

# 식용 빅벨리 해마(*Hippocampus abdominalis*) 유래 단백질 가수분해물의 항산화와 항고혈압 효능

제준건 · 김현수 · 이효근 · 오재영 · Lei Wang · 노섭<sup>1</sup> · 전유진\*

제주대학교 해양생명과학과, <sup>1</sup>주해천마

## Antioxidant and Antihypertension Effects of Enzyme Hydrolysate from *Hippocampus abdominalis*

Jun-Geon Je, Hyun-Soo Kim, Hyo-Geun Lee, Jae-Young Oh, Lei Wang, Sum Rho<sup>1</sup> and You-Jin Jeon\*

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

<sup>1</sup>HAECHUNMA CO.LTD, Jeju 63364, Korea

Seahorses have long been used as ornamental and medicinal products. The sea horse *Hippocampus abdominalis* has a beautiful color and unique shape and is also used for ornamental purposes and as a traditional medicine in China. This study examined the value of *H. abdominalis* as a health functional food or food additive. *H. abdominalis* was hydrolyzed using seven proteases: flavourzyme, neutrase, alcalase, trypsin, kojizyme, pepsin and protamex. The yields of all of the enzyme hydrolysates were higher than that of the aqueous extract. Of the enzymatic hydrolysates, seahorse Protamex hydrolysate (SHP) gave the highest yield and had excellent antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activities. It protected Vero cells against oxidative by 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) and antihypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. This study attempted to demonstrate *H. abdominalis* as a health functional food or food additive in the future.

Key words: *Hippocampus abdominalis*, Enzyme hydrolysate, Protamex, Antioxidant, Antihypertension

### 서 론

최근 현대인들은 빠르게 증가하는 고령화 인구에 대해 우려함과 동시에 건강에 관한 관심과 건강기능식품에 수요가 지속적으로 증가하고 있다(Cha et al., 2012). 그리하여 오랜 시간 동안 항산화제와 항고혈압제에 대하여 인류의 삶의 질적 향상을 위한 연구가 이어져왔다. 활성산소종은 체내에서 생성되는데 세포의 여러 대사과정에 의하여 생성되거나 다른 여러 작용(Cytokine 등)의 자극으로 인하여 생성되고, 이를 통하여 체내에서는 산화적 스트레스가 발생하면서 여러 질병(노화, 비만 등)들의 원인이 된다. 이러한 활성산소를 제거하는 항산화제는 인체에서의 노화 방지, 성인병 예방 등의 기능을 할 수 있다고 알려져 있다(Farag et al., 1989; Lee et al., 2003). 이미 알려진 합성 항산화제인 butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxy toluene (BHT), propyl gallate (PG)가 널리 사용되고

있지만 합성 항산화제의 독성과 부작용으로 규제 받고 있고 그로 인한 사용이 기피되어져 천연 항산화제에 대한 관심이 증가하고 있다(Seog et al., 2002). 또 다른 현대인의 건강을 위협하는 고혈압은 혈액의 압력이 만성적으로 증가하는 만성질환으로서 동맥경화, 심근경색 등의 질환의 위험요인이기도 하여 지속적인 관리와 치료를 필요로 한다. 고혈압을 치료하기 위해 잘 알려져 있는 것으로는 안지오텐신 전환효소 억제제(angiotensin convert enzyme inhibitor, ACEi), 동맥경화에 억제기능이 주목되어 지는 ARBs (angiotensin II type1 receptor blockers) 등이 있다(Kang et al., 2018; Kim et al., 2018). 하지만 ACEi는 여러 종류가 있고 배설되는 부위도 다르지만 마른 기침, 발진, 고칼륨 혈증등이 흔한 부작용으로 나타나고, ARBs 또한 위험군에 따라 다른 항고혈압제를 사용해야하기 때문에 천연으로부터 얻어지는 ACE저해제에 많은 관심이 증가되고 있다(Kim et al., 2000). 해마는 중국에서는 예로부터 전통적인 약재로서 사

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

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



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0127>

Korean J Fish Aquat Sci 52(2), 127-133, April 2019

Received 24 December 2018; Revised 15 January 2019; Accepted 11 February 2019

저자 직위: 제준건(대학원생), 김현수(박사), 이효근(대학원생), 오재영(박사), Lei Wang(박사), 노섭(대표), 전유진(교수)

용했고, 현재 중국을 비롯한 중화 문화권 국가에서 정력제, 화장품 등으로 사용되어 수요가 증가하고 있다(Kang et al., 2017). 우리나라에는 가시해마(*Hippocampus histrix*), 복해마(*Hippocampus kuda*), 산호해마(*Hippocampus mohnkei*), 점해마(*Hippocampus trimaculatus*) 등이 분포하지만 불법무역이나 남획, 생태지 파괴로 인해서 자원으로 서의 해마를 얻는데 어려움이 있다(Huh et al., 2014). 하지만 빅벨리 해마는 최근 제주에서 해마 대량 양식에 성공하였고 크기가 크고 아름다운 형태를 가지고 있어 관상용으로서 가치가 높아 상업적으로 가치가 높다(Ko et al., 2015). 기존의 해마는 향산화, 항암, 항노화, 항고혈압 등 많은 연구가 되었지만 최근 양식에 성공한 빅벨리 해마의 경우 많은 연구가 필요하다(Alagumuthu et al., 2016; Kim et al., 2016). 따라서, 이 연구에서는 양식 빅벨리 해마의 각 효소 별 가수분해물 중 최적의 추출 조건으로 확인된 protamex 가수분해물의 뛰어난 항산화, 항고혈압 효과를 확인하여 빅벨리 해마의 우수한 효능을 입증하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험 시약 및 재료

본 실험에서 사용한 해마는 빅벨리 해마로 제주특별자치도 제주시 구좌읍에 위치한 해천마에서 제공받았고, 동결 건조된 해마를 분쇄 후 사용하였다. 단백질효소가수분해에 사용된 소화효소 7종(Protamex, Neutrase, Alcalase, Kojizyme, Flavourzyme, Trypsin, Pepsin)은 Novozyme Co. (Denmark)에서 구입하였다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH),  $\alpha$ -(4-Pyridyl-1-oxide)-N-tert-butylnitron (4-POBN), 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 항고혈압 활성을 확인하기 위하여 ACE inhibition potential evaluation kit (Dojindo Inc., Japan)을 사용하였다. 그 외 기타 시약은 분석용 시약을 사용하였다.

### 단백질 효소 가수분해물 제조방법

빅벨리 해마를 동결건조, 분쇄 후에 파우더 형태에서 기질 대 효소 비율을 100 대 1로 설정하여 진행하였다. 단백질 가수분해 효소 7종을 사용하여 해마 효소가수분해물을 제조하였고 증류수(distilled water, DW) 추출물과 비교하였다. 각 효소 별 최적온도와 pH에 맞춰 24시간동안 진행하였고 증류수 추출은 상온에서 효소가수분해물과 같이 24시간동안 추출하였다. 100°C Water bath에서 10분동안 불활성화시켜 가수분해를 정지시켰다. 이후 원심분리한 후(12,000 rpm, 15 min, 4°C) 상층액만 분리하여 여과지를 이용하여 필터 후 동결건조 하고 파우더 형태의 총 7종의 단백질 효소 가수분해물과 증류수 추출물을 얻

었다.

### DPPH, Alkyl radical 소거능 측정

DPPH, alkyl radical 소거능은 전자스핀공명(Electron spin resonance, ESR)을 이용하여 해당 시료를 측정하는 Heo et al. (2005)의 방법을 따랐다. DPPH radical 소거능을 측정하기 위하여 DPPH 60  $\mu$ L와 시료 60  $\mu$ L를 1:1로 혼합하여 2분간 반응시켜 capillary tube에 옮겨 측정하였다. Alkyl radical 소거능을 측정하기 위하여 증류수 20  $\mu$ L, 시료 20  $\mu$ L, 40 mM AAPH 20  $\mu$ L, 40 mM 4-POBN 20  $\mu$ L을 혼합하여 37°C water bath에서 30분간 반응시켜 capillary tube에 옮겨 해당 시료를 측정하였다. 각 radical의 대조군으로는 시료 대신 증류수를 사용하였다.

### Angiotensin-I 전환효소 (ACE) 저해작용 측정

ACE 저해 효과를 측정하기 위해 ACE inhibition potential evaluation kit를 사용하여 Kim et al. (2018)의 protocol을 따랐다. Enzyme working solution을 만들기 위하여 증류수를 kit의 enzyme B에 2 mL 주입하여 녹이고 enzyme A에 enzyme B를 1.5 mL에 주입했다. Indicator working solution을 제작하기 위하여 증류수를 각각 enzyme C, coenzyme Bottle에 3 mL씩 주입 후 녹여 indicator solution에 각각 2.8 mL씩 넣어 혼합하여 만들었다. 96 well plate에 protocol을 따라 blank1, 2에는 증류수를 20  $\mu$ L, 시료를 각 농도별로 20  $\mu$ L씩 처리하였다. 모든 well에 20  $\mu$ L의 substrate buffer를 처리한 이후 blank2를 제외한 well에는 enzyme working solution을 20  $\mu$ L씩 처리하였고 blank2에는 증류수 20  $\mu$ L를 처리하였다. 37°C shaking incubator에서 60분간 반응 후 모든 well에 200  $\mu$ L의 indicator working solution을 처리하여 상온에서 10분간 반응시켜 450nm의 흡광도에서 측정하였다.

### Vero cells culture

Vero cell을 RPMI 1640 (include 10% FBS, 1% antibiotic)배지를 사용하였고 세포용 배양 Dish에 배양하였다. 세포의 상태에 따라서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 incubator에서 2-3일간 계대 배양하여 사용하였다.

### 활성산소 생성 저해 활성 - DCFH-DA assay

활성산소 생성 저해 측정을 위하여 DCFH-DA assay로 확인하였다. 측정법은 Wang et al. (2018)의 방법을 따라 세포 수 각 well 당  $5.0 \times 10^4$ 으로 24 well plate에 처리하고 24시간 배양하였다. 이 후 세포에 시료 처리하여 30분동안 incubator에서 반응시킨 후 AAPH (stock, 200 mM) 처리하여 1-3시간 incubator에서 반응시켰다. 반응 후 DCFH-DA (stock, 500  $\mu$ g/mL)를 처리하여 485-530 nm에서 fluorescence로 측정하였다.

### 독성 평가 및 산화보호효과 측정

각 가수분해물에 대한 세포에서의 독성을 평가하기 위해 vero cell을 이용했고 Wang et al. (2018)의 방법을 따라서 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 96 well plate 각 well에  $1 \times 10^5$  cells/mL로 계산하여 190  $\mu$ L씩 분주하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 incubator에서 24 시간동안 배양하였다. 이후 시료를 농도 별로 처리하여 24 시간 후 MTT를 50  $\mu$ L씩 처리하여 3 시간 배양 후 DMSO(dimethylsulfoxide)를 이용하여 완전히 녹인 후 빛을 차단시켜 12 시간 보관 후에 540 nm 흡광도에서 측정하였다.

**동물 및 사육 환경**

이 실험에 사용된 동물은 SHR (Spontaneously hypertensive rat, 본태성 고혈압 쥐)로 중앙동물실험(주)에서 구입하였다(동물 승인번호 2017-0017). SHR은 Ko et al. (2012)의 방법을 따라서 온도 24±1°C, 조명시간 12시간 주기로 하여 2주일간 사육하였고 고형사료와 음용수를 공급하여 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험물질 투여 전 날 혈압측정기로 혈압을 측정하였을 때 수축기 혈압 160 mmHg 이상을 측정하여 구별하였고 비슷한 체중의 실험동물을 선별하여 실험에 사용하였다.

**실험물질 투여 및 혈압 측정**

처음 혈압을 측정한 시간을 0시간으로 하여 이후 3시간 간격으로 측정하여 총 12시간까지 4번 혈압측정을 진행하였고, 실험을 위해 음용수 식이군(Control), 정어리 펩타이드 식이군(Positive control), 해마 protamex 가수분해물 식이군으로 나눠 투여하였으며 해마 protamex 가수분해물은 50 mg/kg, 100 mg/kg으로 나누어 투여하여 실험을 진행하였다. 혈압의 측정은 실험동물의 충분한 혈관 확장을 위해 30-32°C, 플라스틱 고정 장치에서 적응시킨 후 실험동물의 꼬리 시작 지점의 동맥위치를 확인하고 volume pressure recording sensor에 끼워 측정하여 수축기 혈압 수치를 데이터화하였다. 수축기 혈압 측정은 혈압 측정기(CODA® High Throughput System, U.S.A.)를 이용하였다.

**통계분석**

실험결과와 통계분석은 각 시료에 대한 평균±표준편차로 나타내었고, SPSS Version 14 program을 사용하여 Oneway ANOVA-test를 실시하였다. 항목들 간의 유의성 검증은 Turkey's test에 의해 P<0.01, 0.05, 0.1에서 검정하였다.

Table 1. Optimum conditions of enzymatic hydrolysates prepared from *Hippocampus abdominalis* with eight proteinase

Enzymatic digests	Optimum conditions	
	pH	Temp. (°C)
Distilled water	7.0	28
Protamex	6.0	40
Neutrase	6.0	50
Alcalase	8.0	50
Kojizyme	6.0	40
Flavourzyme	7.0	50
Trypsin	8.0	37
Pepsin	2.0	30

**결과 및 고찰**

**단백질 효소 가수분해물의 수율, DPPH, Alkyl radical 소거능 및 ACE 저해 활성 측정**

빅벨리 해마와 7종의 단백질 효소 그리고 증류수(Distilled water, DW)를 각 효소 별 최적 온도와 최적 pH를 설정하여 가수분해를 진행하였고 수율을 측정하였다(Table 1.). DW로 추출한 가수분해물의 수율은 36.00±0.87%로 다른 효소 가수분해물과 비교하였을 때 다소 떨어지는 수율을 확인할 수 있었지만 단백질 분해 효소를 이용하여 가수분해하였을 때는 DW 추출물의 수율에 비해 월등히 높은 수율을 확인할 수 있었다. 2 g의 동결 건조되어 분쇄한 해마와 기질 대 효소 비율을

Table 2. Yields, free radical scavenging activities, and ACE inhibitory effects of proteases hydrolysates of *Hippocampus abdominalis*

Sample	Yield (%)	ACE inhibitory effect (IC <sub>50</sub> , mg/mL)	Free radical scavenging activity (IC <sub>50</sub> , mg/mL)	
			DPPH	Alkyl
Flavourzyme	57.67±0.76	0.13±0.00	3.45±0.23	0.32±0.03
Trypsin	57.17±0.76	0.11±0.00	2.35±0.22	0.33±0.03
Neutrase	65.50±3.04	0.06±0.01	3.04±0.11	0.48±0.02
Protamex	70.67±1.89	0.06±0.00	3.02±0.07	0.47±0.03
Kojizyme	39.33±0.58	0.14±0.01	2.20±0.18	0.40±0.05
Pepsin	55.67±1.04	0.16±0.00	4<	1.29±0.03
Alcalase	67.17±1.15	0.06±0.01	2.63±0.13	0.43±0.03
DW	36.00±0.87	0.95±0.10	1.41±0.01	0.58±0.02

ACE, angiotensin convert enzyme; DPPH, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl; DW, distilled water.

100대 1로 추출하였을 때 해마 protamex 가수분해물(SHP)은  $70.67 \pm 1.89\%$ 로 총 7종의 단백질 효소 가수분해물 중 가장 높은 수율을 보였다(Table 2). 다음으로는 alcalase, neutrase, flavourzyme, pepsin, trypsin, kojizyme 순으로 높은 수율을 보였다. Kim et al. (2016)의 결과에 따르면 alcalase 가수분해물 수율  $78.00 \pm 1.00\%$ , neutrase 가수분해물  $78.33 \pm 2.00\%$ 으로 본 실험과 큰 차이가 있는 시료가 있었던 반면 protamex 가수분해물 수율의 경우  $67.00 \pm 2.00\%$ , DW 가수분해물  $37.45 \pm 0.35\%$ 로 비슷한 경향을 보이는 시료도 있었다. 이후 ESR은 정확하고 직접적인 산화적 스트레스에 대한 저해활성을 보는 방법임으로 이를 이용하여 단백질 가수분해물들의 라디칼들에 소거능을 확인하였다. DPPH 저해 활성에 대한  $IC_{50}$ 는 DW 추출물이  $1.41 \pm 0.01$  mg/mL로 다른 효소 가수분해물에 비하여 높은 활성을 보였다(Table 2). 수율이 높았던 SHP는  $3.02 \pm 0.07$  mg/mL로 다른 가수분해물들과 비교했을 때 상대적으로 높은  $IC_{50}$ 를 확인하였다. Alcalase, neutrase는 각각  $2.63 \pm 0.13$  mg/mL,  $3.04 \pm 0.11$  mg/mL로 확인되었고 trypsin  $2.35 \pm 0.22$  mg/mL, flavourzyme  $3.45 \pm 0.23$  mg/mL, kojizyme  $2.20 \pm 0.18$  mg/mL로 측정되었다. Pepsin 가수분해물은  $IC_{50}$  결과가 4 mg/mL보다 높게 측정되었다. Alkyl radical 소거능  $IC_{50}$  값도 Table 2에 표기한 것과 같이, flavourzyme 가수분해물의  $IC_{50}$ 가  $0.32 \pm 0.03$  mg/mL로 가장 좋았고 trypsin  $0.33 \pm 0.03$  mg/mL, kojizyme  $0.40 \pm 0.05$  mg/mL, alcalase  $0.43 \pm 0.03$  mg/mL, protamex  $0.47 \pm 0.03$  mg/mL, neutrase  $0.48 \pm 0.02$  mg/mL, pepsin  $1.29 \pm 0.03$  mg/mL, DW  $0.58 \pm 0.02$  mg/mL로 확인되었다. Jang et al. (2010)에 따르면 Hippocampus 열수 추출물의 항산화능을 확인해본 결과 DPPH radical 소거능의  $IC_{50}$ 는  $87.46 \mu\text{g/mL}$ 로 확인되었고 그에 반해 우리의 protamex 가수분해물은 우수한 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. ACE 저해효과를 보았을 때 해마 DW 추출물  $0.95 \pm 0.10$  mg/mL  $IC_{50}$  값에 비하여 효소를 사용한 가수분해물들의 활성이 뛰어나다는 것을 확인하였다. 높은 수율을 보였던 SHP는  $0.06 \pm 0.00$  mg/mL, neutrase와 alcalase는 각각  $0.06 \pm 0.01$  mg/mL로 확인하였다. 이 외의 효소들에 의해 제조된 가수분해물들은 상대적으로 수율도 낮았을 뿐만 아니라 ACE 저해효과에서도 0.1 mg/mL 이상을 나타내어 낮았다. Kim et al. (2018)에 따르면 빅벨리 해마 alcalase 가수분해물의 alkyl radical 소거능 및 ACE 저해 활성을 평가한 결과, 각 활성의  $IC_{50}$  값은  $0.58 \pm 0.09$  mg/mL,  $0.32 \pm 0.06$  mg/mL로 확인되었다. 이러한 결과는 이전 연구에서 빅벨리 해마가 항산화, 항고혈압에 우수한 활성이 있음을 보여주었고, 우리는 이전 연구와 다르게 protamex 가수분해물을 이용한 alkyl radical 소거활성과 ACE 저해 활성을 측정된 결과, 각  $IC_{50}$  값  $0.47 \pm 0.03$  mg/mL,  $0.06 \pm 0.00$  mg/mL로 확인되었다. 이전 alcalase 효소 가수분해물의 결과와 우리의 protamex 가수분해물의 결과를 비교하였을 때 protamex가 우수한 활성이 확인되었다. 우리는 이러한 결과들을 토대로 빅

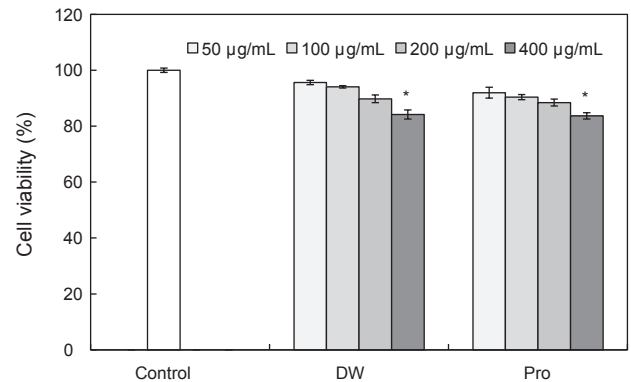


Fig. 1. Cytotoxicity of DW and Protamex extracts of seahorse on Vero cells. Cell viability was measured by MTT assay. The experiments were conducted triplicate, and the data were expressed as the mean±standard error (S.E). \* $P < 0.05$  compare with control group. MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; DW, Distilled water; Pro, Protamex hydrolysate.

벨리 해마 protamex 가수분해물을 이용해 이전 연구에서 평가되지 않은 SHR 동물모델을 이용한 in vivo 항고혈압 활성을 평가하였다.

#### 빅벨리 해마 Protamex 가수분해물 (SHP)의 AAPH에 의한 산화적 스트레스 저해효과

효소 가수분해물들에 대한 항산화 활성은 이미 많은 연구가 되어 있다(Chung et al., 2006; Ko et al., 2010; Kwon et al., 2010; Kim et al., 2016). 그 중 Kim et al. (2016)의 연구에서는 빅벨리 해마 펩신 가수분해물을 이용한 vero cell 내 ROS (Reactive oxygen species) 생성을, 세포 생존율을 보고한 바 있다. 그 결과 해당 가수분해물에 대한 세포 내 우수한 항산화 활성을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 빅벨리 해마 protamex 가수분해물 또한 항산화 활성에 대해 예상할 수 있었고 vero cell을 이용하여 AAPH에 의한 산화적 스트레스 저해 효과를 확인하였다. 세포수의 측정에 사용되는 대표적인 방법인 MTT assay법을 통하여 세포 생존율 측정을 의 방법을 따라 측정하였다. 해마 DW 가수분해물과 SHP의 독성을 평가하여 Fig 1에 나타내었다. 대조구는 시료를 처리하지 않은 실험군으로 구분하였다. 각 시료의 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL 농도에서 시료 처리 24시간 이후 독성을 확인하였고 Fig 1에 나타내었다. 가장 높은 농도인 400 µg/mL에서 유의적으로 ( $P < 0.05$ ) 독성이 있음을 확인하였지만 다른 농도에서는 독성이 없었다. Vero cell에서 AAPH 10 mM에 의한 활성산소종 (Reactive oxygen species, ROS)의 생성억제 활성을 확인하기 위해 해마 DW 가수분해물과 protamex 가수분해물을 각 농도별로 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL로 처리하여 Fig. 2로 나타내었다. AAPH 10mM을 각 농도별로 처리하였을 때 해마 DW 가수분해물에서는 농도의존적으로 ROS 생성이 억제되는

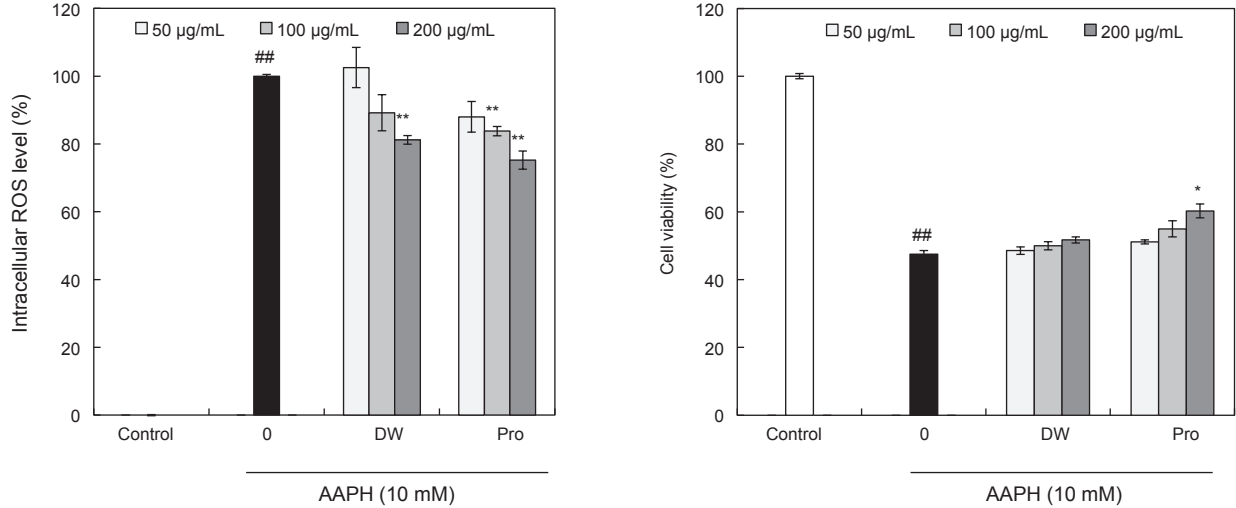


Fig. 2. Protective effects of D.W and Protamex extracts of seahorse against AAPH-induced oxidative stress in Vero cells. (A) Intracellular ROS level; (B) cell viability. The ROS level was measured by DCF-DA assay and the cell viability was measured by MTT assay. The experiments were conducted triplicate, and the data were expressed as the mean±S.E. ##P<0.01 compare with control group; \*P<0.05, \*\*P<0.01 compare with AAPH group. DW, distilled water; Pro, Protamex hydrolysate; SHP, Seahorse Protamex hydrolysate; ROS, reactive oxygen species; DCF-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; AAPH, 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride.

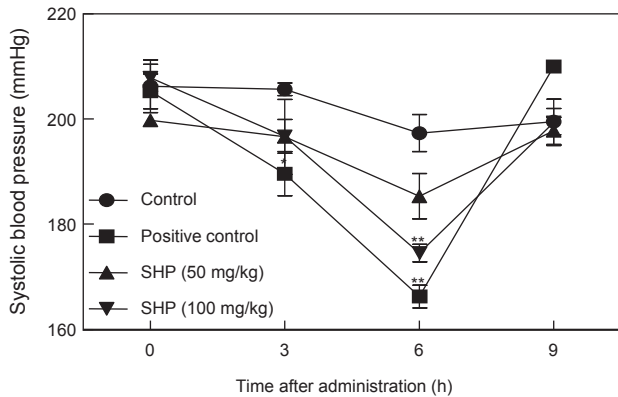


Fig. 3. Change of systolic blood pressure of SHR after oral administration of SHP (Protamex extract of seahorse). The positive control is Sardine peptide (50mg/kg). Symbols indicate: ●, control; ■, positive control (sardine peptide); ▲, SHP (50 mg/ml); ▼, SHP (100 mg/ml); \*P<0.1, \*\*P<0.05 compared with control group. SHR, Spontaneously hypertensive rat; SHP, Seahorse Protamex hydrolysate.

것을 확인하였고, 200 µg/mL에서 유의적인 차이(P<0.01)를 보였다. SHP는 해마 DW 가수분해물에 비해 ROS 생성 억제에 상대적으로 더 좋은 결과를 보였으며, 100 µg/mL와 200 µg/mL에서 유의적인 차이(P<0.01)를 보였다.

AAPH에 의한 산화 보호효과를 확인하기 위해 AAPH 10 mM를 DW 가수분해물과 protamex 가수분해물 SHP의 농도

50 µg/mL, 100 µg/mL 그리고 200 µg/mL과 함께 처리하였다. 시료를 처리하지 않고 산화적 스트레스만 유도시킨 실험군과 유도시키지 않은 실험군으로 대조군을 분류하였다. AAPH만 처리한 실험군에서는 AAPH를 처리하지 않은 실험군보다 유의적으로(P<0.01) 세포 생존율이 낮게 나왔고 SHP의 200 µg/mL농도에서는 유의적으로 우수한 AAPH 산화 보호효과를 확인할 수 있었다. 그 결과 우리는 이전 연구와는 달리 빅벨리 해마 protamex 가수분해물을 이용하여 vero cell 내에서 우수한 항산화 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

### 본태성 고혈압 쥐(Spontaneously hypertensive rat, SHR)에서의 항고혈압 활성 측정

SHP의 항고혈압 활성을 측정하기 위해서 Ko et al. (2012)의 protocol을 따랐다. 실험 기간 동안 대조군의 본태성 고혈압 쥐는 꾸준히 높은 수축기 혈압을 나타냈다. 양성 대조군으로 SHR에 sardine peptide를 50 mg/kg으로 투여하여 수축기 혈압을 0, 3, 6, 9시간으로 측정한 결과 3시간에 수축기 혈압이 대조군과 유의적인 차이(P<0.1)을 확인하였고 6시간에 수축기 혈압이 가장 많이 떨어져 유의적인 차이(P<0.05)를 확인하였다. SHP를 저농도인 50 mg/kg으로 처리하였을 때 6시간에 가장 낮은 혈압을 보였지만 양성 대조군과 비교하였을 때 상대적으로 큰 차이를 보였다. 100 mg/kg 농도에서 SHP를 투여하였을 때 다른 실험군과 마찬가지로 6시간에 가장 낮은 수축기 혈압을 보였고 양성 대조군과 비교하였을 때 유의적인 차이(P<0.05)를 보였으며 비슷한 경향으로 낮아지는 혈압을 확인할 수 있었

으며, SHP는 9시간에 양성대조군으로 사용한 sardine peptide 보다 더 낮은 혈압을 보였다. 이와 관련된 본태성 고혈압 쥐에서 단백질들의 활성에 대한 많은 활성보고가 있는데, 그 중에는 *Chlorella ellipsoidea*, *Paralichthys olivaceus*, royal jelly 등이 있었다(Matsui et al., 2002; Ko et al., 2012; Ko et al., 2016). 본 연구에서는 빅벨리 해마를 단백질 효소를 이용하여 가수분해하여 각 시료의 수율, DPPH, alkyl radical 소거능, ACE 저해 효과를 확인하였다. 이를 통해 빅벨리 해마 protamex 가수분해물을 선정하였고 식품 해마 *H.abdominalis* 유래 protamex 가수분해물은 항산화, 항고혈압 효능을 가지는 것을 확인하였으며, 향후 건강기능식품이나 식품 첨가제로서 뛰어난 잠재력이 있음을 확인하였다.

## 사 사

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 “지역특화산업육성사업(R&D, P0002746)”으로 수행된 연구결과입니다.

## References

- Alagumuthu M, Ravichandran S, Kumaravel K, Arumugam S and Priya R. 2016. Molecular docking and in vitro evaluations of Hippocampus trimaculatus (seahorse) extracts as the anti-inflammatory compounds. *Int J Bioinformatics* 12, 355-371.
- Cha NH, Seo EJ and Sok SR. 2012. Factors influencing the successful aging of older Korean adults. *Contemp Nurse* 41, 78-87. <https://doi.org/10.5172/conu.2012.41.1.78>.
- Chung IK, Kim HS, Kang KT, Choi YJ, Choi JD, Kim JS and Heu MS. 2006. Preparation and Functional Properties of Enzymatic Oyster Hydrolysates. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35, 7. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2006.35.7.919>.
- Farag RS, Badel AZMA, Hewedi FM and El-baroty GSA. 1989. Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *J Am Oil Chem Soc* 66, 792-799. <https://doi.org/10.1007/BF02653670>.
- Heo SJ, Park PJ, Park EJ, Kim KS and Jeon YJ. 2005. Antioxidant activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Ecklonia cava* by electron spin resonance spectrometry and comet assay. *Eur Food Res Technol* 221, 41-47. <http://doi.org/10.1007/s00217-005-1187-3>.
- Huh SH, Park JM, Kwak SN and Seong BJ. 2014. Abundances and feeding habits of Hippocampus coronatus in an eelgrass (*Zostera marina*) bed of Dongdae Bay, Korea. *Korean J Fish Aquat Sci* 50, 115-123. <https://doi.org/10.3796/KSFT.2014.50.2.115>.
- Jang JH, Lee C, Kim SC, Chung JW and Park CI. 2010. Protective Effect of Marine Natural Products against UVB-induced Damages in Human Skin Fibroblast via Antioxidant Mechanism. *J Soc Cosmet Scientists of Korea* 36, 1.
- Kang KW, Kang JY, Jeong MJ, Kim HJ, Sun SH and Jang IS. 2018. The Effect of Cheonmagudeung-eum for Hypertension: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Int Korean Med* 39, 22-43. <https://doi.org/10.22246/jikm.2018.39.1.22>.
- Kang NL, Kim SY, Rho S, Ko JY and Jeon YJ. 2017. Anti-fatigue activity of a mixture of seahorse (*Hippocampus abdominalis*) hydrolysate and red ginseng. *Korean J Fish Aquat Sci* 20, 3. <https://doi.org/10.1186/s41240-017-0048-x>.
- Kim HS, Je JG, Ryu BM, Kang NL, Fernando IPS, Jayawardena TU, Sanjeeva KKA, Oh JY and Jeon YJ. 2018. Antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from Hippocampus abdominalis. *Eur Food Res Technol* 245, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3179-0>.
- Kim HS, Shin BO, Kim SY, Wang L, Lee WW, Kim YT, Rho S, Cho MJ and Jeon YJ. 2016. Antioxidant activity of pepsin hydrolysate derived from edible Hippocampus abdominalis in vitro and in zebrafish models. *Korean J Fish Aquat Sci* 49, 445-453. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2016.0445>.
- Kim KH, Jeong MH, Park JC, Park OY, Kim NH, Lee SU, Ahn YK, Cho JG, Park JC, Choi KS, Kim JW and Kang JC. 2000. The comparison among low and high doses of imidapril, and combined imidapril with losartan in patients with ischemic heart failure after coronary intervention. *Korean Circ J* 30, 965-972. <https://doi.org/10.4070/kcj.2000.30.8.965>.
- Ko JY, Qiang W, Lee SY, Bathige SDNK, Oh MY and Lee JH. 2015. Characterization of Mitochondrial Heat Shock Protein 75 (mtHSP75) of the Big-belly Seahorse *Hippocampus abdominalis*. *Korean J Fish Aquat Sci* 48, 354-361. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2015.0354>.
- Ko JY, Kang NL, Lee JH, Kim JS, Kim WS, Park SJ, Kim YT and Jeon YJ. 2016. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from an enzymatic hydrolysate of flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) muscle as a potent anti-hypertensive agent. *Process Biochem* 51, 535-541. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.01.009>.
- Ko SC, Kang SM, Ahn GN, Yang HP, Kim KN and Jeon YJ. 2010. Antioxidant Activity of Enzymatic Extracts from *Sargassum coreanum*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39, 4. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2010.39.4.494>.
- Ko SC, Kang NL, Kim EA, Kang MC, Lee SH, Kang SM, Lee JB, Jeon BT, Kim SK, Park SJ, Park PJ, Jung WK, Kim DK 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. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.015>.
- Kwon SC, Choi GH, Hwang JH and Lee KH. 2010. Physico-chemical Property and Antioxidative Activity of Hot-Water Extracts from Enzyme Hydrolysate of *Astragalus membranaceus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39, 3. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2010.39.3.406>.

- Matsui T, Yukiyoishi A, Doi S, Sugimoto H, Yamada H and Matsumoto K. 2002. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 80-86. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(01\)00198-X](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(01)00198-X).
- Lee SE, Seong NS, Bang JK, Park CG, Sung JS and Song J. 2003. Antioxidative activities of Korean medicinal plants. *Korean J Med Crop Sci* 11, 127-134.
- Seog HM, Seo MS, Kim HM, Ahn MS and Lee YT. 2002. Antioxidative activity of barley polyphenol extract (BPE) separated from pearling by-products. *Korean J Food Sci Technol* 34, 889-892.
- Wang L, Jo MJ, Katagiri R, Harata K, Ohta M, Ogawa A, Kamagai M, Ishida Y, Tanoue S, Kimura S, Lee SC and Jeon YJ. 2018. Antioxidant effects of citrus pomace extracts processed by super-heated steam. *LWT-Food Sci Technol* 90, 331-338. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.024>.
- Wang L, Park YJ, Oh JY, Fernando I.P.S, Sanjeewa K.K.A, Kang MC, Cui YR, Lee HG, Ko JY, Lee WW and Jeon YJ. 2018. Protective Effects of Enzyme-assistant Extracts of *Sargassum fulvellum* against AAPH-induced Oxidative Stress in vitro in Vero Cells. *J Chitin Chitosan* 23, 113-119. <http://dx.doi.org/10.17642/jcc.23.2.7>.