돈피젤라틴 효소분해물의 항산화 활성 및 신경세포보호효과

김동욱¹ · 박기문¹ · 하고은² · 정주리¹ · 장운기² · 함준상² · 정석근² · 박범영² · 송진³ · 장애라*

강원대학교 동물식품응용과학과, ¹성균관대학교 식품생명공학과,

²농촌진흥청 국립축산과학원, ³농촌진흥청 국립농업과학원

Anti-oxidative and Neuroprotective Activities of Pig Skin Gelatin Hydrolysates

Dong Wook Kim¹, Kimoon Park¹, Goeun Ha², Ju Ri Jung¹, Ounki Chang², Jun-Sang Ham²,
Seok-Geun Jeong², Beom-Young Park², Jin Song³, and Aera Jang*

Department of Animal Products and Food Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Department of Food Science and Biotechnology, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

²National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

³National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-853, Korea

Abstract

This study was conducted to determine the antioxidative and neuroprotective effect of pig skin extracts (PS) and pig skin gelatin hydrolysates (LPS) using a human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y). The extraction yield of PS was 3 fold higher than that of LPS. The protein content of PS was about 10 fold higher than that of LPS ($p<0.05$). Also LPS increased anti-oxidative activity dose dependently, and the activity was significantly higher than PS at all concentration ($p<0.05$). DPPH radical scavenging activity of LPS at 50 mg/mL was 92.97%, which was similar to 1 μ M vitamin C as a positive control. ABTS radical scavenging activity of LPS (20 mg/mL) was 89.83% and oxygen radical absorbance capacity of LPS at 1 mg/mL was 141.39 μ M Trolox Equivalent/g. No significant change of human neuroblastoma cells was determined by MTT test. Cell death by oxidative stress induced by H_2O_2 and amyloid beta 1-42 ($A\beta_{1-42}$) was protected by LPS rather than PS. Acetylcholine esterase was significantly inhibited, by up to 33.62% by LPS at 10 mg/mL. Therefore, these results suggest that pig skin gelatin hydrolysates below 3 kDa have potential to be used as anti-oxidative and neuroprotective functional additives in the food industry, while further animal test should be determined in the future.

Key words: gelatin hydrolysates, collagen, neuroblastoma cell, acetylcholine esterase, pig skin

서론

치매는 보통 뇌의 만성 또는 진행성 질환에서 생긴 인지 능력의 장애를 나타내는 뇌 질환으로, 발병율과 유병율은 지속적으로 증가하여 2012년 우리나라의 치매 환자는 53만 4000명으로 2008년(42만 명)에 비해 26.8% 증가하였으며, 2025년에는 100만 명이 넘을 것으로 추정하고 있을 만큼 치매 환자에 대한 대책 마련이 시급한 실정이다 (Ministry of Health and Welfare, 2012).

노인성 치매의 원인은 다양하며, 치매의 종류로는 알츠하이머형(Alzheimer's disease/AD), 혈관성, 대사성, 알코올

성 치매 등이 있다(Lee *et al.*, 2007) 그 중에서도 알츠하이머형 치매가 50% 이상으로 큰 비중을 차지하고 있다. AD환자들의 뇌는 free radical 손상에서 기인하는 산화적 스트레스(oxidative stress)가 퇴행성 신경질환인 알츠하이머형 치매를 일으킨다는 연구가 알려져 있고(Ames *et al.*, 1993), 산화적 신경세포손상 때문에 장애가 발생한다고 보고되었다(Dnize and Rita, 1986). 또한 퇴행성 뇌신경질환인 AD형 치매의 병리학적 특징은 amyloid β protein ($A\beta$)의 과도한 축적으로 인해 발생된다고 알려져 있다(Lu *et al.*, 2009). $A\beta$ 는 38개에서 43개 정도의 아미노산으로 이루어져 있는데, 신경세포에 독성을 일으키는 것은 42개의 펩티드로 알려져 있으며(Barril *et al.*, 2001), 특히 뇌 신경세포에서 $A\beta$ protein($A\beta_{1-42}$)이 과잉 생성되고, 과생성된 $A\beta$ protein은 녹지 않고, 뇌 속에 남아서 쌓이게 되면 염증반응 등의 다양한 방식으로 뇌세포를 죽이게 된다(Gong *et*

*Corresponding author: Aera Jang, Department of Animal Products and Food Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea. Tel: 82-33-250-8643, Fax: 82-33-251-7719, E-mail: ajang@kangwon.ac.kr

al., 2003). 이를 아밀로이드반(amyloid plaque) 또는 노인 반(senile plaque)이라고 한다. 최근에는 cholinergic system에서 인체 내 전기적 신호를 전달하는 신경전달물질인 acetylcholine(ACh)의 향상이 AD형 치매에 인지기능 증진에 도움이 된다고 알려지면서 cholinergic agonist나 acetylcholinesterase(AChE) inhibitor들을 통한 시냅스에서의 ACh의 함량을 증가시키는 연구가 진행되고 있다(Agusti, 1996). 현재까지 미국 식품의약품안전청(FDA)으로부터 AD병 치료제로 승인 받아 사용되는 의약품은 모두 AChE억제제로 Tacrin(Cognex), Donepezil(Ariceot), Rivastigmine(Exclon), Galanthamine(Reminil) 등이 있다(Davis *et al.*, 1992; Rogers *et al.*, 1998; Rosler *et al.*, 1999; Tariot *et al.*, 2000). 그러나 이 의약품들은 떨림증, 구토, 간독성 등의 부작용을 수반하고 있으며, 증세를 지연시켜 주는 역할을 할 뿐으로 아직까지는 근본적인 치료제는 개발되고 있지 않다. 따라서 기존의 AChE 억제제를 대체할 수 있는 천연물 유래 AChE 억제제에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

콜라겐은 동물성 기원이 풍부한 섬유상의 구조단백질로 생체단백질의 30%를 차지하며(Kim *et al.*, 2010), 생 분해성 및 낮은 항원성 등의 생물학적인 특성 때문에 안전한 생체 적합성을 가진다(Maeda *et al.*, 1999). 콜라겐으로부터 유도되는 섬유 상의 수용성 단백질인 젤라틴은 뼈와 조직을 구성하는 결체단백질로서 콜라겐의 열처리 및 효소가수분해 처리에 의해 제조된다. 콜라겐은 대부분 소(bovine)나 돼지(porcine)의 뼈와 가죽을 이용하여 생산되고 있으며, 현재 화장품, 식품, 건강보조식품, 식품 포장재 그리고 세포배양 등 다양한 분야에서 이용되고 있다. 젤라틴 원료로는 사용량이 많은 순서로 돈피(46%), 우피(29.4%), 돼지와 소뼈(23.1%)로 돈피가 가장 많이 사용되고 있으며 우피의 사용량은 감소하고, 돈피와 기타원료의 사용량이 증가하고 있다(Gómez-Guillén *et al.*, 2011). 우피와 돈피를 이용한 콜라겐 및 젤라틴은 광우병(bovine spongiform encephalopathy, BSE)과 구제역(foot and mouth diseases, FMD)에 따른 제한 등으로 인해 돼지를 이용한 콜라겐 및 젤라틴을 추출하는데 문제가 발생되고 있다(Sadowska *et al.*, 2003). 그러나 돈피는 어류 유래의 콜라겐보다 높은 함량의 imino acid를 가지고 있으며, 열 안정성 또한 높아 주로 사용되고 있다(Foegeding *et al.*, 1996).

단백질의 절단은 가수분해(hydrolysis)에 의하여 이루어지는데, 효소로 처리하여 얻어지는 펩타이드 및 저분자 단백질들은 각각의 고유 기능을 가지므로, 새로운 생물활성 소재로 이용될 가능성이 크다(Nam, 1999). 단백질 가수분해 효소는 여러 종류가 있지만 상업적인 효소 중에서 flavourzyme을 많이 사용하고 있다. Flavourzyme은 *Aspergillus oryzae*에서 유래된 효소로 사슬 중간을 절단하는 엔도펩티다아제(endoproteinase)와 사슬 양 말단을 절단하는 엑소펩티다아제(exoproteinase)의 활성을 가지고 있다. 또한 효소

를 처리하여 분해된 가수분해물이 쓴맛을 내는 것이 많은데 flavourzyme은 이러한 쓴맛이 적고, 역가 지속성이 좋기 때문에 많이 이용되고 있다(Chae *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2012).

따라서 본 연구에서는 고분자인 돈피를 소화흡수가 용이하도록 저분자화한 돈피효소분해물의 항산화 활성 및 산화적 스트레스와 아밀로이드베타 단백질로부터 신경세포를 보호할 수 있는 물질을 탐색하고, acetylcholinesterase의 저해효과를 측정하여 AD형 치매 예방 및 기억력 증진에 효과를 위한 AChE 억제제로서의 활용 가능성을 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

추출에 사용된 돈피는 수원에 소재한 도축장에서 구매하였으며, 1,1-diphenyl-2picryl-hydrazyl(DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS), ascorbic acid, hydrogen peroxide (H₂O₂) solution, acetylcholinesterase, acetylthiocholine chloride, 5,5'-dithiobis [2-nitrobenzoic acid] (DTNB), tacrine, MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)는 Sigma 사(USA) 제품을 구입하였다. Flavourzyme은 novozymes(Denmark) 제품을 사용하였으며, 아밀로이드 베타(Aβ₁₋₄₂)는 미국의 아메리칸 펩티드(American Peptide Co. USA) 제품을 사용하였다. 세포주 배양을 위해 필요한 Dullbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum(FBS)는 Hyclone (Logcen, UT, USA)에서 구입하였으며, Penicillin/streptomycin은 WelGENE (Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

추출물의 제조

본 실험에서 사용된 돈피 추출과정은 Fig. 1에 나타내었다. 돈피는 지방제거 후 동결건조한 것을 고분자 돈피 처리구(PS)로 사용하였으며, PS 처리구에 8배의 물을 가한 후 80°C에서 1시간 수화시켜 젤라틴을 만들었다. 소화흡수율이 높은 저분자 펩타이드로 만들기 위해 flavourzyme을 0.3% 첨가하여 pH 7.0 보정 후 50°C에서 12시간 동안 분해하였다. 이를 membrane filter units(3 kDa, Millipore, Ireland)를 이용하여, 3 kDa 이하 크기의 용액을 분리하여 동결건조한 것을 저분자 돈피 효소 분해물 처리구(LPS)로 사용하였다. 동결 건조된 추출물은 -20°C 냉동고에 보관하여 사용하였다.

단백질 함량 측정

단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin) 용액을 표준용액으로 하고, bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit (Sigma Chemical Co., USA)를 사용하여 측정하였다.

Fig. 1. Diagram of sample preparation procedure of pig skin and pig skin gelatin hydrolysates.

아미노산 조성

아미노산 조성은 시료 400 µg을 취한 후 PICO-Tag 방법을 이용하여 hydrolysis 및 PITC labeling을 하였다. PITC labeling된 시료를 400 µl의 buffer에 녹여 그 중 10 µL을 취하여 Waters 510 HPLC(Waters Co., USA)에 loading하였으며, 254 nm에서 아미노산의 종류와 함량을 분석하였다. Column은 Waters Pico-tag column(3.9×300 mm, 4 mm)를 사용하였으며, 이동상으로 A 용매는 140 mM sodium acetate (6% acetonitrile), B 용매는 60% acetonitrile을 이용하여 gradient로 25분간 분석하였다.

전기영동 패턴

SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법을 이용하였으며, molecular weight range marker는 Sigma 사(USA)의 제품을 사용하였다.

5% stacking gel과 12% separating gel을 만들어 사용하였으며, 시료는 단백질을 정량 후, 2X sample buffer와 1:1로 혼합한 후 95°C에서 5분간 열처리하여 사용하였다. 전기영동장치(pageRun, AE-6531, ATTO, Japan)를 이용하여 20 mA로 전기영동하였으며, 젤은 염색액(0.25% Coomassie brilliant blue R-250, 5% methanol and 7.5% acetic acid)을 이용하여 염색하였으며, 7.5% acetic acid와 25% methanol으로 제조한 탈색액을 이용하여 탈색하였다.

LPS의 조성(LC-MS)

LPS의 분자량은 Tempo nano LC system(MDS SCIEX, Canada)와 hybrid Quadrupole-TOF MS spectrometer(Qstar Elite; Applied Biosystems, USA)를 이용하여 측정하였다. 분석컬럼은 Zorbax 300SB-C18 capillary column(75 µm i.d.×150 mm, 3.5 µm, 300 Å; Agilent Technologies, USA)이 있으며 flow rate는 300 nL/min으로 분석하였다. Mass data는 Analyst QS 2.0 software (Applied Biosystems)를 이용하여 분석하였다.

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) radical scavenging activity

DPPH 라디칼 소거능은 Blois(1958) 방법에 따라 측정하였다. 각 시료 1 mL과 0.2 mM DPPH solution(in methanol) 1 mL을 혼합하여 암실에서 30분간 반응시킨 뒤, UV/VIS spectrophotometer(SpectraMax Plus384, Molecular Devices, US)을 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 아래의 식에 따라 계산하였으며, positive control은 vitamin C(1 mg/mL)를 사용하였다.

DPPH 라디칼소거활성(%) =

$$1 - \frac{O.D(\text{Sample}) - O.D(\text{Ref})}{O.D(\text{Con})} \times 100$$

*Control = Distilled water (DW) 1 mL + 0.2 mM DPPH solution(in methanol) 1 mL

*Reference = DW 1 mL + MeOH 1 mL

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) radical scavenging activity

ABTS 라디칼 소거능은 Re 등(1999)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 7 mM ABTS 용액과 2.45 mM Potassium persulphate 용액을 혼합하고, ABTS⁺ 라디칼을 만들기 위해 실온에서 12-16시간 동안 암소 반응시켰다. 라디칼이 생성된 용액을 735 nm에서 흡광도 값이 0.700 ± 0.02 가 되도록 희석하였다. 시료 50 μ L와 ABTS⁺ 용액 950 μ L을 혼합하여 30°C 암실에서 30분간 반응시킨 뒤, UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 735 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼소거활성능은 아래의 식에 따라 계산하였으며, positive control은 vitamin C(1 mg/mL)를 사용하였다.

$$\text{ABTS 라디칼소거활성능 (\%)} = \frac{((\text{O.D(Con)} - \text{O.D(Sample)}) / \text{O.D(Con)}) \times 100}$$

*Control = 0.700 ± 0.02

Oxygen radical absorbance capacity(ORAC)

총 항산화능 측정에 널리 사용되고 있는 ORAC assay는 ORAC activity assay kit(CELL BIOLABS, USA)로 측정하였다. 96 well plate에 25 μ L 표준시약(trolox) 또는 시료를 넣고, 150 μ L 1X fluorescein working solution을 넣어 혼합한 뒤 37°C incubate에서 30분 동안 방치하였다. 이 후 25 μ L free radical initiator solution을 넣고 완전하게 혼합한 뒤 fluorescent microplate reader를 사용하여 37°C에서 excitation wavelength 480 nm 그리고 emission wavelength 520 nm에서 60분 동안 1분 간격으로 측정하였다. 표준시약(trolox)과 시료의 area under the curve(AUC)를 측정하였으며, 표준시약 농도와 AUC 간의 회귀곡선을 이용하여 결과는 ORAC은 μ M trolox equivalent/g으로 나타내었다.

세포배양조건

본 실험에서 사용한 사람의 신경모세포종 SH-SY5Y cell은 American Type Culture Collection(ATCC CRL-2266TM, USA)에서 구입하여 이용하였으며, 10% FBS가 함유한 DMEM 배지에 1% penicillin/ streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

세포독성시험(MTT assay)

세포독성을 나타내는 시료가 있는 경우를 확인하는 실험으로, Carmichael 등(1988)의 방법에 따라 MTT assay를 측정하였다. 세포배양 후 시료를 농도별로 처리하고, MTT

stock solution 시약을 4시간 동안 처리한 후 배지를 제거한다. 생성된 formazan crystals을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후, ELISA microreader(Biorad, CA)를 이용하여 540 nm에서 측정하고, 결과값은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과

각 돈피 추출물의 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과를 측정하기 위해 MTT reduction assay를 이용하여 측정하였다. SH-SY5Y 세포를 48-well plate에 well당 5×10^4 세포가 되도록 분주하고, 24시간 후 배양액을 제거하고 serum-free DMEM으로 분주한 다음 시료를 농도별로 처리하였다. 그리고 2시간 후 500 μ M의 H₂O₂를 처리하여 2시간 배양하고, MTT stock solution 시약을 4시간 동안 처리한 후 배지를 제거한다. 생성된 formazan crystals을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 후, ELISA microreader를 이용하여 540 nm에서 측정하고, 결과값은 대조군에 대한 백분율로 나타내었으며, positive control은 vitamin C(200 μ M)를 사용하였다.

A β_{1-42} 에 대한 신경세포 보호효과

각 돈피 추출물의 아밀로이드베타에 대한 신경세포 보호효과를 측정하기 위해 MTT reduction assay를 이용하여 측정하였다. SH-SY5Y 세포를 48-well plate에 well당 5×10^4 세포가 되도록 분주하고, 24시간 후 배양액을 제거한 다음 serum-free DMEM으로 분주하고, 시료를 농도별로 처리하였다. 그리고 2시간 후 10 μ M의 A β_{1-42} 를 처리하여 24시간 배양하고, MTT stock solution 시약을 4시간 동안 처리한 후 배지를 제거한다. 생성된 formazan crystals을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 후, ELISA microreader를 이용하여 540 nm에서 측정하고, 결과값은 대조군에 대한 백분율로 나타내었으며, positive control은 tacrine(1 μ M)을 사용하였다.

아세틸콜린에스테라아제(AChE) 저해활성

아세틸콜린에스테라아제 저해 활성 측정은 Ellmans 등(1961)의 방법을 변형하여 측정하였다. 완충용액은 50 mM sodium phosphate buffer(pH 8)을 제조하여 사용하였다. 시료반응은 96well plate에 완충액 20 μ L, 시료 20 μ L과 acetylcholinesterase(0.36 U/mL) 10 μ L를 첨가한 후, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8)에 녹인 Ellman's reaction mixture(0.5 mM acetylthiocholine chloride, 1 mM 5-5'-thiobis-2-nitrobenzoic acid)를 50 μ L를 첨가한 하여 37°C에서 60분간 배양하였다. UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 412 nm에서 측정하고, AChE 저해활성은 아래의 식에 따라 계산하였으며, positive control은 tacrine (1 μ M)을 사용하였다.

AChE inhibition (%) = $[1 - O.D(A)/O.D(B)] \times 100$

*A = 효소와 기질과 시료 반응 후 흡광도 - 대조구 흡광도

*B = 효소와 기질의 반응 후 흡광도 - 대조구 흡광도

통계분석

본 실험의 모든 결과는 SAS program(ver. 9.2 Statistics Analytical System)의 General Linear Model (GLM) 방법을 이용하여 분산 분석하였다. 처리군의 평균값 간의 비교를 위해 Duncan's multiple range test를 이용하여 5% 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

단백질함량

PS와 LPS 추출 수율은 각각 34.49%, 11.73%였다(data not shown). BCA 시약을 이용하여 단백질의 함량을 측정 한 결과는 Table 1에 나타내었다. 고분자 PS 처리구의 단백질 함량은 511.53 mg/g으로 저분자 LPS 처리구의 단백질 함량 54.43 mg/g에 비해 약10배 유의적으로 높은 함량을 나타내었다($p < 0.05$).

아미노산조성

각 돈피추출물을 염산 가수분해 후에 PICO-tag 방법에 의해 아미노산 조성을 분석한 결과는 Table 2에 나타내었다. 일반적으로 주요 콜라겐의 아미노산구성 및 배열은 hydroxyproline (Hyp), glycine (Gly), proline (Pro)으로 구성되어 있으며, Gly-Pro-Hyp의 구조가 반복되는 특징을 가지고 있다(Gilsenan and Ross-Murphy, 2000). 아미노산 조성의 비율은 육상 동물 콜라겐의 경우 hydroxyproline(8.6%), proline(11.6%), glycine(33%)으로(Li *et al.*, 2004), 본 연구결과와 유사한 아미노산 비율을 나타내었다. Proline의 경우 PS 처리구에서는 21.11%, LPS 처리구는 22.82%로 높은 함량을 나타내었다. 그 밖에 glutamic acid, arginine, aspartic acid, alanine 함량도 높게 나타났으며, 고분자인 PS 처리구와 저분자인 LPS 처리구의 아미노산 함량은 유사하게 나타났다.

전기영동 분석

고분자의 PS 처리구의 분자량을 알아보기 위해 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였으며, 발현된 band의 분자량을 측정한 결과는 Fig. 2(A)에 나타내었다. SDS-PAGE에 의한 band의 분자량은 45-200 kDa 사이의 크기를 보였으며 $\alpha_1(I)$ 과 $\alpha_2(I)$ band가 나타나 전형적인 type I형 콜라겐임을 나타내었다.

LPS 조성(LC-MS 프로파일)

저분자 LPS의 구성 물질의 분자량을 알아보기 위해 LC-

Table 1. Protein contents of Pig skin and Pig skin gelatin hydrolysates

Treatment	Protein content (mg/g dry weight)
PS	511.53±11.789 ^a
LPS	54.43±0.401 ^b

All values are means±S.E.

^{a-b}Means with different letters within a same row differ significantly at $p < 0.05$.

PS, pig skin; LPS, low molecular weight pig skin gelatin hydrolysates by flavorzyme.

Table 2. Amino acid composition of PS and LPS (%)

Treatment ¹⁾	PS	LPS
Cysteine	0.51	0.41
Aspartic acid	4.27	4.09
Glutamic acid	5.36	5.42
Hydroxyproline	10.99	10.55
Serine	2.42	2.37
Glycine	32.05	30.70
Histidine	1.10	0.88
Arginine	5.01	5.03
Threonine	2.13	2.27
Alanine	4.31	4.19
Proline	21.11	22.82
Tyrosine	0.69	0.76
Valine	2.11	1.90
Methionine	0.54	0.59
Isoleucine	1.25	1.48
Leucine	2.69	2.87
Phenylalanine	1.53	1.61
Tryptophan	0.13	0.17
Lysine	1.82	1.88

All values are means±S.E.

PS, pig skin; LPS, low molecular weight pig skin gelatin hydrolysates by flavorzyme.

MS를 이용하여 분석한 결과는 Fig. 2(B)에 나타내었다. 저분자 LPS를 구성하는 물질의 분자량은 m/z 471.3-2,299.2 Da 사이를 나타내어 LPS는 3 kDa 이하의 저분자 물질로 구성되어 있음을 확인하였다. PS의 구성 단백질의 크기가 45-200 kDa이었으나 flavorzyme 효소분해와 membrane cut-off를 통해 3 kDa 이하의 저분자 물질(LPS)로 분리되었음이 확인되었다.

PS와 LPS의 항산화 활성

DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 비교적 짧은 시간 내에 간단하게 측정할 수 있어 항산화 측정 실험에 넓게 사용되고 있으며(Que *et al.*, 2006), DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Fig. 3(A)에 나타내었다. 각 돈피추출물의 농도가 증가함에 따라 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 경향을 나타내었으며, 농도 50 mg/mL에서 각각 63.74%와 91.97%의 소거활성을 나타내었다. 고분자 PS 처리구보다는 저분

Fig. 2. SDS-Page profile of PS (A) and LC-MS profile of LPS (B). PS, Pig skin; LPS, Low molecular weight pig skin gelatin hydrolysates by flavorzyme.

자인 LPS처리구에서 높은 소거능을 나타냈으며, 특히 1 mg/mL의 LPS는 positive control로 사용된 vitamin C (1 mg/mL)에 비해 12.2배 낮은 활성을 보였으나($p < 0.05$) 50 mg/mL의 농도에서는 대조군인 vitamin C와 유사한 활성을 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Fig. 3(B)에 나타내었다. 각 돈피추출물의 농도가 증가함에 따라 ABTS 라디칼 소거능이 증가하는 경향을 나타내었으며, 농도 20 mg/mL에서 각각 76.82와 89.83%의 높은 소거활성을 나타내었다. 양성대조군인(positive control) vitamin C(1 mg/mL)와 비교하였을 때 낮은 활성을 나타내었으나, PS 처리구보다는 LPS 처리구에서 높은 소거활성을 나타내었다($p < 0.05$). ABTS 라디칼 소거능이 DPPH 라디칼 소거능보다 높게 나타났으며, ABTS 방법은 DPPH 방법보다 수소 공여항산화제(hydrogen-donating antioxidant)와 연쇄절단형 항산화제(chain-breaking antioxidant)를 측정할 수 있고 수용상과 유기상 모두에 적용 가능한 장점이 있기 때문에(Re *et al.*, 1999) ABTS 라디칼 소거능이 더 높게 나타난 것으로 판단된다. 한편, vitamin C의 DPPH와 ABTS 소거능은 각각 95.62와 92.63%를 보여 유사한 효과를 보였는데 이는 vitamin C가 정제된 성분이기 때문에 본 연구에 이용된 PS와 LPS에 비해 동일한 항산화 특성을 나타낸 것으로 판단된다. 이는 Kwak 등(2010)이 제시한 결과와 유사한 경향을 나타내어 자색고구마 추출물의 항산화 활성 측정시 positive control로 이용된 vitamin C 1.25 mg/mL 처리시 DPPH와 ABTS 소거능이 약 95-98%를 나타내었다.

Oxygen radical absorbance capacity(ORAC)

ORAC assay는 항산화 활성 측정을 판단하는 표준방법의 하나로 측정 감도가 예민하여 정확도를 높일 수 있는 방법(Prior *et al.*, 2005)으로 ORAC을 측정한 결과는 Fig. 3(C)에 나타내었다. 항산화 활성 비교를 위해 vitamin E 수용성 유도체인 Trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)를 표준시약으로 사용하였다. 각 돈피추출물의 농도가 증가함에 따라 ORAC활성이 증가하는 경향을 나타내었으며($p < 0.05$), 특히 LPS처리구의 농도 1 mg/mL에서 141.39 μ M TE/g의 높은 활성을 나타내었었으나, 농도대비 ORAC 활성은 상대적으로 약 10배 정도 낮았다. DPPH, ABTS 라디칼 소거능과 유사한 경향을 나타내었으며, ORAC 활성 결과에서도 고분자 PS 처리구보다는 저분자인 LPS 처리구에서 높은 활성을 나타내었다. 항산화 활성 결과를 종합해보면, 모든 항산화 분석 항목에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었고($p < 0.05$), 고분자인 PS 처리구보다는 저분자인 LPS 처리구에서 유의적으로 높은 항산화 활성을 나타내었다.

세포독성시험(MTT assay)

MTT assay는 세포의 미토콘드리아 물질대사 능력을 측정하는 것으로 세포 내 산화 환원반응으로 세포 생존율을 측정하는 대표적인 실험방법이다. 신경모세포종 SH-SY5Y 세포에 고분자 PS 처리구와 저분자인 LPS 처리구를 10, 50, 100, 200, 500 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때 세포 생존율에 미치는 영향을 알아본 결과 모든 처리 농도에서 Control 처리구와 유사한 생존율을 나타내어, SH-SY5Y 세포에 독성을 보이지 않는 것으로 나타났(Fig. 4).

Fig. 3. DPPH (A), ABTS (B) radical scavenging activities and ORAC (C) activities of PS and LPS. All values are means±S.E. Vit. C, vitamin C; PS, pig skin; LPS, low molecular weight pig skin gelatin hydrolysates by flavorzyme.

Fig. 4. Cytotoxicity of PS and LPS on human neuroblastoma cell (SH-SY5Y). All values are means±S.E. PS, pig skin; LPS, low molecular weight pig skin gelatin hydrolysates by flavorzyme.

산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과

미토콘드리아는 신경세포에서 산화적 손상에 대하여 취약한 세포기관 중 하나로서(Wallace, 1992), SH-SY5Y 신경

세포에 활성산소종인 H_2O_2 를 처리하여 유발시킨 산화적 스트레스에 대한 각 돈피추출물의 신경세포 보호효과를 확인해본 결과는 Fig. 5(A)에 나타내었다. 세포 생존율은 $500 \mu M$ H_2O_2 를 처리한 처리구에서 control 처리구 100%에 비해 56.47%의 생존율을 나타내었으며, H_2O_2 와 $200 \mu M$ vitamin C를 동시에 처리한 처리구에서는 97.54%의 생존율로 H_2O_2 대비 41.07%의 신경세포 보호효과를 나타내었다. 고분자인 PS 처리구보다는 저분자인 LPS 처리구에서 농도의존적으로 산화적 스트레스를 효과적으로 감소시키는 경향을 나타내었다($p < 0.05$). 또한 10, 30, 50, $100 \mu g/mL$ 농도를 처리하였을 때, 각각 75.98, 78.03, 82.14, 86.45%의 생존율을 나타내었으며, $200 \mu g/mL$ 농도를 처리하였을 때, 91.17%의 높은 생존율을 보였으며 H_2O_2 대비 34.70%의 신경세포 보호효과를 나타내었다. H_2O_2 로 유도된 스트레스 상태의 세포에서 돈피 추출물이 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향을 확인해본 결과를 Fig. 5(B)에 나타내었다. Control 처리구에서는 건강하게 뽀얀 신경돌기의 모습을 관찰하였으며, H_2O_2 처리구에서는 산화적 스트레스로 인하여 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 나타내어 신경세포의 형태

Fig. 5. Neuroprotective effects of PS and LPS against H₂O₂ induced oxidative damage in neuroblastoma brain (SH-SY5Y) cells (A) and analysis of microscopic morphological changes by PS and LPS in SH-SY5Y cells (B). All values are means±S.E. H₂O₂, Hydrogen peroxide; Vit. C, vitamin C; PS, pig skin; LPS, low molecular weight pig skin gelatin hydrolysates by flavorzyme.

학적으로 모양이 변화되었다는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 저분자 LPS 처리구에서는 처리농도가 증가할수록 신경세포 손상 정도가 회복되는 것을 확인할 수 있어 신경세포보호에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

베타아밀로이드(Aβ₁₋₄₂)에 대한 신경세포 보호효과

독성 단백질인 Aβ₁₋₄₂는 강력한 치매 유발 물질로 알려져 있다(Varadarajan *et al.*, 2000). 신경세포에 Aβ₁₋₄₂를 처리하여 각 돈피추출물의 신경세포 보호효과를 확인하였다(Fig. 6(A)). 세포 생존율은 Aβ₁₋₄₂를 처리한 처리구에서 control 처리구 100%에 비해 67.63%의 생존율을 나타내었다. Aβ₁₋₄₂와 1 μM Tacrine를 동시에 처리한 처리구에서는 88.31%의 생존율로 Aβ₁₋₄₂ 대비 20.68%의 신경세포 보호효과를 나타내었다. 고분자 PS 처리구 200 μg/mL 농도를 처리하였을 때, 79.14%의 생존율을 나타내었다. 저분자 LPS 처리구에서는 100, 200 μg/mL 농도일 때, 각각 82.01, 89.39%의 높

Fig. 6. Neuroprotective effects of PS and LPS against Aβ₁₋₄₂ induced oxidative damage in neuroblastoma brain (SH-SY5Y) cell (A) and analysis of microscopic morphological changes by PS and LPS in SH-SY5Y cells (B). All values are means±S.E. Aβ, amyloid beta protein; THA, Tacrine; PS, pig skin; LPS, low molecular weight pig skin gelatin hydrolysates by flavorzyme.

은 세포 생존율을 나타내었으며, Aβ₁₋₄₂ 대비 14.38, 21.76%의 신경세포 보호 효과를 나타내었다. 이는 positive control인 tacrine (1 μM)과 유사한 신경세포 보호 효과를 나타내었다($p < 0.05$). 신경세포에 독성 단백질 Aβ₁₋₄₂ 처리하여 돈피 추출물이 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향을 확인해본 결과 Fig. 6(B)에 나타내었다. Control 처리구에서는 건강하게 뽀얀 신경돌기의 모습을 관찰하였으며, Aβ₁₋₄₂ 처리구에서는 독성 단백질에 의하여 신경돌기가 소멸되고 세포 모양이 변형되었다. 그러나 고분자 PS 처리구 200 μg/mL 농도일때, 신경돌기가 회복되는 것을 확인하였으며, 특히 저분자 LPS 처리구에서는 50, 100, 200 μg/mL 농도일 때, 신경세포 손상 정도가 회복되는 것을 확인하였다.

아세틸콜린에스테라아제(AChE) 저해활성 측정

각 돈피추출물이 acetylcholine esterase의 활성을 저해하여 기억력 증진 및 인지개선에 중요한 역할을 하는 AChE

Fig. 7. Acetylcholine esterase inhibitory activities of PS and LPS. All values are means $\pm$ S.E. THA, Tacrine; PS, pig skin; LPS, low molecular weight pig skin gelatin hydrolysates by flavorzyme.

저해활성을 측정한 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 고분자 PS 처리구에서는 AChE 저해효과를 볼 수 없었고 저분자 LPS 처리구 농도가 증가함에 따라 AChE 저해활성을 증가하는 경향을 나타내었으며, 특히 농도 100 mg/mL일 때 33.62%로 positive control인 tacrine(1 μ M)과 유사한 저해활성효과를 나타내었다($p < 0.05$). 이는 LPS 항산화 활성 및 신경세포 보호효과 뿐만 아니라 AChE 저해 효과를 나타내어 기억력 증진 및 AD 치매예방에 효과가 있을 것으로 기대되며, 또한 LPS의 AChE 억제제로서의 활용 가능성을 나타내었다.

요 약

각 돈피추출물의 수율과 단백질함량은 고분자 PS 처리구에서 높은 함량을 나타내었으며, 특히 단백질 함량은 저분자 LPS 처리구에 비해 유의적으로 높았고, 약 10배 정도의 높은 단백질 함량을 나타내었다($p < 0.05$). 항산화활성 측정결과 처리 농도가 증가할수록 높은 항산화 활성을 나타내었으며($p < 0.05$), 특히 고분자 PS 처리구에 비해 저분자 LPS 처리구에서 유의적으로 높은 효과를 나타내었다. ORAC 활성은 LPS 농도 1 mg/mL일 때, 141.39 μ M TE/g의 높은 활성을 나타내었다. 각 돈피추출물을 신경모세포종 SH-SY5Y 세포에 고농도로 처리한 결과 세포에 독성을 나타내지 않았다. 신경세포에 과산화수소를 처리하여 유발시킨 산화적 스트레스에 대한 PS와 LPS의 신경세포 보호효과를 확인한 결과, 모든 처리구에서 농도 의존적으로 세포 보호효과를 나타내었다. 특히 저분자인 LPS 처리구 농도 100 μ g/mL일 때, 86.45%의 세포생존율을 보였으며 H_2O_2 대비 29.98%의 신경세포보호효과를 나타내었다. 독성 단백질인 $A\beta_{1-42}$ 를 처리하여 신경세포 보호효과를 확인한 결과, 고분자 PS 처리구보다는 저분자인 LPS 처리구 농

도 100 μ g/mL일 때, 82.01%의 생존율을 보였으며 $A\beta_{1-42}$ 대비 14.38%의 신경세포보호효과를 나타내었다($p < 0.05$). AChE 저해효과를 확인해 본 결과, 고분자 PS 처리구에서는 거의 효과가 나타나지 않았으나, 저분자인 LPS 처리구에서는 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 농도 100 mg/mL일 때 33.62%의 높은 저해 효과를 나타내었다. 따라서 본 연구결과 돈피에서 분리한 3 kDa 이하의 저분자 효소분해물인 LPS는 높은 항산화 활성을 나타내었고, H_2O_2 와 $A\beta_{1-42}$ 로 유발시킨 산화스트레스에 대한 신경세포 보호효과 및 AChE 저해 효과를 나타내어 향후 항산화 활성 및 신경세포보호를 위한 축산식품 소재로 이용 가능성이 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ008585)의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Agusti, K. T. (1996) Therapeutic values of onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.). *Indian J. Exp. Biol.* **34**, 634-640.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., and Hagen, T. M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 7915-7922.
- Barril, X., Orozco, M., and Luque, F. J. (2001) Toward improved acetylcholinesterase inhibitors: a structural and computational approach. *Mini. Rev. Med. Chem.* **1**, 255-266.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Carmichael, J., Mitchell, J. B., DeGraff, W. G., Gamson, J., Gazdar, A. F., Johnson, B. E., Glatstein, E., and Minna, J. D. (1988) Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br. J. Cancer.* **57**(6), 540-547.
- Chae, H. S., Yoo, Y. M., Ahn, C. N., Cho, S. H., Park, B. Y., Lee J. M., Kim Y. K., Yun S. G., and Choi, Y. I. (2003) Chemical and sensory characteristics of boiled soup extracted from crossbred Ogol chicken as affected by the level of flavourzyme. *Korean J. Poult. Sci.* **30**, 11-16.
- Davis, K. L., Thal, L. J., Gamzu, E. R., Davis, C. S., Woolson, R. F., and Gracon, S. I. (1992) A double-blind, placebo-controlled multicenter study of tacrine for Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **327**, 1253-1259.
- Dnize, F. D. and Rita, L. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **22**, 271-277.
- Ellman, G. L., Countney, K. D., Andress, V., and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination acetylcholine esterase activity. *Biochem Pharmacol.* **7**, 88-95.
- Foegeding, E., Lanier, T. C., and Hultin, H. O. (1996) Charac-

- teristics of edible muscle tissue. In: Food Chemistry. Fennema, O.R. (ed) 3rd ed, Marcel Dekker, Inc., NY, pp. 879-942.
11. Gilseman, P. M. and Ross-Murphy, S. B. (2000) Rheological characterization of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloid*. **14**, 191-195.
 12. Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballeo, M. E., and Montero, M. P. (2011) Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloid*. **25**, 1813-1827.
 13. Gong Y., Chang L., Viola K. L., Lacor P. N., Lambert M. P., Finch C. E., Krafft G. A., and Klein W. L. (2003) Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A-beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. **100**, 10417.
 14. Kim, J. W., Kim, D. K., Kim, M. J., and Kim, S. D. (2010) Extraction and bleaching of acid-and pepsin-soluble collagens from shark skin and muscle. *Korean J. Food Pres.* **17**, 91-99.
 15. Kwak, J. H., Choi, G. N., Park, J. H., Kim, J. H., Jeong, H. R., Jeong, C. H., and Heo, H. J. (2010) Antioxidant and neuronal cell protective effect of purple sweet potato extract. *J. Agric. Life Sci.* **44**, 57-66.
 16. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 17. Lee, D. Y., Yun, J. Y., Kim, J. I., Kim, D. H., Han, I.S., and Lee, W. B. (2007) Protective effect of fibrion BF-7 on neuronal cell death in Alzheimer model using amyloid β peptide. *Kor. J. Anat.* **40**, 57-67.
 18. Lee, K. B., Shin, Y. K., and Baick, S. C. (2012) Effect of sodium caseinate hydrolysates on angiotensin-I converting enzyme inhibition activity. *Korean J. Food Sci. An.* **32**, 652-658.
 19. Li, H., Liu, B. L., Gao, L. Z., and Chen, H. L. (2004) Studies on bullfrog skin collagen. *Food Chem.* **84**, 65-69.
 20. Lu, P., Mamiya, T., Lu, L. L., Mouri, A., Zou, L., Nagai, T., Hiramatsu, M., Ikejima, T., and Nabeshima, N. (2009) Silibinin prevents amyloid beta peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 1270-1277.
 21. Maeda, M., Tani, S., Sano, A., and Fujioka, K. (1999) Microstructure and release characteristics of the mini pellet, a collagen-based drug delivery system for controlled release of protein drugs. *J. Con. Release* **62**, 313-324.
 22. Ministry of Health & Welfare (2012). 2nd General Plan for National Dementia (2013-2015). p. 1.
 23. Nam, H. S. (1999) Market tendency and development of physiological active peptide. *Kor. J. Food Ind. Nutr.* **4**, 17-19.
 24. Prior, R. L., Wu, X., and Schaich, K. (2005) Standardized method for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4290-4302.
 25. Que, F., Mao, L., Zhu, C., and Xie, G. (2006) Antioxidant properties of Chinese yellow wine, its concentrate and volatiles. *LWT-Food Sci. Technol.* **39**, 111-117.
 26. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying and improved ABTS radical action decolorization assay. *Free Radical Biol Med.* **26**, 1231-1237.
 27. Rogers, S. L., Farlow, M. R., Doody, R. S., Mohs, R., and Friedhoff, L. T. (1998) A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* **50**, 136-145.
 28. Rosler, M., Anand, R., Cicin-Sain, A., Gauthier, S., Agid, Y., and Dal-Bianco, P. (1999) Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease. International randomized controlled trial. *BMJ*. **318**, 633-638.
 29. Sadowska, M., Kolodziejska, I., and Niecikowska, C. (2003) Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chem.* **81**, 257-262.
 30. Tariot, P. N., Solomon, P. R., Morris, J. C., Kershaw, P., Lilienfeld, S., and Ding, C. (2000) A 5-month, randomized, placebo-controlled trial of galantamine in AD. The Galantamine USA-10 Study Group. *Neurology* **54**, 2269-2276.
 31. Varadarajan, S., Yatin, S., Aksenova, M., and Butterfield, D. A. (2000) Review: Alzheimer's amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J. Struct. Biol.* **130**, 184-208.
 32. Wallace, D. C. (1992) Mitochondrial genetics: A paradigm for aging and degenerative disease? *Science* **256**, 628-632.

(Received 2013.1.21/Revised 2013.3.20/Accepted 2013.3.20)