

## 홍어류(*Dipturus chilensis*) 껍질로부터 분리 정제된 collagenase-1 저해 펩타이드의 특성

박성하 · 이정권 · 전중균 · 변희국\*

강릉원주대학교 해양생물공학과

### Characterization of a Collagenase-1 Inhibitory Peptide Purified from Skate *Dipturus chilensis* Skin

Sung-Ha Park, Jung-Kwon Lee, Joong-Kyun Jeon and Hee-Guk Byun\*

Department of Marine Biotechnology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea

We attempted to isolate a collagenase-1 inhibitory peptide from skate *Dipturus chilensis* skin protein. The protein from skate skin was digested by various enzymes (alcalase,  $\alpha$ -chymotrypsin, neutrase, papain, pepsin, and trypsin) to produce a collagenase-1 inhibitory peptide. The collagenase-1 inhibitory activity of the peptides obtained was measured by gelatin digestion assay. Among the six hydrolysates, pepsin hydrolysate exhibited the highest collagenase-1 inhibitory activity. The peptide showing strong collagenase-1 inhibitory activity was purified by Sephadex G-25 gel chromatography and HPLC using an octadecylsilyls (ODS) column. The amino acid sequence of purified collagenase-1 inhibitory peptide was identified to be Asn-Leu-Asp-Val -Leu-Glu-Val-Phe (961 Da) by quadrupole time of flight (Q-TOF) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) mass spectroscopy. The  $IC_{50}$  value of purified peptide was 87.0  $\mu$ M. Moreover, the peptide did not exhibit cytotoxic effects on human dermal fibroblast cell lines.

Key words : Skate skin, Collagenase-1 inhibitory activity, Peptide, Purification

## 서 론

최근 국가 경제성장률과 수산물 수입의 자유화 정책에 의해 국내 수산물의 소비량은 점점 증가하고 있다. 국민 1인당 연간 수산물 소비량은 2001년 42.2 kg에서 2009년 49.8 kg으로 지속적으로 증가 추세에 있다. 이처럼 수산물 소비가 늘어난 것은 국민 소득의 향상과 건강에 대한 사회 전반적인 관심이 높아져 수산물이 건강식품으로서 소비자의 선호도가 높아진 것으로 보고되고 있다(MOMAF, 2010).

국내 수산물 소비량의 증가는 수산물가공공장의 가공율의 증가로 이어져 수산가공부산물인 어골, 어피, 어두, 내장, 비늘 등의 발생량도 증가되고 있는 실정이다(Ahn et al., 2009). 하지만 이들 부산물은 대부분 사료로 이용되거나 폐기되는 등 자원의 효율적인 활용이 제대로 이루어지지 않을 뿐 아니라 오히려 환경오염을 유발시키고 있다. 이들 수산가공부산물 중에는 단백질, 탄수화물 및 지방과 같은 유용한 성분이 다량 함유되어 있어 부산물의 유효 이용기술에 대한 관심과 중요성이 점차 높아지고 있으며, 특히 어류의 껍질과 내장 조직에는 유용성분인 다량의 콜라겐 성분이 함유되어 있다. 그러나 현재 이용되는 대부분의 콜라겐은 육상동물인 소나 돼지 등의 껍질, 뼈 등에서 유래한 것

으로 이들 콜라겐은 광우병 및 구제역 등 인체 전이 위험성을 가지고 있기 때문에 안전성을 위하여 동물 이외의 대체 자원으로부터 제조된 콜라겐의 필요가 증대되고 그에 따른 제조 기술도 요구된다. 따라서 해양성 또는 식물성 원료를 이용한 수용성 콜라겐 펩타이드의 제조가 이루어지고 있다(Lee and Jeong 2009; Cho et al., 1997). 해양생물 유래의 콜라겐 기능성에 대한 연구로는 수산가공 부산물 유래의 효소적 단백질 가수분해물 제조에 관한 연구(Do et al., 2006), 수산가공폐기물을 이용한 기능성 조미료 개발에 관한 연구(Kim et al., 1991) 등이 있다.

우리나라의 서남부 지방에서 주로 소비되는 어류인 홍어는 가공 과정에서 부산물로 껍질이 발생되고 있는 실정이다. 홍어껍질은 육상동물의 껍질과 마찬가지로 다량의 콜라겐 펩타이드가 함유되어 있어, 이를 고부가가치의 기능성 식품소재로서 이용이 가능하다. 콜라겐과 관련된 홍어에 대한 연구로는 홍어껍질로부터 정제된 젤라틴의 항균성에 관한 연구(Eun et al., 2006), 홍어 연골로부터 콘드로이틴 황산의 추출에 관한 연구(Choi, 2003), 홍어껍질 콜라겐의 분자량에 관한 연구(Hwang et al., 2007) 등이 보고되어 있다.

콜라겐은 피부세포의 결합조직을 구성하는 주요 성분이며, 피부 건조증량의 약 90%에 달하는 주요 구성 단백질이므로(Park et al., 2008) 콜라겐의 분해는 결합조직의 탄력저하와 피부의 주름 및 처짐에 직접적인 영향을 미친다고 알려져 있다

\*Corresponding author: hgbyun@gwnu.ac.kr

(Park et al., 2008). 콜라겐 분해의 주요 원인으로는 세포외 기질과 기저막의 주성분을 분해하는 기질금속단백질분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)가 중요한 역할을 하며, 주름형성에는 주로 MMP-1(collagenase-1)이 관여하는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2010). 즉, collagenase-1의 활성을 저해하는 물질은 주름개선 효과가 있기 때문에 collagenase-1 저해제 개발은 주름개선관련 소재 및 화장품 소재로서 이용이 가능하다. Lee and Jeong(2009)의 연구에서는 어류유래의 콜라겐 펩타이드의 분자량은 돈피 콜라겐 펩타이드의 분자량보다 낮기 때문에 피부 흡수가 용이하여 화장품 소재로서의 가능성이 높을 것으로 보고 하였다. 해양생물자원 유래의 collagenase-1 저해에 대한 연구는 키토산(Kong et al., 2010), 감태(*Ecklonia cava*)(Kim et al., 2006), 불가사리(*Asterias amurensis*)(Kwon et al., 2007) 등에 관한 연구가 보고되어 있다. 그러나 아직 홍어껍질로부터 collagenase-1 저해활성 펩타이드의 분리 정제에 관한 연구는 보고되어 있지 않다.

따라서, 본 연구에서는 우리나라에서 소비되는 대표적인 연골어류인 홍어의 껍질을 각종 효소로 가수분해하여 collagenase-1 저해활성이 있는 생리기능성 펩타이드를 분리 정제하고, 분리정제된 펩타이드의 아미노산 서열을 확인하였다. 이를 통해서, 홍어껍질로부터 분리된 주름개선효과가 있는 collagenase-1 저해활성 펩타이드의 화장품 소재 및 주름개선제 소재로서의 가능성을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재 료

홍어(*Dipturus chilensis*) 껍질은 전라도 나주의 영산홍어(주)에서 구입하였고, 껍질을 깨끗이 수세한 후 잘게 마쇄하여 실험에 사용하기 전까지 -80℃ 냉동고에 보관하였다.

홍어 껍질을 가수분해하기 위한 효소로 alcalase(from *Bacillus licheniformis*, 2.4 AU/g)와 neutrase(from *Bacillus amyloliquefaciens*, 1.5 AU/g)는 Novozymes(Denmark)의 제품을 구입하였고, α-chymotrypsin(from bovine pancreas, 40-60 units/mg protein), trypsin(from porcine pancreas, 1,000-2,000 units/mg solid), papain(from papaya latex, 1.5-10 units/mg)은 Sigma-Aldrich(USA)의 제품을 구입하였으며, pepsin(from porcine gastric mucosa, 400-800 units/mg protein)은 Junsei Chem. Co. (Japan)의 제품을 구입하여 사용하였다.

그리고 홍어껍질 가수분해물로부터 collagenase-1 저해 펩타이드를 정제하기 위하여 사용된 Sephadex G-25 수지는 Sigma-Aldrich(USA), HPLC(Agilent 1100, USA)로 펩타이드를 분리 정제하는데 사용된 acetonitrile은 J.T. Baker사(USA)에서 구입하였고, HPLC용 column은 Alltech사(Deerfield, IL, USA)의 Gromsil-120 ODS-5ST를 사용하였다. Collagenase-1 저해 활성 측정에 사용된 collagenase-1은 Simga-Aldrich(USA)

Table 1. Optimal conditions for hydrolysis of skate *D. chilensis* skin

Enzyme	Buffer	pH	Temperature(°C)
Alcalase	0.1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.0	50
α-chymotrypsin	0.1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.0	37
Neutrase	0.1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.0	50
Papain	0.1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.0	37
Pepsin	0.1 M Glycine-HCl	2.0	37
Trypsin	0.1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.0	37

에서 구입하였다. 세포독성 실험에 사용된 Human dermal fibroblasts(HDF)는 한국세포주은행에서 구입하였으며, 그 밖의 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

### 일반성분 분석

홍어껍질의 일반성분은 원료를 수세한 후 AOAC방법(AOAC, 1995)에 따라 분석하였다. 수분은 상압가열건조법, 조회분은 건식회화법, 단백질은 Kjeldahl법 그리고 지방은 Soxhlet법으로 측정하였다.

### 아미노산 분석

홍어 껍질의 아미노산은 시료 10 mg을 정평하여 ampoule에 넣고, 6 N HCl 2.0 mL를 가하여 110℃에서 24시간 가수분해하였다. 이 가수분해액을 glass filter로 여과하고 감압 건조하여 HCl을 제거한 후, 아미노산 자동분석기용 loading buffer(Na<sup>+</sup> form, pH 2.2)로 25 mL 되게 정용하였다. 이 중 일정량을 취하여 아미노산 자동분석기(Hitachi, Japan)로 분석하였다.

### 효소적 단백질 가수분해물의 제조

홍어껍질 단백질 가수분해물은 alcalase, α-chymotrypsin, neutrase, papain, pepsin 및 trypsin을 사용하여 효소별로 제조하였다. 즉, 홍어껍질의 가수분해는 껍질의 단백질 함량을 기준으로 1 g을 정평하고 1%(w/v) 기질용액이 되도록 하여 1시간 동안 안정화시킨 후 각 효소별 최적 가수분해 조건(Table 1)으로 온도 및 pH를 조절하여 효소를 첨가하고 6시간 동안 가수분해하였다. 이때 기질 대 효소의 비는 100:1(w/w)로 하였으며, 반응 종료 후 가수분해물은 원심분리(6,000 rpm, 15분)하여 상층액을 동결건조한 후 실험에 사용하였다.

### Collagenase-1 저해활성 측정

Collagenase-1 저해활성은 agarose gel(1.0% agar, 0.1% gelatin)상에 gelatin의 분해도를 측정하여 나타내었다. 먼저, agarose gel(1.0% agar, 0.1% gelatin)을 만들어 well plate에 부어 굳힌 다음 Ø 6.0 mm의 paper disk를 올려놓는다. 20 µL의 0.05% Collagenase-1과 pH 7.5 완충용액(50 mM Tris HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.15 M NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>) 70 µL 및 각 가수분해물 10 µL를 혼합하여 sample solution을 만든다. 제조

된 sample solution은 37°C로 설정된 항온수조에서 한 시간 동안 반응시킨 후, agarose gel상의 paper disk 위에 15 µL를 하였다. 그리고 실온에서 1시간 방치한 후, 37°C 항온수조에서 약 16시간 동안 반응시킨 다음, paper disk를 제거하고 agarose gel을 coomassie blue 용액(0.25% Coomassie brilliant blue G-250, 5% methanol, 7.5% acetic acid)으로 30분간 염색 후, destaining solution(12.5% methanol, 7.5% acetic acid)으로 30분간 gel상의 염색을 제거하였다. Collagenase-1 저해 활성은 염색되지 않은 환의 크기를 측정하여 계산하였다.

Collagenase-1 저해 펩타이드의 분리 정제

Collagenase-1 저해 펩타이드의 분리는 먼저 Sephadex G-25를 충전시킨 column(Ø 2.5×75 cm)에 탈이온수로 평형화를 시킨 후 0.25 g/mL 홍어 껍질 가수분해물 용액 2.0 mL를 주입하고, 탈이온수로 용출(유속 1.5 mL/min, 분획량 7.5 mL)하여 수행하였다. 용출액을 분광광도계로 215 nm에서 흡광도를 측정하여 분획하였으며, 각 분획물은 동결건조하고 일정량을 정평하여 저해 활성을 측정하였다. 각 획분 중에서 저해 활성이 가장 우수한 획분은 ODS column(Gromsil-120 ODS-5ST, Ø10×250 mm, 5 µm)을 이용한 HPLC로 분리하였다. HPLC에서의 분리방법은 이동상인 탈이온수와 acetonitrile을 0-40% 범위에서 선형상 농도구배법으로 용출하여 유속 2.0 mL/min로 60분간 분리하였다. 분리된 획분들은 collagenase-1 저해활성이 측정되었으며, 저해활성이 가장 높은 분획물은 재분리하여 단일획분의 펩타이드를 얻었다.

Collagenase-1 저해 펩타이드의 아미노산 서열 분석

정제된 collagenase-1 저해 펩타이드의 아미노산 서열 분석은 Q-TOF mass spectrometer(Micromass, UK)을 사용하여 실시하였다. 그리고 정제된 collagenase-1 저해 펩타이드의 분자량 분석은 liquid chromatography-mass spectrometry(LC-MS)를 이용하여 electrospray ionization(ESI)방법으로 측정하였다.

세포 독성 측정

세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 Mosmann(1983)의 방법을 변형하여 실시하였다. Human Dermal Fibroblasts(HDF) 세포를 2×10<sup>4</sup> cells/well 농도로 96-well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 처리하여 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 24시간 배양하였다. 5.0 µg/mL의 MTT 용액을 한 well 당 100 µL씩 첨가하고 4시간 후 microplate reader(BIO-TEK Instruments, USA)로 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

홍어껍질의 일반성분 및 아미노산 조성

홍어 껍질의 일반성분 분석결과는 Table 2에 나타내었다.

껍질의 수분, 회분, 지질, 탄수화물 및 단백질 함량비는 각각 70.9%, 1.5%, 1.4%, 2.6%, 23.6%로 나타났으며, 단백질의 비율이 가장 높았다. 단백질의 경우 건조 중량 기준으로 환산하면 81.1%이었다. Jeong et al. (1998)의 연구에서 보도된 어류 껍질의 단백질 함량은 60-70%범위였으며, 홍어껍질의 단백질 함량은 대구 및 명태껍질과 비슷한 함량이었다. 따라서 홍어껍질은 단백질 함량이 높아 단백질 가수분해에 의해 생리활성소재로 개발이 가능함을 확인할 수 있었다. Table 3에서와 같이 홍어껍질의 아미노산 조성을 분석한 결과, 주요 아미노산은 glycine(32.36%), alanine(10.52%) 이었으며, 이들의 함량은 전체 구성아미노산의 40% 이상을 차지하고 있었다. 그 외에 serine, aspartic acid, arginine, leucine 등의 아미노산이 포함되어 있었다. 반면에 cystine, methionine과 같은 함량

Table 2. Proximate composition of skate *D. chilensis* skin

Composition	Contents (%)
Moisture	70.9
Protein	23.6
Lipid	1.4
Carbohydrate	2.6
Ash	1.5
Total	100.0

Table 3. Amino acid compositions of skate *D. chilensis* skin

Amino acids	Contents (%)
Asx*	6.57
Thr	4.59
Ser	7.25
Glx*	9.20
Gly	32.36
Ala	10.12
Val	3.98
Cys	0.08
Met	1.28
Ile	2.99
Leu	5.04
Tyr	1.22
Phe	2.34
Lys	4.38
His	1.52
Arg	5.25
Pro	1.33
Hypro	0.50
Total	100.00

\*Asx : asparagine and aspartate.

\*Glx : glutamine and glutamate.

아미노산의 함량은 낮게 나타났고, tryptophan은 함유되어 있지 않았다. 이와 관련하여 홍어 가식부의 아미노산 조성(Lee, 1995)은 leucine(9.08%), lysine(8.69%), isoleucine(6.20%), valine(6.02%), threonine(5.02%), phenylalanine(3.76%) 으로 나타났으며, 가식부와 껍질의 아미노산 조성에는 차이가 있음을 알 수 있다. Cho et al. (2004)의 연구에서는 홍어껍질에는 풍부한 콜라겐 단백질이 함유되어 있으며, 콜라겐 단백질의 주요 구성아미노산은 glycine, leucine 및 proline이었다. 일반적으로 어류 및 포유류의 껍질에는 그들의 근육단백질보다 glycine, leucine 및 proline의 함량이 높다고 알려져 있다(Gomez-Guillen et al., 2002). 이와 비교하였을 때, 홍어껍질의 주요 아미노산에서도 glycine 및 leucine의 함량이 높게 나타났다.

효소적 단백질 가수분해

홍어껍질의 단백질 가수분해는 가장 일반적이고 널리 사용되고 있는 시판용 효소인 alcalase,  $\alpha$ -chymotrypsin, neutrase, papain, pepsin 및 trypsin을 이용하여 가수분해를 실시하였고, 단백질 가수분해물의 수득율은 각 단백질 가수분해물의 무게를 측정하여 계산하였으며, 각각의 수득율은 Table 4에 나타내었다. 단백질 가수분해물 중 alcalase 가수분해물의 수득율이

79.63%로 가장 높았으며, papain 가수분해물은 16.07%로 가장 낮았다. 앞서 보고된 연구와 비교하면, Jia et al. (2009)의 연구에서 Alaska pollack 껍질의 가수분해물 중 papain 가수분해물의 수득율이 50.49%로 가장 높았지만, alcalase 가수분해물은 38.51%로 홍어껍질의 alcalase 가수분해물의 수득율보다 낮게 나타났다. 이러한 차이는 기질의 차이뿐만 아니라 각 효소가 기질에 작용하는 결합부위가 다르기 때문인 것으로 판단된다. 홍어껍질은 콜라겐 등의 풍부한 단백질을 가지고 있으며, 단백질의 성분과 이를 구성하는 아미노산의 종류 및 함량에 따라 가수분해반응을 통해 다양한 생리활성 펩타이드 소재로 전환된다. 단백질 가수분해 효소에 의하여 생산된 가수분해물은 다양한 펩타이드의 혼합물로 이루어져 있으며, 이들 펩타이드를 구성하고 있는 아미노산들의 특이적인 서열에 따라 다양한 생리활성을 갖는 것으로 보고되고 있다(Je et al., 2007).

Collagenase-1 저해 활성

본 연구에서는 collagenase-1 저해성분으로 사용되는 tetracycline계 항생제인 doxycycline을 대조군으로 하여 6종의 단백질 가수분해물의 collagenase-1 저해 활성을 측정된 결과,

Table 4. Yield of hydrolysis of skate *D. chilensis* skin obtained by various enzymes

Enzymes	Yield (%)
Alcalase	79.63
$\alpha$ -chymotrypsin	72.24
Neutrase	79.21
Papain	16.07
Pepsin	67.53
Trypsin	51.91

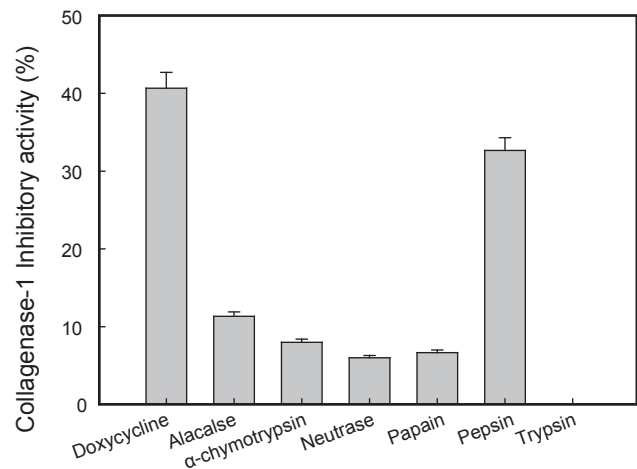


Fig. 1. Collagenase-1 inhibitory effect of skate *D. chilensis* skin hydrolysates on collagenase-1 assessed by gelatin digestion assay.

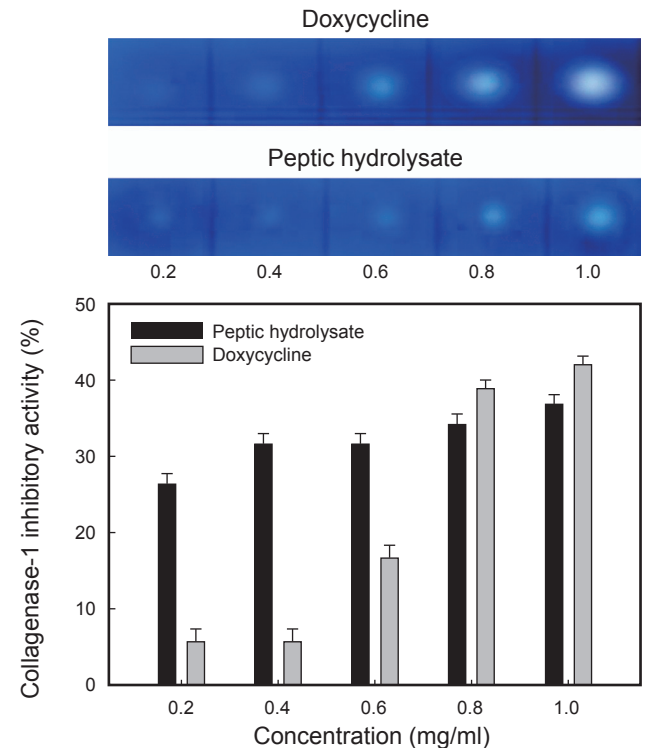


Fig. 2. Inhibitory effect of pepsin hydrolysate on collagenase-1 assessed by gelatin digestion assay (A). Collagenase-1 was reacted with doxycycline as positive control, and with peptic hydrolysate 0.05, 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0 mg/mL. Enzyme activity of remaining bacterial collagenase-1 was calculated by densitometric determination of the gelatin digested clear zone visualized by Coomassie Blue staining (B).

pepsin으로 처리한 가수분해물의 활성이 다른 효소로 처리한 가수분해물에 비해 높게 나타났다(Fig. 1). 따라서 pepsin 가수분해물 및 doxycycline의 농도를 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL로 희석하여 collagenase-1 저해 활성을 측정된 결과, pepsin 가수분해물의 collagenase-1 저해활성은 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 0.2 및 0.4 mg/mL의 농도에서는 doxycycline보다 저해 활성이 더 높았다. 한편, alcalase 가수분해물의 수득율이 가장 높았지만 collagenase-1 저해 활성은 pepsin 가수분해물이 가장 높은 것으로 보아 가수분해도와 collagenase-1 저해 활성과는 상관관계가 없는 것으로 판단되었다.

육상생물자원 유래의 collagenase-1 저해 물질에 관한 연구가 많이 보고되어 있는데, Tamsyn et al. (2009)는 white tea, green tea, rose tuncture 및 lavender 추출물의 collagenase-1 저해 활성을 측정하였으며, white tea, green tea, rose tuncture 및 lavender의 추출물의 농도가 250 µg/mL일 때 collagenase-1 저해 활성값은 각각 87%, 47%, 41%, 31%이었다. 이러한 추출물 중 lavender 추출물의 저해 활성이 동일한 농도의 pepsin 가수분해물의 저해활성 값과 유사하였다. 육상생물자원 이외에 본 연구와 유사성이 있는 해양생물자원 중 불가사리 유래의 저분자 콜라겐 펩타이드의 collagenase-1 저해활성에 관한 연구(Kwon et al., 2007)가 보고되었다. 불가사리 유래의 저분자(24-116 kDa) 콜라겐 펩타이드의 collagenase-1 저해활성 값이 40-60%

이였으며, 홍어껍질에서 유래된 pepsin 가수분해물의 저해활성 값과 유사하였다. 불가사리의 유래의 저분자 콜라겐 펩타이드의 연구(Kwon et al., 2007)에서 저분자의 콜라겐 펩타이드의 collagenase-1 저해 활성을 확인하였으며, 홍어껍질에 다량으로 함유된 콜라겐 펩타이드의 가수분해물에서도 collagenase-1 저해 활성을 확인하였다. 또한 단백질 가수분해물 및 저분자 펩타이드는 체내의 흡수율이 높으며, 추출물에 비해 독성이 낮으므로 단백질 가수분해물 및 저분자의 펩타이드가 collagenase-1 저해 물질로 활용 가능성이 높다고 할 수 있겠다.

#### Collagenase-1 저해 펩타이드의 분리 및 정제

Pepsin 가수분해물로부터 collagenase-1 저해 펩타이드를 분리정제하기 위해 Sephadex G-25 column에 주입하여 gel chromatography를 실시하였다. 분리정제 과정을 거쳐 총 4개의 회분을 얻었으며(Fig. 3.A), 각 회분의 collagenase-1 저해활성을 측정된 결과, 0.5 mg/mL의 농도에서 F1 회분의 저해 활성은 67.6%로 가장 높게 나타났다(Fig. 3.B). Sephadex G-25 column에서 분리된 활성회분 F1으로부터 collagenase-1 저해 펩타이드를 분리정제하기 위하여 C18 ODS column를 이용한 HPLC에서 분리를 실시하였다. HPLC에서 분획된 총 4개 회분의 저해활성을 측정된 결과, F1-2의 활성은 다른 회분에 비하

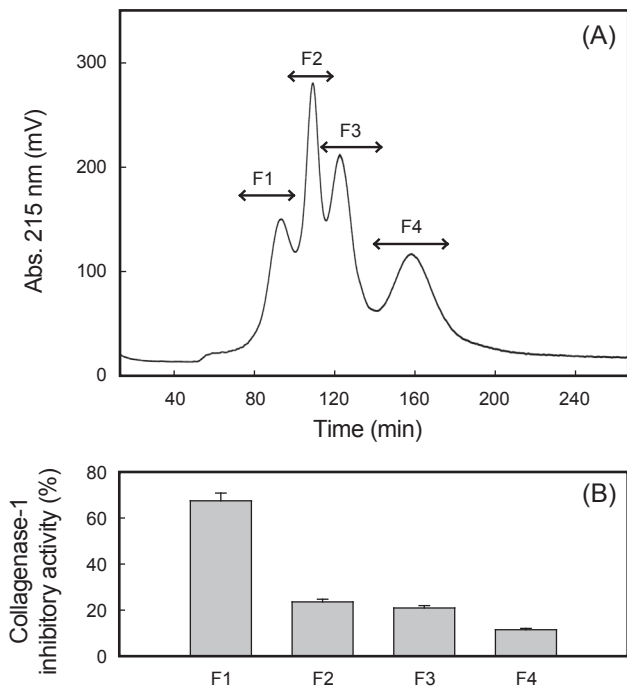


Fig. 3. Sephadex G-25 gel chromatogram of hydrolysates prepared with pepsin (A). Separation was performed at a rate of 1.5 mL/min and collected at a fraction volume of 7.5 mL. The fractions isolated by the Sephadex G-25 gel column were separated (F1-F4), and collagenase-1 inhibitory activity was determined (B).

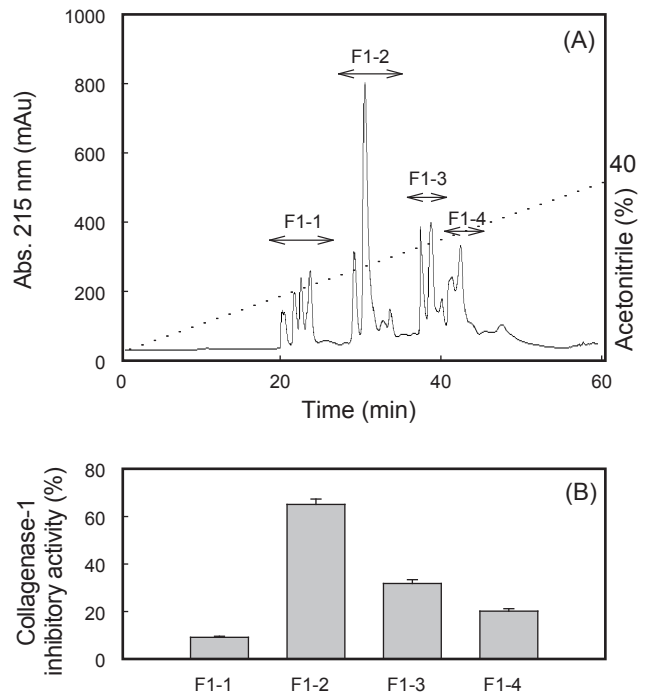


Fig. 4. HPLC chromatogram of potent collagenase-1 inhibitory fraction F1 isolated using Sephadex G-25 (A). Separation was performed with a linear gradient of acetonitrile from 0% to 40% over 60 minutes at a flow rate of 2.0 mL/min using a Gromsil 120 ODS-5 ST column. Elution was monitored at 215 nm. The fractions showing collagenase-1 inhibitory activity were designated F1-1~F1-4 (B).

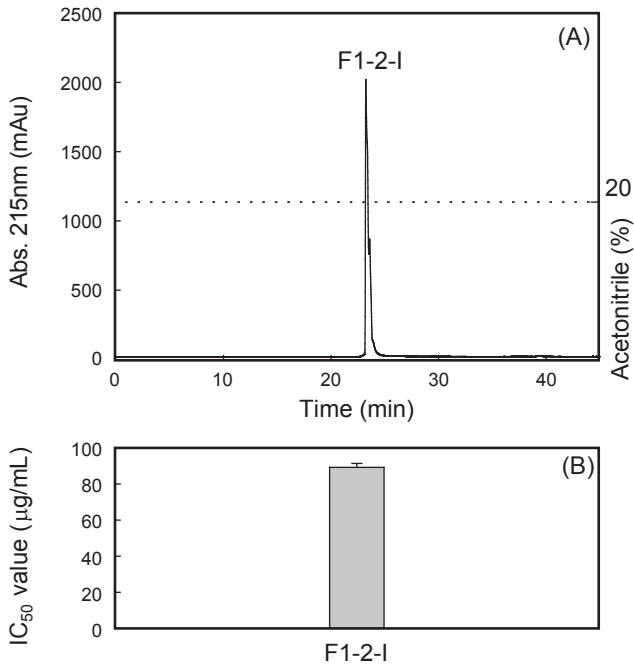


Fig. 5. HPLC chromatogram of potent collagenase-1 inhibitory F1-2 isolated from HPLC (A). Separation was performed with linear isocratic of acetonitrile from 20% in 50 min at a flow rate of 1.0 mL/min and analysis column (5 µm, 4.6 × 250 mm). Elution was monitored at 215 nm. The fractions showing collagenase-1 inhibitory activity were designated F1-2-I and IC<sub>50</sub> (mg/mL) were determined as the upper panel (B).

여 0.25 mg/mL의 농도에서 68.3%로 가장 높았다(Fig. 4). 분리된 F1-2 획분은 HPLC에서 재분리정제를 실시하였다. 재분리

정제 과정을 거쳐 단일 획분인 F1-2-I를 얻었으며, F1-2-I 획분의 collagenase-1 저해활성 값은 IC<sub>50</sub> 값으로 83.6 µg/mL이었다 (Fig. 5).

Collagenase-1 저해 펩타이드의 아미노산 서열

정제된 F1-2-I 획분의 아미노산 서열을 분석한 결과, Asn-Leu-Asp-Val-Leu- Glu-Val-Phe(분자량 : 961 Da)의 8개의 아미노산을 가지고 있었으며, 이 펩타이드의 IC<sub>50</sub> 값은 87.0 µM로 나타났다(Fig. 6). 정제된 collagenase-1 저해 펩타이드의 아미노산 서열에서 N-말단에는 asparagine 및 leucine이 존재하며, C-말단에서 3번째 아미노산은 glutamic acid이고 C-말단에는 phenylalanine이 존재한다. 특히 C-말단의 phenylalanine은 가수분해에 사용된 효소인 pepsin의 특이적인 아미노산 절단기작에 따른 것으로 판단되었다. Pepsin은 펩타이드 내에서 phenylalanine 및 tyrosine과 같은 방향족 아미노산이 있는 부분을 절단하며, N-말단에 위치한 leucine 및 proline을 절단하는 가수분해효소이다(Berstad, 1970). 그러므로 pepsin 가수분해물에서 분리된 collagenase-1 저해 펩타이드는 C-말단에 phenylalanine이 존재하였다. 한편, 정제된 저해 펩타이드의 아미노산과 껍질의 구성아미노산 조성을 비교하면 껍질의 구성아미노산 중 함량이 많았던 glycine(32.36%)과 alanine(10.12%)은 저해 펩타이드에 전혀 포함되지 않았고, 저해 펩타이드에는 소수성 아미노산인 leucine 및 valine이 많이 포함된 것을 알 수 있었다. Borkakoti(2004)의 보고에 따르면, collagenase-1은 기질과 결합하는 특이적인 활성부위인 P1', P2'/P3', P1'(alpha) 및 아연 킬레이트(chelator)를 가지고 있으며, 아연 이외에 칼슘이온에 의존적인 효소이다. Histidine 및 phenylalanine 등의 환 구조를 갖는 아미노산 잔기를 갖는 물질

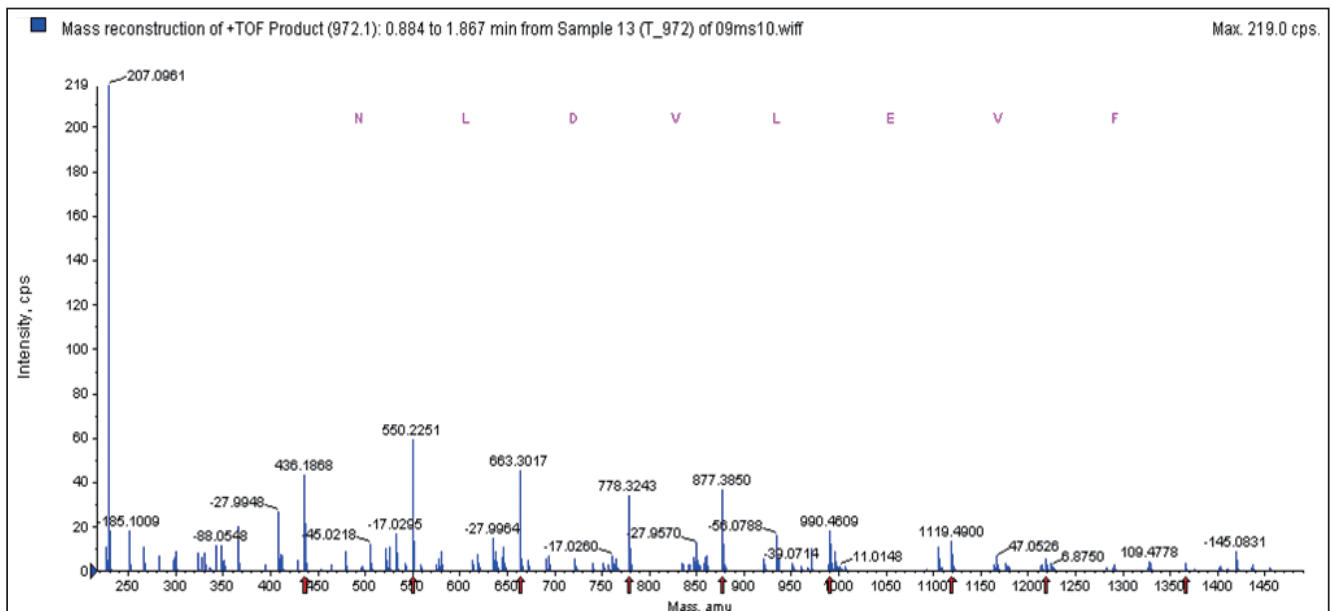


Fig. 6. Identification of molecular weight and amino acid sequence of the purified peptides in peptic hydrolysate from skate ray skin by HPLC. MS/MS experiments were performed on a Q-TOF tandem mass spectrometer equipped with a nano-ESI source.

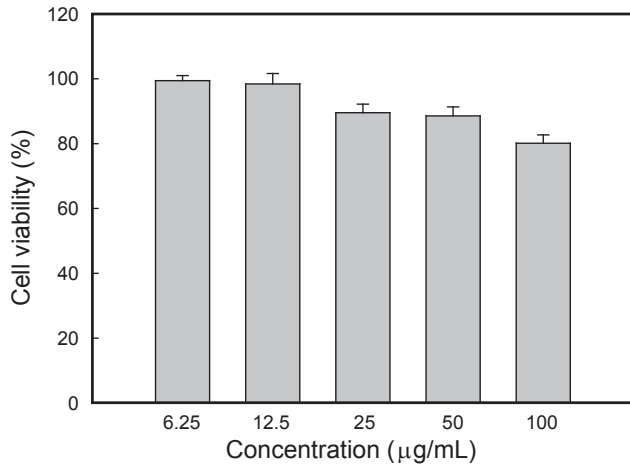


Fig. 7. Effect of purified peptide on viability of human dermal fibroblast. Human dermal fibroblasts was treated with different concentrations of peptic hydrolysate and cell viability was determined by MTT assay after 24 h. Data are given as means of values  $\pm$  S.D. from three independent experiments.

이 collagenase-1 활성 부위에 결합력이 강하며, P1'은 leucine 과 같은 소수성 아미노산 잔기의 결합력이 강하다고 보고하였다(Borkakoti, 2004). 또한 체내에는 collagenase-1, 즉 MMP-1의 저해제인 tissue inhibitors of metalloproteinase-1(TIMP-1)가 존재하며, TIMP-1의 구조와 홍어껍질 유래의 collagenase-1 저해 펩타이드의 구조를 비교하였다. Lodemel et al. (2004)의 연구에서 Atlantic cod(*Gadus morhua*) 근육으로부터 TIMP와 유사한 구조를 갖는 collagenase 저해 펩타이드를 분리정제 하였으며, 분리된 collagenase 저해제는 MMP-1이 아닌 MMP-9를 저해하는 특성을 갖는 것으로 보고하였다. Hideaki et al. (2006)는 TIMP-1이 속한 TIMPs의 구조에서 cysteine의 disulfide 결합이 collagenase-1 저해제의 저해 특성을 갖게 하며, cysteine은 valine, serine 및 leucine과의 결합구조를 형성하여 collagenase-1의 활성 부위에 결합하여 저해 활성을 나타낸다고 보고하였다. 이와 같이 valine과 같은 소수성 아미노산이 collagenase-1 저해 활성에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다. 또한, 홍어껍질에 분리된 collagenase-1 저해 펩타이드의 아미노산 서열은 소수성 아미노산인 leucine 및 valine 다량으로 존재하였으며, 이러한 아미노산 잔기가 collagenase-1의 활성 부위에 특이적으로 결합하여 저해 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

#### Human dermal fibroblasts 세포에 대한 세포독성

홍어 껍질에서 분리 정제된 collagenase-1 저해 펩타이드의 세포독성은 신생아의 표피에서 분리한 인간 피부 섬유아세포인 HDF 세포를 대상으로 하여 측정하였다. Fig. 7에서와 같이, 6.25 및 12.5 µg/mL의 저농도에서는 세포독성이 나타나지 않아서 HDF 세포가 모두 생존할 수 있었고, 그보다 높은 25 및 50

µg/mL 농도에서 90%이상의 생존율을 보였다. 본 실험에서 가장 높은 농도인 100 µg/mL 에서 81%라는 높은 세포 생존율을 나타내었다. 이와 유사한 결과는 불가사리 유래의 저분자 콜라겐 펩타이드(Kwon et al., 2007)에서도 피부세포에서의 독성이 나타나지 않았다. 이에 따라 저분자량의 collagenase-1 저해 펩타이드가 피부 주름 억제 및 세포 보호능에 효과적일 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구에서 분리 정제된 collagenase-1 저해 펩타이드는 100 µg/mL 이하 범위에서는 피부에서 세포독성이 나타나지 않았으므로 저분자량 펩타이드로서 피부손상을 보호하는 새로운 기능성 화장품 및 의약품 천연소재로 활용될 수 있을 것이라 여겨진다.

## 사 사

본 연구는 교육과학기술부, 강원도, 강릉시, 강릉과학산업진흥원의 연구개발사업으로 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- AOAC. 1995. Official methods of analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, U.S.A., 69-74.
- Ahn YS, Lee WW, Lee SH, Ahn G, Ko CI, Oh CK, Oh MC, Kim DW, Jeon YJ and Kim SH. 2009. Processing and Biological Activity of Gelatin Hydrolysate from *Branchiostegus japonicus* scales. Korean J Fish Aquat. Sci 42, 417-425.
- Borkakoti N. 2004. Matrix metalloproteinase inhibitors: design from structure. Biochemical Society Transactions 32. part 1.
- Cho SY, Kim JS and Kim JG. 1997. Screening for the raw material of gelatin from the skins of some pelagic fishes and squid. J Korean Fish Soc 30, 55-61.
- Choi JH. 2003. Isolation and Purification of chondroitin sulfate from skate cartilage. Master. Thesis, Pukyong National University, Busan, Korea, 1-65.
- Choi YR., Kim SK, Park PJ, Choi JH and Moon SH. 2000. Purification and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysate of Cod teiset protein. J Korean Fish Soc 33, 198-204.
- Do JR., Heo IS, Jo JH, Kim DS, Kim HK, Kim SS and Han CK. 2006. Effect of antihypertensive peptides originated from various marine proteins on ACE inhibitory activity and systolic blood pressure in spontaneously hypertensive Rats. Korean J Food Sci Technol 38, 567-570.
- Eun JB, Cho SH, Jahncke ML and Chin GB. 2006. The of processing conditions on the properties of gelatin from skate(*Raja kenogei*) skin. Food Hydrocolloids 20, 810-

816.

- Gomez-Guillen MC, Yurnay J, Fernandez-Diaz MD, Ulmo N, Lizarbe MA and Montero P. 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloid* 16, 25-34.
- Hideaki N, Robert V and Gullian M. 2006. Structure and function of matrix metalloprotease and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69, 562-573.
- Hwang JH, Mizuta S, Yokoyama Y and Yoshinaka R. 2007. Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja kenofei*). *Food Chem* 100, 921-925.
- 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.
- Je JY, Qian ZJ, Byun HG and Kim SK. 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem* 42, 840-846.
- Jeong BY, Choi BD and Lee JS. 1998. Proximate Composition, Cholesterol and  $\alpha$ -Tocopherol Content in 72 Species of Korean Fish. *J Korean Fish Soc* 31, 160-167.
- Kim JM, Jeon SW, Lee WG, Nam HJ, and Kim YB. 2010. Study of preventing methods for skin aging and wrinkles. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, 24, 533-542.
- Kim MM, Ta QV, Mendis E, Rajpakse N, Jung WK, Byun HG, Jeon YJ and Kim SK. 2006. Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity. *Life Sciences* 79, 1436-1443.
- Kim SK, Yang HP and Lee EH. 1991. The development of a natural seasoning using the enzymatic hydrolysate of fish skin. *Korean J Biotechnol Bioeng* 6, 327-366
- Kong SC, Kim JA, Ahn B, Byun HG and Kim SK. 2010. Carboxymethylations of chitosan and chitin inhibit MMP expression and ROS scavenging in human fibrosarcoma cells. *Process Biochem* 45, 179-186.
- Kwon MC, Kim HC, Kim SH, Syed AQ, Hwang BY and 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.
- Lee MJ and Jeong NH. 2009. Preparation and availability analysis of collagen peptides obtained in fish scale. *J Korean Oil Chemists Soc* 26, 457-466.
- Lodemel JB, Egge-Jacobsen W, and Olsen RL. 2004. Detection of TIMP-2-like protein in Atlantic cod (*Gadus morhua*) muscle using two-dimensional real-time reverse zymography. *Comp Biochem Physiol* 139, 253-259.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay. *J Immunol Methods* 65, 55-59.
- MOMAF. 2010. Statistic Database for Fisheries Production. Korea National Statistical Office, Daejeon, Korea
- Tamsyn SAT, Pauline H and Declan PN. 2009. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 9:27.

---

2011년 6월 8일 접수  
 2011년 7월 27일 수정  
 2011년 10월 7일 수리