



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년07월19일
 (11) 등록번호 10-1640801
 (24) 등록일자 2016년07월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07K 14/78 (2006.01) A61K 8/65 (2006.01)
 C07K 14/435 (2006.01) C12P 21/06 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7017012
- (22) 출원일자(국제) 2009년08월19일
 심사청구일자 2014년07월25일
- (85) 번역문제출일자 2011년07월20일
- (65) 공개번호 10-2011-0119652
- (43) 공개일자 2011년11월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/MY2009/000122
- (87) 국제공개번호 WO 2010/074552
 국제공개일자 2010년07월01일
- (30) 우선권주장
 PI20085247 2008년12월23일 말레이시아(MY)
- (56) 선행기술조사문헌
 JP2006028138 A*
 JP2007176909 A
 JP2007332161 A
 JP2006257014 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 유니버시티 푸트라 말레이시아
 말레이시아 세랑고르 세르당 43400 유피엠
- (72) 발명자
 바카르, 자밀라
 말레이시아, 셀랑고르 다룰 옛산 43400, 세르당,
 유니버시티 푸트라 말레이시아 (유.피.엠.)
 모하메드 라잘리, 우미, 하띠나
 말레이시아, 셀랑고르 다룰 옛산 43400, 세르당,
 유니버시티 푸트라 말레이시아 (유.피.엠.)
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 특허법인주원

전체 청구항 수 : 총 11 항

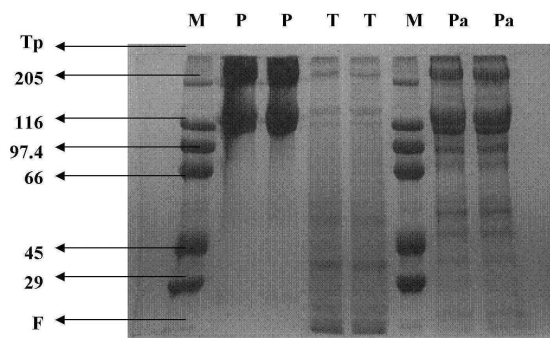
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 수생 동물로부터의 콜라겐 추출물

(57) 요약

본 발명은 콜라겐의 신규 산업적 공급원으로서 생선 껍질의 이용을 개시한다. 유리하게는, 상기 생선 껍질은 선 어(fresh fish)의 저밈(filleting) 또는 절단 후 수득되며, 상기 저밈/절단 직후 냉동되어, 세균학적 관점 및 단백질의 천연 물성 면에서 매우 양호한 품질의 기초재료(base material)를 보장한다.

대표도 - 도1



M: 분자량 마커; T: 트립신 분해된 콜라겐; Pa: 파파인 분해된 콜라겐; P: 펩신 분해된 콜라겐. Tp= 겔 상단, 및 F= 버퍼 프론트 (buffer front)

(72) 발명자

맷 하섬, 드즐키플라이

말레이시아, 쉐랑고르 다룰 옛산 43400, 세르당,
유니버시티 푸트라 말레이시아 (유.피.엠.)

쿠르니 사질리, 에이위스

말레이시아, 쉐랑고르 다룰 옛산 43400, 세르당,
유니버시티 푸트라 말레이시아 (유.피.엠.)

카우루, 할빈더

말레이시아, 쉐랑고르 다룰 옛산 43400, 세르당,
유니버시티 푸트라 말레이시아 (유.피.엠.)

루슬리 압둘 라만

말레이시아, 쉐랑고르 다룰 옛산 43400, 세르당,
유니버시티 푸트라 말레이시아 (유.피.엠.)

마드리샤 샴 바하린

말레이시아, 쉐랑고르 다룰 옛산 43400, 세르당,
유니버시티 푸트라 말레이시아 (유.피.엠.)

명세서

청구범위

청구항 1

파파인을 이용하여, *레이즈 칼카리퍼* (*Lates calcarifer*), *오레오크로미스 nilotica* (*Oreochromis nilotica*), 또는 *레이즈 칼카리퍼* (*Lates calcarifer*) 및 *오레오크로미스 nilotica* (*Oreochromis nilotica*)의 껍질로부터 콜라겐을 추출하는 것을 특징으로 하는 콜라겐 추출방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 껍질은 선어 또는 냉동생선으로부터 껍질을 절단함으로써 취득되는 것을 특징으로 하는 콜라겐의 추출방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, *레이즈 칼카리퍼* (*Lates calcarifer*) 껍질로부터, 하기 단계들을 포함하여 콜라겐을 추출하는 것을 특징으로 하는 콜라겐의 추출방법:

- a) 상기 껍질을 적어도 6시간 동안 알칼리성 용액과 혼합하는 단계;
- b) 상기 껍질을 물로 세척하여 잔류 알칼리성 용액을 제거하는 단계;
- c) 상기 껍질을 알코올에 적어도 18시간 동안 침지시키는 단계;
- d) 상기 껍질을 중성 용액으로 세척하는 단계;
- e) 상기 단계 (d)로부터의 껍질을 산성 용액으로 처리하는 단계;
- f) 상기 단계 (e)로부터의 껍질을 파파인으로 가수분해시키는 단계;
- g) 상기 단계 (f)로부터의 혼합물을 취득하고, 상기 혼합물을 적어도 24시간 동안 4℃의 작업 온도에서 교반하는 단계;
- h) 상기 단계 (g)로부터의 혼합물을 4~5℃에서 원심분리하는 단계;
- i) 콜라겐을 염화나트륨 용액에 도입시킴에 의한 콜라겐의 침전으로 콜라겐 섬유들을 침전시키는 단계;
- j) 상기 단계 (i)로부터의 콜라겐 섬유들을 채집하여, 상기 콜라겐을 적어도 60분 동안 원심분리하는 단계;
- k) 콜라겐 펠렛을 취득하는 단계;
- l) 상기 콜라겐 펠렛을 아세트산 용액에 용해시키는 단계; 및
- m) 상기 투석된 현탁액을 동결건조시키는 단계.

청구항 8

제 1항에 있어서, *오레오크로미스 닐로티카 (Oreochromis nilotica)*의 껍질로부터, 하기 단계들을 포함하여 콜라겐을 추출하는 것을 특징으로 하는 콜라겐의 추출방법:

- a) 상기 껍질을 알칼리성 용액으로 균질화시키는 단계;
- b) 상기 단계 (a)로부터의 현탁액을 수득하는 단계;
- c) 상기 현탁액을 적어도 24시간 동안 교반하는 단계;
- d) 상기 단계 (c)로부터의 현탁액을 적어도 20분 동안 원심분리하는 단계;
- e) 상기 단계 (d)로부터 침전물을 수득하는 단계;
- f) 상기 단계 (e)로부터의 침전물을 알칼리성 용액과 함께 균질화시키는 단계;
- g) 상기 단계 (f)로부터의 침전물을 적어도 24시간 그리고 적어도 3회 반복하여 교반시키는 단계;
- h) 상기 침전물을 물 및 아세트산 용액으로 세척하는 단계;
- i) 상기 단계 (h)로부터의 침전물을, 적어도 24시간 동안 5℃의 작업 온도에서 과파인과 함께 교반시키는 단계;
- j) 상기 단계 (i)로부터의 혼합물을 수득하는 단계;
- k) 상기 단계 (j)로부터의 혼합물을 적어도 20분 동안 원심분리하는 단계;
- l) 상기 단계 (k)로부터 콜라겐 섬유들을 수득하는 단계;
- m) 상기 콜라겐을 염화나트륨 용액 내로 도입하는 단계;
- n) 상기 단계 (m)으로부터 콜라겐 섬유들을 채집하고, 상기 콜라겐을 적어도 20분 동안 원심분리하는 단계;
- o) 콜라겐 펠릿을 수득하는 단계; 및
- p) 상기 투석된 현탁액을 동결건조하는 단계.

청구항 9

제 7항 또는 제 8항에 있어서, 상기 껍질로부터 수득된 콜라겐은 14중량% 내지 40중량%의 작업 수율 백분율을 갖는 것을 특징으로 하는 콜라겐의 추출방법.

청구항 10

제 7항 또는 제 8항의 방법으로 추출된 콜라겐의 아미노산 분석, 펩티드 분석, 및 콜라겐 유형 분석을 포함하는 것을 특징으로 하는 콜라겐의 분석방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 아미노산이 글리신, 프롤린, 알라닌 및 아르기닌을 포함하는 것을 특징으로 하는 콜라겐의 분석방법.

청구항 12

제 10항에 있어서, 상기 콜라겐 중 펩티드의 SDS-PAGE로 측정된 분자량은 37 내지 205 킬로달톤(KDa)인 것을 특징으로 하는 콜라겐의 분석방법.

청구항 13

제 10항에 있어서, 상기 콜라겐 유형은 제 1형 콜라겐인 것을 특징으로 하는 콜라겐의 분석방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

제 1항 또는 제 6항 내지 제 8항 중 어느 한 항의 방법에 따라 추출한 것을 특징으로 하는, 크림, 로션, 아이크림, 연고 또는 겔, 일광차단제, 경구 투여제, 얼굴 마스크 크림, 소염제, 및 진정제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 화장품 제조용 콜라겐.

청구항 16

제 1항 또는 제 6항 내지 제 8항 중 어느 한 항의 방법에 따라 추출한 것을 특징으로 하는, 음료, 유제품, 과자류, 초콜렛 및 기능성 식품으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 식품 제조용 콜라겐.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생선으로부터 수득된 콜라겐 및 그러한 생선 콜라겐의 제조방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 생선 껍질(skin)로부터 수득가능한 콜라겐 및 그의 추출 및 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 쓸모없거나, 용도가 개발되지 않은 것으로 여겨지는, 다량의 생선 폐기 부분들은 버려져왔다. 이는, 현대 사회에서, 이러한 쓸모없어 보이는 생선 부분들을 많은 적용가능한 분야에서 사용하기 위한 여러 방법들을 발견하기 위해 언급되어야만 할 주요 문제들 중 하나이다. 포유동물로부터 수득되고, 식용 재료로서 널리 이용가능한 콜라겐을 고려하여, 생선 콜라겐에 대한, 특히 콜라겐이 조직의 주성분인 연어 및 송어 껍질에 대한 연구가 이루어지고 있다. 이에 따라, 최근 몇년간, 관심 대상인 연어 및 송어의 껍질을 포함한, 생선 껍질들로부터 콜라겐을 추출 및 생산하는 여러 방법들이 제안되어 왔다.

[0003] 그러나, 생선 껍질 콜라겐은 포유동물 콜라겐으로부터의 특성면에서 상이하고, 껍질의 보다 민감한 기질(matrix)로 인하여 비교적 강하지 않은(less harsh) 처리를 필요로 한다. 콜라겐 제품들은 각종 산업들에서 수많은 적용들을 갖는다. 그러한 한 적용에서, 콜라겐 분말들은, 예로서 맥주 및 와인과 같은 휴대가능한 주류를 청정화하기 위한 청정화 또는 침전 공정들에서 사용된다. 주류의 발효 동안, 효모 및 단백질들과 같은 각종 미립자 물질들이 그 주류에 현탁되므로, 제거될 필요가 있다. 콜라겐 정제(finings)는, 현탁된 물질들의 침전을 보조하므로써, 상기 주류에 첨가되어 상기 주류를 청정화시킨다. 콜라겐 및 젤라틴은 주스 청정화 공정에도 사용될 수 있다.

[0004] 콜라겐은 일반적으로 생선 부레풀(isinglass)로부터 제조되는데, 이는 생선의 건조된 부레로부터 제조되는 콜라겐의 매우 순수한 공급원을 구성한다. 동물 및 한류성 생선의 껍질을 포함하는 생선 껍질들로부터의 콜라겐 추출에 대한 많은 연구들이 이루어져 왔다 (US 4,295,894, US 5,698,228, US5, 162,506, US 5,420,248, JP 4037679, JP 9-278639, JP 2-291814, PL 312122, RU 2139937). 상기 알려진 콜라겐 추출 공정은 광범위한 화학적 및 기계적 추출 또는 이들의 조합을 포함한다. 이들 공정들에 의해 수득된 콜라겐 생성물들의 성질은 넓은 범위에서 다양하다. 생선 껍질에 적용되는 많은 추출 공정들은, 포유동물 콜라겐 추출 기술들의 적합화 및 변경들이다. 본 출원인들은, 포유동물 콜라겐 추출에 적용되는 많은 가공 단계들의 경우 그 처리가 생선 껍질 기질에 대해서는 상당히 가혹하거나 너무 강할 수 있기 때문에, 생선 껍질 콜라겐 추출에 직접 적용가능하지 않다는 것을 확인하였다. 그러한 단계들은 다른 것들 중, 화학물질 세척 및 강산 또는 강알칼리를 이용한 추출, 과도한 여과 및 디켄테이션(decantation) 단계들을 포함한다. 이러한 단계들 중 많은 단계들을 없앤 단순화된 추출 공정이, 수율 증가 및 추출된 콜라겐의 변성 감소에 바람직할 것이다.

[0005] 대부분의 콜라겐들의 불용성 성질로 인하여, 콜라겐은 정량하기 어렵고 값비싼 단백질로서 인식되고 있다. 아직까지 용해도는 건강관리 제품들과 같은 각종 적용들에서 중요한 주요 기능성 성질이다. 본 출원인들은, 천연 콜라겐 분자구조(conformation)가 분자 기능성을 결정하고, 변성시 젤라틴의 임의 코일된 분자구조로 변이하여 정제능에서의 현저한 손실을 일으키는 결과를 초래한다는 것도 확인하였다. 헤이크(hake)(머루시우스 머루시우스 *L.: Merluccius merluccius L.*), 황돔(덴텍스 투미폼스: *Dentex tumiforms*), 자주복(타키푸구 러브라이프스: *Takifugu rubripes*), 잉어(사이프루무스 카르피오: *Cyprinus carpio*); 오징어(일렉스 아르젠티누스: *Illex argentinus*) (일로나 콜로지에즈스카: *Ilona Kolodziejska*, 1999); 및 해파리(로펠레마 아사무시:

Rhopilema asamushi) (Takeshi Nagai 등, 2000)과 같은 몇몇 어류종들로부터 콜라겐이 추출되는 것도 보고되어 왔다. 보고된 모든 절차들은 비효소적 추출이 이용되고, 효소 반응이 사용되는 경우 펩신이 가장 일반적인 효소로, 매우 유사하였다.

[0006] 대안으로서, 콜라겐 및 젤라틴 제조를 위한 생선 가공으로부터의 부산물들의 이용은, 수생 종들의 다양성 및 보다 안정하고 보존이 편리한 포유동물들로부터의 것들에 비해 이들 콜라겐의 열화에 대한 보다 높은 민감성이라는 몇가지 문제들을 야기한다(Fernandez-Diaz 등, 2003). 또한, 생선의 내장제거 및 저림(filleting) 후, 껍질들은 나머지 폐기물과 함께 보관되어, 이들은 자연적인, 빠른 효소적 및 세균적 손상을 받아, 추출된 콜라겐 및 젤라틴들의 품질변화를 초래할 수 있다. 수생 동물들에서의 효소 활성은 육상 동물들보다 더 높은 것으로 알려져 있다.

[0007] 콜라겐은 몇몇 다형성 형태들(polymorphic forms)로 존재하며, 제 I, III 및 V 형이 일반적이고; 제 II형 및 IV형은 흔하지 않으며, 보고된 특성의 콜라겐들에서만 발견될 수 있다(Foegeding 등, 2001). 콜라겐들 및 이들의 변성 형태들, 젤라틴들은, 펩티드 결합에 의해 연결된 아미노산들의 긴 사슬들로 구성된다(Ockerman and Hansen, 1988; Ward and Courts, 1977). 상기 사슬들간의 화학적 공유결합들의 수 및 유형은 동물의 연령에 따라 변경되며, 보다 어린 동물에서 그 수가 더 적다. 이는 결과의 젤라틴 및 풀(glue)의 분자적 성질에 영향을 미친다(Ockerman and Hansen, 1988). 생선 콜라겐들은 일반적으로, 포유동물의 콜라겐보다 더욱 낮은 아미노산 함량을 가지며, 이는 보다 낮은 변성 온도에 대한 이유가 될 수 있을 것이다(Grossman and Bergman, 1992, Jamilah and Harvinder, 2002). 이는 결국 그 종들의 체온에 관련되는 것으로 보인다(Johns, 1977). 각종의 약 적용들, 예컨대 임플란트(implants), 장기 이식, 기관 대체, 조직 균등물, 유리질 대체, 성형 및 미용 수술, 외과 봉합사, 상처, 화상에 대한 외과적 드레싱(dressings) 등에 대해 매력적인 성분이 되도록 하는 많은 성질들이 콜라겐에 있다.(예로서, U.S. Pat. Nos. 5,106,949, 5,104,660, 5,081,106, 5,383,930, 4,485,095, 4,485,097, 4,539,716, 4,546,500, 4,409,332, 4,604,346, 4,835,102, 4,837,379, 3,800,792, 3,491,760, 3,113,568, 3,471,598, 2,202,566, 및 3,157,524 참조, 이들 모두는 본 명세서에 참고문헌으로서 통합된다; Prudden, Arch. Surg. 89:1046-1059 [1964]; 및 Peacock 등, Ann. Surg., 161:238~247 [1965]). 예로서, 콜라겐은 그 자체로는 비교적 약한 면역원으로, 이는 적어도 부분적으로는 콜라겐 구조 내에 잠재적인 항원 결정인자들의 마스킹으로 인한 것이다. 또한, 콜라겐은 그의 나선 구조로 인하여 단백질 분해에 대해 저항성이다. 또한, 이는 세포 부착에 대한 천연 물질이며, 근골격계의 주요한 내인장부하(tensile load-bearing) 성분이다. 따라서, 의학 및 수의학 적용에서의 용도에 적당한 콜라겐 섬유들 및 막들의 생산을 위한 광범위한 노력들이 이루어져 왔다. 콜라겐은 최근에는 음료 제제들(인스턴트 및 전통적인 음료 제제 모두에서) 내에 활발하게 통합되어 왔다.

발명의 내용

[0008] **발명의 개요**

[0009] 본 발명은 콜라겐(제 1형 콜라겐) 추출 방법에 관한 것으로, 여기에서 콜라겐은 수생 동물(바람직하게는 큰입선농어(*레이즈 칼카리퍼*: *Lates calcarifer*) 및 *오레오크로미스 닐로티카(Oreochromis nilotica)*)의 껍질로부터 수득된다. 콜라겐은 효소를 이용하여 생선 껍질로부터 추출되며, 그에 사용되는 효소는 파파인이다. 또한, 상기 공정은 본질적으로 생선 껍질로 이루어지는 출발 물질을 포함하고, 상기 생선 껍질로부터 콜라겐을 추출하고, 콜라겐을 회수하는 것을 포함한다. 상기 껍질은 선어 또는 냉동생선으로부터 껍질을 제거하므로써 수득된다. 또한, 상기 공정은 하기 단계들을 더 포함한다: 큰입선농어(바라문디: barramundi)의 껍질로부터 콜라겐을 추출하는 단계로, 이는 하기 단계들을 포함한다: 상기 껍질을 적어도 6시간 동안 알칼리성 용액(예컨대 나트륨)과 혼합하는 단계; 상기 껍질을 물로 세척하여 잔류 알칼리성 용액을 제거하는 단계; 상기 껍질을 알코올 용액(예컨대 부틸 알코올)에 적어도 18시간 동안 침지시키는 단계; 상기 껍질을 중성 용액으로 세척하는 단계; 상기 껍질을 산성 용액으로 처리하는 단계; 상기 껍질을 파파인으로 가수분해시키는 단계; 상기 혼합물을 수득하고, 혼합물을 적어도 24시간 동안 4°C의 작업 온도에서 교반하는 단계; 상기 혼합물을 4~5°C에서 원심분리하는 단계; 콜라겐을 염화나트륨 용액에 도입시킴에 의한 콜라겐의 침전으로 콜라겐 섬유들을 침전시키는 단계; 상기 콜라겐 섬유들을 채집하여, 그 콜라겐을 적어도 60분 동안 원심분리하여 콜라겐 펠렛을 수득하는 단계; 및 상기 콜라겐 펠렛을 아세트산 용액에 용해 및/또는 투석된 현탁액을 동결건조시키는 단계.

[0010] 추가적으로, *오레오크로미스 닐로티카* (적색 틸라피아: red tilapia) 껍질로부터의 콜라겐 추출방법은 하기 단계들을 더 포함한다; 상기 생선 껍질을 나트륨과 같은 알칼리성 용액을 이용하여 균질화하는 단계; 현탁액을 수득하고 상기 현탁액을 적어도 24시간 동안 교반하는 단계; 상기 현탁액을 적어도 20분 동안 원심분리하는 단계;

침전물을 수득하는 단계; 상기 침전물을 알칼리성 용액으로 균질화시키는 단계; 상기 침전물을 적어도 24시간 동안 적어도 3번 반복하여 교반하는 단계; 상기 침전물을 물 및 아세트산 용액으로 세척하는 단계; 상기 침전물을 파파인과 함께 작업온도 4~5℃에서 적어도 24시간 동안 교반하는 단계; 혼합물을 수득하는 단계; 혼합물을 적어도 20분 동안 원심분리하는 단계; 콜라겐 섬유들을 수득하는 단계; 콜라겐을 염화나트륨 용액 내로 도입시키는 단계; 콜라겐 섬유들을 채집하고, 이 콜라겐을 적어도 20분 동안 원심분리하는 단계; 그 결과 콜라겐 펠렛을 수득하는 단계; 및 투석된 현탁액을 동결건조시키는 단계.

[0011] 콜라겐은, 큰입선농어 및 *오레오크로미스 닐로티카*의 껍질(들)로부터, 습윤 중량으로 14 내지 40중량%의 작업 수율로 수득된다. 추출된 콜라겐의 성질들의 특성화는 하기 분석들에 의하였다: 아미노산 분석, 콜라겐 중 펩티드 및 콜라겐 유형. 수득된 아미노산은 글리신, 프롤린, 알라닌 및 아르기닌을 포함한다. 수득된 펩티드는 37 내지 205 킬로달톤(kDa)의 겔보기 분자량 분포를 가졌다.

[0012] 추가적으로, 본 발명은 약학 조성물, 화장품 또는 국소 제제 또는 식품(들) 제조를 위한 콜라겐의 용도에도 관한 것이다. 상기 화장품은 크림, 아이크림, 로션, 연고 또는 겔, 일광차단제(sun-screen), 경구 투여제, 얼굴 마스크 크림, 소염제 및/또는 진정제를 포함한다. 상기 식품(들)은 음료, 유제품, 과자류, 초콜렛 및 성분으로서 또는 임의의 기능성을 위해 식품 제형(들)에서의 임의의 적용을 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 적색 틸라피아 껍질로부터의 콜라겐의 SDS-PAGE 패턴을 나타낸다.
- 도 2는 상이한 효소 추출 및 저장 연구에 의한 적색 틸라피아 껍질로부터의 콜라겐의 SDS-PAGE 패턴을 나타낸다.
- 도 3은 송아지 피부로부터의 제 1형 콜라겐에 비하여, 바라문디로부터의 콜라겐 샘플들의 엘렉트로포레이션(electrophoretic) 패턴을 나타낸다.
- 도 4는 적색 틸라피아 껍질로부터의 콜라겐 샘플의 에너지 분산 X-선(EDX) 크로마토그램을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 수생 동물로부터의 콜라겐 제조방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 생의학 및 약학 적용; 및 식품 적용을 위한 원료로서 적당한 콜라겐의 제조방법을 제공한다.

[0015] 정의

[0016] 크림은 약학 및 의약화장품(cosmesceutical) 조성물 분야에서 공지이며, 점성이 있는 액체 및 유중수(oil-in-water) 또는 수중유(water-in-oil) 반고체 에멀션이다. 크림 베이스들(bases)은 물에 세척가능하며, 오일상, 유화제, 및 수상을 포함한다. 수상은 대개 부피 면에서 오일상보다 많으며, 일반적으로 일정성분(substance)을 함유한다. 유화제는 일반적으로 비이온성, 음이온성, 양이온성 또는 양쪽성 계면활성제인 크림 조성물이다.

[0017] 크림, 로션, 겔, 에멀션 및 페이스트 등은 환부표면에 퍼발라서 부드럽게 마찰될 수 있다. 용액은 면봉 등의 계량 도구를 이용하여, 환부에 조심스럽게 적용될 수 있다.

[0018] 달리 언급되지 않는 한, 양은, 각 제제들의 총 중량을 기준으로 중량%이다.

[0019] 본 발명은 콜라겐의 신규한 산업 공급원으로서 생선 껍질의 이용에 관한 것이다. 유리하게는, 상기 껍질은 선어의 저밈(filleting) 또는 절단 후 수득되고, 저밈/절단 직후 냉동되어, 세균학적 및 단백질의 천연 성질 면에서, 기본 물질의 양호한 품질을 보장한다.

[0020] 실시예

[0021] 재료

[0022] 적색 틸라피아(*오레오크로미스 닐로티카*)는 Ulu Langat, Selangor 지역의 어류양식장으로부터 수득된 양식된 민물고기이다. 상기 적색 틸라피아는 500g 내지 600g의 중량이었다. 실험실에 도착시, 생선을 잡고 저며서, 껍질을 수작업으로 제거하였다. 껍질을 사용할 때까지 -20℃에서 저장하였다.

[0023] 화학물질들

[0024] 3460유닛/mg 단백질의 표기된(declared) 활성을 갖는 펩신(결정화 및 동결건조됨, EC 3.4.23.1, 돼지 위 점막으로부터 수득됨)을 Sigma Chemical 사로부터 수득하였다. 40U/mg 단백질의 표기된 활성을 갖는 트립신(결정화 및 동결건조됨, EC 3.4.21.4 돼지 췌장효소로부터 수득됨) 및 30000USP-U/mg의 표기된 활성을 갖는 파파인(건조분말, EC 3.4.22.2, 카리카 파파야(*Carica papaya*))를 Merck(USA)사로부터 수득하였다. 모든 기타 화학물질들은 분석등급으로 사용하였다.

[0025] **발명의 실시를 위한 최선의 모드**

[0026] **추출**

[0027] 적색 틸라피아 껍질의 저장 연구도 수행하여 콜라겐 특성에 대한 동결 저장의 효과를 결정하였다. 껍질을 동결된 상태로 8주까지 저장하고, 2주 간격으로 처리하였다. 가위를 이용하여 생선 껍질들을 작은 조각들로 자르고 과다량의 물 중에서 철저히 행구어 불필요한 물질을 제거하였다. 이들을 10 부피의 0.1M NaOH와 함께 균질화하여 비콜라겐성 단백질을 제거하고, 콜라겐에 대한 내생의 단백분해효소의 영향을 방지하였다(Sato 등, 1987). 현탁액을 하룻밤동안 교반하고, 10000xg에서 20분 동안 원심분리하였다. 결과의 침전물을 20부피의 0.1M NaOH로 재균질화하고 하룻밤동안 느리게 교반하였다. 이 절차를 3 또는 4회 반복하였다. 알칼리 추출 후 잔류물을 조심스럽게 그리고 부드럽게 증류수로 세척한 후, 0.5M 아세트산 중에 현탁시켰다.

[0028] 그 후 현탁액을, 1/1000(w/w)의 효소/기질 비율로 5℃에서 24시간 동안 효소와 함께 교반하였다. 사용된 효소들은 펩신, 트립신 및 파파인이었다. 그 후 현탁액을 10000xg에서 20분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 수득된 결과의 상등액 중의 콜라겐에 NaCl을 첨가하므로써 염 석출하여(salted out) 2.0M의 최종 농도로 만들었다. 10000xg에서 20분 동안 원심분리한 후, 결과의 침전물을 동결건조시켰다.

[0029] **분석**

[0030] 콜라겐 수율(% w/w)

[0031] 사용된 습윤상태(wet) 껍질의 중량에 대해 추출된 콜라겐의 중량에 의하여, 수율을 결정하였다. 수율은 다음과 같이 계산된다:

[0032] 수율(% w/w) = $\frac{\text{콜라겐 (건조 중량)}}{\text{생선 껍질(습윤상태 중량)}} \times 100\%$

[0033]

[0034] **색상의 시각적 및 기기적 관찰**

[0035] 색상 및 조직에 대한 시각적 관찰도 기록하였다. 색상 측정은 헌터랩 울트라스캔 구형 색차계(Hunterlab Ultrascan Sphere Spectrocolorimeter: Minolta Cr-300 시리즈 모델)를 이용하여 실시하였다. 샘플들을 투명한 비닐에 넣은 후, 판독(reading) 하였다. 판독은 삼회중복하여 실시하였다.

[0036] 적색 틸라피아 껍질(*오레오크로미스 닐로티카*)로부터 수득된 건조 콜라겐의 수율을 표 1에 나타내었다. 수율은 습윤상태 중량 껍질에 대하여 콜라겐의 건조중량에 기초하여 계산하였다. 이들 수율은 농어(Japanese-seabass)(55.4%), 고등어(49.8%) 및 팽이상어(50.1%)에 대한 Takeshi와 Nobutaka(2000)에 의해 보고된 수율 정도의 범위이다. Nagai 등(2000)은 라이조스토무스 해파리(rhizostomous jellyfish)로부터 추출된 콜라겐의 건조 중량 기준으로 35.2%의 수율을 보고하였다. 펩신-분해된 추출물 0주 저장 콜라겐은 가장 높은 수율 74.77±11.36% , 이어서 펩신-분해된 추출물 4주 저장물의 63.62±6.05%, 및 펩신-분해된 추출물 8주 저장물의 62.98±2.37%를 기록하였다. 최저 수율은 트립신-분해된 추출물 0주 저장물로, 31.59±5.95%로 기록되었다.

[0037] 저장 연구에서, 0-주 저장은 74.77%의 최고 수율을 제공하였으며, 이어서 4-주 저장(63.62%) 및 8-주 저장 62.98%가 제공되었다. 최저 수율은 2-주 저장물에 의해 기록되었다(37.66%). 이러한 보다 낮은 수율은 일련의 세척 단계들 동안의 침출(leaching)을 통하여 추출된 콜라겐의 손실로 인한 것일 수 있다. 따라서, 콜라겐의 보다 낮은 농도가 추출되었다. 보다 낮은 수율에 대한 또다른 가능한 이유는 콜라겐의 불완전한 가수분해로 인한 것일 수 있다. 추출 시간 및 온도의 조합은 콜라겐의 완전한 가수분해를 가능케하는데 충분하지 않을 수 있다. 틸라피아 껍질의 단백질 조성도 수득된 콜라겐의 수율에 영향을 미칠 수 있다.

표 1

[0038]

적색 틸라피아 껍질로부터의 콜라겐 샘플의 수율(%) 및 단백질 함량(%)

콜라겐 샘플	콜라겐 샘플들로부터의 수율 및 단백질 함량	
	수율(%)	단백질 함량(%)
파파인-분해	40.15 ± 4.55 ^{CD}	25.83 ± 1.01 ^B
트립신-분해	31.59 ± 8.41 ^D	30.15 ± 0.83 ^A
웹신-0-주	74.77 ± 16.07 ^A	14.24 ± 1.26 ^E
웹신-2-주	37.66 ± 7.58 ^{CD}	26.29 ± 0.40 ^B
웹신-4-주	63.62 ± 6.05 ^{AB}	15.65 ± 2.96 ^E
웹신-6-주	51.51 ± 7.81 ^{BCD}	20.09 ± 0.59 ^D
웹신-8-주	62.98 ± 2.37 ^{AB}	24.68 ± 0.40 ^B

[0039]

값들은 3회 반복값들의 평균±표준편차이다. 각 컬럼 내의 동일 첨자들을 갖는 평균들은 현저한 유의차를 나타내지 않는다(p<0.05).

[0040]

단백질 함량

[0041]

단백질 함량은 마이크로-케달법(micro-Kjedhal)(AOAC, 1995)에 의해 측정하고, 5.3의 질소 전환인자를 사용하였다. 콜라겐의 완전한 가수분해를 보장하기 위하여 농축 황산을 이용하여 단백질 분해를 수행하였다. 분석들은 3회 반복하여 실시하였다. 트립신-분해된 콜라겐의 단백질 함량은 웹신-분해된 콜라겐의 단백질 함량의 2배였다; 각각 30.15% 및 14.24%. 파파인-분해된 콜라겐은 트립신-분해된 콜라겐보다 낮은, 25.83%의 단백질 함량을 갖는다. 저장 연구에서, 0-주 저장 및 4-주 저장물이 최저 단백질 함량(<15%)을 갖는 반면, 2-주 저장물은 26.29%의 최고 단백질 함량을 가졌다.

[0042]

색상의 시각적 및 기기적 관찰

[0043]

시각적 관찰은 표 2에 나타낸 바와 같다. 파파인 분해된 콜라겐을 제외하고, 모든 샘플들은 눈같은 백색으로, 가벼운 질감이었다(light-textured). 그러나, 파파인 분해된 콜라겐은 외관이 밝은 황색이고, 가벼운 질감이었다. 플레이트 1 및 2는 각각 다른 효소들 및 저장 연구에 의해 추출된 콜라겐 샘플들을 나타낸다.

표 2

[0044]

다른 효소들 및 저장 연구에 의해 추출된 적색 틸라피아 껍질 콜라겐의 시각적 관찰

콜라겐 샘플들	외관
트립신 분해	눈같은 백색 및 가벼운 질감
파파인 분해	밝은 황색 및 가벼운 질감
웹신 0-주	눈같은 백색 및 가벼운 질감
웹신 2-주	눈같은 백색 및 가벼운 질감
웹신 4-주	눈같은 백색 및 가벼운 질감
웹신 6-주	눈같은 백색 및 가벼운 질감
웹신 8-주	눈같은 백색 및 가벼운 질감

[0045]

표 3은 상이한 효소들 및 저장 연구에 의해 추출된 콜라겐의 헌터(Hunter) 값들을 나타낸다. L*, a* 및 b* 값들은 모든 콜라겐 샘플들에서 상당히 유사하였다. L* 값은 명도를 나타내는 것으로, 모든 샘플들에서 >93이었다. 이는 다른 효소들에 의해 추출되고 저장 연구된 모든 샘플들의 색상이 백색이고, 이는 시각적 관찰에 대응됨을 나타낸다. 음의 a* 값들도(-a) 모든 샘플들에서 약간 적색조를 나타내는 반면, 보다 높은 b* 값은 더욱 황색조를 나타낸다. 그러나, 파파인 분해된 콜라겐 샘플은 최고 b* 값을 가지므로, 따라서 외관에서 더욱 황색을 띤다. 나아가, 표 3은 모든 샘플들의 L* 값이 >95 임을 예시하며, 이는 더욱 백색 샘플을 나타낸다. 그러나, 웹신 6-주 콜라겐 샘플의 b* 값은 다른 샘플들에 비해 가장 낮았다. 그럼에도 불구하고, 저장 연구에서 모든

샘플들에 대한 상기 L*, a* 및 b* 값들은 거의 비슷하고, 큰 차이가 관찰되지 않아 샘플들의 시각적 외관에 대응된다. 콜라겐 색상은 원료에 따라 달라진다. 그러나, 이는 기타 기능적 성질에 영향을 미치지 않는다 (Ockerman과 Hansen, 1988).

표 3

다른 효소 추출 및 저장 기간의 영향에 따른 콜라겐 샘플들의 기기적 색상

콜라겐 샘플	기기적 색상		
	L	a	b
트립신-분해	95.62 ± 0.07 ^{BC}	-1.10 ± 0.04 ^{EF}	6.38 ± 0.49 ^{BC}
파파인-분해	94.63 ± 0.30 ^D	-0.65 ± 0.04 ^B	7.24 ± 0.37 ^A
웹신-0-주	95.70 ± 0.67 ^{BC}	-0.49 ± 0.09 ^A	6.77 ± 0.82 ^{AB}
웹신-2-주	95.85 ± 0.10 ^{BC}	-1.01 ± 0.02 ^E	5.06 ± 0.25 ^{DE}
웹신-4-주	97.23 ± 0.10 ^A	-0.80 ± 0.04 ^C	5.15 ± 0.15 ^{DE}
웹신-6-주	96.89 ± 0.16 ^A	-0.62 ± 0.06 ^B	4.47 ± 0.08 ^E
웹신-8-주	95.94 ± 0.27 ^B	-0.90 ± 0.07 ^D	5.73 ± 0.40 ^{CD}

값들은 3회 반복값들의 평균±표준편차이다.

각 열 내의 동일 첨자들을 갖는 평균들은 현저한 유의차를 나타내지 않는다(p<0.05).

표 4

표 4는 바라문디 껍질로부터의 콜라겐의 물리화학적 성질들을 나타낸다

성질	대조구	웹신-추출됨	파파인-추출됨
수율 (%)	2.8	14.0	14.1
단백질 함량 (%)	68.72±0.95	92.82±2.68	111.16±1.05
수분 함량 (%)	18.46±1.23	18.55±0.67	16.05±0.31
헨터 색 값			
'L'	65.41±0.08	61.33±0.04	44.76±0.02
'a'	0.14±0.01	2.59±0.02	0.74±0.02
'b'	3.16±0.03	5.35±0.04	2.14±0.04

아미노산 조성

콜라겐 중의 아미노산 조성을, Waters-Pico Tag 아미노산 분석기 고성능 액체 크로마토그래피, 모델명 Waters 501 Millipore Corporation, USA에서 3.9×150 mm의 컬럼 크기를 이용하여 측정하였다. 각 샘플은 110℃에서 24시간 동안 6N HCl로 가수분해시켰다. 가수분해는 Waters-501 Instruments Manual (1991)에서 권장된 바에 따라 Waters 자동분석기에서 이들의 자유 아미노산 함량에 대해 분석하였다. 표 5는, 상이한 효소 추출 및 저장 기간들로 인한, 적색 틸라피아 껍질들로부터의 콜라겐의 아미노산 조성을 나타낸다. 아미노산 프로파일을 아미노산 가수분해물로부터 얻었다. 트립신 및 파파인-분해된 콜라겐의 아미노산 함량은 웹신-분해된 콜라겐에 비해 높았다. 파파인 및 트립신-분해된 콜라겐의 아미노산 프로파일은 유의차가 없었다(p< 0.05).

표 5

생선 콜라겐의 다양한 공급원에서 아미노산 조성

아미노산	아미노산 함량 (mg/g 샘플)			
	적색 틸라피아 ^a	고등어 ^b	황돔 ^b	자주복 ^b

Asp	4.5 ± 0.2	42.9 ± 1.4	40.7 ± 0.9	44.6 ± 0.4
Glu	11.0 ± 0.1	72.5 ± 0.6	72.6 ± 1.2	68.0 ± 0.3
Ser	11.9 ± 0.4	35.8 ± 0.2	41.2 ± 0.6	42.9 ± 0.4
Gly	71.9 ± 0.3	361.5 ± 0.3	351.3 ± 2.0	349.9 ± 2.1
His	ND	4.4 ± 0.0	3.8 ± 0.2	3.6 ± 0.1
Arg	35.6 ± 0.8	53.0 ± 0.4	52.0 ± 1.3	52.7 ± 0.1
Thr	10.8 ± 0.1	30.1 ± 0.4	29.8 ± 0.5	29.1 ± 0.5
Ala	37.3 ± 0.4	120.6 ± 0.7	124.7 ± 1.2	117.5 ± 1.6
Pro	55.8 ± 0.9	115.2 ± 2.2	110.7 ± 0.4	112.5 ± 0.3
Tyr	3.2 ± 0.4	1.5 ± 0.1	2.0 ± 0.0	1.6 ± 0.1
Val	8.0 ± 0.0	16.1 ± 0.4	16.3 ± 0.3	21.7 ± 0.0
Met	6.0 ± 1.1	10.1 ± 0.9	11.4 ± 2.0	14.0 ± 0.2
Cys	ND	ND	ND	ND
Ile	5.1 ± 0.1	8.2 ± 0.2	6.9 ± 0.1	7.4 ± 0.0
Leu	11.4 ± 0.2	18.7 ± 0.1	17.0 ± 0.7	15.4 ± 0.2
Phe	6.5 ± 4.9	11.2 ± 0.0	12.2 ± 0.5	12.3 ± 0.1
Lys	10.9 ± 0.7	23.7 ± 0.9	25.6 ± 1.3	29.0 ± 1.8
총계	289.9	925.5	918.2	922.2

[0053] ND - 검출되지 않음

[0054] ^a - 트립신 분해 콜라겐 결과

[0055] ^b - 제공 Yata 등 (2001)

[0056] 총 아미노산 함량은 4주째로부터 8주째 저장까지 서서히 증가된다. 글리신 및 프롤린은 주요 아미노산으로, 각각의 콜라겐 샘플들의 총 아미노산 함량의 1/4 및 1/5을 구성한다. 이러한 특징은 다른 단백질들로부터의 콜라겐과 구분된다. 트립신 분해된(55.81) 및 파파인-분해된(51.54) 콜라겐들 모두에서의 프롤린 함량은 펩신-분해된 0주 저장물(25.95)보다 두배였다. 그러나, 본 발명에서 히드록시프롤린 함량은 측정될 수 없었다. 이들 조성물들은 고등어, 황돔 및 자주복으로부터 보고된 것과는 상이하다.

표 6

[0057] 표 6은 *바라문디* 껍질로부터의 콜라겐의 아미노산 조성을 나타낸다

아미노산 (g/100g)	대조구	펩신-추출	파파인-추출
아스파르트산	3.797 ± 0.14	4.075 ± 0.19	4.038 ± 0.05
세린	1.927 ± 0.07	1.989 ± 0.09	2.30 ± 0.03
글루탐산	6.847 ± 0.25	7.061 ± 0.35	7.256 ± 0.10
글리신	14.992 ± 0.56	15.539 ± 0.76	19.208 ± 0.31
히스티딘	1.449 ± 0.04	1.298 ± 0.02	검출되지 않음
아르기닌	5.943 ± 0.07	6.38 ± 0.06	8.316 ± 0.08
트레오닌	2.066 ± 0.05	2.171 ± 0.02	2.485 ± 0.02
알라닌	6.996 ± 0.27	6.865 ± 0.20	8.890 ± 0.12
프롤린	7.887 ± 0.21	7.543 ± 0.18	12.772 ± 0.07
시스테인	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
티로신	0.258 ± 0.01	0.4925 ± 0.03	0.298 ± 0.01
발린	1.739 ± 0.07	1.8715 ± 0.09	2.080 ± 0.03
메티오닌	1.299 ± 0.06	1.345 ± 0.06	1.676 ± 0.48
리신	2.561 ± 0.09	2.872 ± 0.14	2.338 ± 0.01
이소류신	0.903 ± 0.04	1.063 ± 0.05	1.135 ± 0.02
류신	1.664 ± 0.07	1.931 ± 0.09	2.229 ± 0.03
페닐알라닌	1.436 ± 0.09	1.369 ± 0.15	1.898 ± 0.02
총계	61.40	63.862	76.919

[0058] 분자량 측정

[0059] 분자량을 SDS-PAGE로 측정하고(Laemmli, 1970), 작동은 0.1% SDS를 포함하는 5% T 겔 중에서 하였다. 분자량 마커 SDS-6H(Sigma)를 표준물질로서 사용하였다. 샘플들(4~50 μ g/웰)을 겔에 적용하고, 겔을 쿠마씨 브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue) R-250를 이용하여 단백질에 대해 염색하였다. 도 1 및 도 2는 각각 다른 효소들 및 저장 기간을 이용하여 추출된 적색 킬라피아로부터의 껍질로부터의 콜라겐의 SDS-PAGE 패턴을 나타낸다. 트립신, 파파인 및 펩신-분해된 추출물에 대해 각각 시각적으로 16, 15 및 7 밴드들이 관찰되었다. 검출된 펩티드의 겔보기 분자량들은, 파파인-분해된 추출물의 경우 20,300Da 내지 221,900Da의 범위였던 반면, 트립신-분해된 추출물의 경우 31,500Da 내지 200,000Da였다. 펩신-분해된 추출물들(저장 연구)에서는, 144,200Da이 넘는 펩티드 밴드들은 관찰되지 않았다. 저장 연구 샘플들에 대한 분자량 패턴들도 거의 유사하였다. 콜라겐 유형들과 연관된 분자 밴드들의 확인은 SDS-PAGE 전기영동에 대해 일반적인 결과 보고형식이다.

[0060] 도 3은, 송아지 피부로부터의 제 1형 콜라겐에 비교한, 바라문디 껍질로부터의 콜라겐 샘플들의 전기영동 패턴을 나타낸다. 검출된 펩티드의 겔보기 분자량은 ~30,000 내지 250,000 kDa의 범위였다. 바라문디 껍질로부터의 콜라겐은 두 개의 상이한 α 쇄(α_1 및 α_2) 및 β -성분을 포함하였다. 이들 전기영동 패턴들은 송아지 피부 콜라겐과 유사하였으며, 이합체 유형도 다른 수생 공급원들로부터의 콜라겐 샘플들에서 관찰되었다. 산-가용성 콜라겐 및 펩신-가용성 콜라겐은 송아지 피부로부터의 제 1형 콜라겐과 유사한 전기영동 패턴을 가졌다. 그러나, 파파인-추출된 콜라겐은, β 이합체가 관찰되지 않는 약간 상이한 패턴을 나타내었다. 파파인 처리한 콜라겐도 100kDa 이하의 효소 가수분해 산물을 포함하였다. 이러한 결과는 상이한 유형의 단백질분해효소가, SDS-PAGE 크로마토그램에서 나타나는 바와 같이, 콜라겐 샘플들에 대해 상이한 분열 성질을 갖는다는 것을 암시하였다.

[0061] 무기물 함량

[0062] 무기물 분석은 에너지 분산 X-선(EDX)를 이용하여 측정하였다. 콜라겐 샘플을 스텝(stub) 위에 올리고, QBSD 신호를 이용하여 EDX로 보았다. 표 7은 상이한 효소 추출물 및 상이한 저장 기간에 의한 킬라피아 껍질로부터의 콜라겐의 무기물 분석을 나타낸다. EDX에 의한 무기물 분석은 수득된 콜라겐의 무기물 성분들을 결정하기 위하여 실시하였다. 4개의 성분들, 즉 탄소, 산소, 나트륨 및 염소가, EDX 크로마토그램에 나타나는 바와 같이(도 4), 모든 샘플들에서 검출되었다. 콜라겐은 금속 단백질이 아니므로, 중금속들의 부재는 이들 콜라겐이 안전한 것(GRAS)임을 나타낸다. 모든 콜라겐에서 나트륨 및 염소의 존재는 아마도 추출 단계 후 콜라겐을 침전시키기 위한 석출 공정(NaCl)의 영향으로 인한 것일 것이다. 트립신-분해된 추출물이 각각 48.64% 및 7.69%의 가장 높은 탄소 및 산소 함량을 나타내었다. 염소는 트립신-분해된 추출물의 경우만 제외하고 모든 샘플들에서 주 성분(33.61%)이다. 산소는 모든 샘플들에서 1~7%의 범위로 검출된 소량 성분이다. 탄소 함량은 콜라겐이 유기물이라는 것을 나타낸다. 이제까지 콜라겐의 무기물 분석에서의 발견은 보고되지 않았다.

표 7

[0063] 다른 효소 추출 및 저장 기간에 의한 적색 킬라피아 껍질로부터의 콜라겐의 무기물 분석(중량%)

샘플	탄소	산소	나트륨	염소
트립신 0-주	48.64 ± 4.03	7.69 ± 0.41	10.05 ± 1.11	33.61 ± 3.15
파파인 0-주	21.54 ± 12.15	2.03 ± 1.49	18.72 ± 2.65	57.79 ± 11.15
펩신 0-주	13.56 ± 2.89	1.02 ± 0.36	22.47 ± 0.36	65.95 ± 2.58
펩신 2-주	30.04 ± 3.48	4.00 ± 0.99	11.45 ± 4.12	54.50 ± 7.56
펩신 4-주	33.30 ± 0.94	4.32 ± 0.15	15.45 ± 0.40	46.92 ± 0.78
펩신 6-주	12.07 ± 1.81	1.56 ± 0.35	20.49 ± 2.10	65.88 ± 3.73
펩신 8-주	23.25 ± 3.15	2.33 ± 0.47	16.33 ± 1.68	58.09 ± 4.41

[0064] 값들은 3회 반복값들의 평균±표준편차이다. 각 컬럼 내의 동일 첨자들을 갖는 평균들은 현저한 유의차를 나타내지 않는다(p<0.05).

[0065] 저장 연구

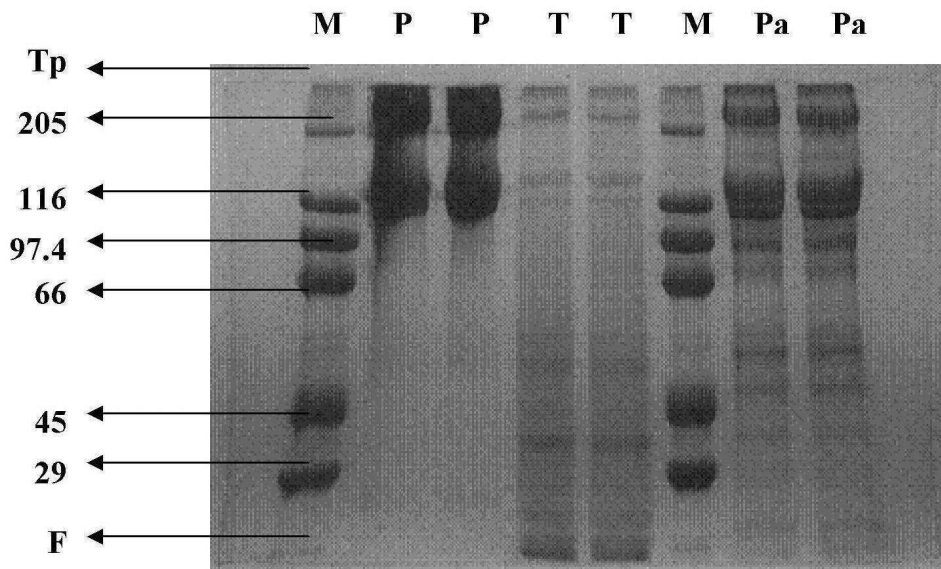
[0066] 껍질들을 2달까지 냉동보관하였다(-20 $^{\circ}$ C). 매주, 껍질들을 해동시키고, 처리하여 콜라겐을 추출하였다. 수득된 콜라겐은, 콜라겐 특징에 대한 껍질들의 냉동 저장의 영향을 결정하기 위하여, 앞에서와 같이 분석하였다.

[0067] 통계 분석

[0068] 채집된 모든 데이터들은, 평균들간의 유의차를 결정하기 위하여 분산분석(ANOVA) 및 던컨 다중 범위 시험(Duncan's Multiple Range Test)를 이용하여 분석하였다(SAS, 1987). 콜라겐 추출 공정 및 이후의 처리들은 수득된 젤라틴의 상이한 품질을 반영한다. 적색 틸라피아 껍질로부터의 콜라겐을 일련의 0.1M NaOH 세척 후 이어서 5°C에서 24시간 동안 효소-보조 추출하였다. 콜로이드 현탁액을 NaCl로 석출시키고, 동결건조시켰다. 사용된 효소들은 펩신, 트립신 및 파파인이다. 적색 틸라피아 껍질들의 저장 연구도 실시하여 콜라겐 특징들에 대한 동결 저장의 영향을 결정하였다. 모든 콜라겐 샘플들은 시각적으로 유사한 것으로 나타났으며, 차이는 단지 단백질 함량, 아미노산 조성, 분자량 프로파일 및 무기물 함량과 같은 화학 분석들에 의해서만 검출될 수 있다. 상이한 효소 추출 및 저장 기간으로부터의 콜라겐들은 외관이 눈과 같은 백색이고 가벼운 질감이었다. 콜라겐 수율은 32.54% 내지 74.77%의 범위로, 펩신 분해된 콜라겐이 최고 수율이었다. 그러나, 펩신 분해된 콜라겐의 단백질 함량은 트립신 및 파파인 분해된 콜라겐들에 비해 훨씬 낮았다. 기록된 단백질 함량은 15% 내지 30%의 범위였다. 트립신 및 파파인 분해된 콜라겐의 아미노산 함량은 펩신 분해된 콜라겐보다 높았다. 검출된 펩티드의 겔보기 분자량은 20,000Da 내지 222,000Da의 범위였다. 무기물 분석에서, 4개의 성분들, 즉 탄소, 산소, 나트륨 및 염소가 모든 콜라겐 샘플들에서 검출되었다. 모든 콜라겐 샘플들의 SEM 관찰들은 유사한 네트워크 구조를 나타낸다. 콜라겐 섬유들은 단백질 매트릭스 내에 임베딩된(embedded) 긴 원통형 단백질이다. 결과들에 따르면, 트립신 분해된 콜라겐이 단백질 함량 및 아미노산 프로파일 면에서 최고의 결과들을 나타내었으나, 수율은 낮았다. 한편 펩신 분해된 콜라겐은 높은 수율을 나타내었으나, 단백질 및 아미노산 함량은 보다 낮았다. 그러나, 상당히 높은 수율, 단백질 및 아미노산 함량을 나타내는 파파인은 효소의 젤라틴 추출 및 특징들에 대한 효과의 연구를 위해 다음 장에서 선택될 것이다. 파파인은 식물계 효소로, 이슬람과 유대교와 같은 특정 사회들과 관련된 종교 문제를 극복할 수 있을 것이다. 저장 연구에서, 틸라피아 껍질의 동결 건조는 콜라겐 특징에 현저한 영향을 갖지 않는다. 따라서, 껍질들은 추출된 젤라틴의 특징들에 큰 영향을 미치지 않으면서 몇 주 동안 동결된 상태로 저장될 수 있다.

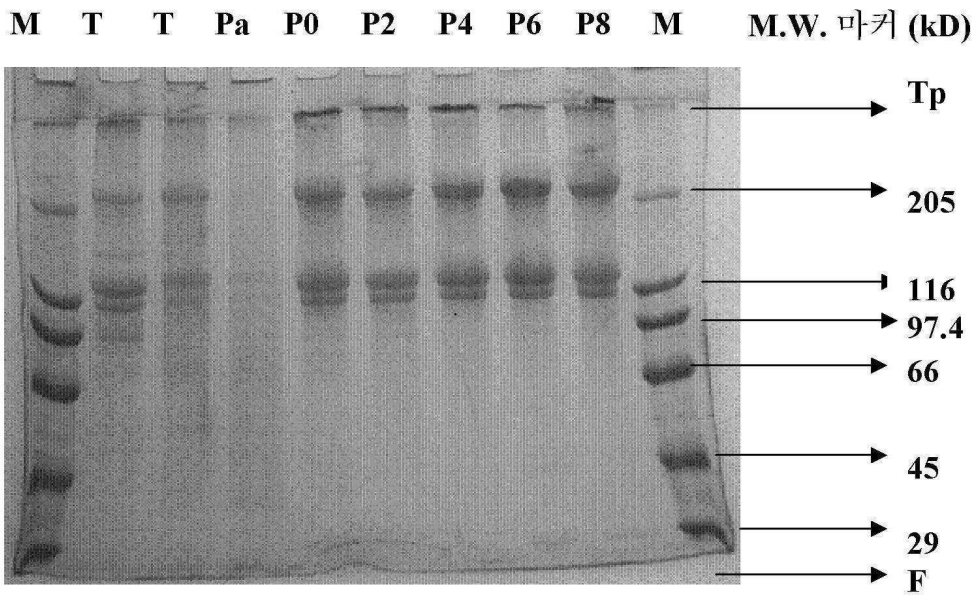
도면

도면1



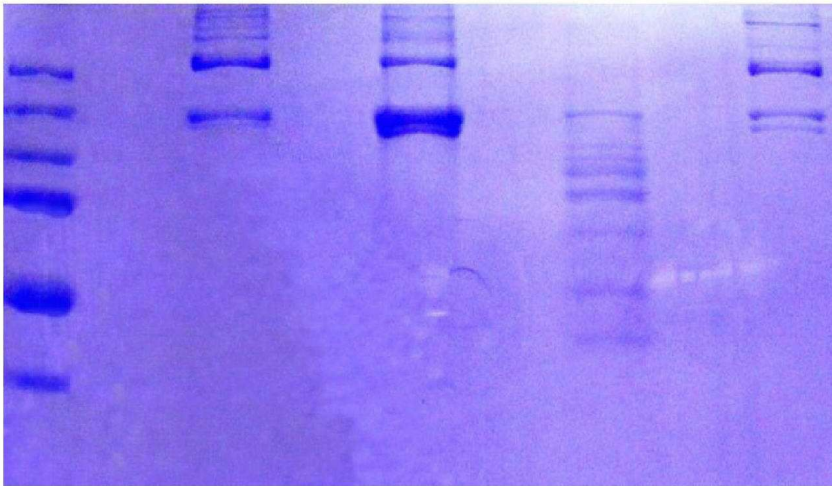
M: 분자량 마커; T: 트립신 분해된 콜라겐; Pa: 파파인 분해된 콜라겐; P: 펩신 분해된 콜라겐. Tp= 겔 상단, 및 F= 버퍼 프론트 (buffer front)

도면2



M: 분자량 마커; T: 트립신 분해된 콜라겐; Pa: 파파인 분해된 콜라겐; P0: 펩신 0-주 저장; P4: 펩신 4-주 저장; P6: 펩신 6-주 저장; P8: 펩신 8-주 저장. Tp= 겔 상단, 및 F= 버퍼 프론트.

도면3



도면4

