

최 종  
연구보고서

**불가사리 콜라겐의 산업적 이용기술 개발**  
**Development of industrial utilization technique of starfish collagen**

불가사리 콜라겐의 이용기술개발 및 산업화 연구  
Studies on development of utilization technique and industrialization of starfish collagen

불가사리 콜라겐의 기능성 및 안전성 연구  
Studies on the functionality and safety of starfish collagen

2005. 12.

주관연구기관 국립수산과학원  
협동연구기관 부경대학교  
참 여 기 업 아마란스화장품

해 양 수 산 부

# 제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “불가사리 콜라겐의 산업적 이용기술 개발” 과제의 최종  
보고서로 제출합니다.

2005 년 12 월 일

주관연구기관명 : 국립수산과학원

총괄연구책임자 : 박희연(생명공학연구단 연구관)

연 구 원 : 윤호동, 김지희, 김연계, 박진일,  
이가정, 조영래

협동연구기관명 : 부경대학교

협동연구책임자 : 박남규(생물공학과 교수)

연 구 원 : 김인혜, 고혜진, 안상현, 손희영,  
김혜미

# 요 약 문

## I. 제 목

불가사리 콜라겐의 산업적 이용기술 개발

## II. 연구개발의 목적

- 불가사리 콜라겐의 산업적 생산시스템 개발
- 불가사리 콜라겐의 건강식품 및 화장품 기능성 규명
- 콜라겐을 이용한 기능성 식품 및 화장품 개발
- 불가사리 구제를 통한 수산 증양산업의 생산성 향상
- 고부가가치의 콜라겐 상품개발로 국내 생물산업 활성화

## III. 연구개발 내용 및 범위

### < 제 1 차년도 >

- 콜라겐의 산업적 추출 조건 확립
- 불가사리 콜라겐의 이화학적 기능성

### < 제 2 차년도 >

- 불가사리 콜라겐의 생화학적 기능성 특성 규명
- 기능성 식품개발
- 기능성 화장품 개발

### < 제 3 차년도 >

- 콜라겐의 인체 안전성 평가
- 산업화 적용시험
- 관련법규 개정 및 허가 추진
- 산업 재산권 확보 및 기술 이전

## IV. 연구개발 결과

### 1. 불가사리 콜라겐의 이용기술개발 및 산업화 연구

불가사리 콜라겐 산업적 추출조건을 확립하기 위하여 수산화칼슘을 이용한 원료의 전처리 방법과 적정 전처리 온도 및 시간 등을 규명하였으며 산, 알카리, 효소 등을 이용하여 불가사리로부터 콜라겐을 추출하는 조건을 검토하였다. Trypsin 및 pepsin을 이용한 저온 추출법과 초산 및 활성탄을 이용하여 콜라겐의 정제 방법을 개발하여 고순도의 atelocollagen 생산이 가능하게 되었으며, 본 소재는 의약품, 화장품 등에 응용이 가능할 것으로 판단되었다. Alcalase를 이용하여 collagen peptide의 산업적 생산공정을 개발하였으며, 본 소재는 식품, 화장품 등에 응용이 가능하다.

콜라겐 음료를 개발하기 위하여 음료제품 원료로써 불가사리 콜라겐의 가공적성을 검토하였고 향미개선, 청량감 부여, 재료배합 비율, 제조공정 Lay out, 저장 안정성 및 기호도 조사를 실시하였다. 콜라겐 겔 제품 개발시험의 일환으로 겔 형성능, 영양성분의 강화, 재료 배합비율, 제조공정 Lay out, 저장안정성, 및 기호도 조사를 하였다. 콜라겐 크림의 제조시험으로 재료 배합사양, 제조공정, 저장 안정성 및 품질평가를 하였다. 콜라겐 마스크 팩의 제조를 위하여 재료 배합사양, 제조공정, 저장안정성 및 품질평가를 하였다. 콜라겐 비누제조 시험으로 비누화 조건, 재료배합 비율, 제조공정 Lay out 및 품질평가를 하였다.

불가사리 콜라겐의 대량생산 시스템을 개발하기 위해 전처리 및 가수분해 탱크, 연속식 원심분리기, 투석장치, 활성탄여과기, 자외선살균장치를 설계하였다. 생산성향상시험의 일환으로 콜라겐의 산업품질규격, 산업안전관리 기준 및 인체 안전관리기준을 설정하고 콜라겐의 경제성을 분석하여 산업화 기초자료로 활용할 수 있도록 하였다. 불가사리 콜라겐을 국제화장품원료집(International Cosmetic Ingredient Dictionary)에 등재를 완료하였다. 불가사리의 식품원료 지정은 현재 추진 중에 있다. 불가사리 콜라겐의 산업적 이용기술과 관련된 내용을 특허로 출원(출원번호 10-2005-0047528호, 2005. 6. 3)하였으며 콜라겐 마스크 팩 화장품은 현재 기술이전과정에 있다.

## 2. 불가사리 콜라겐의 기능성 및 안전성 연구

불가사리 콜라겐의 산업적 이용을 위하여 이화학적 기능성을 규명하였다. SDS-PAGE를 통하여 불가사리 콜라겐의 type을 조사한 결과 I형과 거의 비슷하였다. 불가사리 콜라겐의 분자량은 약 100~200 kDa으로 조사되었다. 불가사리 콜라겐의 용해도, 보수력, 지방흡수력, 유화안정성 등은 식품 및 화장품으로 개발하는 데에 큰 문제가 없을 것으로 판단되었으나 변성온도는 축육 유래의 것보다 크게 낮아 이에 대한 심도 있는 연구가 필요하다고 사료된다. 불가사리 콜라겐 효소가수분해물을 에탄올 50%로 추출한 획분의 항고혈압 활성(IC<sub>50</sub>)은 0.601 mg protein/ml이었다. 불가사리 콜라겐의 항노화성을 알아보기 위하여 free radical 억제율 및 항산화 효과를 측정하였으나 기존 활성물질인 arbutin 및 vitamin C보다 낮았다. 불가사리 콜라겐의 항균성은 peptide에서 미약한 활성을 보였으며 면역활성은 검출되지 않았다. 보습성은 10분경과 후 atelocollagen이 51.3%, collagen peptide가 43.2%이었다. 콜라겐의 미백효과와 자외선 차단능은 미약하였다.

불가사리 콜라겐에서 납, 비소, 수은 등 유해성 중금속은 검출되지 않았으며 일반세균, 대장균군, 녹농균, 황색포도상구균 및 살모넬라균 수 등 미생물의

오염도를 측정 한 결과, 미생물이 검출되지 않았다. 불가사리 콜라겐을 랫드에 체중 1 kg당 2,000 ml까지 투여한 결과, 정상적인 소견을 보여 급성독성이 없는 것으로 나타났으며 백색토끼를 대상으로 실시한 피부독성시험에서도 안전한 것으로 평가되었다. 불가사리 콜라겐을 이용하여 신체 건강한 성인남녀 각 15명을 대상으로 인체침포시험을 실시한 결과, 시험참가자 모두가 홍반 및 부종이 발견되지 않아 인체에 대한 피부독성이 없는 것으로 평가되었다.

## V. 연구개발 결과의 활용계획

1. 불가사리 콜라겐 추출 발명특허 : 등록 후 기술이전(아마란스화장품)
2. 불가사리 콜라겐의 이화학적 특성 : 관련학회 투고
3. 콜라겐의 인체안전성 평가결과 : 식약청 제출 자료로 활용
4. 불가사리 콜라겐 식품 2종 : 식품원료로 등재 후 산업화 추진
5. 불가사리 콜라겐 화장품 3종 : 참여기업(아마란스화장품)에 기술이전
6. 불가사리 콜라겐 국제화장품원료집(ICID) 등재 : 산업화에 활용

# S U M M A R Y

## **I . Title**

Development of industrial utilization technique of starfish collagen

## **II . Purpose and significance**

- Development of industrial production system of starfish collagen
- Study on health food and cosmetic function of starfish collagen
- Development of functional food and cosmetics using collagen
- The productivity improvement of marine aquaculture and multiplication by relief the starfish
- Activation of domestic bio-industries by the development of high-valuable collagen goods

## **III . Contents of research**

### **< 1st year >**

- Establishment of a industrial extraction method
- Physicochemical functional property of starfish collagen

### **< 2nd year >**

- Studies on biochemical characteristics of starfish collagen
- Development of functional foods
- Development of a functional cosmetics

### < 3rd year >

- Evaluation of human safety of starfish collagen
- The application test for industrialization
- The revision of related laws and promotion for legal permission
- Protection of property rights and technology transfer

## **IV. Results**

### **1. Studies on the development of industrial utilization technique and industrialization of starfish collagen**

In order to establish an industrial extraction method of starfish collagen, the conditions for pre-treatment including calcium hydroxide, and reaction temperature and time were investigated.

The condition for using acids, alkalis and enzymes were also investigated.

In this studies we developed two steps for purification; low-temperature extraction step using trypsin and pepsin, and then the purification step using acetic acid and activated carbon.

Consequently, it was possible to produce the atelocollagen with high purity. Using an alcalase, we also developed a method for the industrial manufacturing process of collagen peptide. This collagen peptide would be possible to apply as medicals and cosmetics, etc.

In order to develop the collagen beverages, we investigated the processing condition, flavor betterment, added coolness, material mixing ratio, production processing lay out, store stability and taste test of the starfish collagen.

As a collagen gel product development test, the gel formative ability, increment of nutrition factor, material mixing ratio, manufacturing process lay out, storage stability and taste test were measured. For the collagen cream were material mixing specification, manufacturing process, storage stability



and quality evaluation were also examined. In the case of collagen mask pack, the manufacturing tests including material mixing specification, production process, store stability and quality valuation were evaluated. The manufacturing test of the collagen soap were conducted with saponification condition, material recipe, production process and quality evaluation.

For the mass production system of starfish collagen, the methods including the pre-treatment and hydrolysis tank, continual centrifuge, dialysis system, activated carbon filtering system and UV-sterilizer were designed.

As the productivity improvement test, industrial quality standard, industrial safety management, and human body safety control standard were set up for the starfish collagen. These data will be used as a fundamental industrialization data after checking the economical efficiency.

The starfish collagen was registered in the International Cosmetic Ingredient Dictionary. The specification of the collagen as a food materials is in process. The contents related to the industrial utilization technique were applied for a patent(application number 10-2005-0047528, June. 3. 2005), and the technology transfer for the production of collagen mask pack is in progress.

## **2. Studies on the functionality and safety of starfish collagen**

The physicochemical functional properties of the starfish collagen were investigated for the industrial utilization.

Starfish collagen was revealed by SDS-PAGE that it was similar to the type I collagen and molecular weight was about 100~200 kDa.

Solubility, moisturizing property, oil absorption ability and emulsification stability tests revealed that there will be no problem for development as foods and cosmetics, even though the denaturation temperature was lower than mammalian collagen. This result indicates that the starfish collagen will have potential for the alternative sources of mammalian collagen if we can improve the thermal stability of this collagen. Of the ethanol extract

(50:50/EtOH:water) of the enzyme hydrolysate, angiotensin converting enzyme inhibition activity(IC<sub>50</sub>) was 0.601 mg protein/ml. The free radical scavenging and antioxidants activity of starfish collagen was measured to examine the anti-aging effect. But, it was lower than arbutin and vitamin C.

A little antibacterial activity was detected with the collagen peptide and no immunity was detected. After 10 minutes testing, moisturizing effects of atelocollagen and collagen peptide showed 51.3% and 43.2%, respectively. Whitening effect and UV protection effect were little activity. The heavy metal (lead, arsenic and mercury, etc.) was not detected from starfish collagen. And, the result which was measured with the contamination level of microbes(a *bacillus*, a *coli*, a *pseudomonas aeruginosa* , a *staphylococcus aureus* and a *salmonella*) was negative. Starfish collagen was administered to a rats (1 Kg per 2,000 ml), and it seemed normal and no acute toxicity was detected. The white rabbits, it was safe even from the skin toxicity test. When 15 people of each Adult men and women were conducted for human skin patch test, there was no erythema and the edema detected.

## **V. Application plans of the research and development results**

1. Invention patent of starfish collagen extraction : After registration, technology transfer (Amaranth Cosmetics)
2. Physicochemical characteristics of starfish collagen : Contribute to an academy
3. Result of human safety test : Application as submitting data to KFDA
4. Starfish collagen foods (2 types) : After registration to foodstuffs materials, promotion for industrialization
5. Cosmetics of starfish collagen (a kinds of 3) : Technology transferring to the participation enterprise (Amaranth Cosmetics)
6. Registration of International Cosmetics Ingredient Dictionary (ICID) :

Application for industrialization

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Outline of a research and development theme</b> .....	17
<b>Chapter 2. The Present condition of domestic and foreign technology development</b> .....	20
<b>Chapter 3. Experimental designs, procedures and results</b>	
<b>Part 1. Introduction</b> .....	22
<b>Part 2. Materials and Methods</b> .....	22
1. Materials .....	25
2. Methods .....	25
2.1. Degree of hydrolysis .....	25
2.2. Measurement of purity and contents of the collagen .....	25
2.3. Extraction methods for investigation of physicochemical characteristics .....	26
2.4. Investigation of collagen type .....	26
2.5. Molecular weight of the collagen .....	27
2.6. Solubility .....	27
2.7. Moisturizing property and oil absorption ability .....	27
2.8. Emulsification stability .....	28
2.9. Denaturation temperature .....	28
2.10. ACE inhibition activity .....	28
2.11. Anti-aging activity .....	29
2.12. Anti-bacterial activity .....	29
2.13. Immunity .....	30
2.14. Moisturizing effect .....	31
2.15. Whitening effect .....	31

2.16. UV protection effect .....	33
2.17. Production test of functional foods .....	33
2.18. Production test of functional cosmetics .....	33
2.19. Safety test .....	33
<b>Part 3. Results and Discussion .....</b>	<b>36</b>
1. Industrial extraction methods of starfish collagen .....	36
1.1. Pre-treatment of materials .....	36
1.2. Extraction methods of collagen .....	38
1.3. Purification of collagen by activated carbon .....	41
1.4. Industrial production process of collagen .....	43
2. Physicochemical functional property of starfish collagen .....	45
2.1. Type of starfish collagen .....	45
2.2. Molecular weight of starfish collagen .....	46
2.3. Solubility .....	47
2.4. Moisturizing property and oil absorption ability .....	48
2.5. Emulsification ability and emulsification stability .....	49
2.6. Denaturation temperature .....	50
3. Development of functional foods .....	51
3.1. Collagen beverage .....	51
3.2. Collagen gel .....	59
4. Development of functional cosmetics .....	65
4.1. Collagen cream .....	65
4.2. Collagen mask pack .....	72
4.3. Collagen soap .....	78
5. Biochemical functional ability of Starfish collagen .....	82
5.1. ACE inhibition activity .....	82
5.2. Free radical scavenging effect .....	83
5.3. Antioxidants activity .....	84
5.4. Anti-bacterial activity .....	84
5.5. Immunity .....	86

5.6. Moisturizing property .....	87
5.7. Whitening effect .....	88
5.8. UV protection effect .....	89
6. Safety of Starfish collagen .....	90
6.1. Analysis of hazard property .....	90
6.2. In vivo toxicity test .....	91
6.3. Clinical test .....	91
7. Application test for industrialization .....	92
7.1. Plan for the mass production system .....	92
7.2. Productivity improvement test .....	96
8. Revision of related laws .....	103
9. Security of property rights .....	104
<b>Part 4. Conclusion .....</b>	<b>106</b>
<b>Chapter 4. Degrees of achievement and contribution of purpose ...</b>	<b>109</b>
<b>Chapter 5. Plan of commercial application of research results .....</b>	<b>113</b>
<b>Chapter 6. Technical information of foreign country .....</b>	<b>114</b>
<b>Chapter 7. References .....</b>	<b>139</b>

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	17
제 2 장	국내·외 기술개발 현황 .....	20
제 3 장	연구수행 내용 및 결과 .....	22
제 1 절	서론 .....	22
제 2 절	재료 및 방법 .....	25
1.	재료 .....	25
2.	방법 .....	25
2.1.	가수분해도 측정 .....	25
2.2.	콜라겐 함량 및 순도의 측정 .....	25
2.3.	이화학적 특성 조사용 콜라겐의 추출방법 .....	26
2.4.	콜라겐 type 조사 .....	26
2.5.	콜라겐 분자량 측정 .....	27
2.6.	용해도 .....	27
2.7.	보수력 및 지방흡수력 .....	27
2.8.	유화성 및 안정성 .....	28
2.9.	변성온도 .....	28
2.10.	항고혈압성 .....	28
2.11.	항노화성 .....	29
2.12.	항균 및 항곰팡이 활성 .....	29
2.13.	면역활성 .....	30
2.14.	보습성 .....	31

2.15. 미백효과 .....	31
2.16. 자외선 차단능 .....	33
2.17. 기능성 식품 제조시험 .....	33
2.18. 기능성 화장품 제조시험 .....	33
2.19. 안전성 시험 .....	33
<b>제 3 절 결과 및 고찰</b> .....	<b>36</b>
1. 불가사리 콜라겐의 산업적 추출조건 .....	36
1.1. 원료 전처리 .....	36
1.2. 콜라겐의 추출 방법 검토 .....	38
1.3. 콜라겐의 활성탄 정제 .....	41
1.4. 콜라겐의 산업적 생산공정 .....	43
2. 불가사리 콜라겐의 이화학적 기능성 .....	45
2.1. 불가사리 콜라겐 type .....	45
2.2. 불가사리 콜라겐 분자량 .....	46
2.3. 용해도 .....	47
2.4. 보수력 및 지방흡수력 .....	48
2.5. 유화성 및 유화안정성 .....	49
2.6. 변성온도 .....	50
3. 기능성 식품 개발 .....	51
3.1. 콜라겐 음료 .....	51
3.2. 콜라겐 겔 .....	59
4. 기능성 화장품 개발 .....	65
4.1. 콜라겐 크림 .....	65
4.2. 콜라겐 마스크 팩 .....	72
4.3. 콜라겐 비누 .....	78
5. 불가사리 콜라겐의 생화학적 기능성 .....	82
5.1. 항고혈압성 .....	82



5.2. Free radical 억제율	83
5.3. 항산화효과	84
5.4. 항균성 및 항곰팡이성	84
5.5. 면역활성	86
5.6. 보습성	87
5.7. 미백효과	88
5.8. 자외선 차단능	89
6. 불가사리 콜라겐의 안전성	90
6.1. 유해성 분석	90
6.2. In vivo 독성시험	91
6.3. 임상시험	91
7. 산업화 적용시험	92
7.1. 대량생산 시스템 설계	92
7.2. 생산성 향상 시험	96
8. 관련법규 개정	103
9. 산업재산권 확보	104
<b>제 4 절 결론</b>	106
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b>	109
<b>제 5 장 연구개발결과의 활용계획</b>	113
<b>제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술 정보</b>	114
<b>제 7 장 참고문헌</b>	139

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

콜라겐은 인간을 비롯한 동물의 체내에서 세포와 세포사이를 메우고 있는 아주 중요한 섬유상태의 경단백질(Albuminoid)이다. 세포가 다수 집합되어 있는 부위에는 반드시 콜라겐이 존재하고 있으며 특히 피부, 뼈, 연골, 혈관벽, 치아, 근육 등에는 콜라겐이 다량으로 존재하고 있다. 콜라겐은 오래 전부터 식용으로 이용되고 있으며, 콜라겐 및 그 변성물인 젤라틴을 섭취한 경우에는 다른 단백질과 마찬가지로 소화관내에서 소화효소에 의해 분해되어 대부분 아미노산의 형태로 흡수된다. 콜라겐은 면역기능을 향상시키고, 세포의 재생작용을 촉진시켜 관절을 튼튼하게 해주며, 피부의 신진대사 활성화 및 보습력 유지를 통하여 피부미용에 탁월한 효과를 가져다준다. 콜라겐은 젊어서는 인체 내에서 많이 합성되나 20대 이후에는 생성량이 줄어들기 때문에 나이가 들면서 피부의 탄력은 물론 잇몸의 붕괴, 근육통, 혈관벽의 손상 특히 공기중의 유해산소인 자유라디칼(Free radical)에 의하여 햇빛이 많이 닿는 얼굴 등에 리포프신이라는 색소가 출현하여 생기는 검버섯, 기미 등이 발생한다. 이러한 질병적 요소를 예방, 치료하기 위해서는 콜라겐이 많이 함유된 식품이나 콜라겐가공식품, 콜라겐화장품을 사용해야만 된다. 콜라겐의 생산소재는 현재까지 주로 소, 돼지 등 축산동물로부터 공급되었으나 최근 광우병 파동으로 인한 유해성 문제가 대두되어 광우병과 관련이 없는 해양생물을 소재로 하는 연구가 활발하게 시도되고 있다.

불가사리는 극피동물문에 속하는 해양 저서생물로서 별불가사리, 아무르불가사리, 거미불가사리 등 전세계에 1,700여종이 있는 것으로 학계에 보고되어 있으며, 우리 나라 근해에도 200여종이 서식하고 있다. 이중 특히, 아무르불가사리와 별불가사리는 육식성으로 전복, 바지락, 피조개, 가리비 등 패류를 그 먹이로 하고 있어 수산양식 산업에서는 아주 큰 해적생물로 분류되어 있다. 최근 우리 나라는 산업화에 따른 오염물질의 배출 증가 및 지구 온난화 등 해양환경의

변화로 인하여 연안 생태계가 급속하게 변화하고 있는 실정이며, 이러한 해양환경의 변화는 불가사리, 해파리, 패류독소, 적조 및 백화현상 등 해양 유해생물의 대량 발생을 초래하여 해양 생태계가 파괴될 위험에 처해있음은 물론이고 수산증양식업의 생산성 저하에도 큰 영향을 끼치고 있어 어업인의 소득유지에 막대한 피해를 주고 있는 현실이다. 따라서 정부에서는 불가사리 구제책의 일환으로 수협을 통하여 kg당 140~200원에 불가사리를 수매하고 있으며, 수산과학원에서도 불가사리 구제기구를 개발한바 있다. 그러나 포획된 불가사리는 경제적인 측면에서 거의 유용하게 이용되지 못하고 있는 형편이며, 일부 소량이 비료로 이용되고 있으나 발효과정에서 심한 악취가 나고 발효기간이 오래 걸려서, 경제적인 가치가 거의 없는 등 많은 문제점이 있어 어업인의 자발적 구제는 기대하기 힘든 실정으로 불가사리의 이용에 관한 보다 많은 연구가 절실한 실정이다.

한편, 불가사리의 체벽은 골편과 콜라겐으로 구성되어 있으며 콜라겐은 산업용 소재로 매우 유용하게 사용할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 불가사리의 경우 사포닌, tetrodotoxin 등 다양한 생물독을 함유하고 있어 인체 안전성을 확보하기 위한 기술개발이 필요하며, 콜라겐 추출방법에 있어서도 기존의 산 또는 알카리 추출법으로 콜라겐을 추출할 경우 체벽에 존재하는 골편(탄산칼슘)이 용해되어 혼입됨으로써 콜라겐의 순도를 저하시키는 문제점이 발생할 수 있다. 이를 방지하기 위한 방법으로 투석막을 이용하는 방법이 있으나 본 방법을 산업적으로 적용하기에는 많은 무리가 따른다. 따라서 불가사리로부터 콜라겐을 생산하기 위해서는 특유의 콜라겐 추출법이 개발되어야한다.

콜라겐의 시장 규모는 국내외를 막론하고 급속한 성장세를 보이고 있어 경제·산업적으로 매우 유망한 분야이며 현재 국내에서 소비되는 콜라겐이 거의 수입품임을 감안 할 때 본 연구과제의 수행에 따른 경제적 파급효과가 엄청나게 클 것으로 예상된다. 그리고 현재 우리나라는 수산물의 남획, 환경오염, 이상기후 등으로 인하여 연안 수산자원의 고갈뿐만 아니라 연안어장의 황폐화가 가속되어가고 있어 어업인의 소득이 격감하고 있다. 이로 인하여 사회적으로 수산

업에 대한 관심도가 낮아지고 있고, 수산업의 발전도 아울러 저해되고 있는 실정이며 어촌을 떠나는 인구도 급증하고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 부단한 연구개발을 통하여 연안어장의 생산력을 증대시키고 해양자원의 고도 이용으로 부가가치를 창출할 필요성이 절실한 실정이다. 따라서 본과제의 수행을 통하여 효과적인 불가사리 구제를 유도함으로써 수산증양식업의 생산성을 증대시키고, 미 이용자원인 불가사리를 이용하여 고부가가치의 콜라겐을 생산하는 기술을 산업화함으로써 어촌경제를 활성화시키고, 지역 주민의 사회적 기반을 확고하게 할 필요성이 있다고 하겠다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

외국의 불가사리에 대한 학술적인 연구는 불가사리의 saponin, tetrodotxin, 콜라겐, 항균성 등에 관한 연구 등이 있고, 불가사리의 이용에 관한 연구로 불가사리 사료제조 연구가 있다. 최근에는 불가사리로부터 항암물질, 항생물질을 분리해 내는 등의 연구가 활발하게 진행되고 있으나 아직 괄목할 만한 실용화 성과를 거두지는 못하고 있는 실정이다. 한편 불가사리 콜라겐에 대한 학술적 연구는 아무르불가사리 콜라겐 섬유의 형상, 크기, 아미노산 함량 및 분자적 특성 등에 대하여 보고된바 있으나, 불가사리 콜라겐의 산업적 이용에 관한 연구보고는 찾아볼 수 없다.

국내의 불가사리에 대한 학술적 연구는 항균성, 항산화성, 항혈전성, 항콜레스테롤성, 항고혈압성, 항갈변성, 항돌연변이성 및 락틴 등에 대하여 연구가 수행되어 왔으며, 불가사리 이용에 관한 연구로는 1989년 국립수산진흥원이 불가사리류의 성분 및 비료로서의 효과에 대하여 검토한바 있다. 또한, 산업화된 기술로는 불가사리 액체비료, 불가사리 분말형 비료 등이 소량 생산되고 있으며, 2001년에 국립수산과학원 본 연구진이 불가사리 칼슘제를 개발하여 2개 업체에서 생산 준비 중에 있다. 그러나 국내에서도 불가사리 콜라겐의 이용에 관한 연구는 아직 시도된바 없다.

따라서 지금까지 수행된 조사연구 개발사례를 분석해보면 본 과제(안)의 연구방향과 동일하거나 유사한 내용을 발견하지 못하였으며, 일부 수행된 불가사리 콜라겐에 관한 학술적 연구를 참고로 하여 본 연구과제를 수행할 경우 소기의 성과를 달성할 수 있을 것으로 분석되었다.

또한, 지금까지의 콜라겐은 주로 소, 돼지 등 축산물로부터 추출된 것이었으나 최근 광우병 파동으로 인하여 많은 사람들이 그 안전성에 문제를 제기하고 있어 광우병과 관련이 없는 해양생물로부터 콜라겐을 추출하려는 연구가 일

본을 중심으로 활발하게 추진되고 있는바, 본 과제의 수행을 통하여 해양생물 유래 콜라겐 생산기술을 조기에 확보할 경우, 불가사리 콜라겐이 국내는 물론 외국에도 경쟁력 있는 고부가가치 산업으로 성장할 것으로 분석되었다.

불가사리 콜라겐의 이용기술은 국내·외를 막론하고 시도된바 없는 신기술이므로 국외로부터의 기술도입은 불가능하며, 동 연구가 성공할 경우, 역으로 외국에 관련기술을 수출하여 기술료(Royalty) 수입을 올릴 수 있을 것으로 사료되었다.

## 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

### 제 1 절 서 론

콜라겐(collagen)은 해면동물(海綿動物)에서 척추동물에 이르기 까지 모든 다세포동물에 존재하는 섬유상의 구조단백질(structural protein)이다. 포유동물에서는 생체 총 단백질의 약 30% 정도가 콜라겐이라고 하며 어류는 어종에 따라서 상당한 차이가 있는데, 어육의 습중량당(濕重量當, wet basis) 0.3~2.1%, 건중량당(乾重量當, dry basis) 1.4~9.1%가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 포유동물의 콜라겐은 그것이 발견된 순서에 따라 I ~ XIV형으로 분류되고 있으며 I형 콜라겐은 전 콜라겐의 85~90%를 차지하는 가장 주요한 분자종으로 진피(眞皮)와 뼈의 주성분일 뿐만 아니라 생체 내 각 기관에도 분포한다. 분자량은 약 30만 정도이고, 길이 280~300 nm, 지름 1.4~1.5 nm의 섬유상분자이며, 유동복굴절(流動複屈折)을 나타낸다. 기본적인 분자구조는 세 가닥의 subunit가 서로 휘감기어 콜라겐 helix라는 3중 나선구조를 이루고 있다. 이 subunit는  $\alpha$ 사슬이라고도 하는 polypeptide 사슬로서 약 1,000개의 아미노산잔기로 구성되어 있으며, 분자량은 약 10만이고, 약 20종류의  $\alpha$ 사슬이 존재한다. 콜라겐의 3중나선 부분을 이루는 아미노산서열에는 규칙적으로 매 세 번째 잔기마다 glycine이 반복적으로 위치하여 Gly-X-Y라는 반복서열을 이루고 있으며 X위치에는 proline이 약 129/1000개의 비율로 존재하고, Y위치에는 hydroxyproline이 약 92/1000개의 비율로 존재한다. 이 두 이미노산(imino acid)은 alycyclic형태를 갖기 때문에  $\alpha$ -chain의 peptide bond 간에 free rotation을 억제하여 삼중나선에 stiffness를 부여한다. 또한 hydroxyproline은 translation 이후에 hydroxyprolase에 의해 hydroxylation되는데 이로 인해 삼중나선구조에 수소결합이 도입되어 나선구조를 구조적으로 안정하게 한다. 그리고 3중나선구조의 N-terminal과 C-terminal에 0~40개의 아미노산으로 이루어진 telopeptide라고 하는 비 나선부분이 있다. 콜

라겐은 체내에서 가교결합을 형성하여 물리적, 화학적으로 안정성을 유지한다. I형 콜라겐 섬유의 경우 인접하는 분자가 서로 분자길이의 약 1/4정도씩 순차적으로 밀리어 규칙적으로 배열하여 콜라겐 원섬유(collagen fibril)를 형성하고, 이것이 다시 모여 콜라겐 섬유(collagen fiber)를 형성한다. 각 사슬간과 또 사슬 내에는 가교결합(架橋結合, cross linkage)이 형성되어 있고, 또 전자현미경으로 보면 67 nm의 횡문주기구조(橫紋周期構造)를 볼 수 있다. 콜라겐에는 I형 외에 초자연골(硝子軟骨) 등에 존재하는 II형과 XI형, 그리고 많은 기관에 분포하는 III형과 V형 등이 있다. 상피조직(上皮組織)과 결합조직 사이의 막상구조(膜狀構造)인 기저막(基底膜, basement membrane)은 laminine과 IV형 콜라겐이 주성분인데, 이 IV형은 전형적인 막상(膜狀)콜라겐으로서, 섬유를 형성하지 않는다. 전반적으로 볼 때 II~XIV형의 콜라겐은 그것대로 각각 중요한 기능을 지니고 있으나 I형 콜라겐에 비하면 양적으로 극히 적다. 어류에서 분리 동정된 콜라겐은 진피(眞皮), 뼈, 비늘, 부레, 근육 등에 널리 분포하는 I형, 연골과 척색(脊索) 등에 분포하는 II형 및 XI형, 그리고 근육에 분포하는 V형 등이다. 그 밖에 상어지느러미의 각질섬유(角質纖維) E형이라고 하는 고유의 콜라겐을 주성분으로 하고 있다. 또한 칠성장어와 떡장어는 어류와 같이 I, II, V 및 XI형 콜라겐을 가지는 외에 다른 척추동물에서는 볼 수 없는 I형 유사 콜라겐을 근육, 복막, 장 등 체내 여러 기관의 주요 콜라겐 성분으로 되어 있다.

한편, 패류양식장의 해적생물인 불가사리(*Asterias amurensis*)는 체벽에 약 10%의 단백질을 함유하고 있으며 그중 약 50%가 콜라겐인 것으로 보고되어 있다. 그러나 아직까지 불가사리의 콜라겐을 산업적으로 추출하거나 이용한 사례는 찾아볼 수 없다. 이는 불가사리의 체벽에 다량의 탄산칼슘이 존재하여 통상적인 콜라겐 추출법을 사용하기에는 문제점이 많기 때문일 것이다. 즉, 일반적으로 사용되고 있는 초산 추출법이나, 산성프로테아제 추출법으로 콜라겐을 추출할 경우 체벽에 존재하는 탄산칼슘과 초산이 반응하여 중화반응을 일으키므로 최적 추출조건을 유지하기 곤란하며, pH를 맞추기 위해 과잉의 산을 사용할



## 불가사리 콜라겐의 산업적 이용기술 개발

경우에는 중화반응의 결과로 발생한 다량의 초산칼슘에 의해 용액의 이온강도가 증가하여 콜라겐의 추출이 곤란해진다.

본 연구에서는 불가사리 콜라겐의 산업적 추출방법을 개발하고 추출된 콜라겐의 기능성 및 안전성을 규명하였으며 동 결과를 응용하여 기능성식품 및 기능성화장품의 개발을 시도하였다.

## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 1. 재 료

불가사리는 부산시 기장군 기장읍 공수리 지선의 바다에서 통발을 이용하여 포획한 것을 해수를 담은 용기에 넣어 실험실까지 수송하였으며, 내장을 제거한 다음 세척 및 절단하여  $-18^{\circ}\text{C}$  냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 2. 방 법

#### 2.1. 가수분해도 측정

가수분해도의 측정은 각 효소의 최적 반응조건 하에서 1시간동안 반응시킨 다음 상층액 2 ml을 취하여 20% 삼염화초산 2 ml가 들어 있는 시험관에 넣어 효소를 불활성화시킨 후 원심분리( $1,500\times g$ , 10분)하여 상층액의 가용성 질소를 micro-Kjeldahl법으로 측정하였으며, 가수분해도는 총질소량 중 가용성 질소량이 점하는 비율을 백분율로 나타내었다.

#### 2.2. 콜라겐 함량 및 순도의 측정

콜라겐 함량의 측정은 시료중의 hydroxyproline량을 Woessner(1961)의 방법으로 측정하여 Kimura(1993)의 방법에 따라 콜라겐으로 환산하였다. 즉, 시료용액 0.5 ml에 같은 양의 6 N HCl을 가하여  $130^{\circ}\text{C}$ 에서 6시간동안 가수분해한 후 여과하여 그 여액을  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 감압, 건조한 다음 5 ml의 증류수를 가하였다. 그 중 1 ml을 취하여 Chloramine-T용액(Sodium p-toluenesulfon chloramide trihydrate 423 mg, DW 6 ml, 2-Methoxyethanol ethylene glycol monomethyl ether 9 ml, Acetate-citrate buffer 15 ml) 0.5 ml을 가하고  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 반응시킨 다음 60% 과염소산용액 0.5ml를 가하여  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 반응시켰다. 여기에 p-dimethylbenzaldehyde용액(p-dimethylbenzaldehyde 6 g, 2-Methoxy ethanol 30 ml) 0.5 ml을 가하여  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 반응시킨 다음  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 10분

간 냉각하여 분광광도계로 557 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료 중의 hydroxyproline 함량은 hydroxyproline 표준시약으로 작성한 검량선에 의하여 구하였다. 콜라겐의 순도는 시료를 105°C에서 건조하여 발생한 증발잔유물 중 콜라겐이 차지하는 비율을 백분율로 나타내었다.

### 2.3. 이화학적 특성 조사용 콜라겐의 추출방법

콜라겐은 Kimura 등(1993)의 방법에 따라서 추출하였다. 불가사리를 탈장하고 체벽을 5 mm<sup>3</sup>크기로 절단하여 증류수로 가볍게 세척하였다. 시료 50 g를 1,000 ml 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 넣고 7°C에서 48시간동안 교반하면서 추출한 다음 cheesecloth(60 mesh)에 여과한 액을 원심분리(5,000×g, 20분)하여 침전물을 취하고 증류수로 세척한 후 진공동결건조하여 콜라겐 섬유를 추출하였다. 산가용성 콜라겐은 콜라겐 섬유에 20배의 0.5 N acetic acid를 가하여 48시간 동안 교반하면서 7°C에서 추출하였고, 펩신 가용성 콜라겐의 추출은 콜라겐 섬유에 pepsin 2%를 첨가하고 7°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 원심분리(70,000×g, 1시간)하여 상층액을 취하였다. 이 액을 0.02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>용액으로 투석하여 진공동결건조 시켰다.

### 2.4. 콜라겐 type 조사

불가사리로부터 추출한 콜라겐의 type과 분자량은 SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)하에서 전기영동을 실시하여 측정하였다. 즉, 5%의 polyacrylamide gel 농도로 pH 7.0에서 각 시료당 8 mA의 전류를 8시간 동안 통전시킨 다음 고정액(메탄올 : 빙초산 : 물 = 400 ml : 70 ml : 530 ml)과 염색액(고정액 500 ml속에 Coomassie brilliant blue 1.25 g) 및 탈색액(메탄올 50 ml와 빙초산 75 ml를 1L로 정용)에 차례로 넣어 전기영동 밴드를 확인하였다. 이때 사용한 표준단백질은 콜라겐의 type 확인용으로 쇠 껍질 콜라겐(I형)을 사용하였다.

## 2.5. 콜라겐 분자량 측정

분자량은 gel여과법으로 측정하였다. 시료 50 mg을 0.05 M 인산칼륨완충액 (pH 8.0) 1 ml에 용해시킨 후 동일한 완충액으로 평형화된 Sephadex G-200 column(0.9×60cm)으로 여과하였으며, 분광광도계(OPTIZEN 2120UV)를 사용하여 280 nm에서 여과액의 흡광도를 측정하였다. 분자량 측정에 사용한 표준물질은 carbonic anhydrase(29 kDa), bovine serum albumin(66 kDa), alcohol dehydrogenase(150 kDa),  $\beta$ -amylase(200 kDa) 및 apoferritin(443 kDa)이었으며, 분자량 측정용 표준곡선은 Andrew(1964)의 방법으로 작성하였다. 그리고 collagen peptide의 분자량은 MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager-DETM STR spectrometer, Perseptive Biosystems, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.

## 2.6. 용해도

용해도는 Yamashita 등(1975)의 방법에 따라 콜라겐 0.5 g에 증류수를 가해 40 ml로 하여 25℃에서 30분간 방치하고, 이를 다시 60℃에서 10분 동안 진탕 (60 stroke/min)한 후 원심분리(700×g, 15분)하여 상층액의 가용성질소를 측정한다. 다음 시료 전체의 질소량에 대한 상층액의 가용성 질소량을 상대비율(%)로 나타내었다.

## 2.7. 보수력 및 지방흡수력

보수력과 지방흡수력은 Lin 등(1974)의 방법에 따라 일정량의 콜라겐을 원심관(30mm×110mm)에 넣고, 보수력은 원심관에 일정량의 증류수를, 지방흡수력은 일정량의 대두유를 가하여 20℃에서 1시간 동안 방치하면서 15분 간격으로 5초간 진탕시켰다. 이를 원심분리(450×g, 20분)하여 상층액을 제거하고 각각의 무게를 측정하였다. 보수력은 건조시료의 무게에 대한 흡수하여 증가한 무게의 상대비율(%)로 나타내었고, 지방 흡수력은 시료 단위 무게 당 결합된 대두유의 양으로 나타내었다.

## 2.8. 유화성 및 안정성

유화 안정성은 Wang과 Kinsella의 방법(1976)에 따라서 일정량의 콜라겐에 증류수(100 ml)을 가하여 실온에서 30분간 팽윤시킨 후 60°C에서 용해시켰다. 이어서 용액을 균질기로 분산시킨 후 대두유(10 ml)을 가하여 균질화 하였다. 이 액을 두 개의 원심관에 같은 양으로 나누어 넣고 유화성 및 유화안정성 측정용 시료로 이용하였다. 유화성은 시료를 원심분리(450×g, 15분)하여 총 시료 용액의 부피에 대한 유화된 용액의 부피를 상대비율(%)로 나타내었다. 유화안정성은 유화액을 수조에서 가열(80°C, 30분) 및 냉각(15°C)하여 원심분리(450×g, 15분)한 다음 유화성과 동일한 방법으로 계산하였다.

## 2.9. 변성온도

콜라겐의 변성온도는 0.1 M 초산을 이용하여 0.03% 콜라겐용액을 만들어 온도별로 상대점도(Ostwald점도계)를 측정하여 구간변화 수치(측정온도의 점도 - 40°C의 점도/10°C의 점도 - 40°C의 점도)가 0.5인 온도를 변성온도로 하였다.

## 2.10. 항고혈압성

항고혈압성을 파악하기 위한 방법으로 angiotensin I 전환효소(ACE)의 활성을 검토하였다. ACE활성은 Yamamoto 등(1980)의 방법으로 측정하였다. 즉, 시료 100 µl에 ACE조효소 100 µl 및 붕산완충액(pH 8.3, containing 400 mM NaCl) 200 µl를 가한 후에 37°C에서 preincubation 시켰다. 여기에 기질로써 12.5 mM의 hippuryl-histidyl-leucine용액 100 µl를 가하여 다시 37°C에서 1시간 반응시킨 후 1 N HCl 300 µl를 가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 ethyl acetate 1.5 ml를 가하여 15초간 교반한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 상층액 1 ml를 취하였다. 이 상층액을 140°C에서 20분간 건조시킨 다음 실온에서 5분간 방치한 후 1 M NaCl 3 ml를 가하여 15초간 교반하여 용해시키고 228 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가 전후 잔존활성의 백분율로써 ACE

저해율을 나타내었다. 공시험은 시료용액 대신에 붕산완충액 100  $\mu$ l를 사용하였으며, 대조구는 1 N HCl 300  $\mu$ l를 가한 다음 ACE조효소액 100  $\mu$ l를 가하였다.

## 2.11. 항노화성

### 2.11.1. Free radical 소거효과

항노화성을 파악하기 위한 방법으로 항산화활성을 검토하였다. 항산화활성은 Blois의 방법(1958)에 준하여 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 20 mg을 에탄올 150 ml에 녹인 DPPH용액 600  $\mu$ l에 DMSO 250  $\mu$ l를 가하고 적당량의 에탄올로 희석하여 10초간 진탕한 다음 517 nm의 파장에서 대조군의 흡광도가 0.94~0.97이 되도록 조절하였다. 이 DPPH 용액 3 ml에 시료를 가하여 완전히 섞은 후 10분간 반응시켜 흡광도를 측정한 다음 흡광도 감소치를 DPPH radical 소거활성으로 계산하였다.

### 2.11.2. 항산화효과

본 실험에서는 자동산화가 잘 되는 물질인  $\gamma$ -Linolenic acid를 사용하여 자동산화를 억제하는 정도를 상호비교하였다. 즉, 캡튜브에 10 mM  $\gamma$ -Linolenic acid 용액 3 ml과 4 mg/ml 농도의 시료액 0.075 ml를 첨가한 후 4  $^{\circ}$ C에서 24시간 방치하였다. 이 혼합액 0.1 ml를 EtOH 4.7 ml에 첨가하여 교반한 후 30% Ammonium thiocyanate 용액 0.1 ml와 20 mM FeCl<sub>2</sub> 0.1 ml를 첨가하여 3분간 방치시켜 발색시키고 500 nm에서 흡광도를 측정하여, 시료를 넣지 않은 대조군과 비교하였다.

## 2.12. 항균 및 항곰팡이 활성

### 2.12.1. 항균활성 측정

Radial diffusion assay법을 이용하여 *S. aureus* KCTC 1916과 *E. coli* D 31에 대한 활성을 측정하였다. *S. aureus* KCTC 1916과 *E. coli* D 31을 TSA

(Tryptic soy agar) plate에 접종한 후, 37°C에서 하루동안 배양하였다. 배양 후, TSB 배지 3 ml에 1 colony를 접종 후, 37°C에서 하루동안 배양하였다. 배양된 균을 2000×g에서 15분 간 원심분리하고, 3 ml PBS buffer (pH 7.0)로 3회 세정하였다. 세균의 농도는  $OD_{570} = 0.1$ 로 고정하여  $5 \times 10^5$  CFU/ml로 사용하였다. 세정한 균은 working bacterial stock이 될 수 있게 PBS로 농도를 희석시켜 준비하였다. 준비한 50°C LB 배지에 working bacterial stock을 넣고 흔들어서 잘 섞어준 후 50°C water bath에 넣는다. *E. coli* D 31의 경우는 별도로 Streptomycin을 첨가하였다. 최종적으로 Petri dish에 균이 들어있는 LB를 넣은 후 약 30분 동안 실온에 두어 굳게 하여 항균활성 실험에 사용하였다. LB 배지의 조성은 다음과 같다: 5 × LB broth, 20.7 ml; PBS (pH 6.8), 20.7 ml; Low EEO agar, 1.57 g; NaCl, 0.5 g; 증류수, 58.6 ml활성을 측정하기 위해서 2 mm 인 well에 다양한 종류의 농도를 가진 sample을 넣고 37°C에서 하루동안 배양시킨 후, clear zone의 크기를 측정하여 활성을 확인하였다.

### 2.12.2. 항곰팡이 활성 측정

*Candida albicans*를 PDA (Potato dextrose agar)에 접종한후 30°C에서 48시간 배양 후, 50 ml의 PDB (Potato dextrose broth)에 1 colony를 접종하여 48시간 동안 다시 배양 한 다음 2~4시간 동안 더 30°C에서 배양 한 후 최종 cell의 농도가  $1 \times 10^{-3}$  cell/ml이 되도록 희석하여 활성 측정에 사용하였다. 희석한 곰팡이 액 100 ul 와 sample 10 ul 각각을 96 well plate 에 넣은 후 630 nm에서 흡광도 수치를 확인하여 활성의 유무를 관찰하였다.

### 2.13. 면역활성

MS-222로 마취시킨 틸라피아의 두신을 절취한 후, 차가운 HBSS 완충액을 이용하여 nylon mesh에서 으갠 후 이것의 상층액을 미리 준비해 둔 34/51 % percoll 용액에 넣었다. 500×g, 40분 동안의 원심분리를 통하여 leukocyte를 모

은 후 다시 heparin (10 U/ml), penicillin (100 µg/ml), streptomycin (100 U/ml)을 담고 있는 HBSS에서 400×g, 5분간 3회 원심분리하였다. 세포의 수는 0.1 % trypan blue로 염색 후, hemocytometer를 이용하여  $8 \times 10^5$  cell/ml이 되도록 하였다. 면역작용의 자극제로서는 PMA (phenyl mercuric acetate)를 사용하였고, automatic photoluminometer (Bio orbil 1251)을 사용하여 측정하였다. 각 test cuvette에는 0.7 ml luminol, 0.4 ml phagocyte cell, 4 µl 시료에 300 µl PMA (100 µg/ml)을 첨가하여 면역작용의 촉진 여부를 조사하였다.

#### 2.14. 보습성

신체 건강한 남녀 각각 10명을 대상으로 좌측 팔 전박부에 지름 2.6 cm 크기의 원을 그리고 보습제와 증류수를 각각 도포하여 2시간 경과한 후 Corneometer(CM 420)로 수분함량을 측정하였으며 보습력은 보습제 처리 전 피부의 수분함량에 대한 보습제 처리 후 수분증가량을 백분율로 나타내었다.

$$\text{보습력(\%)} = \frac{\text{처리 후 수분함량} - \text{처리 전 수분함량}}{\text{처리 전 수분함량}} \times 100$$

#### 2.15. 미백효과

##### 2.15.1. tyrosinase 활성저해 실험

본 실험은 tyrosinase의 기능이 억제되는 정도를 보고 미백효과를 판단하는 실험으로 96 well plate에 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) 220 µl와 각각의 농도의 시료 20 µl, 1.5 mM L-tyrosine 용액 50 µl 및 2,380 unit/ml의 mushroom tyrosinase 20 µl를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며 공시험은 시료 대신 phosphate buffer를 넣었다. Tyrosinase에 대한 저해율(%)은 다음 식에 의해 계산하였다.



$$\text{Tyrosinase 활성저해율(\%)} = 100 - \frac{(b-b')}{(a-a')} \times 100$$

a : 공시험액의 반응 후 흡광도

b : 시료액의 반응 후 흡광도

a', b' : Tyrosinase 대신 buffer로 대체하여 측정한 흡광도

### 2.15.2. Melanin의 정량

본 실험에서는 melanin색소를 분비하는 마우스 유래 B16F1 세포를 배양하면서 시험물질을 처리하여 melanin색소의 생성량을 측정하였다. B16F1 세포는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 10 % Fetal Bovine Serum을 첨가한 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 세포가 confluent하게 배양되면 PBS를 세척하고 1% Trypsin-EDTA 용액을 일정량 첨가하여 세포를 떼어낸 뒤 일정량의 배지를 가하여 1000rpm, 5분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 상등액을 제거하고, 얻어진 pellet에 배지를 첨가하여 충분히 현탁시킨 후 세포수를 측정하여 1 × 10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 세포를 배지에 희석하여 배양하였다. 부착된 세포는 일정량의 시험물질을 첨가한 배지로 교환하여 3~4일간 배양한 뒤, 다시 위의 방법으로 pellet을 얻고 세포수를 측정하여 1 × 10<sup>6</sup> cell pellet으로 조절한 후 각각에 1 N NaOH 1 ml을 가하여 water bath에서 10분간 가열하였다. 완전히 녹은 세포는 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 합성 melanin을 이용하여 얻은 standard curve로부터 melanin 양을 계산하고, 이를 단위세포 당 melanin으로 나타내었다. 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 melanin 양의 증감을 나타내었다.

## 2.16. 자외선 차단능

자외선차단능을 측정하기 위해 시료를 용매에 녹인 다음 분광광도계 (OPTIZEN 2120UV)를 사용하여 자외선 파장(240~350 nm) 내에서 형성되는 흡수 스펙트럼의 형태를 분석하였으며 특히 피부손상에 가장 큰 영향을 미치는 Dorno ray(280~320 nm) 부근의 변화 추이를 해석하였다.

## 2.17. 기능성 식품 제조시험

불가사리 콜라겐의 기능성 식품화의 일환으로 콜라겐 음료와 콜라겐 젤의 제조 조건을 확립하였다. 콜라겐 음료를 개발하기 위하여 불가사리 콜라겐의 음료제품으로써 원료사용 가능성을 검토하였고 향미개선, 청량감 부여, 재료배합 비율, 제조공정 Lay out, 저장 안정성 및 기호도 조사를 실시하였다. 그리고 콜라겐 젤 제품의 경우에는 젤형성능, 영양성분의 강화, 재료 배합비율, 제조공정 Lay out, 저장안정성, 및 기호도 조사를 하였다.

## 2.18. 기능성 화장품 제조시험

불가사리 콜라겐을 이용하여 기능성 화장품을 개발하기 위한 방법으로 콜라겐 크림, 콜라겐 마스크 팩 및 콜라겐 비누의 제조방법을 개발하였다. 콜라겐 크림은 재료 배합사양, 제조공정, 저장 안정성 및 품질평가를 하였으며, 콜라겐 마스크 팩의 경우에는 재료 배합사양, 제조공정, 저장안정성 및 품질평가를 하였다. 그리고 콜라겐 비누는 비누화 조건, 재료배합 비율, 제조공정 Lay out 및 품질평가를 하였다.

## 2.19. 안전성 시험

### 2.19.1. 중금속 함량 측정

중금속 함량은 화장품원료지정과기준및시험방법등에관한규정(식품의약품안전청 고시 제 2003-23호)의 방법으로 불가사리 콜라겐에 함유되어 있는 납, 비

소, 수은의 함량을 분석하였다.

### 2.19.2. 미생물 오염도

불가사리 콜라겐용액을 대상으로 미생물 오염도는 의약품등미생물허용기준 및시험방법(식품의약품안전청 고시 제 1998-28호)에 따라 일반세균, 대장균군, 녹농균, 황색포도상구균 및 살모넬라균 수를 측정하였다.

### 2.19.3. 경구독성 시험

ICR계 웅성 랫드(체중 250~300 g) 6마리를 1개 시험군으로 하여 콜라겐용액을 용량을 증가시키면서 체중 1 kg당 2,000 ml까지 투여한 다음 독성증상의 종류, 정도, 발현, 추이 및 가역성을 14일간 관찰하여 독성 여부를 판단하였다. 이때 식이는 실험동물용 고형사료(제일사료)와 물을 제한 없이 공급하였다. 사육실의 온도( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) 및 습도( $50\pm 10\%$ )는 최적조건으로 유지시켰고 명암은 12시간주기(Light 12hr: Dark 12hr)로 조절하였다.

### 2.19.4. 피부독성평가

피부독성 평가는 기능성화장품등의심사에관한규정(식품의약품안전청 고시 제2004-80호)에 따라 실시하였다. 즉, 시험동물은 백색토끼(2.0~3.0 kg) 6마리를 등 부위의 털을 제거하여 사용하였으며 2.5×2.5 cm의 구역 내에 시료 0.5 ml을 투여하고 24시간, 48시간, 72시간까지 투여부위를 육안으로 관찰하여 피부독성 평점표에 따라 평가하였다.

표 1. 피부독성 평점표

홍반과 가피 형성	점수	부종 형성	점수
홍반이 전혀 없음	0	부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반(육안으로 겨우 식별할 정도)	1	아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
분명한 홍반	2	가벼운 부종(뚜렷하게 부어 올라서 변연부가 분명히 구별될 경우)	2
약간 심한 홍반	3	보통의 부종(약 1 mm정도 부어올랐을 경우)	3
심한 홍반(홍당무 색의 발적) 과 가벼운 정도의 가피	4	심한 부종(1 mm 이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 상태)	4

#### 2.19.5. 인체 첩포 시험

신체 건강한 성인남녀 각 15명을 대상으로 전완부에 시료 20  $\mu$ l를 폐쇄첩포 (Finn Chambers on Scanpor  $\varnothing$ 8mm, Epitest Ltd Oy제)한 다음 24시간이 경과한 후에 patch를 제거하고 일과성 홍반의 소실을 기다려 홍반 및 부종의 정도를 피부독성 평점표에 따라 평가하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 불가사리 콜라겐의 산업적 추출조건

##### 1.1. 원료 전처리

##### 1.1.1. 전처리제의 선택

알칼리 종류별 비 콜라겐 물질의 제거 효과를 알아보기 위하여 24시간동안 알칼리 처리한 시료를 효소로 가수분해한 후 가수분해물의 콜라겐 순도를 측정 한 결과를 그림 1에 나타내었다.

#### 그림 1. 알칼리 종류별 불가사리 효소 가수분해물의 콜라겐 순도.

알칼리의 종류 및 농도에 따른 콜라겐 순도는 수산화칼슘이 1.5%에서 85.3%, 수산화나트륨이 2.5%에서 83.6%, 탄산나트륨이 3.0%에서 81.5%로 최고치를 나타내었으며, 그 이상의 농도에서는 콜라겐순도가 감소하였다. 이는 고농도의 알칼리 처리로 인하여 비 콜라겐 물질과 함께 콜라겐도 용출되어 소실되는

것으로 추정된다. 이상의 결과를 종합해 보면 불가사리로부터 콜라겐을 추출하기 위한 전처리제는 1.5% 수산화칼슘이 가장 적합한 것으로 판단되었다.

### 1.1.2. 전처리 시간

적정 전처리 시간을 알아보기 위하여 1.5% 수산화칼슘용액에 불가사리 체벽을 침지시킨 후에 시간별로 효소 가수분해물의 콜라겐 순도를 측정하여 그림 2에 나타내었다. 1.5% 수산화칼슘 처리시간별 콜라겐 순도는 1시간이 73%, 3시간이 78%, 5시간이 80%, 12~48시간이 84~85%를 나타내었다. 따라서 장시간처리에 따른 콜라겐의 변성 등을 고려하면 1.5% 수산화칼슘으로 12시간 동안 처리하는 것이 적당한 것으로 판단되었다.

그림 2. 수산화칼슘 처리 시간별 불가사리 효소 가수분해물의 콜라겐 순도.

### 1.1.3. 전처리 처리온도

적정 전처리 온도를 알아보기 위하여 5, 10, 20, 30, 40℃에서 각각 1.5%

Ca(OH)<sub>2</sub>용액에 12시간 동안 전처리한 다음 온도별로 효소 가수분해물의 콜라겐 순도를 측정하여 그림 3에 나타내었다. 처리 온도별 콜라겐 순도는 84~85%로 큰 차이를 보이지 않았으나 불가사리 콜라겐의 열변성 및 미생물 발육 억제 등을 고려하면 5℃에서 처리하는 것이 바람직하다고 사료되었다.

그림 3. 수산화칼슘 처리 온도별 불가사리 효소 가수분해물의 콜라겐 순도.

## 1.2. 콜라겐의 추출 방법 검토

### 1.2.1. 산, 알카리 및 효소에 의한 콜라겐 추출

수산화칼슘 1.5%로 전처리한 불가사리 체벽을 초산, 수산화나트륨, trypsin을 이용하여 콜라겐을 추출하여 수율 및 콜라겐 순도를 측정한 결과를 표 2에 나타내었다. 추출방법에 따른 콜라겐 순도는 86.7~100%로 비슷하였으나 수율은 trypsin이 5.8%, 수산화나트륨이 0.5%, 초산이 0.3%로 큰 차이를 보였다.

표 2. 추출방법별 수율 및 콜라겐 순도

Method	Yield(%)	Degree of purity(%)
0.5N NaOH	0.5	98.7
0.5N acetic acid	0.3	100
Trypsin	5.8	86.7

불가사리 체벽으로부터 콜라겐의 추출은 산, 염 및 효소를 이용할 수 있겠으나 산 및 염을 이용한 추출은 순도는 높지만 그 수율이 낮아 경제성이 떨어지는 것으로 분석되었다. 특히 불가사리 체벽에 존재하는 골편(탄산칼슘)은 건강보조용 칼슘소재로 이용하고 있으나 산을 처리할 경우 탄산칼슘과 화학적으로 반응하여 칼슘소재로 활용할 수 없는 단점이 있다. 그러나 효소추출법의 경우 칼슘 추출 시 수행하는 효소처리 공정을 응용하면 콜라겐과 칼슘을 동시에 추출할 수 있어 경제성을 향상시킬 수 있다. 또한, 효소추출 콜라겐은 천연의 콜라겐과 거의 동일한 물성을 가지며 나아가 바람직한 성질도 있다. 즉, 효소추출 콜라겐은 주된 항원부위인 telopeptide가 제거되었으므로 인체 항원성이 낮아 체내에 삽입하여도 아무런 문제가 발생하지 않는다. 이 저항원성은 콜라겐을 생체물질로써 이용하는 데에 매우 중요한 요소이다. 이상과 같은 점을 고려하여 본 연구에서는 반응조건이 중성부근이어서 pH 조절을 위해 산 또는 염기를 첨가하지 않아도 되는 단백질 분해효소만을 선정하여 각 효소의 제품수율, 순도 및 용해도 등을 검토하였다.

### 1.2.2. 최적 반응온도에서 효소별 콜라겐 추출 결과

수산화칼슘으로 전처리하여 비 콜라겐 물질을 제거한 불가사리 체벽으로부터 콜라겐을 추출 및 가수분해시키기 위한 적정조건을 규명하기 위하여 최적반응조건에서 각종 단백질 분해효소별 가수분해율, 수율 및 순도 등을 검토한 결과



를 표 3에 나타내었다. 최적 반응조건에서 효소별 가수분해율은 87.7~89.8%, 수율은 5.6~5.9%, 순도는 86.0~86.9%로 큰 차이를 보이지 않았으나 수율 및 순도를 고려할 때 Alcalase나 Protease NP를 사용하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

표 3. 최적 반응조건에서 효소별 콜라겐 추출 결과

Method	Degree of hydrolysis(%)	Yield(%)	Degree of purity(%)	Reaction conditions
Trypsin	88.9	5.8	86.7	25°C, pH 7.6
Alcalase	89.8	5.9	86.1	60°C, pH 7.0
Neutrase	87.7	5.6	86.9	50°C, pH 6.5
Protamex	87.9	5.6	86.5	50°C, pH 6.5
Protease NP	89.1	5.9	86.0	50°C, pH 7.0

### 1.2.3. 저온에서 효소별 콜라겐 추출 결과

콜라겐은 열에 의해 사슬간의 가교결합이 절단되어 나선구조가 변화하고 길어도 수축하는 등 변성을 일으키며 그 생화학적 특성도 크게 변화된다. 이러한 변성은 콜라겐을 화장품 및 의약품의 소재로 활용하는 데에 큰 저해요인이 된다. 본 연구에서 조사한 바에 의하면 불가사리 콜라겐의 변성온도는 약 24°C로 다른 콜라겐에 비해 상당히 낮은 수준이다. 따라서 불가사리로부터 변성되지 않은 콜라겐을 추출하기 위해서는 저온추출이 불가피하다. 본 연구에서는 각종 단백질분해효소를 대상으로 온도 10°C에서 24시간 동안 반응시킨 다음 가수분해율, 수율 및 순도 등을 검토하였다(표 4). 효소별 가수분해율 및 수율은 각각 32.3~63.7%, 2.0~3.7%로 최적반응조건에서의 콜라겐추출보다 크게 낮았으나 trypsin 및 alcalase의 경우 불가사리 육조직으로부터 골편의 분리는 가능하였다.

그러나 atelocollagen의 수율을 높이기 위해서는 2차 가수분해가 필요할 것으로 판단되었다. 따라서 trypsin으로 1차 가수분해후 골편을 제거한 시료를 pepsin으로 2차 가수분해한 결과 가수분해율이 79.5%, 수율이 5.0%, 순도가 88.3%로 향상되었다.

표 4. 저온에서 효소별 콜라겐 추출 결과

Method	Degree of hydrolysis(%)	Yield(%)	Degree of purity(%)	Reaction conditions
Trypsin	63.7	3.7	88.5	10°C, pH 7.6
Alcalase	55.8	3.0	86.8	10°C, pH 7.0
Neutrase	35.8	2.0	76.3	10°C, pH 6.5
Protamex	32.3	2.5	75.9	10°C, pH 6.5
Protease NP	41.8	2.8	77.5	10°C, pH 7.0

### 1.3. 콜라겐의 활성탄 정제

효소에 의해 추출한 콜라겐의 순도를 향상시키기 위하여 활성탄을 농도별로 첨가하여 순도 및 수율을 측정한 결과를 그림 4 및 5에 나타내었다. 콜라겐의 순도는 활성탄의 농도가 높을수록 향상되었으나 수율 및 경제성 등을 고려할 때 활성탄의 농도는 3%가 적당할 것으로 판단된다. 즉, 콜라겐의 순도가 86~88%이던 것이 3% 활성탄의 처리로 98~99%까지 향상되었으며, 수율은 4~5%를 나타내어 산업용 콜라겐 소재로 손색이 없었다. 또한 활성탄의 처리로 제품의 백색도가 향상되었고 이취도 감소하는 효과가 있었다.

그림 4. 활성탄 처리 농도에 따른 콜라겐의 순도 변화.

그림 5. 활성탄의 처리농도에 따른 콜라겐의 수율 변화.

#### 1.4. 콜라겐의 산업적 생산공정

### 1.4.1. Atelocollagen

불가사리로부터 atelocollagen을 산업적으로 생산하는 공정을 그림 6에 나타내었다. 선도가 양호한 불가사리를 탈장하여 1.5% 수산화칼슘용액 중에서 24시간동안 교반한 다음 물로 세척하여 비콜라겐 물질을 제거하고 유기산을 이용하여 pH 2.0으로 조절한 후 pepsin을 첨가하고 10℃에서 24시간동안 가수분해한 다음 원심분리하여 5% NaCl로 수차례 염석하고 12시간동안 투석한다. 이것을 활성탄 및 이온교환수지로 정제한 다음 동결건조 및 살균하여 atelocollagen을 제조한다. 모든 공정은 콜라겐의 변성을 방지하기 위해 10℃이하에서 행한다. 상기공정에 의해 생산되는 atelocollagen은 순도 99.9% 이상의 변성되지 않은 가용성 콜라겐으로 창상보호용 거즈 등 의약품이나 피부질환 개선용 화장품 소재로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

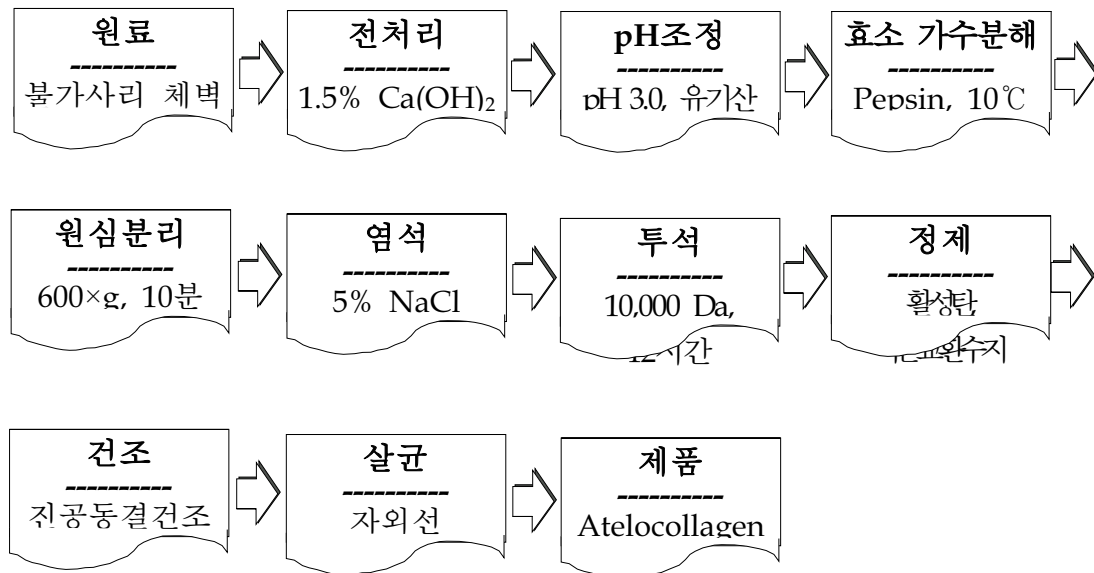


그림 6. 불가사리로부터 atelocollagen의 산업적 생산공정도.

### 1.4.2. Collagen peptide

불가사리로부터 collagen peptide를 생산하는 공정을 그림 7에 나타내었다. 선도가 양호한 불가사리를 탈장하여 1.5% 수산화칼슘용액 중에서 24시간동안 교반한 다음 물로 세척하여 비콜라겐 물질을 제거하고 alcalase를 이용하여 60°C에서 3~5시간 동안 가수분해한 후 침전된 골편을 제거한다. 이것에 유기산을 가하여 pH 3.0으로 조절한 다음 12시간동안 방치 한후 원심분리하여 초산비가용성 물질을 제거한 후 알칼리로 중화하여 원심분리한다. 이것을 활성탄 및 이온교환수지로 정제한 다음 자외선 살균하여 collagen peptide용액을 제조한다. 상기 공정에서 생산되는 산물은 collagen peptide 3~5%의 용액으로 화장품 소재로 활용할 수 있으며 골편은 건강보조용 칼슘제의 소재로 활용이 가능하다.

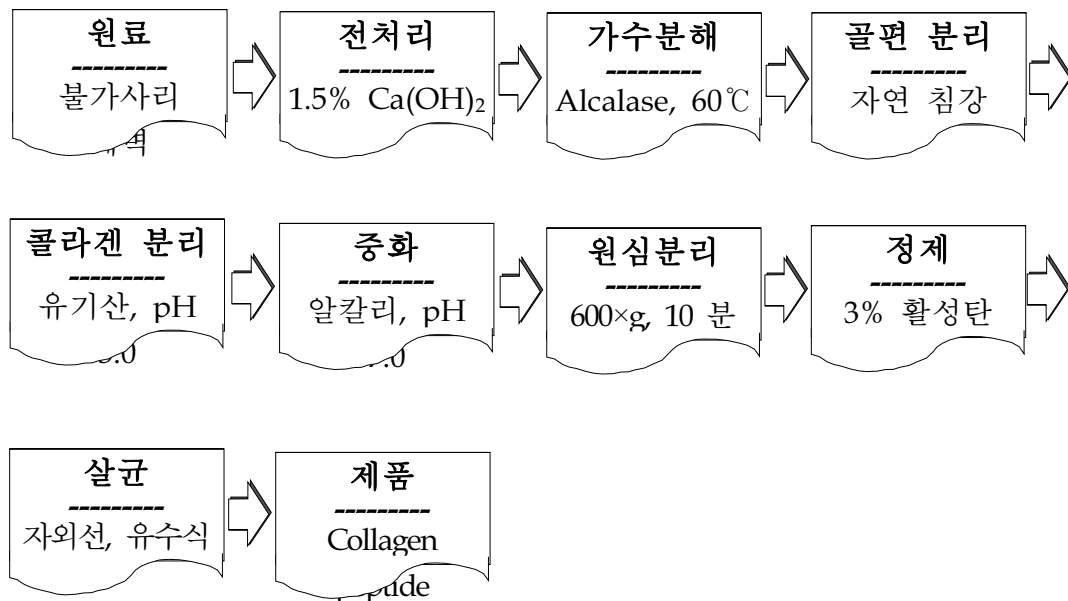


그림 7. Collagen peptide의 산업적 생산공정.

## 2. 불가사리 콜라겐의 이화학적 기능성

## 2.1. 불가사리 콜라겐 type

불가사리로부터 추출한 콜라겐의 type을 알아보기 위하여 SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)하에서 전기영동을 실시한 결과를 그림 8에 나타내었다. 불가사리에서 추출한 산가용성 및 pepsin 가용성 콜라겐 모두 I type인 쇠 껍질 콜라겐과 같이  $\alpha 1$  및  $\alpha 2$  전기영동밴드가 존재하였으며,  $\beta$ 사슬의 위치로 보아 불가사리로부터 추출한 콜라겐은 I type과 거의 유사하였다. 콜라겐은 유전적으로 그 조성이 다른 적어도 14종류의 분자종이 존재한다는 것이 알려져 있으며, 이들 콜라겐은 그것이 발견된 순서에 따라 I ~ XIV type으로 분류되고 있다.

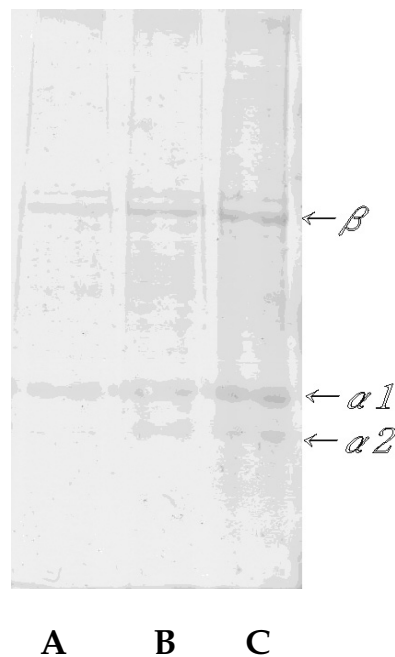


그림 8. 불가사리로부터 추출한 콜라겐의 SDS-PAGE 결과.

A, Acetic acid solubilized collagen; B, Pepsin solubilized collagen; C, Soluble type I collagen from calf skin.

I type의 콜라겐은 동물의 진피조직, 뼈, 연골, 힘줄 및 생체내 각 기관 등 광범위하게 분포하여 전체 콜라겐의 85~90%를 차지한다. Kimura 등(1992)은

일본 오키나와현의 kuroshima에서 채취한 불가사리로부터 콜라겐을 추출하여 전기영동기로 분석한 결과 I형 콜라겐과 비슷하였다고 보고한 바 있어, 우리나라 불가사리와 일본 불가사리의 콜라겐 type이 동일한 것으로 나타났다.

## 2.2. 불가사리 콜라겐 분자량

Pepsin을 이용하여 추출한 불가사리 콜라겐의 분자량을 gel여과법으로 측정하여 그림 9에 나타내었다. 불가사리 콜라겐의 주요 분자량 분포는 100 kDa 및 200 kDa이었으며, pepsin으로 추출한 콜라겐이 초산으로 추출한 콜라겐보다 분자량이 약간 적은 것으로 나타났다. 이는 추출 과정에서 콜라겐 분자의 telopeptide부분이 pepsin에 의해 분해되었기 때문이라고 사료된다. 콜라겐은 분자량 100 kDa의 폴리펩타이드 3개가 나선구조를 이루고 있으며 콜라겐을 추출하면 분자내의 교차결합 여부에 따라 1가닥인  $\alpha$ 사슬, 2가닥인  $\beta$ 사슬, 3가닥인  $\gamma$ 사슬로 분리되어 추출된다. 본 실험에서는 pepsin 및 초산 추출 모두 분자량 100 kDa인  $\alpha$ 사슬과 200 kDa인  $\beta$ 사슬만이 검출되었다.

그림 9. Pepsin 가용성 불가사리 콜라겐의 분자량 측정 결과.

Alcalase로 분해한 불가사리 collagen peptide의 분자량 측정결과를 그림 10에 나타내었다. 분자량의 분포는 1,800~5,400 Da의 범위에서 비교적 고르게 분포하였다. 일반적으로 피부에 흡수 가능한 분자량을 3,000Da으로 보고 있으며 불가사리 collagen peptide를 화장품 소재로 이용할 경우 일부는 피부로 흡수되고 일부는 표면에 잔존하여 피부의 보습 및 coating 효과가 있을 것으로 기대된다.

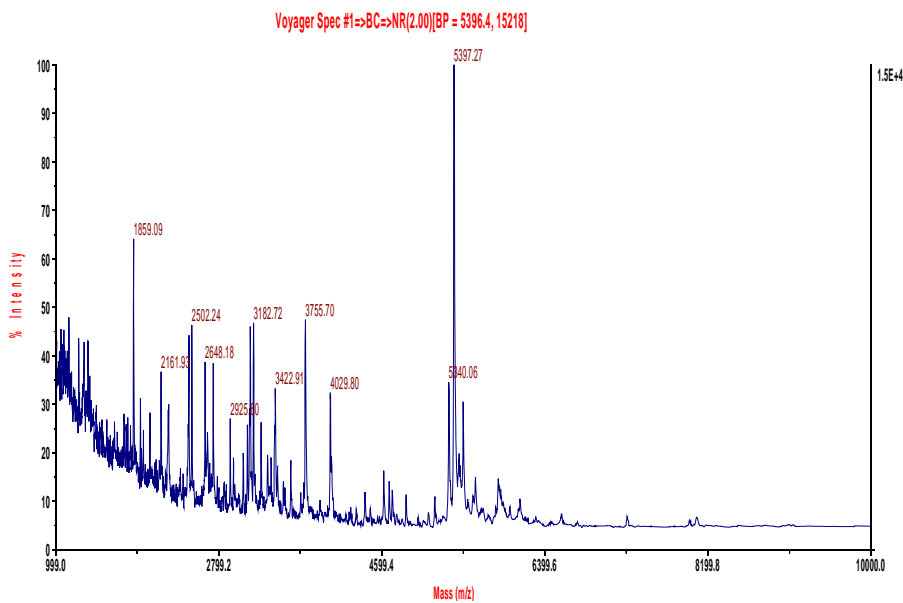


그림 10. 불가사리 collagen peptide의 분자량 측정 결과.

### 2.3. 용해도

불가사리 콜라겐의 pH에 따른 용해도 변화를 그림 11에 나타내었다. 초산 추출 콜라겐의 경우 pH 4.0부근까지는 용해도가 92~95%로 양호하였으나 pH 5.0에서 40%로 급격하게 감소하였으며 pH 9.0 이상의 알칼리 영역에서도 23~25%로 용해도가 낮았다. Pepsin 추출 콜라겐은 pH 3.0~5.0의 산성영역에서 용해도가 93~98%를 나타내었으며 중성 영역에서는 75~78%로 약간 감소하였고 알칼리 영역에서는 52~55%를 나타내었다. 식품가공에 있어서 소재의 용해도는



가공적성을 판별하는 중요한 척도로 작용하며 특히 음료제품에 있어서 저장·유통 중 침전물의 발생은 제품의 품질을 손상시키는 중요한 요소이다. 불가사리 콜라겐의 용해도 측정 결과를 토대로 하여 음료 소재 활용가능성을 검토해보면, 시중에 유통되는 음료제품이 대부분 산성 또는 중성영역임을 고려할 때 pepsin 추출 콜라겐은 음료용 소재로 활용 범위가 넓은 것으로 판단되며, 초산 추출 콜라겐도 과일음료 등 산성영역의 음료제품에 제한적으로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

그림 11. pH의 변화에 따른 불가사리 콜라겐의 용해도 변화.

#### 2.4. 보수력 및 지방흡수력

불가사리 콜라겐의 보수력 및 지방흡수력을 표 5에 나타내었다. 초산 및 pepsin으로 추출한 불가사리 콜라겐의 보수력은 각각 1,498% 및 1,505%이었고 지방흡수력은 각각 3.52 및 3.54 ml oil/g로 나타나 추출방법에 따른 차이는 크지 않았다. 식품에 있어서 보수력은 제품의 물성, 성형, 색상 등과 밀접한 관계가 있으며 특히, gel 형태의 제품의 가공 시에 중요한 지표로써 작용한다. 불가

사리 콜라겐의 높은 보수력을 이용하여 gel 제품의 가공이 가능할 것으로 판단된다. 또한 불가사리 콜라겐의 우수한 보수력 및 지방흡수력은 화장품 소재로의 활용이 가능할 것으로 보인다.

**표 5. 불가사리 콜라겐의 보수력 및 지방 흡수력**

	Water holding capacity(%)	Oil binding capacity (ml oil/g)
Acetic acid solubilized collagen	1,505	3.54
Pepsin solubilized collagen	1,498	3.52

### 2.5. 유화성 및 유화안정성

불가사리 콜라겐의 유화성 및 유화안정성을 측정한 결과를 표 6에 나타내었다. 초산 및 pepsin으로 추출한 불가사리 콜라겐의 유화성은 각각 51.5% 및 53.1%이었고 유화안정성은 각각 50.8% 및 51.7%로 나타나, 유화성 및 유화안정성 모두 pepsin으로 추출한 콜라겐이 약간 높았다. 보습크림, 밀크로션 등 화장품의 제조 시 olive oil, squalane 등이 다량 첨가되므로 화장품용 소재는 유화성 및 유화안정성이 좋아야한다. 콜라겐을 이용한 화장품 제조의 경우 그 첨가량이 3%미만인 점을 감안할 때 불가사리 콜라겐을 보습크림, 밀크로션 등 화장품제조에 사용이 가능할 것으로 사료된다.

**표 6. 불가사리 콜라겐의 유화성 및 유화안정성**

	Emulsifying activity(%)	Emulsifying stability(%)
Acetic acid solubilized collagen	51.5	50.8
Pepsin solubilized collagen	53.1	51.7

## 2.6. 변성온도

불가사리 콜라겐의 변성온도를 측정하여 그림 12에 나타내었다. 불가사리로부터 초산 및 pepsin으로 추출한 콜라겐의 열 변성온도는 각각 24.3℃, 24.7℃이었으며, 이는 Kimura(1992)가 일본산 불가사리를 대상으로 열 변성온도를 측정하여 보고한 23℃보다 다소 높은 수치를 나타내었다.

### 그림 12. 불가사리 콜라겐의 열 변성온도 측정 결과.

콜라겐의 열 변성온도는 같은 종의 생물이라도 서식 온도나 hydroxyproline 함량 등에 따라서 다소 차이를 보이는 것으로 보고되어 있다. 콜라겐을 가열하면 길이가 1/3~1/4로 수축하게되며 나선구조를 형성하고 있는 가교결합도 절단되어 변성을 일으킨다. 일반적으로 축육 콜라겐의 변성온도가 60~70℃인 데에 비하여 불가사리 콜라겐은 24℃로 상당히 낮은 온도를 나타내었으며 불가사리 콜라겐을 산업적으로 이용하는 데에 이러한 특성을 잘 고려해야 할 것으로 사료된다.

### 3. 기능성 식품 개발

#### 3.1. 콜라겐 음료

##### 3.1.1. 불가사리 콜라겐용액의 원료학적 특징

콜라겐 음료를 제조하기 위하여 본 연구에서 전년도에 개발한 collagen peptide 생산 방법에 따라서 제조한 콜라겐 용액의 원료학적 특징을 조사하였다 (표 7).

표 7. 불가사리 콜라겐 용액의 원료학적 특징

항 목	평가 결과	
관능적 특징	색깔	연황색을 나타내며 투명함.
	향	극미한 비린내와 아미노산 취를 느낄 수 있음.
	맛	약간의 단 맛과 특유의 아미노산 맛이 있음.
	음용감	점성이 있으나 음용 전후에 불쾌한 느낌은 없음.
이화학적 특성	콜라겐 함량	3%
	pH	7.4
	점도	1.059
	탁도	4.8
	비중	1.0101

### 3.1.2. 향미의 개선

불가사리 콜라겐 특유의 비린내, 아미노산 취 등을 차폐시키기 위해 불가사리 콜라겐 용액에 사과, 포도, 복숭아 농축액을 농도별로 배합한 다음 관능평가를 통해 적정농도를 규명하였다. 과실 농축액 농도별 향의 관능평가 결과는 사과 30%가 4.8, 포도 20%가 4.2, 복숭아 40%가 4.0으로 평가되었다(표 8).

표 8. 과실 농축액 농도별 향의 관능평가 결과

Concentration	5%	10%	20%	30%	40%	50%
Apple conc.	3.5	4.0	4.5	4.8	4.6	4.4
Grape conc.	3.0	3.8	4.2	4.0	4.0	3.8
Peach conc.	3.0	3.2	3.5	3.8	4.0	3.8

5 scale: 1, very poor; 2, poor; 3, acceptable; 4, good; 5, very good.  
Values are mean for 10 experiments.

불가사리 콜라겐 음료의 맛을 개선하고 기호성을 높이기 위해 액상과당을 첨가한 다음 관능평가를 통하여 적정 배합비율을 규명하였다. 즉, 앞의 실험에서 과실별로 가장 높은 평가치를 보인 농도를 선택하여 액상과당을 농도별로 첨가한 다음 관능평가를 실시한 결과, 액상과당의 적정 배합비율은 사과, 포도 및 복숭아 공히 10%시험구가 가장 높게 평가되었다(표 9).

표 9. 액상과당 농도별 맛의 관능평가 결과

Fructose syrup	5%	7%	10%	15%	20%
Apple conc. 30%	4.0	4.5	4.8	4.6	4.4
Grape conc. 20%	3.8	4.1	4.3	4.0	3.8
Peach conc. 40%	3.3	3.7	4.2	4.0	3.8

5 scale: 1, very poor; 2, poor; 3, acceptable; 4, good; 5, very good.  
Values are mean for 10 experiments.

### 3.1.3. 청량감의 부여

콜라겐 음료에 청량감을 부여하기 위한 방법으로 시험군별로 적정 구연산을 첨가 농도를 규명하였다. 즉, 앞에서 과실별로 가장 높은 평가치를 보인 농도를 선택하여 구연산을 농도별로 첨가한 다음 관능평가를 실시한 결과, 구연산의 적정 배합비율은 사과, 포도 및 복숭아 공히 0.1%시험구가 가장 높게 평가되었다 (표 10).

표 10. 구연산 농도별 맛의 관능평가 결과

Citric acid	0.05%	0.07%	0.10%	0.15%	0.20%
Apple conc. 30%	4.2	4.5	4.7	4.5	4.4
Grape conc. 20%	3.7	4.0	4.2	4.1	3.8
Peach conc. 40%	3.4	3.6	4.2	4.0	3.8

5 scale: 1, very poor; 2, poor; 3, acceptable; 4, good; 5, very good.

Values are mean for 10 experiments.

### 3.1.4. 영양성분의 강화 및 최종 배합비율 결정

이상의 시험결과를 기초로 하여 농축과즙, 액상과당 및 구연산의 배합비율을 결정하였으며 영양 강화를 위하여 음료제품에 통상적으로 첨가되고 있는 식이섬유와 비타민 C를 첨가하여 3종의 시제품에 대한 최종 배합비율을 결정하였다. 즉, 사과향 콜라겐음료의 최종 배합비율은 불가사리 콜라겐 용액(3%) 58.35%, 액상과당 10.0%, 사과농축액 30.0%, 구연산 0.1%, 비타민 C 0.01%, 식이섬유(10%) 1.5%이고, 포도향 콜라겐음료는 불가사리 콜라겐 용액(3%) 68.35%, 액상과당 10.0%, 포도농축액 20.0%, 구연산 0.1%, 비타민 C 0.01%, 식이섬유(10%) 1.5%이며, 복숭아향 콜라겐 음료는 불가사리 콜라겐 용액(3%) 58.35%, 액상과당 10.0%, 복숭아농축액 20.0%, 구연산 0.1%, 비타민 C 0.01%, 식이섬유(10%) 1.5%이다(표 11).

표 11. 콜라겐 음료 시제품의 재료 배합비율(%)

	Apple type	Grape type	Peach type
Collagen solution(3%)	58.35	68.35	58.35
Fructose syrup	10.0	10.0	10.0
Apple conc.	30.0	-	-
Grape conc.	-	20.0	-
Peach conc.	-	-	30.0
Citric acid	0.1	0.1	0.1
Vitamin C	0.05	0.05	0.05
Dietary fiber solution(10%)	1.5	1.5	1.5

### 3.1.5. 제조공정 Lay out

불가사리 콜라겐 음료의 제조공정은 그림 13과 같다. 즉, 본 연구에서 개발한 방법으로 제조된 3%농도의 불가사리 콜라겐 용액에 농축과즙, 액상과당, 구연산, 식이섬유, 비타민 C 등의 부재료를 배합하여 충전 및 밀봉한 다음 열탕살균(80℃, 30분)한 것을 냉각수조에서 냉각, 건조, 포장 공정을 거쳐서 제품화한다. 다만, 살균조건은 관형에 따라서 유동적이다.

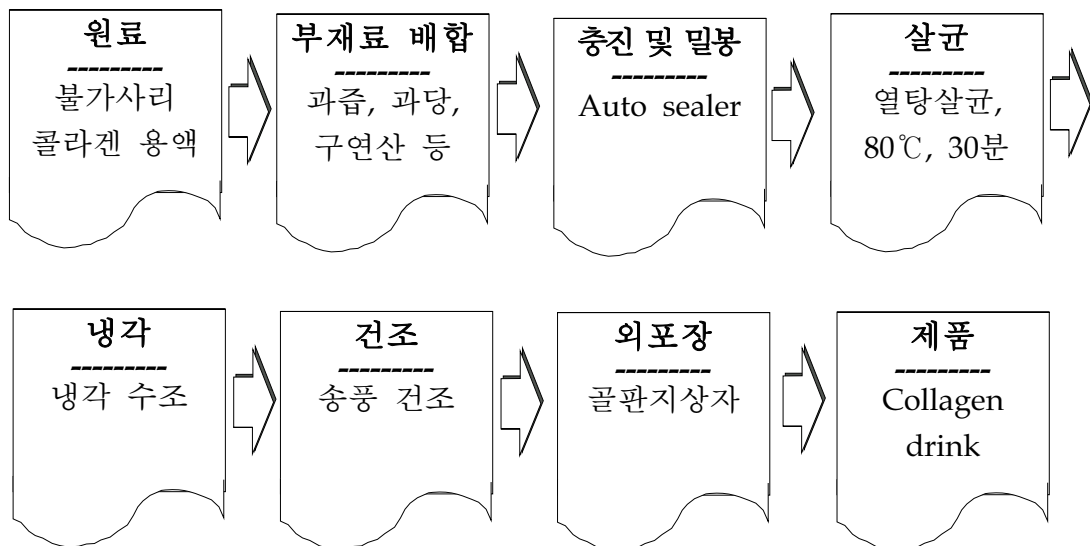


그림 13. 불가사리 콜라겐 음료의 제조공정도.





그림 14. 불가사리 콜라겐 음료 시제품.

### 3.1.6. 콜라겐음료 시제품의 저장 안정성

콜라겐음료 시제품의 저장안정성을 조사하기 위하여 유리병(100 ml)에 콜라겐음료를 충전하여 80℃에서 1시간동안 살균처리한 시제품을 30℃, 37℃, 55℃의 온도조건에서 28일간 저장하면서 품질변화를 관찰하였다. 시제품의 품질평가 결과, pH 3.0, 당도 12.7~12.9%, 탁도 21.4~21.5, 향 4.6~4.8, 맛 4.6~4.8로 저장기간 중 큰 변화가 없었으며 침전물 및 부유물도 발견되지 않아 시제품은 저장안정성에 문제가 없는 것으로 나타났다(표 12).

표 12. 콜라겐 음료 시제품의 저장 안정성 시험 결과

저장온도	항목	저장기간				
		저장초기	7일	14일	21일	28일
30℃	pH	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
	당도(%)	12.8	12.7	12.8	12.9	12.8
	탁도	21.5	21.4	21.5	21.4	21.5
	향(5 scale)	4.7	4.6	4.7	4.8	4.7
	맛(5 scale)	4.7	4.7	4.6	4.7	4.8
	침전물	-	-	-	-	-
	부유물	-	-	-	-	-
37℃	pH	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
	당도(%)	12.8	12.8	12.7	12.8	12.9
	탁도	21.5	21.4	21.5	21.6	21.5
	향(5 scale)	4.7	4.7	4.5	4.6	4.7
	맛(5 scale)	4.7	4.6	4.6	4.7	4.7
	침전물	-	-	-	-	-
	부유물	-	-	-	-	-
55℃	pH	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
	당도(%)	12.8	12.8	12.7	12.9	12.8
	탁도	21.5	21.5	21.4	21.6	21.5
	향(5 scale)	4.7	4.6	4.7	4.7	4.7
	맛(5 scale)	4.7	4.6	4.7	4.7	4.7
	침전물	-	-	-	-	-
	부유물	-	-	-	-	-

5 scale: 1, very poor; 2, poor; 3, acceptable; 4, good; 5, very good.

Values are mean for 10 experiments.

### 3.1.7. 콜라겐 음료 시제품의 기호도

성별, 나이별 조사대상자를 각각 20명씩 선정한 다음 사과향, 포도향 및 복숭아향 콜라겐 음료 중 기호도가 가장 좋은 1종을 선택하게 하였다. 조사결과 사과향 제품에 대한 선호도가 50~70%로 가장 높았으며 포도향 제품은 10~25%, 복숭아향 제품은 5~40%이었다. 나이가 들수록 복숭아향 제품에 대한 기호도가 증가하는 경향을 보였으나 사과향 제품에는 미치지 못하였으며 성별로는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다(표 13).

표 13. 콜라겐음료 세제품의 선호도 조사 결과(%)

성별	나이	사과향 콜라겐음료	포도향 콜라겐음료	복숭아향 콜라겐음료
남자	10대	70	20	10
	20~30대	65	20	15
	40~50대	55	15	30
	60이상	50	10	40
여자	10대	70	25	5
	20~30대	70	25	5
	40~50대	65	15	20
	60이상	65	10	25

## 3.2. 콜라겐 겔

### 3.2.1. 겔 형성능

본 연구에서 개발된 불가사리 콜라겐은 펩타이드 형태를 띠고 있어 겔 형성능이 거의 없으며 겔화시키기 위해서는 겔화제의 사용이 필요하다. 따라서 불가사리 콜라겐 용액에 일반적으로 겔화제로 많이 사용되고 있는 카라기난과 한천을 각각 또는 혼합 첨가하여 겔 형성능을 측정하고 관능평가를 통하여 적정 배합비율을 결정하였다. 겔 강도는 카라기난 0.5%와 한천 1.5%를 혼합한 시험구가 1,183.03 g/cm<sup>2</sup>로 가장 높았고 동일 농도의 경우 한천이 카라기난보다 겔 강도가 높았다. 그리고 카라기난 0.5% 시험구는 겔을 형성하지 않았다. 관능평가를 이용한 식감분석 결과, 경도가 강한 한천보다 점탄성이 있는 카라기난이 콜라겐 겔제품의 가공에 적합한 것으로 평가되었으며, 첨가농도는 카라기난 1.5% 시험구가 4.8(5 scale)로 가장 양호하였다(표 14).

표 14. 카라기난 및 한천의 겔 형성력 및 관능평가 결과

Composition	Gel strength(g/cm <sup>2</sup> )	Sensory evaluation (5 scale)
Carrageenan 0.5%	0	2.5
Carrageenan 1.0%	54.57	4.0
Carrageenan 1.5%	161.92	4.8
Agar 0.5%	148.13	4.3
Agar 1.0%	425.94	3.8
Agar 1.5%	458.51	3.5
Carrageenan 0.5%+Agar 1.5%	1,183.03	3.0
Carrageenan 1.0%+Agar 1.0%	429.96	3.6
Carrageenan 1.5%+Agar 0.5%	386.56	4.1

5 scale: 1, very poor; 2, poor; 3, acceptable; 4, good; 5, very good.  
Values are mean for 10 experiments.

### 3.2.2. 영양성분의 강화 및 최종 배합비율 결정

이상의 시험결과를 기초로 하여 농축과즙, 액상과당 및 구연산의 배합비율을 결정하였으며 영양 강화를 위하여 음료제품에 통상적으로 첨가되고 있는 식이섬유와 비타민 C를 첨가하여 3종의 시제품에 대한 최종 배합비율을 결정하였다. 즉, 사과향 제품의 재료배합비율은 콜라겐용액 56.85%, 과당 10.0%, 농축사과즙 30.0%, 구연산 1.0%, 비타민 C 0.05%, 식이섬유 1.5%, 카라기난 1.5%이고 포도향 제품의 재료배합비율은 콜라겐용액 66.85%, 과당 10.0%, 농축포도즙 20.0%, 구연산 1.0%, 비타민 C 0.05%, 식이섬유 1.5%, 카라기난 1.5%이며 복숭아향 제품의 재료배합비율은 콜라겐용액 56.85%, 과당 10.0%, 농축복숭아즙 30.0%, 구연산 1.0%, 비타민 C 0.05%, 식이섬유 1.5%, 카라기난 1.5%이다(표 15).

표 15. 콜라겐 겔 시제품의 재료 배합비율(%)

	Apple type	Grape type	Peach type
Collagen solution(3%)	56.85	66.85	56.85
Fructose	10.0	10.0	10.0
Apple conc.	30.0	-	-
Grape conc.	-	20.0	-
Peach conc.	-	-	30.0
Citric acid	0.1	0.1	0.1
Vitamin C	0.05	0.05	0.05
Dietary fiber solution(10%)	1.5	1.5	1.5
Carrageenan	1.5	1.5	1.5

### 3.2.3. 제조공정 Lay out

콜라겐 겔의 제조공정은 그림 15와 같다. 즉, 본 연구에서 개발한 방법으로 제조된 3%농도의 불가사리 콜라겐 용액에 농축과즙, 액상과당, 구연산, 식이섬유, 비타민 C, 식이섬유, 카라기난 등의 부재료를 배합하여 95℃의 이중 솥에서 1시간동안 가열한 다음 PE 용기에 충전 및 밀봉하여 열탕살균(80℃, 30분)한 것을 냉각수조에서 냉각, 건조, 포장 공정을 거쳐서 제품화한다.

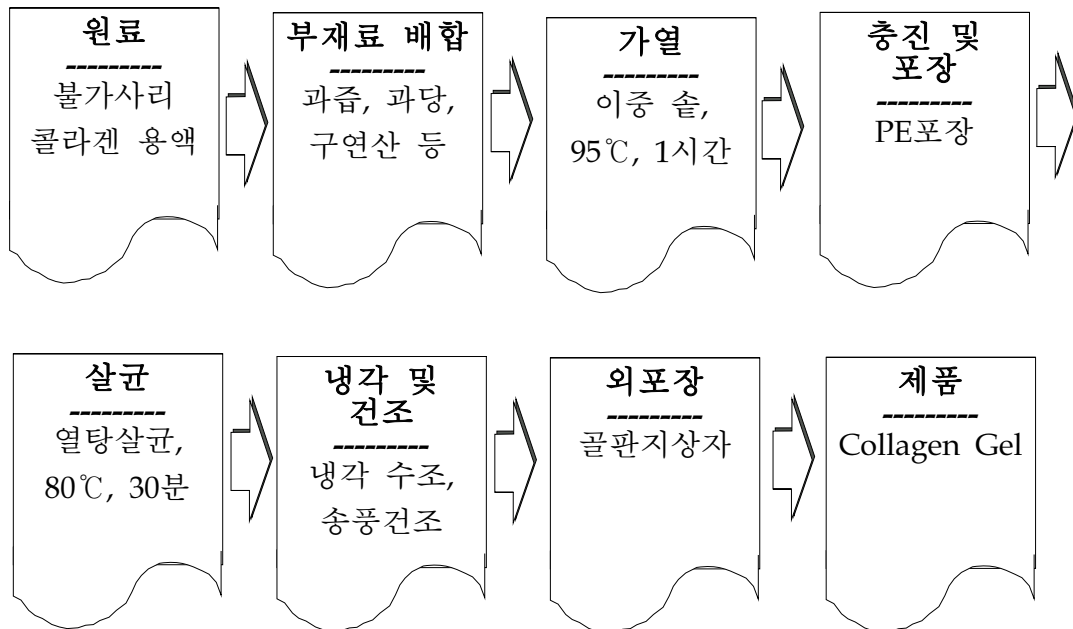


그림 15. 콜라겐 겔의 제조공정도.



그림 16. 콜라겐 겔 시제품.

#### 3.2.4. 콜라겐 겔 시제품의 저장 안정성

콜라겐 겔 시제품의 저장안정성을 조사하기 위하여 PE 포장용기에 콜라겐 겔을 충전하여 80℃에서 30분간 살균처리한 시제품을 30℃, 37℃, 55℃의 온도 조건에서 28일간 저장하면서 품질변화를 관찰하였다. 시제품의 품질평가 결과, 겔 강도 156.2~159.0 g/cm<sup>2</sup>, 향 4.6~4.8, 맛 4.6~4.8로 저장기간 중 큰 변화가 없었으며 유리수가 발생하지 않아 시제품은 저장안정성에 문제가 없는 것으로 나타났다(표 16).

표 16. 콜라겐 겔 시제품의 저장 안정성 시험 결과

저장온도	항목	저장기간				
		저장초기	7일	14일	21일	28일
30℃	향(5 scale)	4.8	4.6	4.7	4.8	4.7
	맛(5 scale)	4.7	4.7	4.6	4.7	4.8
	겔강도(g/cm <sup>2</sup> )	156.2	157.0	158.2	157.5	157.3
	유리수	-	-	-	-	-
37℃	향(5 scale)	4.8	4.7	4.6	4.8	4.7
	맛(5 scale)	4.7	4.7	4.7	4.7	4.8
	겔강도(g/cm <sup>2</sup> )	156.2	154.8	159.0	157.2	156.2
	유리수	-	-	-	-	-
55℃	향(5 scale)	4.8	4.6	4.7	4.8	4.7
	맛(5 scale)	4.7	4.7	4.6	4.7	4.8
	겔강도(g/cm <sup>2</sup> )	156.2	155.8	158.1	155.0	157.3
	유리수	-	-	-	-	-

5 scale: 1, very poor; 2, poor; 3, acceptable; 4, good; 5, very good.

Values are mean for 10 experiments.



### 3.2.5. 콜라겐 겔 시제품의 기호도

성별, 나이별 조사대상자를 각각 20명씩 선정한 다음 사과향, 포도향 및 복숭아향 콜라겐 겔 중 기호도가 가장 좋은 1종을 선택하게 하였다. 조사결과 사과향 제품에 대한 선호도가 40~50%, 포도향 제품은 20~30%, 복숭아향 제품은 25~40%이었다. 시제품별로 뚜렷한 차이를 보이지는 않았으나 전반적으로 사과향에 대한 기호도가 약간 높은 편이었으며 나이별, 성별로는 큰 차이를 보이지 않았다(표 17).

표 17. 콜라겐 겔 세제품의 선호도 조사 결과(%)

성별	나이	사과향 콜라겐 겔	포도향 콜라겐 겔	복숭아향 콜라겐 겔
남자	10대	45	30	25
	20~30대	50	25	25
	40~50대	45	20	35
	60이상	40	20	40
여자	10대	45	20	35
	20~30대	45	25	30
	40~50대	45	20	35
	60이상	45	20	35

## 4. 기능성 화장품 개발

### 4.1. 콜라겐 크림

#### 4.1.1. 콜라겐 크림의 재료배합사양

콜라겐 크림의 제조는 협력업체(아마란스 화장품)에서 주로 생산하고 있는 보습크림의 사양을 응용하여 표 18과 같이 재료의 배합비율을 결정하였다. 즉, oil base는 각 oil들의 Required HLB(R-HLB) 값을 합하여 전체의 R-HLB를 계산한 다음 이에 적합한 유화제를 선정하였으며 aqueous base로는 증류수를 사용하였다. 그리고 계면장력을 낮춰주는 성분으로 계면활성제와 유화안정제를 첨가하여 유화계의 creaming, flocculation, coalescence를 감소시키는 역할을 부여하였다. 향료 및 활성성분들의 용해도를 높여주며, 계면활성제들이 활성성분을 micelle 내부로 포집하여 용해도를 높이고, 활성성분의 결정화를 방지하는 용해제를 사용하였으며 흡습성이 우수해 표피의 수분함량을 증대시키는 기능이 있는 보습제, 피부의 유연효과를 부여하는 완화제를 사용하였다. 또한 이온화된 활성성분을 중화시키거나 화장품의 pH를 피부와 같아지도록 조절하여 피부 자극을 최소화시키기 위한 방법으로 pH 조절제를 사용하였으며, 피부에 도포 시 퍼짐성을 최적화하기 위한 viscosity imparting agents 및 산소에 약한 성분들은 free radical에 의해 자동산화반응을 일으키거나 빛에 의해 산화되기 쉽기 때문에 항산화제를 병행하여 사용하였다.

표 18. 콜라겐 크림의 재료배합 비율

No.	재 료 명	함량(%)
1	Distilled water	46.15
2	EDTA-2Na	0.05
3	Butylene glycol	7.00
4	Glycerine	3.00
5	Methylparaben	0.20
6	Keltrol-F 1% sol'n	5.00
7	TEA 10% sol'n	1.10
8	Squalane	5.50
9	Vitamin E acetate	0.10
10	Octyldodecyl myristate	2.00
11	Butylene glycol dicaprylate/dicaprate	2.00
12	Cetyl octanoate	2.00
13	Liquid paraffin	2.00
14	Caprylic/capric triglyceride	2.00
15	Stearic acid	0.70
16	Cetearyl alcohol	2.00
17	Glyceryl stearate SE	1.00
18	Polysorbate 60	1.00
19	Sorbitan stearate	0.30
20	Glyceryl stearate/PEG-100 stearate	1.00
21	Propylparaben	0.10
22	Carbomer 1% sol'n	10.00
23	AMW0031	0.20
24	Turnera diffusa leaf extract	1.00
25	Phospholipids/whey protein	1.00
26	Glycine soja(soybean) protein	1.10
27	Star fish-collagen	2.50

#### 4.1.2. 콜라겐 크림의 제조공정

##### ○ 수상용해

수상 용해탱크에 증류수(46.15%)를 투입하고, 여기에 원료 EDTA-2Na (0.05%), butylene glycol(7.00%), glycerine(3.00%)를 계량하여 순서대로 넣고 교반하여 완전히 용해시킨다. 이것을 70℃로 가온하고, methylparaben(0.20%)를 투입하여 교반 및 용해시킨 다음 keltrol-F 1% sol'n(1.10%)을 넣고 온도를 75℃까지 올려 완전 용해시킨 후 TEA 10% sol'n을 넣고 충분히 교반하여 준다. 이것을 200 mesh로 여과하여 제조가마로 이송하고, 온도는 75℃를 유지한다.

##### ○ 유상용해

유상 용해탱크에 squalane(5.50%), vitamin E acetate(0.10%), octyldodecyl myristate(2.00%), butyleneglycol dicaprylate/dicaprate(2.00%), cetyl octanoate (2.00%), liquid paraffin(2.00%), caprylic/capric triglyceride(2.00%), stearic acid (0.70%), cetearyl alcohol(2.00), glyceryl stearate SE(1.00%), polysorbate 60 (1.00%), sorbitan stearate(0.30%), glyceryl stearate/PEG-100 stearate(1.00%), propylparaben(0.10%)을 순서대로 투입 후 75℃까지 가온하여 교반하면서 완전히 용해시킨 다음 유상 용해탱크에서 온도 75℃를 유지한다.

##### ○ 유화

수상 용해 재료가 들어 있는 용해탱크에 유상 용해 재료를 200 mesh로 여과하면서 투입한 후 75℃에서 5분간 유화시킨다.

##### ○ 중화

유화가 종료된 것을 65℃로 냉각하여 carbomer 1% sol'n(10.00%)를 첨가하고 5분간 중화하고 중화가 완료되면 교반하면서 50℃까지 냉각한다.

○ 향 첨가

중화가 완료된 것에 AMW0031(0.20%)을 투입하고 2분간 교반하여 혼합한 다음 40℃까지 냉각시킨다.

○ 품질 개선물질 첨가

향을 첨가한 것에 turnera diffusa leaf extract(1.0%), phospholipids/whey protein(1.00%), glycine soja(soybean) protein(1.10%), star fish collagen(2.5%)을 첨가하고 3분간 교반하여 30℃까지 냉각한다.

○ 충전 및 포장

크립을 적당량 용기에 충전하여 포장한다.

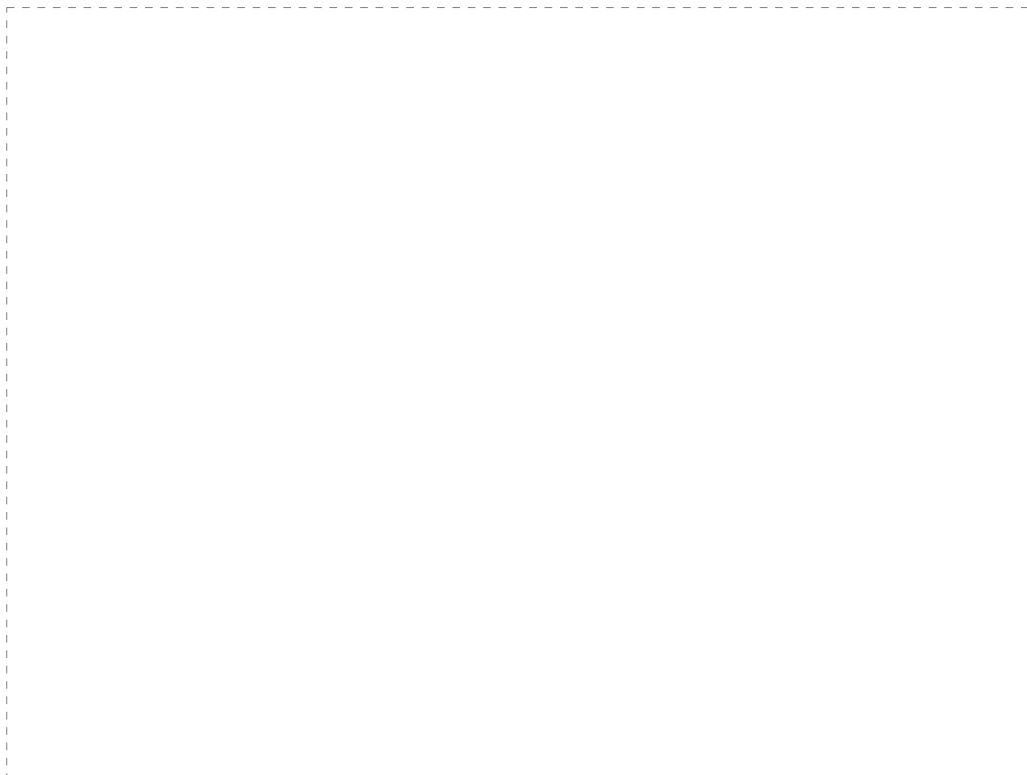


그림 17. 콜라겐 크립 시제품.

#### 4.1.3. 콜라겐 크림의 저장 안정성

시제품의 저장 안정성을 조사하기 위하여 표 19와 같은 조건에서 실험을 하였다.

표 19. 콜라겐 크림의 안정성 시험 조건

시험조건	시험기간	시험 주기	조사항목
실온(R/T)	6주	1주일간 매일, 1주 경과 후 수시	성상, 사용감, 변취, 물성
항온(50℃)	6주	1주일간 매일, 1주 경과 후 1회/주	분리, 침전, 성상, 변취
항온(40℃)	6주	1회/주	분리, 침전, 성상, 변취
항온(4℃)	6주	1회/주	성상, 침전
순환(cycle)	6주	1회/주	분리, 침전, 성상, 변취
일광	2주	1회/일	변색, 산패

즉, 성상의 변화를 보기위해서 광택성, 점성, 입자 몽클거림에 대하여 관찰하였고, 분리의 유무를 파악하였다. 그리고 시험기간동안 침전 또는 부유물의 발생 유무를 확인하였고 이취 또는 변패취에 의한 제품의 냄새 변화도 관찰하였다. 사용감을 파악하기 위해 시험기간 중에 제품을 이용하여 유분감, 흡수력, 백탁 및 변색 등의 현상을 조사하였다. 콜라겐 크림 시제품에 대한 품질 안정성 시험 결과를 표 20에 나타내었다. 콜라겐 크림에 대한 품질 안정성 시험을 표 20의 조건으로 3회에 걸쳐 실시한 결과 모든 조건에서 품질의 변화가 확인되지 않아 본 연구에서 개발한 시제품의 품질안정성은 문제가 없는 것으로 나타났다.

표 20. 콜라겐 크림의 안정성 시험 결과

저장조건	시험항목	1차시험	2차시험	3차시험
실온(R/T)	성상	○	○	○
	사용감	○	○	○
	변취	○	○	○
	물성	○	○	○
항온(50℃)	분리	○	○	○
	침전	○	○	○
	성상	○	○	○
	변취	○	○	○
항온(40℃)	분리	○	○	○
	침전	○	○	○
	성상	○	○	○
	변취	○	○	○
항온(4℃)	성상	○	○	○
	침전	○	○	○
순환(cycle)	분리	○	○	○
	침전	○	○	○
	성상	○	○	○
	변취	○	○	○
일광	변색	○	○	○
	산패	○	○	○

○ : 양호, × : 불량

#### 4.1.4. 콜라겐 크림의 품질평가

콜라겐 크림의 품질평가 항목으로 내용물의 상태, 퍼짐성, 흡수성, 사용 후 피부 상태, 보습력, 피부 유연감, 지속성, 향취강도, 피부 자극정도, 트러블 제어 정도, 종합품질 등을 자체적으로 설정하여 10명이 관능적으로 평가한 결과를 표 21에 나타내었다.

표 21. 콜라겐 크림의 품질평가 결과

평 가 기 준	평가결과 (5 scale)
내용물의 상태 : 내용물을 손에 취할 때 점도나 색상 등의 상태	4.5
퍼짐성 : 피부에 부드럽게 잘 도포되는 정도	4.0
흡수성 : 피부에 걸들지 않고 잘 흡수되는 정도	4.0
사용 후 피부 상태 : 산뜻함이나 끈적임이 느껴지는지 여부	4.0
보습력 : 사용 후 피부에서 느껴지는 촉촉함의 정도	4.5
피부 유연감 : 사용 후 피부에 느껴지는 부드러움이나 탄력감의 정도	4.5
지속성 : 사용 후 피부에서 보습이나 피부 유연감이 느껴지는 정도	4.5
향취강도 : 사용 시 향취의 강도 및 만족도	4.0
피부 자극정도 : 사용 시 얼굴이 따끔거리거나 눈에 자극을 주는지 여부	4.5
트러블 제어정도 : 사용 후 트러블의 제어 또는 피부 청결도	4.0
종합품질 : 전체적인 제품의 만족도 및 기존의 유사제품과 품질비교	4.5

5 scale: 1, very poor; 2, poor; 3, acceptable; 4, good; 5, very good.

Values are mean for 10 experiments.

콜라겐 크림의 품질은 모든 평가항목에서 4.0(5 scale)이상의 점수를 얻었으며 종합적인 품질평가에서도 4.5(5 scale)로 평가되어 품질이 우수한 것으로 나타났다. 기존의 유사제품과의 비교에서도 뒤지지 않는 평가결과를 보였다.



## 4.2. 콜라겐 마스크 팩

### 4.2.1. 콜라겐 마스크 팩의 재료 배합사양

콜라겐 마스크 팩의 제조는 연구 협력업체(아마란스화장품)에서 생산되고 있는 기존의 마스크 팩(식물성콜라겐 마스크 팩)의 배합사양을 응용하여 재료의 배합비율을 결정하였다(표 22).

표 22. 콜라겐 마스크 팩의 재료 배합 비율

No.	재 료 명	함량(%)
1	Distilled water	56.47
2	Ethylparaben	0.10
3	Methylparaben	0.10
4	EDTA-2Na	0.05
5	DPG	0.05
6	Linteus mushroom extract	10.00
7	Glycerine	7.00
8	Distilled water	20.00
9	Natrosol	0.10
10	PEG-60 hydrogenated castor oil	0.80
11	Vitamin E acetate	0.05
12	Squalane	0.05
13	Nymphe 66	0.03
14	Aloe extract	0.40
15	Witchhazel extract	1.50
16	Ginkgo Biloba extract	0.30
17	Star fish collagen	3.00

#### 4.2.2. 콜라겐 마스크 팩의 제조공정

##### ○ 수상 용해

수상용해 탱크에 증류수(56.47%)를 투입하고 80℃까지 가온하여 ethylparaben (0.10%), methylparaben(0.10%), EDTA-2Na(0.05%), DPG(0.05%), linteus mushroom Ex(10.00%), glycerine(7.00%)을 정확히 계량하여 넣고 80℃를 유지하면서 Agi mixer로 교반하여 용해시킨다. 별도의 용해조에 증류수(20.00%)를 넣고 50℃로 가온한 후 교반하면서 natrosol(0.10%)을 서서히 투입하여 완전히 용해시킨 것을 수상 용해탱크에 투입한다.

##### ○ 유상 용해

PEG-60 hydrogenated castor oil(0.80%)을 60℃에서 녹인 후 vitamin E acetate(0.05%), squalane(0.05%)을 투입하여 완전 용해시킨 다음 온도를 55℃로 유지시키면서 nymphe 66(0.03%)를 투입한다.

##### ○ 가용화

유상용해가 완료된 것을 온도 50~55℃를 유지하면서 수상 용해탱크에 천천히 투입하고 Agi mixer로 5분간 교반하면서 가용화시킨다.

##### ○ 품질개선 물질 첨가

수상 용해 탱크의 온도를 40℃까지 냉각시킨 다음 aloe extract(0.40%), witchhazel extract(1.50%), ginkgo biloba extract(0.30%), starfish collagen(3.00%)을 첨가하여 용해시킨 다음 여과( $\varnothing$  50 $\mu$ m)하여 얼굴모양의 부직포에 침투시킨다.

##### ○ 포장

화장품 성분이 완전하게 침투된 부직포를 개체 포장대(PE+Al)에 넣고 밀봉하여 제품으로 한다.



그림 18. 콜라겐 마스크 팩 시제품.

#### 4.2.3. 콜라겐 마스크 팩의 저장 안정성

시제품의 저장 안정성을 조사하기 위하여 표 23과 같은 조건에서 실험을 하였다. 즉, 성상의 변화를 보기위해서 변색, 물성의 변화 등에 대하여 관찰하였고, 부직포로부터 화장성분의 분리 유무를 파악하였다. 그리고 시험기간 동안 제품내부에서 미생물 등의 발육으로 이취가 발생하거나 가스가 생성되어 포장 이 팽창하는지를 조사하였다. 콜라겐 마스크 팩 시제품에 대한 품질 안정성 시험 결과를 표 24에 나타내었다. 콜라겐 마스크 팩에 대한 저장 안정성 시험을 3회에 걸쳐 실시한 결과 실온, 50℃, 40℃, 4℃, 순환 및 일광 조건에서 성상 변화, 화장성분 분리, 이취 및 가스발생 등이 발견되지 않아 본 연구에서 개발한 시제품의 품질안정성은 문제가 없는 것으로 나타났다.

표 23. 콜라겐 마스크 팩의 저장안정성 시험조건

시험조건	시험기간	시험 주기	조사항목
실온(R/T)	6주	1주일간 매일, 1주 경과 후 수시	성상, 분리, 이취, 가스
항온(50℃)	6주	1주일간 매일, 1주 경과 후 1회/주	성상, 분리, 이취, 가스
항온(40℃)	6주	1회/주	성상, 분리, 이취, 가스
항온(4℃)	6주	1회/주	성상, 분리, 이취, 가스
순환(cycle)	6주	1회/주	성상, 분리, 이취, 가스
일광	2주	1회/일	성상, 분리, 이취, 가스

표 24. 콜라겐 마스크 팩의 저장 안정성 시험 결과

저장조건	시험항목	1차시험	2차시험	3차시험
실온(R/T)	성상	○	○	○
	분리	○	○	○
	이취	○	○	○
	가스	○	○	○
항온(50℃)	성상	○	○	○
	분리	○	○	○
	이취	○	○	○
	가스	○	○	○
항온(40℃)	성상	○	○	○
	분리	○	○	○
	이취	○	○	○
	가스	○	○	○
항온(4℃)	성상	○	○	○
	분리	○	○	○
	이취	○	○	○
	가스	○	○	○
순환(cycle)	성상	○	○	○
	분리	○	○	○
	이취	○	○	○
	가스	○	○	○
일광	성상	○	○	○
	분리	○	○	○
	이취	○	○	○
	가스	○	○	○

○ : 양호, × : 불량

#### 4.2.4. 콜라겐 마스크 팩의 품질평가

콜라겐 마스크 팩의 품질평가 항목으로 내용물의 상태, 부착성, 흡수성, 사용 후 피부 상태, 보습력, 피부 유연감, 지속성, 향취강도, 피부 자극정도, 트러블 제어정도, 종합품질 등을 자체적으로 설정하여 10명의 평가요원이 관능적으로 평가한 결과를 표 25에 나타내었다.

표 25. 콜라겐 마스크 팩의 품질평가 결과

평 가 기 준	평가결과 (5 scale)
내용물의 상태 : 내용물을 얼굴에 붙일 때 유연성이나 색상 등의 상태	4.5
부착성 : 얼굴에 마스크 팩이 잘 부착되는 정도	4.5
흡수성 : 화장 성분이 피부에 걸돌지 않고 잘 흡수되는 정도	4.0
사용 후 피부 상태 : 산뜻함이나 끈적임이 느껴지는지 여부	4.0
보습력 : 사용 후 피부에서 느껴지는 촉촉함의 정도	4.5
피부 유연감 : 사용 후 피부에 느껴지는 부드러움이나 탄력감의 정도	4.5
지속성 : 사용 후 피부에서 보습이나 피부 유연감이 느껴지는 정도	4.5
향취강도 : 사용 시 향취의 강도 및 만족도	4.0
피부 자극 정도 : 사용 시 얼굴이 따끔거리거나 눈에 자극을 주는지 여부	4.0
트러블 제어정도 : 사용 후 트러블의 제어 또는 피부 청결도	4.0
종합품질 : 전체적인 제품의 만족도 및 기존의 유사제품과 품질비교	4.3

5 scale: 1, very poor; 2, poor; 3, acceptable; 4, good; 5, very good.

Values are mean for 10 experiments.

콜라겐 마스크 팩의 품질은 모든 평가항목에서 4.0(5 scale)이상의 점수를 얻었으며 종합적인 품질평가에서도 4.3(5 scale)로 평가되어 품질이 우수한 것으로 나타났으며 기존의 유사제품(식물성 콜라겐 마스크 팩)과의 비교에서도 뒤지지 않는 평가결과를 보였다.

### 4.3. 콜라겐 비누

#### 4.3.1. 비누화 조건

불가사리 콜라겐이 함유된 투명비누를 만들기 위하여 베이스오일의 종류를 선정하였다. 즉, 비누의 단단함, 세정력, 거품량, 거품의 안정성 등을 고려하여 코코넛 오일과 팜 오일을 선택하였으며 비누의 투명성을 높이기 위해 피마자 오일을 추가하였다. 베이스 오일의 배합비율은 수차례 실험을 통하여 팜 오일 16.0%, 코코넛 오일 16.0% 및 피마자 오일 10.6%로 결정하였으며 여기에 각각의 비누화 값 0.141, 0.190, 및 0.128을 적용하여 비누화에 필요한 각각의 수산화나트륨 양은 2.3%, 3.0%, 1.4%이었다(표 26). 따라서 본 시험에서 생산되는 비누의 양은 베이스 오일 42.6%에 수산화나트륨 6.7%를 합한 49.3%이었다.

표 26. 베이스 오일 및 수산화나트륨 사용량 산정

Base oil	사용량(%)	비누화 값	NaOH 사용량(%)
Palm oil	16.0	0.141	2.3
Coconut oil	16.0	0.190	3.0
Castor oil	10.6	0.128	1.4
Total	42.6		6.7

#### 4.3.2. 기타 재료배합 비율

콜라겐 비누의 재료배합비율을 표 27에 나타내었다. 즉, 기타 재료의 배합 비율을 결정하기 위하여 총 용제(에탄올+증류수+글리세린)의 양을 결정하였다. 총 용제의 양은 앞의 실험에서 결정된 비누 양(49.3%)에 45/55를 곱한 40.3%로 하였으며 설탕 양은 비누와 용제를 합한 값의 8%로 계산하였다. 그리고 가성소다 녹일 물은 오일 양의 33%, 에탄올은 순 비누의 30%, 글리세린은 전체 비누의 9%, 설탕 녹일 물은 총 용제 양에서 가성소다 녹일 물, 에탄올, 글리세린의 양을 제한 값으로 결정하였다.

표 27. 콜라겐 비누의 재료배합비율

No	재 료 명	함량(%)
1	Palm oil	16.0
2	Coconut oil	16.0
3	Castor oil	10.6
4	NaOH	6.7
5	Distilled water for NaOH	14.0
6	Ethanol	14.8
7	Glycerin	8.7
8	Sugar	7.1
9	Distilled water for sugar	2.7
10	Star fish collagen	3.0
11	Vitamin E	0.3
12	Pigment & aromatic essence	0.1
	Total	100.0



### 4.3.3 제조공정 Lay out

콜라겐 비누의 제조공정은 비누화, 가열, 용해, 여과, 부재료 첨가, 성형, 포장 등의 공정으로 이루어진다. 비누화 탱크에 베이스 오일(Palm oil 16.0%+Coconut oil 16.0%+Castor oil 10.6%)을 넣고 가열하여 녹이고 여기에 온도 60℃의 수산화나트륨용액(NaOH 6.7%+DW 14.0%)넣고 20분간 교반한 다음 하여 뚜껑을 덮고 교반하면서 90분간 중탕에서 가열 한다. 이것에 75℃에서 글리세린(8.7%), 에탄올(14.8%) 및 설탕용액(설탕 7.1%+DW 2.7%)을 가하여 용해시킨 다음 여과하여 불용성 비누를 제거한다. 마지막으로 불가사리 콜라겐(3.0%), 비타민 E(0.3%) 색소 및 향료(0.1%)를 가한 후 압출, 타형 및 컷팅 작업을 통하여 성형한 다음 비닐 랩으로 포장하여 제품으로 한다(그림 19).

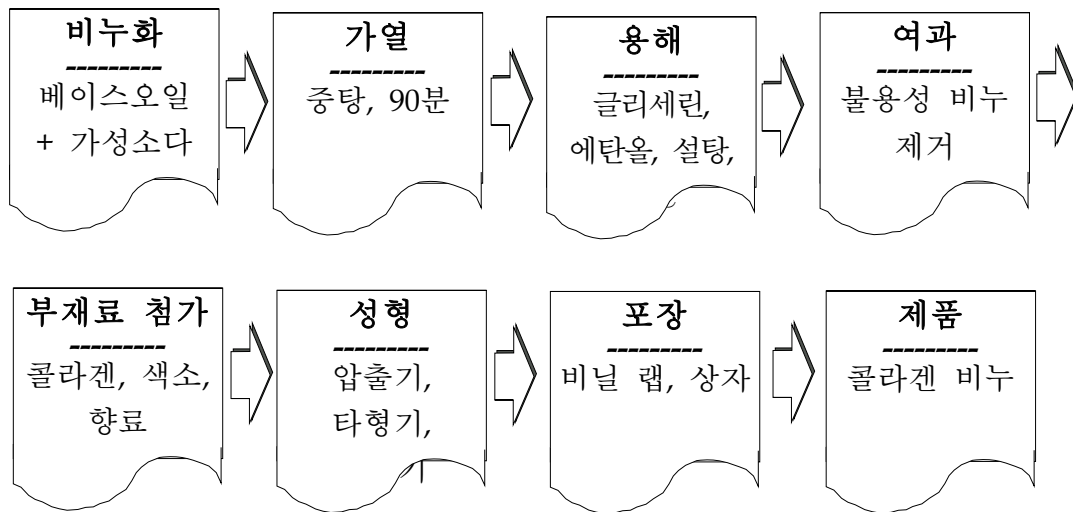


그림 19. 콜라겐 비누의 제조공정도.



그림 20. 콜라겐 비누 시제품.

#### 4.3.4. 콜라겐 비누의 품질 평가

콜라겐 비누의 품질평가 항목으로 색상 및 투명도, 향취강도, 세정력, 거품, 단단함, 사용 후 피부 상태, 보습력, 피부 유연감, 지속성, 피부자극정도, 트러블 제어정도, 종합품질 등을 자체적으로 설정하여 10명의 평가요원이 관능적으로 평가한 결과를 표 28에 나타내었다. 콜라겐 비누의 품질은 세정력과 단단함을 제외한 모든 평가항목에서 4.0(5 scale)이상의 점수를 얻었으며 종합적인 품질평가에서도 4.0(5 scale)로 평가되어 품질이 양호한 것으로 나타났으며 기존의 유사제품과의 비교에서도 뒤지지 않는 평가결과를 보였다. 다만, 투명비누의 특성상 사용 후 강도 약화 및 세정력 부족 등의 단점이 있으나 금후 다양한 실험을 통해서 더욱 개선될 수 있을 것으로 사료된다.

**표 28. 콜라겐 비누의 품질평가 결과**

평 가 기 준	평가결과 (5 scale)
색상 및 투명도 : 비누의 채색 적정성 및 투명도	4.5
향취강도 : 사용 시 향취의 강도 및 만족도	4.5
세정력 : 비누 사용 후 오물 세척의 정도	3.5
거품 : 거품의 생성량 및 거품의 안정성	4.0
단단함 : 비누가 사용 후 물러지는 정도	3.0
사용 후 피부 상태 : 산뜻함이나 끈적임이 느껴지는지 여부	4.0
보습력 : 사용 후 피부에서 느껴지는 촉촉함의 정도	4.5
피부 유연감 : 사용 후 피부에 느껴지는 부드러움이나 탄력감의 정도	4.0
지속성 : 사용 후 피부에서 보습이나 피부 유연감이 느껴지는 정도	4.0
피부 자극정도 : 사용 시 피부가 따끔거리거나 눈에 자극을 주는지 여부	4.0
트러블 제어정도 : 사용 후 트러블의 제어 또는 피부 청결도	4.0
종합품질 : 전체적인 제품의 만족도 및 기존의 유사제품과 품질비교	4.0

5 scale: 1, very poor; 2, poor; 3, acceptable; 4, good; 5, very good.

Values are mean for 10 experiments.

## 5. 불가사리 콜라겐의 생화학적 기능성

### 5.1. 항고혈압성

불가사리 콜라겐을 pretnase NP가수분해한 다음 에탄올 농도별로 추출하여 angiotensin I 전환효소(ACE) 활성을 측정 결과를 표 29에 나타내었다. 효소가수분해한 불가사리 콜라겐의 ACE활성(IC<sub>50</sub>)은 0.912 mg protein/ml이었으나 50% 에탄올 추출획분의 경우 0.601 mg protein/ml로 활성이 증가하였다.

표 29. 불가사리 콜라겐 효소 가수분해물의 ACE활성

Solvent	Protein-g(Yield)	IC <sub>50</sub> (mg protein/ml)
Unfractionated	3.25(100%)	0.912
Ethanol 10%	1.89(58%)	1.583
Ethanol 25%	1.69(52%)	0.842
Ethanol 50%	1.50(46%)	0.601
Ethanol 80%	0.89(27%)	0.759

## 5.2. Free radical 억제율

불가사리 콜라겐과 기존 free radical 억제물질로 알려진 vitamin C 등의 free radical 억제율을 표 30에 나타내었다. 불가사리 콜라겐의 free radical 억제율을 10.0~33.5%로 vitamin C의 61.0~76.8%보다는 낮은 수준이었으나 bovine collagen의 7.9~31.5%보다는 다소 높은 수준을 나타내었다. 그리고 free radical 억제율은 모든 시료가 농도 의존적으로 증가하였다.

표 30. 불가사리 콜라겐의 free radical 억제율(%)

Concentration(%)	0.15	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0
Arbutin	60.5	63.5	69.1	69.3	69.3	70.5	70.9	70.9	71.4	72.0	73.2
Bovine collagen	7.9	9.4	15.0	17.9	20.6	20.6	24.1	27.9	30.0	30.0	31.5
Chondroitin	23.5	25.3	27.4	28.5	28.5	29.7	30.3	30.9	32.1	33.5	39.1
Starfish collagen	10.0	10.0	17.9	18.5	21.2	22.9	25.3	27.6	29.7	30.6	33.5
Vitamin C	61.0	62.3	65.5	66.0	66.4	67.3	71.8	72.3	74.7	75.9	76.8

### 5.3. 항산화효과

불가사리 콜라겐과 기존 항산화물질로 알려진 vitamin C 등의 항산화 효과를 표 31에 나타내었다. 불가사리 콜라겐의 항산화 효과는 4.7%로 vitamin C의 8.4%보다는 낮은 수준이었으나 bovine collagen의 3.9%보다는 다소 높은 수준을 나타내었다.

표 31. 불가사리 콜라겐의 항산화 효과

	Arbutin	Vitamin C	Chondroitin	Bovine collagen	Starfish collagen
항산화효과(%)	7.8	8.4	5.4	3.9	4.7

### 5.4. 항균성 및 항곰팡이성

Radial diffusion assay법을 이용하여 그람양성균인 *S. aureus* KCTC 1916과 그람음성균인 *E. coli* D 31에 대해 atelocollagen과 collagen peptide을 사용하여 항균활성을 측정하였다 (표 32). Atelocollagen 및 collagen peptide을 각각 100 mg, 200 mg 및 300 mg을 사용하였다. 그 결과, collagen peptide의 경우 *E. coli* D 31에 대해서는 4~8 mm 범위에서 항균반응을 나타내었지만, 그람양성균인 *S. aureus* KCTC 1916에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았으며, atelocollagen의 경우에는 *S. aureus* KCTC 1916 및 *E. coli* D 31에 대한 항균활성이 검출되지 않았다. 그리고 저농도인 0.78 ug/ml~200 ug/ml의 농도에서도 *S. aureus* KCTC 1916 및 *E. coli* D 31 대한 항균반응이 나타나지 않았다.

표 32. 불가사리 콜라겐의 항균활성

Concentration (ug/ml)	Atelocollagen from starfish		Collagen peptide from starfish	
	<i>E.coli</i> D31	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i> D31	<i>S.aureus</i>
300000	-	-	8	-
200000	-	-	7	-
100000	-	-	5	-
200	-	-	-	-
100	-	-	-	-
50	-	-	-	-
25	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-
3.13	-	-	-	-
1.56	-	-	-	-
0.78	-	-	-	-

표 33는 *Candida albicans*에 대한 atelocollagen 및 collagen peptide의 항곰팡이 활성을 나타낸 것이다. 사용한 두 샘플의 양은 각각 0.78~200 ug/ml을 사용하였다. 표 28에 나타내는 바와 같이 collagen peptide는 저농도인 0.78 ug/ml에서도 항곰팡이 활성을 나타내었으나 atelocollagen의 경우에는 고농도에서도 활성을 나타내지 않았다. Collagen peptide의 경우 세균에 대해서는 저농도에서 항균반응을 나타내지 않았지만 곰팡이에 대해 활성을 나타내는 것으로 보아 수분을 함유하고 있는 화장품에 첨가제로서 뿐만 아니라 항곰팡이제로서의 사용도 가능하리라 생각된다.

표 33. 불가사리 콜라겐의 항곰팡이 활성

Concentration (ug/ml)	<i>C. albicans</i>			
	Aterocollagen from starfish		Collagen peptide from starfish	
	24hrs	48hrs	24hrs	48hrs
200	-	-	+	+
100	-	-	+	+
50	-	-	+	+
25	-	-	+	+
12.5	-	-	+	+
6.25	-	-	+	+
3.13	-	-	+	+
1.56	-	-	+	+
0.78	-	-	+	+

### 5.5. 면역활성

불가사리로부터 추출한 atelocollagen 및 collagen peptide의 면역활성 측정 결과를 그림 21에 나타내었다. Aterocollagen 및 collagen peptide를 50, 100 및 200 $\mu$ g의 농도로 킬라피아의 phagocytes에 투여하여 배양시킨 결과, atelocollagen 및 collagen peptide 모두 면역반응에 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 따라서 불가사리 콜라겐을 식품 및 화장품에 적용하더라도 체내 이물질 면역반응에 의한 allergy 발생 등이 없을 것으로 사료된다. 또한, 전년도 연구결과 불가사리 콜라겐은 포유류의 콜라겐에서 발견되는 I type 콜라겐과 거의 유사하여 식품 및 화장품에 적용하기에 큰 문제점이 없을 것으로 판단된다.



그림 21. 텔라피아 phagocytes에서 불가사리 콜라겐의 PMA 저해활성.

#### 5.6. 보습성

불가사리로부터 추출한 atelocollagen과 collagen peptide, glycerin 및 증류수를 피부에 처리한 다음 시간별로 보습력의 변화를 비교하였다(표 34). 시료 처리 10분 경과 후 보습력은 glycerin 3% 용액이 63.6%, atelocollagen 3% 용액이 51.3%, collagen peptide 3%용액이 43.2%, 증류수가 39.2%이었으나 120분 경과 후에는 glycerin 3% 용액이 40.3%, atelocollagen 3% 용액이 35.6%, collagen peptide 3%용액이 31.9%, 증류수 0.2%이었다.



**표 34. 불가사리 콜라겐의 보습력(%)**

	Time(min)				
	10	20	30	60	120
Distilled water	39.2	18.3	2.2	0.8	0.2
Glycerin 3% solution	63.6	52.7	47.37	45.5	40.3
Atelocollagen 3% solution	51.3	48.0	40.8	3	35.6
Collagen peptide 3% solution	43.2	40.5	38.1	35.8	31.9

## 5.7. 미백효과

### 5.7.1. Tyrosinase 활성저해

불가사리 콜라겐과 vitamin C 등의 tyrosinase활성 저해율을 표 35에 나타내었다. 불가사리 콜라겐의 tyrosinase활성 저해율 2.7~22.67%로 vitamin C의 18.2~70.0%보다는 낮은 수준이었으나 bovine collagen의 2.0~20.8%보다는 다소 높은 수준을 나타내었다. 그리고 시료액의 농도가 높을수록 저해율이 높게 나타났다.

**표 35. 불가사리 콜라겐의 Tyrosinase 활성 저해율**

Concentration(%)	3	1	0.5	0.05	0.005	0.0005
Arbutin	54.9	52.8	47.7	45.3	25.4	14.7
Vitamin C	70.0	68.2	55.6	19.7	19.0	18.2
Chondroitin	43.1	22.1	18.9	13.6	11.8	10.9
Bovine collagen	20.8	14.7	13.7	9.4	9.1	2.0
Starfish collagen	22.6	15.0	13.6	11.6	10.9	2.7

### 5.7.2. Melanin 생성량

불가사리 콜라겐의 melanin 생성 저해 효과를 기존에 효과가 입증된 vitamin C 등의 물질과 비교하였다(표 36). 즉 대조구의 melanin 생성량이 0.041 g/10<sup>6</sup>cells인 것에 비하여 불가사리 콜라겐을 첨가한 시험구는 0.032 g/10<sup>6</sup>cells로 melanin 생성량이 낮아지는 효과가 있었다. 그리고 arbutin이 0.016 g/10<sup>6</sup>cells, vitamin C가 0.013 g/10<sup>6</sup>cells, bovine collagen이 0.039 g/10<sup>6</sup>cells이었다.

표 36. 불가사리 콜라겐의 melanin 생성 저해 효과

	Control	Arbutin	Vitamin C	Bovine collagen	Starfish collagen
Melanin (g/10 <sup>6</sup> cells)	0.041	0.016	0.013	0.039	0.032

### 5.8. 자외선 차단능

불가사리 콜라겐과 기존 자외선흡수물질 알려진 알부틴 등의 자외선 흡수 효과를 그림 22에 나타내었다. 자외선 영역(200~400 nm) 중 특히 피부에 가장 크게 손상을 주는 파장 범위인 Dorno선(280~320 nm) 부근의 흡수도를 살펴보면, 불가사리 콜라겐의 경우, arbutin이나 vitamin C보다 자외선 흡수 수준 낮았으나 bovine collagen보다는 보다는 다소 높은 수준을 나타내었다. 따라서 불가사리 콜라겐을 화장품의 원료로 사용할 경우, 다소의 자외선 차단 효과도 기대가 된다.

그림 22. 불가사리 콜라겐의 자외선 흡수 스펙트럼.

## 6. 불가사리 콜라겐의 안전성

### 6.1. 유해성 분석

#### 6.1.1. 중금속

현행, 화장품의 중금속 허용기준치는 납이 메이크업용 제품류, 눈 화장용 제품류, 샴푸, 린스 및 헤어스프레이에 대하여 20 ppm이하이어야 하고, 비소가 메이크업용 제품류, 눈 화장용 제품류, 헤어스프레이에 대하여 10 ppm(단, 샴푸 및 린스는 5 ppm이하)이하이어야 하며 수은이 기초 화장품용 제품류 및 어린 이용 제품류 중 크림에 대하여 1 ppm이하이어야 한다고 규정되어 있다. 따라서 불가사리 콜라겐(atelocollagen, collagen peptide)의 납, 비소, 수은 등 중금속 함량을 화장품 원료지정과 기준 및 시험방법 등에 관한 규정(식품의약품안전청 고시 제 2003-23호)의 방법으로 분석한 결과 전항목이 검출되지 않았다.

### 6.1.2. 미생물

불가사리 콜라겐(atelocollagen, collagen peptide)을 대상으로 일반세균, 대장균군, 녹농균, 황색포도상구균 및 살모넬라균 수 등 미생물의 오염도를 측정 (식품의약품안전청 고시 제1998-28호)한 결과 모든 시험구에서 미생물이 검출되지 않았다.

## 6.2. In vivo 독성시험

### 6.2.1. 경구독성

불가사리 콜라겐(atelocollagen, collagen peptide)을 ICR계 웅성 랫드(체중 250~300g) 에 체중 1 kg당 2,000 ml까지 투여한 다음 독성증상의 종류, 정도, 발현, 추이 및 가역성을 14일간 관찰한 결과 정상적인 소견을 보여 급성독성이 없는 것으로 나타났다.

### 6.2.2. 피부독성

백색토끼를 대상으로 불가사리 콜라겐(atelocollagen, collagen peptide)의 피부독성을 육안으로 관찰한 결과 72시간까지 홍반 및 부종이 전혀 발견되지 않아 피부독성이 없는 것으로 평가되었다.

## 6.3. 임상시험

불가사리 콜라겐(atelocollagen, collagen peptide)을 이용하여 신체 건강한 성인남녀 각 15명을 대상으로 인체접포시험(Finn Chambers on Scanpor Ø 8mm, Epitest Ltd Oy제)을 실시한 결과 시험참가자 모두가 홍반 및 부종이 전혀 발견되지 않아 인체에 대한 피부독성이 없는 것으로 평가되었다.

## 7. 산업화 적용시험

### 7.1. 대량생산 시스템 설계

#### 7.1.1. 전처리 및 가수분해탱크

불가사리 체벽을 전처리하여 효소 가수분해하기 위한 장치를 그림 23에 나타내었다. 내장을 제거한 불가사리 체벽 일정량을 장치에 넣고 1.5% 수산화칼슘용액 10배량을 가한다음 5℃에서 진탕기를 가동하면서 24시간동안 처리한 후 충분한량의 정제수를 가하여 pH가 중성이 될 때까지 세척한다. 이것에 다시 5배량의 정제수를 가한다음 pH 3.0이 될 때까지 유기산을 첨가하여 온도를 10℃로 조절하고 단백질분해효소를 가하여 24시간동안 가수분해한다. 단 collagen peptide의 경우에는 단백질분해효소의 최적온도에서 3~5시간동안 가수분해한다.

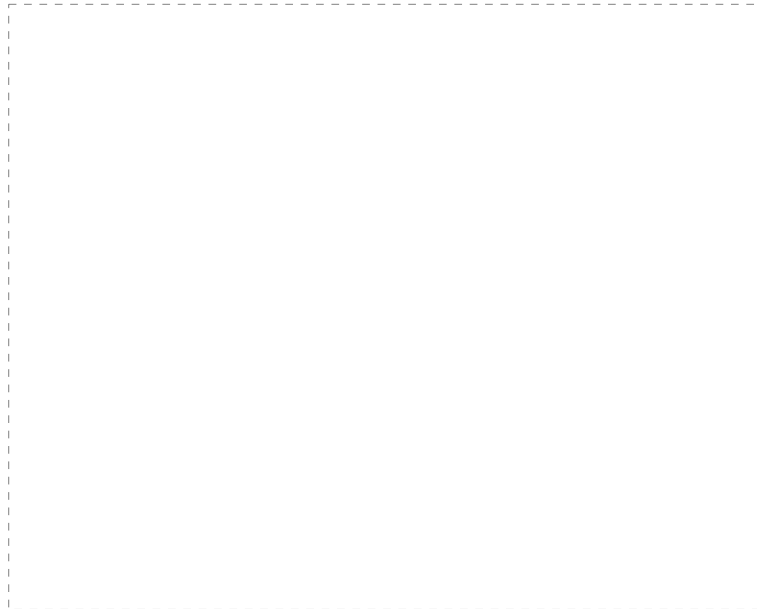


그림 23. 불가사리 콜라겐 생산을 위한 전처리 및 효소가수분해 탱크.

### 7.1.2. 원심분리기

효소 가수분해액을 연속적으로 원심분리하기 위한 장치를 그림 24에 나타내었다. 효소 가수분해액을 연속적으로 공급하면서 원심력  $600\times g$ 로 원심분리하면 골편 등 고형물은 원심분리통의 외벽에 부착되고 액체는 내측에 위치하게 되며 이것을 흡입하는 방식으로 액체를 분리한다. 원심분리통에 일정량의 고형분이 부착되면 원심분리기를 정지하고 고형물을 수동으로 제거한다. 이때 원심분리기의 과도한 사용으로 온도가 상승할 경우 콜라겐 용액이 열에 의한 변성을 일으켜 품질을 손상시킬 우려가 있으므로 주의해야 한다.

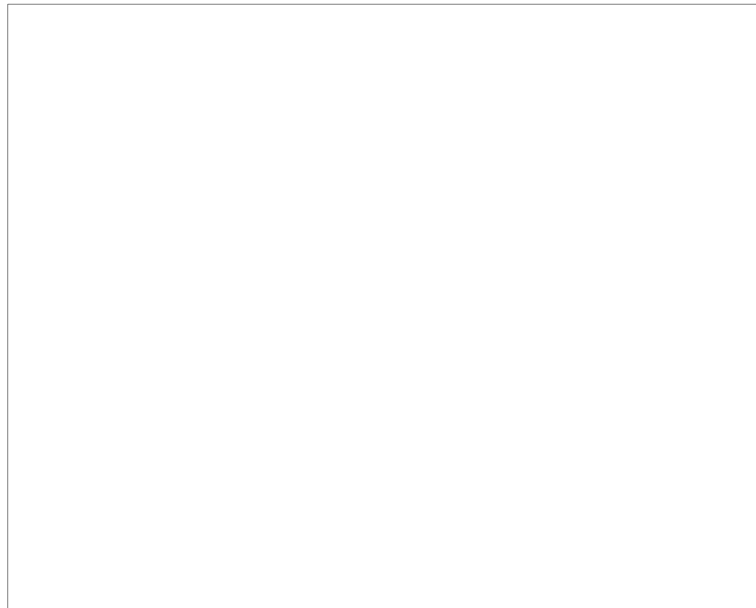


그림 24. 불가사리 콜라겐 생산을 위한 원심분리기.

### 7.1.3. 투석장치

염석한 콜라겐 용액의 탈염 및 농축을 위한 한외여과장치를 그림 25에 나타내었다. 한외여과장치(UF)의 중공사막은 기공(Pore Size)이  $0.001\ \mu\text{m}$ 인 vessel type으로서 5개를 사용하였다. 콜라겐용액이 펌프에 의해  $4\sim 6\ \text{kg}/\text{cm}^2$ 의 압력으로 한외여과장치에 이송되면 물, NaCl 등 저분자물질이 한외여과막을 통과하여 장치 밖으로 배출되고 콜라겐은 다시 탱크로 회수되는 과정을 통하여 콜라겐용액이 탈염 및 농축된다.

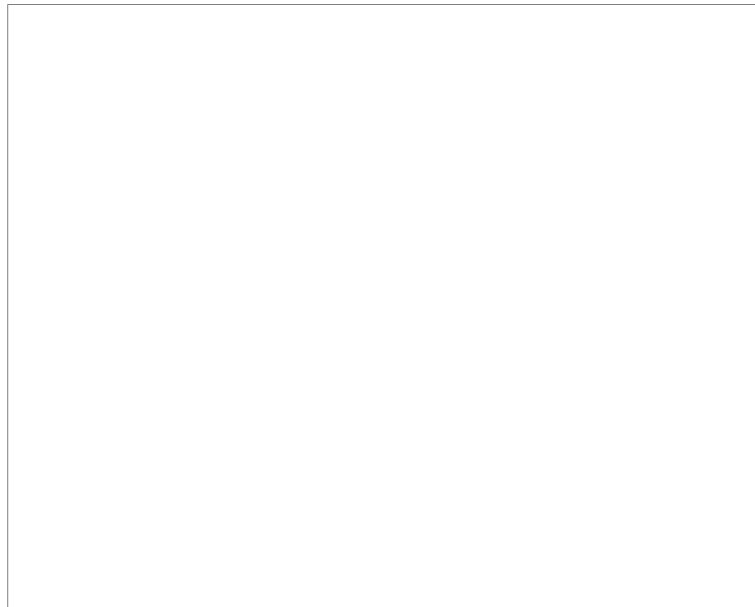


그림 25. 불가사리 콜라겐 생산을 위한 한외여과 장치.

#### 7.1.4. 활성탄 정제장치

콜라겐용액의 탈색 및 탈취를 위한 활성탄 정제장치를 그림 26에 나타내었다. 활성탄은 입자크기 0.5~1.5 mm, 비중 0.45~0.55, 경도 90이상, 요드가 950~1100, MB탈색력 120~200인 것을 사용한다. 정제장치의 규격은 지름 500 mm, 높이 1,520 mm, 인입관경 1.5 inch, 인출관경 1.0 inch, 활성탄 113리터, 압력 0.2 kg/cm<sup>2</sup>를 사용할 경우 2.3 m<sup>3</sup>/hr의 콜라겐용액 정제가 가능하다.

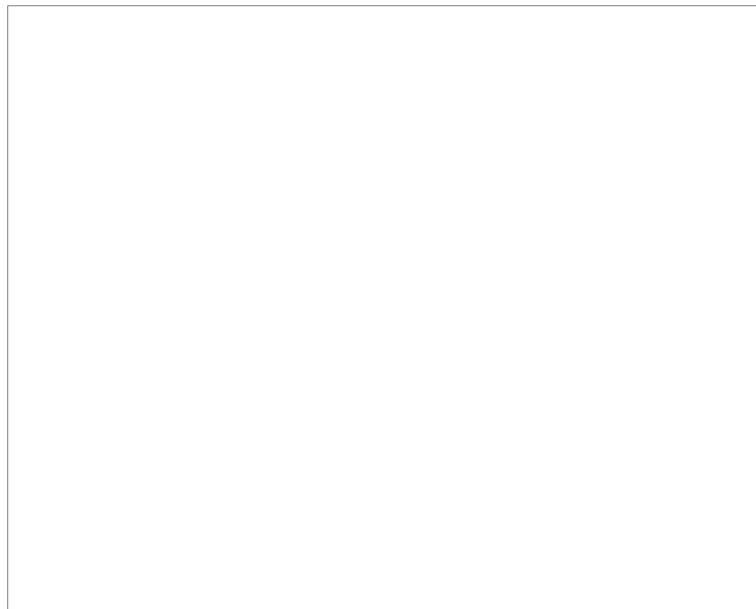


그림 26 불가사리 콜라겐 생산을 위한 활성탄 정제장치.



### 7.1.5. 자외선 살균장치

불가사리 콜라겐 용액의 살균을 위한 자외선살균장치를 그림 27에 나타내었다. 자외선살균기는 상온에서 소독제 등 첨가물을 가하지 않고 단시간에 살균이 가능하기 때문에 콜라겐의 살균에 적합하다. 콜라겐용액을 연속적으로 살균하기 위해서는 관로형이 적합하며 직경 188 mm, 길이 860 mm, 자외선등 2.5 kw의 경우 투과율 40%의 용액을 96 m<sup>3</sup>/day 처리할 수 있다.

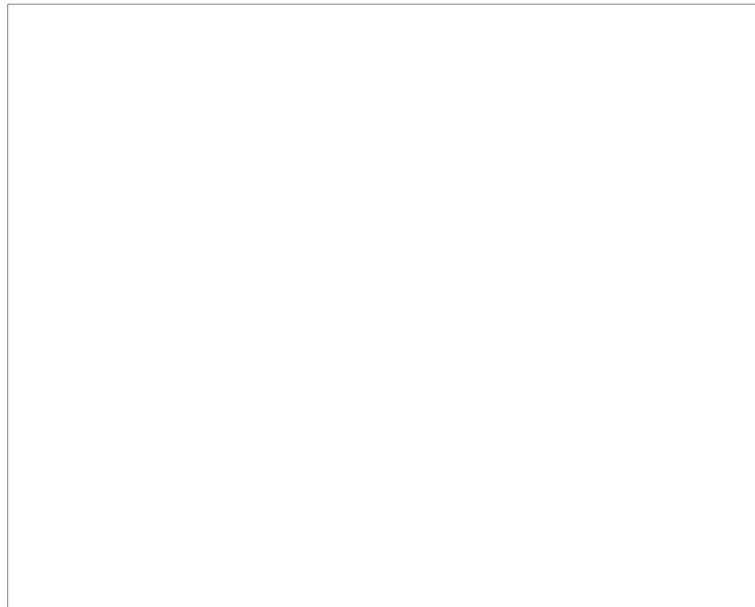


그림 27. 불가사리 콜라겐 생산을 위한 자외선 살균장치.

## 7.2. 생산성 향상 시험

### 7.2.1. 불가사리 콜라겐의 산업화 자료

불가사리 collagen peptide를 산업적으로 생산하기 위해 필요한 산업품질규격, 산업안전기준, 인체안전성 규격을 표 37~39에 나타내었다.

표 37. 불가사리 콜라겐펩타이드의 산업품질규격

<b>TECHNICAL FILES</b>	
<b>SF-Collagen peptide - concentration 3.0%</b>	
<b>DEFINITION</b>	
Water soluble starfish collagen with a minimum concentration of 3.0%.	
<b>COMPOSITION</b>	
(*)Dry matter	: between 3.1 and 5.0%
(*)Mineral matter	: less than or equal to 0.1%
(*)Total proteins	: between 3.0 and 4.0%
(*)Collagen	: between 3.0 and 4.0%
(*)Methylparaben (conserving agent)	: between 0.1 and 0.15%
<b>CHARACTERISATION OF THE COLLAGEN</b>	
This protein is made up of 18 amino acids of which two are characteristic: hydroxyproline and hydroxylysine. Glycine represents approximately 1/3 of all the amino acids.	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Chemical characterisation</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>(*)Nitrogen: nitrogen content is over 0.48% i.e. a protein rate of over 3.0%</li> <li>(*)Hydroxyproline : hydroxyproline content is over 0.18% i.e. a collagenic substance content of over 3.0%</li> </ul> </li> <li>• <b>Physio-chemical characterisation</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▷ The thermal stability of the molecule has been controlled by Differential Scanned Programmed Calorimetry. Start of denaturation : at a temperature &gt;100°C</li> <li>▷ (*) Analysis of the mass spectrometer : In all cases, non of the subunits have a mass of under 5,000 Daltons.</li> </ul> </li> </ul>	

### **CHARACTERISTICS OF THE SOLUTION**

- ▷ (\*)pH: 5.0 TO 7.0
- ▷ Aspect: viscous liquid
- ▷ Odour: slight, characteristic of amino acid in solution.
- ▷ Colour: opalescent, tending to yellow with age.
- ▷ (\*)Bacteriology: number of aerobic germs  $\leq$  100/ml absence of pathogenic germs(these controls were carried out without diluting the solution)

### **CONSERVATION**

Conservation is guaranteed for 1 year after the production date in a 10 to 20°C temperature interval in the original hermetically sealed packaging.

### **UTILIZATION**

This product should never be heated to over 100°C during preparation. It cannot be used with some denaturing agents such as: calcium chloride, organic solvents....

### **CONDITIONNEMENT**

Glass vial, sterilized in an autoclave or translucent polyethylene container with tamper-proof cap.

Net weight of product : 1 kg in glass vial or  
5 kg in plastic container.

Outer packaging : carton of 10 × 1 kg or  
carton of 2 × 5 kg

### **REGISTRATIONS**

INCI denomination : Collagen.

TRADE NAME : SF Collagen

**Note** : Some doses and some characteristics are given here for information purposes only. Routinely, the dosages of each batch are those shown above with an asterisk(\*).

표 38. 불가사리 콜라겐펩타이드의 산업안전 기준

<b>SAFETY FILE</b>	
<b>Amaranth Cosmetics</b> 1534-2, Sonjung-dong, Kangseo-go, Busan, Korea	<b>SPECIFIC RISKS</b> NONE
<b>1 IDENTIFICATION</b> 1.1 Commercial designation : 1.2 Supplier - Manufacture: - Seller:  1.3 Application(for further details, check the technical file)	<b>SF COLLAGEN</b> <b>Amaranth Cosmetics</b> see seal above Fax : 051-832-2332 Telephone : 051-832-2084 <b>RAW MATERIAL FOR COSMETICS</b>
<b>2 CHEMISTRY OF THE PRODUCT</b> · Preparation : dangerous ingredients: · Dangerous impurities:	<b>SUBSTANCE : Native marine collagen</b> None None
<b>3 PHYSICAL PROPERTIES</b> 3.1 Physical state : 3.2 Characteristic temperatures: 3.3 Solubility: 3.4 pH: 3.5 Steam pressure: - 3.6 Density: 3.7 Other data: -	White to pale yellow liquid. characteristic odour. $T_E = 100^\circ\text{C}$ Water soluble 3.5 to 4.5 >1
<b>4 STORAGE AND HANDLING</b> 4.1 Precautions to be taken for storage and handling:  4.2 Type of packaging material recommended: 4.3 Product reacts dangerously with: 4.4 Dangerous biproducts following decomposition: 4.5 Individual preventive measures: 4.6 Special safety precautions: 4.7 Precautions following leakage or accidental spillage: 4.8 Other recommendations:	Storage temperature should be in the 10 to 20°C range This product should not be frozen  Polyethylene, glass Nothing None - - Rinse out with water -

<p><b>5 INFLAMMATION AND EXPLOSION</b></p> <p>5.1 Flash point: 5.2 Spontaneous ignition T°: 5.3 Specific dangers relating to fire or explosion: 5.4 Fire fighting methods 5.5 Specific preventive measures for fire fighting: 5.6 Other recommendation:</p>	<p>- - recommended : sprayed water not recommended : Nothing - -</p>
<p><b>6 TOXICOLOGICAL INFORMATION</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Non irritant for the eyes</li> <li>• Non irritant for the skin</li> <li>• Non toxic when swallowed up to a concentration of 2g/kg of body weight.</li> <li>• Hypoallergenic</li> </ul>
<p><b>7 FIRST AIDS</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rinse with water if the product comes into contact with the skin, eyes or mucous membranes</li> <li>• If large quantities are swallowed, induce vomiting.</li> </ul>
<p><b>8 ENVIRONMENTAL PROTECTION</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Totally biodegradable natural protein</li> </ul>
<p><b>9 SPECIFIC PRECAUTION</b></p>	
<p>This document is correct for product in GOOD CONDITION and in conformity with product specifications. In blends and mixtures, check that no new hazard can occur, and contact <b>Amaranth Cosmetics</b>.</p> <p>This fact sheet is an addition to the instruction notice but do not replace it. All informations contained herein is based on our current awareness of the product concerned on the first August 2005 and is given in good faith.</p>	
<p><b>SF COLLAGEN AUGUST 2005</b></p>	

표 39. 불가사리 콜라겐펩타이드의 인체 안전성 규격

TOXICOLOGICAL DATA
<p><b>ORAL TOXICITY</b>  The protocol is in conformity with OECD guidelines concerning the study of acute oral toxicity(N° 401 dated the 24th February 1987).  Tests were carried out using maximum doses of 2 grammes per kilogramme of body weight and induced no macroscopic lesion which could be traced to a toxic effect of the product.  <b>SF COLLAGEN</b> used orally in a dose of under 2g/kg have NO TOXICITY whatsoever.</p> <p><b>OCULAR IRRITATION</b>  This test was carried out using the official method defined by the regulation dates the 3rd May 1990(published in the official gazette of the French Republic on the 14th November 1990).  Tests carried out with the product induced no lesion of the iris or of the cornea whatsoever and only a slight lacrimal increase which was rapidly reversible was observed.  The highest average ocular irritation index is retained as the allocated ocular irritation index. For NEPTIGENE: IOMa = 3.  Pure instillations of <b>SF COLLAGEN</b> is observed to be non irritant and ocular tolerance can be considered to be EXTREMELY GOOD.</p> <p><b>CUTANEOUS IRRITATION</b>  This test was carried out using the official method defined by the regulation dates the 1st February 1982(published in the official gazette of the French Republic on the 21st February 1982).  Tests were carried out using pure product and no irritation was observed.(IPc=0.0)  Pure instillations of <b>SF COLLAGEN</b> caused no irritation and cutaneous tolerance can therefore be considered as EXCELLENT.</p> <p><b>INVESTIGATION OF ALLERGY PHENOMENA</b>  A suitable protocol to test maximum allergic reaction based on the method described by MAGNUSSON and KLIGMAN test(J.INVEST.DERM. 1969,52, 268-276) was used.  <b>SF COLLAGEN</b> induced no macroscopic reaction symptomatic of allergic reaction. They can therefore be considered as HYPOALLERGENIC.</p>

### 7.2.2. 불가사리콜라겐의 경제성 분석

불가사리 콜라겐의 경제성을 분석하여 표 40에 나타내었다. 농도 3%의 콜라겐 펩타이드 용액의 경우 kg당 생산단가를 100으로 기준 할 때 재료비 71.4%, 노무비 14.3%, 경비 4.3%, 유통비 7.1%, 홍보비 2.9%이었으며 kg당 수익률은 142.9%로 비교적 높게 나타나 경제성이 우수한 것으로 조사되었다. 반면 atelocollagen의 경우에는 수익률이 111.1%로 비교적 낮은 편이었는데 이는 atelocollagen의 제조공정이 복잡하고 제품수율이 3%내외로 낮은데 원인이 있는 것으로 분석되었다.

표 40. 불가사리 콜라겐의 경제성 분석 결과

구 분		Atelocollagen (동결건조)		Collagen peptide 3%용액	
		금액(원)	비율(%)	금액(원)	비율(%)
kg당 생산원가(원)	재료비	1,087,200	60.4	25,000	71.4
	노무비	300,600	16.7	5,000	14.3
	경비	268,200	14.9	1,500	4.3
	소계	1,656,000	92.0	31,500	90.0
kg당 간접경비(원)	유통비	99,000	5.5	2,500	7.1
	홍보비	45,000	2.5	1,000	2.9
	소계	144,000	8.0	3,500	10.0
kg당 생산단가(A)		1,800,000	100	35,000	100.0
판매가(B)		2,000,000		50,000	
손익계산(B-A)		200,000		15,000	
수익률(B/A)		111.1%		142.9%	

## 8. 관련법규 개정

불가사리 콜라겐을 화장품의 원료로 사용하기 위해서는 화장품법 제4조제3항, 제9조 및 제13조제6호의 규정에 합당하여야 한다. 따라서 불가사리 콜라겐을 국제화장품원료집(International Cosmetic Ingredient Dictionary)에 등재를 추진하였으며 그 결과 2004년 11월 9일에 "Assigned INCI Name : Collagen, Tradename : SF Collagen, CTFA File No. 8740"으로 등재를 완료하였으며 본 내용은 2006년에 발행될 ICID(제11판)에 수재될 예정이라는 통보를 받았다.



그림 28. CTFA 승인 문서 사본.

우리나라의 식품위생법에 따르면, 일반적으로 식품은 사람이 섭취할 수 있는 물질 중에서 의약효능을 목적으로 섭취하는 것을 제외한 모든 식물체를 대상으로 한다고 되어 있다. 그러므로 이러한 식품을 만드는 원료로 사용되는 동·식물 등의 각종 식품재료 중에서 식품첨가물로 사용되는 물질을 제외한 재료를



광의의 범위에서 식품원료 라고 정의할 수 있으며 관련법에 의해 개별적으로 지정하고 있다. 따라서 식품의 원료로 지정되어있지 않은 불가사리를 이용하여 식품을 제조하기 위해서는 불가사리를 신규 식품원료로 등재해야한다. 현재 본 과제에의 연구결과를 종합하여 불가사리를 식품의 원료로 등재하기위한 절차를 추진 중에 있다.

### 9. 산업재산권 확보

불가사리 콜라겐의 산업적 이용기술과 관련된 내용을 특허로 출원(출원번호 10-2005-0047528호, 2005. 6. 3)하였으며 그 주요내용은 다음과 같다.

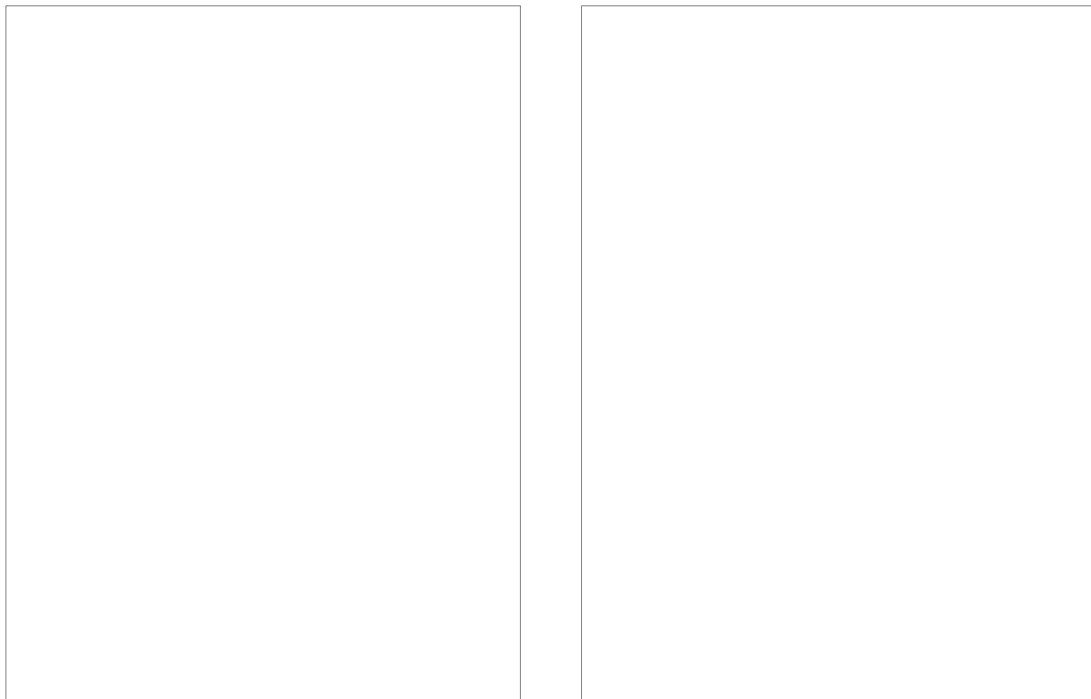


그림 29. 불가사리 콜라겐 특허출원서 사본.

본 발명은 수산 양식장의 해적생물이며 해양생태계 파괴의 주범으로 알려진 불가사리로부터 아텔로콜라겐(atelocollagen), 수용성 저분자 콜라겐 펩티드(collagen peptide) 및 산가용성 저분자 콜라겐 펩티드를 제조하는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 불가사리 껍질에 알칼리를 처리하여 비 콜라겐 성분을 제거하는 방법으로 콜라겐섬유를 제조하고 주석산 또는 구연산을 이용하여 pH를 산성으로 조절한 다음 저온에서 산성프로테아제로 가수분해한 후 염석, 투석, 살균 과정을 거쳐서 아텔로콜라겐을 제조하는 방법과 저온에서 중성프로테아제를 이용하여 상기 아텔로콜라겐으로부터 수용성 저분자 콜라겐 펩티드를 제조하는 방법 및 불가사리 콜라겐 섬유로부터 산가용성 콜라겐 펩티드를 생산하는 방법으로 구성되어 있다.

## 제 4 절 결 론

본 연구는 수산양식장의 해적생물인 불가사리로부터 콜라겐을 산업적으로 추출하는 기술을 개발하고 콜라겐을 이용하여 식품 및 화장품을 제조함으로써 불가사리의 소비수요를 증대시켜 불가사리의 구제를 촉진하고 미 이용 해양자원을 이용하여 고부가가치를 창출하고자 하였다.

먼저, 불가사리 콜라겐을 산업적으로 이용하기 위한 연구 기초자료를 확보할 목적으로 이화학적 기능성을 규명하였다. SDS-PAGE를 통하여 불가사리 콜라겐의 type을 조사한 결과 I 형과 거의 비슷하였다. 불가사리 콜라겐의 분자량은 약 100~200 kDa으로 조사되었다. 불가사리 콜라겐의 용해도, 보수력, 지방흡수력, 유화안정성 등은 식품 및 화장품으로 개발하는 데에 큰 문제가 없을 것으로 판단되었으나 변성온도는 축육 유래의 것보다 크게 낮아 이에 대한 심도 있는 연구가 필요하다고 사료된다. 불가사리 콜라겐 효소가수분해물을 에탄올 50%로 추출한 획분의 항고혈압 활성(IC<sub>50</sub>)은 0.601 mg protein/ml이었다. 불가사리 콜라겐의 항노화성을 알아보기 위하여 free radical 억제율 및 항산화 효과를 측정하였으나 기존 활성물질인 arbutin 및 vitamin C보다 낮았다. 불가사리 콜라겐의 항균성은 peptide에서 미약한 활성을 보였으며 면역활성은 검출되지 않았다. 보습성은 10분경과 후 atelocollagen이 51.3%, collagen peptide가 43.2%이었다. 콜라겐의 미백효과와 자외선 차단능은 미약하였다. 불가사리 콜라겐에 서 납, 비소, 수은 등 유해성 중금속은 검출되지 않았으며 일반세균, 대장균군, 녹농균, 황색포도상구균 및 살모넬라균 수 등 미생물의 오염도를 측정한 결과, 미생물이 검출되지 않았다. 불가사리 콜라겐을 랫드에 체중 1 kg당 2,000 ml까지 투여한 결과, 정상적인 소견을 보여 급성독성이 없는 것으로 나타났으며 백색토끼를 대상으로 실시한 피부독성시험에서도 안전한 것으로 평가되었다. 불가사리 콜라겐을 이용하여 신체 건강한 성인남녀 각 15명을 대상으로 인체접포시

험을 실시한 결과, 시험참가자 모두가 홍반 및 부종이 발견되지 않아 인체에 대한 피부독성이 없는 것으로 평가되었다.

다음으로, 불가사리 콜라겐의 산업적 추출조건을 확립하기 위하여 수산화칼슘을 이용한 원료의 전처리 방법과 적정 전처리 온도 및 시간 등을 규명하였으며 산, 알카리, 효소 등을 이용하여 불가사리로부터 콜라겐을 추출하는 조건을 검토하였다. Trypsin 및 pepsin을 이용한 저온 추출법과 초산 및 황성탄을 이용하여 콜라겐의 정제 방법을 개발하여 고순도의 atelocollagen 생산이 가능하게 되었으며, 본 소재는 의약품, 화장품 등에 응용이 가능할 것으로 판단되었다. Alcalase를 이용하여 collagen peptide의 산업적 생산공정을 개발하였으며, 본 소재는 식품, 화장품 등에 응용이 가능하다. 콜라겐 음료를 개발하기 위하여 음료제품 원료로써 불가사리 콜라겐의 가공적성을 검토하였고 향미개선, 청량감 부여, 재료배합 비율, 제조공정 Lay out, 저장 안정성 및 기호도 조사를 실시하였다. 콜라겐 젤 제품 개발시험의 일환으로 젤 형성능, 영양성분의 강화, 재료배합비율, 제조공정 Lay out, 저장안정성, 및 기호도 조사를 하였다. 콜라겐 크림의 제조시험으로 재료 배합사양, 제조공정, 저장 안정성 및 품질평가를 하였다. 콜라겐 마스크 팩의 제조를 위하여 재료 배합사양, 제조공정, 저장안정성 및 품질평가를 하였다. 콜라겐 비누제조 시험으로 비누화 조건, 재료배합 비율, 제조공정 Lay out 및 품질평가를 하였다. 불가사리 콜라겐의 대량생산 시스템을 개발하기위해 전처리 및 가수분해 탱크, 연속식 원심분리기, 투석장치, 황성탄여과기, 자외선살균장치를 설계하였다. 생산성향상시험의 일환으로 콜라겐의 산업품질규격, 산업안전관리 기준 및 인체안전관리기준을 설정하고 콜라겐의 경제성을 분석하여 산업화 기초자료로 활용할 수 있도록 하였다. 불가사리 콜라겐을 국제화장품원료집(International Cosmetic Ingredient Dictionary)에 등재를 완료하였다. 불가사리의 식품원료 지정은 현재 추진 중에 있다. 불가사리 콜라겐의 산업적 이용기술과 관련된 내용을 특허로 출원(출원번호 10-2005-0047528호, 2005. 6. 3)하였으며 콜라겐 마스크팩 화장품은 현재 기술이전과정에 있다.

이상의 연구결과를 통하여 수산양식장의 해적생물인 불가사리로부터 콜라겐을 산업적으로 생산하여 화장품 소재로 활용이 가능하게 되었으며 이는 불가사리 구제 촉진에 따른 수산업의 생산성향상은 물론 국내 생물산업의 활성화에 크게 기여할 것으로 전망된다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 연구개발목표의 달성도

#### (1) 콜라겐의 산업적 추출조건 확립

- 불가사리 콜라겐 산업적 추출조건을 확립하기 위하여 수산화칼슘을 이용한 원료의 전처리 방법과 적정 전처리 온도 및 시간 등을 규명하였음.
- 산, 알카리, 효소 등을 이용하여 불가사리로부터 콜라겐을 추출하는 조건을 검토하였음.
- Trypsin 및 pepsin을 이용한 저온 추출법을 개발하여 고순도의 atelocollagen 생산이 가능하게 되었으며, 본 소재는 의약품, 화장품 등에 응용이 가능할 것으로 판단됨.
- Alcalase를 이용하여 collagen peptide의 산업적 생산공정을 개발하였으며, 본 소재는 식품, 화장품 등에 응용이 가능함.
- 초산 및 활성탄을 이용하여 콜라겐의 정제 방법을 개발하였음.
- 이상의 결과로 불가사리로부터 산업적으로 콜라겐을 추출하는 것이 가능하게 되었음.

#### (2) 콜라겐의 이화학적 기능성

- 불가사리 콜라겐의 산업적 이용을 위하여 이화학적 기능성을 규명하였음.
- SDS-PAGE를 통하여 불가사리 콜라겐의 type을 조사한 결과 I 형과 거의 비슷하였음.
- 불가사리 콜라겐의 분자량은 약 100~200 kDa으로 조사되었음.
- 불가사리 콜라겐의 용해도, 보수력, 지방흡수력, 유화안정성 등은 식품 및 화장품으로 개발하는 데에 큰 문제가 없을 것으로 판단되었으나 변성온도는 축육 유래의 것보다 크게 낮아 이에 대한 심도 있는 연구가 필요하다고 사료

됨.

### (3) 콜라겐 식품 및 화장품 개발

- 콜라겐 음료를 개발하기 위하여 음료제품 원료로써 불가사리 콜라겐의 가공적성을 검토하였고 향미개선, 청량감 부여, 재료배합 비율, 제조공정 Lay out, 저장 안정성 및 기호도 조사를 실시하였다.
- 콜라겐 젤 제품 개발시험의 일환으로 젤 형성능, 영양성분의 강화, 재료 배합비율, 제조공정 Lay out, 저장안정성, 및 기호도 조사를 하였다.
- 콜라겐 크림의 제조시험으로 재료 배합사양, 제조공정, 저장 안정성 및 품질평가를 하였다.
- 콜라겐 마스크 팩의 제조를 위하여 재료 배합사양, 제조공정, 저장안정성 및 품질평가를 하였다.
- 콜라겐 비누제조 시험으로 비누화 조건, 재료배합 비율, 제조공정 Lay out 및 품질평가를 하였다.

### (4) 콜라겐의 생화학적 기능성

- 불가사리 콜라겐 효소가수분해물을 에탄올 50%로 추출한 획분의 항고혈압 활성(IC<sub>50</sub>)은 0.601 mg protein/ml이었다.
- 불가사리 콜라겐의 항노화성을 알아보기 위하여 free radical 억제율 및 항산화 효과를 측정하였으나 기존 활성물질인 arbutin 및 vitamin C보다 낮았다.
- 불가사리 콜라겐의 항균성은 peptide에서 미약한 활성을 보였으며 면역활성은 검출되지 않았다.
- 보습성은 10분 경과 후 atelocollagen이 51.3%, collagen peptide가 43.2%이었다.
- 미백효과와 자외선 차단능은 미약하였다.

#### (5) 콜라겐의 인체 안전성 평가

- 불가사리 콜라겐에서 납, 비소, 수은 등 유해성 중금속은 검출되지 않았으며 일반세균, 대장균군, 녹농균, 황색포도상구균 및 살모넬라균 수 등 미생물의 오염도를 측정한 결과, 미생물이 검출되지 않았다.
- 불가사리 콜라겐을 랫드에 체중 1 kg당 2,000 ml까지 투여한 결과, 정상적인 소견을 보여 급성독성이 없는 것으로 나타났으며 백색토끼를 대상으로 실시한 피부독성시험에서도 안전한 것으로 평가되었다.
- 불가사리 콜라겐을 이용하여 신체 건강한 성인남녀 각 15명을 대상으로 인체접포시험을 실시한 결과, 시험참가자 모두가 홍반 및 부종이 발견되지 않아 인체에 대한 피부독성이 없는 것으로 평가되었다.

#### (6) 산업화 적용시험 및 기술이전 등

- 불가사리 콜라겐의 대량생산 시스템을 개발하기위해 전처리 및 가수분해 탱크, 연속식 원심분리기, 투석장치, 활성탄여과기, 자외선살균장치를 설계하였음.
- 생산성향상시험의 일환으로 콜라겐의 산업품질규격, 산업안전관리 기준 및 인체안전관리기준을 설정하고 콜라겐의 경제성을 분석하여 산업화 기초자료로 활용할 수 있도록 하였다.
- 불가사리 콜라겐을 국제화장품원료집(International Cosmetic Ingredient Dictionary)에 등재를 추진하였다.
- 불가사리의 식품원료 지정은 현재 추진 중에 있다.
- 불가사리 콜라겐의 산업적 이용기술과 관련된 내용을 특허로 출원(출원번호 10-2005-0047528호, 2005. 6. 3)하였으며 콜라겐 마스크팩 화장품은 현재 기술이전과정에 있다.



## 2. 관련분야의 기술발전 기여도

### (1) 정량적 기여도

- 본 연구결과가 활용될 경우 해양 유해생물인 불가사리를 구제하기 위해 매년 투자하는 예산(연간 10억원 이상)을 70% 이상 절감할 수 있을 것으로 예상됨.
- 파괴되었던 해양생태계가 불가사리의 구제로 복원될 경우 수산자원의 생산기반이 튼튼하게 조성되어 획기적인 어업인의 소득 증대(연간 약 100억원 이상)가 예상됨.
- 고부가가치 신상품의 개발로 해양 바이오산업이 발전할 수 있는 계기가 마련되어 대외 국가경쟁력 향상에 크게 공헌할 것으로 판단됨(연간 75억원 매출 예상).  
※ 연간 5,000M/T × 콜라겐 3% × 50,000원/kg = 75억원
- 상대적 소득격차로 인하여 소외계층으로 전락하고 있는 어업인의 소득을 증대시킴으로 국민 화합의 계기가 될 것으로 사료됨(연간 100억원 지원 효과 추정).

### (2) 정성적 기여도

- 본 연구개발의 핵심기술인 “불가사리 콜라겐 생산기술”은 어업인의 현장애로사항인 “불가사리에 의한 양식장 피해 문제”를 해결하는 데에 적극 활용
- 불가사리 콜라겐의 산업적 이용기술(기능성식품 및 화장품 개발) 실용화를 통하여 우리나라 해양바이오산업을 활성화
- 본 연구과정 중에 확보된 기초기술은 논문 투고를 통하여 관련 연구분야의 참고자료로 활용
- 관련 핵심 기술에 대하여는 발명특허를 출원하여 산업재산권을 확보함으로써 대외 국가 기술경쟁력을 증대

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### (1) 콜라겐의 산업적 추출기술

- 불가사리 콜라겐의 산업적 이용기술과 관련된 내용을 특허로 출원(출원번호 10-2005-0047528호, 2005. 6. 3)되어 있음.
- 참여기업인 아마란스화장품에 우선적으로 기술을 이전하고 필요에 따라 업체에도 확대할 계획임.

### (2) 콜라겐의 이화학 및 생화학적 기능성 연구결과

- 불가사리 콜라겐의 이화학 및 생화학적 연구결과는 우선적으로 산업화 기초자료로 활용.
- 학술적인 내용은 관련학회지에 논문을 투고하여 학술발전에 기여코자함.

### (3) 콜라겐 식품 및 화장품 생산기술

- 불가사리 콜라겐의 가공적성, 재료배합 비율, 제조공정 Lay out, 저장 안정성 및 기호도 조사 등은 산업화 노하우로 이용.
- 콜라겐 화장품 생산기술은 향후 특허출원자료로 활용.

### (4) 콜라겐의 인체 안전성 평가결과

- 불가사리 콜라겐 식품 및 화장품 인·허가자료로 활용
- 불가사리 콜라겐 상품 홍보자료로 이용

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보



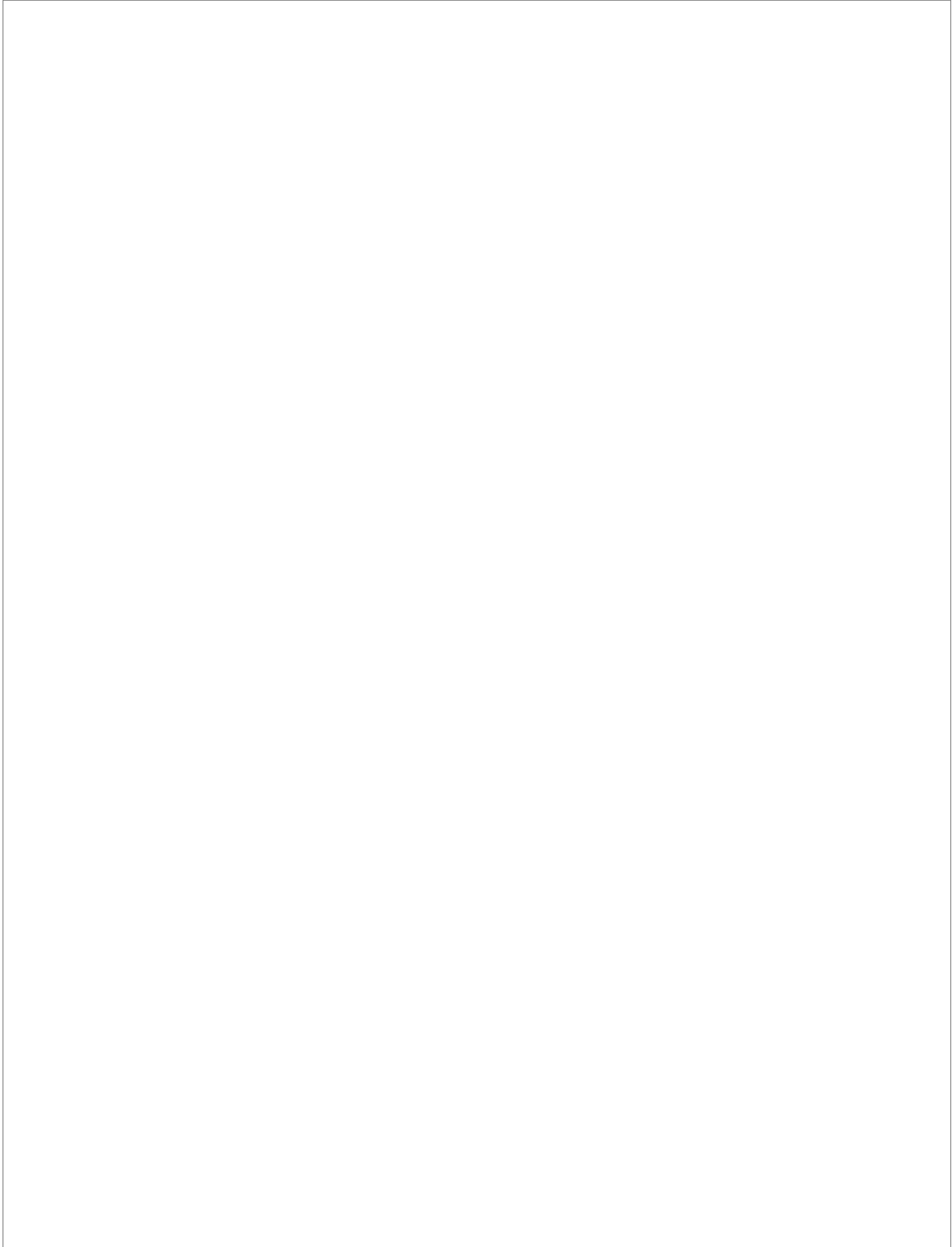


불가사리 콜라겐의 산업적 이용기술 개발



제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보





제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보



불가사리 콜라겐의 산업적 이용기술 개발



제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보



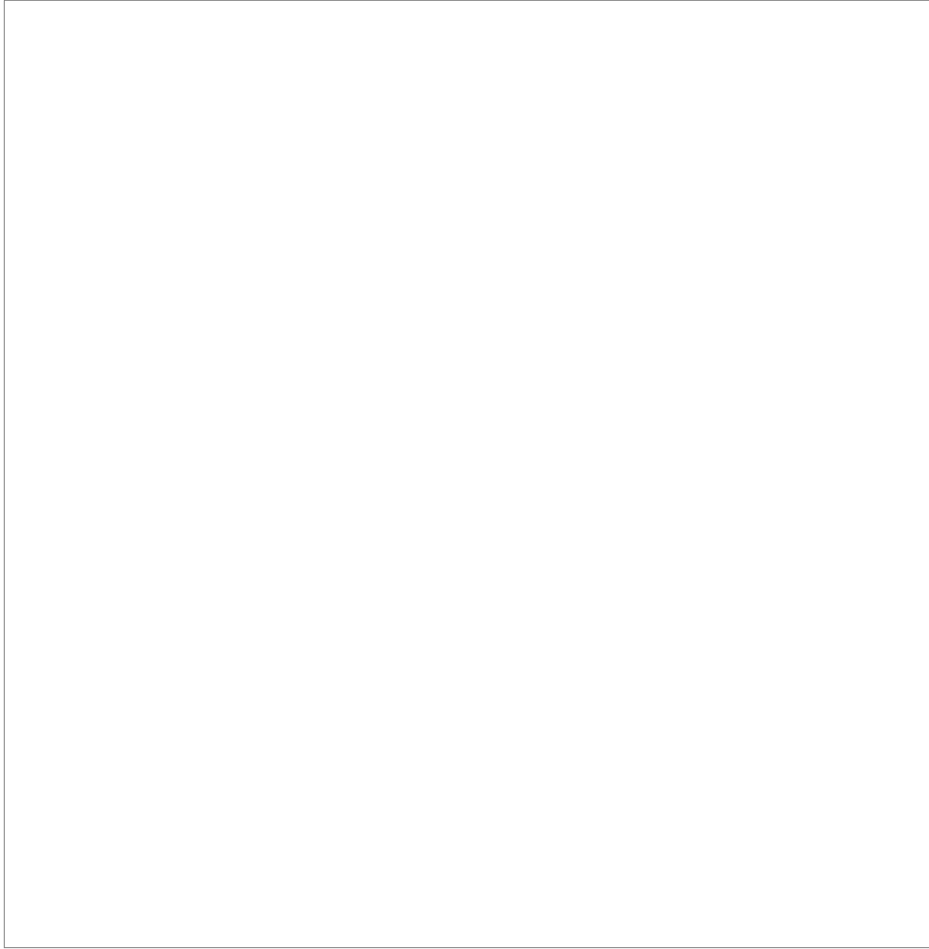


제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보





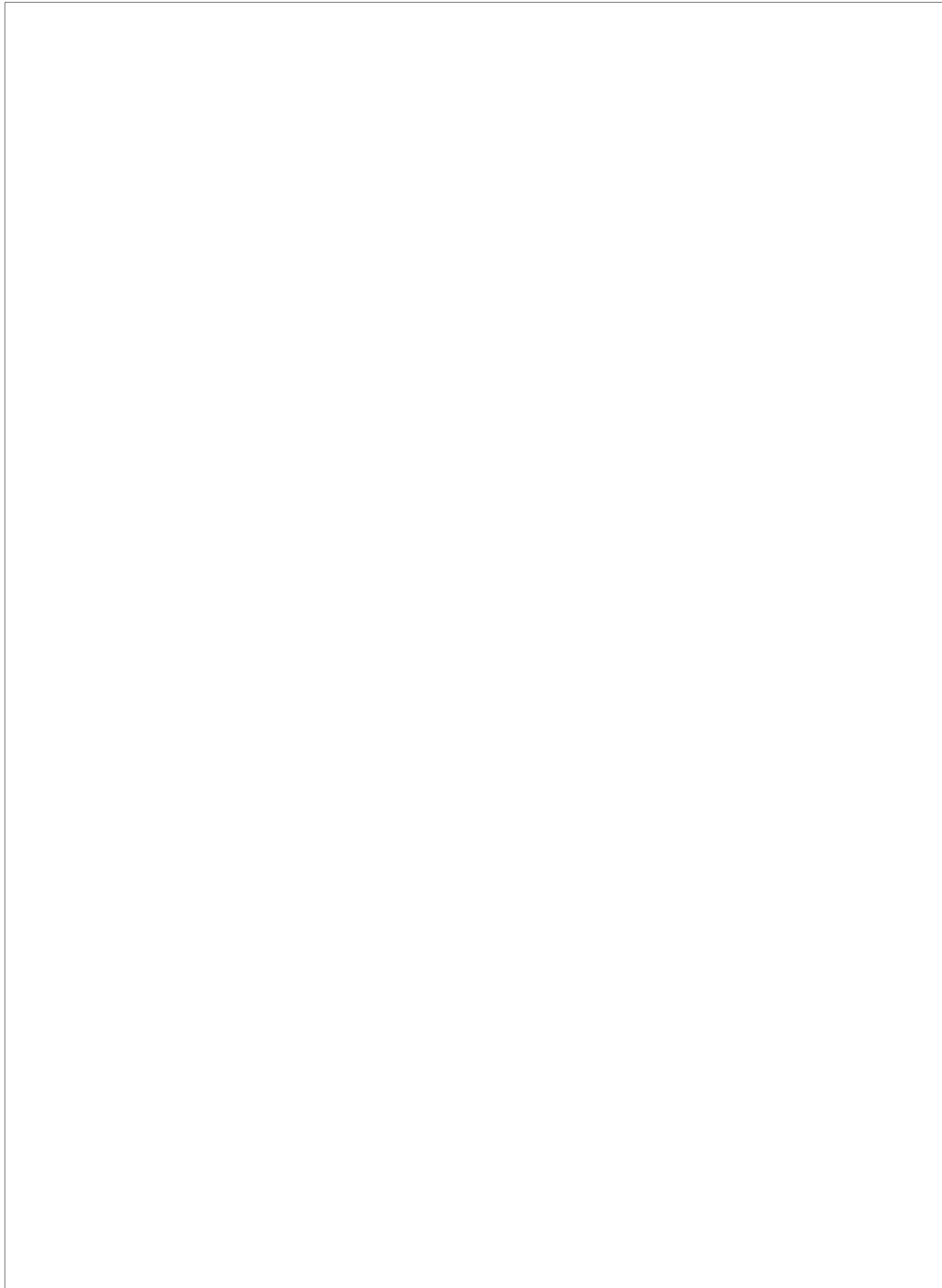
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보



불가사리 콜라겐의 산업적 이용기술 개발

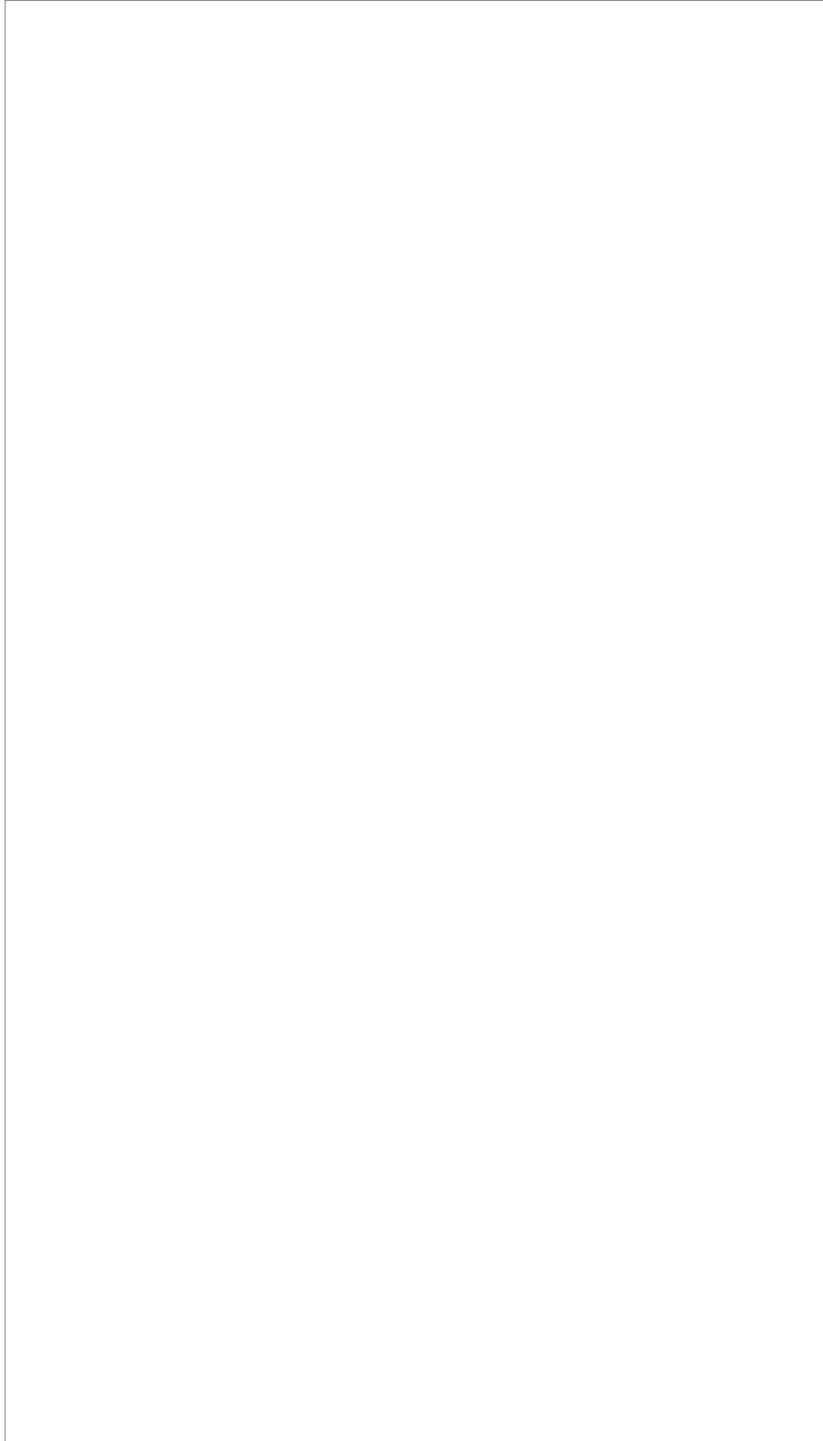


제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

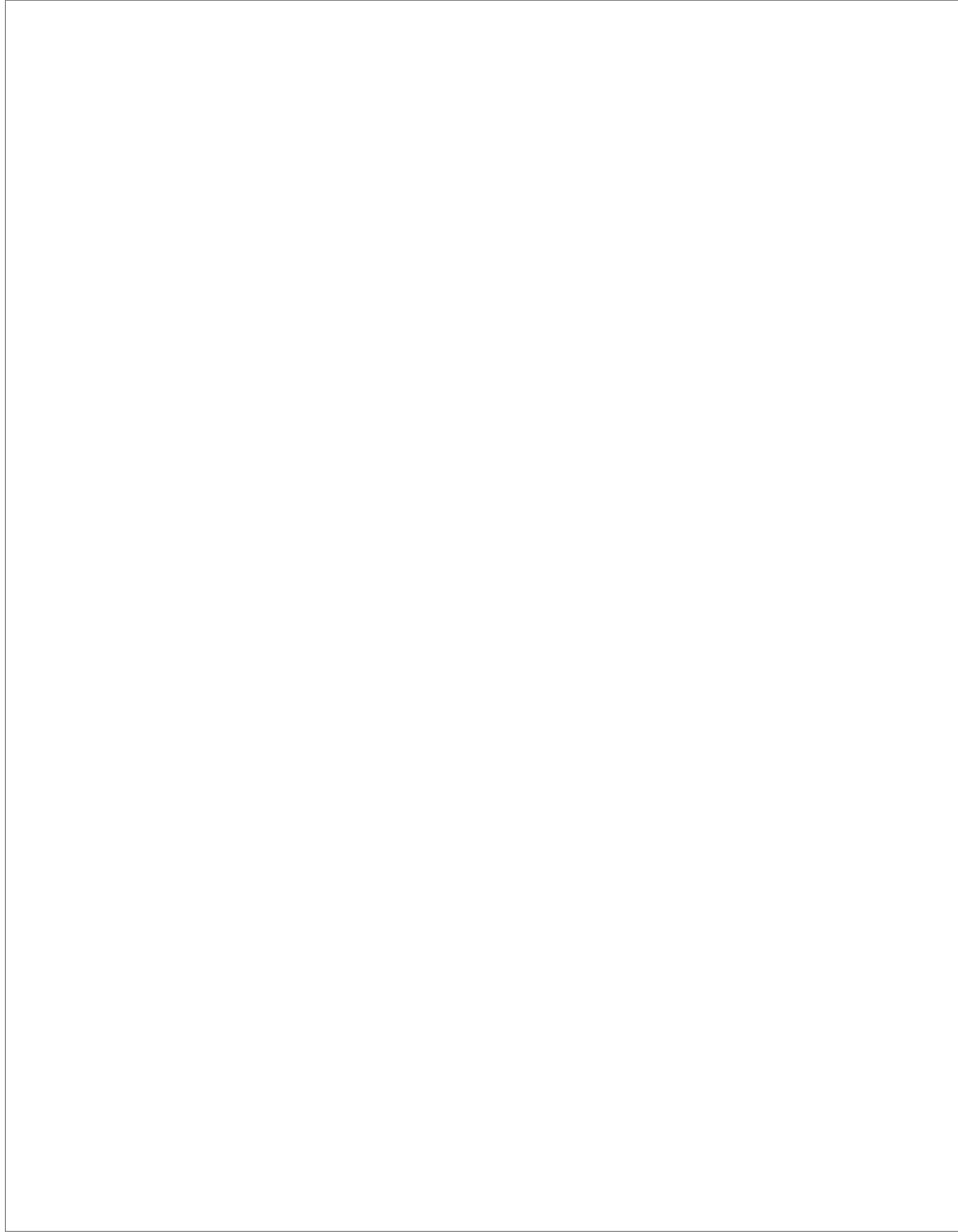




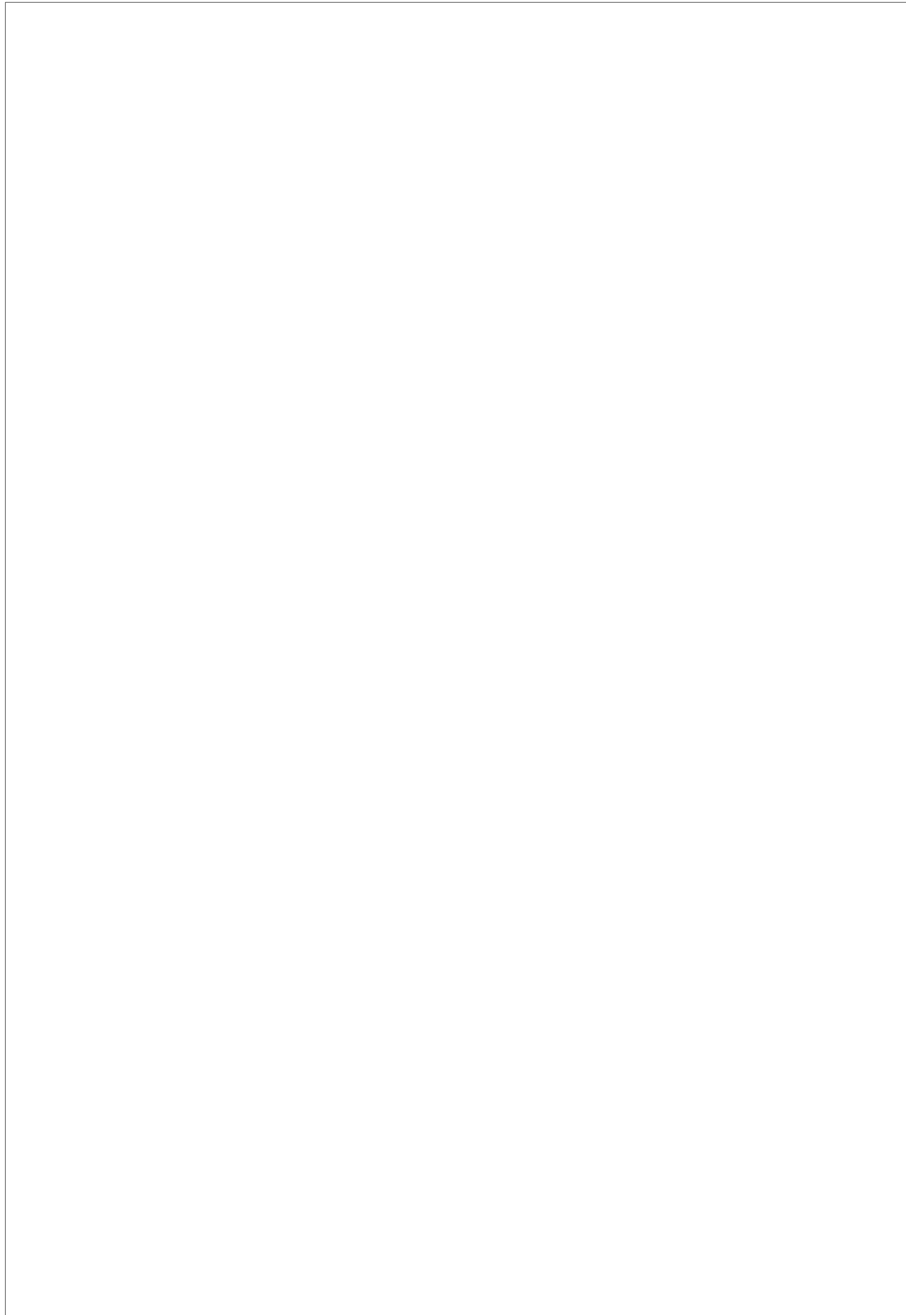
불가사리 콜라겐의 산업적 이용기술 개발

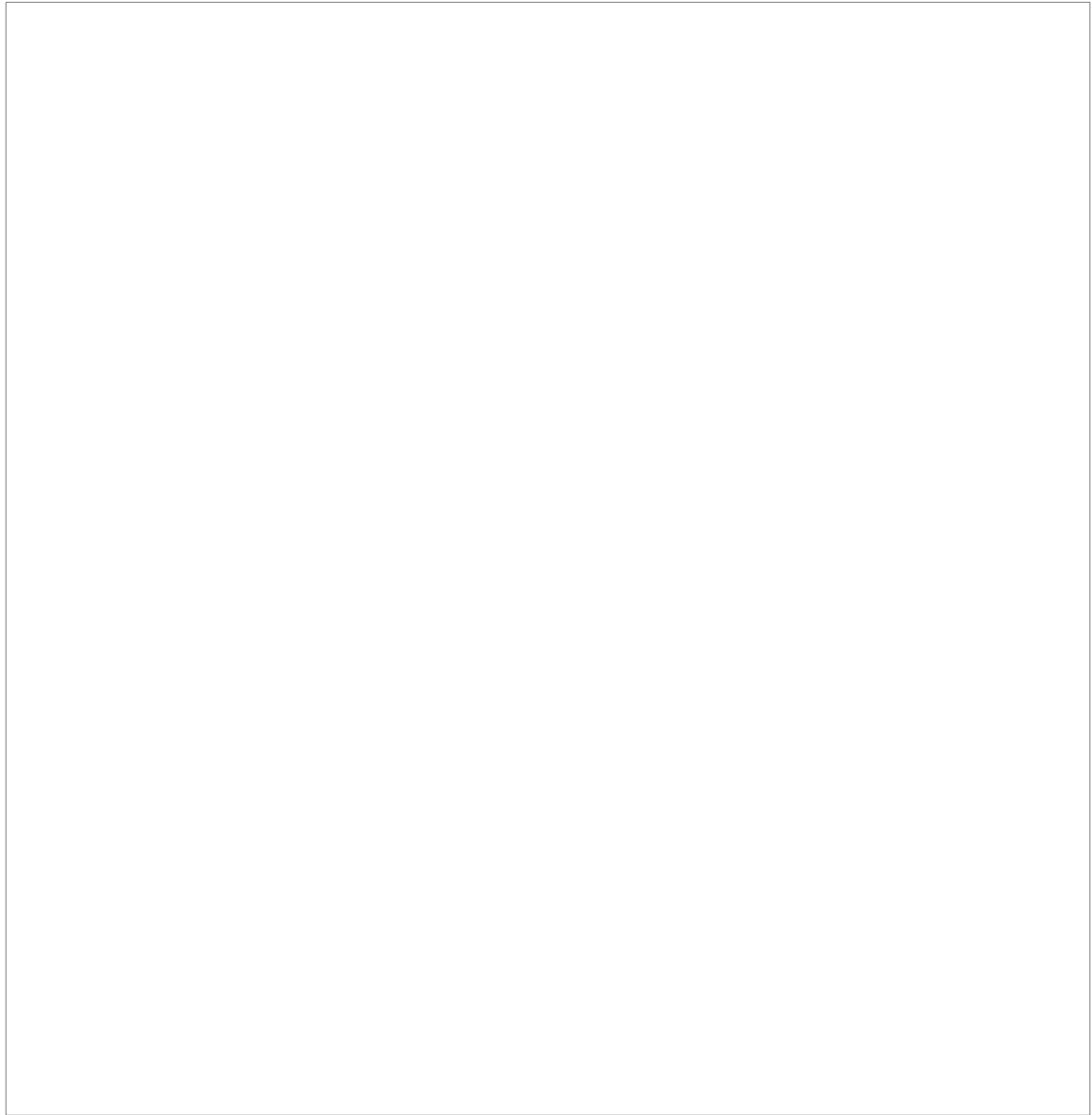


제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

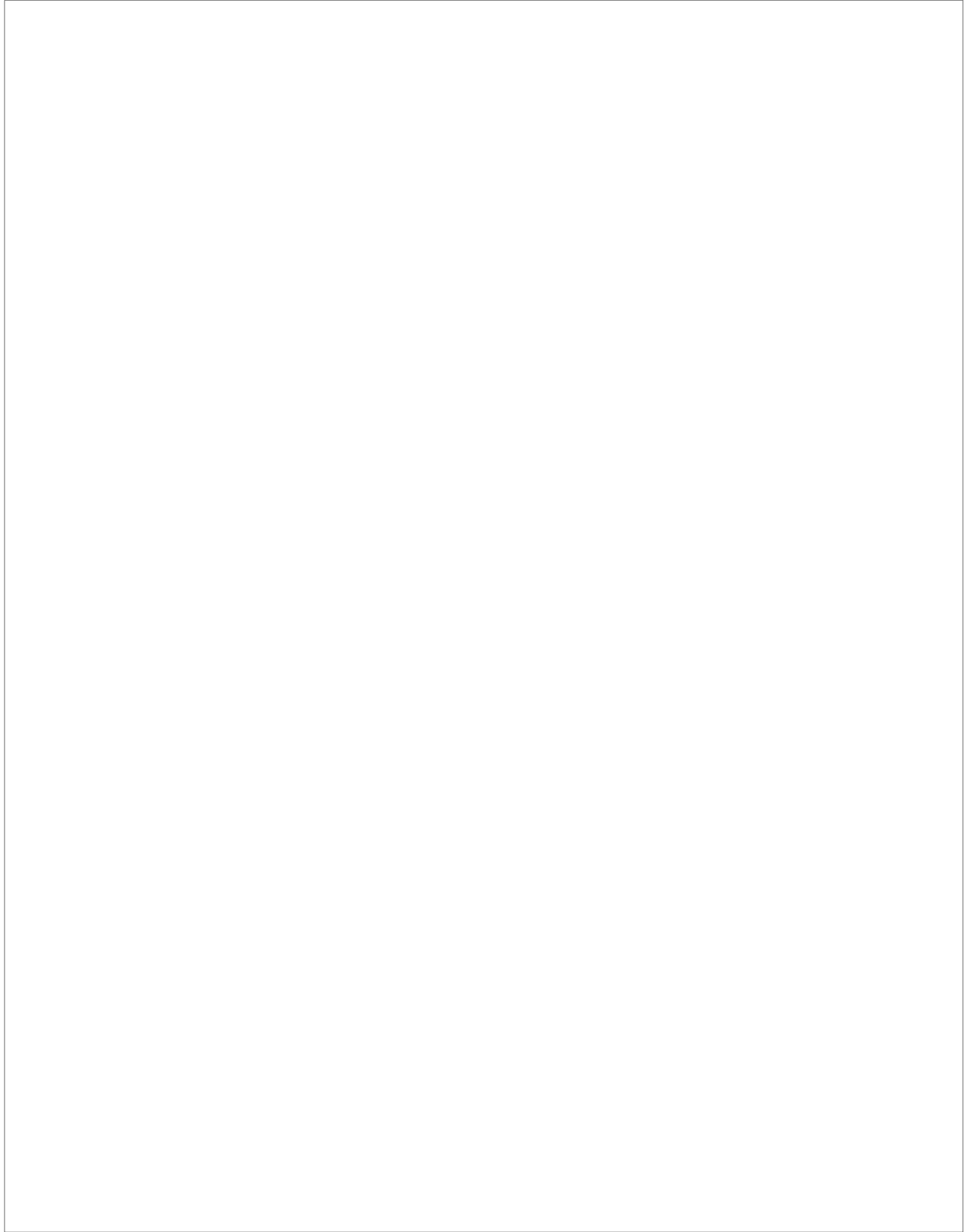


불가사리 콜라겐의 산업적 이용기술 개발

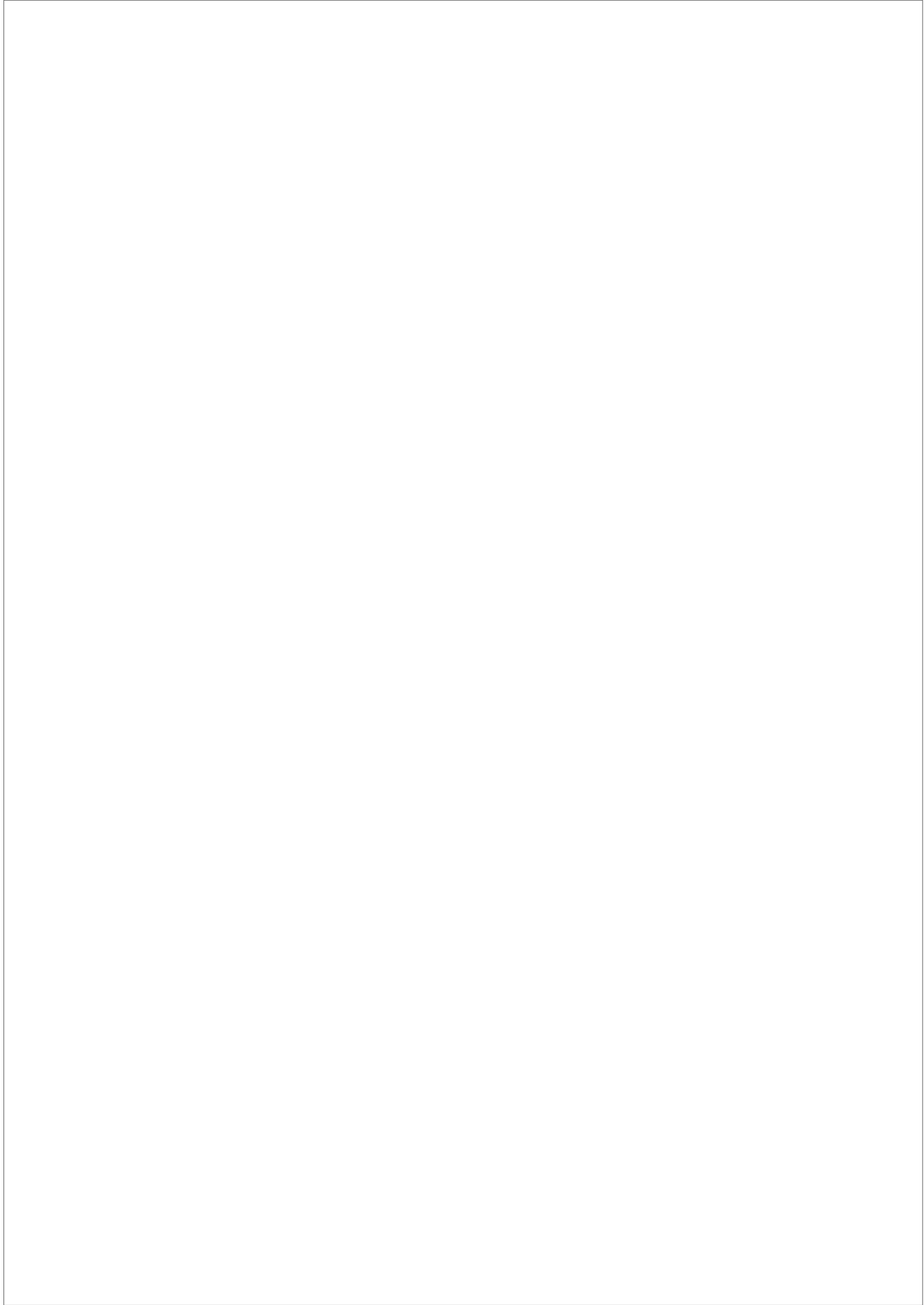




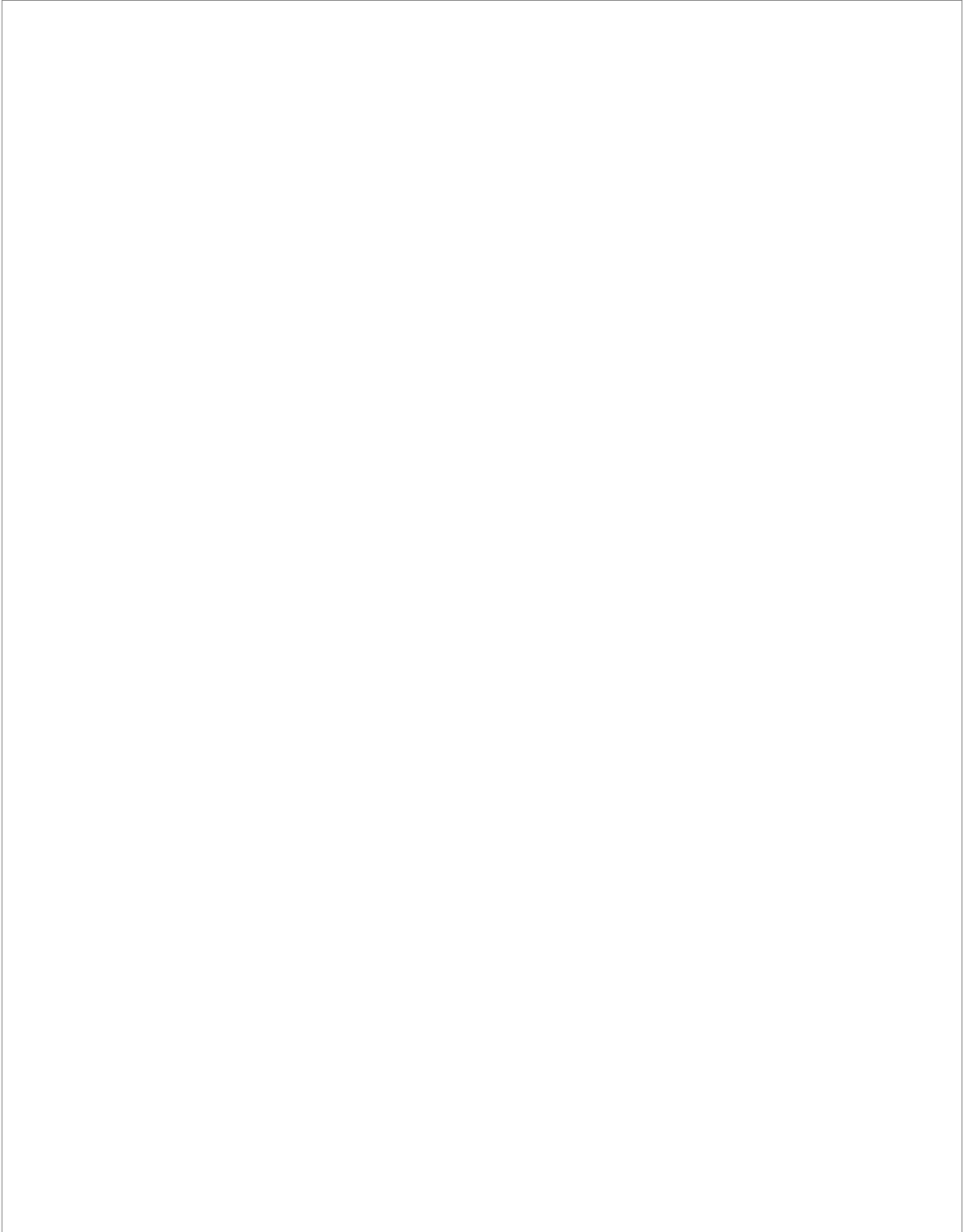
















## 제 7 장 참고문헌

- Andersson L, Bohlin L, Iorizzi M, Riccio R, Minale L, Moreno-Lopez W. 1989. Biological activity of saponins and saponin-like compounds from starfish and brittle-stars. *Toxicon: Official J. of International Society on Toxinology* 27(2): 179-188.
- Andrew P. 1964. Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel filtration. *Biochem. J.* 91: 222-230.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 25: 1199-1200.
- Bruno I, Minale L, Riccio R, Cariello L, Higa T., Tanaka J. 1993. Starfish saponins, 50. Steroidal oligoglycosides from the Okinawa starfish *Naroda tuberculata*. *J. of Natural Products* 56(7): 1057-1064.
- Burnell DJ, ApSimon JW, Gligan MW. 1984. Variations in the levels of asterone and asterogenol, two steroids from the saponins of the starfish, *Asterias vulgaris*(Verrill). *Steroids* 44(1): 67-76.
- Casapullo A, Finamore E, Minale L, Zollo F. 1993. Starfish saponins, 49. New cytotoxic steroidal glycosides from the starfish *Fromia monilis*. *J. of Natural Products* 56(1):105-115.
- Chludil HD, Seldes AM, Alicia M, Maier MS. 2002. Antifungal steroidal glycosides from the patagonian starfish *Asterias minuta*: structure-activity correlations. *J. of Natural Products* 65(2): 153-157.
- Choi HD, Shin S, Park IK. 1999. Characterization of antimicrobial agents extracted from *Asterina pectinifera*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 11: 65-68.

- De Marino, Iorizzi M, Palagiano E, Zollo F, Roussakis C. 1998. Starfish saponins. 55. Isolation, structure elucidation, and biological activity of steroid oligoglycosides from an Antarctic starfish of the family *Asteriidae*. *J. of natural Products* 61(11): 1319-1327.
- Gorshkov BA, Kapustina II, Kicha AA, Aminin DL, Gorshkova IA. 1998. Stimulatory effects of starfish sapogenins(*Asterias amurensis* and *Lethasterias nanimensis chelifera*)on molluscan heart(*Spisula sachalinensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology* 120(2): 235-239.
- Higashi H, Murayama S, Yanase M, Tabei K. 1955. Studies on utilization of worthless marine animals for feed - I. Production of starfish solubles for feed. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 21: 271-279.
- Hisoshi H, Seiji T, Shigeyoshi M, Yoshihiro O, Susumu I. 1990. Structure of a novel steroidal saponin, pachastrelloside A, obtained from a marine sponge of the genus *Pachastrella*. *Tetrahedron Letters* 31(23): 3321-3324.
- Iorizzi M, Bryan P, McClintock J, Minale L, Palagiano E, Mayrelli S, Riccio R, Zollo F. 1995. Starfish saponins, Part 53. A reinvestigation of the polar steroids from the starfish *Oreaster reticulatus*: isolation of sixteen steroidal oligoglycosides and six polyhydroxysteroids. *J. of Natural products* 58(1): 10-26.
- Iorizzi M, de Riccardis F, Minale L, Riccio R. 1993. Starfish saponins, 52. Chemical constituents from the starfish *Echinaster brasiliensis*. *J. of Natural Products* 56(12): 2149-2162.
- Iorizzi M, Minale L, Riccio R, Yasumoto T. 1992. Starfish saponins, 48. Isolation of fifteen sterol constituents(six glycosides and nine polyhydroxysteroids) from the starfish *Solaster borealis*. *J. of Natural*

- Products* 55(7): 866-877.
- Iorizzi M, Minale L, Riccio R, Yasumoto T. 1993. Starfish saponins, 51. Steroidal oligoglycosides from the starfish *Distolasterias nipon*. *J. of Natural Products* 56(10): 1786-1798.
- Iorizzi M, Minale L, Riccio R. 1991. Starfish saponins, 46. Steroidal glycosides and polyhydroxysteroids) from the starfish *Culcita novaeguineae*. *J. of Natural Products* 54(5):1254-1264.
- Kimura S, Omura Y, Ishida M, Shira H. 1993. Molecular characterization of fibrillar collagen from the body wall of starfish *Asterias amurensis*. *Biochem. Physiol.* 104B: 663-668.
- Lin MJY, Humbert ES and Sosulki FW. 1974. Certain function properties of sunflower meals *J. Food Sci.* 39: 368-371.
- Lin SJ, Hwang DF. 2001. Possible source of tetrodotoxin in the starfish *Astropecten scoparius*. *Toxicon Official J. of the International Society on Toxicology* 39(4): 573-579.
- Lin SJ, Tsai YH, Lin HP, Hwang DF. 1998. Paralytic toxins in Taiwanese starfish *Astropecten scoparius*. *Toxicon Official J. of the international Society on Toxinology* 36(5): 799-803.
- Maier MS, Roccatagliata A, Seldes AM. 1993. Two novel steroidal glycoside sulfates from the starfish *Cosmasterias Iurida*. *J. of Natural Products* 56(6): 939-942.
- Matsumura T. 1973. Shap, size and amino acid composition of collagen fibril of the starfish *Asterias amurensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 44B: 1197-1205.
- Riccio R, Minale L, Bano S, Uddin VA. 1987. Starfish saponins part 32. Structure of a novel steroidal 5-0-methyl galactofuranoside from the starfish *Astropecten indicus*. *Tetrahedron Letters* 28(20): 2291-2294.

- Roccatagliata AJ, Maier MS, Seldes AM, Lorizzi M, Minale L. 1994. Starfish saponins, Part 2. Steroidal oligoglycosides from the starfish *Cosmasterias Iurida*. *J. of Natural Products* 57(6): 747-754.
- Wang JC and Kinsella JE. 1976. Functional properties of novel protein Alfalfa leaf protein. *J. Food Sci.* 41: 286-292.
- Woessner JF. 1961. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Archs Biochem. Biophys* 93: 440-447.
- Yamamoto S, Toida I and Iwai K. 1980. Re-examination of the spectrophotometric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Japan J. of Thoracic Diseases* 18(5): 297-303.
- Yamashita M, Arai S, Kokubo S, Aso K and Fujimaki M. 1975. Synthesis and characterization of a glutamic acid enriched plastein with greeter solubility. *Agr. Food Chem.* 23: 27-30.
- 서정길. 1997. 미스토파란 B와 그 유도체들의 구조와 활성과의 관계 및 곰팡이와 불가사리로부터 생리활성물질의 정제. 부경대학교석사학위논문, pp 1-47.
- 손윤희 · 전경희 · 최수정 · 정시련. 1998. 별불가사리 렉틴의 복수암에 대한 항암 효과. *약학회지* 42(4): 388-394.
- 이창국 · 이두석 · 황규철 · 송기철 · 장영순. 1989. 불가사리류의 성분 및 비료로서의 효과. *국립수산진흥원 사업보고 제77호*: 57-74.
- 전경희 · 박채수 · 박원학 · 최수정 · 소명숙 · 정시련. 1997. 별불가사리렉틴의 특성 및 암세포 성장저해 효과. *약학회지* 41(4): 421-432.
- 전경희 · 최수정 · 정시련. 1999. 별불가사리 렉틴의 사이토카인 생성 양상. *약학회지* 43(4): 474-480.
- 조순영. 2000. 불가사리 · 성게껍질 · 우렁쉥이껍질 유래 생리활성물질의 분리, 동

- 정 및 고기능성 소재로서의 응용. 해양수산부 수산특정연구보고서, pp 1-148.
- 최돈호. 1993. 불가사리로부터 추출한 항균성물질의 항균능력 검색과 항균활성 물질의 이화학적 특성. 동국대학교석사학위논문, pp 1-39.
- 함정혜 · 한영환 · 박창훈 · 이동웅. 1999. 별불가사리의 항돌연변이 활성. 약학회지 43(6): 771-775.



## 주 의

1. 이 보고서는 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.