



- (51) 국제특허분류:
C12P 21/00 (2006.01) C07K 14/78 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/002571
- (22) 국제출원일: 2015년 3월 17일 (17.03.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0064270 2014년 5월 28일 (28.05.2014) KR
- (71) 출원인: 부경대학교산학협력단 (PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY CO-OPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 608-739 부산시 남구 신선로 365(용당동, 부경대학교), Busan (KR).
- (72) 발명자: 전병수 (CHUN, Byung Soo); 612-815 부산시 해운대구 반여로 2번길 78, 111-505 (반여동), Busan (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 네이트 (NEIT INTERNATIONAL PATENT LAW FIRM); 135-080 서울시 강남구 테헤란로 6길 16, 4층 (역삼동, 수산빌딩), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

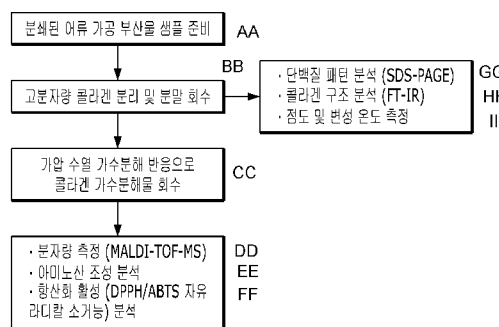
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING LOW-MOLECULAR WEIGHT COLLAGEN PEPTIDES FROM FISH BONES AND SHELLS USING PRESSURIZED HYDROTHERMAL HYDROLYSIS

(54) 발명의 명칭 : 가압 수열 가수분해를 이용하여 어류의 뼈와 껍질로부터 저분자량 콜라겐 펩타이드를 수득하는 방법



- AA ... Prepare crushed fish processing by-product sample
- BB ... Separate high-molecular weight collagen and collect powder
- CC ... Collect collagen hydrolysate through pressurized hydrothermal hydrolysis reaction
- DD ... Measure molecular weight (MALDI-TOF-MS)
- EE ... Analyze amino acid composition
- FF ... Analyze antioxidative activity (DPPH/ABTS free radical scavenging activity)
- GG ... Analyze protein pattern (SDS-PAGE)
- HH ... Collagen structure analysis (FT-IR)
- II ... Measure viscosity and denaturation temperature

(57) Abstract: The present invention relates to a method for obtaining and retrieving collagen hydrolysate from fish bones and shells through a reaction with high-temperature high-pressure water. The hydrolysate obtained in the hydrolysis process contains collagen peptides (<3000 Da) with a low molecular weight, into which collagen proteins (116,000 - 126,000 Da) isolated from fish bones and shells are lysed. It was verified that the hydrolysate derived from fish collagen contains essential amino acids. The antioxidative activity of the fish collagen hydrolysate was higher than that of the initially isolated fish collagen. The fish collagen hydrolysate had a reduced smell that acts as a negative factor of products, but an increased smell that is in favor of sensory feeling. According to the present invention, the process is simple and eco-friendly, and the product safety is excellent, and thus the hardness enhancement is anticipated. Therefore, the fish collagen hydrolysate obtained in the present invention can be utilized as a functional material in food, medicinal, and cosmetic fields.

(57) 요약서: 본 발명은 어류의 뼈와 껍질로부터 고온, 고압의 물을 반응시켜 콜라겐 가수분해물을 수득, 회수하는 방법에 관한 것이다. 가수분해 공정에서 수득된 가수분해물은 어류 뼈와 껍질에서 분리된 콜라겐 단백질(116,000 - 126,000 Da)이 콜라겐 펩타이드 (<3000 Da) 수준으로 분해된 낮은 분자량을 함유하고 있다. 어류 콜라겐 유래 가수분해물은 필수 아미노산이 함유되어 있음이 확인되었다. 어류 콜라겐 가수분해물의 항산화성은 초기에 분리된 어류 콜라겐보다 높았다. 어류 콜라겐 가수분해물은 품질의 부정적 요소로 작용하는 냄새가 감소된 반면, 관능적으로 우호적인 냄새는 증가하였다. 본 발명은 공정이 간단하고

환경 친화적이며 제품의 안전성이 우수하여 경성제고기 기대된다. 따라서 본 발명에서 수득된 어류 콜라겐 가수분해물은 식품, 의약품, 화장품 산업의 기능성 소재로 활용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 가압 수열 가수분해를 이용하여 어류의 뼈와 껍질로부터 저분자량 콜라겐 펩타이드를 수득하는 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 어류로부터 기능성 성분을 회수하는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 어류 가공 후에 남겨지는 껍질, 뼈, 내장 등의 부산물에서 추출한 콜라겐 거대 분자 (약 126 kDa)를 가압 수열 반응으로 가수분해하여 콜라겐 펩타이드 저분자 (약 3 kDa)로 전환하여 저분자량의 콜라겐 펩타이드를 수득하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 콜라겐은 다양한 구조를 가진 단백질로서, 일반적으로 동물의 뼈, 껍질, 연골 조직에서 찾을 수 있다. 콜라겐은 동물 전체 중량의 25%를 차지하고 있고, 근육에 1 - 2%가 함유되어 있다. 콜라겐은 인간을 비롯한 동물 결합 조직의 세포 기질 매트릭스의 주요 성분이다. 콜라겐은 다양한 형태로 존재하는데, 대표적인 콜라겐 타입인 콜라겐 I은 분자량이 약 126 kDa으로 3개의 폴리펩타이드 사슬이 꼬여 있는 삼중 나선형 구조를 갖는다(트로포콜라겐). 콜라겐에는 3개의 주요 아미노산이 존재하며, 특이한 것은 "글리신-프롤린-X"나 "글리신-X-하이드록시프롤린"(X는 임의의 아미노산임)이 반복된 구조를 가지고 있다.
- [3] 현대의 많은 소비자들은 면역력을 강화시키는 천연물 유래의 건강 기능성 식품 또는 건강 보조 식품에 큰 관심을 가지고 있다. 콜라겐은 우수한 생체적합성(bio-compatibility), 생분해성(bio-degradability) 및 항 노화성을 가지고 있어서 조직 재생을 위한 생체 재료로서, 식품, 화장품, 바이오 의약품, 의약품 등의 산업 분야에서 널리 이용되고 있다. 또한, 콜라겐은 면역 기능을 향상시키고, 특히 골 조직에서 칼슘의 흡착을 통해 골세포의 재생 작용을 촉진하여 관절을 튼튼하게 해주며, 피부의 신진대사 활성화 및 보습력 유지를 통하여 피부 미용에 탁월한 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있어서, 의약품, 화장품 등의 기능성 성분으로서 활용되고 있다. 특히, 노화 또는 자외선 등에 의해 야기되는 피부의 주름을 개선하기 위한 기능성 화장품의 성분으로 사용된다.
- [4] 생체 조직에서 콜라겐을 추출함에 있어서는 유기 용매로 추출하여 산이나 알칼리 처리를 한 다음, 적절한 효소, 예를 들어 트립신, 히알루로니다아제를 사용하여 물에 대해 불용성인 콜라겐을 얻는다. 현재 사용되고 있는 콜라겐의 대부분은 육상 동물인 소, 송아지, 돼지, 가금류의 뼈나 껍질에서 분리 정제된다.
- [5] 그러나 육상 동물에서 분리된 콜라겐의 경우, 최근 광우병(bovine spongiform encephalopathy, BSE), 구제역(foot-and-mouth disease, FMD), 조류

인플루엔자(avian influenza, AI), 전염성 광우병 (transmissible spongiform encephalopathy, TSE) 등의 질병이 발생하면서 안전성 문제가 대두되고 있다. 또한 돼지는 이슬람권에서 혐오되는 동물이어서, 돼지 유래의 콜라겐은 특정 종교를 가진 사회에서는 사용이 불가능하다. 따라서 전염성 질병 예방 및 특정 종교인을 위한 대체 콜라겐의 생산 기술 개발이 요구된다.

- [6] 어류(*Scomber japonicus*)는 전 세계적으로 소비되는 중요한 식품 소재로, 다양한 요리 방법을 통해 섭취되고 있으며 매일 많은 양의 어류가 소비되고 있다. 어류가 식품으로 소비될 때 뼈, 껍질 그리고 내장은 비-식용 부위로서 부산물로 처리되거나, 동물 사료로 이용되기도 하지만, 방치되어 환경 오염원이 되기도 한다. 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 도입된다면 상업적으로 유용한 소재를 회수하여 활용함으로써 경제적 이익을 얻을 수도 있다.
- [7] 아울러, 전술한 것과 같이 최근에 국지적, 세계적으로 구제역 등이 유행하면서 육상 동물로부터 추출된 콜라겐에 대한 안전성 문제가 대두되고 있다. 하지만, 어류의 뼈, 껍질, 내장 등에 존재하는 콜라겐을 사용한다면 이러한 문제점을 해소할 수 있다. 특히 3면이 바다로 둘러싸인 국내의 지리적 환경에서 현재 다량 폐기되고 있는 어류의 껍질, 뼈, 내장 등으로부터 콜라겐 가수분해물을 추출할 수 있다면, 수산 자원의 효율적 이용이라는 점에서 바람직할 수 있다.
- [8] 어류로부터 수득되는 천연 콜라겐은 분자량이 약 126 kDa 정도로 상대적으로 분자량이 커서 생체 내부로 깊숙이 침투하지 못하기 때문에 생체 내에서 흡수되지 못하는 문제가 있다. 따라서, 콜라겐을 생체 내부로 효율적으로 침투시키기 위해 상대적으로 분자량이 작은 콜라겐 펩타이드를 생산할 수 있는 기술의 개발이 요구되고 있다.
- [9] 종래 생체 유래의 고분자 물질을 분해시키기 위한 방법으로는, 산, 알칼리 또는 촉매를 이용하는 화학적 가수분해법과, 효소를 이용하는 효소적 가수분해법이 있다. 그러나 화학적 가수분해법은 격렬한 반응 조건을 필요로 하고, 심각한 환경오염을 초래하며, 투입된 화학 물질을 회수하기 위한 공정이 요구되며, 제품의 품질 저하가 따를 수 있다. 한편, 효소적 가수분해법은 반응 진행과정이 복잡하고 생산 주기를 완료하는데 오랜 시간이 소요되어 경제적이지 않다.
- [10] [선행기술문헌]
- [11] 특허 문헌 1: 일본 공개 특허 공보 H06-157233A (공개일: 1994.06.03., "어패류 펩타이드에서의 무취 내지 저 냄새성 성분, 그 제조법 및 상기 성분을 함유하는 외용제 또는 내용제")

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명은 전술한 산, 알칼리 또는 촉매를 사용하여 화학적 또는 효소적 가수분해법으로 저분자량의 콜라겐을 생산하는 종래 기술의 문제점, 즉 부산물 발생, 환경오염, 장시간의 공정 조건 등을 해소하기 위하여 제안된 것으로서, 본 발명의 목적은 어류 가공 후의 부산물인 뼈, 껍질, 내장 등으로부터 어류 유래의 콜라겐 펩타이드 가수분해물 (저분자량 콜라겐 펩타이드)를 수득하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [13] 본 발명의 다른 목적은 촉매를 사용하지 않는 간단한 공정을 통하여 경제적이고, 환경 친화적이며 안전성을 담보하면서 어류 유래의 콜라겐 가수분해물을 수득하는 방법을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 인체 내로의 흡수 및 침투가 용이한 어류 유래의 콜라겐 가수분해물을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [15] 전술한 본 발명의 기술적 과제는 다음과 같은 해결 수단에 의해 달성된다.
- [16] 1. 어류 뼈, 껍질 및 내장으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 어류 가공 부산물로부터 추출된 고분자량의 콜라겐 분말을 가압 수열 가수분해 반응시키는 단계를 포함하는, 어류 유래의 저분자량 콜라겐을 수득하는 방법.
- [17] 2. 어류 뼈, 껍질 및 내장으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 어류 가공 부산물로부터 추출된 고분자량의 콜라겐 분말을 고온 및 고압의 물로 가수분해하는 것을 포함하는, 어류 유래의 저분자량 콜라겐의 제조 방법.
- [18] 3. 저분자량 콜라겐은 3,000 Da 이하의 분자량을 가지는 것인, 상기 1 또는 2의 방법.
- [19] 4. 가압 수열 가수분해 반응에는 150~370°C의 온도 및 5~400 bar 압력의 물이 사용되는 것인, 상기 1 또는 2의 방법.
- [20] 5. 고분자량의 콜라겐 분말을 가압 수열 가수분해 반응시키는 단계 이전에, 건조 및 분쇄된 어류 가공 부산물 시료로부터 고분자량의 콜라겐 분말을 추출하는 단계를 더 포함하고, 여기서 얻은 고분자량의 콜라겐 분말을 가압 수열 가수분해 반응시키는 단계의 출발 물질로 사용하는 것인, 상기 1 또는 2의 방법.
- [21] 6. 고분자량의 콜라겐 분말을 추출하는 단계는 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 산을 가하여 탈석회화하는 단계; 탈석회화된 고등어 뼈에 1:5 - 1:20 (w/v)의 알코올을 가하여 탈지 처리하는 단계; 및 탈지 처리된 고등어 뼈 잔여물에 펩신을 가하여 가수분해하는 단계를 포함하는 것인, 상기 1 또는 2의 방법.
- [22] 7. 고분자량의 콜라겐 분말을 추출하는 단계는 분쇄된 고등어의 껍질을 1:20 - 1:50 (w/v)의 비율로 희석한 알칼리 용액으로 처리하는 단계; 알칼리 용액의 처리에 의해 얻어진 불용성 고등어 껍질에 1:20 - 1:50 (w/v)의 알코올을 가하여 탈지 처리하는 단계; 및 탈지 처리된 고등어 껍질 잔여물에 펩신을 가하여

가수분해하는 단계를 포함하는 것인, 상기 1 또는 2의 방법.

발명의 효과

- [23] 본 발명에 따라 어류의 뼈, 껍질, 내장 등 어류의 가공 후에 남겨지는 부산물로부터 고온, 고압의 물을 이용한 가압 수열 가수분해를 이용하여 분자량이 적은 콜라겐 펩타이드 가수분해물을 수득하는 방법이 제공되었다.
- [24] 본 발명은 효소나 유기산 등과 같은 물질을 사용하지 않는 간단한 공정을 채택함으로써 공정의 효율성 및 경제성의 확보가 가능하고, 환경 친화적이고 안전성을 담보하면서도, 식품, 약품, 화장품 등의 기능성 성분으로 활용되는 저분자량의 콜라겐 펩타이드를 신속하게 생산할 수 있다는 장점이 있다.
- [25] 또한, 본 발명은 어류의 가공 후에 버려지는 뼈, 껍질, 내장 등의 부산물로부터 추출된 콜라겐을 원료로 활용할 수 있고, 본 발명으로 생산된 어류 콜라겐 펩타이드는 어류 특유의 냄새가 없어서 적용 제품의 관능성, 안정성 및 안전성 역시 우수하다.
- [26] 본 발명에 따라 최종적으로 회수, 수득된 콜라겐 펩타이드 가수분해물은 분자량이 3,000 Da 이하로서 작기 때문에, 인체로의 침투와 흡수가 용이하여 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

- [27] 도 1은 본 발명의 예시적인 실시형태에 따라 어류 가공 부산물로부터 저분자량 콜라겐 펩타이드 가수분해물을 수득하는 공정과, 이들 공정에서 얻어진 콜라겐의 구조 및 기능을 확인하기 위한 분석 방법을 개략적으로 도시한 공정도이다.
- [28] 도 2는 본 발명의 예시적인 실시형태에 따라 어류 가공 부산물로부터 저분자량 콜라겐 펩타이드 가수분해물을 수득하기 위한 가압 수열 가수분해 공정 장치의 개략도이다.
- [29] 도 3은 본 발명의 실시예에서 어류 뼈와 껍질에서 분리한 펩신 가용성 콜라겐에 대한 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 사진이다. 도 3에서 MMP는 분자량 마커 단백질, CSC는 송아지 껍질 콜라겐, MSC는 어류 껍질 콜라겐, MBC는 어류 뼈 콜라겐, BATC는 아킬레스 건 콜라겐을 나타낸다.
- [30] 도 4 및 도 5는 본 발명의 실시예에서 어류 뼈와 껍질에서 각각 분리한 펩신 가용성 콜라겐에 대한 FT-IR 스펙트럼 분석 결과이다.
- [31] 도 6은 본 발명의 실시예에서 어류 뼈와 껍질에서 각각 분리한 펩신 가용성 콜라겐에 대한 열 변성 측정 결과이다.
- [32] 도 7 내지 도 9는 본 발명의 실시예에서 어류 뼈와 껍질에서 각각 분리한 펩신 가용성 콜라겐을 가압 열수 가수분해 반응시켜 얻은 콜라겐 가수분해물에 대한 MALDI-TOF 질량 스펙트럼 분석 결과이다. 도 7은 어류 뼈에서 분리한 펩신

가용성 콜라겐을 200°C, 30 bar에서 가압 열수 가수분해하여 얻은 콜라겐 가수분해물, 도 8은 어류 껍질에서 분리한 펩신 가용성 콜라겐을 200°C, 30 bar에서 가압 열수 가수분해하여 얻은 콜라겐 가수분해물, 도 9는 어류 껍질에서 분리한 펩신 가용성 콜라겐을 250°C, 70 bar에서 가압 열수 가수분해하여 얻은 콜라겐 가수분해물에 대한 것이다.

- [33] 도 10 내지 13은 본 발명의 실시예에서 어류의 뼈와 껍질에서 각각 분리한 펩신 가용성 콜라겐을 가압 열수 가수분해하여 수득한 콜라겐 가수분해물에 대한 항산화 활성 측정 결과이다. 도 10은 DPPH 자유 라디칼 소거 활성, 도 11은 ABTS 자유 라디칼 소거 활성, 도 12는 ferric 환원력 분석, 도 13은 Fe²⁺ 킬레이트 활성 측정 결과이다.

[34] [부호의 설명]

[35] 1: 안전밸브2: 압력 게이지

[36] 3: 니들 밸브4: 전기 히터

[37] 5: 고압 반응기6: 임펠러/교반기

[38] 7: 교반 속도/온도 컨트롤러8: 샘플 수집기

발명의 실시를 위한 형태

- [39] 본 발명자들은 종래 기술의 문제점을 해소하기 위한 방법으로, 어류 유래의 고분자량의 콜라겐을 고온, 고압의 물을 이용하는 가압 수열 가수분해 반응으로 저분자량의 콜라겐 펩타이드를 수득하였으며, 이와 같이 수득한 저분자량 콜라겐 펩타이드는 의약품, 건강 식품, 화장품 등 다양한 산업 분야에서 활용될 수 있다는 점에 착안하여 본 발명을 완성하였다.

- [40] 본 발명은 어류 뼈, 껍질 및 내장으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 어류 가공 부산물로부터 추출된 고분자량의 콜라겐 분말을 가압 수열 가수분해 반응시키는 단계를 포함하는, 어류 유래의 저분자량 콜라겐을 수득하는 방법에 관한 것이다.

- [41] 또한 본 발명은 어류 뼈, 껍질 및 내장으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 어류 가공 부산물로부터 추출된 고분자량의 콜라겐 분말을 고온 및 고압의 물로 가수분해하는 것을 포함하는, 어류 유래의 저분자량 콜라겐의 제조 방법에 관한 것이다.

- [42] 본 발명에 있어서, '어류 가공 부산물'이라는 용어는 식품 소재로 가공된 이후에 비-식용 부위로서 남겨지는 부산물, 예를 들면, 뼈, 껍질, 내장 등을 의미한다. 어류는 예를 들면, 고등어, 참치 등을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 가공 부산물에 콜라겐의 함량이 높은 어떤 종류라도 무방하다.

- [43] 본 발명에서는 가압 수열 반응의 출발 물질로서 어류로부터 추출된 고분자량의 콜라겐을 사용하는 것을 특징으로 한다. 이때 '고분자량의 콜라겐'은 어류로부터 공지의 방법으로 추출된 천연 콜라겐으로서 평균 분자량이 약 126 kDa 정도인 것을 의미한다.

- [44] 본 발명에서는 상기와 같은 고분자량의 콜라겐을 가압 수열 가수분해 반응으로 저분자량의 콜라겐, 구체적으로는 3,000 Da 이하의 분자량을 가지는 콜라겐을 수득한다.
- [45] 고압과 고온에 의해 생성되는 아임계 수(subcritical water hydrolysis: 'SWH'로 지칭되기도 함)를 이용하는 가수분해법은 친환경적이며 가수분해 속도가 빠른 방법이다. 물의 비점은 0.1 MPa, 100°C이고, 임계점은 22 MPa, 374°C이며, 아임계수는 물의 임계점 부근에서 존재한다. 아임계 상태의 물은 상온, 상압 또는 비점 부근에서 물이 가지는 물성과는 다른 특성, 즉 낮은 유전 상수와 높은 이온성을 나타낸다. 낮은 유전 상수는 유기물에 대한 높은 용해성을 가지도록 하며, 높은 이온성은 산 또는 염기성을 띠는 촉매 역할을 하여 가수분해를 촉진할 수 있다. 아임계 수 가수분해 공정은 환경 오염과 부산물을 발생시키지 않아 친환경적이다.
- [46] 이에, 본 발명에서 고분자량의 콜라겐을 가수분해하여 저분자량의 콜라겐을 수득함에 있어서는 고온, 고압의 물을 이용한 가압 열수 가수분해 반응을 이용한다. 순수한 물은 대기압에서 100°C의 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°C, 압력 22 MPa로, 그 이하에서 물은 아임계 상태를 유지하는데, 아임계 상태에서 물은 높은 압력으로 인하여 액상을 유지한다. 즉, 아임계 상태에서 물은 기체 상태와 액체 상태의 영역으로 구분되지 않고, 다양한 온도와 압력 변화에 따라 서로 상이한 공정 조건이 형성될 수 있으며, 다양한 영역의 아임계 수는 물리적 특성이 서로 상이한 상태로 존재한다.
- [47] 이처럼 아임계 수의 높은 용해력, 낮은 유전율, 작은 계면 장력, 빠른 침투성, 낮은 점성 등의 독특한 물리적 특성을 이용하여 고분자 물질을 가수분해시키는 경우, 가수분해 반응을 효율적으로 진행시킬 수 있다. 예를 들어, 다양한 조건에서의 아임계 수(sub-critical water)를 이용한 수열 반응은 상온 대기압 상태보다 훨씬 많은 이온들을 가지고 있어, 이 이온들이 산 또는 염기와 같은 촉매 작용을 한다. 또한, 예를 들어, 아임계 상태의 물은 낮은 유전상수로 인하여 광범위한 유기 화합물의 용해에 적절한 용매로 기능할 수 있다. 이처럼, 초임계 조건 이하, 즉 임계 온도 및 임계 압력 이하에서의 아임계 수는 독특한 물리적 및 화학적 특성으로 인하여 다양한 화학 반응에서 새로운 반응 매질로 기능할 수 있다.
- [48] 특히, 아임계 상태에서의 가수 분해 공정(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 가압 열수 가수분해 반응을 이용하여, 아임계수가 포화기체 영역에서 벗어나 액체 상태가 되면, 고분자 물질이 탄화되지 않고 액상의 가압 수열 가수분해(pressurized

hydrothermal hydrolysis) 반응이 진행되어 기능적 특성을 가진 생성물을 수득하는 특징을 나타낸다. 아임계수 가수분해 공정은 사전 처리(pre-treatment) 작업이 필요 없고, 반응 시간이 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 이용될 수 있는, 환경 친화적이고 신속한 생물질(biomass)의 가수분해 방법이다.

- [49] 예시적으로 본 발명에 따라 어류 유래의 고분자량 콜라겐, 예를 들어 펩신 가용성 콜라겐의 가수분해 생성물, 즉 저분자량의 콜라겐을 수득하기 위하여 사용되는 고온, 고압의 물은 150 - 350°C의 온도와 4 - 400 bar의 압력, 바람직하게는 200 - 300°C의 온도와 20 - 100 bar의 압력, 더욱 바람직하게는 220 - 260°C의 온도와 30 - 70 bar의 압력 범위의 아임계 조건으로 조정된다. 온도가 350°C를 초과하거나 압력이 400 bar를 넘는 조건에서는 회수되는 가수분해물의 부정적인 관능적 특성이 유발되며, 에너지 및 경제성 측면에서 경쟁력이 없기 때문에 바람직하지 않다.
- [50] 본 발명에 따른 저분자량 콜라겐의 수득 방법 또는 저분자량 콜라겐의 제조 방법에서는 고분자량의 콜라겐 분말을 가압 수열 가수분해 반응시키는 단계 이전에, 건조 및 분쇄된 어류 가공 부산물 시료로부터 고분자량의 콜라겐 분말을 추출하는 단계를 더 포함하고, 여기서 얻은 고분자량의 콜라겐 분말을 가압 수열 가수분해 반응시키는 단계의 출발 물질로 사용할 수도 있다.
- [51] 본 발명의 한 예시적인 실시 형태에서, 고분자량의 콜라겐 분말을 추출하는 단계는, 분쇄된 어류의 뼈를 1:5 - 1:20 (w/v)의 비율로 희석한 알칼리 용액으로 처리하는 단계와, 알칼리 용액의 처리에 의해 얻어진 불용성 어류 뼈에 1:5 - 1:20 (w/v)의 비율의 탈회제를 가하여 어류 뼈를 탈석회화 하는 단계와, 상기 탈석회화된 어류 뼈에 1:5 - 1:20 (w/v)의 알코올을 가하여 탈지 처리하는 단계와, 탈지 처리된 어류 뼈 잔여물에 펩신을 가하여 가수분해하는 단계를 포함할 수 있다.
- [52] 본 발명의 다른 예시적인 실시 형태에서, 고분자량의 콜라겐 분말을 추출하는 단계는, 분쇄된 어류의 껍질을 1:20 - 1:50 (w/v)의 비율로 희석한 알칼리 용액으로 처리하는 단계와, 알칼리 용액의 처리에 의해 얻어진 불용성 어류 껍질에 1:20 - 1:50 (w/v)의 알코올을 가하여 탈지 처리하는 단계와, 탈지 처리된 어류 껍질 잔여물에 펩신을 가하여 가수분해하는 단계를 포함할 수 있다.
- [53] 이하에서는, 본 발명을 첨부 도면을 참조하여 설명한다.
- [54] 도 1은 본 발명의 한 가지 예시적인 실시 형태에 따라 어류 유래의 콜라겐 가수분해물을 회수, 수득하고 이들을 분석하는 방법을 개략적으로 도시한 공정도이다. 어류 가공 부산물로부터 고분자량의 콜라겐을 직접 추출하고, 이를 가수분해 반응 원료로 사용하는 경우에는, 도 1에 도시된 것과 같이, 어류의 뼈, 껍질, 내장 등 적어도 하나의 어류 가공 부산물 샘플을 준비하고, 이를 물로

깨끗이 세척한 뒤, 건조한다. 바람이 통하는 그늘에서 자연적으로 건조시킬 수도 있고, 저온에서 동결 건조(freeze-dry)시킬 수도 있다. 동결 건조 방식을 채택하면 특히 어류의 뼈와 껍질에 함유되어 있는 콜라겐이 열에 의하여 변형되지 않으므로 특히 유용할 수 있다. 어류 샘플로서의 어류의 뼈와 껍질을 동결 건조 방식을 이용하여 건조하고자 하는 경우, 동결 건조 온도는 대략 -20 내지 10°C, 바람직하게는 -5 내지 10°C이며, 건조 시간은 48 - 96 시간 범위일 수 있다. 이러한 조건에서 동결 건조시키면 완전히 건조된 샘플을 얻을 수 있다. 준비된 어류 가공 부산물의 상태에 따라 동결 건조 온도 및 건조 시간은 달리 선택될 수 있다.

[55] 그 다음, 건조된 샘플을 적절한 크기로 절단, 분쇄한다. 예시적인 실시 형태에서 기계 블렌더(mechanical blend)를 사용하여 건조된 샘플을 대략 0.1 - 3 cm의 크기로 절단한 뒤, 분말 형태로 분쇄할 수 있다. 또는 건조된 샘플을 균질기를 사용하여 분말 형태로 분쇄할 수 있다.

[56] 그 다음, 분쇄된 샘플로부터 콜라겐을 분리한다. 예시적으로 분쇄된 샘플에 적절한 단백질 분해 효소(protease), 예를 들어 콜라겐을 완전히 분해시키는 콜라게나아제 이외의 단백질 분해 효소로서 펩신 등을 사용할 수 있다. 일례로서 펩신을 사용하여 어류 샘플로부터 펩신 가용성 콜라겐(pepsin-solubilized collagen, PSC)을 분리하고, 이를 분말 형태로 회수할 수 있다.

[57] 본 발명의 한 가지 실시예로서 어류의 뼈를 출발 물질로 사용하는 경우, 콜라겐이 없는 부분을 제거하기 위하여, 분쇄된 어류의 뼈를 알칼리 용액과 1:5 - 1:20 (w/v)의 비율로 혼합하여 처리하고, 알칼리 용액으로 처리하여 얻은 불용성 어류 뼈에 1:5 - 1:20 (w/v)의 비율로 탈회제를 가하여 탈석회화한 다음, 탈석회화된 어류 뼈에 1:5 - 1:20 (w/v)의 비율로 알코올을 가하여 탈지하고, 탈지 처리된 어류 뼈 잔여물에 펩신을 가하여 가수분해하는 단계를 포함할 수 있다. 알칼리 용액의 예로는 0.01 - 1.0 M 농도의 수산화나트륨 또는 수산화칼슘 용액을 사용할 수 있다. 탈회제로는 1 - 20% 농도의 포름산, 아세트산, 피크르산(picric acid), 트리클로로아세트산 등의 산(acid) 용액, 시트르산-시트르산 버퍼 등의 완충액, 금속과 착염(chelate)을 형성하는 물질, 예를 들어 0.1 - 1.0 M 농도의 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylene diamine tetra acetic acid, EDTA)의 착염을 이용하는 것과 같은 조직화학적 탈회 방법을 사용할 수 있다. 탈지 처리 단계에서는 탄소 수 1 - 4개의 알코올, 예를 들어 부틸알코올을 사용할 수 있으며, 펩신은 예를 들어 아세트산과 같은 산에 희석된 형태로 사용될 수 있다.

[58] 필요하다면, 알칼리 용액으로 처리한 뒤, 알칼리를 제거하기 위하여 증류수 등으로 수세하거나 중화하는 단계, 탈석회화 단계 이후에 탈회제를 제거하기 위하여 증류수 등으로 수세하거나 중화하는 단계, 또는 탈지 단계 이후에 알코올 등을 제거하기 위하여 증류수로 수세하는 단계 중의 어느 하나를 더 포함할 수도 있다.

[59] 또한, 예를 들어 아세트산과 같은 산에 희석한 펩신을 사용한 경우라면, 그

이후에 염화나트륨과 같은 염을 첨가하여 용액의 농도를 조절하는 단계, 침전물을 원심분리하고 아세트산 등의 산으로 용해하는 단계, 아세트산/증류수를 이용하여 투석하는 단계, 및 투석에 의해 얻어진 시료를 동결 건조(예를 들어 -20 내지 10°C)하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[60] 한편, 어류의 껍질을 출발 물질로 사용하는 경우, 콜라겐을 분리하는 단계는, 분쇄된 어류의 껍질을 0.01 - 1.0 M 농도의 수산화나트륨 또는 수산화칼슘 용액과 같은 알칼리 용액과 1:20 - 1:50(w/v)의 비율로 혼합하여 처리하는 단계, 알칼리 용액의 처리에 의해 얻어진 불용성 어류 껍질에, 예를 들면 부틸알코올과 같은 탄소 수 1 - 4개의 알코올을 1:20 - 1:50 (w/v)의 비율로 첨가하여 탈지 처리하는 단계, 탈지 처리된 어류 껍질 잔여물에 펩신을 가하여 가수분해하는 단계를 포함할 수 있다. 어류 뼈와 마찬가지로 펩신은 예를 들어 아세트산과 같은 산에 희석된 형태로 사용될 수 있다.

[61] 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 내지 10°C)하는 단계를 포함할 수 있다.

[62] 콜라겐 타입 I을 포함하는 콜라겐은 3개의 폴리펩타이드 체인이 3가닥 묶여 나선(helix) 구조를 형성하고 있으며, 분자의 양 말단에는 나선 구조를 가지지 않는 텔로펩타이드(telopeptide) 구조를 가지고 있다. 콜라겐 분자 구조에서 텔로펩타이드는 분자내(intra-molecule) 및 분자간(inter-molecule) 가교가 이루어지는 부분이다. 즉, 생체 내에서 콜라겐은 텔로펩타이드 부분에서 분자가 가교되어 불용화된다. 이 불용성 콜라겐을 펩신 등의 프로테아제로 처리하면 가교 부분의 텔로펩타이드가 제거, 소화되어 가용화된 아테로콜라겐을 얻을 수 있다.

[63] 이어서, 어류 유래의 펩신 가용성 콜라겐에 고온, 고압의 물을 가하는 가압 수열 가수분해 반응에 의하여 콜라겐 가수분해물을 회수, 수득한다.

[64] 예를 들어, 본 발명에 따른 고온, 고압의 물을 이용한 가압 열수 가수분해 공정은 도 2에 도시되어 있는 가수분해 장비를 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 어류와 같은 어류 유래의 뼈 및/또는 껍질로부터 얻어진 콜라겐 샘플을 샘플 수집기(8)에서 반응기(5)로 옮기고, 증류수와 같은 물로 반응기를 채운다. 본 발명의 한 가지 예시적인 실시 형태에서, 콜라겐 샘플과 아임계 상태로 전환될 수 있는 물을 1:100 - 1:300 w/v의 비율로 반응기(5) 내에서 혼합하여 반응시킬 수 있다. 이어서, 가압 수열 반응에 의한 콜라겐의 가수분해를 위하여 온도 컨트롤러(7) 및 압력 게이지(2)를 작동시켜 반응기(5) 내부를 소정의 온도와

압력으로 조정한다. 동시에 반응기(5) 내부에 부착된 교반기(6)를 사용하여 반응기(5) 내로 주입된 콜라겐과 아임계수 혼합물의 균일성을 유지하는 동시에 소정의 압력과 열이 시료 전체에 걸쳐 균일하게 분포되도록 유도할 수 있다.

[65] 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 상술한 과정을 통하여 어류의 뼈, 껍질 및/또는 내장과 같은 어류 가공 부산물로부터 분리된 펩신 가용성 콜라겐에 대한 SDS-PAGE 분석 결과 3개의 사슬(2개의 α -체인 및 1개의 β -체인)이 결합되어 있는 콜라겐 타입 I이었으며(도 3 내지 5 참조), 열 변성 특성이나 점도도 양호한 것으로 나타났다(실시예 5 참조). 열 변성 특성은 콜라겐의 열적 안정성에 관여하는 이미노산은 물론, 콜라겐의 주요 아미노산인 프롤린과 하이드록시프롤린의 함량과도 연관이 있을 수 있다.

[66] 본 발명에서는 전술한 공정을 통하여 회수한 어류의 뼈 및/또는 껍질에서 유래된 콜라겐 가수분해물에 대하여 MALDI-TOF-MS 분석으로 분자량 측정, 아미노산 조성 분석 및 항산화 활성을 측정하였다. 본 발명의 실시예에 따르면, 가압 열수 가수분해 반응으로 얻은 콜라겐 가수분해물의 분자량은 모두 2000 Da 이하로서, 일반적인 콜라겐의 분자량인 수백 kDa에 비하여 크게 감소하였음이 확인되었다(도 7 내지 9 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 것을 의미한다.

[67] 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(표 8 및 도 10 내지 13 참조).

[68] 본 발명의 실시예에서는 어류의 뼈나 껍질을 출발물질로 사용하여 고분자량의 콜라겐을 분리하고, 가압 수열 가수분해 반응으로 콜라겐 가수분해물, 즉 저분자량의 콜라겐을 수득하였다. 그러나, 어류의 뼈, 껍질, 내장 등을 포함하는 어류 가공 부산물로부터 추출된 고분자량 콜라겐 시판 제품을 출발 물질로 사용하여 가압 수열 가수분해 반응으로 저분자량의 콜라겐을 수득하는 것도 가능하다.

[69] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따라 어류 가공 부산물로부터 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.

[70]

[71] 실시예

[72] 이하에서는, 예시적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명이 하기 기재된 실시예에 기재된 발명으로 결코 한정되지 않는다.

[73]

[74] 재료

[75] 고등어(*Scomber japonicus*) 가공 부산물은 부산 소재의 수산물 가공회사((주)동원해사랑)에서 제공받았다. 사용된 시약(펩신, protein marker, 육상 동물 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-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid(trolox)은 Sigma Aldrich(St. Louis, MO., USA)에서 구입하였으며, 그 외 다른 시약과 용매는 분석용 또는 HPLC 등급을 사용하였다.

[76]

[77] 실시예 1: 고등어 뼈와 껍질의 성분 분석

[78] 고등어의 뼈와 껍질을 차가운 물에서 수세한 후 시료를 72시간 동안 동결 건조하였다. 건조된 시료를 균질기에서 분쇄한 후 -20°C에서 보관하였다. 고등어 뼈와 껍질에 대한 일반 조성을 분석하기 위하여 Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 방법에 따라 수분, 회분, 조지방 및 단백질의 함량을 측정하였다. 비-단백질 함량은 수분, 회분, 지방 및 단백질의 총 함량에서 뺀 값으로 계산하였다. 본 실시예에서는 동결 건조된 고등어 뼈와 껍질 시료를 사용하였다. 하기 표 1은 건조된 고등어 뼈와 껍질에서의 주요 구성 성분의 함량 분석 결과로서, 건조된 고등어 껍질은 건조된 고등어 뼈에 비하여 단백질과 지질의 함량이 상대적으로 높다는 것을 알 수 있다.

[79] 표 1

[Table 1]

건조된 고등어 뼈와 껍질의 주요 구성 성분

시료	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

[80]

[81] 실시예 2: 고등어 뼈와 껍질에서 펩신 가용성 콜라겐 분리

- [82] 고등어 뼈와 껍질에 있는 펩신 가용성 콜라겐(pepsin-solubilized collagen, PSC)을 -4°C에서 아래와 같은 방법으로 분리하였다.
- [83] 콜라겐이 없는 부분을 제거하기 위하여, 분쇄된 고등어 뼈를 0.1M NaOH와 1:10 (w/v) 비율로 혼합하였다. 혼합물을 자석 교반기로 250 rpm에서 24시간 동안 지속적으로 교반하였다. 이때 알칼리 용액을 6시간마다 교환하였다. 그 다음, 시료의 pH가 중성에 도달할 때까지 시료를 차가운 증류수로 수세하고, 동결 건조시켰다(EYELA FDV-2100, Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan). 그 후, 시료에 0.5M 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA, pH 7.5)을 1:10 (w/v) 비율로 첨가하고, 4일 동안 탈석회화하였다. EDTA 용액은 매일 교환하였다. 잔여물을 차가운 증류수로 수세하고, 지방을 제거하기 위해, 회수된 잔여물을 10%(v/v) butyl alcohol 수용액과 1:10 (w/v) 비율로 혼합하여 24시간 동안 처리하였다. 그리고 다시 증류수로 씻은 다음, 그 잔여물을 0.1%(w/v) 펩신이 함유된 0.57M 아세트산 용액에 1:10 (w/v)으로 혼합시켜 3일 동안 처리하고, 12,000 rpm으로 50분 동안 원심분리 하였다. 잔여물을 앞과 같은 용액으로 3일 동안 다시 추출하고, 동일한 조건으로 원심분리 하였다. 점성이 있는 용액에 NaCl을 첨가하여 최종적으로 농도를 2.0M로 조정하였다. 이 용액을 24시간 동안 배양하고, 생성된 침전물을 20분간 12,000 rpm으로 원심분리한 후, 0.57M 아세트산에 용해시켰다. 이 용액을 0.1M 아세트산과 증류수로 투석시키고, 투석액에 넣어 2시간 동안 보관한 다음, 동결 건조하여 펩신 가용성 콜라겐 분말을 수득하였다.
- [84] 고등어 껍질로부터는 다음과 같은 방법으로 콜라겐을 분리하였다. 분쇄된 고등어 껍질에 0.1M NaOH를 1:35 (w/v) 비율로 혼합한 다음, 자석 교반기를 이용하여 교반하면서 24시간 동안 처리하였다. 이때 알칼리 용액을 하루에 4번 교체하였다. 그리고 차가운 증류수로 수세한 다음, 동결 건조하였다. 동결 건조한 시료를 10%(w/v) butyl alcohol 수용액과 1:35 (w/v) 비율로 혼합하여, 24시간 동안 탈지하였다. 탈지된 잔여물을 차가운 증류수로 수세한 후, 잔여물을 0.1%(w/v) 펩신이 함유된 0.57M 아세트산 용액에 1:35 (w/v)로 혼합시켜 3일 동안 처리하였다. 그 다음, 고등어 뼈에서 콜라겐을 분리할 때와 동일한 과정을 수행하여 펩신 가용성 콜라겐 분말을 수득하였다.
- [85] 고등어 뼈 및 껍질로부터 얻은 펩신 가용성 콜라겐 분말 중의 콜라겐 함량은 문헌에 기재된 방법(D.E. Goll et al., 1963 *J. Food Science*, 28(5):503-509)에 따라 히드록시프롤린을 정량한 다음, 환산계수를 곱하여 구하였다. 히드록시프롤린의 함량은 문헌에 기재된 방법(I. Bergman et al., 1963, *Analytical Chemistry*, 35(12):1961-65)을 약간 변형하여 정량하였다.
- [86] 하기 표 2는 고등어 뼈와 껍질에서 각각 얻은 펩신 가용성 콜라겐 분말 중의 콜라겐 (단백질) 및 일반 성분 함량 분석 결과를 나타낸다. 고등어 뼈에 비하여 껍질의 펩신 가용성 콜라겐 함량이 높게 나타났다. 고등어 뼈와 껍질의 단백질 함량은 각각 90.05 ± 2.34 및 $86.89 \pm 2.48\%$ 이었다. 또한, 고등어 뼈와 껍질의 수분

함량은 6.28 ± 0.12 및 $7.48 \pm 0.10\%$, 회분 함량은 3.48 ± 0.09 및 $5.37 \pm 0.06\%$, 지방 함량은 0.19 ± 0.02 및 $0.26 \pm 0.03\%$ 이었다.

[87] 표 2

[Table 2]

건조된 고등어 뼈와 껍질에서 수득한 펩신 가용성 콜라겐 분말 중의 단백질(콜라겐) 및 일반 성분 함량

조성(%)	펩신 가용성 콜라겐 분말	
	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

[88]

[89] 실시예 3: 펩신 가용성 콜라겐의 분자량 측정

[90] 실시예 2에서 얻은 펩신 가용성 콜라겐 분말의 분자량을 SDS-PAGE를 이용하여 측정하였다. 단백질을 3.0% stacking gel 및 5.0% resolving gel을 이용하는 Laemmli의 수정된 방법으로 분석하였다. 실시예 2에서 얻은 펩신 가용성 콜라겐(PSC) 분말 시료 2g을 1.0 mL의 0.02M sodium phosphate 완충제(pH 7.2)에 용해시킨 후, 용해된 시료를 완충제(1M Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 25% glycerol, 2% bromophenol blue, 5% 2-mercaptoethanol 포함)와 1:1(v/v)비율로 혼합하였다. 앞에서 준비된 혼합 시료 20 μ L을 polyacrylamide gels에 부착시키고, 30 mA 전류로 지속적인 전기영동으로 분리시켰다. 동일한 방법으로 송아지 껍질과 소의 힘줄로부터 분리된 콜라겐을 표준물질로 사용하여, 실시예 2에서 고등어의 뼈와 껍질에서 분리한 펩신 가용성 콜라겐과 비교 분석하였다. 또한 분자량(MW)이 높은 markers를 단백질의 분자량을 특정하기 위해 사용하였다.

[91] 고등어 뼈와 껍질에서 분리된 펩신 가용성 콜라겐(PSC)의 분자량 크기에 대한 SDS-PAGE 패턴 결과를 도 3에 도시하였다. 2개의 α -체인(α_1 and α_2) 콜라겐은 분자량이 각각 116 kDa(α_1) 및 126 kDa(α_2)이었고, 표준 콜라겐의 분자량과 유사한 값을 보이고 있다. 고등어의 뼈와 껍질로부터 분리된 β -체인 콜라겐은 분자량이 205 kDa이었다. 이러한 결과는 고등어의 뼈와 껍질에서 분리된 콜라겐은 동물 유래 콜라겐과 유사한 크기의 분자량을 가지고 있다는 것을 의미한다.

[92]

[93] 실시예 4: 펩신 가용성 콜라겐의 FT-IR 분석

[94] 실시예 2에서 고등어의 뼈와 껍질에서 각각 얻은 펩신 가용성 콜라겐(PSC) 분말에 대해 FT-IR 분석을 수행하였다. 동결 건조된 고등어의 뼈와 껍질의 PSCs FT-IR 스펙트럼은 Perkin Elmer (USA), Spectrum X를 사용하여 얻을 수 있었고, 스펙트럼은 $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$, 4 cm^{-1} 의 해상도에서 측정하였다. 고등어 뼈와 껍질에서 분리된 콜라겐에 대한 FT-IR 스펙트럼 분석 결과를 도 4 및 5에 각각 도시하였다. 이들 도면에서 보는 것과 같이 고등어 뼈와 껍질에서 분리된 콜라겐의 밴드가 3283 cm^{-1} 및 3285 cm^{-1} 에서 나타났다. 이들 도면에 표시된 amide I, amide II, amide III band에 대한 파장은 콜라겐의 성상과 직접적인 관련이 있고, amide I 밴드($1600 - 1660 \text{ cm}^{-1}$)는 폴리펩타이드에 있는 carbonyl groups (C=O)의 진동과 관련이 있다. Amide II band($\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$)는 N-H bending 및 C-N stretching 진동과 연관되며, amide III band($1220 - 1320 \text{ cm}^{-1}$)는 C-N stretching 진동과 N-H 변형과 연관된다. 이러한 FT-IR 스펙트럼 분석 결과로부터 실시예 2에서 얻은 물질이 콜라겐임을 확인할 수 있었다.

[95]

[96] 실시예 5: 펩신 가용성 콜라겐의 점도 및 변성 온도 측정

[97] 실시예 2에서 얻은 펩신 가용성 콜라겐 분말의 점도 및 변성 온도를 측정하였다.

[98] Brookfield DVII + Pro viscometer (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA 02346 USA)를 사용하여 고등어의 뼈와 껍질의 점성을 다음과 같이 측정하였다. 0.1% (w/v) PSC가 함유된 0.1M 아세트산 8 mL를 20분간 10°C 에서 배양한 후 용기에 두었다. 그 다음 점도 측정 장치 부품인 SC4-18을 사용하여 150 rpm에서 회전시켜 시료의 점성을 측정하였고, 점도의 단위는 centipose (cP) 단위로 표시하였다. 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 $20.26 \pm 0.21 \text{ cP}$ 이었다.

[99] 또한, 변성 온도(Td)를 다음과 같이 측정하였다. 0.1% (w/v) PSC가 함유된 0.1M 아세트산 8 mL를 10°C 에서 40°C 까지 가열하면서 3°C 간격으로 시료를 채취하였다. 채취한 용액을 채취한 온도에서 20분 동안 보관한 후에 점성을 측정하였다. PSC의 열 변성 곡선에 의하면 온도에 따라 점도가 약간 변화하는 것으로 나타났다(도 6 참조). 최대 점도를 각 온도에서 측정된 점도로 나누어 fractional viscosity를 계산하고, fractional viscosity가 0.5에 근접하였을 때의 온도를 변성 온도로 결정하였다. 하기 표 3은 고등어의 뼈와 껍질에서 각각 분리된 콜라겐의 점도와 변성 온도를 나타낸 것이다.

[100] 표 3

[Table 3]

고등어의 뼈와 고등어의 껍질에서 분리된 콜라겐의 점도와 변성 온도

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

[101]

[102] 실시예 6: 가압 수열 가수분해를 이용한 콜라겐 가수분해물 수득

[103] 도 2에 도시된 것과 같은 고온, 고압용 회분식 반응기를 사용하여 실시예 2에서 얻은 펩신 가용성 콜라겐을 가수분해하였다. 가수분해 반응기로서 온도 제어기와 압력게이지가 부착되어 있는 고압반응기(재질: Hastelloy 276, ㈜일신오토클레이브)를 사용하여, 200 mL의 회분식 반응으로 아래에 설명하는 방법으로 가수분해 반응을 진행하였다.

[104] 실시예 2에서 얻은 콜라겐(0.5 g)과 물을 1:200 (w/v)의 비율로 혼합하여 반응기에 주입하였다. 전기 가열기를 사용하여 200 - 250°C의 온도와 30 - 70bar의 압력 범위로 가열하고, 실험을 진행하는 동안 반응기의 온도와 압력을 온도 조절기와 압력 게이지를 사용하여 측정하였다. 150 rpm에서 자석 교반기를 사용하여 교반하였다. 26 - 54분 가열 후에 원하는 온도에 도달하였고, 이 온도에서 3분 동안 유지하였다. 반응기에 냉각 순환 자켓을 연결하여 냉각한 후, 가수분해물을 반응기로부터 회수하고, 여과지를 사용하여 여과하였다.

[105]

[106] 실시예 7: 콜라겐 가수분해물에 대한 MALDI-TOF 질량 분석

[107] 실시예 6에서 얻은 콜라겐 가수분해물의 분자량을 결정하기 위하여, 회수된 콜라겐 가수분해물에 대하여 MALDI-TOF-MS(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry) 분석을 수행하였다. 실시예 6에서 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 혼합된 용액을 혼합하고 건조시켰다. 각 샘플을 377 nm의 펄스 질소 레이저가 탑재된 Ultraflex III 질량분석기(Bruker Daltonics, 독일)의 MALDI TOF MS를 이용하여 분석하였다. 700 - 6000 m/z에서 양이온화 및 반사 모드에서 200 레이저 샷으로부터 데이터를 축적하여 획득하였다.

[108] 실시예 7의 분석 결과를 도 7 내지 도 9 및 하기 표 4 내지 6에 나타내었다. 이들 도면 및 표에 나타낸 것과 같이, 고등어 뼈에서 분리된 콜라겐을 200°C, 30 bar조건에서 가수분해한 경우 펩타이드의 분자량 범위는 약 759 - 988 Da이었고, 같은 조건에서 처리한 고등어의 껍질의 콜라겐 가수분해물의 펩타이드 분자량은 789 - 1632 Da 범위이었다. 가수분해 반응 조건 250°C, 70 bar에서

처리된 고등어 껍질의 콜라겐 가수분해물에 존재하는 펩타이드의 분자량은 952 - 1638 Da 범위를 보였다. 이들 결과로부터 콜라겐 가수분해물의 분자량은 가수분해되지 않은 콜라겐의 분자량 범위 116 - 126 kDa에 비해 크게 감소한 것을 알 수 있다. 가수분해물에 존재하는 펩타이드를 Mascot Database를 사용하여 동정하고, 예상되는 펩타이드를 표 4 내지 6에 나타내었다.

- [109] 표 4는 고등어 뼈 콜라겐 가수분해물의 MALDI-TOF 질량 분석(200°C, 30 bar) 결과를, 표 5는 고등어 껍질 콜라겐 가수분해물에 대한 MALDI-TOF 질량 분석(200°C, 30 bar) 결과를, 표 6은 고등어 뼈 콜라겐 가수분해물에 대한 MALDI-TOF 질량 분석(250°C, 70 bar) 결과를 각각 보여준다. (표 4 내지 6에 표시된 약어: A-알라닌, C-시스테인, D-아스파르트산, E-글루탐산, F-페닐알라닌, G-글리신, H-히스티딘, I-이소류신, K-리신, M-메티오닌, N-아스파라진, P-프롤린, Q-글루타민, R-아르기닌, S-세린, T-트레오닌, V-발린, W-트립토판, Y-티로신; *예상 펩타이드는 mascot 데이터베이스(<http://www.matrixscience.com>)에서 확인 가능)

- [110] 표 4

[Table 4]

고등어 뼈 콜라겐 가수분해물의 MALDI-TOF 질량 분석(200°C, 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	-.MKIIIAPAK.K	3335.74
987.21	986.21	M.ADAELEAIR.Q	2814.04
989.21	988.20	K.TLWHCSDK.L	987.93

- [111] 표 5

[Table 5]

고등어 껍질 콜라겐 가수분해물의 MALDI-TOF 질량 분석(200°C, 30 bar)

m/z	Molecular weight (dalton)	Predicted peptide*	Intensity
790.36	789.36	R.SDGSRIR.F	114.43
1121.27	1120.26	-.MIQMQLTKLK.-	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.SAQFMKIVSLAPE VL.-	120.54

[112] 표 6

[Table 6]

고등어 뼈 콜라겐 가수분해물의 MALDI-TOF 질량 분석(250°C, 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

[113]

[114] 실시예 8: 콜라겐 가수분해물에 대한 아미노산 조성 분석

[115] 실시예 7에서 얻은 콜라겐 가수분해물의 분자량을 측정하기 위하여, 회수된 가수분해물의 아미노산 조성을 분석하였다. 아미노산 함량 분석을 위해 S430(SYKAM) 아미노산 자동 분석기를 사용하였다. 양이온 분리 컬럼 LCA K07/Li (4.6 x 150 mm)의 온도는 37 - 74°C로, 완충제 pH 범위는 2.90 - 7.95로 하였다. 이동상은 1분당 0.45 mL의 유량에서 5 mM *p*-toluenesulphonic acid 용액을 사용하였고, 5 mM *p*-toluenesulphonic acid와, 20 mM of Bis-Tris, EDTA 100 mM의 혼합물을 분당 0.25 mL의 유량으로 포스트 컬럼 시약으로 사용하였다. 방출

파장은 440 및 570 nm이었다. 고등어 뼈와 껍질에서 분리한 콜라겐의 가수분해물 중의 아미노산의 조성 및 함량을 표 7에 나타내었다. 적용된 온도 및 압력 조건에 따라 아미노산의 함량이 달라진 것에 비추어, 수열 반응의 온도와 압력이 가수분해 반응에서 중요한 변수임을 알 수 있다. 가수분해물에 존재하는 아미노산 중에 글리신(glycine)의 함량이 높았는데, 고등어 뼈의 가수분해물에는 약 27.90 - 29.44%, 고등어 껍질의 가수분해물에는 약 32.38 - 35.25%이었다.

[116] 표 7

[Table 7]

콜라겐 가수분해물의 아미노산 조성

	(mg/g)			
아미노산 조성	Bone collagen hydrolyzate		Skin collagen hydrolyzate	
	Temperature (°C)/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

[117]

[118] 실시예 9 : 콜라겐 가수분해물의 항산화 활성 분석

[119] 실시예 6에서 얻은 콜라겐 가수분해물의 항산화 활성을, DPPH 자유 라디칼 소거능, ABTS 자유 라디칼 소거능, 철 환원력(Ferric reducing power activity), Fe²⁺ 킬레이팅 활성법으로 확인하였다.

[120] DPPH 자유 라디칼 소거 분석법

[121] DPPH 자유 라디칼 소거 분석을 위하여, 가수분해 전과 후에 다양한 농도에서 0.1 mL의 콜라겐 샘플이 담긴 Test tubes에 0.1mM DPPH 메탄올 용액 3.95mL를 첨가했다. 혼합물들을 각각 10초 동안 혼합하고, 암실에서 30분 동안 상온에서 배양하였다. 517 nm에서 모든 샘플의 흡광도를 측정하였다. DPPH 자유 radical 소거능은 다음 수식으로 계산되었다.

[122] DPPH 라디칼 소거능(%) = (1 - [As/Ac])x100%

[123] (As는 517 nm에서 측정된 샘플의 흡광도; Ac는 517 nm에의 공실험 흡광도)

[124] 공실험과 실측된 실험은(메탄올에 trolox의 다양한 농도) 앞에서 설명한 것과 같은 절차를 통해 분석되었다.

[125] ABTS+ 자유 라디칼 제거 분석법

[126] ABTS+ 자유 라디칼 제거 분석법을 다음과 같이 수행하였다. 7mM ABTS 수용액과, 2.45mM 황산칼륨 수용액을 1:1의 부피비로 혼합하고, 암실에서 상온 조건에서 반응시켜 ABTS+ 용액을 제조하고, 사용 전에 12 - 16시간 동안 보관하였다.

[127] ABTS+ 용액을 734nm에서 흡광도가 0.70±0.02가 되도록 80% 메탄올에 희석하고, 희석된 ABTS+ 용액 3.95 mL에 PSC 및 그 가수분해물 샘플 0.05 mL를 각각 첨가한 다음, 혼합물을 어두운 환경에서 6분 동안 상온 상태로 유지하였다. 모든 샘플의 흡광도를 734 nm에서 측정하였다. 자유 radical 소거 활성 ABTS+ 퍼센트를 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

[128] ABTS+ 라디칼 소거능(%) = (1 - [As/Ac])x100%

[129] (여기서, As는 734 nm에서 제어된 샘플의 흡광도이고, Ac는 734 nm에서 공실험 흡광도임)

[130] 공실험과 실측된 실험은(80% 메탄올에 trolox의 다양한 농도) 위에서 설명한 것과 같이 분석하였다.

[131] 철 환원력 분석법(Ferric reducing power assay)

[132] PSC 샘플 및 가수분해물의 Fe³⁺ 환원력을 다음과 같은 방법으로 각각 결정하였다. 가수분해 전후에 다양한 농도로 0.125 mL의 PSC 샘플을, pH 6.6인 0.2M 인산 완충용액 0.625 mL, 1% 페리시안화칼륨 0.625 mL와 혼합하였다. 이 혼합물을 50°C에서 20분 동안 배양하였다. 10분 동안 3,000 rpm에서 원심분리 후

10% 트리클로로아세트산 0.625 mL를 첨가 하였다. 용액의 상층 부분 1.0 mL을 증류수 1.0 mL 및 0.1% 염화제2철 1.0 mL와 혼합하였다. 그리고 700 nm에서 흡광도를 판독하였다. 흡광도의 상승은 환원력 증가와 관련이 있는 것으로 나타났다.

[133] Fe²⁺의 킬레이트화 분석법

[134] 샘플의 Fe²⁺ 킬레이트 능력을 다음과 같은 방법으로 결정하였다. 가수분해 전후의 다양한 농도에서 PSC 샘플 (0.1 mL)을 증류수 3.0 mL와 혼합하였다. 또한 2 mM의 FeCl₂ 50μL와 5mM ferrozine 0.1 mL를 가수 분해 전후의 PSC 샘플에 각각 첨가하고, 실온에서 20분 동안 배양하였다. 이후에 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다양한 농도의 EDTA를 관리 시료로 사용하였다. 증류수를 음성 대조군으로 사용하였다. Chelating activity (%)를 하기 식을 이용하여 계산하였다.

[135] $\text{Chelating activity (\%)} = 1 - [As/Ac] \times 100\%$

[136] (여기서 As는 562 nm에서 제어된 샘플의 흡광도; Ac는 562 nm에서 음성 대조군 흡광도)

[137] 본 실시예의 분석 결과를 도 10 내지 13 및 하기 표 8에 나타내었다. 도 10은 고등어 뼈와 껍질에서 분리된 콜라겐을 수열 반응을 통해 회수된 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능을 나타낸 것으로 농도 10 mg/mL에서 비교적 높은 항산화성을 보이고 있다. 도 11은 고등어 뼈와 껍질에서 분리된 콜라겐(PCS)와 가수분해물에 대한 ABTS 소거능 측정을 비교한 결과, 가수분해물의 항산화성이 가수분해전의 콜라겐 보다 높게 나타났다. 도 12 및 13은 가수분해전의 콜라겐과 가수분해 후의 콜라겐 펩타이드 함유 가수분해물의 Fe³⁺ 환원력과 Fe²⁺ 킬레이트 활성에 대한 결과를 나타낸 것으로 어류 콜라겐의 가수분해 전보다 수열반응 후의 가수분해물에서 높은 활성을 보이고 있다. 가수분해 반응 조건 250°C와 70 bar에서 얻은 고등어 껍질에서 분리된 콜라겐의 가수분해물은 다양한 농도에서 고등어 뼈에서 분리된 콜라겐 가수분해물보다 Fe³⁺ 환원력이 크게 나타났다. 고등어 뼈와 껍질의 콜라겐 가수분해물은 비슷한 Fe²⁺ 킬레이팅 효과를 나타내고 있으므로, 고등어 뼈와 껍질에서 분리된 콜라겐의 가수분해물은 Fe²⁺ 킬레이터 기능을 할 수 있음을 보여주고 있다. 고등어 뼈에서의 PSCs IC₅₀ 값은 200°C, 30 bar 조건에서 가수분해된 샘플에서 8.21±0.15 mg/mL, 250°C와 70 bar 조건에서 가수분해된 샘플에서 7.27±0.14 mg/mL이었으며, 고등어 껍질의 경우, 200°C, 30 bar 조건에서 가수분해된 샘플은 7.91±0.11 mg/mL, 250°C, 70 bar 조건에서 가수분해된 샘플은 7.01±0.12 mg/mL의 IC₅₀ 값을 보이고 있다. 아래 표 8은 콜라겐 가수분해물의 DPPH, ABTS 라디칼 소거능 및 Fe²⁺ 킬레이팅 활성(IC₅₀)을 보여주는 것으로서, 이 값들은 reference 값보다 높다는 것을 알 수 있다.

[138] 표 8

[Table 8]

콜라겐 가수분해물의 DPPH, ABTS 라디칼 소거능 및 Fe²⁺ 킬레이팅 활성(IC₅₀)

Activity	Collagen/Reference	IC ₅₀ (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 radicalscavenging	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

[139]

[140] 실시에 10: 휘발성 물질(VOCs) 분석

[141] 고등어 뼈와 껍질에서 회수된 콜라겐으로부터 발생하는 다양한 휘발성 유기 물질을 표 9 및 10에 나타내었다. 아임계 수의 가압 수열 반응에 의해 생산된 고등어 뼈와 껍질의 가수분해물에는 일부 휘발성 유기 물질들이 없어지거나 새로운 휘발성 유기 물질이 생성되었다. 고등어 뼈와 껍질에서 생산된 콜라겐 펩타이드와 아미노산이 함유된 가수분해물에서 동정된 휘발성 유기 물질 중에서 methylene chloride, methyl ethyl ketone, 3-methylbutanal and 2-methylbutanal은 품질에 좋은 영향을 주는 성분들이다. 이 휘발성 유기 물질은 아임계 수에 의한 가수분해반응 처리 전의 고등어 뼈와 껍질의 콜라겐에서 발생하는 휘발성 유기 물질보다 냄새에 대한 관능성이 우수하였다. 하기 표 9는 고등어 뼈 콜라겐과 가수분해물의 휘발성 물질(VOCs) 조성을 각각 보여주는 것이다.

[142] ㉔ 9

[Table 9]

고등어 뼈 콜라겐과 가수분해물에 대한 휘발성 물질(VOCs) 조성

Volatile organic compounds	Area (%)			
	Mackerel bone	Mackerel bone collagen	Bone collagen hydrolyzate (200°C,30bar)	Bone collagen hydrolyzate (250°C,70bar)
Ethanal	3.50	ND	ND	ND
Parapropionaldehyde	15.57	7.53	ND	ND
Furan	2.21	ND	ND	ND
Methylene chloride	ND	1.89	3.04	2.11
Isobutanal	ND	ND	14.42	14.90
Propanal, 2-methyl-	3.14	ND	ND	ND
Propanol	2.52	ND	ND	ND
Butanal	9.85	3.58	2.50	2.16
Methyl ethyl ketone	2.75	ND	5.50	6.76
Furan, 2-methyl-	1.50	ND	ND	ND
2-Butenal	1.60	ND	ND	ND
3-Methylbutanal	5.67	ND	26.61	23.11
2-Methylbutanal	2.89	ND	17.01	16.03
1-Penten-3-one	3.40	ND	ND	ND
2-pentanone	ND	ND	1.18	1.44
2-Ethylfuran	4.01	ND	ND	ND
Furan, 2-ethyl-	9.44	ND	ND	ND
Heptane	2.17	ND	ND	ND
2-Pentenal, (E)-	1.69	ND	ND	ND
1-Pentanol	2.51	ND	ND	ND
n-Hexanal	9.65	5.03	1.26	ND
Heptane, 2,4-dimethyl-	2.09	ND	ND	ND
Heptanal	3.93	2.02	ND	ND

Octanal	2.70	2.07	ND	ND
---------	------	------	----	----

[143]

[144] 아래 표 10은 고등어 껍질 콜라겐과 가수분해물의 휘발성 물질(VOCs) 조성을 각각 보여주는 것이다.

[145] 표 10

[Table 10]

고등어 껍질 콜라겐과 가수분해물에 대한 휘발성 물질(VOCs) 조성

Volatile organic compounds (VOCs)	Area (%)			
	Mackerel skin	Mackerel skin collagen	Skin collagen hydrolyzate (200°C,30bar)	Skin collagen hydrolyzate (250°C,70bar)
Diethoxyethane	16.66	ND	ND	ND
Propionaldehyde	22.37	8.13	ND	ND
Ethyl formate	4.48	ND	ND	ND
Methylene chloride	ND	ND	5.15	3.09
Isobutanal	1.48	ND	14.13	14.09
Butanal	7.78	2.64	1.85	2.36
2-Butanone	2.22	ND	ND	ND
Methyl ethyl ketone	ND	ND	6.03	6.61
Chloroform	1.91	ND	ND	ND
2-Butenal	2.58	ND	ND	ND
3-Methylbutanal	2.08	ND	19.18	20.05
2-Methylbutanal	ND	ND	12.49	14.48
1-Penten-3-one	3.11	ND	ND	ND
Hydroxycyclopentane	8.90	ND	ND	ND
Furan, 2-ethyl-	2.58	1.32	ND	ND
n-Heptane	1.58	ND	ND	ND
n-Hexanal	6.92	5.27	ND	ND
1,2-Butylene glycol	1.38	ND	ND	ND
Heptane, 2,4-dimethyl-	2.01	ND	ND	ND
Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	ND	1.34	ND	ND
Allyl Isothiocyanate	ND	1.29	ND	ND
Heptanal	2.44	4.72	ND	ND
Octanal	1.31	3.90	ND	ND
Nonane,	1.53	ND	ND	ND

3-methyl-5-propyl-				
--------------------	--	--	--	--

[146]

[147] 이상과 같이, 본 발명의 바람직한 실시예에 기초하여 본 발명을 설명하였다. 전술한 실시예는 본 발명의 예시에 불과한 것으로서, 본 발명의 범위가 전술한 실시예의 범위로 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.

[148]

산업상 이용가능성

[149] 본 발명에 따라 어류 가공 과정에서 발생하는 부산물인 어류 뼈, 껍질, 내장 등로부터 가압 수열 반응을 이용하여 생산된 저분자 콜라겐 펩타이드 가수분해물은 분자량이 3 kDa 이하로 작아서 생체 내부로 흡수될 수 있으며, 골 조직 재생에 중요한 소재인 glycine과 proline을 함유하고 있고, 항산화 작용을 나타내므로, 의약품, 건강 보조 식품, 화장품 등을 비롯한 다양한 산업 분야에서 유용하게 활용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 어류 뼈, 껍질 및 내장으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 어류 가공 부산물로부터 추출된 고분자량의 콜라겐 분말을 가압 수열 가수분해 반응시키는 단계를 포함하는, 어류 유래의 저분자량 콜라겐을 수득하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 저분자량 콜라겐은 3,000 Da 이하의 분자량을 가지는 것인, 어류 유래의 저분자량 콜라겐을 수득하는 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 가압 수열 가수분해 반응에는 150 - 370°C의 온도 및 5 - 400 bar 압력의 물이 사용되는 것을 특징으로 하는, 어류 유래의 저분자량 콜라겐을 수득하는 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 고분자량의 콜라겐 분말을 가압 수열 가수분해 반응시키는 단계 이전에, 건조 및 분쇄된 어류 가공 부산물 시료로부터 고분자량의 콜라겐 분말을 추출하는 단계를 더 포함하고, 여기서 얻은 고분자량의 콜라겐 분말을 가압 수열 가수분해 반응시키는 단계의 출발 물질로 사용하는 것인, 어류 유래의 저분자량 콜라겐을 수득하는 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 고분자량의 콜라겐 분말을 추출하는 단계는 분쇄된 고등어의 뼈를 1:5 - 1:20 (w/v)의 비율로 희석한 알칼리 용액으로 처리하는 단계; 알칼리 용액의 처리에 의해 얻어진 불용성 고등어 뼈에 산을 1:5 - 1:20 (w/v)의 비율로 혼합하여 탈석회화 하는 단계; 탈석회화된 고등어 뼈에 알코올을 1:5 - 1:20 (w/v)의 비율로 가하여 탈지 처리하는 단계; 및 탈지 처리된 고등어 뼈 잔여물에 펙신을 가하여 가수분해하는 단계를 포함하는 것인, 어류 유래의 저분자량 콜라겐을 수득하는 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 고분자량의 콜라겐 분말을 추출하는 단계는 분쇄된 고등어의 껍질을 1:20 - 1:50 (w/v)의 비율로 희석한 알칼리 용액으로 처리하는 단계; 알칼리 용액의 처리에 의해 얻어진 불용성 고등어 껍질에 알코올을 1:20 - 1:50 (w/v)의 비율로 혼합하여 탈지 처리하는 단계; 및 탈지 처리된 고등어 껍질 잔여물에 펙신을 가하여 가수분해하는 단계를 포함하는 것인, 어류 유래의 저분자량 콜라겐을 수득하는 방법.
- [청구항 7] 어류 뼈, 껍질 및 내장으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의

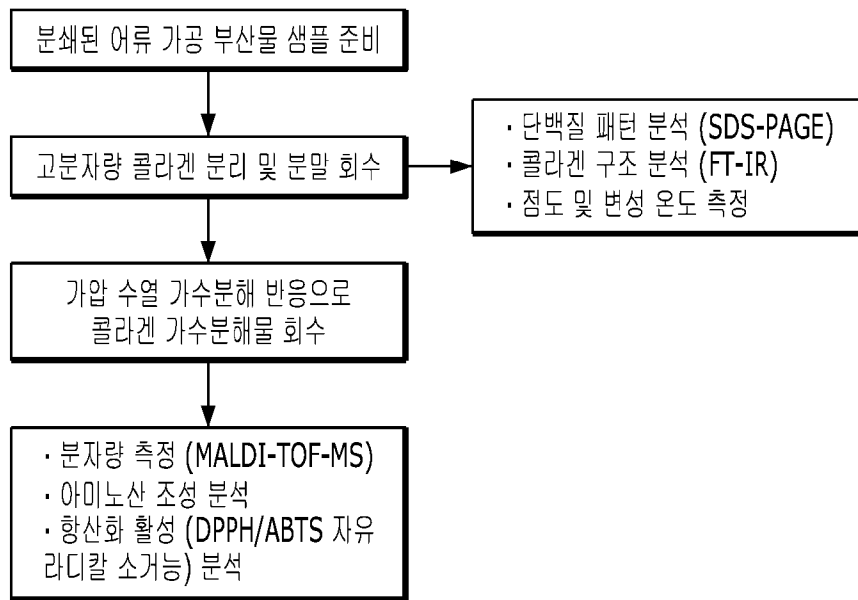
어류 가공 부산물로부터 추출된 고분자량의 콜라겐 분말을 고온 및 고압의 물로 가수분해하는 것을 포함하는, 어류 유래의 저분자량 콜라겐의 제조 방법.

[청구항 8]

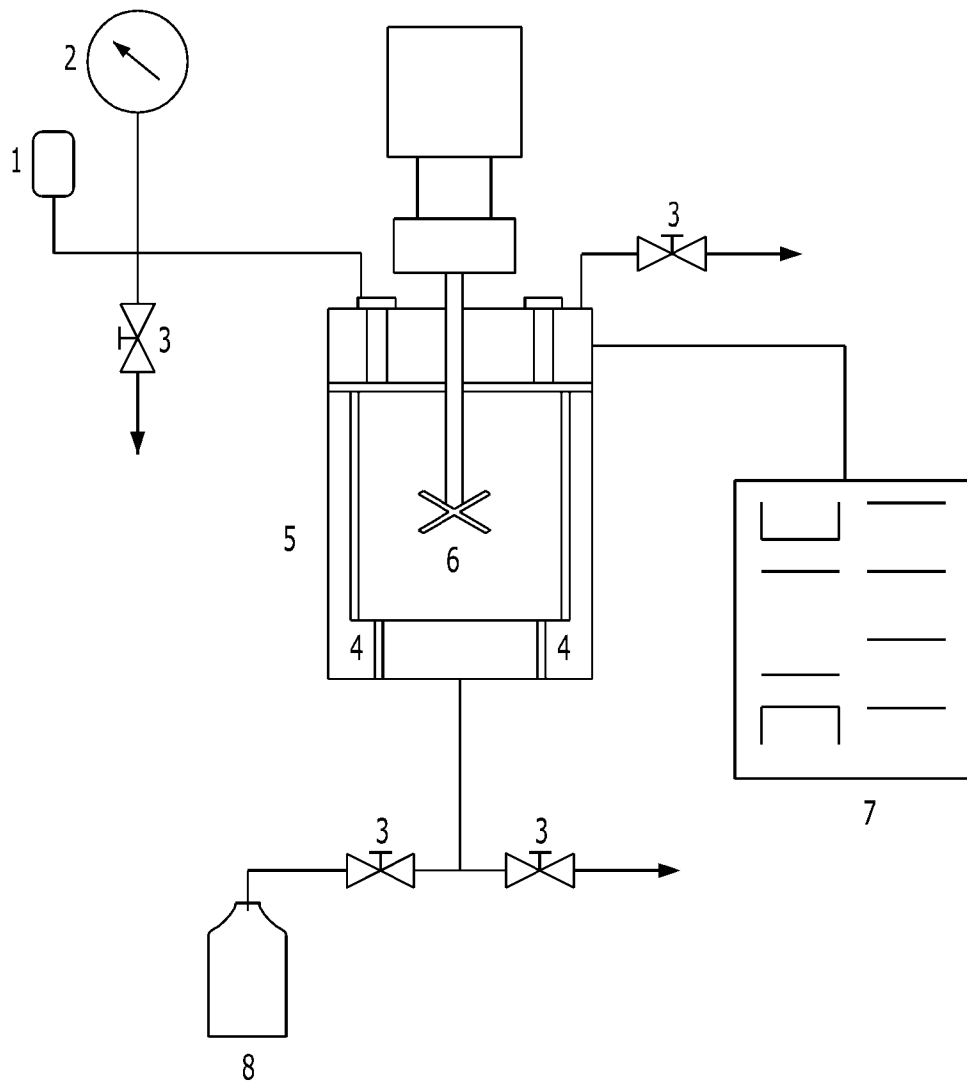
제7항에 있어서,

상기 저분자량 콜라겐은 3,000 Da 이하의 분자량을 가지는 것인, 어류 유래의 저분자량 콜라겐의 제조 방법.

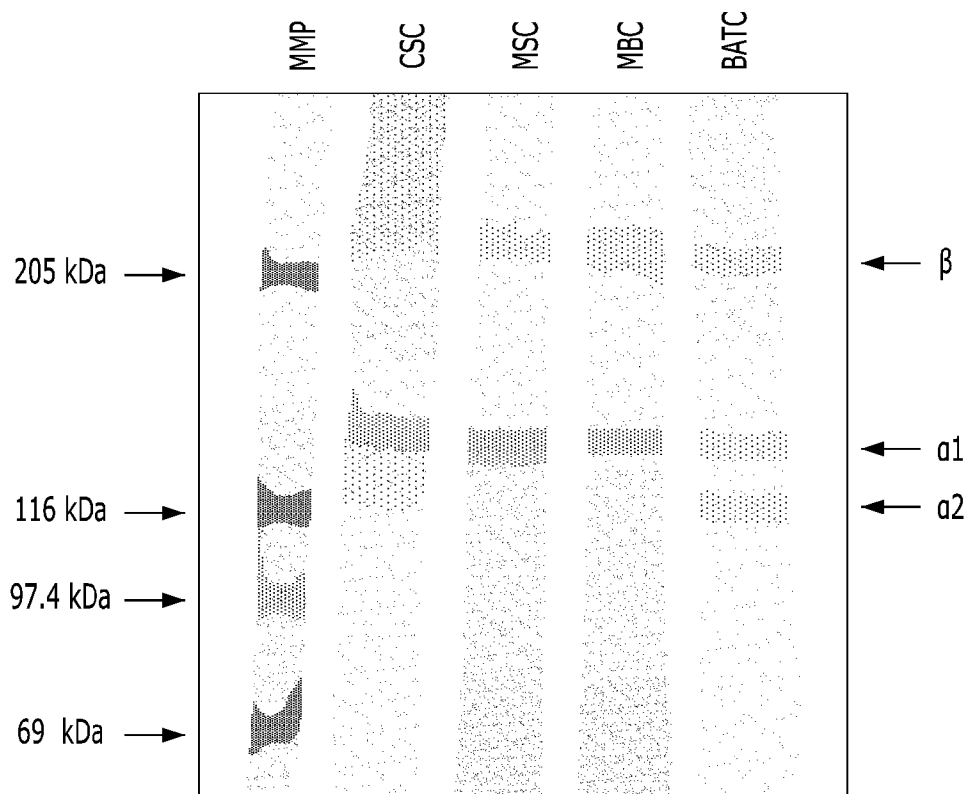
[Fig. 1]



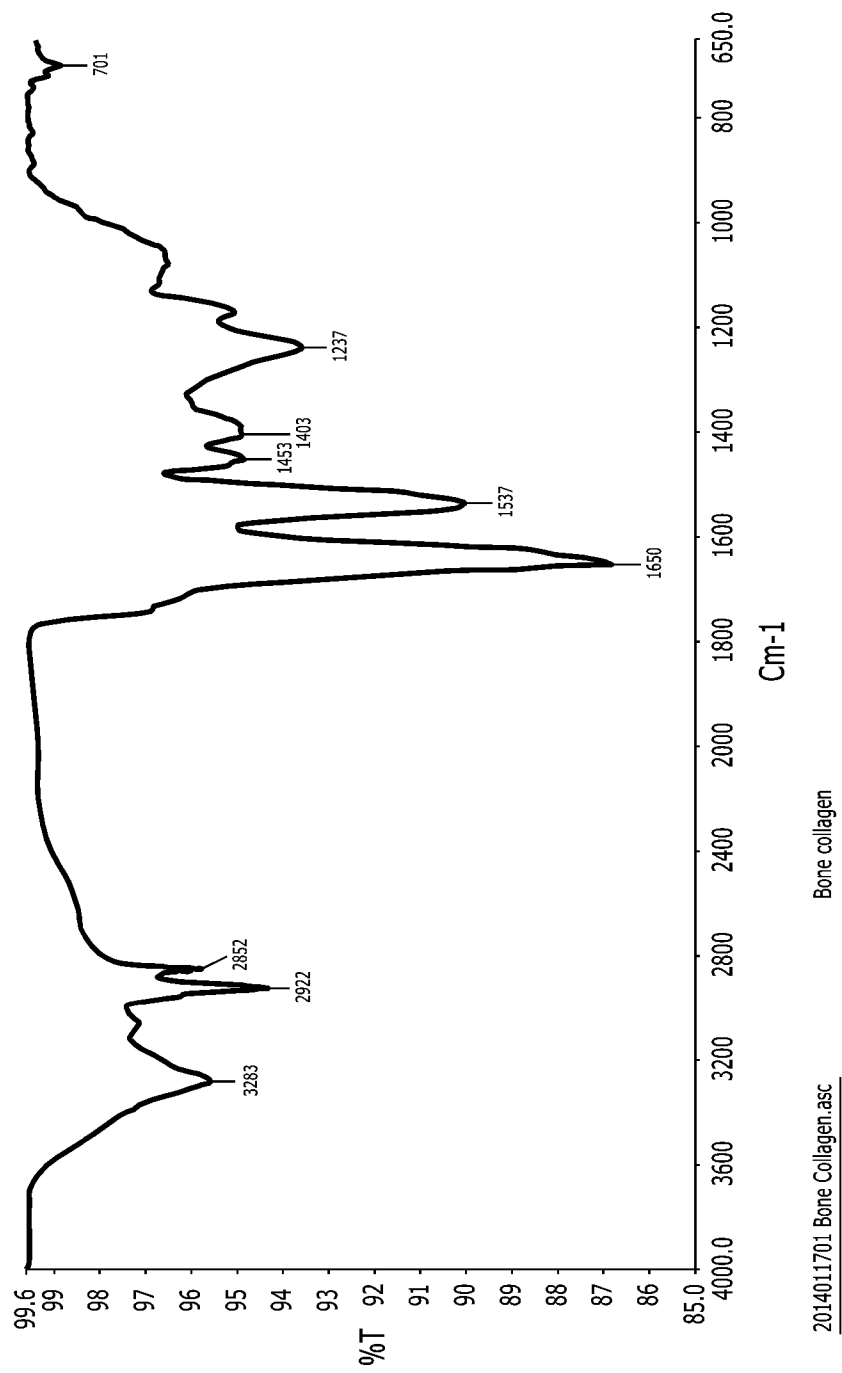
[Fig. 2]



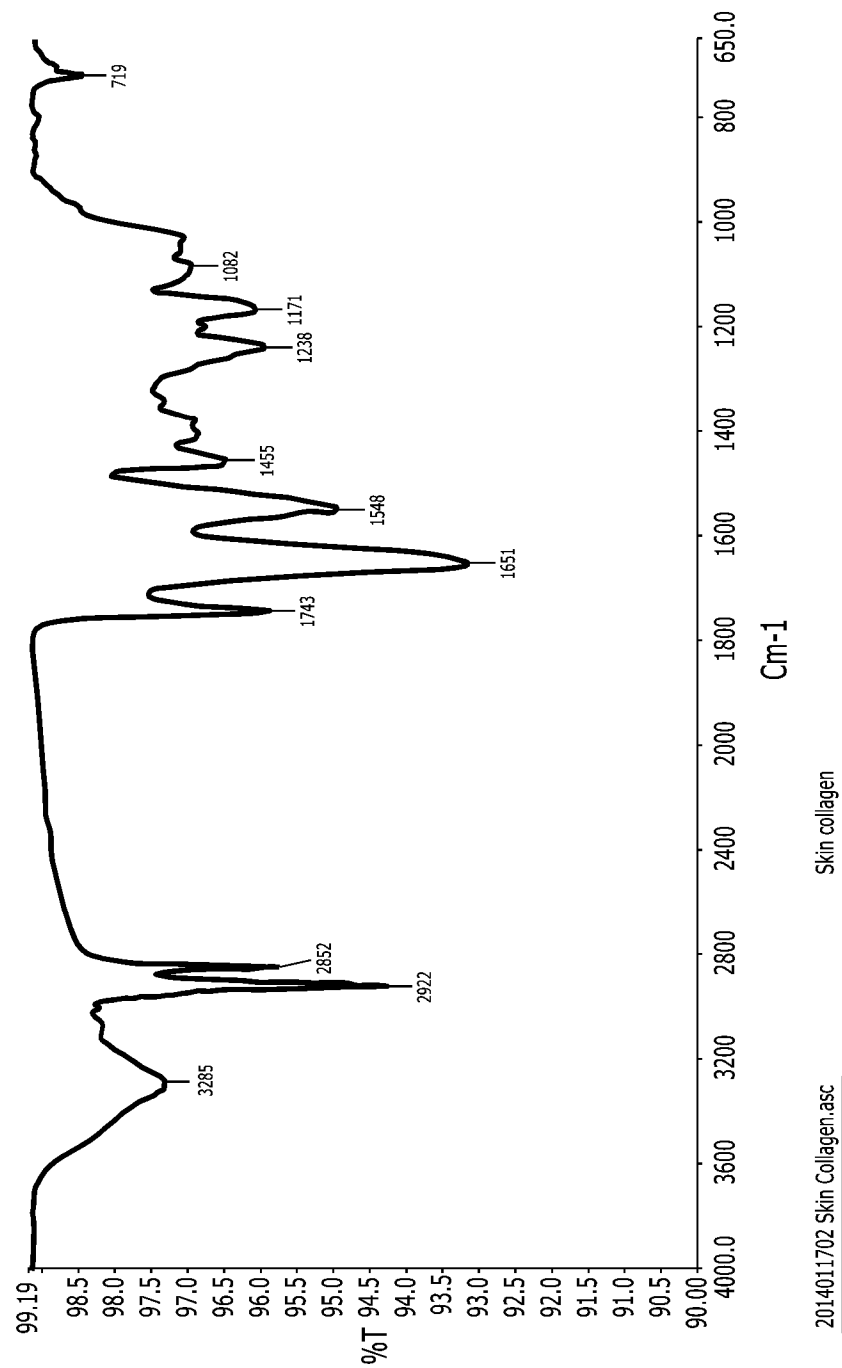
[Fig. 3]



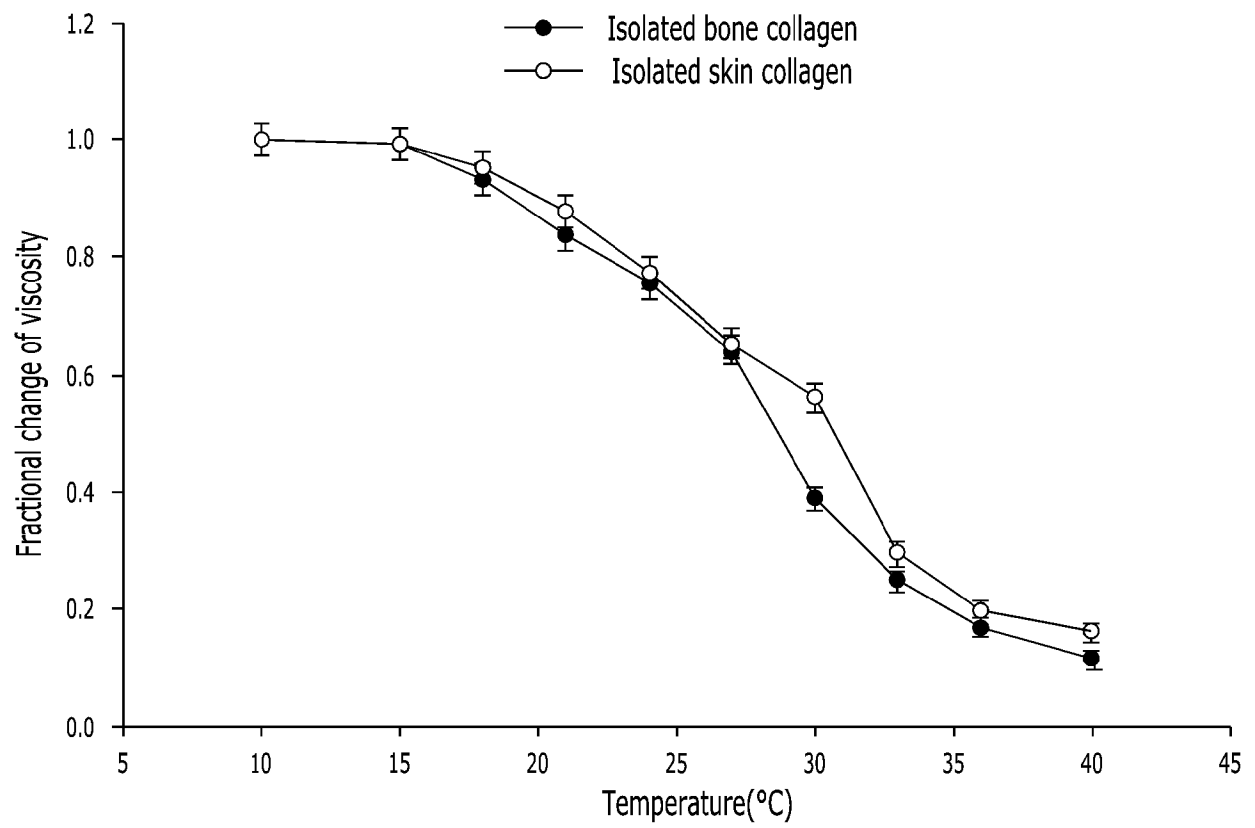
[Fig. 4]



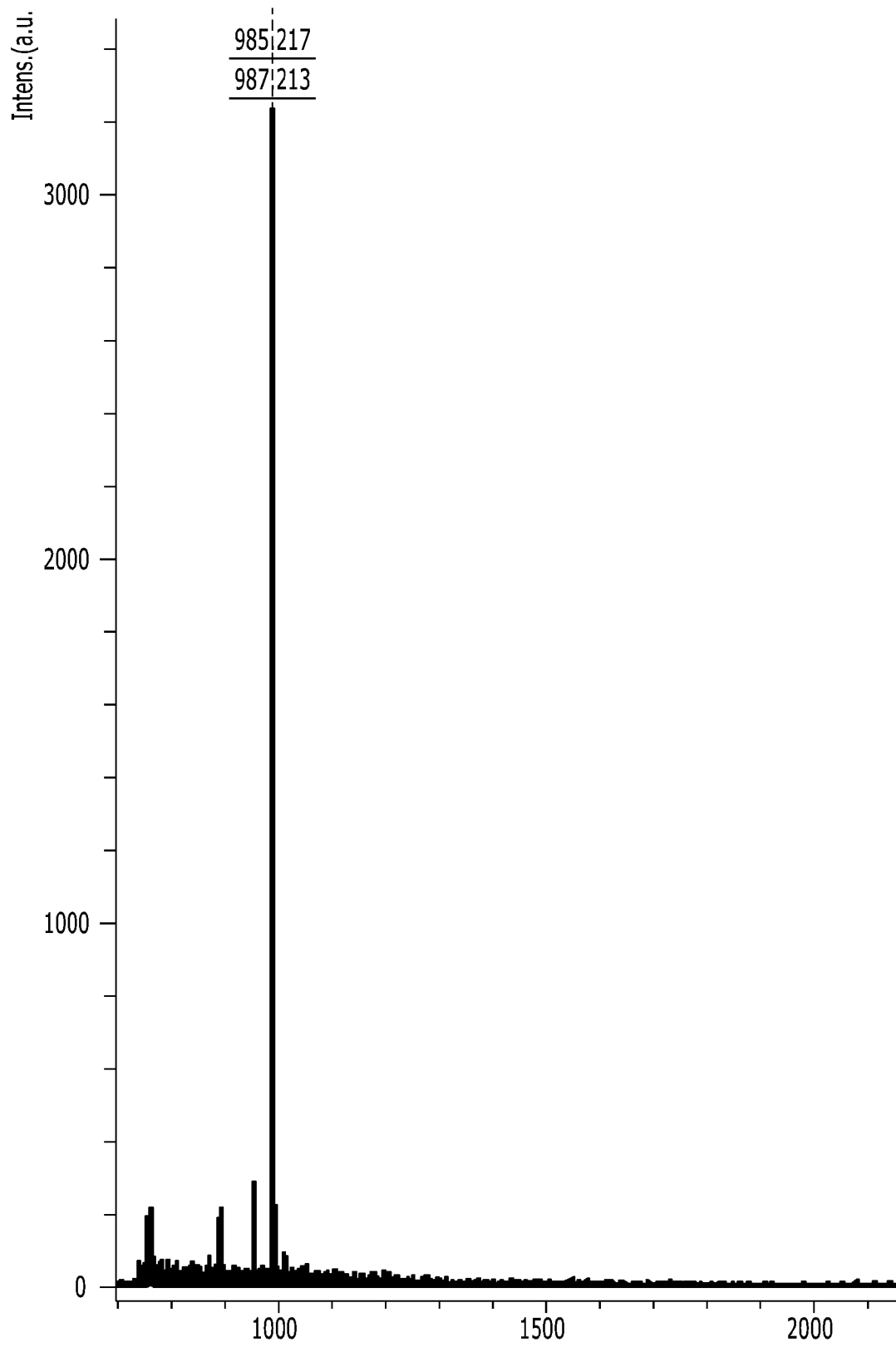
[Fig. 5]



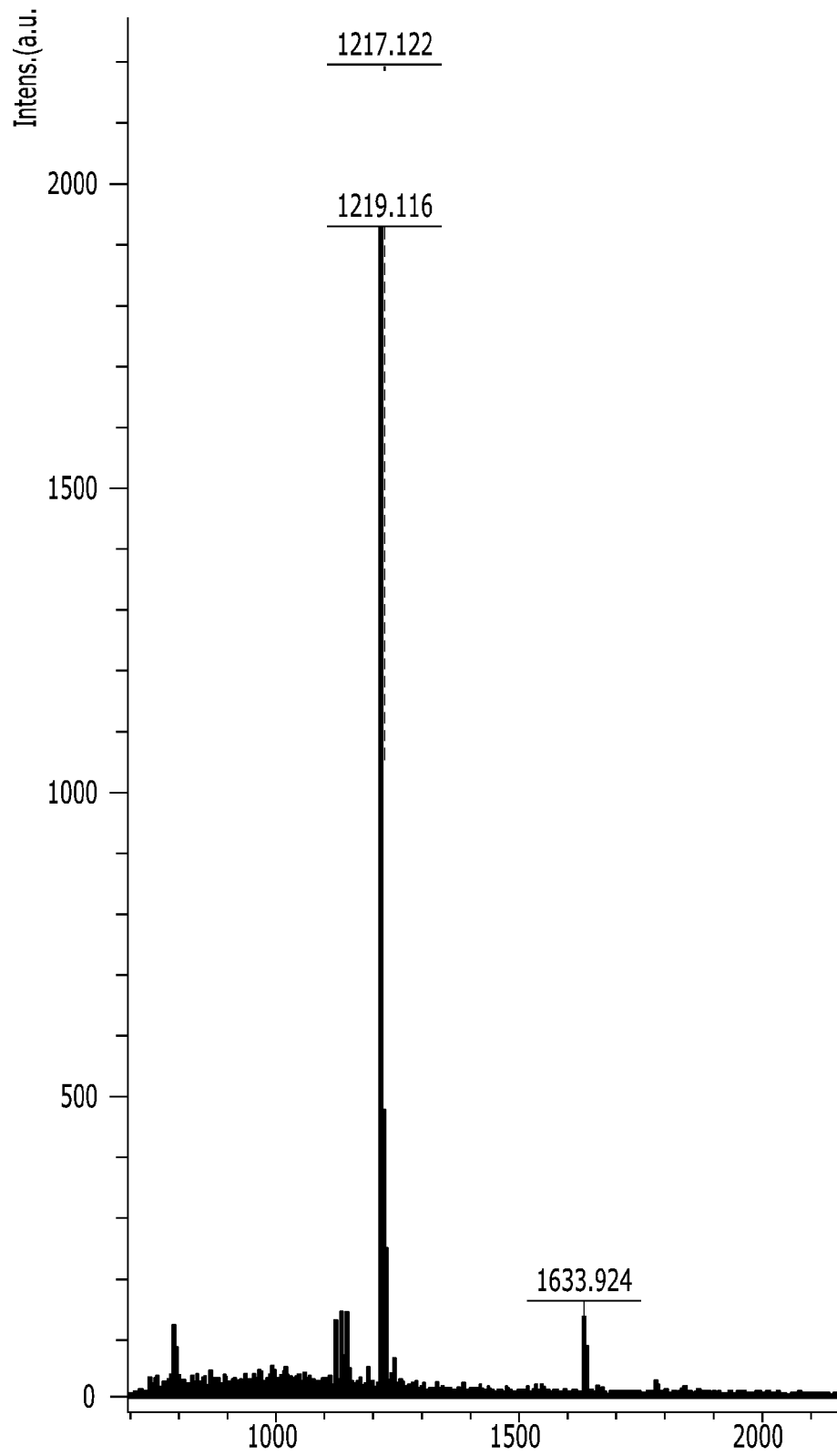
[Fig. 6]



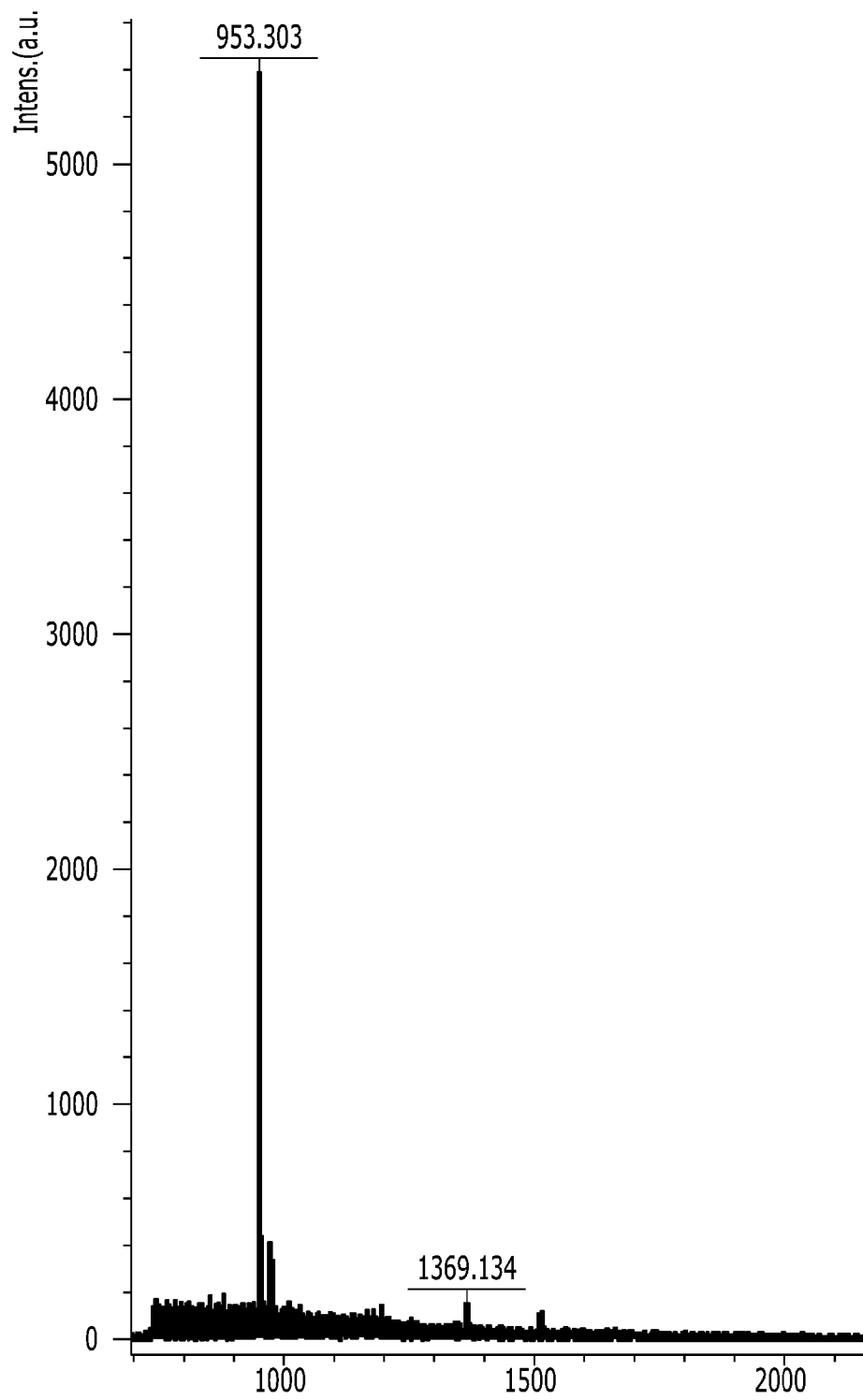
[Fig. 7]



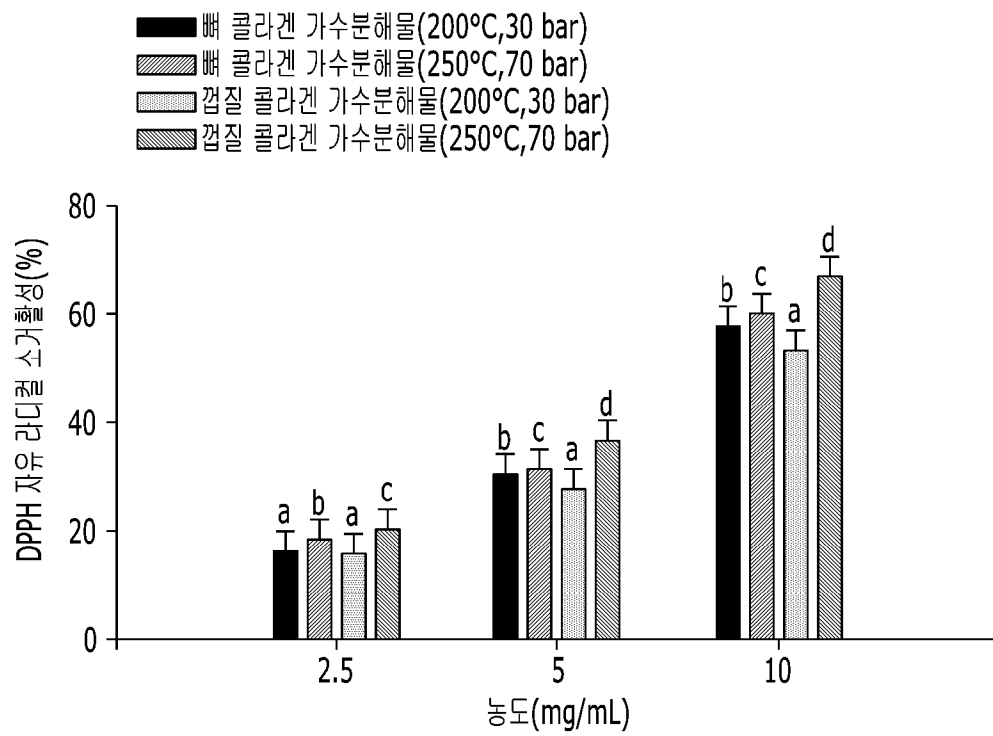
[Fig. 8]



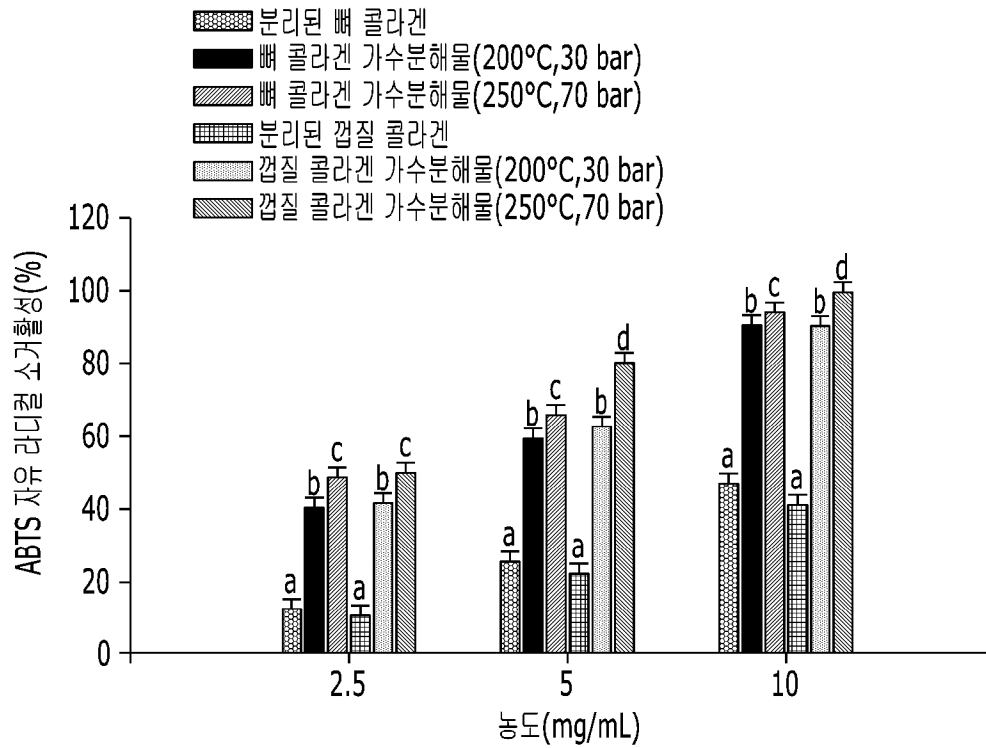
[Fig. 9]



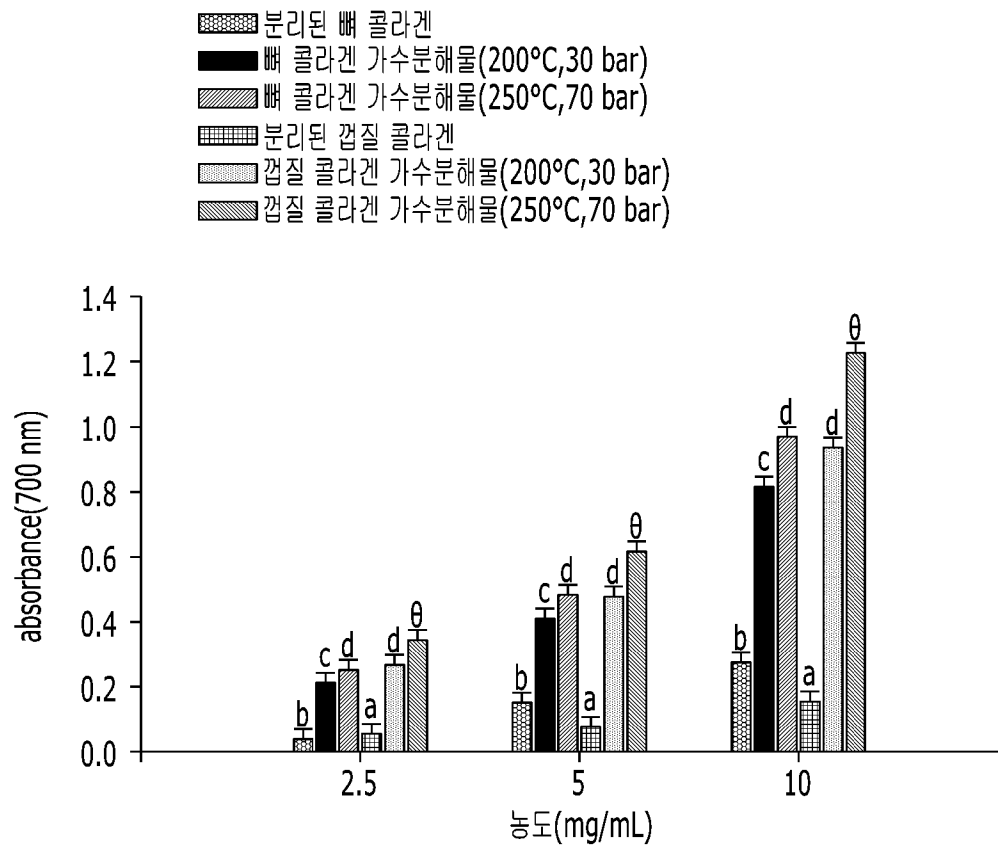
[Fig. 10]



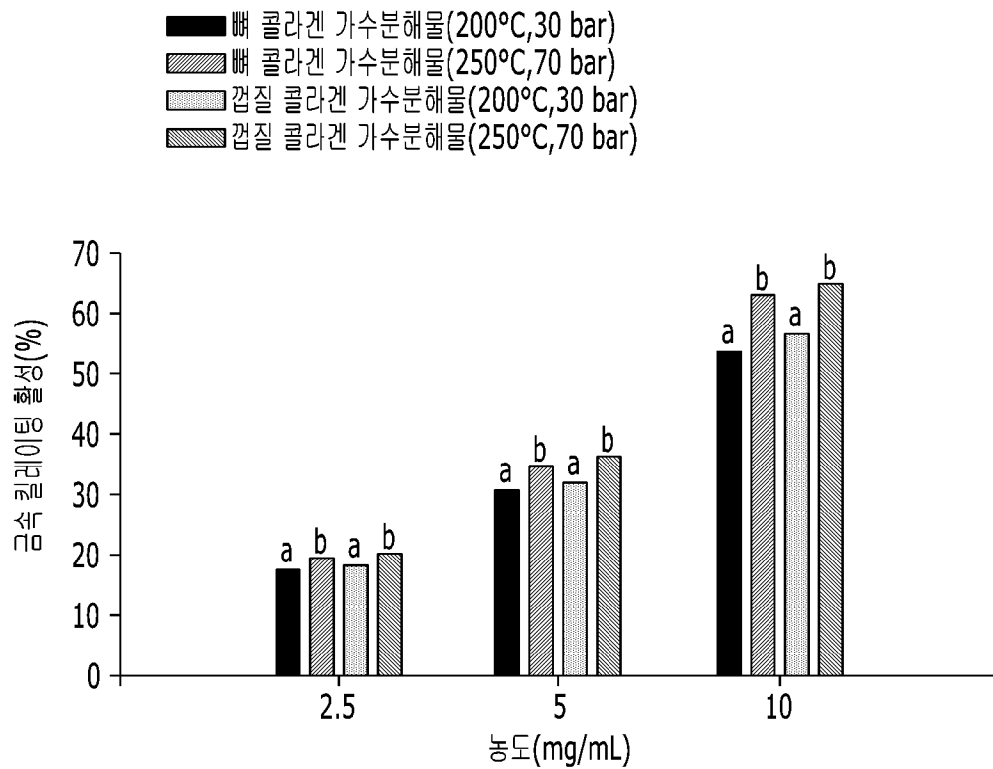
[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/002571**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12P 21/00(2006.01)i, C07K 14/78(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P 21/00; A61K 8/65; C05F 1/00; C07K 14/78; C07K 1/14; A61K 8/97; C05F 11/00; A23J 1/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: collagen, depolymerization, Scomber japonicus, Scomber japonicus, bone, peel, hot channel, high voltage, high temperature, hydrolysis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2010-0036359 A (FUJIFILM CORPORATION) 07 April 2010 See abstract and detailed description of the invention	1-8
Y	KR 10-1341704 B1 (HWANG, Jae - Ho) 16 December 2013 See the claims and detailed description of the invention	1-8
A	KR 10-2014-0015876 A (YOUNGSAN HONGEO CO., LTD.) 07 February 2014 See detailed description of the invention	1-8
A	KR 10-2004-0108147 A (R'SHYT CO., LTD.) 23 December 2004 See detailed description of the invention	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 JUNE 2015 (17.06.2015)

Date of mailing of the international search report

17 JUNE 2015 (17.06.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/002571

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2010-0036359 A	07/04/2010	CN 101686923 A	31/03/2010
		EP 2170262 A1	07/04/2010
		EP 2170262 B1	21/08/2013
		JP 05-101193 B2	19/12/2012
		JP 2009-013129 A	22/01/2009
		KR 10-2013-0042056 A	25/04/2013
		TW 200911295 A	16/03/2009
		US 2010-0330135 A1	30/12/2010
		WO 2009-008397 A1	15/01/2009
KR 10-1341704 B1	16/12/2013	KR 10-1341721 B1	16/12/2013
KR 10-2014-0015876 A	07/02/2014	KR 10-1451971 B1	10/10/2014
KR 10-2004-0108147 A	23/12/2004	KR 10-0532153 B1	23/11/2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12P 21/00(2006.01)i, C07K 14/78(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12P 21/00; A61K 8/65; C05F 1/00; C07K 14/78; C07K 1/14; A61K 8/97; C05F 11/00; A23J 1/04

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 콜라겐, 저분자화, 어류, 고등어, 뼈, 껍질, 열수, 고압, 고온, 가수분해

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2010-0036359 A (후지필름 가부시키키가이샤) 2010.04.07 요약 및 발명의 상세한 설명 참조	1-8
Y	KR 10-1341704 B1 (황재호) 2013.12.16 청구항 및 발명의 상세한 설명 참조	1-8
A	KR 10-2014-0015876 A (영산홍어(주)) 2014.02.07 발명의 상세한 설명 참조	1-8
A	KR 10-2004-0108147 A (주식회사 이제) 2004.12.23 발명의 상세한 설명 참조	1-8

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 06월 17일 (17.06.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 06월 17일 (17.06.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



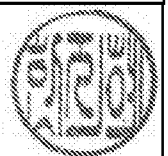
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

한지혜

전화번호 +82-42-481-3335



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2010-0036359 A	2010/04/07	CN 101686923 A	2010/03/31
		EP 2170262 A1	2010/04/07
		EP 2170262 B1	2013/08/21
		JP 05-101193 B2	2012/12/19
		JP 2009-013129 A	2009/01/22
		KR 10-2013-0042056 A	2013/04/25
		TW 200911295 A	2009/03/16
		US 2010-0330135 A1	2010/12/30
		WO 2009-008397 A1	2009/01/15
KR 10-1341704 B1	2013/12/16	KR 10-1341721 B1	2013/12/16
KR 10-2014-0015876 A	2014/02/07	KR 10-1451971 B1	2014/10/10
KR 10-2004-0108147 A	2004/12/23	KR 10-0532153 B1	2005/11/23