

## 광어껍질을 활용한 펩신가수분해물 제조공정 최적화와 피부건강 기능성

# Optimal Processing for Peptic Hydrolysate from Flounder Skin and Its Skincare Function

강유안<sup>1</sup>, 진상근<sup>2\*</sup>, 고종현<sup>3</sup>, 최영준<sup>4\*</sup>

You-an Kang<sup>1</sup>, Sang-Keun Jin<sup>2\*</sup>, Jonghyun Ko<sup>3</sup> and Yeung Joon Choi<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>대표이사, (주)대한뷰티산업진흥원, 제주 63309, 대한민국

<sup>2</sup>교수, 경상국립대학교 동물소재공학과, 진주 52725, 대한민국

<sup>3</sup>연구원, 오션펩 주식회사, 진주 52839, 대한민국

<sup>4</sup>책임연구원, 오션펩 주식회사, 진주 52839, 대한민국

<sup>1</sup>Korea Beauty Industry Development Institute, JeJu 63309, Korea

<sup>2</sup>Department of Animal Resource Technology, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Korea

<sup>3</sup>Ocean-pep Co. Jinju 52839, Korea

<sup>4</sup>Ocean-pep Co. Jinju 52839, Korea

(Received 10 January 2022, Revised 27 January 2022, Accepted 28 January 2022)

**Abstract** Low-molecular weight peptides derived from fish collagen exhibit several bioactivities, including antioxidant, antiwrinkle, antimicrobial, antidiabetic, and antihypertension effects. These peptides are also involved in triglyceride suppression and memory improvement. This study aimed to investigate the optimal processing condition for preparing low-molecular weight peptides from flounder skin, and the properties of the hydrolysate. The optimal processing conditions for peptic hydrolysis were as follows: a ratio of pepsin to dried skin powder of 2% (w/w), pH of 2.0, and a temperature of 50°C. Peptic hydrolysate contains several low-molecular weight peptides below 300 Da. Gly-Pro-Hyp(GPHyp) peptide, a process control index, was detected only in peptic hydrolysate on matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight(MALDI-TOF) spectrum. 2,2'-azinobis-(3-3-ethylbenzothiazolline-6- sulfonic acid(ABTS) radical scavenging activity of the peptic hydrolysate was comparable to that of 1 mM ascorbic acid, which was used as a positive control at pH 5.5, whereas collagenase inhibition was five times higher with the peptic hydrolysate than with 1 mM ascorbic acid at pH 7.5. However, the tyrosinase inhibition ability of the peptic hydrolysate was lower than that of arbutin, which was used as a positive control. The antibacterial effect of the peptic hydrolysate against *Propionibacterium acne* was not observed. These results suggest that the peptic hydrolysate derived from a flounder skin is a promising antiwrinkle agent that can be used in various food and cosmetic products to prevent wrinkles caused by ultraviolet radiations.

**Keywords :** flounder skin, peptic hydrolysate, optimal processing, anti-wrinkle

## 서 론

콜라겐 펩타이드의 생물활성과 기능성에 관한 많은 연구가 진행되고 있으며 인체에 유효한 생리

\* Corresponding author  
Phone: 82-55-762-1093 Fax:  
E-mail: seafoodchoi@gmail.com

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

적 반응을 촉발할 기능적 효능 때문에 상업적으로 부가가치가 높은 소재를 생산할 수 있다[1-7]. 콜라겐 저분자 펩타이드 생산을 위해 가장 많이 사용하는 원료는 수산가공 부산물 유래의 콜라겐 가수분해물이다. 의약 및 식품산업에서 콜라겐 및 콜라겐 단백질 사용은 증가하고 있으며 특히 화장품 산업과 식음료 산업에서 콜라겐 소재의 사용 증가는 콜라겐 시장의 성장을 촉진하는 요인이다. 전 세계 콜라겐 시장은 2018년 35억 4,000만 달러에서 연평균 성장률 5.2%로 증가하여 2023년에는 45억 7,000만 달러에 달할 것으로 전망하고 있다 [8].

참돔의 껍질과 비늘 및 머리, 뼈, 지느러미는 조단백질이 풍부하며 껍질과 비늘은 각각 조단백질 함량의 80.5%와 46.1%가 콜라겐으로서 어체에서 가장 콜라겐 함량이 높은 부위다[9]. 콜라겐은 28가지의 구조가 확인되었고[10], I 형은 총콜라겐의 85~90%를 차지하는 섬유성 콜라겐으로 진피와 뼈의 주성분이며 체내의 모든 기관에 분포한다. I 형 콜라겐은 저온에서 중성염 혹은 저농도의 산에 잘 용해하기 때문에 쉽게 가용성 콜라겐을 만들 수 있고, 효소 가수분해를 통해 저분자 펩타이드 혼합물의 제조에 유리하다. 저분자 콜라겐 가수분해물은 분자량이 큰 콜라겐에 비하여 생물활성이 높은 것으로 알려져 있다. 콜라겐 가수분해물의 생산 및 기능성과 관련하여 저분자 콜라겐 제조[11], 어류 콜라겐의 항산화효과[1,3,12-13], 혈장 중성지방 억제[14], 항주름 및 피부개선 효과[15-19], 기억력 개선[20], 항당뇨와 항혈압[21] 등이 보고되어있다.

항주름과 피부개선 효과는 섬유아세포의 증식, 콜라겐과 엘라스틴 합성능 개선과 상관이 있다[22]. 콜라겐 단백질에서 얻은 효소저해 펩타이드는 단백질분해효소를 저해하고 지질과산화와 tyrosinase 및 keratinocyte apoptosis를 저해한다[23]. 아무르 불가사리 유래 콜라겐 펩타이드는 UVA로 유도한 인간 섬유아세포의 matrix metalloproteinase-1(MMP-1)의 발현을 감소시킨다[24]. 대구껍질 젤라틴 가수분해물 유래 펩타이드, GEIGPSGGRG KPGKDGAGPK와 GFSGLDGAKGD는 유의적으로

로 MMP-1, p-ERK과 p-p38을 저해하였고[17], 엘라스틴 유래 펩타이드 GLPY와 GPGGVGAL은 쥐 피부의 자외선 손상을 완화시켰다[25]. 화장품 소재 이용이 목표인 경우 펩타이드는 피부손상을 방지하는 효과를 가지나 중요한 관점은 피부를 통과하는 투과능으로써 화합물의 물리화학적 특성, 즉 해리상수, 분자량, 안정성, 결합친화성, 용해도와 관련이 있다[23]. 한국에서 피부보습관련 개별인정형 원료로서 펩타이드성 물질은 AP콜라겐 효소분해펩타이드와 collative 콜라겐펩타이드가 있다 [26]. 종교적 관습과 폐기자원의 부가가치 제품생산과 맞물려 최근 해산어류 유래 저분자 콜라겐 펩타이드의 피부 기능성 연구가 활발하게 진행되고 있다[5,27].

본 연구는 제주도에서 다량으로 양식하는 광어의 양식선별 단계에서 발생하는 폐기 광어를 고부가가치 기능성 화장품 소재로 활용할 목적으로 실시하였다. 펩신 가수분해물의 가수분해 공정의 최적화, 펩신가수분해물 구성아미노산 특성과 분자량 분포 특성, 항산화능, 콜라게네이즈 합성능과 저해활성, 여드름균 항균활성과 티로시네이즈 저해활성의 기능성을 조사하여 콜라겐 펩신 가수분해물의 화장품 소재로서 잠재적 가치를 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

실험에 사용한 광어(*Paralichthys olivaceus*) 껍질은 진주시에 소재하는 대형 횡집에서 2020년 11월 9-22일에 걸쳐 수집하여 냉동보관하면서 실험에 사용하였다. 해동한 광어껍질은 제조공정에 따라 효소가수분해물을 제조하였다.

가수분해를 위한 시약급 단백질분해효소로 펩신(370 units/mg solid; Sigma P7000), 파파인(3.0 unit/s/mg solid; P3375)과 판크레아틴(8xUSP, Sigma P7545)을 사용하였고, 상업용 효소로 Protamex, Flavourzyme, Alcalase 2.4 L과 Neutrase 0.8 L은 바이오시스 사(부산, 한국)에 구매하여 사용하였다. 실험에 사용한 모든 시약은 분석용을 사용하였다.

## 2. 가수분해물의 제조와 가수분해조건의 최적화

광어껍질 효소가수분해는 전처리 과정을 거친 후 비콜라겐성 물질과 Ca 제거 유무 및 1단 가수분해와 2단 가수분해 조건의 두 가지 방법을 적용하였다(Table 1).

Table 1. Process for enzymatic hydrolysate from flounder skin

Unit process	Process <sup>1)</sup>	Process <sup>2)</sup>
Raw material	Flounder skin	
Pre-treatment	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ clean the skin with tap water</li> <li>▶ dry wet skin in dry-oven at 60°C for 24 hr</li> <li>▶ crash dried skin for 3 min using food blender</li> <li>▶ screen powder under 100 mesh</li> </ul>	
non-collagen extraction and removing Ca		<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 60 g dried powder is suspended in 3 vol of 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.3) and extract non-collagen for 2 hr with stirring at room temperature</li> <li>▶ centrifuge at 3,000xg for 15 min and discard supernatant containing non-collagen</li> <li>▶ pellet was suspended in 2 vol of 0.1 M EDTA-2Na/0.1 N NaHCO<sub>3</sub>, pH 6.5 (final pH 7.05)</li> </ul>
Proteolysis	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 5 g dried powder/50 mL of 0.01 N HCl</li> <li>▶ add 0.1 g pepsin (final concentration, 2% (w/w))</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ add Protamex to 1% (w/w) of a final concentration</li> <li>▶ digest for 2 hr at 60°C with shaking (60 rpm)</li> <li>▶ cool until room temperature and adjust to pH 2.0</li> <li>▶ add pepsin to 2% (w/w) of a final concentration, and digest at 50°C for 2 hr</li> <li>▶ adjust to pH 6.0~7.0 using 1 N NaOH</li> </ul>
Inactivation of protease	▶ heat the proteolytic mixture at 90~95°C for 10 min	
Remove insoluble materials	▶ centrifuge at 3,000xg for 15 min and recover supernatant	
Ultrafiltration	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ ultrafilter with cut off limit of 1 kDa</li> <li>▶ Sample for chromatography and mass spectrometry analysis</li> </ul>	

1) processing for peptic hydrolysate

2) processing for protamex-peptic hydrolysate

광어껍질을 정제수에 깨끗이 세척하고 플라스틱 용기에서 수분을 제거한 다음 60°C의 항온 건조기에서 24시간 건조하였다. 건조한 껍질을 3분 동안 식품용 블렌더로 마쇄하여 100 mesh의 체로 선별한 후 가수분해 시료로 사용하였다. 펩신을 이용한 일단 가수분해는 광어껍질 0.5 g을 0.01 N HCl 용액(pH 2.0)에 분산시켜 100 mL로 정용하여 기질 용액으로 사용하였다. 기질 분산액 4 mL를 포함하는 에펜도르프 튜브에 2% (v/w)의 단백분해효소를 첨가하여 50°C의 항온수조(SB-12L, Benchm

ark Scientific, NJ, USA)에서 60 rpm으로 흔들며 주면서 2시간 가수분해하였다.

한편 비 콜라겐 단백질 추출, 칼슘 제거 후 2단 가수분해 공정은 전처리한 건조시료에 3배량의 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>(pH 8.3)를 가하고 현탁하여 실온에서 2시간 교반하면서 비콜라겐성 단백질을 추출하였다. 추출용액은 원심분리(3,000xg, 15분, Labogene Model 1248, Gyrozen Co. Ltd, Gimpo, Korea)하여 용해한 상층액인 비콜라겐성 단백질을 버리고 펠렛에 시료량 기준 2배량의 0.1 M EDTA-2

Na/0.1 N NaHCO<sub>3</sub>(pH 6.5)을 가하여 재현탁하였다. 현탁용액에 1단 가수분해효소로 시료 중량 대비 1% (w/w) Protamex를 첨가하여 60°C에서 2시간 60 rpm으로 흔들어주면서 가수분해한 후 실온까지 냉각시켜 1N HCl을 사용하여 pH 2.0으로 조정하였다. 2단 가수분해효소로 pepsin을 시료중량 대비 2%(w/w)가 되도록 첨가하여 50°C에서 2시간 가수분해하였다. 2단 가수분해물은 1N NaOH를 사용하여 pH 5.5와 7.0으로 조정하였다. 2가지 공정으로 제조한 가수분해물은 90~95°C에서 10분 동안 가열하여 효소를 불활성시키고 원심분리(3,000xg, 15분)하여 얻은 상층액을 1 kDa의 막으로 한외여과한 후 칼럼 크로마토그래피 및 질량 분석용 시료로 사용하였다.

가수분해도 측정을 위한 시료는 최종농도가 5%가 되도록 20% 용액을 첨가하여 효소반응을 중지시키고 실온에서 30분 동안 미분해단백질을 침전시킨 후 원심분리하였다(2,500xg, 20분). 상층액의 단백질 농도와 아미노산 농도는 각각 Biuret법과 ninhydrin법으로 측정하였으며[28], 가수분해도는 Lee 등의 방법[29]에 따라 계산하였다.

효소가수분해시간은 광어껍질 시료 5g/50mL (pH 3.0과 pH 6.2) 현탁물에 2% (w/w)가 되도록 펩신과 Protamex를 첨가하여 40°C의 항온수조에서 60 rpm으로 진탕하면서 1, 2, 3, 5 시간 가수분해한 후, 가수분해물 10 mL를 분취하였다. 원심분리(2,500xg, 20분)하여 얻은 상층액의 단백질 농도를 Biuret법으로 측정하여 0차 반응 구간을 가수분해시간으로 설정하였다. 그리고 가수분해효소 선정을 위해 시약급 효소인 펩신, 파파인, 판크레아틴과 상업용 효소인 Alaclase 2.4 L, Neutrase 0.8 L, Protamex와 Flavourzyme을 광어껍질에 대하여 2% (w/w) 첨가하고 60 rpm으로 진탕하면서 50°C에서 2시간 가수분해하였다. 최종농도가 5% (v/v)가 되도록 TCA를 가해 단백질을 침전시키고, 원심분리(2,500xg, 20분)하여 얻은 상층액의 단백질 농도를 측정하여 가수분해도를 계산하였다[29]. 한편 Box-Behnken 실험계획법에 따라 pH, 가수분해온도, 펩신/광어껍질의 비를 인자로 2 수준에서 가수분해물 단백질 농도(mg/mL)와 아미노산 농

도(mM)의 반응값으로 광어껍질의 펩신가수분해물 제조를 위한 최적조건을 측정하였다.

### 3. 구성아미노산 조성

Screw형 시험관에 정확히 무게를 단 광어껍질 시료 20-24 mg을 넣고, 6 N HCl 용액 2 mL를 가하여 질소를 충전하면서 완전히 밀봉한 후 110°C의 가열블록(HB-96D, Daihan Scientific Co, Ltd, Seoul, Korea)에서 24시간 산분해하였다. 가수분해한 시료를 3G-glass filter로 여과하고 50°C 이하에서 회전진공증발기(N-1110, Eyela, Tokyo, Japan)로 완전히 농축한 후 0.02 M HCl 용액으로 10 mL로 정용하였다. 0.20  $\mu$ m의 실린더형 필터로 여과한 후 40  $\mu$ L를 아미노산자동분석기(Biochrom 30, Biochrom, Cambridge, UK)에 주입하여 sodium 분석 프로그램에 따라 아미노산 조성을 분석하였다.

### 4. 분자량 분포측정

크기배제 크로마토그래피를 이용하여 분자량 분포를 측정하였다. 효소 가수분해물 100  $\mu$ L를 Superdex peptide 칼럼(10x300 mm, GE Healthcare, USA)을 장착한 AKTA purifier 시스템(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)에 주입하고 HPLC급 물로 단백질과 펩타이드를 0.5 mL/min의 속도로 용출하면서 280/220 nm에서 용출피크를 확인하였다. 각 피크의 분자량은 동일한 크로마토그래피 조건에서 표준물질 cytochrome c (2.0 mg/mL, 분자량 12400 Da), aprotinin(2.0 mg/mL, 분자량 6500 Da), vit B12 (4.2 mg/mL, 분자량 1355), L-carnosine (20.0 mg/mL, 분자량 225 Da)을 사용하여 작성한 표준곡선에 따라 측정하였다. 칼럼의 void volume은 Blue dextran을 사용하여 측정하였다. 용출피크의 분자량은 용출부피/void volume의 비에 대한 분자량의 상관식, 분자량=1E+06e<sup>-3.546x</sup> (r<sup>2</sup>=0.9925)을 사용하여 계산하였고, 피크면적비는 전체 피크 면적에 대한 상대면적의 %로 계산하였다.

분자량 1000 Da 미만 펩타이드의 분자량 분포를 확인하기 위해 한외여과(cut-off MW, 1000 Da)한 효소 가수분해물 0.5 mL를 에펜도르프 튜브에 넣어 50°C 진공원심분리기에서 6시간 동안 용매를

완전히 휘발시킨 후 메탄올 200  $\mu$ L를 가하여 염을 침전시키고 10,000 rpm에서 15분 원심분리(MC-1 2, Benchmark, Sayreville, NJ, USA)하여 얻은 상층액을 다시 45°C의 진공원심분리기에서 용매를 휘발시킨 후 MALDI-ToF 분석용 시료로 사용하였다. 300-3000 m/z의 분자량 범위에 걸쳐 reflector mode, positive polarity, 가속전압 20,000 V, 레이저 강도 25-30%의 조건에서 MALDI-TOF (Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer 901, Waltham, MA, USA)를 사용하여 펩타이드 절편의 주요 스펙트럼을 확인하였다. Matrix는  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid(CHCA)를 사용하였고, 질량 검정을 위해 펩타이드 표준물 II(bradykinin 1-7, 757.39916; angiotensin II, 1046.54180; angiotensin I, 1296.68480; substance P, 1347.73540; bombesin [M+H], 1619.82230; renin substrate, 1758.93261; ACTH clip 1-17, 2093.08620; ACTH clip 18-32, 2465.190830; somatostatin, 3147.47100)을 사용하였다.

### 5. 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 및 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)

DPPH 항산화능은 Wang 등의 방법[30]을 다소 수정하여 측정하였다. 즉 시험관에 가수분해물 0.1 mL를 넣고 증류수 0.4 mL를 첨가한 혼합용액에 0.2 mM DPPH/ethanol 용액 0.5 mL를 가하였다. 어두운 실온에서 30분 동안 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 시약 대신 증류수를 첨가한 용액을 blank로 사용하였으며, 증류수 0.5 mL에 DPPH 0.5 mL를 첨가한 용액을 reference로 사용하였다.

ABTS radical 소거 활성은 Re 등의 방법[31]을 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS 5 mL와 140 mM potassium persulfate 88  $\mu$ L를 혼합하여 상온에서 16 시간 빛을 차단하여 ABTS 양이온을 형성시켰다. 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.7이 되도록 phosphate buffered saline(PBS)로 희석하였다. ABTS 용액 190  $\mu$ L와 시료 10  $\mu$ L를 혼합한

후 상온에서 6분 동안 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 용매를 대조군으로 하여 대조군에 대한 항산화능을 백분율로 나타내었다. 양성대조군으로 1 mM ascorbic acid 용액을 사용하였다.

$$\text{ABTS 항산화능(\%)} = \frac{(\text{대조군 흡광도}) - (\text{시료 흡광도})}{(\text{대조군 흡광도})} \times 100$$

### 6. 세포내 콜라겐 생성 측정

인체 피부 섬유아세포(Hs68)를 35 mm dish에  $2 \times 10^5$ 이 되도록 분주한 후, 24시간 배양하고 PBS로 세척한 후 fetal bovine serum(FBS)을 포함하지 않은 배지로 24시간 배양하였다. 배지를 제거한 후 PBS로 세척하고 대조군과 시험군에 30 mL/cm<sup>2</sup>의 세기로 UVB를 조사하였다. 이후 FBS를 포함하지 않는 새로운 배지로 48시간 배양하였고 이때 양성대조군은 100  $\mu$ M ascorbic acid를 포함시켰고, 시험군은 펩신 가수분해물 250 ppm, 500 ppm 및 1,000 ppm을 포함시켰다. 배양액은 회수하여 procollagen type 1C peptide(PIP) 측정용 시료로 사용하였다. PIP 농도는 표준곡선에 따라 계산하였으며, 변화율(%)은 음성대조군 PIP 농도(% normal)에서 시험군 PIP 농도(% normal)을 뺀 값으로 표시하였다.

### 7. 콜라게네이즈 저해능 측정

콜라게네이즈 저해능은 Invitrogen사의 EnzChek® Gelatinase/Collagenase Assay Kit (250-2000 Assays) 시약을 구입하여 사용하였다. 먼저 1 mg DQ 콜라겐 vial에 1.0 mL의 재증류수를 가해 DQ 콜라겐 저장용액 (1 mg/mL)을 제조하였다. 10 x reaction buffer 2 mL에 재증류수 18 mL를 가해 reaction buffer로 희석하여 콜라게네이즈 효소 시약을 제조하였다. 작업용액으로 최종 농도가 0.2 U/mL 되도록 reaction buffer로 희석하였다. 시료를 96 well plate에 80  $\mu$ L씩 triple로 준비하여 DQ 콜라겐 20  $\mu$ L를 첨가하였다. Sample blank는 reaction buffer 50  $\mu$ L, 시료에 작업용액 50  $\mu$ L를

첨가하고 빛을 차단한 상태로 실온에서 1 시간 동안 방치한 후 excitation wavelength 485 nm와 emission wavelength 535 nm에서 ELISA plate reader (VICTOR X3™, PerkinElmer, Waltham, MA, USA)로 형광강도를 측정하였다.

$$\text{콜라게네이즈 활성저해능(\%)} = 100 - (b - b' / a - a' \times 100)$$

- a: 공시료액의 반응 후의 흡광도
- b: 시료액의 반응 후의 흡광도
- a',b': 완충액으로 대체하여 측정된 흡광도

### 8. 여드름균 저해능 측정

항균활성 측정에 사용된 균주는 여드름 균인 *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*) KCTC 3320으로서 Korean Collection for Type Cultures (KCTC, 한국생물자원센터)로부터 균주를 분양받아 사용하였다. 사용한 배지는 Reinforced Clostridial Medium를 121°C에서 15분 동안 고압 멸균하여 사용하였다. 균주는 25% glycerol medium을 사용하여 -80°C에서 저장 및 보관하였고, 보관 균액 1 mL을 배지 9 mL에 접종하여 37°C에서 배양하였다. UV-Vis Spectrometer(Optizen Pop, Mecasys Co., Ltd. Daejeon, Korea)를 이용하여 600 nm에서 흡광도 값을 0.6~0.8로 일정하게 조정된 후 실험에 사용하였다.

시료의 항균활성은 disc diffusion 분석법으로 하였다. 여드름균 배양액 100 uL를 멸균한 spreader로 Reinforced Clostridial agar medium의 표면에 균질하게 도말하였다. 시료는 paper disc (6 mm, ADVANTEC Co., Tokyo, Japan)에 시료 30 uL(1차 실험), 50 uL(2차 실험)를 일정하게 주입하였다. 고체배지에 시료가 주입된 paper disc를 일정 간격을 두고 올려둔 후 37°C에서 24시간 동안 배양한 뒤 clear zone의 직경을 사방으로 측정하여 평균값을 구하였다. 대조균은 증류수로 하였고 비교 대조균은 여드름 기능성 화장품의 고시형 원료인 살리실산을 70% EtOH에 용해하여 사용하였다.

### 9. 티로시네이즈 저해활성의 측정

시료를 적당한 용매에 녹여 티로시네이즈 활성 저해를 확인할 수 있는 농도 범위를 설정하였다. 시험관에 0.1 M 인산염 완충액 (pH 6.5) 220 uL, 시료용액 20 uL, 버섯 유래 타이로시나제액 (1,500 ~ 2,000 U/mL) 20 uL를 순서대로 넣었다. 이 액에 1.5 mM 티로시네이즈 40 uL를 넣고 37°C에서 15분 동안 반응시킨 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 농도가 5 mg/mL이하인 시료는 시료 40 uL, 0.1 M 인산염완충액 (pH 6.5) 200 uL, 버섯유래 타이로시나제액 (1,500 ~ 2,000U/mL) 20 uL를 순서대로 넣었다. 이 액에 1.5 mM 티로시네이즈 40 uL를 넣고 37°C에서 15분 동안 반응시킨 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료액 대신 시료의 용매인 25mM Tris-HCl (pH 8.0)을 공시료액으로 하여 보정하였다. 티로시네이즈 저해활성은 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{티로시네이즈 저해활성(\%)} = \{100 - (b - b' / a - a' )\} \times 100$$

- a: 완충액 반응 후의 흡광도
- b: 시료용액 반응 후 흡광도
- a' , b' : 효소 대신 완충액으로 측정된 흡광도

### 10. 통계처리

최적화 실험계획, 표준편차, 분산분석 및 유의성 검증은 통계처리는 통계 프로그램 JMP(ver 12, SAS Institute, NC, USA)를 사용하여 수행하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 광어껍질의 구성 아미노산 조성

광어껍질의 총아미노산 함량은 63.38±1.96 g/100 g이었고 글리신 함량은 12.40±0.39 g/100 g으로서 약 19.6%를 차지하였다(Table 2).

Table 2. Amino acid composition of dried flounder skin and its hydrolysate (unit: g/100 g-sample).

Amino acid	Dried skin	Enzymatic hydrolysate (g/100 g-protein)	
		Pepsin	Protamex/Pepsin
Asp	3.73±0.17	7.07±0.12	8.78±0.39
Hyp	2.21±0.33	-	-
Thr	2.18±0.14	3.23±0.05	4.30±0.20
Ser	2.21±0.14	4.78±0.09	5.65±0.24
Glu	7.76±0.40	10.97±0.15	12.97±0.60
Pro	5.00±0.14	9.69±0.05	9.31±0.32
Gly	12.40±0.39	19.74±0.05	18.70±0.83
Ala	6.97±0.32	8.94±0.09	8.92±0.37
Val	2.05±0.12	2.67±0.06	3.47±0.21
Cys	0.07±0.01	0.23±0.04	0.29±0.02
Met	1.33±0.13	2.37±0.05	2.66±0.10
Ile	1.45±0.07	1.64±0.01	2.53±0.15
Leu	2.86±0.11	3.55±0.05	5.20±0.24
Tyr	1.10±0.03	1.72±0.13	2.72±0.11
Phe	1.93±0.08	3.05±0.17	4.14±0.16
NH3	0.57±0.06	1.06±0.18	1.51±0.39
Hyl	0.44±0.02	-	-
Lys	3.15±0.14	4.28±0.01	5.41±0.22
His	0.76±0.04	1.33±0.02	1.89±0.07
Arg	5.20±0.20	7.22±0.11	7.87±0.32
Total	63.38±1.96	93.56±1.85	106.34±4.94

콜라겐에서 글리신은 총콜라겐 단백질의 약 1/3에 해당하기 때문에[9] 연구에 사용한 분말을 순수한 콜라겐 단백질이라 할 수 없다. 그러나 콜라겐 단백질에서만 발견되는 하이드록시프로린과 하이드록시리신을 각각 약 3.5%와 0.7% 포함하고 있어서 콜라겐 단백질의 특징을 보였다. 광어껍질 펩신 가수분해물과 비콜라겐성 단백질 및 칼슘 이온을 제거하는 공정을 포함하는 Protamex-펩신 2단 가수분해물은 글리신 함량이 각각 19.74 g/100 g과 18.70 g/100 g, 프롤린 함량은 각각 9.69 g/100 g과 9.31 g/100 g으로서 펩신 가수분해물에서 다소 높았다. 그러나 시스테인은 각각 전체 아미노산의 0.24와 0.27%에 해당하여 시스테인이 검출되지 않는 어류 콜라겐 아미노산 조성의 특징과 유사하였다. 정제 콜라겐인 경우 글리신 잔기수는 전체 아미노산 잔기의 33%에 해당하고 프롤린 잔기는 10%에 해당한다[9]. 이 같은 결과는 0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 용액 처리가 비콜라겐성 단백질의 추출에 효과적이지 못함을 반영하는 것으로 추정된다. 그러나 EDTA 용액으로 탈염 처리한 Protamex-펩

신 2단 가수분해물의 단백질 함량이 펩신 가수분해물에 비하여 높은 것에 미루어 탈염처리가 추출물의 순단백질 함량 증가에 기여함을 확인하였다. 그러나 콜라겐의 특이성을 반영하고 GMP 표준공정을 고려하면 단위공정이 단순한 펩신 1단 가수분해가 Protamex-펩신 가수분해에 비하여 경제성을 확보할 것으로 판단하였다.

2. 가수분해효소 선별과 가수분해시간의 설정

광어껍질 가수분해에 적당한 효소를 선정하기 위하여 시약급 효소인 펩신, 파파인, 판크레아틴과 상업용 효소로서 Alcalase 2.4 L, Neutrase 0.8 L, Protamex와 Flavourzyme을 사용하여 광어껍질에 대하여 각 효소를 2% 첨가하고 60 rpm으로 진탕하면서 50°C 에서 2시간 가수분해하였다(Fig. 1).

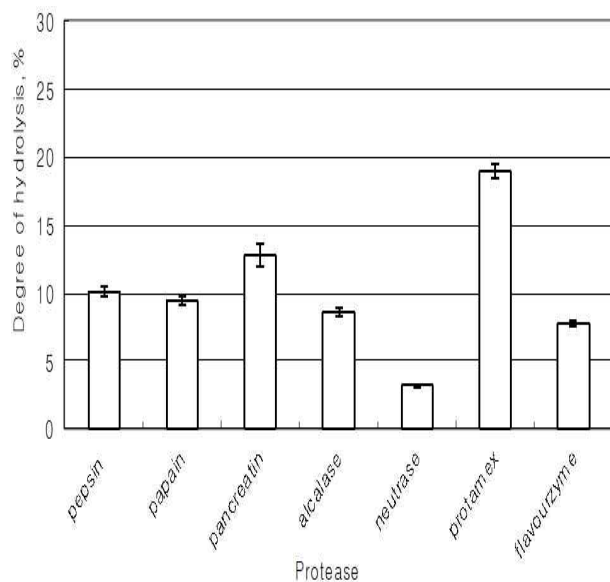


Fig. 1. Hydrolysis of dried flound skin with reagent grade and commercial protease. Dried flound skin was hydrolyzed under 50°C, pH 7.3 and 2% protease for 2 hr. Peptic digestion was performed in pH 2.1.

펩신을 제외한 다른 효소는 가수분해용 분말시료를 10배량의 0.1 N NaHCO<sub>3</sub>에 현탁하고 펩신 가수분해는 10배량의 0.01 N HCl에 현탁한 후 효소량은 분말 중량에 대하여 2%(w/w)를 첨가하였다. 효소혼합물을 60 rpm으로 흔들어주면서 50°C 에서 2시간 가수분해하여 최종농도가 5%가 되도록



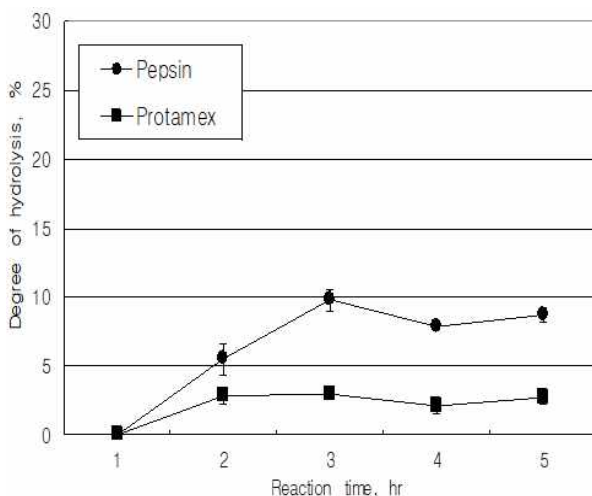
20% TCA용액을 첨가하여 가수분해를 중지시켰다. 반응혼합물을 실온에서 30분 방치하여 단백질을 침전시킨 후 원심분리(2,500xg, 20분)하여 얻은 상등액의 단백질 농도를 Biuret법으로 측정하여 TCA 가용성 단백질로 사용하였다. 한편 크기배제크로마토그래피용 시료인 경우는 반응 중지를 위해 20% TCA 용액을 사용하는 대신 분석 전까지 급속동결하여 -80°C의 동결고에 저장하였다. 시약급 단백분해효소로 분해한 경우 가수분해도는 판크레아틴이 가장 높은  $12.8 \pm 0.8\%$  였으며, 산업용 효소는 Protamex가  $19.0 \pm 0.5\%$ 로 가장 높았고 Alcalase>Flavourzyme>Neutrase의 순으로 낮았으며 Neutrase의 가수분해도는  $3.2 \pm 0.1\%$ 였다. 연어 껍질 단백질의 구조 특성에 미치는 Neutrase, Alcalase, Flavourzyme과 Protamex의 영향을 평가하여 Alcalase가 가장 높은 20.07%의 가수분해도를 보여[32], 본 연구와 결과와 다소 차이를 보였다.

최적 가수분해시간을 설정하기 위하여 pH 3.0과 6.2에서 각각 2% (ww)의 펩신과 Protamex를 첨가하고, 효소 활성 측정을 위한 표준온도 조건인 40°C의 항온수조에서 60 rpm으로 흔들며 주면서 1, 2, 3, 5시간 가수분해하였다. 최종농도 5%가 되도록 20% Trichloroacetic acid (TCA) 용액을 첨가하고 원심분리(2,500xg, 20분)하여 얻은 상등액의 단백질 농도를 측정하였다(Fig. 2).

Fig. 2. Hydrolysis of dried flounder skin with pepsin and protamex at 40°C, pH 3.0 (pepsin) and pH 6.2 (protamex) with reaction time.

펩신은 가수분해 3시간에 가수분해도 9.8%에 도달한 후 가수분해 시간의 증가에 따른 큰 변화는 보이지 않았고 Protamex의 경우 2 시간에 가수분해도 3.0%에 도달한 후 가수분해 시간 증가에 따른 유의적인 변화는 보이지 않았다. 이 같은 결과에 기초하여 가수분해 시간은 2시간으로 설정하였다. 한편 효소선별에서 얻은 Protamex의 가수분해도에 비하여 가수분해시간 설정에서 얻은 낮은 Protamex의 가수분해도는 Protamex의 최적 pH 7.0과 최적온도 55°C에 비하여 낮은 반응조건에 기인하는 것으로 판단하였다. 펩신 가수분해의 최적 pH와 온도는 각각 pH 2.0과 40°C이다[33]. 그리고 펩신 가수분해물은 MALDI-Tof 질량스펙트럼에서 공정관리를 위한 펩타이드 Gly-Pro-Hyp(GP Hyp, 285 Da)에 해당하는 질량 스펙트럼 m/z 286.1366이 검출된 반면, Protamex 가수분해물에서는 GP Hyp가 검출되지 않았다.

효소의 단가를 고려할 때 시약급으로는 펩신, 산업용으로는 Protamex가 가장 적당한 것으로 판단하였다. 그러나 가수분해물질에서 콜라겐의 특성을 반영할 수 있는 적절한 지표물질의 설정이 필요하고 효소농도, pH, 반응온도를 최적화해야 할 필요가 있다.



### 3. 펩신 가수분해조건의 최적화

광어껍질 펩신가수분해물 제조를 위한 최적조건을 찾기 위하여 pH, 온도, 효소 대 기질의 비를 인자로 각각 pH 범위 2-4, 온도범위 30-50, 효소 대 기질비 2-4% (w/w)의 2수준에서 Biuret법에 의한 펩타이드 농도와 ninhydrin법에 의한 아미노산 함량을 반응값으로 설정하여 Box-Behnken법으로 시험을 수행하였으며 반응시간은 2시간으로 고정하였다(Table 3).



Table 3. Experimental design for peptic hydrolysis of flounder skin using Box-Behnken

Exp. No	pH	Temp	Pepsin <sup>1)</sup> uL	Protein <sup>2)</sup> mg/mL	Amino acid <sup>3)</sup> mM
1	3	30	40	6.61	30.57
2	4	30	30	3.13	15.77
3	3	30	20	5.73	26.34
4	2	30	30	10.88	25.82
5	4	40	20	0.00	9.26
6	3	40	30	7.30	23.52
7	3	40	30	8.56	36.81
8	2	40	40	11.34	45.01
9	2	40	20	16.28	42.60
10	4	40	40	1.00	19.03
11	3	40	30	12.65	24.30
12	4	50	30	5.67	27.07
13	3	50	40	8.84	32.93
14	3	50	20	14.55	33.99
15	2	50	30	23.38	34.67

- 1) The ratio of pepsin to flounder skin was 2-4% (w/w).
- 2) Protein concentration was measured by Biuret method
- 3) Amino acid content was measured by ninhydrin method

pH와 반응온도는 각각 유의적 수준에서 반응값인 펩타이드 농도에 영향을 미치며, 상호작용은 pH\*온도가 유의적인 영향을 미쳤다(p<0.05, Fig. 3).

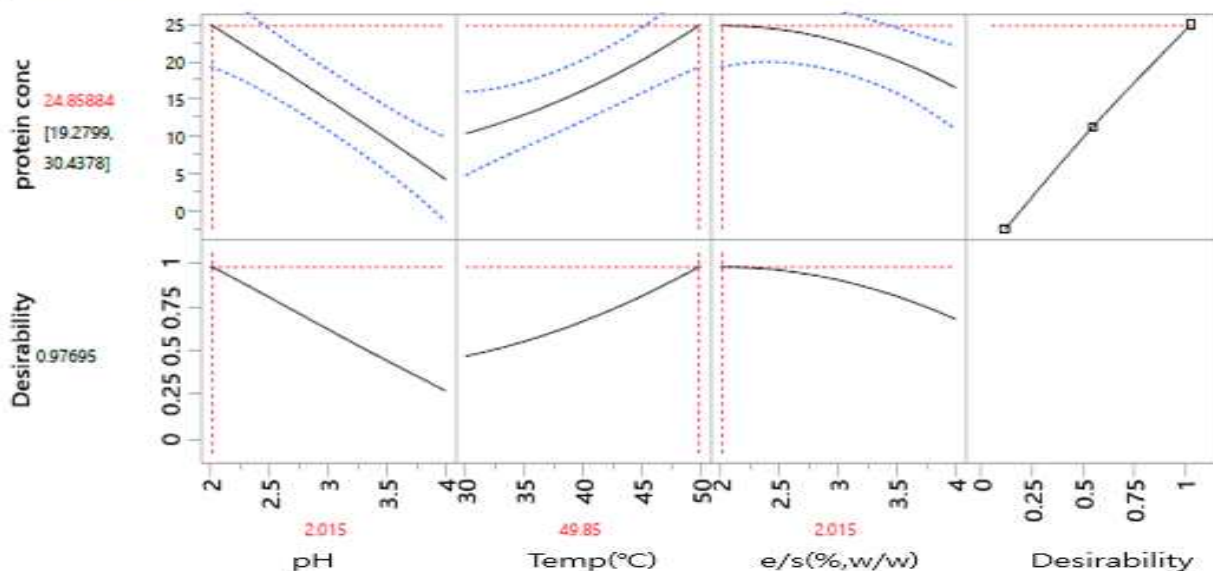


Fig. 3. Experimental design for optimal peptic hydrolysis using Box-Behnken design. The reaction time was fixed at 2 hr.

pH는 상승함에 따라 반응 값은 감소하였고, 반대로 온도는 상승함에 따라 반응 값은 증가하며, 효소 대 기질 비는 증가함에 따라 반응 값은 오히려 감소하여 pH 2.0, 반응온도 50°C, 효소 대 기질 비 2%에서 가장 높은 0.9769의 만족도를 보였다(F

ig. 3). 종속변수 펩타이드 농도에 대한 독립변수 pH, 온도, 효소 대 기질비와 pH\*온도상호작용을 반영한 예측식은 펩타이드 함량(mg/mL)= 9.503 - 6.51\*(pH -3) + 3.261\*(temp-40/10) - 1.096\*(e/s-3) + (pH -3) \*[(temp-40)/10 \*(-2.49) 였다. 최적 조건

에서 반응시킨 펩신가수분해물의 펩타이드 함량은  $17.37 \pm 0.15$  mg/mL로서 예측값 17.9 mg/mL의 97%를 반영하였다.

#### 4. 가수분해물의 분자량 분포

크기배제크로마토그래피를 사용하여 각 가수분해물의 분자량 분포를 측정하였다(Table 4).

Table 4. The relative peak area of protease hydrolysates by size exclusion chromatography<sup>1)</sup>

Protease	Area below 1,000 Da (%)	Range of 240~ 400 Da	
		Da	Area(%)
Pepsin	5.99	300	37.61
Papain	19.93	280	1.29
Pancreatin	23.01	300	5.2
Alcalase	20.38	370	8.47
Neutrase	32.22	300	4.32
Protamex	28.11	240	19.68
Flavourzyme	23.74	300	19.68

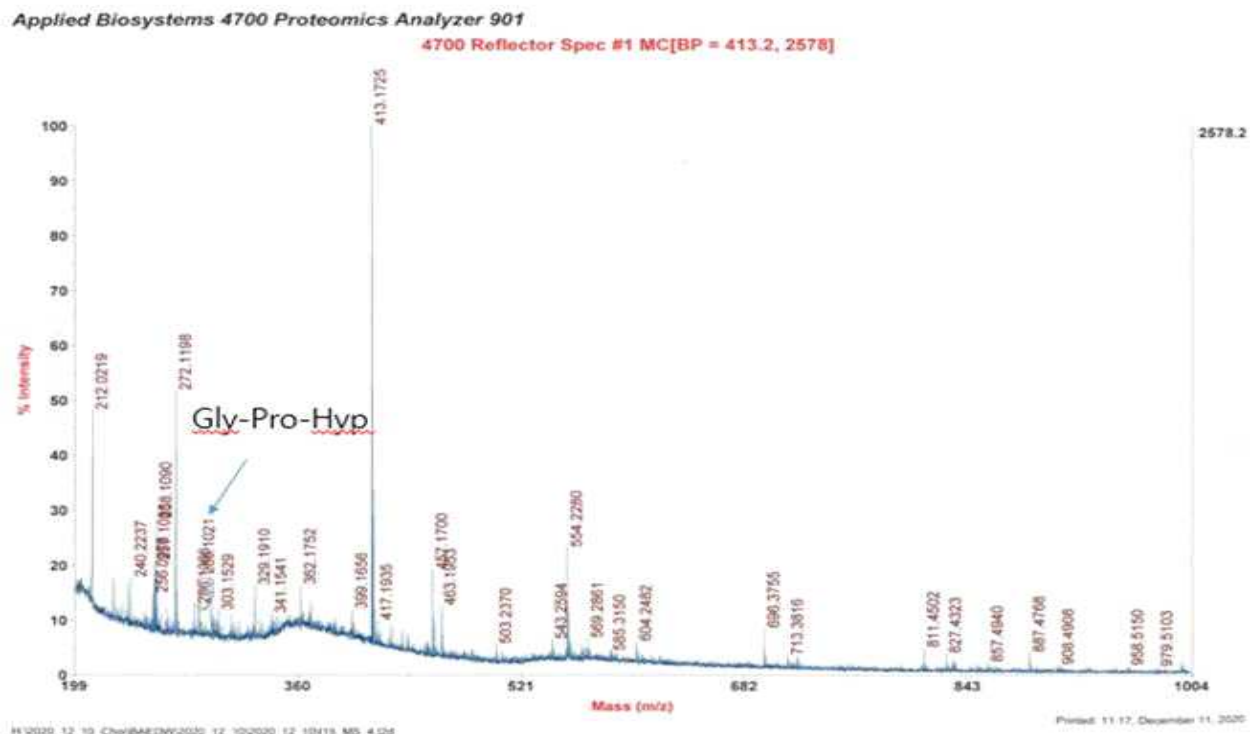
1) Size exclusion chromatography were performed on super dex peptide column(10x300 mm, GE Healthcare, USA). The hydrolysates were eluted with HPLC grade water using flow rate of 0.5 mL/min, and detected at 220 nm.

220 nm에서 측정된 전체 피크 면적에 대한 1,000 Da 이하의 분자량을 보이는 피크들의 상대적 피크면적의 합은 Neutrase 0.8L이 가장 높은 32.2%였고 펩신이 가장 낮은 6.0%였다. 단백질 중 아미

노산 잔기의 평균분자량을 110으로 볼 때[34] 분자량 1000 Da 펩타이드의 평균 아미노산 잔기수는 약 9-10잔기에 해당한다. 이 같이 비교적 긴 사슬의 펩타이드는 적절한 수용체가 없기 때문에 세포투과도가 현저히 떨어지고, 리간드 pose의 다양성이 증가하며 수용체의 활성부위의 공간에 결합친화도가 현저히 감소하여 *in silico* 생물활성 펩타이드의 선별을 방해한다.

지표성분인 GPHyp의 분자량이 285 Da에 해당하기 때문에 펩타이드의 아미노산 잔기수 약 2-3.6개를 표적으로 분자량 240-400 Da 사이에 해당하는 피크의 상대적 면적으로 각 효소의 선택 기준을 설정하였다. 이 경우 펩신이 가장 높은 37.61%가 약 300 Da에 해당하며, 판크레아틴이 가장 낮은 5.2%의 상대면적을 가졌다. 이 같은 결과에 비추어 분자량 약 300 Da에 해당하는 저분자량 펩타이드 생성을 위해 시약급 효소는 펩신이 적합하고, 산업용 효소로는 Protamex가 가장 적절할 것으로 판단하였다.

광어껍질 펩신, Protamex 및 Flavourzyme 가수분해물의 분자량 분포를 MALDI-Tof 질량분광계로 측정된 결과, 펩신가수분해물에서만 m/z 286.1366의 스펙트럼이 관측되었다(Fig.4).



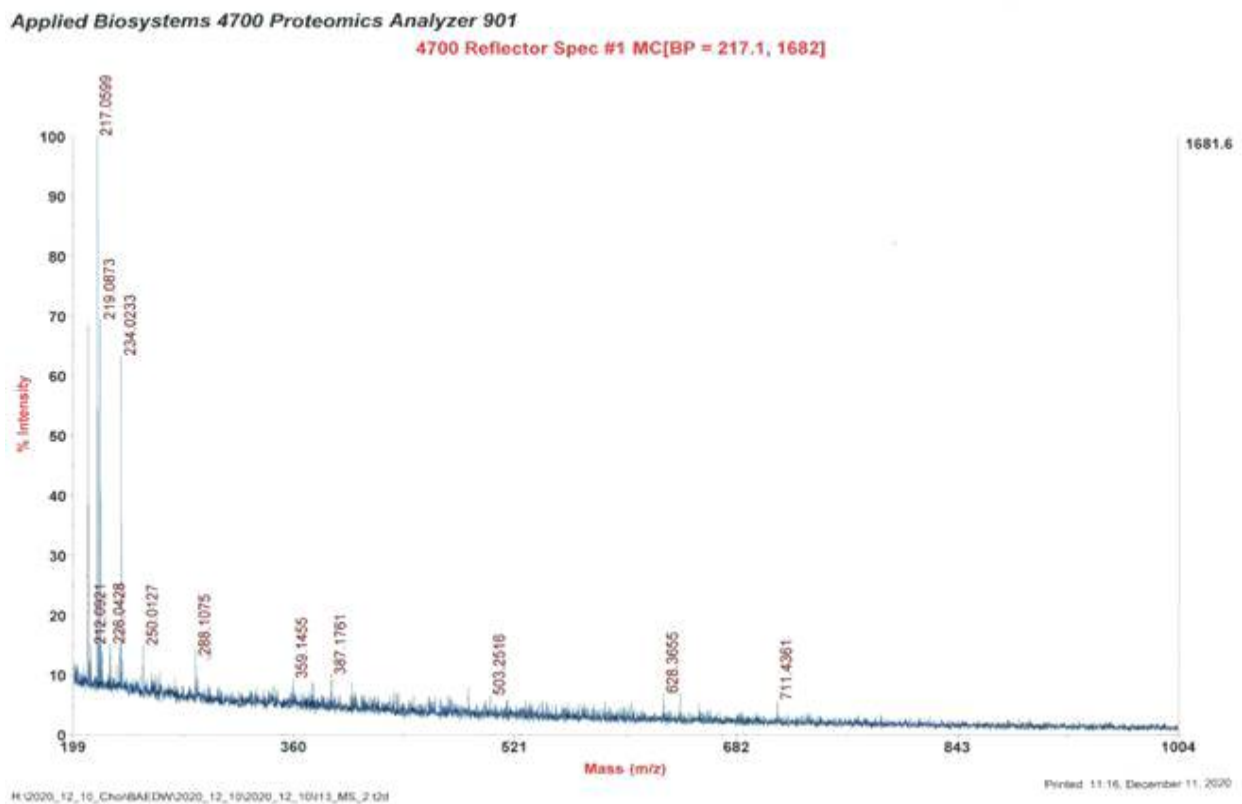
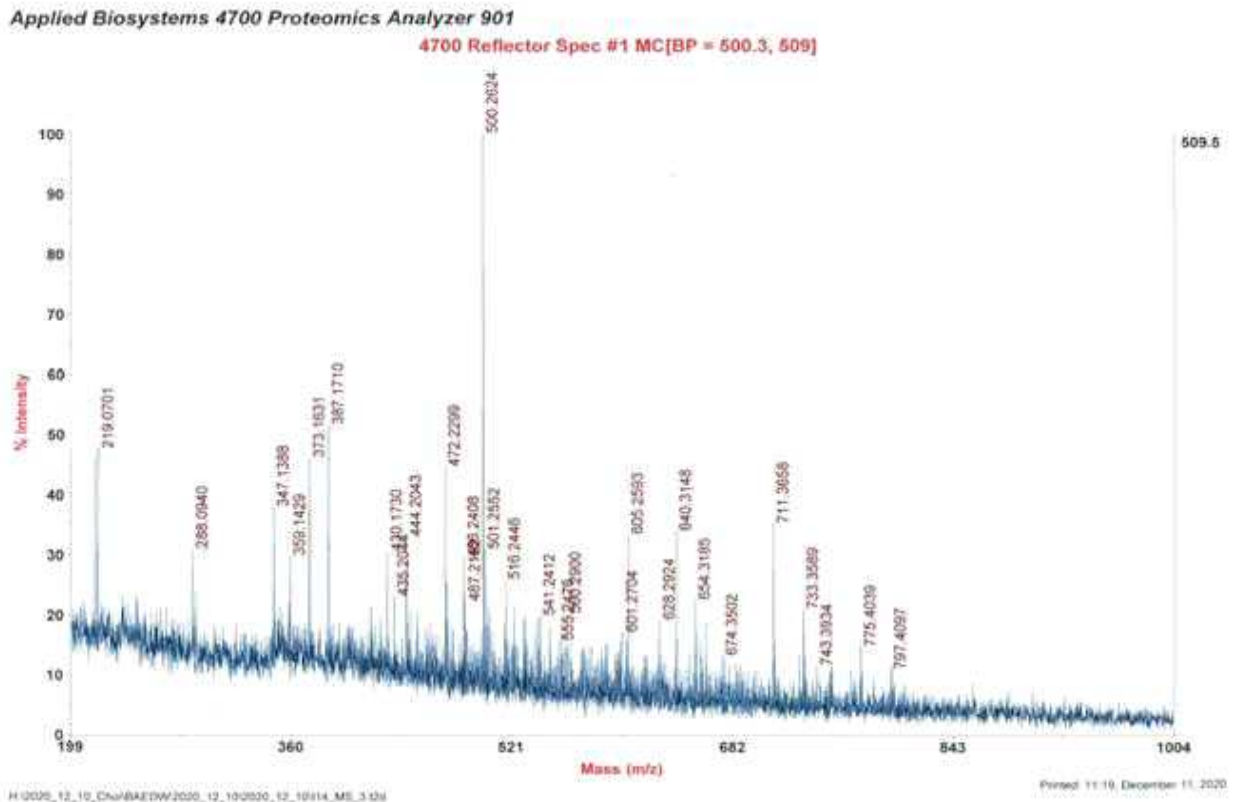


Fig. 4. Fingerprints of pepsin (A), protamex (B), and flavourzyme(C) ultrafiltrates below 1000 Da from each protease hydrolysate using MALDI-ToF spectrometry.

m/z 286.1366은 피크는 분자량 285 Da에 해당하여 GPHyp의 분자량 285.296 Da과 거의 일치하는 결과를 보여 펩신가수분해물에서 지표물질로 설정한 GPHyp가 존재할 가능성을 높였다. 한편 Pro tamex와 Flavourzyme의 가수분해물에서는 각각 m/z 288.0940과 288.1075에 해당하는 스펙트럼을 보여 GPHyp가 아닌 다른 서열의 펩타이드가 분포할 가능성을 보였다. 개별인정형 피부건강기능성 식품 중에서 저분자 콜라겐의 지표성분으로서 대부분 GPHyp를 선택하고 있다[26].

**5. 펩신가수분해물의 기능성**

광어껍질 펩신가수분해물은 pH 7.5 (8.5 mg/mL)와 pH 5.5 (28.1 mg/mL)에서 2.8%와 11.5%의 DPPH 항산화활성을 보였다(Table 5). 이 같은 활성은 펩타이드 mg 당 각각 0.3%와 0.4%로서 동일함에 미루어 구성 펩타이드의 하전에 따른 차이는 없는

것으로 판단하였다. 양성대조군으로서 1 mM ascorbic acid의 DPPH 활성은 95.5%였다. 한편 ABTS 항산화활성은 pH 7.5(0.85 mg/mL)와 pH 5.5(2.81 mg/mL)에서 각각 62.8%와 99.6%로써 pH 5.5의 ABTS 활성은 양성대조군인 1 mM ascorbic acid의 ABTS 활성 99.7%와 거의 동일하였다. DPPH활성에 비하여 ABTS활성이 높은 것은 DPPH활성은 비극성 물질의 활성을 측정하는 반면, ABTS 활성은 극성물질의 활성 측정에 적합하기 때문이다. 실험에 사용한 광어껍질 가수분해물이 수용성 펩타이드 물질이기 때문인 것으로 추정된다.

피부 섬유아세포에서 콜라겐 발현량은 가수분해물에 농도의존적으로 증가하였으며, 음성대조군에 비하여 1000 ppm농도에서 74.1% 증가하였고 100 μM ascorbic acid에 비하여 약 7.5배의 콜라겐 발현량을 보였다(Table 5).

Table 5. DPPH radical scavenging, procollagen synthesis ability, inhibition of collagenase, *Propionibacterium acnes* inhibition and tyrosinase inhibition of peptic hydrolysate from the flounder skin

Function	Condition	Concentration	Activity
DPPH	pH 7.5	8.5 mg/mL	2.8±0.5%
	pH 5.5	28.1 mg/mL	11.5±1.2%
	Ascorbic acid	1 mM	95.5±0.1%
ABTS	pH 7.5	0.85 mg/mL	62.8±2.4%
	pH 5.5	2.81 mg/mL	99.6±0.0%
	Ascorbic acid	1 mM	99.7±0.0%
Procollagen synthesis ability	Hydrolysate	250 ppm	20.49%
		500 ppm	26.33%
		1000 ppm	74.06%
	Ascorbic acid	0.1 mM	9.90%
Collagenase inhibition	pH 7.5	8.5 mg/mL	100.0±0.7%
	pH 5.5	28.1 mg/mL	100.0±2.1%
	Ascorbic acid	1 mM	21.3±10.2%
	Gly-Pro-Hyp	1 mg/mL	non-detection
<i>Propionibacterium acnes</i> inhibition	pH 7.5	0.43 mg/50 uL	negative
	pH 5.5	1.41 mg/50 uL	negative
	salicylic acid	1.2 mg/30 uL	12 mm
Tyrosinase inhibition	pH 7.5 (10 mg/mL)	10 mg/mL	9.9±1.1%
	pH 5.5 (10 mg/mL)	10 mg/mL	2.6±1.5%
	Arbutin	0.5 mg/mL	73.9±9.1%

콜라게네이즈 활성 저해능은 pH 7.5(8.5 mg/mL)와 pH 5.5(28.1 mg/mL)에서 각각 100%의 저해능을 보였으며, 양성대조군으로 사용한 1 mM ascorbic acid의 콜라게네이즈 저해능은 21.3%인 반면 건강기능성 개별인정형 저분자콜라겐의 지표물질로 사용하고 있는 펩타이드 GP Hyp는 콜라게네이즈 저해활성을 보이지 않았다(Table 5). 이 같은 결과는 GP Hyp가 type I형 콜라겐의 아미노산 서열을 반영한 저분자콜라겐 제조공정의 지표물질일 뿐 피부건강기능성식품의 유효성분이 아닌 것으로 추정된다. 그러나 GP Hyp 펩타이드가 콜라겐 가수분해물의 피부주름을 개선하는 효과에 대한 보고가 있어서 좀더 검토할 필요가 있다 [27].

한편 disk 법으로 측정한 여드름 균의 성장억제 효과는 pH 7.5 (0.43 mg/50 uL)와 pH 5.5(1.41 mg/50 uL)에서 확인되지 않은 반면 양성대조군 salicylic acid(1.2 mg/30 uL)에서 12 mm의 환을 확인하였다(Table 5). 이 같은 결과는 콜라겐 가수분해물은 여드름 균인 *Propionibacterium acne*의 성장억제 기능을 포함하지 않음을 뜻한다.

광어껍질 가수분해물의 pH 7.5와 pH 5.5에서 티로시네이즈 저해활성은 10 mg/mL의 농도에서 각각 9.9%와 2.6%로서 arbutin 0.5 mg/mL의 73.9%에 비하여 현저히 낮았다(Table 5). 그러나 껍질 가수분해물(pH 5.5) DPPH와 ABTS 라디칼 소거능은 2.81 mg/mL와 2.81 mg/mL 농도에서 각각 11.5%와 99.6%로서 ABTS 라디칼 소거능은 1 mM ascorbic acid의 99.7%와 유사한 결과를 보였다. 양성대조군 arbutin은 진달래과 *Arctostaphylos* 속의 bearberry 식물에서 추출한 glycosylated hydroquinone으로서 국소 적용시에 티로시네이즈 활성을 억제하여 멜라닌 생성을 예방한다. Arbutin의 티로시네이즈 제해 IC<sub>50</sub> 값은 100 uM이며, ascorbic acid는 400~500 uM이었고 티로시네이즈 저해 활성 95%의 kojic acid, albutin 및 ascorbic acid 농도는 각각 100 uM, 700 uM 및 800 uM이었다[35]. Castro 등은 소 콜라겐 가수분해물은 멜라노마 세포 증식을 저해한다고 보고하였다[36]. 이 같은 보고에 미루어 티로시네이즈 저해활성은 소재 화합물의 지

질친화성과 밀접한 상관을 가지며, 멜라노마 세포 증식억제와 상관이 없는 것으로 판단된다.

## 결론

저분자 콜라겐 가수분해물 제조를 위한 최적공정을 확립하고, 가수분해물의 아미노산 조성, 분자량 분포, 라디칼 소거능, 콜라게네이즈와 티로시네이즈 저해활성과 여드름균 성장 억제 효과를 측정하였다. 가수분해효소는 펩신이 가장 적절하였으며 1단 최적가수분해 조건은 효소 대 기질비 2%(w/w), pH 2.0, 반응온도 50°C였다. 펩신은 300 Da 미만의 저분자 생성량이 가장 높았으며, 공정관리 지표물질로 설정한 GP Hyp 펩타이드는 펩신 가수분해물에서만 MLADI-Tof 스펙트럼에서 검출되었다. DPPH 라디칼 소거능에 비하여 pH 5.5에서 ABTS 라디칼 소거능은 1 mM ascorbic acid와 동일하였다. 콜라게네이즈 저해활성은 pH 7.5와 pH 5.5에서 1 mM ascorbic acid에 비하여 약 5배 정도 높았다. 한편 여드름 균 저해능은 관측되지 않았으며, 티로시네이즈 저해능 역시 arbutin에 비하여 현저히 낮음을 확인하였다. 그러나 pH 5.5에서 1 mM ascorbic acid에 상당하는 ABTS 항산화능과 1 mM ascorbic acid를 상회하는 콜라게네이즈 저해능은 자외선 조사에 의한 피부 개선 효과를 기대할 수 있기 때문에 광어껍질 유래 펩신가수분해물은 수용성 항산화제 및 피부주름 개선을 위한 소재로 활용 가능할 것으로 판단하였다.

## 감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 “지역특화산업육성(R&D, 과제번호 P0015257)” 사업의 지원을 받아 수행된 연구결과임.

## References

1. Ding, J. F., Li, Y. Y., Xu, J. J., Su, X. R., Gao, X., Yue, F. P. 2011. Study on of jellyfish collagen hydrolysate on anti-fatigue and antioxidation. *Food Hydrocolloids*, 25: 1350-13532.
2. Zhang, Y., Olsen, K., Grossi, A., Otte, J. 2013. Effect of pretreatment on enzymatic hydrolysis of bovine collagen and formation of ACE peptides, *Food Chem*, 141: 2343-2354.
3. Wang, L., Jiang, Y., Wang, X., Zhou, J., Cui, H., Xu, W., He, Y., Ma, H., Gao, R. 2018. Effect of oral administration of collagen hydrolysates from Nile tilapia on the chronologically aged skin. *J Funct Foods*, 44: 112-117.
4. Zhang, J. B., Zhao, Y. Q., Wang, Y. M., Chi, C. F., Wang, B. 2019. Eight collagen peptide from hydrolysate fraction of spanish mackerel skins: Isoaltion, identification, and in vitro antioxidant activity evaluation. *Marine Drus*, 17: 224.
5. Lai, C. S., Tu, C. W., Kuo, H. C., Sun, P. P., Tsai, M. L. 2020. Type II collagen from cartilage of *Acipenser baerii* promotes wound healing in human dermal fibroblasts and in mouse skin. *Marine Drugs* 18: doi/10.3390/md18100511.
6. Zheng, J., Tian, X., Xu, B., Yuan, F., Gong, J., Yang, Z. 2020. Collagen peptides from swim bladders of giant croaker (*Nibea japonica*) and their protective effects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage toward human umbilical vein endothelial cells. *Marine Drugs*, 18: 430
7. Zhang, X., Dai, Z., Zhang, Y., Dong, Y., Hu, X. 2021. Structural characteristics and stability of salmon skin hydrolysates obtained with different proteases. *LWT-Food Sci Technol*, doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112460
8. 연구개발진흥특구재단. 2021. 콜라겐 시장
9. Byeun, J. H., Jeon, J. G. 2004. *Seafood chemistry*, Suhaksa, Seoul, Korea.
10. Richard-Blum S. 2011. The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, a004978.
11. Hong, H., Fan, H., Chalamaiah, M., Wu, J. 2019. Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives. *Food Chem*, 301: 125222-
12. Liang, Q., Wang, L., He, Y., Wang, Z., Xu, J., Ma, H. 2014. Hydrolysis kinetics and antioxidant activity of collagen under simulated gastrointestinal digestion. *J Funct Foods*, 11:493-499.
13. Mirzapour-Kouhdasht, A., Moosavi-Nasab, M., Kim, Y. M., Eun, J. B. 2021. Antioxidant mechanism, antibacterial activity, and functional characterization of peptide fractions obtained from barred mackerel gelatin with a focus on application in carbonated beverages. *Food Chem*, 343: 128339.
14. Saito, M., Kiyose, C., Higuchi, T., Uchida, N., Suzuki, H. 2009. Effect of collagen hydrolysates from salmon and trout skins on the lipid profile in rats. *J Agric Food Chem*, 57: 10477-10482.
15. Kato, S., Matsui, H., Saitoh, Y., Miwa, N. 2011. Fish collagen-containing drink is subcutaneously absorbed and attenuates the UVA-induced tissue-integrity destruction and DNA damages in



- 3D-human skin tissue model. J Funct Foods, 3: 50-55.
16. Chen, T., Hou, H., Fan, Y., Wang, S., Chen, Q., Si, L., Li, B. 2016. Protective effect of gelatin peptides from pacific cod skin against photoaging by inhibiting the expression of MMPs via MAPK signaling pathway. J Photochem. Photobiol. B: Biology, 165: 34-41.
  17. Lu, J., Hou, H., Fan, Y., Yang, T., Li, B. 2017. Identification of MMP-1 inhibitory peptides from cod skin gelatin hydrolysates and the inhibition mechanism by MAPK signaling pathway. J Funct Foods, 3: 251-260.
  18. Ito, N., Seki, S., Ueda, F. 2018. Effects of composite supplement containing collagen peptide and ornithine on skin conditions and plasma IGF-1 levels-A randomized, double blind, placebo-controlled trials. Marine Drugs, 16:482
  19. Wang, L., Jiang, Y., Wang, X., Zhou, J., Cui, H., Xu, W., He, Y., Ma, H., Gao, R. 2018. Effect of oral administration of collagen hydrolysates from Nile tilapia on the chronologically aged skin. J Funct Foods, 44:112-117.
  20. Zhao, M., Han, X., Liu, Z., Li, Y. 2010. Marine collagen peptide isolated Chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin facilitates learning and memory in aged C57BL/6J mice. Food Chem, 118: 333-340.
  21. Zhu, C. F., Li, G. Z., Peng, H. B., Zhang, F., Chen, Y., Li, Y. 2010. Effect of marine collagen peptides on markers of metabolic nuclear receptors in type 2 diabetic patients with/without hypertension. Biomedical Environmental Sci, 23:113-120.
  22. Frei, V., Perrier, E., Orly, I., Huc, A., Augustin, C., Danour, O. 1998. Activation of fibroblast metabolism in a dermal and skin equivalent model: a screening test for activity of peptides. Int J Cos Sci, 20: 159-173.
  23. Gorouhi, F., Maibach H.I. 2017. Tropical peptides and proteins for aging skin. In Textbook of aging skin, Farage, M.A., Miller, K.W., Maibach, H.I. (2nd Eds.), Springer, Berlin, Germany, p 1865-1896.
  24. Kwon, M. C., Kim, C. H., Kim, H. S., Syed, A. Q., Hwang, B. Y., Lee, H. Y. 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.
  25. Liu, Y., Su, G., Wang, S., Sun, B., Zheng, L., Zhao, M. 2019. A highly absorbable peptide GLPY derived from elastin protect fibroblast against UV damage via suppressing Ca<sup>2+</sup> influx and ameliorating the loss of collagen and elastin. J Funct Foods, 61; 103487.
  26. 식품의약품안전처. 2016. 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황
  27. Kang, M. K., Kim, D. Y., Oh, H., Kim, S. I., Oh, S. Y., Na, W., Park, S. H., Park, K., Kim, J. I., Kim, A. H., Kang, Y. H. 2021. Dietary collagen hydrolysates ameliorate furrowed and parched skin caused by photoaging in hairless mice. Int J Mol Sci, 22: 6137.
  28. Spies, J. R. 1957. Methods in Enzymology III. Colowick, SP. and Kaplan NO.(Eds.), Academic press Inc, N.Y., p.467-477.
  29. Lee, S. S., Park, S. H., Kim, H. A.,

- Choi, Y. J. 2016. Fermentation process for odor removal of oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysate and its properties. J Korean Soc Food Sci Nutr, 45: 542-550
30. Wang, Z., Liu, X., Xie, H., Liu, Z., Rakariyatham, K., Yu, C., Shahidi, F., Zhou, D. 2021. Antioxidant activity and functional properties of Alcalase-hydrolyzed scallop protein hydrolysate and its role in the inhibition of cytotoxicity in vitro. Food Chem, 344: 128566.
31. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloration assay. Free Radical Biol & Med, 26: 1231-1237.
32. Zhang, X., Dai, Z., Zhang, Y., Dong, Y., Hu, X. 2021. Structural characteristics and stability of salmon skin hydrolysates obtained with different proteases. LWT-Food Sci Technol, doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112460
33. Grant, G. A., Crankshaw, M. W., Crankshaw, C. L. 2005. Enzymatic digestion strategies for sequence analysis, In The encyclopedia of mass spectrometry vol 2; Biological application, Part A: Peptides and proteins, Caprioli R.M., Gross M.L. (Eds.), Elsevier, NY, p.151-157.
34. Nelson, D. L., Cox, M. M. 2014. Lehninger; Principles of Biochemistry, Worldscience, Seoul, Korea, p. 100.
35. Park, Y., Lee, S. J., Park, J., Park, D. 2003. Effects of kojic acid, arbutin and vitamin C on cell viability and melanin synthesis in B16BL6 cells. J Soc. Cosmetic. Sci. Korea, 29: 151-167.
36. Castro, G. A., Maria, D. A., Bouhallab, S., Sgarbieri, V. C. 2009. In vitro impact of a whey protein isolate(WPI) and collagen hydrolysates(CHs) on B16F10 melanoma cells proliferation. J Dermatological Sci, 56: 51