최 종
연구보고서

RT/HPT 융합기술을 이용한 돈피 기능성 올리고펩타이드 생산기술 개발

New technique for production of pigskin oligopeptides by irradiation and high pressure

연 구 기 관

한국식품연구원

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “RT/HPT 융합기술을 이용한 돈피 기능성 올리고펩타이드 생산기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 5 월 24 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 김 영 호

세부연구책임자 : 이 남 혁

세부연구책임자 : 홍 상 필

세부연구책임자 : 김 윤 지

연 구 원 : 양 승 용

연 구 원 : 김 영 붕

연 구 원 : 노 정 해

연 구 원 : 조 영 준

연 구 원 : 김 천 기

요 약 문

Ⅰ. 제 목

RT/HPT 융합기술을 이용한 돈피 기능성 올리고펩타이드 생산기술 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 미래의 식품 안전기술 및 식품 신가공기술로 활용가치가 높은 방사선조사기술과 초고압처리기술을 활용하여 불용성고분자단백질의 저분자화를 위한 환경친화적 가공기술 개발을 목적으로 하였으며, 이러한 목적 달성을 위한 기초연구로써 부가가치가 낮은 돈피를 소재로 하여 돈피 주요 구성성분인 콜라겐의 저분자 펩타이드화를 위한 방사선조사기술과 초고압처리기술의 공정 적용성을 연구하였으며, 이러한 공정기술을 통하여 제조된 콜라겐 펩타이드의 기능성 연구를 통하여 방사선조사기술과 초고압처리기술의 기능성 올리고펩타이드 제조기술 및 그 활용성을 제시하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 돼지 껍질에서 콜라겐 올리고펩타이드의 환경친화적 제조기술을 개발하고자 방사선조사기술 또는 초고압기술을 이용하였으며 2차년에 걸쳐 수행되었다. 1년차에서는 방사선조사 또는 초고압처리에 의한 콜라겐 가수분해물의 제조조건을 수립하였으며, 2년차에서는 콜라겐 가수분해물에서 기능성 올리고펩타이드를 분리하여 생리활성을 탐색하였고, 방사선조사기술에 의한 돈피 유래 올리고펩타이드의 제조기술 모델을 정립하였다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

방사선조사와 초고압을 이용하여 돈피 유래 콜라겐 올리고펩타이드를 제조하기 위하여 1년차에서는 콜라겐 가수분해물 제조기술의 적정 조건을 확립하기 위하여 방사선조사 기술, 초고압처리 기술 및 효소처리 기술을 병행하여 실험하였고, 이때 방사선조사 선량별, 압력별 그리고 효소 적용조건 등을 중심으로 연구하였다. 방사선조사는 (주)그린피아의 상업용 γ-ray 조사시설을 이용하여 최대 300 kGy까지 조사하였고, 초고압처리는 우리 연구원에서 보유하고 있는 초고압장치를 이용하여 최대 600 MPa까지 고압처리하였다. 그리고 방사선조사된 돈피의 콜라겐 가수분해물을 효과적으로 제조하기 위하여 선행연구에서 경제성과 소화력이 우수한 것으로 나타난 papain을 이용하였다. 2년차에서는 1차년도에서 조건을 수립한 콜라겐 가수분해물 제조 기술을 이용하여 올리고펩타이드를 분리하여 혈압강하 효과, 항산화 효과 및 항혈전능 등과 같은 생리활성을 탐색하였고, 올리고펩타이드 제조기술에 대한 모델을 정립하였다. 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 돈피에서 콜라겐 가수분해물을 추출하기 위한 전처리로써 돈피을 분쇄하여 탈지한 다음 방사선조사하였다. 돈피를 hammer mill과 chopper를 이용하여 분쇄한 결과, chopper를 이용하여 분쇄하는 것이 공정이 간단할 뿐만 아니라 경제적으로도 효율성이 있는 것으로 나타났다.
2. 탈지돈피에서 0.5M NaCl에 가용화되는 염가용성 콜라겐과 0.5M citrate buffer(pH3.6)에 가용화되는 산가용성 콜라겐을 추출한 결과 염가용성 콜라겐은 6.0%, 산가용성 콜라겐은 7.9%의 추출 수율을 보여 돈피 구성 단백질의 대부분이 불용성콜라겐으로 나타났다.
3. 돈피에서 추출한 염가용성 및 산가용성 콜라겐을 papin 처리하여 점도와 탁도를 측정한 결과 효소 반응시간이 경과함에 따라 점도 및 탁도가 저하되었다.
4. 돈피를 방사선조사선량(0 ~ 300 kGy)에 따라 조사한 후 0.1 M NaCl, 20 mM

Tris-HCl (pH 7.0) 용액으로 용출한 수용성 단백질의 용해도는 대조군(0kGy)에서 2% 수준이었으며, 방사선조사선량이 증가할수록 용해도는 증가하여 300 kGy의 조사선량에서는 60% 이상의 용해도를 보였다. 2.항에서 염가용성 콜라겐과 산가용성 콜라겐의 추출 수율이 각각 6.0%, 7.9%로써 총 단백질 중 가용성 콜라겐의 함량이 13.9%임을 감안할 때 방사선조사에 의하여 가용화 성분이 4배 이상 증가되었다.

5. 방사선조사선량에 따른 수용성 단백질의 저분자화를 간접적으로 측정하기 위하여 점도를 측정하였으며, 60 kGy ~ 150 kGy 에서는 조사선량이 높아질수록 점도가 감소되었으며, 150 kGy ~ 300 kGy에서는 유사하였다. 이러한 경향은 탁도에서도 유사하게 나타나 돈피 수용성 단백질의 저분자화에는 150 kGy 수준의 조사선량이 적당할 것으로 생각되었다.
6. 방사선자선량에 따른 콜라겐의 sub-unit 조성을 10% polyacrylamide gel을 이용한 SDS-PAGE 결과 방사선 조사선량이 높아질수록 콜라겐의 저분자화가 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 방사선조사를 하지 않은 경우에는 분자량 100 kDa ~ 300 kDa 크기의 콜라겐 monomer, dimer 및 trimer로 구성된 α-chains, β-components 또는 γ- components의 콜라겐 사슬이 대부분이었으나, 40 kGy 이상의 조사선량에서는 100 kDa ~ 300 kDa 부근의 콜라겐 분자가 점차 소실되었고, 조사선량이 높아질수록 분자량 24 kDa 이하의 저분자 물질이 점차적으로 증가하는 현상을 보였다.
7. 초고압처리에 의한 돈피 단백질의 저분자화를 조사하기 위하여 300 ~ 600 MPa의 압력으로 10분과 20분 간 고압처리를 하여 SDS-PAGE한 결과, 돈피 단백질의 저분자화에 대한 600 MPa 까지의 초고압처리는 그 영향이 미미한 것으로 나타났다.
8. 방사선조사하여 구조가 변형된 돈피 단백질의 papain 소화력을 수용성 단백질의 용해도로 측정하였다. 방사선조사를 하지 않은 경우에는 약 55%가 수용성 성분으로서 용출되었으며, 방사선조사선량이 증가할수록 용출되는 수용성 성분은 증가하여 300 kGy 조사선량에서는 90% 이상의 용해도를 보여 돈피 단

백질의 저분자화에 방사선조사와 효소의 병행처리가 매우 효과적인 것으로 나타났다.

9. 방사선조사와 효소를 병행처리 하였을 때의 수용성 성분의 점도와 탁도는 방사선조사선량이 증가할수록 감소하였으며, 100 kGy 이상에서는 일정수준의 점도 및 탁도를 유지하여 8.항의 결과를 뒷받침 하였다.

10. 방사선조사 후 효소처리를 하였을 때의 돈피 유래 콜라겐의 sub-unit 조성을 검토한 결과, 효소처리를 하지 않은 경우에는 α-, β- 및 γ 나선구조의 100 kDa ~ 300 kDa의 콜라겐 밴드가 나타났으나 파파인 효소처리를 한 경우는 이러한 고분자량의 밴드가 소실되는 반면 24 kDa의 밴드가 새롭게 형성되었다. 그러나 24 kDa의 밴드는 효소반응 시간이 길어질수록 그리고 조사선량이 증가할 수록 소실되는 반면에 gel 하단에 저분자 물질이 다량 축적되어 돈피 단백질의 저분자화를 위해서는 방사선조사와 효소의 병행처리가 효율적인 방법임을 제시하였다.

11. 방사선조사와 효소 병행처리에 의한 콜라겐 가수분해물의 제조수율을 검토하였다. 가수분해물의 제조는 UF-10 (MWCO 10,000이상), UF-5 (10,000 ~ 5,000), UF-3 (5,000 ~ 3,000) 그리고 UF-1 (3,000 ~ 1,000)으로 구분하여 한외여과한 다음 동결건조하여 무게 측정에 의한 수율을 계산하였다. 돈피 단백질을 효소 처리하여 얻은 가수분해물의 수율은 64.1%였고, 300 kGy로 방사선조사하여 효소처리한 경우에는 98.0%로써 방사선조사에 의하여 34% 이상의 가수분해물이 증가하였다. 가수분해물을 분자량별로 구분하면, 분자량 10,000 이상의 가수분해물이 전체 가수분해물의 50% 이상을 차지하였고, 분자량 10,000 ~ 5,000 > 5,000 ~ 3,000 > 3,000 ~ 1,000 의 순서로 나타났다.

12. 돈피 단백질 가수분해물의 혈압강하, 항산화 및 혈전용해 효과를 in vitro에서 살펴보았고 in vivo에서 확인하였다.

13. ACE 저해율은 분자량 10,000 이상의 가수분해물에서 72.9%를, 분자량 10,000 ~ 5,000 에서 92.9%, 분자량 5,000 ~ 3,000 에서 91.8%, 그리고 분자량 3,000 ~ 1,000 에서 91.5%를 나타냈고, IC50은 각각 410 μg/ml, 380 μg/ml, 370 μ

g/ml, 그리고 890 μg/ml 로써 분자량 1,000 이하의 저분자 펩타이드에서 강한 것으로 보고된 기존의 연구결과와는 차이를 나타냈다.

14. DPPH radical scavenging 및 Superoxide anion scavenging 을 통하여 항산화 활성을 조사한 결과, 방사선조사처리된 돈피 단백질 가수분해물의 항산화 효과는 미미한 것으로 나타났다.

15. Fibrin plate법에 의하여 혈전용해 활성을 측정한 결과, plasmin 1unit/ml의 활성을 기준으로 하여 분자량 10,000 이상의 가수분해물은 89.8%, 10,000 ~ 5,000은 29.2%, 5,000 ~ 3,000은 20.3%, 그리고 3,000 ~ 1,000은 24.3%를 보였다.

16. Ames test를 통하여 콜라겐 가수분해물의 분자량별 돌연변이원성 시험을 실시한 결과, 방사선조사에 의한 돌연변이원성은 없는 것으로 나타나 안전성이 확인되었다.

17. SHR을 이용하여 콜라겐 가수분해물(분자량 10,000 이상, 10,000 ~ 5,000)의 *in vivo*에서의 혈압강하 효과를 살펴본 결과, SHR의 체중 증가에도 불구하고 2주 이후부터 대조군에 비하여 유의적으로 혈압강하가 뚜렷하게 나타났으며 이러한 유의적 차이는 4주간 지속되었다.

18. 고지방식을 한 SD rat을 이용하여 콜라겐 가수분해물의 항혈전능 효과를 조사하고자 전혈응고시간을 측정하였다. 전혈응고시간은 주령 및 체중이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 대조군에 비하여 가수분해물 처리군(분자량 10,000 이상)은 전혈응고시간이 길어지는 현상을 보였고, 특히 2주 이후에는 유의적으로 길어져 in vivo에서도 혈전용해 활성이 나타났다.

19. 혈압강하 및 항혈전능 효과가 나타난 한외여과 분획물(10,000 이상, 10,000 ~ 5,000)의 분자량을 측정하기 위하여 gel permeation chromatography(GPC)를 하였다. 표준검량선을 이용한 결과 콜라겐 가수분해물은 분자량 12,000, 8,000, 5,000 Da 크기인 것으로 나타났다.

20. GPC에서 분리된 가수분해물을 Vydac 218TP1010 column을 이용한 RP-HPLC에서 2차 분리하였다. 분자량 12,000 fraction과 5,000 fraction은 단

일 peak로 분리되었으며 Vydac 218TP54 column으로 단일 peak를 재확인하였다. 분자량 8,000 fraction은 RP-HPLC에서 분리가 지난하였다.

21. RP-HPLC에 의하여 분리한 분자량 12,000 및 5,000 펩타이드의 아미노산 배열을 조사하였다. 12,000 Da의 경우 10 잔기(residues)를 분석하였는데 R1 = Gly, Ala, Leu, Lys; R2 = Pro, unknown; R3 =Gly; R4 =Pro; R5 =Ala, Lys; R6 = Gly; R7 = Pro; R8 = unknown; R9 = Gly; R10 = pro로 나타났다. 본 결과를 살펴볼 때 분자량 12,000 fraction의 경우 순수한 단일 peptide로 구성되어 있다고 볼 수 없지만 전반적인 아미노산 배열은 Gly-Pro-X, Gly-Pro 계열이 대부분인 것으로 나타났다. 반면에 분자량 5,000의 경우에는 R1 = Gly, Leu, Ala; R2 = Pro, unknown; R3 = Gly이 주요 아미노산으로 검출되어 여러 아미노산으로 구성된 peptide가 혼재되어 있지만 분자량 12,000의 경우와 마찬가지로 Gly-Pro-X의 계열이 대부분인 것을 예상할 수 있었다.
22. 방사선조사에 의한 콜라겐 펩타이드 제조기술은 기존의 방법에 비하여 제조수율이 수배 증가하고 공정시간이 단축되는 결과를 분명히 보였다. 그러나 제조원가면에서는 추가비용이 들어가는 것으로 나타났다.

이상의 결과에서 돈피 단백질의 저분자화를 위한 환경친화적 기술로써 방사선조사가 매우 유용한 기술이고, 초고압처리 기술의 활용은 낮은 것으로 나타났다. 향후에는 돈피의 전처리 공정을 개선하여 현재의 150 kGy 이상의 조사선량보다 낮은 조사선량을 활용하는 방안이 모색되어야 하고, 이러한 기술이 식품가공기술로 이용될 수 있는 법적 조치가 이루어져야 한다.

SUMMARY

Ⅰ. Title

New technique for production of pigskin oligopeptides by irradiation and high pressure

Ⅱ. Purpose and Significance of Research

This project scheduled to develop the new technique environmentally friendly for the conversion of insoluble high molecular weight proteins into low molecular weight peptides by irradiation and high pressure. To achieve the purpose of this project, low value added pigskin were used for the study of processing technique of oligopeptides derived from collagen. And studied the physiological activity of oligopeptides in order to suggest the practical use of new processing technique that utilizes the irradiation and high pressure.

Ⅲ. Scope and Contents of Research

This project were studied for two years. At the first year, the preparation conditions of collagen hydrolysates by irradiation or high pressure were established. At the second year, studied the physiological activity of peptides isolated from collagen hydrolysates and set up the new processing model for producing of oligopeptides by irradiation.

Ⅳ. Results and Recommendation

1. Crushing process by chopper was more simple and made a good efficiency than that of hammer mill.
2. Recovery ratios of the salt soluble and acid soluble collagen were 6.0% and 7.9%, respectively.
3. Viscosity and turbidity of the salt soluble and acid soluble collagen treated with papain were decreased according to become longer the reaction time of papain.
4. Solubility of water soluble proteins was increased according to increase of irradiation doses, which showed the more than 60% of solubility at 300 kGy although showed 2% of solubility at 0 kGy.
5. Viscosity of water soluble proteins was decreased according to increase of irradiation doses, and turbidity showed similar trend also.
6. SDS-PAGE showed the low molecules, especially below 24 kDa, degraded from the collagen α-chains, β-components and γ-components, which increased according to increase of irradiation doses.
7. Effect of high pressure on the degradation of protein was insignificant although increased the pressure up to 600 MPa.
8. Treatment of papain on pigskin proteins not irradiated showed 55% of solubility of water soluble compounds, on the other hand, in case of irradiated at 300 kGy followed by papain treatment showed more than 90% of solubility.
9. According to band patterns of SDS-PAGE on soluble compounds of pigskin protein, showed that the treatments of irradiation and papain successively were the good methods for the degradation process of pig skin protein.
10. Recovery ratios of collagen hydrolysates showed 64.1% incase of papain

treatment, on the other hand, showed 98.0% through the irradiation at 300 kGy followed by papain.

11. ACE inhibition of collagen hydrolysates showed 72.9% at more than 10,000 Da, 92.9% at 10,000 ~ 5,000 Da, 91.8% at 5,000 ~3,000 Da, and then 91.5% at 3,000 ~ 1,000 Da. IC50 of collagen hydrolysates were 410㎍/㎕, 380㎍/㎕, 370㎍/㎕, and 890㎍/㎕, respectively.
12. Antioxidative activity of collagen hydrolysates did not appear almost.
13. Fibrinolytic activity of collagen hydrolysates compared with plasmin 1unit/ml showed 89.8% at more than 10,000 Da, 29.2% at 10,000 ~ 5,000 Da, 20.3% at 5,000 ~3,000 Da, and then 24.3% at 3,000 ~ 1,000 Da, respectively.
13. Desmutagenic effect of collagen hydrolysates confirmed the safety of irradiation process for production of oligopeptides.
14. *In vivo* test of SHR, the systolic blood pressure of SHR dieted collagen hydrolysates decreased significantly after 2 weeks.
15. In vivo test of SD rat, the blood clotting times of SDR dieted collagen hydrolysates(more than 10,000 Da) increased significantly after 2 weeks.
16. Through gel permeation chromatography, the molecular weight of collagen peptides were 12,000 Da, 8,000 Da, and 5,000 Da.
17. The amino acids sequencing showed that the peptides produced by irradiation process were grouped with a large percent of Gly-Pro-X, Gly-Pro series.
18. As a results of these studies, it was suggested that the irradiation process for production of oligopeptides from insoluble high molecular protein will be good process in the near future because of the short processing time and strong increase of recovery ratio.

CONTENTS

SUMMARY..... 8

CONTENTS..... 11

Chapter 1. Outline of research..... 17

Section 1. Significance of research..... 17

Section 2. Need for research..... 20

1. Technical viewpoint..... 20

2. Industrial viewpoint..... 23

3. Cultural viewpoint..... 23

Section 3. Scope of research..... 25

1. Purpose 25

2. Contents..... 25

3. Annual purpose and contents..... 26

Chapter 2. State-of-the-art..... 28

1. Situation and problems of techniques related..... 28

2. View and validity of techniques related..... 29

Chapter 3. Methods and results..... 32

Section 1. Methods and design of research..... 32

1. Research methods..... 32

2. Research design..... 33

3. Research scheme..... 34

Section 2. Materials and experimental methods..... 35

1. Purchase of raw materials..... 35
2. Pre-treatment 35
3. Chemical composition..... 36
4. Preparation of collagen peptide from salt- and acid soluble collagen 36
5. Irradiation..... 37
6. High pressure..... 38
7. pH and collagen contents..... 38
8. Protein solubility..... 38
9. Viscosity..... 40
10. Turbidity..... 40
11. SDS-PAGE..... 41
12. Preparation of collagen hydrolysates..... 41
13. ACE inhibition rate..... 42
14. Antioxidant activity..... 43
15. Fibrinolytic activity..... 44
16. Ames test 44
17. Systolic blood pressure..... 45
18. Blood clotting..... 46
19. Separation of peptides..... 47
20. Separation of active oligopeptides..... 48
21. Identification of oligopeptides..... 48
22. Amino acids sequencing of peptides 50
Section 3. Results and Discussion..... 51
1. Preparation conditions of collagen hydrolysates 51

1) Pre-preparation of pig skin..... 51

2) Chemical composition of crushed pig skin..... 53

3) Properties of salt- and acids soluble collagen..... 53

4) Changes of soluble proteins by irradiation and high pressure..... 57

5) Changes of soluble proteins by papain..... 65

2. Functional properties of collagen hydrolysates..... 71

1) Preparation of collagen hydrolysates..... 71

2) *In vitro* properties of collagen hydrolysates..... 72

3) Ames test of .collagen hydrolysates..... 82

4) *In vivo* properties of collagen hydrolysates..... 84

3. Separation of oligopeptides from collagen hydrolysates..... 88

1) Separation of collagen hydrolysates and identification of MW..... 88

2) Separation of active oligopeptides..... 90

3) Identification of oligopeptides..... 91

4) Amino acids sequencing of peptides..... 93

Section 4. Establishment of processing model of oligopeptide..... 94

1. Processing flowchart of collagen peptide by chemical methods..... 95
2. Processing flowchart of collagen peptide by irradiation methods.... 97
3. Investigation of processing time and cost..... 98

Chapter 4. Achievement and contribution to related fields..... 101

Chapter 5. Application plans of the resluts..... 102

Chapter 6. Technical oversea information collected during research..... 103

Chapter 7. Reference..... 111

목 차

요 약 문 2
SUMMARY 8
CONTENTS 11
제 1 장 연구개발과제의 개요 17
제 1 절 연구개발의 목적 17
제 2 절 연구개발의 필요성 20
1. 기술적 측면 20
2. 경제・산업적 측면 23
3. 사회・문화적 측면 23
제 3 절 연구개발의 범위 25
1. 연구개발 목표 25
2. 연구개발의 범위 25
3. 연차별 연구개발 목표와 범위 26

제 2 장 국내외 기술개발 현황 28
1. 국내・외 관련기술의 현황과 문제점 28
2. 관련기술의 전망 및 기술도입의 타당성 29

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 32
제 1 절 연구개발 방법 및 설계 32
1. 연구개발 방법 32
2. 연구 설계 33
3. 연구개발 추진체계 34
제 2 절 재료 및 방법 35
1. 시료 구입 35

2. 시료의 전처리 35
3. 일반성분 36
4. 염가용성 및 산가용성 콜라겐 펩타이드의 조제 36
5. 방사선조사 37
6. 초고압처리 38
7. pH 및 콜라겐 함량 측정 38
8. 단백질 용해도 38
9. 점도 측정 40
10. 탁도 측정 40
11. SDS-PAGE에 의한 단백질의 subunit 조성 41
12. 콜라겐 가수분해물의 조제 41
13. ACE 저해율 측정 42
14. 항산화 활성 측정 43
15. Fibrin plate를 이용한 혈전용해 활성측정 44
16. 방사선조사에 의한 복귀돌연변이원성 실험(Ames test) 44
17. SHR rat을 이용한 혈압강하 실험 45
18. Sprague-Dawley rat을 이용한 항혈전능 측정 46
19. Fast Protein Liquid Chromatography를 이용한 올리고펩타이드 분리 47
20. RP-HPLC를 이용한 활성 펩타이드의 2차 분리 48
21. RP-HPLC를 이용한 펩타이드 분획물의 순도 확인 48
22. 펩타이드 아미노산 서열 분석 50
제 3 절 결과 및 고찰 51
1. 돈피 유래 콜라겐 및 콜라겐 가수분해물의 제조조건 51
가. 돈피의 전처리 51
나. 분쇄 돈피의 일반성분 53
다. 탈지돈피의 염가용성 및 산가용성 콜라겐 특성 53
라. 방사선조사 및 초고압에 의한 돈피 수용성단백질의 변화 57

마. 방사선조사 후 효소처리에 의한 돈피 단백질의 변화..... 65
2. 돈피 콜라겐 가수분해물의 기능적 특성..... 71
가. 돈피 콜라겐 가수분해물의 제조..... 71
나. 돈피 콜라겐 가수분해물의 *In vitro* 기능성..... 72
다. 방사선조사 콜라겐 가수분해물의 돌연변이원성 시험..... 82
라. 돈피 콜라겐 가수분해물의 In vivo 기능성..... 84
3. 콜라겐 가수분해물의 올리고펩타이드 분리 및 정제..... 88
가. Fast Protein Liquid Chromatography를 이용한 콜라겐 가수분해물의 분리 및 분자량 확인 88
나. RP-HPLC에 의한 2차 분리..... 90
다. 분리된 콜라겐 펩타이드의 순도 확인..... 91
라. 올리고펩타이드의 주요 아미노산 구성 및 배열..... 93
제 4 절 콜라겐 올리고펩타이드 생산 모델 정립..... 94
1. 화학적 방법에 의한 콜라겐 펩타이드 제조공정도..... 95
2. 방사선조사를 이용한 콜라겐 펩타이드 제조공정도..... 97
3. 콜라겐 올리고 펩타이드 제조공정 시간 및 생산비용 검토..... 98

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도..... 101

제 5 장 연구개발결과의 활용계획..... 102

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학..... 103

제 7 장 참고문헌..... 111

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

식품의 방사선조사에 대한 건전성 또는 안전성에 관한 연구는 1960년대부터 추진하기 시작하여 1980년에 FAO/IAEA/WHO 식품조사합동전문위원회에서 10kGy 이하로 방사선조사된 식품은 독성학적, 미생물학적 및 영양학적으로 안전하다고 발표하였으며, 1983년에는 Codex 국제식품규격위원회에서도 방사선조사식품에 대한 Codex 일반규격과 조사시설 운전에 관한 기준을 채택하여 모든 회원국에게 적극적인 활용을 권장하였고, 1992년에는 WHO가 방사선조사 관리수칙에 의거 처리된 방사선조사식품은 독성학적, 미생물학적 및 영양학적으로 안전하다는 재확인을 공식 발표한 바 있다. 또한 WHO, FAO 및 UN 환경위원회 등에서는 식품의 살충, 살균을 위해 사용되는 농약 및 화학훈증제가 발암성 등 인체 안전성과 환경공해의 문제를 발생시킴에 따라 이들의 사용을 금지하는 추세이며 대체 방안으로서 방사선조사를 권장하고 있다.

방사선조사식품의 세계적 허가 현황에 대한 FAO/IAEA/WHO 자료(2003. 4)에 따르면 선진국(지역적 분포는 유럽>북중미>아시아>아프리카, 중동)을 중심으로 전세계 52개국에서 200기 이상의 방사선조사시설로 향신료, 곡류, 과실류, 채소류, 육류 및 수산물 등 250여 품목의 식품군에 방사선조사를 하고 있는데, 주로 농수축산물의 숙도 및 생리적 숙성 지연, 저장기간 연장, 발아억제, 살충, 살균, 기생충 제거, 검역처리, 병원환자용 무균식, 군대식품, 우주식품 등의 다양한 용도로 이용하고 있다. 이와 같은 국제적 상황변화에 따라 세계 각 국에서는 자국의 실정에 적합한 조사식품의 허가규정과 산업화에 필요한 조사시설의 확충에 적극적인 입장을 가지게 되었고, 최근에는 식품안전성 확보를 위한

HACCP 관리체제의 CCP로 활용하는 등 비가열살균기술로써 활용범위와 연구영역을 넓혀가고 있을 뿐만 아니라 환자, 군인 및 우주인을 위한 특수용도식품 그리고 초·중·고 학생들을 위한 학교급식용 안전식품제조를 위한 가공기술로 활용하고 있는 추세이다. 일본 원자력연구소에서는 방사선조사기술을 식품의 살균 및 발아억제에 대한 기초자료 확보와 생물학적·생화학적 관점에서 실용화 연구에 중점을 두고 있으며, 특히, hydrogel을 이용한 wound dressing, 바다 오염물질의 흡착제, 전자선을 이용한 유해환경물질(예; dioxin)의 분해기술 등은 이미 실용화되었으며 이외에도 DNA level에서 기초연구를 수행하는 것으로 조사되었다. 그리고 전자선의 법적 허가는 우리나라와는 달리 감마선, 전자선, 마이크로파, X선 등의 사용허가 규제가 없고, 식품 종류에 따라 적성 선원을 사용하도록 권장하고 있으며, 전자선의 이용 가능성에 대한 연구가 집중적으로 이루어지고 있다.

한편, 초고압처리기술은 일정한 온도에서 제품 전체에 균일하에 높은 정압력(static pressure)을 가하는 공정기술로써 기본적으로 isostatic pressing, quartz growing, chemical reactors, 및 해저심해 장비를 점검하는 simulator 등에 활용되고 있다(Deplace 등, 1992). 식품산업에서 이용하는 초고압처리기술은 isostatic pressing 기술로써 상대적으로 낮은 온도에서 높은 정수압력을 가하여 살균처리를 하거나 식품의 물성을 변화시키는데 이용하고 있는데, 일반적으로 4,000 ~ 9,000 atm의 초고압에서 효소와 미생물은 불활성화되는 것으로 나타나고 있다(홍석인, 2000). 초고압에 의한 물성변화에서는 핵산물질(DNA)에 비하여 단백질분자가 압력에 저항성이 낮은 것으로 나타나는데, 특히 세포막의 구성단백질은 초고압처리에 의하여 쉽게 변성되고 인지질의 크기가 감소되면서 세포벽이 비가역적으로 분해되는 결과를 보이고 있다(Farr, 1990). 초고압처리기술을 이용한 식품은 일본의 明治屋에서 개발한 잼류가 세계 최초인 것으로 보고되고 있으며, 이외에 초고압기술을 이용하여 실용화한 제품의 경우는 과즙 쓴맛의 원인인

리로닌 생성을 방지한 그레이프 후르트 주스(POKKA Corporation), 풍미의 변화를 최소화한 밀감과즙(和歌山農協食品工業), 냉동온도에서도 과일 본래의 형상 및 식감을 느낄 수 있는 과일(日淸製油) 등이 있다(김윤지 등, 2005). 이와같이 방사선조사기술(RT: Radiation Technology)이나 초고압처리기술(HPT: High-Pressure Technology)과 같은 냉온처리기술은 미생물 및 효소의 불활성화에 뛰어난 효과가 입증되고 있을 뿐만 아니라 식품물성변화를 위한 환경친화적 기술로 이용되는 추세인데 국내외적으로 아직 실용화에 대한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 미래의 식품안전기술 및 식품신가공기술로 활용가치가 높은 방사선조사기술과 초고압처리기술을 활용하여 불용성고분자단백질의 저분자화를 위한 환경친화적 가공기술을 개발하고자 하였으며, 이러한 목적 달성을 위한 기초연구로써 부가가치가 낮은 돈피를 소재로 하여 돈피 주요 구성성분인 콜라겐의 저분자 펩타이드화를 위한 방사선조사기술과 초고압처리기술의 공정 적용성을 연구하였으며, 이러한 공정을 통하여 제조된 콜라겐 펩타이드의 기능성 연구를 통하여 방사선조사기술과 초고압처리기술의 기능성올리고펩타이드 제조기술 활용성을 제시하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

저급 식육자원인 돼지 껍질은 식용으로 이용되기보다는 산이나 알카리로 처리하여 제조한 콜라겐, 또는 젤라틴으로써 의약품(캡슐, 정제, 지혈대, 인공콩팥, 인공피부 및 봉합사), 화장품(크림, 연고제) 및 식품(결착제, 증량제, 물성개량제) 분야에서 광범위하게 이용되고 있다. 최근에는 콜라겐 소재가 비만억제, 피부노화억제, 피부탄력개선 등과 연관이 있는 것으로 알려지면서 기능성식품 소재로 점차 이용범위가 확대되고 있으며, 콜라겐 유래 올리고펩타이드의 생리활성 기능이 밝혀지면서 콜라겐 올리고펩타이드 제조 기술이 주요 관심의 대상이 되고 있다.

콜라겐의 아미노산 구조는 $(Gly-X-Y)_n$으로서 이중 X는 proline, Y는 hydroxyproline으로 되는 경우가 1/3 정도이고, 나머지 2/3는 다른 아미노산으로 존재하는 것으로 일반적으로 알려지고 있는데(이무하, 1988; Piez, 1966), Gross(1974)는 α_1-3중 나선구조에서 Gly-Pro-Y, Gly-X-Hyp 형태가 각각 21.4%와 21.2%이고, 10.1%가 Gly-Pro-Hyp 형태임을 보고한 바 있는데, 최근 Togashi 등(2002)은 인간 태반 추출물의 항산화 효과를 관찰하는 중 태반 추출물에 존재하는 올리고펩타이드가 강한 항산화 활성을 가지는데, 주요 활성 물질이 Glycine-X-Y 형태의 콜라겐 유래 올리고펩타이드라고 보고하고 있다. 또한 Samonia 등(2002)은 glyproline peptide family (Pro-Gly, Gly-Pro, Pro-Gly-Pro, Hyp-Gly, Gly-Hyp, cycloPro-Gly)가 유사한 생리활성을 가지는 것으로 보고하였고, glyproline peptide family의 생리활성 효과는 혈전용해작용, 위점막보호기능, 식욕감퇴효과(Samonina 등, 2002; Ashimarin, 1998), morphin analgesia 저

해 및 기억력 증강(cycloPro-Gly) 효과(Ashimarin, 1998; Samonina 등, 2000; Gudasheva 등, 1996) 등인 데 이러한 glyproline peptide family의 가장 좋은 원료는 껍질에 다량 함유되어 있는 콜라겐인 것으로 밝혀지고 있다(Samonina 등, 2002). 이와같이 콜라겐 유래 올리고펩타이드의 생리활성이 점차 밝혀지면서 콜라겐 올리고펩타이드의 활용 범위가 넓어질 것으로 예상되고 있는데, 일반적으로 콜라겐 펩타이드는 산 또는 알카리를 처리하여 콜라겐을 제조한 후에 콜라겐을 효소 가수분해시켜 펩타이드를 제조하는 공정을 거치게 되므로 다량의 산, 알카리 처리에 의한 폐수처리 등 환경오염 문제가 발생되고, 산, 알카리에 원료를 장시간 침지시켜 용출시키기 때문에 제조시간이 오래 걸리는 단점이 있다.

일반적으로 방사선조사 에너지와 가열 에너지에 의한 식품성분의 변화는 그림 1과 같다(이철호, 1998). 50 kGy 이하의 방사선조사는 100℃ 끓는 물에 의한 성분변화와 유사하며, 100 kGy에서는 150℃이상의 가열에 의한 품질변화와 유사한 현상을 나타내며 500 kGy 이상에는 식품의 회화시 발생되는 것과 유사한 발암물질 생성가능성이 있는 것으로 나타나고 있다. 이러한 식품성분의 변화를 비교할 때 50 kGy 이상의 고선량 방사선조사가 식품성분의 구조를 변형시키고 있으며, 고분자물질의 저분자화 가능성이 있다는 것을 제시하고 있다.

콜라겐을 이용한 올리고펩타이드 제조기술과 기능성에 대한 연구는 아직 초기 단계이며, 특히 그림 1에 제시한 방사선조사에 의한 에너지와 초고압처리에 의한 에너지 기술을 이용한 콜라겐 올리고펩타이드 제조공정은 아직 국내외적으로 시도된 바가 없다. 이미 언급한 바와 같이 식품의 위생처리 및 물성변화를 위한 신가공기술로써 방사선조사기술과 초고압처리기술의 활용성 및 범용성에 대한 연구가 진행되고 있는 가운데 국내외적으로 아직 시도된 바 없는 고분자물질의 저분자화를 위한 공정개발은 환경친화적 가공기술로써 그 기술적 가치 및 학술적 가치가 충분하며, 이러한 기술은 국내외 특허기술로 보호되어 국내

Fig. 1. 방사선조사(irradiation)와 가열(heating) 에너지에 의한 식품성분의 변화

기술의 세계 일류를 기하여야 할 것으로 생각된다. 세부적으로 이러한 기술에는 돈피의 주성분인 콜라겐을 산 또는 알카리처리하여 추출하고, 효소처리한 다음 올리고펩타이드를 제조하는 기존의 공정에서 산·알카리 처리를 대체할 수 있는 새로운 가공기술을 도입하여 화학물질에 의한 환경오염 문제를 최소화할 수 있는 방안을 제시하여야 하고, 단순화된 제조공정을 통해 대량생산이 가능한 경제성있는 기능성 올리고펩타이드를 제조할 수 있는 기술의 확립이 필요하다. 이러한 신기술이 고분자물질의 저분자화에 직접 이용될 수 있는 기술로 이용된다면 국내외적으로 혁신적인 기술로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

2. 경제・산업적 측면

식품산업에서 돼지 껍질은 주로 산가용성 콜라겐 및 젤라틴 제조 원료로 이용되고 있으며, 이들은 육제품, 젤리, 아이스크림 등의 결착제, 증량제, 안정제 및 물성개선제 등의 소재로 활용되고 있다. 최근 국내외적으로 콜라겐과 콜라겐 올리고펩타이드의 기능성이 새롭게 조명되면서 이들을 첨가한 기능성 식품의 유통이 증가되는 추세를 보이고 있는데, 이들 기능성 식품 또는 원료의 대부분이 일본, 독일 등 수입에 의존하고 있으며 국내 일부 기업에서만 제품 생산을 하고 있는 실정이다. 국내의 콜라겐 및 콜라겐 올리고펩타이드 제조 기술은 일부 기업에서만 보유하고 있고, 제조기술도 원료를 산 또는 알카리 처리하여 침지・용해・분리 및 정제 ・ 살균 공정 등을 거치는 방법으로 화학물질에 의한 폐수처리문제, 장시간 처리에 의한 원료의 변성 문제 등이 제조 기술의 문제점으로 지적되는 바, 산 또는 알카리 사용을 억제하거나 최소화하고, 공정을 단순화하여 경제성있는 고순도 기능성 물질을 생산할 수 있는 환경친화적 신기술을 개발하여 식품산업체에 보급한다면, 현재 대부분 일본 및 독일 등지에서 수입하고 있는 콜라겐 원료를 오히려 역수출할 수 있는 계기가 될 뿐만 아니라 국내 기술의 해외 진출도 가능한 중요한 의의를 지니고 있다.

3. 사회・문화적 측면

식품의 방사선 처리는 선진국 및 국제기구에서는 가장 안전하고 효율적인 식품 위생화 처리기술로 인정하고 있으며, 최근에는 식품물성 변환기술, 알러지원 제어기술, 공정개선기술 등으로 그 범위를 넓혀가고 있는 추세이다. 그러나 우리나라 국민들은 아직 방사선조사 식품의 안전성에 대한 우려가 있고 이로 인하여 방사선조사기술의 활성화가 미진한 상태이다. 따라서 방사선조사기술을 식

품가공기술로 접목시켜 국내 식품기술의 국제경쟁력을 높이기 위해서는 국민의 신뢰도를 제고할 수 있는 방사선조사식품의 안전성 연구, 검지기술 연구 등이 별도로 추진되어야 할 것으로 생각된다. 방사선조사 기술과 초고압 처리기술은 식품의 물성을 변화시킬 수 있는 효율적인 냉온처리 가공기술로 보고되고 있으므로(변명우 등, 2003; 김윤지 등 2003) 방사선조사 기술 및 초고압처리 기술을 생명공학기술과 접목시키는 연구 및 기술개발은 현재 잇슈가 되고 있는 환경오염을 최소화할 수 있는 대체 기술로 가능하며, 동시에 이러한 신기술은 노령화 시대를 맞이하여 기능성 물질을 안정적으로 공급할 수 있는 제조여건을 제공할 수 있으므로 사회·문화적 측면에서도 긍정적인 기술로 평가될 것으로 생각된다.

제 3 절 연구개발의 범위

1. 연구개발 목표

방사선조사기술 또는 초고압처리기술을 이용한 돼지 껍질 유래 기능성 올리고펩타이드의 환경친화적 제조기술 개발

2. 연구개발의 범위

- ○ 방사선조사 기술을 이용한 콜라겐 가수분해물 제조 조건 확립
- ○ 초고압처리 기술을 이용한 콜라겐 가수분해물 제조 조건 확립
- ○ 방사선조사 기술 및 초고압처리 기술을 병합한 콜라겐 가수분해물 제조 조건 확립
- ○ 기능성 올리고펩타이드 제조 기술 개발
- ○ 제조된 올리고펩타이드의 기능성 탐색
- ○ 올리고펩타이드의 적정 제조기술 모델 정립

3. 연차별 연구개발 목표와 범위

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	연구개발결과
1차년도 (2004)	방사선조사 및 초고압처리에 의한 콜라겐 가수분해물 제조기술 개발	○ 화학물질 이용 올리고펩타이드 제조 · 화학물질 사용량 · 수율 · 미세구조 · 적성 시험 : 점도, pH, 투명도,	○ 수율 및 가공적성 확인
		○ 방사선조사 기술 적용 콜라겐 가수분해물 제조 · 적정 조사선량 선정 · 적정 효소 선정 · 수율 · 미세구조 : 분해 정도 확인 · 적성 시험 : 점도, pH, 투명도,	○ 방사선조사기술을 적용한 콜라겐 가수분해물 제조 조건 수립
		○ 초고압처리 적용 콜라겐 가수분해물 제조 · 적정 압력/효소 선정 · 수율 · 미세구조 : 분해 정도 확인 · 적성 시험 : 점도, pH, 투명도,	○ 초고압처리 기술을 적용한 콜라겐 가수분해물 제조 조건 수립
		○ 환경친화적 제조기술 수립 · 수율 · 미세구조 · 적성 시험	○ 환경친화적 콜라겐 가수분해물 제조 조건 수립 및 경제성 검토

2차년도 (2005)	기능성 올리고펩타이드 제조기술 개발 및 기능성 탐색	○ 기능성 올리고펩타이드 분리 및 정제 기술 개발 · 분자량별 분획 · 수율 및 순도 · 분획 펩타이드의 주요 아미노산 조성 및 서열 분석	○ 기능성 올리고펩타이드 분리 및 정제 조건 수립
		○ in vivo 생리활성물질 분리 및 기능성 탐색 · 혈압강화 효과 · 항산화 효과 · 혈전용해 효과	○ 생리활성물질 분획 및 기능성 확인
		○ 타겟 올리고펩타이드의 제조기술 개발(모델 정립) · 타겟 올리고펩타이드 선정 · 제조기술 모델 정립	○ 올리고펩타이드 제조기술 모델 정립 및 경제성 검토

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

방사선조사기술은 안전성에 관한 과학적 결과와 데이터를 바탕으로 화학물질에 의한 식품의 살균, 유용 성분 추출, 물성 개선, 신소재 개발 등을 대체할 환경친화적 기술로 인식되고 있으며, 이와 관련된 연구가 미국, 캐나다 및 유럽연합 등 선진국을 중심으로 이루어지고 있다. 식품 유래 고분자물질을 제조하거나 고분자물질을 저분자화 하기 위해서는 화학처리 공정, 효소처리 공정 및 미생물처리 공정 등이 이용되는데, 식품제조공정에서 화학물질을 대체하거나 사용량을 최소한으로 줄일 수 있는 환경친화적 기술 개발을 위하여 방사선조사기술 또는 초고압처리기술을 접목시켜 돈피 주성분인 콜라겐에서 콜라겐 올리고펩타이드를 제조하기 위한 기술 개발에 대한 연구는 국내외적으로 아직 없는 실정이다. 그러나 국내에서 고분자물질인 키토산이 방사선조사에 의하여 저분자화 되고, 이로 인하여 키토산올리고당으로 전환되고 있음을 보고한 바 있으므로(최 등, 2002), 키토산과는 분자 구조가 다르다할 지라도 콜라겐 역시 방사선조사에 의하여 분해가 일어나 저분자화될 것으로 예상하였으며, 본 연구결과에서도 방사선조사에 의하여 고분자물질인 콜라겐의 저분자화가 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다.

초고압처리 기술은 미국, 유럽 및 일본 등에서는 식품의 상용화를 위한 가공처리기술로써 활발히 연구가 진행되고 있으며, 고압처리에 의한 근육 구조 변화, 단백질의 겔화, 오렌지 주스의 풍미 유지, 과즙의 쓴맛 원인인 리모닌 생성 억제 등과 같은 여러 분야에서 연구가 진행되고 있다. 반면에 국내에서는 녹즙의 저장성 연장을 위한 연구, 김치의 살균효과, 무취마늘 제조 등에 관한 연구가 수

행되고 있으나 아직 초기 단계이다(김윤지 등, 2005). 그러나 초고압처리 기술은 단백질의 물리적, 생화학적 특성 변화에도 큰 영향을 주는 것으로 나타나기 때문에 고분자의 저분자화를 위한 공정 개발에도 활용할 수 있을 것으로 생각되고 있다. 일반적으로 200 ~ 300 MPa의 압력에서는 단백질 및 효소의 가역적 불활성화가 일어나고, 300 ~ 400 MPa에서는 세균, 효모의 불활성화 및 사멸, 그리고 400 ~ 600 MPa의 압력 범위에서는 근원섬유단백질의 변성 등이 일어나는 것으로 보고되고 있는데(Seiichiro, 2003). 본 연구결과에서는 400 ~ 600 MPa 수준의 초고압에서 콜라겐 분자의 저분자화에 미치는 영향이 미미한 것으로 나타났다. 따라서 콜라겐 분자구조를 변형시키기 위해서는 600 MPa 이상의 초고압을 이용하여야 할 것으로 생각되었으나 식품에서 이러한 초고압을 이용하기에는 경제성을 고려하여야 할 것으로 생각된다. 또한 방사선조사 및 초고압처리에 의하여 고분자의 저분자화가 이루어진다 하더라도 기존의 공정에 의하여 생산된 제품과 수율 및 품질 등의 비교 연구를 통하여 품질을 향상시켜야 할 과제가 남아 있다. 방사선조사기술 또는 초고압처리기술을 이용하여 고분자물질을 저분자화 하는 연구는 국내에서 처음으로 시도하는 연구이므로 연구 과정에서 약간의 시행착오를 겪었으나, 본 연구결과를 토대로 할 때 방사선조사기술은 콜라겐 올리고펩타이드 제조를 위한 단순화 및 환경친화적 공정개발을 위한 대체 기술로 이용될 수 있을 것으로 생각되었다.

2. 관련기술의 전망 및 기술도입의 타당성

지금까지 식품의 방사선조사기술에 대한 연구는 국내외적으로 감자나 양파의 발아·발근 억제, 과실류의 숙도지연, 곡물류의 해충구제 등을 목적으로 하였으나 최근에는 농수축산물에 존재하는 병원성미생물의 살균 또는 전염성기생충의 살충 등 식품안전성에 초점을 두고 있다.

식품의 방사선조사기술은 cold process의 특성을 지닌 식품의 살균기술로써, 위생적 식품 생산을 위한 HACCP의 CCP 활용기술로써, 훈증제 등 살균·살충용 화학약품의 사용금지에 따른 농축수산물 저장 및 유통을 위한 대체기술은 물론 고분자물질의 융합 또는 분해기술, 유용성분 추출기술, 알러젠 제어기술, 유해환경물질(예: dioxin 등) 분해기술, 맞춤형 무균환자식 제조기술, 우주인 및 군인을 위한 특수용도식품 등의 가공기술로써 그 이용가치가 점차 확대될 전망이다. 국내의 식품 방사선조사기술 연구는 한국원자력연구소를 중심으로 이루어지고 있으며, 대학 및 연구소 에서는 부분적인 연구만 진행되고 있으므로 차세대 식품가공기술로써 방사선조사기술을 활용하여 세계일류 식품가공기술을 확립하기 위해서는 끊임없는 연구투자와 지속적인 관심이 요구된다. 한편, 식품성분을 변화시키지 않으면서 효율적으로 위생처리를 할 수 있는 초고압처리기술도 식품의 종류에 따라 일본, 미국을 중심으로 실용화되어 제품이 생산되고 있는 실정이나 국내에서는 아직 기초적인 연구수준에 불과하며, 우리 연구원에서 양념육을 중심으로 초고압처리에 의한 위생처리 및 고품질화에 대한 연구가 3 ~ 4년 전부터 이루어지고 있을 뿐이다. 초고압처리 기술은 단백질의 변성, 미생물의 살균효과 등이 탁월한 것으로 보고되어 식품의 새로운 가공, 살균 기술로 주목받고 있으므로 이에 대한 기초연구는 물론 실용화연구를 통하여 식품가공기술을 한 단계 높여야할 시점이다.

한편, 방사선조사기술을 식품가공기술에 접목시켜 세계 일류기술로 활용하기 위해서는 방사선조사에 대한 조사선원 및 허용품목에 대한 국내 법적 허용기준에 대한 전면적인 재검토가 필요하다. 특히 감마선, 전자선, 마이크로파, X선 등과 이온화에너지의 모든 범위의 사용허가가 필요하며 식품 종류에 따라 적성선원을 사용하도록 권장할 필요가 있다. 최근 선진국에서는 감마선 이외에 전자선의 식품 이용 가능성에 대한 연구가 집중적으로 이루어지고 있는 실정이므로 국내에서도 이러한 방사선조사기술 뿐만 아니라 초고압처리와 같은 냉온처리기

법을 활용한 식품가공기술의 확립이 시급하다. 식품소재 측면에서 볼 때, 소, 돼지 등 대동물의 껍질은 콜라겐이나 젤라틴으로 제조되어 식품산업에서 결착제, 증량제 및 물성개선제 등으로 주로 이용되어 왔는데, 콜라겐이 비만억제, 피부노화억제, 피부탄력개선 등과 연관이 있고, 콜라겐 유리 올리고펩타이드가 혈전용해작용, 위점막보호기능, 식욕감퇴효과(Samonina 등, 2002; Ashimarin, 1998), morphin analgesia 저해 및 기억력 증강(cycloPro-Gly) 효과(Ashimarin, 1998; Samonina 등, 2000; Gudasheva 등, 1996) 등이 있는 것으로 밝혀짐에 따라 이들 콜라겐 원료들은 고부가가치 기능성소재로 이용될 전망이다.

방사선조사 기술과 초고압처리 기술을 접목하여 고분자물질에서 저분자물질로 전환하는 연구는 국내외에서 일부 진행된 바 있으나, 돼지 껍질과 같은 저급 식육자원에서 콜라겐 또는 콜라겐 올리고펩타이드를 제조할 때 방사선조사기술과 초고압처리기술을 접목시킨 연구는 거의 없으므로 이 분야의 외국 기술도 아직은 초보 단계이다. 따라서 국내 연구진이 방사선조사기술과 초고압처리기술을 이용한 환경친화적 콜라겐 올리고펩타이드 제조기술을 확립하면 관련 분야의 기술을 선점할 수 있으므로, 자체적으로 연구 역량을 키우는 것이 국내 식품산업 기술의 발전에 기여할 것으로 생각된다. 또한 본 연구결과 콜라겐 또는 콜라겐 올리고펩타이드 제조시 사용하던 기존의 산 또는 알카리를 대체하거나 사용량을 최소화할 수 있는 공정으로 실용화 기술이 확립된다면, 이러한 기술은 동식물성 고분자 물질의 분리 및 저분자화를 위한 혁신적인 환경친화적 기술로 이용될 수 있을 뿐만 아니라 기타 식품산업의 활용도가 광범위할 것으로 판단된다. 특히 저급 식육자원을 이용한 고부가가치 기능성 펩타이드 제조 기술의 활성화로 기능성 식품소재 시장에서 기술 선점을 통한 국가 경제에 크게 이바지할 것으로 생각된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 방법 및 설계

1. 연구개발 방법

가. 연구의 효율적 운용을 위하여 분야별 세부책임자를 두고 월 1회 이상의 주기적 회의를 통하여 추진상황과 연구결과를 점검하였다.

나. 1차년도에서는 콜라겐 가수분해물 제조 기술의 적정 조건을 확립하기 위하여 방사선조사 기술, 초고압처리 기술 및 효소처리 기술을 병행하여 실험하였고, 이때 조사선량별, 압력별 그리고 효소 적용 조건 등을 중심으로 연구하였다.

다. 2차년도에서는 1차년도에서 조건을 수립한 콜라겐 가수분해물 제조 기술을 이용하여 분자량별로 유사한 올리고펩타이드를 분리하고 정제하였으며, 분획된 올리고펩타이드의 생리활성을 탐색하여 향후 콜라겐 펩타이드의 활용성을 증진시키고자 하였다.

라. 본 연구를 통하여 개발된 방사선조사 이용기술은 특허로 보호함과 동시에 식품산업체에 기술 이전을 목표로 추진하였다.

마. 연구개발을 위한 추진 방법은 다음과 같다.

ㅇ 문헌조사 및 자료수집 : 방사선조사기술 및 초고압처리 기술에 대한 국내외 문헌조사는 특허, 논문, 서적 및 인터넷 탐색을 중심으로 하였으며 방사선조사시설을 구축하고 있는 (주)그린피아 및 한국원자력연구소를 방문하여 방사선조사 실용화기술에 대한 자문을 구하였다. 이외에 미국 아이오와주립대의

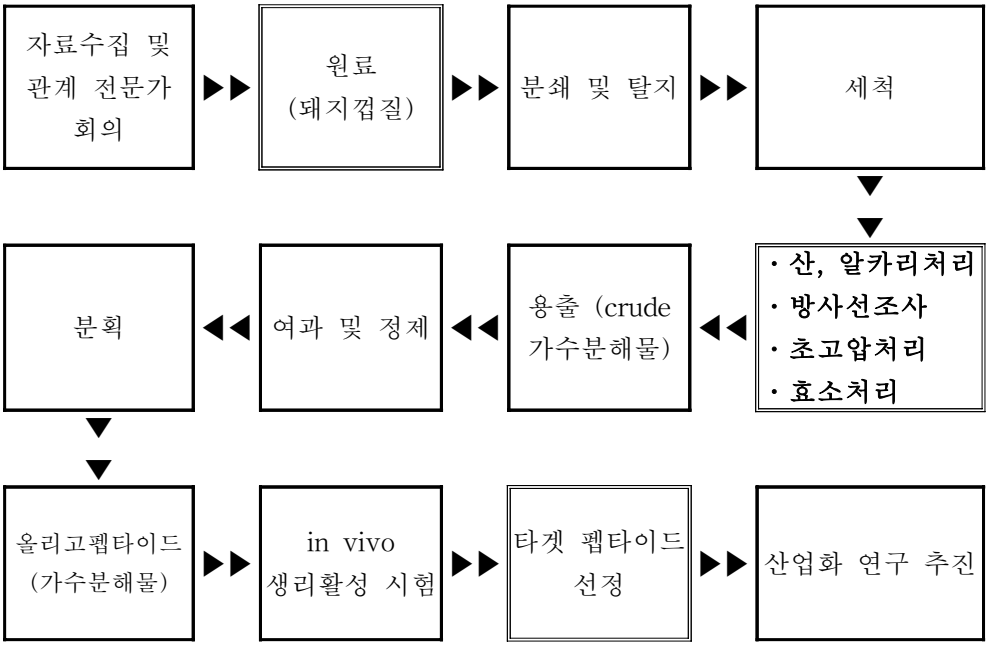
안동욱 교수, 경북대 권중호 교수, 조선대 김경수 교수, 한국원자력연구소 변명우 박사 및 조철훈 박사 등에게 자문 및 연구협력을 추진하였다.

○ 방사선조사는 한국원자력연구소 또는 한국원자력연구소의 실험실용 γ-ray 조사시설과 (주)그린피아의 상업용 γ-ray 조사시설을 이용하여 최대 300 kGy까지 조사하였다.

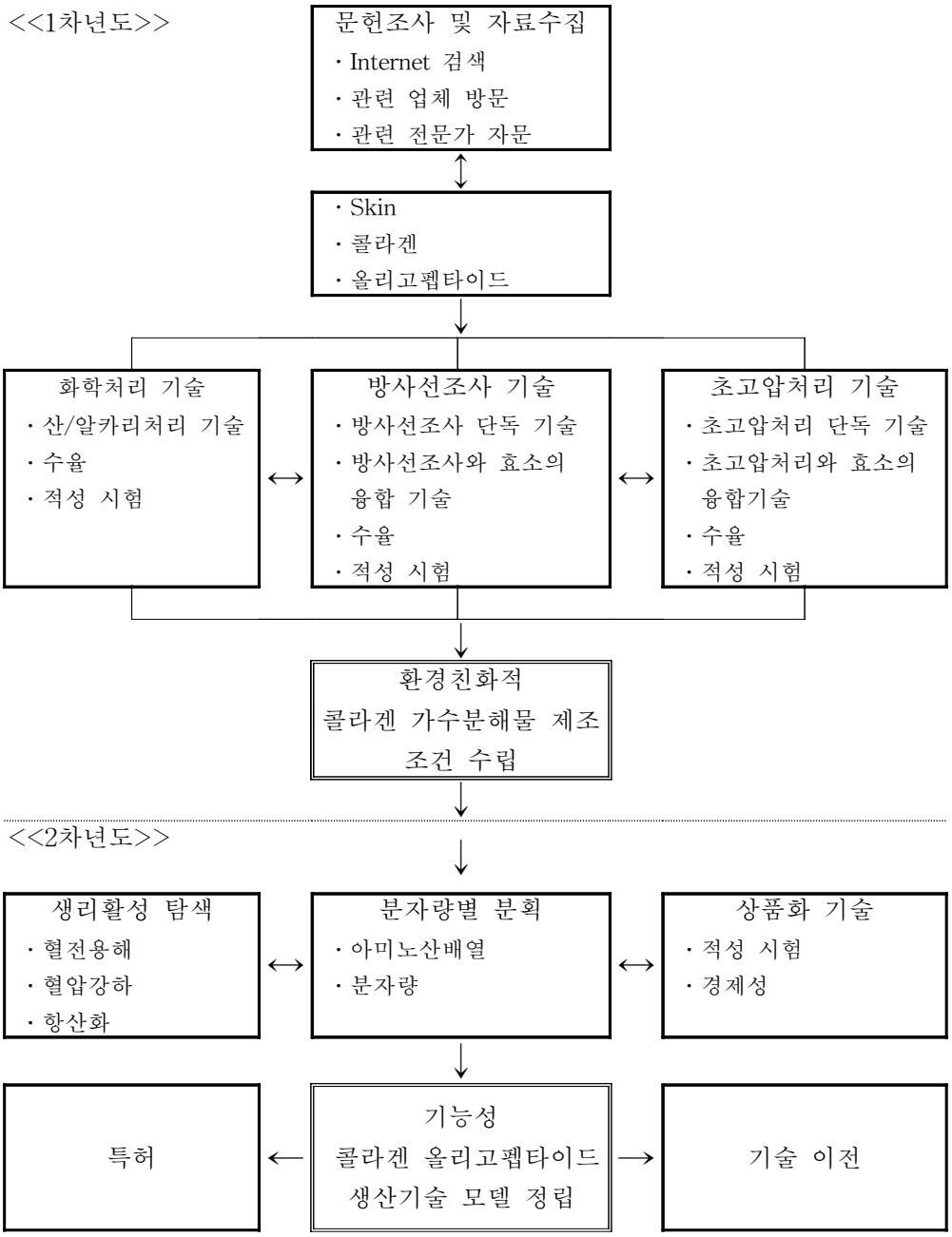
○ 초고압처리는 우리 연구원에서 보유하고 있는 초고압장치를 이용하여 최대 600 MPa까지 초고압처리를 이용하였다.

○ 기능성 올리고펩타이드 또는 콜라겐 가수분해물 제조기술은 산 또는 알카리를 대체하거나 사용량을 최소화하는 방향 그리고 공정의 단순화를 위한 연구를 중심으로 진행하였으며, 최종적으로는 분자량별로 분획하여 각각의 생리활성을 탐색하였다.

2. 연구 설계



3. 연구개발 추진체계


<<1차년도>>
문헌조사 및 자료수집
· Internet 검색
· 관련 업체 방문
· 관련 전문가 자문
· Skin
· 콜라겐
· 올리고펩타이드
화학처리 기술
· 산/알카리처리 기술
· 수율
· 적성 시험
방사선조사 기술
· 방사선조사 단독 기술
· 방사선조사와 효소의 융합 기술
· 수율
· 적성 시험
초고압처리 기술
· 초고압처리 단독 기술
· 초고압처리와 효소의 융합기술
· 수율
· 적성 시험
환경친화적 콜라겐 가수분해물 제조 조건 수립
<<2차년도>>
생리활성 탐색
· 혈전용해
· 혈압강하
· 항산화
분자량별 분획
· 아미노산배열
· 분자량
상품화 기술
· 적성 시험
· 경제성
특허
기능성 콜라겐 올리고펩타이드 생산기술 모델 정립
기술 이전

제 2 절 재료 및 방법

1. 시료 구입

본 실험에 사용한 돈피는 가락동 농수산물 시장에서 100kg 단위로 구입하여 knife를 이용하여 피하지방을 제거하였으며, 피하지방이 제거된 껍질에서 등 부위 만을 사용하였다.

2. 시료의 전처리

방사선조사와 초고압처리를 하여 콜라겐 펩타이드를 제조하기 위하여 피하지방이 제거된 등부위 껍질을 동결하여 hammer mill 또는 chopper를 이용하여 조분쇄한 다음, 탈지하여 건조하거나 하지 않고, 방사선조사와 초고압처리를 하거나 하지 않고 콜라겐과 콜라겐 가수분해물을 추출하였다.

가) Hammer mill에 의한 동결 분쇄

돈피 유래의 콜라겐 및 콜라겐 펩타이드의 추출을 용이하게 하기 위하여 hammer mill을 이용하여 돈피 원피를 조분쇄하였다. 피하지방이 제거된 돈피를 2.5 cm x 2.5 cm의 크기로 절단하고 dry ice를 이용하여 급속 동결하였으며, -40℃ 냉동고에 24시간 동안 저장한 후 hammer mill을 이용하여 조분쇄하였다. 분쇄물은 소포장하여 -40℃ 냉동고에서 저장하면서 방사선 조사, 초고압처리 및 콜라겐 가수분해물 추출에 사용하였다. 콜라겐 펩타이드 추출에 사용하였다. 분쇄에 사용한 hammer mill의 사양 및 특성은 Table 1과 같다.

Table 1. Mechanical characteristic of hammer mill.

Main motor	5.5 Kw, 7.5 HP, 60 Hz
r.p.m	1,740
Sieve size	Each 8mm hole, round type
Standard capacity	250 Kg/hr
Weight	200 Kg

나) 초파(chopper)를 이용한 분쇄

과도한 피하지방이 제거된 돈피를 2.5 cm x 2.5 cm의 크기로 절단하여 -20℃ 냉동고에서 24시간 동안 동결하였다. 돈피를 분쇄하기 전에 초파(AALEN W-114-T -80451-1, Germany)를 0℃로 충분히 냉각시켰으며, -20℃로 동결된 돈피를 -3℃로 해동시켜 직경 12 mm sieve에 1차 조분쇄한 다음 직경 3 mm sieve로 2차 미분쇄하였다. 분쇄물은 소포장하여 -40℃ 냉동고에서 저장하면서 방사선 조사, 초고압처리 및 콜라겐 가수분해물 추출에 사용하였다.

3. 일반성분

돈피의 일반성분 분석은 AOAC 방법에 따랐다. 수분함량은 105℃ 상압 가열건조법으로, 조단백질 함량은 semi-micro kjeldahl법으로 측정하여 질소보정 계수 6.25를 곱하였으며, 조지방 함량은 Soxhlet 추출법으로, 회분함량은 550℃ 회화법으로 측정하였다.

4. 염가용성 및 산가용성 콜라겐 펩타이드의 조제

Nimni와 Harkness의 방법(1966)을 약간 변형하여 염가용성 콜라겐과 산가용성 콜라겐을 제조하였다. 분쇄된 돈피에 -20℃로 냉각된 aceton을 5배량 가하여 상온

에서 30 ~ 60분간 정치시킨 후 상등액을 제거하였다. 상등액이 투명해 질 때까지 -20℃로 냉각된 aceton 처리를 반복하여 지방을 제거한 후, 남은 고형물을 상온에서 1 ~ 2시간 풍건, 완전히 건조시켰다. 건조시료의 20배량에 해당되는 0.15 M NaCl 용액을 첨가하여 4℃에서 24시간 동안 교반(8,000 rpm)한 후 7,000 x g에서 90분간 원심분리하여 상등액을 버리고 침전물만 모은 다음 20배량의 0.5 M NaCl을 첨가하여 4℃에서 24시간 동안 교반(8,000 rpm)하였다. 교반액을 7,000 x g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 거름종이(Whatman No.1)로 거른 여액을 동결건조하여 염가용성 콜라겐으로 하였다. 한편, 염가용성 콜라겐 제조 시 발생한 침전물에 20배량의 0.5 M citrate buffer(pH3.6)를 첨가하여 4℃에서 24시간 동안 교반한 후 7,000 x g에서 20분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 거름종이(Whatman No.1)로 거른 여액을 동결건조하여 산가용성 콜라겐으로 하였다.

염가용성 및 산가용성 콜라겐 유래 펩타이드의 조제는 선행연구(양승용 등, 2002)에서 경제성이 있으면서 분해능이 우수한 것으로 판명된 시판 papain 30,000(이하 papain으로 칭함)을 사용하였다. 염가용성 콜라겐 및 산가용성 콜라겐의 농도를 5 mg/mL, 20 mM Tris-HCl(pH 7.0)로 조절한 후 1% papain을 사용하여 0, 1, 2, 3, 4시간으로 구분하여 실온에서 반응시켰으며, 반응 정지는 1 mM idoacetic acid를 이용하였다.

5. 방사선조사

염가용성 콜라겐 및 산가용성 콜라겐을 제조한 후 효소처리로 펩타이드를 제조하는 공정 대신, 돈피에서 수용성 물질을 추출한 후 효소처리를 하여 펩타이드를 제조할 수 있는 환경친화적 대체 기술을 개발하고자 방사선조사를 이용하였다. 냉동분쇄된 돈피 및 탈지돈피를 건조하여 그린피아기술(주)(경기도 여주 소재)에서 보유하고 있는 상업적 조사시설인 γ-ray irradiator(JS-8900 automatic pallet irradiator, MDS-Nordion Co, Canada)를 이용하여 방사선조사를 실시하였고, 방사

선조사 과정 중 온도상승으로 인한 품질열화를 최소화하기 위해 아이스팩을 채운 스치로폴 박스에 시료를 담아 1 kGy/h 의 조사선량율로 20 kGy, 40 kGy, 60 kGy, 100 kGy, 150 kGy, 200 kGy, 250 kGy, 300 kGy의 총 흡수량을 얻도록 하였다. 흡수선량은 PMMA acryl dosimeter를 이용하여 확인하였고 조사 직후 시료를 아이스박스에 담아 실험실로 운반하였다.

6. 초고압처리

방사선조사된 돈피 분쇄물의 콜라겐 펩타이드 추출 수율을 높이기 위하여 초고압처리를 병행하였다. 초고압처리장치는 FAS autoclave systems(CIP-42260, USA)를 이용하였으며, 탈지돈피를 진공포장하여 0 MPa, 300 MPa, 400 MPa, 500 MPa, 600 MPa의 압력에서 10분과 20분간 실시하였다. 한편, 콜라겐 가수분해물의 추출 수율을 높이기 위해 300 kGy 까지 방사선조사한 탈지시료에 600 MPa의 압력으로 20분간 초고압 처리를 병행하였다.

7. pH 및 콜라겐 함량 측정

방사선조사에 의한 돈피의 pH 측정을 위해 분쇄된 돈피 0.9 g에 증류수 100 mL를 첨가하여 20분간 교반한 다음, pH meter를 이용하여 측정하였다. 염가용성 및 산가용성 시료와 방사선 조사 시료의 콜라겐 함량은 각 시료 0.01 g을 평량하고 여기에 6 N HCl 4 mL을 가하여 질소 가스로 purging하여 밀봉한 다음 110℃ 상에서 12 ~ 24시간 동안 가수분해 시켜 Jamall의 방법으로[13] hydroxyproline 함량을 측정하여 환산계수 7.5를 곱하여 콜라겐 함량을 계산하였으며, 탈지돈피의 조단백질 함량의 백분율로 표시하였다.

8. 단백질 용해도

방사선조사한 탈지시료 0.2 g에 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH7.0)용액

7.8 mL를 첨가하여 4℃에서 1시간 교반한 후 20,000 x g에서 30분간 원심분리 하였다. 상등액에 포함되어 있는 수용성 단백질 함량을 Biuret법(Layne, 1957)으로 측정하였다. 총단백질 함량은 탈지 돈피 0.2 g에 8 M urea, 2% SDS, 2% 2-mercaptoethanol, 20 mM Tris-HCl(pH 7.0) 용액 7.8 mL를 첨가하여 100℃에서 2분간 가열한 후 실온에서 24시간 교반하여 가용화 시켰다. 가용화 성분을 15% TCA와 1 : 1의 비율로 30분간 반응시킨 후 3,000 x g에서 20분간 원심분리 하여 단백질만을 분리하였다. 분리된 단백질을 24시간 동안 풍건한 후 1 N NaOH를 첨가하여 완전히 가용화 시켰다. 가용화된 단백질의 함량은 Biuret법에 의하여 540 nm에서 비색정량하였으며, 1 N NaOH에 대한 알부민의 표준 검량선(Fig. 2)으로 단백질 함량을 산출하였다. 단백질의 용해도는 총단백질 함량에 대한 수용성 단백질의 백분율로 표시하였다.

$$\text{단백질 용해도(\%)} = \frac{\text{원심분리후 상등액의 단백질 함량}}{\text{총단백질 함량}} \times 100$$

한편, 1% papain으로 효소처리한 수용성 단백질(또는 펩타이드)의 함량도 Biuret법으로 측정하여 상기의 방법으로 용해도를 계산하였다.

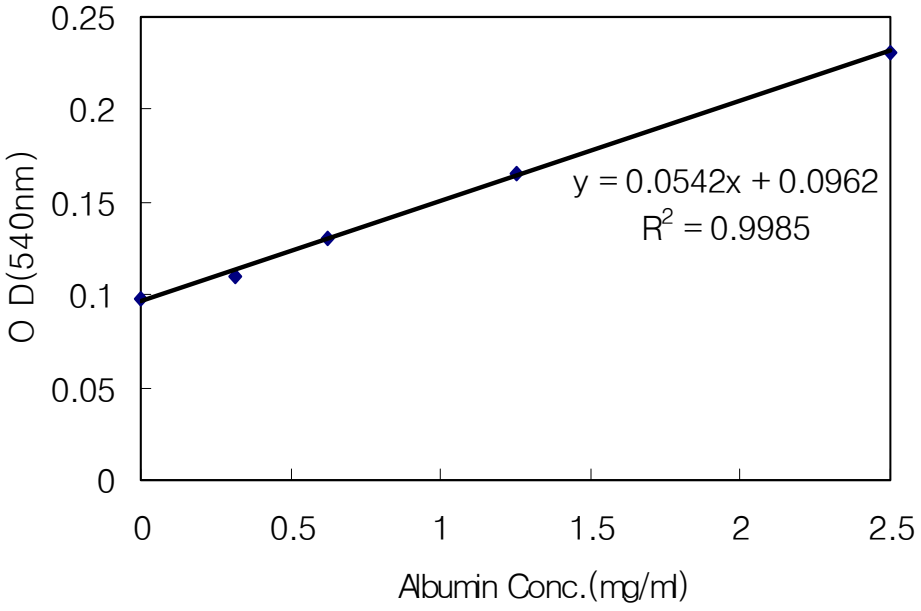


Fig. 2. Standard curve of albumin for calculation of protein concentration by biuret method.

9. 점도 측정

각각의 시료에서 추출한 용액의 점도는 직경 1 mm 크기의 Ostwald type 점도계(GA, ASTM-IP, 200)를 이용하여 측정하였다. 염가용성 콜라겐은 0.5 M NaCl의 용액에, 산가용성 콜라겐은 0.5 M citrate buffer(pH 3.6) 용액에 단백질 농도 1 ~ 2 mg/mL가 되도록 조절한 후 25℃ 항온조에서 점도를 측정하였다. 방사선조사 시료 및 방사선조사 후 효소처리한 시료는 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH 7.0) 용액에 단백질 농도가 1 ~ 2 mg/mL가 되도록 조절한 후 25℃ 항온조에서 측정하였다.

10. 탁도 측정

점도 측정법과 동일하게 시료를 조제하였다. 염가용성 콜라겐은 0.5 M

NaCl의 용액에, 산가용성 콜라겐은 0.5 M citrate buffer(pH 3.6) 용액에 단백질 농도 1 ~ 2 mg/mL가 되도록 조절하였으며, 방사선조사 시료 및 방사선조사 후 효소처리 한 시료는 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH 7.0) 용액에 단백질 농도가 1 ~ 2 mg/mL가 되도록 조절하여 340 nm에서의 흡광도(Spectrophotometer, JASCO UVIDEC-610, Japan)로 측정하였다.

11. SDS-PAGE에 의한 단백질의 subunit 조성

SDS-PAGE를 이용하여 분쇄 탈지 시료, 방사선조사 시료, 초고압처리 시료, 효소처리 시료 등의 단백질 sub-unit 변화를 검토하였다. 각각의 시료를 단백질 농도가 2 mg/mL이 되도록 8 M urea, 2% mercaptoethanol, 2% SDS, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)용액을 첨가하여 100℃에서 2분간 가열한 후 24시간 실온에서 교반하면서 가용화하였다. 가용화된 성분은 10%의 polyacrylamide gel을 이용하여 Laemmli의 방법에[17] 따라 SDS-PAGE를 수행하였다. 한편 콜라겐 가수분해물의 조성변화를 비교하기 위해 방사선조사한 탈지시료 0.2 g에 전체 중량의 1%가 되도록 papain을 첨가한 후 0.1 M NaCl, 20mM Tris-HCl(pH 7.0) buffer 7.8 mL에 용해 한 후 25℃에서 1 ~ 4시간 반응시켜 원심분리 한 다음 상등액을 취하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 분자량 표준물질은 205 kDa ~ 24 kDa 범위로 구성된 Sigma사 제품(M4038)을 사용하였다.

12. 콜라겐 가수분해물의 조제

300 kGy로 방사선조사 한 돈피 50 g을 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH 7.0) 2000 mL에 침지시킨 다음 전체 중량의 1%가 되도록 papain 가수분해효소를 첨가하여 25℃에서 1시간 동안 가수분해 시켰다. 전체 가수분해물의 약 5%가 되도록 1 mM idoacetic acid를 110 mL 첨가하여 실활 시킨 후 4℃에서 30min간 원심분리(7,000 rpm) 하였다. 상등액을 취하여 QuixStand

Benchtop Systems(Amersham Biosciences, UK)에 Xampler Cartridge Filter를 장착하여 UF-10 (MWCO 10,000이상), UF-5 (10,000 ~ 5,000), UF-3 (5,000 ~ 3,000) 그리고 UF-1 (3,000 ~ 1,000) 으로 분류하여 12psi 압력 하에서 500 mL/min 유속으로 한외여과 하였다. 한외 여과한 시료는 동결 건조하여 수율을 계산하였다.

13. ACE 저해율 측정

한외여과하여 얻은 동결건조 분획물들을 아래와 같이 ACE 저해효과 실험을 행하여 ACE 저해능을 가진 획분을 조사하였다. 각 콜라겐 가수분해물 시료는 10 mg/mL로 제조하여 그 시료액에서 50 μL를 취했다.

① Buffer (300 mM Sodium borate) : 0.3 M NaCl, 0.1 M Boric acid와 0.3 M NaCl, 0.1 M Sodium borate를 혼합하여 pH 8.3으로 조정하였다.

② 기질 제조 : 만들어진 buffer를 이용하여 0.3% Hip-His-Leu를 제조하였다.

③ 효소 조제 : ACE 1 unit에 차가운 DDW 3 mL을 첨가하여 0.33 unit/mL 농도가 되도록 희석하였다.

④ 측정 방법 : Cushman등의 방법(1977)에 준하여 측정하였다. 10 mg/mL로 제조한 시료액 50 μL에 0.3% Hip-His-Leu 200 μL를 가한 후 37℃에서 10분간 방치하여 preincubation 하였다. 여기에 ACE 효소액 50 μL를 가하고 37℃에서 15분간 교반시킨 후 1 M HCl을 250 μL 가하여 반응을 정지시켰다. 공실험은 시료용액 대신 탈 이온수 50 μL를 사용하였으며 대조구는 1 M HCl을 250 μL를 먼저 가하여 반응을 정지시킨 후 효소액을 가하였다. 여기에 ethyl acetate 2 mL을 첨가하여 60초간 교반 후 3,000 rpm에서 2분간 원심분리 시켜 상등액을 1 mL 취하였다. 상등액은 100℃에서 30분간 건조 후 탈 이온수 3 mL을 가하여 용해시킨 후 228nm 에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 의해 ACE 저해율을 측정하였다.

$$\text{ACE inhibition activity (\%)} = \frac{C - T}{C - B} \times 100$$

T : 추출물 흡광도
C : Control 흡광도
B : Blank 흡광도

ACE 저해능이 가장 높은 한외여과물의 IC_{50}(μL/mL) 측정은 시료를 일정농도로 희석한 후에 ACE 활성을 50% 저해하는데 필요한 mL수를 단백질 양으로 나타내었다. 단백질 함량은 Lowry법(1951)에 준하여 측정하였다.

14. 항산화 활성 측정

① DPPH radical scavenging 측정 : DPPH 환원에 의한 free radical 소거활성 측정은 Abe등의 방법(2000)을 이용하였다. 100 uM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma) ethanol 용액 900 μL에 8 mg/mL 농도로 조제한 콜라겐 가수분해물 시료용액 100 μL을 가하여 vortexing 하고, 암소에서 10분간 반응시킨 후 517nm 에서 흡광도를 측정하였다.

② Superoxide anion scavenging 측정 : Xanthine-Xanthine oxidase에 의한 NBT 환원법(Togashi 등, 2002)을 이용하였다. 0.8 mM xanthine 0.5 mL, 0.48 mM nitrobluetetrazolium 0.5 mL, 콜라겐 가수분해물 10 mg/mL의 농도로 조제한 시료용액 0.1 mL을 37℃, 10분간 반응 시킨 다음 0.049 units/mL XOD 1 mL을 첨가하여 37℃, 20분간 반응시켰다. 곧바로 69 mM SDS 2 mL을 첨가하여 반응중지 시킨 다음 560nm에서의 흡광도를 측정하였다. Superoxide anion에 대한 포착효과는 다음과 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}}\right) \times 100$$

15. Fibrin plate를 이용한 혈전용해 활성측정

Astrup과 Mullertz의 Fibrin plate법(1952)을 변형하여 실험하였다. 먼저 fibrinogen을 0.5%(w/v)가 되도록 10 mM potassium phosphate buffer(pH 8.0)에 녹인 후, fibrinogen 용액 10 mL을 thrombin 100 ㎕과 신속히 petridish에서 혼합하였다. 상온에서 2시간 방치하여 fibrin막이 형성되면 8 mm paper disk를 fibrin plate에 올려놓고, 콜라겐 가수분해물 시료 용액 50 μL를 점적하여 37℃ 항온 항습 incubator에서 12시간 방치 후 용해되어 나타나는 원의 면적을 측정하였다. 대조구로 혈전용해 효소인 plasmin(1 unit/mL)을 사용하였고, 시료의 혈전용해 활성은 대조구의 용해 면적에 대한 시료의 용해 면적을 상대적인 비율로 환산하여 산출하였다.

16. 방사선조사에 의한 복귀돌연변이원성 실험(Ames test)

방사선조사에 의하여 제조된 콜라겐 올리고펩타이드의 안전성을 조사하기 위하여 Maron과 Ames의 방법(1983)에 준하여 복귀 돌연변이 실험을 하였다. 실험에 사용된 균주는 *Salmonella typhimurium* LT2를 친주로 하는 *S. typhimurium* T98 및 TA100 이었고, 이들 균주는 사용에 앞서 균주의 유전자형 확인을 위해 histidine 요구성 여부, UV에 대한 민감도(*uvr*B 돌연변이), rfa 돌연변이의 유지여부 및 R-factor에 의한 ampicillin 또는 tetracycline 내성 등의 유전형질을 확인한 후 시험에 사용하였다. 본 실험에 사용된 균주는 Molecular Toxicology Inc(Boone. NC. USA)에서 구입하여 형질을 확인한 후 한국화학연구소 부설 안전성연구소에서 계대배양 중인 것을 시험에 사용하였다. 유전형질이 확인된 균주는 nutrient broth No. 2(Oxoid Ltd., Hampshire. England)에 접종하여 37℃에서 200 rpm으로 약 10시간 진탕배양(Vision Scientific Co., Korea)한 후 실험에 사용하였다. 간 균질액(S9 fraction)은 Sprague-Dawley rat의 간으로부터 분리한 것으로 Oriental Yeast Co.(Tokyo, Japan)에서 구입(단백질 함량

22.5 mg/mL 함유) 하였으며, 5%(v/v)의 S9 mixture를 제조하여 사용하였다. 처리 농도는 0.5 mL/plate로 하였으며, S9 mix의 활성은 2-AA의 돌연변이 유발로 확인하였다. 양성 대조물질로 sodium azide(Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Inc., Steinheim. Germany)는 증류수에 용해하였으며, Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim. Germany)사에서 구입한 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO) 및 2-aminoanthracene(2-AA)는 증류수 또는 dimethylsulfoxide(DMSO. Aldrich Chemical Co., Milwaukee. USA)에 용해하여 각 시험균주의 특성에 맞추어 사용하였다.

복귀 돌연변이 시험은 시험물질 각 농도군 당 2개 plate를 사용하여 direct plate incorporation 방법으로 실시하였다. 즉 *S. typhimurium* 군주를 nutrient broth에 하룻밤 동안 배양하여 대수기(2×10^9 cell/mL) 상태에 이르도록 한 배양액 100 μL, 시험물질의 멸균증류수 현탁액 100 μL 및 S-9 mixture(또는 0.2 M Na-Phosphate buffer) 500 μL를 혼합하여 histidine-biotine을 함유한 top agar 2.0 mL에 섞은 후 이를 mineral glucose agar 배지에 부어 고화시킨 다음 37℃에서 48시간 동안 배양한 후 복귀 돌연변이 집락수를 계수하였다. 음성대조군은 시험물질 대신 buffer 100 μL를 첨가하였으며, 양성 대조군은 대사 활성계 미적용 시 SA 및 4-NQO를, 대사 활성계 적용 시 2-AA를 각각 100 μL 씩 가하여 같은 방법으로 실시하였다. 시험결과는 각 농도군 당 각 plate로부터 얻은 colony 수의 평균과 표준편차로 나타내었고 복귀 돌연변이 colony수와 농도 의존성을 보이면서 음성대조군의 2배 이상인 경우를 양성으로 하였다.

17. SHR rat을 이용한 혈압강하 실험

① 동물사육 및 식이조성 : SHR rat을 이용한 혈압강하 실험을 하기 위하여 수축기 혈압(Systolic blood pressure, SBP)이 170mm Hg 이상인 수컷의 본태성 고혈압 쥐(spontaneously hypertensive rat: SHR, 8주령)를 (주)중앙실험동물로

부터 분양받아 일정한 조건(온도 22℃, 습도 50%, 명암 12시간 주기 조명)하에서 일주일간 적응기와 안정기를 거친 다음 steel cage에서 한 마리씩 사육하였고, 실험군은 대조군(control: 수컷, n=8)과 *in vitro* 실험에서 활성을 보인 분획물군(M 10,000: 수컷, n=8/ M 5,000: 수컷, n=8)으로 나누어 6주간 사육하였다. 물과 식이는 자유로이 섭취시켰으며, 분획물을 10 mg/kg의 농도로 경구투여 하였다. 혈압은 실험식이 급여 직전과 6주간 사육기간 동안 매주 일정한 시간에 일정한 장소에서 측정하였고 체중도 일주일 간격으로 측정하였다. 실험에 사용한 식이의 구성성분은 (주) 슈퍼피드의 익스트루젼 형태의 마우스 전용사료로서 Table 2에 나타내었다.

② 혈압측정 : 고혈압 쥐를 혈압 측정용 용기에 고정시킨 다음 37℃ 항온기에서 30분간 안정시킨 후, 조용한 상태에서 비관혈 혈압측정계(IABP, Indirect Automatic Blood Pressure, made in spain)를 이용하여 꼬리 정맥에서 3회 반복 측정하였다. 측정된 혈압수치는 SAS program을 이용하여 α=0.05 수준에서 검정하였다.

Table 2. Composition of experimental diets

Ingredients	Contents(%)
Protein	22.1 이상
Fat	3.5 이상
Crude fiber	5.0 이하
Crude ash	8.0 이하
Calcium	0.6 이상
phosphorus	0.4 이상

18. Sprague-Dawley rat을 이용한 항혈전능 측정

SD rat에 의한 항혈전능을 측정하기 위하여 고지방식이를 한 실험동물

을 이용하였으며, 전혈응고시간으로 항혈전능을 측정하였다.

① 동물사육 및 식이조성 : 생후 6주령의 Sprague-Dawley종 수컷 쥐 30마리를 (주)중앙실험동물로부터 분양받아 실험시작 전 3주간 고지방식이를 통하여 적응훈련 시켰다. 실험군은 대조군(Control: 수컷, n=10)과 분획물군(M 10,000: 수컷, n=10/ M5,000: 수컷, n=10)으로 나누어 steel cage에서 한 마리씩 사육하였고, 온도 22℃, 습도 50%, 조명은 12시간 주기로 조절하였다. 고지방 식이를 위해 콜레스테롤 1%, 돈지 10.5%를 일반 식이에 첨가하여 총 15%의 지방을 함유하도록 하였으며, 3주가 지난 후 콜라겐 가수분해물을 10 mg/kg의 농도로 경구투여 하였다. 체중은 일주일 간격으로 측정하였다.

② 전혈응고시간 측정 : 항혈전능을 간접적으로 제시하고자 전혈응고시간(Clotting time)을 4주일간 일주일 간격으로 동일한 시간대에서 측정하였다. Heparinized capillary tube를 이용하여 쥐의 눈에서 혈액을 채취하고, 채취된 혈액 1 mL을 유리시험관에 넣고 즉시 1.7% $CaCl_2 \cdot H_2O$ 200 μL을 가한 후 가만히 섞어준 뒤, 혈액에 $CaCl_2 \cdot H_2O$를 가한 시간부터 응괴가 생길 때까지의 시간을 측정하였다. 측정된 응고시간은 SAS program을 이용하여 α=0.05 수준에서 검정하였다.

19. Fast Protein Liquid Chromatography를 이용한 올리고펩타이드 분리

돈피 콜라겐 올리고펩타이드를 분리하기 위하여 superdex 200, 10/300 GL 컬럼을 AKTAexplorer chromatography(AMERSHAM BIOSCIENCES, UK)에 장착하여 Table 3의 조건으로 분리 정제 하였으며, 분획물은 molecular weight calibration kit를 이용하여 분자량을 측정하였다.

Table 3. Gel permeation chromatographic conditions for separation of collagen hydrolysates

	Conditions
Instrument	Fast protein purification system (Amersham Biosciences)
Column	Superdex 200, 10/300
Wavelength	280nm
Flow rate	0.4ml/min
Eluent	0.1M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH 7.0)

20. RP-HPLC를 이용한 활성 펩타이드의 2차 분리

아미노산 서열분석에 사용되는 펩타이드의 순도를 높이기 위하여 RP-HPLC를 이용하여 2차 분리 정제를 하였다. 분리 정제는 기능성이 확인된 콜라겐 가수분해물의 GPC fractions 펩타이드를 중심으로 하였으며 0.1% TFA(Trifluoroacetic acid)로 평형화 시킨 Vydac 218TP1010 column을 사용한 HPLC(JASCO PU 980, JAPAN)에 60% acetonitrile이 함유된 0.1% TFA를 이용하여 linear gradient로 10분간 분리하였으며(Table 4), 이 중 가장 높은 피크를 보인 fraction을 선정하여 순도 및 아미노산 서열분석 시료로 하였다.

21. RP-HPLC를 이용한 펩타이드 분획물의 순도 확인

Vydac 218TP1010 column으로 HPLC(JASCO PU 980, JAPAN)에서 분리한 펩타이드의 순도를 확인하기 위하여 Vydac 218TP54 column을 사용하여 RP-HPLC(JASCO PU 980, JAPAN) 분석을 하였다(Table 5). 이때 eluent는 0.1% TFA와 100% acetonitrile을 이용하여 linear gradient하였다. Detector는 220nm UV detector를 사용하였고, 2차 분리된 콜라겐 펩타이드를 30 μL 주입하였다.

Table 4. Separation conditions for oligopeptides derived from GPC fractions by RP-HPLC

Column	Vydac 218TP1010(C_{18}, 10 μm, 10 × 250 mm)		
Detector	UV/VIS		
Wavelenth	220 nm		
Column Temp.	30℃		
Flow rate	2.0 mL/min		
Mobile phase	A : 0.1%(w/v) TFA in water B : 0.1%(w/v) TFA in 60% acetonitrile		
	Time(min)	A(%)	B(%)
Gradient condition	0 ~ 5	100	0
	50	0	100
	50	100	0

Table 5. Identification conditions for collagen peptide by RP-HPLC.

Column	Vydac 218TP54 (C_{18}, 5 μm, 4.6 × 250 mm)		
Detector	UV/VIS		
Wavelength	220 nm		
Column Temp.	30℃		
Flow rate	2.0 mL/min		
Mobile phase	A : 0.1%(w/v) TFA in water B : 100% Acetonitrile		
	Time(min)	A(%)	B(%)
Gradient condition	0	100	0
	0 ~ 1	100	0
	50	0	100
	60	100	0

22. 펩타이드 아미노산 서열 분석

RP-HPLC를 이용하여 단일 peak로 분리한 분자량 12,000 및 5,000 올리고펩타이드의 아미노산 서열을 분석하기 위하여 한국기초과학지원연구원 서울센타에 동결건조 분말상태로 의뢰하였다. PTH anlysis column 2.1 x 220 mm이 장착된 Procise 491 HT protein sequencer(Applied Biosystems, USA)를 이용하였으며, 0.1% TFA/ 60% acetonitrile에 1㎍/㎕의 농도로 시료를 녹인 다음 10㎕를 주입하였다(Table 6).

Table 6. Sequencing conditions of oligopeptide prepared by RP-HPLC

Column	PTH anlysis column(2.1 x 220 mm)			
Mobile phase	A : 3.5% TFA(tetrahydrofurane) in water B : 12% isopropanol in acetonitrile			
Gradient condition	Step	Time(min)	B(%)	Flow rate(㎕/min)
	1	0.0	8	325
	2	0.2	11	325
	3	0.4	14	325
	4	18.0	46	325
	5	18.5	90	325
	6	19.0	90	325
	7	22.0	90	325

제 3 절 결과 및 고찰

1. 돈피 유래 콜라겐 및 콜라겐 가수분해물의 제조조건

가. 돈피의 전처리

콜라겐 또는 콜라겐 가수분해물을 제조하기 위해서는 돈피를 적당한 크기로 분쇄하는 전처리 과정이 필요하다. 돈피를 분쇄하기 위해서는 동결분쇄기(comitrol)를 이용하는 방법, 초파(chopper)를 이용하여 압출·분쇄하는 방법, hammer mill을 이용하여 분쇄하는 방법 등이 있는데, 피하지방이 많이 함유된 돈피 특성을 고려할 때 comitrol과 같은 동결분쇄기 사용에는 제한이 있으므로 상업적으로 이용 가능한 hammer mill 및 초파 이용 방안에 대하여 비교 검토하였다.

Hammer mill을 이용한 시료의 분쇄는 냉매를 사용하여 -40℃ 이하에서 급속 동결시킨 후 분쇄를 하기 때문에 성분의 변화를 최소화 할 수 있는 장점이 있는 반면에 급속 동결 시 에너지 비용이 많이 소요되며 시료의 상태에 따라서 적용하기 어려운 단점을 지니고 있다. -40℃ 이하로 급속 동결된 돈피를 hammer mill로 분쇄를 하면 분쇄초기에는 비교적 양호하게 분쇄되는 현상을 보였으나 분쇄시간의 경과와 함께 마찰열에 의한 온도 상승으로 인하여 분쇄가 잘 이루어지지 않았다. 초파를 이용한 경우에는 -20℃ 이하로 동결된 돈피를 냉장고에서 -1 ~ -3℃ 수준까지 해동하여 partial freezing 상태를 유지시켰으며, 이러한 온도 범위 조건에서 chopping이 효율적으로 이루어짐과 동시에 마찰열에 의한 온도 상승이 일어나지 않아 품질 저하를 방지할 수 있는 것으로 나타났다. Hammer mill과 chopper를 이용하여 돈피를 분쇄하면 분쇄 손실이 발생되는데 돈피 분쇄에 따른 회수율은 Table 7에 나타낸 바와 같이 hammer mill은 76%,

chopper는 96%를 나타내 chopper를 이용하여 분쇄하는 것이 공정이 간단할 뿐만 아니라 경제적으로도 효율성이 있는 것으로 나타났다. 본 실험에 사용한 hammer mill과 chopper는 Fig. 3과 같다.

Table 7. The yield ratio of grinding pigskin of hammer mill to chopper.

	Hammer mill	Chopper
분쇄 전 원료 돈피	5 Kg	5 Kg
분쇄 후 회수 돈피	3.8 Kg	4.8 Kg
회수율	76%	96%

Fig. 3. Inner structure of hammer mill and front picture of chopper for grinding of pigskin

나. 분쇄 돈피의 일반성분

분쇄 돈피의 일반성분을 Table 8에 나타냈다. 분쇄 전 과도한 피하지방을 제거하였으나 지방함량이 14.9%로 비교적 높게 나타난 반면 상대적으로 조단백질 함량은 36.1%로 비교적 낮은 값을 보였다. 한편, 콜라겐을 추출하기 위해서는 지방 제거 공정이 추가되어야 하며 이를 위하여 -20℃로 냉각된 아세톤을 이용하여 탈지돈피를 제조하였다. 제조된 탈지돈피의 일반성분은 Table 9과 같이 수분 15.0%, 조단백 79.5%, 조지방 2.5% 및 회분 0.5%를 보여주고 있어 아세톤 처리에 의하여 대부분의 지방이 제거됨을 알 수 있었다.

Table 8. The chemical composition of grinded pigskin.

수분(%)	조단백(%)	조지방(%)	회분(%)
48.1[1)]±3.0	36.1 ± 1.9	14.9 ± 0.5	0.7 ± 0.2

[1)]All values are mean ± SE (n=3)

Table 9. The chemical composition of defatted pigskin.

수분(%)	조단백(%)	조지방(%)	회분(%)
15.0[1)] ± 0.8	79.5 ± 0.6	2.5 ± 0.7	0.5 ± 0.1

[1)]All values are mean ± SE (n=3)

다. 탈지돈피의 염가용성 및 산가용성 콜라겐 특성

1) 염가용성 및 산가용성 콜라겐 함량

Table 9에 나타낸 바와 같이 탈지돈피의 주성분은 조단백질인데, 조단백질에

함유된 콜라겐 함량을 측정하기 위하여 탈지돈피에 6 N HCl을 가하여 아미노산 형태로 가수분해시킨 다음 hydroxyproline 함량을 측정하였다. Table 10은 탈지돈피의 조단백질 함량을 100%로 하였을 때의 콜라겐 함량 %를 나타낸 것으로 콜라겐 함량은 방사선조사를 하지 않은 대조구에서 91.3%를 나타냈으며 20 kGy ~ 300 kGy 수준에서 단계별 방사선조사한 탈지돈피의 경우에도 조단백질의 89 ~ 93%를 나타내어 탈지돈피 단백질의 대부분이 콜라겐 단백질로 구성되어 있다는 것을 알 수 있었다. 탈지돈피에서 0.5 M NaCl에 가용화되는 염가용성 콜라겐과 0.5 M citrate buffer(pH3.6)에 가용화되는 산가용성 콜라겐을 추출하여 그 함량을 Table 11에 나타냈다. 염가용성 콜라겐은 6.0%, 산가용성 콜라겐은 7.9%의 추출 수율을 보여 탈지돈피를 구성하는 대부분의 콜라겐은 산과 염에 녹지 않는 불용성콜라겐임을 알 수 있었다. 따라서 불용성콜라겐의 가용화를 위한 효소처리 또는 이온화에너지를 이용한 구조변형을 통한 추출 공정의 개선이 필요할 것으로 생각되었다.

Table 10. Percent of total collagen to the crude protein of pigskin

Irradiation dose (kGy)	0	20	40	60	100	150	200	250	300
collagen %	91.3[1)] ± 3.5	90.4 ± 3.8	89.2 ± 4.9	89.8 ± 1.2	89.7 ± 3.4	90.0 ± 3.1	93.4 ± 2.2	93.0 ± 3.2	91.3 ± 3.5

[1)]All values are mean ± SE (n=3)

Table 11. Content of salt- and acid soluble collagen from defatted pigskin. (%)

조단백	염가용성 콜라겐	산가용성 콜라겐
79.5[1)] ± 0.6	6.0 ± 3.3	7.9 ± 3.8

[1)]All values are mean ± SE (n=3)

2) 염가용성 및 산가용성 콜라겐의 효소 처리에 의한 점도 변화

돈피에서 추출한 염가용성 및 산가용성 콜라겐 유래의 펩타이드 조제 시 효소처리에 의한 소화율을 점도와 탁도 변화로 측정하였다. 이때 사용한 효소는 기 연구결과(참고문헌)에서 가장 경제성이 있으면서 분해율이 좋은 것으로 나타난 papain을 이용하였다. Fig. 4에 염가용성 및 산가용성 콜라겐을 1% papain으로 25℃에서 1 ~ 4시간 동안 소화시켰을 때의 점도 변화를 나타냈다. 효소 반응시간이 경과함에 따라서 염가용성 및 산가용성 콜라겐의 점도는 저하되었으며, 반응시간 2시간 까지는 서서히 2시간 이상에서는 급격히 감소되는 현상을 보였다. 이러한 점도 감소는 산가용성 콜라겐 보다 염가용성 콜라겐에서 빠르게 나타났으며, 이는 콜라겐 종류에 따라 효소 특이성에 차이가 있는 것을 제시하고 있다.

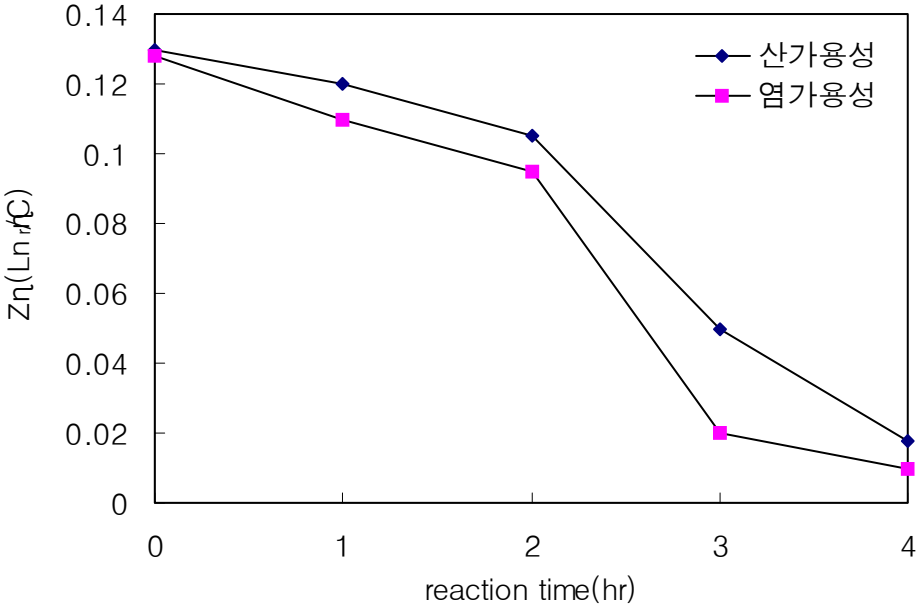


Fig. 4. Viscosity of salt-soluble and acid-soluble collagen according to enzymatic reaction time.

3) 염가용성 및 산가용성 콜라겐의 효소 처리에 의한 탁도 변화

염가용성 콜라겐과 산가용성 콜라겐의 효소반응 시간에 따른 탁도 변화를 Fig. 5에 나타냈다. 효소반응 시간이 길어질수록 염가용성 콜라겐 및 산가용성 콜라겐의 탁도는 감소하였으며, 이러한 감소 현상은 효소반응 시간에 따른 점도 변화와 유사하였다. 이상의 점도 변화와 탁도 변화 결과에서 염가용성 콜라겐과 산가용성 콜라겐은 파파인에 의하여 저분자화되고 있음을 알 수 있었으며, 생리활성을 나타낼 수 있는 저분자 펩타이드를 제조할 수 있는 파파인의 적정 소화율 조건을 수립하는 것이 필요할 것으로 생각되었다.

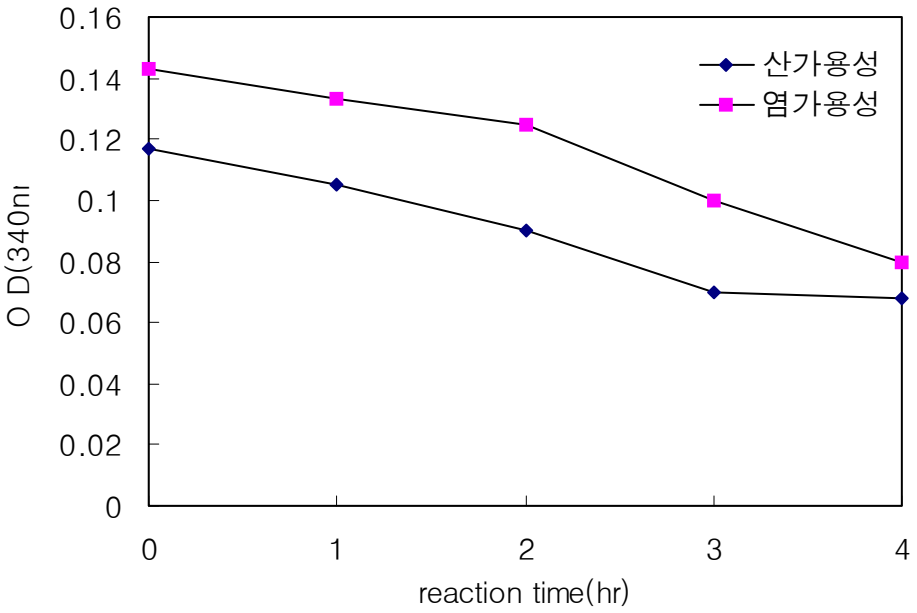


Fig. 5. Turbidity of salt-soluble and acid-soluble collagen according to enzymatic reaction time.

라. 방사선조사 및 초고압에 의한 돈피 수용성단백질의 변화

상기의 연구결과에 나타나듯 콜라겐 유래 올리고펩타이드를 제조하기 위해서는 염가용성 콜라겐 또는 산가용성 콜라겐을 제조한 후 적정 효소처리를 하여 펩타이드로 분해한 후 정제하는 공정을 거치게 된다. 이러한 공정은 처리공정이 복잡할 뿐만 아니라 콜라겐 제조시 사용하는 다량의 산 또는 알카리를 중화할 수 있는 대용량의 폐수처리 시설 보완이 필요하다. 본 연구는 이러한 복잡한 공정을 단순화할 수 있는 공정으로 개선함과 동시에 환경오염을 최소화시킬 수 있는 방안을 모색하였으며, 최근 냉온처리기술 또는 환경친화적 가공기술로써 이용가치가 넓은 방사선조사기술과 초고압처리 기술을 이용하여 이러한 문제점을 해소하고자 하였다.

방사선조사기술은 식품안전성 확보를 위한 HACCP 시스템의 CCP로 활용하는 등 비가열살균기술로써, 환자, 군인 및 우주인을 위한 특수용도식품 개발을 위한 가공기술로써 그리고 유해환경물질(예; dioxin)의 분해기술 등으로 활용범위와 연구영역이 점차 확장되고 있을 뿐만 아니라 고분자물질의 분해 또는 융합에도 이용되고 있다. 식품에서는 고분자물질인 키토산을 저분자화하여 키토산 올리고당으로 전환시킨 연구도 보고된 바 있으므로(최 등, 2002), 고분자 단백질인 콜라겐도 방사선조사에 의한 이온화에너지로 인하여 저분자화가 가능할 것으로 예상하였고, 본 연구결과에서도 방사선조사에 의하여 고분자물질인 콜라겐의 저분자화가 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다. 한편, 식품산업에서의 초고압처리 기술은 isostatic pressing 기술로써 500 MPa 이내의 고압에서 살균처리를 하거나 식품의 물성을 변화시키고, 효소와 미생물의 불활성화를 위하여 400 ~ 900 MPa의 초고압을 이용하는 것으로 검토된 바 있으므로(홍석인, 2000) 초고압처리 단독 또는 방사선조사와의 병행 처리에 의한 단백질분자의 물성 변환 가능성도 검토하고자 하였다.

따라서 본 연구에서는 방사선조사 및 초고압의 단독 또는 병행 처리에

의한 돈피 단백질의 돈피 단백질의 구조적 변화를 살펴보고자 pH, 수용성 단백질, 점도, 탁도 및 단백질 sub-unit 변화를 검토하였다.

1) 방사선 조사선량에 따른 탈지돈피의 pH

탈지돈피의 주성분은 단백질, 특히 콜라겐으로 구성되어 있으며, 방사선 조사에 의하여 콜라겐의 구조가 변형되어 소편화됨에 따라 극성 및 비극성 아미노산 조성의 차이로 인하여 pH 변화가 예상된다. Table 12에 0 ~ 300 kGy의 조사선량으로 방사선조사한 탈지돈피의 pH를 측정한 결과를 나타냈다. 탈지돈피의 pH는 6.54를 보였으나 조사선량에 따라 pH 변화가 나타났다. 조사선량 60 kGy 까지는 탈지돈피의 pH가 감소하는 현상을 보였으며, 이후 300 kGy 까지 증가하는 현상을 보이고 있어 방사선조사에 의한 탈지돈피 단백질의 조성 변화가 예측되었다.

Table 12. Changes in pH of the defatted pigskin according to irradiation dose.

Irradiation dose (kGy)	0	20	40	60	100	150	200	250	300
pH	6.54[1)] ±0.07	6.46 ±0.12	6.43 ±0.08	6.37 ±0.27	6.49 ±0.03	6.61 ±0.04	6.71 ±0.06	6.96 ±0.04	6.94 ±0.07

[1)]All values are mean ± SE (n=3)

2) 방사선조사선량에 따른 수용성 단백질의 용해도

탈지돈피를 방사선조사선량에 따라 조사한 후 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 용액으로 용출한 수용성 단백질의 용해도를 Fig. 6에 나타냈다. 방사선조사를 하지 않은 탈지돈피의 수용성 단백질의 용해도는 2% 수준이었으며, 방사선조사선량이 증가할수록 수용성 단백질의 용해도는 증가하여 300 kGy의 조사선량에

서는 60% 이상의 용해도를 보였다. Table 11에서 염가용성 콜라겐과 산가용성 콜라겐의 추출 수율이 각각 6.0%, 7.9%로써 총 단백질 중 가용성 콜라겐의 함량이 13.9%임을 제시한 바 있는데, 본 실험 결과 방사선조사에 의하여 가용화 성분이 4배 이상 증가되고 있음을 알 수 있었으며 이는 고선량의 방사선조사가 콜라겐 단백질의 3중 나선구조를 파괴하여 단편화된 성분들을 유도하여 수용성 성분으로 새로이 용출되는 것으로 생각되었다.

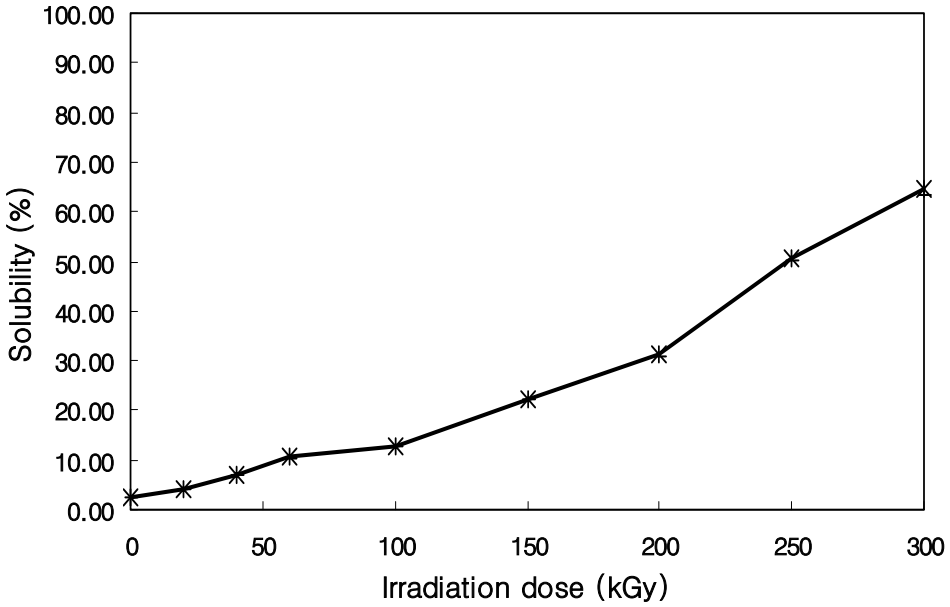


Fig. 6. Solubility of aqueous protein according to irradiation doses.

3) 방사선조사선량에 따른 수용성 단백질의 점도 변화

방사선조사선량에 따른 수용성 단백질의 저분자화를 간접적으로 측정하기 위하여 점도를 측정하였으며 그 결과를 Fig. 7에 나타냈다. 조사선량 0 ~ 40 kGy까지는 Ostwald 점도계에서 점도 측정이 불가능하였는데, 이는 저분자화가 이루어지지 않은 돈피 단백질의 coagulation과 용출된 수용성 단백질의 고분자에 기인할 것으로

예상되었으며, 방사선조사에 의한 영향이 크기 않았다는 것으로 간접적으로 나타내고 있다. 반면에 60 kGy 이상의 조사선량에서는 점도 측정이 가능하였고, 조사선량이 높을수록 점도가 저하하는 현상을 보여주어 고선량의 방사선조사가 돈피 수용성 단백질의 구조변화를 일으켜 저분자화를 유도하고 있음을 간접적으로 확인할 수 있었다. 한편, 이러한 경향은 150 kGy ~ 300 kGy에서 유사한 점도를 보여주고 있어 150 kGy에서 수용성 단백질의 저분자화가 대부분 진행되었음을 제시하고 있다.

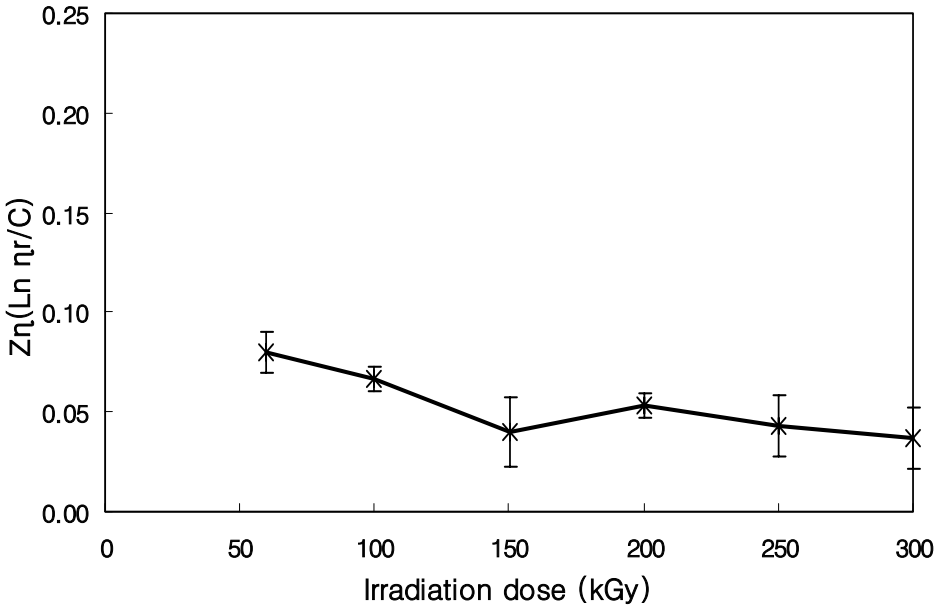


Fig. 7. Viscosity of aqueous protein according to irradiation doses.

4) 방사선조사선량에 따른 수용성 단백질의 탁도 변화

방사선조사선량에 따른 수용성 단백질의 탁도 변화를 Fig. 8에 나타냈다. 일반적으로 수용성 단백질의 탁도는 분자량 크기 및 형태에 좌우되는데 방사선조사선량이 높아질수록 탁도가 저하되는 현상을 보이고 있다. 이러한 탁도 변화는 Fig. 7에 제시한 점도 변화와 유사한 경향을 보여 방사선조사가 돈피 콜라겐의 구조변화를 일

으켜 저분자화를 유도하고 있음을 제시하고 있다.

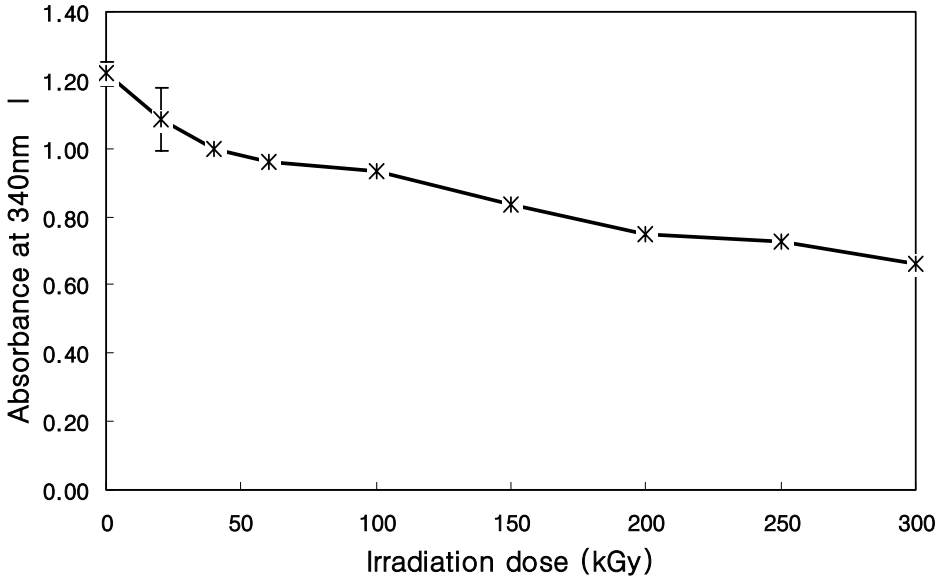
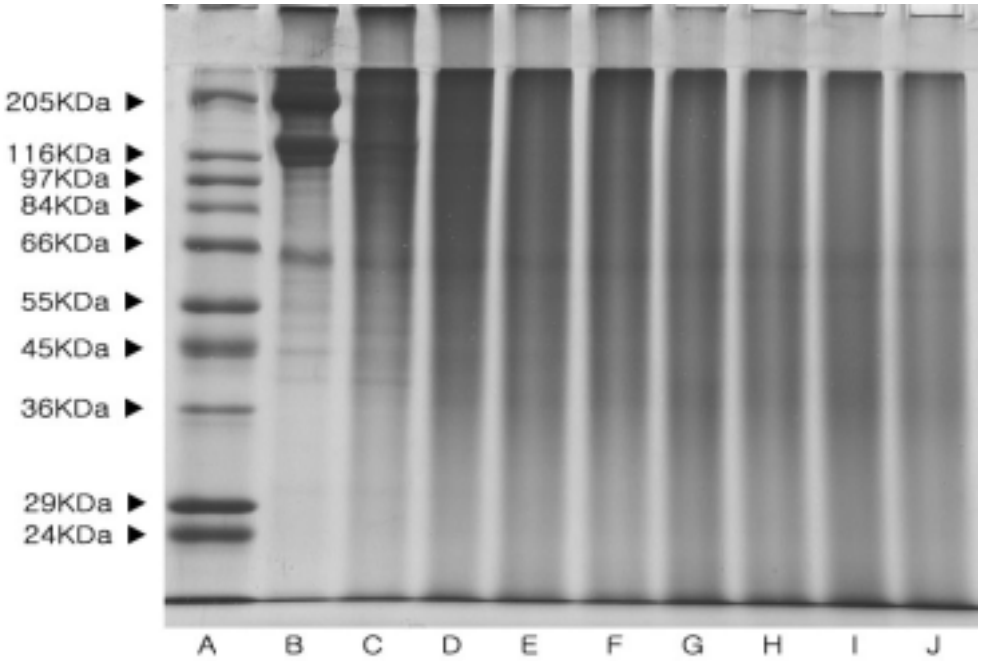


Fig. 8. Turbidity of aqueous protein according to irradiation doses.

5) 방사선조사선량에 따른 콜라겐 sub-unit 조성의 변화

방사선조사선량이 증가할수록 수용성 콜라겐 단백질의 용해도가 증가하고, 점도 및 탁도가 감소하는 현상을 보였는데(Fig. 6 ~ 8), 이러한 현상은 방사선조사에 의하여 수용성 콜라겐 단백질의 구조변형이 일어나 저분자화 되고 있음을 간접적으로 제시하는 바, 방사선조사에 의한 콜라겐의 sub-unit 조성을 직접 확인하고자 10% polyacrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 검토하여 그 결과를 Fig. 9에 나타냈다. Fig. 9에 나타난 바와 같이 방사선 조사선량이 높아질수록 콜라겐의 저분자화가 일어나는 것을 직접 확인할 수 있었다. 즉, 방사선조사를 하지 않은 대조구에서는(B) 분자량 100 kDa ~ 300 kDa 크기의 콜라겐 monomer, dimer 및 trimer로 구성된 α-chains, β-components 또는 γ- components의 콜라겐 사슬이 대부분인 것으로 나타

났으나, 40 kGy 이상의 조사선량에서는 100 kDa ~ 300 kDa 부근의 콜라겐 분자가 점차 소실되는 모양을 보였으며 조사선량이 높아질수록 분자량 24 kDa 이하의 저분자물질이 점차적으로 증가하는 현상을 보였다. 이러한 결과는 앞서 제시한 수용성 단백질의 변화, 점도, 탁도 변화의 결과와 일치하는 경향을 나타낸 것으로 방사선조사가 콜라겐 펩타이드 제조 시 유용하게 활용할 수 있는 가공기술로써의 가능성이 있음을 보여주고 있다.



A protein marker B 0 kGy C 20 kGy D 40 kGy E 60 kGy
F 100 kGy G 150 kGy H 200 kGy I 250 kGy J 300 kGy

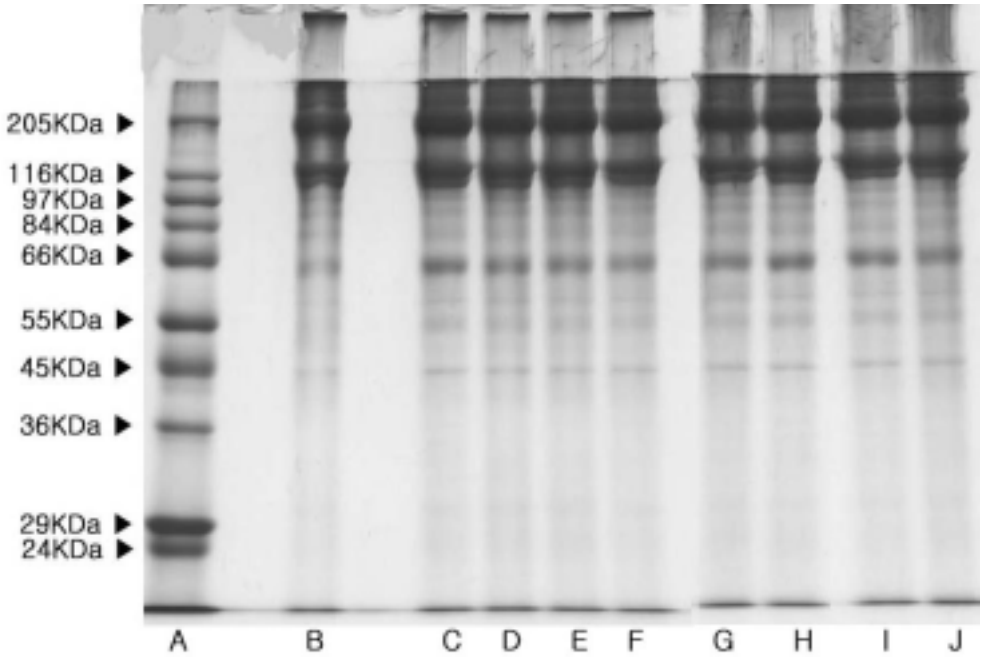
Fig. 9. SDS-PAGE pattern of pigskin proteins according to irradiation doses.

6) 초고압처리에 따른 콜라겐 sub-unit 조성의 변화

일반적으로 식품산업에서의 초고압처리는 600 MPa 이내의 고압에서 살균처리를 하거나 식품의 물성을 변화시키는데 이용하고 있다. 따라서 본 실험에서는 최대 600 MPa의 압력으로 10분과 20분 간 고압처리를 하였을 때 발생되는

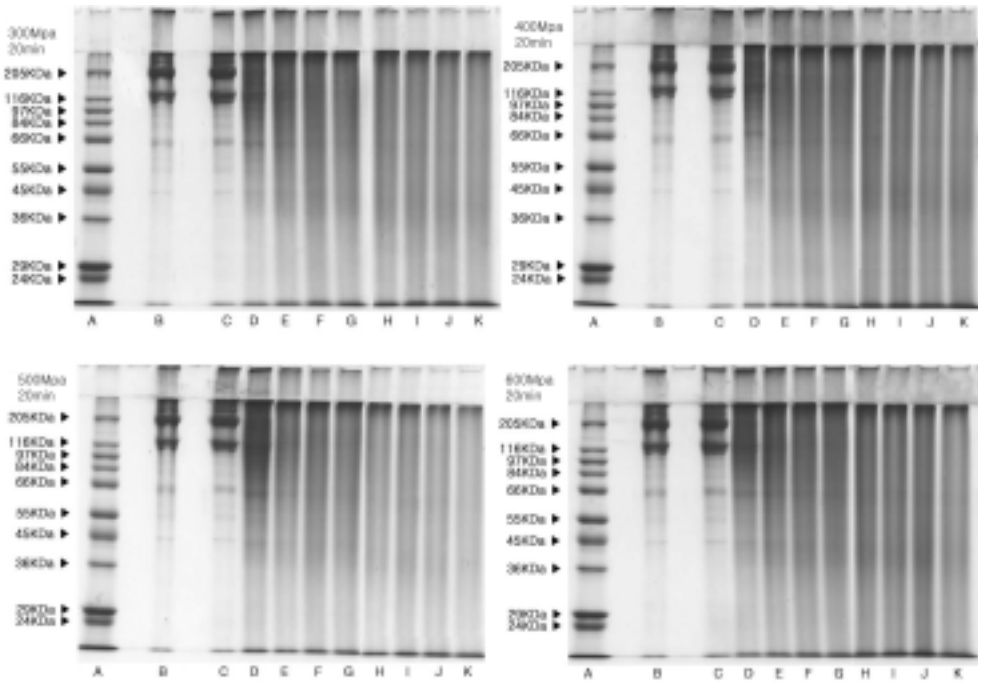
돈피 콜라겐의 구조변형에 미치는 영향, 그리고 고선량의 방사선조사 처리로 콜라겐 구조를 변형시킨 후의 초고압처리에 의한 저분자화에 미치는 영향 등을 검토하였다. Fig. 10에 나타난 바와 같이 초고압처리를 하지 않은 대조구(B)에서 분자량 100 kDa ~ 300 kDa 크기의 콜라겐 α-chains, β-components 또는 γ- components, 그리고 66 kDa에 해당되는 밴드가 선명하게 나타났는데, 이러한 밴드 패턴은 압력을 300 MPa, 400 MPa, 500 MPa, 그리고 600 MPa 까지 올려도(C ~ J) 동일한 경향을 보이고 있어 600 MPa 까지의 초고압은 콜라겐 분자의 구조 변형에 미치는 영향이 미미하다는 것을 알 수 있었다. 한편 효소와 미생물의 불활성화에 4,000 ~ 9,000 atm의 초고압이 필요하다는 것이 정리된 바 있으므로(홍석인, 2000) 콜라겐 분자 구조를 변형시켜 저분자화를 이루기 위해서는 600 MPa 이상의 고압이 필요할 것으로 생각되었으나 당 연구원에서 보유하고 있는 초고압처리기의 최대 압력 한계를 벗어나기 때문에 600 MPa 이상의 고압 실험을 하지 못하였다. 그러나 저선량의 방사선조사에 의하여 콜라겐 구조가 일부 변형되어 결합력이 약해질 경우에는 600 MPa 정도의 고압에서도 구조 변형이 가속화될 것으로 예상하여 방사선조사 후 초고압처리를 병행하여 그 결과를 Fig. 11에 나타냈다. 방사선조사(F ~ K)한 돈피 단백질은 100 kGy 이상으로 조사선량이 증가할 수록 100 kDa ~ 300 kDa 크기의 콜라겐 분자가 소실되면서 24 kDa 이하의 저분자 물질이 축적되고 있는데 이러한 현상은 고압처리(300 MPa ~ 600 MPa)와 관계없이 동일하게 나타나고 있어 Fig. 8의 결과와 비교할 때 콜라겐 분자의 저분자화는 방사선조사에 의한 것임을 알 수 있었다. 한편, 20 kGy와 40 kGy로 방사선조사 하여(D, E) 콜라겐 구조를 일부 소편화시킨 다음 300 ~ 600 MPa의 압력으로 20분간 처리한 경우에도 유사한 밴드 패턴을 보여주고 있어 600 MPa 이내의 초고압처리는 콜라겐 분자의 저분자화에 미치는 영향이 미미하다는 것을 알 수 있었다. 따라서 초고압에 의한 콜라겐 분자의 저분자화는 600 MPa 이상의 초고압이 필요할 것으로 생각되었으나, 이러한 초고압처리는 식품산업의 고부가가치 또는 고품질화를 위한

경제성이 고려되어야 할 것으로 생각한다.



A protein marker B 0 MPa C 300 MPa, 10 min D 400 MPa, 10 min E 500 MPa, 10 min
F 600 MPa, 10 min G 300 MPa, 20 min H 400 MPa, 20 min I 500 MPa, 20 min J 600 MPa, 20 min

Fig. 10. SDS-PAGE pattern of pigskin proteins according to high pressure.



A protein marker B non treated C 0kGy D 20kGy E 40kGy
F 60kGy G 100kGy H 150kGy I 200kGy J 250kGy K 300kGy

Fig. 11. SDS-PAGE pattern of pigskin proteins according to irradiation doses and high pressure.

마. 방사선조사 후 효소처리에 의한 돈피 단백질의 변화

방사선조사에 의한 돈피 단백질의 저분자화에 대하여 용해도, 점도, 탁도 및 콜라겐 sub-unit의 변화에 대하여 알아본 결과, 돈피 단백질의 주성분인 콜라겐은 100 kGy 이상의 고선량 방사선조사에 의하여 효율적인 저분자화가 나타났으나, 600 MPa 이내의 초고압 단독처리 및 방사선조사와 병행한 초고압 처리 방법에서는 sub-unit를 변화시키는데 그 영향이 미미하다는 것을 알 수 있었다. 따라서 앞으로의 연구는 초고압처리에 의한 저분자화 연구를 지양하고 방사선조사와 효소의 병행처리에 의한 효율적 저분자화 연구에 대하여 모색하였다. 즉, 돈피를 방사선조사하면 돈피의 주요 성분인 콜라겐의 구조적 변화가 일어나 수용

성 성분이 증가하여 150 kGy 조사선량에서 대조구에 비하여 약 7배 이상 증가하는 것으로 나타났으며 300 kGy에서는 65.3%의 수용성 성분이 용출되었다. 수용성 성분의 SDS-PAGE에서 콜라겐의 저분자화가 이루어지는 알 수 있었으나 150 kGy의 조사선량에서도 100 ~ 300 kDa의 3중 나선구조 형태의 고분자가 상당부분 남아 있고, 300 kGy 조사선량에서도 불규칙한 형태로 잔존하는 것으로 나타나 저분자 펩타이드를 효율적으로 얻기 위한 방편으로 방사선조사 후 효소처리 가능성을 살펴보았다.

1) 수용성 성분의 변화

돈피를 0 ~ 300 kGy의 범위에서 방사선조사한 후 파파인 1%를 첨가하였을 때의 수용성 성분의 변화를 Fig. 12에 나타냈다. 방사선조사를 하지 않은 대조구는 약 55%가 수용성 성분으로서 용출되었으며, 방사선조사선량이 증가할수록 용출되는 수용성 성분은 증가하여 300 kGy 조사선량의 돈피는 90% 이상의 용해도를 보였다. 이러한 용해도 증가는 60 kGy 이하에서 증가폭이 크게 나타난 반면 100 kGy 이상에서는 소폭 증가하는 현상을 보였다. 한편, 효소반응 시간이 1시간에서 4시간으로 길어짐에 따라 용해도가 증가하고 있으나, 그 차이는 유의적 차이(α = 0.05) 이내로 나타났다. 이상의 결과를 살펴볼 때 300 kGy 수준의 고선량 방사선조사에 의하여 65.3%의 수용성 성분의 용해도를 보였는데, 본 실험의 파파인 효소를 이용할 경우에는 100 kGy 이내의 방사선조사선량에서도 80% 이상의 수용성 성분 용해도를 보이고 있어 방사선조사와 효소의 병행처리가 매우 효과적으로 콜라겐 분자의 저분자화를 유도할 수 있는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 방사선조사선량이 증가할수록 콜라겐구조를 약하게 하여 효소에 대한 소화력을 증가시키는 것으로 생각되었으며, 향후 방사선조사와 효소 병행처리를 이용한 콜라겐 펩타이드 제조시 경제성을 고려한 방사선 조사선량의 선정이 필요할 것으로 사료되었다.

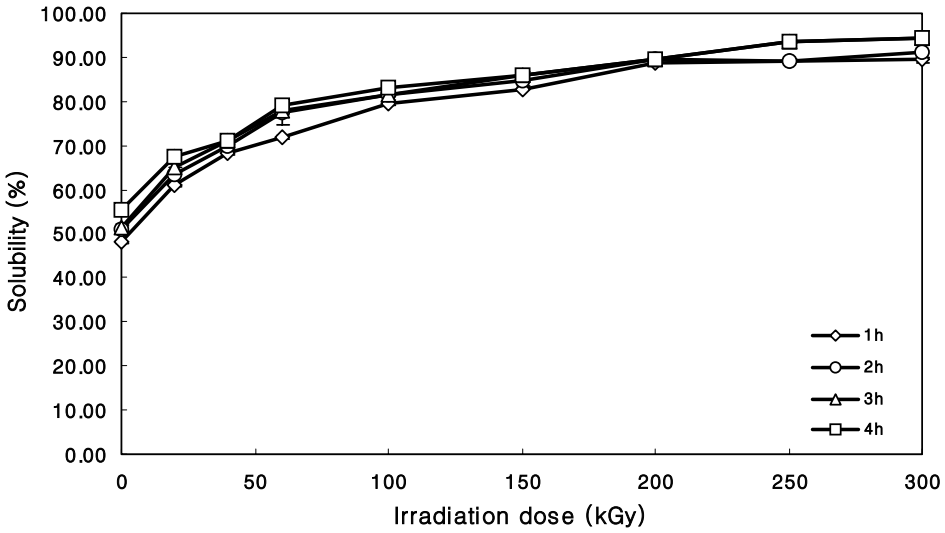


Fig. 12. Solubility of aqueous protein according to irradiation doses and enzyme treatment.

2) 점도 변화

돈피를 0 ~ 300 kGy의 범위에서 방사선조사한 후 파파인 1%를 첨가하였을 때의 수용성 성분(단백질 또는 펩타이드)의 점도 변화를 Fig. 13에 나타냈다. 방사선 조사선량이 증가할수록 점도는 감소하는 경향을 나타냈다. 전반적으로 100 kGy 이내의 조사선량에서는 점도가 급격히 감소하는 현상을 보였고, 100 kGy 이상에서는 일정수준의 저점도를 유지하고 있었다. 이러한 결과는 수용성 성분의 용해도 증가 변화와 밀접한 관계가 있음을 보여주고 있으며 특히 150 kGy 이상의 조사선량에서는 방사선조사가 콜라겐 구조를 급격하게 약화시켜 papain의 소화력에 영향을 주어 저분자화가 전반적으로 이루어지고 있음을 추론할 수 있었다.

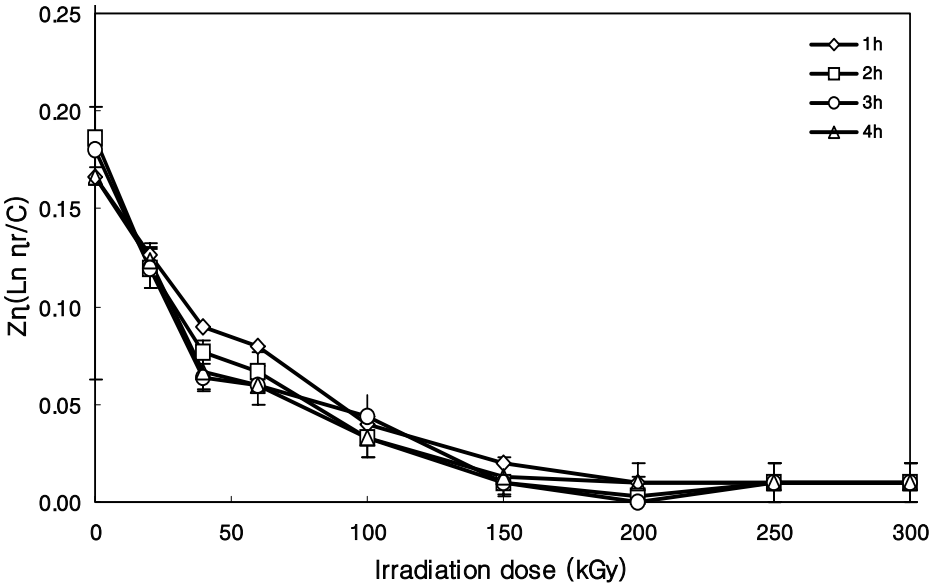


Fig. 13. Viscosity of aqueous protein according to irradiation doses and enzyme treatment.

3) 탁도 변화

탁도 변화(Fig. 14)는 점도 변화와 유사한 경향을 나타냈다. 즉, 100 kGy 이내의 방사선조사선량에서는 효소반응 시간에 관계없이 급격하게 탁도가 저하되고 있으며, 100 kGy 이상의 조사선량에서는 그 변화폭이 적은 것으로 나타났다. 이러한 현상은 수용성 성분의 용해도 및 점도와 매우 밀접한 것으로 나타났고, 고선량의 방사선조사가 콜라겐 구조를 급격하게 약화시켜 효소에 의한 소화력을 받기 쉬운 구조로 변형시켜 저분자화를 촉진시킨 결과임을 시사하고 있다.

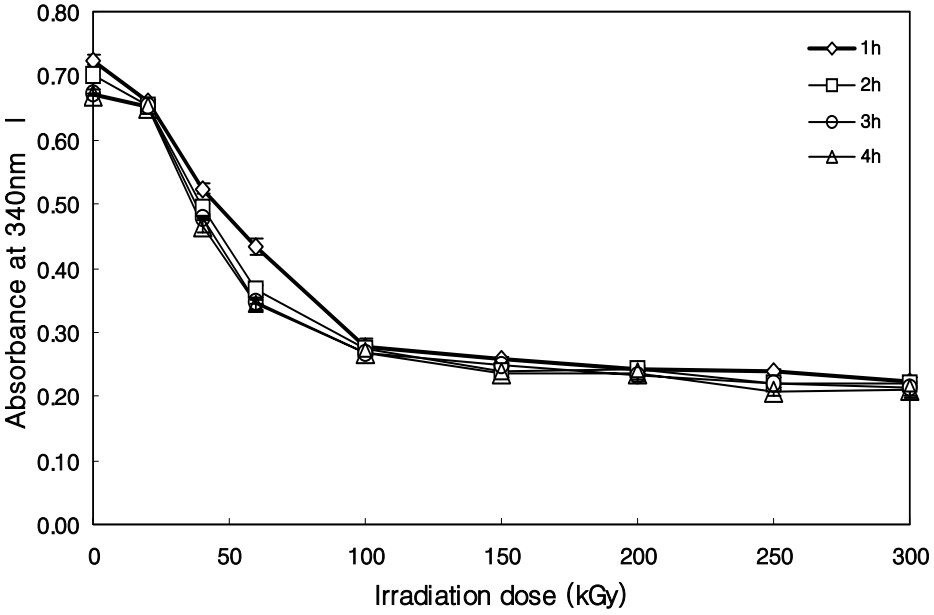
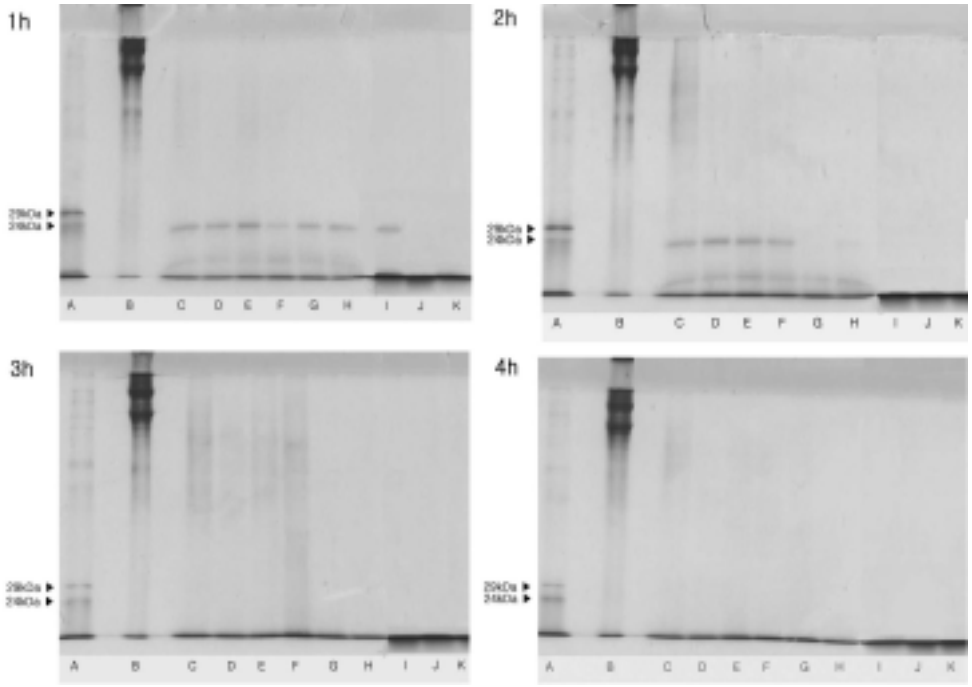


Fig. 14. Turbidity of aqueous protein according to irradiation doses and enzyme treatment.

4) 콜라겐 sub-unit 조성의 변화

방사선조사 후 효소처리를 하였을 때의 돈피 유래 콜라겐의 sub-unit 조성을 검토하였다. Fig. 15에 나타낸 바와 같이 효소처리를 하지 않은 대조구의 경우(B) α-, β- 및 γ 나선구조의 100 kDa ~ 300 kDa의 콜라겐 밴드가 나타났으나 파파인 효소처리를 한 경우(C ~ K)에는 이러한 콜라겐 밴드가 소실되는 반면 24 kDa의 밴드가 새롭게 형성되고 있다. 24 kDa의 밴드는 효소반응 1시간에서는 250 kGy 이상에서, 효소반응 2시간에서는 100 kGy 이상에서, 그리고 효소반응 3시간 이상에서는 방사선조사선량에 무관하게 나타나지 않았다. 그러나 200 kGy 이상의 방사선 조사선량에서는 효소반응 시간과 관계없이 10% SDS-polyacrylamide gel 하단에 콜라겐 분해물질로 예상되는 저분자 물질이 다

량 축적되는 현상을 나타내 콜라겐 분자의 저분자화를 위해서는 방사선조사 단독처리 또는 효소 단독처리 보다는 방사선조사와 효소의 병행처리가 효율적인 방법임을 제시하고 있다. 본 결과는 SDS 존재 하에서 관찰된 것으로써 소수결합, 수소결합 및 S-S 결합 등이 SDS나 mercaptoethanol로 쉽게 해리되어 단백질의 sub unit가 절단되는 현상을 야기하고 있으나 선행연구에서(양승용 등, 2002) 닭 껍질에서 유래한 산가용성 콜라겐 및 염가용성 콜라겐의 papain 처리에 의한 SDS-PAGE 밴드 형태와 HPLC에 의한 분자량 추정이 유사하게 나타나 돈피 유래 콜라겐 분자의 저분자화에서도 SDS나 mercaptoethanol의 영향이 미미할 것으로 생각되었다.



A protein marker B non treated C 0kGy D 20kGy E 40kGy
F 60kGy G 100kGy H 150kGy I 200kGy J 250kGy K 300kGy

Fig. 15. SDS-PAGE pattern of pigskin proteins according to irradiation doses and papain treatments.

2. 돈피 콜라겐 가수분해물의 기능적 특성

가. 돈피 콜라겐 가수분해물의 제조

돈피 콜라겐 유래 수용성 단백질의 용해도, 점도, 탁도 및 PAGE에 의한 sub unit 확인 등으로 방사선조사와 효소의 병행처리에 의한 환경친화적 올리고펩타이드의 제조가능성을 확인하였고, 방사선조사에 의한 콜라겐 가수분해물의 제조수율을 검토하고자 방사선조사를 하지 않은 대조구와 300 kGy로 조사한 돈피에서 수용성 단백질의 효소가수분해에 의한 제조수율을 나타냈다(Table 12). 가수분해에 사용한 효소는 선행연구의 닭 껍질 및 연골 콜라겐 펩타이드 제조시 검토하였던 papain, bromelain, HT-proteolytic, GC-710 중에서 분해능과 가격에서 우수한 것으로 나타난 papain을 사용하였다. 효소가수분해에 의한 가수분해물의 제조는 UF-10 (MWCO 10,000이상), UF-5 (10,000 ~ 5,000), UF-3 (5,000 ~ 3,000) 그리고 UF-1 (3,000 ~ 1,000)으로 구분하여 한외여과 하였으며, 한외여과 분획물을 동결건조하여 무게 측정에 의한 수율을 계산하였다. 한외여과에 의한 콜라겐 가수분해물의 수율은 Table 13에 나타낸 바와 같이 대조구에서는 64.1%, 300 kGy로 방사선조사한 경우에는 98.0%로써 방사선조사에 의하여 34% 이상의 가수분해물이 증가하였고, 이는 방사선조사에 의하여 콜라겐 단백질의 구조 변형이 일어나 papain 효소에 의하여 쉽게 가수분해되어 저분자화 되었기 때문으로 생각되었다. 콜라겐 가수분해물을 분자량별로 구분하면, 방사선조사 여부와 관계없이 분자량 10,000 이상의 가수분해물이 전체 가수분해물의 50% 이상을 차지하였고, 분자량 10,000 ~ 5,000 > 5,000 ~ 3,000 > 3,000 ~ 1,000 의 순서로 가수분해물이 생성되었다.

Table 13. Yields of collagen hydrolysates from pigskin

MWCO	Not irradiated		Irradated at 300 kGy	
	Dry wt(g)	Yield(%)	Dry wt(g)	Yield(%)
> 10000 Da	18.5	37.0	31.0	59.3
10,000 Da - 5,000 Da	6.5	12.9	9.9	18.9
5,000 Da - 3,000 Da	4.1	8.2	6.9	13.2
3,000 Da - 1,000 Da	3.0	6.0	3.4	6.6
계	32.1	64.1	51.2	98

나. 돈피 콜라겐 가수분해물의 *In vitro* 기능성

콜라겐 단백질이 비만억제, 피부노화억제, 피부탄력개선 등과 연관이 있고, 콜라겐 올리고펩타이드의 생리활성기능이 밝혀지면서 콜라겐 올리고펩타이드의 고부가가치화를 위한 상품화 기술이 기능성식품 분야의 주요 관심 대상이 되고 있다. 즉, 올리고펩타이드 중에서 Glycine-X-Y 형태 또는 glyproline peptide family (Pro-Gly, Gly-Pro, Pro-Gly-Pro, Hyp-Gly, Gly-Hyp, cycloPro-Gly) 형태의 콜라겐 유래 올리고펩타이드에서 항산화 활성(Togashi 등, 2002), 혈전용해 작용, 위점막 보호기능(Samonina 등, 2002; Ashimarin, 1998) 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있으므로 본 연구의 방사선조사기술 과 효소 병행처리에 의하여 제조한 올리고펩타이드의 혈압강하, 항산화 및 혈전용해 효과를 *In vitro*에서의 기능성을 살펴본 다음 *In vivo*에서 확인하여 관련 분야 기능성식품으로의 이용 가능성을 조사하였다.

1) ACE 저해율

혈압은 renin-angiotensin system에 의해 조절되며(William 등, 1995),

이 과정에서 angiotensin Ⅰ- converting enzyme(ACE)이 중요한 역할을 한다. ACE는 신장의 방사구체 세포에서 분비되는 renin의 작용에 의해 생성되는 decapeptide인 angiotensin Ⅰ에 작용하여 carboxy 말단으로부터 dipeptide가 잘라져 혈압상승에 중요한 역할을 하는 octapeptide인 angiotensin Ⅱ를 생성한다. 또한 ACE는 혈압강하 작용 펩타이드인 bradykinin의 불활성화를 촉진시킨다. ACE에 의해 생성된 angiotensin Ⅱ는 혈관수축을 일으키며 신장에서의 Na/수분의 재흡수를 증가시키고, 부신에서의 aldosterone 분비를 촉진하여 결과적으로 혈압을 상승시키는 작용을 한다. 따라서 ACE를 특이적으로 저해하는 물질은 혈압상승 억제효과를 가져오게 되므로, 제조된 가수분해물(올리고펩타이드)의 ACE 저해능을 살펴보고자 *in vitro*에서의 angiotensin Ⅱ의 생성증가를 억제하는 효과를 우선적으로 조사하였다. Peptide의 ACE 저해제는 초기에 뱀의 독에서 발견되었으며, 이 물질은 Glu-Lys-Try-Ala-Pro 배열을 가지는 pentapeptide인 것으로로 보고되고 있으며(Cushman 등, 1979), 이외에 gelatin, 오징어, 새우, 게, 정어리, 참치, 우유 등 동물성단백질의 가수분해산물로서의 peptide가 ACE 저해활성이 강한 것으로 보고되고 있다(홍상필 등, 1998). Table 14에 300 kGy로 방사선조사한 시료를 papain 효소 가수분해하여 얻은 한외여과물의 분자량별 ACE 저해율을 나타냈다. ACE 저해율은 분자량 10,000 이상의 가수분해물에서 72.9%를, 분자량 10,000 ~ 5,000 범위의 가수분해물에서 92.9%, 분자량 5,000 ~ 3,000 범위의 가수분해물에서 91.8%, 그리고 분자량 3,000 ~ 1,000 범위의 저분자 가수분해물에서 91.5%의 ACE 저해율을 보여 콜라겐 가수분해물의 ACE 저해율은 분자량 10,000 ~ 5,000 범위에서 가장 높은 것으로 나타났다. 이러한 돈피 콜라겐 가수분해물의 ACE 저해율은 선행연구의(양승용 등, 2002) 분자량 7,000 수준의 닭 껍질 콜라겐 펩타이드에서 58%의 ACE 저해율이 나왔다는 결과보다 전반적으로 높은 것으로 나타났다. 한편, ACE 저해율을 50%까지 감소시킬 수 있는 펩타이드 농도인 IC_{50}은 Table 15에 나타낸 바와 같이 분자량 10,000 이상의 가수분해물에서 410 ㎍/ml을, 10,000 ~ 5,000 에

서에서 380 μg/ml을, 5,000 ~ 3,000에서 370 μg/ml을, 그리고 3,000 이하의 저분자에서 890 μg/ml을 나타냈다. 지금까지 알려진 peptide ACE 저해제의 IC_{50}은 peptide의 종류와 분자량에 따라 다른 것으로 보고되고 있는데, 새우, 게 등의 가수분해물은 72.0 ~ 75.0, 대두 가수분해물은 6.8 ~ 293.0, 오징어의 특정 peptide는 7.5 ~ 600.0 그리고 chitosan oligosacchride는 0.5 ~ 120.3인 것으로 보고되며(홍상필 등, 1998), 이러한 ACE 저해활성은 분자량 1,000 이하의 저분자 펩타이드에서 강한 것으로 보고되고 있는데 본 연구에서는 분자량 3,000 이하의 저분자 peptide에서 오히려 IC_{50}이 높은 것으로 나타나 상기의 연구 결과와는 차이를 보이고 있다. 이러한 결과는 ACE 저해에 미치는 특정 peptide의 절단이나 아미노산 잔기 생성에 방사선조사가 미치는 영향이 크다는 것을 간접적으로 예상할 수 있었다.

Table 14. ACE inhibition rate of collagen hydrolysates

MW[a)]	ACE inhibition rate(%)[b)]
> 10.000	72.9 ± 14.9
10,000 ~ 5,000	92.9 ± 2.0
5,000 ~ 3,000	91.2 ± 2.8
3,000 ~ 1,000	91.6 ± 0.6

a) Concentration=10 mg/mL, n=3
b) Mean±S.E.

Table 15. Concentration of collagen hydrolysates for IC_{50}

MW	IC_{50}(μg/ml)[1)]
> 10,000[a)]	410
10,000 ~ 5,000[b)]	380
5,000 ~ 3,000[b)]	370
3,000 ~ 1,000[b)]	890

a) Concentration=2 mg/mL b) Concentration=1 mg/mL
1) The Concentration of peptide needed to 50% decrease of the ACE inhibition

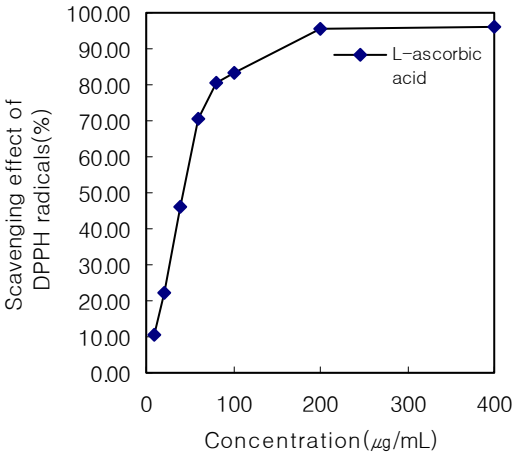
2) 항산화 활성

일반적으로 식품에서 이용되고 있는 인공 항산화제는 phenolic compounds로써 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), TBHQ(tertiary butyl hydroquinone), 비타민 C 및 E등이 법적으로 허용되어 있는데(Giese, 2005; 식품첨가물공전, 2005), 이들 합성항산화제는 안전성에 논란이 있고 소비자의 거부감이 심해짐에 따라 오래전부터 먹어왔던 동식물로부터 항산화 효과가 있는 물질을 분리 이용하려는 시도가 이루어지고 있다. 이들 중에는 천연채소 및 과실류에 널리 분포되어 있는 ascorbic acid, tocopherol, carotenoids, flavonoids 등이 있으며 단백질과 탄수화물의 상호 반응에 의하여 생성된 maillard 반응 생성물에서도 항산화 효과가 있음이 밝혀지고 있다(Evans 등, 1958; Lee, 1992). 그리고 식물성단백질 가수분해물과(Pratt 등, 1981), 동물 근육조직의 dipeptide인 carnosine 함유 추출물에서도 항산화성이 밝혀진 바 있다(Chan 등, 1993). 또한 Glycine-X-Y 형태의 콜라겐 유래 올리고펩타이드에서 강한 항산화 활성이 존재하는 것을 보고(Togashi 등, 2002)한 바 있으므로 본 연구에서도 콜라겐 유래 가수분해물의 항산화 효과를 살펴보았다.

① DPPH radical scavenging 측정

DPPH는 수소에 전자를 제공해 주는 전자공여체와 반응하게 되면 전자나 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하면서 흡수 band도 사라지게 되고 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며, 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH 색깔은 점점 옅어지게 되고 흡광도도 감소하게 된다. 이러한 원리를 이용하여 DPPH radical scavenging을 측정하여 그 결과를 Fig. 16에 나타냈다. Ascorbic acid의 경우에는 200 μg/mL 이상의 농도에서 90% 이상의 소거효과를 나타낸 반면, 콜라겐 가수분해물의 경우에는 분자량의 크기에 관계없이 8,000 μg/mL의 농도에서도 소거활성이 거의 나타나지 않았다. 본 연구 책임자는 분자량 3,000 이하의 저분자 콜라겐 펩타이드에서 항산화 활성을 기대하였으나, 본 연구결과 콜라겐 가수분해물에서는 항산화 활성이 나타나지 않았고

이는 방사선조사에 의하여 생성되는 free radical과 간접적인 관계가 있을 것으로 예상하였다.



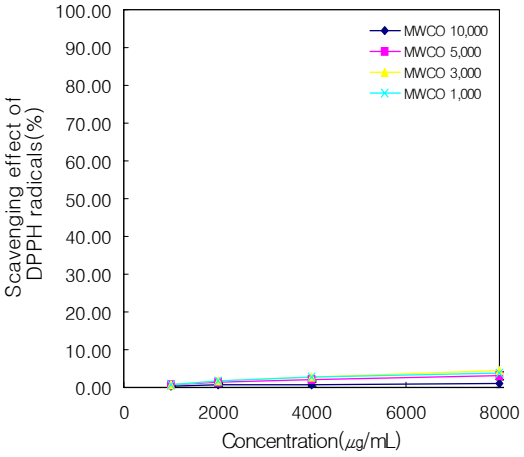


Fig. 16. The radical scavenging effect of L-ascorbic acid and collagen hydrolysates on DPPH radical

② Superoxide anion scavenging 측정

DPPH radical scavenging 측정에서 콜라겐 가수분해물의 소거활성이 거의 나타나지 않아, xanthine-xanthine oxidase에 의한 NBT 환원법을 이용하여 superoxide anion scavenging 효과를 살펴보았다. 일반적으로 xanthine oxidase는 xanthine을 uronic acid로 산화시키고 부산물로 superoxide anion을 만드는데, 이 때 생성된 superoxide anion이 NBT를 환원시켜 560nm에서 흡광을 나타내게 된다. Fig. 17에 콜라겐 가수분해물의 superoxide anion scavenging 결과를 나타냈다. DPPH radical scavenging 결과와 마찬가지로 ascorbic acid의 경우에는 200 μg/mL 이상의 농도에서 80% 이상의 소거효과를 나타낸 반면, 콜라겐 가수분해물의 경우에는 10,000 μg/mL의 고농도에서도 4% 이내의 소거 활성을 보여 콜라겐 가수분해물들이 항산화 효과가 미미하다는 것을 나타내고 있다.

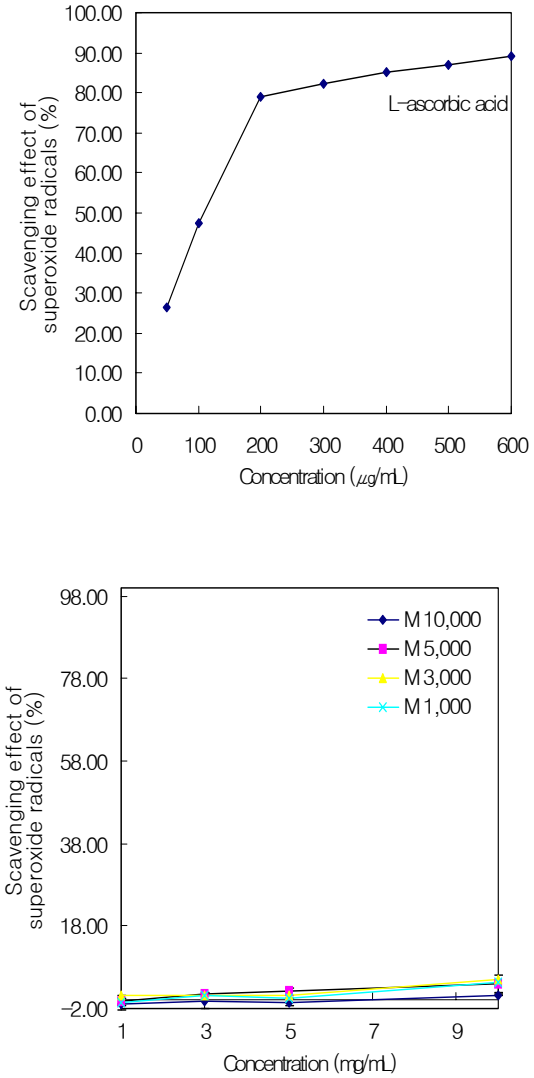


Fig. 17. Superoxide radical-scavenging activities of L-ascorbic acid and collagen hydrolysates on xanthine-xanthine oxidase system by the NBT method.

3) Fibrin plate를 이용한 혈전용해 활성 측정

체내에서 혈전의 생성은 생체내의 복잡한 혈전생성기작(blood cascade mechanism)에 의해 활성화된 트롬빈에 의하여 피브리노겐이 피브린으로 전환되어 혈소판과 불용성의 중합체를 만들면서 형성된다. 즉 상처발생 시 복구를 위해 혈전이 생성되는데, 혈액의 응고와 용해 작용의 항상성이 깨져 상처복구 후에도 분해되지 않고 정맥, 동맥에서 혈액의 순환을 방해하여 조직으로의 영양공급 및 산소공급을 차단함으로써 뇌출혈, 심부전, 심근경색, 동맥경화 등의 성인병을 일으킨다. 최근 식품단백질이나 혈액단백질로부터 아편상 펩타이드(opioid peptides), 항암 펩타이드(tumor suppressing peptides), 탐식작용촉진 펩타이드(phagocytic peptides), 칼슘흡수촉진 펩타이드(caseinophospho peptides), 혈중 콜레스테롤 감소 펩타이드(hypocholesterolemic peptides) 그리고 혈전용해 펩타이드(antithrombotic peptides) 등과 관련된 생리활성 펩타이드에 대한 연구가 진행되고 있다. 혈전용해 펩타이드는 RGDS 등 RDG 서열을 갖는 펩타이드에서 혈소판 응집활성 및 암의 전이 저해활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(D'Souza 등, 1991). 이외에 대두단백질 유래의 DEGLPR 펩타이드(Kanazawa, 1996), 된장 유래의 염기성 펩타이드 분획(Shon 등, 1996) 등에서 혈소판 응집 저해활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 분획된 콜라겐 가수분해물의 혈전용해 활성을 측정하기 위하여 우선적으로 분자량별 고농도(10 mg/ml, 8mg/ml)에 의한 혈전용해 활성을 조사하였고(Table 15), 그 결과에 따라 혈전용해 활성이 높은 분자량을 선택하여 농도별 혈전용해 활성을 재검토하였다. 콜라겐 가수분해물의 혈전용해 활성을 측정하기 위하여 가수분해물을 10 mM potassium buffer(pH 8.0)에 용해하여 실험목적에 따라 2 ~ 10 mg/mL의 농도로 조절하였으며, 8 mm paper disk에 점적하여 fibrin plate법에 의한 혈전용해 활성을 측정하여 콜라겐 가수분해물의 용해면적과 plasmin(1 unit/mL)이 용해한 면적을 백분율로 나타냈다. Table 16에 나타난 바와 같이 콜라겐 가수분해물의 혈전용해 활성은 농도에 따라 그리고 분자량에 따라 큰 차이를 보였다. 분자량 10,000 이상의 가수분해물에서는 8

mg/ml, 10 mg/ml의 농도에서 각각 51.6%, 89.8%를 나타낸 반면에 분자량이 적어질수록 혈전용해 활성은 급격히 저하되어 10 mg/ml의 농도에서 분자량 10,000 ~ 5,000에서는 29.2%, 5,000 ~ 3,000에서는 20.3% 그리고 3,000 ~ 1,000 에서는 24.3%를 보였다. 본 연구결과를 토대로 향후 *in vivo* 실험에서는 분획물이 많으면서 혈전용해 활성이 비교적 높은 분자량 10,000 이상과 10,000 ~ 5,000 범위의 콜라겐 가수분해물을 이용하였다. Fig. 18에 분자량 10,000 이상과 10,000 ~ 5,000의 가수분해물에 대한 농도별 혈전용해 활성을 나타냈다. A-plate는 분자량 10,000 이상의 가수분해물에 대한 혈전용해 활성을 나타낸 것으로써 2 mg/ml 이상의 농도에서 혈전용해 활성이 나타났으며, 가수분해물의 농도가 높아질수록 혈전용해 활성은 뚜렷하게 증가하여 10 mg/ml에서는 plasmin 1unit/ml의 90%에 상당하는 활성을 보였다. 반면에 B-plate에서와 같이 분자량 5,000 ~ 10,000의 가수분해물의 활성은 A-plate에 비하여 현저히 저하되고 있음을 보여주고 있다.

이상의 결과를 종합하면 콜라겐 가수분해물은 분자량의 크기에 따라 기능적 특성이 달리 나타나고 있음을 알 수 있었다. 즉, 콜라겐 가수분해물에 의한 혈압강하 효과는 분자량 5,000 ~ 10,000의 분획물에서, 혈전용해 활성은 분자량 10,000 이상의 분획물에서 뚜렷하게 나타났으며, 항산화 효과는 콜라겐 가수분해물에서는 없는 것으로 나타났다.

Table 16. Fibrinolytic activity of collagen hydrolysates

MW	Ratio of fibrinolytic activity(%) [a)]	
	8 mg/ml	10 mg/ml
> 10.000	51.6	89.8
10,000 ~ 5,000	20.1	29.2
5,000 ~ 3,000	16.8	20.3
3,000 ~ 1,000	18.6	24.3

[a)]Fibriolytic activity ratio of collagen hydrolysates to the 1 unit of plasmin

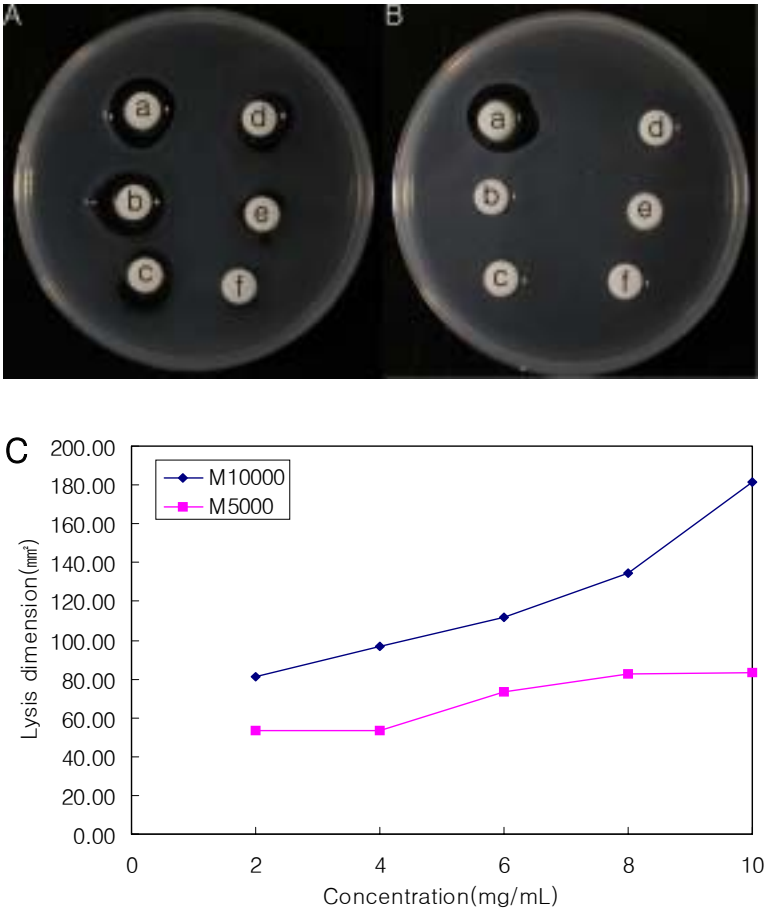


Fig. 18. Fibrinolytic activity of plasmin and collagen hydrolysates.

A : MW >10,000, B : MW 5,000 ~ 10,000

a) plasmin 1 unit/ml b) 10 mg/ml c) 8 mg/ml, d) 6 mg/ml e) 4 mg/ml f) 2 mg/ml

다. 방사선조사 콜라겐 가수분해물의 돌연변이원성 시험

Maron과 Ames(1983)의 방법을 이용하여 방사선조사에 의한 콜라겐 가수분해물의 돌연변이원성 시험을 실시하였다. GFC를 통해 분획한 분자량 1,000, 3,000, 5,000 및 10,000 fraction에 대한 *Salmonella typhimurium* TA98와 TA100에 대한 복귀돌연변이 집락수를 조사한 결과는 Table 17과 같다. 우선 대사활성 부재 시, 모든 시험균주에서 시험적용 농도인 μg/plate의 범위에서 복귀돌연변이 집락수가 용매 대조군과 비교하였을 때 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한 대사활성계(S-9 mixture)를 도입하였을 때 시험물질에 대해 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험결과에서도 시험한 모든 검체는 적용농도에서 복귀돌연변이 집락수가 유의적으로 차이가 없었다. 일반적으로 돌연변이원성의 판정은 음성대조군 복귀변이 집락수의 2배 경우를 양성으로 하므로 시험적용농도에서 복귀 돌연변이를 유발하지 않은 것으로 보아 방사선조사에 의한 각 콜라겐 가수분해물의 fraction에 는 방사선조사에 의한 돌연변이원성은 없는 것으로 나타났다.

Table 17. Desmutagenic effect of the collagen hydrolysates from gel filtration chromatography in *S. typhimurium* TA 98 and TA 100

Sample	Dose (μg/plate)	Number of revertant colonies (His+) per plate			
		TA98(-S9)	TA98(+S9)	TA100(-S9)	TA100(+S9)
M:1,000 Fr-10	1	38±2	27±1	194±15	211±1
	2	38±1	16±6	175±12	195±13
	3	31±8	21±6	182±25	203±8
	4	24±1	19±5	178±6	186±1
	5	30±13	21±1	134±17	117±15
M: 1,000 Fr-11	1	31±6	17±1	269±1	266±48
	2	26±6	15±5	246±57	252±25
	3	17±6	18±7	204±18	226±28
	4	16±3	19±4	208±20	238±20
	5	13±1	21±4	252±11	274±8
M: 3,000 Fr-10	1	37±1	21±3	264±26	245±35
	2	29±2	15±2	192±11	216±4
	3	28±3	20±6	175±2	227±36
	4	33±9	22±2	182±1	251±19
	5	23±3	19±6	215±6	238±3
M: 3,000 Fr-11	1	32±3	14±1	333±69	341±46
	2	34±6	16±1	280±28	304±42
	3	35±1	15±6	255±1	343±41
	4	34±5	17±6	226±6	367±28
	5	18±6	21±1	255±8	296±19
M: 5,000 Fr-10	1	33±4	22±6	220±14	258±23
	2	28±5	26±7	207±18	219±6
	3	27±10	21±4	215±35	214±11
	4	34±3	15±3	182±19	228±15
	5	32±9	20±3	191±23	270±42
M: 5,000 Fr-11	1	31±7	20±3	258±57	321±13
	2	25±4	18±11	283±14	313±13
	3	19±2	21±6	259±48	324±38
	4	17±1	21±1	249±67	361±18
	5	15±1	19±5	233±41	287±18
M: 10,000 Fr-10	1	26±3	21±9	299±15	264±2
	2	22±6	16±8	275±7	230±8
	3	23±3	21±5	259±1	236±14
	4	18±6	14±5	255±27	242±1
	5	17±1	13±1	232±14	195±22
Negative control	buffer	26±4	18±5	327±35	340±28
Positive control	4-NQO 0.5	536±283			
	2-AA 2		693±123		
	SA 0.5			721±57	
	2-AA 2				811±56

4-NQO, 4-Nitroquinoline-1-oxide/ SA, Sodium azide/ 2-AA, 2-Aminoanthracene.
[a] Values are the Mean±SD ($p<0.05$).

라. 돈피 콜라겐 가수분해물의 *In vivo* 기능성

1) 돈피 콜라겐 가수분해물에 의한 SHR의 혈압강하 효과

In vitro 실험에서 콜라겐 가수분해물의 분자량별 수율과 기능성(혈압강하 효과, 항산화 효과 및 혈전용해 효과)에 대하여 살펴보았다. 그리고 복귀돌연변이원성 실험을 통하여 방사선조사에 의하여 생성된 콜라겐 가수분해물의 안전성을 확인하였다. 따라서 쥐를 이용한 *In vivo* 실험에서는 *In vitro*실험에서 회수율이 높으면서 기능성이 나타난 콜라겐 가수분해물인 분자량 10,000 이상과 분자량 10,000 ~ 5,000의 두가지 분획물을 중심으로 SHR의 혈압강하 효과 그리고 Sprague-Dawley Rat의 전혈 응고시간에 따른 항혈전능 효과에 대하여 살펴보았다.

Table 18, 19에 ACE 저해활성을 나타낸 분획물의 *in vivo*에서의 혈압강하 효과를 검토하여 그 결과를 나타냈다. 콜라겐 가수분해물에 의한 SHR의 혈압강하 효과를 조사하기 위하여 콜라겐 가수분해물(분자량 10,000 이상/ 분자량 10,000 ~ 5,000)을 각각 10 mg/kg의 농도로 조절하여 매일 일정시간(오전 9시 ~ 9시 30분)에 1회 경구투여한 뒤 일주일별로 체중과 혈압을 6주간 측정하였다. Table 17에 실험동물의 6주간 체중 변화를 나타냈다. 평균적으로 초기(8주령)에는 211 ~ 216g의 체중을 나타냈으나 6주(14주령) 후에는 313 ~ 318g으로 체중이 50% 정도 증가하였다. 실험시작 3주(11주령)까지는 체중 증가폭이 컸으나 4주(12주령)부터는 체중 증가폭이 줄어드는 경향을 보여 이때부터 실험동물이 점차 노화되는 것으로 예상되었다. 한편, 콜라겐 가수분해물을 경구투여한 군이나 대조구로써 증류수를 투여한 군이나 각 주령별 체중차이는 나타나지 않았다. 대조군으로서 증류수를 경구투여한 군과 콜라겐 가수분해물을 경구투여한 군의 6주간 혈압 변화를 Table 18에 나타냈다. 대조군의 경우 6주 동안 혈압이 190 ~ 195 으로 일정한 수준을 유지하였으나, 콜라겐 가수분해물을 경구투여한 군에서는 실험동물의 체중 증가에도 불구하고 2주 이후부터 대조군에 비하여 유의적으로 혈압강

하가 뚜렷하게 나타났으며 이러한 유의적 차이는 4주간 지속적으로 유지되고 있었다. 이러한 결과는 콜라겐 가수분해물이 분자량에 관계없이 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 혈압강하 효과가 나타나고 있음을 보여주어 관련 분야의 식품산업에 이용가치가 있음을 제시하고 있다.

Table 18. Body weight in SHR for 6 weeks.

Week	Control	M 10,000 >	> M 5,000
0	211.1±4.2	210.7±6.2	215.8±5.0
1	246.5±5.2	246.1±8.7	252.5±6.5
2	266.0±3.9	266.0±10.8	269.4±6.3
3	289.0±7	280.9±11.9	285.3±9.4
4	303.0±5.4	297.4±9.8	299.8±9.3
5	302.6±5.3	300.2±10.2	313.5±9.0
6	313.0±7.5	318.1±11.5	313.8±9.6

* Values are Mean±SD

Table 19. Systolic blood pressure in SHR for 6 weeks.

Week	Control	M 10,000 >	> M 5,000
0	195.3±15	188.3±12.7	185.6±9.4
1	192.6±7.6	182.3±16.6	180.8±9.9
2	192.6±8.5[a)]	172.3±7.3[b)]	169.1±5.0[b)]
3	192.6±4.4[a)]	170.5±4.2[b)]	170.0±4.1[b)]
4	191.1±4.3[a)]	172.3±4.4[b)]	170.1±3.7[b)]
5	192.4±3.0[a)]	173.0±3.1[b)]	170.6±2.6[b)]
6	190.9±2.0[a)]	171.1±2.5[b)]	170.4±1.5[b)]

* All values are Mean±SD
* Values within the same row with different alphabets are significantly different ($p<0.01$)

2) 돈피 콜라겐 가수분해물의 전혈응고 시간에 따른 항혈전능 효과

콜라겐 가수분해물에 의한 항혈전능 효과를 조사하기 위하여 생후 6주령의 Sprague-Dawley종 수컷 쥐를 이용하였으며, 실험시작 전 3주간 고지방식이를 통하여 적응훈련 시켰다. 이후(9주령) 콜라겐 가수분해물(분자량 10,000 이상/ 분자량 10,000 ~ 5,000)을 각각 10 mg/kg의 농도로 조절하여 매일 일정시간(오전 9시 ~ 9시 30분)에 1회 경구투여한 뒤 일주일별로 체중과 혈압을 4주간 측정하였다. Table 20에 실험동물의 4주간 체중 변화를 나타냈다. 초기(9주령)에는 372 ~ 402g의 체중을 보였는데 4주후(13주령)에는 23 ~ 25%의 증가율을 보인 476 ~ 495g의 체중으로서 대조군과 콜라겐 가수분해물 투여군과 큰 차이를 보이지 않았다. 콜라겐 가수분해물의 항혈전능 효과를 살펴보기 위하여 전혈응고 시간 변화를 측정하여 그 결과를 Table 21에 나타냈다. 전혈응고 시간은 대조군, 콜라겐 가수분해물 투여군에 관계없이 주령 및 체중이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 고지방식에 따른 혈전 생성 유발과 관계가 있을 것으로 예상되었으며, 각 실험군에서 전혈응고 시간의 편차가 크게 나타난 것은 SD rat 개체간의 차이가 주요 원인인 것으로 생각되었다. 주령별 콜라겐 가수분해물 투여군의 종류에 따른 전혈응고 시간을 살펴보면, 분자량 10,000 이상의 콜라겐 가수분해물 투여군에서 전혈응고 시간이 길어지는 현상을 보였고, 특히 2주차(11주령) 이후에는 유의적으로 길어졌다. 이러한 결과는 fibrin plate를 이용한 혈전용해 활성을 측정한 *in vitro* 실험에서도 분자량 10,000 이상의 콜라겐 가수분해물에서 뚜렷한 혈전용해 활성을 보여주고 있어 그 결과를 뒷받침하고 있다. 반면에 분자량 10,000 ~ 5,000의 콜라겐 가수분해물 투여군은 대조군에 비하여 전혈응고 시간이 약간 짧아지는 경향을 보였는데 유의적 차이가 없었으며, 이러한 결과는 혈전용해 활성이 미약한 *in vitro* 실험의 결과와 유사하였다.

이상의 SH rat을 이용한 혈압강하 효과, 그리고 SD rat을 이용한 항혈전능 효과는 in vitro 실험과 유사한 결과를 가져왔으며, 본 실험에서 조제한 콜

라겐 가수분해물의 기능성 식품으로의 이용 가능성을 제시하고 있다.

Table 20. Body weight in Sprague-Dawley rats for 4 weeks.

Week	Control	M 10,000 >	> M 5,000
0	389.0±4.8	382.2±8.9	402.0±14.5
1	409.1±12.7	407.2±10.8	424.4±23.8
2	429.9±14.8[a)b)]	412.6±9.8[b)]	444.8±22.6[a)]
3	463.4±9.7	439.0±11.1	456.9±20.1
4	476.8±11.5	479.0±20.4	495.0±22.8

* All values are Mean±SD
* Values within the same row with different letters are significantly different ($p<0.05$)

Table 21. Blood clotting times of Sprague-Dawley rats for 4 weeks

Week	Control	M 10,000 >	> M 5,000
0	504.5±56.2	484.2±63.1	486.6±28.8
1	446.8±42.6	502.0±63.1	437.0±37.6
2	436.5±35.9[a)b)]	497.6±55.7[a)]	393.4±46.7[b)]
3	352.0±22.8[b)]	394.2±18.0[a)]	333.8±27.3[b)]
4	352.0±31.0[b)]	401.6±46.0[a)]	335.0±15.3[b)]

* All values are Mean±SD
* Values within the same row with different letters are significantly different ($p<0.05$)

3. 콜라겐 가수분해물의 올리고펩타이드 분리 및 정제

가. Fast Protein Liquid Chromatography를 이용한 콜라겐 가수분해물의 분리 및 분자량 확인

혈압강하 및 항혈전능 효과가 나타난 한외여과 분획물을 분리정제하기 위해 gel permeation chromatography를 수행하였다. 분자량 10,000 이상과 10,000 ~ 5,000의 분획시료를 각각 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH 7.0) buffer에 녹여 10 mg/mL의 농도로 조절한 다음 superdex 200 column을 이용하여 분리한 결과를 Fig. 19에 나타냈다. 분자량 10,000 이상의 분획물에서는 한 개의 peak가 용출되었고, 10,000 ~ 5,000 분획에서는 shoulder 현상이 있는 2개의 peak가 용출되었다. 용출된 peak의 분자량 측정을 위해 molecular weight calibration standard로 용출한 결과 분자량을 알고 있는 Albumin, Ovalbumin, Ribonuclease A의 elution volume은 각각 14.91, 15.58, 18.8 mL 이었고, 한외여과 분획물들의 elution volume은 분자량 10,000 이상의 분획물은 19.28 mL, 분자량 10,000 ~ 5,000 분획물은 20.15, 21.33 mL로 측정되었다. 검량선을 이용하여 분자량을 측정한 결과 콜라겐 가수분해물은 분자량 12,000, 8,000, 5,000 Da 크기인 것으로 확인하였다(Fig. 20).

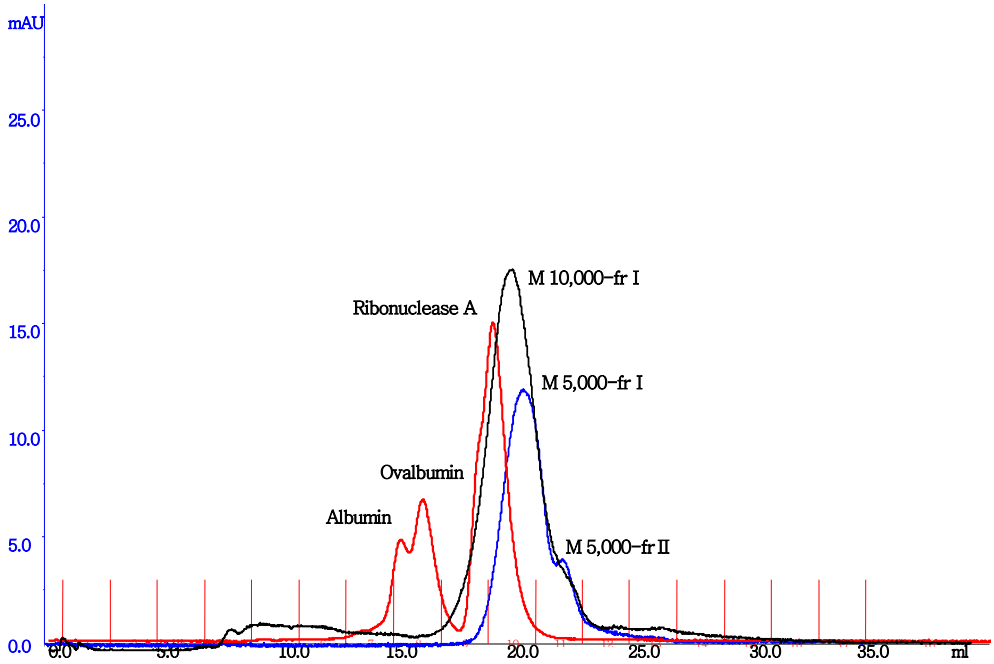


Fig. 19. Separation of collagen hydrolysates by superdex 200 using FPLC

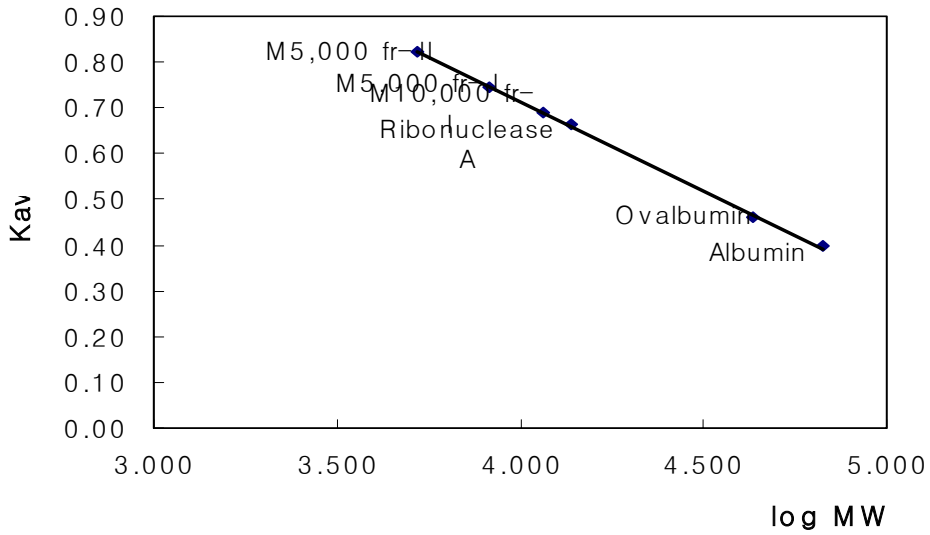


Fig. 20. Standard curve for the determining of molecular weight of collagen hydrolysates

나. RP-HPLC에 의한 2차 분리

Fast Protein Liquid Chromatography를 이용하여 분리된 활성 펩타이드의 순도를 높여 아미노산 서열분석에 이용하기 위하여 Vydac 218TP1010 column을 이용한 RP-HPLC에서 2차 분리하였다. Fig. 21은 RP-HPLC에 의하여 분리된 peak를 나타낸 것으로 FPLC에 의하여 확인된 분자량 12,000 fraction(A)은 retention time 7.6 min.에서 단일 peak로 분리되었고, 분자량 5,000 fraction(C)은 retention time 7.8 min.에서 단일 peak로 분리할 수 있었다. 그러나 분자량 8,000 fraction(B)은 C_{18} column을 이용한 RP-HPLC에서 분리가 지난하였다. 따라서 분자량 8,000 fraction(B)의 분리를 위하여 시료성분이 전하와 이동도에 따라 분리가 가능한 모세관 전기영동법(CE, capillary electrophoresis)을 이용하는 방안이 모색되어야 한다.

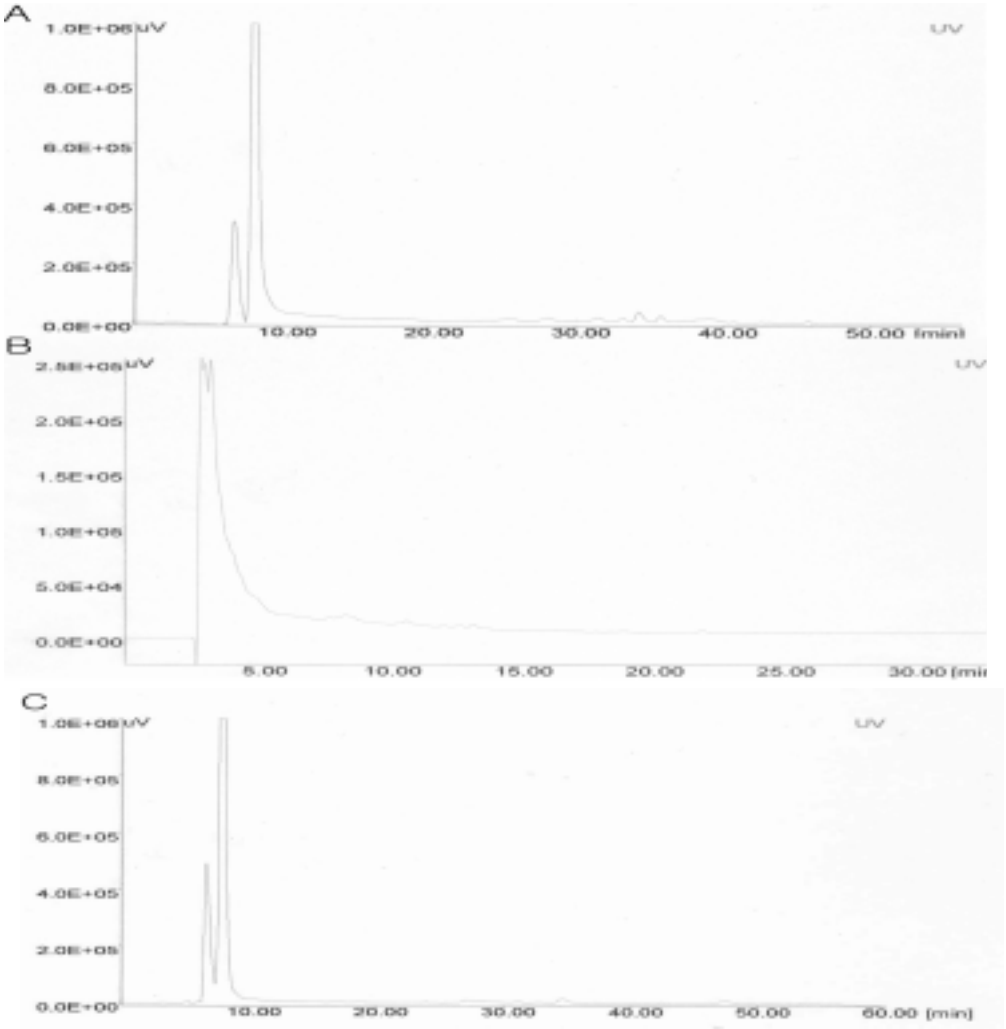


Fig. 21. Separation of collagen peptide by RP-HPLC on Vydac 218TP1010 column

A : MW 12,000
B : MW 8,000
C : MW 5,000

다. 분리된 콜라겐 펩타이드의 순도 확인

Vydac 218TP1010 column을 이용하여 RP-HPLC에서 분리한 콜라겐 펩타이드의 순도를 확인하기 위하여 Vydac 218TP54 column으로 RP-HPLC(JASCO

PU 980, JAPAN) 분석을 하였다. 펩타이드 분리능 향상을 위하여 0.1% TFA와 100% acetonitril로 linear gradient elution 하였으며, Fig. 22에 나타낸 바와 같이 분자량 12,000 fraction과 분자량 5,000 fraction이 단일 peak로 나타나고 있음을 확인할 수 있었으며, 분리된 fraction의 주요 아미노산 조성 분석에 이용하였다.

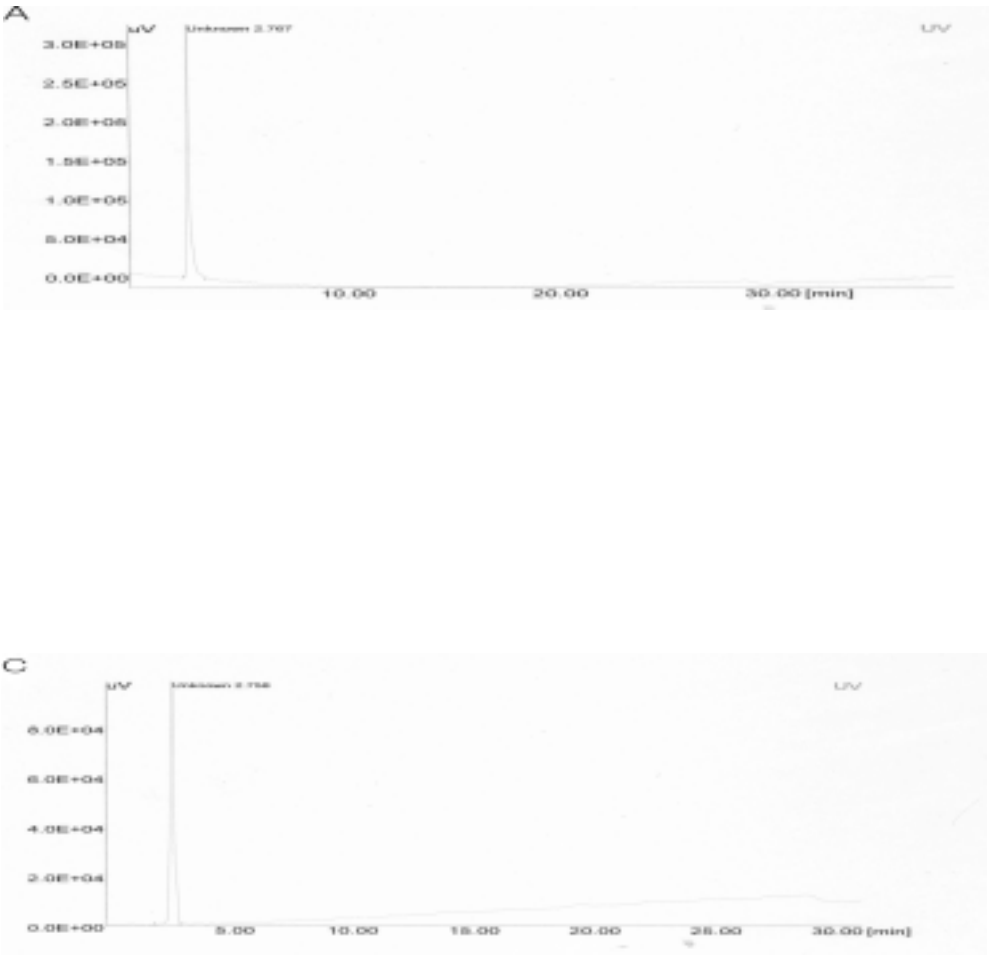


Fig. 22. Identification of collagen peptides by RP-HPLC on Vydac 218TP54 column

A : MW 12,000
B : MW 8,000
C : MW 5,000

라. 올리고펩타이드의 주요 아미노산 구성 및 배열

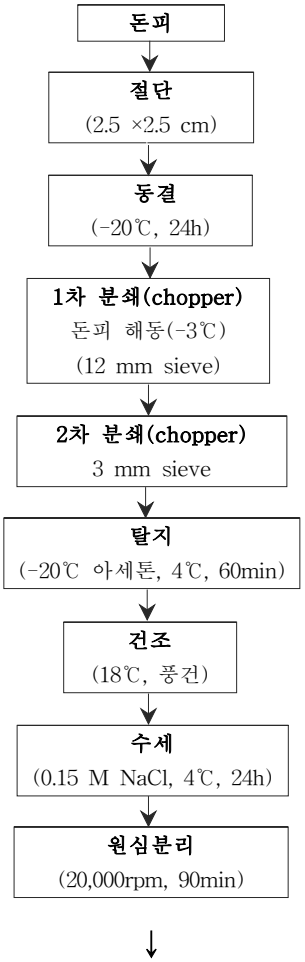
본 연구에서는 RP-HPLC를 이용하여 단일 peak로 분리한 분자량 12,000 및 5,000 올리고펩타이드를 구성하는 주요 아미노산과 서열 분석을 위하여 한국기초과학지원연구원 서울센타에 의뢰하였다. 당초 아미노산 배열을 확인하고자 한 목적은 방사선조사 또는 초고압에 의한 돈피 단백질의 가수분해물인 올리고펩타이드의 아미노산 배열이 기존의 논문에 나타난 결과와 유사한지를 확인하고자 하였으나, 연구 과정에서 분자량 10,000 이상 및 분자량 10,000 ~ 5,000 의 콜라겐 가수분해물에서 혈압강하 및 혈전용해 등의 효과가 나타난 반면 분자량 3,000 이하의 저분자 펩타이드에서는 이러한 효과가 나타나지 않아 3,000 이하의 저분자 펩타이드를 제조하거나 순수 분리할 필요성을 느끼지 않았고, 식품산업에서 기능성 식품으로 이용하기에는 분자량 5,000 이상의 펩타이드 만으로도 생리활성 및 경제성에서 우수한 것으로 판단되어 RP-HPLC에 의하여 분리한 분자량 12,000 및 5,000 펩타이드의 아미노산 배열을 조사하였다. 12,000 Da의 경우 10 잔기(residues)를 분석하였는데 R1 = Gly, Ala, Leu, Lys; R2 = Pro, unknown; R3 =Gly; R4 =Pro; R5 =Ala, Lys; R6 = Gly; R7 = Pro; R8 = unknown; R9 = Gly; R10 = pro로 나타났다. 본 결과를 살펴볼 때 분자량 12,000 fraction의 경우 순수한 단일 peptide로 구성되어 있다고 볼 수 없지만 전반적인 아미노산 배열은 Gly-Pro-X, Gly-Pro 계열이 대부분인 것으로 나타났다. 반면에 분자량 5,000의 경우에는 R1 = Gly, Leu, Ala; R2 = Pro, uknown; R3 = Gly이 주요 아미노산으로 검출되어 여러 아미노산으로 구성된 peptide가 혼재되어 있다는 것을 알 수 있지만 분자량 12,000의 경우와 마찬가지로 Gly-Pro-X의 계열이 대부분인 것을 예상할 수 있었다. 이러한 결과는 지금까지 Glycine-X-Y 형태, glyproline peptide family(Pro-Gly, Gly-Pro, Pro-Gly-Pro, Hyp-Gly, Gly-Hyp, cycloPro-Gly) 형태의 콜라겐 유래 펩타이드가 여러 생리활성을 가지는 것으로

보고된 결과(Togashi 등, 2002; Samonia 등, 2002; Ashimarin, 1998; Samonina 등, 2000; Gudasheva 등, 1996)와 유사한 glyproline peptide family로 구성되어 생리활성을 나타내고 있음을 알 수 있었다.

제 4 절 콜라겐 올리고펩타이드 생산 모델 정립

본 연구결과를 토대로 하여 기존의 화학적 방법과 방사선조사를 이용한 새로운 방법의 올리고펩타이드 생산 모델을 비교하고자 Fig. 23과 24에 제조공정도를 나타냈다. Fig. 23은 화학적 방법에 의한 콜라겐 펩타이드 제조공정도로써 염과 산에 가용화시키는 작업이 포함되어 제조공정이 복잡할 뿐만 아니라, 이들 화학물질을 중화시켜 폐수처리를 하여야 하므로 폐수처리 비용이 추가된다. 반면에 Fig. 24에 제시한 방사선조사에 의한 콜라겐 올리고펩타이드 제조기술은 염 또는 산에 가용화 시키는 공정이 생략되므로 처리시간이 빨라지고 환경친화적인 가공기술로 이용할 수 있다.

1. 화학적 방법에 의한 콜라겐 펩타이드 제조공정도



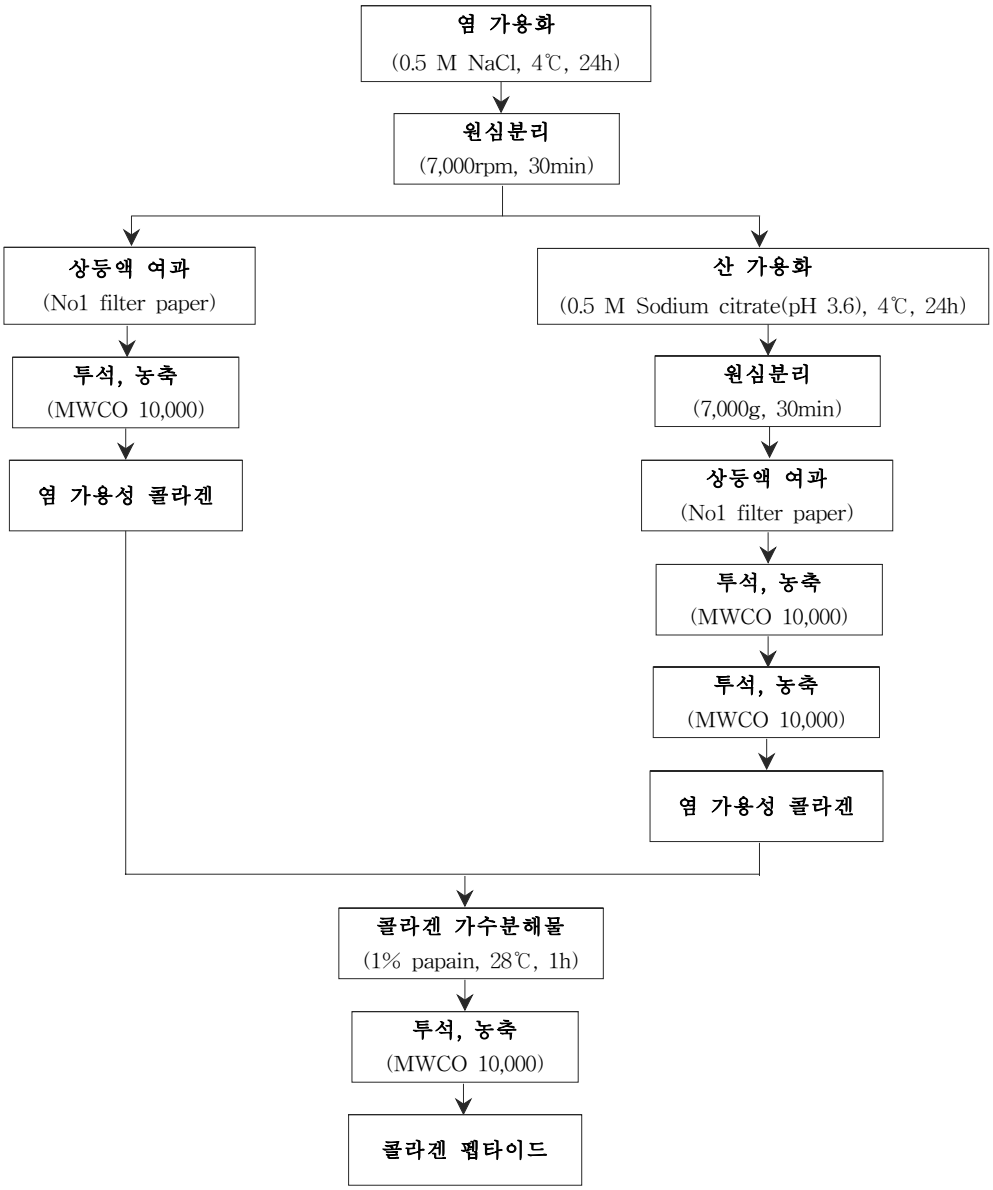


Fig. 23. 화학적 방법에 의한 콜라겐 펩타이드 제조공정도

2. 방사선조사를 이용한 콜라겐 펩타이드 제조공정도

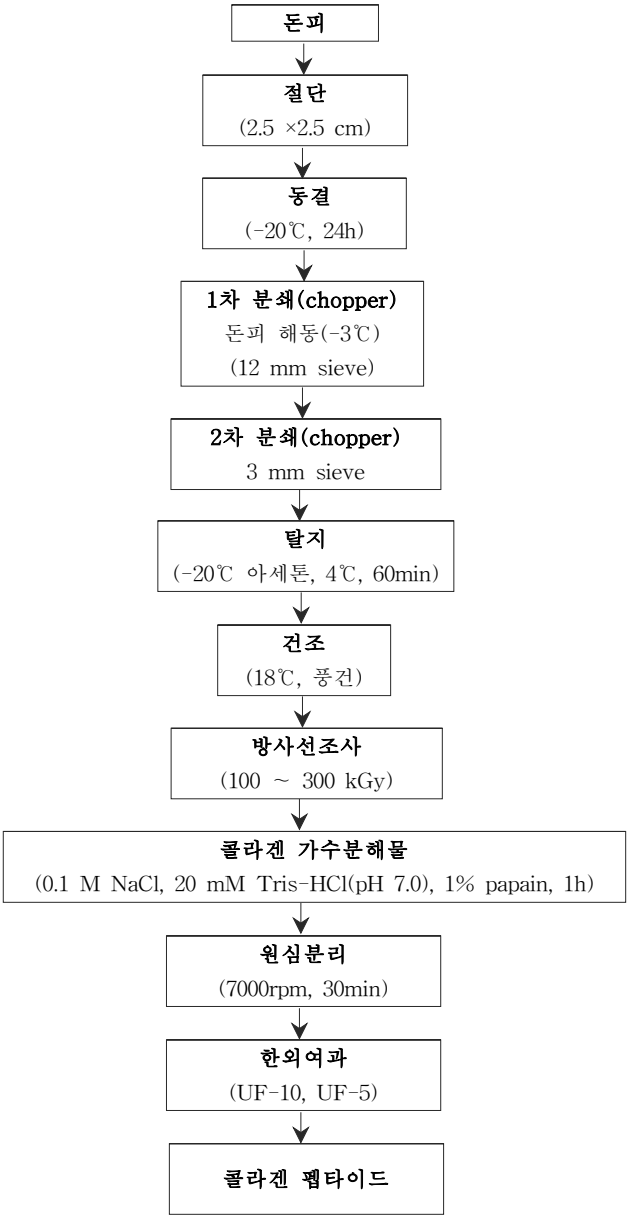


Fig. 24. 방사선조사를 이용한 콜라겐 펩타이드 제조공정도

3. 콜라겐 올리고 펩타이드 제조공정 시간 및 생산비용 검토

기존의 화학적처리에 의한 콜라겐 올리고펩타이드 생산기술과 방사선조사에 의한 올리고펩타이드 생산기술 이용시 공정시간 및 생산비용을 사용원료를 기준으로 간략하게 비교하였다. 기존의 화학적 방법으로 올리고펩타이드를 제조하였을 경우(돈피 5kg 기준), 대략적으로 올리고펩타이드 제조수율은 3% 수준으로서 139g이 생산되었는데 본 실험에서 나타난 제조수율은 통상적인 제조수율보다 낮은 것으로 나타나 탈지방법 및 가용화 조건 등을 변형하면 수율이 일정수준 늘어날 것으로 예상되었다. 제조시간은 458.5시간(19일)이 걸렸으며 추출에 소요된 단순한 시약값만 계산하면 2,582 천원이었다.

반면에 방사선조사에 의한 방법으로 올리고펩타이드를 제조하였을 경우(돈피 5kg 기준)에는 수율 25%로써 1,248g을 생산할 수 있는 것으로 계산되어 기존의 방법에 비하여 8배 이상의 수율 증가가 나타났다. 제조시간은 310.5시간(13일) 그리고 추출에 사용한 단순한 시약값(방사선조사비용 포함)은 2,715천원이었다. 이러한 계산은 단순 비교에 의한 것이므로 실제 공정과 차이가 있을 수 있으나, 방사선조사에 의한 콜라겐 펩타이드 제조기술은 기존의 방법에 비하여 제조수율이 증가하고 공정시간이 단축되는 결과를 분명히 보여주고 있다. 그러나 제조원가면에서는 추가비용이 들어가는 것으로 나타났다.

1) 기존의 가용화 방법에 의한 올리고펩타이드 제조기술(돈피 5kg 기준)

공정	무게	수율 (%)	공정시간 (hr)	비용(원)	비고
절단	5.0kg		1		
분쇄	4.8kg	96	1		chopper
탈지			90	2,500,000	45,000원/18L acetone
건조	1.3kg	28	24		
수세			24	2,000	8,000원/kg NaCl
원심분리			1.5		
염가용화			24	6,500	8,000원/kg NaCl
원심분리			0.5		
여과			2		
투석농축			24		
동결건조(염)	26g	2	72		
산가용화			24	65,000	22,000원/kg sodium citrate
원심분리			0.5		
여과			1		
투석농축			24		
동결건조(산)	113g	9	72		
효소처리		100	1	8,400	150,000원/10kg papain
동결건조	139g		72		
계	139g	3	458.5	2,581,900	

2) 방사선조사에 의한 올리고펩타이드 제조기술(돈피 5kg 기준)

공정	무게	수율 (%)	공정시간 (hr)	비용(원)	비고
절단	5.0kg		1		
분쇄	4.8kg	96	1		chopper
탈지			90	2,500,000	45,000원/18L acetone
건조	1.3kg	28	24		
방사선조사			72	200,000	
효소처리		96	1	15,000	150,000원/10kg papain
원심분리			0.5		
여과			1		
투석농축			48		
동결건조	1,248g		72		M 12,000 : 62% 수율 M 5,000 : 34% 수율
계	1,248g	25	310.5	2,715,000	

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구는 연구의 창의성, 계획수립의 타당성, 방사선조사기술 및 초고압처리기술 적용의 선진성, 올리고펩타이드 생산기술의 활용성, 연구결과의 실용화 가능성에 대한 평가착안점을 가지고 시작되었으며, 1차년도에서는 돈피 고분자 단백질의 저분자화를 위한 방사선조사기술과 초고압처리기술의 적용조건을 중심으로 실험하였으며, 2차년도에서는 방사선조사기술을 활용하여 생산한 가수분해물과 펩타이드의 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통하여 생리활성을 확인하였고 올리고펩타이드 생산을 위한 새로운 모델을 정립하였다. 본 연구는 계획서 상의 내용을 충실히 수행하여 소기의 목적을 달성한 것으로 생각하며, 특히 방사선조사에 의한 돈피 콜라겐 단백질의 저분자화에 대한 기초기술 및 생산기술 연구는 국내외적으로 최초의 연구임과 동시에 저분자화 효율성이 크고 안전성이 확인된 것으로 나타나 본 연구를 토대로 하여 이 분야의 연구가 국내외적으로 가속화될 것으로 사료된다. 특히, 본 연구의 성공적 수행으로 화학물질을 이용한 식품 성분의 추출, 분해 등의 공정을 방사선조사기술 대체할 수 있는 새로운 환경친화적 가공기술이 활성화될 것이고, 가공공정의 단순화로 생산비를 절감하면서 고부가가치를 창출할 수 있는 기반 기술 구축이 가능할 것으로 생각된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구는 고선량의 방사선조사를 중심으로 저분자화에 성공하였지만 향후에는 방사선조사에 효과적으로 분해가 가능한 심도있는 전처리 연구가 수행되어야 하며, 동시에 방사선조사를 가공기술로 이용할 수 있는 법적인 조치가 수반되어야 할 문제점이 남아있다. 그러나 본 연구는 방사선조사기술을 이용한 고분자단백질의 저분자화를 위한 최초의 환경친화적 가공기술이므로 본 연구를 통하여 개발된 생산공정 기술은 특허로 기술을 보호하고 국내외 유명 학술지에 관련 기술 및 연구 결과를 발표할 계획이다. 또한 방사선조사기술의 가공기술로써의 유권해석을 행정기관에 의뢰하여 방사선조사기술의 실용화를 위하여 지속적으로 노력하고, 향후 본 기술을 기능성 식품의 상품화 기술과 연계할 수 있도록 요구하는 기업체에 기술을 전수할 계획이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보

본 연구의 효율적 운용을 기함과 동시에 방사선조사기술 관련 전문가들과의 네트워크 구축을 위하여 1년차에서는 IFT(미국, LAS, 2004. 7. 12 ~ 19)에 참석하여 poster를 발표하였고, 전문가들로부터 방사선조사기술과 관련된 최신 정보를 수집하였다. 그리고 미국에서 시판되고 있는 콜라겐을 이용한 건강기능성 식품을 수집하였다. 미국 아이오와 주립대 안동욱 교수(동물과학과)는 미국 NASA에서 관심을 가지고 있는 연구 분야인 우주식품 또는 군용식품의 개발에 방사선조사기술의 이용이 중요하다는 점을 강조하였지만, 아직 미국내에서는 방사선을 이용한 고분자 물질의 저분자화를 위한 식품 가공 기술에 대한 연구는 초기 단계임을 피력하였고, 콜라겐인 경우는 방사선조사에 의하여 펩타이드 결합이 깨어질 수 도 있지만, 비나선 선형 부분인 telopeptide 부분 또는 3중 나선구조를 연결하는 결합의 부분 분해가 일어날 가능성이 있는 것으로 의견을 교환하였다. 그리고 전자선 조사 필요시, 미국 아이오와 주립대에서 적극적으로 협조하기로 하였다. 일본 식품총합연구소 Dr. Isobe 실장과도 연구협의를 하였는데 일본에서는 방사선조사기술의 활용보다는 검지기술에 관심이 많다는 의견을 피력하면서 우리 연구원과 검지기술에 대한 공동연구를 제의하기도 하였다. 한편, 방사선조사기술 및 검지기술과 관련된 Symposium(Title : Advances in food irradiation research and technology)은 "Toxicology & safety evaluation division" 분과에서 다루고 있었으며, Technical poster session은 "Food chemistry : Food analysis, irradiation and toxicology" 분야에서 중점적으로 발표된 반면, "Nonthermal processing : General" 분야에서는 일부가 발표되었다. Symposium은 아래의 7개 주제로 이루어 졌으나 발표 내용은 그동안 발표되었던

- Advances in gamma, e-beam, and x-ray technologies;
- Regulation of irradiated foods and packaging used for irradiation
- Technological safety of irradiated foods
- Marketing and consumer acceptance of irradiated foods
- Palatability of irradiated ground beef for the national school lunch program
- Controlling off-flavor and color changes due to irradiation in meat and meat products
- New developments in the irradiation of fresh-cut fruits and vegetables

내용 및 결과를 취합한 일반적 수준으로써, 대부분이 고기류나 채소류의 위생을 향상시키는 방법으로 방사선조사 기술의 필요성과 이용을 언급하는 수준이었다. 방사선조사시 나타나는 제반 문제점 및 방사선조사식품의 검지기술과 관련된 주제는 일부를 제외하고 연사나 토론자 모두 관심이 적은 것으로 나타났다. 이러한 현상은 발표자나 토론자 대부분이 식품의 방사선조사를 활성화하고자 하는 사람들로 구성된 것으로 볼 수도 있지만, 또 다른 한편으로는 미국에서의 식품의 방사선조사에 대한 문제점 및 위해성 여부는 정책적으로 이미 논의가 끝난 것으로 해석할 수도 있었다. 각 주제별 Symposium과 관련된 내용을 요약하면 다음과 같다.

① Advances in gamma, e-beam, and x-ray technologies - M. R. Cleland, Ion Beam Applications -

방사선조사는 물질의 물리적, 화학적 및 생물학적 특성을 증진시키는 방법으로 산업적으로 널리 이용되고 있는데, 식품의 방사선조사 역시 성공적으로 이용되고 있다. 방사선 공정을 이용한 물리적 benefits은 solvent-free ink와

coating의 경화(curing), 전선(electric wires)에 이용되는 플라스틱과 고무절연(rubber insulation)의 가교(cross linking), 자동차 타이어의 부분 가교, 플라스틱 식품포장지의 가교 등이 있다. 화학적 benefits은 산화가스에서 나오는 sulfur와 nitrogen oxides의 extracting, 폐수(오수, waste eater)와 오염된 토양에 있는 독성물질의 degrading 등이 있다. 생물학적 benefits은 1회용 의약용 기구(device)의 살균(sterilizing), 외부(foreign) 곤충의 유입 방지, 신선 과채류의 저장기간 연장, 신선한 고기, 가금 및 해산물(seafood)의 부분살균 등이 있다. 이온화에너지는 방사선동위원소에서 방출되는 감마선, 입자 가속기에서 나오는 에너지를 가진 전자선, 그리고 에너지를 가진 전자에서 유래하는 X선 등 3가지가 이용되고 있다. 이들 이온화에너지는 공통의 원리로 작용하기 때문에 다음의 특정 목적을 위하여 각각 선택(choice)되고 있다. 즉, 제품(products)의 두께, 밀도 및 모양, 요구흡수선량(absorbed dose requirement) 및 선량 균일성 비율(dose uniformity ratio), 취급 물질(material)과 운송방법(conveying method), 가공비율(processing ratio), 처리실에서의 체류 시간, 제품 온도의 조절, 자본과 운전비용 등에 따라 달리 선택될 수 있다. Radiation processing의 실질적 관점(practical aspects)에서 토의되었고, 서로 다른 방사선원의 기본 특성이 논의되었다.

② Regulation of irradiated foods and packaging used for irradiation - G. H. Pouli, Center for food safety & applied nutrition, FDA -

방사선조사에 이용되는 식품과 포장지(packaging)는 상업적으로 사용하기 전에 안전하다는 것이 입증되고 FDA의 승인을 얻어야 한다. 식품의 방사선조사 승인은 공개되고 일정한 절차에 따라야 하고, 포장지 승인은 법적인 식품접촉물질공고조항 하에서 이루어질 수 있다(packaging approval may be achieved under the food contact substance notification provisions of law).

③ Technological safety of irradiated foods - C. H. Sommers, Food safety intervention technologies research unit, USDA-ARS-Eastern regional research

center -

식품의 방사선조사는 미생물학적 안전성 증진, 해충 구제, 숙도 지연, 발아 억제, 저장 기간 연장 등을 위하여 지난 45년 동안 활발히 연구되어 왔다. 방사선조사는 다양한 식품군에 대하여 40여 개국에서 승인하고 있는데, 이러한 승인은 방사선조사된 식품의 광범위한 독성학적 테스트를 거치게 된다. 즉, 여러 동물을 대상으로 단기적인 유전독성학 연구와 장기적인 다세대 (multigeneration) 급여 연구 등을 병행하여 부작용이 없다는 것을 입증한 후 방사선조사된 식품을 소비하게 된다. 이와같은 동물 연구에는 출산율(fertility rate), 기형 가능성 및 암 유발 평가 등이 검토된다. 또한 인간을 대상으로 방사선조사식품의 안전성을 평가한 수많은 연구가 있다. 최근 방사선분해(radiolysis)로 palmitic acid에서 새롭게 미량 발생되는 alkylcyclobutanones인 2-dodecylcyclobutanone(2-DCB)가 Comet assay에서 약한 genotoxicity가 발생된다는 이의가 제기되었다. 그러나 불행스럽게도 Comet assay는 weak genotoxin을 검지하는 방법으로 타당성을 검증받지 못하였으며, non-genotoxic cell death에 기인한 잘못된 양성 결과(false positive results)가 나타날 수 있고, 국제적인 관련 당국(international regulatory agencies)으로부터도 승인받지 못하고 있다. 2-DCB의 genotoxicity를 정확히 평가하기 위하여 *E.coli* TRP reverse mutation assay, *Salmonella* Mutagenicity test, Yeast DEL assay에서 test되었다. 2-DCB는 *E.coli* TRP reverse mutation assay에서 point mutation이 유도되지 않았고, *Salmonella* Mutagenicity test에서는 point mutation 또는 frameshift mutation이 유도되지 않았고, 또한 Yeast DEL assay에서는 chromosomal recombination이 유도되지 않았다. 이와같이 short-term genetic toxicology tests에서 2-DCB가 mutation이나 genomic rearrangments를 야기하는 활성이 없다는 결과는 방사선조사식품을 동물에 급여하여 연구한 long-term genetic toxicology에서도 동일한 결과를 보이고 있어, 방사선조사식품의 독성학적 안전성을 지지하고 있다.

④ Marketing and consumer acceptance of irradiated foods - R. F. Eustice, Minnesota beef council -

미네아폴리스 소재 Huisken Meats of Sauk Rapids가 분쇄육 가공자로서는 미국에서 처음으로 E.coli O157:H7과 같은 병원성미생물의 질병으로부터 구제하기 위하여 방사선조사를 이용한 것이 2000년 5월이었는데, 처음에는 84개의 상점에서 판매되던 것이 급속도로 성장하여 Huisken의 방사선조사 제품 판매는 수천개의 점포로 늘어났다. International Dairy Queen이 햄버거패티의 안전성을 보장하기 위하여 미국 내에서 방사선을 이용한 첫 번째 fast food chain이 되었다. 최근에는 미네소타와 다른 주에 소재하는 100개 이상의 Dairy Queen 체인망(franchise)에서 방사선조사된 분쇄육(ground beef)이 공급되고 있으며 점차 증가되고 있다. 2002년 5월에는 뉴욕, 뉴저지, 펜실베니아에서 65개 점포를 가진 Wegmans이 방사선조사된 분쇄육의 상표에 회사명을 적은 최초의 소매점(retailer)이 되었다. 2년 후에 Wegmans irradiated fresh ground beef는 모든 분쇄육 판매의 10% 이상으로 늘어났고, 이는 전년 대비 3%가 증가한 것이었다. 방사선조사된 분쇄육은(fresh or frozen) 8,000개의 수퍼마켓, 2,500개의 레스토랑, 그리고Omaha Steaks를 통하여 가정으로 배달되고 있다. 현재 미네소타가 방사선조사된 분쇄육 확산의 중추적 역할을 하고 있는데, 이는 사실(facts)과 구체적 지식(solid science)을 대중에게 제공하기 때문이다. 소비자 교육에 대한 "미네소타 모델"은 방사선조사식품의 마켓팅 확산의 촉매제로 기여하고, 소비자 식탁에 가장 안전한 분쇄육 및 다른 식품이 제공되도록 도움을 주고 있다.

⑤ Palatability of irradiated ground beef for the national school lunch program

- X, Fan, Food safety intervention technologies research unit,

USDA-ARS-Eastern regional research center -

2002 Farm Bill은 상품구매프로그램(commodity purchase programs)을 위하여 승인된 식품안전기술(approved food safety technology)의 이용을 요구하

고 있다. 2002 Farm Bill에 대응하기 위하여, USDA Agricultural Marketing Service(AMS)에서는 National School Lunch Program(NSLP)에 사용되는 방사선조사된 분쇄육의 조달품 명세서(procurement specifications)를 발간하였다. 방사선조사된 분쇄육은 2004년 1월부터 학교 급식에 이용되고, USDA Food and Nutrition Service는 식품 방사선조사와 방사선조사된 분쇄육에 대한 정보를 모든 학교 행정 당국(school district)에 제공하였다. 개개의 학교 행정 당국은 원(desire)에 의하여 방사선조사된 분쇄육의 주문을 달리할 수 있다. 연방학교급식 프로그램(federal school lunch program)과 관련된 식인성질병의 발병은 매우 낮았지만, 방사선조사된 고기와 가금육 제품의 구입 및 이용은 학교급식에서 식인성 질병의 위험을 감소하는 것처럼 보이고 있다. *E. coli* O157:H7과 같은 식인성 병원균이 이온화 방사선에 의하여 감균되는 장점이 있음에도 불구하고, 방사선조사된 분쇄쇠고기는 풍미변화에 의한 식미(palatability)가 주요 관심사로 되고 있다. 이러한 점 때문에 AMS 명세서에 따라, NSLP에서 사용하고 있는 15% 지방함량을 가진 냉동분쇄육을 0, 1.35, 3.0kGy로 방사선조사하여 관능검사를 실시한 연구가 도입되었다. 이때 분쇄육 패티는 오븐에서 내부온도가 80℃에 이를 때까지 가열(cook)한 다음 소비자를 대상으로 전반적 기호도, 향미, 맛, 조직 및 뒷맛(after taste)이 조사되었는데, 결과는 3.0kGy까지 방사선조사를 하여도 방사선조사된 분쇄육의 식미에는 영향이 없는 것으로 나타났다.

⑥ Controlling off-flavor and color changes due to irradiation in meat and meat products - D. U. Ahn, Dept. Anim. Sci., Iowa State Univ. -

방사선조사된 고기에서 소비자 수용성에 미치는 중요 품질인자는 이취생성과 색깔 변화이다. 이취는 함황 아미노산의 방사선분해에 의한 S(황) 함유물질이, 그리고 색깔은 적육은 갈색(brown) 또는 회색(gray) 형성이, 백색육은 핑크색(pinking) 형성이 문제가 되고 있다.

백색육의 핑크색은 산화환원전위차(ORP) 변화와 carbon monoxide

-myoglobin(CO-Mb) 형성이 주요한 역할을 하고, 적색육은 강한 산화제 형성이 heme 색소의 갈변에 주요 영향을 미치고 있는데, 이러한 변화는 적육의 환원력(reducing potential)에 의하여 결정된다. 이취에 주요 역할을 하는 휘발성 황 화합물은 aerobic 환경(함기포장)에 저장하면 제거할 수 있지만, 이 때에는 ORP와 CO:O_2 competition이 증가하여 CO-Mb ligand 형성을 감소시키고, 이것은 백색육의 핑크색 강도를 감소시키는 원인이 된다. 진공포장은 지방산화를 감소시키지만, 고기의 환원상태를 유지시키고 이취형성 물질을 제거할 수 없다. 따라서 진공포장, 함기포장 및 항산화제의 적절한 조합은 색깔, 이취, 및 지방산화를 조절하는 효율적인 방법이 될 수 있다.

⑦ New developments in the irradiation of fresh-cut fruits and vegetables

- A. Prakash, Dept. Food Sci. & Nutrition, Champman Univ.-

신선한 채소(fresh-cut vegetables)의 품질과 안전성에 대한 방사선조사의 효과에 대하여 논의하고자 한다. 방사선조사는 신선과채류의 품질을 보존하고 안전성을 증진하는 combination approach에서 hurdle 역할을 제공하고 있는데, 미생물 부패에 의하여 저장기간이 제한을 받는 제품에서 상당기간 저장 기간을 연장할 수 있다. 방사선조사는 표면살균방법으로 처리할 수 없는 제품의 병원균을 파괴하는 기술 중의 하나로 이용되고 있는데, 병원균 제거에 이용되는 조사선량은 일반적으로 매우 낮은데, 병원균 파괴를 최대화하면서 바람직하지 못한 품질변화를 최소화하기 위하여 조사선량의 범위를 증대시킬 수 있다. 일부 방사선조사된 과채류에서는 상처가 났거나 스트레스를 받은 조직의 형태를 나타내기도 한다. 조사선량에 따라 호흡율과 ethylene 생산에서 일시적인 변화가 나타나기도 한다. 효소활성, 세포의 손상, 수분손실 증가와 같은 물리적, 화학적 변화가 일어나 품질 감소를 야기하기도 한다. 방사선조사를 칼슘처리, 온수침지(warm water dips), MA 포장과 같은 기술과 조합을 시키면 저장기간을 연장하고 품질의 부작용을 감소시킬 수 있다. 방사선조사가 모든 fresh-cut 생산에 적당한 것

은 아니지만, cut celery, green onions, cut cilantro, sliced mushrooms과 같은 제품에는 저장기간 뿐만 아니라 안전성 증진에 큰 영향을 주고 있다.

또한, 미국 로스앤젤레스에서 콜라겐을 이용한 건강기능성 식품을 수집하였는데, 제품별(형태)로 Collagen Hydrolysate(Bar), Hydrolyzed Collagen (tablet), Gelatin(capsules), 그리고 skin, Hair, and Nails Formula(tablets) 등이 있었다.

2년차 연구에서는 일본의 방사선조사식품 연구동향 및 전망에 대한 정보수집을 위하여 일본식품조사연구협의회 및 방사선프로세스 심포지엄에 참석하였고, 군마현 소재 일본원자력연구소 방문을 통한 시설견학 및 식품의 방사선조사이용에 대한 연구를 협의하였다. 심포지엄에서는 일본에서도 식품조사의 필요성에 대한 연구자의 관심이 점차 고조됨과 동시에 소비자인식도 제고가 우선되어야 한다는 점이 강조되고 있었다. 그리고 일본에서는 방사선을 이용하여 고분자를 분해하는 경우 키토산 제조시 활용한 경우는 있으나, 콜라겐 펩타이드 제조시에는 이용을 하지 않은 것으로 조사되었다. 한편, 일본 원자력연구소의 주요 연구방향은 Dr. Tamikazu Kume와 Dr. Kobayashi Yasuhiko와의 면담에서 식품의 살균 및 발아억제 기술에 대한 기초자료 확보와 생물학적·생화학적 관점에서 실용화 연구에 중점을 두는 것으로 나타났다. 이중에서 hydrogel을 이용한 wound dressing, 바다 오염물질의 흡착제, 전자선을 이용한 유해환경물질(예; dioxin)의 분해기술 등은 실용화된 것으로 나타났고 이외에도 DNA level에서 기초연구를 수행하는 것으로 나타났다.

제 7 장 참고문헌

Abe, N., Nemoto, A., Tsuchiya, Y., Hojo, H., Hitota, A. : Studies of the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging mechanism for a 2-pyrone compound. *Biosci. Biotech. Biochem.* 64(2), 306-333 (2000)

Ariyoshi, Y. : Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends in Food Science & Technology*. 4, 139-144 (1993)

Ashimarin, I. P., Karazeeva, E. P., Lyapina, L. A., and Samonia G. E. : The simplest proline-containing peptides PG, GP, PGP and GPGG: regulatory activity and possible sources of biosysthesis. *Biochemistry* (Moscow), 63, 119-124 (1998a)

Astrup, T. and Mullerz, S. : The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 40, 346-351 (1952)

Battista, O. A. : Colloidal polymer microcrystals - new compositions for cosmetics., *J. Soc. Cosmet. Chem.,* 22, 561 (1971)

Chan, K. M., Decker, E. A., and Means, W. J. : Extraction and activity of carnosine, a naturally occuring antioxidant in beef muscle. *J. Food Sci.*, 58, 1 (1993).

Choi, W. S., Ahn, K. J., Lee, D. W., Byun, M. W., and Park, H. J. : Preparation of chitosan oligomers by irradiation. *Polymer Degradation and Stability*. 78, 533-538 (2002)

Chvapil, M., Owen, J. A., Clark, D. S., Koorajian, S. and Goodman, A. P. : Effect of collagen crosslinking on the rate of resorption of implanted collagen tubing in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res.,* 11, 297 (1977)

Crushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F. and Ondetti, E. : Design of potent competitive inhibitors of angiotensin converting enzyme. Carboxyalkanoyland mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*. 16, 5484 (1977)

Cushman, D. W., and Ondetti, M. A. : In Progress in medical chemistry, elsevier, North Holland, Amsterdam, Vol 17, p41 (1979))

Deplace, G., and Mertens, B. The commercial application of high pressure technology in the food processing industry. vol 224, p469. In High pressure and Biotechnology. Hayashi,R., Heremans, K., and Masson, P. (eds.). Colloque INSERM John Libbey Eurotext Ltd., Paris (1992).

D'Souza, S. E. Ginberg, M. H., and E. F. Plow : *Trends Biochem. Sci.*, 16, 246 (1991)

Evans, C. D., Moser, H. A., Cooney, P. M. and Hodge, J. e. : Amino hexosereductones as antioxidants. Vegetable oil. *J. Am. Oil chem. soc.*, 35, 84 (1958)

Farr, D : High pressure technology in the food industry. *Trends Food Sci. Tecnol.*, 1: 14-16 (1990)

Giese, J. : Antioxidants.: Tools for preventing lipid oxidation. *Food Tech.*, 50(11), 73 (1996)

Gross, J. : Collagen biology : structure, degradation, and disease. *Harvey Lect.* 68, 351-432 (1974)

Gudasheva, T. A., Boyko, S. S., Akparov, V. Kh, Ostrovskaya, R. U., Scoldinov, S. P., Rozantsev, G. g., Voronina, T. A., Zherdev, V. P., and Seredenin, S. V. : Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolyl in rat brain. *FEBS Lett.* 391, 149-152 (1996)

Harkeness, R. D. and Nimni, M. E. : Chemical and mechanical changes in the collageneous framework of induced by thiol compounds. *Acta Phisiologica Academiae Scientiarum Hungaricae Tomus,* 33(3), 325-343 (1968)

Hayashi, R., Kawamura, Y. Ohtsuka, T. and Itoh, N. : Preparation of amidated gelatins and their physicochemical properties, *Agric. Biol. Chem.*, 54(9), 2213 (1990)

Jamall IS, Finelii VN, Que Hee S. 1981. A single method to determine nanogram of levels of 4-hydroxyproline in biological tissue. *Anal Biochem* 112, 70-75 (1981)

Kanazawa, T. : Proceedings of second international symposium on the role of soy in Preventing and Treating Chronic Disease, p27, Brussels Belgium (1996))

Kim, M. O., Fibrinolytic activity of egg chalaza peptide prepared by enzymatic hydrolysis. Department of Biotechnology Graduate School Yonsei National University (2001)

Komanowsky, M., Sinnamon, H. I., Elias, S., Heiland, W. H. and Arceto, N. C. : Production of comminuted collagen for novel applications. *J. Am. Leather Chem. Assn.*, 69, 410 (1974)

Kwon, S. I. : Separation of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from enzymatic hydrolysate of Animal and Plant Protein. Department of Food Science and Technology Graduate School Yosu National University (2002)

Laemmli, U. K. : New self incompatability alleles produces inbreeding, *Nature*, 227, 689 (1970)

Layne, E. : Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Methods in Enzymology,* 10, 447-455 (1957)

Lee, H. S . : Antioxidative activity of browning reaction products isolated from storage-aged orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 550 (1992))

Lee, M. and Kim Y. H. : Functional properties of microcristalline collagen

manufactured from rawskins. *K. J. Food Sci. Technol.*, 19(5), 409 (1987)

Leuenberger, B. L. : Investigation of viscosity and gelation properties of different mammalian and fish gelatins, *Food Hydrocolloids*, 5(4), 353 (1991)

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)

Lyapina, L. A., Pastorava, V. E., Samonia, G. E., and Ashmarin, I. P. : The effect of PGP peptide and PGP-rich substances on haemostatic parameters of rat blood. *Fibrinolysis Blood Coagul.* 11, 1-6 (2000)

Maron, D. M., Ames, B. N. : Reserved methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res.* 113, 173-215 (1983)

Monsheimer, R., Pfleiderer, E. : Method of dissolving collagen-containing tissues, *U.S Patent* 4, 293, 647 (1981)

Oh, S. J., Kim, S. H., Kim, S. K., Baek, Y. J., and Cho, K. H. : Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Activity of the κ-Casein Fragments Hydrolysated by Chymosin, Pepsin, and Trypsin. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29(6), 1316-1318 (1997)

Peterson, B. R. : Gelatin extraction. *U.S. Patent* 4064008 (1977)

Piez, K. A. : Collagen. In "The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food" (Eds., E. J. Briskey, R. G. Cassens and J. C. Trauman), Vol Ⅰ, p315, Univ. Wisconsin Press, Madison (1966)

Pratt, D. E., Dipietro, C., Porter, W. L. and Giffee, J. W. : Phenolic antioxidants of soy protein hydrolysates. *J. Food Sci.*, 47, 24 (1981)

Rijiken, D. C., Sakharov D. V. : Basic principles in thrombolysis ; regulatory role of plasminogen. *Thromb Res.* 30(103), S41-49 (2001)

Samonia, G. E., Ashmarin, I., and Lyapina, L. : Glyproline peptide family : review on bioactivity and possible origins. *Pathophysiol.* 8, 229-234 (2002)

Samonia, G. E., Kopylova, G. N., German, S. V., Umarova, B. A., Bakaeva, Z. V., Zeliaznik, N. J., Zhuykova, S. E., Sergeev, V. I., Lukjanzeva, G. V., Smirnova, E. A., and Lelekova, T. V. : Endogenous peptides and gastric mucosal homeostasis. In "Pathophysiology of organs and system. Typical physiological processes(experimental and clinical aspects)". *Proceedings of Ⅱ Russian Congress of Photophysiology,* Moscow, 133 (2000b)

Seiichiro Isobe : Advance technology for food processing, *香料*, 219, 89-96, (2003)

Shon, D. H., Lee, C. A., Kim, S. H., Ahn, C. W., Nam, H. S., Lee, H. J., and Shin, Z. I. : *Kor. J. Food Sci. Technol.,* 28, 684 (1996)

Togashi, S. I., Takahashi, N., Iwama, M., Watanabe, S., Tamagawa, K., and Fukui, T. : Antioxidative collagen-derived peptides in human-placenta extract. *Placenta*. 23, 497-502 (2002)

Tomonori, U., Iwao, S., Toshiki, M. : Antioxidative of water Extracts of Lageroemia speciosa leaves. *Biosci. Biotech. Biochem*. 61, 10 (1997)

Turkot, V. A., Komanowsky, M. and Shinnamon, H. I. : Comminuted collagen-estimated costs of commertial production. *Food Technol.*, 32(4), 48 (1978)

Voet, D., Voet, J. G. : Biochemistry. John willy and Sons, New York USA, 1990

WHO : *Wholesomeness of irradiated food*. Report of a joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee. Tech. Rep. 651. World Heath Organization. Geneva (1981)

WHO : *Review of the safety and nutritional adequacy of irradiated food*. WHO/HPP/FOS/92.2 (1992)

William, O. A., Thomas, L. L., and David, A. W. : Renin-angiotensin inhibitors. In Principles of Medical Chemistry. 4th ed., William &Wilkin, Baltimore, p724 (1995)

김윤지, 이남혁, 홍석인, 김영호, 안지윤, 이은정 : 초고압기술을 이용한 고부가가치 육제품 및 ready-to-eat raw fish 제품 생산을 위한 응용기술 개발. 한국식품

연구원 (2003)

김윤지, 이남혁, 홍석인, 김영호, 이은정 : 초고압기술을 이용한 고부가가치 양념육제품 생산을 위한 응용기술개발, 한국식품연구원, E054004-05106 (2005)

변명우, 조철훈, 이주운, 김동호, 김동수, 조성기, 안현주, 이유석, 김재현, 강호진, 송현파, 서지현, 육홍선, 김학수, 이철호, 강일준, 박현진, 권중호 : 방사선 식품생명공학 기술 개발. 한국원자력연구소 (2003)

양승용, 이남혁, 오세욱, 김영호 : 도계 부산물로부터 유용 콜라겐의 제조기술 및 기능성 음료 산업에의 이용 연구, 한국식품연구원 GA0350-0225 (2002)

이무하 : 콜라겐의 이용, 식육과학-이론과 응용. p 242, 선진문화사 (1988)

이철호 : 식품과학과 산업, 31(2), p2-3, 한국식품과학회 (1998)

홍상필, 김명희, 오세욱 : 식품과학과 산업, 41(4), p86-92 한국식품과학회(1998))

홍석인 : 식품과학과 산업, 33(2), p36-49, 한국식품과학회 (2000)

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발 사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.