

# 연육 제조과정에서 발생하는 어피 부산물의 활용을 위한 Cosmeceutical 활성 평가

오재영<sup>1</sup> · 이효근<sup>2</sup> · 제준건<sup>2</sup> · 왕뢰<sup>3</sup> · 김현수<sup>4</sup> · 전유진<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 수산생명의학과, <sup>2</sup>제주대학교 해양생명과학과, <sup>3</sup>제주대학교 해양과학연구소, <sup>4</sup>국립해양생물자원관 유전자원실

## Evaluation of Cosmeceutical Properties of Fish Skin By-product Hydrolysates Collected During Surimi Manufacturing Process

Jae-Young Oh<sup>1</sup>, Hyo-Geun Lee<sup>2</sup>, Jun-Geon Je<sup>2</sup>, Lei Wang<sup>3</sup>, Hyun-Soo Kim<sup>4</sup> and You-Jin Jeon<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Aquatic Life Medicine, Jeju National University, Jeju, 63243, Korea

<sup>2</sup>Department of Marine Life Science, Jeju National University, Jeju, 63243, Korea

<sup>3</sup>Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju, 63243, Korea

<sup>4</sup>Department of Genetic Resources Research, National Marine Biodiversity Institute of Korea, Seocheon, 33662, Korea

This study investigated the cosmetic effects of enzymatic hydrolytes of an aquatic by-product, fish skin. The skins of olive flounder *Paralichthys olivaceus* (PO) and Alaska pollock *Gadus chalcogrammus* (AP) were hydrolyzed using pepsin, Alcalase, and Protamax. Three enzymatic hydrolytes were obtained and the inhibitory effects of these hydrolytes on the aging-related enzymes tyrosinase, elastase, and collagenase were determined. The results indicated that the pepsin hydrolytes of PO and PA had stronger activities than the other hydrolytes. PO and PA also significantly reduced the intracellular reactive oxygen species levels in and improved the viability of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated Vero cells; decreased nitric oxide production by and increased the cell viability of lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells; and reduced intracellular reactive oxygen species levels and improved the viability of ultraviolet B irradiated HaCaT cells and human dermal fibroblasts. Furthermore, PO and PA remarkably reduced the intra- and extracellular melanin contents of alpha-melanocyte-stimulating hormone-stimulated B16F10 cells. These results demonstrate that PO and PA have potential for use in the cosmetic industry.

Keywords: Enzymatic hydrolysate, Fishery by-products, Cosmetic, *Paralichthys olivaceus*, *Gadus chalcogrammus*

### 서론

연육이란 어류의 머리, 뼈, 껍질 등을 제거한 후, 어육만을 마쇄하고 수세하는 공정을 거쳐 근원섬유단백질만을 동결변성방지제와 혼합한 것으로 어묵, 맛살, 소시지 등 다양한 연제품의 원료로 사용되고 있다(Park and Morrissey, 2000). 최근에는 다양한 어류를 이용한 연육 소재 개발 연구가 활발히 진행되고 있으며(Park and Morrissey, 2000; Chaijan et al., 2004; Luo et al., 2008; Chae et al., 2014), 지역 특산 어류의 소비를 활성화 시키기 위하여 지역적 대표성을 갖는 어종을 이용한 연육 개발 연구도 진행되고 있다(Heu et al., 2010; Kim et al., 2014;

Gao et al., 2016; Oh et al., 2019). 하지만 연육을 생산하는 공정 중 원물의 65%가 부산물로 발생되고 있으며(Kim and Park, 2004), 2017년 세계 연육 생산량이 82만 톤을 기록한 것을 바탕으로(Future Seafood, 2018) 연육 부산물 발생량은 약 151만 톤으로 추정된다. 이러한 연육 가공 부산물은 대부분 어분이나 비료로 사용되거나 폐기되어 환경오염을 초래하고 있다(Kim and Park, 2004). 어류 가공 시 발생하는 부산물 중 뼈와 껍질은 약 30% 이상 발생하며 이들은 다량의 콜라겐을 함유하고 있어 광우병과 구제역과 같은 문제가 있는 육상동물 유래 콜라겐 대체 소재로 평가된다(Shahidi, 1994; Sadowska et al., 2003), 현재까지 어피를 이용하여 콜라겐 추출 및 이들의 분

\*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3475 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: youjin2014@gmail.com



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

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0297>

Korean J Fish Aquat Sci 53(3), 297-307, June 2020

Received 25 March 2020; Revised 21 April 2020; Accepted 9 June 2020

저자적위: 오재영(연구원), 이효근(대학원생), 제준건(대학원생), 왕뢰(연구원), 김현수(연구원), 전유진(교수)

자적 특성연구들이 진행되었으며(Sadowska et al., 2003; Kit-tiphattanabawon et al., 2005; Nalinanon et al., 2007), 어피 유래 콜라겐들의 다양한 생리활성들에 관한 연구들도 보고되었다(Jia et al., 2010; Gu et al., 2011; Baehaki et al., 2015). 또한 어피 유래 콜라겐의 화장품 소재로 사용 확대를 위하여 미백, 보습 피부기능성 소재 연구도 보고되고 있다(Wood et al., 2008; Hayashi et al., 2011; Hou et al., 2011; Hou et al., 2012). 이 연구에서는 최근 제주지역에서 생산되고 있는 광어(*Paralichthys olivaceus*) 연육의 부산물인 광어 어피와 북미에서 주로 생산되고 있는 명태(*Gadus chalcogrammus*) 연육의 부산물인 명태 어피를 단백질 분해효소로 가수분해하고 이들의 화장품 소재로서 가능성을 확인하기 위하여 항산화, 항염증, 미백, 주름억제 효능을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 시약 및 재료

본 실험에서 사용된 광어 어피와 명태 어피는 탐나씨푸드 영 어조합법인(Jeju, Korea)으로부터 제공받았고, 이를 세척하여 혈액, 뼈 그리고 협잡물을 제거하고 껍질만 분리하여 동결 건조 후 사용하였다. 효소가수분해에 사용된 alcalase와 protamex는 Novozyme Co. (Bagsvard, Denmark)에서 구매하였고, pepsin, mushroom tyrosinase, (-) - Epigallocatechin gallate (EGCG), arbutin, dimethyl sulfoxide (DMSO), N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide, Elastase from porcine pancreas, Azo dye-impregnated collagen, collagenase, 3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), Lipopolysaccharides (LPS), 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), alpha-melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), Hydrogen peroxide solution ( $H_2O_2$ ),  $1 \times$  phosphate buffered saline (PBS)는 sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) medium, Ham's Nutrient Mixtures medium (F-12), penicillin/streptomycin, fetal bovine serum (FBS)는 Gibco BRL (Life Technologies, Burlington, ON, Canada)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 기타 시약은 분석용 등급의 시약을 사용하였다.

### 어피 가수분해물 제조

동결건조된 어피를  $0.5 \times 0.5$  cm 이하의 크기로 분쇄 후, 시료 대비 1%의 비율로 효소를 첨가하여 효소 별 최적조건에서 24 시간동안 가수분해하였으며, 효소가수분해물은 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 감압여과 하였고, 여과된 가수분해물들은  $100^\circ\text{C}$ 의 항온수조에서 15분동안 불활성화를 진행하였다. 이 후 가수분해물들은 동결건조 후 분말화하여 실험

에 사용하였다. 실험에 사용된 시료의 약어는 광어 어피 pepsin 가수분해물(PO), 광어 어피 alcalase 가수분해물(PA), 광어 어피 protamex 가수분해물(PTO), 명태 어피 pepsin 가수분해물(PA), 명태 어피 alcalase 가수분해물(AA), 명태 어피 protamex 가수분해물(PTA)과 같다.

### Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase 저해 활성은 Heo et al. (2009)의 방법을 이용하여 측정하였다. 96 well plate에  $40 \mu\text{L}$ 의  $1.5 \text{ mM}$  tyrosinase와  $140 \mu\text{L}$ 의  $50 \text{ mM}$  phosphate buffer (pH 6.5)를 취한 후,  $10 \mu\text{L}$ 의 mushroom tyrosinase ( $1000 \text{ units/mL}$ )을 처리하였다. 이후  $10 \mu\text{L}$ 의 시료를 처리한 뒤  $37^\circ\text{C}$ 에서 12분간 반응 후  $5^\circ\text{C}$ 에서 5분간 방치시켜 효소반응을 정지시킨 후 microplate reader (BioTek Synergy HT, Woburn, MA, USA)를 이용하여  $490 \text{ nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다.

### Elastase 저해 활성

Elastase 저해 활성은 Kraunsoe et al. (1996)의 방법을 따라 측정하였다.  $50 \mu\text{L}$ 의 시료와  $650 \mu\text{L}$ 의  $1.015 \text{ mM}$  N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (dissolved in Tris-HCl, pH 8.0)을 혼합하며  $25^\circ\text{C}$ 에서 10분간 반응시켰다. 반응 후  $50 \mu\text{L}$ 의 elastase solution ( $0.0375 \text{ units/mL}$ )을 처리하여  $25^\circ\text{C}$ 에서 10분간 반응 후 microplate reader를 이용하여  $410 \text{ nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다.

### Collagenase 저해 활성

Collagenase 저해 활성은 Wang et al. (2018a)의 방법을 따라 측정하였다.  $1 \text{ mg}$ 의 azo dye-impregnated collagen을  $800 \mu\text{L}$ 의  $0.1 \text{ M}$  Tris-HCl (pH 7.0)에 녹인 뒤  $100 \mu\text{L}$ 의 collagenase solution ( $200 \text{ unit/mL}$ )과  $100 \mu\text{L}$ 의 시료를 혼합하였고  $43^\circ\text{C}$ 에서 1시간동안 교반하며 반응시켰다. 반응 후 microplate reader를 이용하여  $410 \text{ nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포 배양

Monkey kidney fibroblast cell (Vero cell)은 한국세포주은행(Korean cell line bank, KCLB, Seoul, Korea) 10% FBS, 1% antibiotic을 포함하는 RPMI 배지를 사용하여 배양하였고, Murine macrophage cell line (RAW 264.7)과 HaCaT은 KCLB에서, B16F10 mouse melanoma cells (ATCC® CRL-6475™)은 ATCC (American type culture collection; Manassas, VA, USA)에서 구매하여, 10% FBS, 1% antibiotic를 함유한 DMEM 배지에 배양하였다. Human dermal fibroblast cell (HDF; ATCC® PCS20101™)은 ATCC에서 구매하였으며, DMEM과 F-12를 3:1 비율로 혼합한 후, 10% FBS, 1% antibiotic를 첨가하여 배양에 사용하였다. 세포들은  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator (Sanyo MCO-18AIC  $\text{CO}_2$  Incubator, Moriguchi, Japan) 세포상태에 따라 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

**산화적 스트레스가 유도된 세포보호효과**

Vero cell에서 산화적 스트레스를 유도 후 세포 생존율을 측정은 Wang et al. (2018b)의 방법을 이용하여 평가하였다. 배양된 Vero cell을  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주하고, 16시간 뒤 시료들을 농도 별로 처리한 후, 2시간 뒤 산화스트레스 유도물질(10 mM AAPH, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 10 µL 처리하여 37°C의 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 MTT solution (2 mg/mL)을 50 µL씩 처리한 뒤 3시간 배양하였고, 상층액을 제거하고 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 이용하여 침전물을 녹인 뒤 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Reactive oxygen species (ROS) 생성 억제 활성**

산화적 스트레스에 의해 세포에서 생성되는 ROS 양의 변화를 측정하기 위하여 Vero cell을  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 incubator에서 24시간 배양하여 시료를 농도별로 처리하였다. 30분 처리 후 산화스트레스 유도물질(10 mM AAPH, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 처리하였고, incubator에서 30분간 반응시킨 뒤 0.05% DCFH-DA를 10 µL 처리하고 10분간 반응시킨 후 fluorescence microplate reader를 이용하여 excitation 파장 485nm, emission 파장 535nm에서 측정하였다.

**Nitric oxide (NO) 생성 저해 활성**

NO 생성 저해 활성 평가는 Kim et al. (2013)의 방법을 따라 RAW 264.7 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 16시간 뒤 시료를 처리한 후, 1시간 뒤에 LPS (1 µg/mL)를 처리하여 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 이 후 각 well의 배양액 100 µL와 griess 시약 100 µL를 혼합한 뒤 상온에서 10분 동안 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Ultraviolet B (UVB) 조사에 의한 ROS 생성 저해 활성**

HaCaT cell과 HDF cell을 48 well plate에  $4 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 24시간 배양 후 FBS를 첨가하지 않은 배지로 교환하여 24시간 동안 배양하였다. 시료를 처리하고 12시간 후 배지를 제거하고 PBS로 세척하였고, 그 후 PBS 200 µL를 각 well에 분주 후 UVB meter (UV Lamp, VL-6LM, Vilber Lourmat, France)로 UVB를 30, 50 mJ/cm<sup>2</sup>로 조사하였다. UVB 조사 후 PBS를 제거하고 배지로 교환한 후 시료를 처리하였다. 배양 후 MTT solution (2 mg/mL)을 50 µL씩 처리한 뒤 3시간 배양하였고, 상층액을 제거하고 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 이용하여 침전물을 녹인 뒤 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Ultraviolet B (UVB) 조사 후 콜라겐 합성량 및 Matrix metalloproteinase (MMP)-1 발현 억제 활성 측정**

48 well plate에 HDF cell을  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 24

시간 배양하였고, FBS가 포함되지 않은 배지로 교체한 후 시료를 처리하였다. 2시간 후 UVB를 50 mJ/cm<sup>2</sup> 조사하였고, 48시간 동안 배양하였다. 이후 배양액을 취하여 procollagen type I protein synthesis kit (TaKaRa Bio, Kusatsu, Japan)를 이용하여 콜라겐 전구체의 C-말단의 양을 측정하였고, MMP 1 Elisa kit (GE Healthcare Life Sciences, Exeter, Devon, UK)를 이용하여 MMP-1 발현량 변화를 측정하였다.

**Melanin 생성 억제 활성**

B16F10세포에서 세포 외 melanin 함량 측정을 위하여  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 24시간 배양 후 50 nM의 α-MSH (Melanocyte stimulating hormone)와 시료를 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 이 후 배지를 회수하여 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 96 well plate에 옮겨 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 내 melanin 함량 측정을 위하여 배양된 세포는 배지를 제거하고 PBS로 수세 후 500 rpm에서 5분 동안 원심분리 하였고 10% DMSO가 첨가된 1N NaOH용액을 첨가하여 80°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**통계분석**

실험결과와 통계분석은 각 시료에 대한 평균±표준편차로 나타내었고, SPSS Version 14 program을 사용하여 Oneway ANOVA-test를 실시하였다. 항목들 간의 유의성 검증은 Turkey's test에 의해 P<0.01, 0.05, 0.1에서 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**효소 별 어피 가수분해물의 Tyrosinase 저해 활성**

Alcalase와 protamex는 대표적인 산업용 단백질 분해 효소로 널리 사용되고 있으며, 어류 및 이의 부산물을 가수분해하기 위하여 사용되고 있다(Herpandi et al., 2012). 또한 펩신은 콜라겐 가수분해물의 telopeptide 부분을 절단하여 콜라겐의 수율을 증가시킨다고 알려져 있어 펩신을 이용한 콜라겐 생산방법에 관

Table 1. Optimum digestion conditions as per each enzyme used and relevant abbreviations.

Species	Enzyme	Optimum condition		Abbreviation
		pH	Temperature (°C)	
Olive flounder	Pepsin	2.0	37	PO
<i>Paralichthys olivaceus</i> skin	Alcalase	8.0	50	AO
	Protamex	6.0	40	PTO
Alaska pollack	Pepsin	2.0	37	PA
<i>Gadus chalcogrammus</i> skin	Alcalase	8.0	50	AA
	Protamex	6.0	40	PTA

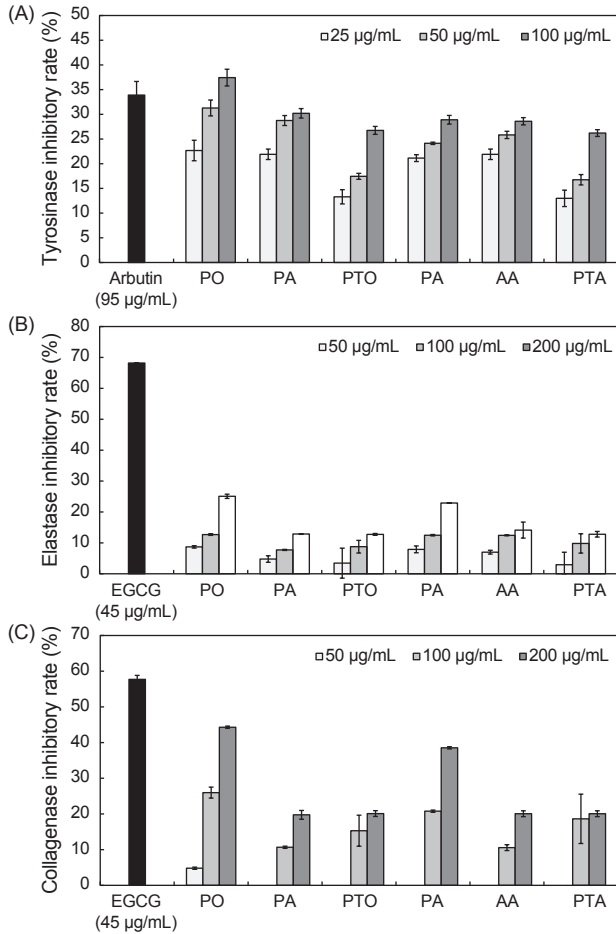


Fig. 1. Fish skin hydrolysates inhibits commercial tyrosinase, elastase, and collagenase. The inhibitory effects of fish skin hydrolysates on (A) tyrosinase activity; (B) elastase activity; and (C) collagenase activity. The experiments were conducted in triplicate, and the data are expressed as the means±standard error (SE).

한 많은 연구가 보고된 바 있다(Nagai and Suzuki, 2002; Jongjareonrak et al., 2005). 따라서 향후 광어와 명태 어피 유래 콜라겐의 산업적 활용을 위하여 alcalase, protamex 그리고 pepsin을 이용하여 어피를 가수분해하였고, 연구를 진행하였다.

건조 후 분쇄한 광어, 명태 어피를 pepsin, alcalase, protamex 효소를 이용하여 최적의 온도와 pH 조건에서 24시간 동안 가수분해하였으며 최적조건과 효소 별 어피 가수분해물 시료명은 Table 1에 나타내었다. Tyrosinase는 색소세포 내에서 자동산화반응에 의하여 멜라닌 생성에 관여하는 효소이며 자외선 및 산화반응에 의하여 활성화되면 색소침착을 일으킨다고 알려져 있다(Hearing and Jiménez, 1987; Prota, 2012). 이와 같이 tyrosinase 저해 활성 소재는 피부미백 소재로 사용될 수 있어 많은 연구가 진행되고 있다. 어피 가수분해물들의 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과는 Fig. 1A에 나타내었고, 양성대조군

으로 95 µg/mL의 arbutin과 비교하였다. 가수분해물들은 모두 농도의존적으로 tyrosinase 저해 활성이 증가하는 것으로 나타났다으며, 100 µg/mL의 PO를 처리하였을 때 37.43%의 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다. PA와 PTO는 100 µg/mL의 농도에서 각각 30.20%와 26.74%의 저해 활성을 나타내었다. 명태 어피 가수분해물의 100 µg/mL의 농도에서 각각 28.90%, 28.59%, 26.21% (PA, AA, PTA)로 PA와 AA가 유사한 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 해양생물 유래의 흑해삼 유래 콜라겐(Abdillah et al., 2017), 불가사리 유래 효소가수분해물(Park et al., 2005) 오징어 유래 콜라겐(Kwon et al., 2008) 등 다양한 소재를 활용하여 tyrosinase 저해 활성 연구가 진행되었다. Kim et al. (2009)에 따르면 pepsin 가용성 상어껍질 콜라겐과 pepsin 가용성 상어육조직 콜라겐의 tyrosinase 저해 활성은 100 µg/mL의 농도에서 10.33%와 11.07%의 저해율을 나타내었고, Nakchum and Kim (2016)의 연구에 따르면 오징어 껍질 콜라겐 가수분해물의 저분자 분획물은 1 mg/mL의 농도에서 39.65%의 tyrosinase 저해 활성을 나타내어 광어와 명태 어피 효소가수분해물이 우수한 tyrosinase 저해 활성을 나타내는 것으로 판단된다.

### 효소 별 어피 가수분해물의 elastase와 collagenase 저해 활성

Elastase는 피부의 진피조직에서 그물망구조를 형성하여 피부탄력에 관여하는 elastin과 collagen 단백질을 분해하는 효소로 피부의 주름 생성과 탄력 감소를 유발한다고 알려져 있다(Imokawa et al., 1995). 또한 collagenase는 collagen을 특이적으로 분해시키는 효소로서 피부탄력을 떨어뜨린다고 보고되었다(Nagase, 1996). 효소 별 어피 가수분해물들의 elastase 저해 활성을 평가한 결과는 Fig. 1B에 나타내었으며, 양성대조군으로 45 µg/mL의 EGCG를 사용하였다. 가수분해물 모두 농도의존적으로 저해 활성이 높아지는 경향을 보였으며, 특히 pepsin 가수분해물인 PO와 PA의 가장 높은 농도인 200 µg/mL에서 25.06%와 22.90%의 저해 활성을 나타내었다. 하지만 양성대조군인 EGCG의 저해율 68.19% 보다는 낮은 결과를 보였다. PA, PTO, AA, PTA에서는 모두 최고 농도인 200 µg/mL에서 15% 이상 저해 활성을 보이지 않았다. 어피 가수분해물들의 collagenase 저해 활성은 Fig. 1C에 나타내었으며, 광어 어피 가수분해물 중에서는 PO, 명태 어피 가수분해물 중에서는 PA가 200 µg/mL의 농도에서 44.30%와 38.53%의 저해율을 나타내어 우수한 활성을 나타내었다. pepsin 가용성 상어껍질 콜라겐과 pepsin 가용성 상어육조직 콜라겐의 elastase 저해 활성(Kim et al., 2009)은 0.5 mg/mL의 농도에서 51.11%와 13.33%로 광어와 명태 어피의 pepsin 가수분해물이 우수한 저해활성을 나타내는 것으로 확인되었다. Tyrosinase, elastase, collagenase의 효소 저해활성 확인 결과 광어와 명태 어피 가수분해물 중 pepsin 가수분해물이 우수한 효소저해활성이 확인되어 PA와

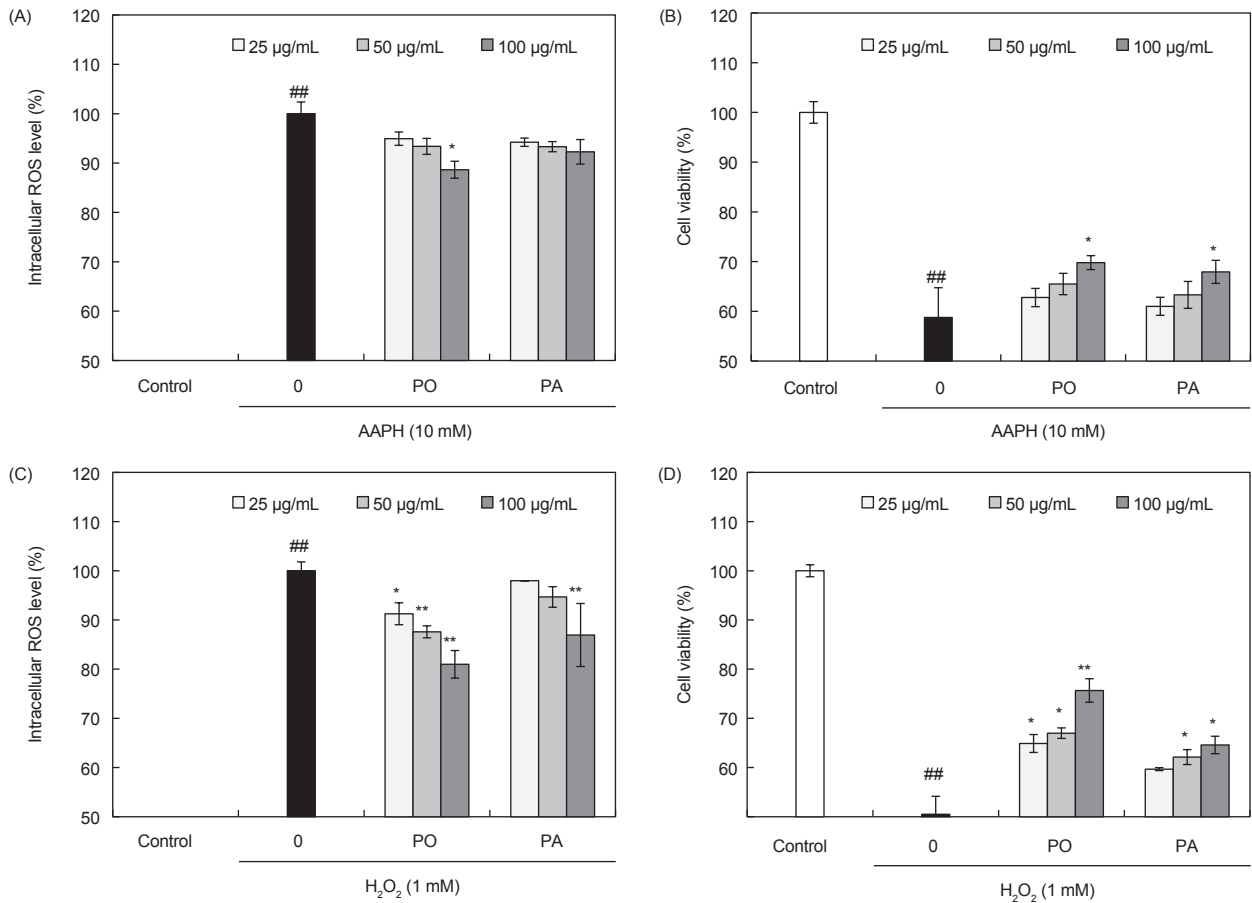


Fig. 2. Protective effects of pepsin hydrolysates of olive flounder skin (PO) and alaska pollack skin (PA) against AAPH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in Vero cells. Cells were treated with PO and PA at 25, 50, and 100 µg/mL for 1 h and then AAPH or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 or 1 mM) was added for 24 h. (A), (C) The intracellular ROS level was measured by DCF-DA assay and (B), (D) the cell viability was measured by MTT assay. The experiments were conducted triplicate, and the data were expressed as the mean±SE. ##P<0.01 compare with control group; \*P<0.05, \*\*P<0.01 compare with stimulated group.

AA를 선택하여 추후 실험을 진행하였다.

### AAPH와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스로부터 세포 보호효과 및 ROS 소거 활성

광어와 명태 어피의 항산화 활성을 측정하기 위하여 정상세포인 vero cell에서 산화적 스트레스를 유도하여 PO와 PA의 항산화 활성을 평가하였고, 그 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 산화적 스트레스 유도물질을 AAPH로 세포의 ROS를 유도시켰을 때 PO의 농도가 증가할 수록 ROS를 감소시켰으나 농도인 100 µg/mL에서만 유의적으로 ROS 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). PA를 25, 50, 100 µg/mL 농도로 처리를 하였을 때에는 유의적인 ROS 생성 억제 활성은 나타나지 않았다. AAPH를 처리하고 PO와 PA에 의한 세포생존율의 변화를 측정하였고, PO와 PA의 100 µg/mL 농도에서 유의적으로 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 다음으로 산화

적 스트레스 유도물질을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 처리하였을 때의 PO와 PA의 ROS 생성 변화를 측정하였다(Fig. 2C). PO의 경우 농도의존적으로 ROS 생성이 유의적으로 억제되는 경향을 보였으며, 100 µg/mL을 처리하였을 때 ROS양이 약 19% 감소하였다. PA의 경우 25 µg/mL와 50 µg/mL에서는 유의적인 활성은 나타나지 않았지만 100 µg/mL의 농도에서는 유의적으로 ROS 생성이 억제되는 것을 확인하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 처리 후 PO와 PA에 의한 세포 생존율 변화를 측정한 결과 PO와 PA 모두 농도의존적으로 유의적인 생존율 증가를 확인할 수 있었고, 100 µg/mL의 PO를 처리하였을 때 75.66%의 세포생존율이 확인되었으며, 100 µg/mL의 PA를 처리하였을 때 64.58%의 생존율을 나타내었다(Fig. 2D). 따라서 PO는 ROS를 감소시킴으로써 세포 보호 효과를 증가시키는 것으로 확인되며 더 우수한 항산화 활성을 갖고 있다고 판단된다. 이전 연구에서 오징어 껍질 콜라겐 가수분해물(Giménez et al., 2009), 날새기 껍질 콜라겐 가수분해

물(Yang et al., 2008), 티라피아 껍질 콜라겐 가수분해물(Yang et al., 2009) 등의 껍질 가수분해물의 항산화 활성이 보고된 바 있으며, ROS의 과생성은 피부 조직 내의 단백질 산화, 콜라겐과 엘라스틴의 구조를 붕괴, 멜라닌의 생성을 촉진시켜 주름과 기미 등의 피부노화를 발생시킨다고 보고 된 바 있다(Davies, 1987; Foote, 2012). 따라서 어피 가수분해물의 효과적인 ROS 생성 억제 활성과 세포보호 효과로 인하여 피부에서의 미백활성과 주름억제 활성을 기대할 수 있을 것이라 판단된다.

### LPS로 유도된 Raw264.7 세포에서 어피 가수분해물의 항염증 활성

NO는 체내에서 신호 전달, 혈관 확장, 방어 기전 등의 역할을 하기도 하지만, 과생성 되었을 시 염증반응을 일으켜 피부 염증질환을 일으키거나, 조직 손상에 영향을 미치는 인자이다(Ohshima et al., 1990; Deliconstantinos et al., 1996; Liang et al., 1999). RAW 264.7 cell에서 LPS로 NO를 유도시킨 후 PO와 PA의 항염증 활성을 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다. LPS를 단독 처리하였을 때 발생하는 NO 생성량을 100%로 두었고, PO와 PA를 처리하였을 때 모두 유의적인 NO 저해 활성을 나타내었다(Fig. 3A). PO를 25, 50, 100 µg/mL의 농도에서 각각 90.98%, 70.05%, 71.24%의 NO 생성량으로 농도의존적인 NO 억제 활성을 확인할 수 있었으며, PA를 25, 50, 100 µg/mL 처리하였을 때 또한 84.76%, 83.86%, 70.84%로 농도가 증가할 수록 NO 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. LPS를 처리한 후 RAW 264.7 cell의 생존율이 68.24%로 감소하였지만, PO와 PA를 처리하였을 때 농도가 증가할수록 높은 세포생존율을 나타냈으며, 100 µg/mL의 농도에서 각각 79.52%와 75.14%의 생존율을 확인하였다.

### UVB로 유도된 산화적 스트레스로부터 세포보호효과 및 ROS 소거 활성

UVB는 체내에서 ROS와 NO를 생성시켜 산화적 스트레스에 의한 apoptosis를 야기 시키거나 피부 탄력 저하와 염증성 피부반응을 유발한다고 보고되었다(Soter, 1990). 또한 섬유아세포에서 UV에 의해 발생한 ROS가 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유발시키기도 한다(Deliconstantinos et al., 1996; Schatrfetter-Kochanek, 1996). 따라서 UVB 조사에 의한 PO와 PA의 세포 내 ROS 생성 억제 활성과 콜라겐 합성능의 변화, 그리고 MMP-1의 발현 억제 활성을 측정하였다(Fig. 4). HaCaT cell에 30 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB를 처리하였을 때 ROS가 발생하는 것을 확인할 수 있었고, PO와 PA를 농도별로 처리함에 따라 농도의존적으로 ROS 생성량이 감소하는 결과를 보였다(Fig. 4A). PO와 PA 모두 100 µg/mL의 농도에서 69.57%와 70.54%의 값으로 우수한 ROS소거활성을 확인하였다. 반면 UVB 조사로 인한 세포의 생존율을 측정할 결과 UVB만 단독 조사하였을 때 생존율이 50.12%까지 감소하였고, PO와 PA를

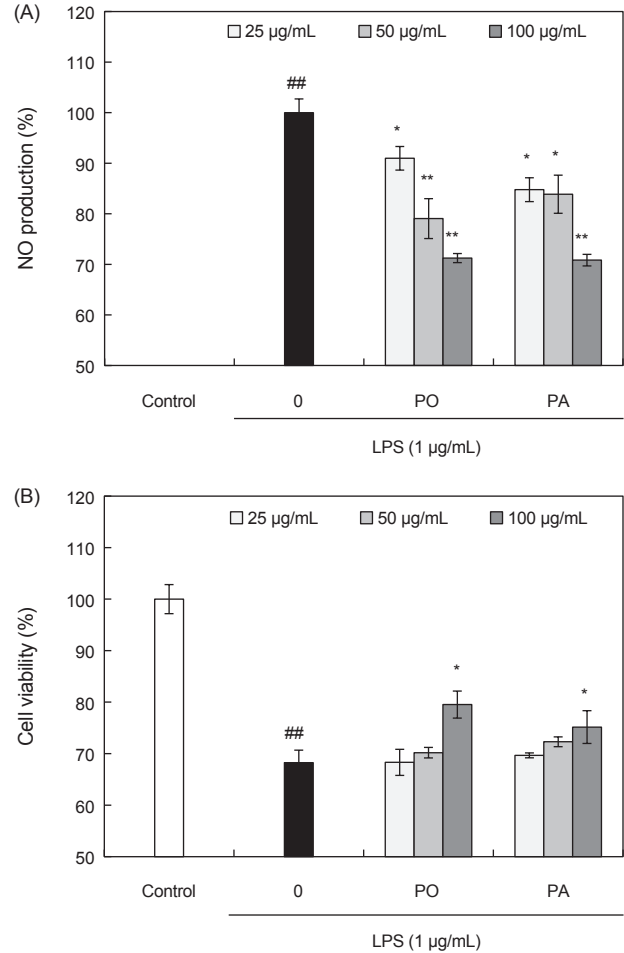


Fig. 3. Inhibitory effect of PO and PA on NO production in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. Cells were treated with PO and PA at 25, 50, and 100 µg/mL for 1 h and then LPS (1 µg/mL) was added for 24 h. (A) NO production was measured by griess reaction and (B) the cell viability was measured by MTT assay. The experiments were conducted triplicate, and the data were expressed as the mean±SE. ##P<0.01 compare with control group; \*P<0.05, \*\*P<0.01 compare with LPS group.

처리하였을 때 농도가 증가할수록 미미하게 세포생존율이 증가하였으나 유의적인 결과는 나타나지 않았다(Fig. 4B). HDF cell에는 50 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB를 조사하였고, PO와 PA를 처리하였을 때 모든 농도에서 유의적으로 ROS 생성이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 100 µg/mL의 농도에서 각각 38.89% 34.4%의 ROS 생성을 감소시킨 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4C). PO와 PA의 처리농도에서 세포 보호 효과를 나타내었으며, 특히 100 µg/mL의 PO를 처리하였을 때 유의적으로 생존율이 증가하여 100%의 생존율을 나타내었다(Fig. 4D). 따라서 PO와 PA는 UVB로 유도된 ROS를 억제시켜 세포 보호효과를 나타내는 것으로 사료된다. Procollagen 합성능 측정 결

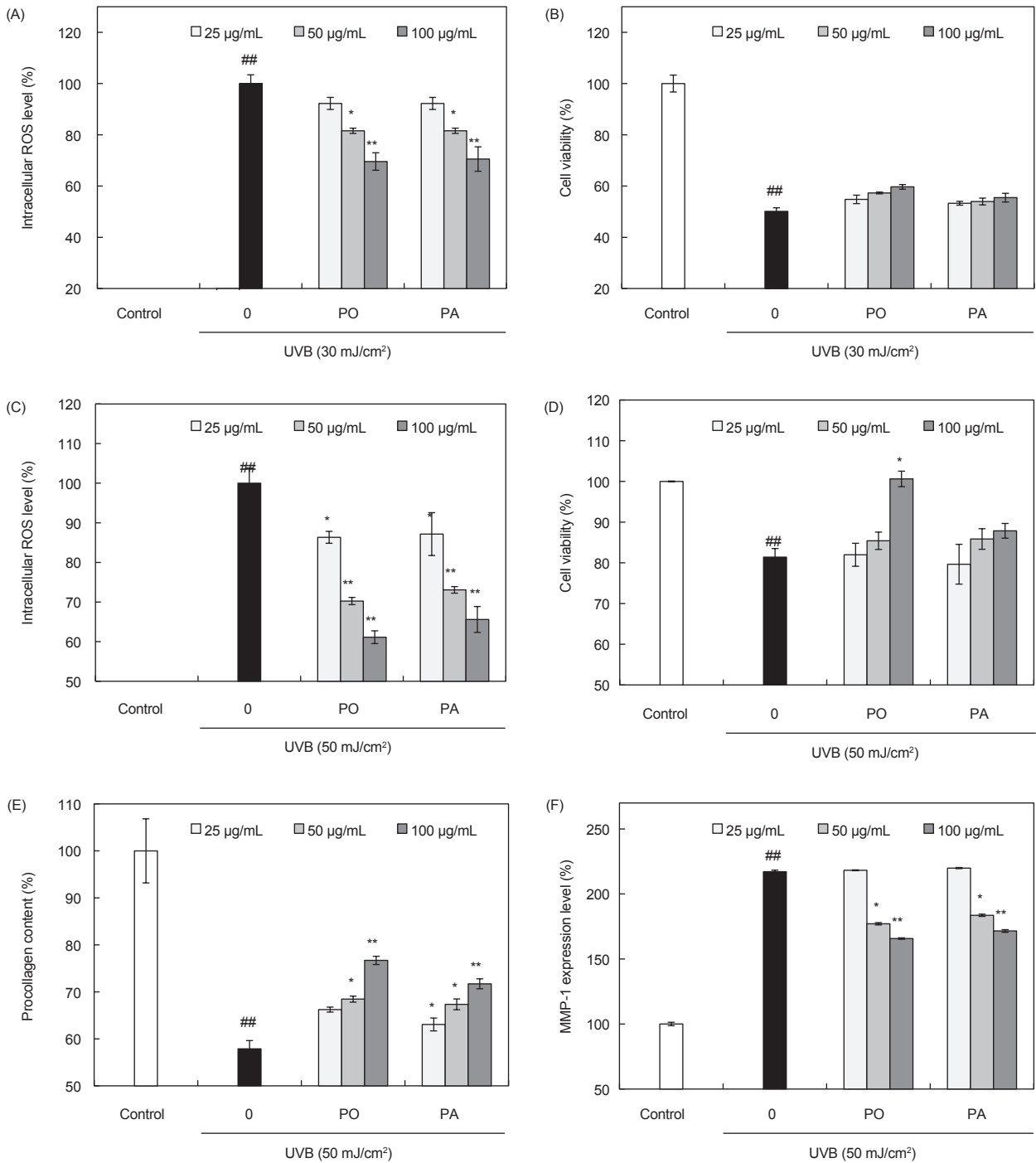


Fig. 4. Protective effects of PO and PA against UVB-induced cell damage. HaCaT cells treated with PO and PA at 25, 50, and 100 µg/mL for 12 h, followed by exposure to 30 mJ/cm<sup>2</sup> of UVB. (A) Intracellular ROS scavenging effect was measured by DCF-DA assay and (B) cell viability was measured by MTT assay. HDF cells treated with PO and PA at 25, 50, and 100 µg/mL for 12 h, followed by exposure to 50 mJ/cm<sup>2</sup> of UVB. (C) Intracellular ROS scavenging effect was measured by DCF-DA assay and (D) cell viability was measured by MTT assay. (E) Collagen synthesis level was reflected by the amounts of PIP (Procollagen Type I C-peptide), and the content of PIP and (F) MMPs were measured by the commercially ELISA kits, based on the manufacturer's instructions. The experiments were conducted triplicate, and the data were expressed as the mean±SE. ##P<0.01 compare with control group; \*P<0.05, \*\*P<0.01 compare with UVB-exposed group.

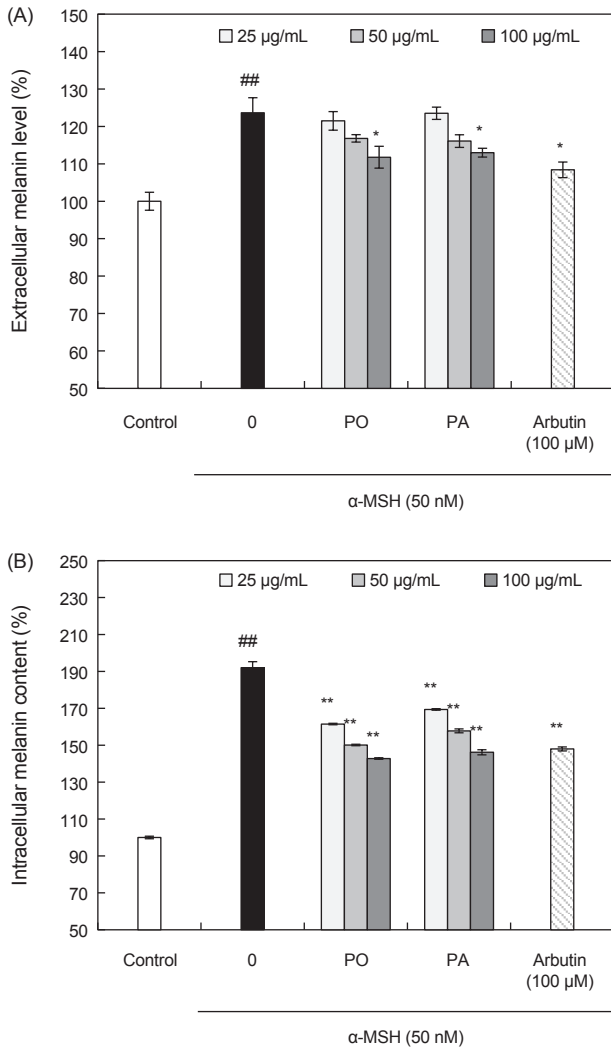


Fig. 5. Inhibitory effects of PO and PA on  $\alpha$ -MSH-induced melanin production in B16F10 melanoma cells. (A) The extracellular melanin content and (B) the intracellular melanin content was determined in B16F10 melanoma cells after co-cultured with  $\alpha$ -MSH (50 nM) and PO, PA at 25, 50, and 100  $\mu$ g/mL for 72 h. The experiments were conducted triplicate, and the data were expressed as the mean $\pm$ SE. ##P<0.01 compare with control group; \*P<0.05, \*\*P<0.01 compare with  $\alpha$ -MSH-treated group.

과 UVB로 인해 감소된 합성능을 PO와 PA를 농도별로 처리하였을 때 농도가 증가할수록 합성능이 향상되는 것을 확인할 수 있었으며, 100  $\mu$ g/mL의 농도에서 각각 76.70%와 71.71%의 Procollagen 함량을 나타내어 UVB를 조사하였을 때 보다 18.82%와 13.83% 증가시킴으로써 procollagen 합성능이 우수함을 확인할 수 있었다(Fig. 4E). Collagen 합성을 저해하는 인자로 알려진 MMP-1의 발현을 확인한 결과 UVB를 조사하였을 때 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, PO와 PA

를 농도별로 처리하였을 때 MMP-1 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4F). 특히 50, 100  $\mu$ g/mL의 농도에서 PO는 177.08%와 165.74%, PA는 183.61%와 171.55%로 농도의 존적으로 MMP-1의 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 미세조류(Ha et al., 2019), 굴 효소가수분해물(Kim et al., 2015), 톳 효소추출물(Wang et al., 2018) 등의 다양한 해양생물에서 ROS 소거활성, procollagen 합성능 증가, MMP-1 발현 감소등의 확인을 통해 주름억제 효능에 대해서 연구되어지고 있다. 따라서 PO와 PA 모두 피부세포에서 UVB에 대한 ROS 소거활성, procollagen 합성능 증가, MMP-1 발현 감소의 활성이 확인되어 피부 주름 생성 억제에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

### 어피 가수분해물들의 미백 활성 평가

Melanin은 사람의 피부, 눈동자, 머리카락 등의 색을 결정하는 주요 인자로 표피층에 존재하는 melanocyte에서 합성된다(Sim et al., 2016). 따라서 melanin 합성을 저해하는 것은 미백활성을 증명하는 데에 주요한 요인이다. B16F10 cell에  $\alpha$ -MSH를 처리하여 melanin 생성을 유도하였으며, PO와 PA를 처리하였을 때 melanin 생합성에 영향을 미치는지를 확인하였다(Fig. 5).  $\alpha$ -MSH를 단독으로 처리하였을 때 세포 외 melanin이 증가한 것을 확인할 수 있었으며, PO와 PA의 고농도인 100  $\mu$ g/mL에서 111.76%와 112.99%로 melanin 유의적으로 감소시켰다(Fig. 5A). 세포 내 melanin 함량은 현저한 차이를 보였으며,  $\alpha$ -MSH를 처리하였을 때 melanin 함량이 약 2배 정도 증가하였으며, PO와 PA를 처리하였을 때 농도가 증가할수록 melanin 함량이 감소하였으며, 특히 고농도인 100  $\mu$ g/mL은 각각 142.78%와 142.76%로 양성대조군 100  $\mu$ M의 arbutin 과 유사한 효능을 확인할 수 있어 PO와 PA가 미백 활성에 도움을 주는 것으로 판단된다. 본 연구에서는 연육 생산공정 중 발생하는 광어와 명태의 어피 부산물을 단백질 분해 효소를 이용하여 가수분해하였고, 그 중 pepsin 가수분해물의 항산화 활성, 항염증 활성을 나타내며, tyrosinase, elastase, collagenase 저해효과가 있음을 확인하였다. 또한 UVB로부터 산화적 세포손상 및 주름생성을 저해 수 있고, melanin 생성을 저해시켜 화장품 소재로서 잠재력을 확인하였다.

### 사 사

이 논문은 2016년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임 (해역별 특성을 고려한 전통 수산가공식품 개발 및 상품화).

### References

Abdillah S, Wijayanti G, Setiawan M, Noor U and Nurilmala M. 2017. In vitro anti-tyrosinase and anti-elastase activ-



- ity of collagen from sea cucumber *holothuria leucospilota*. Afr J Biotechnol 16, 771-776. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15655>.
- Baehaki A, Nopianti R and Anggraeni S. 2015. Antioxidant activity of skin and bone collagen hydrolyzed from striped catfish *pangasius pangasius* with papain enzyme. J Chem Pharm 7, 131-135.
- Chae YJ, Choi EH, Lee YB, Chun BS and Kim SB. 2014. Effects of additives on the physical properties of antarctic krill *euphausia superba* surimi. Korean J Fish Aquat Sci 47, 347-355. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2014.0347>.
- Chaijan M, Benjakul S, Visessanguan W and Faustman C. 2004. Characteristics and gel properties of muscles from sardine *sardinella gibbosa* and mackerel *rastrelliger kanagurta* caught in thailand. Food Res Int 37, 1021-1030. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.06.012>.
- Davies KJ. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals I General aspects. J Biol 262, 9895-9901.
- Deliconstantinos G, Villiotou V and Stavrides JC. 1996. Nitric oxide and peroxynitrite released by ultraviolet b-irradiated human endothelial cells are possibly involved in skin erythema and inflammation. Exp Physiol 81, 1021-1033. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1996.sp003986>.
- Foote CS. 2012. Photosensitized oxidation and singlet oxygen: Consequences in biological systems. In: Free radicals in biology (Vol 2). William AP, ed. Academic Press, London, U.K., 85-124.
- Future Seafood. 2018. Surimi market update november 2018. Retrived from <https://surimitech123.com/wp-content/uploads/2019/10/Surimi-Market-Update-November-2018.pdf> on Jan 12, 2020.
- Gao Y, Oh JH, Karadeniz F, Lee SG, Kim HK, Kim SJ, Jung JM, Cheon JH and Kong CS. 2016. Gel and texture properties of fish-meat gel prepared with pagrus major in comparison to different grades of alaska pollock. J Life Sci 26 955-962. <https://doi.org/10.5352/JLS.2016.26.8.955>.
- Giménez B, Alemán A, Montero P and Gómez-Guillén M. 2009. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. Food Chem 114 976-983. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.050>.
- Gu RZ, Li CY, Liu WY, Yi WX and Cai MY. 2011. Angiotensin i-converting enzyme inhibitory activity of low-molecular-weight peptides from atlantic salmon (*salmo salar l.*) skin. Food Res Int 44, 1536-1540. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.006>.
- Ha SK, Kim Y, Park YK and Lee Sh. 2019. Effects of enzyme hydrolysis extract of microalgae residues on collagen synthesis and matrix metalloproteinase-1 expression in uvb induced human dermal fibroblasts. J Chitin Chitosan 24, 165-172. <https://doi.org/10.17642/jcc.24.3.3>.
- Hayashi Y, Yamada S, Ikeda T and Yanagiguchi K. 2011. Fish collagen and tissue repair. In: Marine cosmeceuticals: Trends and prospects. Kim SK, ed. CRC Press, London, U.K., 133-138.
- Hearing VJ and Jiménez M. 1987. Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. Int J Biochem Cell Biol 19, 1141-1147. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(87\)90095-4](https://doi.org/10.1016/0020-711X(87)90095-4).
- Heo SJ, Ko SC, Cha SH, Kang DH, Park HS, Choi YU, Kim D, Jung WK and Jeon YJ. 2009. Effect of phlorotannins isolated from *ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by uv-b radiation. Toxicol In Vitro 23, 1123-1130. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.013>.
- Herpandi H, Huda N, Rosma A and Wan NW. 2012. Degree of hydrolysis and free tryptophan content of skipjack tuna *katsuwonus pelamis* protein hydrolysates produced with different type of industrial proteases. Int Food Res J 19, 863-867.
- Heu MS, Shin JH, Park KH, Lee JS, Noe YN, Jeon YJ and Kim JS. 2010. Quality of surimi from unmarketable bastard halibut as affected by the region where cultured. Korean J Fish Aquat Sci 43, 598-605. <https://doi.org/10.5657/kfas.2010.43.6.598>.
- Hou H, Li B, Zhang Z, Xue C, Yu G, Wang J, Bao Y, Bu L, Sun J and Peng Z. 2012. Moisture absorption and retention properties, and activity in alleviating skin photodamage of collagen polypeptide from marine fish skin. Food Chem 135, 1432-1439. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.009>.
- Hou H, Zhao X, Li B, Zhang Z and Zhuang Y. 2011. Inhibition of melanogenic activity by gelatin and polypeptides from pacific cod skin in b16 melanoma cells. J Food Biochem 35, 1099-1116. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00437.x>.
- Imokawa G, Takema Y, Yorimoto Y, Tsukahara K, Kawai M and Imayama S. 1995. Degree of ultraviolet-induced tortuosity of elastic fibers in rat skin is age dependent. J Invest Dermatol 105, 254-258. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12317607>.
- Jia J, Zhou Y, Lu J, Chen A, Li Y and Zheng G. 2010. Enzymatic hydrolysis of alaska pollack *theragra chalcogramma* skin and antioxidant activity of the resulting hydrolysate. J Sci Food Agric 90, 635-640. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3861>.
- Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W and Tanaka M. 2005. Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper *priacanthus macracanthus* skin. J Sci Food Agric 85, 1203-1210. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2072>.
- Kim BM, Kim DS, Jeong IH and Kim YM. 2014. Quality of steam cooked surimi gel prepared using sandfish *arctoscopus japonicus* meat. Korean J Fish Aquat Sci 47, 474-481. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2014.0474>.
- Kim HA, Park SH, Lee SS and Choi YJ. 2015. Anti-wrinkle effects of enzymatic oyster hydrolysate and its fractions on human fibroblasts. Korean J Food Nutr 44, 1645-1652. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0300-0>.

- doi.org/10.3746/jkfn.2015.44.11.1645.
- Kim JW, Kim DK, Park JS, Lee YK, Beik KY and Kim SD. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of shark collagens, and inhibitory actions on elastase and tyrosinase. *Korean J Food Preserv* 16, 419-426.
- Kim JS and Park JW. 2004. Characterization of acid-soluble collagen from pacific whiting surimi processing byproducts. *J Food Sci* 69, C637-C642. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09912.x>.
- Kim KN, Ko YJ, Yang HM, Ham YM, Roh SW, Jeon YJ, Ahn G, Kang MC, Yoon WJ and Kim D. 2013. Anti-inflammatory effect of essential oil and its constituents from fingered citron (*citrus medica l. Var. Sarcodactylis*) through blocking jnk, erk and nf-kb signaling pathways in lps-activated raw 264.7 cells. *Food Chem Toxicol* 57, 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.017>.
- Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T and Tanaka M. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper *priacanthus tayenus*. *Food Chem* 89, 363-372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.042>.
- Kraunsoe JA, Claridge TD and Lowe G. 1996. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* 35, 9090-9096. <https://doi.org/10.1021/bi953013b>.
- Kwon MC, Qadir SA, Kim HS, Ahn JH, Cho NH and Lee HY. 2008. Uv protection and whitening effects of collagen isolated from outer layer of the squid *todarodes pacificus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 41, 7-12. <https://doi.org/10.5657/kfas.2008.41.1.007>
- Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF and Lin JK. 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20, 1945-1952. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.10.1945>.
- Luo Y, Shen H, Pan D and Bu G. 2008. Gel properties of surimi from silver carp *hypophthalmichthys molitrix* as affected by heat treatment and soy protein isolate. *Food Hydrocoll* 22, 1513-1519. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.10.003>.
- Nagai T and Suzuki N. 2002. Preparation and partial characterization of collagen from paper nautilus (*argonauta argo, linnaeus*) outer skin. *Food Chem* 76, 149-153. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00255-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00255-2).
- Nagase H. 1996. Matrix metalloproteinases. In: *Zinc metalloproteases in health and disease*. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A., 173-224.
- Nakchum L and SM Kim. 2016. Preparation of squid skin collagen hydrolysate as an antihyaluronidase, antityrosinase, and antioxidant agent. *Prep Biochem Biotechnol* 46, 123-130. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.995808>.
- Nalinanon S, Benjakul S, Visessanguan W and Kishimura H. 2007. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper *priacanthus tayenus*. *Food Chem* 104, 593-601. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.035>.
- Oh JY, Kim EA, Lee H, Kim HS, Lee JS and Jeon YJ. 2019. Antihypertensive effect of surimi prepared from olive flounder *paralichthys olivaceus* by angiotensin-i converting enzyme (ace) inhibitory activity and characterization of ace inhibitory peptides. *Process Biochem* 80, 164-170. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.016>
- Ohshima H, Friesen M, Brouet I and Bartsch H. 1990. Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins. *Food Chem Toxicol* 28, 647-652. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(90\)90173-K](https://doi.org/10.1016/0278-6915(90)90173-K).
- Park H, Yun H, Kim J, Kim Y, Park J, Lee G, Jo Y, Park N, Kim I and Go H. 2005. Development of industrial utilization technique of starfish collagen. Research Report of Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, Sejong, Korea.
- Park JW and Morrissey MT. 2000. Manufacturing of surimi from light muscle fish. In: *Surimi and surimi seafood*. Park JW, ed. Marcel Dekker, New York, NY, U.S.A., 23-58.
- Prota G. 2012. *Melanins and melanogenesis*. Academic Press, Cambridge, MA, U.S.A.
- Sadowska M, Kołodziejska I and Niecikowska C. 2003. Isolation of collagen from the skins of baltic cod *gadus morhua*. *Food Chem* 81, 257-262. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00420-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00420-X).
- Schatrfetter-Kochanek K. 1996. Photoaging of the connective tissue of skin: Its prevention and therapy. In: *Advances in pharmacology*. Elsevier, Alpharetta, GA, U.S.A., 639-655.
- Shahidi F. 1994. *Seafood processing by-products*. In: *Seafoods: Chemistry, processing technology and quality*. Springer, Berlin, Germany, 320-334.
- Sim MO, Lee HE, Jang JH, Jung HK, Kim TM, Kim MS and Jung WS, 2016. Anti-melanogenesis and anti-wrinkle properties of korean native *dendrobium speciosum* ethanol extract. *Korean J Plant Res* 29, 155-162. <https://doi.org/10.7732/kjpr.2016.29.2.155>.
- Soter N. 1990. Acute effects of ultraviolet radiation on the skin. Abstract, Seminars in dermatology, 11-15.
- Wang L, Lee W, Oh JY, Cui YR, Ryu B and Jeon YJ. 2018a. Protective effect of sulfated polysaccharides from celluclast-assisted extract of *hizikia fusiforme* against ultraviolet b-induced skin damage by regulating nf-kb, ap-1, and mapks signaling pathways in vitro in human dermal fibroblasts. *Mar Drugs* 16, 239. <https://doi.org/10.3390/md16070239>.
- Wang L, Park Y, Oh J, Fernando I, Sanjeewa K, Kang M, Cui Y, Lee H, Ko J and Lee W. 2018b. Protective effects of enzyme-assistant extracts of *sargassum fulvellum* against aaph-induced oxidative stress in vitro in vero cells. *J Chitin Chitosan* 23, 113-119. <http://dx.doi.org/10.17642/jcc.23.2.7>
- Wood A, Ogawa M, Portier RJ, Schexnayder M, Shirley M and Losso JN. 2008. Biochemical properties of alligator *alligator mississippiensis* bone collagen. *Comp Biochem Physiol*

B 151, 246-249. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.05.015>.

Yang JI, Ho HY, Chu YJ and Chow CJ. 2008. Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from co-bia *rachycentron canadum* skin. Food Chem 110, 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.072>.

Yang JI, Liang WS, Chow CJ and Siebert KJ. 2009. Process for the production of tilapia retorted skin gelatin hydrolysates with optimized antioxidative properties. Process Biochem 44, 1152-1157. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.013>.