

최 종
연구보고서

GA0350-0225

도계 부산물로부터 유용콜라겐의 제조기술 및
기능성 음료산업에의 이용 연구

Development of manufacturing technology of collagen
from by-product of chicken and its utilization for
functional drink

연 구 기 관

한국식품개발연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “도계 부산물로부터 유용 콜라겐의 제조 기술 및 기능성 음료산업에의 이용 연구”에 관한 연구 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2002년 11월 24 일

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 양 승 용

연 구 원 : 이 남 혁

연 구 원 : 오 세 욱

연 구 원 : 김 영 호

요 약 문

I. 제 목

도계 부산물로부터 유용 콜라겐의 제조 기술 및 기능성 음료산업에
의 이용

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 콜라겐 제조기술 확립
- 콜라겐의 생리기능성 탐색 및 기능성 펩타이드 정제
- 기능성 펩타이드의 대량 제조기술 개발
- 기능성 콜라겐 음료개발

III. 연구개발 내용 및 범위

- 1차년도 : 도계 부산물로부터 콜라겐의 적정 제조조건 확립
 - 콜라겐의 제조 시험 및 수율 분석
 - 콜라겐의 기능성 분석
 - 가용성 콜라겐의 음료화 가능성 검토
- 2차년도 : 콜라겐으로부터의 기능성 peptide 제조기술 및 가용화
기술개발
 - 콜라겐의 효소를 이용한 peptide 정제기술 개발
 - 콜라겐 peptide의 기능성 검토
 - 음료수 제조를 위한 peptide의 가용화 기술
 - 실험실 규모의 시제품 가공 및 제조 공정도 개발
- 3차년도 : 콜라겐 peptide 제조 및 음료개발의 산업화 연구
 - Scale up된 콜라겐 peptide의 제조 시험

- 저장성 검토
- 공장 규모의 제조 공정도 작성

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

닭의 부산물인 껍질, 날개 및 연골의 일반성분을 분석한 것은 다음과 같다. 껍질의 일반성분은 수분이 약 50.3%, 조단백 22.1%, 조지방 27%, 회분 0.32%, 기타 0.28% 이었으며 날개는 수분 58.7%, 조단백 18.4%, 조지방 16.2%, 회분 6.47%, 기타 0.27%를 나타내었으며 연골의 경우 수분 68.3%, 조단백 21.8%, 조지방 1.6%, 회분 7.86%, 기타 0.44%를 나타내었다.

콜라겐을 제조하기 위하여 시료를 -60℃에 동결시킨후 동결분쇄기(햄머밀)를 이용하여 분쇄하였다. 각각의 분쇄된 시료를 0.5M NaCl과 0.5M Citrate buffer에 추출한 후 동결건조하여 이를 염가용성콜라겐과 산가용성콜라겐이라 하였다.

콜라겐의 수율을 측정하기 위하여 총 단백질 함량에 대한 콜라겐 함량비율을 비교하였다.

껍질의 경우 조단백 함량이 22.32%에 대하여 콜라겐 함량이 20.29%로 조단백질에 대한 콜라겐의 비율이 약 91%로 조단백질 대부분의 성분은 콜라겐인 것으로 사료된다. 날개끝 부분의 조단백질 함량은 19.4%에 대하여 콜라겐 함량은 13.52%로 조단백질 함량의 약 70%를 차지하여 껍질과 비교시 낮은 콜라겐 비율을 나타내었다. 연골의 경우 조단백질 함량이 19.6%에 대하여 콜라겐 함량 16.79%로 조단백질 함량의 86%로 비교적 높게 나타났다. 이는 경제적 측면으로 볼 때 연골이 가장 효율적이라 사료된다. 각각의 콜라겐을 염가용성 및 산가용성으로 나누어 함량을 조사하였다. 껍질의 염가용성 및 산가용성 콜라겐의 함량은 12.79%, 7.5%이고 조단백질 대비 각 타입의 콜라겐 함량은 염가용성콜라겐이 57.3%, 산가용성콜라겐이 33.6%로 염가용성이 높게 측정되었다. 날개에

서의 각 콜라겐 함량은 염가용성 콜라겐이 8.56%, 산가용성 콜라겐이 4.96%로 조단백질 대비 염가용성 콜라겐이 44.1%, 산가용성콜라겐이 25.6%로 산가용성에 비해 염가용성콜라겐이 높게 측정되었다. 연골의 각 염가용성 콜라겐과 산가용성 콜라겐은 11.65%, 5.23%의 콜라겐 함량을 나타내었고 조단백질 대비 각 콜라겐 함량은 염가용성 콜라겐이 59.4%, 산가용성 콜라겐이 26.7%로 닭의 3종 부산물중 연골의 염가용성 콜라겐 함량이 조단백질 함량 대비 가장 높게 측정되었다. 타입별 콜라겐 subunit 조성을 보면 껍질 및 날개의 경우 분자량 약 20만과 겔 최상단 부분에서 검출되는 거대분자로 사료되는 성분이 검출이 되었으며 연골의 경우 분자량 약 20만, 120만, 6.6만 및 2.9만에 상당하는 성분들이 관찰되었다. 콜라겐의 음료화 가능성을 검토하기 위하여 색차계에 의해서 분석한 결과는 연골로부터 추출한 콜라겐이 밝게 나타났으며 상대적으로 적색도와 황색도는 낮게 나타나 음료수 제조시 색택에 크게 영향을 미치지 않을것이라 사료된다.

콜라겐의 가공적성을 위하여 콜라겐 첨가농도에 따른 점도, 용해도 및 탁도를 측정하였다. 부위에 관계없이 콜라겐 첨가 비율이 높아질수록 점도는 상승하는 경향을 나타내었다. 이는 콜라겐 자체가 고분자로서 첨가량이 많아질수록 그 속도가 빠르게 나타나 고분자 성분의 양에 비례적 상승을 하는것으로 사료된다. 콜라겐 첨가에 의한 용해도는 첨가비율이 0.3%까지는 서서히 저하하다 콜라겐 첨가량이 증가할수록 급격히 용해도가 저하하는 것을 볼 수 있다. 콜라겐 첨가에 의한 탁도의 변화는 콜라겐의 첨가비율 0.3% 이상에서 증가하기 시작하였으며, 그 후 콜라겐 첨가량이 많아질수록 급격히 탁도가 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 산가용성 및 염가용성의 콜라겐이 추출시에는 원활히 추출되었는데 반하여 추출 후 냉동 건조에 의하여 분말화된 각각의 콜라겐이 같은 용액에서 용해를 시켰음에도 불구하고 용해도가 급격히 떨어지며, 탁도 및 점도가 급격히 상승하는 것은 분말화 과정에 있어서 콜라겐의 구조적인 변화가 추측되었다.

콜라겐 음료제품으로 개발하기 위해서 고분자의 물질을 peptide화 하기 위해 효소첨가를 하였다. 모든 처리구에서 papain 농도와 처리시간에 따른 SDS-PAGE pattern을 보면 papain 농도 0.01% 첨가시 처리시간 10분부터 고분자 콜라겐이 가수분해되어 14200이하의 저분자로 나타남을 볼 수 있었다. 처리시간 30분째에는 분자량이 2000~6000사이로 peptide화 되었다 이와 같은 저분자 peptide는 ACE저해능과 항산화억제능의 생리기능적 특성이 있는것으로 알려져 있으므로 본 연구에서 개발한 peptide의 ACE 저해능과 항산화 억제능에 대하여 검토하였다. 염가용성 펩타이드의 ACE 저해는 껍질 60%, 날개 52%, 연골이 58%로 껍질이 가장 높게 나타났다. 산가용성 펩타이드의 ACE 저해는 염가용성 보다 다소 낮게 측정된 52~58%로 나타났다. 따라서 부산물의 종류와 관계없이 염가용성 저분자 peptide는 1mg/mL의 농도로 50%이상의 ACE 저해효과를 나타내어, 이를 음료로 적용시 높은 부가가치 창출의 가능성을 나타낼 것으로 사료된다.

항산화능은 염가용성 펩타이드 중 껍질 33%, 날개 29%, 연골 31%로 껍질이 가장 높게 나타났으며 산가용성 펩타이드는 껍질 31%, 날개 34%, 연골 40%로 연골이 가장 높게 측정되었다. 콜라겐 음료 적성 검토를 위해 각 펩타이드의 용해도를 측정하였다. 타입별 펩타이드의 농도별 첨가에 따른 용해도는 껍질과 연골의 2% 농도에서도 90% 이상의 용해도를 나타내어 물에 쉽게 용해되어 산업적으로 충분히 이용가능 할 것으로 사료되었다.

한편, 실질적으로 0.1%의 peptide를 첨가하여 음료수를 개발한 결과 색택, 맛, 향 등에 거의 영향을 미치지 않았으며 또한 가용화능이 뛰어나 침전등이 전혀 형성되지 않아 기능성 음료로서의 제품개발이 가능하였다.

SUMMARY

I. Title

Development of manufacturing technology of collagen from by-product of chicken and its utilization for functional drink.

II. Objective and Significance of Research

- o Establishment of processing technology of collagen
- o Screening of functionality for collagen and refining of functional peptide
- o Development of mass manufacturing process for functional peptide
- o Development of functional collagen drink

III. Scope

- o First year : Establishment of optimal manufacturing condition of collagen from by-product of chicken
 - Study on manufacturing and analysis of yield for collagen
 - Study on functionality of collagen
 - Examination of possibility for soluble collagen drink
- o Second year : Development of manufacturing technology of functional peptide and technology of solubility
 - Development on refining of peptide with collagen enzyme
 - Examination on functionality of collagen peptide
 - Solubility technology of peptide for manufacturing of drink
 - Study of pilot-scale for sample and flow chart of

manufacturing process

- o Third year : manufacturing of collagen peptide and development of industrial study for drink
 - Study of manufacturing of peptide with scale-up
 - Examination of storage ability
 - Framing of flow chart of manufacturing process

IV. Results and Recommendation

Approximate composition of by-product of chicken such as skin, tip and cartilage was determined. The data showed that water content 50.3%, crude protein 22.1%, lipid 27%, ash 0.32% in chicken skin and water content 58.7%, crude protein 18.4%, lipid 16.2%, ash 6.47% in chicken wing while water content 68.3%, crude protein 21.8%, lipid 1.6% and ash 7.86% in chicken cartilage. The sample was reduced to powder with frozen grinder after frozen at -60°C for preparation of collagen. Each sample was extracted by 0.5NaCl and 0.5M citrate buffer solution and frozen dried called salt-soluble collagen and acid-soluble collagen. The content of collagen was 20.29% among crude protein content(22.32%) and the ratio of collagen content was 91% in total crude protein content that means the protein abounds in collagen in chicken skin. In the end part of wing, content of crude protein was 19.4% with 16.79% collagen content and collagen content was 70% in total crude protein content which mean lower collagen content relatively. The content of collagen was 16.79% among crude protein content(19.6%) and the ratio of collagen content was 86% in total crude protein content, thus one can conclude that chicken cartilage result in very effective one in economic view. A content of

salt-soluble collagen type and acid-soluble one in chicken skin were 12,79% and 7.5% respectively and the ratio of salt-soluble collagen content and acid one were 57.3% and 33.6% in total crude protein content. In chicken tip, a content of salt-soluble collagen type and acid-soluble one in chicken skin were 8,56% and 4.96% respectively and the ratio of salt-soluble collagen content and acid one were 44.1% and 25.6% in total crude protein content. Also, A content of alkali soluble collagen type and acid soluble one in chicken cartilage were 11,65% and 5.23% respectively and the ratio of salt-soluble collagen content and acid one were 59.4% and 26.7% in total crude protein content, thus one can conclude that salt-soluble collagen content among by-product of chicken was the highest value. 200,000 molecular weight and huge one were observed in chicken skin and tip by using gel chromatography while 200,000, 1,200,000, 66,000, 29,000 molecular weight were also observed in chicken cartilage. Examination data for manufacturing of collagen drink showed that the highest L value in collagen extracted chicken cartilage while lower a and b values that means color values did not effect a manufacturing of collagen drink. Effect of collagen concentration was studied on viscosity, solubility and turbidity. Viscosity was increased as collagen concentration increased while solubility was decreased dramatically. Turbidity was increased slowly up to 0.3% adding of collagen and increased dramatically as collagen concentration increased. Thus, one can conclude that the change of structure was happened during preparation of powder. Effect of enzyme treatment for collagen drink was also studied. Lower molecular weight(14200) was observed in SDS-PAGE pattern with adding 0.01% concentration of papain and 10 min treatment and divide into between 8,000 and 4,000 molecular

weight after 30 min treatment. Inhibitory activity of peptide ACE and antioxidative activity were studied. Inhibitory activities of peptide ACE were 60%, 52% and 58% in chicken skin, tip and cartilage respectively. ACE inhibitory activity of peptide from acid-soluble was lower than salt one. Therefore, peptide from salt-soluble collagen of lower molecular weight can be used for manufacturing of collagen drink. Antioxidative activity in peptide of salt-soluble collagen were 33%, 29% and 31% in chicken skin, tip and cartilage respectively while 31%, 34% and 40% in peptide of acid-soluble collagen. Solubility index of peptide were 90% in 2% concentration. Color, taste and flavor did not effect by 0.1% addition of peptide and also precipitation was not observed.

CONTENTS

SUMMARY.....	
Chapter 1. Introduction.....	
Chapter 2. Material and method.....	
Section 1. Material.....	
Section 2. Method.....	
1. Material treatment.....	
2. Component analysis of chicken by-product	
3. Preparation of aalt- and acid soluble collagen.....	
4. Protein concentration.....	
5. Measurement of hydroxyproline and collagen content.....	
6. SDS-PAGE analysis.....	
7. Enzyme treatment	
8. Viscosity of collagen	
9. Solubility of collagen	
10. Turbidity of collagen	
11. HPLC analysis	
12. ACE inhibition of peptide	
13. Antioxidative activity of peptide	
14. Total plate counts of peptide drink	
Chapter 3. Result and discussion.....	
Section 1. Establishment of optimal manufacturing condition of collagen from by-product of chicken	

1. Component analysis of chicken by-product
2. Preparation of collagen
3. Content of collagen
4. Subunit of various type collagen by SDS-PAGE
5. Examination of possibility for soluble collagen drink

Section 2. Development of manufacturing technology of functional peptide and technology of solubility

1. Development on refining of peptide with collagen enzyme
2. Examination on functionality of collagen peptide
3. Solubility technology of peptide for manufacturing of drink
4. Study of laboratory-scale for sample and flow chart of manufacturing process

Section 3. manufacturing of collagen peptide and development of industrial study for drink

1. Framing of flow chart of manufacturing process
2. Examination of storage ability and sensory evaluate of peptide drink

Reference.....

목 차

요 약 문.....

제 1 장 서론

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 시료

제 2 절 실험방법

1. 원료의 전처리
2. 일반성분 분석
3. 염가용성 및 산가용성 콜라겐의 조제
4. 단백질 농도의 측정
5. Hydroxyproline 및 Collagen 함량 측정
6. SDS-PAGE 분석
7. 효소처리
8. 콜라겐의 점도측정
9. 콜라겐의 용해도 측정
10. 콜라겐의 탁도측정
11. HPLC 분석
12. ACE 저해도 측정
13. 항산화 측정
11. 일반세균 측정

제 3장 결과 및 고찰

제 1 절 도계 부산물로부터 콜라겐의 적정제조조건 확립

1. 도계 부산물의 일반 성분
2. 콜라겐의 제조
3. 콜라겐의 수율
4. 타입별 콜라겐의 subunit 조성
5. 콜라겐의 가공적성 및 음료화 가능성 검토

제 2 절 콜라겐으로부터의 기능성 peptide의 제조기술 및 가용화 기술 개발

1. 콜라겐의 효소를 이용한 peptide의 정제
2. 콜라겐 peptide의 기능성 검토
3. 음료수 제조를 위한 가용화 기술
4. 실험실 규모의 시제품 가공 및 제조 공정도 개발

제 3 절 콜라겐 peptide의 제조 및 음료개발의 산업화 연구

1. 공장규모의 시제품 제조 공정도
2. 저장성 및 관능검사

참고문헌

제 1 장 서 론

콜라겐은 동물조직의 껍질, 뼈, 인대, 혈관, 근막 등 생체조직 전반에 걸쳐 분포되어 있는 구조 단백질로서 조직의 종류에 따라 섬유상 특성이 striated fiber 콜라겐(Type I, II, III), nonfibrous 콜라겐(Type IV) 및 microfibrillar 콜라겐(Type V, VI, VII, IX, X) 등으로 구분되기 때문에 콜라겐의 효율적인 이용을 위해서는 각 Type별 콜라겐 특성을 이해하여야 한다. 도계 부산물인 닭발, 날개끝(tip), 무릎연골, 가슴연골, 껍질 등은 striate fiber 콜라겐이 주성분인데, striated fiber 콜라겐은 α 사슬의 구성과 분자형태에 따라 Type I, II, III로 분류하고 있으며, Type I 콜라겐은 피부, 건, 뼈, 혈관등에, Type II 콜라겐은 연골조직에 그리고 Type III 콜라겐은 Type I 과 같지만 뼈에는 존재하지 않는 것으로 알려지고 있다.

도계 부산물에 존재하는 콜라겐을 효율적으로 이용하기 위해서는 연골 부분과 껍질을 구분하여 콜라겐 Type 별 콜라겐 제조방법과 제품이용기술을 개발하여야 할 필요가 있다.

이와 더불어 부산물을 분리하는 분리공정없이 콜라겐을 제조할 수 있는 단순 공정개발에 대한 연구를 병행하여야 하며, 소, 돼지 등 대동물의 뼈와 껍질에 존재하는 Type I, II 콜라겐과 도계 부산물에서 제조한 콜라겐 Type I, II 와의 품질특성에 대한 비교 분석으로 도계 부산물의 콜라겐 품질향상을 기하여 가격경쟁력을 높여야 할 과제가 남아있다.

한편, 도계 부산물은 거의 폐기되고 있는 실정이어서 아까운 단백질 자원의 막대한 손실뿐만이 아니라 환경오염의 주원인이 되고 있다.

따라서 본 연구에서는 도계 부산물(껍질, 연골, 날개)로부터 collagen을 분리하여 생리기능성 및 가용화 방법을 검토하여 부산물의 고부가가치 창출을 위한 기능성 음료수의 소재개발을 하고자 하였다.

제 2 장 재료 및 방법

제1절 시료

시료의 수집은 도계부산물인 날개(tip), 가슴연골(breast cartilage)과 껍질(skin)을 참여업체인 (유)하림유통으로부터 공급받았으며 과도한 지방을 제거하여 실험하였다.

제2절 실험방법

1. 원료의 전처리

(유)하림유통으로부터 공급된 각각의 시료는 -60°C 에서 동결시킨후 Hammer mill(국산, 한국식품개발연구원 개발)로 분쇄하였다. 분쇄 후 원료별로 1kg씩 소포장하여 -60°C 에서 저장하면서 추출시험에 임하였다.

2. 일반성분 분석

지방을 제거한 후에 껍질, 날개끝, 연골의 수분, 조단백, 조지방 및 회분을 측정하였다. A.O.A.C 방법에 준하여 수분함량은 0.002g 이하의 유의차를 향량으로 하여 105°C 상압가열건조법으로 측정하였고, 조지방 함량은 Soxhlet 추출법으로 측정하였으며 조단백질 함량은 Micro Kjeldahl 방법으로 측정하여 질소보정계수 6.25를 곱하였으며, 그리고 회분 함량은 건식법으로 측정하였다.

3. 염가용성 및 산가용성 콜라겐의 조제

Harkness와 Nimnidnk 방법을 약간 수정하였다. -20°C 로 유지된 acetone을 5배량 가하여 30~60분간 방치한 후 상등액을 버렸다. 상등액이 투명해질때까지 acetone 처리를 반복하였고, 이때 남은 고형물을 상

온에서 1~2시간 풍건, 완전히 건조시켰다. 건조시료의 20배량에 해당되는 0.15M NaCl 용액을 가하여 4°C에서 24시간 동안 stirring 하였다. 30,000 × g에서 90분간 원심분리 하여 상등액을 버리고 침전물만 모은 다음, 20배량의 0.5M NaCl을 가하여 4°C에서 24시간 동안 stirring 한 후에, 7,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 거름종이(Whatman No.1)로 거른 여액을 염가용성 콜라겐으로 명명하였다.

상기의 방법으로 추출한 염가용성 콜라겐, 산가용성 콜라겐을 cellulose 투석막(MWCO 10,000)으로 투석한 다음 동결건조하였으며, 동결 건조된 각각의 콜라겐 시료는 -5°C 이하에서 보관하면서 실험하였다.

4. 단백질농도의 측정

단백질 농도는 Biuret법으로 비색정량 하였다.

5. Hydroxyproline 및 Collagen 함량 측정

염가용성 콜라겐, 산가용성 콜라겐에 존재하는 Hyp 함량을 측정하여 콜라겐 함량을 계산하였다. 동결 건조된 콜라겐 시료 0.1g 에 6N HCl 10ml을 가하고 N₂ gas로 purging 하여 밀봉한 다음 110°C에서 24시간 동안 산가수분해 하였으며, Bergman과 Loxley의 방법중에서 rapid procedure를 이용하여 558nm에서의 흡광도를 측정하여 Hyp 함량을 계산하였다. 콜라겐 함량은 Hyp 함량 × 7.5(계수)로 계산하였다.

6. SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) 분석

콜라겐 및 펩타이드의 전기영동 샘플은 각각의 powder를 0.1g 측량한 후 8M urea, 2% SDS, 2% mercaptoethanol, 20mM Tris-HCl(pH 8.0)용액을 단백질 농도 2mg/ml가 되도록 첨가한 후 100°C에서 2분간 가열하였다. 그런 다음 실온에서 24시간 동안 교반하여 가용화 시켰다.

SDS-PAGE는 Laemmli 및 K. Webber and M. Osborn의 방법에 따라

실시하였다. 즉, 고분자 콜라겐의 경우는 5% polyacrylamide gel을 이용한 Webber and M. Osborn의 방법에 따라 수행하였으며, 펩타이드는 10% polyacrylamide gel을 이용한 Laemmli의 방법에 따라 수행하였다. 시료의 공시량은 20~40ug 이었다.

전기영동 분자량 표준물질(marker protein)은 분자량이 29K, 45K, 66K, 97.4K, 116K 및 205K로 구성된 Sigma사 제품으로 사용하였다.

7. 효소처리

각 타입의 콜라겐 시료에 시판되고 있는 효소를 이용하여 콜라겐을 소화 시켰으며, 효소의 종류 및 그 특성은 Table 1과 같다.

Table 1. Characteristic of enzyme

Enzyme	Usable pH	Optimum Temp. °C	Origin	Type
Papain 30,000	3.0 ~ 9.0	55	Carica papaya	Endo
Bromelain	4.6 ~ 6.0	50	Pineapple stem	
HT-Proteolytic	6.5 ~ 8.0	55	<i>Bacillus subtilis</i>	Endo
GC-710	6.0 ~ 8.0	50	<i>Bacillus</i>	Endo
AFP 2000	2.5~3.5	50	<i>Aspergillus niger</i>	Exo

염가용성 콜라겐은 Papain 30,000, Bromelain, HT-Proteolytic, GC-710을 이용하여 반응시켰으며, 효소 농도는 0.01% 및 0.05%, 반응 온도 및 시간은 50°C 및 0~30분간으로 하였다. 산가용성 콜라겐은 Papain 30,000, Bromelain, AFP 2000을 이용하여 반응시켰으며, 반응 조건은 염가용성 콜라겐의 시료와 마찬가지로 효소 농도는 0.01% 및

0.05%, 반응온도 및 시간은 50℃ 및 0~30분간으로 하였다.

8. 콜라겐의 점도 측정

콜라겐의 점도는 Ostwald-type 점도계를 이용하여 측정하였다. 염가용성 콜라겐은 0.5M NaCl 용액에, 산가용성 콜라겐은 0.5M citrate buffer(pH 3.6) 용액에 0~1%가 되도록 첨가한 후 상온에서 2시간 동안 교반하여 25℃에서 측정하였다.

9. 콜라겐의 용해도 측정

콜라겐 농도를 0~1%가 되도록 조절한 후 상온에서 2시간 동안 교반하여 가용화 시켰다. 그런 다음 10,000 × g에서 30분간 원심분리한 후 상층액 중의 단백질 농도를 biuret법(540nm)으로 비색 정량하여 전체의 단백질 함량에 대한 상층액 중의 단백질 함량을 백분율로 계산하여 용해도로 하였다. 즉, 용해도는 이하의 식에 의해서 산출되었다.

$$\text{용해도(\%)} = (\text{상층액의 단백질 농도} / \text{총단백질 농도}) \times 100$$

가용화는 염가용성 콜라겐의 경우 0.5M NaCl을 사용하였으며, 산가용성 콜라겐은 0.5M citrate buffer(pH 3.6)를 사용하였다.

한편, 펩타이드의 용해도는 증류수에 0~2%를 첨가하여 30분간 교반한 후 원심분리 전, 후의 시료를 216nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다.

10. 탁도 측정

탁도는 콜라겐 함량을 0~1%가 되도록 조절하였으며, 상온에서 2시간 동안 교반한 후 260nm에서 측정하였다. 염가용성 콜라겐은 0.5M NaCl,

산가용성 콜라겐은 0.5M citrate buffer(pH3.6)를 사용하였다.

11. HPLC 분석

Table 3. Conditions of HPLC analysis

Column	protein pak 125 [7.8mm(ID)×30cm]
Buffers	Phosphate(pH7.2)에 안정화
Sample preparation and filtration	Usa HPLC grade solvents, filtered to 0.45 microns
Pressure	3500psi
Maximun Flow Rate	1 ml/min
Detectors	254nm or 280nm (UV)
Mobile Phase	100% Methanol
Test Sample Peak	1.2 Dichlorobenzene

콜라겐 및 콜라겐 유래의 펩타이드는 Table3의 조건하에서 수행하였다.

12. ACE 저해도의 측정

ACE 저해활성은 Cushman과 Cheung (1971)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 시료를 일정농도로 조제한 후 50uL 첨가한 다음 0.1

M sodium borate buffer(pH 8.3, 300mM NaCl 함유) 100uL 첨가하고

ACE 조효소액을 50uL 첨가하였다. 37°C에서 30분간 preincubation 한 다음 25mM HHL (107.4mg/10ml sodium borate buffer) 50 μ l를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 1 N HCl 용액 250uL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응이 멈춘 용액에 ethyl acetate 1.5ml를 가하여 15초간 교반한 후, 원심분리(2,500 \times g, 5min)시켜 상층액 1ml를 취한다. 이 상층액을 완전히 건조시킨 후 증류수 1ml를 가하여 용해시키고, 228 nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해율을 계산하였다.

$$\text{ACE inhibitory activity(\%)} = [1 - (\text{대조구/실험구})] * 100$$

13. 항산화능의 측정

콜라겐 펩타이드물의 항산화 작용은 Antioxidant effect manual (Bliss method, 1958)방법에 따라 실험하였다. 즉, Methanol로 각각의 sample을 일정한 농도로 맞춘 후 sample용액 4mL을 취한 다음 1mL DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl methanol solution, 1.5×10^{-4} M)를 첨가하였다. 상온에서 30분간 방치한 후 520nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 DPPH양을 측정하였다.

$$\text{항산화 작용 (\%)} = [1 - (\text{시료구/대조구})] \times 100$$

15. 미생물의 측정

Pour plate 법에 의해 생균수를 측정하였다. 즉, 펩타이드를 첨가하여 제조한 음료수를 상온 및 4°C에서 보관하면서 각각의 시료를 단계로 희석시킨 시료 1ml에 Nutrient Agar를 부어 굳힌 후 37°C에서 24~36시간 배양한 생균수를 측정하였다.

제 2 장 결과 및 고찰

제 1 절 도계 부산물로부터 콜라겐의 적정 제조조건 확립

1. 도계 부산물의 일반성분

닭의 부산물인 껍질, 날개 및 연골의 일반성분을 분석하여 Table 4에 제시하였다. 껍질의 일반성분은 수분이 약 50.3%, 조단백 22.1%, 조지방 27.0%, 회분 0.32%, 기타 0.28% 이었으며, 날개는 각각 수분 58.7%, 조단백 18.4%, 조지방 16.2%, 회분 6.47%, 기타 0.27% 이었다. 연골의 경우는 수분 68.3%, 조단백 19.6%, 조지방 1.8%, 회분 7.2%, 기타 0.68%를 나타내었다. 이상의 결과로부터 시료에 따른 비교분석을 하면 수분함량은 연골이 가장 높았으며, 조단백은 각각 약 18~22%로 높은 단백질 함량의 시료간의 큰 차이는 인정되지 않았다. 만일 이와 같은 조단백이 대부분 콜라겐으로 예상하면 콜라겐을 이용한 음료개발의 시료로 적합할 것으로 사료되었다. 한편, 조지방의 경우는 시료에 따라서 크게 상이하였으며 껍질 및 날개는 약 19~24%, 연골은 1.6%로 나타나, 본 실험을 수행하는데 있어서 껍질 및 날개의 경우는 세심한 주의를 요할 것으로 사료되었다.

Table 4. Composition of by-product from chicken

By-product	Composition(%)				
	Moisture	Protein	Fat	Ash	Others
Skin	50.3	22.1	27.0	0.32	0.28
Tip	58.7	18.4	16.2	6.47	0.27
Cartilage	68.3	21.8	1.6	7.86	0.44

2. 콜라겐의 제조

콜라겐을 제조하는데 있어서 특히 연골의 경우는 일반적인 cutter나 chopper를 사용하면 분쇄하는데 매우 어려움이 있으며 분쇄를 하더라도 큰 덩어리 형태로 밖에 분쇄되지 않는다. 또한 분쇄 과정 중 마찰열에 의한 온도상승으로 단백질의 변성을 유발시켜 콜라겐의 수율을 저하시키는 요인이 된다. 따라서 본 연구에서는 새로운 시료의 전처리 방법인 냉동분쇄기(한식연 개발)를 이용하여 시료를 분쇄한 후 콜라겐을 추출하는 공점법으로 콜라겐을 추출하였다.

동결분쇄기는 일반적으로 냉매(액화질소, 액화천연가스등)의 소비가 필요한 분쇄환경을 만들기 위해 저온유지를 위한 고가의 공정이 필요한 기기장치이나 본 연구에 사용된 동결분쇄공정은 동결분쇄상의 냉각설비나 냉매의 사용이 필요없고 또한 Frozen cutter 나 Chopper를 사용하여 분쇄하는 방식이 아닌 동결원료 자체의 품온으로 직접 분쇄하여, 분쇄되어진 재료의 품온이 영하 5℃~영하 10℃를 유지할 수 있는 기술로서 상온에서 연속적으로 작업이 가능한 공정이다.

따라서, 본 공정에서는 일반적인 냉매 사용으로부터 원료의 저온처리가 유지되는 원리로부터 초기부터 원료를 일반동결고에서 동결시키고 그 차가운 품온을 이용하여 분쇄물의 빙결정을 형성시킨 후 햄머의 충격에 의해 빙결정이 깨어지면서 작은 알갱이를 만들 수 있도록 되어 있는 장치이다.

Fig. 1에는 동결분쇄기(햄머밀)의 내부구조를 나타내었다. 총 10개의 햄머로 구성되어 있으며, 그 밑 부분에 약 8mm size의 망이 설치되어 있어 최소한 8mm 이하의 분쇄물 만이 통과되도록 구성되어 있다. 통과되지 못한 분쇄물은 계속해서 8mm보다 작은 size의 분쇄물이 될 때까지 분쇄되는 특성을 지니고 있다.

Table 5에는 햄머밀의 기기적 특성을 제시하였다. main motor는 5.5 kw, 7.5HP, 60HZ로서 최대 1,740회/분의 회전력으로 작동된다. 또한, 시료처리는 250kg/시간의 능력을 지니고 있다.

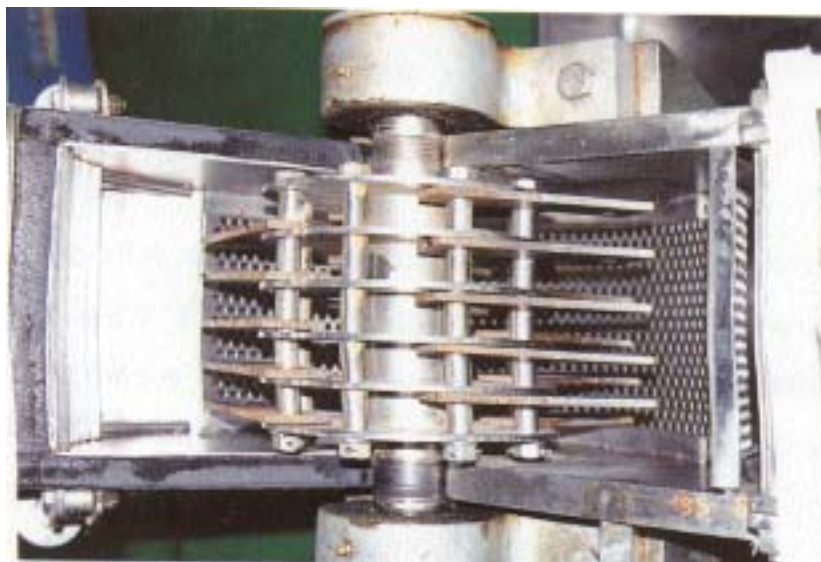


Fig. 1. Inner part of hammer mill

Table 5. Mechanical characteristic and dimension of pulverator.

Specification	Cryogenic Crusher
Manufacture	Korea
Main Motor	5.5KW, 7.5HP, 60HZ
r.p.m	1,740
Sieve size	Each 8mm hole, round type
Standard Capacity	250kg/hr
Weight	200kg

각각의 시료를 -60°C 에서 동결시킨 후 Fig. 1의 기기로 분쇄하였을 때의 분쇄물의 온도를 측정하여 Table 1에 결과를 제시하였다. 날개 분쇄물의 온도는 -8.9°C 이었으며, 연골은 9.4°C , 껍질은 -5.9°C 를 나타내었다. 이상의 결과는 시료의 종류에 따라서 분쇄과정 중 온도의 상승속도가 각기 상이함을 나타내었다. 날개 및 연골의 경우는 껍질보다 온도상승 속도가 느리게 나타나는 것으로 나타났는데 이는 분쇄 특성이 시료에 따라 다르다는 것을 반영한 것이며, 즉 연골과 껍질의 조직이 매우 상이하기 때문인 것으로 사료되었다.

Table 6. Temperature of shattered product after cryogenic crushing.

Freezing Temperature (Raw materials)	Temperature of shattered Chicken		
	Tip	Cartilage	Skin
-60°C	-8.9°C	-9.4°C	-5.9°C

각각의 분쇄물을 20배 배율의 확대경을 이용한 Image analysis를 수행하여 결과를 Fig. 2에 제시하였다. 껍질의 경우는 전체적으로 근육이 긴섬유형태로 분쇄되는 경향이었으나, 연골 및 날개의 경우는 조각난 형태의 구조가 관찰되었다. 이와 같은 경우는 각각의 시료의 구성성분이 다르기 때문인 것으로 사료되었다. 즉 Table 4에서도 설명한 것과 같이 회분의 함량이 껍질 보다 연골 및 날개에서 많이 검출되었다는 점으로 미루어 볼 때 Ca 등과 같은 무기 성분이 많이 함유되어 있기 때문인 것으로 사료되었다.

Skin



Cartilage



Tip

Fig. 2. Structure of shattered product by hammer mail.

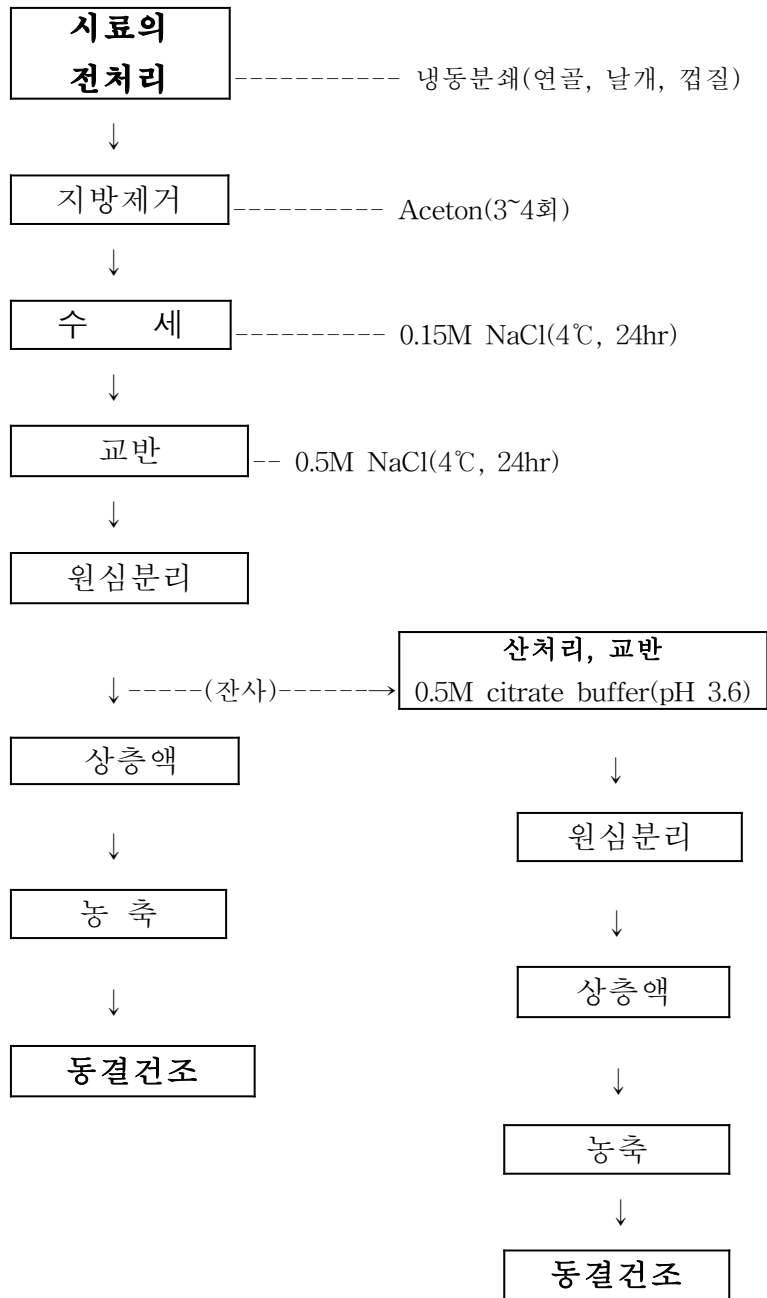


Fig. 3. Preparation of collagen from by-product of chicken.

3. 콜라겐의 수율

콜라겐의 수율을 조사하기 위하여 대조구로서 전체 단백질 함량은 Fig. 4과 같이 카제인에 의해서 산출된 검량 곡선으로부터 그 함량을 측정하였으며, 콜라겐의 함량은 Fig. 5에 제시한 hydroxyproline의 함량의 검량 곡선으로부터 산출하였다.

우선 Fig. 4에 제시한 전체 단백질을 산출하기 위한 검량선은 $y = ax + b$ 의 식이 성립되었다. Fig. 5에 제시한 hydroxyproline의 검량선은 $y = ax + b$ 를 나타내었으며, 이후 총 단백질 함량 및 콜라겐 함량은 각각의 식에 의해서 산출하였다.

콜라겐을 Fig. 2와 같이 조제한 후 수율을 조사하여 결과를 Fig. 5에 제시하였다. 껍질의 경우 조단백질 함량이 22.32%에 대하여 콜라겐 함량이 20.29%로 조단백질에 대한 콜라겐의 비율이 약 91%로서 조단백질의 대부분의 성분은 콜라겐인 것으로 사료되었다.

날개끝 부분의 조단백질 함량은 19.4%로서 껍질과 비교하여 약간 낮은 경향을 나타내었으며, 이에 대한 콜라겐 함량은 13.52%로 조단백질 함량의 약 70%를 차지하여 껍질과 비교하였을 때 매우 낮은 콜라겐 비율을 나타내었다.

한편, 연골의 경우에 있어서는 콜라겐의 비율이 조단백질의 약 86%로 비교적 높게 나타났다.

따라서, 닭의 부산물 중의 부위에 따른 콜라겐 함량을 비교하여 볼 때 껍질이 가장 경제적인 것으로 사료되었으며, 연골에 있어서도 비교적 경제적이라 할 수 있었으며, 날개끝은 경제적인 측면에 있어서 부산물 중 가장 낮은 것으로 사료되었다.

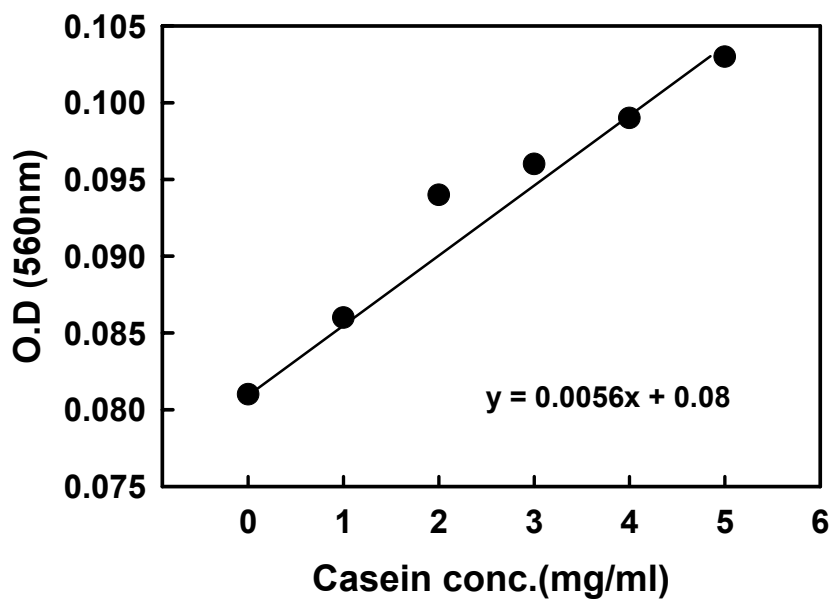


Fig. 4. Standard curve of protein concentration using casein.

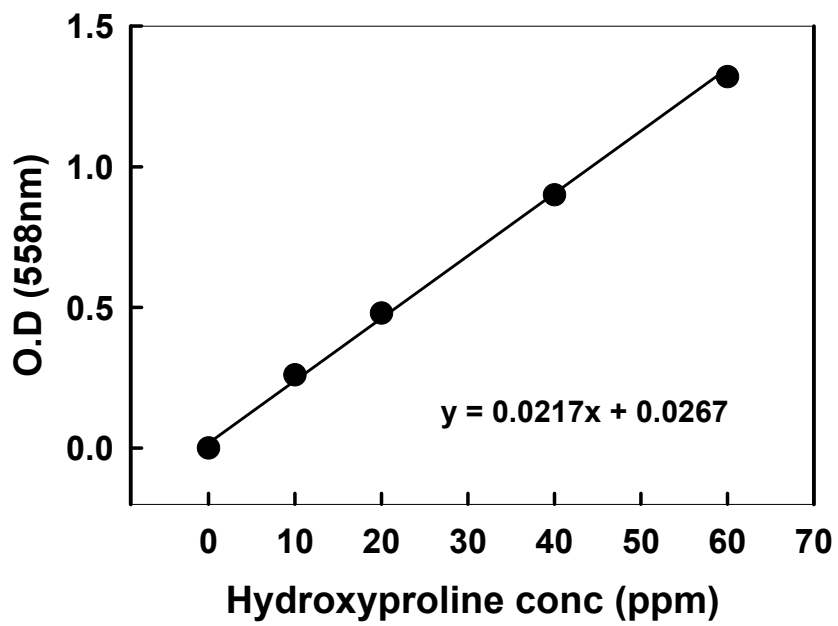


Fig. 5. Standard curve for calculation of collagen concentration using hydroxyproline.

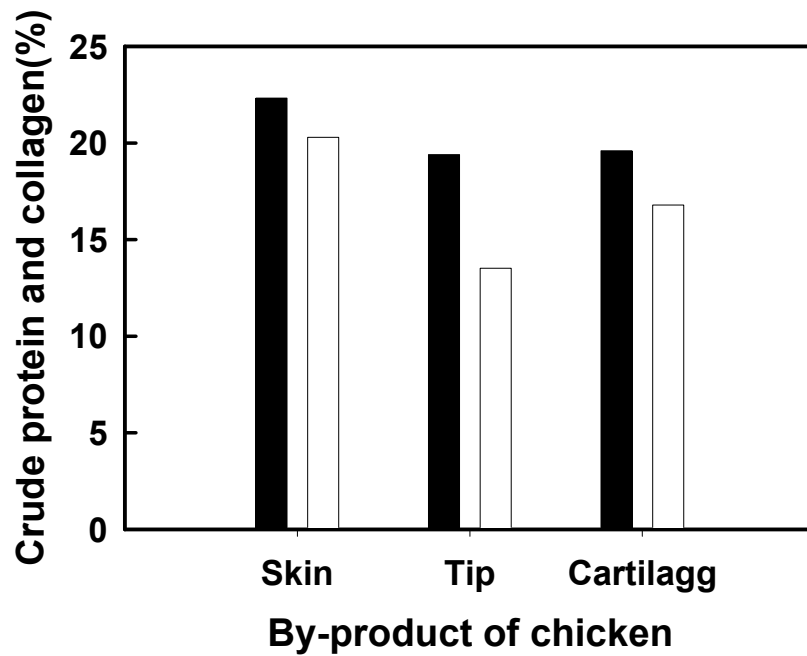


Fig. 6. Comparison between crude protein and crude collagen content prepared from by-product of chicken .

■ : Crude protein □ : Collagen

각각의 부산물로부터 콜라겐을 추출한 후 산가용성 및 염가용성의 타입별로 나누어 함량을 조사하여 Fig. 7, Fig. 8 및 Fig. 9에 결과를 제시하였다.

우선, 껍질로부터 제조한 산가용성 및 염가용성의 콜라겐 함량은 Fig. 7과 같다. 조단백질에 대한 산가용성 콜라겐의 비율은 33.6%이었으며, 염가용성 콜라겐의 비율은 57.3%로 산가용성과 비교하여 월등히 높은 비율을 차지하였다.

날개로부터 제조한 산가용성 및 염가용성의 콜라겐 함량은 Fig. 8과 같다. 조단백질에 대한 산가용성 콜라겐의 비율은 22.5%였으며, 염가용성 콜라겐의 비율은 44.1%로 산가용성에 비교하여 월등히 높은 비율을 차지하였다.

연골로부터 제조한 산가용성 및 염가용성의 콜라겐 함량은 Fig. 9와 같다. 조단백질에 대한 산가용성 콜라겐의 비율은 26.6%였으며, 염가용성 콜라겐의 비율은 59.4%로 산가용성과 비교하여 월등히 높은 비율을 차지하였다.

이상의 결과로부터 닭의 3종의 부산물의 콜라겐은 그 종류와는 상관없이 산가용성 보다는 염가용성 성분이 많이 검출되었으므로 경제적인 측면에서 볼 때 염가용성 콜라겐을 활용하는 것이 적합한 것으로 사료되었다. 한편, 조단백질 중에는 알칼리 가용성 성분도 포함되어 있을 것으로 사료되나, 매우 미비할 것으로 추측되어 본 연구에서는 검토를 생략하였다.

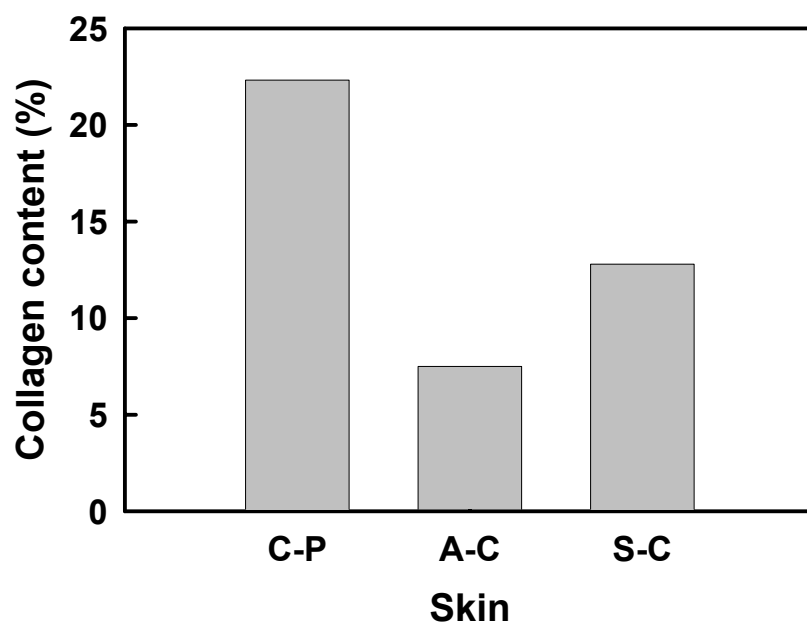


Fig. 7. Comparison between acid-soluble and salt-soluble collagen content prepared from skin of chicken .

C-P : Crude protein

A-C : Acid-soluble collagen

S-C : Salt-soluble collagen

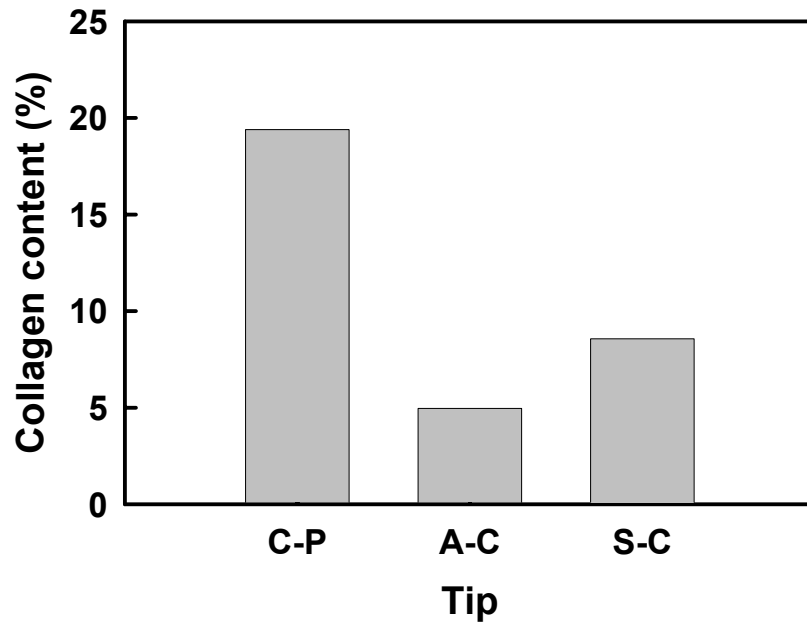


Fig. 8. Comparison between acid-soluble and salt-soluble collagen content prepared from tip of chicken .

C-P : Crude protein

A-C : Acid-soluble collagen

S-C : Salt-soluble collagen

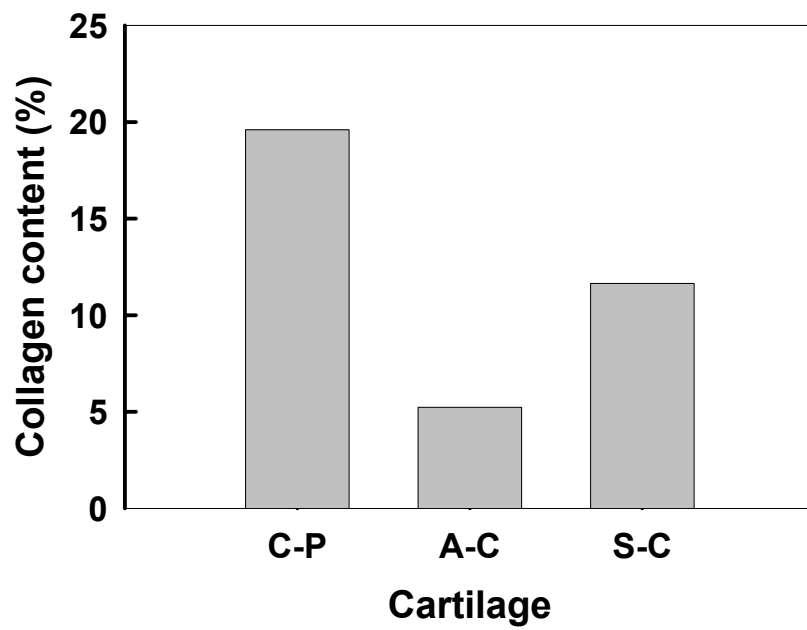


Fig. 9. Comparison between acid-soluble and salt-soluble collagen content prepared from cartilage of chicken .

C-P : Crude protein

A-C : Acid-soluble collagen

S-C : Salt-soluble collagen

4. 타입별 콜라겐의 subunit 조성

닭의 껍질, 날개 및 연골로부터 추출한 산가용성 콜라겐의 Subunit 성분을 SDS-PAGE로 분석하여 Fig. 10에 나타내었다.

껍질(B) 및 날개(C)의 경우는 분자량 약 20만에 상당하는 2개의 밴드와 껍질의 최상단 부분에서 검출되는 거대 분자로 사료되는 성분이 관찰되었다. 한편, 연골(D)의 경우는 분자량 20만, 120만(2개)에 상당하는 성분이 관찰되었으며, E에 제시한 산가용성 콜라겐의 대조구(sigma제품)와 유사한 경향의 패턴을 나타내었다.

닭의 껍질, 날개 및 연골로부터 추출한 염가용성 콜라겐의 Subunit 성분을 SDS-PAGE로 분석하여 Fig. 11에 나타내었다. 껍질(B)의 경우는 분자량 약 20만에 상당하는 2개의 밴드와 약 6.6만 및 2.9만에 상당하는 성분들이 주요 성분으로 관찰되었다. 이밖에도 껍질의 최상단 부분에서 검출되는 거대 분자로 사료되는 성분과 여러개의 미량 성분들이 관찰되었다.

날개(C)의 경우는 분자량 6.6만에 상당하는 성분이 주요 성분으로 검출되었으며, 그 외에 여러 개의 미량성분들이 관찰되었다.

연골(D)의 경우는 약 9.7만의 밴드가 주요 성분인 것으로 관찰되었으며, 분자량 약 20만, 12만, 6.6만, 4.5만 등의 미량 성분들이 관찰되었다.

이상의 결과로부터 부위에 따라서 콜라겐의 Subunit 성분에 있어서 큰 차이가 있었으며, 이러한 성분들은 어떠한 타입의 콜라겐에 해당되는지 좀더 자세한 연구를 필요로 하였다.

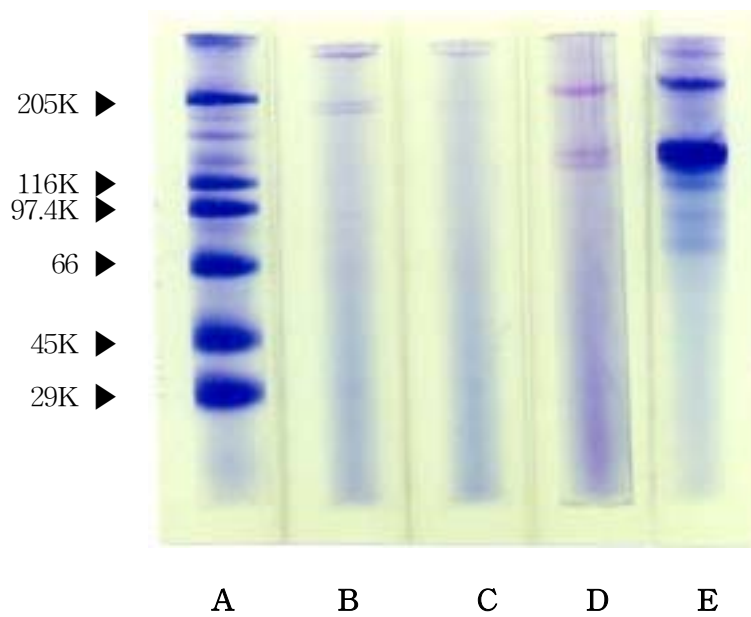


Fig. 10. SDS-PAGE patterns of acid-soluble collagen

A: standard of molecular weight

B: Skin C: Tip

D: Cartilage

E: Commercial acid-soluble collagen

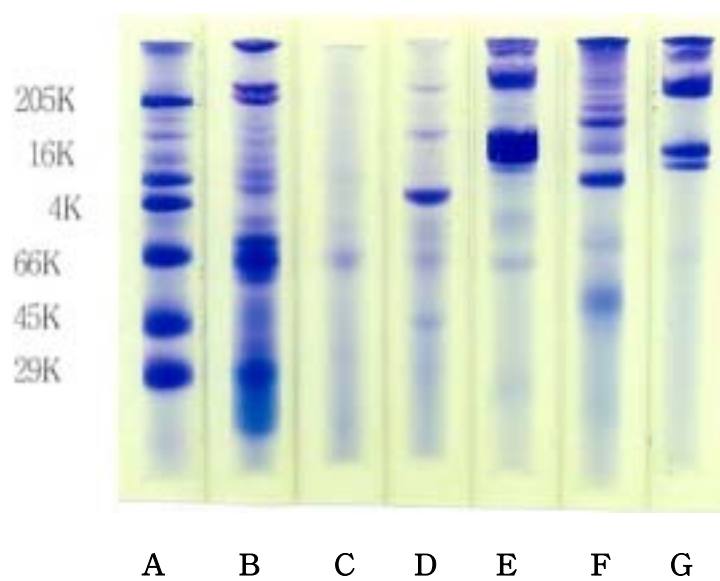


Fig. 11. SDS-PAGE patterns of salt-soluble collagen.

- A: standard of molecular weight
- B: Skin C: Tip
- D: Cartilage
- E: Commercial collagen II type
- F: Commercial collagen VI type
- G: Commercial collagen VII type

5. 콜라겐의 가공적성(기능성) 분석 및 음료화 가능성 검토

닭의 부산물인 껍질, 날개, 연골로부터 추출한 염가용성 및 산가용성의 콜라겐 분말을 색차계에 의해서 분석한 결과를 Table 7에 제시하였다. L값(밝기)에 있어서는 연골로부터 추출한 염용성 콜라겐이 가장 높게 나타났으며, 다음으로 연골의 산가용성, 껍질의 염, 산가용성 날개의 산가용성, 염가용성의 순으로 나타났다. a값(적색도)에 있어서는 날개의 염가용성이 가장 높게 나타났으며, 다음으로 날개의 산가용성, 날개의 염가용성, 껍질의 산가용성, 염가용성, 연골의 염가용성, 산가용성의 순으로 나타났다. 한편, b값(황색도)은 껍질의 염가용성, 날개의 염가용성, 날개의 산가용성, 껍질의 산가용성 연골의 산가용성, 염가용성의 순으로 나타났다.

Table 7. Color of salt and acid-soluble collagen prepared from by-product of chicken

By-product \ Color		Color			
		L	a	b	ΔE
Skin	Salt-soluble	91.482	+0.212	+11.495	11.7
	Acid-soluble	91.68	+0.32	+6.183	7.4
Tip	Salt-soluble	85.85	+3.98	+10.46	15.1
	Acid-soluble	89.06	+0.9667	+6.583	15.1
Cartilage	Salt-soluble	99.104	-0.04	+1.248	1.6
	Acid-soluble	96.646	-0.244	+2.744	1.4

이상의 결과를 종합하여 볼 때 밝기에 있어서는 전체적으로 연골로부터 추출한 콜라겐이 밝게 나타났으며, 상대적으로 적색도 및 황색도는 낮게 나타나는 현상을 보였으므로 음료수를 제조할 때 색택에 크게 영향을 미치지 않는 연골을 이용하는 것이 유리할 것으로 사료되었다.

다음은 가공적성에 있어서 중요한 포인트 중의 하나인 콜라겐의 첨가 농도에 따른 점도를 측정하였다. Fig.12 에는 각각의 부산물로부터 추출한 산가용성 콜라겐의 첨가 비율에 따른 점도의 결과를 나타내었다. 산가용성 콜라겐을 0.5M Citrate buffer(pH 3.6)에 가용화 시킨 후 Ostwald 점도계를 이용하여 25℃에서 측정한 결과, 부위에 관계없이 콜라겐 첨가 비율이 높아질수록 점도는 상승하는 경향을 나타내었다. 즉 콜라겐의 비율이 약 0.6%까지는 급속히 증가하는 경향이었으나, 그 이상의 농도에서는 그 속도가 느려지는 경향을 나타내었다.

한편, 염가용성 콜라겐의 점도는 0.5M NaCl의 용액속에 Fig. 12와 같은 콜라겐 함량을 첨가하여 측정하였으며 그 결과를 Fig. 13에 나타내었다. 이 결과에 있어서도 Fig. 12의 결과와 매우 유사한 경향을 나타내었으나, 산가용성 보다는 약간 낮은 점도를 나타내었다. 이상의 결과를 고찰하면 고분자인 콜라겐을 그대로 첨가하면 매우 높은 점도를 나타내는 결과를 초래하였으며, 이는 첨가량이 높아질수록 그 속도가 빠르게 나타나는 경향이었으므로 고분자 성분의 양에 비례하여 상승하는 것으로 사료되었다.

Fig. 14에는 산가용성 콜라겐의 0.5M Citrate buffer(pH 3.6)에 대한 용해도를 첨가 비율과의 관계로 측정하여 결과를 제시하였다. 이 결과에 의하면 첨가비율 약 0.3%까지는 서서히 저하하는 경향을 나타내었으나, 그 이상의 콜라겐을 첨가하면 급격히 용해도가 저하하는 경향을 나타내었다. 또한 Fig. 15에 제시한 염가용성 콜라겐의 용해도의 결과에 있어서도 산가용성과 매우 유사한 경향을 나타내었다. 즉, 이와 같은 결과는 각각의 시료로부터 콜라겐을 추출할 때에는 용이하게 각각의 용액에 대하여 가용화 되었음에도 불구하고 동결건조에 의한 분말화된 콜라겐을 다

시 각각의 용액에 가용화 시켰을때에는 불용화 성분이 대량 검출되었는

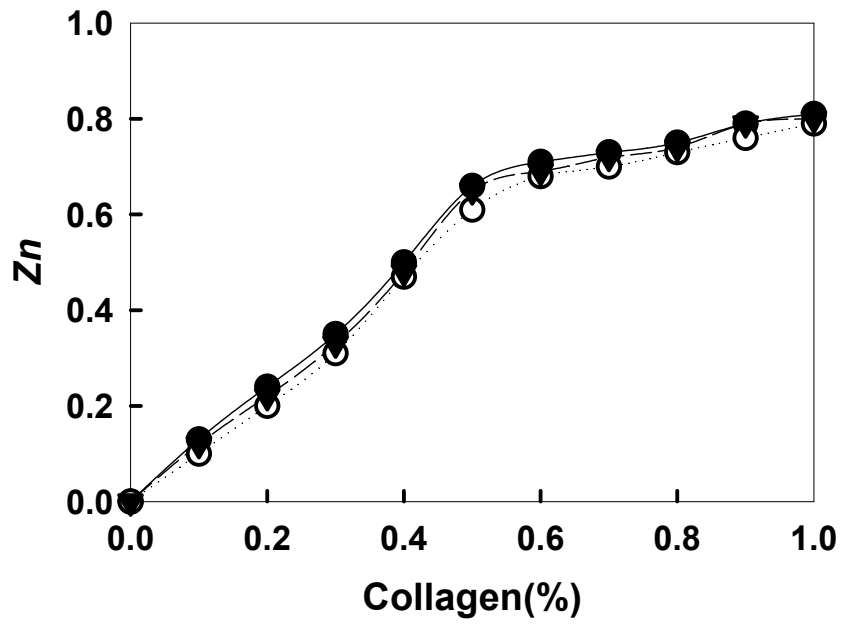


Fig. 12. Changes in viscosity of acid-soluble collagen prepared from by-product of chicken.

—●— : Cartilage, —○— : Skin, —▼— : Tip

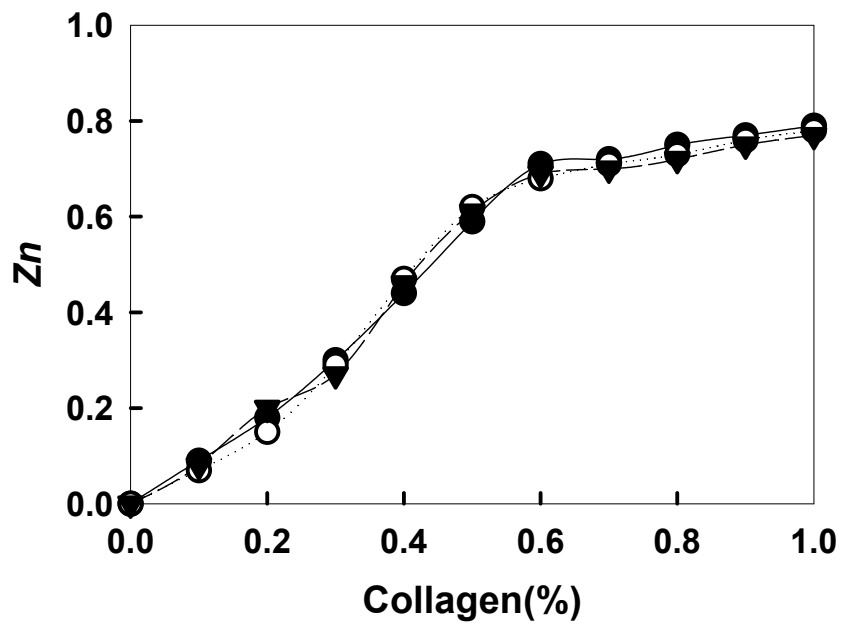


Fig. 13. Changes in viscosity of salt-soluble collagen prepared from by-product of chicken.

-●- : Cartilage, -○- : Skin, -▼- : Tip

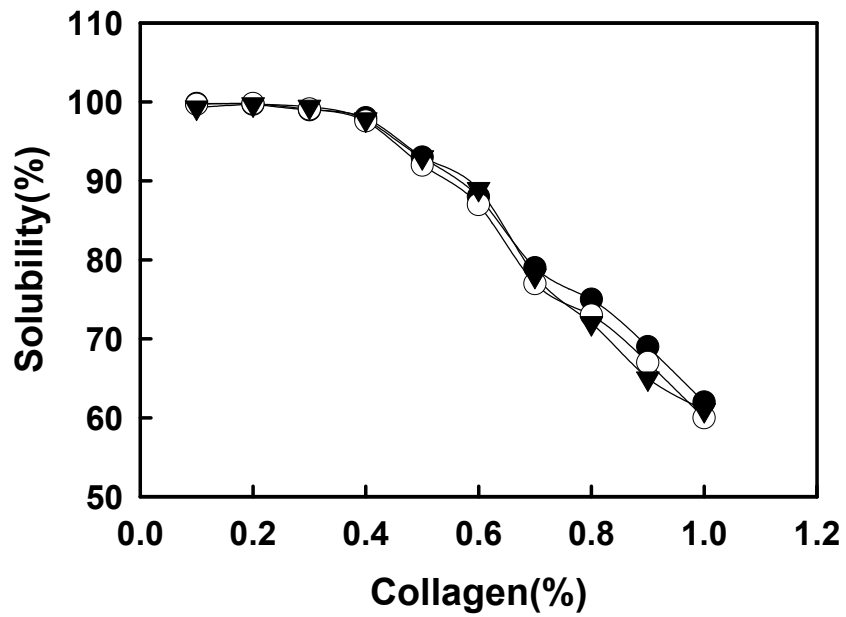


Fig. 14. Changes in solubility of acid-soluble collagen prepared from by-product of chicken.

-●- : Cartilage, -○- : Skin, -▼- : Tip

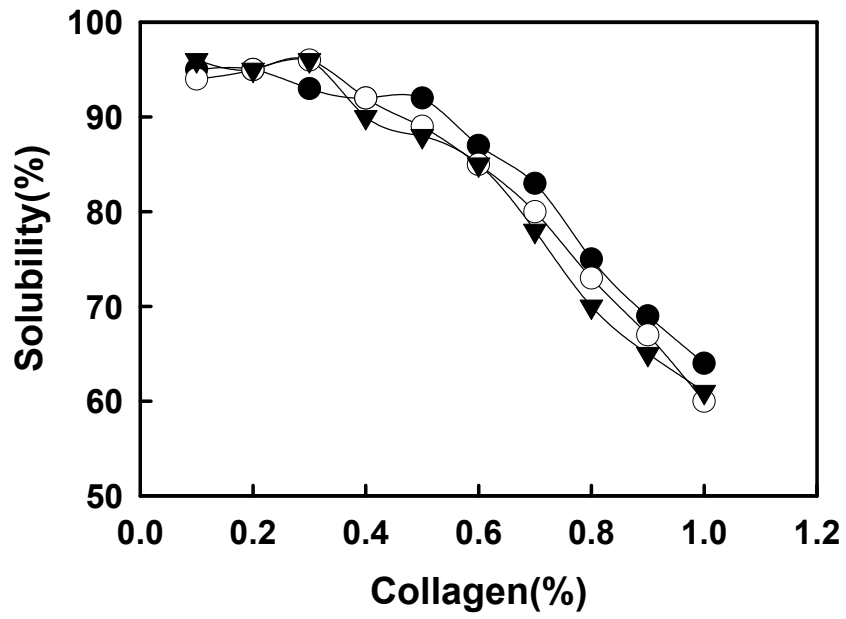


Fig. 15. Changes in solubility of salt-soluble collagen prepared from by-product of chicken.

-●- : Cartilage, -○- : Skin, -▼- : Tip

데 이는 분말화 과정 중 콜라겐의 구조적인 변화가 이루어졌기 때문인 것으로 추측되었다.

Fig. 16에는 산가용성 콜라겐을 0.5M Citrate buffer(pH 3.6)에 첨가하여 24시간 동안 교반한 후 측정된 탁도를 나타내었다. 이 결과에 의하면 콜라겐의 첨가비율 0.3% 이상에서 증가하기 시작하였으며, 그 후 콜라겐 첨가량이 많아질수록 급격히 탁도가 증가하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 시료의 종류와 상관없이 거의 유사한 경향이었다.

Fig. 17에는 염가용성 콜라겐을 0.5M NaCl 용액에 첨가하여 측정된 탁도의 결과를 나타내었다. 이 결과에 있어서도 산가용성 콜라겐의 경향과 유사한 결과를 나타내었다.

이상의 Fig. 12, 13의 점도, Fig. 14, 15의 용해도 및 Fig. 16, 17의 탁도 등의 결과로부터 종합하여 고찰하면 점도가 상승할 때 탁도는 증가하였으며, 용해도는 저하하는 결과였다. 이 결과는 3자간의 관계에 있어서 일치하는 경향이었다. 즉 콜라겐을 산 또는 염에 첨가하였을 때 점도 및 탁도가 증가하는 것은 고분자 성분이 많이 포함되어 있어 용액에 대한 용해가 원활히 이루어지지 않기 때문인 것으로 사료되었다. 한편 산가용성 및 염가용성의 콜라겐이 추출시에는 원활히 추출되었는데 반하여 추출 후 냉동 건조에 의하여 분말화된 각각의 콜라겐이 같은 용액에서 용해를 시켰음에도 불구하고 용해도가 급격히 떨어지며, 탁도 및 점도가 급격히 상승하는 것은 분말화 과정에 있어서 콜라겐의 구조적인 변화가 추측되었다. 이에 관한 구조적인 변화의 연구는 앞으로 좀더 자세히 이루어지면 보다 확실한 냉동건조 중의 변화가 밝혀질 것으로 사료되었다. 또한 지금까지의 결과로 볼 때 콜라겐을 그대로 음료수에 적용하기에는 용이하지 않을 것으로 판단되어 쉽게 가용화 할 수 있는 방법을 검토하는 것이 필요할 것으로 사료되었다. 즉 콜라겐을 음료제품으로 개발하기 위해서는 콜라겐의 수용화 기술이 절대적으로 필요하다.

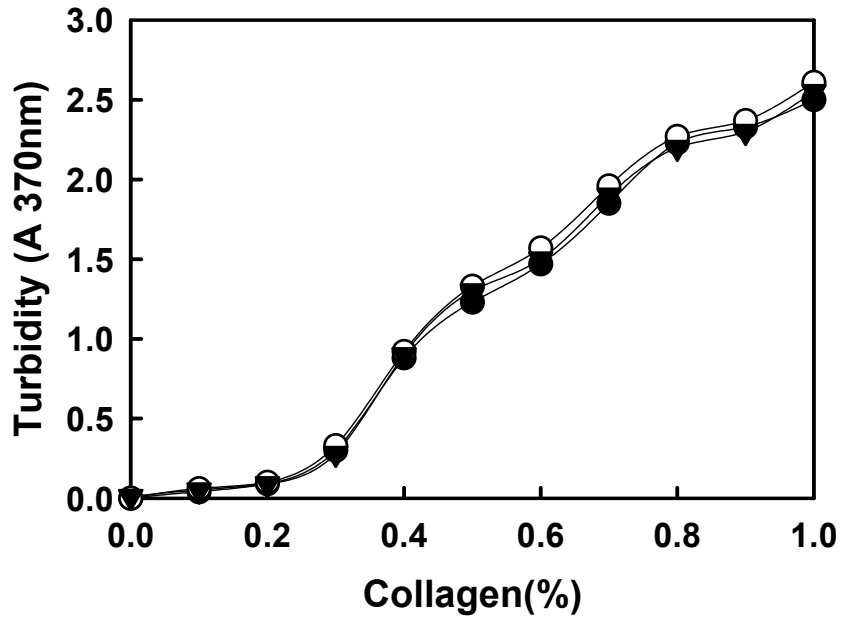


Fig. 16. Changes in turbidity of acid-soluble collagen prepared from by-product of chicken.

● : Cartilage, ○ : Skin, ▼ : Tip

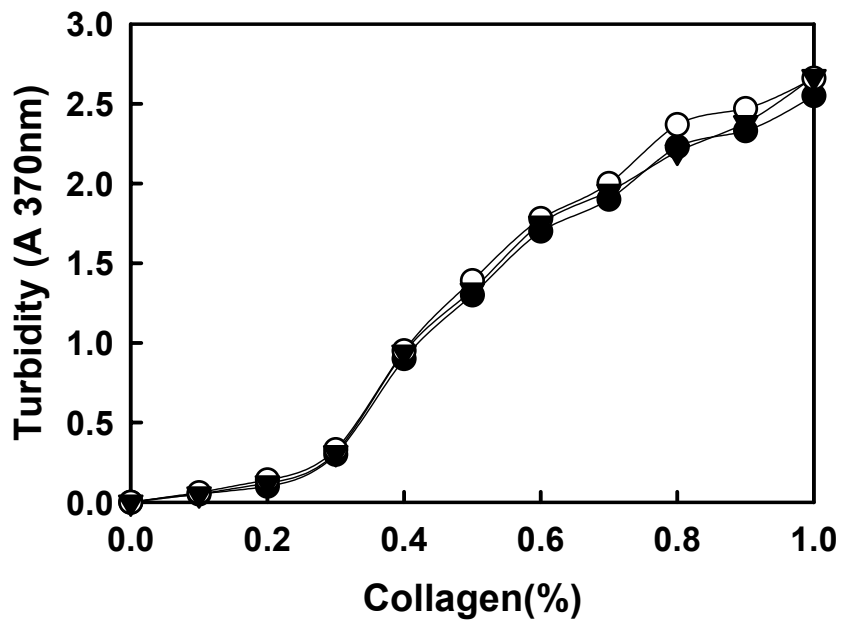


Fig. 17. Changes in turbidity of salt-soluble collagen prepared from by-product of chicken.

● : Cartilage, ○ : Skin, ▼ : Tip

제 2 절 콜라겐으로부터의 기능성 peptide 제조기술 및 가용화 기술 개발

제 1 절에서 기술한 바와 같이 콜라겐을 음료제품으로 개발하기 위해서는 우선적으로 콜라겐을 수용화 하는 것이 절대적으로 필요할 것으로 사료된다. 또한 수용화를 위해서는 단백질 분해 효소를 이용한 콜라겐의 펩타이드화가 필요할 것으로 생각된다. 일반적으로 펩타이드는 분자량의 크기에 따라서 다르지만 분자량 수천의 펩타이드는 ACE 저해능 및 항산화 작용 등이 있는 것으로 알려지고 있다. 따라서 제 2 절에서는 수종의 단백질 분해 효소를 이용하여 콜라겐을 분해시켜 펩타이드를 제조하여 펩타이드의 생리 기능성을 우선적으로 검토한 후 가공적성에 대해서도 검토하여 콜라겐 유래의 기능성 펩타이드 음료의 제조가 가능한지를 조사하였다.

1. 콜라겐의 효소를 이용한 peptide 정제

콜라겐의 펩타이드 정제는 시판되고 있는 papain 30,000(이하 papain으로 칭함), Bromelain, HT-Proteolytic, GC-710을 이용하여 검토하였다. 그 결과 콜라겐의 분해능은 papain 및 bromeline이 우수하게 나타났으나, 효소의 가격면에 있어서 papain이 경제성이 있는 것으로 판단되어 papain을 사용하여 실험을 수행하였다.

Fig. 18에는 파파인 0.01%와 함께 분해시킨 닭개의 염가용성 및 산가용성의 콜라겐의 SDS-PAGE 패턴을 나타내었다. 염가용성의 경우는 파파인을 첨가함으로써 급격한 분해패턴을 나타내었으며, 반응 20분 후에는 분자량 2,000~6,000 정도로 추정되는 성분이 대량으로 검출되었다. 한편, 산가용성 콜라겐의 분해는 반응시간의 경과와 함께 진행되었으나,

염가용성과 비교하여 그 속도가 매우 느렸으며, 분자량 약 36K 및 29K, 5K 등의 성분이 검출되어 파파인에 의한 저분자화(peptide)는 크게 일어나지 않는 것으로 사료되었다. 펩타이드의 생리기능적인 측면에서 고려하면 분자량 약 2,000~6,000 사이의 것이 ACE 저해능과 같은 기능성의 효과가 큰 것으로 알려지고 있어 날개의 산가용성 콜라겐으로부터 추출한 분해산물은 기능성 식품의 소재로 활용하기에는 좀더 자세한 연구를 필요로하였다. 반면, 날개의 염용성 콜라겐을 분해시킨 펩타이드는 분자량 2,000~6,000사이의 펩타이드가 대량 검출되었으며 날개의 경우는 염가용성 콜라겐 유래의 펩타이드를 기능성 식품의 소재로 활용할 수 있을 것으로 사료되었다.

Fig. 19에는 파파인의 함량을 0.05%로 높여서 날개의 산 및 염용성 콜라겐에 첨가하여 반응 시켰을 때의 SDS-PAGE 패턴을 나타내었다. 이 결과에 의하면 염용성 콜라겐의 경우는 Fig. 18에 제시한 0.01%의 파파인을 첨가한 것과 거의 같은 경향의 분해패턴을 나타내었으며, 산가용성의 경우에 있어서도 0.01%에서의 결과와 마찬가지로 콜라겐의 분해속도가 늦게 진행되는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 염가용성 및 산가용성 콜라겐의 분해양상에는 큰 차이가 있었으며 그 특성이 매우 상이한 것으로 사료되었다. 즉 염가용성 콜라겐의 경우 본 연구에서는 구조분석은 수행하지 못하였으나, 분해되기 쉬운 구조를 지니고 있는 것으로 판단되었으며, 산가용성의 경우는 분해되기 어려운 구조를 지니고 있거나, 효소와 기질간의 상호작용이 잘 이루어지지 않는 것인지 이에 대한 연구는 앞으로 계속 이루어져야 할 것으로 사료되었다.

Fig. 20에는 파파인 0.01%와 함께 분해시킨 연골의 염가용성 및 산가용성 콜라겐의 SDS-PAGE 패턴을 나타내었다. 이 결과에 의하면 파파인을 0.01% 첨가함으로써 반응시간 10분만에 원래의 콜라겐 subunit 성분은 소실되었다. 동시에 새로운 subunit가 형성되었으며 겔의 최하단에 나타나는 분자량 약 2,000~6,000으로 추정되는 성분이 관찰되었다. 한편, 산가용성 콜라겐의 경우를 살펴보면 Fig. 19의 날개의 산가용성 콜라겐

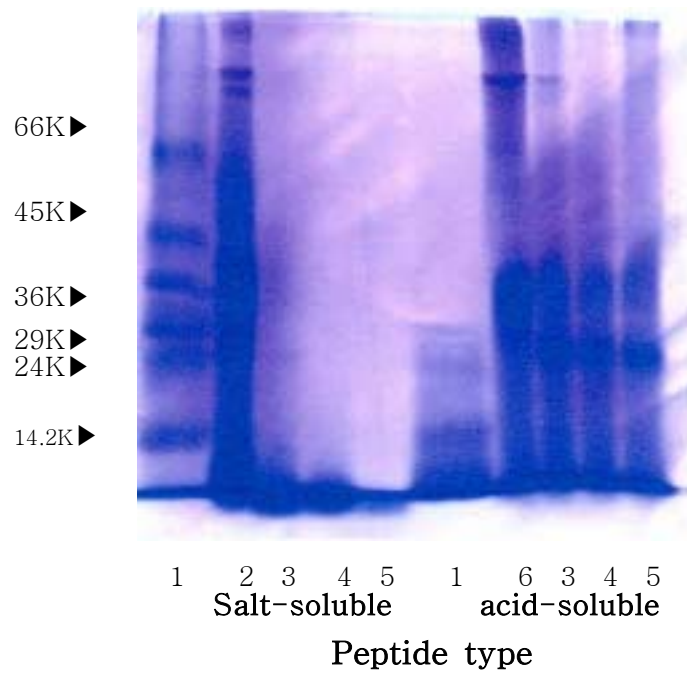


Fig. 18. SDS-PAGE patterns of peptide prepared from salt and acid-soluble collagen of by-product(tip) of chicken.

Collagen peptide prepared using 0.01% papain

- 1 : Molecular weight
- 2 : Salt-soluble collagen
- 3 : Treatment for 10 min with papain
- 4 : Treatment for 20 min with papain
- 5 : Treatment for 30 min with papain
- 6 : Acid-soluble collagen

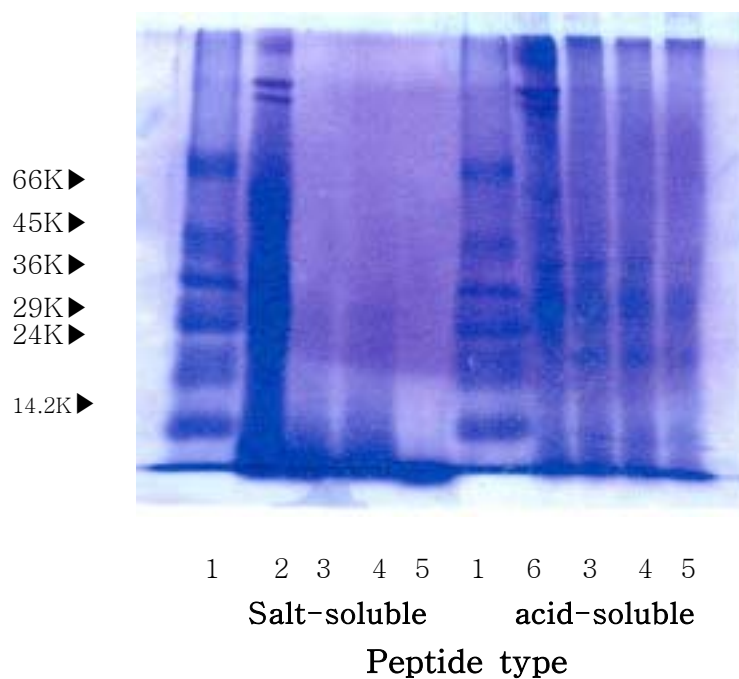


Fig. 19. SDS-PAGE patterns of peptide prepared from salt and acid-soluble collagen of by-product(tip) of chicken.

Collagen peptide prepared using 0.05% papain

- 1 : Molecular weight
- 2 : Salt-soluble collagen
- 3 : Treatment for 10 min with papain
- 4 : Treatment for 20 min with papain
- 5 : Treatment for 30 min with papain
- 6 : Acid-soluble collagen

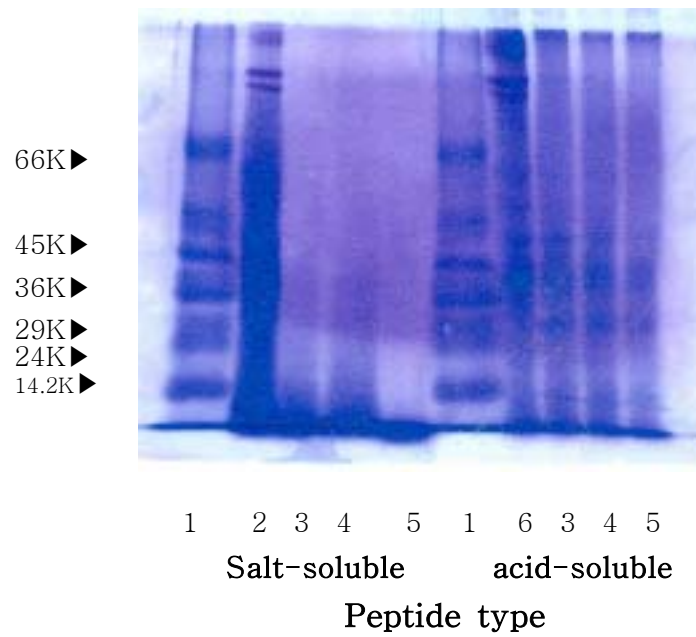


Fig. 20. SDS-PAGE patterns of peptide prepared from salt and acid-soluble collagen of by-product(cartilage) of chicken.

Collagen peptide prepared using 0.01% papain

- 1 : Molecular weight
- 2 : Salt-soluble collagen
- 3 : Treatment for 10 min with papain
- 4 : Treatment for 20 min with papain
- 5 : Treatment for 30 min with papain
- 6 : Acid-soluble collagen

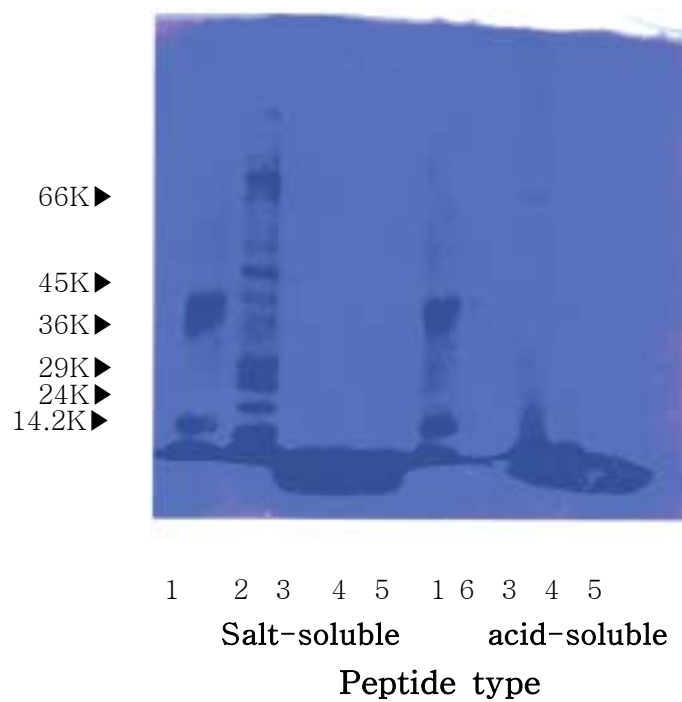


Fig. 21. SDS-PAGE patterns of peptide prepared from salt and acid-soluble collagen of by-product(cartilage) of chicken.

Collagen peptide prepared using 0.05% papain

- 1 : Molecular weight
- 2 : Salt-soluble collagen
- 3 : Treatment for 10 min with papain
- 4 : Treatment for 20 min with papain
- 5 : Treatment for 30 min with papain
- 6 : Acid-soluble collagen

과 거의 같은 패턴이 관찰되었다. 즉, 염가용성과 비교하여 그 속도가 매우 느리게 진행되었으며, 반응 30분이 지나도록 분자량 약 14,000이상의 고분자가 다량 검출되었다. Fig. 21에는 과파인의 함량을 0.05%로 높여서 연골의 산 및 염용성 콜라겐에 첨가하여 반응 시켰을 때의 SDS-PAGE 패턴을 나타내었다. 염가용성의 경우는 0.01%를 첨가한 결과와 같은 경향을 나타내었으나, 산가용성의 경우는 다른 분해패턴을 나타내었다. 즉 산가용성 콜라겐의 경우는 효소첨가량을 늘리면 급격히 분해되는 양상을 나타내었으며, 반응시간 10분만에 분자량 2,000~8,000으로 추정되는 성분이 관찰되었다. 이상의 결과로부터 연골의 경우는 날개의 분해패턴의 양식에 있어서 다소 다르게 나타났다. 날개의 경우 산가용성 콜라겐은 효소 농도를 달리(증가)하여도 콜라겐의 분해가 잘 일어나지 않았으나 연골의 산가용성 콜라겐은 효소 첨가량을 높이면 염가용성 콜라겐과 마찬가지로 원활히 분해가 일어나 분자량 2,000~8,000사이의 저분자로 형성되는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 같은 산가용성 콜라겐일지라 하더라도 부위(부산물)에 따른 콜라겐의 특성이 각기 틀리며 구조적으로 상이하기 때문인 것으로 사료되었다. 구조적인 특성에 관한 연구는 앞으로 좀더 자세히 해야만 할 숙제로 남아있으며, 이것이 밝혀지면 부위에 따른 콜라겐의 특성이 해명될 것으로 사료된다.

Fig. 22 및 23에는 껍질의 염가용성 및 산가용성 콜라겐에 각각 과파인을 0.01% 및 0.05%를 첨가하여 소화시킨 SDS-PAGE 패턴을 나타내었다. Fig. 22에 제시한 과파인 0.01%를 첨가하여 소화시킨 껍질의 염가용성 및 산가용성의 소화패턴의 특성은 매우 빠른 소화패턴을 보여주었으며 불과 10분간의 반응으로 10% polyacrylamide 겔의 최하단에 머무는 분자량 2,000~8,000사이의 성분이 대량 검출되었다. 또한 산가용성 콜라겐의 경우에 있어서도 염가용성 콜라겐과 마찬가지로 매우 빠른 소화패턴을 보여주었다. 한편, Fig. 23에 제시한 과파인 0.05%를 첨가하여 소화시킨 염 또는 산가용성 콜라겐의 소화패턴은 0.01%와 거의 유사한 결과이었다. 또한, 연골, 날개 유래의 산 또는 염용성 콜라겐과 비교하면

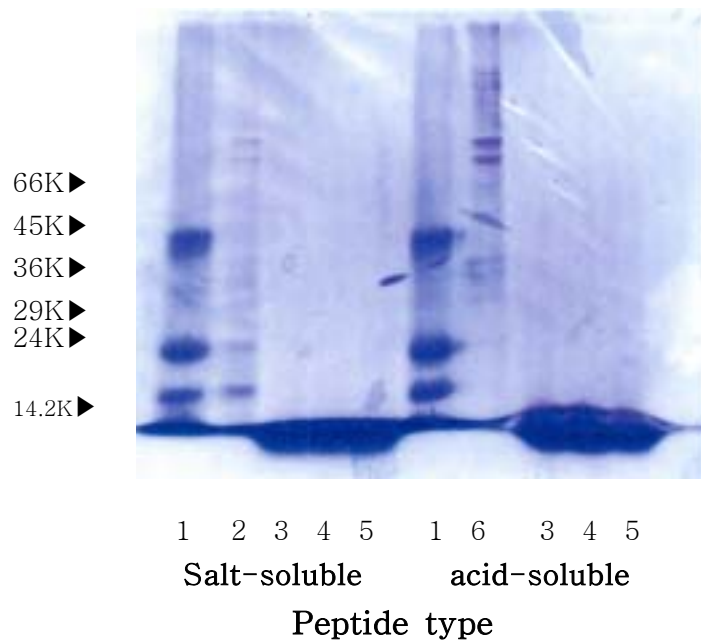


Fig. 22. SDS-PAGE patterns of peptide prepared from salt and acid-soluble collagen of by-product(skin) of chicken.

Collagen peptide prepared using 0.01% papain

- 1 : Molecular weight
- 2 : Salt-soluble collagen
- 3 : Treatment for 10 min with papain
- 4 : Treatment for 20 min with papain
- 5 : Treatment for 30 min with papain
- 6 : Acid-soluble collagen

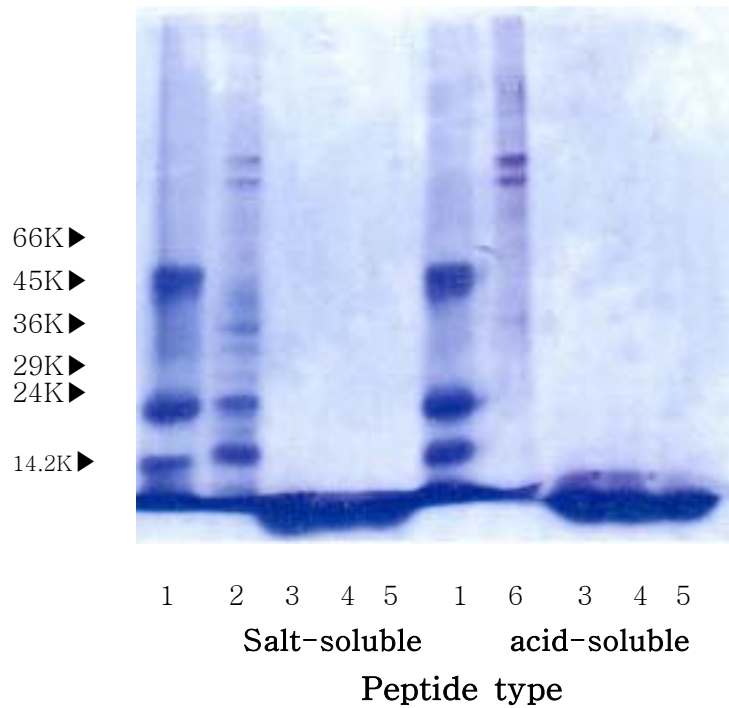


Fig. 23. SDS-PAGE patterns of peptide prepared from salt and acid-soluble collagen of by-product(skin) of chicken.

Collagen peptide prepared using 0.01% papain

- 1 : Molecular weight
- 2 : Salt-soluble collagen
- 3 : Treatment for 10 min with papain
- 4 : Treatment for 20 min with papain
- 5 : Treatment for 30 min with papain
- 6 : Acid-soluble collagen

특히 빠른 소화패턴을 보여주었으며, 구조적으로 분해되기 쉬운 형태를 취하고 있는 것으로 사료되었으며, 이를 토대로 고려하여볼 때 상업적인 공정에서 껍질이 가장 활용하기 쉬운 소재로 생각된다.

이상의 결과를 종합하여보면 다음과 같은 결론이 얻어질 것으로 사료된다. 즉 연골로부터 추출한 산가용성 콜라겐은 생리활성 기능이 있는 것으로 알려진 분자량 수천의 peptide를 제조하는데 있어서는 경제성 있는 효소를 이용하였을 때 소화가 잘 일어나지 않아 상업적으로 활용하기에는 좀더 충분한 조사가 필요할 것으로 사료된다. 그러나, 그 외의 연골의 염가용성 콜라겐, 날개의 산, 염가용성 콜라겐 및 껍질의 산, 염가용성 콜라겐은 파파인과 같은 경제성 있는 효소에도 쉽게 분해가 일어나 분자량 2,000~8,000사이의 펩타이드가 손쉽게 제조 가능한 것으로 확인되었으며 상업적으로 활용하기에 매우 적합한 것으로 사료된다. 또한 더욱 의미 있는 것은 도계 가공품의 가공과정 중 연골, 껍질, 날개(끝) 등은 거의 폐기되고 있는 실정인으로서, 본 연구를 통하여 이와 같은 폐기물을 이용한 고부가가치의 소재 개발이 가능해진 것이다.

지금까지는 SDS-PAGE를 통하여 파파인에 의한 타입별 콜라겐의 분해패턴을 검색하여 분자량 2,000~8,000사이의 peptide가 형성됨을 확인하였다. 그러나, 이 분석법은 SDS, mercaptoethanol과 같은 시약을 첨가기 때문에 시약에 의한 영향을 받을 수 있다. SDS의 작용은 peptide chain을 절단하는 작용을 하는 것은 아니지만 subunit 구조를 지니고 있는 단백질은 subunit 별로 절단되는 특성을 지니고 있다. 단백질의 subunit는 소수결합, 수소결합, 정전결합과 같은 약한 결합으로 형성되어 있기 때문에 SDS를 첨가함으로써 쉽게 해리된다. 또한, mercaptoethanol의 특성은 S-S결합과 같은 강한 결합을 해리시키는 특성을 지니고 있기 때문에 단백질 연구에 있어서 이와 같은 영향을 고려하여 고찰할 필요가 있다.

따라서, 다음은 SDS, mercaptoethanol의 영향을 받지않는 조건하에서 HPLC를 이용한 콜라겐의 분해산물을 분석하여 SDS-PAGE의 결과와

유사한지를 비교분석 하였다.

우선 Fig. 24에는 HPLC를 이용한 분자량 마커의 이동 경로를 나타내었다. 14,200부터 66,000 사이의 분자량 6종을 분석한 결과 11.478분 후부터 검출되기 시작하여 약 11.585분이 지나면 완료되는 것으로 나타났다.

Fig. 25에는 Fig. 24의 결과를 토대로 하여 분석한 표준곡선의 결과를 나타내었다. 이 결과에 의하면 $y = 496749x - 5687833$ 의 식이 성립되는 직선관계를 나타내었으며, 콜라겐 펩타이드의 분자량은 이후 이식에 의하여 산출하였다.

이와 같은 결과를 토대로 하여 각각의 분자량을 분석할 수 있으므로 Fig. 26에는 연골의 염가용성 콜라겐을 파파인으로 분해시킨 후 HPLC의 패턴으로부터 단백질의 움직임을 분석하여 그 결과를 나타내었다. 우선 (a)에 제시한 연골의 염가용성 콜라겐의 결과를 살펴보면 분자량 약 6.3만 8.6만 10.4만 및 18.2만의 4개의 main peak가 검출되었다. 한편 (b)에 제시한 파파인으로 분해시킨 분해산물의 분자량을 살펴보면 분자량 약 5천의 단일 peak가 나타났다. 이상의 결과는 SDS-PAGE의 결과와 매우 유사한 경향을 나타내었다. 즉, 파파인으로 소화를 시키면 불과 30분만에 대부분 저분자화 되었으며, SDS 및 mercaptoethanol의 비존재하에서도 유사한 분자량 분포를 나타내어 연골의 염가용성 콜라겐은 파파인에 의하여 소화되기 쉬운 구조를 지니고 있는 것으로 추정되었다.

Fig. 27에는 연골의 산가용성 콜라겐을 파파인으로 분해시킨 peptide를 HPLC를 이용하여 분석한 결과이다. 그림 (a)에서 보는바와 같이 연골의 산가용성 콜라겐은 분자량 약 7.3만 및 11.8만의 주요 peak가 관찰되었으며, 그 외에 10.3만 및 10,26.7만의 작은 2개의 peak가 검출되었다. 이를 papain 효소 처리하여 측정된 HPLC의 pattern(b)에서는 약 6천의 저분자 peptide의 단일 peak가 검출되었으며 이와 같은 현상은 SDS-PAGE와 일치하는 결과였다.

Fig. 28에는 날개의 염가용성 콜라겐의 분자량 및 파파인으로 소화시켰을 때 단백질의 변화를 검토하여 각각 (a) 및 (b)에 그 결과를 제시하

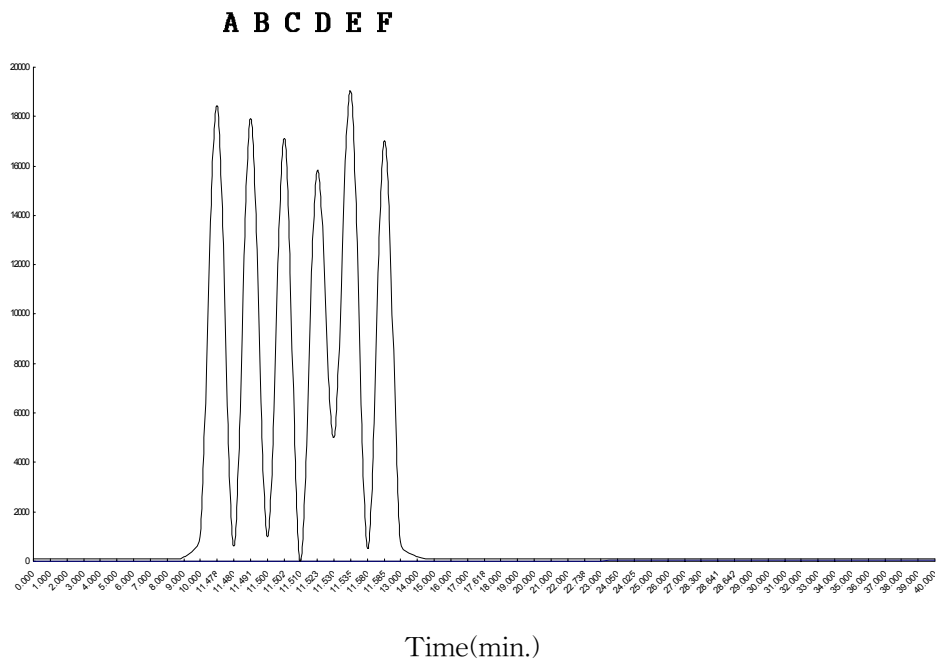


Fig. 24. HPLC fractionation of Molecular weight.

MW

A : 14,200 B : 20,100 C : 24,000

D : 36,000 E : 45,000 F : 66,000

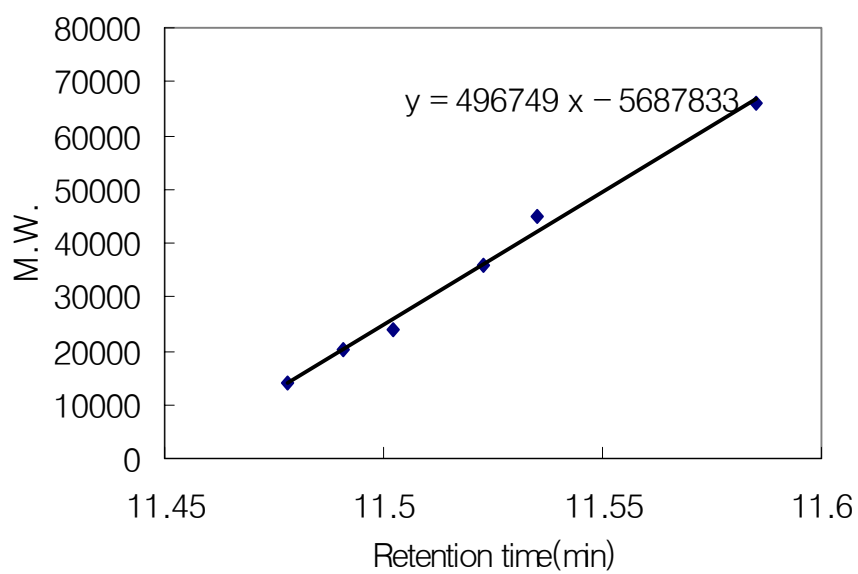


Fig. 25. Stander curve of molecular weight analyzed by HPLC.

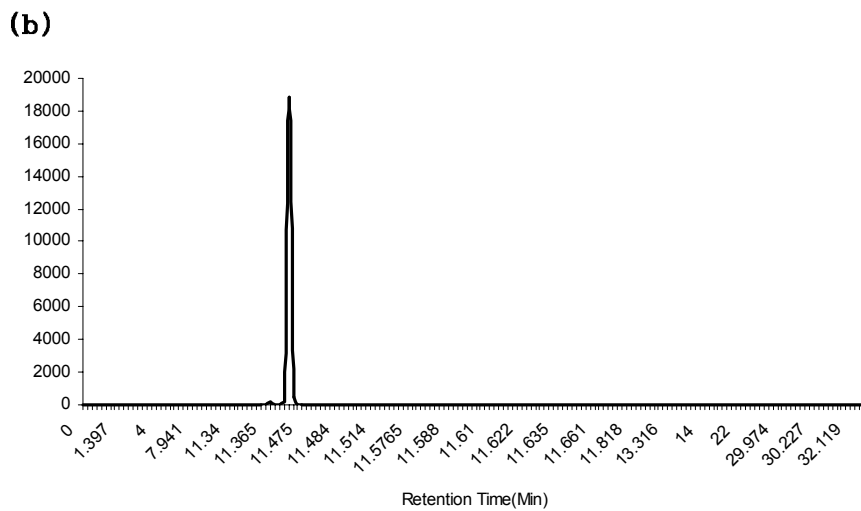
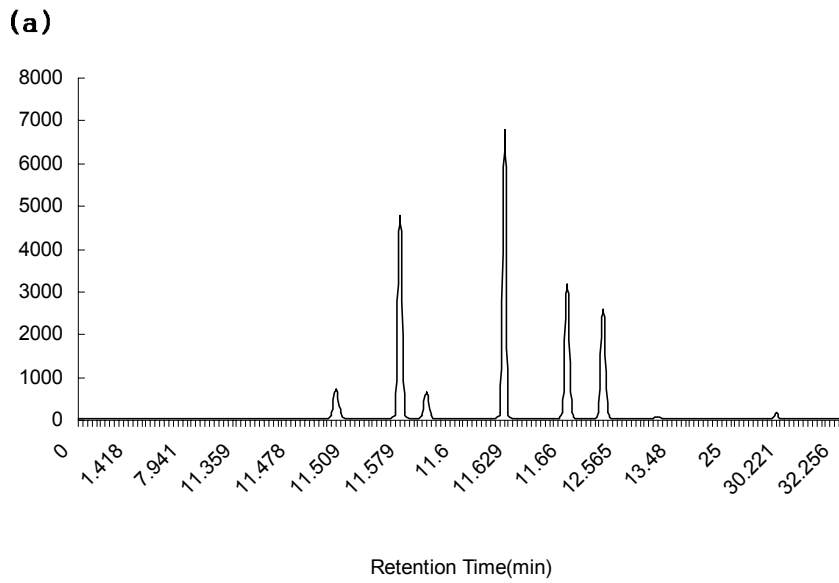


Fig. 26. HPLC fractionation of peptide and salt-soluble collagen prepared from by-product(cartilage) of chicken.

(a) Salt-soluble collagen (B) Peptide from collagen

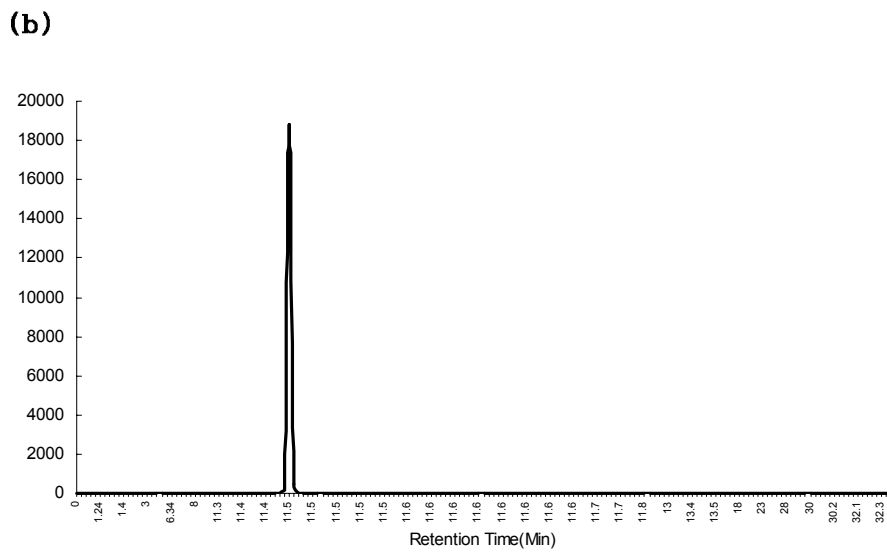
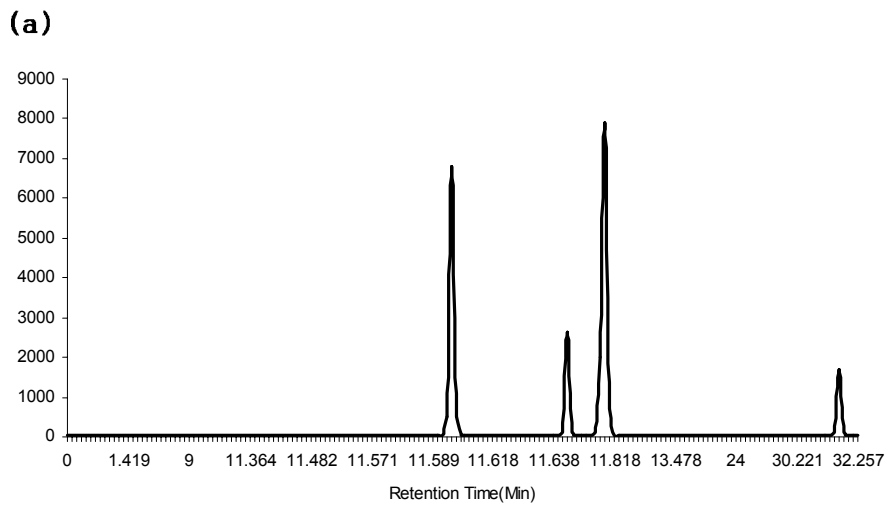
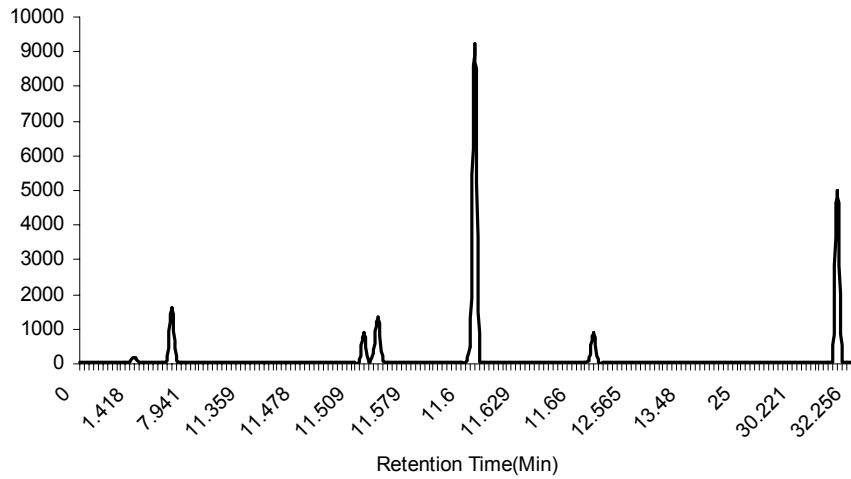


Fig. 27. HPLC fractionation of peptide and acid-soluble collagen prepared from by-product(cartilage) of chicken.

(a) Acid-soluble collagen (B) Peptide from collagen

(a)



(b)

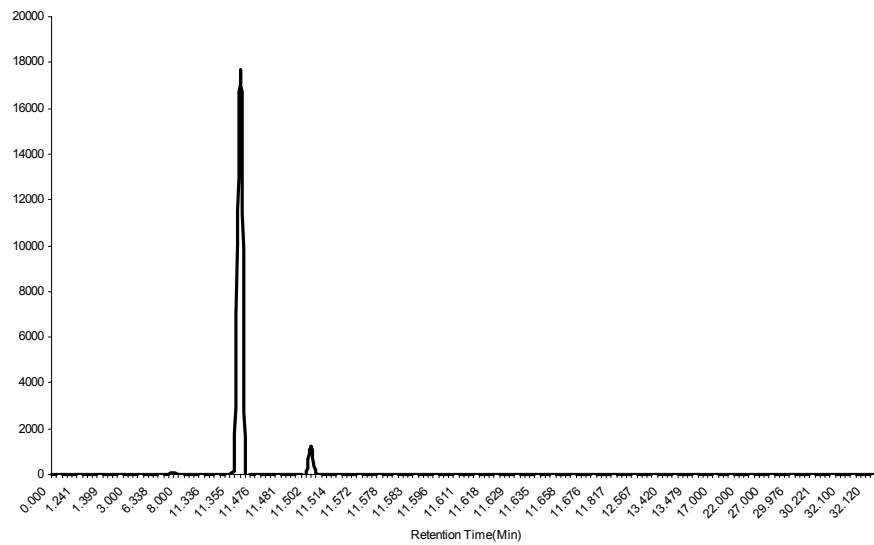


Fig. 28. HPLC fractionation of peptide and salt-soluble collagen prepared from by-product(Tip) of chicken.

(a) Salt-soluble collagen (B) Peptide from collagen

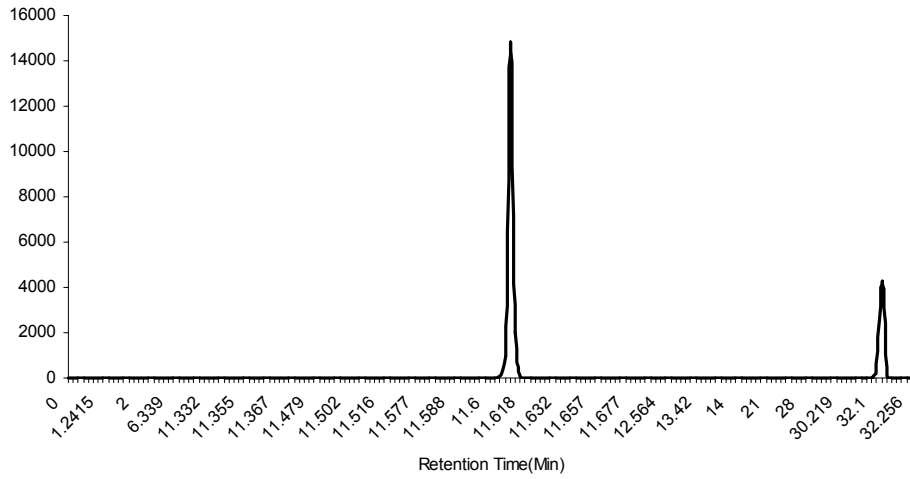
였다. (a)에 제시한 날개의 염가용성 콜라겐의 분자량은 약 7.9만 및 1,000만 이상의 거대분자가 검출되었으며, 11.2 등을 포함한 수개의 작은 peak가 검출되었다. 한편, (b)에 제시한 것과 같이 날개의 염가용성 콜라겐을 파파인으로 소화하면 분자량 약 8천의 주요 peak 1개와 분자량 약 2.8만으로 추정되는 매우 작은 peak가 검출되었다.

Fig. 29.에는 날개의 산가용성 콜라겐의 분자량을 살펴보았다. 그림 (a)에서와 같이 분자량 약 분자량 약 8만으로 추정되는 주요 peak 1개와 분자량 1,000만 작은 peak 한 개로 모두 두 개의 peak가 나타났다. (b)에는 이들을 효소처리 하였을 때의 HPLC 패턴을 나타내었다. 이 결과에 의하면 분자량 약 8천의 매우 큰 주요 peak 1개와 무시해도 될만한 매우 작은 고분자 2개의 peak가 검출되었다.

껍질로부터 추출한 염가용성 콜라겐의 HPLC 패턴은 Fig. 30과 같다. (a)에 제시한 염가용성 콜라겐은 분자량 약 2.8만, 6.3만 8.3만의 비교적 큰 3개의 peak가 검출되었으며, 그 외에 매우 분자량이 큰 2개의 작은 peak가 검출되었다. 모두 5개의 성분을 포함하는 콜라겐을 파파인으로 분해하면(b) 분자량 약 7천의 단일 peak가 검출되었다.

Fig. 31에는 껍질로부터 추출한 산가용성 콜라겐의 HPLC 패턴(a) 및 이를 파파인으로 소화시킨 콜라겐의 HPLC 패턴(b)을 나타내었다. (a)에 제시한 껍질의 산가용성 콜라겐은 분자량 약 9.1만, 92.6만, 900만과 1,000만 분포도를 나타내었으며 peak의 크기는 분자량이 작은 순으로 크게 나타났다. 이를 효소처리하면(b) 분자량 약 7천으로 추정되는 단일 peak가 검출되었다. 이상의 결과를 종합하면 기본적으로는 SDS-PAGE와 같은 경향의 결과를 나타냈으나, 분자량에 있어서는 다소 차이가 인정되었다. 그러나 이 정도의 분자량의 차이는 매우 미미한 것으로서 무시할만한 수준인 것으로 사료되었다. 한편 SDS-PAGE와 HPLC에 의한 분석에 있어서 서로 같은 양상의 분해 패턴을 보여준 것은 SDS-PAGE 분석법에서 SDS 및 mercaptoethanol의 시약에는 크게 영향을 받지 않은 것으로 사료되며, 이상의 결과로 볼 때 파파인에 의한 콜라겐의 분해는

(a)



(b)

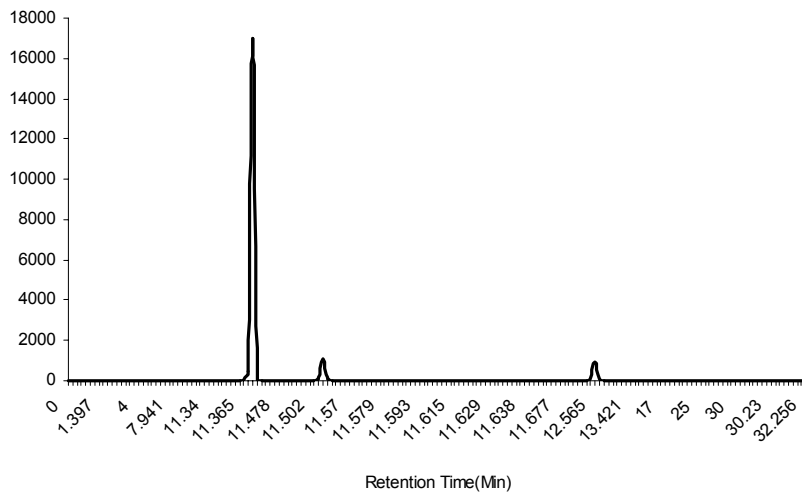
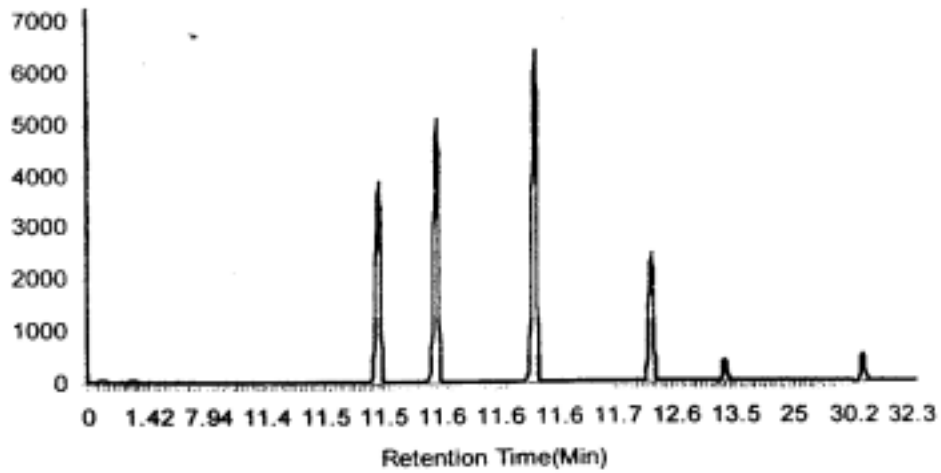


Fig. 29. HPLC fractionation of peptide and acid-soluble collagen prepared from by-product(Tip) of chicken.

(a) acid-soluble collagen (B) Peptide from collagen

(a)



(b)

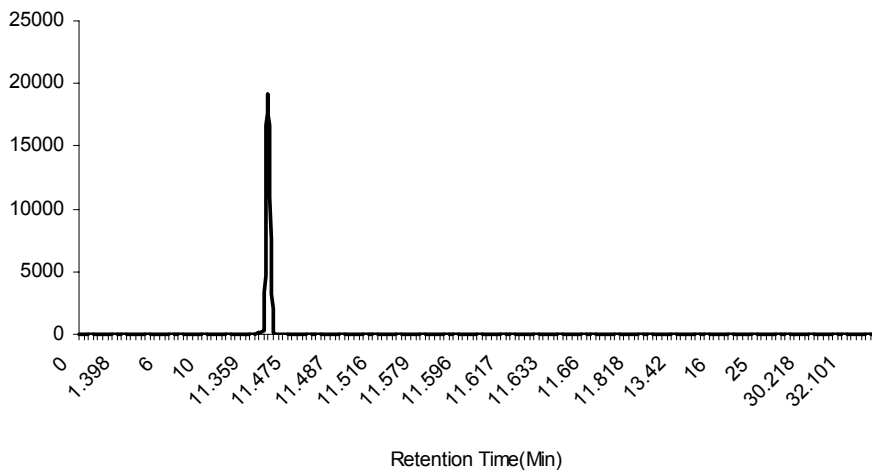


Fig. 30. HPLC fractionation of peptide and salt-soluble collagen prepared from by-product(Skin) of chicken.

(a) Salt-soluble collagen (B) Peptide from collagen

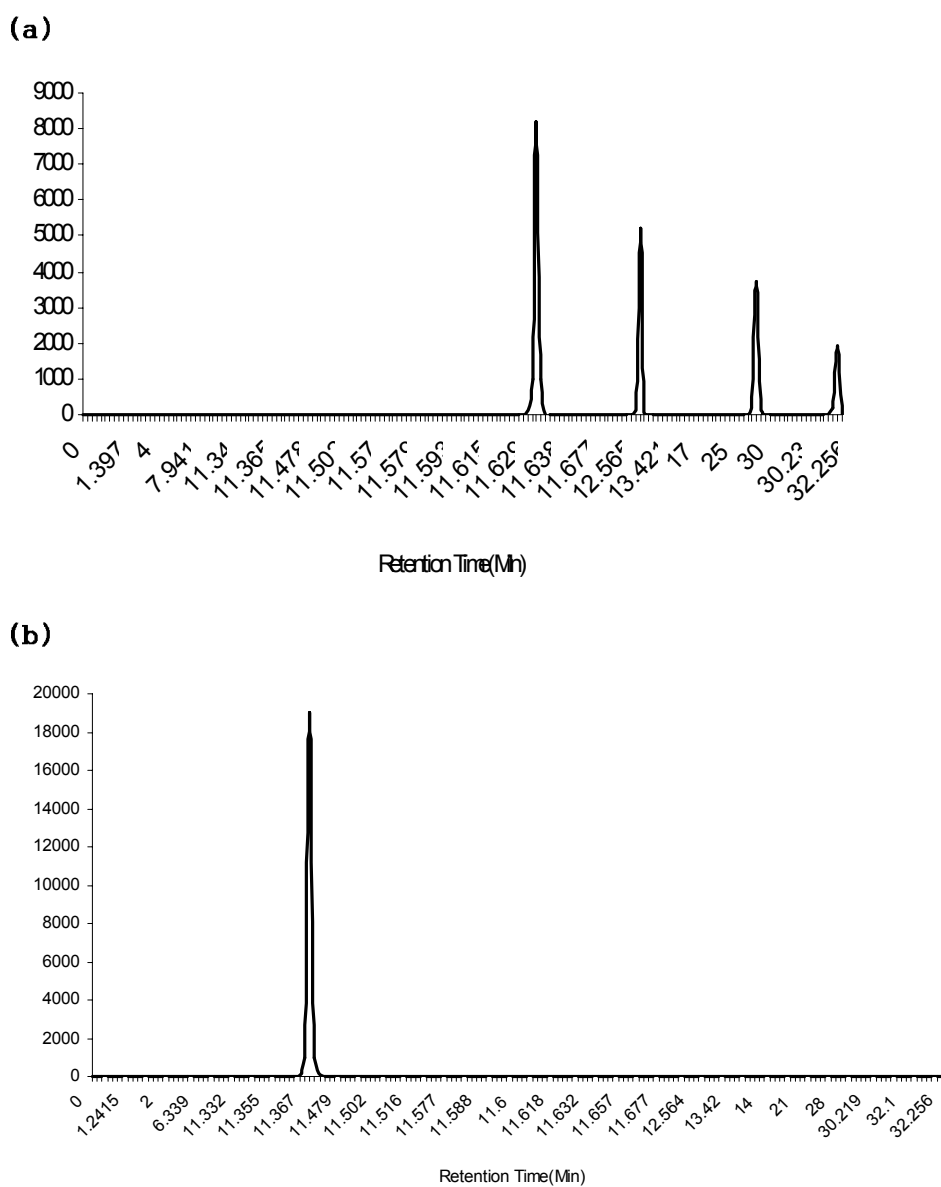


Fig. 31. HPLC fractionation of peptide and acid-soluble collagen prepared from by-product(Skin) of chicken.

(a) Acid-soluble collagen (B) Peptide from collagen

원하고자 하는 펩타이드를 얻고자하였을 때 매우 유용한 방법 중의 하나로 사료되었다.

2. 콜라겐 peptide의 기능성 검토

제 1 항에서는 파파인에 의한 collagen의 peptide를 제조하여 분석한 결과, SDS-PAGE에서는 분자량 약 5,000~8,000, HPLC에 의한 분석에 있어서는 약 4,000~8,000의 분자량이 분포하는 것으로 판명되었다. 제 2 항에서는 이와 같은 분자량의 peptide를 ACE 저해능 및 항산화성 등에 대하여 검토하였다.

Angiotensin I Converting Enzyme은 승압 활성이 약한 Angiotensin I 을 강력한 승압 펩타이드인 Angiotensin II 변형시킴과 동시에 강압 펩타이드인 Bradykinin을 불활성화하는 반응을 촉매하는 효소이다. 따라서 ACE를 특이적으로 저해하는 물질은 혈압 상승을 억제하는 효과를 가지며, 이 관점에서 단백질효소 가수 분해물을 이용하여 ACE 저해 활성을 갖는 펩타이드를 만들하고자 ACE 저해능을 살펴보았다.

산가용성 콜라겐에 파파인 0.01%를 첨가하여 분해하여 얻어진 저분자 펩타이드 농도 1mg/ml의 ACE 저해능을 검토하여 결과를 Fig. 32에 제시하였다. 연골이 58%, 날개가 54%, 껍질이 52%로 연골로 분해된 저분자 펩타이드가 가장 높은 저해율을 나타내었지만 3자간에 큰 차이는 인정되지 않았다.

염가용성 콜라겐에 파파인 0.01% 첨가하여 얻어진 저분자 peptide의 ACE 저해능을 검토하여 결과를 Fig. 33에 제시하였다. 단백질 농도 1mg/ml 일 때 껍질의 경우 ACE 저해능이 껍질 60%, 날개 52%, 연골이 58%로 껍질이 가장 높게 측정되었고, 모두 50% 이상의 ACE 저해능을 나타내었다. 이와같이 저분자로 분해한 잠재적 생리활성 펩타이드는 음료에 적용시 음료 100ml당 50mg의 ACE저해 기능이 있을 것으로 판단되며 음료제조시 기능성 음료로서의 활용 가능성이 기대된다.

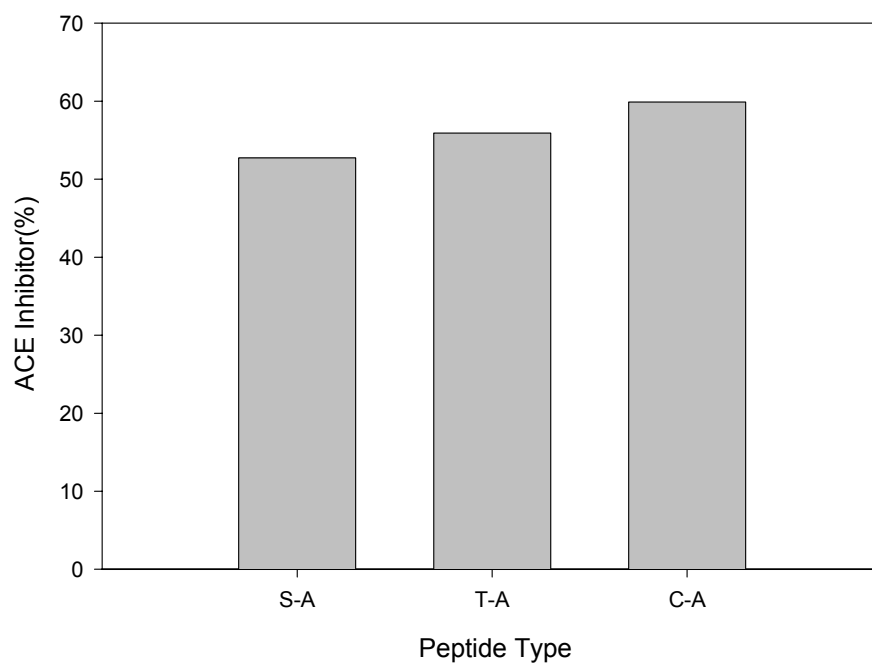


Fig. 32. ACE inhibition of peptide from acid-soluble collagen prepared from by-product chicken

S-A : Skin T-A : Tip C-A : Cartilage

Peptide concentration was mg per ml

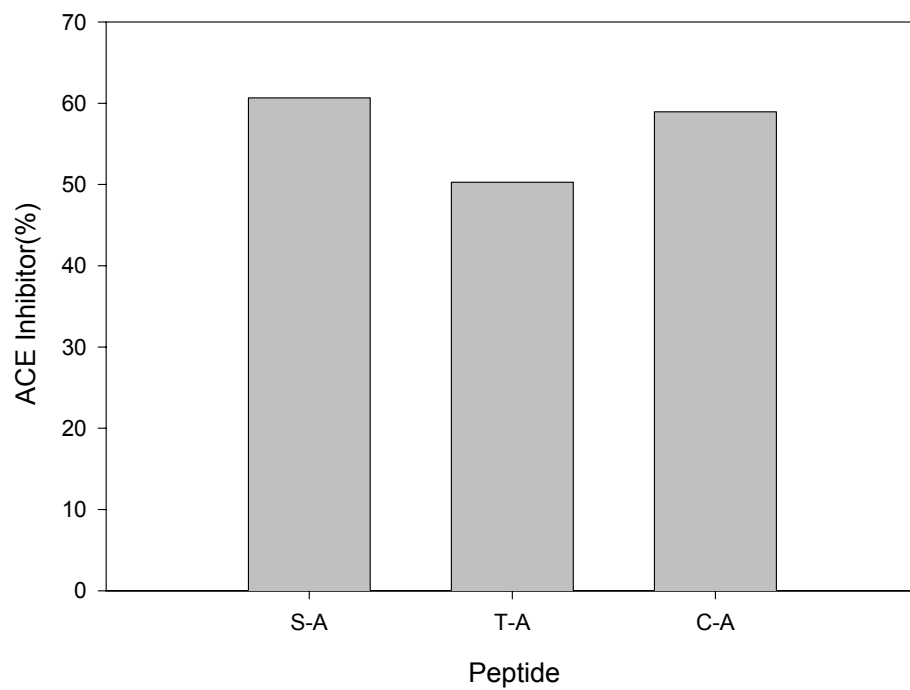


Fig. 33. ACE inhibition of peptide from salt-soluble collagen prepared from by-product chicken

S-A : Skin T-A : Tip C-A : Cartilage

Peptide concentration was mg per ml

Fig. 34에는 껍질, 날개 및 연골로부터 추출한 염가용성 콜라겐 펩타이드의 항산화능 결과를 제시하였다. 이 결과에 의하면 껍질, 연골, 날개의 순으로 항산화능이 높게 나타났으나, 그 차이는 매우 작았으며, 또한 전체적으로 35% 이하의 낮은 항산화능을 보여 주었다.

Fig. 35에는 껍질, 날개 및 연골로부터 추출한 산가용성 콜라겐 펩타이드의 항산화능 결과를 제시하였다. 이 결과에서는 연골, 날개, 껍질의 순으로 높게 나타났으며, 가장 높았던 연골의 경우 항산화능이 약 40% 수준으로 낮은 수준의 경향을 나타내었다. 이상의 결과로부터 펩타이드의 타입과는 관계없이 전체적으로 낮은 항산화능을 나타내었으며, 본실험의 결과 항산화능은 그다지 크지 않은 것으로 판단되었다.

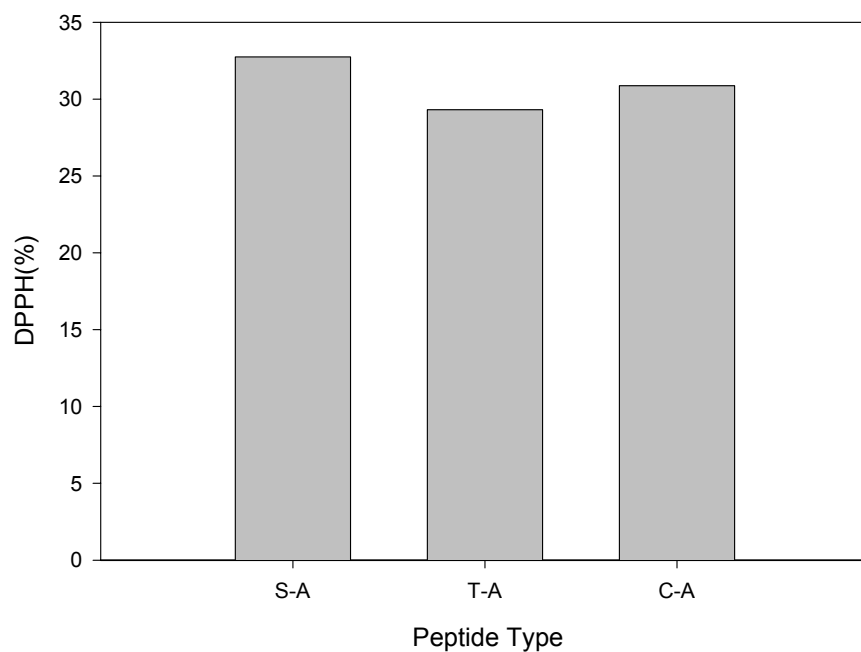


Fig. 34. Antioxidative activity of peptide from salt-soluble collagen prepared from by-product chicken

S-A : Skin T-A : Tip C-A : Cartilage

Peptide concentration was mg per ml

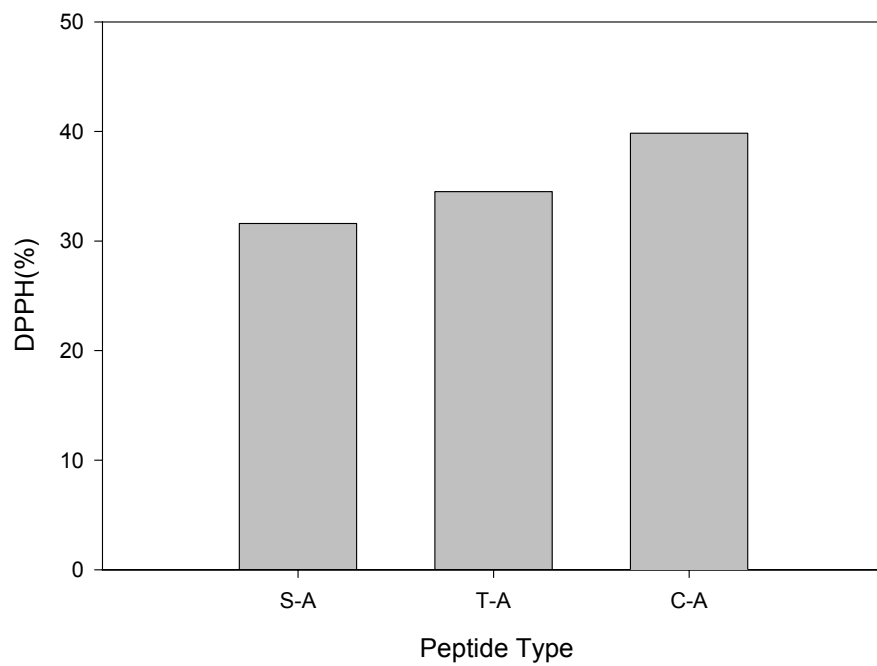


Fig. 35. Antioxidative activity of peptide from acid-soluble collagen prepared from by-product chicken

S-A : Skin T-A : Tip C-A : Cartilage

Peptide concentration was mg per ml

3. 음료수 제조를 위한 peptide의 가용화

콜라겐을 이용한 음료수를 제조하기 위해서는 절대적인 가용화 기술이 필요하다. 그러나, 제 1 절에서도 기술한 바와 같이 콜라겐은 고분자의 형태를 지니고 있으므로 물에는 잘 용해되지 않는 특성을 지니고 있으므로 이들의 수용화를 위해서는 일정 크기의 펩타이드 형태로 제조할 필요가 있다. Fig. 36에는 연골, 껍질, 날개의 염가용성 콜라겐으로부터 제조한 분자량 약 4,000~8,000사이의 펩타이드를 증류수에 농도별(0.1~2%)로 첨가하였을 때의 용해도를 나타내었다. 연골 및 껍질의 경우는 모든 첨가구에서 95% 이상의 높은 용해도를 나타내었다. 날개의 경우는 전체적으로 연골 및 껍질과 비교하여 용해도가 떨어지는 경향을 나타내었으며, 또한 첨가량이 많아짐에 따라서 용해도가 저하되는 경향을 나타내었다. 그러나 전체적으로는 75% 이상의 용해도를 나타내었으며, 좀더 세분화된 펩타이드를 제조한다면 용해도를 상승시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

Fig. 37에는 연골, 껍질, 날개의 산가용성 콜라겐으로부터 제조한 분자량 약 4,000~8,000사이의 펩타이드를 증류수에 농도별(0.1~2%)로 첨가하였을 때의 용해도를 나타내었다. 이 결과에서도 Fig. 36과 유사한 경향의 용해도를 나타내었으며, 연골 및 껍질의 경우는 기능성 음료를 제조하는데 있어서 충분히 활용할 수 있을 것으로 사료되었다.

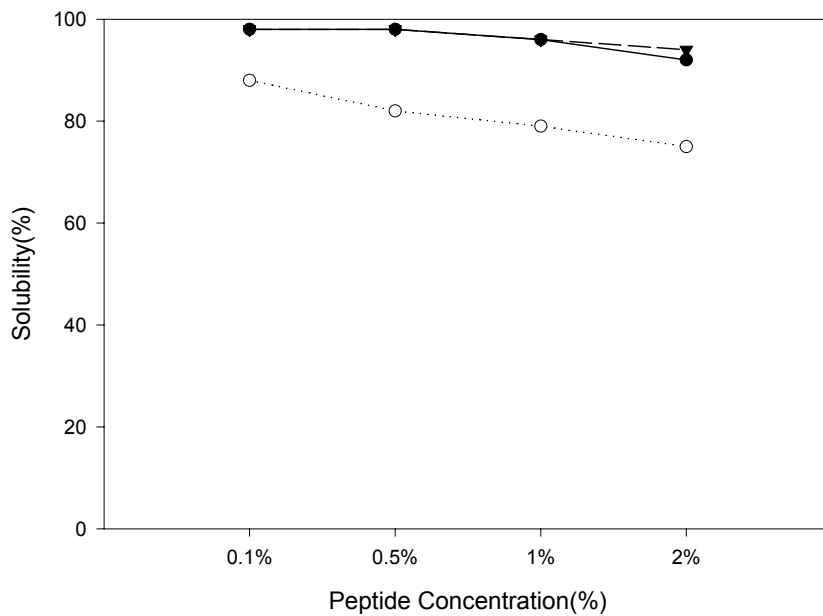


Fig. 36. Changes in solubility of peptide from salt-soluble collagen prepared from by-product of chicken.

-▽- : cartilage -●- : skin -○- : tip
 Peptide concentration was mg per ml

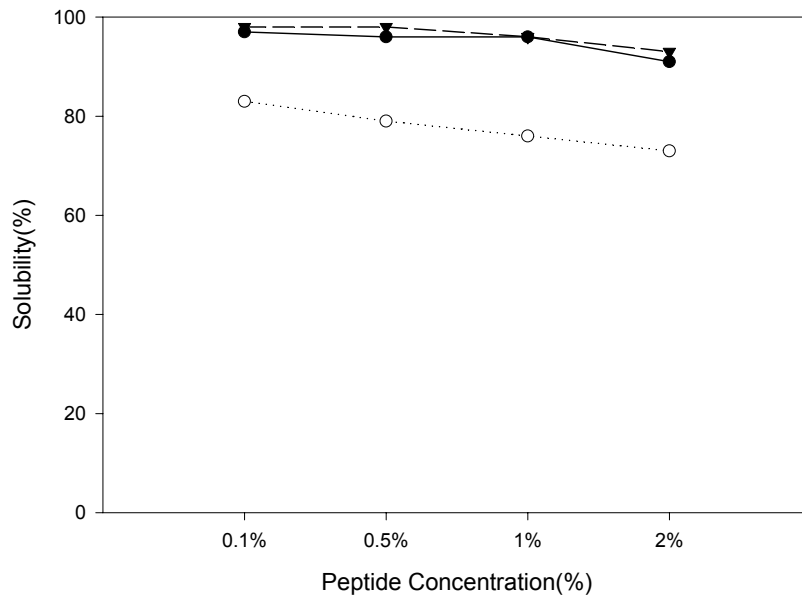


Fig. 37. Changes in solubility of peptide of acid-soluble collagen prepared from by-product of chicken.

-▽- : cartilage -●- : skin -○- : tip
 Peptide concentration was mg per ml

4. 실험실 규모의 시제품 가공 및 제조 공정도 개발

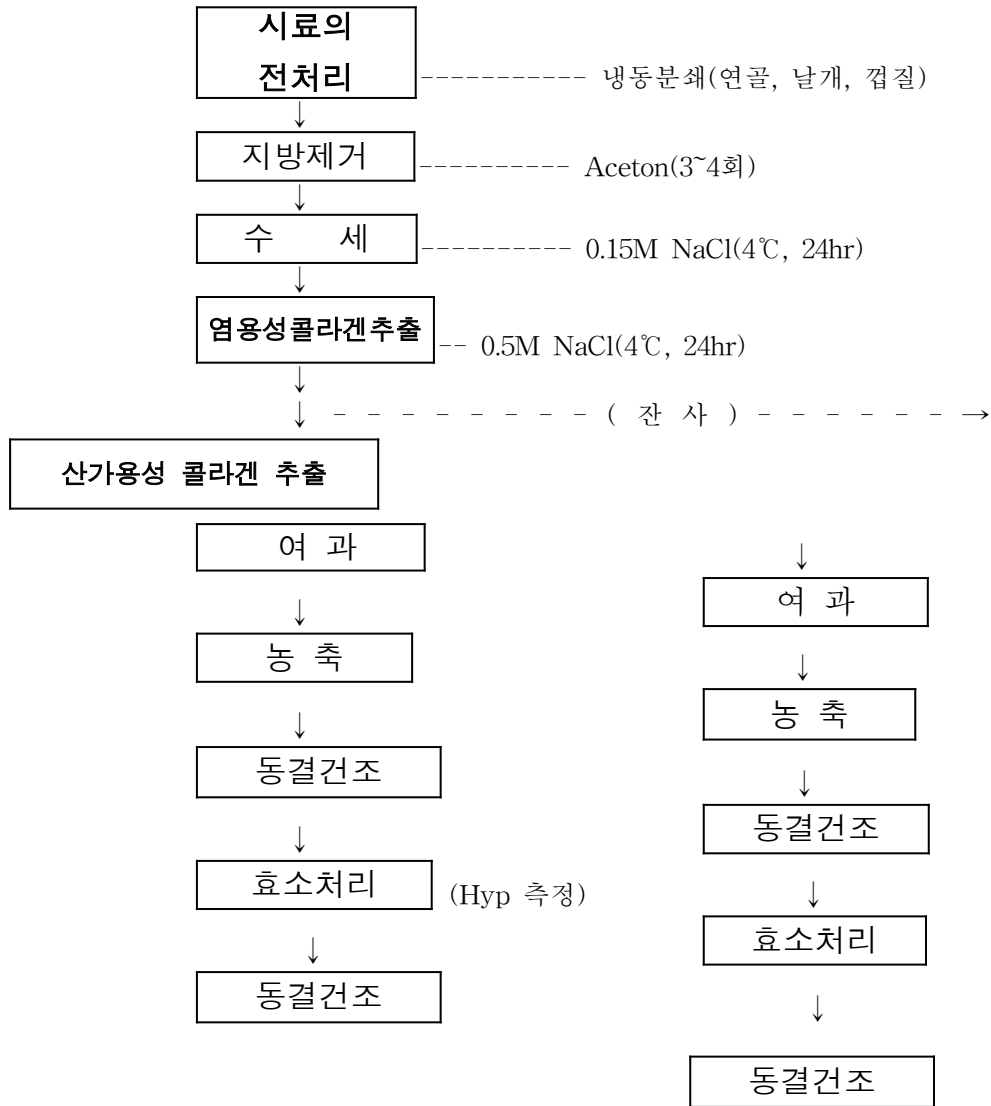


Fig. 38. Preparation of collagen peptide from by-product of chicken.



(A)



(B)



(C)

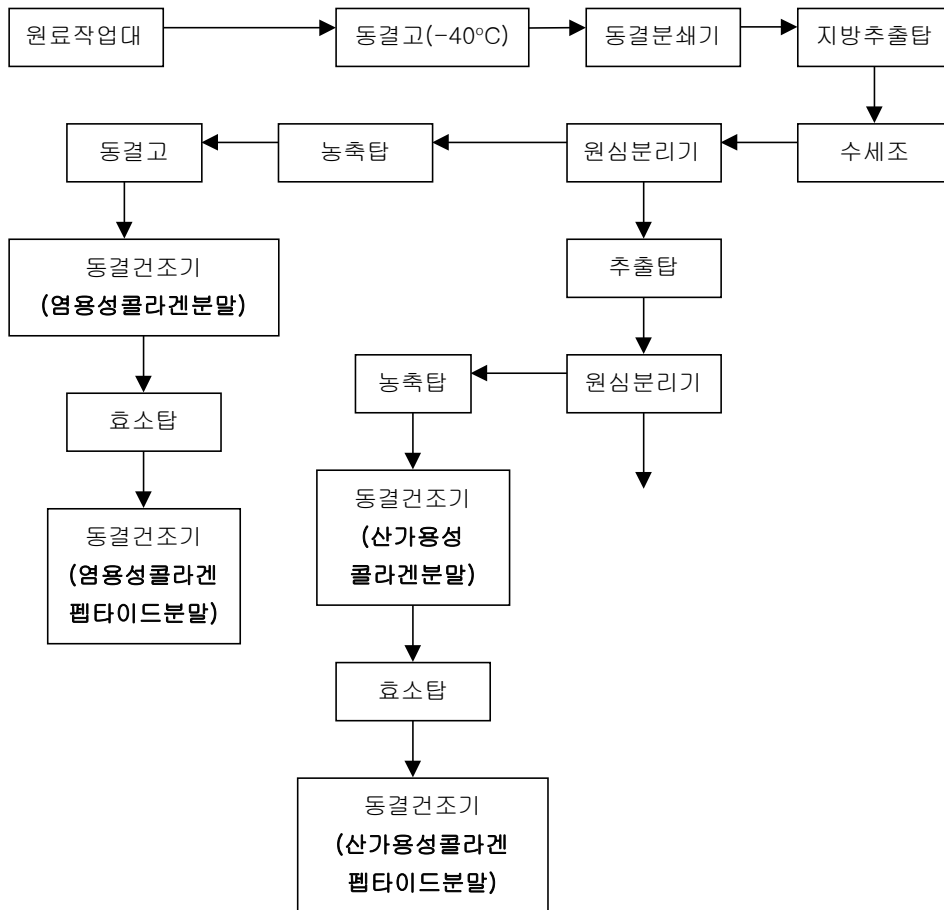
Fig. 39. Peptide powder prepared by same processing as in Fig.37

A : Skin, B : Tip, C : cartilage

지금까지의 결과를 토대로하여 실험실 규모에서의 껍질, 날개로부터 제조한 콜라겐 펩타이드의 제조공정도를 Fig. 38에 제시하였으며, 제조된 콜라겐 펩타이드 분말을 Fig. 39에 제시하였다. 우선 Fig. 38에 제시한 공정도는 그림에서와 같이 매우 단순한 원리로 제조가 가능하며, 실질적으로 상업화하는 데에는 큰 문제가 없을 것으로 사료된다. Fig. 38의 공정에 의해서 제조된 콜라겐 펩타이드(Fig. 39)의 형태는 백색을 띄고 있으며, 물에 잘 녹는 특성을 지니고 있어 기능성 음료수를 제조하는데 있어서 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 대부분 상기의 부산물은 폐기처분되고 있기 때문에 환경을 오염시키는 원인이 될 뿐 아니라 아까운 단백질 자원을 낭비하므로, 폐기처분되고 있는 부산물을 이용함으로써 새로운 고부가가치의 소재를 발굴했다는 점에서 큰 의미가 있다고 사료된다.

제 3 절 콜라겐 peptide 제조 및 음료개발의 산업화 연구

1. 공장규모의 시제품 제조공정도



가. 염가용성 콜라겐 펩타이드의 제조

시료 전처리 작업대

시료의 전처리는 닭껍질, 닭날개끝, 가슴연골부위를 가능한 이물질이 분지 않도록 정선한다



동결분쇄기

동결분쇄기는 특수 열처리(강도가 높을 것)된 스테인레스 재질이어야 하며 직경 8mm수준의 다공질의 체와 고강도의 햄머(4열 x 5햄머)를 장착한 것으로 한다.



추출탑

추출탑은 아세톤 추출탑으로 용매가 안전하게 회수될 수 있는 장치가 부착된 회수율 및 외부 충격등에 강하고 안전한 KS 제품의 안전규격을 통과한 추출탑 이어야함



수세조

염용성 콜라겐을 추출할 수 있는 수세조로서 0.15M NaCl용액에 충분히 원료가 잠길 수 있도록 추출 및 수세에 따른 물질수지에 적합한 용량의 것이어야 함



원심분리기

원심분리기는 rpm 20,000이상의 고성능 원심분리기가 필요하며 연속적이어야 함. 이때 상등액이 염용성콜라겐 원료가 되며 원심분리 후 잔사는 산 가용성 콜라겐의 원료가 됨



농축탑

농축탑은 솔벤트가 물이므로 압력이 3kg이상이 되어야 농축수율을 높일 수 있다.
이 농축탑 역시 염에 잘 견딜 수 있도록 전 재질이 내염성의 스테인레스 스틸을 소재로 함



동결

농축된 원료는 쉘브형 트레이에 넣고 - 20℃ 이하에서 급속 동결시킨다.



동결건조기

동결된 시료는 동결건조기에서 건조시킨다. 동결건조기는 배치식이므로 최대용량을 한번에 처리할 수 있는 규격을 미리 파악하여 처리할 수 있도록 하여야 한다. 이 건조물이 **염용성 콜라겐 분말**이며 이 분말을 밀봉하여 냉장에 보관한다.



효소탑

동결건조된 시료(염용성 콜라겐분말)를 효소처리를하여 Hyp.를 측정
후 다시 동결건조기에서 건조시킨다.



동결건조기

이때 제조된 것이 **염가용성 콜라겐 펩타이드 분말**임. 이 시료 역시
냉장보관 및 밀봉보관하여야 함

나. 산가용성 콜라겐 및 콜라겐 펩타이드의 제조공정도

추출탑

원심분리기에서의 상등액이 염용성 콜라겐 제조의 원료가 되며 원심분리
후 잔사가 **산 가용성 콜라겐의 원료**가 된다. 산을 처리하는 추출탑으로
내산성 및
안전성의 확보가 필수적임



원심분리기

원심분리기는 rpm 20,000이상의 고성능 원심분리기가 필요하며 연속적이어야 함. 이때 상등액이 산가용성 콜라겐의 원료가 되며 원심분리 후 잔사는 불용성 콜라겐의 원료가 됨



농축탑

농축탑은 솔벤트가 물이므로 압력이 3kg이상이 되어야 농축수율을 높일 수 있다.
이 농축탑 역시 산에 잘 견딜 수 있도록 전 재질이 내산성의 스테인레스 스틸을 소재로 함



동결건조기

동결된 시료는 동결건조기에서 건조시킨다. 동결건조기는 배치식이므로 최대용량을 한번에 처리할 수 있는 규격을 미리 파악하여 처리할 수 있도록 하여야 한다.
이 건조물이 산가용성 콜라겐 분말이며 이 분말을 밀봉하여 냉장에 보관한다.



효소탑

동결건조된 시료(산가용성 콜라겐분말)를 효소처리를하여
Hyp.를 측정 한 후 다시 동결건조기에서 건조시킨다.



동결건조기

이때 제조된 것이 **산가용성 콜라겐 펩타이드 분말**임.
이 시료 역시 냉장보관 및 밀봉보관하여야 함

2. 저장성 및 관능 검사

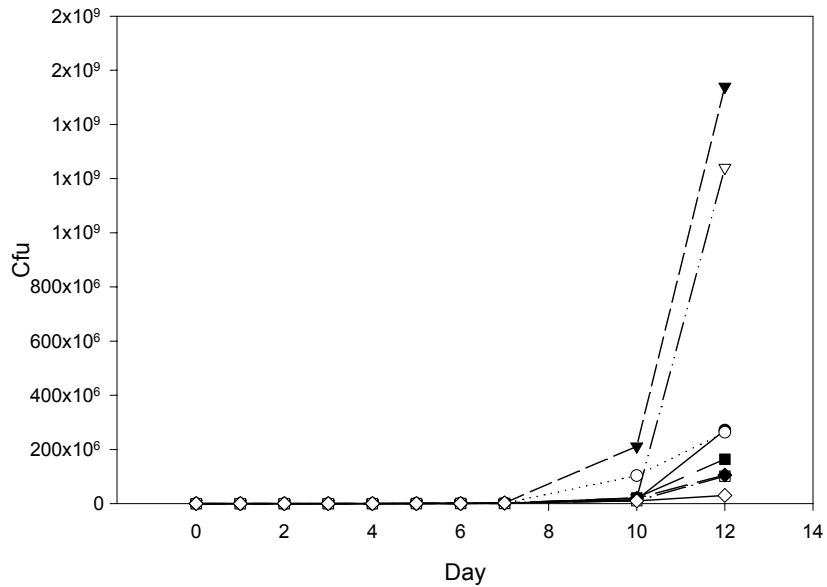


Fig. 41. Changes in total plant count of peptide drink of salt-soluble collagen(cartilage) prepared from by-product of chicken during storage at room temperature.

- : A drink + peptide -○- : A drink
- ▼- : B drink + peptide -▽- : B drink
- : C drink + peptide -□- : C drink
- ◆- : D drink + peptide -◇- : D drink

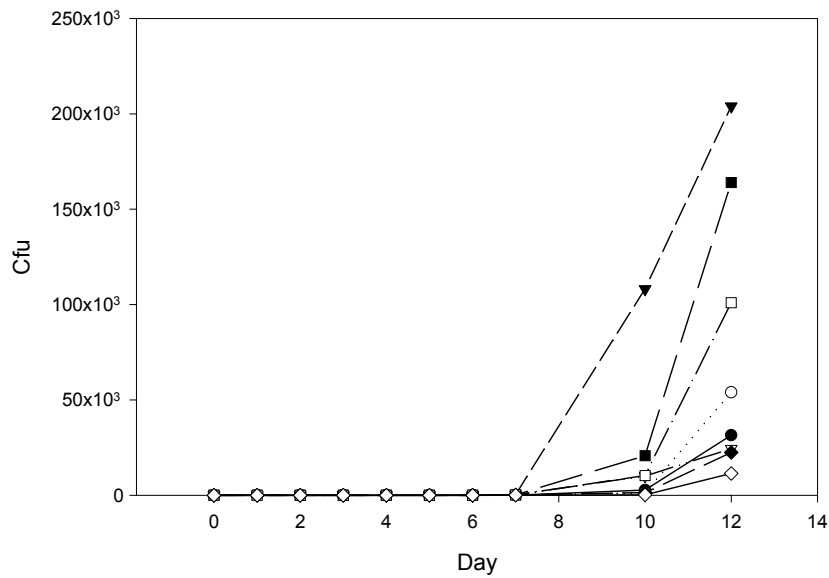


Fig. 42. Changes in total plant count of peptide drink of salt-soluble collagen(cartilage) prepared from by-product of chicken during storage at 4°C

- ▼- : A drink + peptide
- : A drink
- : B drink + peptide
- ◇- : B drink
- : C drink + peptide
- : C drink
- ▽- : D drink + peptide
- ◆- : D drink

Fig. 41 및 42에서는 저장성 검토를 위하여 펩타이드를 첨가한 음료수를 실온 및 4℃에서 보관하였을 때의 미생물(총균수)의 변화를 검토하였다. 이 결과에 의하면 대조구와 비교하여 큰 변화가 인정되지 않았으며, 저장성에 있어서도 문제가 없는 것으로 판단되었다.





Fig. 43. Peptide drink made from salt and acid-soluble collagen of by-product(skin) of chicken.

Table 8. Sensory evaluate of peptide-drink made from collage

Sensory \ No.	211	128	439	447	752
Color	5	5	5	5	4.8
Mouth feel	5	5	5	4.6	4.1
Flavour	5	5	5	4.7	4.8
Taste	5	5	4.5	4.5	4.3
Overall acceptability	5	5	4.8	4.5	4.2

211: Control

128: Added 0.05% peptide

439: Added 0.2% peptide

477: Added 0.5% peptide

752: To added 1% peptide

1 : very poor

2 : poor

3 : neither like nor neither dislike

4 : good

5 : very good

collagen 콜라겐 기능성 음료를 산업화하기 위한 모델 음료를 제조하여 관능검사를 실시하여 그 결과를 표 8에 제시하였다.

그 결과 control(211)을 5점 만점으로 하였을 때 0.05%(128) 까지 첨가하였을 때에는 control과 거의 같은 관능검사 결과를 나타내었다. 그러나 그 이상의 collagen peptide powder를 첨가하면 기호도에 있어서 저하하는 경향을 나타내었으며, 1% 이상의 첨가에 있어서는 전체적으로 쓴맛이 느껴진다는 결과가 얻어졌다. 또한, 현탁도에 있어서도 육안으로 약간 느껴질 정도로 현탁되어 있었으며, 완전히 용해되지 않는 경향을 나타내었다.

이상의 결과로부터 복합 collagen peptide 음료는 첨가량을 0.5% 이하가 적절한 것으로 나타났으며, 기능성 음료로서의 가능성을 충분히 시사한 결과였다.

참고문헌

1. 김세권, 최영일, 박표잠, 최정호, 문성훈 : 대구고니 단백질의 효소적 가수분해물로부터 항산화성 펩타이드의 분이·정제 및 특성. 한수지, 33(3), 198~204. (2000)
2. K. Weber and M. Osborn: J. Biol.Chem., 244, 4406-4412 (1969)
3. Z. DEYL, M.. ADAM : Separation methods for the study of collagen and treatment of collagen disorders. Journal of Chromatography, 488 161-197 (1989)
4. 신재익, 안창원, 남희섭, 이형재, 이형주., 문태화 : 된장으로부터 Angiotensin Converting Enzyme(ACE) 저해 Peptide의 분획. Korean J. Food Sci. Technol. 27. 230~234 (1995)
5. 황종현 : 메주 유래의 B. subtilis SCB-3으로 제조된 된장의 ANgiotensin I Converting Enzyme 조해효과. J. Korean Food Sci. Nutr. 26(5), 775~783(1997)
6. 이만중, 장영렬, 임무현 : Cacao bean으로부터 분리된 polyphenol 성분의 화학구조분석과 ACE 저해효과. Agricultural Chemistry and Biotechnology. 41, 1, 110~117(1998)
7. 하영득, 이삼빈, 광연길 : 마 점질물의 중금속 제거능과 ACE 저해 효과. J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr. 27(4), 751~755 (1998)
8. 홍상필, 김명희, 오세욱, 한찬규, 김용현 : Chitosan 올리고당의 안지오텐신 전환효소 활성 억제 및 SHR에서의 고혈압 억제 특성. Korean J. Food Sci. Technol. 30, 6, 1476~1479(1998)
9. 류일환, 신용서 : 알로에 아세칠만난의 ACE (Angiotensin Converting Enzyme) 저해효과 및 동력학적 분석. Korean J. Food Sci. Technol. 29, 6, 1269~1274(1997)
10. 김선봉, 이태기,, 박영범, 염동민, 김외경, 도정룡, 박영호 : 멸치육 단백질 효소가수분해물로부터 Angiotensin- I 전환효소 저해제의 분리 및

- 특성. Bull. Korean Fish. Soc. 27(1), 1~6, 1994
11. 염동민, 이태기, 도정룡, 김외경, 박염범, 김선봉, 박영호 : 수산발효식품 중의 Angiotensin-I 전환효소 저해제의 특성. 2. 정어리 어간장 중의 Angiotensin-I 전환효소 저해제의 특성. Bull. Korean Fish. Soc. 26(5), 416~423. 1993
 12. 염동민, 이태기, 도정룡, 김외경, 박염범, 김선봉, 박영호 : 수산발효식품 중의 Angiotensin-I 전환효소 저해제의 특성. 1. 멸치 젓갈중의 Angiotensin-I 전환효소 저해제의 특성. Bull. Korean Fish. Soc. 26(4), 321~329. 1993
 13. 염동민, 이태기, 변한석, 김선봉, 박영호 : 효소에 의한 고등어 근육단백질 가수분해물의 Angiotensin-I 전환효소 저해작용. Bull. Korean Fish. Soc. 25(3), 229~235. 1992
 14. 조영제, 차원섭, 복수경, 김명옥, 천성숙, 최웅규 : 청국장 발효과정 중 항고혈압성 peptide의 생산 및 분리. J. Korean Soc. Afric. Chem. Biotechnol. 43. 4. 247~252(2000)
 15. 김영현, 이현규, 도정룡, 신현균, 양차범 : Purification and Identification of Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Turban Shell(Turbo cornutus). Food. Sci. Biotechnol. 9, 6, 353~357(2000)
 16. 김세권, 이현철, 변희국, 전유진 : 가자미피 젤라틴 가수분해물로부터 항산화성 펩티드의 분리·정제 및 특성. J. Korean Fish. Soc. 29(2), 246~255, 1996
 17. Marcel E. Nimni : Collagen vol. I
 18. 김영호, 박은지, 양용 : 피부조직 콜라겐의 유동 특성. Korean J. Food Sci. Technol. 27, 4, 576~581 (1995)
 19. 김영호, 홍상필, 양용 : 피부조직 콜라겐의 DSC 특성. Korean J. Food Sci. Technol. 27, 4, 517~575 (1995)
 20. Ma Zhi-Ling, Wang Yan-Ping 외 2인 : HPLC determination of

muscle, collagen, wheat, shirmp, and soy proteins in mixed food with aid of chemometrics. American Laboratory. 27~29 (1997)

21. Albert J. Banes and G. William Link, L.R.Snyder : Comparison of Reversed-phase columns for the separation of tryptic peptides by gradient elution. Journal of Chromatography, 326, (1985) 419-431

22. Phillip J. Stone 외5인 : Elastin and collagen degradation products in urine of patients with cystic fibrosis. American journal of respiratory and critical care medicine, 152, 1995

23. A. Antonini and S. bader : Average molecular weight as parameter for quality control of protein derivatives. Cosmetics and Toiletries, 103, 59~61, 1988

24. Z. Deyl, M. Adam : Separation methods for the study of collagen and treatment of collagen disorders. Journal of Chromatography, 488, (1989) 161-197

Stephen T. Reeders, Hamden, Conn : α -3 Chain type IV collagen polynucleotides, United States Patent. 1995.

25. Bailey, Allen Jackson 외 3인 : Collagen blend. European patent application. 1998

26. B. Picard, C. Barboiron, M.P. Duris, H. Gagniere, C.Jurie, Y. Geay : Electrophoretic sepatation of bovine muscle myosin heavy chain isoforms. Meat Science 53 (1999) 1-7

27. 황선일, 임진경 : Purification of Bovine Pregnancy-Associated Proteins by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 32. 5. 1999. 445-450

28. Diane E. Mechling and Hans Peter Bachinger : The Collagen-like Peptide (GER)15 GPCCG Forms pH-dependent Covalently Linked Triple Helical Trimers. The Journal of Biological Chemistry. 275. 19. 14532-14536, 2000

29. Una Casserly, marie-Therese Mooney, Declan Troy : Standardisation and application of a semi-quantitative SDS-PAGE method for measurement of myofibrillar protein fragments in bovine longissimus muscle. *Food Chemistry* 69 (2000) 379-385
30. Natalia Kuznetsova and Sergey Leikin : Does the Triple Helical Domain of Type I Collagen Encode Molecular Recognition and Fiber Assembly while Telopeptides Serve as Catalytic Domains?. *The Journal of Biological Chemistry*. 274. 51. 36083-36088
31. Emmanuel Monnet and Francoise Fauvel-Lafeve : A New Platelet Receptor Specific to Type III Collagen. *The Journal of Biological Chemistry*. 275. 15. 10912-10917. 2000
32. Hans Ulrich Bergmeyer : *Methods of enzymatic analysis*. vol.2.
33. Anne Snellma 외 6인 : Type XIII Collagen Forms Homotrimers with Three Triple Helical Collagenous Domains and Its Association into Disulfide-bonded Trimer Is Enchnced by prolyl 4-Hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry*. 275. 12. 8936-8944. 2000
34. G. Lamprecht : Rapid method for the isolation of hydroxylysylpyridinoline and lysylpyridinoline from concentrated bone hydrolysates by liquid chromatogrphoc techniques. *The Journal of chromatography B*, 691 (1997) 297-304
35. Roman Kaliszan : Retention data from affinity high-performance liquid chromatography in view of chemometrics, *The Journal of chromatography B*, 715 (1998) 229-244
36. Zdenek Deyl 외 5인 : Quantitation of collagen types I , III and V in tissue slices by capillary electrophoresis after cyanogen bromide solubilization. *The Journal of chromatography B*, 689 (1997) 181-194
37. James A. Loging 외 7인 : Effects of Angiotensin Type-I Receptor Blockade on Pericardial Fibrosis. *Journal of Surgical*

Research 87, 101-107 (1999)

38. 심재한, 박명우, 임계택 : 초식동물 쓸개즙 추출물의 천연항산화 성분; 생물학적인 기능 및 특성구명. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 18, 3, 221~228 (1999)

39. 김세권, 최영일, 박표잠, 최정호, 문성훈 : 대구가공 부산물로부터 생릴기능성 펙타이드의 스크리닝. *J. Korean. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 43, 3, 225~27 (2000)

40. Shuji. A : 단백질 가수분해물에서 특징적인 조성을 가진 올리고펩타이드 혼합물의 조제. *New Food Industry*, 34 (9) 1992, 17-21

41. Fumihide Yamaguchi, Noriko Shimizu and Chitoshi Hatanaka : Preparation and Physiological Effect if Low-molecular-weight Pectin. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58 (4) 679-682, 1994

42. 이계준 : 신생리활성물질로서 효소저해제의 종류와 개발. *유전공학.* (33) 1991 32-29

43. Qingyi chu, Bradford T. Evans, Michael G. Zeece : Quantitative separation of 4-hydroxyproline from skeletal muscle collagen by micellar electrokinetic capilla_고 electrophoresis. *The Journal of chromatography B*, 692 (1997) 293-301

44. Ruud A. Bank, Bob Beekman, Ruggero Tenni, Johan M. Tekoppele : Pre-column derivatisation method for the measurement of glycosylated hydroxylysines of collagenous proteins. *The Journal of chromatography B*, 703 (1997) 267-272

45. Fukumi Furukawa, Akihisa Hiroi : Collagen diseases in children. *Clinics in Dermatology*, 2000;18:725-733

46. Kiyoshi Yamauchi 외 3인 : Films of collagen crosslinked by S-S bonds: preparation and charaterization. *Biomaterials* 22 (2001) 855-863

47. V. Ottani, M. Raspanti, A. Ruggeri : Collagen structure and functional implications. *Micron*, 32 (2001) 251-260

48. Tim J. Wess, Joseph P. Orgel : Changes in collagen structure: drying, dehydrothermal treatment and relation to long term deterioration. *Thermochimica Acta* 365 (2000) 119-128