



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

보라성게(*Anthocidaris crassispina*)의
알과 껍질 추출물의 항균활성 및 항산화
효과와 껍질의 열수추출물이 넙치의
비특이적 면역반응에 미치는 영향



濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

鄭智云

2015年 2月

보라성게(*Anthocidaris crassispina*)의
알과 껍질 추출물의 항균활성 및
항산화 효과와 성게껍질 열수추출물이
넙치의 비특이적 면역반응에 미치는
영향

指導教授 許文洙

鄭智云



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2015 年 2 月

朴昭炫의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 ___ 진 창 남 _____ (인)

委 員 ___ 김 만 철 _____ (인)

委 員 ___ 허 문 수 _____ (인)

濟州大學校 大學院

2015 年 2 月

Antibacterial, antioxidant effect of sea-urchin
(*Anthocidaris crassispina*) roe and shell extract
and the effect of the hot water extract of shell
on the non-specific immune responses in
Paralichthys olivaceus

Ji-Woon Jeong

(Supervised by professor Moon-Soo Heo)



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, 2015

목 차

목 차	i
List of Tables	iii
List of Figures	iv
Abstract	vi
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
2.1. 시료의 구입 및 추출	4
2.1.1. 시료의 구입	4
2.1.2. 성게알 및 껍질의 분말 제조	4
2.1.3. 성게알 및 성게껍질의 열수추출물 제조	4
2.1.4. 성게알 및 성게껍질의 유기용매 추출 및 분획물 제조	5
2.2. 성게알 및 성게껍질 추출물의 항균활성 확인	6
2.2.1. 항균실험 사용균주	6
2.2.2. 추출물의 항균활성 탐색	7
2.3. 성게알 및 성게껍질 추출물의 항산화 효과 확인	8
2.3.1. DPPH radical 소거활성 측정	8
2.3.2. Hydroxyl radical 소거활성 측정	9
2.4. 성게껍질 열수추출물의 첨가에 따른 양식 넙치의 비특이적 면역 반응	10
2.4.1. 실험어 사육관리	10
2.4.2. 실험사료 제작 및 투여	10
2.4.1 Respiratory burst activity 측정	11
2.4.2. 혈청 내 lysozyme activity 측정	11

III. 결과 및 고찰	12
3.1. 시료의 추출	12
3.1.2. 성게알 및 껍질의 열수추출물과 각 분획물의 수율	12
3.2. 성게알 및 성게껍질 추출물의 항균활성 확인	14
3.3. 성게알 및 성게껍질 추출물의 항산화 효과 확인	19
3.3.1. DPPH radical 소거활성 측정	19
3.3.2. Hydroxyl radical 소거활성 측정	23
3.4. 성게껍질 열수추출물의 첨가에 따른 양식 넙치의 비특이적 면역 반응 ..	27
3.4.1 Respiratory burst activity 측정	27
3.4.2. 혈청 내 lysozyme activity 측정	29
IV. 요약	31
V. 참고 문헌	32
VI. 감사의 글	38



List of tables

Table 1. List of strains and media for antibacterial experiments	6
Table 2. Yields (%) of various solvent fractions of <i>A. crassispina</i> 's egg	12
Table 3. Yields (%) of various solvent fractions of <i>A. crassispina</i> 's shell ..	13
Table 4. Antibacterial activity of various solvent of <i>A. crassispina</i> egg extract against fish pathogenic and human clinical bacteria	15
Table 5. Antibacterial activity of various solvent of <i>A. crassispina</i> shell extract against fish pathogenic bacteria and human clinical bacteria	17

List of figures

- Fig. 1. Radical scavenging activity of various extracts and concentration obtained *A. crassispina* egg 20
- Fig. 2. Radical scavenging activity of various extracts and concentration obtained *A. crassispina* shell 21
- Fig. 3. Radical scavenging activity of *A. crassispina* shell methylene chloride layer 1.7 mg/ml and ethyl acetate layer 3.8 mg/ml 22
- Fig. 4. Hydroxyl radical scavenging activity of various extracts and concentration obtained *A. crassispina* egg 24
- Fig 5. Hydroxyl radical scavenging activity of various extracts and concentration obtained *A. crassispina* shell 25
- Fig 6. Hydroxyl radical scavenging activity of *A. crassispina* shell methylene chloride layer 1.7 mg/ml and ethyl acetate layer 3.8 mg/ml 26
- Fig 7. NBT reduction of the olive flounder (*paralichthys olivaceus*) fed on *A. crassispina* shell hot water extract and commercial diet for 4 weeks 28
- Fig 8. Lysozyme activity in the serum from the olive flounder (*P. olivaceus*) fed on *A. crassispina* shell hot water extract and commercial diet for 4 weeks 30

Abstract

Side effects of synthetic antibiotics and antioxidants, natural antibacterial substances and antioxidants present in natural products, and their human impact are the major research topics conducted to date. Recently, a study on natural antibacterial substances and antioxidants are concentrated in bio-active compounds of marine source has produced a unique metabolism and specificity. Sea-urchin called as “haedam” in oriental medicine, known for its excellent physiological activity.

In this study, we use purple sea-urchin (*Anthocidaris crassispina*)'s shell and egg, was used to measured antimicrobial activity against human and fish bacterial pathogens, and its antioxidant activity. Also, we investigate effect of hot water extract of sea-urchin shell in the immune response of olive flounder and to check it's usage as feed additives.

Hence for the study, 8.3955 g of *A. crassispina* egg hot water extract, 2.009 g of *A. crassispina* shell hot water extract, 3.1344 g of *A. crassispina* egg hexane layer, 0.3199 g of *A. crassispina* egg methylene chloride (CH_2Cl_2) layer, 0.2998 g of *A. crassispina* egg ethyl acetate layer, 2.5713 g of *A. crassispina* egg aqueous layer, 0.517 g of *A. crassispina* shell hexane layer, 0.0085g of *A. crassispina* shell CH_2Cl_2 layer, 0.0153 g of *A. crassispina* shell ethyl acetate layer and 0.8838 g of *A. crassispina* shell aqueous layer were extracted.

Antibacterial activity of *A. crassispina* egg extracts were compared with that of *A. crassispina* shell extracts, which reveals that egg extracts were more effect than shell extracts. In DPPH radical scavenging activity, both egg and shell extracts show similar reducing activity but higher than that of control BHA and BHT. Especially, aqueous layer of egg extracts, hot water extract and ethyl acetate layer of shell's antioxidant activities were excellent in low concentration. In hydroxyl radical scavenging activity, also show

similar results with DPPH radical scavenging assay. However, hydroxyl radical scavenging activity of egg extracts is slightly higher than that of shell extracts.

As a result in in vivo test, the hot water extract of *A. crassispina* shell was showed that do not effect on the non-specific immune responses of the olive flounder. The reason for this result, the feed uptake of olive flounder is presumably due to low during the experiment period. Further studies are need to detailed analyses of sea-urchin shell extracts and to encouraging the isolating biologically more potential substance.

I. 서론

1990년대 이후 양식산업의 급격한 성장에 따라 질병에 의한 어류의 폐사량 역시 증가하고 있다. 양식산업에서 어류의 질병예방 및 치료를 위해 사용하는 가장 일반적인 방법으로는 항생제와 백신요법이 있다(Newman, 1993; Elder *et al.*, 1995). 항생제 요법의 경우, 질병의 치료를 위하여 페니실린계(Penicillins), 테트라사이클린계(Tetracyclines)와 퀴놀론계(Quinolones) 등의 항생제가 주로 사용되고 있으며(국립수산진흥원, 2000), 이러한 항생제의 오남용으로 인해 어류의 체내 잔류(Karunasagar *et al.*, 1994)와 항생제 내성균의 출현(Witte *et al.*, 1999)과 같은 문제를 일으킬 수 있다. 또한 최종 소비자인 사람의 체내에 항생제가 장기간 축적될 경우 인체에 유해한 내성균의 출현과 균교대증, 알러지 반응 유발 등의 안전성 문제가 제기 될 수 있다(Jang *et al.*, 2010).

천연물에 존재하는 항균성 물질의 개발에 관한 연구로는 계란이나 우유, 감자, 어류 등 식품 소재로부터 분리한 항균성 물질에 관한 연구(Hughey *et al.*, 1987; Beuchat *et al.*, 1989, Shin *et al.*, 1992)부터 향신료로부터 추출한 성분들의 항균활성에 대한 연구(Shelef *et al.*, 1980), 미생물의 대사산물인 bacteriocin, 지방산, 유기산 등의 항균활성(Mok *et al.*, 1998; Mok *et al.*, 1999; Okabe *et al.*, 2000), 한약재와 같은 천연식물의 약리작용 및 천연 항균성 물질의 탐색(Kwak *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1994; Mok *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1995) 등 다양한 연구가 수행되어져 왔다. 이러한 천연물에 포함된 항균활성 물질에 관한 연구는 식품에 존재하며 사람에게 유해한 세균들에 대한 항균효과에 대해서는 많이 보고가 되어 있으며, 양식어류에 질병을 일으키는 세균에 대한 항균효과에 대한 연구 또한 점차 증가하고 있다.

생체 내 산화촉진물질(prooxidant)과 산화억제물질(antioxidant)이 여러 가지 요인에 의해 균형이 무너지면 산화적 스트레스(oxidative stress)가 유발되어 잠재적인 세포손상이나 병리적 질환을 일으키게 된다(Haliwell *et al.*, 1991; Haliwell *et al.*, 1999). 이러한 산화적 스트레스의 직접적 원인이 되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)는 호흡을 하는 생물에서 필수적으로 생성되

는 부산물이다(Kim, 1999; Poli *et al.*, 1993; Punched *et al.*, 1996). ROS에서 유래되는 자유 라디칼은 비공유 전자를 갖고 있기 때문에 매우 불안정하고 반응력이 높다. 이 때문에 생체 내 물질과 쉽게 반응하며, 끊임없이 체내 분자를 공격하여 세포와 조직에 비가역적인 손상을 초래하거나 유전자의 돌연변이, 세포독성 및 암 등을 유발한다(Ito *et al.*, 1983; Min *et al.*, 2004). 이를 방지하기 위해 많은 천연, 합성 항산화 물질이 개발되어 왔으나, 효과와 경제성 및 안전성을 문제로 실제로 사용되는 것은 합성 항산화제인 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), 천연 항산화제인 tocopherol 정도이다. 그러나 합성 항산화제인 BHA과 BHT의 경우, 고농도로 투여 할 경우 간 비대증이 유발되거나 발암성을 나타내는 것으로 알려져 있다.(Brannen, 1975; Chan *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1983). Tocopherol의 경우, 효과가 낮고 가격이 높다는 결점이 있다(Cha *et al.*, 1998; Cha *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 1997). 이에 인체에 무해하고 항산화능이 우수한 천연 항산화제에 관한 연구가 계속 진행되고 있다.

최근 천연 항균물질 및 천연 항산화제에 관한 연구는 독특한 대사과정과 특이성을 갖는 해양생물이 생산하는 생리 활성 물질에 집중되고 있다. 그러나 미역, 다시마, 감태, 곰피 등의 해조류 등 흔히 접할 수 있는 생물에 대한 연구들은 많이 보고되고 있으나(Park *et al.*, 1998; Ryu *et al.*, 1989; Cho *et al.*, 1994; Cho *et al.*, 1994), 육상생물에 비해 그 결과가 적고 미흡한 실정이다.

성게(sea urchin)는 극피동물문(Phylum Echinodermata), 성게강(Class Echinoidea)에 속하며, 주로 연안에서 수심이 깊은 곳까지 서식한다. 전 세계에 약 900종이 분포하며, 한국에서는 약 30종이 서식하는 것으로 알려져 있으며, 갯녹음 현상의 원인 중 하나이다. 우리나라 연근해에서 서식하는 성게 중, 식용으로 이용되고 있는 성게는 보라성게(*Anthocidaris crassispina*), 말뚝성게(*Hemicentrotus pulcherrimus*), 분홍성게(*Pseudocentrotus depressus*), 북쪽 말뚝성게(*Strongylocentrotus imternmedius*) 등이다. 성게는 한의학에서 해담(海膽)이라고 부르며, 수분과 단백질, 지방, 비타민 B군, 비타민 C, 마그네슘 및 칼슘을 함유하고, 결핵, 거담 작용, 신경통에 효과가 있으며 알코올 해독작

용을 갖는다(Yu, 1999; Kim *et al.*, 2002).

그러나 성계의 식용으로 이용되는 생식소(알) 부위는 전체의 약 20% 뿐이며, 나머지 80%는 껍질로 구성되어 있다. 성계의 연간 평균 총생산량 2,500톤을 기준으로 했을 때, 이 중 약 2,000톤이 껍질이며, 이는 모두 폐자원으로 버려지고 있다. 난분해성인 껍질은 대부분 폐기된 그대로 방치되고, 그로 인해 새로운 환경문제가 되고 있다(Kim *et al.*, 2002).

성계에 대한 연구는 대부분 성계의 산란과 성장(Yoo *et al.*, 1982), 성분 및 생산, 가공에 관한 것이다(Nam, 1986; De la Cruz-Gracia *et al.*, 2000). 이 외에 성계를 이용한 서남해역 저질 오염 검정(Wui *et al.*, 1992) 및 해수의 생물학적 평가(Yu *et al.*, 1999)에 관한 연구가 있으나, 성계껍질에 관한 연구는 미흡한 편이다. 최근 일본의 한 기업에서 성계껍질로부터 칼슘을 분리하여 칼슘보조제를 생산하여 시판하고 있고, 비료첨가제로서의 이용 가능성에 대해 연구 중인 것으로 알려져 있다. 또한 성계껍질 추출물의 항당뇨 효과, 식품 유해 미생물에 대한 항균활성 효과, 성계껍질이 계육 및 계란의 품질에 미치는 영향 등 성계껍질의 유효성분 이용 가능성에 대해 검토하고 있으나(Kim *et al.*, 2011; Bae, 2004; Kim, 2005; Kim, 2005; Kim *et al.*, 2002), 구체적인 성계껍질의 활용에 관한 연구는 아직 미비한 실정이다.

본 연구는 해안지역 환경오염의 원인이 되고 있는 성계를 이용하여, 알과 껍질이 어류질병세균과 인체유해세균에 대해 갖는 항균 활성과 항산화 활성을 측정하였다. 또한 전량 폐기되고 있는 성계 껍질을 추출하여 사료에 첨가함으로써 환경 문제를 해결하고, 성계껍질 추출물을 첨가한 사료의 급여 시 나타나는 넙치의 면역 반응을 조사하여, 사료 첨가제로서의 응용 가능성을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

2. 1. 시료의 구입 및 추출

2. 1. 1. 시료의 구입

본 실험에 사용된 성게는 제주특별자치도 서귀포시 성산해역 인근에서 채취된 보라성게(*Anthocidaris crassispina*)로, 2014년 6월 24일에 알 2kg, 껍질 4kg을 구입하여 사용하였다.

2. 1. 2. 성게알 및 껍질의 분말 제조

성게껍질은 깨끗이 수세하여 통풍이 잘 되는 곳에서 48시간 동안 건조 및 정선하여 동결건조 하였다. 성게알은 수세 후 물기를 최소화한 후, 냉동시켜 동결 건조 하였다 (PVTED10A, Ilshinbiobase, Dongduchun, Korea). 동결건조 한 시료는 블렌더를 이용하여 마쇄한 후 분말로 제조하고, -80°C 에서 보관하여 사용하였다.

2. 1. 3. 성게알 및 성게껍질의 열수추출물 제조

진공 동결된 시료 100g에 시료량의 10배(w/v)인 멸균 증류수를 혼합하여 10°C 의 water bath에서 180분간 증탕한 후, 감압여과장치와 filter paper (110 mm, No. 5C, ADVANTEC, Japan) 이용하여 여과하였고, 3회 반복 추출하였다. 여과액은 회전식 진공 농축기로 감압 농축시킨 후, 동결 건조하여 분말형태로 제조하고, -80°C 에서 보관하여 실험에 사용하였다.

2. 1. 4. 성게알 및 성게껍질의 유기용매 추출 및 분획물 제조

진공 동결된 시료 100g과 시료량의 10배(w/v)인 80% ethyl alcohol을 가하여 실온에서 180분간 반응시킨 후, filter paper (110 mm, No. 5C, ADVANTEC, Japan)와 감압여과장치를 이용하여 여과하였고, 총 3회 반복 추출하였다. 여과액은 회전식 진공 농축기로 감압 농축시킨 후 동결건조 하였다. 성게껍질과 성게알의 80% EtOH 추출물을 얻은 후 용매별로 분획 처리하여 각각 hexane층, methylene chloride (CH₂Cl₂)층, ethyl acetate층, 수층분획물로 계층 분획하였다. 각 층은 감압 농축 후, 동결 건조하여 분말형태로 제조하였고, -80℃에 보관하여 실험에 사용하였다.



2. 2. 성게알 및 성게껍질 추출물의 항균활성 확인

2. 2. 1. 항균실험 사용균주

본 연구에 사용된 어류 병원성 세균과 인체 유해 세균은 미생물자원센터 (Korean Collection for Type Culture, KCTC)와 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)로부터 분양받았으며, 그람 양성균 4종과 그람 음성균 8종, 총 12종의 균주의 균주를 사용하였다(Table 1). 사용 배지는 Brain Heart Infusion Agar (BHIA), 1.5%의 NaCl이 첨가된 BHIA, Marine Agar (MA), Reinforced Clostridial Medium (RCM), Nutrient Agar (NA), 3%의 NaCl이 첨가된 NA 등 Difco (USA)사의 제품을 사용하여 stab culture하였고, 5일마다 계대하여 사용하였다.

Table 1. List of strains and media for antibacterial experiments.

	Strain	Media	Temp (°C)
Gram (+) bacteria	<i>Streptococcus iniae</i> (KCTC 3657)	BHIA	25
	<i>Streptococcus parauberis</i> (KCTC 3651)	BHIA	25
	<i>Propionibacterium acnes</i> (KCCM 41747)	RCM	37
	<i>Micrococcus luteus</i> (KCTC 3063)	MA	25
Gram (-) bacteria	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (KCCM 11965)	NA	37
	<i>Vibrio alginolyticus</i> (KCCM 40513)	MA	30
	<i>Vibrio ichthyoenteri</i> (KCCM 40870)	MA	25
	<i>Vibrio anguillarum</i> (KCTC 2711)	MA	25
	<i>Vibrio fluvialis</i> (KCCM 40827)	MA	30
	<i>Edwardsiella tarda</i> (KCTC 12267)	BHIA	25
	<i>Aeromonas hydrophila</i> (KCCM 32586)	NA	25
	<i>Aeromonas salmonicida</i> (KCCM 40239)	BHIA	25

2. 2. 2. 추출물의 항균활성 탐색

추출물의 어류질병세균과 인체유해세균에 대한 항균활성 효과는 paper disc method를 이용하여 탐색하였다(Murray *et al.*, 1999). 실험에 사용된 각 병원균은 최적배지를 이용하여 전배양 한 후, Spectrophotometer (Libra S22, Biochrome, England)를 사용하여 660 nm에서 Optical Density (O.D)값이 0.4가 되도록 0.85% 생리식염수로 희석하였다. 희석한 균 현탁액은 각각의 최적 배지에 멸균한 면봉을 이용하여 고르게 도말하였다. 각 추출물은 1, 5, 10, 100, 200 mg/ml로 희석하고 0.45 μ m syringe filter (Whatman, UK)를 이용하여 여과한 후, 멸균한 8 mm paper disc (ADVANTEC, Japan)에 50 μ l씩 분주하여 흡수 및 건조시켰다. 건조된 disc는 균주가 도말된 plate에 밀착시켜서 각 병원균의 최적 배양온도에서 48시간 배양 후, disc 주변에 생성된 생육저해환(clear zone, mm)을 측정하여 성계알과 껍질의 열수 추출물과 분획별 추출물의 항균활성을 비교분석하였다.



2. 3. 성게알 및 성게껍질 추출물의 항산화 효과 확인

2. 3. 1. DPPH radical 소거활성 측정

전자공여능은 96 well plate (Biofil, China)에 4.0×10^{-4} M DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma-aldrich Co., USA)용액 100 μ l와 동량의 각 추출액을 1, 5, 10 mg/ml의 농도로 첨가하여 30분간 반응시킨 후, microplate reader (Synergy HTX multi-mode reader, BioTek, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT, Sigma-aldrich Co., USA)와 butylated hydroxyanisole (BHA, Sigma-aldrich Co., USA)를 0.05% (w/v)의 농도로 제조한 후, DPPH 용액 100 μ l와 대조구역 100 μ l을 혼합하여 30분간 반응시킨 후, 흡광도를 측정하였다. Control은 DPPH용액과 methyl alcohol을 각각 100 μ l씩 혼합한 용액을 이용하였다.

전자공여능(Electron donating ability, EDA(%))은 성게알과 껍질의 열수 추출물 및 분획 추출물을 농도별로 첨가한 실험구와 control의 흡광도 감소율로 나타내었다.

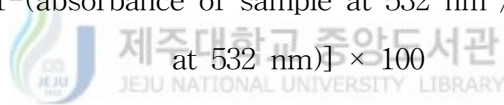
$$\text{EDA (\%)} = (1 - \text{absorbance of sample at 517 nm} / \text{absorbance of control at 517 nm}) \times 100$$

2. 3. 2. Hydroxyl radical 소거활성 측정

1, 5, 10 mg/ml로 희석한 보라성게 알과 껍질 추출물의 hydroxyl radical (OH⁻)소거활성능을 측정하기 위해 2-deoxyribose oxidation method 방법을 변형하여 측정하였다(Kawagan, 1996).

시험관에 10 mM FeSO₄/EDTA 용액 200 μl, 10 mM 2-deoxyribose 200 μl, 추출물 200 μl, 0.1 mM phosphate buffer (pH 7.4) 1 ml, 10 mM H₂O₂ 200 μl 를 가하고 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 후, 2.8% TCA (trichloroacetic acid) solution 1 ml을 가하여 반응을 중지시켰다. 그 후, 1% TBA (thiobarbituric acid) solution 1 ml을 가하여 100°C에서 10분간 가열 후, 급속히 냉각하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료에 대한 기준시료로는 DPPH solution을 이용하였다. Hydroxyl radical 소거활성은 HSA (hydroxyl radical scavenging ability, %)로 표기하였다.

$$\text{HSA (\%)} = [1 - (\text{absorbance of sample at 532 nm} / \text{absorbance of control at 532 nm})] \times 100$$



2. 4. 성게껍질 열수추출물의 첨가에 따른 양식 넙치의 비특이적 면역 반응

2. 4. 1. 실험어 사육관리

본 연구에 사용된 넙치는 제주특별자치도 제주시 조천읍에 위치한 양식장에서 분양받아 사용하였다. 실험 시작 전, 실험 환경에 적응시키기 위해 약 2주간 사료를 공급하지 않는 상태로 순치시켰다. 실험 시작 전 넙치의 평균 무게는 $48.2 \pm 4.4\text{g}$ 이었다. 사육 수조는 120 L의 사각 유리 수조를 사용하였고, 각 수조당 15마리를 수용하였다. 실험 기간 중 염분, 수온, 용존산소량(dissolved oxygen, DO), pH는 YSI (YSI-556MPS, YSI Life Sciences, USA)를 사용하여 매일 측정하였다. 실험 기간 중 사육온도는 $18.12 \sim 19.84^{\circ}\text{C}$, 염분은 $33.68 \sim 34.21\text{‰}$, pH $7.96 \sim 8.34$, 용존산소량(dissolved oxygen)은 $7.2 \sim 7.9 \text{ ppm}$ 이었다. 사료는 1일 2회(오전 9시, 오후 6시), 어체중의 2%만큼 공급하였으며, 사육은 총 4주간 진행하였다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 4. 2. 실험사료 제작 및 투여

실험용 사료는 시판하고 있는 넙치용 배합사료(조단백질 52.0%, 조지방 8.0%, 조섬유 3.0%, 조회분 14.0%, 칼슘 1.5%, 인 2.7%, Suhyup Co., Korea)에 성게껍질 1% 열수 추출물과 5% 열수 추출물을 첨가하여 실험사료를 제작하였다. 대조구로는 성게껍질 열수 추출물을 첨가하지 않은 일반 상업 사료를 급여하였다. 실험 기간 내 사료는 1일 2회(오전 9시, 오후 6시), 어체중의 2%로 공급하였으며, 실험 사육은 총 4주 동안 진행하였다.

2. 4. 3. Respiratory burst activity 측정

어류의 혈액 내 식세포 작용을 알아보기 위해 respiratory burst activity를 측정하였다. 실험어의 미부정맥에서 채취한 전혈과 0.2% nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma-aldrich Co., USA)을 1:1 비율로 유리 원심관에 넣고 상온에서 30분간 반응시킨 후, dimethyl formamide 1 ml을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후, 상층액을 수거하고 glass cell에 분주하여 540 nm에서 spectrophotometer (Libra S22, Biochrome, England)로 흡광도를 측정하였다.

2. 4. 4. 혈청 내 lysozyme activity 측정

실험어의 혈청 내 lysozyme 활성을 측정하기 위해 0.85% 멸균 생리식염수 (pH 6.2)에 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-aldrich Co., USA)이 0.2 mg/ml의 농도가 되도록 solution을 제조하였다. 실험어의 미부정맥에서 채취한 전혈을 800 xg에서 20분간 원심하여 혈청을 분리하였다. 96 well plate (Biofil, China)에 분리한 혈청 15 μ l를 분주하고 *M. lysodeikticus* solution 150 μ l을 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 30초와 4분 30초 반응 후, microplate reader (Synergy HTX multi-mode reader, BioTek, USA) 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도의 분당 0.001 감소치를 lysozyme의 활성 단위인 1 unit/ml로 표시하였다.

III. 결과 및 고찰

3. 1. 시료의 추출

3. 1. 1. 성게알 및 껍질의 열수추출물과 각 분획물의 수율

보라성게 알과 껍질을 각각 멸균 증류수에 넣어 100℃에서 3회 추출하여 감압농축 후 동결건조하여 8.3955 g의 보라성게 알 열수추출물과 2.0099 g의 보라성게 껍질 열수추출물을 얻었다. 보라성게의 알과 껍질을 각각 80% ethyl alcohol로 상온에서 3회 반복 추출하여 11.2144 g의 보라성게 알 에탄올 추출물과 1.7366 g의 보라성게 껍질 에탄올 추출물을 얻었다. 이 추출물을 다시 극성과 비극성 용매로 분획하여 보라성게 알 hexane 3.1344 g, methylene chloride (CH₂Cl₂) 0.3199 g, ethyl acetate 0.2998 g, 수층(aqueous) 2.5713 g, 보라성게 껍질 hexane 0.517 g, methylene chloride (CH₂Cl₂) 0.0085 g, ethyl acetate (EtAct) 0.0153 g, 수층(aqueous) 0.8838 g을 얻었다(Table 2, 3). 각 분획물은 각각 감압농축 후 동결건조하여 분말형태로 제조한 후, 시료로 사용하였다.

Table 2. Yields (%) of various solvent fractions of *A. crassispina*'s egg.

Fraction	Yields (g)	Yields (%)
Hot water ex.	8.3955	8.3955
80% ethanol ex.	11.2144	11.2144
Hexane fr.	3.1344	3.1344
CH ₂ Cl ₂ fr.	0.3199	0.3199
EtAct fr.	0.2998	0.2998
Aqueous fr.	2.5713	2.5713

Table 3. Yields (%) of various solvent fractions of *A. crassispina*'s shell.

Fraction	Yields (g)	Yields (%)
Hot water ex.	2.0099	2.0099
80% ethanol ex.	1.7366	1.7366
Hexane fr.	0.517	0.517
CH ₂ Cl ₂ fr.	0.0085	0.0085
EtAct fr.	0.0153	0.0153
Aqueous fr.	0.8838	0.8838

3. 2. 성게알 및 성게껍질 추출물의 항균활성 확인

어류 병원성 미생물인 그람 양성균 2종과 그람 음성균 5종, 그리고 인체 유해 미생물인 그람 양성균 2종과 그람 음성균 3종에 대하여 보라성게의 알과 껍질의 열수추출물과 분획물을 이용하여 항균활성을 측정하였다(Table 4, 5). 그 결과, 보라성게 껍질 추출물에 비해 알 추출물이 보다 많은 균주와 낮은 농도에서 항균활성을 나타냈다. 그 중 보라성게 알 methylene chloride 분획물의 경우, 담수어류에서 질병을 일으키는 *A. hydrophila*에 대해 5 mg/ml의 농도에서도 항균활성이 강하게 나타났다. 보라성게 알 hexane 분획물의 경우, 양식넙치의 자어에서 장관백탁증을 유발하는 *V. ichthyoenteri*에 대하여 10 mg/ml의 농도에서 항균활성이 나타났다. 보라성게 껍질 hexane 분획물은 *A. hydrophila*에 대해, 수층분획물은 여름철 사람에서 장염비브리오를 유발하는 *V. parahaemolyticus*에 대해 약한 항균활성이 나타났다. 항균활성이 관찰된 모든 추출물은 인체 유해 미생물에 비해 어류질병세균에 대해 항균활성이 더 높았다. 또한 활성이 나타난 모든 추출물은 농도의존적인 경향을 보였으며, 추출물의 농도가 높아질수록 더 강한 항균활성을 나타내었다. 성게껍질 추출물은 이전에 500 ~ 2000 μ g/ml의 농도에서 식품 부패 미생물에 대해 항균효과가 존재한다고 보고된 적이 있다.

Table 4. Antibacterial activity of various solvent of *A. crassispina* egg extract against fish pathogenic and human clinical bacteria.

Sample name	Fish pathogenic bacteria (mm)							Human clinical bacteria (mm)				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AEHW	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1mg AEHW	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5mg AEHW	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10mg AEHW	-	-	-	-	-	23.0	-	-	-	-	-	-
200mg AEHW	-	-	-	-	-	28.0	-	-	-	-	-	-
AEH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1mg AEH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5mg AEH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10mg AEH	-	-	-	-	-	-	12.0	-	-	-	-	-
100mg AEH	19.5	-	-	-	-	22.5	35.0	-	-	-	-	-
200mg AEH	27.0	-	-	-	-	35.5	45.0	-	-	11.0	-	-
AEMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1mg AEMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5mg AEMC	23.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10mg AEMC	28.0	-	11.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80mg AEMC	38.5	-	24.0	-	-	33.5	-	-	-	14.5	18.5	-
AEEA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1mg AEEA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5mg AEEA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10mg AEEA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79mg AEEA	12.0	-	12.0	-	-	-	-	-	-	25.5	-	-
AEAQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1mg AEAQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

AEAQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5mg													
AEAQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10mg													
AEAQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100mg													
AEAQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200mg													

1; KCCM 32586 *A. hydrophila*, 2; KCCM 40239 *A. salmonicida*, 3; KCTC 12267 *E. tarda*, 4; KCTC 3657 *S. iniae*, 5; KCTC 3651 *S. parauberis*, 6; KCTC 2711 *V. anguillarum*, 7; KCCM 40870 *V. ichthyenteri*, 8; KCTC 3063 *M. luteus*, 9; KCCM 41747 *P. acnes*, 10; KCCM 40513 *V. alginolyticus*, 11; KCCM 40827 *V. fluvialis*, 12; KCCM 11965 *V. parahaemolyticus*, AEHW; *A. crassispina* egg hot water extract, AEH; *A. crassispina* egg hexane layer, AEMC; *A. crassispina* egg methylene chloride layer, AEEA; *A. crassispina* egg ethyl acetate layer, AEAQ; *A. crassispina* egg aqueous layer



Table 5. Antibacterial activity of various solvent of *A. crassispina* shell extract against fish pathogenic bacteria and human clinical bacteria.

Sample name	Fish pathogenic bacteria (mm)							Human clinical bacteria (mm)				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ASHW	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1mg ASHW	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5mg ASHW	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10mg ASHW	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100mg ASHW	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200mg ASH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1mg ASH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5mg ASH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10mg ASH	14.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16.0
100mg ASMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1mg ASEA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3mg ASAQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1mg ASAQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5mg ASAQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10mg ASAQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100mg ASAQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200mg ASAQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.5

1; KCCM 32586 *A. hydrophila*, 2; KCCM 40239 *A. salmonicida*, 3; KCTC 12267 *E. tarda*, 4; KCTC 3657 *S. iniae*, 5; KCTC 3651 *S. parauberis*, 6; KCTC 2711 *V. anguillarum*, 7; KCCM 40870 *V. ichthyoenteri*, 8; KCTC 3063 *M. luteus*, 9; KCCM 41747 *P. acnes*, 10; KCCM 40513 *V. alginolyticus*, 11; KCCM 40827 *V. fluvialis*, 12; KCCM 11965 *V. parahaemolyticus*, ASHW;

A. crassispina shell hot water extract, ASH; *A. crassispina* shell hexane layer, ASMC; *A. crassispina* shell methylene chloride layer, ASEA; *A. crassispina* shell ethyl acetate layer, ASAQ; *A. crassispina* shell aqueous layer



3. 3. 성게알 및 성게껍질 추출물의 항산화 효과 확인

3. 3. 1. DPPH radical 소거활성 측정

체내에서 일어나는 산화반응은 노화, 세포손상, 세포의 변이를 유발하여 암 세포를 생성한다. 따라서 산화적 스트레스를 유발하는 free radical의 생성을 억제하는 것은 간접적으로 노화와 암을 예방한다고 할 수 있다. 이러한 free radical의 생성을 억제하는 것을 항산화 작용이라고 하는데, 생체 내에서 발생하는 free radical을 대상으로 실험하는 것은 어렵기 때문에 보편적으로 DPPH와 ABTS radical을 bio-maker로서 사용하고 있다. DPPH radical은 보라색을 띠며, 항산화능력을 가진 물질과 반응하면 노란색으로 변색되며, 항산화 효과가 강할수록 더 옅은 노란색으로 변색된다.

보라성게 알과 껍질의 1, 5, 10 mg/ml의 농도로 이루어진 각 추출물의 항산화능을 DPPH에 대한 전자공여능(electron donating ability, EDA(%))으로 나타내었다(Fig. 1, 2, 3). 보라성게 알 추출물의 전자공여능을 측정한 결과, 1 mg/ml에서 평균 22.9%, 5 mg/ml에서 45.2%, 10 mg/ml에서 57.2%의 전자공여능을 나타내었으며(Fig. 1), 모든 추출물은 농도가 높아질수록 항산화 활성이 좋아지는 농도의존적 성향이 나타났다. 보라성게 알 추출물 중 가장 높은 활성을 나타낸 것은 수층분획물(AEAQ)로, 1 mg/ml의 농도에서 41.6%로 BHT(40.0%)와 유사한 활성을 나타내었고, 5 mg/ml과 10 mg/ml의 농도에서는 각각 71.5%와 78.1%로 BHT보다 높은 활성을, BHA(74.6%)와는 유사한 라디칼 소거활성을 나타냈다.

보라성게 껍질 추출물의 전자공여능 측정 결과, 1 mg/ml에서 평균 21.3%, 5 mg/ml에서 50.1%, 10 mg/ml에서 67.3%의 전자공여능을 나타내었으며(Fig. 2), 성게알 추출물과 마찬가지로 농도의존적 이었다. 껍질 추출물의 경우 모든 농도에서 가장 높은 활성이 나타난 추출물은 열수추출물(ASHW)로 농도별로 25.2%, 69.6%, 75.6%의 라디칼 소거활성능이 측정되었으며, 5 mg/ml의 경우, BHA과 유사한 활성을 나타냈다. 또한 3.8 mg/ml의 ethyl acetate 분획물(ASEA, 76.9%) 역시 높은 라디칼 소거활성을 나타냈다(Fig. 3).

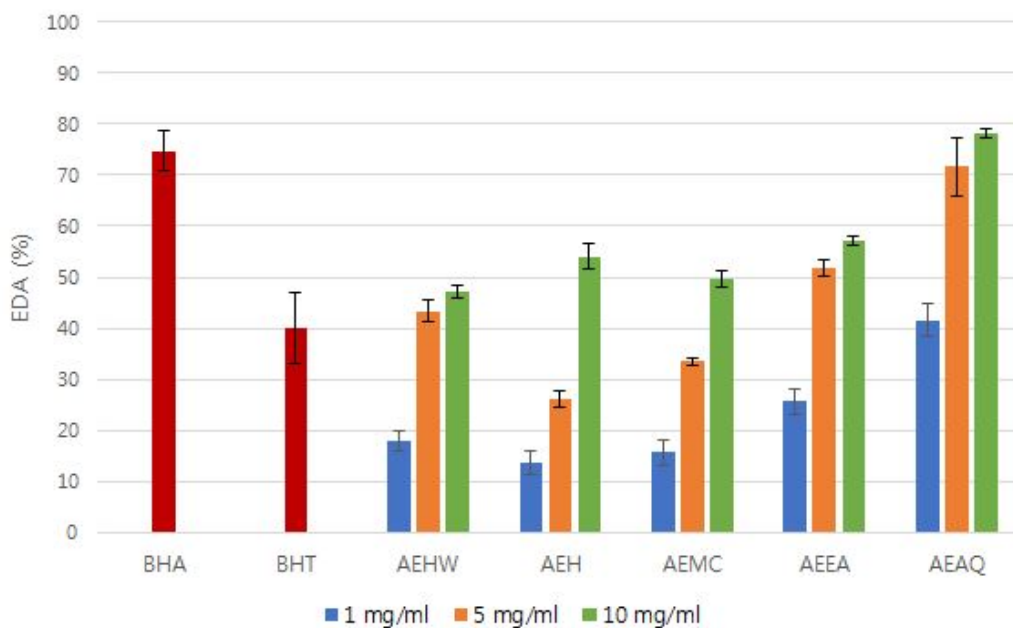


Fig. 1. Radical scavenging activity of various extracts and concentration obtained *A. crassispina* egg. The antioxidative activity was tested by DPPH method. BHA; Butylated hydroxyanisole, BHT; Butylated hydroxytoluene, AEHW; *A. crassispina* egg hot water extract, AEH; *A. crassispina* egg hexane layer, AEMC; *A. crassispina* egg methylene chloride layer, AEEA; *A. crassispina* egg ethyl acetate layer, AEAQ; *A. crassispina* egg aqueous layer

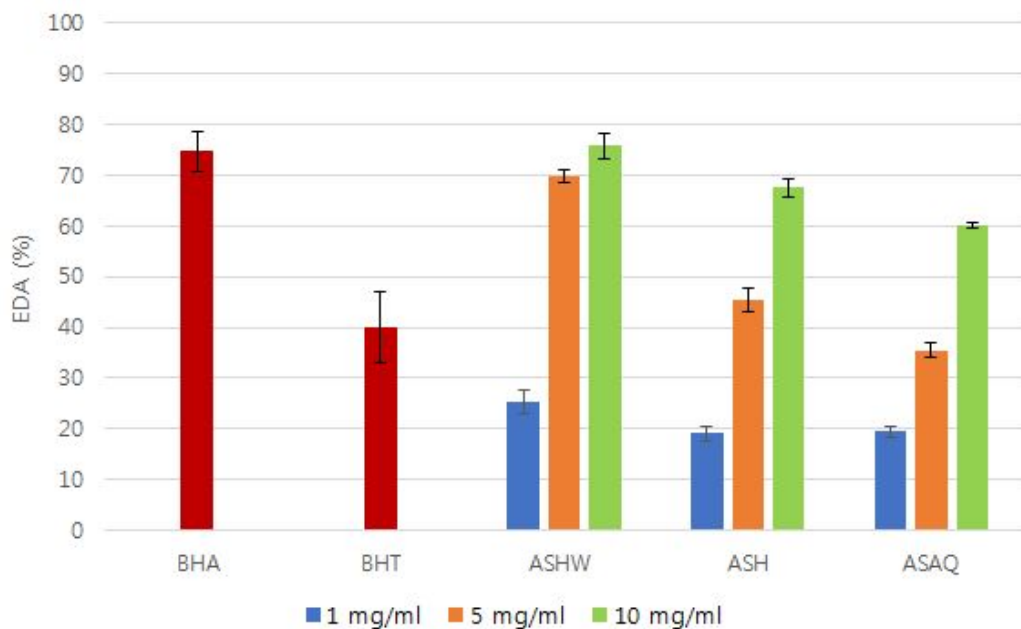


Fig. 2. Radical scavenging activity of various extracts and concentration obtained *A. crassispina* shell. The antioxidative activity was tested by DPPH method. BHA; Butylated hydroxyanisole, BHT; Butylated hydroxytoluene, ASHW; *A. crassispina* shell hot water extract, ASH; *A. crassispina* shell hexane layer, ASAQ; *A. crassispina* shell aqueous layer

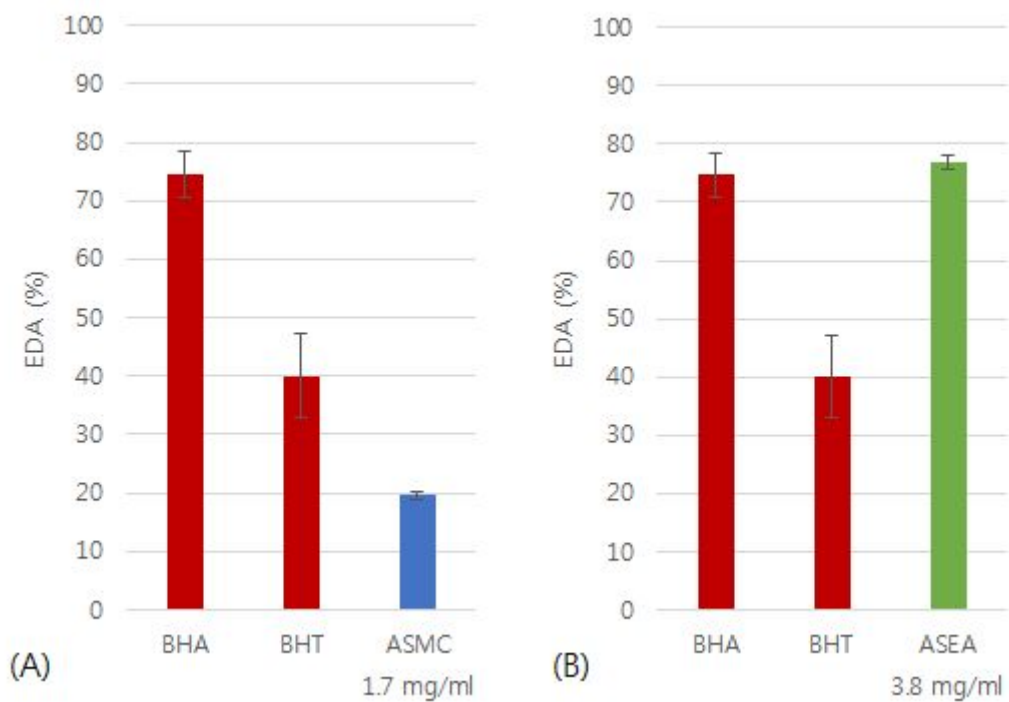


Fig. 3. Radical scavenging activity of *A. crassispina* shell methylene chloride layer 1.7 mg/ml (A) and ethyl acetate layer 3.8 mg/ml (B). The antioxidative activity was tested by DPPH method. BHA; Butylated hydroxyanisole, BHT; Butylated hydroxytoluene, ASMC; *A. crassispina* shell methylene chloride layer, ASEA; *A. crassispina* shell ethyl acetate layer

3. 3. 2. Hydroxyl radical 소거활성 측정

2-deoxyribose는 Renton reagent로부터 생성된 hydroxyl radical에 의해 산화되어 malondialdehyde를 생성한다. 이러한 2-deoxyribose의 산화적 분해 정도는 산성 조건 하에서 TBA를 첨가하여 95°C 이상으로 가열하여 생성되는 붉은색의 화합물(thiobarbituric acid reactive species, TBAR)을 흡광도로 측정하여 나타낸다.

보라성계 알과 껍질의 1, 5, 10 mg/ml의 농도로 이루어진 각 추출물 별 항산화능을 hydroxyl radical scavenging activity (HSA)를 이용하여 측정하였다(Fig. 4, 5, 6). 보라성계 알 추출물의 HSA 측정 결과, 1 mg/ml에서 평균 21.1%, 5 mg/ml에서 38.2%, 10 mg/ml에서 49.7%의 HSA를 나타냈으며, 모든 보라성계 알 추출물은 대조구인 BHA (15.0%), BHT (15.2%)와 유사하거나 더 높은 활성이 나타났다(Fig. 4). 보라성계 알 추출물 중 ethyl acetate 분획물(AEEA)이 각 35.9%, 70.3%, 76.8%로 HSA가 가장 높게 나타났고, hexane 분획물(AEH)은 5 mg/ml에서 47.9%, 10 mg/ml에서 66.3%, methylene chloride 분획물(AEMC)은 43.9% (5 mg/ml), 54.1% (10 mg/ml)로 모두 BHA와 BHT보다 더 높은 활성을 나타냈다. 보라성계 알 수층분획물과 열수추출물의 경우 농도에 따른 HSA의 변화에 큰 차이가 나타나지 않았다.

보라성계 껍질 추출물의 HSA 측정 결과, 농도별 평균 22.2%, 26.9%, 27.4%의 값을 나타내었다(Fig. 5). 모든 보라성계 껍질 추출물은 대조구인 BHA와 BHT와 비교하였을 때, 거의 모든 추출물이 유사한 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 모든 농도에서 hexane 분획물(ASH)이 24.3%, 40.2%, 51.4%로 가장 우수한 활성을 나타냈다. 1.7 mg/ml의 methylene chloride 분획물 역시 36.7%로 대조구에 비해 활성이 높았다(Fig. 6). 성계껍질 열수추출물과 수층분획물의 경우, 농도에 따른 HSA의 변화에 차이가 나타나지 않았다(Fig. 4).

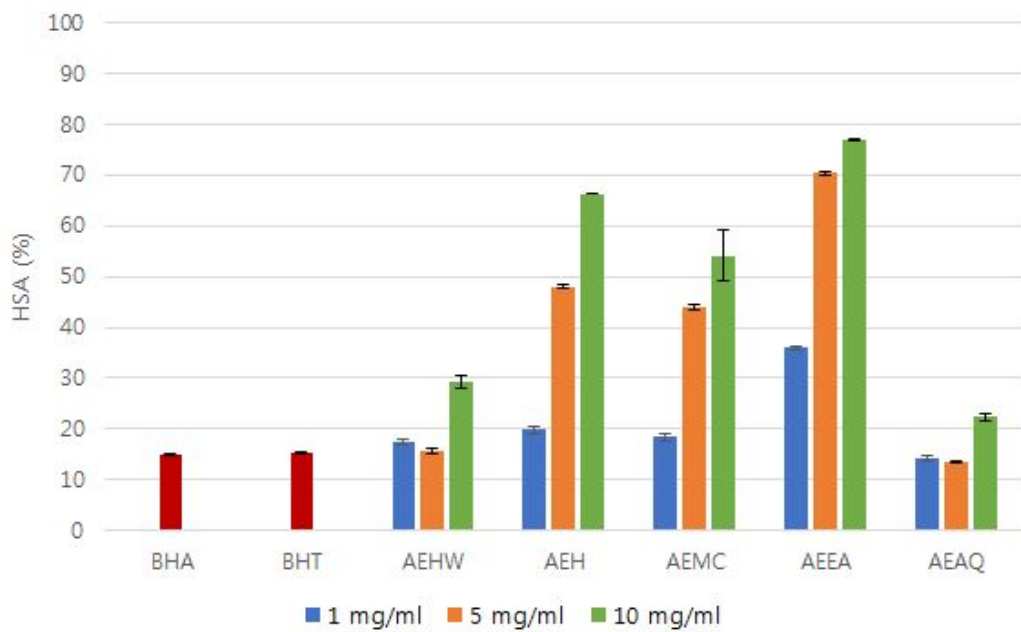


Fig. 4. Hydroxyl radical scavenging activity of various extracts and concentration obtained *A. crassispina* egg. BHA; Butylated hydroxyanisole, BHT; Butylated hydroxytoluene, AEHW; *A. crassispina* egg hot water extract, AEH; *A. crassispina* egg hexane layer, AEMC; *A. crassispina* egg methylene chloride layer, AEEA; *A. crassispina* egg ethyl acetate layer, AEAQ; *A. crassispina* egg aqueous layer

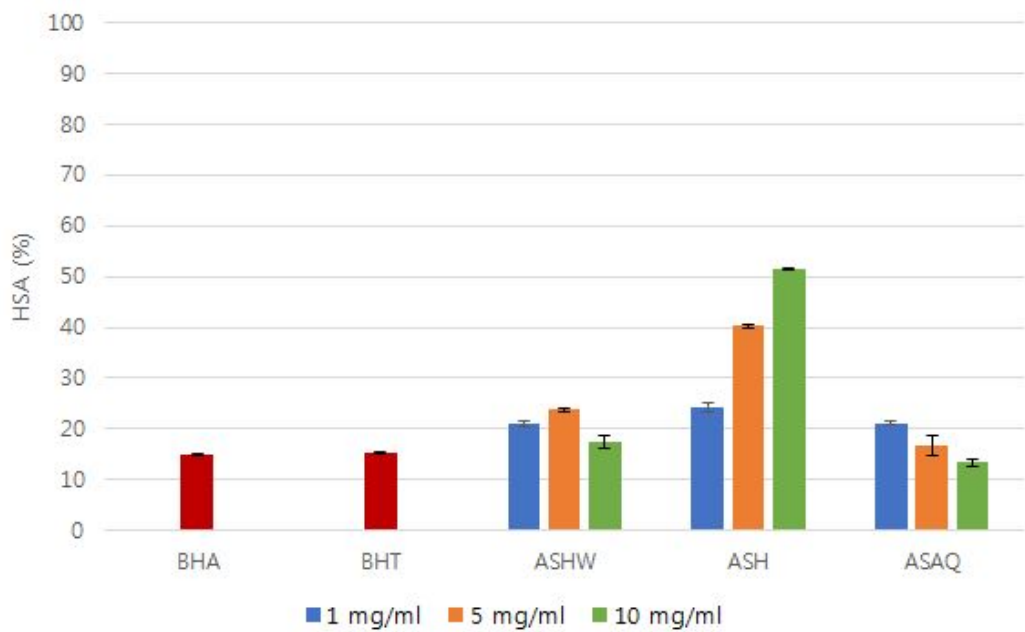


Fig. 5. Hydroxyl radical scavenging activity of various extracts and concentration obtained *A. crassispina* shell. BHA; Butylated hydroxyanisole, BHT; Butylated hydroxytoluene, ASHW; *A. crassispina* shell hot water extract, ASH; *A. crassispina* shell hexane layer, ASAQ; *A. crassispina* shell aqueous layer

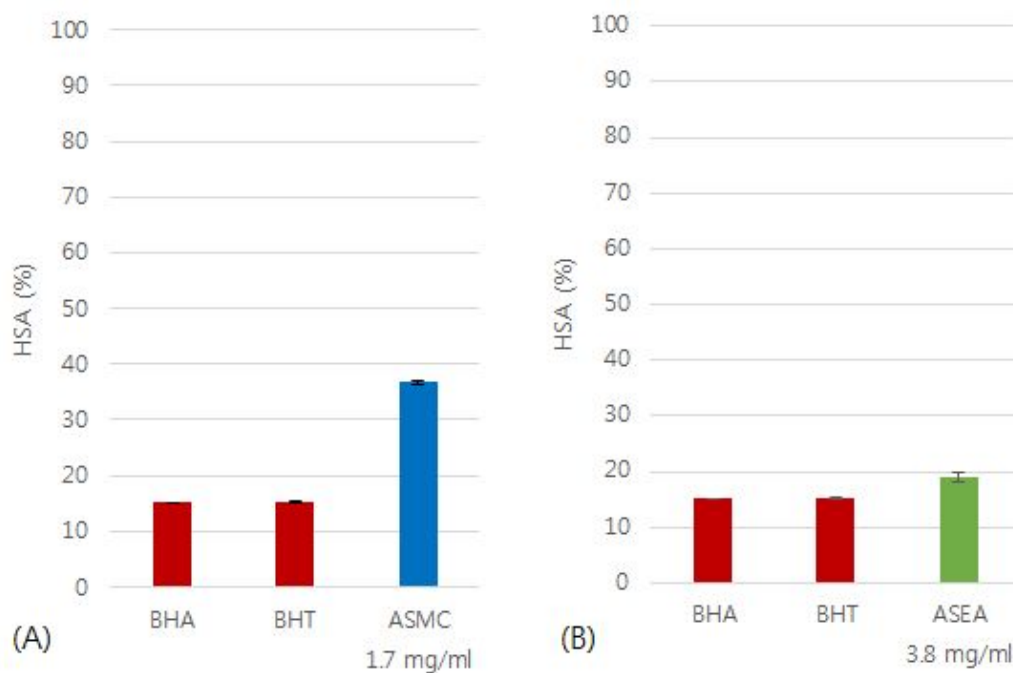


Fig. 6. Hydroxyl radical scavenging activity of *A. crassispina* shell methylene chloride layer 1.7 mg/ml (A) and ethyl acetate layer 3.8 mg/ml (B). BHA; Butylated hydroxyanisole, BHT; Butylated hydroxytoluene, ASMC; *A. crassispina* shell methylene chloride layer, ASEA; *A. crassispina* shell ethyl acetate layer

3. 4. 성게껍질 열수추출물의 첨가에 따른 양식 넙치의 비특이적 면역 반응 확인

3. 4. 1. Respiratory burst activity 측정

어류에 있어 비특이적 면역 반응이 얼마나 증가되었는가를 가장 잘 반영하는 척도로서 식세포 활성(phagocyte activity) 측정을 가장 많이 사용하고 있다. 식세포의 활성이 일어나면 혈장과 phagosomal membranes에 있는 NADPH oxidase에 의해 superoxide가 생성된다 superoxide는 hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH^-), singlet oxygen (1O_2) 등 다른 종류의 ROS로 전환된다. Respiratory burst란 식세포가 식작용 또는 다른 물질들에 의해서 자극받았을 때 산소 소비량이 증가하고, O_2^- , OH^- , H_2O_2 와 같은 ROS를 다량으로 방출하는 현상을 말하며, 이러한 ROS는 생체 내에 침입한 병원체를 사멸시키는 매우 중요한 역할을 한다(Siwicki *et al.*, 1994). 이러한 respiratory burst 측정 방법에는 주로 NBT법을 사용하며, 최근에는 chemiluminescence (CL)법의 사용이 증가하는 추세이다.

본 연구에서는 NBT법을 이용하여 respiratory burst를 측정하였다(Fig. 7). 측정 결과, 1주차에서는 2주차까지는 서로 차이가 나타나지 않았으며, 3주차에서는 대조구와 5% 성게껍질 첨가구의 활성이 갑자기 증가하였다가, 4주차에 다시 감소하는 모습을 보였다. 본 실험결과에 의하면, 대조구와 실험구 모두 실험 기간에 따른 면역력 증가에 대한 연관성이 관찰되지 않았는데, 이것은 혈액 채취 시 handling에 의한 과도한 스트레스 또는 추출물에 의한 기호성의 변화에 따른 사료섭취율의 저하 때문인 것으로 보인다.

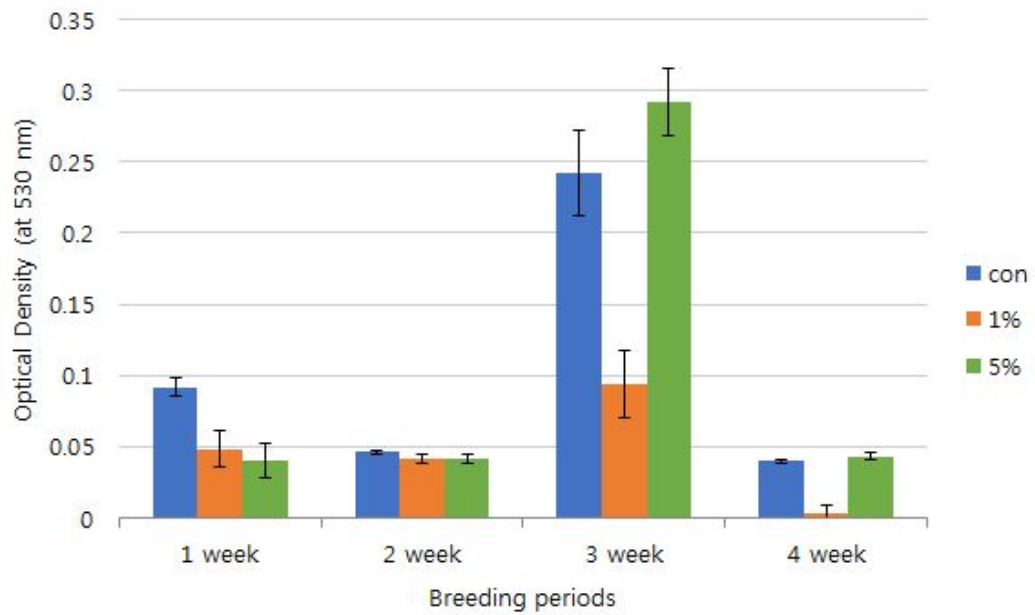


Fig. 7. NBT reduction of the olive flounder (*paralichthys olivaceus*) fed on *A. crassispina* shell hot water extract and commercial diet for 4 weeks.

3. 4. 2. 혈청 내 lysozyme activity 측정

Lysozyme은 체액성 면역 반응에 관여하는 효소로 세균의 세포벽에 존재하는 다당류 속의 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine 사이의 β -1,4-glycoside (muramide) 결합을 가수분해한다. 난백, 비점액, 타액, 눈물, 혈장 등에 존재하며, 그람양성균에 대한 항체 및 보체의 활성화와 식세포 작용을 증가시킨다. 어류의 피부, 점액, 아가미 등은 어류 감염의 초기 단계에서 중요한 역할을 한다. 피부의 점액 및 표면점막 등에는 lysozyme, complement, lectin, proteolytic enzyme 등의 면역인자가 포함되어 있으며, 이들에 의해 비특이적 면역 반응이 일어난다. Lysozyme은 세균벽의 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine 사이의 β -1,4-glycoside (muramide) 결합을 가수분해하여 병원균을 사멸시키고, 그람양성균의 세포벽에 직접 작용하며, 그람음성균에 대한 항체 및 보체의 활성화와 식세포 작용을 증가시키고, peptidoglycan 층을 분해시킨다고 알려져 있다.

본 연구결과, 실험이 진행됨에 따라 대조구의 lysozyme 활성은 실험이 진행될수록 감소하고, 1% 성게껍질 열수추출물 첨가구와 5% 성게껍질 열수추출물 첨가구의 lysozyme 활성이 증가하는 것으로 나타났으며, 실험 마지막 주인 4주차에서는 두 실험구 모두 대조구에 비해 활성이 증가하였다(Fig. 8). 본 결과에 의하면 성게껍질 열수추출물이 양식넙치의 혈청 내 lysozyme의 증가에 영향을 미치는 것으로 생각이 되나, respiratory burst와 동일한 이유로 연관성이 낮다고 여겨진다.

이전 연구결과에 의하면, 성게껍질 분말을 급여한 육계의 근육에서 Fe와 Ca의 함량이 증가하였으며, 총 아미노산 함량 역시 증가하여, 기능성 계육의 생산에 효과가 있을 것이란 보고가 있었다. 또한 산란계에 급여 시, 일반 성분 및 외관상에는 변화가 없으나 Fe와 Ca 함량이 높고, 고도불포화 지방산 함량이 높은 기능성 계란의 생산이 가능할 것이란 보고가 있다(Kim, 2005; Kim, 2005; Kim *et al.*, 2002). 따라서 본 실험에서 이용한 성게껍질 추출물 이외에, 성게껍질 분말을 넙치에 급여 할 경우, 선행 연구 결과와 같이 영양상 기능이 우수한 넙치의 생산을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

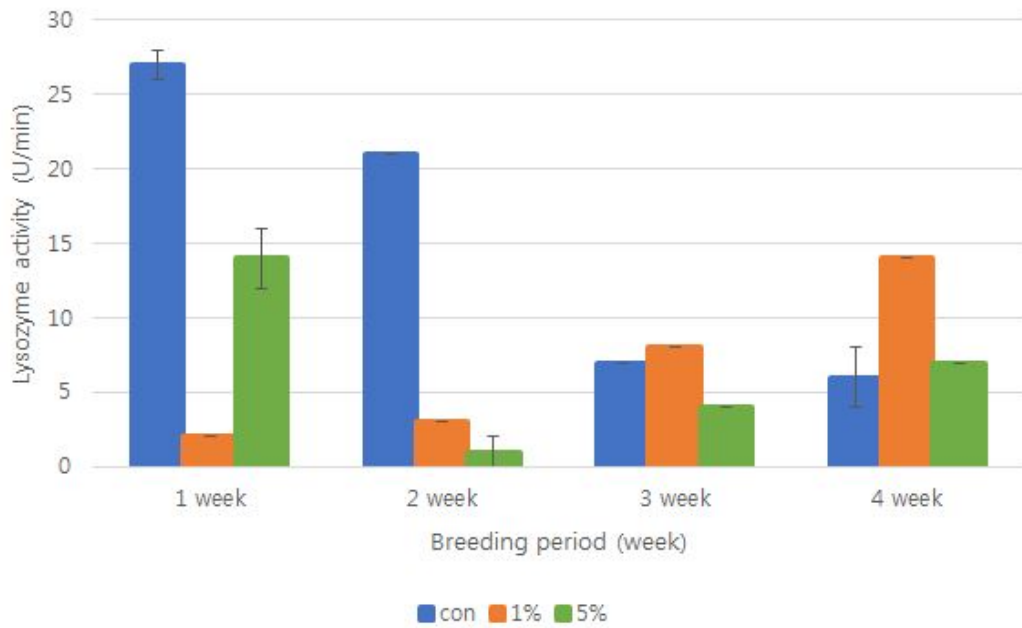


Fig. 8. Lysozyme activity in the serum from the olive flounder (*P. olivaceus*) fed on *A. crassispina* shell hot water extract and commercial diet for 4 weeks.

IV. 요약

항생제와 합성 항산화제의 부작용 및 문제점에 의해, 천연물에 존재하며 인체에 무해하고 효과가 좋은 항균성 물질과 항산화제에 관한 연구는 현재까지도 주로 진행되고 있는 연구 주제 중 하나이다. 최근 천연 항균물질 및 천연 항산화제에 관한 연구는 독특한 대사과정과 특이성을 갖는 해양생물이 생산하는 생리 활성 물질에 집중되고 있다. 성게는 한의학에서 해담이라고 불리며, 우수한 생리활성을 나타낸다고 알려져 있다.

본 연구에서는 바다 갯녹음 현상의 주원인 중 하나이며, 폐자원으로 버려지는 껍질에 의해 최근 환경오염의 문제점으로 대두되고 있는 성게를 이용하여, 알과 껍질이 어류질병세균과 인체유해세균에 대해 갖는 항균 활성과 항산화 활성을 측정하였다. 또한 전량 폐기되고 있는 성게 껍질을 추출하여 사료에 첨가함으로써 환경 문제를 해결하고, 성게껍질 추출물을 첨가한 사료의 급여 시 나타나는 넙치의 면역 반응을 조사하여, 사료 첨가제로서의 응용 가능성을 확인하고자 하였다. 추출 결과, 8.3955g의 보라성게 알 열수추출물과 2.0099g의 보라성게 껍질 열수추출물, 보라성게 알 hexane 3.1344g, methylene chloride (CH_2Cl_2) 0.3199g, ethyl acetate 0.2998g, 수층(Aqueous) 2.5713g, 보라성게 껍질 hexane 0.517g, methylene chloride (CH_2Cl_2) 0.0085g, ethyl acetate (EtAct) 0.0153g, 수층(Aqueous) 0.8838g을 얻었다.

항균활성은 보라성게 껍질 추출물에 비해 보라성게 알 추출물이 더 많은 활성을 나타내었으며, 항산화 효과에서 DPPH radical 소거 활성의 경우, 알과 껍질 추출물 모두 대조구인 BHA와 BHT와 유사하거나 더 높은 활성을 나타내었다. Hydroxyl radical 소거 활성 또한 DPPH와 유사한 결과였으나, DPPH는 껍질 추출물의 활성이 더 높았던 반면, hydroxyl radical 소거활성은 보라성게 알 추출물이 더 높게 나타났다. 따라서 기존에 생리활성이 연구되어 왔던 성게알 뿐만 아니라, 폐자원으로 버려지는 성게껍질에서도 유용한 생리활성물질이 존재한다고 여겨지며, 본 연구는 앞으로 진행될 성게껍질의 성분에 대한 연구의 기초 자료가 될 것으로 생각된다.

V. References

- Bae, S. J. 2001. The antimicrobial activit of wasted Anthocidaris crassispina peel fractions. Silla University natural science research institute collection of dissertations **13**, 55-59.
- Beuchat, L. R. and Golden, D. A. 1989. Antibicrobials occuring naturally in foods. *Food Technol* **43**, 134-142.
- Brannen, A. L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy toluene and butylated hydroxy anisole. *J Am Oil Chem Soc* **52**, 59-63.
- Cha, B. C., Lee, H. W. and Choi, M. Y. 1998. Antioxidative and antimicrobial effects of Nut species. *Kor L Pharmacogn* **29**, 28-34.
- Cha, B. C., Lee, S. K., Lee, H. W., Choi, M. Y., Rhim, T. J. and Park, H. J. 1997. Antioxidative effect of domestic plants. *Kor J Parmacogn* **28**, 15-20.
- Chan, K. M., Decker E. A. and Means, W. J. 1993. Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in beef muscle. *J Food Sci* **58**, 1-4.
- Cho, S. Y., You, B. J., Chang, M. H., Lee, S. J. and Sung, N. J. 1994. Screening for potato lipoxygenase-1 inhibitor in unused marine resources by the polarographic method. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **23**, 959-963.
- Cho, S. Y., You, B. J., Chang, M. H., Lee, S. J., Sung, N. J. and Lee, E. H. 1994. Screening for antimicrobial compounds in unused marine resources by the paper disk method. *Korean J Food Sci Technol* **26**, 261-265.

De la Cruz-Garcia, C., Lopez-Hernandez, J., Gonzalez-Castro, M. J., Rodriguez-Bernaldo De Quiros A. I. and Simal-Lozano, J. 2000. Protein, amino acid and fatty acid contents in raw and canned sea urchin (*Paracentrotus lividus*) harvested in Galicia (NW Spain). *J Sci Food Agric* **80**, 1189-1192.

Elder, A., Shapiro, O., Bejerano, Y. and Bercovier, H. 1995. Vaccination with whole-cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningo encephalitis. *Vaccine* **13**, 867-870.

Haliwell, B. and Aruoma, O. I. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. *FEMS Letters* **281**, 9-19.

Haliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1999. Free radical in biology and medicine. 3rd ed., Oxford University Press, New York, USA.

Hughey, V. L. and Johnson, E. A. 1987. Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Appl Environ Microbiol* **53**, 2165-2170.

Ito, N., Fukushima, S. and Hasegawa, A. 1983. Carcinogenicity of BHA in F344 rats. *J Natl Cancer Inst* **70**, 343-352.

Jang, D. S., Kim, Y. M., Lee, M. S., Shin, I. S. and Lee, H. J. 2010. Fisheries food hygienics. pp. 289. Pukyong National University, Busan, Korea.

Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. R. and Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* **128**, 203-209.

Kawagan, S. 1996. Protocol for control of body functional material in food. pp.8-15. Kakuen press center, Japan.

Kim, K. E., Jeong, Y. J., Kim, O. M., Park, N. Y. and Lee, K. H. 2002. Effect of sea urchin shell on egg quality. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **31**, 373-377.

Kim, K. S., Kim, D. I., Lim, A. K., Yoon, S. R, Kim, J. O. and Lee, G. D. 2011. Anti-diabetic effects of *Hemicentrotus pulcherrimus* shells on non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **40**, 1537-1543.

Kim, S. H., Kim, N. J., Choi, J. S. and Park, J .C. 1993. Determination of flavonoid by HPLC and biological activities from the leaves of *Cudrania tricuspidata* bureau. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **22**, 68-72.

Kim, S. J. 1994. Effect of natural antioxidants on reactive oxygen species. Ph.D. Thesis, Korea Advanced Institute of Science and Technology.

Kim, Y. J. 2005. Influence of dietary sea urchin shell powder on broiler performance and mineral contents in chicken meat. *Korean J Poult Sci* **32**, 61-66.

Kim, Y. J. 2005. Influence of dietary sea urchin shell powder on physico-chemical properties of chicken meat. *Korean J Poult Sci* **32**, 55-60.

Kwak, Y. S., Yang, J. W. and Lee, K. S. 1993. Screening of herb drugs showing antimicrobial activity against some pathogenic microorganisms. *J Fd Hyg Safety* **8**, 141-145.

Min, S. K., Park, Y. K., Park, J. H., Jin, S. H. and Kim K. W. 2004. Screening of antibacterial activity from hot water extracts of indigenous plants. *J Life Sci* **14**, 951-962.

Mok, J. S., Kim, Y. M., Kim, S. H. and Chang, D. S. 1995. Antimicrobial properties of *Salvia miltiorriza* extract. *J Fd Hyg Safety* **10**, 23-28.

Mok, J. S., Miyamoto, T. and Kataoka, K. 1998. Properties of antibacterial substance produced by wild *Lactobacillus* strain IMC-1 from Inner Mongolian cheese. *Animal Sci Technol* (Japanese) **69**, 768-778.

Mok, J. S., Miyamoto, T., Kataoka, K., Araki, M., Yoneya, T. and Sewaki, T. 1999. Antibacterial action of an antimicrobial substance from *Lactobacillus amylovorus* IMC-1 against foodborne spoilage and pathogenic organisms. *Milk Sci* **48**, 79-85.



Moon, J. O. and Park, J. H. 1997. Screening of the hepatoprotective drugs for folk medicines. *Kor J Pharmacogn* **28**, 156-161.

Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. Am., Tenover, F. C. and Tenover, R. H. 1999. Manual of clinical microbiology, 7th ed., ASM, Washington DC, USA.

Nam, H. K. 1986. The composition of fatty acid and amino acid for sea urchin. *J Korean Oil Chemists' Soc* **3**, 33-37.

Newman, S. G. 1993. Bacterial vaccines for fish. *Annu Rev Fish Dis* **3**, 145-185

Okabe, S., Mok, J. S., Sewaki, T., Kataoka, K., Izumimoto, M. and

Miyamoto, T. 2000. Characteristic of bacteriocin produced by Enterococcus strain from meat. *Sci Re Facul Agric Okayama Univ*(Japanese) **89**, 39-44.

Park, J. C., Yu, Y. B., Lee, J. H. and Kim, N. J. 1994. Studies on the chemical components and biological activities of edible plates in Korea (IV). *J Korean Soc Food Nutr* **23**, 116-119.

Park, U. Y., Seong, H. K., Mok, J. S. and Chang, D. S. 1995. Effects of treatment with the extract from the root bark of *Morus alba* on the cell composition and the shape change of microorganisms. *J Fd Hyg Safety* **10**, 147-153.

Park, Y. B., Kim, I. S., Yoo, S. J., Ahn, J. K., Lee, T. G., Park, D. C. and Kim, S. B. 1998. Elucidation of anti-tumor initiator and promoter derived from seaweed-2: investigation of seaweed extracts suppressing mutagenic activity of PhIP and MeIQx. *J Korean Fish Soc* **31**, 581-586.

Poli, G., Albano, E. and Dianzani, M. U. 1993. Free radical—from basic science to medicine. *Molecular and Cell Biology Updates*, Birkhauser Verlag.

Punchard, N. A. and Kelly, F. J. 1996. Free radicals—a practical approach. Oxford University Press, New York, USA.

Ryu, B. H., Kim, D. S., Cho, K. J. and Sin, D. B. 1989. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J Food Sci Technol* **21**, 595-600.

Shelef, L. A., Naglic, O. A. and Bogen, D. W. 1980. Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary and allspice. *J Food Sci* **45**, 1042-1044.

Shin, H. K., Shin, O. H. and Koo, Y. J. 1992. Effects of potato protein on the growth of *Clostridium perfringens* and other intestinal microorganisms. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* **20**, 249-256

Siwicki, A. K., Anderson D. P., and Rumsey, G. L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout effects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet Immunol Immunopathol* **41**, 125-139.

Witte, W., Klare, I. and Werner, G. 1999. Selective pressure by antibiotics as feed additives. *Infection* **27**, 35-38.

Wui I. S., Lee, J. B. and Yoo, S. H. 1992. Bioassay on marine sediment pollution by using sea urchin embryo culture in the south-west inland sea of Korea. *Korean J Environ Biol* **10**, 92-99.

Yoo S. K., Hur S.B. and Ryu, H. Y. 1982. Growth and spawning of the sea urchin *Anthocardaris crassispina* (A. Agassiz). *Bull Korean Fish Soc* **15**, 345-358.

Yu, C. M. and Cho, K. A. 1999. The effects of temperature on biological evaluation of seawater with sea urchins. *J Korean Environ Sci Soc* **8**, 160-164.

Yu, T. J. 1999. Food Donguibogam. pp. 337-338. Academy books, Seoul, Korea.

국립수산진흥원. 2000. 건강어류 생산을 위한 어병예방 및 치료대책.

VI. 감사의 글

제주도에 내려온 지 햇수로 6년이 되었습니다. 2학년 종강 할 때쯤 들어와서 실험실에는 거의 5년을 있었는데, 졸업하려니 실감이 나지 않고, 작성한 논문을 보니 굉장히 부족한 부분이 많은 것을 다시 한 번 느꼈습니다. 이 논문이 완성될 수 있도록 많은 조언을 해주시고, 학부, 석사 지도 교수님이시자 부족한 학생이었던 저를 잘 이끌어 주시고, 무사히 석사 졸업까지 이끌어주신 허문수 교수님, 심사위원으로 논문 수정에 많은 도움을 주신 진창남 소장님께 깊은 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 학부 시절부터 지금까지 저를 지도해주신 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 전유진 교수님, 이경준 교수님, 이제희 교수님, 여인규 교수님, 김기영 교수님, 정준범 교수님, 이승현 교수님, 정석근 교수님, 박상율 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

실험실에 들어와서 아버지같이 듬직하셨던 만철 오빠, 세심하게 챙겨주시던 주상 오빠, 저한테 “에프 킬라”라는 별명을 붙여주신 용재 오빠, 말은 험하게 하셨지만 행동은 다정하셨던 익수 오빠, 창영이 형 그리고 친오빠 같은 승현 오빠, 영민이 형, 일찌감치 실험실을 떠난 리나 언니, 무뚝뚝하지만 석사 실험 때 많은 도움이 되어주신 동휘 오빠, 그리고 실험실에 들어오신 지는 얼마 안됐지만, 실험이나 그 외적인 부분에서 많은 상담 해주셨던 소현 언니, 의사소통은 좀 힘들었지만 친절한 dharan에게도 감사드립니다. 그리고 학부 선배이면서 석사 동기인 민선 언니, 경미 언니는 뭐라고 표현 할 수 없을 정도로 감사합니다. 언니들이 함께 했기에 제가 실험실에서 이렇게 오랜 시간을 버틸 수 있었던 것 같습니다. 또한, 부족한 저를 선배로 두고, 졸업 시즌에 들어와 많은 실험을 알려주지 못하고 더 오래 함께 하지 못해 아쉬운 하리, 진국이 오빠께도 고맙고 미안합니다. 그리고 다른 실험실이지만 많은 도움을 주셨던 문휴 오빠, 유철 오빠, 은아 언니, 나래 언니, 숙경 언니, 효원 언니, 제가 실험실 물품 주문 담당할 동안 이것저것 잘 챙겨주셨던 한 대준 대리님, 2013년 석사 동기인 은성 오빠, 원보 오빠, 현수 오빠, 서영 언니, 혜나 언니 모두 고생 많으셨습니다. 아직 졸업하지 못한 동기 분들도 고생 많았고, 얼마 남지 않았으니 힘내라는 말을 전하고 싶습니다.

떨어져 있지만 변치 않고 제가 지치고 힘들어 할 때마다 조금만 더 힘내라고 다독여 준 친구들 혜선, 정선, 지희 고맙고 사랑한다, 짧은 시간동안 많이 정들었던 민정 언니, 의숙 언니, 진영이, 그리고 은철쌤도 많이 보고 싶을 거예요. 마지막으로 공부하겠다고 멀리 집 떠난 딸을 끝까지 믿고 격려해주고 아낌없이 지원해 주신 엄마, 아빠, 인생 선배이자 사회 선배로 믿음직한 상담사였던 오빠, 고맙고 사랑합니다. 앞으로도 열심히 노력하고, 더 든직한 사람이 되겠습니다. 감사합니다!

