

상어 콜라겐의 항산화능, 항균성, Elastase 및 Tyrosinase 저해활성

김재원 · 김도균 · 박진수¹ · 이예경 · 백경연 · 김순동[†]
대구가톨릭대학교 외식식품산업학부 식품가공학전공, ¹동아대학교 식품영양학과

Antioxidant and Antimicrobial Activities of Shark Collagens, and Inhibitory Actions on Elastase and Tyrosinase

Jae-Won Kim, Do-Kyun Kim, Jin-Soo Park¹, Ye-Kyung Lee, Kyung-Yean Beik and Soon-Dong Kim[†]

Faculty of Food Science and Industrial Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea
¹Department of Food Science and Nutrition, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

Abstract

The antioxidant and antimicrobial effects of acid-soluble and pepsin-solubilizable shark (*Isurus oxyrinchus*) collagens (SC) (ASSC: acid-soluble shark skin collagen, ASMC: acid-soluble shark meat collagen, PSSC: pepsin-solubilizable shark skin collagen, PSMC: pepsin-solubilizable shark meat collagen) and standard marine collagen (STMC) as materials, and the ability of these materials to inhibit tyrosinase and elastase, were investigated. The electron-donating ability of SC (1 - 5 g/mL) was 14.91 - 17.21%, which was 3.0 - 3.6-fold higher than that of STMC at the same concentration. Also, the SOD (superoxide dismutase)-like activity of SC (5 - 80 mg/mL) was 4.67 - 37.28%, thus 3.0 - 3.6-fold greater than that of STMC. The MIC values of SC against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* were 5 µg/disc, which were remarkably lower than that of STMC (200 µg/disc). There was no antimicrobial activity against *Escherichia coli* in STMC, but the MIC against *E. coli* was 200 µg/disc for acid-soluble SC and 100 µg/disc for pepsin-solubilizable SC. The inhibition of tyrosinase by SC (3-5 mg/mL) was 58.95 - 98.16%, 3.34 - 3.74-fold higher than that of STMC (17.67 - 26.25%). Also, elastase inhibition by SC (at 1 mg/mL) was 53.33 - 80.0%, 1.1 - 4.0-fold greater than that of STMC. These results indicated that shark collagens may be valuable new functional materials owing to their antioxidant and antimicrobial properties, and because the inhibitory activities against elastase and tyrosinase are better than those of standard marine collagen.

Key words : shark, acid and pepsin soluble collagen, antioxidant, tyrosinase, elastase

서 론

Collagen은 생체 단백질 총 중량의 30% 정도를 차지하는 섬유상의 기질 단백질로 섬유아세포에서 생합성되며, procollagen이 세포외로 방출되어 아미노산 및 카르복실 말단이 떨어져 나가면서 collagen으로 전환된다(1). Procollagen은 collagen보다 glycine과 hydroxyproline의 함량은 낮고 serine 함량은 높으며, collagen에는 존재하지 않는 cysteine을 함유하며 세포외로 방출되기까지 다양한 효소의 작용을

받는다(2). Collagen은 섬유상 단백질의 기본단위인 tropocollagen의 분자내 또는 분자간의 공유결합성 가교결합에 의하여 물리학적 또는 생물학적으로 안정한 구조를 이룬다(3). Collagen은 생명체 중에서도 세포가 다수 집합되어 있는 피부, 뼈, 연골, 힘줄, 인대, 혈액, 혈관, 치아 및 각막에 많이 존재하며 척추동물의 모든 장기에 널리 분포되어 있다(4). Collagen은 연골세포, 근섬유세포, 피부섬유아세포, 골세포 등 특수한 세포에서만 만들어지며 세포의 증식과 기능을 활성화 하는 작용을 한다(5). Collagen에 관한 연구는 의약품, 화장품 및 식품분야에서 다양하게 이루어지고 있으며(6), 최근에는 항피부노화(7) 및 피부탄력개선

[†]Corresponding author. E-mail : kimsd@cu.ac.kr,
Phone : 82-53-850-3216, Fax : 82-53-850-3216

(8), 관절염예방(9) 및 항고혈압(10) 및 항암작용(11) 등에 관한 연구로 확대되고 있다. 특히 피부는 수분을 제외 한 70%가 collagen으로 구성되어 있으며, 피부를 이루고 있는 진피는 90% 정도가 collagen으로 extracellular matrix를 형성하고 있으며, collagen type I 이 80~85%, collagen type III가 8~11%를 차지하여 피부의 탄력을 유지케 한다(12).

어류의 collagen 함량은 어종에 따라 상당한 차이가 있는 것으로 알려져 있으며, 단백질 량에 대한 collagen의 비율은 잉어가 15.7%, 장어는 43.2%, 고등어는 16.7%정도이다(13). 상어의 지느러미, 간, 연골, 껍질, 육 등에는 collagen을 비롯하여 squalene, DHA(docosahexaenoic acid), chondroitin sulfate 등 다양한 기능성 성분들이 함유(14,15)되어 있는 것으로 알려져 있으나 collagen에 관한 구체적인 연구는 매우 적다. 본 연구에서는 상어의 껍질과 육 조직으로부터 추출한 산가용성 collagen과 pepsin 가용성 collagen의 항산화능과 항균성 및 tyrosinase와 elastase의 저해활성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 상어는 모노상어(*Isurus oxyrinchus*)로 그 껍질과 육은 영천 전통돔배기 영농조합 법인에서 제공 받았으며 -70℃ deep freezer에 저장하면서 실험재료로 사용하였다. 대조구로는 Marine Collagen(Dermalab Co., Ltd, Gangwondo, Korea)을 사용하였다.

Collagen 추출

Collagen의 추출은 Fig. 1과 같이 상어의 껍질과 육조직으로 구분하고 다시 산가용성 및 pepsin 가용성 collagen으로 구분하여 추출하였다. 즉, 상어 껍질과 육은 각각 상온에서 2-3시간 해동한 후 5℃의 냉수로 핏물과 비린내를 수세하여 제거한 후 1 x 3 mm로 세절하였다. 다음에 시료 량에 대하여 10배의 0.3 N NaOH를 가한 후 Ace homogenizer(AM-10, Mihonseiki kaisha Ltd, Japan)를 이용하여 균질화 하였으며 magnetic bar를 넣어 9시간동안 교반한 후 여과하여 알칼리 가용성의 비 collagen성 단백질을 제거한 후 남은 알칼리를 증류수로 세척하여 제거하였다. 다음에 10배량의 0.48%의 sodium hypochlorite 용액을 가하여 60분 동안 교반하여 탈색시킨 후 3겹의 cheese cloth로 여과하여 탈색된 잔유물을 얻었으며 증류수로 3회 반복 세척하였다. 산가용성 collagen(acid soluble collagen: ASC)은 탈색, 세척한 시료에 10배량의 0.3 M citric acid를 가하여 3일 동안 교반 추출한 후 4℃, 3,000 x g에서 20분간 원심분리하였으며, pepsin 가용성 collagen(pepsin soluble collagen: PSC)은 탈색, 세척한 시료에 10배량의 0.1%(w/v) pepsin을 함유하는 0.3 M

citric acid 용액을 가하여 열변성의 최소화 하기위해 10℃이내에서 3일 동안 교반, 추출한 후 4℃, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 이렇게 하여 얻은 ASC와 PSC는 동결 건조한 후 5℃에서 저장하면서 실험에 사용하였다.

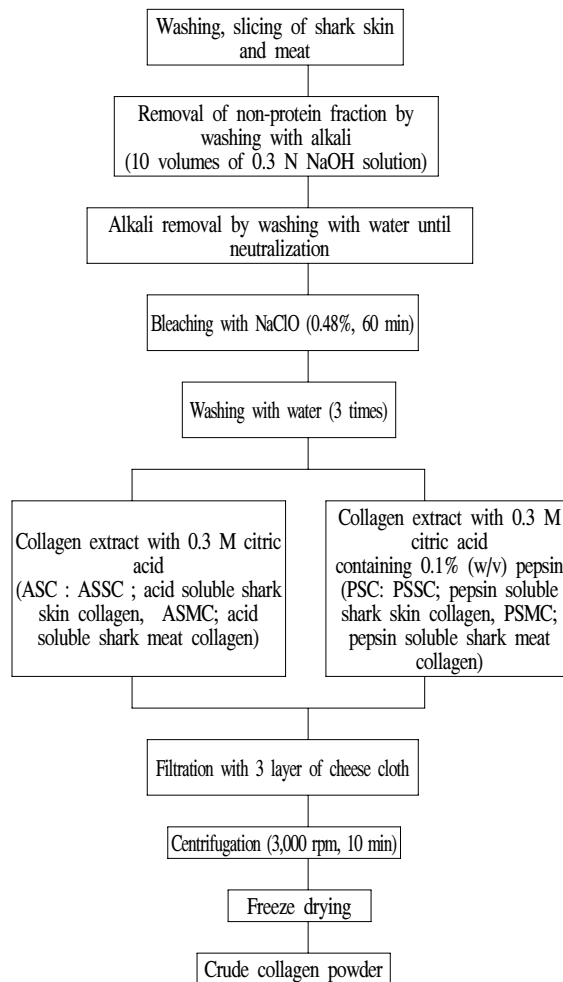


Fig. 1. Extraction and preparation of crude collagen procedure from shark skin and meat tissue.

색상

색상은 색차계(Chromameter CR-200 Minolta, Japan)를 이용하여 L*(lightness), a*(redness), b*(yellowness)를 측정하였다.

전자공여능

전자공여능(electron donating ability, EDA)은 Blois(16)의 방법에 따라 일정하게 희석한 collagen 용액 0.2 mL에 0.4 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)용액 0.8 mL를 가하여 Vortex상에서 가하고 10분간 방치 한 다음 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. EDA 활성도는 계산식 electron donating ability(%) = [1 - (시료흡광도/대조구흡광도)] x

100에 의하여 산출하였다.

환원력(reducing power)

환원력은 Saeedeh와 Asna(17)의 방법에 따라 반응액내 Fe^{3+} 과 Fe^{2+} 간의 상호전환에 의하여 생성된 청록색의 흡광도를 700 nm에서 측정하였다. 즉, collagen 용액 1 mL에 0.2 M phosphate buffer(pH 6.6) 2.5 mL와 1% potassium ferricyanide 용액 2.5 mL를 가한 후 50°C에서 30분간 반응시켰다. 다음에 10% trichloroacetic acid 용액 2.5 mL를 가한 후 1,650 x g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 하여 얻은 상등액 2.5 mL에 증류수 2.5 mL와 0.1% $FeCl_3$ 용액 0.5 mL를 가한 후 흡광도를 측정하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성

Marklund와 Marklund(18)의 방법에 따라 collagen 용액 200 μ L에 pH 8.5로 조정된 tris-HCl buffer 용액[50 mM tris(hydroxymethyl) amino-methane + 10 mM EDTA] 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 200 μ L을 가하고 25°C에서 10분간 방치, 1 N HCl 1 mL로 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며 계산식, SOD-like activity(%) = $100 - [(OD \text{ sample}/OD \text{ control}) \times 100]$ 에 의하여 활성을 산출하였다.

항균성

Staphylococcus aureus KCTC 1621, *Samonella enteritidis* ATCC 13076 및 *Escherichia coli* ATCC 11775에 대한 항균력 측정은 paper disc(Advantec Toyo Roshi Kaishi, Ltd., Tokyo, Japan)법(19)을 이용하여 측정하였다. 평판배지에 배양된 각 균주는 Difco™ nutrient broth(Becton, Dickison & CO., sparks, MD, USA)에 이식하여 2~3회 활성화시킨 후 사용하였다. 배지는 Difco™ nutrient agar(Becton, Dickison & CO., sparks, MD, USA) 평판배지를, 도말균수는 10^7 cells/mL, collagen의 농도는 5~400 μ g/disc로 조정하였다. 최소저해농도(minimal inhibitory concentration: MIC)는 clear zone을 나타내는 최저농도로 하였다.

Elastase 저해활성

Elastase 저해활성 측정은 James(20)의 방법에 따라 0.2 M tris/HCl buffer용액(pH 8.0) 1.0 mL에 N-succinyl-(Ala)3-p-nitroaniline(10.4 mM) 0.1 mL 및 collagen 시료(T) 0.1 mL를 가한 후 25°C에서 5분간 반응시킨 다음 elastase (Pancreatic from porcine pancreas, 3-6 units/mg-protein, EC 3.4.21.36, Sigma, USA, 1 μ g/mL) 0.1 mL를 가하여 405 nm에서 0 time에서의 흡광도를 측정 후 다시 25°C에서 20분간 반응한 후의 흡광도를 측정하였다. 대조군(C)은 시료 대신 buffer 용액을 사용하였다. 저해활성도는 계산식, inhibitory activity (%) = $[1 - \{T(OD \text{ 20 min} - OD \text{ 0 min})/C(OD \text{ 20 min} - OD \text{ 0 min})\}] \times 100$ 에 의하여 저해활성을 산출하였다.

min - OD 0 min)] x 100에 의하여 저해활성을 산출하였다.

Tyrosinase 저해활성

Tyrosinase 저해활성(21)은 0.175 M phosphate buffer 용액(pH 6.8) 0.2 mL, 5 mM L-DOPA용액 0.2 mL 및 collagen 용액 0.5 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase(Tyrosinase from mushroom, $\geq 2,000$ units/mg solid, EC 1.14.18.1, Sigma, USA, 100 units/mL) 0.1 mL를 첨가하여 37°C에서 3분간 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 저해활성은 inhibitory activity (%) = $[1 - (S_{Abs} - B_{Abs}/C_{Abs})] \times 100$: S_{Abs} ; 시료의 흡광도, B_{Abs} ; 효소대신에 증류수를 넣었을 때의 흡광도, C_{Abs} ; 시료 추출액 대신에 증류수를 넣었을 때의 흡광도"의 계산식에 의하여 산출하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 유의성 검증은 version 12의 SPSS(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software package program을 이용하여 Duncan's multiple range test를 행하였다.

결과 및 고찰

색상

상어의 껍질과 육으로부터 산가용성 및 pepsin 가용성 collagen을 각각 추출하여 동결건조한 분말(ASSC: 산가용성 껍질 collagen, ASMC: 산가용성 육 collagen, PSSC: pepsin 가용성 껍질 collagen, PSMC: pepsin 가용성 육 collagen)과 표준품으로 사용한 시판 marine collagen (STMC)의 색상을 비교한 결과는 Table 1과 같다.

상어의 껍질과 육으로부터 추출한 collagen들은 표준품 STMC에 비하여 밝기를 나타내는 L*값은 낮은 반면 적색도를 나타내는 a*값은 높았다. 상어 collagen중에서는 산가용성의 ASSC 및 ASMC의 L*값은 92.83~93.74로 pepsin 가용

Table 1. Color of the freeze dried acid and pepsin soluble collagens prepared with shark skin and meat

Color	ASSC ¹⁾	ASMC ²⁾	PSSC ³⁾	PSMC ⁴⁾	STMC ⁵⁾
L*	92.83±0.43 ^{c(6)}	93.74±0.06 ^b	73.69±0.31 ^c	78.09±0.06 ^d	96.56±0.93 ^a
a*	- 0.43±0.02 ^c	- 0.53±0.01 ^d	1.39±0.02 ^a	1.18±0.06 ^b	- 2.06±0.02 ^e
b*	2.10±0.09 ^e	4.01±0.03 ^d	7.46±0.06 ^b	11.19±0.04 ^a	5.67±0.03 ^c
H°	101.43±0.80 ^b	97.17±0.25 ^c	80.03±0.12 ^e	84.57±0.06 ^d	109.30±0.20 ^a

¹⁻⁵⁾ Abbreviations: ASSC, acid soluble shark skin collagen; ASMC, acid soluble shark meat collagen; PSSC, pepsin soluble shark skin collagen; PSMC, pepsin soluble shark meat collagen; STMC, standard marine collagen.

⁶⁾ Values are mean \pm standard deviations of triplicate determinations, different superscripts within a row indicate significant differences at p<0.05.

성 PSSC 및 PSMC의 73.69~78.09보다 현저히 높았으며 a*값은 낮았다. PSSC 및 PSMC는 b*값도 ASSC, ASMC 및 STMC에 비하여 높았다. Hue angle(H°)에서도 L*, a*, b*값과 동일한 경향으로 산가용성의 ASSC 및 ASMC는 STMC와 대등한 값을 나타낸 반면 PSSC와 PSMC는 연한 적색을 띠는 황색을 나타내었다. Pepsin 가용성 collagen에서 L*값이 낮고 a*값이 높게 나타나는 현상은 사용한 pepsin의 색상이 황갈색으로 이에 의한 영향으로 사료된다.

전자공여능과 환원력

ASSC, ASMC, PSSC 및 PSMC의 전자공여능을 STMC와 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. 전자공여능은 각 collagen의 농도가 1~5 mg/mL까지 높아짐에 따라 비례적으로 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 다시 감소하는 경향을 보였다. 전자공여능이 가장 높게 나타나는 1~5 mg/mL에서의 활성은 상어껍질 및 육조직으로부터 추출한 collagen인 ASSC, ASMC PSSC 및 PSMC가 14.91~17.21%를 나타낸 반면 STMC는 4.82~5.48%로 상어 collagen이 표품에 비하여 약 3.0~3.6배 이상의 높은 활성을 나타내었다. 전자공여능은 산화에 관여하는 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 힘으로 값이 높을수록 항산화 활성이 높음을 나타내며, 식품 내 성분의 산화 또는 생체의 노화를 억제하는 척도가 된다(22,23). 5 mg/mL이상의 농도에서 활성이 감소하는 현상은 추출물내의 비 collagen성 물질에 기인된 현상으로 사료되며 앞으로의 연구가 요망된다.

Park 등(24)은 불가사리에서 추출한 collagen의 전자공여능이 6 mg/mL에서 17.9%, bovine collagen에서 15.0%라 보고하여 5 mg/mL농도의 상어 collagen과는 유사하거나 다소 낮은 활성을 나타내었다. 또, Nam 등(25)은 오징어

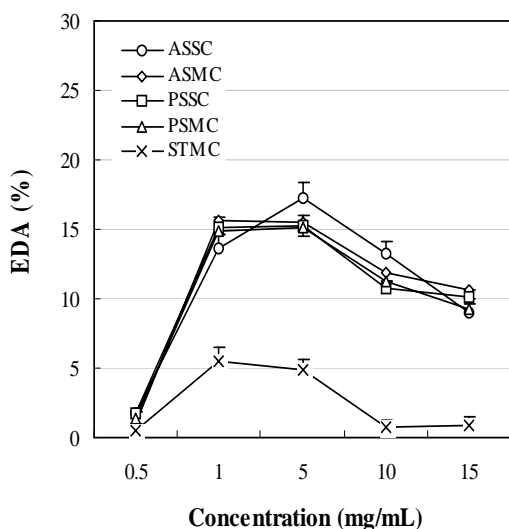


Fig. 2. Electron donating ability (EDA) of acid and pepsin soluble collagens prepared with shark skin and meat.

Abbreviations: See Table 1. Values are mean ± standard deviations of triplicate determinations.

외피 collagen의 전자공여능은 0.1 mg/mL에서 12.50~27.98%, 내피 collagen은 14.4~18.4%로 차이가 있다고 보고하였다.

상어 collagens의 환원력(Table 2)은 0.1~10 mg/mL의 농도에서는 거의 나타나지 않거나 미미하였다.

Table 2. Reducing power of different concentration of acid and pepsin soluble collagens prepared with shark skin and meat

Samples ¹⁾	Concentration (mg/mL)					
	0.1	0.5	1	3	5	10
ASSC	0.00±0.00 ^{NS2)}	0.00±0.00 ^{NS}	0.01±0.01 ^{NS}	0.01±0.01 ^{NS}	0.01±0.01 ^{NS}	0.01±0.01 ^{NS}
ASMC	0.02±0.00	0.03±0.02	0.03±0.02	0.03±0.02	0.03±0.01	0.04±0.02
PSSC	0.01±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.03±0.02	0.03±0.02
PSMC	0.02±0.01	0.03±0.02	0.03±0.02	0.03±0.01	0.04±0.02	0.04±0.02
STMC	0.01±0.01	0.01±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.03±0.02	0.03±0.02

¹⁾Abbreviations: See Table 1.

²⁾NS: Not significant.

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성

ASSC, ASMC, PSSC 및 PSMC의 SOD 유사활성을 STMC와 비교한 결과는 Fig. 3과 같다. 상어 collagens(5~80 mg/mL)의 SOD 유사활성은 4.67~37.28%로 STMC에 비하여 1.9~5.9배가 높았으며 낮은 농도일수록 STMC과 대비하여 높은 활성을 나타내었다. ASSC, ASMC 및 PSMC는 농도가 20 mg/mL까지 활성이 비례적으로 증가하였으며 40~80 mg/mL에서는 증가율이 둔화되었다. 그러나 PSSC와 STMC에서는 80 mg/mL까지 활성이 줄곧 증가하였다. 산가용성 및 pepsin 가용성 상어 collagen의 SOD활성은

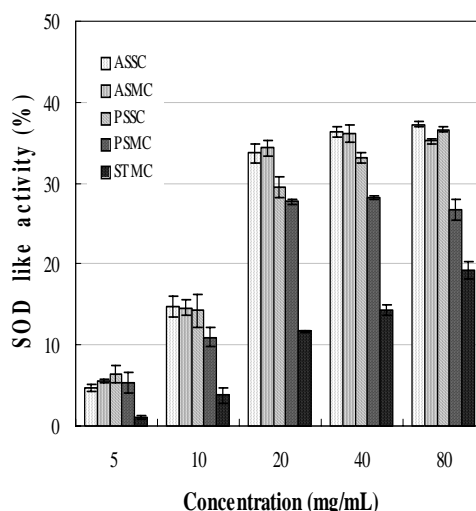


Fig. 3. Superoxide dismutase (SOD) like activity of acid and pepsin soluble collagens prepared with shark skin and meat.

Abbreviations: See Table 1. Values are mean±standard deviations of triplicate determinations.

PSMC가 다소 낮았으나 나머지 ASSC, ASMC 및 PSSC은 유사하였다. SOD는 체내 항산화계 효소의 하나로 superoxide anion radical(O²⁻)을 hydrogen peroxide(H₂O₂)로 전환하는데 관여하나 SOD 유사활성은 이러한 superoxide를 정상상태의 산소로 전환하지는 못하지만 그 반응성을 억제함으로써 생체를 보호하는 역할을 한다(26).

항균성

ASSC, ASMC, PSSC 및 PSMC가 피부상재균으로 알려진 *S. aureus*와 식중독균인 *S. enteritidis* 및 대장균인 *E. coli*에 대한 항균성을 표품 STMC와 비교하기 위하여 MIC와 clear zone을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 상어 collagen의 *S. aureus*와 *S. enteritidis*에 대한 MIC는 5 µg/disc로 STMC의 200 µg/disc에 비하여 현저하게 낮았다. *E. coli*에 대한 ASSC 및 ASMC의 MIC는 200 µg/disc이었으나 PSSC 및 PSMC는 100 µg/disc로 pepsin 가용성 collagen에서 낮았으며 표품인 STMC에서는 항균활성이 나타나지 않았다.

*S. aureus*와 *S. enteritidis*에 대한 상어 collagen의 항균력은 collagen의 농도(5~400 µg/disc)가 높아짐에 따라 정도의 차이는 있으나 거의 비례적으로 clear zone이 커지는

경향을 보였으며, 낮은 농도(5~25 µg/disc)에서는 산 가용성 collagen에서, 높은 농도(50~400 µg/disc)에서는 pepsin 가용성 collagen에서 항균성이 높은 경향을 나타내었다. 또, 산 가용성은 껍질 collagen에서, pepsin 가용성은 육 조직 collagen에서 다소 높은 항균성을 나타내었다. *S. aureus*에 대한 항균력은 상어 collagen 중에서는 PSMC가, *S. enteritidis*에 대한 항균력은 ASMC가, *E. coli*에 대한 항균력은 PSMC가 가장 높았다. 이상의 상어 collagen들은 citric acid가 함유되어 있으며 동일 농도의 citric acid가 나타내는 clear zone의 직경을 뺀 값이 0.4~6.3 mm를 나타냄으로서 순수한 collagen에서도 항균력이 있음을 확인할 수 있다.

Tyrosinase 저해활성

산가용성 상어껍질 및 육조직 collagen(ASSC, ASMC)과 pepsin 가용성 상어껍질 및 육조직 collagen(PSSC, PSMC)의 tyrosinase 저해활성을 표준 collagen(STMC)과 비교한 결과는 Table 4와 같다. 0.01~1 mg/mL에서는 2.70~18.47% 범위로 비교적 낮은 저해활성을 나타내었으며 STMC는 2.35~10.47%로 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나 3~5 mg/mL에서는 58.95~98.16%로 STMC의 17.67~

Table 3. Antimicrobial activity of acid and pepsin soluble collagens prepared with shark skin and meat on the pathogenic microorganisms

Clear zone (diameter: mm)

Strains ¹⁾	Samples ²⁾	Concentration (µg/disc)						
		5	15	25	50	100	200	400
<i>S. aureus</i>	ASSC	12.3±0.06³⁾	14.7±0.06	17.2±0.03	21.3±0.15	23.3±0.06	25.3±0.06	33.2±0.10
	ASMC	11.0±0.10	12.2±0.03	14.7±0.06	20.8±0.08	22.0±0.10	25.3±0.06	30.2±0.08
	PSSC	10.8±0.08	11.7±0.06	13.8±0.03	16.5±0.05	21.7±0.12	23.8±0.03	29.0±0.10
	PSMC	11.0±0.10	12.2±0.03	13.7±0.06	18.8±0.03	25.0±0.01	27.5±0.05	33.8±0.08
	STMC	-	-	-	-	-	8.4±0.12	8.9±0.12
	Citric acid	9.1±0.01	10.6±0.04	14.5±0.05	18.4±0.13	21.2±0.08	3.4±0.06	27.5±0.05
<i>S. enteritidis</i>	ASSC	10.2±0.03	12.2±0.03	14.7±0.06	20.5±0.13	22.2±0.03	24.7±0.06	27.7±0.06
	ASMC	9.2±0.03	10.7±0.06	13.3±0.06	17.7±0.06	24.7±0.06	27.8±0.03	32.7±0.06
	PSSC	9.2±0.03	10.3±0.06	13.8±0.08	17.3±0.06	24.2±0.03	26.2±0.03	29.3±0.06
	PSMC	9.2±0.03	10.2±0.03	11.2±0.03	20.7±0.06	22.2±0.08	24.5±0.05	29.7±0.10
	STMC	-	-	-	-	-	8.5±0.01	9.2±0.10
	Citric acid	8.8±0.03	9.8±0.03	12.1±0.09	16.5±0.13	21.2±0.12	24.7±0.06	27.8±0.03
<i>E. coli</i>	ASSC	-	-	-	-	-	10.3±0.12	12.8±0.03
	ASMC	-	-	-	-	-	11.0±0.63	11.8±0.03
	PSSC	-	-	-	-	8.8±0.03	9.8±0.03	11.2±0.03
	PSMC	-	-	-	-	8.8±0.03	9.7±0.06	13.3±0.10
	STMC	-	-	-	-	-	-	-
	Citric acid	-	-	-	-	-	9.5±0.05	12.8±0.02

¹⁾*S. aureus*; *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *S. enteritidis*; *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *E. coli*; *Escherichia coli* ATCC 11775.

²⁾Abbreviations: See Table 1.

³⁾Values are mean±SD of triplicate determinations. Bold letters denotes the minimum inhibitory concentration (MIC).

Table 4. Tyrosinase inhibitory activity of acid and pepsin soluble collagens prepared with shark skin and meat

Concentration (mg/mL)	ASSC ¹⁾	ASMC ²⁾	PSSC ³⁾	PSMC ⁴⁾	STMC ⁵⁾
0.01	2.70±0.54 ^{bF,6)}	3.47±0.42 ^{bF}	8.67±0.23 ^F	8.49±0.39 ^{bE}	2.35±0.57 ^{bE}
0.1	3.45±0.48 ^{bE}	4.94±0.39 ^{bE}	10.33±0.46 ^{bE}	11.07±0.55 ^{bD}	3.42±0.66 ^{bE}
0.5	6.47±0.64 ^{bD}	6.82±0.57 ^{bD}	12.05±0.44 ^{bD}	12.33±0.35 ^{bD}	5.55±0.80 ^{bD}
1.0	10.60±1.58 ^{bC}	12.70±1.71 ^{bC}	17.74±1.44 ^{bC}	18.47±1.40 ^{bC}	10.14±1.16 ^{bC}
3.0	77.43±3.22 ^{aB}	69.41±3.19 ^{aB}	58.95±3.17 ^{aB}	57.19±3.09 ^{aB}	17.67±2.32 ^{aB}
5.0	96.09±3.87 ^{aA}	96.12±3.92 ^{aA}	88.54±3.66 ^{aA}	86.16±3.36 ^{aA}	36.25±3.18 ^{aA}

¹⁻⁵⁾ Abbreviations: See Table 1.

⁶⁾ Values are mean±SD of triplicate determinations, different superscripts within a row(a-f) and a column(A-E) are significantly different at p<0.05.

26.25%보다 3.34~3.74 배가 높은 저해활성을 나타내었다. Tyrosinase는 tyrosine을 DOPA(dihydroxyphenylalanine)로의 전환에 관여할 뿐만 아니라 DOPA를 DOPA-quinone으로 전환시킴으로서 적색의 melanin 색소를 생성하는 중간반응에 관여한다(27,28). 따라서 tyrosinase활성제해제는 의약(29), 화장품(30)등에 널리 적용되며, 인체에 부작용이 적은 천연소재를 확보하기 위한 노력이 경주되고 있다(31). 잘 알려진 tyrosinase 활성제해제로는 aromatic aldehydes(32), aromatic acids(33), tropolone(34) 및 Kojic acid(35) 등이 있다.

Park 등(24)은 불가사리의 collagen 효소분해물에 대한 tyrosinase 저해활성은 3 mg/mL일 때 22.6%, bovine collagen에서는 20.8%의 저해율을 보였다고 하여 본 연구의 STMC과 유사한 저해활성을 나타내었다. 또, phenol성 화합물로 tyrosinase의 활성제해제로 알려진 arbutin(3 mg/mL)의 tyrosinase 저해활성은 54.9%, 동일 농도의 vitamin C는 70%, chondroitin은 43.1%의 저해활성을 나타낸 것과 비교하였을 때 본 연구의 상어 collagen이 이보다 다소 높은 활성을 나타내었다. 또, Kwon 등(7)은 오징어 collagen(0.2~1 mg/mL)의 tyrosinase 저해활성은 51.5~69.4%였다고 하였으며 이는 상어의 경우보다 저해활성이 높다.

Elastase 저해활성

ASSC, ASMC, PSSC, PSMC 및 STMC의 elastase 저해활성을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 전반적으로 농도가 0.5에서 1 mg/mL으로 높아짐에 따라 비례적으로 저해활성이 증가하였다. 산 및 pepsin 가용성의 모든 상어 collagens은 STMC에 비하여 높은 활성을 나타내었는데, 0.5 mg/mL에서 ASSC는 13.33%, ASMC는 26.67%, PSSC는 51.11%, PSMC는 13.33%인 반면 STMC는 6.67%이었다. 0.75 mg/mL에서는 ASSC는 33.34%, ASMC는 47.62%, PSSC는 61.91%, PSMC는 52.38%로 STMC의 30.33%보다 높았으며, 1 mg/mL에서는 ASSC는 53.33%, ASMC는 64.44%, PSSC는 80%, PSMC는 66.67%로 STMC의 50.67%보다

현저하게 높았으며 PSSC에서 가장 높은 저해활성을 나타내었다.

Elastase는 진피 내 피부탄력을 유지하는 기질 단백질인 elastin의 분해에 관여하며(36), collagen을 분해할 수 있는 비 특이적 가수분해 효소이다(36). 또한 체내의 elastin을 분해하는 백혈구 과립 효소 중의 하나로 이상조직에서는 활성이 높아져 조직파괴의 직접적인 원인이 되며, 피부의 주름 및 탄력성 소실 등을 유발한다(36). 따라서 elastase 저해제는 피부의 주름을 개선하는 효과(37)가 있다. Elastase 활성제해제인 ursolic acid(38)는 활성 50% 저해농도(IC50)가 50 µg/mL라 보고(25) 하였으며, ursolic acid와 공존하는 oleanolic acid는 농도 0.5 mg/mL에서 elastase를 31.7%정도 저해하는 것으로 알려져 있다(39).

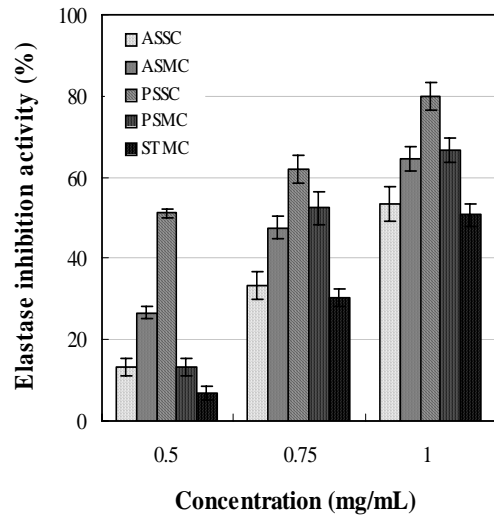


Fig. 4. Elastase inhibitory activity of acid and pepsin soluble collagens prepared with shark skin and meat.

Abbreviations: See Table 1. Values are mean±standard deviations of triplicate determinations.

요 약

상어 collagens(SC)(ASSC: 산가용성 껍질 collagen, ASMC: 산가용성 육 collagen, PSSC: pepsin 가용성 껍질 collagen, PSMC: pepsin 가용성 육 collagen)의 항산화성, 항균성, tyrosinase 및 elastase 저해활성을 표품(시판 marine collagen)과 비교하였다. SC(1~5 mg/mL)의 전자공여능은 14.91~17.21%로 표품의 4.82~5.48%에 비하여 3.0~3.6배가 높았다. SC(5~80 mg/mL)의 SOD활성은 4.67~37.28%로 STMC 보다 1.9~5.9배가 높았다. SC의 *S. aureus*와 *S. enteritidis*에 대한 최소저해농도(MIC)는 5 µg/disc로 표품의 200 µg/disc보다 현저하게 낮았다. *E. coli*에 대한 MIC는 ASSC 및 ASMC에서는 200 µg/disc인 반면 PSSC 및 PSMC는 100 µg/disc이었으며 표품에서는 항균활성이 없었다. *S.*

*aureus*에 대한 항균력은 PSMC가, *S. enteritidis*에 대한 항균력은 ASMC가, *E. coli*에 대한 항균력은 PSMC가 가장 높았다. SC(3~5 mg/mL)의 tyrosinase 저해활성은 58.95~98.16%로 표품의 17.67~26.25%보다 3.34~3.74배가 높았다. SC의 elastase 저해활성은 농도가 0.5 mg/mL에서 1 mg/mL으로 높아짐에 따라 비례적으로 증가하였고 1 mg/mL에서의 활성도는 53.33~80.00%로 STMC의 50.67%보다 높았으며 PSSC에서 가장 높은 저해활성을 나타내었다. 산 및 pepsin 가용성의 모든 상어 collagen은 STMC에 비하여 1.1~4.0배의 높은 활성을 나타내었다. 이상의 결과 상어 collagens은 시판 marine collagen보다 항산화성, 항균성, tyrosinase 및 elastase 저해활성이 우수하여 새로운 기능성 소재로서의 활용성이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지정 대구가톨릭대학교 해양바이오 산업연구센터의 지원에 의한 것입니다.

참고문헌

- Oilarinen, A., Autio, P., Kiistala, U., Ristell, L. and Risteli, J. (1992) A new method to measure type I and III collagen synthesis in human skin in vivo: Demonstration of decreased collagen synthesis after topical glucocorticoid treatment. *J. Invest. Dermatol.*, 98, 220-225
- Bornstein, P., Mark, K., Wyke, H.P., Ehrlich, H.P. and Manson, J. (1972) Characterization of the pro- $\alpha 1$ chain of procollagen. *J. Biol. Chem.*, 247, 2808
- Kim, S.K. and Kwak, D.C. (1991) The enzymatic modification and functionalities of filefish skin collagen. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.*, 34, 265-272
- Senaratne, L.S., Park, P. and Kim, S. (2006) Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource Technol.*, 97, 191-197
- Jerome, S.P., Gabrielle, L. and Raul, F. (1998) Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. *J. Invest. Dermatol.*, 90, 48-54
- Ashley, W., Masahiro, O., Ralph, J.P., Mark, S., Mark, S. and Jack, N.L. (2008) Biochemical properties of alligator (*Aligator mississippiensis*) bone collagen. *Comp. Biochem. Physiol. (Part B)*, 151, 246-249
- Kwon, M.C., Qadir, S.A., Kim, H.S. and Ahn, J.H. (2008) UV protection and whitening effects of collagen isolated from outer layer of the squid *Todarodes pacificus*. *J. Kor. Fish. Soc.*, 41, 7-12
- Kwon, M.C., Kim, C.H., Kim, H.S., Syed, A.Q., Hwang, B.Y. and Lee, H.Y. (2007) Anti-wrinkle activity of low molecular weight peptides derived from collagen isolated from *Asterias amurensis*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 39, 625-629
- Hu, Y., Zhao, W., Qian, X. and Zhang, L. (2003) Effects of oral administration of type II collagen on adjuvant arthritis in rats and its mechanisms. *Chin. Med. J.*, 116, 284-287
- Tonnesen, M.G., Feng, X. and Clark, R.A. (2000) Angiogenesis in wound healing. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, 5, 40-46
- Rehn, M., Veikkola, T., Kukk-valdre, E., Makamura, H., Iimonen, M., Lombardo, C., Pihlajaniemi, T., Alitalo, K. and Vuori, K. (2001) Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 98, 1024-1029
- Chung, J.H., Youn, S.H., Kwon, O.S., Cho, K.H., Cho, K.H., Youn, J.I. and Eun, H.C. (1997) Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid, transforming growth factor- β and interferon- γ in human dermal fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gel are photoaging and aging-independent. *J. Dermatol. Sci.*, 15, 188-200
- Feinstein, G.R. and Buck, E.M. (1984) Relationship of texture to pH and collagen content of yellowtail flounder and cusk. *J. Food Sci.*, 49, 298-299
- Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M. and Shimizu, Y. (1986) Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. *Nippon Suisan Gakkai*, 52, 1595-1600
- Murphy, M.G., Wright, V., Ackman, R.G. and Horackova, M. (1997) Diets enriched in menhaden fish oil, seal oil, or shark liver oil have distinct effects on the lipid and fatty acid composition of guinea pig heart. *Mol. Cell. Biochem.*, 177, 257-269
- Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1120
- Saeedeh, A.D. and Asna, U. (2007) Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chem.*, 102, 1233-1240
- Marklund, S. and Marklund, G. (1974) Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biol. Chem.*, 47, 468-474

19. Conner, D.E. and Beuchat, L.R. (1984) Sensitivity of heat-stressed yeasts to essential oils of plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 229-233
20. James, A.E.K., Timothy, D.W. and Gorden, L. (1996) Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic tyrosinase inhibitors. *Biochem.*, 35, 9090-9096
21. Jung, S.W., Lee, N.K., Kim, S.J. and Han, D.S. (1995) Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27, 891-896
22. Heo, J.C., Park, J.Y., An, S.M., Lee, J.M., Yun, C.Y., Shin, H.M., Kwon, T.K. and Lee, S.H. (2006) Antioxidant and antitumor activities of crude extracts by *Gastrodia elata* Blume. *Korean J. Food Preserv.*, 13, 83-87
23. Torel, J., Gillard, J. and Gillard, P. (1986) Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochem.*, 25, 383-385
24. Park, H.Y., Yun, H.D., Kim, J.H., Kim, Y.G., Park, J.I., Lee, G.J., Jo, Y.R., Park, N.G., Kim, I.H., Go, H.J., An, S.H., Son, H.Y. and Kim, H.M. (2005) Development of industrial utilization technique of starfish collagen. Research Report of Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, p. 83-88
25. Nam, K.A. (2007) Characterization of squid skin collagens and functionality of their enzymatic hydrolysates. MS Thesis, University of Kangnung, p. 35-36
26. Shin, S.R., Hong, J.Y., Nam, H.S., Yoon, K.Y. and Kim, K.S. (2006) Anti-oxidative effects of extracts of Korean herbal materials. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, 35, 187-191
27. Pavel, S. and Muskiet, F.A. (1983) Eumelanin(precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma, a preliminary report. *Cancer Detect. Prev.*, 6, 311-316
28. Jimenez, M., Kameyama, K., Maloy, W.L., Tomita, Y. and Hearing, V.J. (1988) Mammalian tyrosinase: biosynthesis, processing, and modulation by melanocyte-stimulating hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85, 3830-3834
29. Fitzpatrick, T.B., Eisen, A.Z., Wolff, K., Freedberg, I.M. and Austen, K.F. (1983) Update: Dermatology in General Medicine. New York, McGraw-HILL, p. 205-225
30. Maeda, K. and Fukuda, M. (1991) In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 42, 361-368
31. Lee, G.C. and Lee, C.Y. (1997) Inhibitory effect of caramelization products on enzymic browning. *Food Chem.*, 60, 231-235
32. Jimenez, M., Chazarra, S., Escibano, J., Cabanes, J. and Garcia-Carmona, F. (2001) Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4060-4063
33. Robit, C., Rouch, C. and Cadet, F. (1997) Inhibition of palmito(*Acanthophoenix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids. *Food Chem.*, 92, 707-712
34. Valero, E., Garcia-Moreno, M., Varon, R. and Garcia-Carmona, F. (1991) Timedependent inhibition of grape polyphenol oxidase by tropolone. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1043- 1046
35. Cananes, J., Chazarra, S. and Garcia-Carmona, F. (1994) Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.*, 46, 982-985
36. DeWitt, DL., Rollins, TE., Day, J.S., Gauger, J.A. and Smith, W.L. (1981) Orientation of the active site, and antigenic determinants of prostaglandin endoperoxide of synthase in the Endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 256, 10375-10382
37. Tsuji, N., Moriwaki, S., Suzuki, Y., Takema, Y. and Imokawa, G. (2001) The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: Implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem. Photobiol.*, 74, 283-290
38. Ying, Q.L., Rinehart, A.R., Simon, S.R. and Cheronis, J.C. (1991) Inhibition of human leukocyte elastase by ursolic acid. Evidence for a binding site for pentacyclic. *Biochem. J.*, 277, 521-526
39. Kim, M.J., KIM, J.Y., Choi, S.W., Hong, J.T. and Yoon, K.S. (2004) Anti-wrinkle effect of safflower(*Cathamus tinctorius*) seed extract. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, 30, 15-22

(접수 2009년 1월 12일, 채택 2009년 4월 24일)