

황다랑어 복부 껍질을 이용한 콜라겐의 제조 및 물리화학적 특성 해석

유승재·조승목¹·우진욱·김상호²·한유나·안주련·김수연·김태완·김선봉*
 부경대학교 식품공학과/식품연구소, ¹한국식품연구원, ²송호식품개발(주)

Processing and Physicochemical Properties of Collagen from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Abdominal Skin

Sung-Jae YOO, Sueng-Mock CHO¹, Jin-Wook WOO, Sang-Ho KIM², Yoo-Na HAN, Ju-Ryun AHN, Su-Yeon KIM, Tae-Wan KIM and Seon-Bong KIM*
 Department of Food Science and Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
¹Research Division for Food Industry Promotion, Korea Food Research Institute, Sungnam Gyeonggi-do 463-746, Korea
²Song-Ho Food Development Co., Busan 619-912, Korea

Processing of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skins was optimized by response surface methodology and central composite design. The values of independent variables at optimal conditions were NaOH concentration: 0.5 N, NaOH treatment time: 36.2 hr, pepsin concentration: 1:4.9 ratio (0.245%, w/v), and digestion time: 48.1 hr, respectively. The collagen content estimated under optimal conditions was 33.1%, and the actual experimental collagen content was 32.3%. Physicochemical properties of collagen from yellowfin tuna abdominal skin were investigated by amino acids analysis, SDS-PAGE, FT-IR, viscosity and denaturation temperature. Amino acids content of the collagen was 21.0%. SDS-PAGE pattern of the collagen showed two different α -chain (α_1 - and α_2 - chain), β -component and γ -component. The spectrum of FT-IR of the collagen showed wavenumber at 3,434, 1,650, 1,542 and 1,235 cm^{-1} representing the regions of amide A, I, II and III, respectively. Relative viscosity of the collagen decreased continuously on heating up to 32°C, and the rate of decrease was retarded in the temperature range of 35-50°C. Denaturation temperature (Td) of the collagen solution (0.06%, w/v) was 31°C and was lower than calf skin collagen (35°C).

Key words: Yellowfin tuna, Fish collagen, Seafood by-products, Response surface methodology

서 론

콜라겐은 결합조직의 주요 구성 단백질로써 전체 생체 단백질의 약 30% 이상을 차지하고 있으며, 현재까지 19종류가 알려져 있다(Nakamura et al., 2003). 콜라겐은 대부분 소나 돼지의 뼈와 가죽으로부터 생산되고 있으나, 육상동물 콜라겐은 광우병 및 구제역 발생으로 인해 콜라겐을 제조하지 못하는 문제가 발생하기도 한다(Sadowska et al., 2003). 따라서 육상동물 콜라겐을 대체하기 위한 연구의 필요성이 높아지고 있어, 광우병 및 구제역으로부터 안전한 수산자원을 이용한 콜라겐의 추출에 대한 관심이 높다.

수산물을 이용한 콜라겐에 관한 연구를 살펴보면, Kittiphattanabawon et al. (2005)은 bigeye-snapper (*Lutjanus lutjanus*)의 껍질과 뼈로부터 acid-soluble 콜라겐을 추출 특성을 밝혔으며, Sadowska et al. (2003)은 대구 (*Gadus morhua*)로부터 콜라겐을 추출하기도 하였다. Nagai et al. (1999)은 해파리 콜라겐 특성을 해석한 바 있고, Ikoma et al. (2003)은 *Pagrus major*와 *Oreochromis niloticas*의 비늘로부터 추출된 콜라겐의

물리적 특성을 연구하였으며, Kolodziejska et al. (1999)는 오징어 외피로부터 산가용성 콜라겐을 추출하여 그 특성을 알아보았다. Muyonga et al. (2004a,b)은 Nile perch (*Lates niloticus*)의 뼈와 껍질에서 콜라겐을 추출하여 광학스펙트럼으로 고차구조를 연구하였으며, Yoshimura et al. (2000)은 상어 껍질에서 알칼리 가용성 콜라겐을 추출하여 동적 점탄성을 해석한 바 있다. 또한, Duan et al. (2009)은 잉어 (*Cyprinus carpio*)의 비늘, 및 껍질 콜라겐의 성질을, Wang et al. (2008)은 초어 (*Ctenopharyngodon idella*) 껍질로부터 펩신 가용성 콜라겐의 추출에 관하여 보고한 바 있다. Nagai et al. (2008)은 멱고래 (*Balaenoptera acutorostrata*)에서, Wang et al. (2008)은 심해성 적어 (*Sebastes mentella*)의 뼈에서, Hwang et al. (2007)은 홍어 (*Raja kenoeji*) 껍질에서 콜라겐을 추출하여 고차구조 및 분자종을 해석한 바 있다. 그리고 Nalinanon et al. (2007)은 동남아에서 동결연육의 원료로 많이 이용되는 bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) 껍질 콜라겐의 subunit의 분자량 특성을, Woo et al. (2008)은 황다랑어 등 껍질에서, Senaratne et al. (2006)은 은밀복 (*Lagocephalus gloveri*) 껍질에서 콜라겐의 전

*Corresponding author: owlkim@pknu.ac.kr

기영동 특성 및 변성온도 등을 각각 보고하였다. Skierka and Sadowska (2007)은 발트산 대구 (*Gadus morhua*)의 껍질에서 콜라겐의 추출에 대한 산의 종류 및 펩신의 영향에 대하여 연구하였다.

이와 같이 수산물에 관한 콜라겐 연구는 수산 가공 부산물로 얻어지는 껍질, 뼈 및 비늘 등을 이용한 연구가 대부분이다. 어류 가공 부산물로 얻어지는 껍질과 뼈는 대략 30% 이상으로 그 양이 많을 뿐 아니라 콜라겐을 다량 함유하고 있으므로 (Shahidi, 1994), 수산가공 부산물을 이용하여 육상동물 유래 콜라겐을 대체할 수 있는 어류 콜라겐의 제조는 그 의미가 클 것으로 보인다.

황다랑어는 횡감 및 통조림용으로 어획량이 꾸준히 증가하고 있으며 다랑어류 중에서 비교적 많은 양이 어획되는 상업적인 어종이다. 황다랑어를 이용한 생선회 가공시에 껍질 및 뼈가 부산물로 많은 양이 나오므로 이는 콜라겐 추출의 좋은 원료로 이용 가능할 것이다.

본 연구에서는 황다랑어의 복부 껍질 (피)로부터 콜라겐을 제조하고 그 물리화학적 특성을 알아보고자 하였다. 콜라겐 제조를 위한 최적화는 반응표면분석법의 중심합성계획법에 의해 도출되었으며, 콜라겐의 물리화학적 특성은 아미노산의 조성, 전기영동, FT-IR 스펙트럼, 점도 및 변성온도의 측정을 통하여 해석하였다.

재료 및 방법

재 료

황다랑어 (Yellowfin tuna, *Thunnus albacares*) 복부 껍질은 (주)두영수산 (부산 602-030, 한국)으로부터 공급받았다. 껍질은 비늘을 제거한 뒤 수세하여 -20℃ 이하의 동결상태로 보관하여 사용하였다. 황다랑어 복부의 피로부터 추출된 콜라겐의 물리화학적 특성을 비교하기 위하여 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)의 우피에서 추출된 콜라겐 (No. 232-697-4)을 사용하였다. 이 외의 사용된 모든 시약은 연구용 특급품을 사용하였다.

콜라겐의 제조

황다랑어 피로부터 콜라겐의 제조는 Ogawa et al. (2004)의 방법을 약간 수정하여 알칼리 처리와 효소 가수분해의 2가지 공정을 통해 이루어졌다. 알칼리 처리 공정은 황다랑어 껍질의 비콜라겐 단백질의 제거, 효소의 불활성화 및 조직을 팽윤시킬 목적으로 실시되었으며, 효소 가수분해는 팽윤된 원료에서 콜라겐의 추출을 용이하게 하기 위한 공정이었다. 우선 알칼리 처리는 원료에 NaOH 용액을 5배 (v/w) 가하여 9℃, 900 g의 조건으로 교반시킴으로써 이루어졌으며, 이 후 잔존하는 NaOH를 제거하기 위하여 중화 및 수세를 하였다. 효소 가수분해 공정에서는 펩신 (EC 3. 4. 23.1; 2,080 U/mg protein, Sigma, USA)을 함유 한 Acetic acid (pH 2.0) 용액을 원료 대비 20배 (v/w) 첨가하였으며, 9℃, 200 rpm의 조건에서

이루어졌다. 효소 가수분해물을 여과한 후, 분리된 추출액은 20% NaCl 용액을 사용하여 최종농도 5%까지 염석하였다. 석출된 콜라겐은 증류수를 이용하여 중화 및 수세하였으며, 최종적으로 원심분리 (HB-201SF, Hanbaek Scientific Co., Korea, 10,000×g)를 통하여 수집되었다. 이 후 콜라겐의 열변성을 방지하고 보관하기 위하여 동결건조를 하였다.

콜라겐 함량 분석

콜라겐의 함량은 hydroxyproline을 정량한 다음 환산 계수 11.42를 곱한 값으로 하였다 (Sato et al., 1991). Hydroxyproline 함량은 ISO (1978)의 방법을 약간 수정하여 분석하였는데 콜라겐 100 mg을 test tube에 넣고 6 N HCl 5 mL를 주입하여 110℃에서 12시간 동안 가수분해 시켰다. 가수분해 된 콜라겐 시료는 6 N NaOH를 이용하여 중화시키고 2 mL의 acetate/citrate buffer (pH 3)를 첨가한 후 0.3 M NaCl 용액으로 25 mL까지 정용하였다. 콜라겐 시료 용액 300 uL를 시험관에 넣고 isopropanol (600 uL)와 oxidant solution (7% (w/v) chloramide T, 300 uL)을 첨가하고 상온에서 4분간 방치하였다. 이 후 Ehrlich's reagent 용액 (7% chloramide T와 acetate/citrate buffer를 3:13 비율로 혼합) 4 mL를 첨가한 후 25분간 60℃의 water bath에서 가열하였다. 콜라겐 시료 용액의 hydroxyproline 함량은 660 nm에서의 흡광도 측정을 통해 분석되었으며, Sigma사로부터 구입한 분석용 특급 hydroxyproline (H5877, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 미리 작성한 검량선을 이용하여 계산하였다.

실험계획 및 통계분석

황다랑어 피로부터 콜라겐 추출공정을 최적화하기 위하여 반응표면분석법 (response surface methodology)을 이용하였다. 실험계획은 중심합성계획법 (central composite design, Box and Wilson, 1951)에 의하여 설정되었으며, 반응표면 회귀분석 (Response surface regression, RSREG)을 위해 SAS (Version 8.01, SAS Institute Inc., USA) 프로그램의 RSREG procedure를 이용하였다. 독립변수로는 알칼리 처리 공정의 NaOH 농도 (N, X₁), NaOH 처리시간 (hr, X₂)과 효소 가수분해 공정의 펩신 농도 (ratios, X₃), 펩신 처리시간 (hr, X₄)을 설정하였다. 독립변수의 중심값과 범위는 예비실험을 바탕으로 설정되었으며, -2, -1, 0, 1, 2의 5가지 수준으로 부호화 하여 통계분석을 수행하였다 (Table 1). 종속변수로는 콜라겐 함량 (%), Y)을 설정하였으며, 콜라겐 함량이 최대값을 나타내는 지점에서 최적화 조건을 산출하였다. 통계 분석 결과를 바탕으로 95% 수준에서 유의성을 가지는 아래와 같은 반응표면 모델식 (response surface model equation)을 구하였다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{ij} X_i X_j$$

여기서 Y는 종속변수인 콜라겐 함량 (%), X_i, X_j는 독립변수 그리고 β₀, β_i, β_{ii}, β_{ij}는 상수항, 1차항, 2차항, 교차항에 대한

Table 1. Experimental range and values of the independent variables in the central composite design for collagen processing from yellowfin tuna abdominal skin

Independent variables	Symbol	Range and levels				
		-2	-1	0	1	2
Concentration of NaOH (N)	X ₁	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
Treatment time (hr)	X ₂	24	30	36	42	48
Additional ratio of pepsin (ratio)	X ₃	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7
Hydrolysis time (hr)	X ₄	24	36	48	50	62

변수를 각각 의미한다. 반응표면 그래프는 Maple software (Version 7, Waterloo Maple Inc., Canada)를 이용하여 3차원으로 나타내었으며, 두 개의 독립변수에 대하여 개별적으로 나타내었는데 나머지 두 변수는 최적조건에서 고정하였다.

아미노산 조성

건조된 콜라겐 시료 5 mg을 vacuum-sealed glass tube에 넣고 6 N HCl 용액 3 mL에 녹인 후 110°C에서 24시간 동안 dry bath (Dry bath incubator 11-718-2, Fisher Scientific Co., USA)에서 산가수분해 시켰다. 이 후, 진공건조된 콜라겐 시료를 citric acid buffer (pH 2.2)에 녹여 아미노산 자동분석기 (Amino acid analyzer S-433H, Sycam, Germany)로 아미노산 조성을 분석하였다.

전기영동

SDS-PAGE는 Laemmli (1970)의 방법에 따라 실시되었으며, 황다랑어 피 콜라겐의 band 형태를 알아보기 위하여 우 피 콜라겐을 지표로 사용하였다. 4%의 stacking gel과 5%의 resolving gel로 구성된 polyacrylamide gel을 이용하였으며, 전기영동장치는 Mini-Protean 3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)를 사용하였다. 각각의 콜라겐 시료를 5 mg/mL의 농도로 60°C에서 증류수에 녹여 샘플 용액으로 사용하였다. 샘플 용액은 5% 2-mercaptoethanol, 10% SDS, 20% glycerol 및 0.1% bromophenol blue가 함유된 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 6.8)와 섞어 90°C에서 5분 동안 가열되었다. 전기영동은 25 mA/gel의 조건에서 이루어졌으며, 단백질 band의 염색은 0.25% (w/v) Coomassie brilliant blue R250을 이용하여 2시간 동안 실시하였다.

FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

콜라겐의 FT-IR 분석은 FT-IR spectrophotometer (Brooker IFS 88, Germany)를 이용하여 600부터 4,000 cm⁻¹까지 2 cm⁻¹의 데이터 포착 속도로 분석하였다. FT-IR 분석 곡선은 peakfit software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 나타내었다.

점도 측정

점도의 측정은 Kittiphattanabawon et al. (2005)의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. 0.1 M acetic acid에 콜라겐을 0.03% (w/v) 농도로 녹여 500 mL의 용액을 제조하였다. 점도의 측정은 Brookfield Synchrolectic viscometer (Model II+,

Brookfield Eng Labs Inc., Stoughton, MA, U.S.A)를 이용하였으며, spindle 번호 1, spindle 회전속도 100 rpm, 온도 범위 15-50°C 및 온도 변화 속도 4°C/min의 조건에서 이루어졌다. 점도 분석은 3번 반복되었으며, 4°C에서의 점도값과 비교한 상대점도 (Relative viscosity, %)로 표현하였다.

변성온도 (T_d)의 측정

콜라겐의 변성온도는 Kimura et al. (1988)의 방법을 약간 수정하여 측정되었다. 0.1 M acetic acid에 콜라겐을 0.03% (w/v) 농도로 녹여 5 mL의 sample 용액을 제조하였다. Sample 용액의 점도를 20-50°C 범위에서 2°C 간격으로 Ostwald-Fenske 점도계를 이용하여 측정하였으며, 측정값의 비율이 초기의 반이 되는 지점을 콜라겐의 변성온도 (T_d)로 하였다.

결과 및 고찰

콜라겐 제조의 통계적 해석

중심합성계획법에 의해 27개의 구간에서 실험이 진행되었으며, 각각의 구간에 따른 종속변수인 수율 (Y, %)을 Table 2에 나타내었다. 실험 결과 얻어진 종속변수의 값을 SAS software의 RSREG procedure를 이용하여 반응표면분석한 결과를 바탕으로 적합한 2차 다항 모델식을 도출하였다. 1차항 (X₁, X₂, X₃, X₄), 2차항 (X₁₁, X₂₂, X₃₃, X₄₄), 교차항 및 상수항의 유의수준을 t-statistic에 의거하여 Table 3에 나타내었다. 1차항 중에서는 X₂ (P=0.2209)와 X₃ (P=0.5306)가 0.05 보다 높아 유의성이 없는 것으로 나타났으며, X₁ (P=0.0146), X₄ (P=0.0392)는 P<0.05의 수준에서 유의성을 보였다. 모든 2차항은 유의수준이 0.01 이하로 99%의 높은 수준에서 유의성이 나타난 반면에, 모든 교차항은 유의성을 나타내지 못했다. 반응표면모델식은 95% 수준에서 유의성이 없는 항을 제외하여 도출되었으며, Table 4에 나타내었다. 도출된 모델식의 결정계수 (R²) 값은 0.9809로 매우 높게 나타났으며 유의수준 또한 0.0001로 나타났다. 높은 결정계수 및 유의수준을 보인 것은 예비실험을 통해 중심값 및 범위를 설정했기 때문으로 판단된다. Analysis of variance (ANOVA)의 분석에 의해 반응표면모델식의 통계적 유의성을 평가하였다. 종속변수에 따른 ANOVA 분석을 통해 Y (content, %)의 반응 모델을 표현하여 Table 5에 나타내었다. ANOVA의 결과 교차항 (P=0.2071)을 제외한 1차항 (P=0.0298), 2차항 (P<0.0001)은 95% 이상의 수준에서 유의성이 인정되었다 (Table 4).

Table 2. Central composite design and responses of the dependent variables for collagen processing from yellowfin tuna abdominal skin to the independent variables

Run No.	Coded levels of variable				Response
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y
1	-1	-1	-1	-1	21.6
2	-1	-1	-1	+1	21.3
3	-1	-1	+1	-1	20.7
4	-1	-1	+1	+1	20.0
5	-1	+1	-1	-1	22.1
6	-1	+1	-1	+1	22.4
7	-1	+1	+1	-1	21.5
8	-1	+1	+1	+1	20.1
9	+1	-1	-1	-1	23.3
10	+1	-1	-1	+1	23.6
11	+1	-1	+1	-1	23.9
12	+1	-1	+1	+1	21.7
13	+1	+1	-1	-1	22.1
14	+1	+1	-1	+1	23.2
15	+1	+1	+1	-1	21.2
16	+1	+1	+1	+1	21.7
17	-2	0	0	0	21.4
18	+2	0	0	0	21.2
19	0	-2	0	0	21.8
20	0	+2	0	0	20.3
21	0	0	-2	0	21.7
22	0	0	+2	0	21.8
23	0	0	0	-2	22.8
24	0	0	0	+2	22.8
25	0	0	0	0	33.1
26	0	0	0	0	32.9
27	0	0	0	0	33.2

X₁, concentration of NaOH, %; X₂, treatment time, hr; X₃, additional ratio of pepsin, ratio; X₄, hydrolysis time, hr.

콜라겐 제조의 최적화

반응표면분석 결과 도출된 콜라겐 제조 최적 조건을 부호(coded)값과 실제(uncoded)값으로 나누어 Table 6에 나타내었

Table 3. Estimated coefficients of the fitted quadratic polynomial equation for the response of Y (content, %) based on *t*-statistic

Parameter	Parameter estimate	Standard error	T-value	P-value
Intercept	33.066667	0.438009	75.49	0.0001
X ₁	0.441667	0.154860	2.85	0.0146
X ₂	-0.200000	0.154860	-1.29	0.2209
X ₃	-0.358333	0.154860	-2.31	0.0392
X ₄	-0.100000	0.154860	-0.65	0.5306
X ₁ X ₁	-2.912500	0.164253	-17.73	0.0001
X ₁ X ₂	-0.425000	0.189663	-2.24	0.0447
X ₁ X ₃	0.087500	0.189663	0.46	0.6528
X ₁ X ₄	0.112500	0.189663	0.59	0.5641
X ₂ X ₂	-2.975000	0.164253	-18.11	0.0001
X ₂ X ₃	-0.112500	0.189663	-0.59	0.56641
X ₂ X ₄	0.212500	0.189663	1.12	0.2845
X ₃ X ₃	-2.800000	0.164253	-17.05	0.0001
X ₃ X ₄	-0.325000	0.189663	-1.71	0.1123
X ₄ X ₄	-2.537500	0.164253	-15.45	0.0001

X₁, concentration of NaOH, %; X₂, treatment time, hr; X₃, concentration of hydrolysis, ratio; X₄, hydrolysis time, hr.

Table 4. Response surface model for processing conditions of collagen from yellowfin tuna abdominal skin

Quadratic polynomial model	R ²	P-value
Y=33.067+0.442X ₁ -0.358X ₃ -2.913X ₁ ² -0.425X ₁ X ₂ -2.975X ₂ ² -2.800X ₃ ² -2.538X ₄ ²	0.9809	0.0001

다. RSREG procedure의 결과에 의하면, eigen-value 값들이 모두 음수로써 정상점으로 최고치를 나타내었다. 황다랑어 피를 이용한 콜라겐 제조 최적 조건은 부호값으로 X₁=0.07, X₂=-0.03, X₃=-0.06 그리고 X₄=-0.01로 나타났다. 즉 NaOH 처리시 농도(X₁)는 0.5 N, 처리시간(X₂)은 36.2 hr, 효소와 기질간 비(X₃)는 1:4.9 ratios (83%, w/v), 가수분해 시간(X₄)은 48.1 hr 일 때 최적 수율을 보이는 것으로 나타났다. 통계적으

Table 5. Analysis of variance (ANOVA) for response of the dependent variable (Y, Contents (%))

Sources	DF	SS	MS	F-value	P-value
Regression					
Linear	4	8.963333	0.0248	3.89	0.0298
Quadratic	4	339.586667	0.9399	147.50	0.0001
Cross-product	6	5.830000	0.0161	1.69	0.2071
Total model	14	708.760000	0.9808	197.06	0.0001
Residual					
Lack of fit	10	6.860000	0.6860	29.40	0.0333
Pure error	2	0.046667	0.0233	-	-
Total error	12	6.906667	0.5755	-	-
Total	26	27.506668	1.2848		
Factors					
X ₁	5	188.86000	37.77200	65.63	<0.0001
X ₂	5	193.58833	38.71767	67.27	<0.0001
X ₃	5	172.35000	34.47000	59.89	<0.0001
X ₄	5	140.21833	28.04367	48.72	<0.0001

DF, Degrees of Freedom; SS, Sum of Square; MS, Mean Square; X₁, concentration of NaOH, %; X₂, treatment time, hr; X₃, concentration of enzyme, ratio; X₄, extraction time, hr.

로 도출된 최적 조건에서 예상되는 콜라겐의 최대 수율은 33.1%로 나타났으며, 실제 추출한 결과 32.3%로 예상치보다 약 0.8% 낮게 나왔으나 큰 차이를 보이지 않았다 (Table 6). 독립변수들이 종속변수에 미치는 영향을 Maple software (Maple 7, Waterloo Maple Inc., Canada)를 이용하여 3차원 그래프로 나타내었다 (Fig. 1). 반응표면 그래프를 통해 종속변수에 대한 독립변수의 영향을 살펴보면, 모든 독립변수가 중심값 (부호값 0)에 가까울수록 종속변수인 콜라겐의 수율이 높아지는 것으로 나타났다. 4개의 독립변수 중 NaOH의 농도 (X_1 , N)이 가장 높은 영향력을 미치는 것으로 나타났다. 펩신과

기질간의 비 (X_3 , ratios) 또한 많은 영향을 미치는 것으로 나타났으나 coded 값이 0에서 -2로 감소할 경우 수율에 영향을 적게 미치는 것으로 나타났다. 이는 알칼리 농도 조절을 적절히 하여 비 콜라겐 단백질의 제거 및 팽윤을 시키는 것이 콜라겐 제조를 위한 효소의 농도의 조절보다 큰 영향을 미치는 것으로 여겨진다. 따라서, 콜라겐 제조 시 가장 중요한 요인으로 작용하는 것은 NaOH의 농도 (X_1 , N)로 나타났다.

아미노산 조성 특성

콜라겐의 아미노산 구성은 Gly-X-Y 배열이 반복되는 특징을 가지고 있다. 일반적으로 Gly-X-Y가 Gly-Pro-Hyp일 때 hydroxyproline (Hyp) 잔기는 콜라겐 triple helix의 열 안정성을 높여 준다 (Johnston-Banks, 1990). 또한 hydroxyproline의 함량은 콜라겐으로부터 유도되는 젤라틴의 중요한 기능적 특성인 겔강도와 같은 물리적 특성에 중요한 영향을 미치며, 함량이 높을수록 좋은 물리적 특성을 가진다고 알려져 있다 (Gilsenan & Ross-Murphy, 2000; Gómez-Guillén et al., 2002). 따라서 imino acid인 proline, hydroxyproline 잔기의 함량은 콜라겐 및 젤라틴에 있어서 매우 중요한 것이라 할 수 있다. 우피 및 황다랑어 피 콜라겐의 아미노산 분석결과를 Table 7에 나타내었다. 황다랑어 피 및 우피 콜라겐의 glycine 함량은 각각 25.3%, 24.1%로 아미노산 중 가장 많은 비중을 차지하였다. Hydroxyproline 함량은 우피 콜라겐의 경우 9.9%로 나타났으며, 황다랑어 피 콜라겐의 경우는 8.8%로 우피 콜라겐의 함량이 조금 높게 나타났다. 우피 및 황다랑어 피 콜라겐의 높은 함량을 나타내었다. Proline 잔기는 우피 콜라겐과 황다랑어 피 콜라겐이 각각 11.7%와 12.2%로 황다랑어 피 콜라겐 imino acids (hydroxyproline and proline)의 함량은 각각 21.6%,

Table 6. Optimal conditions of collagen processing from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin

Independent variable	Critical value		Predicted value	Stationary point
	coded	uncoded		
X_1	0.07	0.5	33.09	Maximum
X_2	-0.03	36.2		
X_3	-0.06	1:4.9		
X_4	-0.01	48.1		

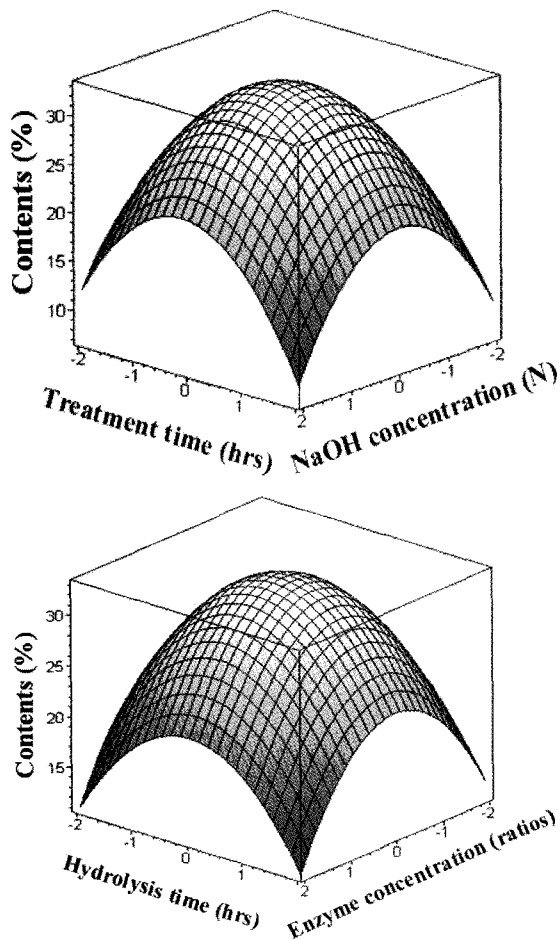


Fig. 1. Response surface plots for optimization of collagen extraction from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin.

Table 7. Amino acid composition of collagens from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin and calf skin

Amino acids	Collagen Type	
	Yellowfin tuna (%)	Calf skin (%)
Hydroxyproline	8.8	9.9
Aspartic acid	6.0	6.8
Threonine	3.2	2.0
Serine	3.8	3.5
Glutamic acid	9.8	10.9
Proline	12.2	11.7
Glycine	25.3	24.1
Alanine	8.7	7.8
Valine	2.6	2.8
Isoleucine	1.0	1.7
Leucine	2.5	3.3
Tyrosine	0.3	0.6
Phenylalanine	2.1	2.4
Histidine	3.6	1.1
Lysine	1.5	4.0
Arginine	8.4	7.3
Cysteine	0.2	0.1
Imino acids ^a	21.0	21.6
Total	100.0	100.0

^aImino acids mean proline and hydroxyproline.

21.0% 로 육상동물 유래 콜라겐 보다 낮게 나타나 다른 수산 생물 유래 콜라겐과 같은 경향을 나타내었다 (Jongjareonrak et al., 2005; Ikoma et al., 2003).

전기영동 특성

황다랑어 (A) 및 우피 (B) 콜라겐의 SDS-PAGE 결과를 Fig. 2에 비교하여 나타내었다. 황다랑어 복부 껍질 콜라겐은 비교를 위한 지표단백질로 사용된 우피 콜라겐과 같은 전기영동 패턴을 보였는데, 두개의 α -chain (α_1 -과 α_2 -)과 β - 및 γ -components가 나타났다. α_1 과 α_3 는 이동도가 같아 전기영동 상으로 구분하기 어려워 3개의 subunit인지 아니면 2개의 subunit인지는 확실하지는 않다. 우피 콜라겐은 type I으로써 두개의 α -chain (α_1 -과 α_2 -, 2:1의 비율)과 β -component, γ -component로 구성되어 있다 (Giraud-Guille et al., 2000). 반면에 어피 콜라겐의 경우 어종에 따라 상이한 전기영동 결과를 보이기도 한다. 다른 수산자원으로부터 추출된 콜라겐을 살펴보면, 고등어 콜라겐은 하나의 α -band를 형성했으며, 상어 및 농어의 경우는 두 개의 α -band를 가지고 있는 것으로 나타났다 (Nagai & Suzuki, 2000).

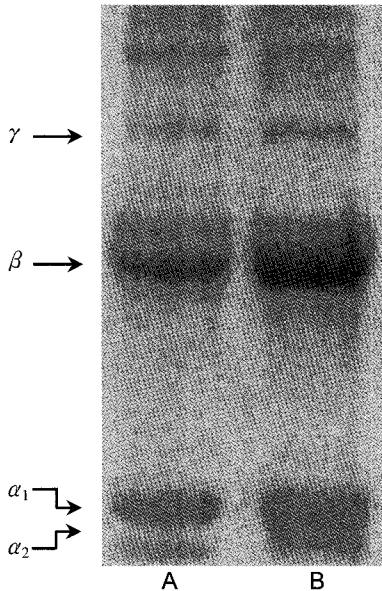


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin and calf skin. The 5.0 mg/mL of sample solution, 4% stacking gel and 5% resolving gel were used for electrophoretic analysis. Calf skin type I collagen was used as mobility makers of α -chains, β and γ -components. A, type I collagen from calf skin; B, collagen from abdominal skin of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*).

FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy) 스펙트럼 특성

황다랑어 피 및 우피 콜라겐의 FT-IR 스펙트럼을 Fig. 3에 비교하여 나타내었다. 본 연구에서 우피 및 황다랑어 피 콜라

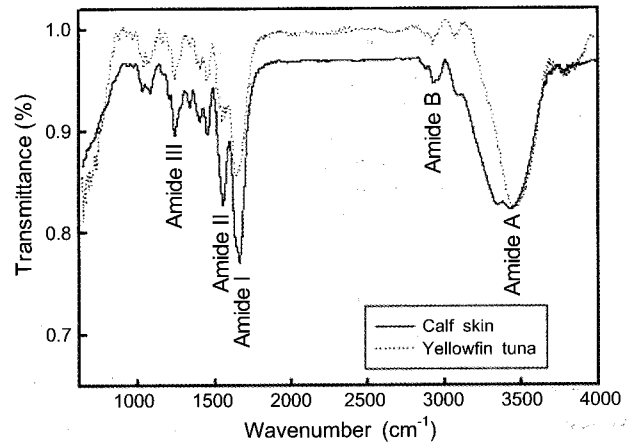


Fig. 3. Fourier transform infrared spectra of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin and calf skin.

겐의 amide A, I, II 및 III 영역의 최대 peak band는 각각 3,433/cm, 3,437/cm (amide A), 1,659/cm, 1,661/cm (amide I), 1,549/cm, 1,550/cm (amide II) 그리고 1,240/cm, 1,236/cm (amide III)로 비슷한 과정에서 peak band를 나타내었다. Muyonga et al. (2004b)과 Jakobsen et al. (1983)의 연구에 따르면 스펙트럼에서 나타난 amide A, I, II 및 III의 영역은 polypeptide의 형태와 직접적으로 연관이 있으며, amide B 영역의 peak는 CH₂의 stretching vibration을 나타내며, amide A 영역 (3,200-3,600/cm)의 peak band는 N-H stretching vibration과 관련이 있다고 하였다. 또한 amide I 영역 (1,600-1,800/cm)의 peak band는 peptide의 carbonyl group의 stretching vibrations과 관련이 있으며, 단백질의 2차 구조를 알아보는데 가장 유용하게 이용이 된다. 그리고 amide II 영역 (1,300-1,600/cm)의 peak band는 NH bending 및 CN stretching과 관련이 있으며, amide III (600-1,300/cm) 영역의 최대 peak band는 CN stretching과 NH에 의해서 나타나며, 콜라겐의 triple helical 구조와 관련이 있다고 한다. Muyonga et al. (2004b)의 연구에 따르면 치어 Nile perch의 껍질 콜라겐의 경우 각각의 amide 영역 (A, I, II 및 III)은 3,434, 1,650, 1,542와 1,235/cm에서 최대 peak가 나타났으며, 상어 Nile perch 껍질 콜라겐의 Amide 영역은 각각 3,458, 1,654, 1,555와 1,238/cm에서 각각의 peak가 나타났다.

점도 특성

0.03% (w/v) 농도의 황다랑어 피 콜라겐을 0.1 M 농도의 acetic acid 용액에 녹여 점도 측정을 하여 Fig. 4에 나타내었다. 그 결과, 콜라겐 용액의 점도는 50°C까지 꾸준히 감소하는 것으로 나타났다. 이는 가열처리에 의해 콜라겐의 수소 결합이 깨져 삼중 나선구조가 와해되기 때문으로 생각된다 (Nagai & Suzuki, 2000; Nagai & Suzuki, 2002). Kittiphattanabawon et al. (2005)의 bigeye snapper 콜라겐 연구 결과에서도 본 실험과 같은 경향을 나타내었다.

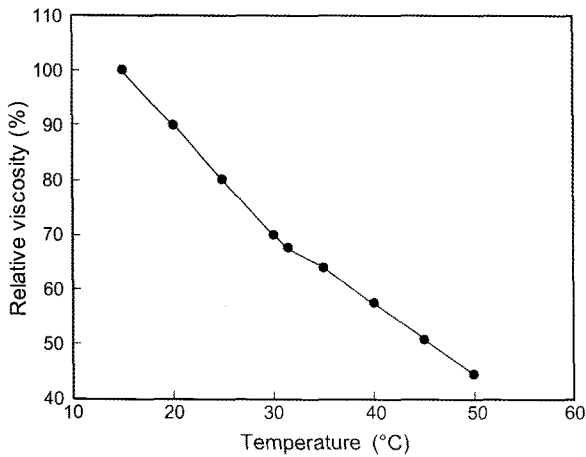


Fig. 4. Relative viscosity at different temperatures of the collagen solution from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin.

콜라겐 변성온도 (T_d) 특성

황다랑어 피 콜라겐의 변성온도를 측정하여 Fig. 5에 나타내었다. 그 결과, 황다랑어 피 콜라겐의 변성온도는 약 31°C로 나타났고, 우피 콜라겐의 변성온도는 약 35°C로 나타났다. Kimura et al. (1988)의 보고에 따르면, 우피 콜라겐의 변성온도는 35°C로 보고하고 있으므로 황다랑어 피 콜라겐의 변성온도는 우피 콜라겐 보다 4°C 가량 낮게 나타났다. 이는 황다랑어와 우피 콜라겐의 아미노산 분석 시 나타난 imino acid의 함량 (21.0%, 21.6%)과 비교하는 결과를 나타내었다. 이처럼 일반적으로 어류 유래 콜라겐의 변성온도는 육상동물 유래의 콜라겐 보다 낮게 나타난다. 또한, 황다랑어 피 콜라겐의 변성온도는 육상동물 콜라겐의 변성온도 보다 낮은 것으로 나타났다 (Nagai & Suzuki, 2002). 콜라겐의 열안정성은 콜라겐을 산업적으로 응용하는데 있어서 중요한 특성 중의 하나이다. 이는

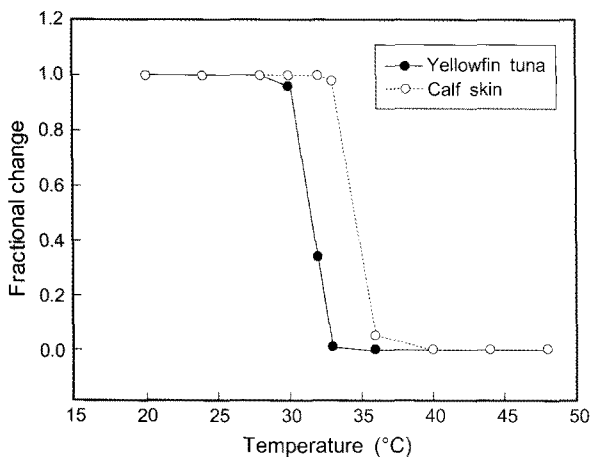


Fig. 5. Thermal denaturation curves determined by measuring the viscosities of yellowfin tuna abdominal skin and calf skin collagen solutions in 0.1 M acetic acid. The incubation time at each temperature was 4 hr collagen concentration was 0.06% (w/v).

열안정성에 관여하는 imino acid (proline and hydroxyproline) 함량과 일반적으로 관련되어 있다. 그 동안 연구된 어류 콜라겐의 변성온도를 알아보면, chum salmon (19.4°C), saury (23.0°C), common mackerel (26.9°C), bullhead shark (25°C), Japanese seabass (30°C) 그리고 skipjack (29.7°C)로 나타났다 (Nagai & Suzuki, 2000, Kimura et al., 1988).

사 사

본 연구는 지식경제부에서 지역중점기술개발사업으로 시행된 수산가공부산물을 이용한 고기능성 단백질의 제조공정 개발 및 산업화 (Grant No. 10024274) 과제지원에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

Box, G.E.P. and K.B. Wilson. 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. *J. Royal Stat. Soc. (Series B)*, 13, 1-45.

Duan, R., J. Zhang, X. Du, X. Yao and K. Konno. 2009. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chem.*, 112, 702-706.

Gilsenan, P.M. and S.B. Ross-Murphy. 2000. Rheological characterization of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids*, 14, 191-195.

Giraud-Guille, M.M., L. Besseau, C. Chopin, P. Durand and D. Herbage. 2000. Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states. *Biomaterials*, 21, 899-906.

Gómez-Guillén, M.C., J. Turnay, M.D. Fernández-Díaz, N. Ulmo, M.A. Lizaebe and P. Montero. 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species. *Food Hydrocolloids*, 16, 25-34.

Hwang, J.H., S. Mizuta, Y. Yokoyama and R. Yoshinaka. 2007. Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja kenogei*). *Food Chem.*, 100, 921-925.

Ikoma, T., H. Kobayashi, J. Tanaka, D. Walsh and S. Mann. 2003. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticas*. *Biol. Macromol.*, 32, 199-204.

Jakobsen, R.L., L.L. Brown, T.B. Hutson, D.J. Fink and A. Veis. 1983. Intermolecular interactions in collagen self-assembly as revealed by fourier transform infrared spectroscopy. *Science*, 220, 1288-1290.

Johnston-Banks, F.A. 1990. Gelatin. In P. Harris J.R. (Ed.), *Food gels*. London: Elsevier Applied Science Publishers, 233-289.

- Jongjareonrak, A., S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai and T. Muehiko. 2005. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). Food Chem., 93, 475-484.
- Kimura, S., X.P. Zhu, R. Matsui, M. Shijoh and S. Takamizawa. 1988. Characterization of fish muscle type I collagen. J. Food Sci., 53, 1315-1318.
- Kittiphattanabawon, P., S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai and M. Tanaka. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). Food Chem., 89, 363-372.
- Kolodziejska, I., Z.E. Sikorski and C. Niecikowska. 1999. Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illex argentinus*) skins. Food Chem., 66, 153-157.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature, 227, 680-685.
- Muyonga, J.H., G.B. Cole and K.G. Duodu. 2004a. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). Food Chem., 85, 81-89.
- Muyonga, J.H., C.G.B. Cole and K.G. Duodu. 2004b. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). Food Chem., 87, 325-332.
- Nagai, T., T. Ogawa, T. Nakamura, T. Ito, H. Nakagawa, K. Fujiki, M. Nakao and T. Yano. 1999. Collagen of edible jellyfish exumbrella. J. Sci. Food Agric., 79, 855-858.
- Nagai, T. and N. Suzuki. 2000. Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins. Food Chem., 68, 277-281.
- Nagai, T. and N. Suzuki. 2002. Preparation and partial characterization of collagen from paper nautilus (*Argonauta argo*, Linnaeus) outer skin. Food Chem., 76, 149-153.
- Nagai, T., N. Suzuki and T. Nagashima. 2008. Collagen from common minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) unesu. Food Chem., 111, 296-301.
- Nakamura, Y.N., H. Iwamoto, Y. Ono, S. Nishimura and S. Tabata. 2003. Relationship among collagen amount, distribution and architecture in the *M. Longissimus thoracis* and *M. pectoralis profundus* from pigs. Meat Sci., 64, 43-50.
- Nalinanon, S., S. Benjakul, W. Visessanguan and H. Kishimura. 2007. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). Food Chem., 104, 593-601.
- Ogawa, M., J.R. Portier, M.W. Moody, J. Bell, M.A. Schexnayder and J.N. Losso. 2004. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Achrosargus ptobatocephalus*). Food Chem., 88, 495-501.
- Sadowska, M., I. Kolodziejska and C. Niecikowska. 2003. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). Food Chem., 81, 257-262.
- Sato, K., C. Ohashi, K. Ohtski and M. Kawabata. 1991. Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. J. Agric. Food Chem., 39, 1222-1225.
- Senaratne, L.S., P.J. Park and S.K. Kim. 2006. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. Biores. Technol., 97, 191-197.
- Shahidi, F. 1994. Seafood Processing By-products. In F. Shahidi and J.R. Botta, Seafoods chemistry, processing, technology and quality pp. 320-334. Glasgow; Blackie Academic and Professional.
- Skierka, E. and M. Sadowska. 2007. The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). Food Chem., 105, 1302-1306.
- Yoshimura, K., M. Terashima, D. Hozan and K. Shirai. 2000. Preparation and dynamic viscoelasticity characterization of alkali-solubilized collagen from shark skin. J. Agric. Food Chem., 48, 685-690.
- Wang, L., B. Yang, R. Wang and X. Du. 2008. Extraction of pepsin-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin using an artificial neural network. Food Chem., 111, 683-686.
- Wang, L., X. An, F. Yang, Z. Xin, L. Zhao and Q. Hu. 2008. Isolation and characterization of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). Food Chem., 108, 616-623.
- Woo, J.W., S.J. Yu, S.M. Cho, Y.B. Lee and S.B. Kim. 2008. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunus albacares*) dorsal skin. Food Hydrocolloids, 22, 879-887.