

몇가지 펩티드-동착체의 시험관내항산화활성

편 정 민

화장품의 질을 높이기 위하여서는 사람의 피부에 자극을 주지 않는 천연물질이면서도 피부재생작용과 상처아물촉진작용 등의 기능을 가진 첨가제들을 개발하여야 한다.

최근 GHK-Cu(글리실-히스티딜-리진과 동의 착체)가 항산화활성과 항염증활성, 상처아물촉진작용 등을 나타내는것으로 하여 화장품첨가제로 널리 리용[14, 15]되고있으며 합성펩티드인 GHK대신 피브로인, 콜라겐과 같은 천연단백질의 물작용분해물을 리용하기 위한 연구도 진행되고있다.

Cu^{2+} 은 필수미량원소로서 생물체안에서 진행되는 여러가지 생리적과정들에 참가하여 중요한 역할을 한다. 그러나 과잉의 Cu^{2+} 은 무기상태로 있을 때 활성산소를 발생시켜 산화과정을 촉진하며 항산화제들의 작용을 억제하여 세포독성을 나타낼수 있다.[6, 10, 18] 따라서 동화합물을 리용할 때에는 우선 Cu^{2+} 에 의하여 산화과정이 촉진되지 않는가 하는것을 검토해보아야 한다.

우리는 몇가지 천연단백질을 물작용분해하고 동과 반응시켜 얻은 펩티드-동착체들의 항산화활성을 측정하고 해당 펩티드 및 비타민 C(아스코르빈산)의 항산화활성과 비교하였다.

재료와 방법

견사를 1mol/L HCl용액에서 물작용분해(140℃, 2.5×10^5 Pa)한 후 활성탄탈색하고 음이온교환수지로 중화하여 견펩티드(평균펩티드길이 3)를 제조하였다.[9] 령압착콩깨묵으로부터 제조한 콩단백질과 돼지가죽으로부터 추출한 콜라겐을 *Bacillus licheniformis*기원의 알칼리성프로테아제와 *Aspergillus oryzae*기원의 중성프로테아제로 물작용분해하여 콩펩티드(평균펩티드길이 16)와 콜라겐펩티드(평균펩티드길이 19)를 제조하였다.[1]

견펩티드, 콩펩티드, 콜라겐펩티드와 Cu^{2+} 을 반응시켜 견펩티드-동착체, 콩펩티드-동착체, 콜라겐펩티드-동착체를 제조하였다.[13] 펩티드-동착체들에서 Cu^{2+} 의 농도는 0.1mol/L로 하였다. 이때 견펩티드, 콩펩티드와 콜라겐펩티드의 농도는 5%(50mg/mL)였다.

안정유리라디칼소거활성은 DPPH(α , α' -디페닐- β -피크릴히드라질)라디칼소거활성 측정법[22]으로, 히드록실라디칼($\cdot\text{OH}$)소거활성은 $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 반응계에서 펜톤반응결과에 생긴 $\cdot\text{OH}$ 와 살리칠산의 발색반응을 리용한 살리칠산법[20]으로, 기름질과산화억제률은 $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 반응계에서 생긴 $\cdot\text{OH}$ 에 의한 기름질과산화의 최종산물인 MDA(말론디알데히드)와 TBA(티오바르비투르산)의 발색반응을 리용한 TBA법[21]으로 측정하였다.

결과 및 논의

1) DPPH라디칼소거활성

견펩티드-동착체, 콩펩티드-동착체 및 콜라겐펩티드-동착체와 해당 펩티드들, CuSO_4 과 비타민 C의 DPPH라디칼소거활성은 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 DPPH라디칼소거활성은 콩펩티드, 콩펩티드-동착체, 콜라겐펩티드, 콜라겐펩티드-동착체, 견펩티드, 견펩티드-동착체, CuSO_4 순서로 낮아졌다. CuSO_4 이 DPPH라디칼소거활성을 가지는것은 Cu^{2+} 과 Cu^+ 이 호상전환될수 있는것으로 하여 DPPH라디칼과 반응할수 있기때문이라고 볼수 있다. 주목되는것은 CuSO_4 이 DPPH라디칼을 일정하게 소거함에도 불구하고 펩티드-동착체들의 DPPH라디칼소거활성이 해당 펩티드들보다 떨어지는것이다. 이것은 펩티드에서 DPPH라디칼소거에 참가할수 있는 원자단들이 Cu^{2+} 과의 착체형성에 참가하면서 라디칼소거에 참가할수 없기때문이라고 볼수 있다.

그림 1로부터 50%의 DPPH라디칼을 소거하는 농도 IC_{50} 을 계산한 결과는 표 1과 같다.

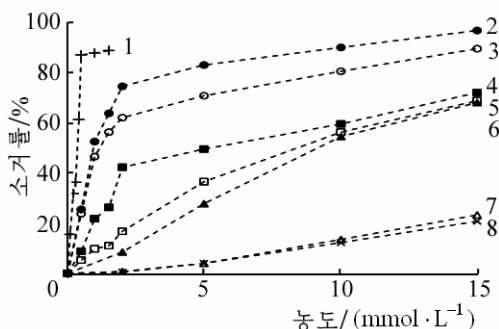


그림 1. 물질 농도에 따르는 DPPH라디칼소거활성
1-비타민 C, 2-콩펩티드, 3-콩펩티드-동착체,
4-콜라겐펩티드, 5-콜라겐펩티드-동착체,
6-견펩티드, 7-견펩티드-동착체, 8- CuSO_4 ;
* 비타민 C의 농도는 그림에 반영된 농도의 1/10배임

표 1. DPPH라디칼소거에 대한 IC_{50}

물질 종류	$\text{IC}_{50}/$ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$\text{IC}_{50}/$ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
콩펩티드	0.477	—
콩펩티드-동착체*	0.587	1.17
콜라겐펩티드	2.61	—
콜라겐펩티드-동착체*	4.21	8.41
견펩티드	4.57	—
견펩티드-동착체*	17.4	34.8
Cu^{2+}	2.44	38.5
비타민 C	5.58×10^{-5}	31.7×10^{-3}

* 펩티드-동착체들의 $\text{IC}_{50}(\text{mg/mL})$ 은 해당한 펩티드의 농도, $\text{IC}_{50}(\text{mmol/L})$ 은 펩티드와 결합된 Cu^{2+} 의 농도임

IC_{50} 에 의하여 펩티드-동착체들과 펩티드들의 DPPH라디칼소거활성을 비교하면 콩펩티드-동착체의 소거활성은 콩펩티드의 0.83배, 콜라겐펩티드-동착체는 콜라겐펩티드의 0.62배, 견펩티드-동착체는 견펩티드의 0.26배였다. 그리고 콩펩티드-동착체, 콜라겐펩티드-동착체, 견펩티드-동착체의 DPPH라디칼소거활성은 각각 비타민 C의 약 1/100, 1/750, 1/3 100배로서 비타민 C보다 훨씬 낮았다.

2) 히드록실라디칼소거활성

히드록실라디칼은 라디칼종류들중에서 산화력이 제일 강한것으로 하여 가장 센 독작용을 나타낼수 있다. 세가지 펩티드와 그것들의 동착체들, CuSO_4 과 비타민 C의 히드록실라디칼소거활성을 살리칠산법으로 측정한 결과는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 히드록실라디칼소거활성은 콜라겐펩티드, 콩펩티드, 콜라겐펩티드-동착체, 콩펩티드-동착체, 견펩티드, 견펩티드-동착체의 순서로 낮아졌으며 CuSO_4 은 활성이 없었다. 펩티드-동착체들의 히드록실라디칼소거활성이 해당한 펩티드들보다 떨

어지는것은 펩티드의 일부 원자단들이 Cu^{2+} 과 착체를 형성하면서 히드록실라디칼소거에 참가하지 못하기때문이라고 볼수 있다.

그림 2로부터 히드록실라디칼소거에 대한 IC_{50} 을 계산한 결과는 표 2와 같다.

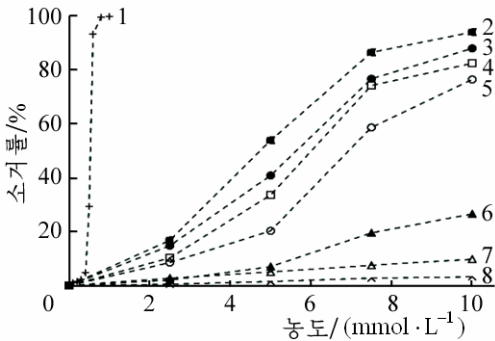


그림 2. 물질농도에 따르는 히드록실라디칼소거률

1-비타민 C, 2-콜라겐펩티드, 3-콩펩티드, 4-콜라겐펩티드-동착체, 5-콩펩티드-동착체, 6-견펩티드, 7-견펩티드-동착체, 8- CuSO_4

표 2. 히드록실라디칼소거에 대한 IC_{50}

물질 종류	$\text{IC}_{50}/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\text{IC}_{50}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$
콜라겐펩티드	2.37	—
콜라겐펩티드-동착체*	3.01	6.02
콩펩티드	2.82	—
콩펩티드-동착체*	3.47	6.94
견펩티드	10.4	—
견펩티드-동착체*	25.5	51.0
Cu^{2+}	9.65	152
비타민 C	0.091	0.517

* 펩티드-동착체들의 $\text{IC}_{50}(\text{mg/mL})$ 은 해당한 펩티드의 농도, $\text{IC}_{50}(\text{mmol/L})$ 은 펩티드와 결합된 Cu^{2+} 의 농도임

IC_{50} 에 기초하여 펩티드-동착체들과 펩티드들의 히드록실라디칼소거활성을 비교하면 콜라겐펩티드-동착체는 콜라겐펩티드의 0.79배, 콩펩티드-동착체는 콩펩티드의 0.81배, 견펩티드-동착체는 견펩티드의 0.41배였다. 그리고 콜라겐펩티드-동착체, 콩펩티드-동착체, 견펩티드-동착체의 히드록실라디칼소거활성은 각각 비타민 C의 약 1/33, 1/38, 1/280배로서 비타민 C보다 훨씬 낮았다.

DPPH라디칼소거활성의 경우에는 콩펩티드 및 콩펩티드-동착체가 콜라겐펩티드 및 콜라겐펩티드-동착체보다 각각 5.5, 7.2배로 높았지만 히드록실라디칼소거활성의 경우에는 콜라겐펩티드 및 콜라겐펩티드-동착체의 1.2배정도로써 약간 높기는 하였지만 큰 차이가 없었다. 이것은 펩티드에서 DPPH라디칼이나 히드록실라디칼소거에 참가하는 원자단들이 일부 차이거나 원자단들마다 DPPH라디칼소거활성과 히드록실라디칼소거활성이 차이 있기 때문이라고 볼수 있다.

3) 기름질과산화억제활성

활성산소는 불포화기름산과 반응하여 모노히드로페록시드를 비롯한 기름질과산화물을 형성한다. 펩티드-동착체 및 펩티드들의 기름질과산화억제활성을 측정하고 비타민 C와 비교하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 콩펩티드-동착체, 콜라겐펩티드-동착체, 견펩티드-동착체의 기름질과산화억제활성은 유사하면서도 해당한 펩티드들보다 훨씬 높았으며 비타민 C 보다는 약간 낮았다. 펩티드-동착체들의 기름질과산화억제활성이 해당한 펩티드들보다 높은것은 Cu^{2+} 자체가 기름질과산화를 억제하기때문이라고 볼수 있다.

그림 3으로부터 기름질과산화억제에 대한 IC_{50} 을 계산한 결과는 표 3과 같다.

IC_{50} 에 기초하여 펩티드-동착체들과 해당 펩티드들의 기름질과산화억제활성을 비교하면 콩펩티드-동착체는 콩펩티드의 5.7배, 콜라겐펩티드-동착체는 콜라겐펩티드의 6.0배, 견펩티드-동착체는 견펩티드의 8.1배였다. 그리고 콩펩티드-동착체, 콜라겐펩티드-동착체,

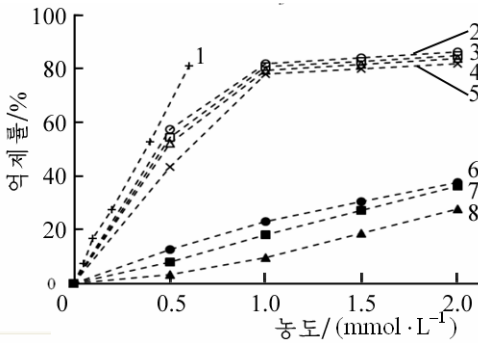


그림 3. 물질농도에 따르는 기름질과산화억제물

1—비타민 C, 2—콩펩티드—동착체, 3—콜라겐펩티드—동착체, 4—견펩티드—동착체, 5—CuSO₄, 6—콩펩티드, 7—콜라겐펩티드, 8—견펩티드

표 3. 기름질과산화억제에 대한 IC₅₀

물질 종류	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)	IC ₅₀ /(mmol·L ⁻¹)
콩펩티드—동착체*	0.218	0.436
콜라겐펩티드—동착체*	0.230	0.461
견펩티드—동착체*	0.240	0.480
콩펩티드	1.248	—
콜라겐펩티드	1.385	—
견펩티드	1.972	—
Cu ²⁺	0.038	0.596
비타민C	0.065	0.371

* 펩티드—동착체들의 IC₅₀(mg/mL)은 해당한 펩티드의 농도, IC₅₀(mmol/L)은 펩티드와 결합된 Cu²⁺의 농도임

견펩티드—동착체의 DPPH라디칼소거활성은 각각 비타민 C의 약 0.30, 0.28, 0.27배로서 비타민 C보다 낮았다.

콩펩티드와 콜라겐펩티드 및 해당 동착체들의 항산화활성이 견펩티드 및 견펩티드—동착체의 항산화활성보다 높은 원인은 콩펩티드, 콜라겐펩티드, 견펩티드의 아미노산조성 차이에 있다고 볼수 있다. 선행연구들에서 항산화활성이 있다고 한 아미노산들의 종류와 견단백질, 콩단백질, 콜라겐에서의 함량은 표 4와 같다.

표 4. 항산화활성을 가지는 아미노산들의 종류와 견단백질, 콩단백질, 콜라겐에서의 함량

No.	항산화활성을 가진 아미노산들	단백질들의 아미노산함량/%			
		견단백질*[11]		콩단백질[12]	콜라겐[5]
		피브로인	세리신		
1	Gly	43.5	14.1	4.25	33
2	Ala[2]	29.9	5.3	4.33	11
3	Val	2.1	2.8	4.31	2
4	Leu[24]	0.5	1.0	7.71	2
5	Ile[17]	0.5	0.5	4.39	1
6	Met[2, 8, 16, 24, 25]	0.1	—	1.34	0.6
7	Pro[3, 16, 25]	0.3	0.3	5.34	13
8	Phe[8, 17, 25]	0.6	0.3	4.99	1
9	Trp[3, 8, 16, 17, 19, 25]	—	—	1.26	—
10	Ser[8]	10.7	30.8	5.30	4
11	Thr[2]	0.9	7.4	3.97	2
12	Tyr[3, 8, 17, 19]	4.8	2.8	3.86	0.3
13	Cys[8, 16, 17, 19, 23, 24]	—	—	1.23	—
14	Lys[2, 16, 23, 24]	0.7	3.0	6.16	3
15	Arg[2, 16]	0.5	3.1	7.41	5
16	His[2, 3, 4, 8, 24]	0.2	0.9	2.57	0.5
17	Asp	1.5	15.4	11.66	5
18	Glu[16, 23, 24]	1.1	4.8	19.71	7
19	Hyp**	—	—	—	9
20	Hyl***	—	—	—	0.6

* 견단백질중 피브로인은 약 70%, 세리신은 약 30%이다.

** 히드록시프롤린, *** 히드록시리진

표 4에서 보는바와 같이 항산화활성을 가지고있는 아미노산들은 주로 Cys, Trp, Met, His, Tyr, Lys, Pro, Phe, Glu, Arg 등이다. 견단백질, 콩단백질, 콜라겐의 아미노산함량을 보면 항산화활성에서 주되는 역할을 하는 Cys와 Trp가 견단백질과 콜라겐에는 없으며 Met와 His는 콩단백질에는 많지만 견단백질과 콜라겐에는 적게 들어있다. 그리고 Tyr는 콩단백질과 견단백질에는 많지만 콜라겐에는 적으며 Lys는 콩단백질에 많이 들어있다. 또한 Pro는 콜라겐에 특별히 많이 들어있으며 콩단백질에도 많이 들어있다. Phe와 Glu는 콩단백질에 많이 들어있으며 Arg는 콩단백질과 콜라겐에 많이 들어있다. 위의 10가지 아미노산잔기들의 함량을 합해보면 견단백질에서는 평균 10.4%(피브로인 8.3%, 세리신 15.2%), 콩단백질에서는 53.9%, 콜라겐에서는 30.4%(Hyp과 Hyl까지 합치면 40%)이다. 아미노산조성에 기초해보면 콩펩티드의 항산화활성이 제일 높을것으로 예견되며 이것은 우리의 실험결과와 기본적으로 일치한다.

콩펩티드와 콜라겐펩티드 및 해당 동착체들의 항산화활성이 견펩티드 및 그것의 동착체의 항산화활성보다 높은 원인은 또한 펩티드길이의 차이에 의한것일수도 있다. 이것은 평균중합도가 큰 해파리젤라틴펩티드들이 작은것들보다 Cu^{2+} 과 착체를 더 잘 형성하며 더 높은 항산화활성을 나타낸다는 선행연구자료[18]와 대서양고등어의 물작용분해물에서 평균분자량이 더 큰 분획이 더 높은 항산화활성을 나타낸다는 선행연구자료[7]와도 잘 일치한다.

맺 는 말

콩펩티드-동착체, 콜라겐펩티드-동착체, 견펩티드-동착체의 DPPH라디칼소거활성은 각각 해당 펩티드들의 0.83, 0.62, 0.26배이고 비타민 C의 1/100, 1/750, 1/3 100배이며 IC_{50} 은 각각 0.59, 4.21, 17.4mg/mL이다.

콜라겐펩티드-동착체, 콩펩티드-동착체, 견펩티드-동착체의 히드록실라디칼소거활성은 각각 해당 펩티드들의 0.79, 0.81, 0.41배이고 비타민 C의 1/33, 1/38, 1/280배이며 IC_{50} 은 각각 3.01, 3.47, 25.5mg/mL이다.

콩펩티드-동착체, 콜라겐펩티드-동착체, 견펩티드-동착체의 기름질과산화억제활성은 각각 해당 펩티드들의 5.7, 6.0, 8.1배이고 비타민 C의 약 0.3배이며 IC_{50} 은 각각 0.22, 0.23, 0.24mg/mL이다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 60, 9, 102, 주체103(2014).
- [2] A. G. Gopala et al.; JAOCS, 71, 6, 645, 1994.
- [3] Anne Pihlanto; International Dairy Journal, 16, 1306, 2006.
- [4] H. M. Chen et al.; Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 49, 1998.
- [5] N. N. David et al.; IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 5, 4, 1107, 1999.
- [6] Fumiko Hayakawa et al.; Biosci. Biotechnol. Biochem., 68, 9, 1825, 2004.
- [7] Hui-Chun Wu et al.; Food Research International, 36, 949, 2003.
- [8] I. Popov et al.; Luminescence, 14, 169, 1999.
- [9] Kaili Chen et al.; J. Seric. Sci. Japan, 60, 5, 358, 1991.
- [10] Kazuo Nakagawa et al.; Journal of Health Science, 53, 5, 591, 2007.

- [11] Keizo Hayashiya et al.; Proceedings of the Japan Academy, B 40, 5, 349, 1964.
- [12] Kengo Ishihara et al.; Biosci. Biotechnol. Biochem., 67, 12, 2505, 2003.
- [13] Laura Habasescu et al.; Rev. Roum. Chim., 58, 6, 501, 2013.
- [14] Lijuan Zhang et al.; Clinics in Dermatology, 27, 485, 2009.
- [15] Loren Pickart et al.; Journal of Aging Research and Clinical Practice, 1, 1, 13, 2012.
- [16] M. M. Ahmad et al.; JAOCS, 60, 2, 420, 1983.
- [17] Tadahiro Murakata et al.; Journal of Chemical Engineering of Japan, 38, 3, 208, 2005.
- [18] Yong-Liang Zhuang et al.; Food Technol. Biotechnol., 48, 2, 222, 2010.
- [19] Z. Y. Chen et al.; JAOCS, 68, 1, 47, 1991.
- [20] 徳武昌一; New Food Industry, 43, 11, 1, 2001.
- [21] 剂玲 等; 食品科学, 26, 4, 187, 2005.
- [22] 戸高大介; 日本食品科学会誌, 46, 1, 34, 1999.
- [23] 山庄司志朗 他; 油化学, 26, 1, 28, 1977.
- [24] 滝沢靖臣 他; 油化学, 29, 3, 199, 1980.
- [25] 湯木悦二 他; 油化学, 23, 8, 497, 1974.

주체106(2017)년 2월 5일 원고접수

Antioxidative Activities *in vitro* of Copper Complexes with Several Peptides

Phyon Jong Min

DPPH radical scavenging activities of the copper complexes with soybean peptide, collagen peptide and silk peptide are 0.83, 0.62 and 0.26 times of the corresponding peptides, and 1/100, 1/750, and 1/3 100 times of vitamin C with IC₅₀ values 0.59, 4.21, and 17.4mg/mL, respectively.

Hydroxyl radical scavenging activities of the copper complexes with collagen peptide, soybean peptide and silk peptide are 0.79, 0.81 and 0.41 times of the corresponding peptides, and 1/33, 1/38, and 1/280 times of vitamin C with their IC₅₀ values 3.01, 3.47, and 25.5mg/mL, respectively.

Lipid peroxidation inhibition rates of the copper complexes with soybean peptide, collagen peptide and silk peptide are 5.7, 6.0 and 8.1 times of the corresponding peptides, and 0.3 times of vitamin C with IC₅₀ values 0.22, 0.23, and 0.24mg/mL, respectively.

Key words: antioxidative activity, peptide, copper complex