

## 동물 유래 폐지방으로부터 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용한 콜라겐 추출

노성래\* · 신용우\* · 유성식†

한국기술교육대학교 에너지·신소재·화학공학부  
31253 충남 천안시 동남구 병천면 충절로 1600

\*(주)도프

18468 경기도 화성시 동탄대로 635 SH 타임스퀘어 제1동 1506호  
(2022년 1월 25일 접수, 2022년 3월 9일 수정본 접수, 2022년 3월 23일 채택)

## Collagen Extraction Using Supercritical CO<sub>2</sub> from Animal-Derived Waste Tissue

Seong-Rae No\*, Yong-Woo Shin\* and Seong-sik You†

School of Energy, Materials and Chemical Engineering, Korea University of  
Technology & Education, 1600 Chungjeol-ro, Byeongcheon-myeon, Dongnam-gu, Cheonan, Chungnam, 31253, Korea  
\*DOF Inc.,

635, Dongtan-daero, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, 18468, Korea

(Received 25 January 2022; Received in revised form 9 March 2022; Accepted 23 March 2022)

### 요 약

본 연구는 콜라겐을 함유하는 지방흡입 유출물을 초임계 유체 존재 하에 처리하여 지방을 추출하여 콜라겐을 얻어 내는 기술에 대한 것이다. 초임계 용매를 이용하여 동물 유래 폐지방으로부터 단시간(약 6시간)에 콜라겐 추출물을 얻을 수 있었으며, 원료 대비 질량으로 대략 2~3%의 콜라겐을 얻을 수 있었다. 초임계 추출로 얻어진 추출물을 SDS-PAGE를 이용하여 콜라겐이 존재함을 확인하였고, 비교적 분자량이 큰 타입1 콜라겐임을 알 수 있었다. 또한, 초임계 추출에 의해서 얻어진 콜라겐 중에 어떤 성장인자 등이 있는 지 알아보기 위하여 IGF-1, bFGF, VEGF 및 NGF의 성장인자에 대해서 분석하였으며, 이들 성장인자 등이 추출물에 함유 되어 있음을 알 수 있었다. 초임계 처리 전, 후의 시료 mg 당 DNA함량은 큰차이를 보이지 않았다. 초임계 공정을 이용한 탈세포화 기술에 대해서는 보다 심도 깊은 추가적인 연구가 필요할 것 같다. 결론적으로 초임계유체를 이용한 용매추출 과정을 통하여 얻어진 세포외기질은 탈세포 및 탈지하여도 일정 함량 이상의 성장인자를 함유하여 생체적합성이 매우 증가될 뿐만 아니라, 조직의 재생을 빠르게 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

**Abstract** – This study is about a technique for obtaining collagen by extracting fat by treating collagen-containing liposuction effluent in the presence of supercritical fluid. Using a supercritical solvent, a collagen extract could be obtained from animal-derived fat in a short time (about 6 hours), and about 2-3% of collagen by mass compared to the raw material could be obtained. The presence of collagen in the extract obtained by supercritical extraction was confirmed by SDS-PAGE, and it was confirmed that it was type 1 collagen having a relatively large molecular weight. In addition, the growth factors of IGF-1, bFGF, VEGF and NGF were analyzed to find out which growth factors were present in the collagen obtained by supercritical extraction, and it was found that these growth factors were contained in the extract. There was no significant difference in DNA content per mg of sample before and after supercritical treatment. Further in-depth studies are likely to be needed on decellularization technology using the supercritical process. In conclusion, the extracellular matrix obtained through the solvent extraction process using a supercritical fluid contains growth factors above a certain amount even after decellularization and removal of fat, so that it was found that not only biocompatibility is greatly increased, but also tissue regeneration can be rapidly induced.

Key words: Supercritical, Collagen, Extracellular matrix, Extraction, Growth factor

### 1. 서 론

콜라겐(collagen)은 인체의 결합조직을 이루는 주요 단백질로서, 신체 구성 단백질 중 25~35% 차지하고 있다. 인체 부분별로 살펴보면, 이의 상아질 18%, 피부표피 아래 진피의 70%, 관절 연골의

† To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ssyou@kut.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

50%, 뼈의 유기물 중 80%, 뼈와 근육을 이어주는 힘줄의 80% 그리고, 눈의 각막과 결막에서 콜라겐이 주성분이다. 동물에서 발견되는 콜라겐은 300 kDa의 단량체로 이루어져 있으며, 대부분이 제 1형 콜라겐이며 화학구조 상 특정부위에 공유결합을 가지고 있다. 따라서, 성숙한 조직에서 발견되는 콜라겐은 낮은 용해성을 가진다. 또한 콜라겐을 구성하는 아미노산은 글루탐산, 하이드록시프롤린, 글리신, 프롤린 및 알라닌 등이며, 그 중 콜라겐에만 특이적으로 존재하는 하이드록시프롤린의 함량이 높은 것이 특징이다[1-2].

콜라겐은 나이가 들수록 체내에서 합성하는 능력이 잃게 되고, 40세가 되면 18세에 비해 합성능력이 절반 이하가 되는 것으로 알려져 있다. 또한 나이가 들수록 신진대사가 둔해져, 오래된 콜라겐이 분해되지 않고 계속 축적되고 콜라겐을 합성하는 재료도 부족해짐으로써 노화가 촉진된다. 이러한 문제를 개선하기 위해서 식품이나 화장품, 의약 관련 분야 등에서는 콜라겐 개발과 이를 이용한 화장품, 식용 및 생체 소재 개발 등에 대해 지속적으로 연구되고 있다[3].

지금까지는 소나 돼지에서 얻어진 콜라겐이 주로 이용되어 왔지만, 소에서 발생하는 광우병의 발병 이후로 소나 돼지 이외의 어류나 기타 축산물에서 유래하는 콜라겐이 주목을 받아 화장품이나 건강식품, 의약품 등의 원료로서 이용이 검토되고 있다. 기존에는 조직수복제, 창상회복제 등 기능성 의료기기의 원료 중 하나인 콜라겐을 소, 돼지와 같은 축산물 외에 오징어 등의 어류나, 녹용, 닭발 등과 같은 동물의 특수부위에서 추출하여 얻었다. 이 기술은 소, 돼지의 피부에서 세척, 효소처리, 여러 단계의 원심분리, 투석, 냉동건조, 멸균 및 주사제 제조 등의 공정을 거쳐 제조 공급되고 있다. 생산에 약 2주가 소요되고, 단계가 복잡함에 따라 수율이 저하된다는 문제점이 있다[4-7]. 생체에 적합하고, 고수율, 단시간에 효율적으로 콜라겐을 생산할 수 있는 기술의 개발이 필요한 실정이다.

콜라겐을 추출하는 방법으로는 기본적으로는 화학적 가수분해[8-9] 및 효소 가수분해[10-11]에 의해 얻어진다. 화학적 가수분해는 더 일반적으로 산업에서 사용되지만 효소를 이용하는 생물학적 공정이 보다 나은 품질의 콜라겐을 얻기 위해서 이용된다. 효소 공정은 폐기물을 덜 발생시키고, 처리 시간을 단축할 수 있지만 비용이 보다 많이 들고 콜라겐 추출을 위해서 상당히 복잡한 과정을 거쳐야 한다[12].

최근에는 초음파를 이용하여 콜라겐 추출 공정시간을 단축하고, 추출 효율을 올리는 결과를 얻은 바 있다[13-14]. 하지만, 폴리펩타이드 사슬의 수소결합을 깨뜨려 단백질의 변성을 일으킬 수도 있다는 단점이 있다[15].

이 밖에도 다양한 탈세포화 기술이 있으며 Crapo 등이 잘 정리하였다[16]. Crapo 등에 의하면 크게 화학적 처리와 물리적 처리 기술로 나눌 수 있는 데 화학적 처리 기술은 위에 설명한 방법들로서[8-16] 조직의 물성을 열화시키는 경향이 있으며, 처리 기간도 길어지므로, 본 연구에서는 물리적 처리 중 초임계 유체를 이용한 탈세포화 기술을 콜라겐 추출에 적용하고자 하였다. 고압 또는 초임계 용매를 이용한 조직의 탈세포화에 적용한 예는 여러 연구자[17-19]들이 연구를 수행하였으며, 공정에서 처리 시간은 기존의 방법들에 비해 단축되지만, 탈세포화는 물, 에탄올 등의 공용매를 초임계 이산화탄소와 같이 사용하는 경우 탈세포화가 잘 되었다는 보고도[18] 있지만 그렇지 않다는 보고도[19] 있다.

본 연구에서는 폐기되는 인체 지방 중에서 지방을 제거하여 콜라겐을 얻어내고자 하였으며, 지방 유래 조직은 지방이 다량 함유되

어 있고, 지방이 조직 깊숙이 침투되어 있어서 일반적인 용매 추출로 지방을 완전히 제거하는 것은 어렵지만, 초임계용매의 경우 표면장력이 매우 작으므로 미세 공극까지 침투가 가능할 것으로 생각되므로, 지방유래 조직에서 지방의 추출이 용이할 것으로 판단되고, 화학적인 측면에서도 초임계 이산화탄소 단독으로 또는 극성 공용매를 이용하여 지방과 같은 친유성 성분의 제거가 가능하므로, 초임계 용매를 이용한 기술을 적용하면 단시간 내에 효율적으로 지방을 제거하고 콜라겐을 얻을 수 있을 것으로 판단하였다.

따라서, 인체 지방 유래 조직에서 초임계 유체 공정을 이용하여 콜라겐을 고속, 고수율, 고순도로 분리하여 조직수복제 및 창상회복제와 같은 의료기기의 원료의약품 개발하고자 하였다. 고 효율 공정 개발을 위하여 운전조건 즉, 온도, 압력 및 공용매의 사용량에 따른 추출시간과 추출된 콜라겐을 분석하여 조직수복제 및 창상회복제로의 적용이 가능한 지를 알아보고자 하였으며, 인체유래 콜라겐의 경우도 면역반응이 존재하여 이에 대한 대책도 필요하므로 얻어진 콜라겐의 DNA함량을 분석하여 탈세포화 가능성을 알아보고자 하였다.

## 2. 실험

### 2-1. 시약

실험에서 이용된 CO<sub>2</sub>는 가스캠테크놀로지(주)의 순도 99.9%, 그리고 공용매로 이용된 증류수는 (>99.8%), 대정화금의 에탄올(99.9%)을 추가 정제없이 사용하였다.

인체 유래 지방 시료는 (주)도프로 부터 공급받은 것으로서 기름성분과 물 등 불순물이 다량 함유된 상태였으며 유동성이 있는 걸쭉한 액체 상태였다. 시료에 다량 포함되어 있는 수분으로 인해 초임계 유체의 오일에 대한 용해력이 감소할 수 있으며, 유용한 콜라겐 성분 등은 수층과 오일층에 녹아 있지 않으므로, 나스코 고속원심분리기(D3024)를 이용하여 단순히 원심 분리하여 오일 성분 및 수분을 제거하여 추출 시간을 단축시키고자 하였다. 따라서, 4 °C, 10,000 rpm의 조건으로 20분간 원심분리 시켰으며 시료의 원심 분리 후 상단의 오일층과 하단의 수층을 제거한 부분으로 콜라겐 추출 실험을 수행하였다.

### 2-2. 초임계 추출 공정

초임계 용매를 이용한 추출 실험장치는 Fig. 1에 나타내었으며, 크게 냉각부, 추출부, 배출부로 총 3가지 부분으로 구성되어 있다. 이산화탄소를 액체 펌프로 일정량을 도입시키기 위해 -40 °C로 냉각된 냉각장치를 통해 액화시킨 후 고압액체 펌프로 가압을 한다. 경우에 따라서는 고압 액체 펌프 대신에 가스부스터를 이용하기도 하였다. 추출조는 액체 이산화탄소가 주입되어 추출이 이뤄지는 부분으로 주변부를 실리콘히터가 감싸고 있어서 실험 온도를 조절할 수 있도록 되어있다. 실험 압력을 조절하기 위해 일정량의 이산화탄소를 배출시키기 위해 추출조 후단에 역압조절기로 배출 유량을 조절하였다. 배출부는 역압조절기 후단에 유리 재질의 트랩을 설치하여 상압으로 추출되어 나오는 지방과 기화된 이산화탄소를 분리하였으며 그 후단부에는 습식가스미터(wet gas meter)를 설치하여 실험에 사용된 CO<sub>2</sub>유량을 측정하였다. 시료로부터 지방을 추출하는 실험은 원심분리된 후 상단의 오일층과 수층을 제거한 시료 3 g을 추출조 내부에 넣고 고압 추출조를 밀봉한다. 그 후 실리콘 히터를

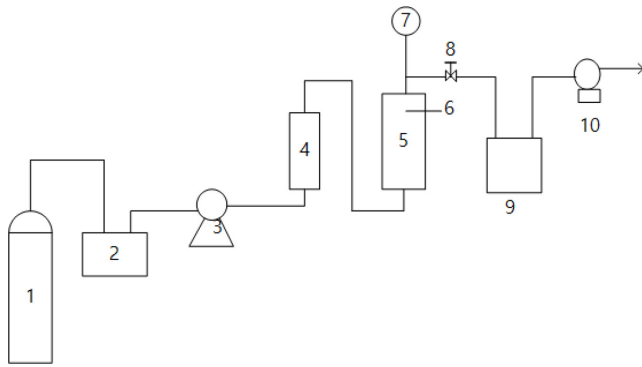


Fig. 1. Schematic diagram of supercritical extraction process.

1. CO<sub>2</sub> bomb
2. Cooler
3. High pressure liquid pump
4. Solvent tank
5. Extraction chamber
6. Pt-resistance thermocouple
7. Pressure gauge
8. Back pressure regulator
9. Sample trap
10. wet gas meter

이용해 추출조를 실험 온도인 31 °C까지 승온시키고 -40 °C로 액화된 이산화탄소를 액체펌프를 통해 12 ml/min의 유속으로 추출조 내부를 300 bar까지 가압한다. 역압조절밸브를 통해 나오는 이산화탄소는 트랩을 거친 후 지방성분은 트랩에 쌓이고, 배출되는 이산화탄소의 유량을 습식가스미터로 측정하였다. 추출은 6시간 동안 진행하였으며 추출이 끝난 후 추출조를 상압까지 감압시키고 추출조를 열어 내부의 시료의 상태를 육안으로 확인 및 질량을 측정하였다.

### 2-3. 콜라겐 측정

초임계 추출에 의해 분리된 콜라겐은 SDS-PAG (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)를 이용하여 전기영동하여 존재유무를 확인하였다. 초임계 추출 원액을 원심분리하여, 상등액과 침전물로 각각 분리하고, 환외여과장치를 이용하여 탈염 및 농축하여 20배로 농축하였다. 농축 전 전체 원액에 대한 단백질 농도를 브래드퍼드 방법(Bradford Protein Assay)으로 측정하였으며, 브래드퍼드 단백질 정량법에 의한 단백질 정량분석에 의해서는 콜라겐이 측정되지 않는다. SDS-Page에 의하여 콜라겐 존재 유무를 확인한 후 농축된 콜라겐 추출물 상등액 및 침전물에 대하여 웨스턴 블롯(Western Blot) 분석을 수행하여 콜라겐 타입을 확인하였다. 20배 농축한 상등액 및 침전물을 8% SDS-PAGE 겔에 전기영동한 후, 콜라겐 밴드를 니트로셀룰로오스 막으로 이동시킨 후, 타입 1 콜라겐 단클론항체(Abcam, Cambridge, UK)를 처리하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.

### 2-4. SEM 측정

지방이 추출된 콜라겐의 형상을 알아보기 위해 SEM (Scanning Electron Microscope, JEOL Ltd., 모델 JSM-6010LA)을 측정하였다.

### 2-5. 성장인자 확인

세포의 기질에는 매우 다양한 성장인자가 포함 될 수 있지만, 본 연구의 경우는 성장인자 중 VEGF, bFGF, IGF-1 및 EGF로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 성장인자의 수준을 효소 결합 면역흡착 분석(Enzyme-Linked Immunosorbent assay)으로 성장인자의 함량을 확인하고자 하였다.

### 2-6. DNA함량 측정

Qiagen사의 DNA extraction kit를 사용하여 DNA를 추출하고, Thermo Fisher Scientific사의 Nanodrop 1000 UV/vis spectrophotometer 이용하여 DNA함량을 분석하였다.

## 3. 실험 결과 및 검토

### 3-1. 운전조건의 영향

추출에 있어서 특정 압력 범위에서는 압력이 높을수록 초임계 유체의 밀도가 상승하여 더 높은 용해력을 가지지만 임계점보다 높은 압력에서 작업하는 경우 작업시간을 획기적으로 줄일 수 있을 정도로 압력에 따른 용해도의 차이가 크지 않으므로, 장치의 초기 투자비 및 안정적인 운전을 고려하여 압력은 최대 500 bar이하에서 운전하였다.

우선은, 압력은 300 bar로 고정 시켜 놓고, 온도와 CO<sub>2</sub> 유량에 따른 영향을 알아보기 위하여 세가지 조건에서 실험을 수행하였다. 각각의 세가지 운전 조건 A, B, C는 Table 1에 정리하였다.

공용매로는 물과 에탄올을 각각 그리고 둘의 혼합시켜 공용매로 이용하였으며, 지방 시료와 접촉하기 전에 별도의 탱크에서 액체 또는 초임계 CO<sub>2</sub>와 접촉시켜 공용매를 포화시킨 후 시료를 통과하도록 하였다. 문헌에 의하면[19] 물의 첨가에 의해서 탈수화(dehydration)에 의한 추출 후 시료가 딱딱해지는 현상을 방지할 수 있다고 하며, 본 연구에서도 같은 결과를 얻을 수 있었지만 공용매 첨가에 의한 공정시간 단축에는 큰 영향을 주지 못하였으므로 물과 에탄올을 3:7의 일정비율로 실험하였다.

A와 B 조건은 일정 CO<sub>2</sub> 유량에서 각기 다른 두 온도, 25 °C와 35 °C에서 지방을 추출한 실험으로서 온도가 추출에 미치는 영향을 확인할 수 있으며 A와 C의 조건에서 얻어진 결과를 비교하여 이산화탄소의 유량이 추출에 어떤 영향을 미치는지 확인하였다. 또한, 추출의 효율성 및 최적 운전시간의 측정을 위해 2시간마다 추출조를 개방하여 시료의 상태를 육안으로 확인하였고, 질량을 측정하였

Table 1. Experimental Conditions A, B and C to study the effect of temperature and CO<sub>2</sub> flow rate at 300 bar

	Temperature (°C)	Flow rate (mL/min)
A	25	12
B	35	12
C	25	6

Table 2. Mass change with time under experimental conditions A, B and C

	2 hour	4 hour	6 hour
A	0.8038 g (26.79%)	0.1320 g (4.40%)	0.0616 g (2.05%)
B	1.1382 g (37.94%)	0.2332 g (7.77%)	0.0742 g (2.47%)
C	0.9835 g (32.78%)	0.2814 g (9.38%)	0.0778 g (2.59%)

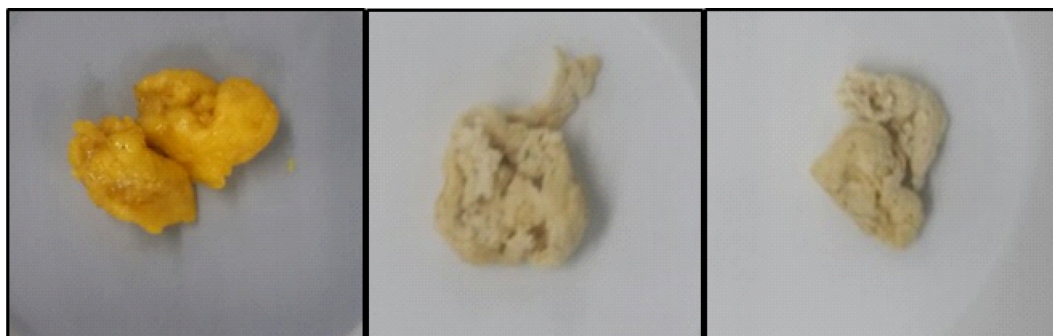


Fig. 2. Changes in appearance of samples after 2 hours, 4 hours, and 6 hours from the left, respectively.

다. 시간에 따른 각각의 운전조건에서 질량 변화는 Table 2에 정리하였다.

또한, 추출 시간에 따른 질량변화도 Table 2에 나타내었다. 이 결과를 보면, A 조건에서 2시간 동안 추출한 후 시료의 질량은 최초 3 g에서 0.8038 g으로 74%의 질량이 감소했다. 시료를 육안으로 관찰한 결과 표면에 소량의 오일 성분이 아직 잔존해 있었고, Fig. 2에서 보는 바와 같이 처리 전 보다 백색을 띄지만 전체적으로 황색을 띄고 있었다. 같은 조건에서 4시간 동안 초임계유체로 추출한 결과는 Fig. 2의 사진과 같이 거의 백색의 고체상을 띄었으며 질량은 0.1320 g으로 약 96% 감소함을 보였다. 시료 겉면은 거의 백색이었으나, 시료 내부에는 아직 황색으로 기름 성분의 추출이 완료되지 않았음을 확인하였다. A조건에서 6시간 동안 추출한 시료의 경우 질량이 0.0616 g을 나타냈고 Fig. 2에서 보듯이 외부의 백색으로 4시간 추출 후와 외관은 비슷하지만, 내부까지 모두 백색으로 나타나서 시료의 내부 및 표면 모두 지방이 완전히 추출되었음을 확인할 수 있었다. 따라서, A조건(25 °C, 300 bar와 초임계 이산화탄소 주입 유량 12 ml/min)에서는 6시간 이전에 지방 성분의 추출이 끝날 것으로 예상된다.

Fig. 2에는 A의 조건에서 초임계 CO<sub>2</sub>로 추출한 후 2시간, 4시간, 6시간 후의 시간에 따른 시료의 외관 변화를 나타낸 것이지만, 시료의 추출시간에 따른 시료의 외관색 변화는 다른 운전조건에서도 유사한 결과를 얻었다.

실험 조건 B의 경우 추출조의 온도가 추출 속도에 미치는 영향을 확인하기 위하여 추출조의 온도를 35 °C로 변경하고 압력 300 bar, 펌프의 유량은 12 ml/min은 조건 A와 동일하게 실험을 실시하였다. 추출 2시간 후 시료를 확인한 결과 많은 양의 지방 성분이 남아있음을 확인할 수 있었고 질량을 측정할 결과 1.1382 g으로 초기 질량 3 g 대비 62%의 지방이 제거 됐음을 확인하였다. 온도의 경우는 시료의 변성 때문에 60 °C 이하에서 운전해야 하며 용해도 때문에 낮은 온도로 운전하는 것이 어려우므로 이산화탄소가 액체인 영역인 25 °C와 초임계 상태인 35 °C를 대표적으로 실험하였으나, 두 온도에서 지방 추출속도에 약간의 차이를 보이고 있지만 큰 차이는 나는 것은 아니었다.

추출 속도와 주입되는 액체 이산화탄소의 유량의 상관관계를 확인하기 위하여 펌프의 유량을 6 ml/min으로 변경하고 다른 온도 및 압력조건은 실험 A와 동일한 25 °C, 300 bar에서 지방 추출을 수행하였다. 2시간이 지난 시료는 질량이 0.9835 g으로 최초 시료 대비 67%의 질량감소를 나타냈으며 타 실험과 비슷하게 지방 성분이 다량 함유되어 있음을 확인하였다. 추출 6시간이 지난 시료는 다른

조건의 시료와 동일하게 백색이었으며 육안으로 대부분의 지방이 추출되었음을 확인할 수 있었지만, 시료 내부에는 잔존해 있는 지방의 추출이 종료되지 않았음을 관찰할 수 있었다. 질량은 0.0778 g으로 CO<sub>2</sub> 유량이 12 ml/min에 비해서 최종 질량이 더 컸었다.

온도 조건이 다른 A(25 °C)와 B(35 °C)의 질량을 비교한 결과 A의 경우 최초 3 g의 시료대비 최종적으로 2.05%의 시료를 얻었고 B의 경우 2.47%의 결과를 나타내었으며 둘의 색을 육안으로 비교하고 질량 변화를 고려 해볼 때 35 °C에 추출했을 때에 비해서 약간의 차이이긴 하지만 25 °C가 더 유리함을 확인하였다.

또한, C의 경우 A와 동일한 온도 및 압력 조건(25 °C, 300 bar)에서 주입되는 이산화탄소의 양을 12 ml/min에서 6 ml/min으로 줄여 실험하였다. 그 결과 Table 2에서 확인된 것처럼 최종 질량이 A의 경우 최초 3 g 시료대비 2.05%였으며 C의 경우는 2.59%를 나타내었다. 예상 대로 유량이 큰 경우가 추출 속도에 유리함을 알 수 있었다.

6시간 추출 후, 기존의 황색의 시료와는 다르게 백색에 가까우며 섬유질과 비슷한 질감을 가진 고체를 얻을 수 있었으며 시료의 질량은 최초 3 g에서 0.0723 g으로 약 98%의 질량이 감소되었다. 추출조 후단의 유분 트랩의 경우 지방으로 추측되는 황색의 맑은 액체를 얻을 수 있었으며 기존 시료에서 초임계 이산화탄소를 이용하여 지방이 함유된 동물 시료로부터 내 지방을 성분을 추출할 수 있음을 알 수 있었다.

### 3-2. 콜라겐 측정

기초 실험 후 얻어진 시료 내부에 콜라겐의 존재 유무를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 통해 분석하였으며 그 결과를 Fig. 3에 표

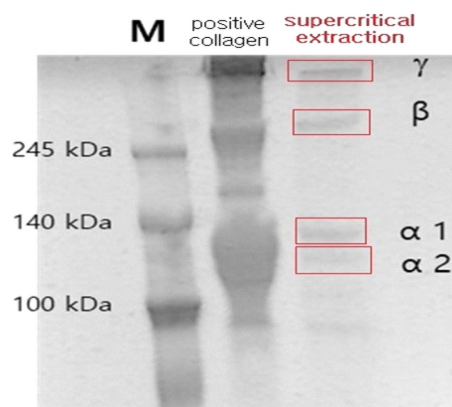


Fig. 3. SDS-PAGE analysis result of supercritical extract.



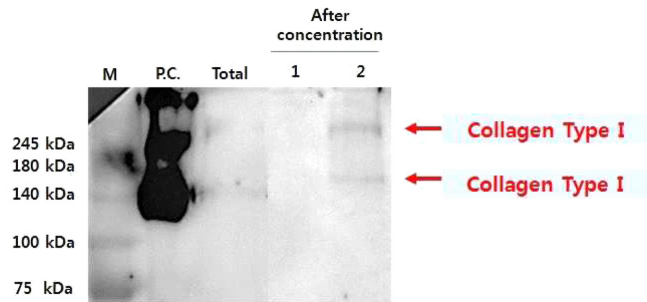


Fig. 4. Protein Bands in 20-fold Concentrated Precipitate. M: Protein marker, P.C.:human Collagen (15  $\mu$ g), 1: supernatant (20x concentration), 2: precipitate (20x concentration)

시하였다. 분석 결과 콜라겐을 함유하고 있는 것을 확인할 수 있는 특성 띠인  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 를 확인할 수 있었으므로, 추출 후에 지방 등이 추출되었지만, 콜라겐은 추출되지 않고 추출조 내부에 남아있음을 확인하였다. 따라서, 동물 유래 시료에서 지방 등을 추출하는 경우 기존의 기술로는 수일 또는 일주일 이상 걸리지만, 콜라겐을 단 시간(운전시간 6시간)에 효과적으로 추출할 수 있음을 알 수 있었다. 또한, Fig. 4의 20배 침전물을 웨스턴 블릿을 수행하여 얻은 결과를 보면 비교적 분자량이 큰 타입1 콜라겐 단백질 밴드를 확인할 수 있었다. 즉, 초임계 추출로 얻어진 콜라겐은 타입1임을 알 수 있었다.

### 3-3. SEM분석결과

지방을 추출한 후 시료의 ECM (Extra cellular matrix)의 망상 구조가 추출과정에서 깨지는 것이 있는지 알아보기 위하여 SEM을 이용하여 표면을 촬영하였으며 이 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 운전 조건에 따라 표면은 차이점을 보이지 않았으며 ECM 구조는 콜라겐과 같은 섬유질 형상과 그 외 추출되지 않은 물질들이 얹혀있는 모양을 보이고 있고, 제품화시 중요한 물리적 특성을 좌우하는

콜라겐의 망상구조가 깨지거나 하는 것은 SEM사진으로만 명확히 알 수 없지만, 계면활성제 또는 효소 처리 등의 다른 화학적 처리에 비해서 기계적 강도가 유지된다고 알려져 있다[19].

### 3-4. Growth factor 분석

추출 후 남아있는 콜라겐 중에 어떤 성장인자들이 있는지 알아보기 위하여 효소 결합 면역 흡착 분석(Enzyme-Linked Immunosorbent assay)으로 성장인자의 함량을 분석하고, IGF-1, bFGF, VEGF 및 NGF의 함량 분석결과를 Table 3에 나타 내었다.

IGF-1 인자는 포도당 대사와 단백질 대사를 향상시키는 인자이며, bFGF는 체내에 있는 섬유아 세포에 효과를 나타내는 성장인자의 하나로 세포 성장을 촉진하는 성장인자의 하나이다. VEGF는 혈관형성과 혈관 신생을 자극하는 신호 단백질이며, NGF는 신경조직의 분화, 생장 활성을 나타내는 시토킨성 펩티드 인자이다.

따라서, 초임계유체를 이용한 용매추출 과정을 통하여 수득한 세포외기질은 탈세포 및 탈지하여도 일정 함량 이상의 성장인자를 함유하여 생체적합성이 매우 증가될 뿐만 아니라, 세포의 생리활성을 조절하고, 조직의 재생을 빠르게 유도할 수 있음을 알 수 있다.

### 3-5. DNA 함량

Qiagen사의 DNA extraction kit를 사용하여 DNA를 추출한 다음, Nanodrop 1000 UV/vis spectrophotometer 이용하여 DNA함량을 분석하였다. 분석결과 처리전 시료의 경우, 시료 mg당 DNA함량이 753~1200 ng정도 됨을 알 수 있었다. 하지만 초임계 처리 한 후에도 시료 mg 당 DNA함량은 큰 차이를 보이지 않았으므로 초임계 용매에 의해서 추출된 양을 고려하여도 DNA함량이 초임계 추출에 의하여 크게 영향 받지는 않는 것 같다. 초임계와 공용매를 이용한 탈세포화 기술에 대하여 연구한 다른 연구들[18-19]도 있지만, 본 연구의 결과에 의하면 초임계 공정에 의하여 탈세포화가 가능할 것인지에 대해서는 보다 심도 깊은 추가적인 연구가 필요할 것 같다.

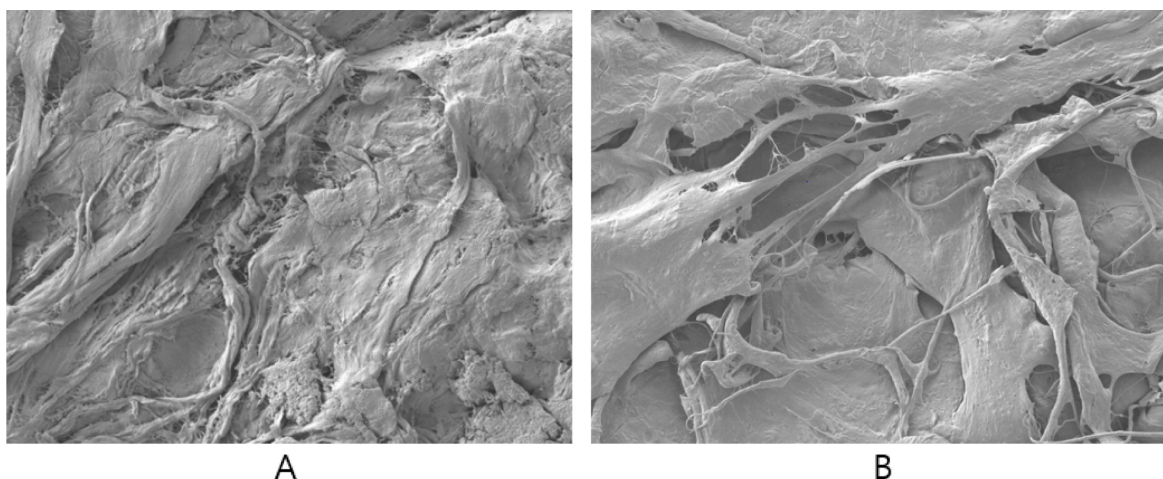


Fig. 5.  $\times 500$  SEM photography, A: 25  $^{\circ}$ C, 12 ml/min, B: 35  $^{\circ}$ C, 12 ml/min.

Table 3. Content of various growth factors in ECM obtained using supercritical extraction

	IGF	bFGF	VEGF	NGF
Concentration of extracted growth factors in ECM (pg/ml)	80.389	114.595	9.63	7.174

#### 4. 결 론

초임계 용매를 이용하여 동물 유래 지방으로부터 단시간(약 6시간)에 콜라겐 추출물을 얻을 수 있었으며, 원료 대비 질량으로 대략 2~3%의 콜라겐을 얻을 수 있었다. 초임계 추출로 얻어진 추출물을 SDS-PAGE를 이용하여 콜라겐이 존재함을 확인하였다. 또한, 웨스턴 블롯을 수행하여 얻은 결과를 보면 비교적 분자량이 큰 타입1 콜라겐 단백질 밴드를 확인할 수 있었다.

초임계 추출에 의해서 얻어진 콜라겐 중에 어떤 성장인자 등이 있는 지 알아보기 위하여 효소 결합 면역 흡착 분석(Enzyme-Linked Immunosorbent assay)으로 성장인자의 함량을 분석하고, IGF-1, bFGF, VEGF 및 NGF가 다량 함유 되어 있음을 알 수 있었다.

초임계 처리 전, 후의 시료 mg 당 DNA함량은 큰차이를 보이지 않았으므로 DNA함량이 초임계 추출에 의하여 크게 영향 받지는 않는 것 같다. 초임계 공정을 이용한 탈세포화 기술에 대해서는 보다 심도 깊은 추가적인 연구가 필요할 것 같다.

따라서, 초임계유체를 이용한 용매추출 과정을 통하여 얻어진 세포외기질은 탈세포 및 탈지하여도 일정 함량 이상의 성장인자를 함유하여 생체적합성이 매우 증가될 뿐만 아니라, 세포의 생리활성을 조절하고, 조직의 재생을 빠르게 유도할 수 있음을 알 수 있다.

#### 감 사

이 논문은 2020년도 한국기술교육대학교 교수 교육연구진흥과제 지원에 의하여 연구가 수행되었으며 감사드립니다.

#### Reference

1. <https://ko.wikipedia.org/wiki/%EC%BD%9C%EB%9D%BC%EA%B2%90>.
2. Di Lullo, G. A., Sweeney, S. M., Korkko, J., Ala-Kokko, L. and San Antonio, J. D., "Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen," *J. Bio. Chem.*, **277**, 4223-4231(2002).
3. Lafarga, T. and Hayes, M., "Bioactive Peptides from Meat Muscle and by-products: Generation, Functionality and Application as Functional Ingredients," *Meat Science*, **98**, 227-239(2014).
4. Schmidt, M. M., Dornelles, R. C. P., Mello, R. O., Kubota, E. H., Mazutti, M. A., Kempka, A. P. and Demiate, I. M., "Collagen Extraction Process," *Int. Food Res. J.*, **23**, 913-922(2016).
5. Mizuta, S., Hwang, J. and Yoshinaka, R., "Molecular Species of Collagen from Wing Muscle of Skate (*Raja kenoi*)," *Food Chem.*, **76**, 53-58(2002).
6. Kimura, S., Omura, Y., Ishida, M. and Shirai, H., "Molecular Characterization of Fibrillar Collagen from the Body Wall of Starfish *Asterias Amurensis*," *Comp Biochem Physiol.*, **104**, 663-668(1993).
7. Nagai, T. and Suzuki, N., "Partial Characterization of Collagen from Purple Sea Urchin (*Anthodidaris crassispina*) Test," *Int J. Food Sci. Technol.*, **35**, 497-501(2000).
8. Wang, L., Liang, Q., Chen, T., Wang, Z., Xu, J. and Ma, H., "Characterization of Collagen from the Skin of Amur Sturgeon,"

*Food Hydrocolloids*, **38**, 104-109(2014).

9. Nagai, T., "Characterization of Collagen from Emu (*Dromaius novaehollandiae*) Skins," *Journal of Food Science and Technology*, **52**, 2344-2351(2015).
10. Li, D., Mu, C., Cai, S. and Lin, W., "Ultrasonic Irradiation in the Enzymatic Extraction of Collagen," *Ultrasonics Sonochemistry*, **16**, 605-609(2009).
11. Woo, J. W., Yu, S. J., Cho, S. M., Lee, Y. B. and Kim, S. B., "Extraction Optimization and Properties of Collagen from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Dorsal Skin," *Food Hydrocolloids*, **22**, 879-887(2008).
12. Zavareze, E. R., Silva, C. M., Mellado, M. S. and Prentice-Hernández, C., "Funcionalidade de Hidrolisados Proteicos de Cabrinha (*Prionotus punctatus*) Obtidos a Partir de Diferentes Proteases Microbianas," *Química Nova*, **32**, 1739-1743(2009).
13. Kim, H. K., Kim, Y. H., Kim, Y. J., Park, H. J. and Lee, N. H., "Effects of Ultrasonic Treatment on Collagen Extraction from Skins of the Sea Bass *Lateolabrax Japonicus*," *Fisheries Science*, **78**, 485-490(2012).
14. Kim, H. K., Kim, Y. H., Park, H. J. and Lee, N. H., "Application of Ultrasonic Treatment to Extraction of Collagen from the Skins of Sea Bass *Lateolabrax Japonicus*," *Fisheries Science*, **79**, 849-856(2013).
15. Ran, X. G. and Wang, L. Y., "Use of Ultrasonic and Pepsin Treatment in Tandem for Collagen Extraction from Meat Industry by-products," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **94**, 585-590(2014).
16. Crapo, P. M., Gilbert, T. W. and Badylak, S. F., "An Overview of Tissue and Whole Organ Decellularization Processes," *Biomaterials*, **32**, 3233-3243(2011).
17. Sawada, K., Terada, D., Yamaoka, T., Kitamura, S. and Fujisato, T., "Cell Removal with Supercritical Carbon Dioxide for Acellular Artificial Tissue," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **83**, 943-949(2008).
18. Wang, J. K., Luo, B., Guneta, V., Li, L., Foo, S. E. M., Dai, Y., Tan, T. T. Y., Tan, N. S., Choonga, C. and Wong, M. T. C., "Supercritical Carbon Dioxide Extracted Extracellular Matrixmaterial from Adipose Tissue," *Materials Science and Engineering C*, **75**, 349-358(2017).
19. Casalia, D. M., Handletonb, R. M. and Matthews, M. A., "A Novel Supercritical CO<sub>2</sub>-Based Decellularization Method for Maintaining Scaffold Hydration and Mechanical Properties," *J. of Supercritical Fluids*, **131**, 72-81(2018).

#### Authors

**Seong-sik You:** Professor/ Korea University Of Technology & Education School of Energy, Materials and Chemical Engineering, Korea University of Technology & Education, 1600 Chungjeol-ro, Byeongcheon-myeon, Dongnam-gu, Cheonan, Chungnam, 31253, Korea; ssyou@kut.ac.kr

**Yong-Woo Shin:** CEO/DOF Inc. 635, Dongtan-daero, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, 18468, Korea; ywshin@biodof.com

**Seong-Rae No:** Assistant Researcher/DOF Inc. 635, Dongtan-daero, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, 18468, Korea; srnoh@biodof.com