



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0136802
(43) 공개일자 2015년12월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 21/00 (2006.01) C07K 14/78 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0064270
(22) 출원일자 2014년05월28일
심사청구일자 2014년05월28일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
전병수
부산광역시 해운대구 반여로 67, 111동 505호(반
여동, 해운대메가센텀 한화 꿈에그린아파트)
(74) 대리인
특허법인네이트

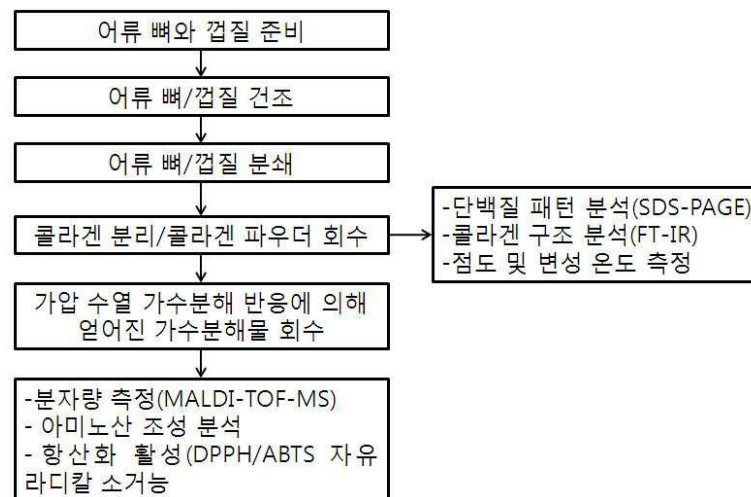
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 가압 수열 가수분해를 이용하여 어류 뼈와 껍질로부터 콜라겐 펩타이드 수득

(57) 요약

본 발명은 어류의 뼈와 껍질로부터 고온, 고압의 물을 반응시켜 콜라겐 가수분해물을 수득, 회수하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 간단한 공정을 채택하여 공정의 효율성 및 경제성을 확보하는 동시에, 환경 친화적이며 안전성을 담보하면서도, 식품, 약품, 화장품 등의 기능성 성분으로 활용되는 콜라겐을 신속하게 생산할 수 있으므로, 의료업, 바이오산업, 화장품 산업 및 식품 산업에 적용되어 높은 부가가치를 창출할 수 있다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

준비된 고등어의 뼈와 껍질 중에서 적어도 하나의 샘플을 건조시키는 단계;
 상기 건조된 샘플을 분쇄하는 단계;
 상기 분쇄된 샘플에 단백질 분해 효소를 첨가하여 콜라겐을 분리하는 단계; 및
 상기 분리된 콜라겐의 분말을 고온, 고압의 물과 반응시켜 얻어진 콜라겐 가수분해물을 회수하는 단계를 포함하는 어류 유래의 콜라겐 가수분해물을 수득하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 콜라겐 가수분해물을 회수하는 단계에서 150~350℃의 온도 및 5~400 bar 압력의 물이 사용되는 것을 특징으로 하는 어류 유래의 콜라겐 가수분해물을 수득하는 방법.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 얻어진 콜라겐 가수분해물은 3000 Da 이하의 분자량을 가지는 것을 특징으로 하는 어류 유래의 콜라겐 가수분해물을 수득하는 방법.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 콜라겐을 분리하는 단계는, 상기 고등어의 뼈를 분쇄하는 단계와, 분쇄된 고등어의 뼈를 1:5 ~ 1:20 (w/v)의 비율로 희석한 알칼리 용액으로 처리하는 단계와, 알칼리 용액의 처리에 의해 얻어진 불용성 고등어 뼈에 1:5 ~ 1:20 (w/v)의 비율의 산을 가하여 탈석회화 하는 단계와, 탈석회화된 고등어 뼈에 1:5 ~ 1:20 (w/v)의 알코올을 가하여 탈지 처리하는 단계와, 탈지 처리된 고등어 뼈 잔여물에 펩신을 가하여 가수분해하는 단계를 포함하는 어류 유래의 콜라겐 가수분해물을 수득하는 방법.

청구항 5

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 콜라겐을 분리하는 단계는, 상기 고등어의 껍질을 분쇄하는 단계와, 분쇄된 고등어의 껍질을 1:20 ~ 1:50 (w/v)의 비율로 희석한 알칼리 용액으로 처리하는 단계와, 알칼리 용액의 처리에 의해 얻어진 불용성 고등어 껍질에 1:20 ~ 1:50 (w/v)의 알코올을 가하여 탈지 처리하는 단계와, 탈지 처리된 고등어 껍질 잔여물에 펩신을 가하여 가수분해하는 단계를 포함하는 어류 유래의 콜라겐 가수분해물을 수득하는 방법.

청구항 6

제 1항 또는 제2항에 있어서, 상기 얻어진 콜라겐 가수분해물은 항산화 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 어류 유래의 콜라겐 가수분해물을 수득하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 어류로부터 기능성 성분을 회수하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 가압 수열 가수분해 반응을 이용하여 어류의 뼈와 껍질로부터 기능성 성분인 콜라겐을 회수, 수득하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 콜라겐은 인간을 비롯한 동물 결합 조직의 세포기질 매트릭스의 주요 성분이다. 콜라겐은 다양한 형태로 존재하는데, 대표적인 콜라겐 타입인 콜라겐 I 은 대략 분자량 10만인 3개의 폴리펩타이드 사슬이 꼬여 있는 삼중 나선형 구조를 형성한다(트로포콜라겐). 특이하게도 콜라겐은 "글리신-프롤린-X"나 "글리신-X-하이드록시프롤린"(X는 임의의 아미노산임)이 반복된 구조를 가지고 있다. 생체 조직에서는 유기용매로 추출하여 산이나 알칼리 처리를 수행한 뒤, 적절한 효소, 예를 들어 트립신, 히알루로니다아제를 적용하여 불용성 콜라겐을 얻는다.

[0003] 식품과 관련해서 콜라겐을 추출하여 얻어지는 젤라틴은 젤리에 사용되는 등 응고제로 활용될 수 있다. 아울러, 콜라겐은 면역 기능을 향상시키고, 특히 골 조직에서 칼슘의 흡착을 통하여 골세포의 재생작용을 촉진시켜 관절을 튼튼하게 해주며, 피부의 신진대사 활성화 및 보습력 유지를 통하여 피부 미용에 탁월한 효과를 발휘하기 때문에, 약품 및 화장품의 기능성 성분으로서 활용되고 있다. 특히, 노화 또는 자외선 등에 의해 야기되는 피부의 주름을 개선하기 위한 기능성 화장품의 성분으로 콜라겐의 합성을 촉진하는 성분이 다량 포함되어 있다. 또한, 콜라겐은 우수한 생체적합성(bio-compatibility) 및 생분해성(bio-degradability)을 가지고 있어서 조직 재생을 위한 생체 재료로 널리 활용되고 있다.

[0004] 이와 같이 식품, 화장품, 생체이식 등의 기능성 성분이나 소재와 같이 다양한 산업에서 요구되는 콜라겐은 현재 주로 소, 돼지 등과 같은 육상 동물의 뼈와 껍질에서 분리된 것이 이용되고 있다. 그런데 최근 몇 년 동안 구제역(foot-and-mouth disease, FMD), 조류 인플루엔자(avian influenza, AI), 광우병 등과 같이 육상 동물이나 조류에서 초래된 전염병이 세계적으로 발생하면서, 육상 동물에서 얻어진 콜라겐에 대한 안전성의 문제가 대두되고 있다. 또한 돼지는 이슬람권에서 혐오되는 동물이어서, 돼지에서 얻어진 콜라겐은 특정 종교에서 이용할 수 없는 소재이기 때문에, 대체 콜라겐을 생산하는 기술개발이 요구되고 있다.

[0005] 한편, 많은 소비자들은 면역력을 강화시키는 천연물 유래의 건강 기능성 식품 또는 건강 보조식품에 큰 관심을 가지고 있다. 위에서 살펴본 것과 같이 콜라겐은 인체 내에서 면역력을 강화시키는 등 다양한 생리 활성화에 관여하는데, 상대적으로 분자량이 큰 콜라겐은 생체 내로 깊숙이 침투하지 못하기 때문에 생체에서 흡수되지 못하는 문제가 있다. 따라서 콜라겐을 생체 내로 효율적으로 침투시키기 위해서는 상대적으로 분자량이 작은 콜라겐 펩타이드를 생산할 수 있는 기술개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 전술한 종래 기술의 문제점을 해소하기 위하여 제안된 것으로, 본 발명의 목적은 예를 들어 해수어와 같은 어류로부터 콜라겐 펩타이드와 아미노산이 함유된 가수분해물을 회수, 수득하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 간단한 공정을 통하여 경제성을 확보할 수 있고, 환경 친화적이며 안전성이 담보될 수 있는 어류 유래의 콜라겐 가수분해물을 회수, 수득하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 인체 내로의 흡수 및 침투가 용이한 어류 유래의 콜라겐 가수분해물을 생산하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 전술한 목적을 가지는 본 발명은 준비된 고등어의 뼈와 껍질 중에서 적어도 하나의 샘플을 건조시키는 단계; 상기 건조된 샘플을 분쇄하는 단계; 상기 분쇄된 샘플에 단백질 분해 효소를 첨가하여 콜라겐을 분리하는 단계; 및 상기 분리된 콜라겐의 분말을 고온, 고압의 물과 반응시켜 얻어진 콜라겐 가수분해물을 회수하는 단계를 포함하는 어류 유래의 콜라겐 가수분해물을 수득하는 방법을 제공한다.

[0010] 예시적으로, 상기 콜라겐 가수분해물을 회수하는 단계에서 150~350℃의 온도 및 5~400 bar 압력의 물이 사용될 수 있다.

[0011] 본 발명에 따라 얻어진 콜라겐 가수분해물은 3000 Da 이하의 분자량을 가질 수 있다.

[0012] 본 발명의 한 예시적인 실시형태에서, 상기 콜라겐을 분리하는 단계는, 상기 고등어의 뼈를 분쇄하는 단계와, 분쇄된 고등어의 뼈를 1:5 ~ 1:20 (w/v)의 비율로 희석한 알칼리 용액으로 처리하는 단계와, 알칼리 용액의 처리에 의해 얻어진 불용성 고등어 뼈에 1:5 ~ 1:20 (w/v)의 비율의 탈회제를 가하여 고등어 뼈를 탈석회화 하는 단계와, 상기 탈석회화된 고등어 뼈에 1:5 ~ 1:20 (w/v)의 알코올을 가하여 탈지 처리하는 단계와, 탈지 처리된 고등어 뼈 잔여물에 펩신을 가하여 가수분해하는 단계를 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 예시적인 실시형태에서, 상기 콜라겐을 분리하는 단계는, 상기 고등어의 껍질을 분쇄하는 단계와, 분쇄된 고등어의 껍질을 1:20 ~ 1:50 (w/v)의 비율로 희석한 알칼리 용액으로 처리하는 단계와, 알칼리 용액의 처리에 의해 얻어진 불용성 고등어 껍질에 1:20 ~ 1:50 (w/v)의 알코올을 가하여 탈지 처리하는 단계와, 탈지 처리된 고등어 껍질 잔여물에 펩신을 가하여 가수분해하는 단계를 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명에 따라 얻어진 콜라겐 가수분해물은 항산화 활성을 가지는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에서는 어류의 뼈와 껍질로부터 고온, 고압의 물을 이용한 가압 수열 가수분해를 이용하여 분자량이 적은 콜라겐 펩타이드 가수분해물을 분리하였다. 본 발명의 방법은 공정이 간단하여 충분한 경제성을 도모할 수 있고, 환경 친화적이며, 인체에 아무런 해가 없는 안전한 방법이다.

[0016] 본 발명에 따라 최종적으로 회수, 수득된 콜라겐 펩타이드 가수분해물은 분자량이 3 KDa 이하로서 작기 때문에, 인체로의 흡수가 용이하기 때문에 다양한 생리 활성 기능, 예를 들어 환원 능력을 가지는 콜라겐 가수분해물의 효율적인 섭취가 가능하다.

[0017] 따라서 본 발명의 방법을 통하여 회수된 저분자량의 콜라겐 가수분해물은 면역 증강, 피부 노화 방지, 골세포 재생 등을 위한 기능성 성분으로 식품, 의약품, 화장품 등에 첨가될 수 있어서, 이들 산업에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명의 예시적인 실시형태에 따라 예를 들어 고등어와 같은 어류의 뼈와 껍질로부터 인체에 대한 흡수가 양호한 콜라겐 펩타이드 가수분해물을 회수, 수득하는 공정과, 이들 공정에서 얻어진 콜라겐의 구조 및 기능을 알아보기 위한 다양한 분석 방법을 개략적으로 도시한 플로 차트이다.

도 2는 본 발명의 예시적인 실시형태에 따라 어류의 뼈와 껍질로부터 콜라겐 펩타이드 가수분해물을 회수하기 위하여 고온, 고압의 가압 수열 가수분해 공정에 사용된 장치를 개략적으로 도시한 도면이다.

도 3은 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 고등어 뼈와 껍질에서 분리된 펩신 가용성 콜라겐에 대한 SDS-PAGE 측정 결과를 도시한 사진이다. 도 3에서 MMP는 분자량 마커 단백질, CSC는 송아지 껍질 콜라겐, MSC는 고등어 껍질 콜라겐, MBC는 고등어 뼈 콜라겐, BATC는 아킬레스 건 콜라겐을 나타낸다.

도 4a 및 도 4b는 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 각각 고등어 뼈와 껍질에서 분리된 펩신 가용성 콜라겐에 대한 FT-IR 스펙트럼 분석 결과를 도시한 그래프이다.

도 5는 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 고등어 뼈와 껍질에서 분리된 펩신 가용성 콜라겐에 대한 열 변성 측정 결과를 도시한 그래프이다.

도 6a 내지 도 6c는 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 고등어 뼈와 껍질에서 분리된 펩신 가용성 콜라겐을 가압 열수 가수분해 반응시켜 얻어진 콜라겐 가수분해물에 대한 MALDI-TOF 질량 스펙트럼 분석 결과를 도시한 그래프이다. 6a는 고등어 뼈에서 분리한 펩신 가용성 콜라겐을 200℃, 30 bar에서 가압 열수 가수분해하여 얻어진 콜라겐 가수분해물, 도 6b는 고등어 껍질에서 분리한 펩신 가용성 콜라겐을 200℃, 30 bar에서 가압 열수 가수분해하여 얻어진 콜라겐 가수분해물, 도 6c는 고등어 껍질에서 분리한 펩신 가용성 콜라겐을 250℃, 70 bar에서 가압 열수 가수분해하여 얻어진 콜라겐 가수분해물을 대상으로 측정한 것이다.

도 7a 내지 도 7d는 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 고등어의 뼈와 껍질에서 분리한 펩신 가용성 콜라겐을

가압 열수 가수분해하여 수득된 콜라겐 가수분해물에 대한 항산화 측정 결과를 도시한 그래프이다. 도 7a는 DPPH 자유 라디칼 소거 활성, 도 7b는 ABTS 자유 라디칼 소거 활성, 도 7c는 ferric 환원력 분석, 도 7d는 Fe^{2+} 킬레이트 활성을 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명자들은 종래 기술의 문제점을 해소하기 위한 방법으로, 어류의 뼈와 껍질 중 적어도 하나의 샘플에서 콜라겐을 분리하고, 이 콜라겐을 고온, 고압의 물을 이용한 가압 수열 가수분해 반응시켜 콜라겐 펩타이드와 아미노산이 함유된 가수분해물을 수득하여 높은 잠재력을 가진 다양한 산업으로 활용할 수 있다는 점에 착안하여 본 발명을 완성하였다. 이하, 필요한 경우에 첨부하는 도면을 참조하면서 본 발명을 설명한다.
- [0020] 도 1은 본 발명의 예시적인 실시형태에 따라 어류 유래의 콜라겐 가수분해물을 회수, 수득하고 이들에 대한 분석 과정을 개략적으로 도시한 순서도이다. 도시된 것과 같이, 고등어의 뼈와 껍질 중에서 적어도 하나의 어류 샘플을 준비한다. 고등어(*Scomber japonicus*)는 전 세계적으로 소비되는 중요한 식품 소재로, 다양한 요리 방법을 통해 섭취되고 있으며 매일 많은 양의 고등어가 소비되고 있다. 고등어가 식품으로 소비될 때 뼈, 껍질 그리고 내장은 비-식용 부위로서 부산물로 처리되고 있다. 이러한 폐기물의 부적절한 처리로 인하여 악취 및 영양류에 의한 환경오염의 원인이 될 수 있다. 그러나 이러한 부산물에 함유된 기능성 물질의 높은 영양 가치 및 기타 산업적 활용 가능성을 고려해 볼 때, 현재 폐기되고 있는 이들 소재에 의한 환경오염의 문제를 해소하는 동시에, 적절한 가공 기술이 도입될 경우 상업적으로 유용한 소재를 회수하여 활용할 수 있다.
- [0021] 아울러, 전술한 것과 같이 최근에 국지적, 세계적으로 구제역 등이 유행하면서 육상 동물로부터 추출된 콜라겐에 대한 안전성 문제가 대두되고 있다. 하지만, 어류의 뼈와 껍질에 존재하는 콜라겐을 사용한다면 이러한 문제점을 해소할 수 있다. 특히 3면이 바다로 둘러싸인 국내의 지리적 환경에서 현재 다량 폐기되고 있는 고등어의 껍질과 뼈로부터 콜라겐 가수분해물을 추출할 수 있다면, 수산자원의 효율적 이용이라는 점에서 바람직할 수 있다. 더욱이, 본 발명에 따라 어류의 뼈와 껍질로부터 회수된 콜라겐 가수분해물은 화장품, 약품 및 식품 등의 기능성 소재로서 고부가가치 산업에 적용할 수 있는 이점을 또한 가진다.
- [0022] 준비된 고등어의 뼈와 껍질을 물로 깨끗이 세척한 뒤, 이들 준비된 샘플을 건조한다. 세척된 어류 샘플을 건조시키기 위한 방법으로서 바람이 통하는 그늘에서 자연적으로 건조시키는 방법을 사용할 수도 있지만, 특히 바람직하게는 고등어의 뼈와 껍질을 저온에서 동결 건조(freeze-dry)하는 방법을 채택할 수 있다. 동결건조 방식을 채택하면 특히 고등어의 뼈와 껍질에 함유되어 있는 콜라겐이 열에 의하여 변형되지 않으므로 특히 유용할 수 있다. 어류 샘플로서의 고등어의 뼈와 껍질을 동결 건조 방식을 이용하여 건조하고자 하는 경우, 동결 건조 온도는 대략 $-20 \sim 10^{\circ}\text{C}$, 바람직하게는 $-5 \sim 10^{\circ}\text{C}$ 이며, 건조 시간은 48-96 시간 범위일 수 있다. 이러한 조건에서 동결 건조시키면 어류 샘플은 완전히 건조되어 수분이 제거된 고등어의 뼈와 껍질 샘플을 얻을 수 있다. 하지만, 준비된 고등어의 뼈와 껍질의 상태에 따라 동결 건조 온도 및 건조 시간은 변형될 수 있다.
- [0023] 이어서, 건조된 고등어의 뼈와 껍질 샘플을 적절한 크기로 절단, 분쇄한다. 예시적인 실시형태에서 기계 블렌더(mechanical blend)를 사용하여 건조된 고등어육을 대략 0.1 ~ 3 cm의 크기로 절단한 뒤, 분말 형태로 분쇄할 수 있다. 또는 건조된 고등어의 뼈와 껍질을 균질기를 사용하여 분말 형태로 분쇄할 수 있다.
- [0024] 계속해서 분쇄된 고등어의 뼈와 껍질 샘플로부터 콜라겐을 분리할 수 있는데, 예시적으로 분쇄된 샘플에 적절한 단백질 분해 효소(protease), 예를 들어 콜라겐을 완전히 분해시키는 콜라게나아제 이외의 단백질 분해 효소인 펩신 등을 이용한다. 예시적인 실시형태에서 본 단계를 통하여 어류 샘플(뼈 및/또는 껍질)로부터 펩신 가용성 콜라겐(pepsin-solubilized collagen, PSC)을 분리하고, 이를 분말 형태로 회수할 수 있다.
- [0025] 예를 들어 고등어의 뼈와 같은 어류의 뼈를 샘플로 사용하는 경우, 콜라겐이 없는 부분을 제거하기 위하여 분쇄된 고등어의 뼈를 1:5 ~ 1:20 (w/v)의 비율로 희석한 알칼리 용액으로 처리하는 단계, 알칼리 용액의 처리에 의해 얻어진 불용성 고등어 뼈에 1:5 ~ 1:20 (w/v)의 비율의 탈회제를 가하여 탈석회화 하는 단계, 탈석회화된 고등어 뼈에 1:5 ~ 1:20 (w/v)의 알코올을 가하여 탈지 처리하는 단계, 탈지 처리된 고등어 뼈 잔여물에 펩신을 가하여 가수분해하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 콜라겐이 없는 부분을 제거하기 위하여 사용되는 알칼리 용액으로 0.01 ~ 1.0 M 농도의 수산화나트륨 또는 수산화칼슘 용액을 사용할 수 있다. 탈석회화에 사용되는 탈회제로는 1~20% 농도의 포름산, 아세트산, 피크르산(picric acid), 트리클로로아세트산과 같은 산(acid) 용액을 이용하는 탈회 방법이나, 시트르산-시트르산 버퍼와 같은 완충액을 이용하거나 금속과 착염(chelate)을 형성

하는 물질, 예를 들어 0.1 ~ 1.0 M 농도의 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylene diamine tetra acetic acid, EDTA)을 이용하는 작업을 이용하는 것과 같은 조직화학적 탈회 방법을 사용할 수 있다. 또한 탈지 처리 단계에서는 탄소수 1-4의 알코올, 예를 들어 부틸알코올을 사용할 수 있으며, 펩신은 예를 들어 아세트산과 같은 산에 희석된 형태로 사용될 수 있다.

[0026] 필요하다면, 알칼리 용액으로 처리한 뒤, 알칼리를 제거하기 위하여 증류수 등을 이용하여 수세/중화하는 단계와, 탈석회화하는 단계 이후에 탈회제를 제거하기 위하여 증류수 등을 이용하여 수세/중화하는 단계와, 탈지 처리하는 단계 이후에 알코올 등을 제거하기 위하여 증류수로 수세하는 단계를 포함할 수 있다.

[0027] 또한, 예를 들어 아세트산과 같은 산에 희석한 펩신을 사용한 경우라면, 그 이후에 NaCl과 같은 염을 첨가하여 용액의 농도를 조절하는 단계와, 침전물을 원심분리하고 아세트산 등의 산으로 용해하는 단계, 아세트산/증류수를 이용하여 투석하는 단계와, 투석에 의해 얻어진 시료를 동결 건조(예를 들어 -20 ~ 10℃)하는 단계를 포함할 수 있다.

[0028] 한편, 고등어의 껍질과 같은 어류 껍질을 샘플로 사용하는 경우 콜라겐을 분리하는 단계는, 분쇄된 고등어의 껍질을 1:20 ~ 1:50(w/v)의 비율로 희석한 0.01 ~ 1.0 M 농도의 수산화나트륨 또는 수산화칼슘 용액과 같은 알칼리 용액으로 처리하는 단계와, 알칼리 용액의 처리에 의해 얻어진 불용성 고등어 껍질에 1:20 ~ 1:50 (w/v)의 부틸알코올과 같은 탄소수 1-4의 알코올 일 수 있는 알코올을 가하여 탈지 처리하는 단계와, 탈지 처리된 고등어 껍질 잔여물에 펩신을 가하여 가수분해하는 단계를 포함할 수 있다. 어류 뼈와 마찬가지로 펩신은 예를 들어 아세트산과 같은 산에 희석된 형태로 사용될 수 있다.

[0029] 필요하다면, 알칼리 용액으로 처리한 뒤, 알칼리를 제거하기 위하여 증류수 등을 이용하여 수세/중화하는 단계와, 탈지 처리하는 단계 이후에 알코올 등을 제거하기 위하여 증류수로 수세하는 단계를 포함할 수 있다. 또한, 예를 들어 아세트산과 같은 산에 희석한 펩신을 사용한 경우라면, 그 이후에 NaCl과 같은 염을 첨가하여 용액의 농도를 조절하는 단계와, 침전물을 원심분리하고 아세트산 등의 산으로 용해하는 단계, 아세트산/증류수를 이용하여 투석하는 단계와, 투석에 의해 얻어진 시료를 동결 건조(예를 들어 -20 ~ 10℃)하는 단계를 포함할 수 있다.

[0030] 콜라겐 타입 I 을 포함하는 콜라겐은 3개의 폴리펩타이드 체인이 3가닥 묶여 나선(helix) 구조를 형성하고 있으며, 분자의 양 말단에는 나선 구조를 가지지 않는 텔로펩타이드(telopeptide)라는 구조를 가지고 있다. 콜라겐 분자 구조에서 텔로펩타이드는 분자내(intra-molecule) 및 분자간(inter-molecule) 가교가 도입되는 부분인데, 생체 내에서 콜라겐의 텔로펩타이드 부분에 분자가 가교가 도입되어 불용화된다. 이 불용성 콜라겐에 펩신 등의 프로테아제를 처리하면 가교 부분의 텔로펩타이드를 제거, 소화되어 가용화된 아테로콜라겐을 얻을 수 있다.

[0031] 본 발명의 예시적인 실시예에서는 이와 같은 과정을 통하여 고등어의 뼈 및/또는 껍질과 같은 어류 샘플로부터 분리된 펩신 가용성 콜라겐에 대한 SDS-PAGE 분석 결과 3개의 사슬(2개의 α-체인 및 1개의 β-체인)이 결합되어 있는 콜라겐 타입 I 이었으며(실시예 3의 SDS-PAGE와 도 3; 실시예 4의 FT-IR와 도 4a 및 도 4b 참조), 열변성 특성이나 점도도 양호한 것으로 나타났다(실시예 5 참조). 열 변성과 관련해서는 콜라겐의 열적 안정성에 관여하는 이미노산은 물론이고 콜라겐의 주요 아미노산인 프롤린과 하이드록시프롤린의 함량과도 연관이 있을 수 있다.

[0032] 이어서, 어류 유래의 콜라겐에 고온, 고압의 물을 가하는 가압 수열 가수분해 반응에 의하여 콜라겐 가수분해물을 회수, 수득한다. 종래 생체 유래의 고분자 물질을 분해시키기 위한 방법으로서, 산, 알칼리 또는 촉매를 이용하는 화학적 처리법과 효소를 이용한 가수 분해법이 있으나, 화학적 처리법은 격렬한 반응 조건을 필요로 하며 심각한 환경오염을 초래하고 투입된 화학물질을 회수하기 위한 공정이 요구되며 제품의 품질 저하가 따를 수 있다. 효소 처리법은 반응 진행과정이 복잡하고 생산주기를 완료하는데 장시간 소요되며 경제성의 문제점이 따른다.

[0033] 이에, 본 발명에서는 고온, 고압의 물을 이용한 가압 열수 가수분해 반응을 이용한다. 순수한 물은 대기압에서 100℃의 끓는점을 가지고 있으며, 이 영역에서 열수 추출을 수행하고 있으나, 압력의 변화 없이 온도 변화에 대한 실험 범위가 제한적이다. 그러나 물의 임계점(critical point)은 온도 374℃, 압력 22 MPa에서 존재하는 고유의 영역으로, 그 이하에서 물은 아임계 상태를 유지하는데, 아임계 상태에서 물은 높은 압력으로 인하여 액상을 유지한다. 즉, 이 조건에서의 물은 기체 상태와 액체상태의 영역이 존재하지 않고 다양한 온도와 압력 변화에 따른 조건이 형성될 수 있으며, 다양한 영역에서의 아임계수는 물리적 특성이 다른 상태로 존재한다.

[0034] 이처럼 물을 아임계 상태로 전환시켜 높은 용해력, 낮은 유전율, 작은 계면장력, 빠른 침투성, 낮은 점성 등의

독특한 물리적 특성을 이용하여 고분자 물질을 가수분해시킬 경우, 효율적으로 가수분해 반응이 진행될 수 있는 장점을 가지고 있다. 예를 들어, 다양한 조건에서의 아임계수(sub-critical water)를 이용한 수열 반응은 상온 대기압 상태 보다 훨씬 많은 이온들을 가지고 있어, 이 이온들이 산 또는 염기와 같은 촉매 작용을 한다. 뿐만 아니라, 예를 들어, 아임계 상태의 물이 가지는 낮은 유전상수로 인하여 광범위한 유기 화합물과 반응하여 이들 유기화합물을 용해시키기에 적절한 용매로 기능할 수 있다. 이처럼, 초임계 조건 이하, 즉 임계온도 및 임계 압력 이하의 조건을 가지는 아임계수가 가지는 물리적, 화학적 특성으로 인하여 아임계수는 많은 화학 반응에서 새로운 반응 매질로 기능한다.

[0035]

특히, 아임계 상태에서의 수열 가수 분해공정(hydrothermal hydrolysis process)은 짧은 반응 시간, 높은 가수 분해율, 가수분해물의 안전성, 공정의 단순성, 환경 친화적 공정 등으로 기존의 가수분해 공정의 대체기술로 인정받고 있다. 이에, 본 발명에서는 아임계 상태인 고온, 고압의 물을 이용한 가수 열수 가수분해 반응을 이용하여, 아임계수가 포화기체 영역에서 벗어나 액체상태가 되면, 고분자 물질이 탄화되지 않고 액상의 가압 수열 가수분해(pressurized hydrothermal hydrolysis) 반응이 진행되어 기능적 특성을 가진 생성물을 수득하는 특징을 이용한다. 아임계수 가수분해 공정은 사전-처리(pre-treatment) 작업이 필요 없고, 반응시간이 상대적으로 짧으며, 반응에 의한 부식이나 잔여물 생성이 적으며, 독성 용매를 사용할 필요도 없고, 분해 상물의 형성이 작은 이점을 가지고 있어서 기존의 산이나 염기를 사용하는 화학적 방법이나 촉매적 방법의 대안으로서 사용될 수 있는, 환경 친화적이고 신속한 생물질(biomass)의 가수분해 방법이다.

[0036]

예시적으로 본 발명에 따라 어류 유래의 콜라겐, 예를 들어 펩신 가용성 콜라겐의 가수분해물을 회수, 수득하기 위하여 사용되는 고온, 고압의 물은 150~350℃의 온도, 바람직하게는 220~260℃의 온도와 같은 200~300℃의 온도 및 4~400 bar의 압력, 바람직하게는 30~70 bar의 압력과 같은 20 ~ 100 bar 압력과 같은 아임계 조건으로 조정될 수 있다.

[0037]

예를 들어 본 발명에 따른 고온, 고압의 물을 이용한 가압 열수 가수분해 공정은 도 2에 예시적으로 도시되어 있는 가수분해 장비를 이용하여 수행될 수 있다. 도 2에서 부호 1은 안전밸브, 부호 2는 압력 게이지(pressure gauge), 부호 3은 니들 밸브, 부호 4는 전기 히터, 부호 5는 고압 반응기, 부호 6은 임펠러/교반기(impeller/stirrer), 부호 7은 교반 속도 및 온도 컨트롤러, 부호 8은 샘플 수집기이다. 예를 들어, 고등어와 같은 어류 유래의 뼈 및/또는 껍질로부터 얻어진 콜라겐 샘플을 샘플 수집기(8)로부터 반응기(5)로 옮기고, 증류수와 같은 물로 반응기를 채운다. 예시적인 실시형태에서, 콜라겐 샘플과 아임계 상태로 전환될 수 있는 물은 1:100 ~ 1:300 w/v의 비율로 반응기(5)에서 혼합, 반응할 수 있다. 이어서, 가압 열수 반응에 의한 콜라겐의 가수분해를 위하여 온도 컨트롤러(7) 및 압력 게이지(2)를 이용하여 반응기(5) 내부를 소정의 온도와 압력에 도달하도록 작동한다. 동시에 반응기(5) 내부에 부착된 교반기(6)를 사용하여 반응기(5) 내로 주입된 콜라겐과 아임계수 혼합물의 균일성을 유지하는 동시에 소정의 압력과 열이 고등어육에 일정하게 유지되도록 유도할 수 있다.

[0038]

본 발명에서는 진술한 공정을 통하여 회수된 어류의 뼈 및/또는 껍질에서 유래된 콜라겐 가수분해물에 대하여 MALDI-TOF-MS 분석을 통한 분자량 측정, 아미노산 조성 분석 및 항산화 활성을 측정하였다. 예시적인 실시예에 따르면, 가압 열수 가수분해 반응에 의하여 얻어진 콜라겐 가수분해물의 분자량은 모두 3000 Da 이하로서, 일반적인 콜라겐의 분자량인 수백 kDa에 비하여 크게 감소하였다(도 6a sow 도 6c 및 실시예 7 참조). 이러한 분석 결과는 본 발명에 따라 최종적으로 회수, 수득된 어류 뼈 및/또는 껍질 유래의 콜라겐 가수분해물이 인체 내로 신속하게 유입될 수 있다는 점을 의미한다.

[0039]

또한, 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 얻어진 콜라겐 가수분해물에는 식욕 부진과 빈혈로 고생하는 사람들에게 도움이 되는 아미노산인 리신의 함량이 상대적으로 많을 뿐만 아니라, 신체의 결합 조직의 형성에 중요한 기능을 수행하는 글리신, 프롤린과 하이드록시프롤린이 많이 함유되어 있다(실시예 8의 표 7 참조). 아울러, 본 발명의 예시적인 실시예에 따르면 본 발명의 공정에 따라 회수된 콜라겐 가수분해물은 항산화 활성을 가지고 있다(실시예 9의 표 8 및 도 7a-7d 참조).

[0040]

따라서 본 발명에 따라 어류의 뼈 및/또는 껍질에서 콜라겐을 분리하고, 이를 가압 수열 가수분해 반응을 통하여 콜라겐 펩타이드와 아미노산이 함유된 가수분해물을 수득할 수 있다. 본 발명에 따라 회수된 콜라겐 가수분해물은 항산화 활성을 가질 뿐만 아니라, 인체에 상대적으로 쉽게 투여될 수 있기 때문에, 화장품, 약품 및/또는 식품의 기능성 성분으로 첨가될 수 있어서 다양한 산업에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0041]

이하, 예시적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명이 하기 기재된 실시예에 기재된 발명으로 결코 한정되지 않는다.

[0042]

재료

[0043]

고등어(*Scomber japonicus*)는 부산 소재의 수산물 가공회사((주)동원해사랑)에서 제공받았다. 사용된 시약(펩신, protein marker, 육상동물 콜라겐, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS), potassium ferricyanide, 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine(ferrozine), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid(trolox)는 Sigma Aldrich(St. Louis, MO., USA)에서 구입하였으며, 그 외 다른 시약과 용매는 분석용 또는 HPLC 등급을 사용하였다.

[0044]

실시예 1 : 고등어 뼈와 껍질의 성분 분석

[0045]

가공되지 않은 고등어의 뼈와 껍질을 분리하여 차가운 물에서 수세한 후 시료를 72시간 동안 동결 건조하였다. 건조된 시료는 균질기에서 분쇄한 후 -20℃에서 보관하였다. 고등어 뼈와 껍질에 대한 일반 조성을 분석하기 위하여 AOAC 방법에 따라 수분, 회분, 조지방과 단백질의 함량을 측정하였다. 비-단백질 함량은 수분, 회분, 지방과 단백질의 총 함량에서 뺀 값으로 계산하였다. 본 실시예에서 사용된 시료는 동결 건조된 고등어 뼈와 껍질을 대상으로 하였으며, 건조된 고등어 뼈와 껍질에서의 주요 구성 성분의 함량 분석 결과는 하기 표 1에 표시되어 있다. 건조된 고등어 껍질은 건조된 고등어 뼈에 비하여 단백질과 지질의 함량이 상대적으로 높다는 것을 확인하였다.

표 1

[0046]

건조된 고등어 뼈와 껍질의 주요 구성 성분

샘플 명	수분 (%)	회분 (%)	조지방 (%)	조단백(%)	비-단백질(%)
건조 고등어 뼈	6.68±0.07	6.89±0.06	17.59±1.10	47.25±1.25	21.59±1.28
건조 고등어 껍질	4.60±0.06	4.50±0.05	29.47±1.26	49.49±1.52	11.94±0.76

[0047]

실시예 2 : 고등어 뼈와 껍질에서 펩신 가용성 콜라겐 분리

[0048]

고등어 뼈와 껍질에 있는 펩신 가용성 콜라겐(pepsin-solubilized collagen, PSC)은 아래와 같은 방법으로 분리하였고, 과정은 -4℃에서 수행하였다. 먼저 콜라겐이 없는 부분을 제거하기 위하여 분쇄된 고등어 뼈를 1:10 (w/v) 비율로 희석한 0.1 M NaOH(알칼리 용액)으로 처리하였다. 혼합물은 자석교반기를 사용하여 250 rpm에서 24 시간동안 지속적으로 교반하였다. 이때 알칼리 용액을 6시간마다 교환하였다. 그 다음 차가운 증류수로 수세한 시료를 중성에 도달할 때까지 수세한 다음 동결 건조시켰다(EYELA FDV-2100, Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan). 그 후 불용성 뼈를 1:10 (w/v)비율로 희석한 0.5 M 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA, pH 7.5)으로 4일 동안 탈석회화시켰다. 이 때 EDTA용액은 매일 갈아주었다. 잔여물들은 차가운 증류수로 수세한 다음 지방을 제거하기 위해 1:10 (w/v)비율로 희석한 10% (v/v) butyl alcohol로 24시간 동안 처리하였다. 그리고 다시 증류수로 씻은 다음 남은 잔여물들을 0.1%(w/v) 펩신을 포함한 1:10 (w/v) 비율로 희석시킨 0.57 M 아세트산으로 3일 동안 처리하였고 12,000 rpm으로 50 분간 원심분리 시켰다. 남은 잔여물을 앞과 같은 용액으로 3일 동안 다시 추출하였으며 같은 조건에서 원심분리 하였다. 각각의 점성 있는 용액들은 NaCl을 첨가하여 최종적으로 2.0M으로 농도를 맞추었다. 이 용액을 24시간 동안 배양하였으며 침전물을 측정했다. 이 침전물을 20분간 12,000 rpm으로 원심분리 시킨 후 0.57 M의 아세트산으로 용해시켰다. 이 용액은 0.1 M 아세트산과 증류수로 투석시킨 후 투석액에 넣어 2시간동안 보관 후 동결 건조하였다.

[0049]

한편, 분쇄된 고등어 껍질은 1:35 (w/v)비율로 희석된 0.1 M NaOH 알칼리 용액으로 24시간 처리하였으며 자석 교반기를 이용하여 교반시켰다. 이때 용액은 하루에 4번 교체해주었다. 그리고 차가운 증류수로 수세하였다. 그 다음 동결 건조한 시료를 1:35 (w/v)비율로 희석된 10% (w/v) butyl alcohol로 24시간동안 탈지하였다. 탈지된 잔여물들은 차가운 증류수로 수세한 후 0.1% (w/v) 펩신을 포함한 1:35 (w/v)로 희석된 0.57 M 아세트산으로 3일간 혼합시켰다. 반복 되는 절차들은 위에 설명된 고등어 뼈에서 콜라겐을 분리하는 과정에 따라 수행했다.

[0050]

펩신 가용성 콜라겐의 함량은 문헌에 기재된 방법(D.E. Goll et al., 1963 *J. Food Science*, 28(5):503-509)에 따라 히드록시프롤린을 정량화한 다음 환산계수를 곱하여 구하였으며, 히드록시프롤린의 함량은 문헌에 기재된

방법(I. Bergman et al., 1963, *Analytical Chemistry*, 35(12):1961-65)에 기재된 방법을 약간 변형하여 정량하였다. 하기 표 2에서 고등어 뼈와 껍질에서 얻어진 펩신 가용성 콜라겐 및 일반 조성의 분석 결과를 나타낸다. 펩신 가용성 콜라겐은 고등어 뼈에 비하여 껍질에서 높은 함량을 나타냈다. 고등어 뼈와 껍질의 단백질 함량은 각각 90.05 ± 2.34 및 86.89 ± 2.48 %로 비교되었다. 또한, 고등어 뼈와 껍질의 수분 (6.28 ± 0.12 및 7.48 ± 0.10 %), 회분(3.48 ± 0.09 및 5.37 ± 0.06 %), 그리고 지방 함량 (0.19 ± 0.02 및 0.26 ± 0.03 %)이었다.

표 2

[0051]

건조된 고등어 뼈와 껍질의 콜라겐 함량 및 일반 성분 비교

조성(%)	콜라겐	
	뼈	껍질
수율	1.75 ± 0.07	8.10 ± 0.12
단백질	90.05 ± 2.34	86.89 ± 2.48
수분	6.28 ± 0.12	7.48 ± 0.10
회분	3.48 ± 0.09	5.37 ± 0.06
지질	0.19 ± 0.02	0.26 ± 0.03

[0052]

실시예 3 : 펩신 가용성 콜라겐의 분자량 측정

[0053]

실시예 2에서 얻어진 펩신 가용성 콜라겐 분말을 대상으로 SDS-PAGE를 이용하여 분자량을 측정하였다. 단백질은 3.0% stacking gel과 5.0% resolving gel을 이용한 Laemmli의 수정된 방법에 따라 분석되었다. 실시예 2에서 얻어진 PSC 시료 2g을 1.0 mL의 0.02 M sodium phosphate 완충제(pH 7.2)에서 용해시킨 후 시료 완충제와 혼합하였다. 그리고 각각의 시료(20 μ g 단백질) 20 μ L을 polyacrylamide gels에 준비시켰고 30 mA 전류로 지속적인 전기영동에 의해 분리시켰다. 동일한 방법과 과정을 거쳐 송아지 껍질과 소의 힘줄로부터 분리된 콜라겐을 표준물질로 사용하여, 실시예 2에서 고등어의 뼈와 껍질에서 분리한 콜라겐과 비교 분석하였다. 또한 분자량(MW)이 높은 markers는 단백질의 분자량을 특정하기 위해 사용되었다. 본 실시예에 따라 고등어 뼈와 껍질에서 분리된 펩신 가용성 콜라겐(PSC)의 분자량 크기에 대한 SDS-PAGE 패턴 결과가 도 3에 도시되어 있다. 두개의 α -체인(α_1 and α_2)을 함유하고 있는 콜라겐은 분자량이 116 kDa(α_1)과 126 kDa(α_2)을 나타내고 있고, 표준 콜라겐의 분자량과 유사한 값을 보이고 있다. 또한 고등어의 뼈와 껍질로부터 분리된 β -체인의 콜라겐은 205 kDa의 분자량을 보이고 있다. 이는 고등어의 뼈와 껍질에서 분리된 콜라겐은 동물 유래 콜라겐과 유사한 크기의 분자량을 가지고 있다는 것을 의미한다.

[0054]

실시예 4 : 펩신 가용성 콜라겐의 FT-IR 분석

[0055]

실시예 2에서 고등어의 뼈와 껍질에서 각각 얻어진 펩신 가용성 콜라겐 분말을 대상으로 FT-IR 분석을 수행하였다. 동결 건조된 고등어의 뼈와 껍질의 PSCs FT-IR 스펙트럼은 Perkin Elmer (USA), Spectrum X를 사용하여 얻을 수 있었고, 스펙트럼은 $4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$, 4 cm^{-1} 의 해상도에서 측정하였다. 고등어 뼈와 껍질에서 분리된 콜라겐에 대한 FT-IR 스펙트럼 분석 결과가 각각 도 4a 및 도 4b에 도시되어 있다. 이들 도면에 나타낸 바와 같이 고등어 뼈와 껍질에서 분리된 콜라겐의 밴드는 3283 cm^{-1} 및 3285 cm^{-1} 에서 나타났다. 이들 도면에 표시된 amide I, amide II, amide III band에 대한 파장은 콜라겐의 성상과 직접 연관되며, amide I 밴드($1600\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$)는 폴리펩타이드에 있는 carbonyl groups (C=O)의 진동과 연관된다. Amide II band($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$)는 N-H bending 및 C-N stretching 진동과 연관되며, amide III band($1220\text{--}1320\text{ cm}^{-1}$)는 C-N stretching 진동과 N-H 변형과 연관된다. 본 실시예에 따른 FT-IR 스펙트럼 분석을 통해, 실시예 2에서 분리, 획득된 물질이 콜라겐임을 확인할 수 있었다.

[0056]

실시예 5 : 펩신 가용성 콜라겐의 점도 및 변성 온도 측정

[0057]

실시예 2에서 얻어진 펩신 가용성 콜라겐 분말을 대상으로 점도 및 변성 온도를 측정하였다. 점도는 Brookfield DV II + Pro viscometer (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA 02346 USA)를 사용하여

고등어의 뼈와 껍질에 대한 점성을 아래의 방법으로 측정하였다. 0.1 M 아세트산에 0.1% (w/v) PSC 8 mL을 넣고 20분간 10℃에서 배양시킨 후 용기에 두었다. 그 다음 SC4-18을 사용하여 150 rpm에서 회전시켜 얻은 data를 시료의 점성 측정을 위해 사용하고, 점도의 단위는 centipose (cP) 단위로 표현하였다.

콜라겐은 점도가 높은 것이 중요한 특징인데, 본 실시예에 따라 고등어 뼈와 껍질로부터 분리된 콜라겐(PSC)의 점도를 표 3에 표시하였다. 점도 범위는 18.34 ± 0.25 및 20.26 ± 0.21 cP이었다.

한편, 변성온도(Td)는 아래의 방법에 따라 측정하였다. 0.1 M 아세트산에 0.1% (w/v) PSC 8 mL을 넣고 10??40℃에서 3℃ 간격으로 가열시킨다. 이 용액을 점성을 측정하기 전에 20분 동안 지정된 온도에서 보관하였다. PSC의 열 변성 곡선은 온도에 대한 점도의 약간의 변화가 좌표에 나타났다. fractional viscosity는 각 온도마다 다음과 같이 계산되었다. fractional viscosity는 최대 점도를 측정된 점도로 나눈 것이다. 변성 온도는 fractional viscosity가 0.5에 근접하였을 때의 온도로 결정하였다. 하기 표 3과 도 5는 고등어 뼈와 껍질로부터 수득한 콜라겐의 변성 온도에 대한 전환 곡선을 표시하고 있다.

표 3

고등어의 뼈와 고등어의 껍질에서 분리된 껍질의 점도와 변성 온도

물성	콜라겐	
	뼈	껍질
점도(cP)	18.34 ± 0.25	20.26 ± 0.21
변성 온도(℃)	27	30

실시예 6 : 가압 수열 가수분해를 이용한 콜라겐 가수분해물 회수, 수득

실시예 2에서 얻어진 펩신 가용성 콜라겐을 가수분해하기 위하여 도 2에 도시된 것과 같은 고온, 고압용 회분식 반응기를 사용하였다. 가수분해 반응기는 온도제어기와 함께 Hastelloy 276로 구성된 200 mL의 회분식 반응으로 실험을 진행하였다. 실시예 2에서 얻어진 콜라겐(0.5 g)과 물을 1:200 (w/v)의 비율로 혼합하여 반응기에 주입하였다. 가수분해 반응 조건은 전기 가열기를 사용해서 원하는 온도(200-250℃)와 압력(30-70bar)에서 가열하였다. 반응기의 온도와 압력을 온도 조절기와 압력 게이지를 사용하여 실험 중에 측정하였다. 샘플은 150 rpm에서 자석 교반기를 사용하여 교반하였다. 가열시간은 26~54분이 지난 후 원하는 온도에 도달하였고, 3분 동안 유지하였다. 반응기에 냉각순환 자켓을 연결하여 냉각한 후, 가수분해물 샘플은 반응기로부터 회수되었고, 여과지를 사용하여 여과하였다.

실시예 7 : 콜라겐 가수분해물에 대한 MALDI-TOF 질량 분석

실시예 7에서 얻어진 콜라겐 가수분해물에 대한 분자량을 측정하기 위하여, 회수된 콜라겐 가수분해물에 대하여 MALDI-TOF-MS(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry) 분석을 수행하였다. 실시예 6을 통하여 고등어의 뼈와 껍질로부터 분리된 펩신 가용성 콜라겐(PSC) 가수분해물 샘플 1 μL을 광택 스틸 384 표적 판에 붙였다. 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) 1 μL와 1% THF가 포함된 매트릭스 용액을 섞고 건조시켰다. 각 샘플은 377 nm의 펄스 질소레이저가 탑재된 Ultraflex III 질량분석기(Bruker Daltonics, 독일)의 MALDI TOF MS를 이용하여 분석하였다. 측정 범위는700-6000 m/z에서 양이온화 및 반사 모드에서 200 레이저 샷으로부터 데이터를 축적하여 획득하였다.

본 실시예에 따른 분석 결과는 도 6a 내지 도 6c 및 하기 표 4 내지 6에 표시되어 있다. 이들 도면 및 표에 나타난 것과 같이, 회수된 가수분해물에 존재하는 콜라겐의 분자량의 범위가 고등어 뼈에서 분리된 콜라겐을 200℃, 30 bar조건에서 가수분해한 경우 펩타이드의 크기는 약 759-988 Da이었고, 같은 조건에서 처리된 고등어의 껍질의 콜라겐 가수분해물의 펩타이드 크기 789-1632 Da 범위를 나타냈다. 가수분해 반응 조건 250℃, 70 bar에서 처리된 고등어 껍질의 콜라겐 가수분해물에 존재하는 펩타이드 크기는 952-1638 Da 범위를 보였다. 이 결과들은 일반 콜라겐 분자량인 116-126 kDa의 범위 보다 크게 감소함을 알 수 있다. 가수분해물에 존재하는 펩타이드는 Mascot Database를 사용하여 동정하였으며, 예상되는 펩타이드를 표 4 내지 6에 또한 표시하였다.

표 4

[0066]

고등어 뼈 콜라겐 가수분해물에 대한 MALDI-TOF 질량 분석(200℃, 30 bar)

m/z	Molecular weight (dalton)	Predicted peptide *	Intensity
760.13	759.12	K.TKATLAR.M	144.83
762.12	761.11	K.RMDLAR.I	212.60
764.14	763.14	K.VTFNRK.Q	129.75
889.63	888.62	K.ATLARMAR.G	181.04
891.62	890.61	R.MARGAMVR.F	178.46
953.29	952.29	R.FVFIYQH.-	282.55
985.22	984.21	-.MKII I IAPAK.K	3335.74
987.21	986.21	M.ADAELEAIR.Q	2814.04
989.21	988.20	K.TLWHCSDK.L	987.93

표 5

[0067]

고등어 껍질 콜라겐 가수분해물에 대한 MALDI-TOF 질량 분석(200℃, 30 bar)

m/z	Molecular weight (dalton)	Predicted peptide *	Intensity
790.36	789.36	R.SDGSRIK.F	114.43
1121.27	1120.26	-.MIQMOTKLK.-	91.13
1133.11	1132.10	K.DAAADKAEDVK.D	150.02
1146.10	1145.09	K.EGLGKLTGNEK.L	138.77
1148.09	1147.08	R.RYANIGDVIK.Y	70.98
1217.12	1216.11	K.QLDTLGNDKGR.L	2173.88
1219.12	1218.11	K.DAVEDKVEDAK.E	1036.45
1221.11	1220.10	K.KGDVYDAVVVR.T	169.52
1633.92	1632.92	R.SAQFMKIVSLAPEVL.-	120.54

표 6

[0068]

고등어 뼈 콜라겐 가수분해물에 대한 MALDI-TOF 질량 분석(250℃, 70 bar)

m/z	Molecular weight (dalton)	Predicted peptide *	Intensity
953.30	952.30	R.HAEVVASIK.A	5328.47
955.30	954.29	R.SVDPGSPAAR.S	1027.45
976.27	975.27	-.MKTAQELR.V	398.92
1369.13	1368.13	K.NLLTGSASESVYK.A	163.41

[0069]

표 4 내지 6의 약어: A-알라닌, C-시스테인, D-아스파르트산, E-글루탐산, F-페닐알라닌, G-글리신, H-히스티딘, I-이소류신, K-리신, M-메티오닌, N-아스파라긴, P-프롤린, Q-글루타민, R-아르기닌, S-세린, T-트레오닌, V-발린, W-트립토판, Y-티로신; *예상된 펩타이드는 mascot 데이터베이스 (<http://www.matrixscience.com>에서 확인)

[0070]

실시예 8 : 콜라겐 가수분해물에 대한 아미노산 조성 분석

[0071]

실시예 7에서 얻어진 콜라겐 가수분해물에 대한 분자량을 측정하기 위하여, 회수된 가수분해물에 대한 아미노산 조성을 분석하였다. 아미노산 함량 분석을 위해 S430(SYKAM) 아미노산 자동 분석기를 사용하였고, 양이온 분리 컬럼 LCA K07/Li (4.6 × 150 mm)은 37-74℃의 컬럼 온도와 완충제 pH 범위는 2.90-7.95를 사용하였다. 이동상은 1분당 0.45mL의 유량에서 5 mM p-toluenesulphonic acid 용액을 사용하였고, 5 mM p-toluenesulphonic acid과, 20 mM of Bis-Tris, EDTA 100 mM의 혼합물은 분당 0.25 mL의 유량으로 포스트컬럼 시약으로서 사용되었다. 방출 파장은 440과 570 nm에서 작동하였다. 고등어 뼈와 껍질에서 분리한 콜라겐을 수열

반응을 통하여 생산된 아미노산의 조성과 함량을 표 7에 나타내었다.

표 7

콜라겐 가수분해물의 아미노산 조성

	(mg/g)			
아미노산 조성	Bone collagen hydrolyzate		Skin collagen hydrolyzate	
	Temperature (℃)/Pressure(bar)			
	200/30	250/70	200/30	250/70
포스포세린	0.32±0.03 ^a	0.27±0.02 ^a	0.20±0.01 ^b	0.16±0.01 ^b
타우린	0.40±0.02 ^a	0.48±0.03 ^a	0.18±0.01 ^b	0.26±0.02 ^b
아스파르트산	2.28±0.05 ^a	1.89±0.04 ^a	0.99±0.04 ^b	1.01±0.03 ^b
하이드록시프롤린	5.99±0.09 ^a	5.33±0.07 ^b	5.37±0.08 ^b	4.71±0.06 ^c
세린	1.67±0.06 ^a	ND	1.08±0.04 ^b	ND
글루탐산	1.17±0.04 ^a	1.24±0.04 ^a	0.73±0.02 ^b	0.64±0.03 ^b
프롤린	13.20±0.12 ^b	11.52±0.17 ^c	15.36±0.11 ^a	11.92±0.15 ^c
글리신	40.86±1.80 ^a	35.26±1.12 ^b	38.56±1.15 ^a	33.59±1.25 ^b
알라닌	24.82±0.88 ^a	21.19±0.82 ^b	24.83±0.92 ^a	19.36±0.78 ^c
α-아미노부티르산	1.09±0.04 ^a	1.15±0.03 ^a	0.59±0.03 ^b	0.31±0.02 ^b
발린	4.44±0.15 ^b	4.07±0.18 ^c	5.27±0.16 ^a	3.89±0.11 ^c
시스테인	2.61±0.09 ^a	2.28±0.08 ^a	1.70±0.08 ^b	1.36±0.07 ^b
메티오닌	2.29±0.07 ^a	1.35±0.08 ^b	0.64±0.03 ^c	0.59±0.02 ^c
시스타티온	3.34±0.10 ^a	2.80±0.07 ^b	1.42±0.06 ^c	0.88±0.04 ^d
이소류신	4.36±0.15 ^a	3.77±0.12 ^a	1.78±0.09 ^b	1.42±0.08 ^b
류신	8.05±0.18 ^a	4.07±0.11 ^c	5.33±0.15 ^b	4.47±0.12 ^c
티로신	5.34±0.16 ^a	4.53±0.11 ^b	1.90±0.08 ^c	1.63±0.09 ^c
페닐알라닌	6.03±0.13 ^a	5.89±0.11 ^a	2.30±0.10 ^b	2.02±0.08 ^b
β-알라닌	0.01±0.01	0.04±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01
β-아미노부티르산	0.18±0.02	0.12±0.02	0.10±0.01	0.11±0.01
γ-아미노-n-부티르산	0.03±0.01	0.05±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01
히스티딘	5.46±0.11 ^a	3.50±0.10 ^b	1.93±0.08 ^c	1.73±0.07 ^c
히드록시리신	0.13±0.01 ^b	0.55±0.02 ^a	0.06±0.01 ^b	0.43±0.02 ^a
오르니틴	1.09±0.05 ^b	1.01±0.06 ^b	1.91±0.06 ^a	0.83±0.04 ^b
리신	7.08±0.12 ^a	6.79±0.10 ^a	4.21±0.11 ^b	3.64±0.09 ^b
에탄올아민	0.79±0.03 ^a	0.62±0.02 ^b	0.46±0.04 ^c	0.28±0.01 ^d
아르기닌	3.42±0.09 ^a	ND	2.11±0.08 ^b	ND

표 7에 나타낸 바와 같이 아미노산 조성은 적용된 온도 및 압력 조건에 따라 아미노산의 함량이 달라짐을 알 수 있으므로 수열 반응의 온도와 압력이 중요한 변수임을 알 수 있다. 가수분해물에 존재하는 아미노산 중에 글리신(glycine)의 함량이 높았고, 고등어 뼈의 가수분해물에는 약 27.90-29.44%, 고등어 껍질의 가수분해물에는 약 32.38-35.25%를 나타내었다.

실시예 9 : 콜라겐 가수분해물에 대한 항산화 활성 분석

실시예 6에서 얻어진 콜라겐 가수분해물에 대한 항산화 활성을 알아보기 위하여, DPPH 자유 라디칼 소거능, ABTS 자유 라디칼 소거능, 철 환원력(Ferric reducing power activity), Fe²⁺ 킬레이팅 활성법으로 측정하였다.

- [0076] **DPPH 자유 라디칼 소거 분석법**
- [0077] DPPH 자유 라디칼 소거 분석을 위하여, 가수분해 전과 후에 다양한 농도에서 0.1 mL의 콜라겐 샘플이 담긴 Test tubes에 0.1 mM의 DPPH용액이 포함된 메탄올 3.95mL을 첨가했다. 이 혼합물들은 10초 동안 섞은 후 어둠에서 30 분동안 상온으로 배양하였다. 모든 샘플의 517 nm서 흡광도를 측정 하였다. DPPH 자유radical 소거활성 비율은 다음 수식을 통하여 계산되었다.
- [0078]
$$\text{DPPH 라디칼 소거능}(\%) = (1 - [As/Ac]) \times 100$$
- [0079] (As는 517 nm에서 측정된 샘플의 흡광도; Ac는 517 nm에의 공실험 흡광도)
- [0080] 공실험과 실측된 실험은(메탄올에 trolox의 다양한 농도) 앞에서 설명한 것과 같은 절차를 통해 분석되었다.
- [0081] **ABTS+ 자유 라디칼 제거 분석법**
- [0082] ABTS^+ 자유 라디칼 제거 분석법은 다음과 같은 방법으로 행해졌다. ABTS는 7 mM/L의 농도로 물에 용해시켜 ABTS^+ 를 제조하였다. ABTS^+ 는 ABTS 저장액과 같은 양의 2.45mM/L 황산칼륨과 반응하고, 사용 전에 16시간 동안 상온과 암흑 속에서 혼합물이 배양되어 만들어졌다. 샘플 분석을 위해, ABTS^+ 저장액은 734 nm에서 0.70 ± 0.02 의 흡광도의 80% 메탄올로 하였고, 희석된 ABTS 3.95 mL와 PSC 및 그 가수분해물 샘플 0.05 mL을 더한 후에(가수분해 전후에 다른 조건에서), 혼합물을 어두운 환경에서 6분 동안 상온상태로 유지한다. 모든 샘플은 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자유 radical 소거활성 ABTS+ 퍼센트는 다음과 같은 공식을 통해서 계산되었다.
- [0083]
$$\text{ABTS}^+ \text{ 라디칼 소거능}(\%) = (1 - [As/Ac]) \times 100$$
- [0084] (여기서 As는 734 nm에서 제어된 샘플의 흡광도; Ac는 734 nm에서 공실험 흡광도)
- [0085] 공실험과 실측된 실험은(80% 메탄올에 trolox의 다양한 농도) 위에서 설명한 것과 같이 분석하였다.
- [0086] **철 환원력 분석법(Ferric reducing power assay)**
- [0087] PSC 샘플 및 가수분해물에서의 Fe^{3+} 의 환원력은 다음과 같은 방법에 따라 결정하였다. 가수분해 전후에 다양한 농도로 0.125 mL의 PSC 샘플을, pH 6.6인 0.2M 인산 완충용액 0.625mL, 1% 페리시안화칼륨 0.625 mL과 혼합되었다. 이 혼합물을 50℃에서 20분 동안 배양하였다. 10 % 트리클로로아세트산 0.625 mL을 10분 동안 3,000 rpm에서 원심분리 후 첨가 하였다. 용액의 상층부 1.0 mL을 증류수 1.0 mL과 0.1% 염화제2철 1.0 mL과 혼합하였다. 그리고 700 nm에서 흡광도를 판독하였다. 흡광도의 상승은 환원력 증가와 관련이 있는 것으로 나타났다.
- [0088] **Fe^{2+} 의 킬레이트화 분석법**
- [0089] 샘플의 Fe^{2+} 킬레이트 능력은 다음과 같은 단계들을 통해 결정하였다. 가수분해 전후의 다양한 농도에서 PSC 샘플 (0.1 mL)을 증류수 3.0 mL과 혼합하였다. 계속해서, 2 mM의 FeCl_2 50 μL 와 5 mM ferrozine 0.1 mL를 실온에서 20 분 동안 배양 하였다. 이후에 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다양한 농도의 EDTA는 관리시료로 사용되었다. 증류수는 음성 대조군으로 사용되었다. Chelating activity (%)는 다음과 같이 계산되었다.:
- [0090]
$$\text{Chelating activity}(\%) = 1 - [As/Ac] \times 100$$
- [0091] (여기서 As는 562 nm에서 제어된 샘플의 흡광도; Ac는 562 nm에서 음성 대조군 흡광도)
- [0092] 본 실시예에 따른 분석 결과는 도 7a 내지 도 7d, 하기 표 8에 표시되어 있다. 도 7a에서 고등어 뼈와 껍질에서 분리된 콜라겐을 수열반응을 통해 회수된 가수분해물의DPPH 라디칼 소거능을 나타낸 것으로 농도 10 mg/mL에서 비교적 높은 항산화성을 보이고 있다. 도 7b는 고등어 뼈와 껍질에서 분리된 콜라겐(PCS)와 가수분해물에 대한 ABTS 소거능 측정을 비교한 결과, 가수분해물의 항산화성이 가수분해전의 콜라겐 보다 높게 나타났다. 도 7c와 7d는 가수분해전의 콜라겐과 가수분해 후의 콜라겐 펩타이드 함유 가수분해물의 Fe^{3+} 환원력과 Fe^{2+} 킬레이트 활성에 대한 결과를 나타낸 것으로 어류 콜라겐의 가수분해 전보다 수열반응 후의 가수분해물에서 높은 활성을 보이고 있다. 가수분해 반응 조건 250℃와 70 bar에서 얻은 고등어 껍질에서 분리된 콜라겐의 가수분해물은 다양한 농도에서 고등어 뼈에서 분리된 콜라겐 가수분해물보다 Fe^{3+} 환원력이 크게 나타났다. 고등어 뼈와 껍질의 콜라

겐 가수분해물은 비슷한 Fe^{2+} 킬레이팅 효과를 나타내고 있으므로 고등어 뼈와 껍질에서 분리된 콜라겐의 가수분해물은 Fe^{2+} 킬레이터 기능을 할 수 있음을 보여주고 있다. 고등어 뼈에서의 PSCs IC_{50} 값은 200°C , 30 bar 조건에서 가수분해된 샘플은 $8.21 \pm 0.15 \text{ mg/mL}$ 을 나타냈고, 250°C 와 70 bar 조건에서 가수분해된 샘플은 $7.27 \pm 0.14 \text{ mg/mL}$ 을 나타냈으며, 고등어 껍질에서는 200°C , 30 bar 조건에서 가수분해된 샘플은 $7.91 \pm 0.11 \text{ mg/mL}$, 250°C , 70 bar 조건에서 가수분해된 샘플은 $7.01 \pm 0.12 \text{ mg/mL}$ 의 값을 보이고 있으며, 하기 표 8에 나타낸 바와 같이 reference 값보다 높게 나타났다.

표 8

[0093]

콜라겐 가수분해물의 DPPH, ABTS 라디칼 소거능 및 Fe^{2+} 킬레이팅 활성(IC_{50})

Activity	Collagen/Reference	$\text{IC}_{50}(\text{mg/mL})$
DPPH 자유 라디칼 소거능	뼈의 콜라겐 가수분해물(200°C , 30 bar)	8.71 ± 0.14^c
	뼈의 콜라겐 가수분해물(250°C , 70bar)	8.38 ± 0.13^c
	껍질의 콜라겐 가수분해물(200°C , 30 bar)	9.57 ± 0.12^d
	껍질의 콜라겐 가수분해물(250°C , 70bar)	7.58 ± 0.10^b
	Trolox (reference)	0.35 ± 0.05^a
ABTS free radical scavenging	뼈에서 분리된 콜라겐	10.77 ± 0.11^d
	뼈의 콜라겐 가수분해물(200°C , 30bar)	4.18 ± 0.07^c
	뼈의 콜라겐 가수분해물(250°C , 70bar)	2.61 ± 0.05^b
	껍질에서 분리된 콜라겐	12.12 ± 0.13^d
	껍질의 콜라겐 가수분해물(200°C , 30bar)	4.05 ± 0.08^c
	껍질의 콜라겐 가수분해물(250°C , 70bar)	2.50 ± 0.05^b
	Trolox (reference)	0.25 ± 0.03^a
Fe^{2+} chelating	뼈의 콜라겐 가수분해물(200°C , 30bar)	8.21 ± 0.15^c
	뼈의 콜라겐 가수분해물(250°C , 70bar)	7.27 ± 0.14^b
	껍질의 콜라겐 가수분해물 (200°C , 30bar)	7.91 ± 0.11^c
	껍질의 콜라겐 가수분해물(250°C , 70 bar)	7.01 ± 0.12^b
	EDTA (reference)	0.34 ± 0.06^a

[0094]

상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 기초하여 본 발명을 설명하였으나, 본 발명이 전술한 실시예에 기재된 발명으로 한정되는 것은 아니다. 오히려 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 기술자라면 전술한 실시예에 기초하여 다양한 변형과 변경을 용이하게 추고할 수 있을 것이다. 하지만, 그러한 변형과 변경은 모두 본 발명의 권리범위에 속한다는 사실은 첨부하는 청구의 범위를 통하여 더욱 분명해질 것이다.

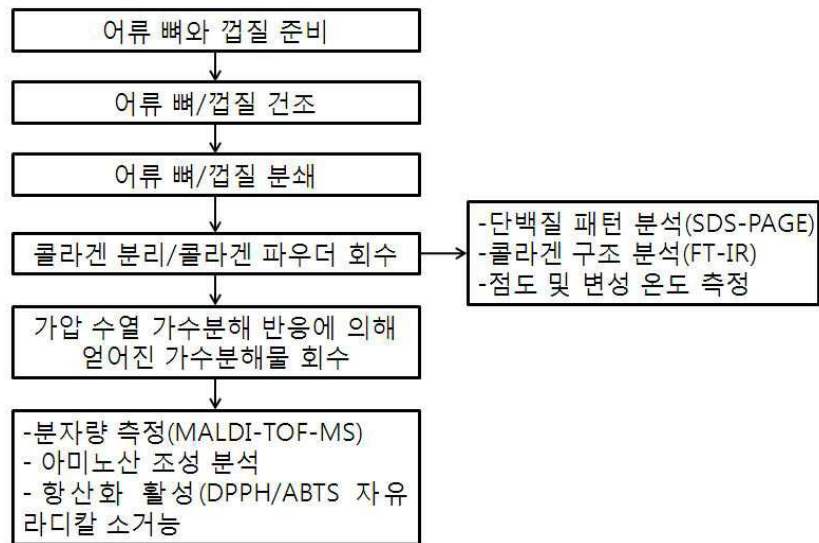
부호의 설명

[0095]

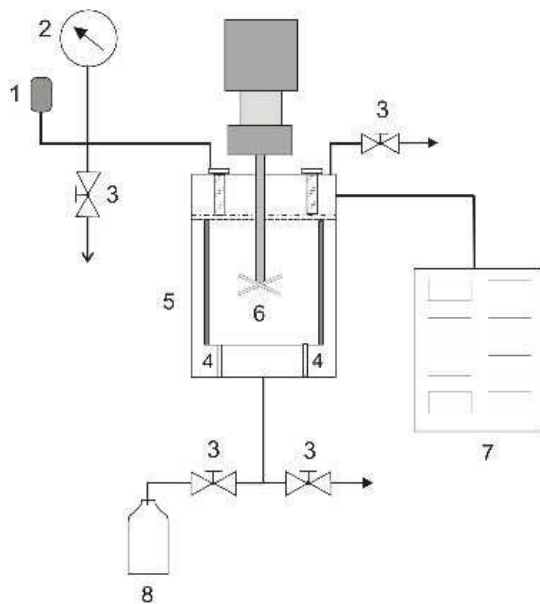
- | | |
|-------------------|-------------|
| 1 : 안전밸브 | 2 : 압력 게이지 |
| 3 : 니들 밸브 | 4 : 전기 히터 |
| 5 : 고압 반응기 | 6 : 임펠러/교반기 |
| 7 : 교반 속도/온도 컨트롤러 | 8 : 샘플 수집기 |

도면

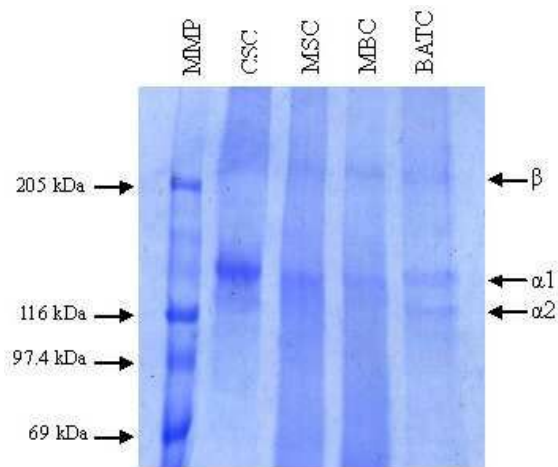
도면1



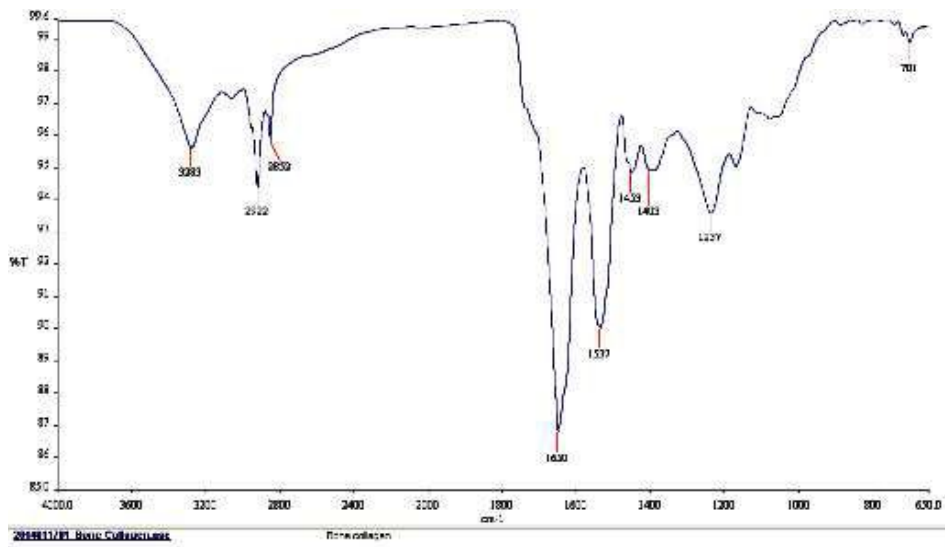
도면2



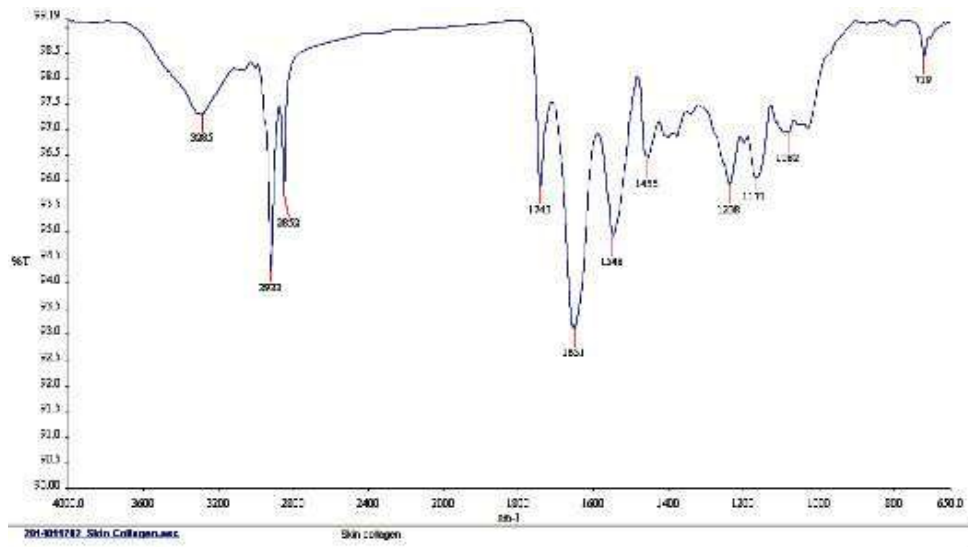
도면3



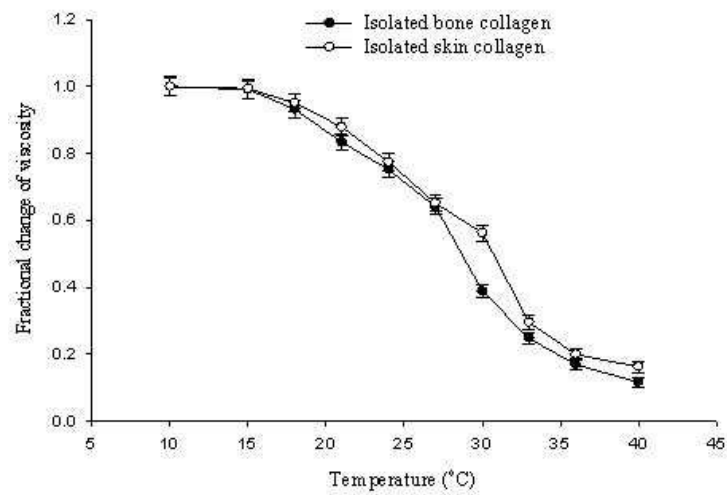
도면4a



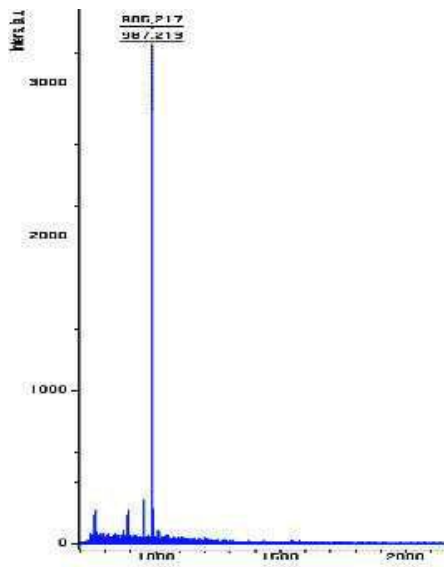
도면4b



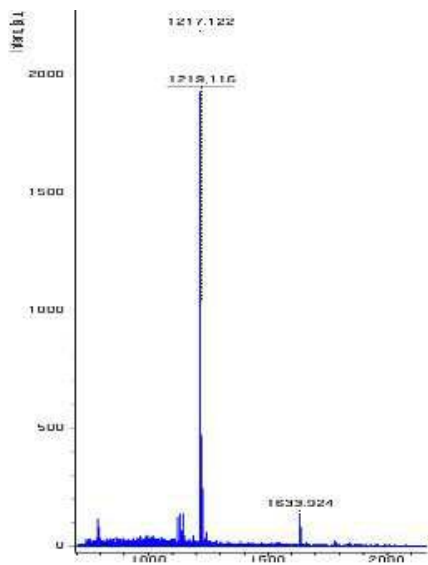
도면5



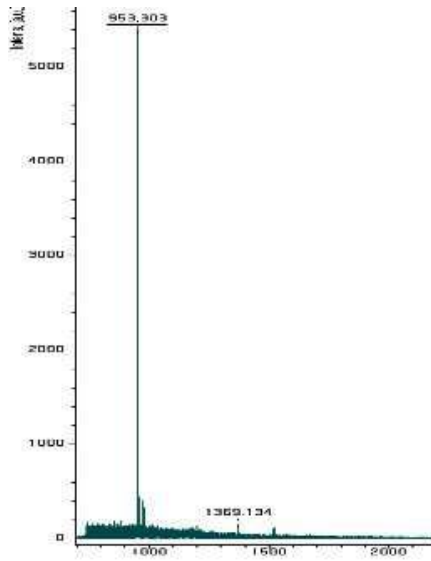
도면6a



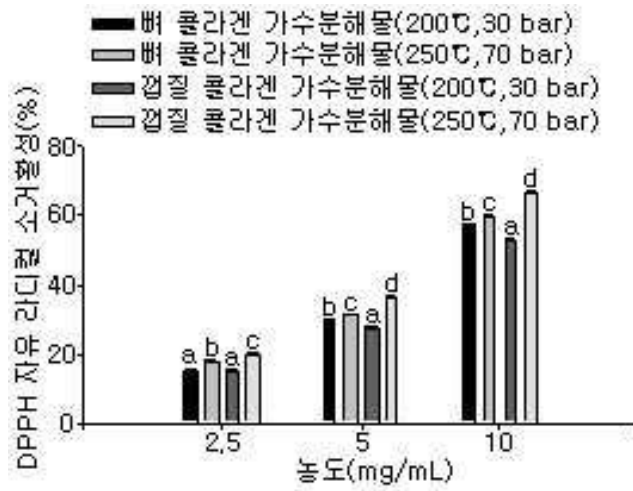
도면6b



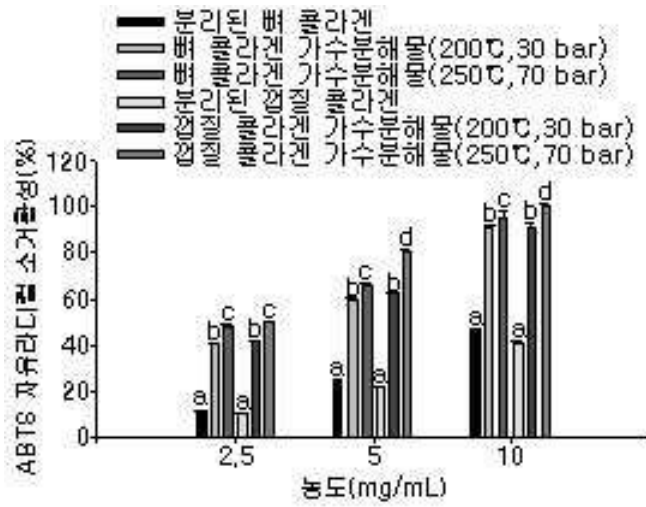
도면6c



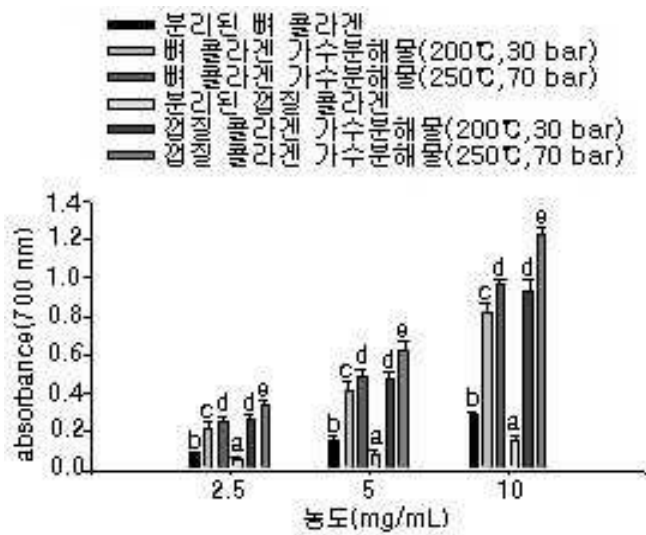
도면7a



도면7b



도면7c



도면7d

