

## 돈피 콜라겐 유래 올리고펩타이드 제조를 위한 방사선조사의 이용

조영준\* · 서정은 · 김영호 · 김윤지 · 이남혁 · 홍상필

한국식품연구원

### 서 론

콜라겐은 독특한 구조적 특성 때문에 다양한 식품산업에 다양한 용도로 이용되고 있는데, 최근 면역, 항균, 항혈전, 항산화, 항고혈압 효과와 같은 기능적 특성이 콜라겐 유래 올리고펩타이드에 기인한다는 사실이 밝혀지면서 이들의 활용범위가 넓어질 것으로 예상되고 있다. 기존의 콜라겐 올리고펩타이드 생산공정은 산 또는 알칼리에 침지하여 콜라겐을 추출한 다음 효소 처리하여 콜라겐을 분해하는 공정을 거치는데, 다량의 산 또는 알칼리 처리로 인하여 환경오염문제가 유발되기 때문에 본 실험에서는 환경 친화적 기술로 알려진 방사선조사기술(RT: Radiation Technology)을 이용하여 공정을 단순화하면서 기존의 화학처리 공정을 일부 대체할 수 있는 기술을 개발하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 전처리

생 박 돈피의 과도한 지방을 제거한 후 hammer mill과 chopper를 이용하여 조분쇄하였다. 분쇄된 돈피는  $-20^{\circ}\text{C}$  아세톤으로 탈지하였다.

#### 2. 방사선 조사

탈지돈피를 (주) 그린피아기술(경기도 여주 소재)의  $\gamma$ -ray irradiator(JS-8900 automatic pallet irradiator, MDS Nordion Co, Canada)를 이용하여 0, 20, 40, 60, 100, 150, 200, 250, 300 kGy의 총 흡수량을 얻도록 방사선을 조사하였다.

#### 3. pH

돈피 0.9g을 증류수 100ml에 첨가하여 20분간 교반 후, pH meter로 측정하였다.

#### 4. 콜라겐 함량 및 SDS-PAGE

콜라겐 함량 분석은 Jamall법으로 측정하였으며, Laemmli의 방법으로 SDS-PAGE를 수행하여 sub-unit를 비교하였다.

#### 5. 용해도

용해도 측정은 biuret법으로 전체 단백질 함량에 대한 수용성 단백질의 백분율로 표시하였다.

## 6. 점도, 탁도 측정

0.1M NaCl, 20mM Tris-HCl(pH 7.0) 용액에 용해한 시료를 Ostwald( $\Phi$  1mm) 점도계로 측정하였고, 탁도는 spectrophotometer(JASCO UVIDECS- 610, Japan)를 이용하여 340 nm에서 흡광도로 측정하였다.

## 7. Gel Permeation Chromatography

방사선조사와 효소 처리를 병행한 시료를 AKTAexplorer chromatography로 분획하여 분자량을 측정하였다.

# 결과 및 고찰

### 1. 분쇄수율

Chopper를 이용한 돈피의 분쇄 수율은 96%로 76%의 hammer mill 수율 보다 높게 나타났다. Hammer mill을 이용할 경우 분쇄시간의 경과와 함께 발생하는 마찰열을 해소하는 것이 필요한 것으로 나타났다.

### 2. pH

0~300 kGy의 조사선량으로 방사선 조사한 돈피의 pH의 변화는 6.54~6.94 범위로 100 kGy까지의 조사선량에서는 변화가 작았고, 150 kGy 이상에서는 pH가 소폭 증가하였다.

### 3. 콜라겐 함량 및 SDS-PAGE

Hydroxyproline법으로 측정하여 산출한 콜라겐 함량은 전체 단백질 함량 대비 93% 이었다. 펩타이드를 보다 효율적으로 제조하기 위해 방사선조사를 하였으며, 효소처리를 병행하였을 때의 콜라겐 조성변화를 검토하였다. 그 결과, 150 kGy 이상 방사선을 조사한 처리구에서 206 kDa 및 116 kDa 부근의 고분자가 소실되며 저분자 물질이 점차적으로 증가하는 현상을 보였다. 방사선조사와 초고압을 병행한 처리구에서는 저분자화를 확인할 수 없었다. 방사선을 조사한 돈피콜라겐을 효소처리하면 효소반응 시간이 길어질수록 약 24 kDa 범위의 밴드가 확인되었고, 100 kGy 이상의 고선량에서는 효소반응 2시간 이후 10% 전기영동 겔의 최 하단에 머무는 분자량의 펩타이드가 다량 관찰되었다.

### 4. 용해도

방사선 조사를 하지 않은 대조구(0 kGy)에서는 수용성 단백질의 용해도가 약 2% 수준이었는데, 300 kGy 조사선량에서는 약 65%가 수용성 성분으로 검출되었다. 이러한 결과는 방사선 조사에 의해서 3중 나선구조가 단편화되거나 풀어져 수용성 성분이 새롭게 용출되는 것으로 생각되었다. 그러나 고선량의 방사선 조사에 의해서도 고분자가 상당부분 남아있는 것으로 나타났다으므로 효소처리에 의한 저분자 펩타이드 분획을 살펴보았다. 돈피에 papain 1%를 첨가하였을 때 방사선 조사를 하지 않은 대조구(0 kGy)는 효소반응 시간과 관계없이 약 55%가 수용성 성분으로서 용출되었으나 20~60 kGy로 조사한 돈피는 효소반응 시간이 길어질수록(1시간~4시간) 65~80% 까지 용해도 증가를 보인 반면에 100 kGy 이상에서는 효소반응 시간에 관계없이 80%의 유사한 용해도를 보였으며, 300 kGy에서는 90% 이상의 용해도를 보여주었다. 이러한 결과는 방사선조사가 콜라겐구조를 약하게 하여 효소에 대한 소화력을 증가시키는 것으로

생각되었다.

## 5. 점도, 탁도

본 실험에서 0.1M NaCl, 20mM Tris-HCl(pH 7.0) 용액에 용해한 돈피 수용액의 점도측정 결과 대조구(0 kGy), 20, 40 kGy로 조사한 시료에는 점도 측정이 불가능하였으며 60 kGy 이상에서 점도 측정이 가능하였다. 60 kGy 이상의 방사선조사선량에서는 조사선량이 높을수록 점도가 저하하는 현상을 보여주었으며, 고선량의 방사선조사가 돈피콜라겐 성분의 구조변화를 일으키고 있음을 간접적으로 확인할 수 있었다. 돈피를 0~300 kGy의 범위에서 방사선 조사한 후 papain 1%를 첨가하였을 때 100 kGy 이상의 고선량에서는 짧은 효소반응 시간(1시간)에도 점도가 급격히 감소하는 현상을 보였으며, 점도의 결과와 마찬가지로 100 kGy 이상의 고선량에서는 효소반응 시간과 관계없이 유사한 탁도를 보였다.

## 6. Gel Permeation Chromatography

300 kGy로 조사한 돈피 가수 분해물을 gel permeation chromatography한 결과 분자량 9,000, 8,200, 860, 170 Da의 분자량을 확인하였다.

이상의 결과는 방사선조사가 돈피 콜라겐의 구조에 변형을 일으켜 저분자화를 유도하고 있음을 보여주고 있으며, 콜라겐 펩타이드 제조 시 유용하게 활용할 수 있음을 보여주었다.

## 요 약

환경친화적 기술로 알려진 방사선조사기술(RT: Radiation Technology)을 이용하여 돈피 유래 올리고펩타이드를 제조하고자 하였다. 생 박 돈피를 hammer mill과 chopper를 이용하여 조분쇄한 후 -20℃ 아세톤으로 탈지하였고,  $\gamma$ -ray irradiator를 이용하여 0, 20, 40, 60, 100, 150, 200, 250, 300 kGy의 총 흡수량을 얻도록 탈지돈피에 방사선조사를 실시하였다. 방사선 조사에 의한 탈지돈피의 pH 변화는 0~100 kGy 조사선량에서는 미비했으나, 150 kGy 이상에서는 소폭 증가하였다. 탈지돈피의 단백질 함량 중 콜라겐 함량은 93% 이었으며 방사선조사된 돈피콜라겐을 효소처리하면 효소반응 시간이 길어질수록 약 24 kDa 범위에서 밴드가 확인되었고, 100 kGy 이상의 고선량에서는 효소반응 2시간 이후 10% polyacrylamide 전기영동 겔의 최하단에 머무는 분자량의 펩타이드가 다량 관찰되었다. 용해도 변화는 20~60 kGy의 선량에서는 효소반응 시간이 길어질수록(1시간~4시간) 최대 65~80%의 용해도 증가를 보였고, 반면에 100 kGy 이상에서는 효소반응 시간에 관계없이 80% 이상, 300 kGy에서는 90% 이상의 용해도를 보여주었다. 점도와 탁도는 100 kGy 이상의 고선량에서 짧은 효소반응 시간(1시간)에 급격히 감소하였다. 가수 분해물(300 kGy)을 gel permeation chromatography한 결과 분자량 9,000 Da의 주 피크가 검출되었다.

## 참고문헌

1. Jonston-Banks, F. A. (1990) *Elsevier Applied Science Publ*, 233-289.
2. Gomez-Guillen, et al. (2005) *Food Hydrocolloids*, 19, 923-928.
3. Ho, H. O., et al. (1997) *Journal of Controlled Release*, 44, 103-112.