

# 빅벨리 해마(*Hippocampus abdominalis*) 유래 펩신 가수분해물의 *In vitro*와 *In vivo*에서의 항산화 효능

김현수 · 신병옥 · 김서영 · Lei Wang · 이원우 · 김윤택<sup>1</sup> · 노섭<sup>1</sup> · 조문제<sup>2</sup> · 전유진\*

제주대학교 해양의생명과학부, <sup>1</sup>한국해수관상어센터, <sup>2</sup>제주대학교 의학전문대학원

## Antioxidant Activity of Pepsin Hydrolysate Derived from Edible *Hippocampus abdominalis* in vitro and in Zebrafish Models

Hyun-Soo Kim, Byeung-Ok Shin, Seo-Young Kim, Lei Wang, WonWoo Lee, Yoon Taek Kim<sup>1</sup>, Sum Rho<sup>1</sup>, Moonjae Cho<sup>2</sup> and You-Jin Jeon\*

Department of Marine Life Science, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

<sup>1</sup>Center of Ornamental Reefs and Aquariums, Jeju 63354, Korea

<sup>2</sup>Department of Medicine, Medical School, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

Seahorse *Hippocampus abdominalis* a marine teleost fish, has long been used as one of the essential materials in traditional Chinese medicine. However, the uses of seahorse have been limited due to its high cost, despite its beneficial biological activities. Seahorse has not been widely explored for its biofunctional properties and active components. In the present study, the enzymatic hydrolysates of seahorse were prepared by using two digestive enzymes (trypsin and pepsin) and five food grade enzymes (neutrase, protamex, alcalase, kojizyme, and flavourzyme). The enzymatic hydrolysates indicated higher hydrolysis yields than its water extract. Among them, the distilled water-pepsin hydrolysate (DP) which was obtained by distilled water extraction followed by pepsin hydrolysis, showed the highest yield and protein content as well as the highest alkyl radical scavenging activity. Also, it provided protective effects against oxidative stress induced by AAPH in vero cell and zebrafish. Further fractionation based on the molecular weight was carried out to identify its active components, and < 5 kDa (less than 5 kDa) molecular weight fraction was confirmed to have the highest antioxidant activity. In conclusion, this study suggests that DP of seahorse has antioxidant properties, and might be a novel and useful material from the marine origin for healthy functional foods and cosmetics.

Key words: Seahorse, *Hippocampus abdominalis*, Enzymatic hydrolysis, Antioxidant activity, Zebrafish

### 서 론

해마는 실고기과에 속하는 경골어류로서 실고기목(Syngnathiformes), 실고기과(Syngnathidae)에 속하는 52속 215종 중에 해마속(*Hippocampus*) 어류 32종이 분류되며 열대에서 아한대의 광범위한 해역에 분포하고 있는 것으로 보고되어 있고, 이 중 70% 정도가 인도-태평양해역에 분포한다(Myers, 1979; Vari, 1982; Lourie et al., 1999). 우리나라에는 해마(*Hippocampus coronatus*), 가시해마(*Hippocampus histrix*), 복해마(*Hippocampus kuda*), 산호해마(*Hippocampus mohnikei*)

그리고 점해마(*Hippocampus trimaculatus*) 등의 5종이 서식하고 있다(Kim and Lee, 1995). 해마는 중국에서 전통적인 약제로서 천식, 간 기능 장애, 성기능 향상 그리고 일반적인 통증에 효능이 있는 것으로 알려져 있어 중국을 비롯한 동남아시아에서는 약제로서의 수요가 많고 유럽과 북미에서는 관상용과 건조시켜 기념품이나 골동품 등으로 상품화하고 있다(Vincent, 1996; Choi et al., 2006).

해마의 이전 연구에서 밝혀진 약학적 연구로는 항암(Zhu, 2005), 항노화(She et al., 1995; Zhang et al., 1994), 항혈전(Xu and Xu, 1997), 항관절염(Ryu et al., 2010a; Ryu et al., 2010b),

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2016.0445>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 49(4) 445-453, August 2016

Received 30 June 2016; Accepted 11 July 2016

\*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3475 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: youjin@jejunu.ac.kr

항산화(Chen et al., 2011; Qian et al., 2008), 발기부전 완화(Xu et al., 2003), 신경보호작용(Himaya et al., 2012)과 같은 많은 연구가 밝혀졌지만 *in vitro* 정도의 연구만이 되어 있어 더 깊이 있는 연구가 필요하다.

이 연구에서 사용한 빅벨리해마(*Hippocampus abdominalis*)는 큰가시고기목(Syngnathiformes), 실고기과(Syngnathidae)에 속하며 온대와 열대해역에 서식하고 해마들 중에서도 크기가 가장 크고 아름다운 체색과 체형을 지니고 있어 관상가치가 높아 국제 해수 관상생물 시장에서도 인기가 많다. 이미 뉴질랜드, 호주, 중국에서 해마양식이 시도되었고(Woods, 2007), 최근 제주에서는 식용으로 지정된 빅벨리해마의 완전 양식이 성공하였다. 하지만 이전에 많은 생리활성 연구가 진행된 북해마(*Hippocampus kuda* Bleeker), 갈귀해마(*Hippocampus guttulatus*), Short-snouted seahorse (*Hippocampus hippocampus*) 종 등에 비해 빅벨리해마는 생리활성 연구가 많이 부족한 상황이다. 따라서 이 연구에서는 소화효소 2종(trypsin, pepsin)과 식품용 가수분해 효소 5종(neutrased, protamex, alcalase, kojizyme, flavourzyme)을 이용한 빅벨리해마 가수분해물들의 제조와 가수분해물 유래의 각 분자량별 분획물을 이용해 염증을 유발하고 세포 내 조직을 손상시키며, 노화와 암, 당뇨, 뇌졸중, 동맥경화, 심혈관 질환, 빈혈, 위궤양, 치매 등의 질병을 야기하는 원인으로 알려져 있는 자유 라디칼에(Beckman et al., 1990; Cho et al., 2012; Heo et al., 2005; Ahn et al., 2007; Park et al., 2004) 대한 소거능을 확인함으로써 해마의 항산화 활성을 평가하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험시약 및 재료

본 실험에서 사용한 해마는 제주에 위치한 한국해수관상어종묘센터(CCORA)에서 약 20 cm 크기의 빅벨리해마(Fig. 1)를 제공 받았고, 동결건조 된 해마는 분쇄 후 사용되었다. 단백질



Fig. 1. The photo of different sizes of seahorses *Hippocampus abdominalis*.

효소가수분해에 사용된 소화효소 2종(trypsin, pepsin)은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였으며 식품용 가수분해 효소 5종(neutrased, protamex, alcalase, kojizyme, flavourzyme)은 Novozyme Co. (Denmark)에서 구입하였다. 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH),  $\alpha$ -(4-Pyridyl-1-oxide)-N-tert-butylnitron (4-POBN), 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-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Pierce® BCA protein assay kit는 Thermo Scientific™ (Rockford, IL, USA)에서 구입하여 사용하였고 RPMI 1640 배지와 fetal bovine serum (FBS)는 Gibco/BRL (Canada)에서 구입하여 사용하였다. 이 밖에 모든 기타 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

### 해마의 일반성분 분석

해마 건조 시료의 일반성분은 AOAC (Helrich, 1990) 방법에 준하여 측정하였다. 수분함량은 105°C 건조기에 24시간 유지하여 측정하였으며, 회분은 직접회화법으로 회분기를 이용하여 550°C에서 3시간 동안 회화한 뒤 측정하였다. 조단백은 Kjeldahl 법으로 측정 하였으며, 조지방은 Soxhlet 추출법을 이용하여 측정하였다.

### 해마의 단백질 효소가수분해물의 제조

해마의 단백질 효소가수분해물은 Ko et al. (2013)의 방법에 따라 제조되었고, 가수분해 효소 7종을 이용하여 해마의 효소적 가수분해물을 제조하여 물(distilled water, DW) 추출물과 비교하였다. 해마 동결건조물을 이용하여 효소 대 기질비를 1:100으로 하였으며, 각 효소별 최적온도 및 pH 조건에 따라 24시간 가수분해를 진행하였다. 한편 가수분해 수율을 높일 목적으로 DW 24시간 추출을 먼저 진행 한 후 pepsin과 trypsin을 각각 12시간 가수분해를 진행하여 DW-pepsin 가수분해물(DP)와 DW-trypsin 가수분해물(DT)를 추가적으로 제조하였다. 가수분해를 정지시키기 위해 100°C에서 10분간 효소의 반응을 불활성화시킨 후 pH를 7.0으로 조정해 주었다. 이 후 20분간 원심분리한 뒤 잔사를 제외한 상층액을 pore size 7  $\mu$ m의 여과지를 사용하여 추출물을 여과하고 동결건조 후 분말화하여 최종적으로 7종의 단백질 효소가수분해물을 얻었다.

### 단백질 효소가수분해물의 수율 및 단백질 함량 측정

각 추출조건에 따른 효소가수분해물의 수율은 단백질 효소가수분해 후 얻어진 가수분해물 일부의 무게를 100°C 드라이오븐에서 수분을 제거한 나머지 고형분 함량을 기준으로 수율을 측정하였다. 7종의 단백질 효소가수분해물의 총 단백질의 함량은 Pierce® BCA protein assay kit를 사용하여 측정하였고, 단백질의 정량의 표준물질은 BSA를 사용하였다.

### Alkyl radical 소거능 측정

가수분해물들의 alkyl radical 소거능은 Kang et al. (2013)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 시료 20 µL, DW 20 µL, 40 mM AAPH 20 µL, 40 mM 4-POBN 20 µL를 혼합 후 37°C에서 30 분간 반응시킨 다음 capillary tube에 옮겨 전자스핀공명; Electron spin resonance (JES-FA ESR, JEOL, Tokyo, Japan)을 사용하여 signal 값을 구하였다. 대조구는 시료 대신 용매인 DW를 사용하였으며 분석조건은 다음과 같이 하였다.

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

### 세포배양

Vero cell은 10% FBS, 1% antibiotic을 포함하는 RPMI 1640 배지를 사용하여 배양 하였다. Cell culture flask에 적정농도로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 세포상태에 따라 2-3일간 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

### Vero cells에서의 독성 평가

시료에 대한 세포독성을 확인하기 위해 Ko et al. (2012)의 방법을 따라 MTT assay 방법으로 측정하였다. 먼저 Vero cells (1 × 10<sup>5</sup> cells/mL)으로 96 wellplate에 190 µL를 분주하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 배양하여 시료들을 농도 별로 처리하였다. 이 후 37°C 인큐베이터에서 24시간 배양하였으며 2 mg/mL 농도의 MTT를 50 µL처리하였다. 그리고 37°C에서 3시간 배양하고 형성된 불용성 결정을 dimethylsulfoxide (DMSO)로 완전히 녹인 후에 빛을 차단시켜 12시간 보관 후에 ELISA reader를 사용하여 540 nm 흡광도에서 측정된 뒤 값을 구하였다.

### Vero cells에서의 ROS 생성 측정

산화적 스트레스를 유도하였을 때 해마 가수분해물에 의한 ROS 소거능을 확인하기 위해 Ko et al. (2012)의 방법을 따라 AAPH 자극을 주어 ROS의 변화를 측정하였다. 먼저 1 × 10<sup>5</sup> 세포농도의 vero cells을 만들어 96 wellplate에 180 µL를 분주하였고, 37°C 인큐베이터에서 24시간 배양하여 시료들을 농도 별로 처리하였다. 이 후 37°C 인큐베이터에서 30분 배양하여 4 mM AAPH 10 µL를 처리하였고, 37°C 인큐베이터에서 30 분간 반응시켜 0.05% DCF-DA 에탄올용액을 10 µL 처리하고 빛을 차단시킨 후 37°C 인큐베이터에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader를 사용하여 측정하였다.

### Vero cells에서 AAPH에 의한 산화적 손상에 대한 보호효과 측정

AAPH로 세포에 산화적 스트레스를 유도하였을 때의 해마 가수분해물의 보호효과에 대한 활성을 확인하기 위해 Ko et al. (2012)의 방법을 따라 AAPH 자극을 주어 시료처리에 대한 세

포 생존력을 측정하였다. 먼저 1 × 10<sup>5</sup> 세포농도의 vero cells을 만들어 96 wellplate에 180 µL를 seeding하였고, 37°C 인큐베이터에서 24시간 배양하였으며 시료를 농도 별로 처리하였다. 이 후 37°C 인큐베이터에서 1시간 배양하였으며 4 mM AAPH 10 µL를 처리하였다. 그 다음 37°C 인큐베이터에서 24시간 배양하였으며 2 mg/mL 농도의 MTT를 50 µL 처리하였다. 이후 37°C 인큐베이터에서 3시간 반응시키고, 37°C에서 3시간 배양한 후 형성된 불용성 결정을 DMSO로 완전히 녹여 빛을 차단시키고 12시간 보관 후에 ELISA reader를 사용하여 540 nm 흡광도에서 측정된 뒤 값을 구하였다.

대조구는 시료처리 없이 산화적 스트레스만 유도시킨 실험군과 산화적 스트레스를 유도시키지 않은 실험군으로 구분하였다.

### Zebrafish embryo에서의 AAPH 산화 보호효과 측정

Zebrafish (*Danio rerio*)는 인간과 유전적 상동성이 유사한 척추동물로서 초기발생단계에서 산화적 스트레스를 유도하였을 때 시료처리에 의한 항산화 활성으로부터의 보호효과를 확인하고자 시간경과에 따른 생존율 변화를 측정하였다(Kim et al., 2014). 7-9 hpf (hours post-fertilization)에 zebrafish embryo를 12 well plates에 각각 15마리씩 넣어준 뒤 embryo medium 1.8 mL를 맞추고 농도별(25, 50, 100, 200 µg/mL) 시료를 100 µL씩 처리하였다. 1시간 노출시킨 후 15 mM 농도의 AAPH를 100 µL 처리하였고 이후 생존율 변화를 관찰하였다. 대조구는 시료처리 없이 산화적 스트레스만 유발시킨 실험군과 산화적 스트레스를 유도시키지 않은 실험군으로 하였다.

### 통계분석

실험결과와 통계처리는 각각의 시료에 대한 평균 ± 표준편차로 나타내었다. SPSS 프로그램(SPSS Inc. Ver. 12.0)을 사용하여 Oneway ANOVA-test를 실시하여 조사 항목들 간의 유의성 검증은 Turkey's multiple range test로 P<0.05 수준에서 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 해마의 일반성분

해마의 일반성분 분석 결과는 Table 1에 나타냈으며, 수분, 회분, 조단백질, 조지방을 건조무게를 기준으로 확인하였다. 해마의 조단백질의 함량으로 58.47%을 확인하여 해마의 대부분이 조단백질로 이루어짐을 확인하였다.

Table 1. Chemical compositions of seahorse *Hippocampus abdominalis* (% , w/w)

Composition	Moisture	Ash	Crude protein	Crude lipid
<i>Hippocampus Abdominalis</i>	5.18	33.75	58.47	2.6

## 해마의 단백질 효소 가수분해물들의 수율 및 단백질 함량

단백질 가수분해 효소는 아미노산 또는 펩타이드 혼합물을 만드는 효소이며, 일반적으로 단백질 가수분해 효소를 이용해 시료를 가수분해 하였을 때 효소 양과 가수분해 시간에 비례하여 DW 추출물에 비해 높은 수율과 단백질 함량을 나타냄을 확인할 수 있다(Tsai et al., 2006). DW로 24시간 추출한 추출물의 수율은 1 g의 건조해마로부터  $374.5 \pm 3.54$  mg였으나, 7종의 단백질 효소 가수분해를 이용하여 효소 가수분해물을 제조한 경우, 증가된 수율을 확인할 수 있었다. DP에 경우 다른 단백질 효소 가수분해물에 비해 가장 높은  $786.67 \pm 15.28$  mg의 수율을 확인하였고, DT의 경우 이보다 낮은  $520.00 \pm 25.17$  mg의 수율을 확인할 수 있었다(Table 2). 식품용 가수분해 효소 5종을 이용한 효소 가수분해물에서는 전반적으로 높은 수율을 확인할 수 있었다. 이 중 DP와 대등하게 높은 수율을 보인 효소 가수분해물은 neutrase로 가수분해한 효소 가수분해물과 alcalase로 가수분해한 효소 가수분해물로 확인 되었으며, 각각  $783.33 \pm 20.0$  mg,  $780.00 \pm 10.0$  mg의 수율을 확인할 수 있었다(Table 2). 또한 동결건조된 해마 조시료 1 g으로부터 얻을 수 있는 총 단백질은 DW로 24시간을 추출한 추출물이  $93.38 \pm 3.04$  mg으로 확인되었으며, 그 외 모든 효소 가수분해물들에서는 DW로 24시간을 추출한 추출물 대비 약 2배 가량 높은 총 단백질을 얻을 수 있는 것으로 확인되었다(Table 2). 소화효소를 이용하여 가수분해한 효소 가수분해물에서는 DP 효소 가수분해물이  $221.21 \pm 7.02$  mg의 총 단백질을 얻을 수 있는 것으로 확인되었고, 식품용 가수분해 효소 5종을 이용한 효소 가수분해물에서는 전반적으로 높은 총 단백질을 얻을 수 있는 것으로 확인되었다(Table 2). 이와 같은 결과는 가수분해물의 수율이 높을 수록 단백질 함량도 높은 것이 확인되어 DW 추출물에 비해 수율과 단백질 함량이 높았던 DP와 DT, 식품용 가

수분해 효소 5종에서 가수분해가 많이 진행되었고 그에 따라 많은 양의 저분자 펩타이드가 함유되어 있을 것으로 사료된다.

## 해마 단백질 효소 가수분해물들의 Alkyl radical 소거능

Alkyl radical 소거활성에 대한 해마 단백질 효소 가수분해물들의 효과를 평가하였다. 이 중 우수한 활성을 가진 추출물의  $IC_{50}$  값(mg/mL)을 산출한 결과 DP가  $0.15 \pm 0.00$  mg/mL, DT가  $0.15 \pm 0.00$  mg/mL, Neutraxe로 가수분해한 효소 가수분해물이  $0.18 \pm 0.16$  mg/mL로 확인되었으며, DP와 DT가 전체 가수분해물 중 가장 우수한 alkyl radical 소거활성을 나타내는 것을 확인하였다(Table 2). 이 결과는 앞에 수율과 단백질 함량의 결과와도 관련이 있다. 수율과 단백질 함량이 높았던 DP가 활성 저분자 펩타이드의 양이 많이 함유한다는 것을 암시하며, 따라서 수율과 단백질 함량이 높고, alkyl radical 소거능이 우수한 DP를 이용하여 이후 실험에 사용하였다.

## DP의 세포독성 및 AAPH 산화 보호효과

MTT assay 법은 MTT 시약이 세포 내로 흡수된 후 미토콘드리아의 숙신산탄수소효소(succinate dehydrogenase)에 의해 보라색의 불용성 포르마잔(formazan)을 형성하는데 이 물질의 세포 내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하므로 세포의 생장율 및 살아있는 세포수의 측정에 사용되는 대표적인 방법이다(Yang and Boo, 2013). DP의 세포독성은 Fig. 2A에 나타내었다. 시료를  $50 \mu\text{g/mL}$ ,  $100 \mu\text{g/mL}$ ,  $200 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 각각 처리하여 독성이 없음을 확인하였고, 독성이 없는 농도를 이용해 4 mM AAPH로 산화적 스트레스를 유도하여 세포생존율을 확인하였다. DP는 농도의존적으로 AAPH 산화에 의한 세포 보호효과를 확인할 수 있었으며(Fig. 2B), AAPH로 세포에 자극을 주고 세포 내 AAPH 산화에 의한 ROS 생성 정도를 측정된 결과, 농도의존적으로 AAPH에

Table 2. Yields and alkyl radical scavenging activity of enzymatic hydrolysates prepared from seahorse *Hippocampus abdominalis* by seven proteinases

	Yields (amount obtained from 1 g of raw sample)		Radical scavenging activity ( $IC_{50}$ , mg/mL)
	Hydrolsates contents (mg)	Protein contents (mg)	Alkyl
DW	$374.50 \pm 3.54$	$93.38 \pm 3.04$	$0.38 \pm 0.06$
Trypsin	$410.50 \pm 2.12$	$127.67 \pm 2.79$	<0.25
Pepsin	$445.00 \pm 1.41$	$144.21 \pm 3.29$	$0.24 \pm 0.06$
DT <sup>1</sup>	$520.00 \pm 25.17$	$147.50 \pm 7.14$	$0.15 \pm 0.00$
DP <sup>2</sup>	$786.76 \pm 15.28$	$221.21 \pm 7.02$	$0.15 \pm 0.00$
Neutraxe	$783.33 \pm 20.00$	$222.19 \pm 5.67$	$0.18 \pm 0.16$
Protamex	$670.00 \pm 20.00$	$156.12 \pm 6.21$	<0.25
Alcalase	$780.00 \pm 10.00$	$179.20 \pm 3.20$	$0.73 \pm 0.09$
Kojizyme	$673.33 \pm 7.00$	$228.39 \pm 3.15$	$0.25 \pm 0.00$
Flavourzyme	$626.67 \pm 3.00$	$251.20 \pm 1.56$	$0.70 \pm 0.03$

<sup>1</sup>Distilled water-trypsin hydrolysate (DT). <sup>2</sup>Distilled water-pepsin hydrolysate (DP).

의한 세포의 ROS 생성을 줄여 주는 것을 확인하였다(Fig. 2C).

이와 같은 결과는 DP에 의해 다른 효소의 작용이나 생리적인 변화없이 단분자적으로 변성되는 AAPH 산화로 인한 세포 보호효과와 ROS 생성 감소로 항산화 활성이 있음을 시사한다. 단분자적으로 변성된 AAPH는 두 carbon radical과 질소로 분해되는데, 이 carbon radical은 다른 carbon radical과 다시 결합하여 안정적인 구조를 취하기도 하지만 대부분은 산소와 반응하여 peroxy radical을 생성하게 되며, 이 peroxy radical은 세포의 손상을 유발하고, 생체 내 단백질, 지질 등에 산화적 스트레스를 주는 요인으로 작용하게 된다(Niki, 1990).

**DP 및 분자량 별 분획물의 SDS PAGE를 이용한 분석 및 각 분자량 분획물의 Alkyl radical 소거 활성**

DP의 각 분자량 별로 분획물을 나누는 것은 각각 다른 크기의 한외여과막을 사용하여 나누었다. DP를 5 kDa과 10 kDa의 크기 막으로 가수분해물을  $\geq 10$  kDa, 5-10 kDa,  $\leq 5$  kDa의 각 분획물로 분배하였고, Fig. 3A의 SDS-PAGE 전기영동 결과를 통해 해마 펩신 가수분해물과 가수분해물의 각 분자량별 분획물의 분자량 크기에 따라 다양한 밴드 패턴이 나타나 분자량별로 분획물이 잘 분리된 것을 확인하였다. 각 분획물들 중,  $\leq 5$  kDa 분획물이 가장 강한 alkyl radical 소거능을 확인할 수 있었고 IC<sub>50</sub> 값은  $0.15 \pm 0.01$  mg/mL으로 확인되었다(Fig. 3B).

이와 같은 결과는 DP의 각 분자량별 분획물 중 저분자 분획물에 뛰어난 alkyl radical 소거능이 확인되어 DP의 저분자 펩

타이드가 활성을 나타냄을 제시한다. 다른 연구들에서도 이와 비슷한 결과들을 확인할 수 있었으며(Ko et al., 2012, Je et al., 2005, Ren et al., 2008, Zhao et al., 2009), 이들 연구에서도 저분자 분획물의 우수한 활성을 확인할 수 있다.

**DP 분자량 별 분획물의 세포독성 및 AAPH에 의해 산화된 Vero cells의 보호효과**

DP 분자량별 분획물들의 세포 독성은 Fig. 4A에 나타내었다. MTT assay를 통하여 세포생존율을 측정된 결과  $\geq 10$  kDa, 5-10 kDa,  $\leq 5$  kDa의 각 분획물을 50  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하였을 때, Vero cells에 대한 세포독성은 나타나지 않았다. 4 mM AAPH의 산화적 스트레스를 유도하였을 때 각 분획물을 50  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하여 Vero cells에 세포생존율을 측정된 결과, Vero cells의 생존률이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 확인하였다. 펩신 가수분해물이 저분자화 됨에 따라 세포생존률이 증가하는 경향을 확인하였고,  $\leq 5$  kDa의 Fration의 100  $\mu$ g/mL 농도 처리에 의해 세포생존률이  $77.17 \pm 2.12\%$ 로 증가하였다(Fig. 4B). 4 mM AAPH로 산화적 스트레스를 유도하여 분자량별 분획물을 50  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL 농도로 처리하였을 때, Vero cells에서 Total ROS 생성이 농도 의존적으로 감소하는 경향이 확인되었고,  $\leq 5$  kDa의 분획물의 100  $\mu$ g/mL 농도 처리에 의해 Total ROS 생성이  $61.01 \pm 0.49\%$ 로 감소하였다. 또한 펩신 가수분해물이 저분자화 됨에 따라  $\leq 5$  kDa의 분획물이 Total ROS 생성을 가장 많이

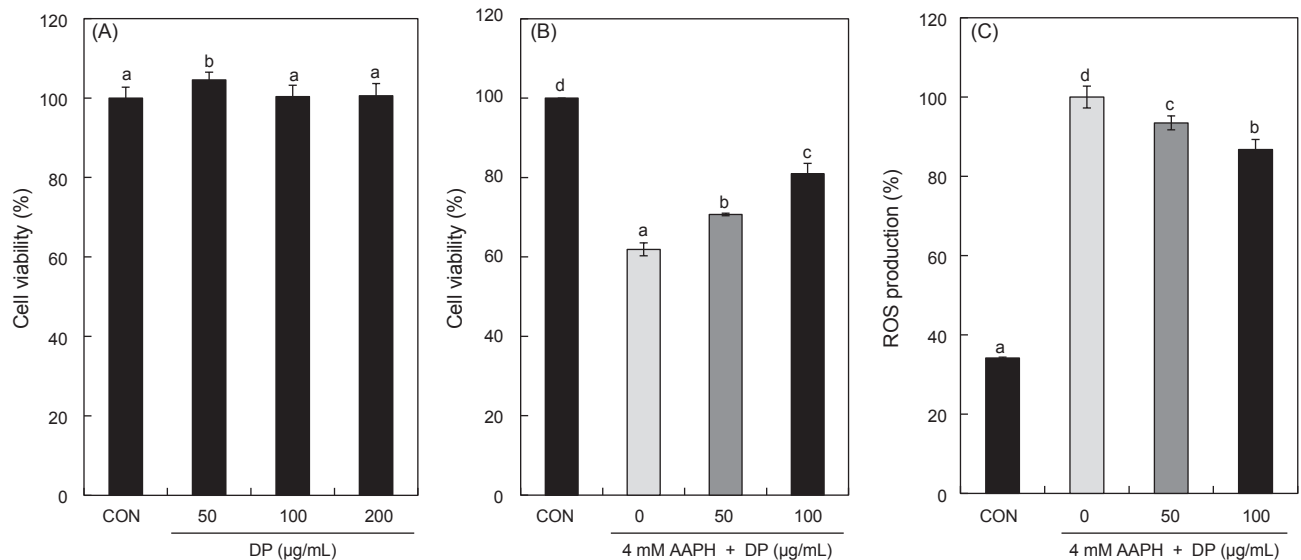


Fig. 2. (A) The cytotoxic effect of distilled water-pepsin hydrolysate (DP) on viability in vero cells. Cells were treated with DP at the indicated concentrations (50, 100 and 200  $\mu$ g/mL). (B) Protective effect of DP on AAPH-induced oxidative damage in normal cells. The viabilities of cells on AAPH treatment was assessed by MTT assay. (C) Inhibitory effect of DP on the intracellular ROS generated in AAPH-induced oxidative cells. Experiments were performed in triplicate, and the data are expressed as mean  $\pm$  SD. <sup>a-c</sup>*P*<0.05 indicates significantly different in each groups.

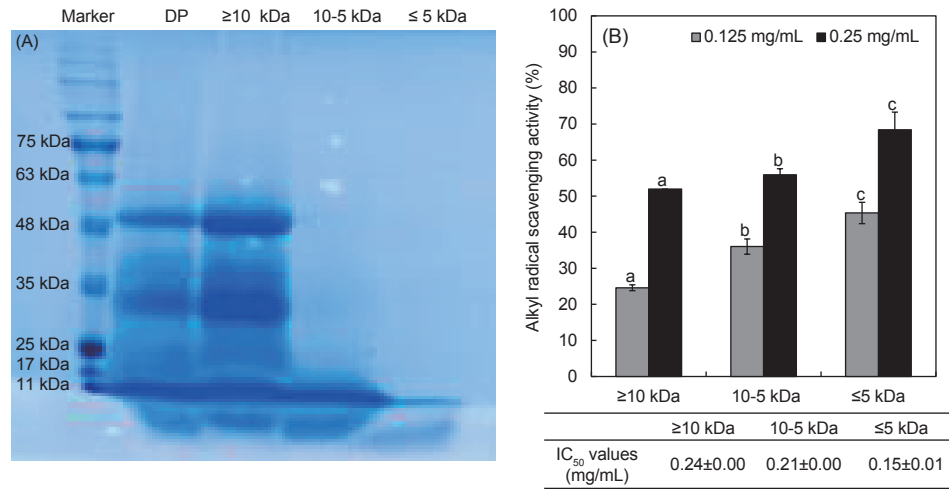


Fig. 3. (A) SDS-PAGE patterns of molecular weight fractions from DP. (B) Alkyl radical scavenging activities of the molecular weight fractions prepared from DP. Alkyl radical scavenging activities of the three samples (0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL) were measured by ESR spectrometry.  $^{a-c}P < 0.05$  indicates significantly different in each groups.

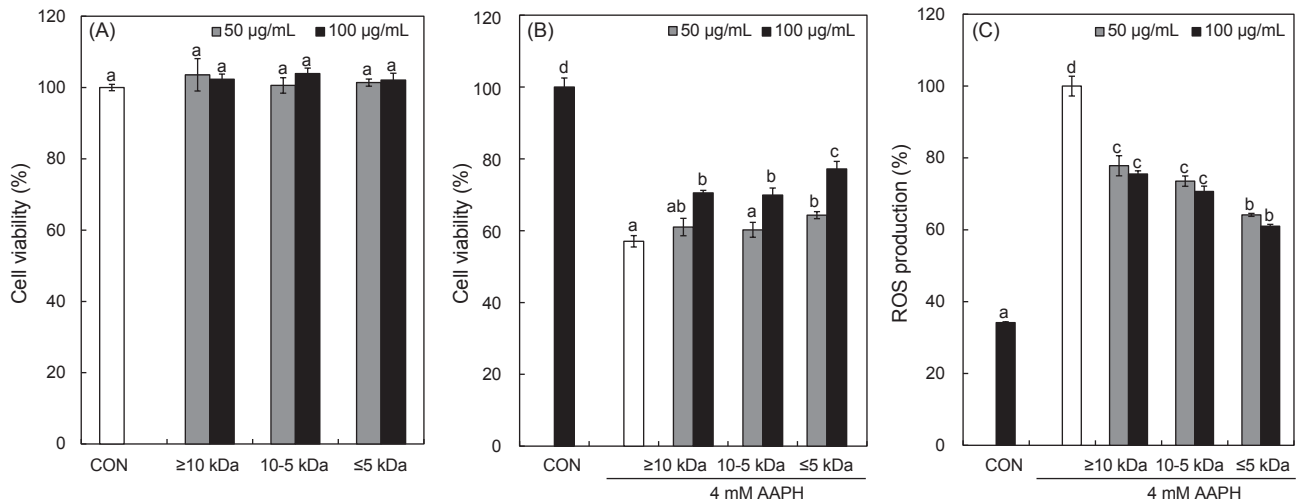


Fig. 4. (A) The cytotoxic effects of the molecular weight fractions from DP on viability in vero cells. Cells were treated with the molecular weight fractions from pepsin digestive hydrolysate at the indicated concentrations (50, 100  $\mu$ g/mL). After 24 h incubation, cell viabilities was assessed by MTT assay. (B) Protective effects of the molecular weight fractions from DP on AAPH-induced oxidative damage in normal cells. The viabilities of cells with AAPH treatment was assessed by MTT assay. (C) The intracellular ROS was detected by DCFH-DA assay. Graph showed the intracellular ROS scavenging activity. Experiments were performed in triplicate, and the data are expressed as mean $\pm$ SD.  $^{a-d}P < 0.05$  indicates significantly different in each groups.

감소시키는 것을 확인하였다(Fig. 4C). 세포에서의 결과도 앞에 ESR을 이용한 alkyl radical 소거능 결과와 마찬가지로 저분자 분획물이 항산화 활성을 갖음을 확인했고, DP의 우수한 항산화 활성을 *in vivo*에서도 확인하기 위해 연구를 진행함에 있어  $\leq 5$  kDa의 분획물을 사용하여 zebrafish embryo 실험에 임하였다.

#### DP 5 kDa 이하 분획물의 AAPH에 의해 산화된 Zebrafish embryo의 보호효과

Zebrafish 모델은 다른 동물모델들에 비해 많은 이점들을 지닌다. 예를 들면, 작은 크기이고 투명한 embryo, 낮은 비용, 쉽게 다룰 수 있는 실험 모델로써 zebrafish는 약학 관련 연구에서 사전 독성평가나 유전기능의 연구형태 등으로 사용되어 아

주 인기 있는 *in vivo* 모델로 사용되고 있다(Kang et al., 2015; Ko et al., 2014).

70% epiboly 단계의 zebrafish embryo에 15 mM AAPH의 산화적 스트레스를 유도하여 경과시간에 따른 zebrafish embryo의 생존율을 측정된 결과, 산화적 스트레스 유도 후 3시간이 경과하여 DP를 50,200 µg/mL 농도 처리했을 때 생존율이 농도의존적으로 증가하는 경향이 확인 되었으며, 24시간, 48시간, 72시간으로 경과함에도 이러한 경향은 유지되었다. 산화적 스트레스를 입지 않은 대조구와 산화적 스트레스를 입은 대조구를 비교하였을 때 200 µg/mL의 농도처리는 약 50%에 가까운 생존율을 유지시켜 주는 것으로 확인되었으며 이로부터 펩신 가수분해물의 ≤ 5 kDa 분획물이 AAPH로 유도된 산화적 스트레스로 인한 보호효과가 확인되었다. 이와 같은 결과는 *in vivo* 모델 zebrafish embryo에서 DP 저분자 분획물의 AAPH 산화 보호효과를 확인함으로써 해마 가수분해물이 동물 모델에서도 항산화 활성이 있음을 제시한다.

따라서 본 연구에서는 해수관상어센터로부터 기증받은 빅벨리해마를 다양한 효소를 사용해 가수분해 하여 각 가수분해물의 수율, 단백질 함량과 alkyl 라디칼 소거능 측정을 통해 우수한 효소 가수분해물을 선정하여 기능성소재 응용가능성을 검토하였다. 효소 가수분해물 중 우수 효소 가수분해물인 DP는 Vero Cells에 대한 세포독성이 없이 농도의존적으로 ROS 생성을 감소시켰고, AAPH에 대한 산화반응을 억제 함으로서 항산화 효능을 가진다는 것을 확인하였다. DP를 한외여과막을 통해 각 분자량 별로 분획물을 나누고, alkyl 라디칼 소거능을 확인하였을 때, 저분자량인 ≤ 5 kDa의 분획물이 가장 우수한 라디칼 소거능을 보였고, vero cells에 대한 세포독성을 보이지 않는 농도들에서 농도의존적으로 ROS 생성과 AAPH에 대한 산화억제 효과를 보임으로 저분자량의 DP 분획물이 항산화 효능을 가

진다는 것을 확인하였다. 또한, ≤ 5 kDa의 분획물은 AAPH가 감소시킨 zebrafish embryo의 생존율을 향상시켰다는 것을 확인하였다. 이 모든 결과로부터, 빅벨리해마 유래 DP 가수분해물은 항산화 효과를 가지며, 향후 기능성 화장품 소재나 식품으로 활용하기 위한 매우 효과적인 재료가 될 수 있다고 판단된다.

## 사 사

이 논문은 2015년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 수산실용화기술개발사업 "양식 해마를 이용한 기능성 식품 개발"의 지원을 받아 수행한 연구입니다

## References

Ahn GN, Kim KN, Cha SH, Song CB, Lee J, Heo MS, Yeo IK, Lee NH, Jee YH, Kim JS, Heu MS and Jeon YJ. 2007. Antioxidant activities of phlorotannins purified from *Ecklonia cava* on free radical scavenging using ESR and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated DNA damage. *Eur Food Res Technol* 226, 71-79. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-006-0510-y>.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA and Freeman BA. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *PNAS* 87, 1620-1624. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.4.1620>.

Choi YU, Rho S, Jung MM, Lee YD and Noh GA. 2006. Parturition and Early Growth of Crowned Seahorse, *Hippocampus coronatus* in Korea. *N Am J Aquacult* 19, 109-118.

Chen CB, Yuan XH, Chen Z and Yi MH. 2011. Study on extraction and antioxidant activities of liquefied protein of three-spot hippocampus. *Chinese Tropical Medicine* 11, 329-331.

Cho CH, Lee BH, Kim HY, Kim YC and Kim DO. 2012. Effect of feedstuffs on mineral composition, antioxidant capacity, and protection of neuronal PC-12 cells of deer actlers. *KSBB J* 27, 243-250. <http://dx.doi.org/10.7841/ksbbj.2012.4.243>.

Helrich K. 1990. Official Methods of Analysis of AOAC Intl. 15th ed.; Association of Official Analysis Chemists, Washington, DC, USA. Chapter 11. 1-31.

Himaya SWA, Ryu BM, Qian ZJ and Kim SK. 2012. Paeonol from *Hippocampus kuda* Bleeler suppressed the neuro-inflammatory responses in vitro via NF-κB and MAPK signaling pathways. *Toxicol In Vitro* 26, 878-887. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.04.022>.

Heo SJ, Park EJ, Lee KW and Jeon YJ. 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Biore-source Technol* 96, 1613-1623. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotech.2004.07.013>.

Je JY, Park PJ and Kim SK. 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res Int* 38, 45-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2004.07.003>.

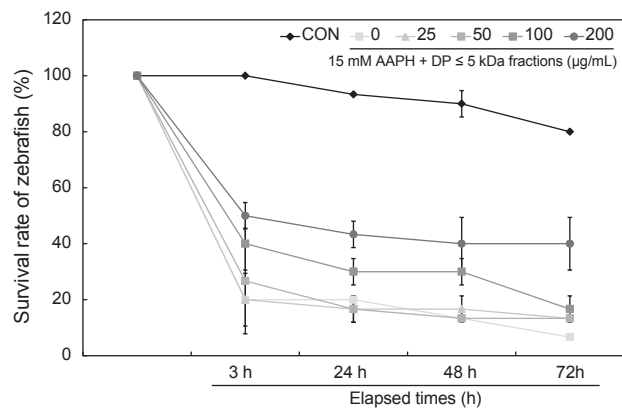


Fig. 5. Survival rates after treatment with AAPH or co-treatment with 5 kDa≥molecular fraction from DP. The embryos were treated with 15 mM AAPH with or without 5 kDa≥molecular fraction from DP at the different concentrations (25, 50, 100, 200 µg/mL).

- Kim IS and Lee WO. 1995. First record of the seahorse fish, *Hippocampus trimaculatus* (Pisces: Syngnathidae) from Korea. *Kor J Zool* 38, 74-77.
- Ko JY, Lee JH, Samarakoon K, Kim JS and Jeon YJ. 2013. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. *Food Chem Toxicol* 52, 113-120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.058>.
- Kang N, Ko SC, Samarakoon K, Kim EA, Kang MC, Lee SC, Kim J, Kim YT, Kim JS, Kim H and Jeon YJ. 2013. Purification of antioxidant peptide from peptic hydrolysates of *Mideodeok* (*Styela clava*) flesh tissue. *Food Sci Biotechnol* 22, 541-547. <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-013-0112-y>.
- Ko SC, Kim D and Jeon YJ. 2012. Protective effect of a novel antioxidative peptide purified from a marine *Chlorella ellipsoidea* protein against free radical-induced oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 50, 2294-2302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.022>.
- Kim EA, Lee SH, Ko CI, Cha SH, Kang MC, Kang SM, KO SC, Lee WW, Ko JY, Lee JH, Kang N, Oh JY, Ahn G, Jee YH and Jeon YJ. 2014. Protective effect of fucoidan against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish model. *Carbohydr Polym* 102, 185-191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.022>.
- Ko SC, Kang N, Kim EA, Kang MC, Lee SH, Kang SM, Lee JB, Jeon BT, Kim SK, Park SJ, Park PJ, Jung WK, Kim D and Jeon YJ. 2012. A novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from a marine *Chlorella ellipsoidea* and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Process Biochem* 47, 2005-2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.015>.
- Kang MC, Kim SY, Kim EA, Lee JH, Kim YS, Yu SK, Chae JB, Choe IH, Cho JH and Jeon YJ. 2015. Antioxidant activity of polysaccharide purified from *Acanthopanax koreanum* Nakai stems *in vitro* and *in vivo* zebrafish model. *Carbohydr Polym* 127, 38-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.043>.
- Ko JY, Kim EA, Lee JH, Kang MC, Lee JS, Kim JS, Jung WK and Jeon YJ. 2014. Protective effect of aquacultured flounder fish-derived peptide against oxidative stress in zebrafish. *Fish Shellfish Immun* 36, 320-323. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.11.018>.
- Lourie JR, Vincent ACJ and Hall HJ. 1999. Seahorses: An Identification Guide to the World's Species and Their Conservation. Project Seahorse, London, 214 pp.
- Myers GS. 1979. A freshwater seahorse. *Pac Disc* 32, 30-31.
- Niki E. 1990. Free radical initiators as source of water-or lipid-soluble peroxy radicals. *Meth Enzymol* 186, 100-108. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86095-D](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(90)86095-D).
- Park PJ, Shahidi F and Jeon YJ. 2004. Antioxidant activities of enzymatic extracts from an edible seaweed *Sargassum horneri* using ESR spectrometry. *J Food Lipids* 11, 15-27. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4522.2004.tb00257.x>.
- Qian ZJ, Ryu BM, Kim MM and Kim SK. 2008. Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of the extracts from seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeler. *Biotechnol Bioproc E* 13, 705-715. <http://dx.doi.org/10.1007/s12257-008-0093-5>.
- Ryu BM, Qian ZJ and Kim SK. 2010. 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- $\kappa$ B/P38 kinase. *Peptides* 31, 79-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2009.10.019>.
- Ryu BM, Qian ZJ and Kim SK. 2010. Purification of a peptide from seahorse, that inhibits TPA-induced MMP, iNOS and COX-2 expression through MAPK and NF- $\kappa$ B activation, and induces human osteoblastic and chondrocytic differentiation. *Chem-biol Interact* 184, 413-422. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2009.12.003>.
- Ren J, Zhao M, Shi J, Wang J, Jiang Y, Cui C, Kakuda Y and Xue SJ. 2008. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chem* 108, 727-736. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.010>.
- She M, He GX, Chen H and Jin ZJ. 1995. An experimental study of five species halobios on anti-aging activity. *Chinese J Mar Drugs* 53, 30-34.
- Tsai JS, Lin TC, Chen JL and Pan BS. 2006. The inhibitory effects of freshwater clam (*Corbicula fluminea*, Muller) muscle protein hydrolysates on angiotensin I converting enzyme. *Process Biochem* 41, 2276-2281. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.023>.
- Vari RP. 1982. Fishes of three western North Atlantic, Subfamily Hippocampinae. The seahorses, Sears Foundation for Marine Research, Yale University Report 1, 173-189.
- Vincent AC. 1996. The International trade in Seahorses. TRAF-FIC International, Cambridge, U.K., 4-163.
- Woods C. 2007. Aquaculture of the big-bellied seahorse *Hippocampus abdominalis* Lesson 1827 (Teleostei : Syngnathidae). Ph.D. Thesis, Victoria University, Melbourne, Australia.
- Xu DH and Xu SB. 1997. The extract from *Hippocampus trimaculatus* Leach: its effect of antithrombosis on rats and ingredients analysis. *Chinese J Mar Drugs* 61, 11-13.
- Xu DH, Mei XT, Li BJ, Lin ZI and Xu SB. 2003. The pharmacological effects of *Hippocampus* capsule on enhancing sexual functions of rats. *J Chinese Med Mater* 26, 807-808.
- Yang AY and Boo HO. 2013. Phenolic compounds, antimicrobial effects and tyrosinase inhibition activities of cucumber grown greenhouse according to cultivars and growth stages. *Korean J Plant Res* 26, 645-651. <http://dx.doi.org/10.7732/kjpr.2013.26.5.645>.
- Zhu AM. 2005. Pharmacologic researches on ethanol extracts



from *Hippocampus*. Chinese Pharmaceutical Affairs 19, 23-24.

Zhang ZH, Xu GJ, Xu LS and Wang Q. 1994. Inhibitory effects of Hippocampus SPP. extracts on L-glutamic acid induced Ca influx in rats' neurons. Chinese J Mar Drugs 52, 6-9.

Zhao Y, Li B, Dong S, Liu Z, Zhao X, Wang J and Zeng M. 2009. A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioidea* hydrolysate. Peptides 30, 1028-1033. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2009.03.002>.