

초음파 복합처리를 통한 참굴 펩타이드의 피부미백 및 피부면역 활성

한재건¹ · 김효성¹ · 권민철¹ · 김진철¹ · 황보영² · 이현용^{1,3*}

¹강원대학교 BT특성화학부대학 생물소재공학과, ²(주)SKY007, ³강원대학교 생명공학연구소

Skin Whitening and Skin Immune Activities of the Peptides Isolated from *Crassostrea gigas* by Ultrasonification Processes

Jae Gun Han¹, Hyo Sung Kim¹, Min Chul Kwon¹, Jin Chul Kim¹, Bo Young Hwang², and Hyeon Yong Lee^{1,3*}

¹Bio Materials Engineering, College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University

²SKY007 Co.

³Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University

Abstract In this study, peptides were isolated from *Crassostrea gigas* using an ultrasonification process at 40°C. The yield of the peptides was greater than 34%, and their cytotoxicity was found to be less than 22.8% against several cell lines that were treated with the extracts at a dose of 1.0 mg/mL. In addition, the tyrosinase inhibitory and melanin synthesis of the peptides isolated from *Crassostrea gigas* were also evaluated to determine if they could be used as a potential cosmetic agent. The peptides were found to significantly inhibit the melanin synthesis of the clone M-3 cell line by up to 62.7%. The inhibitory activities of the tyrosinase were observed 34.51% in ascorbic acid, 42.49% in extract with the ultrasonification at 40°C and 35.37% in 40°C extract at 1.0 mg/mL concentration, respectively. Finally, when samples were treated with the peptide extracts at a concentration of 0.6 mg/mL, PGE2 expression was significantly decreased. Taken together, these results indicate that *Crassostrea gigas* may be a source of cosmetic agents capable of improving physiological hyperpigmenting and immunomodulating skin disorders.

Key words: *Crassostrea gigas*, skin immuno-modulating, skin whitening effect, melanin, ultrasonification process

서 론

굴은 바다의 우유라 할 만큼 완전식품으로 알려져 있어, 날 것을 식용하지 않는 서양에서도 생굴은 널리 식용되고 있다. 굴은 양식을 하더라도 시설만 인위적일 뿐 자연 상태 그대로 성장하기 때문에 자연산과 양식의 구분이 크지 않다(1). 영양 성분으로는 글리코겐, 타우린, 단백질, 비타민은 물론 다양한 미네랄을 함유하고 있어(2) 예부터 고�혈압, 동맥 경화, 심장병 예방 등에 효과가 있으며 알카리성 체질을 만들고 심장, 간장, 췌장 등 장기의 기능을 높이는 강장 및 스테미너 식품으로 알려져 있다. 또한 민간에서는 비만 예방 및 피부 미용에 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 임산부가 굴을 많이 먹으면 머리 좋은 아기를 낳는다는 속설이 있어, 임신기간 여성들의 빈혈을 막는 보양식으로도 섭취되고 있다.

이처럼 굴은 많은 유효성분 및 효능을 가지고 있어 비타민과 미네랄의 보고로 불리고 있으나, 수산물의 특성상 유효성분의 대부분이 고온에서 불안정한 성분으로 이루어져 안정성이 떨어짐에 따라 기능성 소재로 이용하기에 용이하지 않은 문제점을 가

지고 있다. 열수추출은 천연물로부터 유효성분을 추출하는 가장 기본적인 추출 방법으로 천연물의 소재화 공정에 폭넓게 사용되고 있다. 하지만 추출 효율이 낮고 이로 인한 에너지 소비가 많으며, 고열로 인해 유용성분의 파괴, 단백질의 변성, 성분의 손실, 가용성분 위주의 추출 등 열에 대하여 불안정한 단점을 드러내고 있어(3), 이러한 문제점을 해결함과 동시에 굴의 활용성을 증진할 수 있는 새로운 추출 공정이 요구된다.

초음파 에너지는 초음파 진동에 의한 공동현상을 유도함으로써 매우 큰 에너지를 발생하는데 이를 통해 주변에 위치하는 반응물 입자들의 운동에너지가 상승하고, 초음파 에너지의 충격 효과로 높은 압력을 유도함으로써 혼합 효과를 높여주게 된다(4). 일반 열수 추출과 초음파 추출을 비교한 실험에서 초음파 공정을 통해 추출 수율의 증가 및 추출 시간의 단축 효과가 있으며, 이는 초음파의 공동효과에 따른 높은 압력이 세포 내부조직을 파괴함으로써 지방질의 이동거리가 짧아지고 확산이 용이하게 일어나기 때문이라는 결과가 보고된 바 있다(5,6).

생리활성 펩타이드는 구조와 활성이 다양하고, 유전공학 기술을 통한 생산 및 개조가 가능할 뿐 아니라, 높은 안전성을 기대할 수 있어 최근 다양한 분야에서 새로운 활용소재로 주목받고 있다(7). 특히 최근에는 해양생물 유래 펩타이드에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 특히 천연 저분자 펩타이드 중에서 camosine이나 anserine과 같은 히스티딘계 저분자 펩타이드는 항산화능, 글리케이터 저해능, 가교결합 저해능, 자유라디칼과 금속이온 소거능이 매우 높은 것으로 보고되고 있어 세포 노화 억제 물질로의 개발이 기대되고 있다. 천연 펩타이드는 세포독성 및

*Corresponding author: Hyeon Yong Lee, College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon-do 200-701, Korea

Tel: 82-33-250-6455

Fax: 82-33-256-4819

E-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr

Received October 28, 2007; revised June 13, 2008;

accepted July 17, 2008

염증성 부작용이 적을 뿐 아니라 산소와 물에 대하여 안정성을 가짐으로써 높은 보습력을 나타냄에 따라 향장소재로의 개발이 기대된다.

따라서 본 연구에서는 기능성 향장소재로서 활성이 기대되는 참굴의 저온 초음파 추출물로부터 펩타이드를 분리하고, 이들 펩타이드의 향장활성을 측정함으로써 굴의 기능성 향장소재로의 활용 가능성을 확인하고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

참굴의 추출

본 실험에 사용한 시료는 동해산 양식 참굴(*Crassostrea gigas*)을 강원도 춘천시 소재 수협에서 구입하여 세절한 후에 열풍건조기(mechanical circulation oven, Dong Yang Science, Bucheon, Korea)를 이용하여 36°C에서 열풍 건조하여 사용하였다. 건조한 굴은 추출 flask에 시료 200 g을 넣고 중량 대비 10배의 증류수를 넣어 수직 환류 냉각장치가 부착된 추출기를 이용하여 40°C에서 12시간씩 2회 반복 추출하였다. 추출한 시료의 일부는 다시 초음파 추출기(ultrasonic extraction system, Asia industry, Incheon, Korea)를 이용하여 추출온도에서 40 kHz의 초음파를 30분간 병행하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 회전증발기(rotary vacuum evaporator N-N series, Eyela, Japan)를 이용하여 여과 및 농축 후, 동결건조기(Cleanvac 8B, Biotron, Bucheon, Korea)를 이용하여 -70°C, 0.1 ton에서 동결건조하여 분말 상태로 사용하였으며, 시료 중 단백질 정량을 위하여 BCA kit(Pierce Co., Rockford, IL, USA)를 이용하고 시료의 단백질 수율을 측정하였다.

활성 펩타이드 분리

굴 단백질은 broad-range pre-stained marker(DokDo-Mark™, EBM-1032, Elpis-biotech, Daejeon, Korea)를 이용해 표지하고 SDS-PAGE(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 분자량을 측정 후, 10³-10⁵ Da의 분자량 부근을 용출할 수 있는 sephadex G-75(Sigma Chemical Co.)로 여과하고 fraction별로 구분하였다. Spectrophotometer 측정을 통해 O.D값이 증가하는 시점을 기준으로 주피크를 모아 다시 MALDI-TOF MS(Voyager-DE™ PRP, Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA)를 이용하여 분자량을 확인하였으며, 분자량별로 분리하여 시료로 사용하였다.

세포 배양

세포배양에 필요한 시약으로 배지는 RPMI 1640(Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA), DMEM-F12(Gibco-BRL Life Technologies), DMEM(Gibco BRL Life Technologies)을 사용하였고, 혈청은 fetal bovine serum(HyClone, Logan, Utah, USA)을 이용하였다. 그 외에 세포 배양에 필요한 시약으로 Hepes buffer(Sigma Chemical Co.), gentamycin sulfate(Sigma Chemical Co.), trysin-EDTA(Sigma Chemical Co.) 등을 사용하였다.

Human dermal fibroblasts(HDFs)로 CCD-986sk(KCLB, 21947)와 human embryonic lung cell인 HEL-299(KCLB, 10002.2), melanocyte인 Clone M-3 cell(KCLB, 10023) 모두 동결 바이알로 구입하여 각 배지에 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가해 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하여 사용하였다.

세포 독성 측정

세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bro-

mide(MTT) 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 mosmann 방법(8)을 변형하여 시행하였다. CCD-986sk, HEL-299, Clone M-3 세포들을 각각 2×10⁴ cells/well 농도로 96-well plate에 접종한 후 각 well에 시료를 투여하여 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. MTT 용액(5 µg/mL)을 첨가하고 4시간 후 원심 분리하여 상등액을 제거하고 10 µL acid-iso-propanol(1% 0.04 N HCl in iso-propanol)을 첨가한 후 푸른색의 formazan이 용출되도록 하여 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

섬유아세포인 CCD-986sk에 대한 직접적 영향을 알아보기 위해 선 행된 세포독성 실험의 결과를 뒷받침하기 위하여 시료처리 후 광학현미경(C-mount, Olympus Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 총 30일간 형태학적 관찰을 실행하였다(9). 섬유아세포를 75T flask에 working volume을 30 mL으로 통일하여 DMEM(FBS 5%)배지로 37°C CO₂ incubator(Jeiotech Co., Seoul, Korea)에서 48시간 배양한 후 시료는 0.2 mg/mL로 처리하였다. 배지는 4일 간격으로 교환해주었으며 관찰은 10일과 15일, 20일, 25일, 30일에 실시하였다. FBS와 DMEM의 양과 종류는 통일하여 오차가 없도록 하였다.

Clone M-3 세포로부터 멜라닌 생성량 측정

Mouse 유래 Clone M-3 세포는 멜라닌을 생성하는데(10), 멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 melanocyte 내의 소기관인 melanosome에서 생합성되며 이는 가시광선 영역대의 흡광도를 측정함으로써 melanin의 생성량을 비교할 수 있다(11). 따라서 본 연구에서는 추출물 투여가 Clone M-3 세포주의 멜라닌 생합성과 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포 접종 후 3일간 시료를 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL의 농도로 3일간 각각 처리하였다. 배지를 제거하고 세포를 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후 각 well에 1 mL씩 1 N NaOH를 가하고 교반하여 세포막을 용해함으로써 멜라닌 성분을 녹여 나오게 하여 가시광선 영역대 중 가장 파장이 짧은 푸른색의 가시광선 영역인 400 nm에서 흡광도를 측정하여 생성량을 비교하였다(12).

Tyrosinase 억제 효과 탐색

Tyrosinase 억제 효과는 dopachrome방법(13)을 이용하여 측정하였다. 150 µL의 mushroom tyrosinase-150 unit(Sigma Chemical Co.), 225 µL(2.5 mM)의 L-tyrosine, 225 µL의 0.4 M Hepes buffer (pH 6.8), 그리고 300 µL의 ethanol 용액 혹은 시료(1 mg/mL)용액을 섞은 후 배양전과 15분간 배양을 한 후 475 nm에서 흡광도를 각각 측정하여 억제되는 정도를 살폈다. Tyrosinase의 억제정도는 다음과 같이 측정하였다.

$$\text{Tyrosinase Inhibition (\%)} = \frac{(D-C) - (B-A)}{(D-C)} \times 100$$

A와 B는 각각 시료를 가지는 용액의 배양 전과 배양 후의 흡광도이며, C와 D는 각각 시료를 넣지 않은 용액(기준 용액)의 배양전과 배양 후의 흡광도이다. 이들 tyrosinase 억제효과는 100으로 나타날 때 완전한 억제를 의미하며, 0일 때 전혀 억제를 하지 못하는 것을 의미한다.

PGE₂ 생성량 측정

일반적으로 염증 및 통증에 관여한다고 알려진 prostaglandin(PG)이 생성되는 기전은 LPS, SNP 또는 UV 자극에 의해 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF), interleukin-6(IL-6) 같은 염증성 cytokine이 분비되면, phospholipase A₂(PLA₂)가 활성화되고

PLA2에 의해 세포막의 phospholipid에서 arachidonic acid(AA)가 분비되어 세포내 AA가 cyclooxygenase(Cox)에 의해 PG로 변하는 과정을 통해 이루어진다(14).

UV 조사는 COX₂ 효소의 양을 크게 변화시키며 높은 수준의 PGE₂ 발현량을 나타낸다(15). 인간 fibroblast인 CCD-986sk 세포를 10% FBS와 DMEM 배지에 현탁하여 1×10⁶ cells/mL로 하였다. 이 현탁액에 aspirin을 50 μM이 되도록 첨가하여 세포에 잔존하는 COX 효소의 활성을 비가역적으로 억제시켜 동일한 PGE₂ 양이 될 수 있도록 조절하였다. 다음 세포 현탁액과 시료를 96 well 세포 배양관의 각각 well에 20 μL씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 UV 등에 필터를 이용하여 UVA(6.3 J/cm²)를 조사하였다. 배양 후 세포를 well 바닥에 부착시켰다. 그런 다음 부착된 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 표면에 남아 있는 세포를 실험에 사용하였다.

PGE₂ 생성량은 Prostaglandin E₂ Express EIA Short kit(ACETM, 155019)를 이용하여 측정하였다(16). 항 PGE₂ 항체가 부착되어 있는 plate의 각 well에 회수한 상층액과 함께 PGE₂-acetylcholinesterase tracer를 넣어 상온에서 18시간 배양한 후, 각 well에 남아있는 용액을 말끔히 털어낸 후, 0.05% tween 20-phosphate buffer solution으로 각 well을 5회 세척하고 Ellman 시약 200 μL를 각 well에 넣은 후 7시간 배양하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. PGE₂를 표준품으로 검량선을 작성하여 각 시료를 처리한 배양액 중의 PGE₂ 생성량을 구하였다.

통계

실험결과는 SPSS program(ver. 12.0)의 T-test로 검정하였으며 모든 data는 평균±표준오차(mean±standard error)로 나타내었다.

결과 및 고찰

추출 수율 및 분자량 측정

참굴 시료의 추출공정별 추출 수율은 Table 1에 나타내었다. 초음파를 병행한 시료군의 추출 수율이 52.49%로 초음파를 처리하지 않은 시료군의 40.81%보다 약 11% 이상 추출 수율의 증진을 보였다. 조추출물의 조단백질 함량 또한 초음파 처리된 시료가 65%로 대조군의 59%에 비해 높은 함량을 나타냄에 따라 참굴의 추출에서 초음파 병행을 통해 고품분 및 단백질의 추출 수율을 증진할 수 있음을 확인하였다.

참굴 유래 단백질을 broad-range pre-stained marker를 표지하여 SDS-PAGE로 분자량을 측정된 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 240-140 kDa의 영역대에서 잔피크가 나타났으며 70 kDa과 50 kDa 사이에서 특정 주피크를 나타내었다. 240 kDa과 140 kDa에 걸쳐서 나타난 피크는 굴의 단백질이 일반적으로 100 kDa의 분자량을 가지는 것을 감안하면 굴의 단백질이 그대로 용출되었을 가능성이 크며 단백질에 비해 저분자인 펩타이드의 향상활성 탐색을 목표로 하였으므로 이후의 실험에서는 배제하고 수행하였다. 70 kDa과 50 kDa 사이의 주피크를 sephadex G-75로 분리한 뒤 감압 농축하여 다시 MALDI-TOF MS를 이용해 측정된 분자량 검정 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 66,197 Da의 주피크를 나타내었으며 양

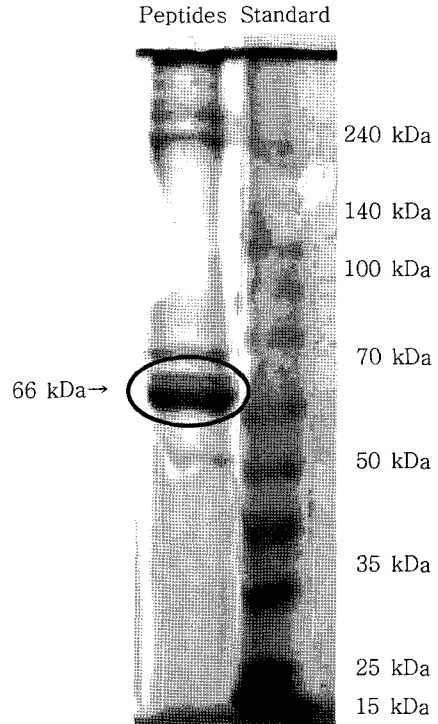


Fig. 1. SDS-PAGE separation of the peptides isolated from *Crassostrea gigas* with ultrasonification process.

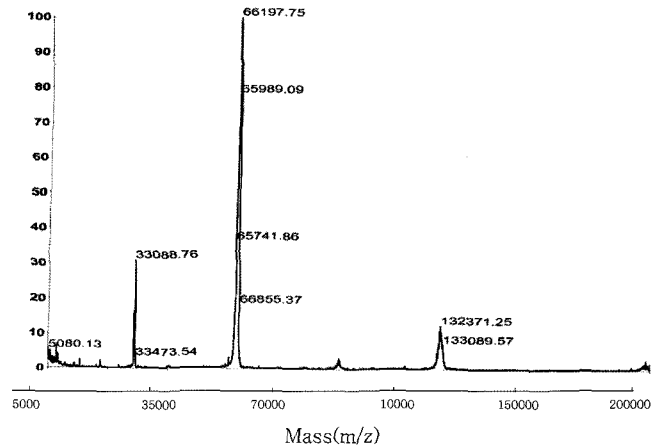


Fig. 2. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS) analyses of the peptides isolated from *Crassostrea gigas* with ultrasonification process.

쪽으로 33,088 Da과 13,237 Da의 작은 피크를 확인할 수 있는데, 일반적으로 MALDI-TOF MS 피크의 값은 mass를 charge 값으로 나눈 값으로 나타내므로 각각 13,237 Da과 33,088 Da에 나타난 피크는 주피크인 66,197 Da과 동일한 물질로 판단 할 수 있다. 실험에서는 주피크인 66 kDa에서 분리한 펩타이드를 사용하였다.

Table 1. Comparison of the extraction yield from *Crassostrea gigas* according to different extraction processes

Sample	Extraction condition	Extraction yield (% , w/w)	Protein content (%)
<i>Crassostrea gigas</i>	Control	40.81±2.50	59
	Ultrasonification (40 kHz)	52.49±4.33	65

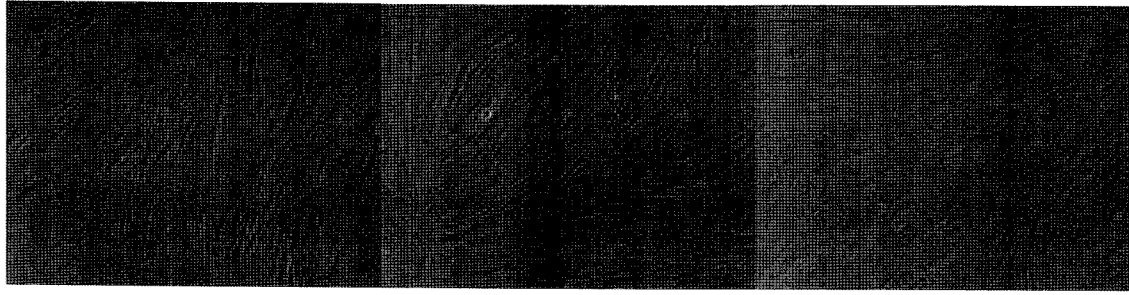


Fig. 3. Comparison of cell morphology in dermal fibroblast cell with the peptides isolated from *Crassostrea gigas* at the 30th day. (a) control (no treatment), (b) crude extract at 40°C, (c) crude extract at 40°C with ultrasonification.

세포 독성 측정

CCD-986sk에 각 시료를 1.0 mg/mL의 농도로 처리한 세포의 형태학적 관찰 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 확인할 수 있는 바와

같이 시료를 처리하지 않은 대조군과 시료를 처리한 각 세포 간의 큰 형태학적 차이는 확인할 수 없었다. 실험에서 사용된 각 세포주에 시료첨가를 통한 세포독성은 Fig. 4에 나타내었다. 40°C 일반 열수 추출물과 초음파 추출물이 최고농도인 1.0 mg/mL의 농도에서 각각 다음과 같은 수치를 나타내었다. HEL-299 세포에서는 각각 14.7%와 11.1%를 나타내었으며, Clone M-3 세포에서는 22.4%와 22.8%를 나타냈고, CCD-986sk 세포에서는 모두 13% 이하의 세포독성을 나타내었다. 이상의 결과들을 종합해 볼때 굴 추출물이 세포 수준에서 큰 독성을 나타내지 않으며 항장소제로 사용이 가능할 것으로 사료된다.

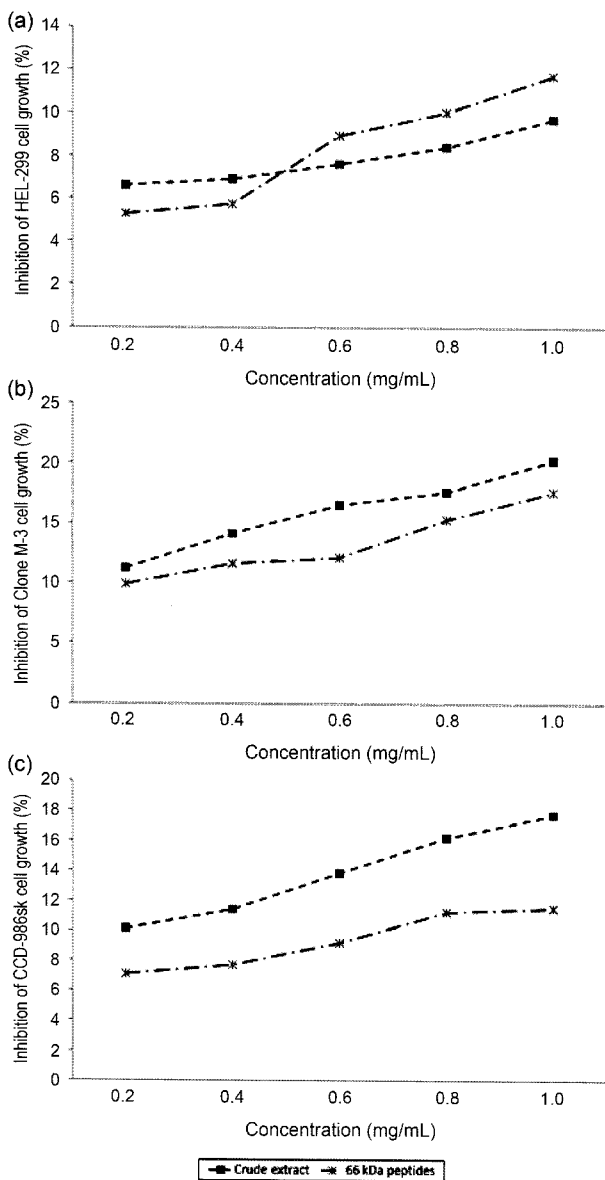


Fig. 4. Cytotoxicity of *Crassostrea gigas* on three kinds of human cell lines. (a) HEL-299, human embryonic lung cells, (b) Clone-M3, mouse male melanocyte, (c) CCD-986sk, human normal skin fibroblast. *, with ultrasonification

멜라닌 생성량 측정

시료 첨가를 통한 멜라닌 생성량의 측정 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 측정 시 세포생존율에는 큰 변화가 없었으며, 시료 첨가를 통한 멜라닌 생성량은 모든 시험군의 결과에서 농도 의존적으로 멜라닌 생성량을 감소시키는 것으로 나타났다. 최고농도인 1.0 mg/mL에서 40°C 열수 추출물 및 초음파 병행추출물, 분리 펩타이드가 각각 84.0%, 82.5%, 62.7%로 대조군인 ascorbic acid가 나타낸 86.7%를 상회하는 것으로 나타났다. 특히 굴에서 분리한 펩타이드가 다른 시료들에 비해 높은 활성을 나타내었으며, 초음파 처리를 한 시료가 처리하지 않은 시료보다 더 높은 활성을 나타내어 초음파 처리를 통해 멜라닌 생성 억제활성에 증진 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 항장 미백과 관련이 깊은 멜라닌 생성량 측정을 통하여 굴 추출물 및 굴로부터 분리한 펩타이드가 항장 피부미백용 기능성 소재로 활용 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

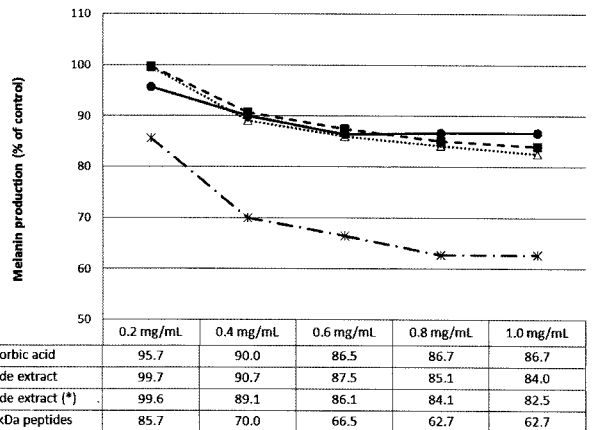


Fig. 5. Effects of *Crassostrea gigas* on melanin production in Clone M-3 cells. *, with ultrasonification

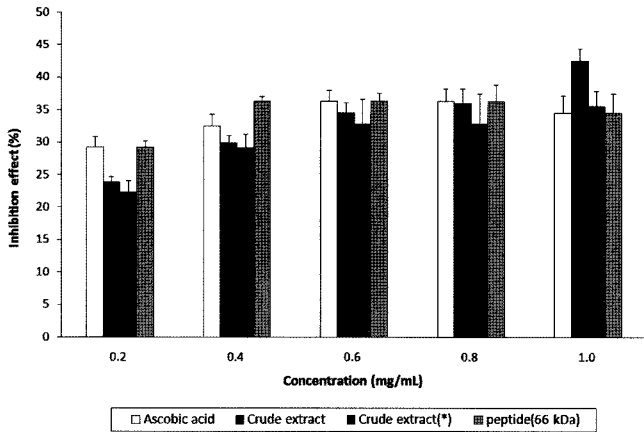


Fig. 6. Tyrosinase inhibition effect of extracts from *Crassostrea gigas* against the *in vitro* melanin synthesis. Each value was expressed as mean \pm standard deviation (n=3). *, with ultrasonification

Tyrosinase 억제 효과 탐색

참굴로부터 추출한 수용성 물질들의 tyrosinase 억제 활성 측정을 위하여 시료 첨가를 통한 저해율을 대조구 대비로 계산하여 Fig. 6에 나타내었다. Ascorbic acid의 경우 0.8 mg/mL에서 36.3%의 최고 저해율을 보인 반면 참굴의 40°C 일반 열수 추출물의 경우 1.0 mg/mL의 농도에서 42.5%까지 저해율을 나타냈다. 분리 정제한 펩타이드의 경우도 모든 농도에서 ascorbic acid와 유사한 활성을 나타냄에 따라 멜라닌 생성량 측정에서와 마찬가지로 미백 활성을 나타내는 기작에 영향을 주는 물질로 판단된다. 이는 직접적인 tyrosinase와의 연계성을 나타내는 결과로 참굴의 수용성 추출물 중 일부가 멜라닌합성 억제제는 물론 tyrosinase 억제 활성의 기전임을 알 수 있다. 더욱이 농도 의존적으로 나타남에 따라 특정물질의 작용으로 볼 수 있으며 차후 물질 검증 단계를 거쳐 기존의 향장 소재들과의 정량적 비교가 필요할 것으로 사료된다.

PGE₂ 생성량 측정

참굴 수용성 추출물의 피부면역 활성 탐색을 위해 UV로 피부 세포인 CCD-986sk를 자극하여 염증과 관련된 PGE₂의 발현도를 관찰하고 그 결과를 Fig. 6과 7에 나타내었다. UV를 조사하고 시료를 넣어주지 않은 것과 UV를 조사하지 않고 시료를 넣어주지 않은 군에서는 각각 2,647 pg/mL과 691 pg/mL의 PGE₂ 발현을 나타내었다. UV를 조사한 것과 조사하지 않은 조건 모두에서 시료 첨가 후의 PGE₂의 발현도는 미첨가 대조군에 비하여 모두 낮아지는 경향을 보였으며 농도 의존적으로도 낮아지는 경향을 보여, 정제한 펩타이드 처리 시 최종 1.0 mg/mL의 농도에서 UV를 조사하지 않았을 경우와 UV를 조사했을 경우에 각각 560 pg/mL과 1,000 pg/mL 이하의 PEG₂ 발현을 나타내었다. 이러한 결과는 UV로 인하여 IL-1과 TNF와 같은 cytokine의 분비되는 것을 특정 펩타이드가 저해하였을 가능성과 차후 PLA₂ 활성을 직접 저해하였을 가능성, 또는 직접적 염증 물질인 arachidonic acid가 phospholipid에서 분비되는 최종 과정을 막았을 가능성을 나타낸다. 또한 각 효소 또는 단백질에 경쟁적 binding함으로 인한 활성의 감소 또는 증강으로 인한 결과로 추측할 수도 있다. 이의 보다 면밀한 연구를 위하여 이후 특정 잔기를 가진 peptide의 binding을 조사하고 그 활성을 탐색하여 메카니즘을 밝히는 실험이 진행되어야 하겠다.

이상의 결과를 통해 굴의 수용성 추출물 및 펩타이드가 미백

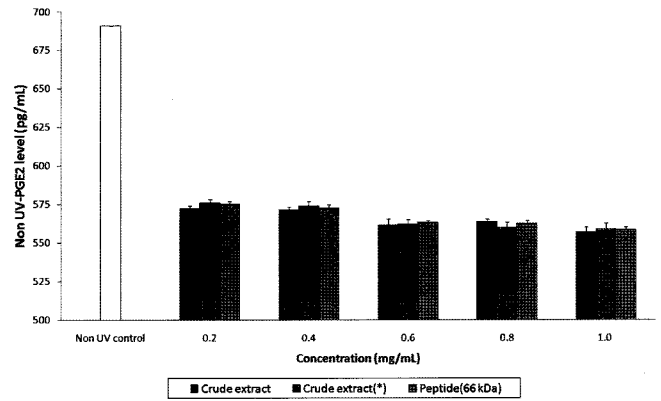


Fig. 7. Effect of peptides isolated from *Crassostrea gigas* on PGE₂ secretion of human fibroblast CCD-986sk by Non-UV irradiation. The values represent means \pm standard deviation of triplicate samples.

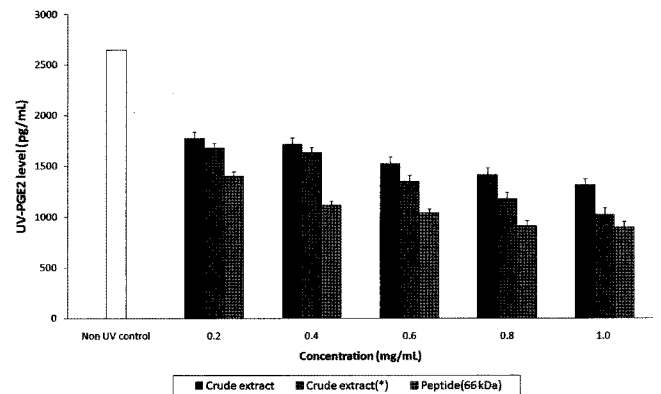


Fig. 8. Effect of peptides isolated from *Crassostrea gigas* on PGE₂ secretion of human fibroblast CCD-986sk by UV irradiation. The values represent means \pm standard deviation of triplicate samples.

활성 및 피부면역에 활성을 가짐을 확인하였을 뿐 아니라 우리나라 참굴이 기존 화학합성물을 대체할 수 있는 천연 기능성 미백소재로 개발될 가능성을 가지고 있는 것으로 사료된다.

요 약

조음파를 병행한 참굴 시료로부터 조단백질의 수율은 34% 이상으로 높은 수율을 나타내었다. 분리 단백질을 SDS-PAGE로 검정한 결과 70 kDa와 50 kDa 사이에 특정 피크를 나타내었다. 이를 sephadex G-75 컬럼을 이용하여 분리하였으며 MALDI-TOF MS를 이용하여 분자량을 검정한 결과 66 kDa으로 판단하였다. 굴 추출물 및 펩타이드의 세포독성을 측정한 결과 최고농도인 1.0 mg/mL에서 모두 22.8%를 나타내었으며 형태학적 차이를 나타내지 않아 굴의 저온 추출물 및 펩타이드가 식품 또는 향장 소재로서 독성을 나타내지 않는 것으로 사료된다. Melanocyte를 이용한 멜라닌 생성량 측정을 통해 굴 펩타이드의 미백활성을 탐색한 결과 최고 62.7%의 멜라닌 생성 저해 효과를 나타내었으며, 1.0 mg/mL의 농도에서 tyrosinase의 활성을 35%까지 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 피부 염증과의 관계를 알아보기 위하여 실행한 PGE₂ 생성량 측정의 경우 특정 수용체(EP3)와 결합하면 알레르기 증상이 억제되는 것으로 밝혀졌는데, 연구의 결과를 바탕으로 특정 펩타이드와 결합으로 인한 PGE₂의 생성 억제 가

능성이 있으리라 사료된다. 이상의 결과에서 시료의 활성은 농도 의존적으로 경향을 나타남에 따라 특정 물질의 작용으로 볼 수 있으며 melanocyte의 멜라닌 생성량 저해능과 더불어 향후, 보다 면밀한 정제를 통한 물질 검정의 단계를 거치면 천연 피부미백용 향장소재로서 피부미백 및 피부 면역 활성을 안전하게 향상시킬 수 있는 기능성 소재로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2007년 중소기업이전기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구결과로, 이에 감사드립니다.

문헌

1. Bouilly K, Gagnaire B, Bonnard M, Thomas GH, Renault T, Miramand P, Lapegue S. Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 78: 149-156 (2006)
2. Tanaka K, Ikeda I, Kase A, Koba K, Nishizono S, Aoyama T, Imaizumi K. Effects of feeding oyster, *Crassostrea gigas*, on serum and liver lipid levels in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 49: 100-106 (2003)
3. Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK, Lee HY. Improvement of anticancer activation of ultrasonicated extracts from *Acanthopanax senticosus* Harms, *Ephedra sinica* Stapf, *Rubus coreanus* Miq, and *Artemisia capillaris* Thunb. *Korean J. Med. Crop Sci.* 12: 273-278 (2004)
4. Chung K, Kim WI, Hong IK, Park KA. Ultrasonic energy effects on squalene extraction from amaranth seed. *Appl. Chem.* 4: 149-152 (2000)
5. Kim WI, Shung KW, Lee SB, Hong IK, Park KA. Ultrasound energy effects on solvent extraction of amaranth seed oil. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 12: 307-311 (2001)
6. Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK, Lee HY. Improvement of anticancer activation of ultrasonicated extracts from *Acanthopanax senticosus* Harms, *Ephedra sinica* Stapf, *Rubus coreanus* Miq, and *Artemisia capollaris* Thunb. *Korean J. Med. Crop Sci.* 12: 273-278 (2004)
7. Park JH, Kim SM. Biofunctionality of peptides purified from naturally fermented anchovy sauce. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 1120-1125 (2003)
8. Mosmann TR, Livingstone AM. Dendritic cells: The immune information management experts. *Nat. Immunol.* 5: 564-566 (2004)
9. Karesen R, Hervik A, Schlichting E. Medical logistics: Principles applied to diagnostics and therapy in women with symptoms and signs of breast cancer. *Tidsskr. Norske Laege.* 123: 1687-1690 (2003)
10. Hong L, Simon JD, Sarma T. Melanin structure and the potential functions of uveal melanosomes. *Pigm. Cell Res.* 19: 465-466 (2006)
11. Kim JY, Song MG, Ki JD. Zeta potential of nanobubbles generated by ultrasonification in aqueous alkyl polyglycoside solutions. *J. Colloid Interf. Sci.* 223: 285-291 (2000)
12. Pattinson RC, Arsalio I, Bergh AM, Malan AF, Patrick M, Phillips N. Implementation of kangaroo mother care: A randomized trial of two outreach strategies. *Acta Paediatr.* 94: 924-927 (2005)
13. Kim KS, Kim JA, Eom SY, Lee SH, Min KR, Kim Y. Inhibitory effect of piperlonguminine on melanin production in melanoma B16 cell line by downregulation of tyrosinase expression. *Pigm. Cell Res.* 19: 90-98 (2006)
14. Bernstein EF, Chen YQ. Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J. Invest. Dermatol.* 103: 182-186 (1994)
15. Liou JY, Ellent DP, Lee S, Goldsby J, Ko BS, Matijevic N, Huang JC, Wu KK. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E₂ protects mouse embryonic stem cells from apoptosis. *Stem Cells* 25: 1096-1103 (2007)
16. Cui X, Bai I, He X, Zhang Y. Western blot analysis of type I, III, V, VI collagen after laser epithelial keratomileusis and photorefractive keratectomy in cornea of rabbits. *Yan Ke Xue Bao* 21: 141-148 (2005)