

## Examination of Antioxidant and Immune-enhancing Functional Substances in Fermented Sea Cucumber

Sam Woong Kim<sup>1</sup>, Ga-Hee Kim<sup>2</sup>, Beom Cheol Kim<sup>3</sup>, Lee Yu Bin<sup>2</sup>, Lee Ga Bin<sup>2</sup>, Sang Wan Gal<sup>2</sup>, Chul Ho Kim<sup>2</sup>, Woo Young Bang<sup>4</sup> and Kyu Ho Bang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>FARMIMs Co., Ltd., 55, Dongjin-ro, Jinju-si, Gyeongsangnam-do 52725, Korea

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Korea

<sup>3</sup>Kainen Co., Ltd., 79-3 beon-gil, Murim-ro, Idong-myeon, Namhae-gun, Gyeongsangnam-do 52430, Korea

<sup>4</sup>Biodiversity Research and Cooperation Division, National Institute of Biological Resources (NIBR), Environmental Research Complex, Incheon 22689, Korea

Received June 3, 2024 / Revised June 17, 2024 / Accepted June 18, 2024

Sea cucumbers contain more than 50% protein in their solid content, and they also possess various bioactive substances such as saponins and mucopolysaccharides. This study analyzed the activities of various enzymes derived from *Bacillus* and lactic acid bacteria and determined to degrade the components of sea cucumbers. Among the analyzed strains, *B. subtilis* K26 showed the highest activities in protease and xylanase and relatively high activity in cellulase. Accordingly, samples of sea cucumber and water were mixed in equal proportions, sterilized, and then fermented by inoculating them with *B. subtilis* K26. Following this, a higher amino acid content was observed between 1.5 and 7.5 hr, a lower residual solid content in this time, and a lesser fermentation odor. The saponin content in fermented sea cucumber powder extracted with butanol was measured to be 1.12 mg/g. The chondroitin sulfate content was evaluated to be 5.11 mg/g in raw sea cucumber. The total polyphenol content, flavonoid content, and antioxidant activities were 6.95 mg gallic acid equivalent/g, 3.69 mg quercetin equivalent/g, and 3.69 mg quercetin equivalent/g in raw sea cucumber, respectively. Moreover, the DNA damage protective effect of fermented sea cucumber extract was found to be concentration-dependent, with a very strong effect at very low concentrations. Overall, we suggest that sea cucumber fermented with *B. subtilis* K26 has a high potential as a food for inhibiting oxidation, enhancing immunity, and improving muscle function in the human body thanks to its high free amino acid content.

**Key words :** Antioxidant, DNA damage, fermentation, saponin, sea cucumber

### 서 론

해삼은 무척추동물로서 다양한 종류가 전 세계적으로 서식하고 있다. 그 중에서 한국 해양에서 주로 서식하는 종은 청해삼(*Apostichopus japonicus*) 종류이며, 이외에도 흑해삼 및 홍해삼 등이 나타나고 있지만, 이들은 동일 종(species)에 포함되는 해삼 자원이다[2, 3]. 최근에는 홍해삼의 사포닌 함량이 높고 맛과 향의 우수함이 알려지면서 생산량이 증가되고 있는 추세이다[3, 12]. 해

삼의 주 소비층은 중국에서 형성되며, 국내에서 생산된 대부분의 해삼은 건조 또는 염장을 통해 중국으로 수출되고 있는 경향이다. 최근, 조미 소재로 활용되는 경향성이 일부 보이지만, 산업적 규모로 성장하기에는 아직 국내 생산량이나 국제적인 생산량이 매우 부족한 여건이다.

해삼의 구성 성분은 90% 이상이 수분으로 구성되며, 고형분의 50% 이상이 단백질로 구성되어 있다[9]. 해삼 단백질을 구성하는 주성분은 골격을 형성하는 콜라겐이며, 기타 신체의 기능성을 유지하는 것 등으로 구성된다. 외부 점질성 특성을 나타내고 있는 물질은 콘드로이친 황산과 퍄코단 등이며, 지질은 다가불포화지방산이 높게 형성되어 있다[6, 7, 25]. 다른 한편으로, 해삼은 후천적 면역반응이 존재하지 않기 때문에, 선천적 면역반응체계로 구성되는 기능성 성분으로 구성되며, 사포닌, 페놀화합물, 항균 펩타이드 등이 그 역할을 수행한다[5,

#### \*Corresponding author

Tel : +82-55-772-3396, Fax : +82-55-772-3399

E-mail : [khsang0095@gnu.ac.kr](mailto:khsang0095@gnu.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.

11]. 또한, 펩타이드, 콘드로이친 황산, 사포닌 등은 항산화, 항암, 항고혈압, 항염증, 항비만 등의 추가적인 역할도 수행한다[5, 17, 19, 21].

현재 국내 해삼 양식업이 해삼 씨뿌림 사업용도로만 사용되고 있으며, 해삼의 육성은 대부분 연근해에서 자연적인 성장에 의해 생산되고 있다. 최근, 이와 같은 해삼 생산의 양상이 점차 인공 양식에 의해 생산하려는 흐름을 맞이하고 있다. 따라서 본 연구에서는 이와 같은 해삼 생산의 방향성에 따라 향후 대량생산에 따른 해삼의 단순 가공에서 벗어나 가공수산물로 이행되도록 발효해삼분말을 제조하였다. 제조된 발효해삼분말에 대해 총 페놀류, 항산화, 사포닌, DNA 손상보호실험을 수행하여 그 기능성을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

해삼은 남해 및 동해안에서 4-6월경에 직접 채취된 것을 구매하여 사용하였다. 구입된 해삼은 4°C와 20°C의 담수에 4시간 침지 한 후 내장을 제거하고 본 연구에 사용하였다. 본 연구에 사용된 분리대두단백 등은 동원식품에서 식품용으로 분류된 제품을 구매하여 실험에 사용하였다.

본 연구에 사용된 유산균은 *Lactiplantibacillus plantarum* KACC12404, *L. plantarum* K9, *L. plantarum* NIBR97, *L. plantarum* SSD8, *L. plantarum* SSDan7, *L. acidophilus* SSD9 등이다. 또한, 본 연구에 사용된 *Bacillus* 균주는 *B. velezensis* K10, *B. velezensis* KACC10334, *B. licheniformis* BL K12, *B. licheniformis* KCTC1030, *B. licheniformis* KCTC1659, *B. licheniformis* KCTC1831, *B. licheniformis* KCTC3056, *B. subtilis* K26, *B. subtilis* KACC10579, *B. subtilis* KACC14549, *B. subtilis* KACC15671, *B. subtilis* KACC15947 등이다. 유산균과 바실러스 균주들은 일반적인 배양을 위해 각각 MRS 액체/고체와 LB 액체/고체, 또는 자체 제조 산업용 배지에 의해 30°C 또는 37°C에서 배양되었다.

### 세포외 효소 활성 분석

전분의 분해 능력은 전분한천배지(0.3% beef extract, 1.0% soluble starch, 1.2% agar)에 7 mm 코르크보리로 punching하고 각 균주 배양액을 100 µl씩 투입한 후 적절한 배양온도에서 24시간 배양하였다. 배양 후 0.05 M iodine solution을 점적하여 노란색 환을 관찰하여 amylase의 활성으로 나타내었다.

Protein의 분해 능력은 nutrient gelatin 배지(0.3% Beef

extract (BD Difco, France), 0.5% Peptone (BD Difco, France), 12% Gelatin (WAKO, Japan))에 7 mm 코르크보리로 punching하고 각 균주 배양액을 100 µl씩 투입한 후 적절한 배양온도에서 24시간 배양하였다. 배양 후 0.05 M iodine solution을 점적하여 투명환을 관찰하여 protease의 활성으로 나타내었다.

Cellulose 분해 능력은 TY-CMC (0.5% trypton, 0.5% yeast extract, 0.1% CaCl<sub>2</sub>, 0.5% CMC (carboxymethyl cellulose), 1.5% agar)에 7 mm 코르크보리로 punching하고 각 균주 배양액을 100 µl씩 투입한 후 적절한 배양온도에서 24시간 배양하였다. 배양 후 1.0% congo red 염색액을 점적하여 노란색 환을 관찰하여 cellulase의 활성으로 나타내었다.

Xylan 분해 능력은 TY-xylan (0.5% trypton, 0.5% yeast ext, 0.1% CaCl<sub>2</sub>, 0.5% xylan, 1.5% agar)에 7 mm 코르크보리로 punching하고 각 균주 배양액을 100 µl씩 투입한 후 적절한 배양온도에서 24시간 배양하였다. 배양 후 1.0% congo red 염색액을 점적하여 노란색 환을 관찰하여 xylanase의 활성으로 나타내었다.

### 바실러스 균주의 배양 및 해삼 발효 조건

바실러스 균주 배양 배지는 1.0% 미강, 1.0% 대두박, 0.025% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% KCl를 제조한 후에 121°C에서 15분 또는 100°C에서 1시간 멸균하여 사용하였다. 바실러스 균주의 배양은 각 온도에서 120 rpm으로 진탕하면서 주어진 시간 동안 배양하였다.

해삼발효는 해삼 25 g와 정제수 25 ml를 혼합하여 100°C에서 1시간 멸균한 후에 *B. subtilis* K26을 1% 접종하고 30°C에서 시간 별로 관찰하여 발효 조건을 확립하였다.

### 사포닌 부분 정제 및 분석

사포닌의 부분정제 및 분석은 Bahrami 등의 방법에 따라 실시하였다[1]. 생해삼과 증류수를 동량으로 *B. subtilis* K26으로 발효된 발효해삼분말 40 g은 400 ml 70% 에탄올을 첨가하여 실온에서 1시간 진탕한 후에 용액을 회수하였고, 4회 반복하여 추출을 실시하였다. 추출액은 Whatman No.1 필터페이퍼(GE Healthcare UK)로 여과하고 진공 농축하여 에탄올을 제거하였다. 처리된 용액은 동일 양의 부탄올(Duksan General Science, Korea), 과 혼합하여 16시간 동안 상분리를 실시하였다. 분리된 물층은 적절하게 농축하여 최종 50% 메탄올 용액(Duksan General Science, Korea)에 현탁하였다.

처리된 추출물은 적절한 양으로 TLC (Silica gel 60 F254 aluminium sheets (Merck 1.05554.0001, Darmstadt, Germany))에 점적하여 클로로포름:메탄올:증류수(7:13:8;

Duksan General Science, Korea)의 전개 용매에 의해 사포닌이 분리되었다. 발색은 15% sulfuric acid(Duksan General Science, Korea)로 분무 후에 110°C에서 15분 동안 열처리하여 UV light (UV hand lamp, Labcampus, Korea)에 의해 발색을 확인하였다. 사포닌의 표준품은 sigma-aldrich의 saponin (Sigma-Aldrich, Korea)을 구입하여 사용하였다.

### Chondrochin sulfate 분석

Chondrochin sulfate 함량 분석을 위한 DMMB (Dimethylmethylene Blue, Sigma-Aldrich, Korea) 용액은 16 mg DMMB, 3.04 g glycine, 1.6 g NaCl, 95 ml 0.1 M acetic acid를 첨가하여 1 l로 용해하였다. 이 용액의 pH는 약 3.0이며, Whatman 3MM으로 여과 또는 0.45 µm filter 여과를 통해 제조하였다. Chondroitin 4 sulfate 표준품 제조는 증류수에 500 µg/ml로 제조하여 표준곡선 형성을 위해 microtiter plate에 0, 5.7, 11.4, 22.7, 34.1, 45.5 µg/ml를 사용하였다. 발효 샘플 안에 chondrochin sulfate 함량을 분석하기 위해 총 220 µl 반응액 중에서 20 µl 이내에서 원액 또는 적절하게 희석하여 사용하였다. 샘플을 microtiter plate에 최종 20 µl가 되게 첨가한 후에 200 µl DMMB 용액을 첨가하여 5초간 진탕하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 표준품의 표준 곡선에 준하여 chondrochin sulfate 함량을 계산하였다.

### 총 페놀화합물, 총 플라보노이드 및 항산화 활성 분석

총 페놀함량은 Folin-danis 방법을 약간 변형하여 사용하였다[18, 23]. 즉, 원래 방법에서 microtiter plate에 적합하도록 1/10로 전체 양을 축소하여 분석을 실시하였다. 반응액 조성은 10 µl FCR (Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 2 N, Sigma-Aldrich, Korea), 30 µl 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 160 µl 샘플 및 증류수를 첨가하여 실온에서 2시간 방치한 후에 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid (Sigma-Aldrich, Korea)로 표준곡선을 작성하고, 이 검량선에 따라 총 페놀함량을 측정하였다.

총 플라보노이드 함량은 염화알루미늄법을 microtiter plate에 적합하도록 1/10로 전체 양을 축소하여 분석을 실시하였다[13, 18]. 60 µl 95% 에탄올, 4 µl 10% aluminium chloride, 4 µl 1 M potassium acetate을 첨가하고, 샘플 및 증류수를 최종 200 µl가 되도록 조정하여 첨가하였다. 반응액은 실온에서 30분간 반응한 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였고, quercetin (Sigma-Aldrich, Korea)을 표준품으로 하여 검량선을 작성한 후에 샘플의 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

항산화활성은 시료의 free radical 소거 활성을 Singh와

Rajini의 방법을 변형하여 free radical인 DPPH (Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 대한 환원력으로 측정하였다 [20]. 100 µl 0.2 mM DPPH와 100 µl 샘플 현탁액을 첨가하여 실온에서 30분간 반응하였다. 반응된 시료는 517 nm에서 흡광도를 측정 후, ascorbic acid로 작성된 표준 검량선에 의해 항산화활성을 평가하였다.

### DNA 손상 보호효과

Plasmid pMMP365는 plasmid DNA prep kit (Bioneer, Korea)에 의해 분리 및 정제하여 100 ng/µl로 조정하였다. 하이드록실 라디칼에 대한 supercoiled plasmid DNA 가닥 손상에 대한 발효해삼에 의한 억제에 DNA nicking assay를 사용하여 추정되었다[8]. 반응 혼합물은 2 µl 100 ng/µl DNA, 2 µl 1 mM hydrogen peroxide, 2 µl 1 mM iron (II) sulfate, 샘플 및 PBS 완충액(pH 7.4)으로 최종 20 µl로 조정하였다. 혼합물을 37°C에서 30분 동안 반응한 후, 로딩 완충액(50% 글리세롤(v/v), 40 mM EDTA 및 0.05% bromophenol blue) 4 µl를 첨가하여 반응을 중단시키고 반응 혼합물을 100 V 조건에서 20분 동안 1% 아가로오스 겔에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, 겔은 GreenStar™ Nucleic Acid Staining Solution I (Bioneer, Korea)으로 염색한 다음 UV transilluminator에서 염색된 band를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주 별 세포 외 고분자 분해 효소 활성

해삼은 수온이 24°C 이상일 경우에는 여름잠을 자기 때문에 우리나라의 경우에 7-8월에는 성장이나 수확이 불가능한 것으로 나타난다. 그리고 이 시기 이후 한 동안 고갈된 영양분을 보충하는 시기가 필요하여 실질적으로 해삼의 수확 시기는 1-6월에 집중된 것으로 보인다. 생해삼은 91.2% 수분, 4.4% 단백질, 0.3% 지방, 3.3% 회분, 0.8% 탄수화물 등으로 구성되어 있다[9]. 다른 한편으로 건해삼은 56-62% 단백질, 1.4-1.93% 지방, 0.71-0.96% 탄수화물, 30-33% 조회분 등으로 나타난다. 그러나 이런 체내 성분은 수확시기 및 지역에 따른 편차가 존재하는 것으로 판단된다.

발효해삼 액을 제조하기 위해 세포 외 효소 활성을 분석하였다. 가장 우선적으로 해삼 고형분의 50% 이상을 차지하는 단백질을 분해하기 위해서는 protease 활성이 강한 균주가 선발대상 균주이다. 그 외 부가적인 성분의 분해에 필요한 효소들의 활성을 분석하기 위해 amylase, cellulase, xylanase 등의 활성을 비교 분석하였다. Protease 활성이 가장 우수한 균주는 *B. subtilis* K26이었으

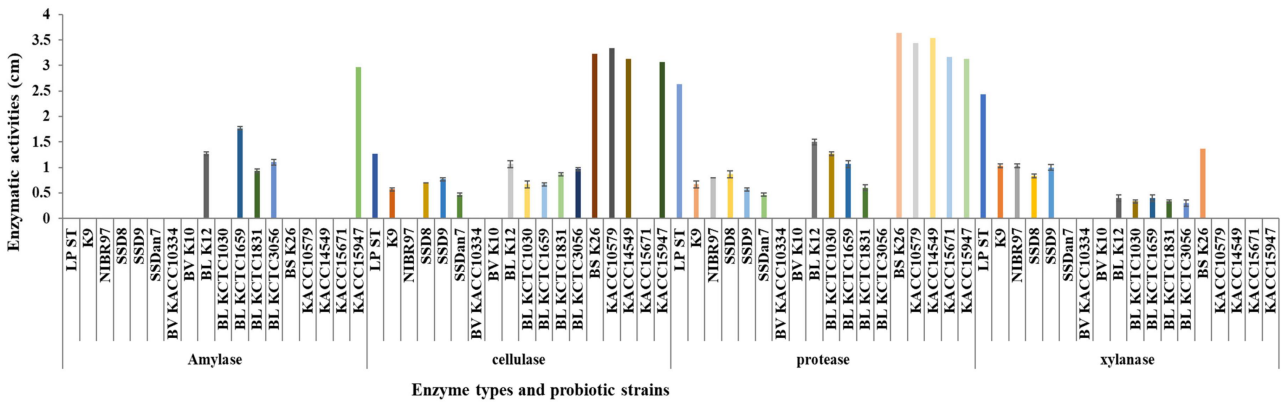


Fig. 1. Evaluation of activities for extracellular enzyme of potential probiotics. Each bacterium was cultured for 24 hr at 37°C by the indicated media, and then the clear or yellow zones were measured for the enzymatic activities. LP ST, K9, NIBR97, SSD8, SSDan7; *L. plantarum*, BV; *B. velezensis*, BL; *B. licheniformis*, BS K26 and KACCs; *B. subtilis*.

며, 나머지 *B. subtilis* 표준균주들도 protease 활성이 우수한 것으로 평가되었다(Fig. 1). 이들 균주들은 모두 청국장, 간장, 된장 등에서 분리되었기 때문에 본 효소의 활성이 다른 균주들에 비해서 강력한 것으로 추정되었다. 또한, *B. subtilis* K26은 cellulase와 xylanase 활성이 강력한 것으로 나타났다. 그러나 amylase 활성은 감지되지 않았다. 효소식품은 식품에 효소를 첨가하거나 미생물의 발효를 통하여 효소활성을 강화하여 음식물의 분해를 촉진시켜 소화능력을 개선하여 영양성분의 흡수를 촉진하는 건강기능식품으로 개발될 수 있다[15]. 현재는 *Bacillus* 속을 포함한 다양한 미생물을 활용한 효소식품 개발 연구가 진행 중이며, 효소 생산 고초균(*Bacillus subtilis*)을 활용한 프로바이오틱스 균주 개발 연구도 활발하게 진행되고 있다. 따라서 protease 활성이 강력한 *B. subtilis* K26을 발효해삼 제조에 사용하였으며, 대조군으로써 *B. subtilis* 표준 균주 중에서 protease 활성이 *B. subtilis* K26과 유사한 *B. subtilis* KACCI4549를 참조 균주로 활용하여 다음 실험을 실시하였다. *B. subtilis* KACC 14549는 대한민국 용인시 소재 전통 콩 발효 페이스트로부터 분리된 균주이다.

**발효 해삼 특성**

해삼은 생육조건에 따른 수분함량이 80.2-91.5%로 비교적 수분함량이 높은 해양무척추동물이다[16]. 따라서 채취된 해삼은 비교적 단시간 내에 미생물의 작용을 받아 분해가 진행되기 때문에 보관이나 취급이 매우 불편하다. 해삼의 장내미생물에 대한 메타게놈믹스 분석 결과(unpublished data), 87%가 no hit인 것으로 나타났으며, 확립된 미생물 중에서 Firmicutes와 Proteobacteria가 우점하는 것은 일반적인 경향과 동일하였다. 속(genus) 수준에서 볼 때, *Bacillus*, *Clostridium*, *Acinetobacter* 등이

우점 속으로 나타났다. 높은 수분함량과 *Bacillus* 및 *Clostridium*의 높은 점유율은 해삼이 쉽게 변질되는 특성과 연관성이 있는 것으로 추정된다. 그러나 장내 점유율은 계절적인 환경에 따라 변화가 발생되며, 봄과 여름에는 Cyanobacteria와 Firmicutes가 상승되는 반면에, 가을과 여름에는 Proteobacteria가 상승되는 경향성을 보였다[4].

본 연구에서도 해삼을 열처리 후 실온에서 48시간 이상 보관할 때, 일부 변질이 유발되는 것이 관찰되었다. 이와 같은 현상은 해삼 장 내에 *Bacillus*, *Clostridium* 등과 같은 포자형성균들의 높은 점유율에 기인되는 것으로 추정되었다. 따라서 해삼의 내장 제거 시 미생물이 해삼의 타 조직으로 전이되지 않도록 내장 제거 즉시 냉동 보관을 실시하였다. 다른 한편으로 해삼을 추출하여 항균활성을 분석해 본 결과, *E. coli* 10<sup>4</sup> CFU/ml 정도에서 항균활성이 관찰되었다(data not shown). 일반적으로 대상 균주는 10<sup>6</sup> CFU/ml로 분석을 실시하기 때문에 해삼은 사포닌, 올리고펩타이드, 유리아미노산 등의 생리활성물질에 의해 약한 항균 활성이 있는 것으로 추정되었다.

해삼은 수분을 제외하고, 약 50% 내외가 단백질로 구성되어 있기 때문에 미생물 발효 시 이취가 심하게 발생할 수 있다. 해삼 특유의 냄새와 발효에서 나타나는 이취가 병합되어 식품으로 활용하기 쉽지 않은 것이 일반적인 양상이다. 따라서 해삼 발효 산업에 있어서 이 발효취를 감소하거나 마스킹 하는 것이 매우 중요한 문제이다. 따라서 발효취가 최소화하면서 암모니아까지 완전 분해가 진행되지 않는 조건을 설정하기 위해 우선적으로 반응 온도 별로 분해 실험을 실시하였다. 그 결과 37°C에서는 매우 빠르게 반응이 진행되어 이취를 제어하는 것이 매우 어려웠다(data not shown). 다른 한편으

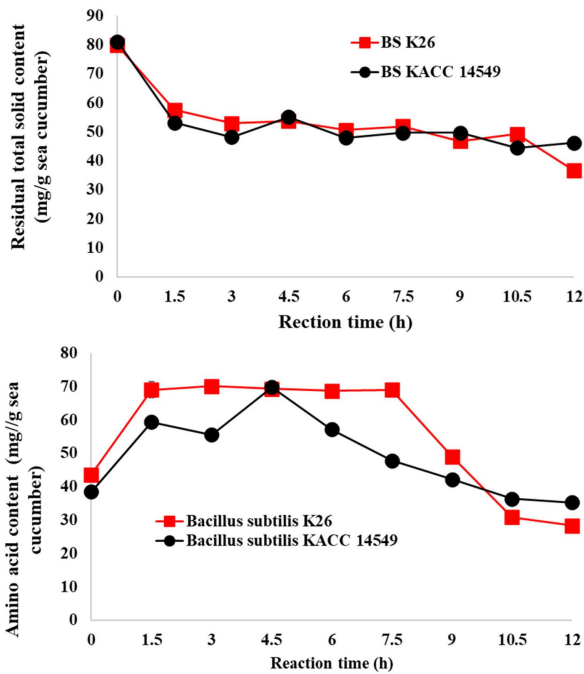


Fig. 2. Fermentation of sea cucumber depending on fermentative time. Raw sea cucumber was crushed by a mixer, suspended with water of the same volume, and then treated for 15 min at 121°C. The solution was inoculated with 1.0% *B. subtilis* K26, and then reacted for the indicated time at 30°C.

로 25°C에서는 반응이 매우 느리게 진행되는 것으로 나타났기 때문에 경제성이 낮은 것으로 분석되었다. 따라서 적절한 반응속도와 경제성이 있는 30°C가 발효 조건으로 설정되었다. 설정된 발효온도에서 발효 시간에 따른 잔류고형분과 잔존아미노산을 분석해 본 결과, Fig. 2와 같이 나타났다. 잔류 고형분, 잔존아미노산 및 발효취를 비교 분석한 결과, 4.5시간 동안 발효하는 것이 가장 적합한 것으로 판단되었다. 또한, 참조균주인 *B. subtilis* KACC14549도 유사한 경향성을 보였다. 따라서 이후 연구에서는 30°C에서 4.5시간 발효에 의해 실시하였다.

**기능성 성분 분석 및 항산화 활성**

해삼이 보유하고 있는 기능성 성분들은 유리아미노산, 사포닌, 콘드로이친황산, 페놀류, 플라보노이드류 등이다. 유리아미노산 및 올리고아미노산류 들은 항균 및 항산화 효과가 있는 것이 잘 알려져 있다[14]. 사포닌, 콘드로이친 황산, 페놀류, 플라보노이드류 등은 항산화 및 면역능력 개선 효과가 있는 것으로 잘 알려져 있다 [6]. 따라서 발효해삼 용액에 이들 성분의 함유량은 기능성 식품으로써 중요한 요소가 된다.

사포닌의 분석 결과 Fig. 3에서 보여지는 바와 같이 1.12 mg/g 생해삼으로 나타났다. 본 결과는 백해삼, 청해삼 및 홍해삼에서 0.28, 0.47, 0.50 mg/g 생해삼으로 나타난 결과에 비교하여 약간 높은 값으로 나타났다[22]. 콘

strain	time	smell	Sensory evaluation
BS K26	0	++	A damped sea water smell
	1.5	+	A grilled fishy smell
	3	+	A damped grilled fishy smell
	4.5	+	A damped grilled fishy and salty smell
	6	+	A delicious salty and damped sea water smell
	7.5	+	A shell and fishy smell
	9	+	The fishy smell of a sewer and a slightly sour smell
	10.5	+	The stale smell of the sewer, the fishy smell, the slight smell of carbonation
	12	+	The stale smell of the sewer and the fishy smell
	BS KACC 14549	0	+
1.5		++	A damped sea water smell, shell and fishy smell
3		+	A damped sea water smell and shell smell
4.5		+	A damped salty smell and fishy smell
6		+	the fishy smell of a sewer and salty smell
7.5		+	Shell-smell and fishy smell (almost no smell)
9		+	a fishy smell mixed with the sea and sewers
10.5		+	A damped sea water smell, shell and fishy smell
12		+	Shell-smell and fishy smell
6		+	The smell of sea fishy smell and seaweed soup
12		++	a pungent smell



Fig. 3. Saponin content of sea cucumber. The saponin was partially purified by butanol extraction. The partially purified saponins were loaded onto TLC plate, and then separated with the running solution. The saponin staining was developed by 15% sulfuric acid and for 15 min 110°C. The developed spot was detected by a UV hand lamp.

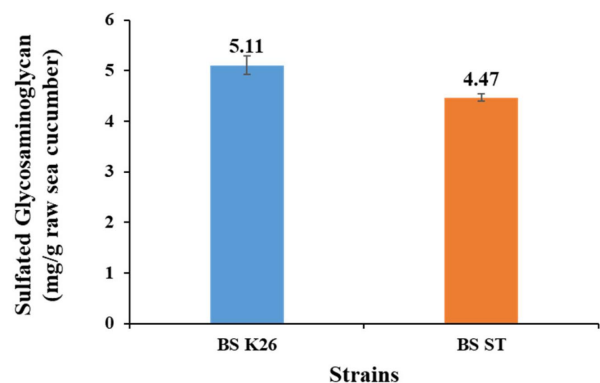


Fig. 4. Assay of condroichin sulfate content. The fermented solution was mixed with DMMB solution, and then measured at 525 nm with a microtiter reader. The condroichin sulfate content in the sample was evaluated by a standard curve prepared with bovine chondroitin 4-sulfate.

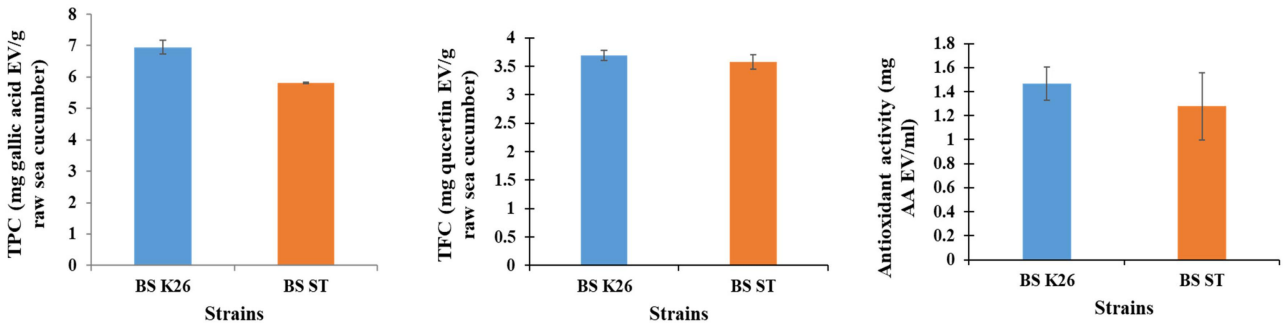


Fig. 5. Evaluations of total polyphenolic content (TPC), flavonoid content (TFC), and antioxidative activity. The raw sea cucumber was fermented with *B. subtilis* K26, and then applied for TPC, TFC, and antioxidative activity. TPC, TFC, and antioxidative activity were indicated by equivalent contents of gallic acid, quercetin, and ascorbic acid (AA), respectively.

드로이친 황산의 분석결과, Fig. 4에서 보여지는 바와 같이 5.11 mg/g 생해삼의 함량으로 분석되었다. 참조균인 *B. subtilis* KACC14549보다 약간 높은 값으로 나타났다. 즉, *B. subtilis* K26은 참조균인 *B. subtilis* KACC14549 콘드로이친 황산의 가용화가 보다 우수한 것으로 평가되었다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 6.95 mg gallic acid/g raw sea cucumber 및 3.69 mg quercetin/g raw sea cucumber으로 각각 나타났다(Fig. 5). 이들 값은 표준군주에 비교 시 약간 높은 경향성을 보였으며, 특히, 총 폴리페놀 함량이 보다 높게 나타나는 것으로 관찰되었다. 항산화활성은 0.59 mg ascorbic acid/g sea cucumber로써 또한, 표준군주에서 유래된 값보다 약간 높게 형성되었다. 이와 같은 결과 항산화 값이 *B. subtilis* K26에서 표준군주보다 높게 형성되는 것은 발효과정에서 유리되는 총 폴리페놀 함량, 유리 아미노산 및 기타 당류와 연관

성이 있는 것으로 추정되었다[6].

### DNA 손상 보호 효과 분석

Plasmid pMMP365 T-easy vector (Promega, USA)는 *Bacillus licheniformis* protease 유전자 382 bps가 클로닝되어 있는 총 3.8 kbps의 plasmid이다. DNA 손상 보호효과를 관찰하기 위해 4.5시간 동안 발효된 용액으로 분석을 실시하였다. 분석결과, Fig. 6과 같이 나타났다. Plasmid pMMP365은 무처리 DNA 샘플에 대해 covalently closed circular (CCC) 및 concatemer 형태인 각각 하단 및 상단 DNA band로 나타나고 있다. 그러나 hydrogen peroxide와 iron (II) sulfate에 의해 유발된 hydroxyl radical은 이 두 형태를 모두 변형시키는 것으로 나타났다[24]. Radical 발생 용액만으로 처리된 DNA에서 하단 band는 위치상 linear DNA인 것으로 판단되며, 상단에 나타나는 것은 open circular DNA로 추정되었다.

발효해삼액으로 처리할 때 대부분의 DNA는 radical 발생 용액만으로 처리된 DNA와 비교하여 band의 이동이 관찰되었다. 적은 양 (1  $\mu$ l)으로도 대부분의 DNA band가 이동되었고, linear DNA는 소량으로 나타났다. 따라서 대부분의 DNA는 발효해삼 1-2.5  $\mu$ l 사이의 용액이 첨가될 때 hydroxyl radical로부터 보호받는 것으로 추정된다. 발효해삼 샘플로 처리된 용액에서 concatemer band의 위치는 변화가 관찰되지 않지만, 하단의 CCC 형태의 band는 pMMP365 무처리 샘플에 비교하여 이동거리가 짧아지는 것으로 나타났다. 이 현상은 radical solution과 발효해삼 용액에 의해 유발되는 각종 염류들에 의해 이동속도에 변화가 발생한 것으로 추정된다. *Bacillus cereus* 및 *Phellinus baumii* 등의 exopolysaccharides는 항산화와 DNA damage에 대한 보호효과가 있는 것으로 나타났다[10, 24]. 따라서 본 연구에서 도출된 항산화 효과가 강력한 물질들도 또한, DNA 손상 보호효과가 충분히 유도할 수 있는 것으로 제외된다.

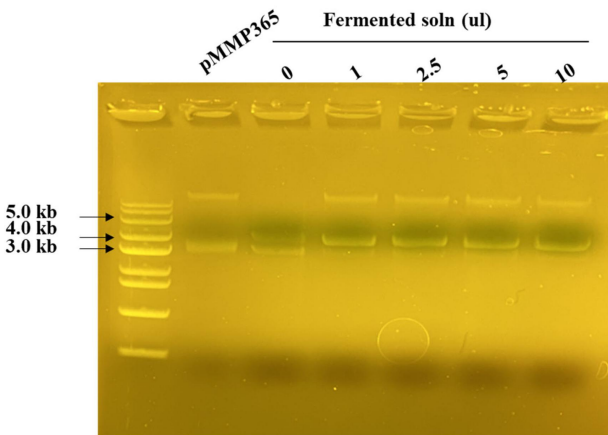


Fig. 6. DNA damage protection with the fermented solution. The raw sea cucumber was fermented for 4.5 hr with *B. subtilis* K26, and then applied for DNA damage protection assay. The radical for DNA damage was produced by hydrogen peroxide and iron (II) sulfate.

이상의 결과를 종합해 보면, 발효해삼 용액에는 유리 아미노산, 사포닌, chondrochin sulfate, total phenolic content, total flavonoid content 등이 풍부하게 유지되어 있어 항산화 효과가 높은 것으로 나타나며, 또한, 이들 성분에 의해 DNA 손상 보호 효과가 우수한 것으로 제의된다. 또한, 이들 성분은 근육관련 건강기능식품에 있어서 필수적인 요소들이 될 수 있기 때문에 향후에 발효해삼 유래 성분들의 세포 및 동물수준에서 기능성 입증에 대한 추가 연구가 추진되어야 할 것으로 제의된다.

### 감사의 글

본 논문은 2024년 경상국립대학교 교육연구학생지도비 학술연구트랙 지원금으로 수행하였습니다.

### The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

### References

- Bahrami, Y., Zhang, W. M. M. and Franco, C. 2018. Distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria lessona*; the body wall versus the viscera, and their biological activities. *Mar. Drugs*. **16**, 423.
- Choe, S. and Oshima, Y. 1961. On the morphological and ecological differences between two commercial forms, 'green' and 'red', of the Japanese common sea cucumber, *Stichopus japonicus* SELENKA. *Nippon Suisan Gakk.* **27**, 97-105.
- Choo, P. S. 2008. Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Asia. *Sea Cucumbers. A Glob. Rev. Fish. Trade* **516**, 81-118.
- Deng, B., Ru, X., Wang, T., Zhang, C., Sun, W., Lu, S. and Zhang L. 2022. Seasonal variations in microbial diversity and metabolite profiles of the gut of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Front. Mar. Sci.* **03**, 2022.
- Hossain, A., Dave, D. and Shahidi, F. 2020. Northern sea cucumber (*Cucumaria frondosa*): A potential candidate for functional food, nutraceutical, and pharmaceutical sector. *Mar. Drugs* **18**, 274.
- Hossain, A., Dave, D. and Shahidi, F. 2022. Antioxidant potential of sea cucumbers and their beneficial effects on human health. *Mar. Drugs* **20**, 521.
- Hossain, A., Dave, D., and Shahidi, F. 2023. Sulfated polysaccharides in sea cucumbers and their biological properties: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **253**, 127329.
- Jeong, J. B., Park, J. H., Lee, H. K., Ju, S. Y., Hong, S. C., Lee, J. R., Chung G. Y., Lim J. H. and Jeong H. J. 2009. Protective effect of the extracts from *Cnidium oolicinale* against oxidative damage induced by hydrogen peroxide via antioxidant effect. *Food Chem. Toxicol.* **47**, 525-529.
- Jiang, S., Dong, S., Gao, Q., Wang, F. and Tian, X. 2013. Comparative study on nutrient composition and growth of green and red sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867), under the same culture conditions. *Aquac. Res.* **44**, 317-320.
- Jin, Q. L., Zhang, Z., Lv, G., Gai, W., Cheng, J., Wang, J. and Fan L. 2016. Antioxidant and DNA damage protecting potentials of polysaccharideextracted from *Phellinus baumii* using a delignification method. *Carbohydr. Polym.* **152**, 575-582.
- Joshi, R. K. 2023. Bioactive usual and unusual triterpenoids derived from natural sources used in traditional medicine. *Chem. Biodivers.* **20**, e202200853.
- Kan-no, M. and Kijima, A. 2003. Genetic differentiation among three color variants of Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Fish. Sci.* **69**, 806-812.
- Kim, E. J., Lee, H. J., Kim, H. J., Nam, H. S., Lee, M. K., Kim, H. Y., Lee, J. H., Kang, Y. S., Lee, J. O. and Kim, H. Y. 2005. Comparison of colorimetric methods for the determination of flavonoid in propolis extract products. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **37**, 918-921.
- Kim, S. W., Jeon, S. H., Bang, W. Y. and Kim I. S. 2019. Examination of antimicrobial peptides from *Serrognathus titanus* larvae. *Int. J. Adv. Res.* **7**, 96-100.
- Lee, J. H. and Moon, G. S. 2023. Development of functional material by using *Bacillus subtilis* harboring  $\alpha$ -amylase and protease enzyme activity. *Curr. Top. Lact. Acid Bact. Probiotics* **9**, 81-85
- Lee, M. H., Kim, Y. K., Moon, H. S., Kim, K. D., Kim, G. G., Cho, H. A., Yoon, N. Y., Sim, K. B., Park, H. Y. and Lee, D. S. 2012. Comparison on proximate composition and nutritional profile of red and black sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) from Ulleungdo (Island) and Dokdo (Island) *Food Sci. Biotechnol.* **21**, 1285-1291.
- Muhsin, M. F., Fujaya, Y., Hidayani, A. A., Fazhan, H., Wan Mahari, W. A., Lam, S. S., Shu-Chien, A. C., Wang, Y., Afiqah-Aleng, N., Rukminasari, N. and Waiho, K. 2023. Bridging the gap between sustainability and profitability: unveiling the untapped potential of sea cucumber viscera. *PeerJ.* **11**, e16252.
- Park, J. W., Lee, Y. J. and Yoon, S. 2007. Total flavonoids and phenolics in fermented soy products and their effects on antioxidant activities determined by different assays. *Kor. J. Food Culture* **22**, 350-358.
- Shou, Y., Feng, C., Lu, Q., Mao, X., Huang, H., Su, Z., Guo, H. and Huang, Z. 2023. Research progress on the chemical components and biological activities of sea cucumber polypeptides. *Front. Pharmacol.* **14**, 1290175.
- Singh, N. and Rajini, P. S. 2004. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chem.* **85**, 611-616.
- Tang, L., Xiao, M., Cai, S., Mou, H. and Li, D. 2023. Potential application of marine fucosyl-polysaccharides in regulating blood glucose and hyperglycemic complications.

- Foods* **12**, 2600.
22. Xing, L., Sun, L., Liu, S., Zhang, L., Sun, J. and Yang, H. 2021. Metabolomic analysis of white, green and purple morphs of sea cucumber *Apostichopus japonicus* during body color pigmentation process. *Comp. Biochem. Physiol. Part D: Genom. Proteom.* **39**, 100827.
23. Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., Dennis, D. A. and Barrow, C. J. 2006. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J. Appl. Phycol.* **18**, 445-450.
24. Zheng, L. P., Zou, T., Ma, Y. J., Wang, J. W. and Zhang, Y. Q. 2016. Antioxidant and DNA damage protecting activity of exopolysaccharides from the endophytic bacterium *Bacillus Cereus* SZ1. *Molecules* **21**, 174.
25. Zhukova, N. V. 2023. Fatty acids of Echinoderms: diversity, current applications and future opportunities. *Mar. Drugs* **21**, 21.

### 초록 : 발효해삼의 항산화 및 면역강화 기능성 물질의 분석

김삼웅<sup>1</sup> · 김가희<sup>2</sup> · 김범철<sup>3</sup> · 이유빈<sup>2</sup> · 이가빈<sup>2</sup> · 갈상완<sup>2</sup> · 김철호<sup>2</sup> · 방우영<sup>4</sup> · 방규호<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>㈜파미스, <sup>2</sup>경상국립대학교 제약공학과, <sup>3</sup>㈜카이넨, <sup>4</sup>국립생물자원관 생물다양성총괄과)

해삼은 고형분의 50% 이상이 단백질이며, 그 외 기능성 물질로써 사포닌, 뮤코다당류 등 다양한 생리활성 물질들을 보유하고 있다. 해삼 성분을 미생물의 효소로써 분해하기 위해 *Bacillus* 및 유산균 유래 각종 효소의 활성을 분석하였다. 분석된 균주 중에서, *B. subtilis* K26은 protease의 활성과 xylanase의 활성이 가장 높았으며, cellulase의 활성도 비교적 높은 것으로 나타났다. 따라서 해삼과 정제수를 동일 비율로 혼합하고 멸균한 후 *B. subtilis* K26를 접종하여 발효를 실시하였다. 그 결과 1.5-7.5시간에서 가장 높은 잔존 아미노산의 함량이 평가되었으며, 잔류고형분도 비교적 낮게 나타났고, 발효취도 적게 나타났다. 발효해삼분말을 부탄올로 추출하여 사포닌 함량을 측정한 결과 1.12 mg/g로 나타났다. Chondroichin sulfate 함량은 5.11 mg/g 생해삼으로 평가되었으며, 총 폴리페놀 함량은 6.95 mg gallic acid equivalent/g 생해삼, 총 플라보노이드 함량은 3.69 mg quercetin equivalent/g 생해삼 등으로 평가되었다. 발효해삼의 항산화효능은 0.59 mg ascorbic acid equivalent/g 생해삼으로 항산화능력이 우수한 것으로 평가되었다. 다른 한편으로 발효해삼액의 DNA 손상 보호효과는 발효액의 농도 의존적으로 생성되었으며, 매우 저 농도에서 매우 우수한 효과가 있는 것으로 평가되었다. 이상의 결과로 볼 때, 해삼발효액은 아미노산, 사포닌, 페놀류, 콘드로이친 황산, 플라보노이드류 등에 기인하여 우수한 항산화능력과 DNA 손상 방지능력이 있는 것으로 제의된다. 따라서, *B. subtilis* K26의 발효해삼액은 인체에 있어서 산화억제, 면역증강 및 근 개선 식품으로 가능성이 높은 것으로 추정된다.