



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

해마 (*Hippocampus abdominalis*)
효소가수분해물의 항산화 활성 및
생리활성 펩타이드의 분리

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

申丙玉

2016年2月

해마 (*Hippocampus abdominalis*)
효소가수분해물의 항산화 활성 및
생리활성 펩타이드의 분리

지도교수 전 유 진

신 병 옥

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2016 년 2 월

신병옥의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 여 인 규



위 원 정 준 범



위 원 전 유 진



제주대학교 대학원

2016 년 2 월

**Antioxidant activity of enzymatic hydrolysates
from seahorse (*Hippocampus abdominalis*)
and isolation of its bioactive peptides**

Byeung-Ok Shin

(Supervised by professor You-Jin Jeon)

**A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for
the degree of Master of Science**

Department of Marine Life Science

**GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

February, 2016

목차

목차	i
ABSTRACT	iv
LIST OF FIGURES	v
LIST OF TABLES	vi
1. 서론	1
2. 재료 및 방법	6
2. 1. 실험재료	6
2. 2. 시약	6
2. 3. 해마의 일반성분 분석	7
2. 4. 단백질 효소가수분해물의 제조	7
2. 5. 단백질 효소가수분해물의 수율 측정	11
2. 6. 단백질 효소가수분해물의 총단백질 측정	11
2. 7. 자유 라디칼 (free radical) 소거활성의 측정	11
2. 7. 1. DPPH radical	12
2. 7. 2. Hydroxyl radical	12
2. 7. 3. Alkyl radical	13
2. 7. 4. Hydrogen peroxide	13
2. 8. Vero cell 에서의 항산화 활성 측정.....	14
2. 8. 1. Cell culture	14

2. 8. 2. Cytotoxicity	15
2. 8. 3. Total ROS	15
2. 8. 4. Cell viability	16
2. 9. Zebrafish embryo 에서의 항산화 활성 측정.....	17
2. 10. 생리활성 펩타이드의 분리	18
2. 10. 1. Ultrafiltration	18
2. 10. 2. Gel filtration chromatography	18
2. 11. Amino Acid composition analysis	19
3. 결과	21
3. 1. 해마의 일반성분	21
3. 2. 단백질 효소가수분해물의 수율	21
3. 3. 단백질 효소가수분해물의 총단백질	24
3. 4. 자유 라디칼 (free radical) 소거활성의 평가	26
3. 4. 1. DPPH radical	26
3. 4. 2. Hydroxyl radical	29
3. 4. 3. Alkyl radical	32
3. 4. 4. Hydrogen peroxide	35
3. 5. Vero cell 에서의 항산화 활성 평가	38
3. 5. 1. Cytotoxicity	38
3. 5. 2. Total ROS	40
3. 5. 3. Cell viability	42
3. 6. Ultrafiltration	44
3. 6. 1. Alkyl radical 소거활성의 평가	44

3. 6. 2. Vero cell 에서의 항산화 활성 평가	46
3. 6. 2. 1. Cytotoxicity	46
3. 6. 2. 2. Total ROS	46
3. 6. 2. 3. Cell viability	49
3. 6. 3. Zebrafish embryo 에서의 항산화 활성 평가	51
3. 7. Sephadex G-25 gel filtration chromatogram	53
3. 7. 1. Alkyl radical 소거활성의 평가	53
3. 7. 2. Amino Acid composition	56
4. 고찰	60
5. 참고문헌	64
6. 감사의 글	68

ABSTRACT

Seahorse, *Hippocampus abdominalis* (*H. abdominalis*) known as a marine teleost fish, has been used as one of the most famous and expensive materials of traditional Chinese medicine due to its beneficial biological activities. However, its use has been limited by its high cost despite its beneficial biological activities and there are few reports on its biological activity and active components. Therefore, we investigated the antioxidant activity of *H. abdominalis* and its active compounds. First of all, to improve its extraction yields, we prepared the water-enzymatic hydrolysates by performing the water and enzymatic extraction techniques with the seven food grade enzymes (Trypsin, Pepsin, Neutrase, Protamex, Alcalase, Kojizyme, and Flavourzyme) in consecutive order. The enzymatic extracts showed the higher extraction yield than that of the only water extract. Among them, the water-Pepsin hydrolysate showed the higher DPPH, hydroxyl and alkyl radicals, and hydrogen peroxide scavenging activities. Also, it protected against oxidative stress caused by the treatment of AAPH. To identify its active components, we fractionated the > 5 KDa and < 5 KDa molecular weight fractions from the Water-Pepsin hydrolysates and confirmed the superior antioxidant activity of < 5 kDa fraction. The < 5 KDa fraction, a low molecular weight fraction was applied to Sephadex G-25 gel filtration chromatography and we identified that the isolated most low molecular weight fraction led to the highest alkyl radical scavenging activity. Results of examining amino acid composition of the active peptide, it was possible to confirm the presence of peptides consisting with mainly many tryptophan and glycine. In conclusion, in this study suggests that the seahorse water-enzymatic hydrolysates prepared by the useful water-extraction techniques has the antioxidant activity and might be an useful resource of marine origin as a novel material for healthy functional foods and cosmetics.

LIST OF FIGURE

- Fig. 1.** The source of seahorse (*Hippocampus abdominalis*).
- Fig. 2.** Yields of enzymatic hydrolysates from *H. abdominalis*.
- Fig. 3.** DPPH radical scavenging activity of enzymatic hydrolysates. (%)
- Fig. 4.** Hydroxyl radical scavenging activity of enzymatic hydrolysates. (%)
- Fig. 5.** Alkyl radical scavenging activity of enzymatic hydrolysates. (%)
- Fig. 6.** Hydrogen peroxide scavenging activity of enzymatic hydrolysates. (%)
- Fig. 7.** Cytotoxicity by HADPH in vero cells. (%)
- Fig. 8.** Total ROS production by HADPH treatment in vero cells induced by AAPH-oxidative stress. (%)
- Fig. 9.** Cell viability by HADPH treatment in vero cells induced by AAPH-oxidative stress. (%)
- Fig. 10.** Alkyl radical scavenging activity of specific molecular weight fractions of HADPH. (%)
- Fig. 11.** Cytotoxicity by specific molecular weight fractions of HADPH in vero cells. (%)
- Fig. 12.** Total ROS production by specific molecular weight fractions of HADPH treatment in vero cells induced by AAPH-oxidative stress. (%)
- Fig. 13.** Cell viability by specific molecular weight fractions of HADPH treatment in vero cells induced by AAPH-oxidative stress. (%)
- Fig. 14.** Survival rate by ≤ 5 kDa fractions of HADPH treatment in zebrafish embryo induced by AAPH-oxidative stress. (%)
- Fig. 15.** Sephadex G-25 gel filtration chromatogram of ≤ 5 kDa fractions of HADPH.
- Fig. 16.** Alkyl radical scavenging activity of Sephadex G-25 gel filtration fractions of ≤ 5 kDa fractions of HADPH. (%)
- Fig. 17.** Measurement of Amino Acids from Sephadex G-25 gel filtration fractions.

LIST OF TABLE

Table 1. Extraction process and optimum conditions of hydrolysis.

Table 2. HPLC conditions from Amino Acid composition analysis.

Table 3. Yields of Total protein contents from *H. abdominalis*. (mg/g)

Table 4. DPPH radical scavenging activity of enzymatic hydrolysates. (IC₅₀ values)

Table 5. Hydroxyl radical scavenging activity of enzymatic hydrolysates. (IC₅₀ values)

Table 6. Alkyl radical scavenging activity of enzymatic hydrolysates. (IC₅₀ values)

Table 7. Hydrogen peroxide scavenging activity of enzymatic hydrolysates. (IC₅₀ values)

Table 8. Amino Acid composition of Sephadex G-25 gel filtration fractions. (%)

1. 서론

인류는 경제성장률 증가에 따른 소득증가와 더불어 건강증진을 통한 삶의 질 향상을 위해 정크푸드와 같은 건강에 해로운 식품의 섭취를 지양하고 있으며 건강보조식품이나 기능성이 뛰어난 특수영양식품 등의 소비를 늘려가는 등 건강에 대한 꾸준한 관심을 갖고 있다. 한편 최근 소비자의 수요 트렌드가 건강기능성과 함께 안전 또한 중요시 하게 됨에 따라 자연적으로 존재하는 안전성이 높은 천연물 소재나 이를 응용한 건강기능식품 등의 선호도가 증가하고 있는 추세이며 이러한 천연물 소재의 발굴을 위해 점차 다양한 유용자원 탐색이 이루어지고 있다. 지구표면의 약 70% 정도를 차지하는 해양에는 풍부한 유용자원이 있으며 이러한 유용자원으로부터 천연의 해양생물소재를 이용하는 해양바이오산업은 고부가가치의 미래지향적인 산업으로서 발전 잠재성이 매우 큰 산업이다. 이에 따라 최근 활발한 연구를 통해 해양유래 천연물이 가진 항산화, 항염증, 항고혈압, 항당뇨, 항암, 항비만, 항노화, 항혈전 등 다양한 생리활성 효과가 확인된 바 있다 (Kang et al., 2012, Jao et al., 2002, Wu et al., 2003, Je et al., 2005, Thiansilakul et al., 2007, Kim et al., 2014, Ko., 2009, Kim., 2011, Kim., 2010, Kang et al., 2014, Mayer et al., 2004). 이러한 생리활성효과를 갖는 해양유래 천연물은 건강기능식

품, 건강보조식품, 의약품, 화장품 등의 다양한 형태로 개발 및 이용 되어지고 있지만 해양자원의 이용은 여전히 원물 형태의 수산물이나 냉동제품, 건어물 등 단순가공 식품류가 주를 이루고 있어 고부가가치 해양바이오산업에 일조할 수 있는 기능성소재나 이를 응용한 제품 개발이 시급한 실정이다.

이러한 부분에서 최근 주목 받고 있는 해마는 동의보감, 본초강목, Materia medica 등과 같은 고대문헌기록에 따르면 신장기능 증진 및 원기보강, 성기능개선 (남성의 발기부전, 여성의 난산), 통증완화, 심혈관계안정, 신경계안정 등과 같이 다양한 생리활성효과를 보이는 것으로 기록되어져 있다. 분류학적으로는 실고기과에 속하는 경골어류로서 현재까지 전세계적으로 약 54종이 확인되었으며, 각국에서 식용 및 한약재로 활용되고 있다. 각국의 수요 및 소비와 더불어 특히 중국의 한약재시장인 TCM (Traditional Chinese Medicine) 시장에서 건조해마는 1kg당 약 200만원 내외로 고가에 거래되고 있으며 최상품의 건조해마는 1kg당 약 1000만원을 호가할 정도로 매우 인기가 높다. 하지만 이러한 해마는 무분별한 포획과 기타 등의 이유로 인해 자원량이 급감하게 됨에 따라 '멸종위기에 처한 야생 동·식물의 국제거래에 관한 협약' (CITES ; Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora)에 의해 2004년도부터 국제멸종위기종으로 지정되어 현재는 포획이 금지된 상황이다. 이에 따라 일부 국가에서는 해마를 인공양식하여 공급하고 있으나 지속적인 수요 증가로 인해 거래가격

이 급상승하고 있는 실정이다. 이는 해마의 양식기술이 매우 까다롭고 어려우며 폐사율이 높은 등의 문제로 수요량에 비해 적은 공급량이 유통되고 있기 때문이며 이러한 수요 충족을 위해 세계 각국에서는 해마 양식기술개발 및 양식기술개선에 상당한 노력을 기울이고 있다. 국내에서는 2007년도부터 해마양식기술 개발에 박차를 가한 결과 현재는 양식해마의 대량생산이 가능해졌으며 2015년 2월, 식품의약품안전처로부터 '식품의 기준 및 규격 일부 개정고시'를 통해 제주에서 양식되고 있는 빅벨리해마 (*Hippocampus abdominalis*)를 식품원료로서 사용이 가능하게 개정되는 등 산업적 중요성과 그 가치가 점차 부각되고 있다.

이러한 해마는 전통적으로 오랜 기간 식용 및 한약재로 활용되었음에도 불구하고 생리활성분야의 다양한 연구가 이루어지지 않았으나 최근 들어 일부 연구 결과들이 밝혀지고 있다. 해마 추출물로부터 마우스의 전립선 비대증 완화 및 성기능개선에 대한 연구 (Xu et al., 2014), 해마 효소가수분해물에서 정제한 펩타이드의 항염증 효과 및 활성경로에 대한 연구 (Ryu et al., 2010a, Ryu et al., 2010b), 해마의 암수 및 부위별 메탄올 추출물로부터 페놀성 물질의 항산화 활성에 대한 연구 (Sanaye et al., 2014) 등이 있다. 이 중 일부 연구결과에서 밝혀졌듯이 해마는 다량의 단백질을 갖고 있으며 이를 활용하기 위해 효소공학적인 방법을 이용하였을 때 높은 항염증효과와 연골보호효과를 가진 펩타이드를 얻을 수 있는 것으로 확인되었다. 이처럼 단백질의 효소공학적인 방법을 이용한 가수분해는 다양한

가수분해 조건에 따라 산업적 이용 또는 특정 목적의 기능을 향상시키기 위한 방법으로 활용될 수 있다 (Panyam et al., 1996). 이는 단백질이 물리적, 화학적, 효소적 처리 등의 방법에 따라 단백질구조가 변화되어 용해도 및 유화능 등과 같은 이화학적 특성과 기능적 특성이 변화되기 때문이다 (Chobert et al., 1988). 산업적 이용에 있어 강산, 강염기 처리에 의한 가수분해는 제조단가를 낮출 수 있는 장점이 있으나 일부 필수 아미노산의 소실 가능성과 독성물질로 인한 안전성 문제가 있을 수 있는 반면, 효소처리에 의한 가수분해는 사용효소의 비용과 여러 단계의 공정을 거치기 때문에 제조단가를 상승시키는 단점이 있지만 비교적 우수한 안전성과 양질의 단백질 가수분해물을 얻을 수 있는 장점이 있다. 한편 현재 제주도에 양식되고 있는 빅벨리해마 (*H. abdominalis*)는 산업적 이용 가치 및 연구가치를 고려할 때 발전잠재성이 매우 높은 해양유래의 천연물 소재임에도 불구하고 아직 생리활성 관련분야의 연구가 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 해마의 산업적 이용에 있어 고부가가치화 소재로서의 가능성을 살펴 보고자 효소공학적인 방법을 이용하여 단백질 가수분해물을 제조하였고 이로부터 기초생리활성 주요지표인 항산화 활성을 확인하고자 하였다. 이에 따라, 소화효소 2종 (Trypsin, Pepsin)과 기타상업적으로 많이 활용되는 5종의 단백질 가수분해효소 (Neutralse, Protamex, Alcalase, Kojizyme, Flavourzyme)를 활용하여 다양한 조건에서 단백질 효소가수분해물을 제조하였으며 항산화 활성의 평

가를 위해 주요 항산화 활성 지표인 자유 라디칼 (free radical) 소거능을 스크리닝하고 세포독성 및 산화적 스트레스로부터의 보호효과를 Vero cell 과 Zebrafish embryo를 이용하여 확인하고자 하였다. 또한 높은 항산화 활성을 가지는 생리활성 펩타이드의 존재를 확인하기 위해 이를 분리하여 활성 펩타이드를 구성하고 있는 주요 아미노산에 대해 확인해 보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2. 1. 실험재료

본 연구에 사용된 해마는 제주도 제주시 구좌읍 종달리에 위치한 한국해수관상어센터에서 양식되어진 10g 내외의 빅밸리해마 (*Hippocampus abdominalis*)를 제공받아 사용하였다 (Fig. 1). 시료는 세척 후 동결건조 (-80°C, 3~4일) 하였으며 미립자 형태로 분쇄 후 단백질 효소가수분해를 위한 추출원료로 사용하였다.

2. 2. 시약

단백질 효소가수분해에 사용된 Trypsin, Pepsin은 Sigma Chemical Co. (USA) 에서 구입하여 사용하였으며, Neutrase, Protamex, Alcalase, Kojizyme, Flavourzyme 은 Novozyme Co. (Denmark) 에서 구입하여 사용하였다. 분석에 사용된 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin N-oxide (DMPO), α -(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron (4-POBN), peroxidase, 2,2-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazolin)-6-sulfonic acid (ABTS), 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), Sodium dodecyl

sulfate (SDS), Dimethyl sulfoxide (DMSO), Bovine Serum Albumin (BSA)는 Sigma Chemical Co. (USA) 에서 구입하여 사용하였으며 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Hydrogen peroxide 는 Dae Jung Chemical Co. (Korea) 에서 구입하여 사용하였다. Pierce® BCA protein assay kit 는 Thermo Scientific™ (USA) 에서 구입하여 사용하였고 RPMI 1640 medium, Fetal bovine serum (FBS) 는 Gibco/BRL (Canada)에서 구입하여 사용하였다. 이 밖에 모든 기타 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

2. 3. 해마의 일반성분 분석

해마의 일반성분은 AOAC (Helrich, K. 1990)에 준하여 조단백, 조지방을 측정하였다. 조단백은 Kjeldahl법으로 측정 하였으며, 조지방은 Soxhlet 추출법을 이용하여 측정하였다.

2. 4. 단백질 효소가수분해물의 제조

해마 조시료는 소화효소 2종 (Trypsin, Pepsin), 기타상업용효소 5종 (Neutrase, Protamex, Alcalase, Kojizyme, Flavourzyme)을 이용하여 단백질 효소가수분해물을 제조하였다. 효소 대 기질비는 1:100 으로 하였으며 각 효소별 최적온도 및 pH 조건과 반응시간에 따라 가수분해를 진행하였고, 가수분해를 정지시키기 위해 100°C 에서 10분간 효소의 반응을 불활성화 시킨 후 pH를 7.0으로 조정해 주었

다 (**Table 1**). 이 후 3500RPM에서 20분간 원심분리한 뒤 잔사를 제외한 상층액을 pore size 7um의 여과지를 사용하여 추출물을 여과하고 동결건조 (-80°C, 3~4일) 후 파우더화하여 최종적으로 단백질 효소가수분해물을 얻었다.



Fig. 1. The source of seahorse (*Hippocampus abdominalis*).

Table 1. Extraction process and optimum conditions of hydrolysis.

	Extraction process		Optimum conditions	
	Methods	Times (hours)	pH	Temperature (°C)
D	D.W	24 h	-	37
T1	Trypsin	1 h	7.6	37
T2		3 h		
T3		6 h		
T4		12 h		
T5		24 h		
P1	Pepsin	1 h	2.0	37
P2		3 h		
P3		6 h		
P4		12 h		
P5		24 h		
PT		Pepsin 12 h + Trypsin 12 h		
DT	Complex	D.W 24 h + Trypsin 12 h		
DP		D.W 24 h + Pepsin 12 h		
N1	Neutrased	3 h	6.0	50
N2		12 h		
N3		24 h		
X1	Protamex	3 h	6.0	40
X2		12 h		
X3		24 h		
A1	Alcalase	3 h	8.0	50
A2		12 h		
A3		24 h		
K1	Kojizyme	3 h	6.0	40
K2		12 h		
K3		24 h		
F1	Flavourzyme	3 h	7.0	50
F2		12 h		
F3		24 h		

adjusted to pH 7.0 after deactivating the enzyme reaction for 10 minutes at 100 °C in order to stop the hydrolysis.

2. 5. 단백질 효소가수분해물의 수율 측정

각 추출조건에 따른 효소가수분해물의 수율은 단백질 효소가수분해 후 얻어진 추출물 일부의 무게를 측정한 후 100°C 드라이오븐에서 수분을 제거한 나머지 고형분 함량을 기준으로 수율을 측정하였다.

2. 6. 단백질 효소가수분해물의 총단백질 측정

각 추출조건에 따른 총단백질의 수율은 Pierce® BCA protein assay kit를 사용하여 단백질 정량을 한 뒤 효소가수분해물의 수율을 기준으로 산출하였으며 단백질 정량의 표준물질은 BSA 표준용액을 제조하여 측정하였다. 단백질 정량은 96wellplate에 1 mg/ml 농도의 각 효소가수분해물 25 μ l 와 BCA solution 200 μ l 를 혼합한 뒤 빛을 차단시켜 37°C 에서 30분간 반응시킨 이후 ELISA reader를 사용하여 562nm 흡광도에서 측정한 다음 값을 구하였다.

2. 7. 자유 라디칼 (free radical) 소거활성의 측정

free radical 소거활성은 ESR ; electron spin resonance (JES-FA ESR, JEOL, Tokyo, Japan) 을 사용하여 signal 값을 측정하고 다음과 같이 소거활성을 산출하였다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = (\text{control signal} - \text{sample signal}) / \text{control signal} \times 100$$

2. 7. 1. DPPH radical

DPPH radical의 측정은 시료 30 $\mu\ell$, 60 μM DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 30 $\mu\ell$ 를 볼텍싱 후 2분간 반응시킨 다음 capillary tube에 옮겨 ESR을 사용하여 signal 값을 구하였다. 대조구는 시료대신 용매인 D.W를 사용하였으며 분석조건은 다음과 같이 하였다.

Power : 1mW, Amplitude : 800, Modulation width : 0.8mT, Sweep width : 10mT, Sweep time : 30sec, Time constant : 0.03sec

2. 7. 2. Hydroxyl radical

Hydroxyl radical의 측정은 시료 20 $\mu\ell$, 0.3M DMPO (5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide) 20 $\mu\ell$, 10mM FeSO₄·7H₂O 20 $\mu\ell$, 10mM H₂O₂ 20 $\mu\ell$ 를 볼텍싱 후 2분 30초간 반응시킨 다음 capillary tube에 옮겨 ESR을 사용하여 signal 값을 구하였다. 대조구는 시료대신 용매인 D.W를 사용하였으며 분석조건은 다음과 같이 하였다.

Power : 1mW, Amplitude : 1000, Modulation width : 0.1mT, Sweep width : 10mT, Sweep time : 30sec, Time constant : 0.03sec

2. 7. 3. Alkyl radical

Alkyl radical의 측정은 시료 20 μ l, D.W 20 μ l, 40mM AAPH [2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride] 20 μ l, 40mM 4-POBN [α -(4-Pyridyl-1-oxide)-N-tert-butylnitron] 20 μ l를 볼텍싱 후 37°C 에서 30분간 반응시킨 다음 capillary tube에 옮겨 ESR을 사용하여 signal 값을 구하였다. 대조구는 시료대신 용매인 D.W를 사용하였으며 분석조건은 다음과 같이 하였다.

Power : 1mW, Amplitude : 1000, Modulation width : 0.2mT, Sweep width : 10mT, Sweep time : 30sec, Time constant : 0.03sec

2. 7. 4. Hydrogen peroxide

Hydrogen peroxide의 측정은 96wellplate에 시료 50 μ l, 0.1M phosphate buffer (pH 5.0) 50 μ l, 10mM hydrogen peroxide 10 μ l를 넣어준 뒤 빛을 차단시켜 37°C 에서 5분간 반응시켰다. 이후 1.25mM ABTS 15 μ l, Peroxidase (1unit/ml) 15 μ l를 넣어준 뒤 빛을 차단시켜 37°C 에서 10분간 반응시킨 다음 ELISA reader를 사용하여 405nm 흡광도에서 측정한 뒤 값을 구하였다. 대조구는 시료대신 용매인 D.W를 사용하였다.

2. 8. Vero cell 에서의 항산화 활성 측정

Normal cell 에서의 항산화 활성을 측정하기 위해 안전성이 잘 정립되어 있는 아프리카 녹색 원숭이의 신장 유래세포인 Vero cell을 배양하여 실험에 사용하였다. Vero cell은 Korean Cell Line Bank (Korea) 에서 분양 받아 사용하였으며, 시료에 대한 Cytotoxicity를 확인하고 산화적 스트레스를 유도하였을 때의 Total ROS 변화와 Cell viability를 확인하여 항산화 활성을 평가하였다.

2. 8. 1. Cell culture

Vero cell은 10% FBS (fetal bovine serum), 1% antibiotic을 포함하는 RPMI 배지를 사용하여 배양 하였다. Cell culture flask (75ml)에 적정농도로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 세포상태에 따라 2~3일간 배양하였으며, 바닥에 부착된 세포를 분리하기 위해 배지상층액을 제거한 후 1X PBS로 2~3회 세척한 다음 1X Trypsin 2ml을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 2분간 유지 후 가벼운 자극을 주어 부착된 세포를 분리하였다. 이 후 3~5ml의 배지를 넣어주어 가볍게 흔들어 준 뒤 코니칼튜브에 옮겨 500RPM에서 5분간 원심분리를 하고 상층액을 제거한 다음 배지를 넣고 피펫팅하여 세포를 풀어주었다. 준비된 세포는 계대배양과 이 후 실험에 사용하였다.

2. 8. 2. Cytotoxicity

시료에 대한 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 하여 세포생존율을 측정하였다. 먼저 1×10^5 으로 세포농도를 만들어 96wellplate에 $190\mu\text{l}$ 를 seeding하였고 37°C , 5% CO_2 조건에서 세포상태에 따라 20~24시간 배양하였으며 시료처리를 위해 최종농도의 20배 농도를 만들어 $10\mu\text{l}$ 를 처리하였다. 이 후 37°C , 5% CO_2 조건에서 세포상태에 따라 20~24시간 배양하였으며 2mg/ml 농도의 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 $50\mu\text{l}$ 처리하였다. 그 다음 37°C , 5% CO_2 조건에서 염색상태에 따라 2~3시간 반응시키고 난 뒤 상층액 $150\mu\text{l}$ 를 제거하고 10% SDS + 50% DMSO를 $100\mu\text{l}$ 넣어 주었으며, 빛을 차단시켜 120RPM에서 3~12시간 교반시킨 후 ELISA reader를 사용하여 540nm 흡광도에서 측정한 뒤 값을 구하였다. 대조구는 시료대신 용매인 D.W를 사용하였다.

2. 8. 3. Total ROS

산화적 스트레스를 유도하였을 때의 시료처리에 의한 항산화 활성을 확인하기 위해 AAPH [2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride] 자극을 주어 시료처리에 대한 Total ROS의 변화를 측정하였다. 먼저 1×10^5 세포농도의 vero cell을 만들어 96wellplate에 $180\mu\text{l}$ 를 seeding하였고 37°C , 5% CO_2 조건에서 세포상태

에 따라 20~24시간 배양하였으며 시료처리를 위해 최종농도의 20배 농도를 만들어 10 μ l를 처리하였다. 이 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 세포상태에 따라 1시간 배양하였으며 80mM AAPH 10 μ l를 처리하였다. 그 다음 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10분간 반응시켰으며 0.05% DCF-DA 에탄올용액을 10 μ l 처리하고 빛을 차단시켰다. 이후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader를 사용하여 아래와 같은 조건에서 형광 측정된 뒤 값을 구하였다. 대조구는 시료처리없이 산화적 스트레스만 유도시킨 실험군과 산화적 스트레스를 유도시키지 않은 실험군으로 구분하였다.

excitaion : 485/20, Emission : 528/20, Optics position : Top, Read height : 7mm, Scale value : 30000

2. 8. 4. Cell viability

산화적 스트레스를 유도하였을 때의 시료처리에 의한 항산화 활성을 확인하기 위해 AAPH [2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride] 자극을 주어 시료처리에 대한 세포 생존력을 측정하였다. 먼저 1 x 10⁵ 세포농도의 vero cell을 만들어 96wellplate에 180 μ l를 seeding하였고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 세포상태에 따라 20~24시간 배양하였으며 시료처리를 위해 최종농도의 20배 농도를 만들어

10 μ l를 처리하였다. 이 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 세포상태에 따라 1시간 배양하였으며 80mM AAPH 10 μ l를 처리하였다. 그 다음 37°C, 5% CO₂ 조건에서 세포상태에 따라 20~24시간 배양하였으며 2mg/ml 농도의 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 50 μ l 처리하였다. 이후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 염색상태에 따라 2~3시간 반응시키고 난 뒤 상층액 150 μ l를 제거하고 10% SDS + 50% DMSO를 100 μ l 넣어 주었으며, 빛을 차단시켜 120RPM에서 3~12시간 교반시킨 후 ELISA reader를 사용하여 540nm 흡광도에서 측정한 뒤 값을 구하였다. 대조구는 시료처리없이 산화적 스트레스만 유도시킨 실험군과 산화적 스트레스를 유도시키지 않은 실험군으로 구분하였다.

2. 9. Zebrafish embryo 에서의 항산화 활성 측정

Zebrafish (*Danio rerio*)는 인간과 유전적 상동성이 유사한 척추동물로서 초기발생단계에서 산화적스트레스를 유도하였을 때 시료처리에 의한 항산화 활성으로 부터의 보호효과를 확인 하고자 시간 경과에 따른 생존율 변화를 측정하였다. embryo medium 1.8ml에 70% epiboly 단계의 zebrafish embryo를 넣어준 뒤 시료처리를 위해 최종농도의 20배 농도를 만들어 100 μ l를 처리하였다. 1시간 노출시킨 후 300mM 농도의 AAPH [2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride]를 100 μ l 처리하였고 이후 생존율 변화를 관찰하였다. 대조구는 시료처리 없이

산화적스트레스만 유발시킨 실험군과 산화적스트레스를 유도시키지 않은 실험군으로 하였다.

2. 10. 생리활성 펩타이드의 분리

단백질 효소가수분해물에서 항산화 활성이 높은 생리활성 펩타이드의 존재를 확인하기 위해 Ultrafiltration을 하여 분자량별 분리하였으며, 이 후 세부적인 size exclusion을 위해 Gel filtration chromatography 하여 fraction을 분리하였다.

2. 10. 1. Ultrafiltration

단백질 효소가수분해물의 분자량별 분리를 위해 Labscale TFF System (Merck Millipore, Germany)을 사용하여 Ultrafiltration을 하였다. 10 kDa 과 5 kDa의 Ultrafilter membrane을 사용하여 10 kDa 이상, 10-5 kDa, 5 kDa 이하로 분리하였으며 동결건조 (-80°C, 3~4일)후 파우더화 하여 이후 실험에 사용하였다.

2. 10. 2. Gel filtration chromatography

우수한 활성을 가진 분자량의 분리물을 D.W 1ℓ에 용해시킨 뒤 Sephadex G-25 column (2.5 x 100cm)을 이용하여 분당 2ml의 유속으로 10ml씩 분리하였다. 분획물은 Spectrophotometer를 사용하여 220nm 흡광도에서 측정한다.

chromatogram을 구하였다.

2. 11. Amino Acid composition analysis

Sephadex G-25 column을 사용하여 분획한 fraction의 구성아미노산 조성비를 확인하기 위해 강산인 HCl을 처리하여 단백질 펩타이드 결합을 완전히 가수분해한 뒤 Pico-Tag 방법을 이용하여 RP-HPLC (reversed-phase high-performance liquid chromatography)로 표준 20종 아미노산에 대해 분석하였으며, 이 중 Tryptophan은 메테인술폰산 (methanesulfonic acid)을 처리하여 별도로 가수분해한 뒤 분석하였다. 분석과정은 speed vac을 통해 건조한 시료 약 100ug을 PITC labeling 한 후 400ul의 buffer에 녹인 다음 이 중 10ul를 HPLC에 loading 하여 측정하였다. 각 아미노산의 표준조건 설정은 HPLC상의 표준물질 retention time을 기준으로 하였고, 정밀성을 높이기 위해 Internal standard로서 N_Leucine을 사용한 내부표준법을 사용하였다. HPLC analysis system은 아래와 같이 구성하여 분석하였으며, 분석조건은 다음과 같다 (Table 2).

System : Waters 510 HPLC Pump x 2, Waters Gradient Controller, Waters 717 Automatic sampler., Column : Waters Pico-tag column (3.9 X 300mm, 4 um)., Detector : Waters 2487 UV detector, 254nm., Data analysis : empower 2 software.

Table 2. HPLC conditions from Amino Acid composition analysis.

Time	Flow	%A	%B
Initial	1.0	100	0
9.0	1.0	86	14
9.2	1.0	80	20
17.5	1.0	54	46
17.7	1.0	0	100
21.0	1.0	100	0
24.0	1.0	100	0
25.0	1.0	100	0

%A ; 140 mM sodium acetate (6% acetonitrile)

%B ; 60% acetonitrile

3. 결과

3. 1. 해마의 일반성분

해마 (*H. abdominalis*)의 일반성분 분석 결과, 조단백은 58.47%, 조지방은 2.60%, 회분 등 기타는 38.93%로 구성된 것을 확인할 수 있었으며, 주 성분이 단백질임을 확인할 수 있었다.

3. 2. 단백질 효소가수분해물의 수율

D.W로 24시간 추출한 추출물 (D)의 수율은 $37.45 \pm 0.35\%$ 로 확인되었으며, 그 외 모든 단백질 효소가수분해를 이용한 효소가수분해물에서 이보다 높은 수율이 확인되었다 (Fig. 2). 소화효소인 Trypsin과 Pepsin을 이용한 효소가수분해에서는 가수분해시간이 1시간, 3시간, 6시간, 12시간으로 증가함에 따라 수율이 상승하는 경향을 확인하였다. Pepsin으로 12시간 가수분해 후 Trypsin으로 12시간을 가수분해하여 복합추출한 효소가수분해물 (PT)의 경우 $69.7 \pm 2.89\%$ 의 수율을 확인할 수 있었으며, D.W로 24시간 추출 후 Trypsin으로 12시간을 가수분해하여 복합추출한 효소가수분해물 (DT)의 경우 이보다 낮은 $52 \pm 2.52\%$ 의 수율을 확인할 수 있었다. D.W로 24시간 추출 후 Pepsin 으로 12시간을 가수분해하여

복합추출한 효소가수분해물 (DP)의 경우 전체 단백질 효소가수분해물 중에서 가장 높은 $78.7 \pm 1.53\%$ 의 수율을 확인할 수 있었다. 기타 상업용효소 5종 (Neutrase, Protamex, Alcalase, Kojizyme, Flavourzyme)을 이용한 효소가수분해물에서는 전반적으로 Trypsin과 Pepsin을 이용한 효소가수분해물 보다 높은 수율을 확인할 수 있었다. 이 중 DP 와 대등하게 높은 수율을 보인 효소가수분해물은 Neutrase로 24시간을 가수분해한 효소가수분해물 (N3)과 Alcalase로 12시간을 가수분해한 효소가수분해물 (A2)로 확인 되었으며 각각 $78.3 \pm 2.00\%$, $78 \pm 1.00\%$ 의 수율을 확인할 수 있었다.

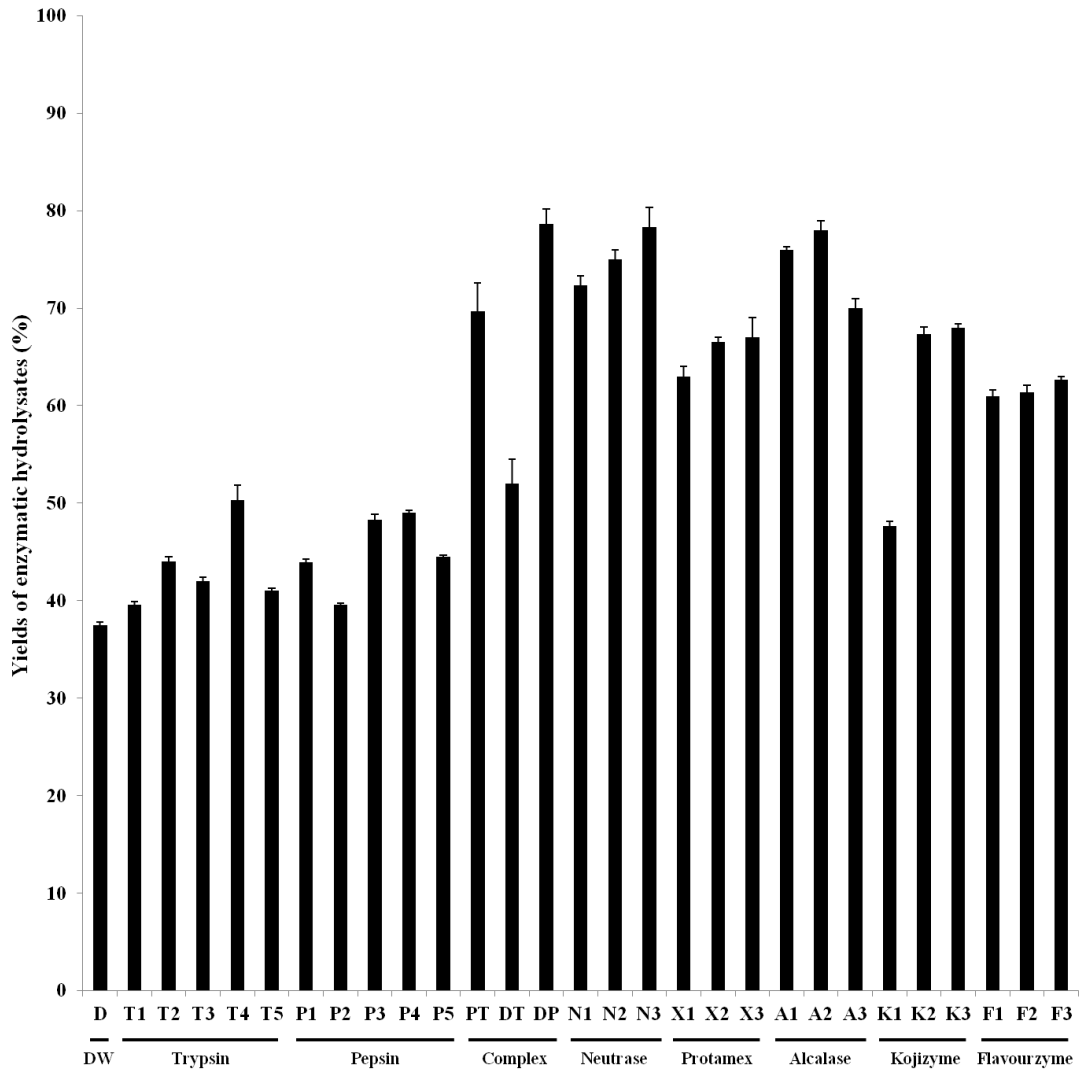


Fig. 2. Yields of enzymatic hydrolysates from *H. abdominalis*.

Mean \pm SD from triplicate determinations. Measurement by the based on the solids content.

3. 3. 단백질 효소가수분해물의 총단백질

동결건조된 해마 조시료 1g으로부터 얻을 수 있는 총단백질은 D.W로 24시간을 추출한 추출물 (D)이 93.38 ± 3.04 mg 으로 확인되었으며, 그 외 모든 효소가수분해를 이용한 추출물에서는 D.W로 24시간을 추출한 추출물 (D) 대비 약 2~3배 가량 높은 총단백질을 얻을 수 있는 것으로 확인되었다 (Table 3). 소화효소를 이용하여 가수분해한 효소가수분해물에서는 Pepsin으로 12시간 가수분해 후 Trypsin으로 12시간을 가수분해하여 복합추출한 효소가수분해물 (PT)이 238.01 ± 1.53 mg의 총단백질을 얻을 수 있는 것으로 확인되었으며, D.W로 24시간 추출 후 Pepsin 으로 12시간을 가수분해하여 복합추출한 효소가수분해물 (DP)이 221.21 ± 7.02 mg의 총단백질을 얻을 수 있는 것으로 확인되었다. 기타 상업용 효소 5종 (Neutrase, Protamex, Alcalase, Kojizyme, Flavourzyme)을 이용한 효소가수분해물 에서는 전반적으로 Trypsin과 Pepsin을 이용한 효소가수분해물 보다 높은 총단백질을 얻을 수 있는 것으로 확인되었다. 이 중 Neutrase로 3시간을 가수분해한 효소가수분해물 (N1)과 Flavourzyme 으로 3시간을 가수분해한 효소가수분해물 (F1) 이 각각 281.38 ± 11.41 mg, 268.68 ± 2.64 mg의 총단백질을 얻을 수 있는 것으로 확인되었다.

Table 3. Yields of Total protein contents from *H. abdominalis*. (mg/g)

	Total protein contents (mg)
D	93.38 ± 3.04
T1	196.90 ± 2.55
T2	190.07 ± 6.21
T3	194.94 ± 4.39
T4	184.37 ± 11.80
T5	127.67 ± 2.79
P1	164.15 ± 2.84
P2	119.13 ± 0.87
P3	206.43 ± 5.21
P4	198.22 ± 2.28
P5	144.21 ± 3.29
PT	238.01 ± 15.49
DT	147.50 ± 7.14
DP	221.21 ± 7.02
N1	281.38 ± 11.41
N2	257.15 ± 8.19
N3	222.19 ± 5.67
X1	247.90 ± 5.75
X2	234.52 ± 2.15
X3	156.12 ± 6.21
A1	226.13 ± 0.89
A2	179.20 ± 3.20
A3	169.40 ± 4.85
K1	202.36 ± 4.60
K2	228.39 ± 3.15
K3	172.61 ± 2.98
F1	268.68 ± 2.64
F2	252.12 ± 6.83
F3	251.20 ± 1.56

Mean ± SD from triplicate determinations.

3. 4. 자유 라디칼 (free radical) 소거활성의 평가

3. 4. 1. DPPH radical

단백질 효소가수분해 조건에 따른 DPPH radical 소거활성을 평가한 결과 우수한 활성을 갖는 5개의 추출물을 확인하였으며 (Fig. 3), IC₅₀값 (mg/ml)을 산출한 결과 D.W로 24시간 추출한 추출물 (D)이 0.52 ± 0.02 , D.W로 24시간 추출 후 Trypsin으로 12시간을 가수분해하여 복합추출한 효소가수분해물 (DT)이 0.28 ± 0.00 , D.W로 24시간 추출 후 Pepsin으로 12시간을 가수분해하여 복합추출한 효소가수분해물 (DP)이 0.77 ± 0.04 , Kojizyme으로 12시간을 가수분해하여 추출한 효소가수분해물 (K2)이 1.09 ± 0.10 , Kojizyme으로 24시간을 가수분해하여 추출한 효소가수분해물 (K3)이 1.23 ± 0.10 으로 확인되었으며, 이 중 DT가 전체 추출물 중 가장 우수한 DPPH radical 소거활성을 나타내는 것을 확인하였다 (Table 4).

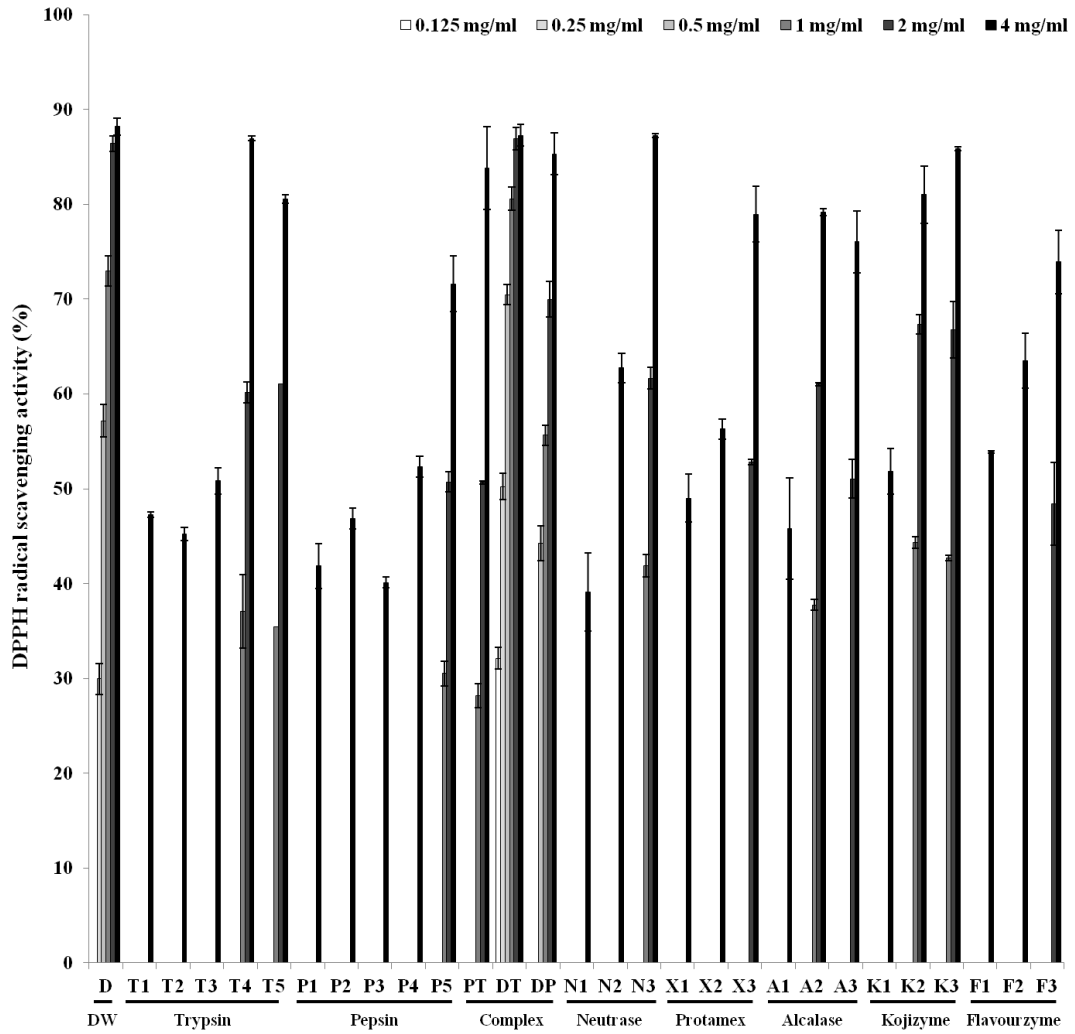


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of enzymatic hydrolysates. (%)

Mean \pm SD from triplicate determinations.

Table 4. DPPH radical scavenging activity of enzymatic hydrolysates. (IC₅₀ values)

DPPH radical scavenging activity (IC ₅₀ , mg/ml)	
D	0.52 ± 0.02
T1	>4
T2	>4
T3	<4
T4	1.62 ± 0.10
T5	1.70 ± 0.00
P1	>4
P2	>4
P3	>4
P4	<4
P5	2.26 ± 0.08
PT	2.11 ± 0.09
DT	0.28 ± 0.00
DP	0.77 ± 0.04
N1	>4
N2	<4
N3	1.41 ± 0.08
X1	>4
X2	<4
X3	>2
A1	>4
A2	1.62 ± 0.02
A3	>2
K1	<4
K2	1.09 ± 0.10
K3	1.23 ± 0.10
F1	<4
F2	<4
F3	>2

Mean ± SD from triplicate determinations.

3. 4. 2. Hydroxyl radical

단백질 효소가수분해 조건에 따른 Hydroxyl radical 소거활성을 평가한 결과, 소화효소를 이용한 효소가수분해물에서는 Pepsin을 사용하여 가수분해한 효소가수분해물에 비해 Trypsin을 사용하여 가수분해한 효소가수분해물이 우수한 활성을 갖는 경향을 확인하였으며, 기타효소를 이용한 효소가수분해물에서는 Protamex를 사용하여 가수분해한 효소가수분해물이 우수한 활성을 갖는 경향을 확인하였다 (Fig. 4). 이 중 우수한 활성을 가진 추출물의 IC₅₀값 (mg/ml)을 산출한 결과 Trypsin으로 24시간 가수분해하여 추출한 효소가수분해물 (T5)이 0.69 ± 0.10, D.W로 24시간 추출 후 Trypsin으로 12시간을 가수분해하여 복합추출한 효소가수분해물 (DT)이 0.70 ± 0.12, Protamex로 12시간 가수분해하여 추출한 효소가수분해물 (X2)이 0.59 ± 0.18, Protamex로 24시간 가수분해하여 추출한 효소가수분해물 (X3)이 0.59 ± 0.08 으로 확인되었으며 Protamex를 사용하여 가수분해한 효소가수분해물이 전체 추출물 중 가장 우수한 Hydroxyl radical 소거활성을 나타내는 것을 확인하였다 (Table 5).

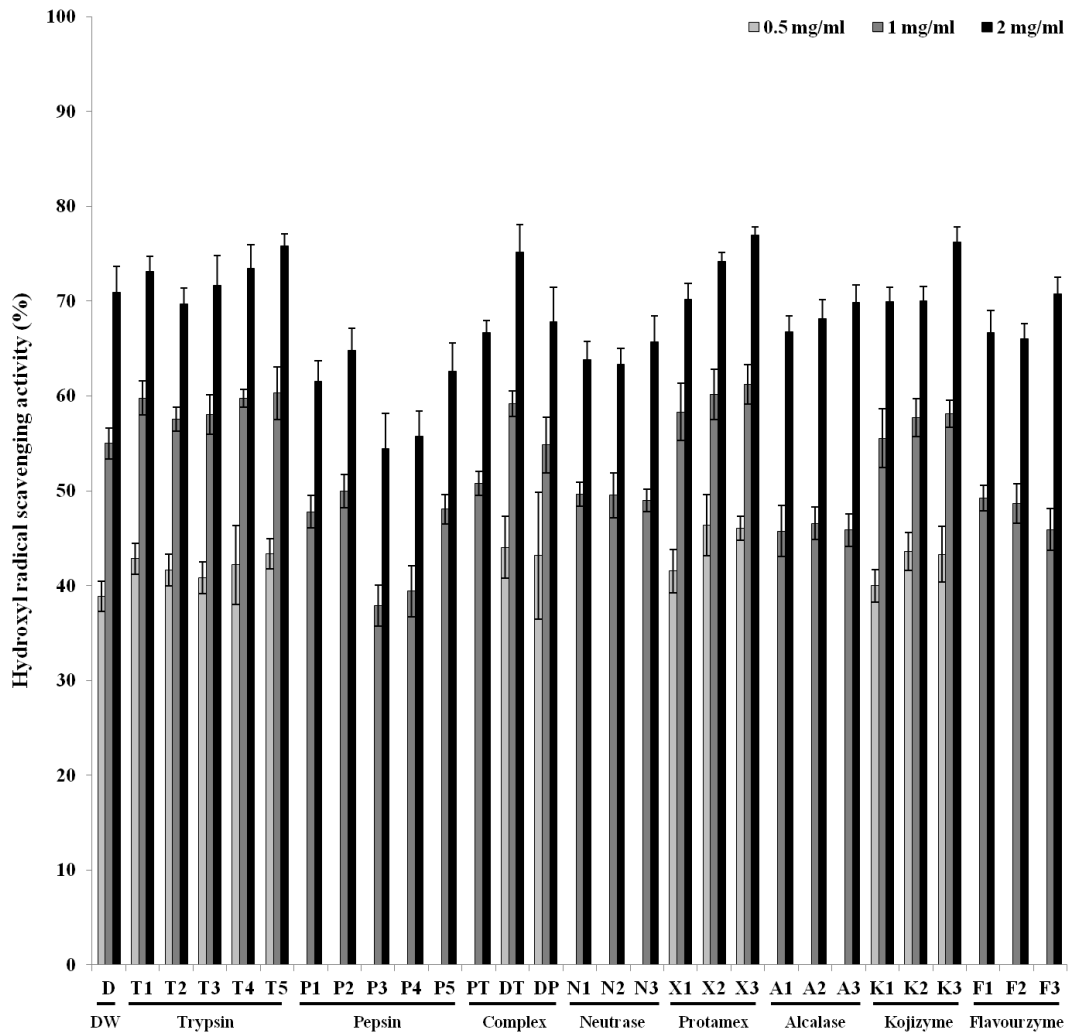


Fig. 4. Hydroxyl radical scavenging activity of enzymatic hydrolysates. (%)

Mean \pm SD from triplicate determinations.

Table 5. Hydroxyl radical scavenging activity of enzymatic hydrolysates. (IC₅₀ values)

Hydroxyl radical scavenging activity (IC ₅₀ , mg/ml)	
D	0.93 ± 0.09
T1	0.72 ± 0.09
T2	0.81 ± 0.08
T3	0.82 ± 0.10
T4	0.74 ± 0.14
T5	0.69 ± 0.10
P1	>1
P2	>1
P3	>1
P4	>1
P5	>1
PT	<1
DT	0.70 ± 0.12
DP	0.81 ± 0.14
N1	>1
N2	>1
N3	>1
X1	0.79 ± 0.14
X2	0.59 ± 0.18
X3	0.59 ± 0.08
A1	>1
A2	>1
A3	>1
K1	0.90 ± 0.11
K2	0.74 ± 0.12
K3	0.73 ± 0.11
F1	>1
F2	>1
F3	>1

Mean ± SD from triplicate determinations.

3. 4. 3. Alkyl radical

단백질 효소가수분해 조건에 따른 Alkyl radical 소거활성을 평가한 결과, 소화 효소를 이용한 효소가수분해물에서는 Pepsin을 사용하여 가수분해한 효소가수분해물에 비해 Trypsin을 사용하여 가수분해한 효소가수분해물이 우수한 활성을 갖는 경향을 확인하였으며, 기타효소를 이용한 효소가수분해물에서는 Neutralse를 사용하여 가수분해한 효소가수분해물이 우수한 활성을 갖는 경향을 확인하였다 (Fig. 5). 이 중 우수한 활성을 가진 추출물의 IC₅₀값 (mg/ml)을 산출한 결과 D.W로 24시간 추출 후 Trypsin으로 12시간을 가수분해하여 복합추출한 효소가수분해물 (DT)이 0.15 ± 0.00, D.W로 24시간 추출 후 Pepsin으로 12시간을 가수분해하여 복합추출한 효소가수분해물 (DP)이 0.15 ± 0.00, Neutralse로 12시간 가수분해하여 추출한 효소가수분해물 (N2)이 0.23 ± 0.03, Neutralse로 24시간 가수분해하여 추출한 효소가수분해물 (N3)이 0.18 ± 0.16 으로 확인되었으며 DT와 DP가 전체 추출물 중 가장 우수한 Alkyl radical 소거활성을 나타내는것을 확인하였다 (Table 6).

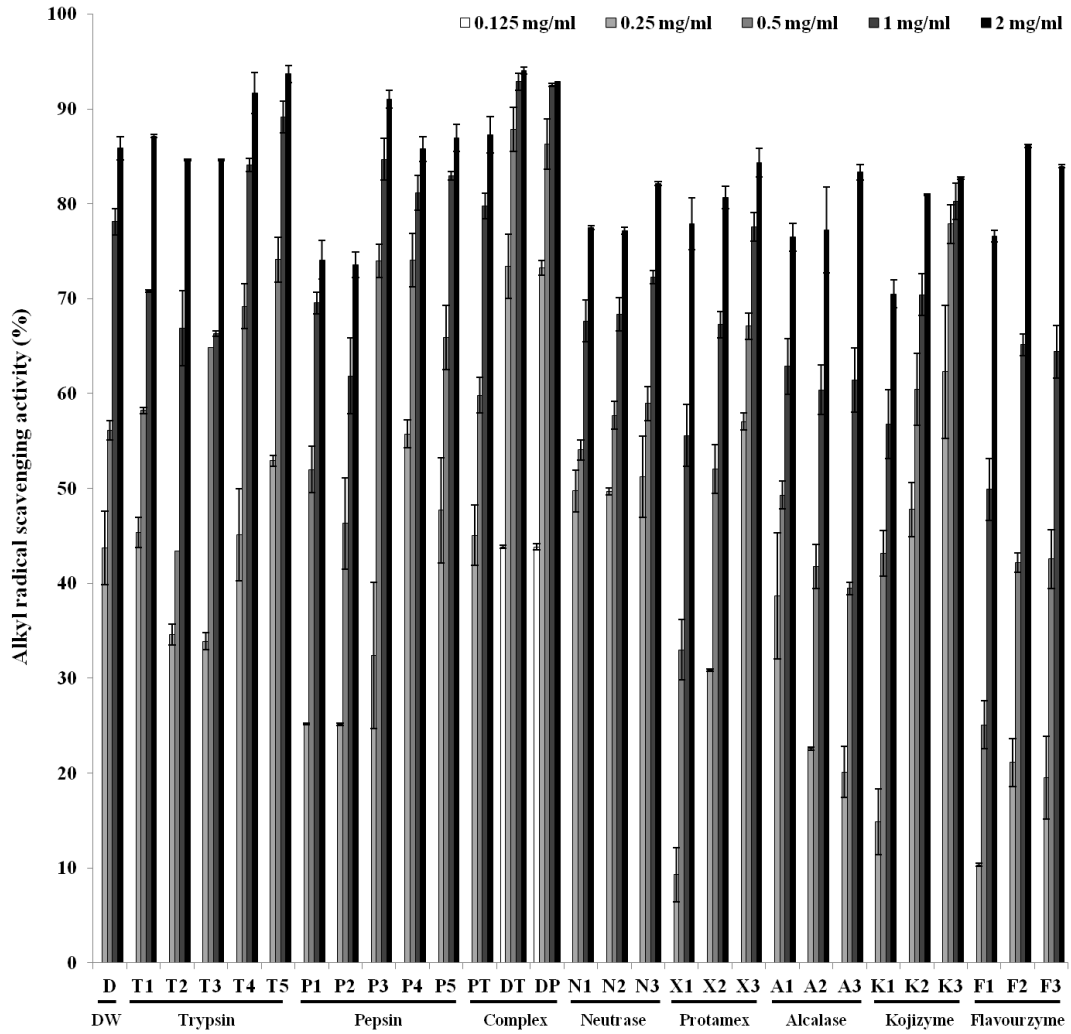


Fig. 5. Alkyl radical scavenging activity of enzymatic hydrolysates. (%)

Mean ± SD from triplicate determinations.

Table 6. Alkyl radical scavenging activity of enzymatic hydrolysates. (IC₅₀ values)

	Alkyl radical scavenging activity (IC ₅₀ , mg/ml)
D	0.38 ± 0.06
T1	0.33 ± 0.03
T2	0.63 ± 0.03
T3	0.41 ± 0.02
T4	0.25 ± 0.05
T5	<0.25
P1	0.60 ± 0.02
P2	0.59 ± 0.15
P3	0.36 ± 0.08
P4	<0.25
P5	0.24 ± 0.06
PT	0.33 ± 0.06
DT	0.15 ± 0.00
DP	0.15 ± 0.00
N1	0.28 ± 0.09
N2	0.23 ± 0.03
N3	0.18 ± 0.16
X1	0.78 ± 0.16
X2	0.58 ± 0.01
X3	<0.25
A1	0.51 ± 0.03
A2	0.73 ± 0.09
A3	0.77 ± 0.03
K1	0.78 ± 0.00
K2	0.25 ± 0.00
K3	<0.25
F1	0.99 ± 0.25
F2	0.71 ± 0.02
F3	0.70 ± 0.03

Mean ± SD from triplicate determinations.

3. 4. 4. Hydrogen peroxide

단백질 효소가수분해 조건에 따른 Hydrogen peroxide 소거활성을 평가한 결과, 소화효소를 이용한 효소가수분해물에서는, Pepsin을 사용하여 가수분해한 효소가수분해물에 비해 Trypsin을 사용하여 가수분해한 효소가수분해물이 우수한 활성을 갖는 경향을 확인하였으며, 기타효소를 이용한 효소가수분해물에서는 Protamex를 사용하여 가수분해한 효소가수분해물과 Kojizyme을 사용하여 가수분해한 효소가수분해물이 우수한 활성을 갖는 경향을 확인하였다 (Fig. 6). 이 중 우수한 활성을 가진 추출물의 IC₅₀값 (mg/ml)을 산출한 결과 D.W로 24시간 추출 후 Trypsin으로 12시간을 가수분해하여 복합추출한 효소가수분해물 (DT)이 0.23 ± 0.02, D.W로 24시간 추출 후 Pepsin으로 12시간을 가수분해하여 복합추출한 효소가수분해물 (DP)이 0.89 ± 0.03, Protamex로 24시간 가수분해하여 추출한 효소가수분해물 (X3)이 0.56 ± 0.04, Kojizyme으로 24시간을 가수분해하여 추출한 효소가수분해물 (K3)이 0.42 ± 0.26으로 확인되었으며 DT가 전체 추출물 중 가장 우수한 Hydrogen peroxide 소거활성을 나타내는것을 확인하였다 (Table 7).

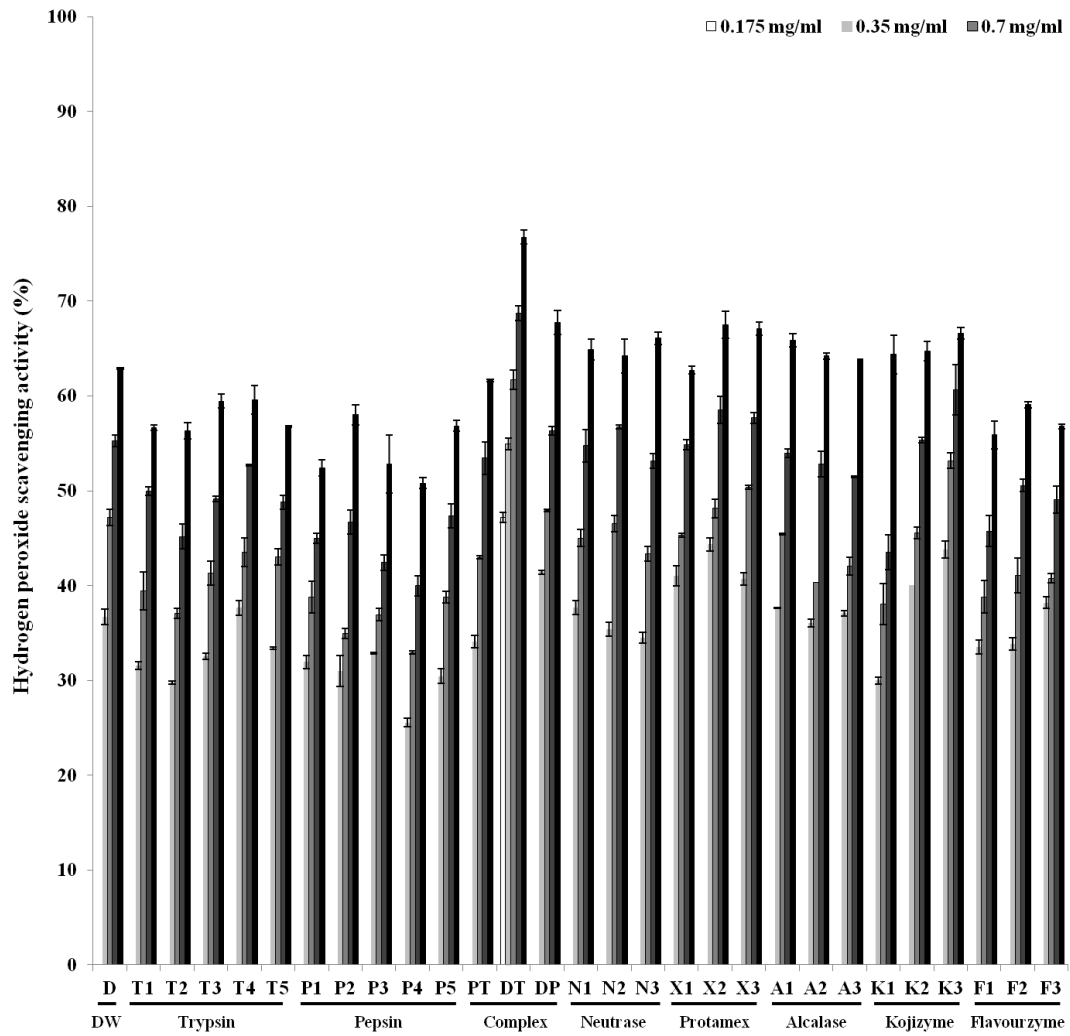


Fig. 6. Hydrogen peroxide scavenging activity of enzymatic hydrolysates. (%)

Mean \pm SD from triplicate determinations.

Table 7. Hydrogen peroxide scavenging activity of enzymatic hydrolysates. (IC₅₀ values)

Hydrogen peroxide scavenging activity (IC ₅₀ , mg/ml)	
D	0.92 ± 0.11
T1	1.38 ± 0.05
T2	1.84 ± 0.31
T3	1.64 ± 0.09
T4	1.20 ± 0.03
T5	1.71 ± 0.08
P1	2.09 ± 0.51
P2	1.75 ± 0.28
P3	2.45 ± 0.33
P4	2.68 ± 0.09
P5	1.73 ± 0.36
PT	1.25 ± 0.17
DT	0.23 ± 0.02
DP	0.89 ± 0.03
N1	1.10 ± 0.11
N2	1.01 ± 0.03
N3	1.20 ± 0.04
X1	1.04 ± 0.00
X2	0.79 ± 0.07
X3	0.56 ± 0.04
A1	1.10 ± 0.01
A2	1.25 ± 0.07
A3	1.29 ± 0.01
K1	1.73 ± 0.03
K2	1.02 ± 0.02
K3	0.42 ± 0.26
F1	1.88 ± 0.35
F2	1.45 ± 0.17
F3	1.51 ± 0.12

Mean ± SD from triplicate determinations.

3. 5. Vero cell 에서의 항산화 활성 평가

D.W로 24시간 추출한 추출물 (D) 및 단백질 효소가수분해를 사용하여 제조한 가수분해물 28종에 대해 *In vitro* 상의 항산화 활성을 스크리닝한 결과 다른 효소가수분해물 대비 전반적으로 우수한 항산화 활성을 갖는 일부 효소가수분해물을 확인하였으며, 이 중 산업적이용을 고려 하였을 때 가장 높은 수율과 총단백질을 얻을 수 있는 D.W로 24시간 추출 후 Pepsin으로 12시간을 가수분해하여 복합추출한 효소가수분해물 (DP ; HADPH)이 Cell line 상에서도 활성을 보이는지 확인하고자 Vero cell 에서의 항산화 활성을 평가하였다. 이에 따라 시료처리에 대한 Cytotoxicity를 확인하고 산화적 스트레스를 유도하였을 때의 Total ROS 변화와 Cell viability를 확인하여 항산화 활성을 평가하였다.

3. 5. 1. Cytotoxicity

MTT assay를 하여 세포생존율을 측정한 결과 D.W로 24시간 추출 후 Pepsin으로 12시간을 가수분해하여 복합추출한 HADPH의 50~200 µg/ml 농도 처리에 의한 세포독성은 없는 것으로 확인되었다 (**Fig. 7**).

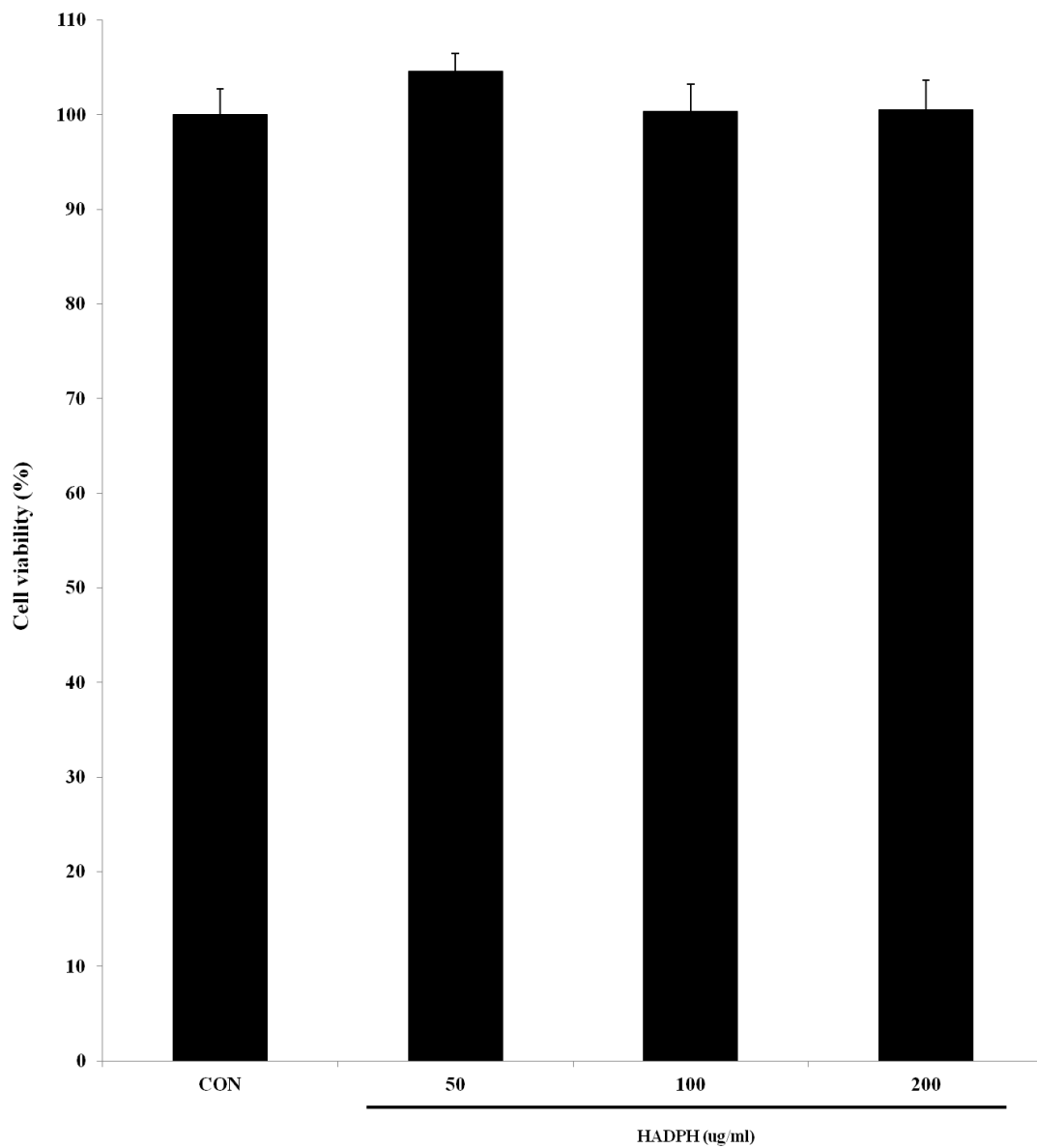


Fig. 7. Cytotoxicity by HADPH in vero cells. (%)

Mean \pm SD from triplicate determinations. HADPH ; *Hippocampus abdominalis* Distilled water Pepsin Hydrolysates ; extract from freeze dried seahorse. Hydrolysis for 12 hours by pepsin after extraction for 24 hours by water.

3. 5. 2. Total ROS

4mM AAPH의 산화적 스트레스를 유도하였을 때 HADPH 50~100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리에 의해 Total ROS 생성이 농도의존적으로 감소하는 경향을 확인하였다. 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리에 의해 Total ROS 생성이 $83.52 \pm 1.90\%$ 수준으로 감소하는 것으로 확인되었다 (**Fig. 8**).

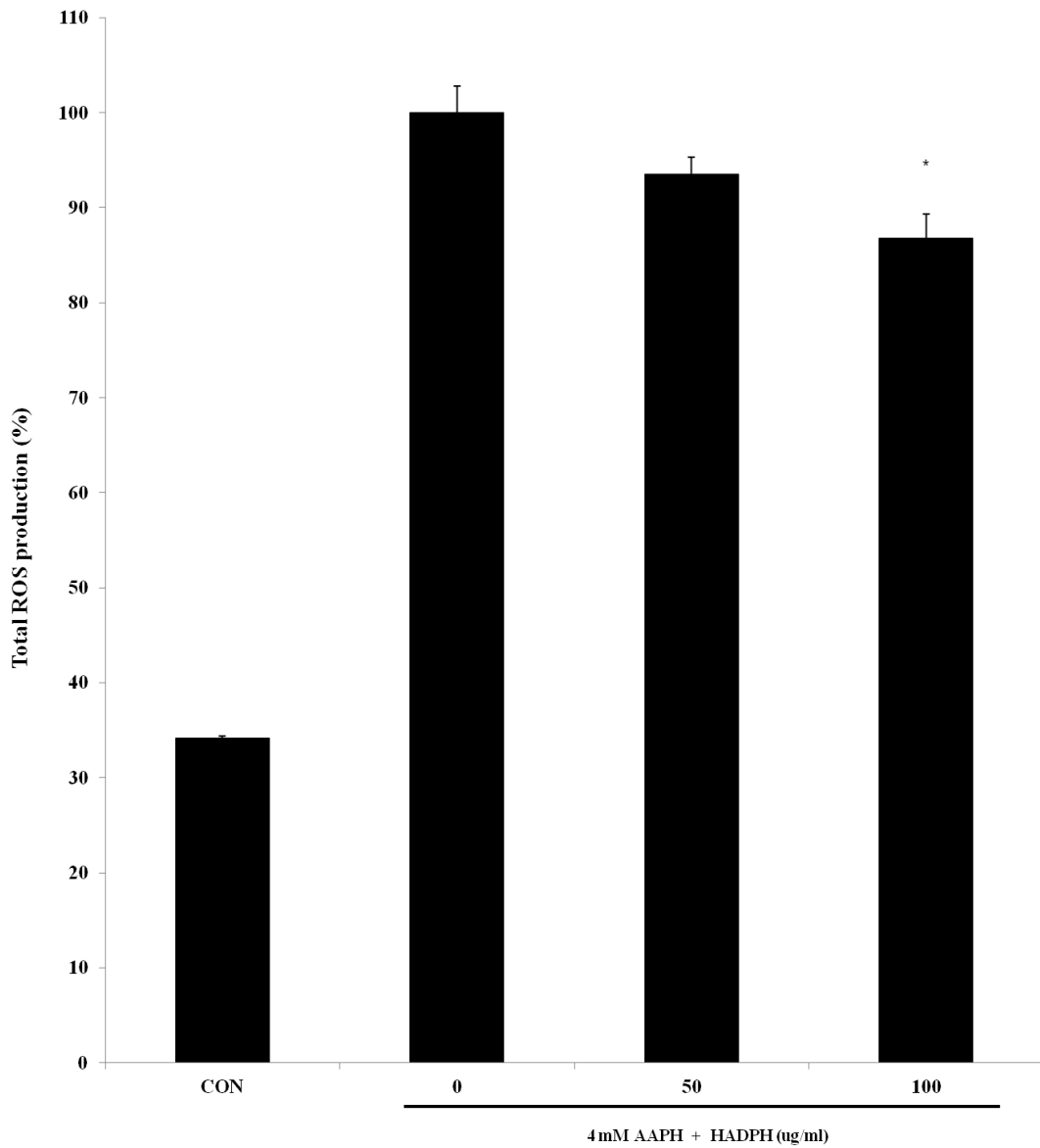


Fig. 8. Total ROS production by HADPH treatment in vero cells induced by AAPH-oxidative stress. (%)

Mean \pm SD from triplicate determinations. HADPH ; *Hippocampus abdominalis* Distilled water Pepsin Hydrolysates ; extract from freeze dried seahorse. Hydrolysis for 12 hours by pepsin after extraction for 24 hours by water.

3. 5. 3. Cell viability

4mM AAPH의 산화적 스트레스를 유도하였을 때 HADPH 50~100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리에 의해 세포 생존력이 농도의존적으로 증가하는 경향을 확인하였다. HADPH 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리에 의한 세포 생존력은 $80.98 \pm 2.58\%$ 수준으로 증가하는것으로 확인되었다 (Fig. 9).

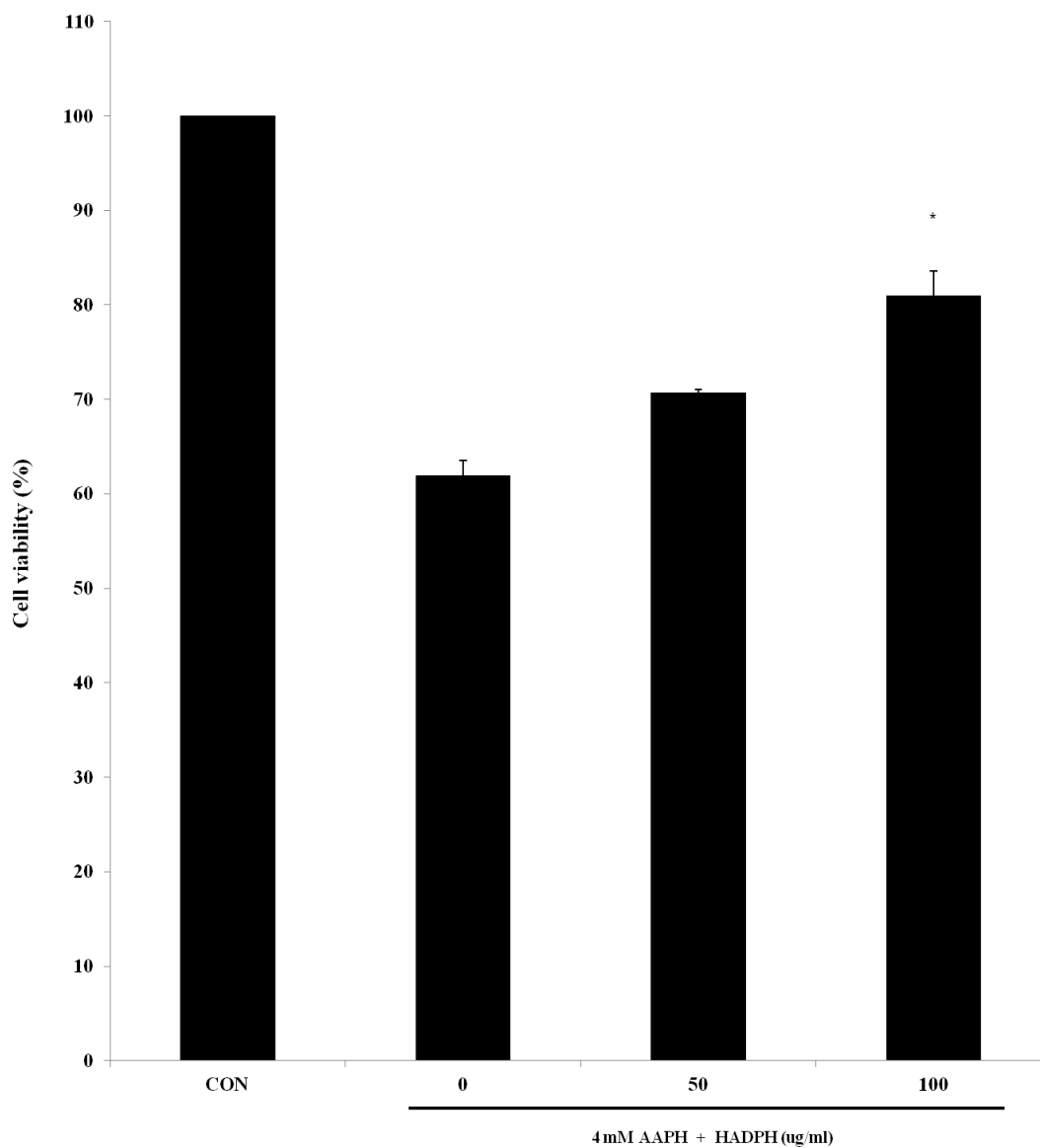


Fig. 9. Cell viability by HADPH treatment in vero cells induced by AAPH-oxidative stress. (%)

Mean \pm SD from triplicate determinations. HADPH ; *Hippocampus abdominalis* Distilled water Pepsin Hydrolysates ; extract from freeze dried seahorse. Hydrolysis for 12 hours by pepsin after extraction for 24 hours by water.

3. 6. Ultrafiltration

D.W로 24시간 추출 후 Pepsin으로 12시간을 가수분해하여 복합추출한 효소가 수분해물 (DP ; HADPH)이 *in vitro* 와 Cell line 상에서 모두 항산화 활성을 나타내는 것으로 확인되어 이로부터 항산화 활성이 높은 생리활성 펩타이드의 존재를 확인하기 위해 Ultrafiltration을 하여 10kDa 이상, 10-5kDa, 5kDa 이하의 분자량별로 분리하였으며 각 분획물의 항산화 활성을 측정하였다.

3. 6. 1. Alkyl radical 소거활성의 평가

10kDa 이상, 10-5kDa, 5kDa 이하의 분자량별 분획물의 Alkyl radical 소거활성을 평가한 결과 HADPH는 저분자화 됨에 따라 Alkyl radical 소거활성이 높은 것으로 확인되었으며 농도의존적으로 활성이 증가하는 경향을 확인하였다. 분자량별 분획물의 IC₅₀값 (mg/ml)을 산출한 결과 10 kDa 이상이 0.24 ± 0.00, 10-5 kDa이 0.21 ± 0.00, 5 kDa 이하가 0.15 ± 0.01로 확인되었다 (**Fig. 10**).

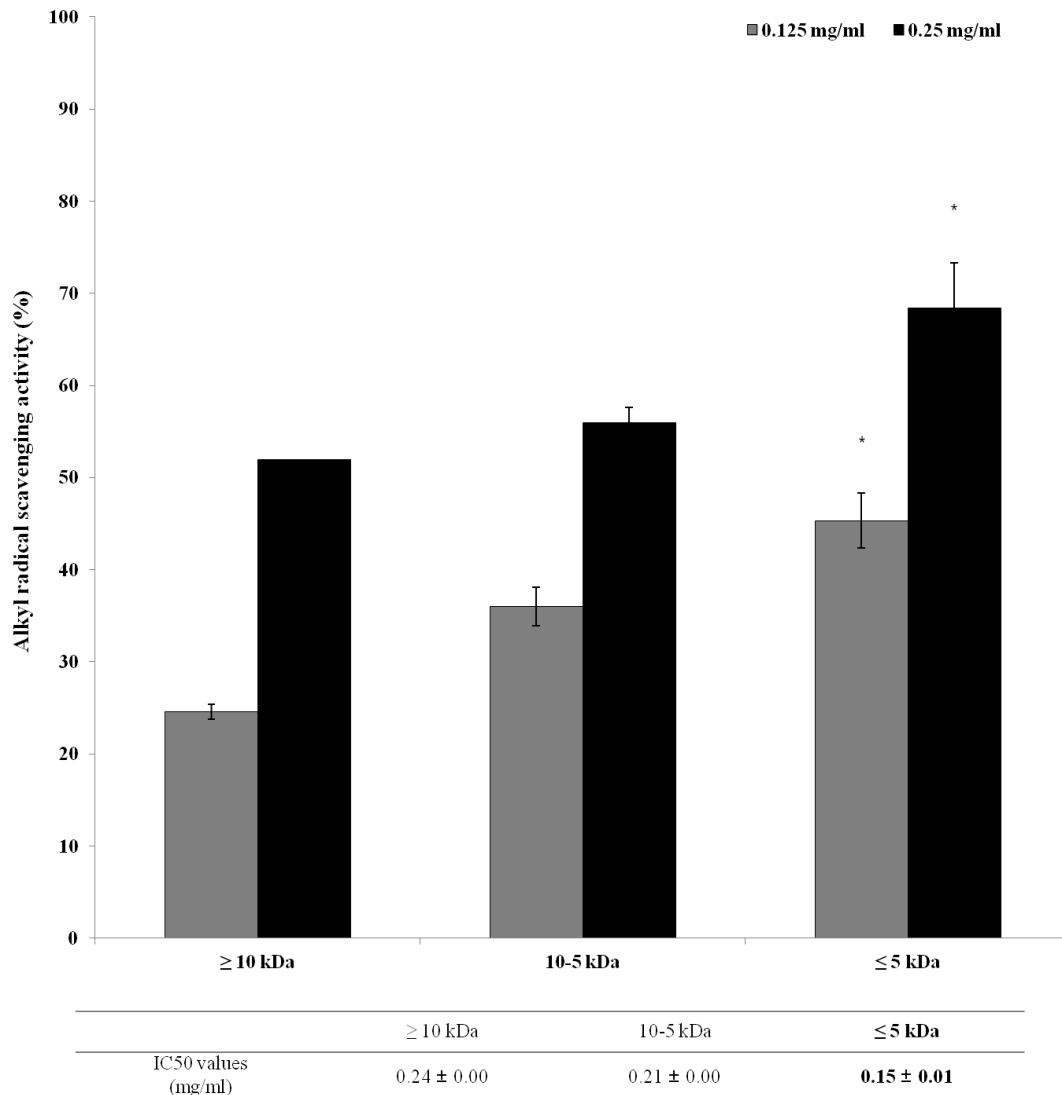


Fig. 10. Alkyl radical scavenging activity of specific molecular weight fractions of HADPH. (%)

Mean ± SD from triplicate determinations. HADPH ; *Hippocampus abdominalis* Distilled water Pepsin Hydrolysates ; extract from freeze dried seahorse. Hydrolysis for 12 hours by pepsin after extraction for 24 hours by water.

3. 6. 2. Vero cell 에서의 항산화 활성 평가

3. 6. 2. 1. Cytotoxicity

MTT assay를 하여 세포생존율을 측정한 결과 10kDa 이상, 10-5kDa, 5kDa 이하의 50~100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리에 의한 세포독성은 나타나지 않았다 (**Fig. 11**).

3. 6. 2. 2. Total ROS

4mM AAPH의 산화적 스트레스를 유도하였을 때 10kDa 이상, 10-5kDa, 5kDa 이하의 50~100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리에 의한 Total ROS 생성은 농도의존적으로 감소하는 경향이 확인되었으며 HADPH가 저분자화 됨에 따라 Total ROS 생성이 감소되는 경향을 확인하였다. 5kDa 이하의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리에 의해 Total ROS 생성이 $61.01 \pm 0.49\%$ 로 감소하였으며, 산화적 스트레스를 입지 않은 대조구와 비교하면 약 50% 수준으로 감소되는 것으로 확인되었다 (**Fig. 12**).

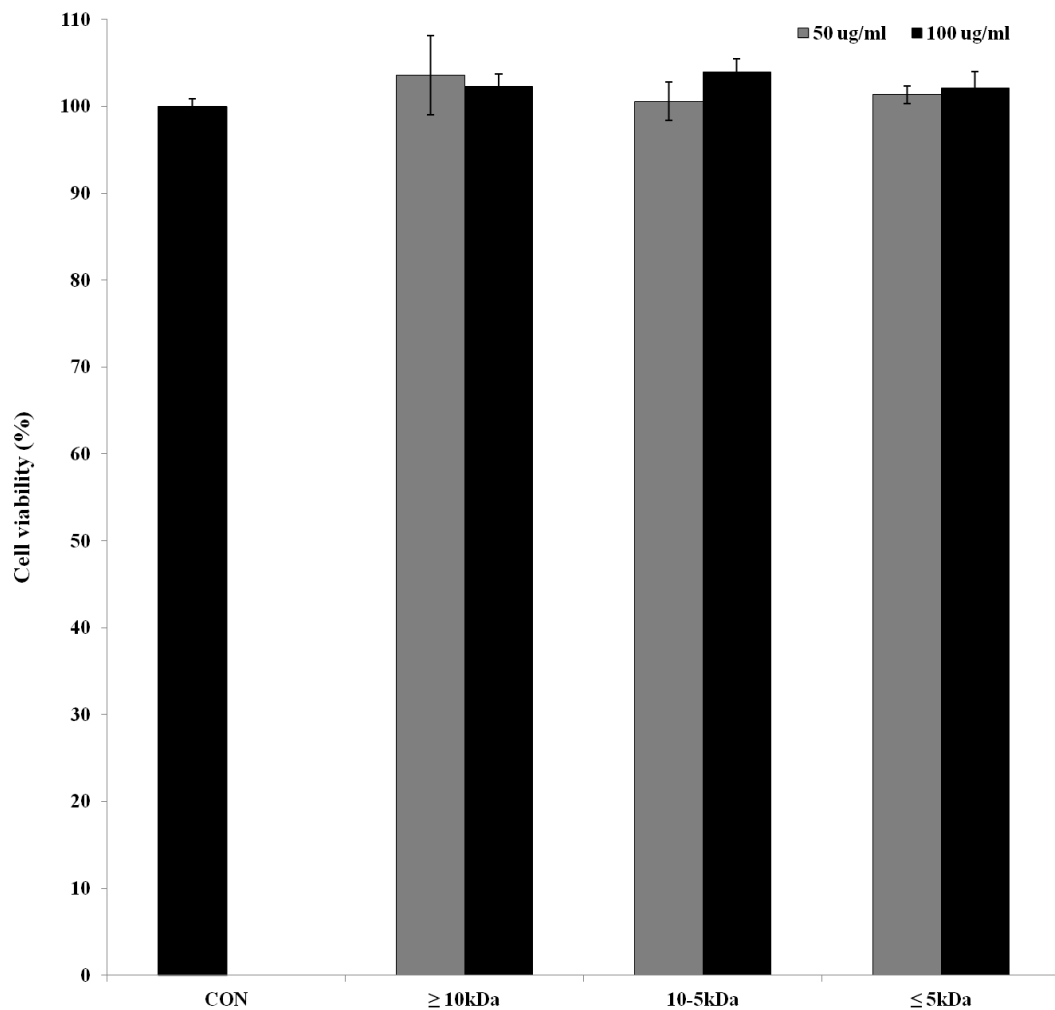


Fig. 11. Cytotoxicity by specific molecular weight fractions of HADPH in vero cells. (%)

Mean \pm SD from triplicate determinations. HADPH ; *Hippocampus abdominalis* Distilled water Pepsin Hydrolysates ; extract from freeze dried seahorse. Hydrolysis for 12 hours by pepsin after extraction for 24 hours by water.

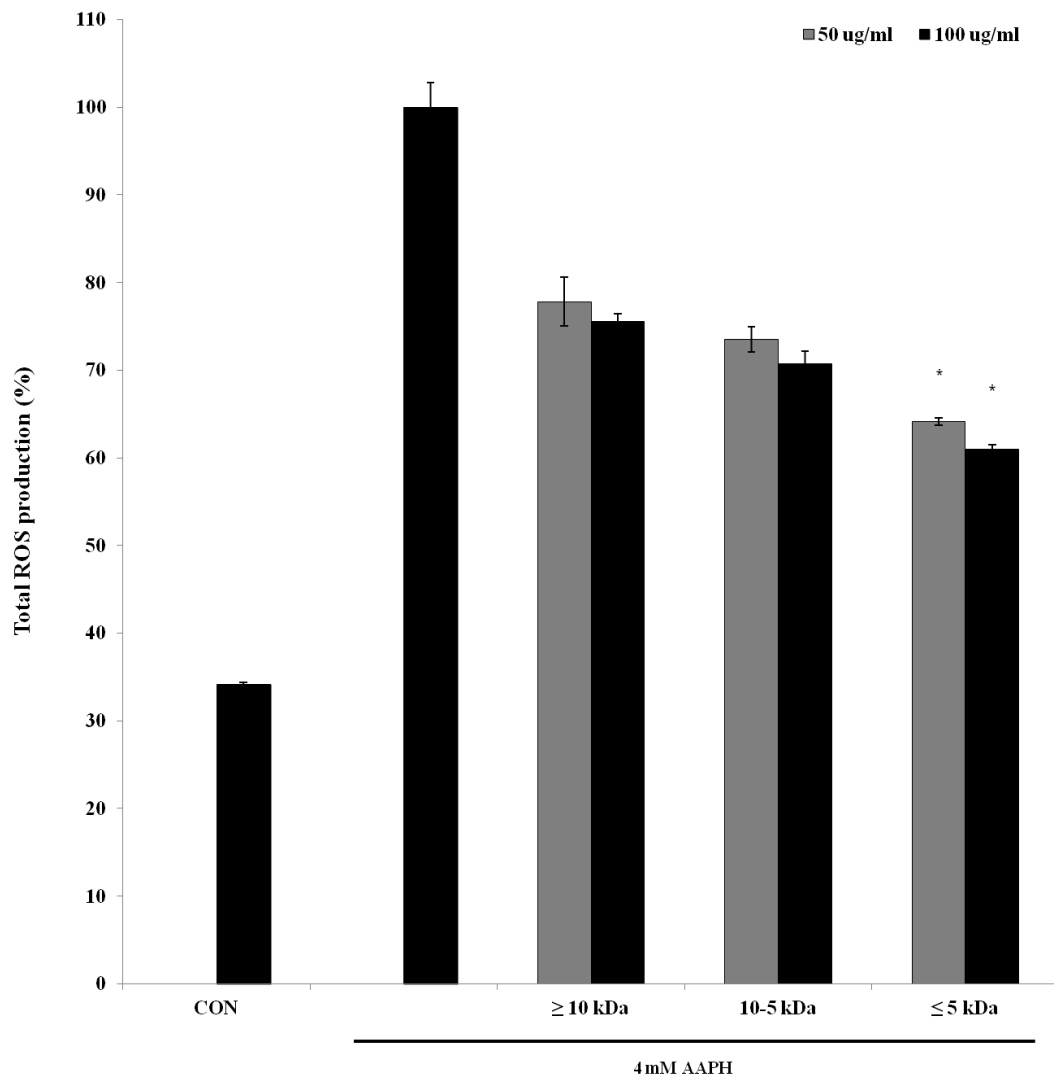


Fig. 12. Total ROS production by specific molecular weight fractions of HADPH treatment in vero cells induced by AAPH-oxidative stress. (%)

Mean \pm SD from triplicate determinations. HADPH ; *Hippocampus abdominalis* Distilled water Pepsin Hydrolysates ; extract from freeze dried seahorse. Hydrolysis for 12 hours by pepsin after extraction for 24 hours by water.

3. 6. 2. 3. Cell viability

4mM AAPH의 산화적 스트레스를 유도하였을 때 10kDa 이상, 10-5kDa, 5kDa 이하의 50~100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리에 의한 세포 생존력은 농도의존적으로 증가하는 경향이 확인되었으며 HADPH가 저분자화 됨에 따라 세포 생존력이 증가하는 경향을 확인하였다. 5kDa 이하의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리에 의해 세포 생존력이 $77.17 \pm 2.12\%$ 로 증가하였으며, 산화적 스트레스를 입지 않은 대조구와 비교하면 약 50% 수준으로 증가되는 것으로 확인되었다 (**Fig. 13**).

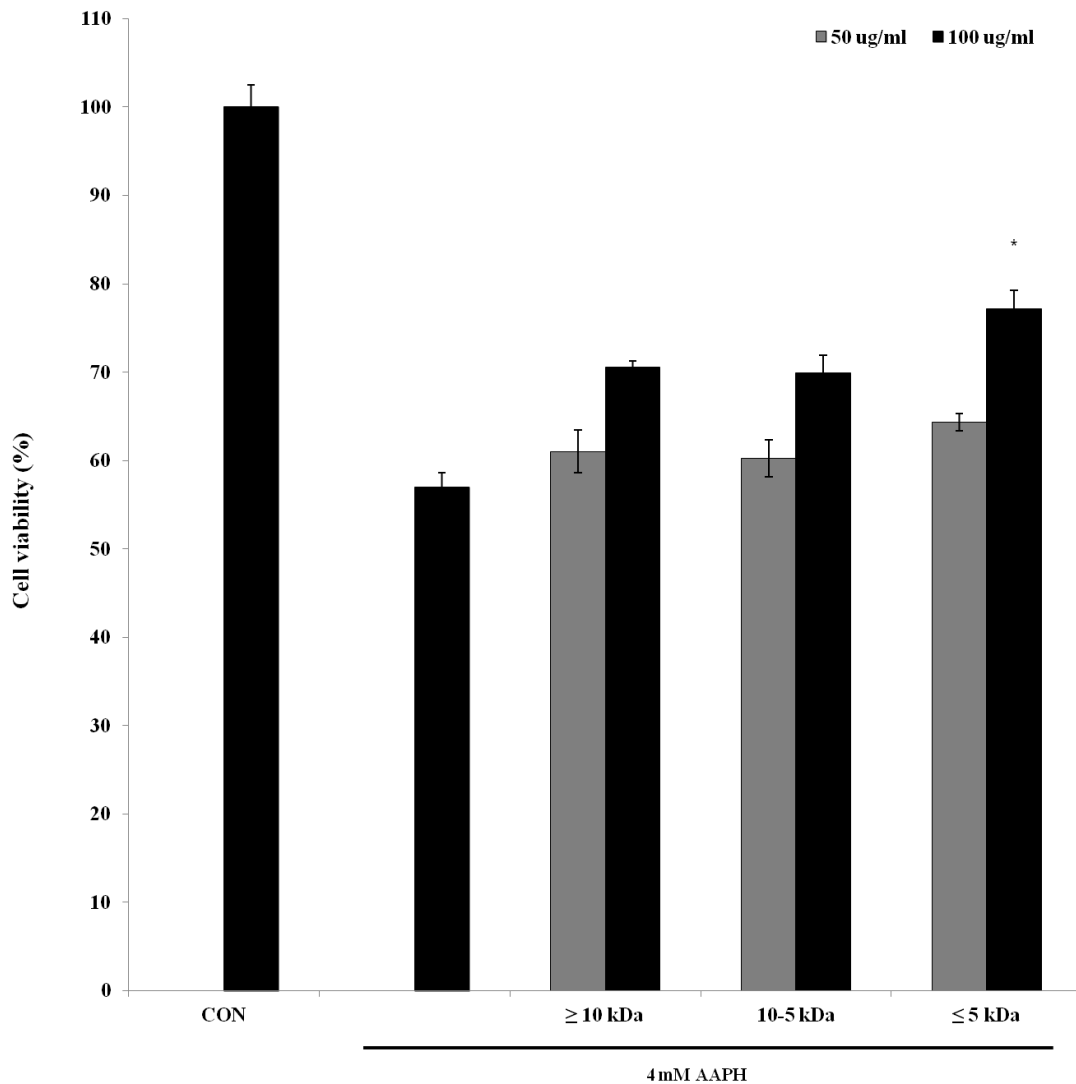


Fig. 13. Cell viability by specific molecular weight fractions of HADPH treatment in vero cells induced by AAPH-oxidative stress. (%)

Mean \pm SD from triplicate determinations. HADPH ; *Hippocampus abdominalis* Distilled water Pepsin Hydrolysates ; extract from freeze dried seahorse. Hydrolysis for 12 hours by pepsin after extraction for 24 hours by water.

3. 6. 3. Zebrafish embryo 에서의 항산화 활성 평가

10 kDa 이상, 10-5 kDa, 5 kDa 이하의 분자량별 분획물 중 Alkyl radical 소거능과 Vero cell 에서의 항산화 활성을 확인한 결과 5 kDa 이하의 저분자성 펩타이드가 우수한 활성을 보여 이로부터 70% epiboly 단계의 Zebrafish embryo에 15mM AAPH의 산화적 스트레스를 유도하였을 때 경과시간에 따른 Zebrafish의 생존율을 측정하여 항산화 활성을 평가하였다. 산화적 스트레스 유도 후 3시간이 경과하였을 때 50~200 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리에 의한 생존율은 농도의존적으로 증가하는 경향이 확인 되었으며 24시간, 48시간, 72시간으로 경과함에도 이러한 경향은 유지되었다. 산화적 스트레스를 입지 않은 대조구와 산화적 스트레스를 입은 대조구를 비교하였을 때 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도처리는 약 50%에 가까운 생존율을 유지시켜 주는 것으로 확인되었으며 이로부터 HADPH 5 kDa 이하의 저분자성 펩타이드는 AAPH로 유도된 산화적스트레스로부터 항산화 활성으로 인한 보호효과가 확인되었다 (**Fig. 14**).

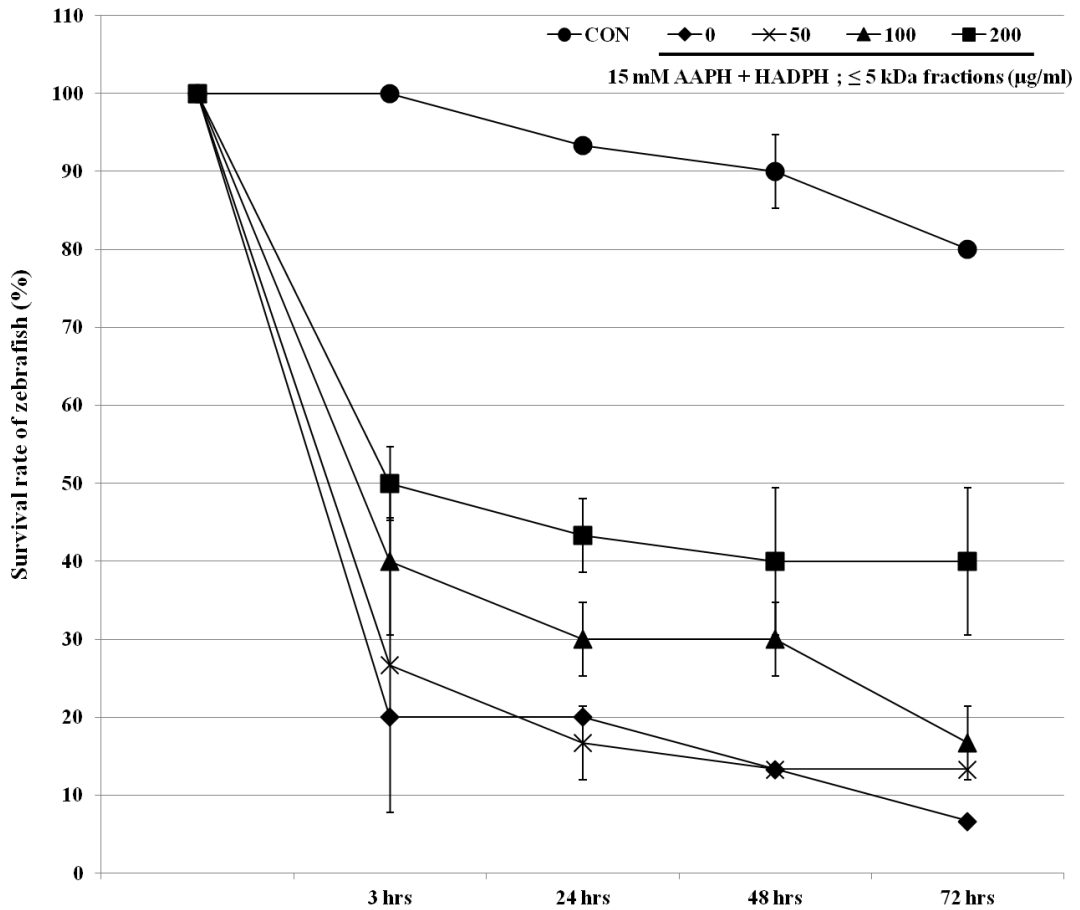


Fig. 14. Survival rate by ≤ 5 kDa fractions of HADPH treatment in zebrafish embryo induced by AAPH-oxidative stress. (%)

Mean ± SD from triplicate determinations. HADPH ; *Hippocampus abdominalis* Distilled water Pepsin Hydrolysates ; extract from freeze dried seahorse. Hydrolysis for 12 hours by pepsin after extraction for 24 hours by water.

3. 7. Sephadex G-25 gel filtration chromatogram

우수한 활성을 보이는 5kDa 이하 펩타이드 분획물의 세부적인 분자량별 분리를 위해 Sephadex G-25 column을 사용하여 분리한 결과 4개의 fraction을 확인할 수 있었다 (**Fig. 15**). 이 후 분리된 펩타이드의 항산화 활성을 확인하고자 Alkyl radical 소거활성을 측정하였고, Amino Acid composition analysis를 하여 각 fraction별로 구성아미노산 조성비를 확인하였다.

3. 7. 1. Alkyl radical 소거활성의 평가

4개의 fraction중 F1, F2와 F4는 낮은 Alkyl radical 소거활성을 보였으나, F3에서 아주 우수한 Alkyl radical 소거활성을 확인할 수 있었다. F3의 IC₅₀값은 $92.18 \pm 7.37 \mu\text{g/ml}$ 로 확인되었다 (**Fig. 16**).

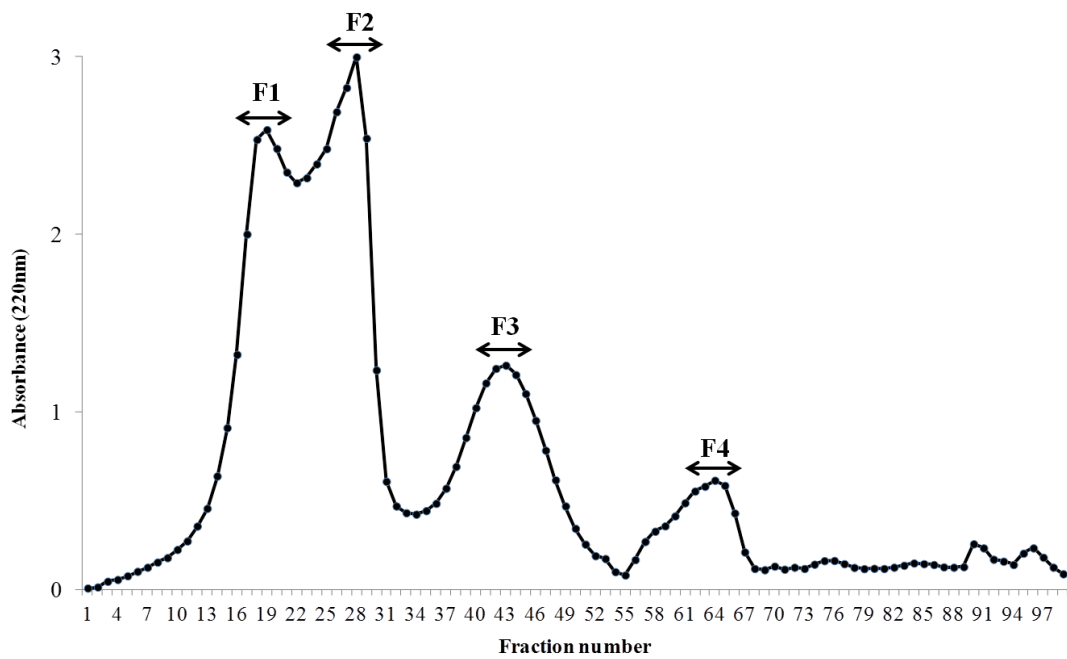


Fig. 15. Sephadex G-25 gel filtration chromatogram of ≤ 5 kDa fractions of HADPH.

HADPH ; *Hippocampus abdominalis* Distilled water Pepsin Hydrolysates ; extract from freeze dried seahorse. Hydrolysis for 12 hours by pepsin after extraction for 24 hours by water.

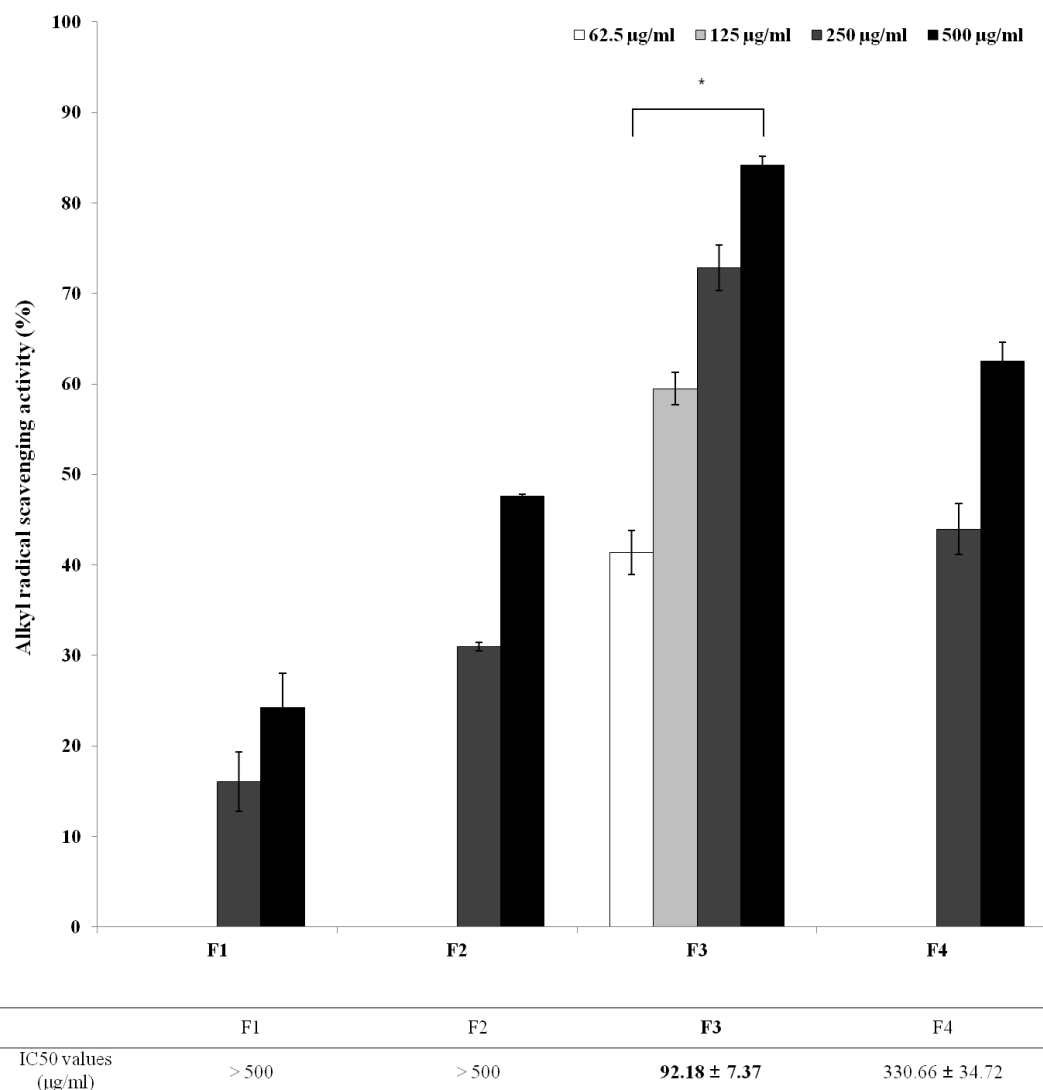


Fig. 16. Alkyl radical scavenging activity of Sephadex G-25 gel filtration fractions of ≤ 5 kDa fractions of HADPH. (%)

Mean \pm SD from triplicate determinations. HADPH ; *Hippocampus abdominalis* Distilled water Pepsin Hydrolysates ; extract from freeze dried seahorse. Hydrolysis for 12 hours by pepsin after extraction for 24 hours by water.

3. 7. 2. Amino Acid composition

Aspartic acid 와 Asparagine은 MW (분자량)이 각각 133.100, 132.120 으로 유사하고 Glutamic acid 와 Glutamine은 MW (분자량)이 각각 147.130, 146.140 으로 유사하기 때문에 HPLC 분석상의 retention time 구분이 난해하여 이를 합산하여 측정하였다 (**Fig. 17**). Sephadex G-25 column을 사용하여 분리한 fraction 4개의 구성아미노산 조성비는 각각 다음과 같다. F1 fraction의 조성비는 Alanine 16.00%, Glycine 13.16%, Glutamic acid / Glutamine 9.97%, Tryptophan 8.48%, Valine 7.76%, Leucine 7.47%, Proline 6.57%, Arginine 5.76%, Lysine 4.51%, Isoleucine 4.00%, Threonine 3.73%, Serine 3.70%, Aspartic acid / Asparagine 2.99%, Histidine 2.38%, Methionine 1.57%, Phenylalanine 1.21%, Tyrosine 0.61%, Cystine 0.12% 의 순서로 구성된 것을 확인 할 수 있었다. F2 fraction의 조성비는 Alanine 20.76%, Phenylalanine 14.93%, Leucine 12.12%, Tryptophan 9.35%, Valine 9.04%, Isoleucine 5.75%, Histidine 5.04%, Proline 3.70%, Glutamic acid / Glutamine 3.63%, Methionine 3.47%, Arginine 3.41%, Glycine 3.26%, Threonine 2.02%, Lysine 1.14%, Serine 1.04%, Tyrosine 0.71%, Aspartic acid / Asparagine 0.57%, Cystine 0.05% 의 순서로 구성된 것을 확인 할 수 있었다. F3 fraction의 조성비는 Tryptophan 54.90%, Glycine 32.78%, Cystine 2.49%, Isoleucine 1.57%, Serine 1.18%, Phenylalanine 0.96%, Alanine 0.87%, Histidine 0.80%, Glutamic acid

/ Glutamine 0.67%, Arginine 0.58%, Leucine 0.52%, Aspartic acid / Asparagine 0.48%, Valine 0.48%, Proline 0.45%, Threonine 0.42%, Tyrosine 0.37%, Lysine 0.35%, Methionine 0.12% 의 순서로 구성된 것을 확인 할 수 있었다. F4 fraction 의 조성비는 Alanine 13.23%, Glutamic acid / Glutamine 12.29%, Glycine 8.86%, Leucine 8.00%, Aspartic acid / Asparagine 7.79%, Serine 7.55%, Isoleucine 7.55%, Valine 6.89%, Threonine 6.74%, Proline 5.37%, Arginine 3.98%, Phenylalanine 3.43%, Lysine 2.98%, Tyrosine 2.30%, Methionine 1.39%, Tryptophan 0.87%, Cystine 0.77%, Histidine 0.00% 의 순서로 구성된 것을 확인 할 수 있었다.

이 중 높은 Alkyl radical scavenging activity를 가진 F3 fraction의 구성아미노산 조성비는 다른 fraction 과는 다르게 Tryptophan이 54.90%, Glycine이 32.78% 로 비중이 높은 것을 확인할 수 있었으며, 이로부터 이러한 아미노산이 주를 이루고 있는 펩타이드가 존재할 것으로 예상할 수 있었다 (**Table 8**).

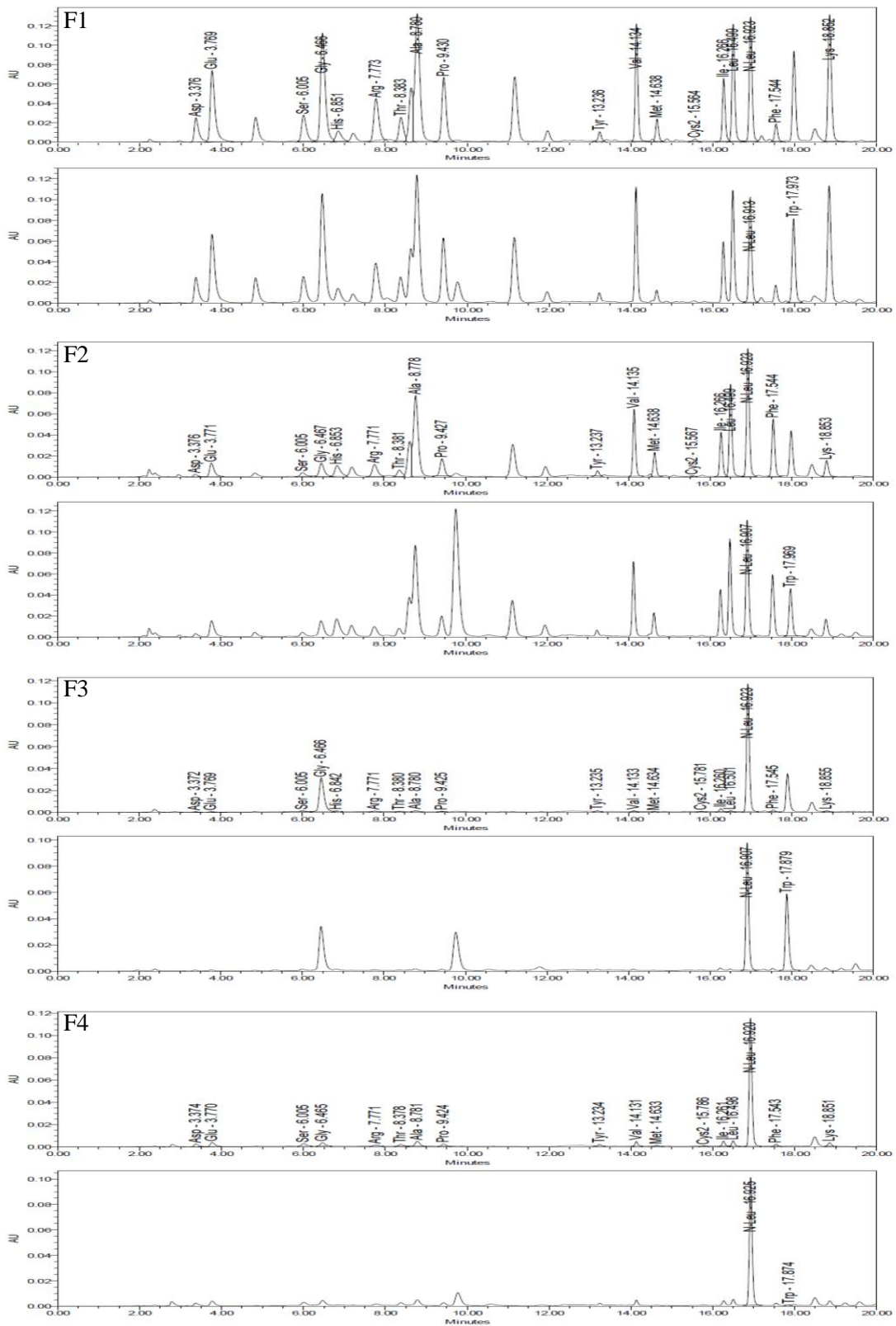


Fig. 17. Measurement of Amino Acids from Sephadex G-25 gel filtration fractions.

Table 8. Amino Acid composition of Sephadex G-25 gel filtration fractions. (%)

(Unit : %)

Amino Acid	F1	F2	F3	F4
Asp / Asn	2.99	0.57	0.48	7.79
Glu / Gln	9.97	3.63	0.67	12.29
Ser	3.70	1.04	1.18	7.55
Gly	13.16	3.26	32.78	8.86
His	2.38	5.04	0.80	0.00
Arg	5.76	3.41	0.58	3.98
Thr	3.73	2.02	0.42	6.74
Ala	16.00	20.76	0.87	13.23
Pro	6.57	3.70	0.45	5.37
Tyr	0.61	0.71	0.37	2.30
Val	7.76	9.04	0.48	6.89
Met	1.57	3.47	0.12	1.39
Cys2	0.12	0.05	2.49	0.77
Ile	4.00	5.75	1.57	7.55
Leu	7.47	12.12	0.52	8.00
Phe	1.21	14.93	0.96	3.43
Trp	8.48	9.35	54.90	0.87
Lys	4.51	1.14	0.35	2.98
TOTAL	100.00	100.00	100.00	100.00

Cys2 ; Cystine (disulfide linkage between two Cysteine residue)

4. 고찰

항산화 활성 물질은 음주, 흡연, 과도한 다이어트 및 폭식, 스트레스, 과격한 운동 등 우리가 일상생활을 하며 축적되는 산화적 스트레스의 산물인 자유 라디칼 (free radical) 및 활성산소 (ROS ; Reactive Oxygen Species) 를 억제시키고 줄여줄 수 있으며 이로부터 발생할 수 있는 염증유발, 각종 심혈관계질환, 당뇨 등의 각종 질병 및 암에 이르는 건강악화를 예방해주며 체내 항상성을 유지시켜주고 노화를 지연시키는 등 다양한 긍정적인 영향을 기대할 수 있는 잠재적인 건강기능성 생리활성 물질로 널리 알려져 있다. 본 연구에서는 이러한 항산화 활성을 가진 해양유래의 천연물을 탐색 함과 동시에 제주도에 양식되고 있는 식용 해마인 *H. abdominalis* 에 대한 산업적이용을 위해 효소공학적 방법을 이용하였으며, 본 해마 종에 대한 생리활성관련 분야 연구는 전무한 실정이기에, 기초생리활성 주요지표로 활용될 수 있는 항산화 활성을 확인하고자 하였다. 단백질 효소가수분해물의 제조는 Trypsin, Pepsin, Neutrase, Protamex, Alcalase, Kojizyme, Flavourzyme을 이용하여 추출 시간별로 28종의 가수분해물을 제조하였고 가수분해를 하지 않은 D.W 추출물과 함께 총 29종의 추출물로부터 수율 및 항산화 활성을 스크리닝 하였다.

D.W 24시간 추출물의 수율은 $37.45 \pm 0.35\%$ 로 확인되었으며, 그 밖에 모든 효소가수분해를 이용한 추출물에서 이보다 높은 수율이 확인되었다. 그 중 D.W 24시간 추출 후 Pepsin 12시간을 가수분해하여 복합 추출한 효소가수분해물의 수율이 $78.7 \pm 1.53\%$ 로 확인되었고 이러한 복합 추출 방법이 가장 높은 수율을 얻을 수 있는 추출법으로 확인 되었다. 또한 다른 효소가수분해물 대비 비교적 우수한 DPPH radical, Hydroxyl radical, Alkyl radical, Hydrogen peroxide 소거활성을 갖고 있으며, AAPH에 의해 산화적 스트레스로 유도된 Vero cell에서 항산화 활성으로 인한 보호효과를 확인할 수 있었다. 이로부터 분리한 분자량별 분획물에서는 5 kDa 이하의 저분자성 펩타이드가 Alkyl radical 소거활성이 우수하며 산화적 스트레스로 유도된 Vero cell 과 Zebrafish embryo 에서의 뛰어난 항산화 활성을 확인할 수 있었다. 또한 세부적인 분자량별 분획을 위해 Sephadex G-25 gel filtration chromatography 한 결과 4개의 fraction을 얻을 수 있었으며 이 중 아주 우수한 Alkyl radical 소거활성을 갖는 fraction을 확인할 수 있었다. IC₅₀값은 $92.18 \pm 7.37 \mu\text{g/ml}$ 인 것으로 확인되었고, 구성 아미노산 조성비를 살펴본 결과, 소수성 아미노산인 Tryptophan과 Glycine이 87.68%로 주를 이루고 있는 것으로 확인되었다.

일반적으로 생리활성 펩타이드는 3개에서 20개 내외의 아미노산이 연결된 구조를 이루고 있으며 아미노산의 조성 및 순서에 기초하여 활성을 갖는 것으로

연구된 바 있다 (Pihlanto-Leppälä, A. 2000). 최근 천연물 유래의 항산화 펩타이드에 대해 다양하게 연구 되고는 있지만 명확한 작용 메카니즘은 아직 뚜렷하게 밝혀져 있지 않다. 다만 일부 보고에 따르면 펩타이드 구조를 이루고 있는 구성 아미노산 중 소수성 아미노산이 많이 포함된 펩타이드가 항산화 활성과 연관성이 높을 것으로 추정하고 있으며 (Mendis et al. 2005a), 이러한 주장을 뒷받침 하는 일부 연구결과가 보고된 바 있다 (Jun et al. 2004., Mendis et al. 2005b). 본 연구결과에서는 이러한 가설에 부합하는 결과를 확인할 수 있었으며, Tryptophan과 Glycine 등 소수성 아미노산이 주를 이루고 있는 저분자성 펩타이드의 존재를 확인하였다. 이러한 저분자성 펩타이드는 일반적으로 우수한 생리활성을 가지며 고분자성 물질에 비해 체내 흡수속도 및 반응속도가 매우 빠르고 대부분이 흡수될 정도로 흡수력이 높은 장점이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 해마효소가수분해물로부터 분리한 저분자성 펩타이드는 빠르고 강력한 항산화 작용을 할 수 있을 것으로 기대되어지며, 해마의 산업적이용을 고려함에 있어 본 연구에서 다루어진 추출법 및 항산화 활성에 대한 기초자료 등이 도움될 것으로 판단되어진다.

결론적으로 본 연구를 통해 해양유래의 유용자원인 해마로부터 효소공학적 방법을 이용한 고부가가치화 가능성을 확인할 수 있었으며 건강기능식품 및 기능성화장품 등의 신소재 등으로 활용이 가능할 것으로 기대되어진다. 이를 위해서는 향후 생리활성 펩타이드의 정제와 함께 sequencing을 통한 명확한 펩타이드

의 구조를 규명할 필요성이 있으며, 이러한 후속연구와 더불어 다양한 생리활성
효과에 대한 추가연구도 필요할 것으로 생각되어진다.

5. 참고문헌

- Chobert, J. M., Bertrand-Harb, C., Nicolas, M. G. 1988. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymically by trypsin. *Agricultural and food chemistry*. 36(5), 883-892.
- Helrich, K. 1990. *Official Methods of Analysis of AOAC Intl.* 15th ed.; Association of Official Analysis Chemists, Washington, DC, USA. Chapter 11. 1-31.
- Jao, C. L., Ko, W. C. 2002. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna coking juice. *Fisheries Sci.* 68(2), 430-435.
- Je, J. Y., Park, P. J., Kim, S. K. 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res. Int.* 38(1), 45-50.
- Jun, S. Y., Park, P. J., Jung, W. K., Kim, S. K. 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology*. 219: 20-26.
- Kang, M. C. 2014. Anti-obesity effects of red algae on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and obese mice fed a high-fat diet. Cheju national university.

- Kang, M. C., Cha, S. H., Wijesinghe, W. A. J. P., Kang, S. M., Lee, S. H., Kim, E. A., Song, C. B., Jeon, Y. J. 2012. Protective effect of marine algae phlorotannins against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish embryos. *Food Chemistry*. 138:950-955.
- Kim, E. A. 2011. Antidiabetic activity of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* in zebrafish model. Cheju national university.
- Kim, K. N. 2010. Anti-inflammatory and anti-tumor activity of fucoxanthin from *Ishige okamurae* through MAPKs regulation. Cheju national university.
- Kim, S. Y., Kim, E. A., Kang, M. C., Lee, J. H., Yang, H. W., Lee, J. S., Lim, T. I., Jeon, Y. J. 2014. Polyphenol-rich fraction from *Ecklonia cava* (a brown alga) processing by-product reduces LPS-induced inflammation in vitro and in vivo in a zebrafish model. *Algae*. 29:165-174.
- Ko, S. C. 2009. Purification and Characterization of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Enzymatic Digests of *Styela plicata*. Cheju national university.
- Mayer, A. M. S. & Hamann, M. T. 2004. Marine Pharmacology in 2000: Marine Compound with Antibacterial, Anticoagulant, Antifungal, Anti-inflammatory, Antimalarial, Antiplatelet, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting Cardiovascular, Immune, and Nervous Systems and

Other Miscellaneous Mechanisms of Action. *Marine Biotechnology*. 1, 37-52.

Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. G., Kim, S. K. 2005a. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sci*. 77: 2166-2178.

Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S. K. 2005b. Antioxidant Properties of a Radical-Scavenging Peptide Purified from Enzymatically Prepared Fish Skin Gelatin Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 53: 581-587.

Panyam, D., Kilara, A. 1996. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science & Technology*. 7(4), 120-125.

Pihlanto-Leppälä, A. 2000. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Science & Technology*. 11: 347-356.

Ryu, B. M., Qian, Z. J., Kim, S. K. 2010a. SHP-1, a novel peptide isolated from seahorse inhibits collagen release through the suppression of collagenases 1 and 3, nitric oxide products regulated by NF-kB/p38 kinase. *Peptides*. 31, 79-87.

- Ryu, B. M., Qian, Z. J., Kim, S. K. 2010b. Purification of a peptide from seahorse, that inhibits TPA-induced MMP, iNOS and COX-2 expression through MAPK and NF- κ B activation, and induces human osteoblastic and chondrocytic differentiation. *Chemico-Biological Interactions*. 184, 413–422.
- Sanaye, S. V., Pise, N. M., Pawar, A. P., Parab, P. P., Sreepada, R. A., Pawar, H. B., Revankar, A. D. 2014. Evaluation of antioxidant activities in captive-bred cultured yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852). *Aquaculture*. 434, 100-107.
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S., Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using Alcalase and Flavourzyme. *J Food Biochem*. 31, 266-287.
- Wu, C. H., Chen, H. M., Shiau, C. Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res Int*. 36(9-10), 949-957.
- Xu, D. H., Wang, L. H., Mei, X. T., Li, B. J., Lv, J. L., Xu, S. B. 2014. Protective effects of seahorse extracts in a ratcastration and testosterone-induced benignprostatic hyperplasia model and mouse oligospermatism model. *Environmental toxicology and pharmacology*. 37, 679–688.

6. 감사의 글

석사학위 졸업을 앞두고 우여곡절이 많았던 지난 2년간의 시간들을 되돌아보니 만감이 교차 하는것 같습니다. 새삼 감사한 분들이 계시기에 이 자리를 빌어 그분들께 감사한 마음을 표하고자 합니다. 여러분들의 도움이 있었기에 이러한 학위논문을 완성할 수 있었고 학위과정을 마무리 할 수 있었습니다. 우선, 제가 어려운 상황 속에서 많은 고민과 끝없는 두려움에 사로잡혀 중심을 잡지 못하고 흔들릴 때 항상 희망과 용기를 주시고 올바른 길로 나아갈 수 있도록 많은 가르침을 주신 전유진 교수님께 무한한 감사의 말씀을 드리고 싶습니다. 진심으로 감사합니다. 교수님의 애정 어린 지도로 인해 제가 무사히 학위과정을 마칠 수 있게 되었습니다. 앞으로 교수님의 가르침과 은혜로움에 보답하기 위해 현실에 안주하지 않고 한걸음 한걸음 정진하도록 하겠습니다.

더불어 저의 학위논문 심사를 위해 어려운 발걸음을 해주신 여인규 교수님, 정준범 교수님께도 감사의 말씀을 드리며, 학부과정과 석사과정에서 전공지식 및 많은 가르침을 주신 해양생명과학과의 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 이영돈 교수님, 이경준 교수님, 김기영 교수님, 정석근 교수님, 이제희 교수님, 허문수 교수님, 이승헌교수님, 박상률교수님께도 감사의 말씀을 드립니다. 교수님들의 진심

어린 관심과 조언으로 이 학위논문을 완성할 수 있었습니다. 그리고 본 논문에 있어 해마에 대한 양식 및 생태학적 관련 지식들을 가르쳐 주신 한국해수관상어 센터 노섬 교수님 및 이하 직원분들께도 감사의 말씀을 드립니다. 교수님을 필두로 한 전사적인 열정에 감탄하였고, 국내 수산업계의 밝은 미래를 볼 수 있었습니다.

그리고 우리 해양생물자원이용공학 실험실 식구들에게도 너무나 감사하고 또 감사합니다. 먼저, 부족함이 많은 저의 논문을 살펴주시고 부족한 부분들을 최대한 스스로 채워 나갈 수 있도록 도와 주신 지혁이형, 원우형, 긴내누나, 주영누나에게 감사의 말씀을 전합니다. 선배님들의 진심 어린 관심과 격려가 제게는 너무나 큰 힘이 되었습니다. 그리고 학위논문을 준비하며 누구보다 많은 도움을 주었던 우리 현수, 여러 실험들을 스스로 할 수 있을 정도로 잘 알려준 사부님이자 너무나 고마운 석사동기 혜원이, 아주 깊은 내면에 고운 심성을 지닌 재영이, 멀리서도 우렁찬 에너지를 전파하는 귀여운 준성이, 귀찮을 법한 질문에도 늘 진심으로 답해준 은아, 항상 밝은 모습으로 맞아준 나래, 돋보이는 카리스마를 지닌 착한 서영이, 많이 친해지지 못해서 아쉬운 윤택이, 묘하게 방앗간이 떠오르는 김본좌 형호, 은근히 야한 바로, 대륙의 두 남자 왕뢰, 웬지안, 마술을 좋아하는 샤누라, 뽀글뽀글 아산카, 치킨을 좋아하는 네할, 모두 감사합니다. 여러분들 덕분에 많은 것들을 배우고 느끼고 더 발전할 수 있었습니다. 그리고 함께할 자리

가 생길 때마다 늘 좋은 말씀을 많이 해주시고 우리 실험실을 빛내주신 허수진
선배님, 김길남 선배님, 이승홍 선배님, 차선희 선배님 및 실험실 졸업 선배님들
께 감사의 말씀을 드립니다.

또한 제가 성장하는데 큰 계기를 마련해 주시고 많은 것들을 배울 수 있게 해
주신 청룡수산 기업부설연구소의 안용석 소장님과 창익이형에게도 감사의 말씀
을 드립니다. 그리고, 주위에서 응원해준 창수, 승민이, 종경이, 경필이, 재진이,
남현이 등 든든한 우리 벗들에게 모두 고맙고 감사하다는 말을 전합니다. 마지막
으로, 저의 어떠한 결정과 판단에도 항상 지지해주시고 끝없는 사랑으로 보살펴
주셨던 아버지, 어머니에게 감사의 말씀을 올립니다. 힘들고 지칠 때마다 큰 버
팀목이 되어 주셔서 감사하고, 저를 낳아 주셔서 감사합니다. 앞으로 부모님의
든든한 효자가 될 수 있도록 노력하겠습니다.

석사과정의 졸업이 끝이 아닌 또 다른 시작이기에 항상 도전하는 마음가짐과
더욱 겸손한 자세로 저의 부족한 부분들을 채워나가며 미래를 개척해 나가도록
하겠습니다. 이러한 각오를 다지며 이 글을 마무리 합니다. 모두 감사합니다.