeptide의 형태와 직접적으로 연관이 있으며 amide B 영역의 peak는 CH_2 의 stretching vibration을 나타내며 amide I은 $1,600\sim 1,700\text{ cm}^{-1}$ 에서 carbonyl group의 stretching vibration을 나타내고, amide II는 $1,500\sim 1,550\text{ cm}^{-1}$ 에서 NH bending 및 CN stretching, amide A는 $3,200\sim 3,600\text{ cm}^{-1}$ 에서 N-H stretching vibration과 관련이 있음을 나타내고 있다(Muyonga JH 등 2004). 오징어 및 명태껍질에서 추출한 콜라겐은 amide I, amide II, amide III와 amide A의 범위에서 wavenumber속에 포함되어 콜라겐 표준품과 유사한 peak band값을 나타내어 콜라겐 표준품과 화학구조가 동일함을 알 수 있었다. Yoo SJ 등(2008)은 황다랑어 복부 껍질에서 추출한 콜라겐의 FT-IR 스펙트럼은 amide A, I, II 및 III 영역의 최대 peak band는 각각 3437 cm^{-1} (amide A), $1,661\text{ cm}^{-1}$ (amide I), $1,550\text{ cm}^{-1}$ (amide II) 및 $1,236\text{ cm}^{-1}$ (amide III)이라고 보고하였는데 본 연구결과와 유사하였다.

6. 열분해성

오징어 및 명태껍질로부터 추출된 콜라겐의 식품가공용 소재로 활용 가능성을 확인하기 위해 1차로 열분해성을 분석하였다. 열분해 특성은 시료의 전처리 방법과 불순물의 함유량에 따라 다양하게 나타난다. TGA를 이용하여 온도증가에 따른 콜라겐 분말의 무게감량과 무게감량의 변화를 1차 미분곡

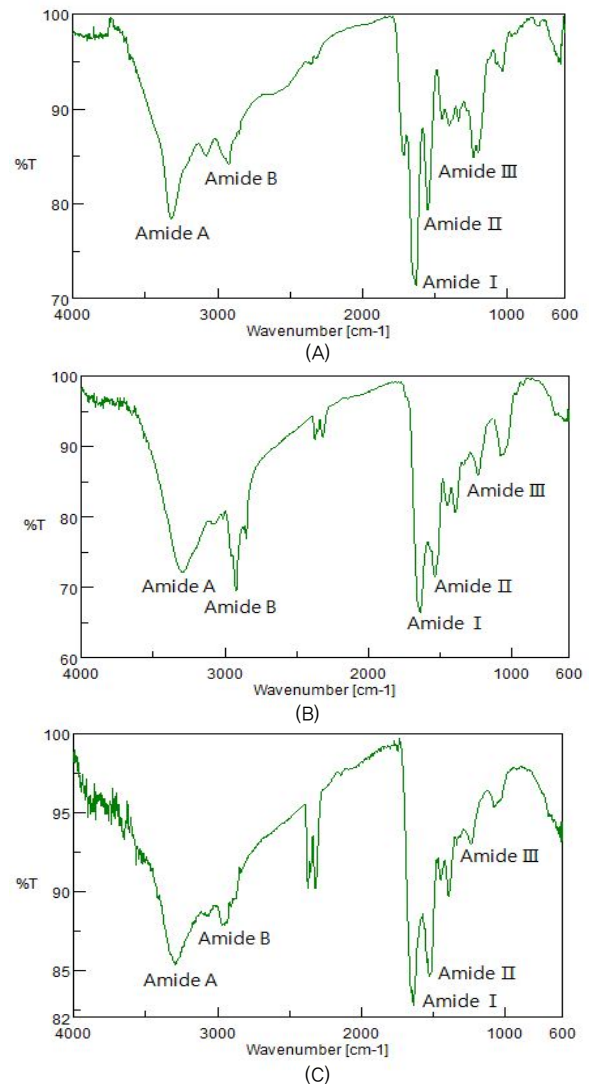


Fig. 1. Fourier transform infrared spectra of collagen standard (A), collagen from squid skin (B) and Alaska pollack skin (C).

선으로 분석하는 DTG(differential thermogravimetry)를 정량적으로 측정하여 열안정성과 분해온도를 Fig. 2에 나타내었다.

오징어 및 명태껍질에서 추출한 콜라겐은 순수한 물질이 아닌 관계로 단백질 성분외의 기타 다양한 성분이 복잡하게 결합되어 있는 고분자물질로 열분해가 여러 단계로 이루어졌으며 오징어 및 명태껍질에서 추출한 콜라겐의 TGA 결과는 DTG 패턴과 일치하였다. 첫 번째 단계인 $70\sim 120^\circ\text{C}$ 부근에서 수분의 증발이 시작됨을 확인할 수 있었고, 두 번째 단계의 온도범위인 $186\sim 367.25^\circ\text{C}$ 에서 콜라겐의 구성분이 각각 70.84%와 76.58%의 무게 감소를 보여주었다. 이러한 결과는 무게감량이 많은 온도대에서 콜라겐 분말의 열분해가 급격히 진행됨을 알 수 있으며, 열분해온도는 대략 300°C 정도임을 확인하였다. Park JH 등(2007)은 돈피 가공 부산물을 이용

하여 crosslinking agent에 의해 제조한 콜라겐 분말은 318°C, graft polymerization에 의해 제조한 콜라겐 분말은 326°C와 468.9°C의 높은 열분해 온도를 나타내어 열 안정성을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 추출한 오징어 및 명태껍질 유래 콜라겐 분말은 열적 특성이 안정한 물질임을 알 수 있으며 고온을 요구하는 식품 가공공정에도 적용가능 함을 확인하였다.

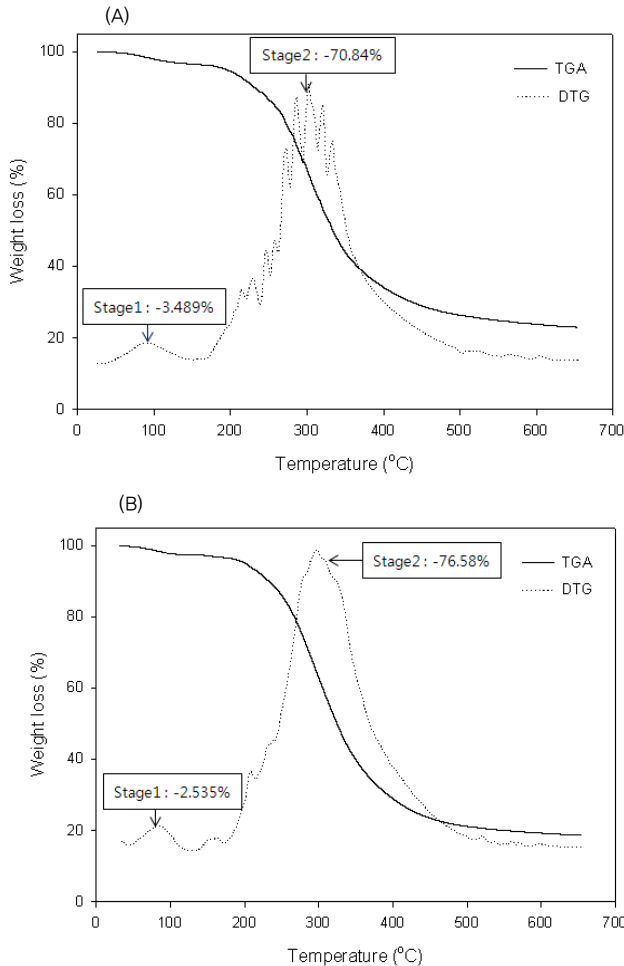


Fig. 2. TGA and DTG curves of the collagen from squid skin and Alaska pollack skin.

Squid skin collagen (A) and Alaska pollack skin collagen (B) after treated with Neutrased in 0.1 N NaOH addition.

IV. 요약

본 연구에서는 수산 부산물인 오징어 및 명태껍질 유래 콜라겐을 효율적으로 추출하기 위해서 다양한 조건에서 추출하였으며 추출된 콜라겐의 물리화학적 특성을 조사하였다. 추출 수율은 오징어 및 명태껍질 모두에서 Neutrased가 Alcalase보다 높았으며 0.1 N NaOH 농도에서 가장 높은 추출수율을 나타

내는 것을 확인하였다. 단백질 함량은 오징어껍질이 30.3~38.2%이었고 명태껍질이 38.9~62.7%로 나타났으며, 콜라겐 함량은 오징어껍질에서 11.3~26.6%, 명태껍질에서 13.1~28.9%로 나타나 단백질 및 콜라겐 함량 모두 명태껍질이 높음을 확인하였다. 아미노산 조성은 시료 모두에서 glycine이 가장 높은 비중을 차지하였으며 hydroxyproline 함량은 0.1 N NaOH, Neutrased를 처리한 명태껍질에서 5.75 g/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 추출조건에 따른 전자공여능은 오징어 및 명태껍질 모두에서 Neutrased가 Alcalase 처리구에 비해 높았으며 NaOH 농도가 낮을수록 높음을 확인하였다. SOD 유사활성은 오징어 껍질의 경우 14.64~22.76%로 명태껍질의 12.34~21.74% 보다 높았으며 처리 조건에 따른 영향은 오징어 및 명태껍질 모두에서 Alcalase에 비해 Neutrased를 처리한 구간이 SOD유사활성이 우수하였다. 추출된 콜라겐의 pH는 NaOH 농도가 증가함에 따라 증가하였으나 중성을 보여주었고, 염도는 뚜렷한 차이가 발견되지 않았다. 콜라겐 함량이 가장 높게 나타난 추출조건인 0.1 N NaOH로 전처리 후 Neutrased로 추출한 콜라겐의 FT-IR 스펙트럼은 1,631 cm^{-1} , 1,549 cm^{-1} , 1,234 cm^{-1} 및 3,322 cm^{-1} 로 각각 amide I와 amide II, amide III, amide A의 peak band를 나타내었다. 콜라겐 분말의 열분해온도는 대략 300°C 정도였으며 열적 특성이 안정한 물질이었으며 고온을 요구하는 식품 가공공정에 적용가능 함을 확인하였다.

V. 감사의 글

본 연구는 2012학년도 대구가톨릭대학교 교비 지원에 의하여 수행된 결과이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- AOAC, 1990. Official methods of analysis, 15th ed, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.
- Ashley W, Masahiro O, Ralph JP, Mark S, Mark S, Jack NL, 2008. Biochemical properties of alligator (*Alligator mississippiensis*) bone collagen, *Biochem Physiol* 151:246-249
- Bergaman I, Loxley R, 1963. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal Chem* 35:1961-1963
- Bella J, Brodsky B, Berman HM, 1995 Hydration structure of a collagen peptide. *Structure* 3:893-906
- Chung IK, Kim HS, Kang TK, Choi YJ, Choi JD, Kim JS, Heu MS, 2006. Preparation and functional properties of enzymatic oyster hydrolysates. *Korean Soc Food Sci Nutr* 35:919-925

- Gilsenan PM, Ross-Murphy SB. 2000. Rheological characterization of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloid* 14:191-195
- Heu MS, Park SH, Kim HS, Jee SJ, Lee JH, Kim HJ, Han BW, Kim JS. 2007. Improvement on the functional properties of gomtang-like product from salmon frame using commercial enzymes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36(12):1596-1603
- Jerome SP, Gabrielle L, Raul F. 1998 Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. *J Invest Dermatol* 90:48-54
- Johnston-Banks FA. 1990. Gelatin. In Press, Harris JR (Ed.), *Food gels*, Elsevier Applied Science Publishers, London, pp 233-289
- Kim JW, Kim DK, Kim MJ, Kim SD. 2010. Extraction and bleaching of acid- and pepsin-soluble collagens from shark skin and muscle. *J Korean Soc Food Preserv*, 17(1):91-99
- Kim SK, Kang OJ, Kwak DC. 1993. Physicochemical characteristics of filefish and cod skin collagen. *J Korean Agric Chem Soc* 36(3):265-272
- Kim SK, Yang HP, Lee EH. 1991. The development of a natural seasoning using the enzymatic hydrolysate of fish skin. *Korean J Biotechnol Bioeng* 6(4):327-336
- Kwon MC, Syed AQ, Kim HS, Ahn JH, Cho NH, Lee HY. 2008. UV protection and whitening effects of collagen isolated from outer layer of the squid *Todarodes pacificus*. *J Kor Fish Soc* 41(1):7-12
- Lee EJ, Kim JS, Kwon JH. 2008. Optimization of microwave-assisted extraction conditions for total catechin and electron donating ability of grape seed extracts. *Korean J Food Preserv* 15(6):840-846
- Lee MJ, Jeong NH. 2009. Preparation and availability analysis of collagen peptides obtained in fish scale. *J Korean Oil Chem Soc* 26(4):457-466
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL. 1951. Protein measurement folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Marklund G, Marklund S. 1975 Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47:468-474
- McCormick RJ. 1994. Structure and properties of tissues. In: *Muscle foods, meat poultry and seafood technology*. Chapman and Hall, New York pp 25-62
- Muyonga JH, Cole CGB, Duu KG. 2004. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chem* 85:81-89
- Narayana K, Narasinga MS. 1991. Effect of acetylation and succinylation on the physicochemical properties of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) proteins. *J Agr Food Chem* 39:259-261
- Park JH, Paik IK, Kim YB. 2007. A study on an efficient manufacturing process of fine collagen powder using leather by-product. *Korea Organic Resource Recycling Association* 15(4):100-106
- Shin SR, Hong JY, Nam HS, Yoon KY, Kim KS. 2006. Anti-oxidative effects of extracts of Korean herbal materials. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35(2):187-191
- Torel J, Gillard J, Gillard P. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochem* 25:383-385
- Yoo SJ, Cho SM, Woo JW, Kim SH, Han YN, Ahn JR, Kim SY, Kim YW, Kim SB. 2008. Processing and physicochemical properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin. *J Korean Fish Soc* 41(6):427-434
- Weiss JB, Ayad S. 1982. An introduction to collagen. In: *Collagen in health and disease*. Charter 1, Churchill Livingstone, New York pp 1-17