

명태 껍질 유래 콜라겐의 분자량에 따른 이화학적 특성 및 생리활성

양수진 · 홍주헌

대구가톨릭대학교 식품공학전공

Physicochemical Properties and Biological Activities of Collagens with Different Molecular Weights from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) Skin

Su-Jin Yang and Joo-Heon Hong

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu

ABSTRACT This study was conducted to investigate the physicochemical properties and biological activities of collagens with different molecular weights from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin as well as their efficacies as functional materials. The molecular weights of collagens were between 1~10 kDa (below 1 kDa (AP1), 1~3 kDa (AP2), 3~10 kDa (AP3), and above 10 kDa (AP4). The protein content of AP4 (40.19 g/100 g) was the highest. Collagen contents of AP1, AP2, AP3, and AP4 were 36.43, 32.23, 19.23, and 14.89%, respectively. The free amino acid and essential amino acid contents of AP1 were higher than those of AP2, AP3, and AP4. Fourier transform infrared spectroscopy spectra of collagens with different molecular weights showed wavenumbers representing the regions of amide I, amide II, amide III, and amide A, respectively. The electron-donating ability (29.51%) and SOD-like activity (38.45%) of AP1 were higher than those of AP2, AP3, and AP4. Tyrosinase inhibition activity of AP1 improved with higher treatment concentration. The rate of inhibition of MMP-1 production in HS68 cells exposed to UVB was suppressed by treatment with AP1 (29.78%) and AP2 (26.49%) at 1 mg/mL. Furthermore, there was a strong correlation between DPPH, superoxide dismutase, tyrosinase activity, and MMP-1 inhibition rate of collagens with different molecular weights.

Key words: Alaska pollack skin, collagen, different molecular weight, tyrosinase activity, MMP-1

서 론

콜라겐은 동물성 기원의 섬유상 구조단백질로 척추 및 무척추 동물의 총 단백질 중 30%를 차지하고 3중 나선구조를 이루며 주로 피부, 뼈, 치아 유기물질의 대부분을 형성하는 역할을 한다(1). 피부조직에 있어서 콜라겐은 진피층의 세포간 기질(extracellular matrix)을 채우고 있으며, 노화에 의한 주름 생성 및 탄력 저하 등 피부 상태와 밀접한 관련이 있다(2). 콜라겐을 이루는 기본단위는 tropocollagen으로 분자 내 또는 분자 간 공유결합성 가교결합을 이룸으로써 물리적 또는 생물학적 안정성을 가지며(3), 콜라겐을 이루는 아미노산의 조성은 그 타입에 따라 다소 차이가 있으나 보통 glycine이 전체의 1/3 정도이며, proline이 1/4, hydroxyproline이 1/7 정도 차지하고 있다(4). 콜라겐을 구성하는 아미노산인 hydroxyproline은 hydroxylysine과 함께 일정 비율(12.5~14%)을 구성함으로써 콜라겐을 정량하는 지표

성분으로 활용되고 있으며(5), 콜라겐의 구성 비율은 생물의 종류와 연령에 따라 차이가 있는 것으로 알려져 있다(6).

콜라겐은 의약품, 화장품 및 식품 분야에서 다양하게 이용되어 왔으며 최근에는 항 피부 노화 및 피부 탄력 개선, 관절염 예방 등으로 확대되고 있다(7). 또한 콜라겐 및 그 변성물인 젤라틴을 섭취할 경우 소화효소에 의해서 분해되어 대부분 아미노산 형태로 흡수된다(8). 현재 유통되고 있는 콜라겐 제품은 주로 소, 돼지 등 육상동물에서 유래한 것으로 최근 광우병 및 구제역 발생으로 인해 안정성을 확보하기 위하여 동물 이외의 해양생물 자원으로부터 제조된 콜라겐의 수요가 증가되고 있다. Yoo 등(9)은 황다랑어 복부 껍질을 이용하여 콜라겐을 제조하였으며, Kim 등(10)은 말퀴치피의 콜라겐에 대한 물리화학적 특성을 조사하였고, Kwon 등(11)은 오징어 껍질 콜라겐의 UV 보호능 및 미백 효과에 대해 연구하였다. 콜라겐의 급원이 부족한 상황에서 많은 수산물을 소비하고 있는 우리나라는 어패류 가공 처리시 배출되는 어류가공잔사가 증가하고 있다. 명태는 소비량이 약 40만 톤이며 그중 껍질이 8~10%로 상당량의 부산물이 배출되고 있으나 대부분 이용도가 낮아 폐기되어 자원 낭비는 물론 환경오염의 원인이 되기도 한다. 이러한 부산물로 콜라겐을 산업적 소재로 이용할 수 있다면 그 의미는 매

Received 2 June 2014; Accepted 24 July 2014

Corresponding author: Joo-Heon Hong, Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-702, Korea

E-mail: jhhong@cu.ac.kr, Phone: +82-53-850-3218

우 클 것으로 생각된다.

콜라겐의 추출 공정은 주로 산 용액에 장시간 침지시켜 용출하기 때문에 제조시간이 오래 걸리며 다량의 산 처리로 인하여 폐수처리 및 환경오염의 문제가 발생된다. 또한 산 또는 알칼리에 의한 가수분해물은 중화에 의한 염의 생성으로 맛의 변화와 탈색 등 정제 과정이 복잡하며 강한 조건에서 가수분해를 수행하는 관계로 영양분의 파괴가 일어나는 단점이 있는 반면, 효소에 의한 가수분해물은 안정적인 조건에서 진행되어 영양분의 파괴가 거의 일어나지 않으므로 효소적 가수분해에 의해 생성된 펩타이드가 다양한 생리활성을 나타내며 어육단백질의 가수분해물이 항산화 활성을 가진다고 보고되고 있다(12). 최근 단백질의 저분자 형태인 펩타이드의 생체조절기능에 대한 관심이 증대하고 있으며 이러한 기능성 펩타이드는 식품 및 화장품 소재로서의 활용이 기대되고 있다.

따라서 본 연구에서는 명태 껍질로부터 콜라겐을 효율적으로 추출하기 위한 방법으로 효소 처리 공정을 적용하였으며, 식품 및 화장품 산업에 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인하기 위하여 분자량별로 분리한 후 이화학적 특성 및 생리활성에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 명태 껍질은 대구 소재 (주)바다누리에 서 제공받았으며 -70°C deep freezer에 저장하면서 실험 재료로 사용하였다. 실험에 사용된 pepsin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)과 neutrase(주)바이오시스, 부산, 한국)의 효소 처리 최적 조건은 각각 온도 37°C, pH 2.0~4.0 및 온도 45~55°C, pH 5.5~7.5였다.

콜라겐의 추출 및 분자량별 분리

명태 껍질 유래 콜라겐의 추출은 Kim 등(4)의 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다. 즉 명태 껍질의 알칼리 처리는 시료 150 g에 0.1 N NaOH 용액을 시료 대비 5배(v/w) 가한 다음 4°C에서 24시간 동안 비 콜라겐성 물질을 제거하였고 잔존하는 NaOH를 제거하기 위하여 수세하였다. 효소가수분해 공정은 세척한 시료에 10배량의 0.1%(w/v) pepsin을 함유하는 0.1 M acetic acid 용액을 가하여 24시간 동안 37°C에서 교반하여 분해하였고, 여과 후 85°C에서 20분 동안 가열하여 효소를 불활성화한 다음 동결건조 하였다.

콜라겐을 분자량별로 분리하기 위하여 동결건조 시료에 10배량의 증류수를 가하고 0.1%(w/v)의 neutrase를 가한 다음 24시간 동안 55°C에서 교반하였으며 이후 centrifugal filter와 dialysis를 통하여 1 kDa 이하, 1~3 kDa, 3~10 kDa 및 10 kDa 이상으로 분리한 다음 동결건조 하여 실험에 사용하였다.

수율 측정

추출 수율은 콜라겐을 함유하는 추출액을 감압농축(Rotavapor R-123, Buchi, Flawil, Switzerland) 한 다음 건조 오븐(Forced Convection Oven, Jeio Tech, Seoul, Korea)을 이용하여 105°C 상압가열건조법(13)으로 항량이 될 때까지 건조한 후 원료 건물량에 대한 고형분 함량(% , d.b.)으로 나타내었다.

단백질 함량 측정

단백질 함량은 Lowry 등(14)의 방법으로 측정하였으며 BSA(bovine serum albumin, Sigma-Aldrich Co.)를 표준품으로 한 표준곡선에 의하여 계산하였다.

콜라겐 함량 측정

콜라겐 함량은 Bergaman과 Ioxley(15)의 방법을 수정하여 측정하였다. 즉 동결건조 한 분자량별 콜라겐 300 mg에 6 N HCl 3 mL를 가한 후 발생하는 가스를 흔들어 제거한 다음 110°C에서 24시간 가수분해한 후 50 mL로 정용하여 분석용 시료로 사용하였다. 가수분해 용액 0.3 mL에 0.6 mL의 isopropanol을 가한 후 7% chloramine T 용액과 0.25 M sodium acetate, 0.13 M trisodium citrate, 0.03 M citric acid 및 0.3% isopropanol 용액을 1:4(v/v)의 비율로 혼합한 용액 0.3 mL를 가하여 상온에서 4분 동안 산화시켰다. 이후 Ehrlich 시약과 isopropanol을 3:13(v/v)의 비율로 혼합한 용액 4 mL를 가하고 60°C의 water bath에서 25분간 반응시킨 후 558 nm에서 흡광도를 측정하였고 hydroxyproline(Sigma-Aldrich Co.)으로 작성한 표준곡선에 의하여 아래의 계산식으로 콜라겐 함량을 계산하였다.

$$\text{Collagen in protein (\%)} = (\text{hydroxyproline mg} \times 9.75 / \text{protein mg}) \times 100$$

유리 아미노산 분석

유리 아미노산은 시료 0.2 g에 94% ethanol 10 mL를 가하여 24시간 교반한 뒤 원심분리(4,000 rpm, 15분) 하여 상층액과 고형분을 분리하였다. 분리된 상층액을 40°C 이하에서 감압농축 하였으며 농축한 시료는 0.02 N HCl 10 mL로 정용하여 여과(0.22 μm, membrane filter) 후 amino acid analyzer(L-8900, Hitachi Co., Tokyo, Japan)로 분석하였다.

FT-IR 분석

분자량에 따른 콜라겐의 FT-IR(Fourier transform infrared spectroscopy) 분석은 FT-IR spectrophotometer(FT/IR-4100, Jasco Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 600~4,000 cm⁻¹까지의 데이터 포착 속도로 calf skin 유래 콜라겐 표준품(Sigma-Aldrich Co.)과 시료를 비교 분석하였다. FT-IR 분석 곡선은 Jasco Spectra Manager Version 2를 이용하여 나타내었다.

전자공여능 측정

전자공여능은 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)의 환원력을 이용하여 측정하였다(16). 즉 분자량별 콜라겐 시료 100 mg을 증류수 1 mL에 용해한 다음 4×10^{-4} M DPPH 용액(99.9% ethyl alcohol에 용해) 1 mL를 가하여 총액의 부피가 2 mL가 되도록 하였다. 이 반응액을 약 10초간 혼합하고 실온에 30분간 방치한 후 분광광도계(Ultaspec 2100 pro, Amersham Co., Buckinghamshire, UK)를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 분자량별 콜라겐의 첨가 전후의 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{Electron donating ability (\%)} = \frac{[\text{Absorbance control} - \text{Absorbance sample}]}{\text{Absorbance control}} \times 100$$

Superoxide dismutase 유사 활성 측정

Superoxide dismutase 유사 활성은 Marklund와 Marklund(17)의 방법을 이용하여 분석하였다. 즉 분자량별 콜라겐 시료에 tris-HCl buffer[50 mM tris(hydroxymethyl) amino-methane+ 10 mM EDTA, pH 8.5]를 이용하여 pH 8.5로 조절된 시료액을 만들었다. 각 시료 0.2 mL에 pH 8.5로 보정된 tris-HCl buffer 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하고 25°C에서 10분간 방치 후 1 N HCl 1 mL로 반응을 정지시킨 후 분광광도계를 이용하여 420 nm에서의 흡광도를 측정하여 시료 첨가 및 무첨가구 간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{SOD-like activity (\%)} = \frac{[\text{Absorbance control} - \text{Absorbance sample}]}{\text{Absorbance control}} \times 100$$

Tyrosinase 활성 측정

세포 내 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparaza 등(18)의 방법으로 측정하였다. B16/F10 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 10% fetal bovine serum(FBS), 100 unit/mL penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37°C에서 5% CO₂를 공급하면서 3일마다 계대 배양을 하여 본 실험에 이용하였다. B16/F10 세포를 24 well plate에 4×10^4 cells/well씩 분주한 다음 24시간 동안 배양하여 세포를 부착시킨 후, 시료와 α -MSH 20 nM을 각각 처리하고 3일간 배양하였다. 배양이 끝난 세포는 PBS로 세척하고 lysis buffer로 세포를 용해하였다. 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성 측정에 사용하였다. 시료 50 μ L를 취하여 0.1 M sodium phosphate buffer와 0.05% L-DOPA를 첨가하여 37°C에서 반응시키면서 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조군의 흡광도를 기준으로 한 백분율로 환산하여 나타내었다.

MMP-1 저해 활성 측정

Ultraviolet B(UVB)로 손상된 피부 세포로부터 분자량별

콜라겐의 영향을 조사하기 위해 사람 진피 섬유아세포주인 HS68은 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받아 10% FBS 및 100 unit/mL penicillin, 100 ng/mL streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지를 이용하여 37°C에서 5% CO₂를 공급하면서 3일마다 계대 배양을 하여 본 실험에 이용하였다. UVB 조사를 통한 HS68 세포의 광노화 유도는 24 well plate에서 2×10^5 cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 뒤 Quan 등(19)의 방법을 변형하여 수행하였다. 즉 세포를 24시간 배양한 뒤 배지를 제거하고 phosphate buffered saline(PBS)으로 두 번 세척한 다음 세포에 1 mL PBS를 첨가하였다. UVB 조사는 UV 램프를 이용하여 UVB(280~320 nm)를 80 mJ/cm² 되게 조사하였다. 이때 UVB 조사량은 Chiang 등(20)의 보고에 따라 세포 생존율에 영향을 주지 않으면서 matrix metalloproteinase(MMPs) 유도가 일어나도록 설정하였으며, UV-radiometer를 이용하여 조사량을 측정하였다. 시료에 의한 MMP-1 생산 변화는 상기와 같이 UVB를 조사한 세포에 PBS를 제거하고 10% FBS 및 100 unit/mL penicillin, 100 ng/mL의 streptomycin을 첨가한 DMEM 배지와 함께 시료를 처리하고 24시간 추가 배양한 후 6,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하여 상등액을 회수하여 matrix metalloproteinase-1(MMP-1) human biotrak에 대해 ELISA system(Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, USA)을 이용하여 MMP-1 생산량을 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 얻은 결과를 평균과 표준편차로 나타내었으며 실험결과는 SPSS 12.0 version(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)으로 통계처리 하였고 시료 간의 유의성 검정은 분산분석 후 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 따라 분석하였다. 또한 측정값 간의 pearson 상관계수는 SPSS 12.0 version을 사용하여 구하였다.

결과 및 고찰

수율, 단백질 함량 및 콜라겐 함량

명태 껍질은 0.1 N NaOH를 사용하여 알칼리 처리 후 pepsin으로 추출하였으며, neutrane를 이용하여 2단 효소 분해 공정을 통해 콜라겐을 저분자화 하였다. 일반적으로 콜라겐을 식품 및 산업 소재로 응용하려면 콜라겐이 1 kDa 미만의 분자량을 가져야 한다는 연구보고(21)를 참고하여 본 연구에서는 콜라겐을 1 kDa 이하, 1~3 kDa, 3~10 kDa 및 10 kDa 이상의 네 구간으로 분리하여 분자량별 품질 특성을 분석하였다. 분자량별 콜라겐 시료의 수율, 단백질 함량 및 콜라겐 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 추출 수율은 분자량 10 kDa 이상에서 6.83 g/10 g으로 가장 높았

Table 1. Yield, protein, and collagen contents of collagen with different molecular weight from Alaska pollack skin

Measurements	AP1 ¹⁾	AP2	AP3	AP4
Yields of freeze dried powder (g/10 g)	0.84	0.98	1.35	6.83
Total protein (g/100 g)	17.71±0.43 ^{d2)}	27.27±0.34 ^c	40.19±0.72 ^a	36.19±0.45 ^b
Collagen in protein (%)	36.43±0.71 ^a	32.23±0.24 ^b	19.23±0.97 ^c	14.89±1.03 ^d

All values are mean±SD (n=3).

¹⁾AP1: collagen (MW<1 kDa) from Alaska pollack skin, AP2: collagen (MW 1~3 kDa) from Alaska pollack skin, AP3: collagen (MW 3~10 kDa) from Alaska pollack skin, AP4: collagen (MW>10 kDa) from Alaska pollack skin.

²⁾Means with different superscript letters (a-d) within the row are significantly different ($P<0.05$).

으며 분자량이 작아질수록 수율이 감소하는 경향을 나타내었다. 단백질 함량을 측정한 결과, 분자량 3~10 kDa에서 40.19%로 가장 높게 나타났으며 1 kDa 이하에서 17.71%로 가장 낮은 함량을 보였다. 그러나 hydroxyproline으로 산출한 콜라겐 함량은 분자량이 작을수록 높은 함량을 보였으며 분자량별로 AP1, AP2, AP3 및 AP4가 각각 36.43%, 32.23%, 19.23%, 14.89%였다. Kim 등(3)은 대구피를 collagenase로 가수분해 시킨 가수분해물의 분자량이 10~20 kDa 범위였고 collagenase로 분해 후 pronase로 다시 분해시킨 것은 7~10 kDa 범위로 나타나 2단 효소분해 공정을 통하여 평균 분자량이 작아지는 것을 확인하였다.

유리 아미노산 조성

콜라겐의 아미노산 조성은 Gly-X-Y 배열이 반복되는 특징을 가지고 있다. 일반적으로 Gly-X-Y가 glycine-proline-hydroxyproline(Gly-Pro-Hyp)일 때 hydroxyproline 잔기는 콜라겐 triple helix의 열 안정성을 높여준다(22). 또한 hydroxyproline의 함량은 콜라겐으로부터 유도되는 젤라틴의 중요한 기능적 특성인 겔 강도와 같은 물리적 특성에 중요한 영향을 미치며, 함량이 높을수록 좋은 물리적 특성을 가진다고 보고되고 있다(23). 따라서 amino acid인 proline, hydroxyproline 잔기의 함량은 콜라겐에 있어서 매우 중요하다고 알려져 있다. 분자량별 콜라겐의 아미노산 조성은 Table 2와 같다. 콜라겐의 분자량에 따른 아미노산 함량은 AP1, AP2, AP3, AP4가 각각 1,603.69, 1,000.55, 475.04, 415.73 mg/100 g으로 분자량이 작을수록 아미노산의 함량이 높았으며 콜라겐의 구성 아미노산인 Gly-Pro-Hyp도 AP1에서 71.15 mg/100 g으로 AP2(61.84 mg/100 g), AP3(47.31 mg/100 g), AP4(46.81 mg/100 g)보다 높은 함량을 나타내었다. Ha(24)는 해파리 콜라겐 효소 가수분해물을 한외여과 후 각각의 분획물의 구성 아미노산을 분석한 결과 10 kDa 이상의 고분자보다 3~5 kDa 사이의 분획에서 Pro, Gly, Hyp의 함량이 가장 높게 나타나 고분자보다는 저분자에서 콜라겐 펩타이드가 많다고 보고하여 명태 껍질 콜라겐의 분자량별 hydroxyproline 함량에 대한 결과와 유사한 것으로 나타났다. 분자량별 콜라겐의 필수아미노산 함량도 AP1, AP2, AP3, AP4가 각각 961.19, 648.84, 246.44 및 219.82 mg/100 g으로 분자량이 작을수록 필수아미노산의 함량이 높았으며 이 중 L-phenylalanine, L-

Table 2. Free amino acid contents of collagen with different molecular weight from Alaska pollack skin (unit: mg/100 g)

Free amino acid	AP1 ¹⁾	AP2	AP3	AP4
Taurine	49.68	25.99	10.72	13.30
Urea	77.50	31.73	83.02	22.03
Aspartic acid	19.37	4.63	4.95	2.65
L-Hydroxyproline	11.25	9.10	6.28	6.11
L-Threonine*	19.40	9.36	3.82	3.78
L-Serine	11.71	4.71	3.36	2.20
L-Glutamic acid	38.04	15.43	6.36	6.69
L(-)-Proline	10.12	8.94	5.01	4.55
Glycine	49.78	43.80	36.02	36.15
L-Alanine	40.01	22.50	6.68	8.63
L-Citrulline	24.48	2.87	0.00	0.00
DL-2-Aminobutyric acid	0.00	0.00	0.00	9.16
L-Valine*	92.22	56.34	20.50	12.90
L-Methionine*	61.75	37.30	14.98	9.82
L-Isoleucine*	71.90	43.91	17.00	10.10
L-Leucine*	259.86	162.87	62.15	48.16
L-Tyrosine	203.94	119.86	44.07	35.24
L-Phenylalanine*	443.43	331.69	126.48	97.30
β-Alanine	0.00	0.00	0.00	12.05
DL-3-Aminoisobutyric acid	0.00	0.00	0.00	39.11
2-Aminoethanol	0.00	0.00	0.00	5.32
Ammonium chloride	44.15	31.29	15.41	16.57
L-Ornithine	29.03	17.01	4.92	6.77
L-Lysine*	12.63	7.37	1.51	2.52
L-1-Methylhistidine	15.18	9.17	1.46	2.72
L-Histidine	11.02	0.00	0.34	1.47
L-Carnosine	7.24	4.68	0.00	0.43
Total	1,603.69 (961.19) ²⁾	1,000.55 (648.84)	475.04 (246.44)	415.73 (219.82)

¹⁾AP1: collagen (MW<1 kDa) from Alaska pollack skin, AP2: collagen (MW 1~3 kDa) from Alaska pollack skin, AP3: collagen (MW 3~10 kDa) from Alaska pollack skin, AP4: collagen (MW>10 kDa) from Alaska pollack skin.

²⁾Total residue of essential amino acids.

*Essential amino acids in children.

leucine의 함량이 특히 높았다. Yamaguchi 등(25)은 어종간에 아미노산의 조성 차이가 다소 나타나지만 청어 및 대구 메기의 근경막 및 어피 콜라겐 사이에 아미노산 조성에는 차이가 거의 없다고 보고하였는데, 본 실험에서도 분자량이 작을수록 아미노산의 함량은 높아졌지만 아미노산 조성의 차이는 AP1, AP2, AP3 및 AP4가 유사한 것으로 확인되었

다.

FT-IR 스펙트럼 특성

분자량별 콜라겐 및 콜라겐 표준품의 FT-IR 스펙트럼을 Fig. 1에 나타내었다. 콜라겐의 아미노산 조성은 glycine-proline-hydroxyproline으로 이루어져 있으며 콜라겐 펩타이드의 분자구조는 glycine의 -NH amino group과 polypeptide chain의 carbonyl group인 C=O로 이루어져 있다 (26). 본 실험에 사용한 분자량별 콜라겐의 FT-IR 스펙트럼은 콜라겐 표준품과 유사하였다. 콜라겐 표준품의 최대 peak band는 1,636 cm^{-1} 과 1,542 cm^{-1} , 1,200 cm^{-1} 및 3,312 cm^{-1} 로 각각 amide I, amide II, amide III와 amide A의 peak band를 나타내었다. Amide I, II와 A 영역은 polypeptide의 형태와 직접적으로 연관이 있고 amide B 영역의 peak는 CH_2 의 stretching vibration을 나타내며, amide I은 1,600~1,700 cm^{-1} 에서 carbonyl group의 stretching vibration을 나타내고 amide II는 1,500~1,550 cm^{-1} 에서 NH bending 및 CN stretching, amide A

는 3,200~3,600 cm^{-1} 에서 N-H stretching vibration과 관련이 있음을 보여준다고 보고되고 있다(27). 본 연구에서 사용한 분자량별 콜라겐은 amide I, amide II, amide III, amide A의 범위에서 wavenumber 속에 포함되어 콜라겐 표준품과 유사한 peak band 값을 나타내어 화학구조가 동일함을 알 수 있었다. Matmaroh 등(28)은 spotted folden goatfish에서 산 가용성 및 pepsin으로 콜라겐을 추출하였으며 pepsin으로 추출한 콜라겐의 FT-IR 스펙트럼을 분석한 결과 amide A, I, II 및 amide III 영역의 최대 peak band는 각각 3,294 cm^{-1} (amide A), 1,631 cm^{-1} (amide I), 1,536 cm^{-1} (amide II) 및 1,234 cm^{-1} (amide III)이라고 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다.

전자공여능 및 superoxide dismutase 유사 활성

명태 껍질유래 분자량별 콜라겐의 전자공여능은 Table 3과 같다. 전자공여능은 20.91~29.51%로 1 kDa 이하에서 가장 높은 항산화 활성을 나타내었으며 분자량이 커질수록 항산화능이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. Superoxide

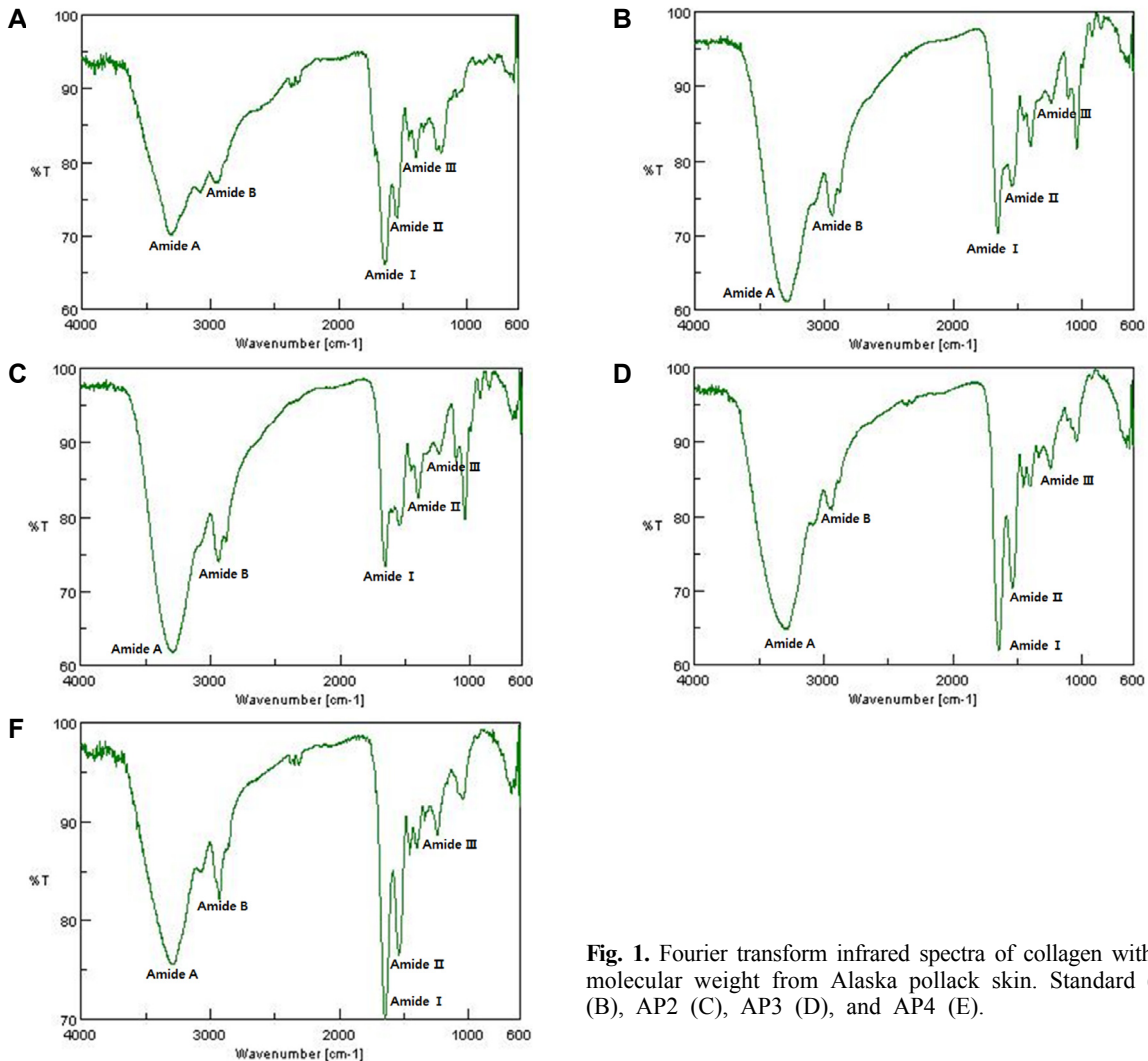


Fig. 1. Fourier transform infrared spectra of collagen with different molecular weight from Alaska pollack skin. Standard (A), AP1 (B), AP2 (C), AP3 (D), and AP4 (E).

Table 3. Electron donating ability and SOD-like activity of collagen with different molecular weight from Alaska pollack skin

Measurements	AP1 ¹⁾	AP2	AP3	AP4
Electron donating ability (%)	29.51±0.27 ^{a2)}	27.82±0.32 ^b	24.27±0.61 ^c	20.91±0.12 ^d
SOD-like activity (%)	38.45±0.89 ^a	37.26±1.69 ^b	25.26±0.49 ^c	24.61±0.79 ^c

All values are mean±SD (n=3).

¹⁾AP1: collagen (MW<1 kDa) from Alaska pollack skin, AP2: collagen (MW 1~3 kDa) from Alaska pollack skin, AP3: collagen (MW 3~10 kDa) from Alaska pollack skin, AP4: collagen (MW>10 kDa) from Alaska pollack skin.

²⁾Means with different superscript letters (a-d) within the row are significantly different ($P<0.05$).

dismutase 유사 활성도 전자공여능과 비슷한 결과로 1 kDa 에서 38.45%로 가장 높은 활성을 나타내었으며 10 kDa 이상에서 24.61%로 가장 낮은 활성을 나타내었다. Kim 등 (29)은 상어 껍질 및 육조직으로부터 추출한 콜라겐을 이용하여 전자공여능을 측정할 결과 14.91~17.21%의 활성을 나타내었으며, Kim 등(30)은 가자미 콜라겐을 한외여과막을 이용하여 10 kDa, 5 kDa, 1 kDa의 막을 차례로 통과시켜 얻은 가수분해물 중 분자량이 1,800~2,000 Da의 가수분해물이 천연 항산화제인 α -tocopherol보다 항산화력이 10% 정도 더 높았다고 보고하였는데, 저분자에서 항산화능이 높은 경향은 본 연구 결과와 유사하였다.

Tyrosinase 저해 활성

분자량별 콜라겐이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 본 연구에서는 먼저 멜라닌 합성의 속도 조절 효소로 작용하는 tyrosinase의 활성을 측정하였다(Fig. 2). α -MSH 처리 시 262±20%로 대조군에 비하여 tyrosinase 활성이 증가하였지만, 저분자 콜라겐을 같이 처리한 구간에서는 α -MSH 단독 처리한 경우에 비해 tyrosinase의 활성이 억제되는 것으로 나타났다. 분자량별 콜라겐을 1,000 μ g/mL 농도로 처리한 경우 α -MSH군에 비하여 tyrosinase 활성도가 AP1, AP2, AP3 및 AP4가 각각 92.9%, 86.5%, 49.2%, 22.3%로 분자량이 작아질수록 tyrosinase 활성이 감소하였으며 AP1에서는 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다. Tyrosinase는 tyrosine을 기질로 하여 DOPA로

전환시키는 DOPA hydroxylase와 DOPA를 DOPA quinone으로 전환시키는 DOPA oxidase로서 멜라닌 합성의 처음 두 단계 반응을 촉매 한다. 따라서 DOPA 염색을 이용하여 멜라닌 세포의 tyrosinase의 활성을 관찰한 결과, α -MSH 처리 시 대조군에 비하여 tyrosinase의 활성이 현저히 증가하였으며, α -MSH와 분자량별 콜라겐 처리군은 α -MSH 단일 처리군에 비하여 tyrosinase의 활성이 감소하였음을 알 수 있었다. Park 등(8)의 연구에 의하면 불가사리 콜라겐 효소 가수분해물은 0.5 mg/mL의 농도에서 13.6%의 tyrosinase 저해 활성을 가진다고 보고하여 본 연구에서 사용한 콜라겐의 tyrosinase 저해 활성이 우수하다고 사료된다.

MMP-1 활성 저해능

피부의 광노화에 의한 피부 주름 생성에 중요한 역할을 담당하고 있는 MMP-1의 발현은 UV에 의해 세포에서 JNK/p38 활성도가 증가하고 전사인자인 AP-1의 활성도가 증가되는 신호전달 경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다(31). 이러한 UVB에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 미치는 명태 유래 콜라겐의 분자량에 따른 영향을 확인하고자 HS68 cell에 UVB를 조사하여 콜라겐의 전처리가 UVB 조사된 피부 세포에 미치는 세포 보호 효과를 측정하였다. 그 결과 Fig. 3의 세포 보호 효과로 AP4에서는 MMP-1 저해율이 나타나지 않았으며 AP3은 1 mg/mL 농도에서 11.63%의 감소율을

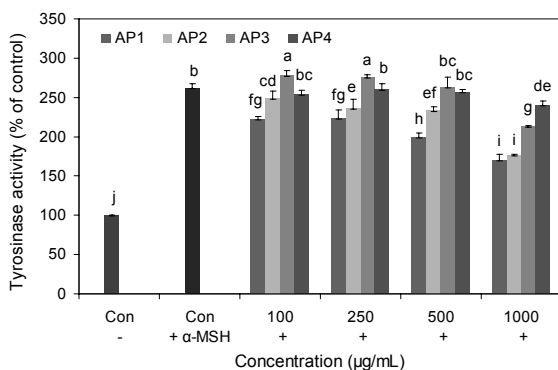


Fig. 2. Effect of Alaska pollack skin collagen with different molecular weight on tyrosinase in B16/F10 cells. Each values are mean±SD of triplicate determinations. Means with different letters above the bars are significantly different ($P<0.05$).

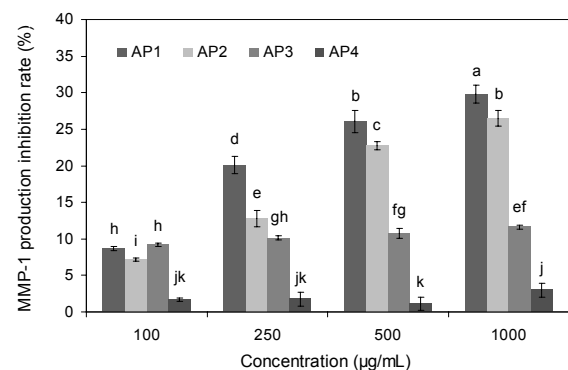


Fig. 3. Effect of MMP-1 inhibition in HS68 cells treated UVB of collagen with different molecular weight from Alaska pollack skin. Each values are mean±SD of triplicate determinations. Means with different letters above the bars are significantly different ($P<0.05$).

Table 4. Correlation coefficients among electron donating ability, SOD-like activity, tyrosinase activity, and MMP-1 inhibition of collagen with different molecular weight from Alaska pollack skin

	DPPH	SOD-like activity	Tyrosinase activity	MMP-1 inhibition rate
DPPH	1.000	—	—	—
SOD-like activity	0.927**	1.000	—	—
Tyrosinase activity	-0.979**	-0.948**	1.000	—
MMP-1 inhibition rate	0.987**	0.966**	-0.993**	1.000

**Significant at $P < 0.01$.

나타내었지만 농도별로 저해율은 크게 감소되지 않았다. 하지만 3 kDa 이하의 분자량에서는 농도별로 유의적으로 MMP-1 활성을 저해시켰으며 1 mg/mL의 농도에서는 AP1과 AP2가 각각 29.78% 26.49%로 높은 저해율을 나타내어 UVB에 대한 효과가 있음을 확인하였다. Kwon 등(32)은 불가사리 콜라겐을 이용하여 UVA 처리를 이용하여 MMP-1 저해 활성을 측정된 결과, 1 mg/mL에서 62.4%의 높은 저해율을 나타내었으며 UVA에 의해 발생된 JNK/p38에서 AP-1의 활성도를 증가시키는 과정을 억제한 것으로 볼 수 있으며 결과적으로 MMP-1의 발현을 효과적으로 조절한 것이라고 보고하였는데, 본 연구 결과도 분자량이 작을수록 MMP-1 발현 저해능을 나타내어 피부 주름 개선에 영향을 줄 것으로 사료된다.

콜라겐의 분자량과 생리활성 간의 상관성

콜라겐의 분자량과 전자공여능, superoxide dismutase 유사 활성, tyrosinase 저해 활성 및 MMP-1 활성 저해능 간의 상관성을 분석하여 각각의 상관계수 값을 Table 4에 나타내었다. 분석 결과 콜라겐의 분자량과 생리활성 값 간에는 유의적인 상관관계를 나타내었다($P < 0.01$). 전자공여능은 superoxide dismutase 유사 활성 및 MMP-1 활성 저해능과 유의적인 상관관계($r = 0.927, r = 0.987$)가 인정되었으며, tyrosinase 저해 활성과는 높은 음의 상관관계($r = -0.979$)를 나타내었다. Superoxide dismutase 유사 활성과 tyrosinase 저해 활성 간의 상관계수는 $r = -0.948$ 로 유의적인 음의 상관관계가 존재하는 것으로 나타났으며, MMP-1 활성 저해능과의 상관계수는 $r = 0.966$ 으로 높은 양의 상관관계를 보였다. 이상의 결과를 미루어 볼 때 명태 껍질로부터 분리한 콜라겐의 생리활성은 분자량에 따라 매우 높은 의존성을 보여주었다.

요 약

어류 부산물인 명태 껍질에서 콜라겐을 추출하기 위하여 0.1 N NaOH로 알칼리 처리 후 pepsin으로 효소 처리하였고 저분자화를 위해 neurase를 이용하여 분자량별로 콜라겐을 제조하였다. 콜라겐은 1 kDa 이하, 1~3 kDa, 3~10 kDa 및 10 kDa 이상으로 분자량별로 분리하여 이화학적 특성 및 생리활성을 조사하였다. 분자량에 따른 콜라겐 함량은 1 kDa 이하에서 36.43%로 가장 높았으며 유리 아미노산

조성은 1 kDa 이하, 1~3 kDa, 3~10 kDa 및 10 kDa 이상에서 각각 1,603.69, 1,000.55, 475.04, 415.73 mg/100 g으로 분자량이 작을수록 유리 아미노산의 함량이 높게 나타났다. 콜라겐의 분자구조를 Fourier transform infrared spectroscopy로 측정한 결과 분자량에 따른 콜라겐 모두 amide A, amide I, amide II, amide III의 범위에 wave-number 속에 포함되었으며 콜라겐 표준품과 유사한 peak band 값을 나타내어 화학구조가 동일함을 알 수 있었다. 전자공여능과 superoxide dismutase 유사 활성은 1 kDa 이하에서 각각 29.51%, 38.45%로 가장 높았으며 분자량이 커질수록 그 값은 감소하였다. 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 α -MSH를 첨가한 tyrosinase 활성 측정은 1 kDa 이하에서 농도 유의적으로 tyrosinase 활성을 저해시키는 것을 확인할 수 있었으며, 광노화에 의한 피부 주름 개선 효과는 HS68 cell을 이용하여 MMP-1 저해 활성을 측정하였고 그 결과 10 kDa 이상에서는 MMP-1 저해 활성이 나타나지 않았으나 3 kDa 이하에서는 MMP-1 저해 활성이 나타나 세포 보호 효과가 있음을 확인하였다. 콜라겐의 분자량은 항산화 활성 및 생리활성과 유의적인 상관관계를 나타내어 저분자 콜라겐은 기능성 식품 및 화장품 소재로서 활용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부의 지역산업기술개발사업(과제번호: R0000006)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Perlsh JS, Lemlich G, Fleischnmajer R. 1998. Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. *J Invest Dermatol* 90: 48-54.
2. Lee JH, Seo JH, Park YH, Kim WG, Lim KM, Lee SJ. 2008. The effect of hydroxyproline and Pro-Hyp dipeptide on UV-damaged skin of hairless mice. *Korean J Food Sci Technol* 40: 436-442.
3. Kim SK, Yang HP, Lee EH. 1991. The development of a natural seasoning using the enzymatic hydrolysate of fish skin. *Korean J Biotechnol Bioeng* 6: 327-336.
4. Kim JW, Kim DK, Kim MJ, Kim SD. 2010. Extraction and bleaching of acid- and pepsin-soluble collagens from shark skin and muscle. *Korean J Food Preserv* 17: 91-99.
5. Weiss JB, Ayad S. 1982. An introduction to collagen. In

- Collagen in Health and Disease*. Churchill Livingstone, New York, NY, USA. p 1-17.
6. McCormick RJ. 1994. Structure and properties of tissues. In *Muscle Foods, Meat Poultry and Seafood Technology*. Chapman and Hall, New York, NY, USA. p 25-62.
 7. Wood A, Ogawa M, Portier RJ, Schexnayder M, Shirley M, Losso JN. 2008. Biochemical properties of alligator (*Alligator mississippiensis*) bone collagen. *Biochem Physiol* 151: 246-249.
 8. Park HY, Yoon HD, Hae J. 2006. Development of industrial utilization technique of starfish collagen. Fishery Science & Technology Last Research Report. Ministry of Oceans and Fisheries, Sejong, Korea. p 94-96
 9. Yoo SJ, Cho SM, Woo JW, Kim SH, Han YN, Ahn JR, Kim SY, Kim TW, Kim SB. 2008. Processing and physicochemical properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) abdominal skin. *J Kor Fish Soc* 41: 427-434.
 10. Kim SK, Kang OJ, Kwak DC. 1993. Physicochemical characteristics of filefish and cod skin collagen. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 36: 163-171.
 11. Kwon MC, Syed AQ, Kim HS, Ahn JH, Cho NH, Lee HY. 2008. UV protection and whitening effects of collagen isolated from outer layer of the squid *Todarodes pacificus*. *J Kor Fish Soc* 41: 7-12.
 12. Matsui T, Matsufuji H, Seki E, Osajima K, Nakashima M, Osajima Y. 1993. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates deived from sardine muscle. *Biosci Biotech Biochem* 57: 922-925.
 13. AOAC. 1990. *Official methods of analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. p 777-784.
 14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
 15. Bergaman I, Loxley R. 1963. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal Chem* 35: 1961-1963.
 16. Lee EJ, Kim JS, Kwon JH. 2008. Optimization of microwave-assisted extraction conditions for total catechin and electron donating ability of grape seed extracts. *Korean J Food Preserv* 15: 840-846.
 17. Marklund G, Marklund S. 1975. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.
 18. Martinez-Esparaza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, Garcia-Borron JC. 1998. Mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem* 255: 139-146.
 19. Quan T, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ. 2001. Ultraviolet irradiation blocks cellular responses to transforming growth factor-beta by down-regulating its type II receptor and inducing Smad7. *J Biol Chem* 276: 26349-26356.
 20. Chiang HM, Lin TJ, Chiu CY, Chang CW, Hsu KC, Fan PC, Wen KC. 2011. Coffea arabica extract and its constituents prevent photoaging by suppressing MMPs expression and MAP kinase pathway. *Food Chem Toxicol* 49: 309-318.
 21. Choi YC. 2013. Development of high pressure/high temperature processing and high pressure enzymatic processing for rapid hydrolysis of porcine placenta. *MS Thesis*. Konkuk University, Seoul, Korea. p 3.
 22. Harris JR. 1990. *Gelatin in press food gels*. Johnston-Banks FA, ed. Elsevier Applied Science Publishers, London, UK. p 233-289.
 23. Gilsenan PM, Ross-Murphy SB. 2000. Rheological characterization of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids* 90: 191-195.
 24. Ha YK. 2009. Development and evaluation of functional ingredient using Jellyfish (*Rhopilema esculentum*). *MS Thesis*. Andong National University, Andong, Korea. p 50-51
 25. Yamaguchi K, Lavety J, Love RM. 1976. The connective tissues of fish: VIII. Comparative studies on hake, cod and catfish collagens. *Int J Food Sci Technol* 11: 389-399.
 26. Bell J, Brodsky B, Berman HM. 1995. Hydration structure of a collagen peptide. *Structure* 3: 893-906.
 27. Muyonga JH, Cole CGB, Duu KG. 2004. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chem* 85: 81-89.
 28. Matmaroh K, Benjakul S, Prodpran T, Encarnacion AB, Kishimura H. 2011. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chem* 129: 1179-1186.
 29. Kim JW, Kim DK, Park JS, Lee YK, Beik KY, Kim SD. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of shark collagens, and inhibitory actions on elastase and tyrosinase. *Korean J Food Preserv* 16: 419-426.
 30. Kim SK, Lee HC, Byun HC, Jeon YJ. 1996. Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysed of tellowfin sole skin gelatin. *J Korean Soc Fish* 29: 246-255.
 31. Kim SJ, Kim JD, Kang MJ, Ahn HY, Kim DJ. 2000. Collagen-induced activation of MMPs (membrane-type matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2) in ovarian cancer cell lines *in vitro*. *J Korean Soc Obstet Gynecol* 43: 1972-1978.
 32. Kwon MC, Kim CH, Kim HS, Syed AQ, Hwang BY, Lee HY. 2007. Anti-wrinkle activity of low molecular weight peptides derived from the collagen isolated from *Asterias amurensis*. *Korean J Food Sci Technol* 39: 625-629.