

굴 효소 가수분해물과 분자량 분획물의 섬유아세포에 대한 주름 개선 효과

김현아¹ · 박시향² · 이수선² · 최영준¹

¹경상대학교 해양식품공학과/해양산업연구소
²(주)선마린바이오테크

Anti-Wrinkle Effects of Enzymatic Oyster Hydrolysate and Its Fractions on Human Fibroblasts

Hyeon-Ah Kim¹, Si-Hyang Park², Su-Seon Lee², and Yeung Joon Choi¹

¹Department of Seafood Science and Technology/ Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University
²Sunmarine Biotech. Co., Ltd.

ABSTRACT We investigated the anti-wrinkle efficacy of hydrolysate from oyster protein by Protamex and Neutrase for the purpose of finding materials to assist skin health originating from marine organisms. There were about 7.9% free amino acids in the oyster hydrolysate, and contents of urea, taurine, alanine, and glycine were high. Oyster hydrolysate also showed collagenase inhibitory activity and was not toxic to CCD986sk human fibroblast cells. Yield of the fractions according to the molecular weight of oyster hydrolysate was 40% for less than 1,000 Da and 60.4% for less than 5,000 Da, respectively. Antioxidative effect, procollagen production, and matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity were highest in 1,000~3,000 Da fractions. We observed that oyster hydrolysate and its less than 5,000 Da fraction are potential functional compounds for skin health and for improving wrinkles.

Key words: oyster, radical, procollagen, collagenase

서 론

해양생물은 다양한 생물종으로 이루어져 있으며, 종에 따라, 동종도 부위에 따라, 혹은 생산 시기에 따라 생리활성을 나타내는 화합물의 종류도 다르게 나타난다(1). 이러한 해양 생물 유래 화합물에는 해조 다당류, 미네랄, 비타민, 항산화제, 효소 및 생리활성 펩티드 등이 있으며, 그 기능적 특성과 관련된 많은 연구가 이루어지고 있다(2,3). 특히 펩타이드는 영양을 공급하고, 용해 및 유화 특성을 가지고 있을 뿐만 아니라 항암 효능 및 면역 증강 등의 광범위한 생리활성을 나타내고 있다(2-4). 이러한 생리활성을 가지는 펩타이드는 화학적 합성을 통해서, 동식물 및 어류 추출물로부터, 단백질 효소 가수분해에 의한 단백질 가수분해물(5-7) 혹은 미생물 발효 공정(8)을 통해 얻을 수 있다.

천연물 유래의 기능성 펩타이드는 해양생물의 단백질이 갖는 특이적인 1차 결합에 근거하여 많은 연구가 진행되고 있다. Aneiros와 Garateix는 해면동물, 연체동물 및 해조로부터 펩타이드의 기능적 특성 및 분리 기술에 관하여 연구하

였고, Suarez-Jimenez 등(9)은 해면동물과 연체동물 가수분해물의 항산화 효능과 항암 효능에 관하여 연구하였다. 이외에도 Sacoglossan mollusk와 *Elysia rufescens*로부터 항암 효능과 항균 효능이 있는 cyclic depsipeptides인 Kahalalides를 분리하기도 하였다(10).

우리나라의 노령인구는 2014년 12.7%였으며, 2026년이면 20.8%로 초고령 사회로 진입한다고 한다(통계청, 장래인구추계, 2012). 노령인구의 증가로 노화를 지연시킬 수 있는 약물에 관한 관심도 크게 증가하였고, 피부를 젊게 유지하기 위한 화장품 개발도 함께 빠르게 진행되고 있다. 피부의 노화 현상을 예방하거나 지연하기 위한 연구로는 피부의 수분 균형을 조절하기 위한 보습인자(11), 미백 및 주름 개선에 도움을 주는 물질에 관한 연구가 있다(12).

굴은 바다에서 사는 굴과의 연체동물로 예부터 전 세계 여러 사람들이 즐겨 먹고 있는 맛이 좋고 영양가가 높은 수산식품이다(13). 굴은 고형물 함량 중 60~70%가 단백질로 이루어져 있으며, 비타민 A, B₁, B₂, C 및 철, 칼슘, 인, 아연, 셀레늄, 구리 등의 무기질 등 기능성 성분을 다량 함유하고 있다(14). 굴에 다량 함유된 단백질을 효소로 가수분해 하여 얻은 굴 가수분해물은 유리아미노산이 풍부하고 저분자의 펩타이드가 다량 함유되어 있다(15). 저분자의 화합물은 피부 침투력(16)이 좋을 뿐만 아니라 물에 대한 용해도가 증가하여 수용성 형태의 원료로 다양한 화장품 소재 적용이 가능

Received 9 July 2015; Accepted 6 August 2015

Corresponding author: Yeung Joon Choi, Department of Seafood Science and Technology/ Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong, Gyeongnam 53064, Korea
E-mail: yjchoi@gnu.ac.kr, Phone: +82-55-772-9143

하다. 피부의 노화를 억제하는 효능에 관한 물질로 펩타이드에 관한 연구가 진행되고 있으나(17), 해양생물을 소재로 한 저분자 펩타이드의 주름 개선 효능에 관한 연구는 거의 되어 있지 않다.

본 연구는 해양생물 유래 피부건강 기능성의 소재를 발굴할 목적으로 굴 단백질의 효소 가수분해물이 주름 개선에 미치는 효과를 조사하였다. 굴 단백질 가수분해물의 항산화 효과를 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 및 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS) 라디칼 소거능으로 확인하였으며, collagenase 저해 활성을 측정하여 그 효과를 확인하였다. 그리고 굴 가수분해물을 분자량 크기별로 분획하여 분자량의 크기에 따른 인간 피부 섬유아세포의 procollagen 생성능과 matrix metalloproteinase-1(MMP-1) 활성 저해능을 측정하여 주름 개선에 미치는 효과를 비교하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 참굴(*Crassostrea gigas*)은 경남 통영 연안의 양식장에서 채취하여 알굴의 형태로 급속 동결하여 1~2년 정도 냉동 보관된 제품(Daione Foods Co., Tongyeong, Korea)을 구입하여 사용하였다. 굴을 가수분해 하기 위한 단백질 분해 효소는 식품 첨가물로 인정된 neutral protease (Neutrase)와 *subtilisin* 유래 protease(Protamex)를 바이오시스(Busan, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 CCD986sk 세포주는 미국 세포주 은행(American Type Culture Collection(ATCC), Manassas, VA, USA)에서 분양받아 사용하였다. 세포배양에 필요한 배지 등은 Hyclone 사(Thermo Fisher Scientific Inc., Lenexa, KS, USA) 제품을 사용하였다.

굴 가수분해물의 제조

굴 가수분해물은 Hur 등(18)의 방법에 따라 제조하였으며, 냉동굴을 냉동 상태에서 습식 분쇄기로 마쇄하였다. 마쇄 굴의 2배의 물을 넣고, 단백질 분해 효소인 Protamex를 생굴 무게의 1%가 되도록 넣어 2시간 동안 40°C에서 가수분해 한 다음, 100°C에서 30분간 가열하여 효소를 불활성화 하였다. 방랭한 후 가수분해물에 1% Neutrase를 넣어 50°C에서 2시간 가수분해 하고 다시 가열하여 효소의 활성을 제거하였다. 이것을 부직포로 여과한 여액을 brix 30까지 농축하여 60% 에탄올로 단백질을 침전한 후 상등액을 취해 에탄올을 증발시킨 다음 굴 가수분해물 시료로 사용하였다 (Fig. 1).

굴 가수분해물의 분획

굴 가수분해물은 한외여과막을 통해 분자량별로 분획하였다. 한외여과는 10,000 Da 이상, 3,000~10,000 Da, 1,000

~3,000 Da 및 1,000 Da 미만과 5,000 Da 미만의 분획물로 분리하였으며, 분획은 분자량에 따른 여과막을 장착한 한외여과기(Stirred Ultrafiltration Cells 8200, Millipore Corporation, Darmstadt, Germany)를 사용하였다.

굴 가수분해물의 유리아미노산 분석

굴 가수분해물 1.5 mL에 5'-sulfosalicylic acid 75 mg을 넣고 상온에서 30분간 방치하였다. 10,000 rpm에서 10분간 원심분리(MICRO17TR, Hanil Science Industrial, Incheon, Korea) 하고 상등액을 취하여 실린더형 여과기(0.22 µm)로 여과한 후, 유리아미노산 분석기(Biochrom 20, LKB Biochrom Ltd., Cambridge, UK)로 분석하였다.

DPPH 라디칼 소거능의 측정

96 웰 플레이트에 굴 가수분해물을 여러 농도로 희석한 용액과 0.4 mM의 DPPH 용액을 가해 30분간 실온에서 반응시키고, Microplate reader(Perkin Elmer 1420, VICTOR™ X Multilabel Plate Readers, Waltham, MA, USA)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 흡광도를 비교하여 굴 가수분해물 및 분획물의 DPPH 라디칼의 소거능을 측정하였다.

ABTS 라디칼 소거능의 측정

ABTS 라디칼 소거능의 측정은 Re 등(19)의 방법에 따라 측정하였다. 7 mM ABTS와 140 mM potassium persulfate를 혼합하여 어두운 곳에 12시간 동안 양이온화한 후, 흡광도가 734 nm에서 0.700±0.01이 되도록 phosphate buffer saline(pH 7.4) 용액을 가해 조절한 ABTS 용액을

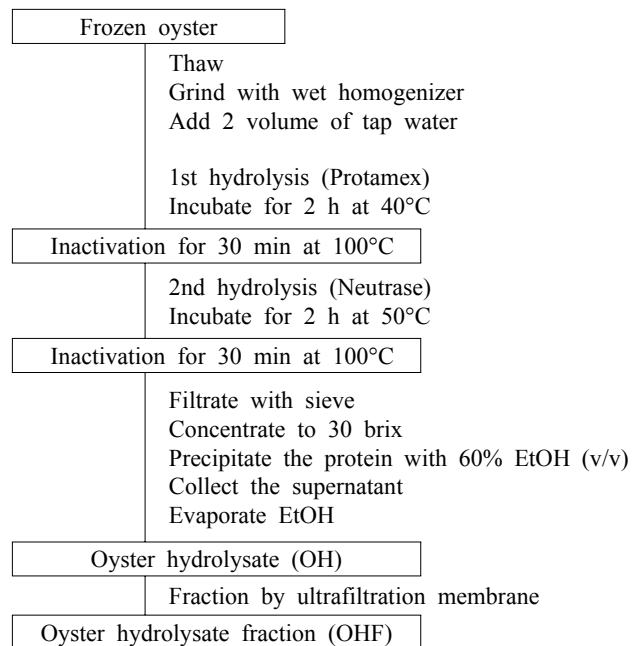


Fig. 1. Preparation of oyster hydrolysate and its fraction.

사용하였다. 시료용액 10 µL와 ABTS 용액 190 µL를 혼합하여 6분간 실온에서 차광한 상태로 반응시키고 734 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식에 의해 라디칼 소거능을 계산하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}}\right) \times 100$$

Collagenase 활성 저해능

굴 가수분해물과 분자량 분획물의 collagenase 활성 저해능은 EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay kit(D-12054, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하였다. Kit 시약은 정제된 효소를 이용하여 세포나 조직 용해물에서 collagenase 활성을 측정하는 high-throughput 형식의 활성 저해 효과를 선별하는 방법으로, 형광 표지자인 DQ gelatin conjugate에 효소가 작용할 때 발현되는 형광량을 측정하는 방법이다. Collagenase 저해 활성은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Collagenase inhibitory activity (\%)} = \left(1 - \frac{B - B_0}{A - A_0}\right) \times 100$$

- A: 효소 첨가 증류수의 흡광도
- A₀: 효소 무첨가 증류수의 흡광도
- B: 효소 첨가 시료의 흡광도
- B₀: 효소 무첨가 시료의 흡광도

피부 세포 독성

인간 피부 섬유아세포주인 CCD986sk를 Iscove's modified Dulbecco's medium(IMEM) 배지로 배양하였다. 각 세포주는 배양 플레이트에 배양하여 1주일에 2~3회 계대하였으며, 배지는 10% FBS 배지를 함유한 성장배지를 이용하였다. 세포주는 95% humidity, 5% CO₂와 35°C로 조절된 항온기에서 배양하였으며, 배지는 2일에 한 번씩 교환하였다. 섬유아세포에 대한 독성 여부를 알아보기 위하여 세포를 96 웰 플레이트에 1×10⁴ cells의 농도로 분주하고 24시간 동안 안정화하였다. 시료는 최종 농도가 10, 50, 100 및 200 µg/mL가 되도록 배지에 녹여 세포에 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 세포의 생존율은 CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay 시약(Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 Microplate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하고 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도 비를 %로 나타내었다.

Procollagen 생성량 측정

CCD986sk는 48 웰 플레이트에 5×10⁴의 농도로 분주한 후 24시간 동안 FBS free 배지로 안정화하고 배지에 시료를 녹여 세포에 처리하였다. 24시간 동안 배양한 다음 배양 상등액을 취해 procollagen type 1 C-peptide EIA kit(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)으로 procollagen 함량을 측정하여 콜라겐의 생성 정도를 비교하였다. 배양액 내의 총 단백

질 함량을 Lowry 법(20)에 따라 측정하여 콜라겐의 생성량을 보정하였다.

MMP-1 효소 활성 저해능의 측정

MMP-1 효소 활성 저해능은 procollagen 함량 측정과 같은 방법으로 세포를 배양하여 MMP-1 human biotrac ELISA system(GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK)으로 측정하였다.

통계처리

본 연구의 모든 실험 결과는 3회 이상 반복하여 얻은 측정값의 평균값으로 나타내었다. 통계분석은 Minitab 17(Minitab 17, Minitab Inc., State College, PA, USA)을 이용하였고, 결과는 일원 분산분석 후 Turkey 다중비교법을 수행하였다. 대조군에 대한 통계적 유의성은 P<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

굴 가수분해 분획물의 함량

총 가수분해물에 대한 분획물의 구성 비율은 10,000 Da 이상이 34.1%, 3,000~10,000 Da은 8%였으며, 3,000 Da 미만의 분획은 57.5%로 굴 가수분해물의 50% 이상이 저분자의 펩타이드까지 가수분해 되었음을 알 수 있었다. 한편 5,000 Da 미만의 분획물은 전체 가수분해물의 60.4%였다.

굴 가수분해물 분획물 중 분자량이 1,000 Da 미만의 물질은 아미노산 잔기수가 10개 미만의 펩타이드와 아미노산 및 염 등으로 구성된 물질로 여겨진다. 화장품의 기능적 효능을 확보하기 위해서는 피부 투과도가 높아야 하며, 분자량이 500 Da 미만으로 분자량이 적을수록 투과도가 높다(21). 굴 펩타이드 추출물 중 1,000 Da 이하의 분획물에는 보습에 관여하는 아미노산 및 저분자량의 펩타이드가 다량 함유되어 있어서 피부 경피 흡수율 증가와 보습에 기여할 것으로 기대된다(14,15).

굴 가수분해물의 유리아미노산 조성

굴 가수분해물의 유리아미노산 함량은 약 7.8%로 urea와 taurine 함량이 가장 높았고, proline, asparagine, alanine, glutamic acid, leucine, glycine 순으로 아미노산이 함유되어 있었다(Table 1).

소수성 및 친수성 물질과 결합하여 피부에 수분을 유지시켜 주는 역할을 하는 물질을 피부의 천연 보습인자(natural moisturizing factors)라고 부른다. 천연보습인자에는 amino acids, carboxylic pyrrolidone acid, lactic acid, urea, glucose와 mineral ions 등이 있다(22). 아미노산은 천연보습인자의 42% 정도를 차지하며 serine, citrulline, alanine, glycine, aspartic acid, threonine 등으로 이루어져 있다(23). 굴 가수분해물에는 천연보습인자인 urea가 전체 유리

Table 1. Free amino acid composition of oyster hydrolysate

Amino acid	mg/100 g ¹⁾	% to FAA ²⁾
Taurine	716.9±1.4	9.1±0.3
Urea	1,227.0±23.2	15.7±0.4
Asparagine	623.3±30.7	8.0±0.1
Glutamic acid	449.6±7.3	5.7±0.1
Proline	681.5±2.1	8.7±0.3
Glycine	335.0±5.0	4.3±0.1
Alanine	470.5±5.8	6.0±0.2
Methionine	163.4±9.2	2.1±0.1
Cystathionine	142.7±3.3	1.8±1.0
Isoleucine	61.1±1.9	0.8±0.0
Leucine	338.0±6.7	4.3±0.1
Tyrosine	249.6±6.9	3.2±0.0
β-Alanine	215.6±10.2	2.8±0.0
Phenylalanine	293.9±16.5	3.8±0.1
Homocystine	88.3±8.7	1.1±0.1
δ-Hydroxy lysine	158.7±27.6	2.0±0.3
Lysine	171.7±14.0	2.2±0.1
Histidine	85.3±4.8	1.1±0.0
Carnosine	147.2±5.3	1.9±0.1
Arginine	223.6±4.9	2.9±0.1
Etc.	994.1±42.1	13.3±4.3
Total	7,836.5±260.7	100

¹⁾Free amino acid contents of oyster hydrolysate (100 g).

²⁾Amino acid ratio of total free amino acid.

Each results represents the mean±SD (n=3).

아미노산 함량의 15.7% 함유되어 있었다. 천연보습인자 중 alanine은 전체 유리아미노산의 6.0% 함유되어 있고, glycine은 4.3% 함유되어 있었다. 또한 피부를 구성하고 있는 콜라겐은 glycine, proline, alanine, glutamic acid 및 arginine 등으로 이루어져 있는데(24), 굴 가수분해물의 유리 아미노산 조성의 유사하였다. 굴 가수분해물에 함유된 유리 아미노산은 피부의 천연보습인자와 피부 콜라겐을 이루고 있는 아미노산과 비슷한 조성을 나타내었다.

굴 가수분해물의 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 농도별 항산화 활성을 3회 이상 실시하여 그 평균값으로 50% 라디칼 소거 활성(IC₅₀)을 계산하였고 굴 가수분해물의 IC₅₀ 값은 11.1 mg/mL였으며, 아스코르브산의 경우는 0.03 mg/mL로 굴 가수분해물에 비해 현저히 낮았다(Table 2). 한편 1,000~3,000 Da과 3,000~10,000 Da 분획물의 DPPH 라디칼 소거능(IC₅₀)은 각각 6.4와 8.3 mg/mL로 다른 분획물에 비해 낮은 값을 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거 활성은 3,000~10,000 Da 분획물에서 가장 높은 활성을 보였으나, DPPH 라디칼 소거 활성과 마찬가지로 높은 편은 아니었다(Table 2). Mendis 등(25)은 어피 젤라틴 가수분해물로부터 정제한 펩타이드의 항산화 특성 연구에서 His-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Leu(797 Da) 배열을 가지는 펩타이드가 항산화제인 BHT와 비슷한 높은 항산화능을 갖는다고 보고하였다. 메틸단백질 가수분

Table 2. Free radical scavenging activities of oyster hydrolysates and its fractions

Sample, MW size	IC ₅₀ (mg/mL) ¹⁾		
	DPPH	ABTS	
Ascorbic acid	0.03	0.08	
OH ²⁾	11.1	6.1	
OHF ³⁾	10,000 Da<	11.2	5.6
	3,000~10,000 Da	8.3	3.8
	1,000~3,000 Da	6.4	4.2
	1,000 Da>	11.1	7.8
	5,000 Da>	10.6	8.2

¹⁾The IC₅₀ calculated as the average value of experiments at least three times.

²⁾OH: oyster hydrolysate.

³⁾OHF: oyster hydrolysate fraction.

해물을 Sephadex G-25 gel 여과를 통해 회수한 저분자 분획물로부터 ABTS 라디칼 소거능이 매우 높은 펩타이드를 분리하였다(26). 굴 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 저해 활성은 분자량 분포와 항산화 활성과의 상관관계는 없었다. Pihlanto(27)의 보고처럼 단백질의 가수분해 펩타이드의 항산화 활성은 항산화 활성 측정법에 따라 차이가 있고, 펩타이드의 항산화 활성에 대한 구조 활성 상관관계는 아직까지 완전히 이해될 수는 없으나 가수분해 효소의 기질 특이성에 따라 생성되는 아미노산 배열 및 아미노산 조성의 영향을 받는 것으로 여겨진다.

Collagenase 활성 저해능

피부주름의 발생원인 중 하나는 노화에 의한 피부 교원질 콜라겐의 결핍 때문이다. 진피의 섬유아세포에서 생성되는 콜라겐은 피부 진피를 이루고 있는 주 단백질로 피부구조와 탄력을 유지하는 역할을 하고 있다. 콜라겐은 나이가 들면서 섬유아세포의 기능 저하로 인해 생성이 감소되고, 이것을 분해하는 효소인 collagenase에 의해 분해되어 불규칙적인 구조로 변해 피부의 주름을 생성하는 것으로 알려져 있다(28). 따라서 콜라겐의 생성, 분해 정도는 피부주름 개선의 지표로 사용할 수 있다.

Adenosine은 식품의약품안전처 고시형 주름 개선 원료로 굴 가수분해물과 비교하기 위하여 함께 측정하였다(Table 3). Adenosine 5 mg/mL의 농도와 굴 가수분해물 50 mg/mL에서 collagenase 저해 활성은 비슷하였고, 굴 가수분해물 100 mg/mL의 농도에서는 81.2%의 높은 collagenase 저해 활성을 보여주었다. Adenosine 5 mg/mL는 모든 분획물 50 mg/mL에서 유의적인 차이가 보여 분획물의 높은 활성 저해능을 확인할 수 있었다. 그러나 농도에 따른 분획물 간의 상관관계는 없었다.

굴 가수분해물과 분획물의 독성

굴 가수분해물과 분획물의 피부세포에 주름 개선 효능을 확인하기 위하여 먼저 인간 피부 섬유아세포인 CCD986sk

Table 3. Collagenase inhibitory activities of oyster hydrolysate and its fractions

Sample, concentration (mg/mL)	Collagenase inhibitory activity (%)	
Adenosine	5	21.7±5.7 ^{de}
	10	17.2±10.5 ^{ef}
	50	24.3±8.3 ^{de}
	100	81.2±9.5 ^a
10,000 Da<	10	16.2±4.9 ^{ef}
	50	53.9±3.8 ^b
3,000~10,000 Da	10	15.8±9.5 ^{ef}
	50	45.3±5.8 ^{bc}
OHF ²⁾ 1,000~3,000 Da	10	14.7±1.9 ^{ef}
	50	50.5±2.7 ^{bc}
1,000 Da>	10	3.0±2.1 ^f
	50	36.0±1.9 ^{bcd}
5,000 Da>	10	8.9±4.5 ^{ef}
	50	35.7±3.3 ^{cd}

¹⁾OH: oyster hydrolysate.

²⁾OHF: oyster hydrolysate fraction.

Each results represents the mean±SD (n=3). Values not sharing the same letter (a-f) are significantly different at P<0.05.

를 통해 독성시험을 실시하였다(Table 4). 먼저 세포를 웰당 2×10³ 농도로 96 웰 플레이트에 분주하고, 24시간 동안 안정화한 후 굴 가수분해물은 최종농도가 각각 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL 및 100 µg/mL로, 굴 가수분해 분획물은 1 µg/mL, 10 µg/mL 및 50 µg/mL의 농도가 되도록 배지

Table 4. Cell toxicity of the oyster hydrolysates and its fractions

Sample, concentration (µg/mL)	Cell toxicity (%)	
Control	100.0±11.6	
OH ¹⁾	5	104.1±6.3
	10	104.9±5.1
	50	104.8±6.6
	100	99.7±5.2
10,000 Da<	1	99.9±5.2
	10	96.7±10.2
	50	98.5±2.9
3,000~10,000 Da	1	99.8±8.3
	10	99.4±6.7
	50	101.2±3.7
OHF ²⁾ 1,000~3,000 Da	1	95.6±4.6
	10	113.5±8.1
	50	112.1±7.9
1,000 Da>	1	109.8±12.2
	10	102.0±3.4
	50	106.1±7.8
5,000 Da>	1	102.6±12.3
	10	98.0±7.9
	50	104.0±9.6

¹⁾OH: oyster hydrolysate.

²⁾OHF: oyster hydrolysate fraction.

Each results represents the mean±SD (n=3).

에 혼합하여 배양하였다. 세포의 생존율은 무처리군에 대비한 시료 처리군의 흡광도의 비를 %로 표시한 결과, 모든 농도에서 독성이 나타나지 않았다.

CCD986sk를 이용한 procollagen 생성 효능

피부를 이루는 주 단백질인 콜라겐은 피부조직의 진피에 존재하는 섬유아세포에서 합성되는데, 먼저 procollagen이 합성되고 활성화 collagen은 procollagen에 결합된 C-peptide가 분해되어 형성된다. 피부 균질물을 가수분해 하여 C-peptide의 함량을 측정하면 활성화된 콜라겐 함량을 측정할 수가 있다(29).

모든 분획물에서 농도가 증가함에 따라 procollagen의 생성량이 증가하였다(Table 5). 무시료 처리군에 비해 adenosine 10 µg/mL 처리군은 유의적으로 생성량이 증가하였으며, 굴 가수분해 분획물에서는 1,000~3,000 Da에서 procollagen 생성량이 가장 높았고 다음으로는 5,000 Da 순이었다. 그렇지만 1,000 Da 미만 분획물의 procollagen 생성량은 높지 않았다. 1,000~3,000 Da과 5,000 Da 미만의 분획물에서 콜라겐의 생성률이 거의 비슷한 것에 미루어 수율 향상과 산업적인 대량 생산을 위해 5,000 Da 미만 분획물의 회수를 고려할 필요가 있다.

CCD986sk를 통한 MMP-1 저해 활성

시료 무처리 대조군과 굴 가수분해 분획물의 MMP-1의 저해 활성을 비교한 결과(Table 6), 굴 가수분해 분획물은 모든 농도에서 농도 의존적으로 MMP-1의 활성을 저해하

Table 5. Production of procollagen of oyster hydrolysate fractions

Sample, concentration (µg/mL)	Procollagen production (%)	
Control	100.0±9.5 ^a	
Adenosine	1	117.5±9.3 ^{ab}
	10	127.2±9.1 ^b
10,000 Da<	1	107.0±2.6 ^{ab}
	10	107.9±6.2 ^{ab}
	50	112.4±1.9 ^{ab}
3,000~10,000 Da	1	108.5±18.9 ^{ab}
	10	119.8±7.1 ^{ab}
	50	128.4±11.2 ^b
OHF ¹⁾ 1,000~3,000 Da	1	126.8±12.3 ^{ab}
	10	136.1±8.1 ^b
	50	142.2±4.7 ^b
1,000 Da>	1	113.8±4.1 ^{ab}
	10	115.0±7.3 ^{ab}
	50	116.1±5.3 ^{ab}
5,000 Da>	1	117.0±3.2 ^{ab}
	10	130.6±14.9 ^b
	50	140.4±6.5 ^b

¹⁾OHF: oyster hydrolysate fraction.

Each results represents the mean±SD (n=3). Values not sharing the same letter (a,b) are significantly different at P<0.05.

Table 6. Comparison of MMP-1 inhibitory activities of oyster hydrolysate fractions

Sample, concentration ($\mu\text{g/mL}$)	MMP-1 inhibitory activity (%)	
Adenosine	0.1	35.0 \pm 7.3 ^a
	1	38.8 \pm 12.4 ^a
10,000 Da<	1	11.0 \pm 2.2 ^{bc}
	10	16.8 \pm 3.7 ^{bc}
	50	17.3 \pm 7.4 ^{bc}
3,000~10,000 Da	1	4.3 \pm 1.4 ^c
	10	11.6 \pm 3.8 ^{bc}
	50	13.1 \pm 6.2 ^{bc}
OHF ¹⁾ 1,000~3,000 Da	1	8.4 \pm 2.8 ^c
	10	12.6 \pm 1.4 ^{bc}
	50	25.2 \pm 4.3 ^{ab}
1,000 Da>	1	—
	10	11.1 \pm 3.4 ^{bc}
	50	9.5 \pm 4.9 ^{bc}
5,000 Da>	1	5.7 \pm 4.9 ^c
	10	13.2 \pm 3.9 ^{bc}
	50	15.6 \pm 0.1 ^{bc}

¹⁾OHF: oyster hydrolysate fraction.

Each results represents the mean \pm SD (n=3). Values not sharing the same letter (a-c) are significantly different at $P<0.05$.

였다. Adenosine은 0.1과 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 MMP-1 활성을 저해하였고 굴 가수분해 분획물은 아데노신에 미치지 못하는 못하였으나 1,000~3,000 Da 분획물에서 농도가 증가함에 따라 저해 활성이 증가하였으며, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 가장 높은 저해 활성을 보였다. 5,000 Da 미만의 분획물에서는 MMP-1 활성 저해능이 1,000~3,000 Da 분획물보다 좋지 않았다. Procollagen 생성 효능과 MMP-1 저해 효능은 1,000~3,000 Da에서 모두 가장 높은 활성을 보여주었다.

노화에 따라 생기는 주름은 진피의 섬유아세포의 기능 저하로 기인한다. UV 조사나 외부 스트레스를 받게 되면 ERK와 c-JUN kinase의 활성이 증가하게 된다. 이로 인해 콜라겐을 분해하는 효소인 collagenase의 활성이 증가되고 procollagen 합성량이 저하되어 피부의 노화가 진행되며 주름이 생기게 된다(30). 이러한 기전 때문에 주름 개선 효능을 갖는 물질 탐색을 위해 procollagen 생성 증진 효능과 콜라겐을 분해하여 주름 형성을 유도하는 효소인 MMP-1 활성 저해능을 측정하게 된다. *Sanguisorba officinalis* 뿌리 추출물은 MMP-1의 발현을 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 40.6% 저해하였고, 추출물에서 분리한 Ziyuglycoside I은 50 μM 농도에서 procollagen type I의 생성량이 71.3% 이상 증가하였다고 보고하였다(31). 굴 유래 펩타이드 분획물은 1,000~3,000 Da의 분획물에서 약 42.2%의 활성 저해능을 보여주어 *S. officinalis* 뿌리 추출물과 비슷한 저해 활성을 보였다. Kim 등(32)은 마늘의 성분인 caffeic acid, S-allyl cysteine 및 uracil이 NF- κ B의 생성을 억제하여 MMP의 활성을 저해하고 procollagen 생성을 증진한다고 하였다.

굴 유래 펩타이드 분획물은 1,000~3,000 Da의 분획물에서 procollagen 생성 효능이 가장 높았고, 콜라겐 분해 효소인 MMP-1의 활성 저해에도 관여하기 때문에 주름 개선에 가장 효과적으로 나타났다. 또한 수율을 높이기 위해 실시한 5,000 Da 미만의 효능 실험에서는 1,000~3,000 Da의 분획물과 유사한 높은 활성을 보여 5,000 Da 미만의 분획물과 큰 차이가 없었다. 이처럼 procollagen과 MMP-1 활성 저해능은 분획물에 따라 활성 차이를 보여주었고, 이러한 차이는 분자량의 차이보다는 항산화 활성과 마찬가지로 가수분해 효소의 기질 특이성에 따라 생성되는 아미노산 배열 및 아미노산 조성의 영향을 받는 것으로 여겨진다. 즉 분자크기보다는 분획물에 함유된 procollagen 생성을 유도하는 펩타이드 혹은 MMP-1의 활성을 저해하는 펩타이드가 관여한 것으로 여겨진다(17,21).

주름 개선 소재 개발의 중요한 부분을 차지하는 소재 중 하나가 펩타이드이다. 펩타이드는 합성 펩타이드와 천연물로부터 추출한 가수분해 추출물로부터 얻을 수 있다. 생리적 활성을 가지는 합성 펩타이드로는 Cu-peptide, acetyl-peptide 그리고 palmitoyl peptides 등이 있다. 팔미토일 펩타이드는 피부조직의 재생과정에서 신호전달 물질로 관여하여 피부의 콜라겐과 글리코사미노글리칸의 합성을 촉진한다(17,21). Acetyl-peptide 중 acetyl-hexapeptide 3는 무독성의 amino-peptide로 주름 완화 및 초기 노화의 징후 완화를 위해 사용하는 물질(33)로 일시적으로 신경전달 물질의 과생성 및 배출을 억제하며 안면 근육 수축의 강도를 초기화하고 제어하는 특징을 갖고 있다. Cu-peptide는 피부재생, 세포분열을 촉진하는 성분으로 Glycyl-histidyl-lysine에 copper가 킬레이트된 펩타이드로 인체 내에서 발견된 피부세포의 성장인자로 조직을 보호하고 조직 손상에 따른 염증을 막아주는 효능(34)을 가지고 있으나 고가의 원료로 사용량에 제한을 받고 있다.

이를 대신할 수 있는 생리활성을 나타내는 천연물 유래의 펩타이드 연구로는 rice peptide와 silk protein인 sericin에 관한 것이 있다. Rice peptide(35)는 hyaluronic acid의 합성을 촉진하고 MMP의 활성을 저해하며, 누에에서 추출한 silk peptide는 MMP 효소 저해제로 작용하고 지질의 과산화를 억제하며 tyrosinase 활성을 저해한다고 하였다(36, 37). 이처럼 펩타이드가 노화 과정을 지연시키는 기능을 나타내는 데는 signal peptide, 효소의 활성을 저해하는 펩타이드, 신경전달 물질 저해 펩타이드와 운반 펩타이드로 작용을 한다고 한다(21).

굴 가수분해물과 분획물은 주름 개선 기능성 고시 원료인 아데노신보다 높은 활성은 아니지만 단일성분이 아닌 가수분해 혼합물로서 주름 개선 기능성 소재 개발의 가능성을 확인하였다. 굴 가수분해물 분획물은 천연물 유래의 펩타이드 혼합물로 기능적 효능을 나타내는 유효성분 펩타이드의 구조에 대한 연구와 작용기전에 대한 연구가 진행되어야만 한다. 더불어 화장품 소재로 개발하기 위해서는 굴 가수분해

물의 경피 흡수율을 높이기 위한 연구도 진행되어야만 할 것이다.

요 약

해양생물 유래 피부건강 기능성의 소재를 발굴할 목적으로 굴 단백질을 Protamex와 Neutrase로 가수분해 한 후 생성된 굴 가수분해물 펩타이드의 주름 개선 효과를 조사하였다. 굴 가수분해물은 약 7.9%의 유리아미노산을 포함하며 urea, taurine, alanine, glycine 등의 아미노산의 함량이 높았다. 굴 가수분해물은 collagenase 저해 활성을 가지고 있었고, 피부세포인 CCD986sk에 대한 독성은 없었다. 분획물의 수율은 1,000 Da 미만이 40%였으며, 5,000 Da 미만이 60.4%를 차지하였다. 1,000~3,000 Da인 분획물이 항산화 활성, procollagen의 생성능 및 MMP-1 효소 저해 활성이 가장 높았다. 굴 가수분해물과 5,000 Da 미만의 분획물은 주름 개선을 위한 피부건강 기능성 소재로서 화장품 등의 제품에 응용 가능성을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 해양수산부의 재원으로 해양생명공학기술개발사업(PJT200671) 연구개발비 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Aneiros A, Garateix A. 2004. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *J Chromatogr B* 803: 41-53.
2. Kim SK, Jeon YJ, Byun HG, Park PJ, Kim GH, Choi YR, Lee YS. 1999. Calcium absorption acceleration effect on phosphorylated and nonphosphorylated peptides from hoki (*Johnius belengeri*) frame. *J Korean Fish Soc* 32: 713-717.
3. Pomponi SA. 1999. The bioprocess - technological potential of the sea. *J Biotechnol* 70: 5-13.
4. Kim SK, Mendisa E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts - a review. *Food Res Int* 39: 383-393.
5. Kim SK, Ravichandran YD, Khan SB, Kim YT. 2008. Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. *Biotechnol Bioprocess Eng* 13: 511-523.
6. Lahl WJ, Braun SD. 1994. Enzymatic production of protein by hydrolysates for food use. *Food Technol* 48: 68-71.
7. Pihlanto-Leppälä A. 2000. Bioactive peptides derived from bovine proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol* 11: 347-356.
8. Gibbs BF, Zougman A, Masse R, Mulligan C. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res Int* 37: 123-131.
9. Suarez-Jimenez GM, Burgos-Hernandez A, Ezquerro-Brauer JM. 2012. Bioactive peptides and decapeptides with anticancer potential: sources from marine animals. *Mar Drugs* 10: 963-986.
10. Hamann MT, Otto CS, Scheuer PJ. 1996. Kahalalides: Bioactive peptides from a marine mollusk *Elysia rufescens* and

- its algal diet *Bryopsis* sp. (1). *J Org Chem* 61: 6594-6600.
11. Wilhelm KP, Cua AB, Maibach HI. 1991. Skin aging; Effect on transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and casual sebum content. *Arch Dermatol* 127: 1806-1809.
12. Rawlings AV, Harding CR. 2004. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 17(suppl 1): 43-48.
13. You TJ. 1993. *Source book of food*. Seo-Woo, Seoul, Korea. p 60.
14. Choi JD, Hwang SM, Kang JY, Kim SH, Kim JG, Oh KS. 2012. Food components characteristic of oysters produced in Korea. *J Agri & Life Sci* 46: 105-115.
15. Jung IK, Kim HS, Kang KT, Choi YJ, Choi JD, Kim JS, Heu MS. 2006. Preparation and functional properties of enzymatic oyster hydrolysates. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 919-925.
16. Förster M, Bolzinger MA, Fessi H, Briançon S. 2009. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. *Eur J Dermatol* 19: 309-323.
17. Robinson LR, Fitzgerald NC, Doughty DG, Dawes NC, Berge CA, Bissett DL. 2005. Topical palmitoyl pentapeptide provides improvement in photoaged human facial skin. *Int J Cosmet Sci* 27: 155-160.
18. Hur SI, Park SH, Lee SS, Choung SY, Choi YJ. 2013. Antioxidative effect of oyster hydrolysate on the serum and hepatic homogenate in SD-rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1940-1948.
19. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr Lewis A, Randall RJ. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 256-275.
21. Gorouhi F, Maibach HI. 2009. Review article: Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *Int J Cosmet Sci* 31: 327-345.
22. Marty JP. 2002. NMF and cosmetology of cutaneous hydration. *Ann Dermatol Venereol* 129: 131-136.
23. Spier HW, Pascher G. 1956. Analytical and functional physiology of the skin surface. *Hautarzt* 7: 55-60.
24. Bornstein P, Piez KA. 1964. A biochemical study of human skin collagen and the relation between intra- and intermolecular cross-linking. *J Clin Invest* 43: 1813-1823.
25. Mendis E, Rajapakse N, Kim SK. 2005. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem* 53: 581-587.
26. Ma Y, Xiong YL, Zhai J, Zhu H, Dziubla T. 2010. Fractionation and evaluation of radical-scavenging peptides from *in vitro* digests of buckwheat protein. *Food Chem* 118: 582-588.
27. Pihlanto A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int Dairy J* 16: 1306-1314.
28. Park SH, Hong Y, Choi YJ, Choi JH, Kim BK. 2008. Anti-wrinkle effects of mugwort (*Artemisia vulgaris*) extracts on UVB-irradiated hairless mouse skin. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1136-1141.
29. Krupsky M, Fine A, Berk JL, Goldstein RH. 1994. Retinoic acid-induced inhibition of type I collagen gene expression by human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1219: 335-341.
30. Zague V, de Freitas V, da Costa Rosa M, de Castro GÁ,

- Jaeger RG, Machado-Santelli GM. 2011. Collagen hydrolysate intake increases skin collagen expression and suppresses matrix metalloproteinase 2 activity. *J Med Food* 14: 618-624.
31. Kim YH, Chung CB, Kim JG, Ko KI, Park SH, Kim JH, Eom SY, Kim YS, Hwang YI, Kim KH. 2008. Anti-wrinkle activity of ziyuglycoside I isolated from a *Sanguisorba officinalis* root extract and its application as a cosmeceutical ingredient. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 303-311.
32. Kim SR, Jung YR, An HJ, Kim DH, Jang EJ, Choi YJ, Moon KM, Park MH, Park CH, Chung KW, Bae HR, Choi YW, Kim ND, Chung HY. 2013. Anti-wrinkle and anti-inflammatory effects of active garlic components and the inhibition of MMPs via NF- κ B signaling. *PLoS One* 8: e73877.
33. Fields K, Falla TJ, Rodan K, Bush L. 2009. Bioactive peptides: signaling the future. *J Cosmet Dermatol* 8: 8-13.
34. Buffoni F, Pino R, Dal Pozzo A. 1995. Effect of tripeptide-copper complexes on the process of skin wound healing and on cultured fibroblasts. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 330: 345-360.
35. Sim GS, Lee DH, Kim JH, An SK, Choe TB, Kwon TJ, Pyo HB, Lee BC. 2007. Black rice (*Oryza sativa* L. var. japonica) hydrolyzed peptides induce expression of hyaluronan synthase 2 gene in HaCaT keratinocytes. *J Microbiol Biotechnol* 17: 271-279.
36. Padamwar MN, Pawar AP, Daithankar AV, Mahadik KR. 2005. Silk sericin as a moisturizer: an in vivo study. *J Cosmet Dermatol* 4: 250-257.
37. Daithankar AV, Padamwar MN, Pisal SS, Paradkar AR, Mahadik KR. 2005. Moisturizing efficiency of silk protein hydrolysate: Silk fibroin. *Indian J Biotechnol* 4: 115-121.