

넙치(*Paralichthys olivaceus*) 수정란 유래 효소가수분해물의 기능성 바이오소재로서의 기초적 생리활성 평가

김병훈 · 오수현¹ · 신찬성¹ · 허성표^{2*}

제주국립대학교 기당해양과학원, ¹(주)브이에스신비, ²제주국립대학교 해양생명과학과

Preliminary Biological Activity Evaluation of Enzymatic Hydrolysates from Fertilized Eggs of Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* as a Functional Bioactive Resource

Byeong-Hoon Kim, Su-Hyeon Oh¹, Chan Seong Shin¹ and Sung-Pyo Hur^{2*}

Kidang Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju 63333, Republic of Korea

¹R&D Center, VS Shinbi Co. Ltd., Jeju 63243, Republic of Korea

²Department of Marine Life Science, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

This study investigated the potential industrial use of fertilized eggs of olive flounder *Paralichthys olivaceus*, an aquaculture by-product, as a functional bioactive ingredient. High-performance liquid chromatography confirmed that proteins isolated from fertilized eggs were identical when analyzed in two solvents [100% dimethyl sulfoxide and methanol:water (2:3, v/v)]. Enzymatic hydrolysates of egg protein showed no inhibitory effects on elastase or tyrosinase activity. However, ABTS⁺ radical scavenging assays revealed concentration-dependent antioxidant activity. In addition, evaluation of nitric oxide (NO) inhibition and cytotoxicity using the MTT assay demonstrated that the protein suppressed NO production in a dose-dependent manner, with negligible cytotoxicity. These findings highlight the antioxidant and anti-inflammatory potential of enzymatic hydrolysates derived from fertilized olive flounder eggs. As a sustainable fish by-product, these hydrolysates may serve as promising functional materials for industrial applications.

Keywords: ABTS⁺ radical scavenging, By-product, HPLC, MTT assay, Olive flounder fertilized eggs

서론

지구상 약 80%의 생물이 해양에 서식하고 있으며 최근 해양 생물을 이용한 소재 및 원료 개발이 이루어지고 있다. 해양 생물 자원은 풍부한 생리활성물질과 고부가가치 성분을 함유하고 있어 의약, 식품, 화장품 등 다양한 산업 분야에서 원료로 활용될 수 있는 잠재력이 크다. 특히, 해양 소재는 육상 생물에 비해 독창적인 대사 경로와 극한 환경 적응 특성을 바탕으로 기능성이 우수한 물질을 생산하는 것으로 알려져 있다(Cong et al., 2022; Karthikeyan et al., 2022; Barzkar et al., 2024). 특히, 해양 유래 소재는 육상 자원과 차별화된 기능성을 지니며, 지속가능성과 친환경성을 바탕으로 한 해양 유래 소재를 이용한 새로운 산

업 원료 개발에 대한 수요가 증가하고 있다(Galla et al., 2012; Ghosh et al., 2022). 해양 소재를 활용한 원료 개발은 인류 건강 증진과 고부가가치 산업 창출을 위해 필수적이며, 최근 바이오 소재 산업의 핵심 분야로 빠르게 성장하고 있다. 세계적으로 해양 소재를 이용한 원료 개발 연구는 다양한 분야에서 이루어지고 있으며, 해양생물에서 유래된 단백질, 펩타이드, 지질은 항산화, 항염증, 항암, 항균 등 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며(Sung et al., 2012; Shahidi and Ambigaipalan, 2015), 해양 미세조류 유래 오메가-3 지방산과 아스타잔틴의 상용화 연구(Shah et al., 2016), 해양 무척추동물 유래 콘드로이틴 및 키토산의 식품 및 의약 원료로의 활용(Vázquez et al., 2013; Ustyuzhanina et al., 2020) 등 해양 소재를 이용한 다양

*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3428 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: hursp@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.2026.0027>

Korean J Fish Aquat Sci 59(1), 27-35, February 2026

Received 20 October 2025; Revised 7 December 2025; Accepted 20 January 2026

저자 직위: 김병훈(박사), 오수현(연구원), 신찬성(연구소장) 허성표(교수)

한 원료 개발 연구가 이미 보고되고 있다. 우리나라 역시 연근해 수산자원과 양식업의 발전에 따라 해양 바이오산업으로의 확장이 요구되고 있으며, 특히 어류 부산물의 고부가가치 활용이 중요한 과제로 부각되고 있다(Kim et al., 2012). 어류의 가공, 유통, 판매 과정에서 발생하는 부산물은 머리, 껍질, 뼈, 내장, 비늘 등과 같은 부수적인 부위들을 포함한다(Coppola et al., 2021). 과거 이러한 부산물들은 산업적으로 활용되지 못하고 폐기되거나, 어류 또는 애완동물의 사료, 비료 제작 등 사용에 한계가 있었으나, 최근 부산물에 내 포함된 단백질, 지방, 미네랄, 콜라겐 등 다양한 고부가가치 유용 인자들을 자원화하여 새로운 바이오소재로 활용하기 위한 노력들이 이루어지고 있다. 어류 부산물로부터 단백질 가수분해물, 콜라겐, 젤라틴 등을 추출하여 기능성 소재원으로 활용한 연구도 활발히 보고되고 있다(Kim and Mendis, 2006; Ngo and Kim, 2013; Guedes et al., 2022; Canovas et al., 2024).

어류의 난(알, egg)과 정자(sperm)를 포함하고 있는 생식소 역시 어류 부산물에 포함된다. 다만 어류 알 부산물의 경우 내장과 함께 내장류 부산물로 분류되며, 선행 연구에 따르면 어류 내장류 부산물은 전체 부산물의 약 5–15%를 차지하는 것으로 보고된다(Islam and Peñarubia, 2021). 국내 연간 어류 부산물 발생량은 약 49만톤 수준으로 추정되며, 이를 기준으로 할 경우 내장류 부산물은 연간 약 2.45–7.35만톤에 이를 것으로 추산된다. 특히 수정란(fertilized egg)에는 초기 배아 발달 및 부화 후 초기 자어(larva)의 성장 및 발달을 위한 영양 공급원으로 이용되는 난황(yolk)을 포함하고 있으며, 난황전구체단백질인 비텔로제닌(vitellogenin)을 포함한 알부민(albumin), 콜라겐(collagen), 리보리텔린(lipovitellin), 포스비틴(phosvitin) 등의 단백질과 지질(인지질, 중성 지질), 비타민, 미네랄 등이 포함되어 자어의 성장 및 발달을 위한 영양분으로 이용된다(Kim et al., 2021). 레시틴(lecithin)은 계란의 난황 내 풍부한 인지질(phospholipid)의 한 종류로 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)을 다량 함유하고 있어 강력한 항산화 효과를 통해 세포 보호, 노화 방지, 뇌 기능 개선 및 혈관 건강 증진 등의 효과가 보고되며, 특히 유화제(emulsifier)로서의 특성이 뛰어나 식품, 의약품, 화장품 등의 바이오소재원으로 이용된다(Zhang et al., 2021).

어류는 무지개 송어(rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*) (Topuz et al., 2021)와 청어(sea cucumber *Holothuria forskali*) (Pascual-Silva et al., 2025) 알에서 레시틴이 확인되었으며, 이외에도 boal *Wallago attu* 오일(Molla et al., 2015), 고등어(chub mackerel *Scomber japonicus*) 근육(Asaduzzaman and Chun, 2015), 연어(atlantic salmon *Salmo salar*) 머리(Malplate et al., 2019)에서 추출된 레시틴에 대한 항산화 효과가 보고된다. 이 밖에도 어류의 난은 무기질, 오메가-3 지방산(eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid) 등을 함유하고 있으며 난황 유래 펩타이드에 의한 항산화 및 면역 조절 활성도 보고

된다(Liu et al., 2018).

넙치(olive flounder *Paralichthys olivaceus*)는 우리나라에서 가장 중요한 양식 어종 중 하나로 우리나라 양식생산량의 50% 이상을 차지하는 경제적 가치가 큰 양식 어종이다. 국내 넙치 생산은 대부분 양식에 의해 이루어지며, 연간 약 4만톤 이상의 생산량을 유지하고 있다. 이러한 넙치 양식은 종묘장에서 생산된 수정란을 기반으로 이루어지며, 넙치 수정란의 연중 생산 기술이 확립으로 안정적인 공급이 가능하다. 그러나 대량으로 생산되는 넙치 수정란 중 종묘 생산에 이용되지 않는 알은 산업적으로 활용되지 못한 채 일부 폐기되고 있는 실정이며, 이를 기능성 소재로 활용하기 위한 연구는 아직 미흡한 수준이다. 하지만 다른 어종의 알에서 확인된 유용성분들을 고려할 때 넙치 수정란 역시 다양한 유용성 인자들이 포함되어 있는 것으로 생각되며, 이는 넙치 수정란이 다양한 기능성 소재로서 이용될 수 있는 잠재력을 갖는 것으로 추정할 수 있다.

따라서 본 연구는 넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물의 생리활성에 대한 기초 정보를 확보하고, 기능성 바이오소재로서의 활용 가능성을 탐색하기 위한 기초 단계 연구로 수행되었다. 이를 위해 항산화 활성과 함께 피부 노화 및 색소 형성과 관련된 생물학적 지표로 활용되는 elastase 및 tyrosinase 억제 활성을 평가하였으며, 염증 반응 조절 가능성을 확인하기 위하여 Nitric oxide (NO) 생성 억제 효과를 분석하였다. 또한, 생리활성 평가 결과의 해석과 향후 기능성 소재로의 활용 가능성을 검토하기 위해 세포 독성 평가를 수행하였다.

재료 및 방법

넙치 수정란 확보

실험에 사용된 넙치 수정란은 제주특별자치도 제주시 영어조합법인 해연에서 자연 산란된 수정란 500 g을 분양받았으며, 효소 가수분해물 획득 이전까지 초저온 냉동고(-80°C)에 보관하였다.

넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물 획득

단백질 가수분해물 획득을 위하여 수정란은 분쇄하였으며 phosphate buffered saline (pH 7.4)에 현탁 후 원심분리(7,000 rpm, 4°C, 30 min)하였다. 분리된 상층액은 ethanol과 시료 4:1 비율로 현탁하여 1시간 교반(55°C, 100 rpm)하여 침전물을 획득하였다. 침전물로부터 가수분해물을 획득하기 위하여 침전물을 증류수에 현탁 후 alcalase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 1:100의 비율로 첨가하여 4시간동안 교반(55°C, 100 rpm)하였다. 가수분해물의 효소 불활성화를 위해 95°C에서 20분 처리 후 원심분리(7,000 rpm, 30 min)하여 상등액을 획득하였으며, 분리된 상등액은 동결건조(-50°C, 0.5–4 × 10⁻⁴ mbar, 48 h)하여 최종 넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물을 획득하였다.

넙치 수정란 유래 단백질의 HPLC 분석

넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물의 성분 분포 특성을 분석하기 위해 HPLC (high performance liquid chromatography) 분석을 수행하였다(Table 1, Table 2). HPLC 분석은 어류 알 유래 단백질 가수분해물 및 어류 부산물 유래 단백질 가수분해물 성분 특성 평가에 활용된 선행연구들을 참고하였다(Chalamaiah et al., 2010; Naghdi et al., 2023). HPLC 분석은 Waters e2695 Separations Module과 Waters 2998 PDA Detector (Waters Corporation, Milford, MA, USA)를 사용하여 정성 분석하였다. 수정란 유래 단백질 가수분해물을 2가지 용매[dimethyl sulfoxide 100% (Daejung Chemicals & Metals Co. Ltd., Siheung, Korea), methanol (Samchun Pure Chemical Co. Ltd., Pyeongtaek, Korea):H₂O=2:3]에 녹인 후, 0.45 µm PTFE syringe filter (Cytiva, Amersham, UK)로 여과하여 나온 여액을 사용하였다. 분석에는 주입 부피 5 µL, 컬럼온도 40°C, 이동상은 0.1% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich Co.) 가 함유된 증류수(용매 A)와 acetonitrile (Avantor Performance Materials Inc., Radnor, PA, USA) (용매 B)을 사용하여 acetonitrile의 비율을 2-100%로 높여주면서 70분 조건으로 용매를 컬럼에 통과시켰다.

Elastase inhibition assay

Elastase inhibition 분석은 단백질 가수분해물의 피부 노화 관련 생리활성을 평가하는데 활용되는 방법으로 해양 유래 단백

Table 1. HPLC chromatographic conditions of the control factors

Control factor	Conditions
Injection volume	5 µL
Column	Kromasil 100-5C ₁₈ (250×4.6 mm) (AkzoNobel, Bohus, Sweden)
Mobile phase	A: 0.1% Trifluoroacetic in H ₂ O, B: Acetonitrile
Flow rate	1.0 mL/min
Column temperature	40°C
Wavelength	275.0 nm
Detector	Waters 2998PDA (Waters Corporation, Milford, MA, USA)
Separation module	Waters 2695 (Waters Corporation)

HPLC, High performance liquid chromatography.

Table 2. Gradient elution condition for HPLC analysis

Time (min)	Flow (mL/min)	A (%)	B (%)
0	1	98	2
60	1	0	100
70	1	0	100

HPLC, High performance liquid chromatography.

질 가수물의 elastase 억제 활성을 평가한 선행 연구들을 참고하였다(Kim and Wijesekara., 2010; Oh et al., 2020). Elastase inhibition 분석을 위해 0.1 M tris-HCl buffer (pH 8.0) (Biosesang Co. Ltd., Seongnam, Korea)와 기질로 6.25 mM SANA [N-succ(Ala)3-p-nitroanilide] (Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였으며, 실험에 사용된 효소는 돼지 췌장에서 채취된 elastase (porcine pancreatic elastase) (Sigma-Aldrich Co.) 0.1 mg/mL를 사용하였다. 96 well plate (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria)에 농도별(25, 50, 100 µg/mL) sample 20 µL를 분주 후 SANA 13 µL와 buffer 117 µL 혼합액, elastase 10 µL와 buffer 40 µL의 혼합액을 분주하여 25°C에서 15분간 반응하여 410 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 효소 저해능력은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었으며, 이때 사용된 대조군으로는 oleanolic acid (1 mg/mL, stock) (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다.

Elastase inhibition activity (%)

$$= [1 - (A \text{ sample} - A \text{ blank}) / (A \text{ control} - A \text{c-blank})] \times 100$$

이때 A sample은 410 nm 파장에서 sample와 반응용액의 흡광도, A blank는 410 nm 파장에서 sample의 흡광도, A control와 Ac-blank는 각각 410 nm 파장에서 반응용액의 흡광도와 sample 및 elastase를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도를 의미한다.

Tyrosinase inhibition activities

Tyrosinase inhibition 분석은 어류 알 유래 단백질 및 단백질 가수분해물의 미백 관련 기능성 평가에 활용된 선행연구를 참고하였다(Lee et al., 2017; Kang et al., 2025). Elastase inhibition 분석을 위해 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) (Biosesang Co. Ltd.), mushroom tyrosinase (2,500 units/mL, enzyme) (Sigma-Aldrich Co.) 효소를 사용하였으며, 2 mM 농도의 L-tyrosine [L-3(Hydroxyphenyl)alanine] (Sigma-Aldrich Co.)과 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) (Biosesang Co. Ltd.)를 각각 기질과 용매로 사용하였다. 96 well plate에 농도별(25, 50, 100 µg/mL) sample 20 µL를 분주 후 L-tyrosine (70 µL)과 buffer (60 µL)의 혼합액과 mushroom tyrosinase (5 µL)과 buffer (45 µL) 혼합액을 각각 분주한 후 37°C에서 30분간 반응시켜 492 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 효소 저해능력은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었으며, 대조군으로는 arbutin (Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였다.

Tyrosinase inhibition activity (%)

$$= [1 - (A \text{ sample} - A \text{ blank}) / (A \text{ control} - A \text{c-blank})] \times 100$$

이때 A sample은 492 nm 파장에서 sample과 반응용액의 흡광도, A blank는 492 nm 파장에서 sample의 흡광도, A control과 Ac-blank는 각각 492 nm 파장에서 반응용액의 흡광도

와 sample과 tyrosinase를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도를 의미한다.

ABTS⁺ 라디칼 소거 활성

ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] cation radical 소거 활성 실험은 항산화 특성 평가에 일반적으로 사용되는 방법으로 어류 알 및 어류 부산물 유래 단백질 가수분해물의 항산화 특성 평가에 대한 선행 연구를 참고하였으며(Lee et al., 2017; Hwang et al., 2024), Re et al. (1999)의 방법을 응용하여 분석을 수행하였다. ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하기 위해 7.0 mM ABTS (Sigma-Aldrich Co.) 용액과 2.5 mM potassium persulfate (Sigma-Aldrich Co.)를 1:1로 혼합하여 상온 및 암소에서 16시간 동안 반응시켜 ABTS⁺ radical을 형성시켰다. ABTS⁺ 용액은 700 nm 파장에서 흡광도가 0.78 ± 0.02 가 되도록 ethanol로 희석 후 실험에 사용하였다. 농도별(25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$)로 희석한 시료를 96 well plate에 각각 20 μL 와 희석한 ABTS⁺ 용액 180 μL 을 혼합하여 상온에서 30분간 반응 후 microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 700 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 butyl hydroxy toluene (BHT; Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였으며, radical 소거 활성은 다음의 식을 이용하여 %로 계산하였다.

Radical scavenging activity (%)

$$= [1 - \text{Abs sample} - \text{Abs blank}] / \text{Abs control} \times 100$$

이때 Abs control은 700 nm 파장에서 ABTS⁺의 흡광도, Abs sample는 700 nm 파장에서 시료와 ABTS⁺ 반응액의 흡광도, Abs blank는 700 nm 파장에서 시료 자체의 흡광도를 의미한다.

세포 독성 평가(MTT assay) 및 nitric oxide (NO) 생성 저해능

넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물의 세포 독성 평가 및 NO 생성 저해능 평가는 기질의 항염증 활성 및 세포 독성 평가에 일반적으로 사용되는 방법으로 해양 부산물 유래 단백질 가수분해물의 염증 조절 효과에 대한 선행 연구를 참고하였다(Hwang et al., 2024). 세포 독성 평가는 MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl]-tetrazolium bromide] assay를 이용하였다. 24 Well plate에 RAW 264.7 cell을 2.0×10^5 cells/well로 접종하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 전배양하였다. 전배양된 cell 100 ng/mL의 lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich Co.)가 포함된 배지로 교환한 후 각각 sample을 농도별(12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 MTT (Tokyo Chemical Industry CO. Ltd., Tokyo, Japan)시약을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3-4시간 동안 반응시킨 후 배지를 제거하였다. 여기에 DMSO

(dimethyl sulfoxide)를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 후 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 다음과 같은 식을 이용하여 %로 계산하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \text{Abs sample} / \text{Abs control} \times 100$$

NO 생성 저해능 평가를 위해 murine macrophage cell line RAW 264.7 cell (ATCC, Manassas, VA, USA)을 사용하였으며, 세포는 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin과 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Life Technologies Limited, Plymouth, UK) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기(Thermo Fisher Scientific Inc.)에서 배양하여, 2일 간격으로 계대 배양하였다. NO 생성 저해능 측정을 위해 배양된 RAW 264.7 cell을 2.0×10^5 cells/well로 24 well plate (SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)에 접종하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 18시간 동안 전배양하였다. 전배양된 cell을 100 ng/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후 각각 sample을 농도별(12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 생성된 NO의 양을 측정하기 위해 96 well plate에 세포 상등액 100 μL 와 griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) (Sigma-Aldrich Co.) 100 μL 를 혼합하여 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였으며 sodium nitrite (NaNO₂; Sigma-Aldrich Co.)를 표준물질로 사용하여 작성한 표준 검정 곡선을 통해 정량하였으며, 각 시료의 NO 생성 저해율이 50%일 때의 시료 농도(IC₅₀)를 구하였다. 양성대조구로는 2-amino-4-picoline (5 μM) (Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였다.

통계처리

본 연구에서 진행한 모든 실험은 3반복 실시하였으며 통계 분석은 Excel software (version 2019; Microsoft Corp., Redmond, WA, USA)를 사용하여 student's t-test를 실시하여 평가하였다. 대조군과 실험군 사이의 통계적 검정 후 P 값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 의미 있음을 판단하였다.

결과 및 고찰

넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물의 HPLC 분석

넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물의 HPLC 분석 결과, 가수분해물 10 mg/mL (DMSO)에서 10.53분과 16.73분대에서 피크가 확인되었고, 가수분해물 10 mg/mL (MeOH:H₂O=2:3)에서는 10.56분과 16.77대에서 피크가 확인되었다(Fig. 1). 서로 다른 두 용매 조건에서 분석된 수정란 유래 단백질 가수분

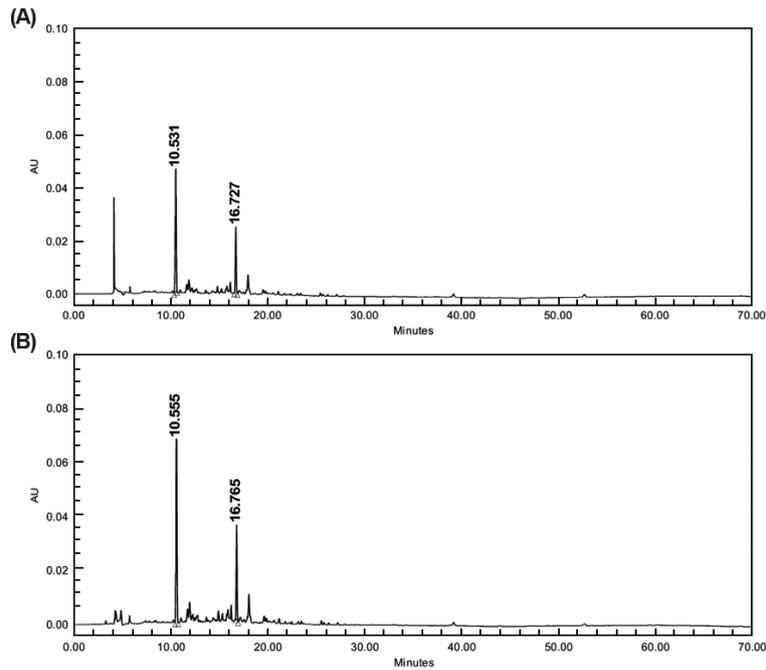


Fig. 1. HPLC chromatogram of enzymatic hydrolysates from fertilized eggs of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. A, Protein 10 mg/mL (DMSO); B, Protein 10 mg/mL (MeOH:H₂O=2:3); HPLC, High performance liquid chromatography; DMSO, Dimethyl sulfoxide.

해물은 유사한 피크 패턴 및 retention time을 나타내었으며 이는 분석 단백질이 용매 조건에 영향을 받지 않고 안정적으로 존재함을 의미하며, 용매 조건에 따른 단백질 가수분해물 종류 및 구조적인 차이가 없는 것으로 생각된다. 하지만 본 실험에서 각각의 피크에 대한 단백질 가수분해물을 명확하게 규명하지 못하였으며, 향후 가수분해물의 구성 및 종류를 규명하기 위한 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) 또는 아미노산 분석의 추후 연구가 필요하다.

Elastase inhibition activity와 Tyrosinase inhibition activities

넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물의 elastase inhibition activity 측정결과 대조군에서는 25 µg/mL 그룹에서 8.9%, 50 µg/mL 그룹과 100 µg/mL 그룹에서는 각각 26.3%와 38.4%의 효소 억제 활성이 나타났으나, 가수분해물이 처리된 실험구에서는 모든 농도에서 효소 억제 활성이 거의 나타나지 않았다 (Fig. 2A).

Tyrosinase inhibition activities에서도 대조군에서는 25 µg/mL, 50 µg/mL, 그리고 100 µg/mL 그룹에서 각각 20.3%, 25.4% 그리고 43.5%의 효소 억제 활성이 나타났으나, 가수분해물이 처리된 실험구에서는 모든 농도에서 효소 억제 활성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 2B). 이러한 결과는 시료 내 활성 성분의 농도, 분자량 분포, 또는 효소의 기질 접근성에 영향을

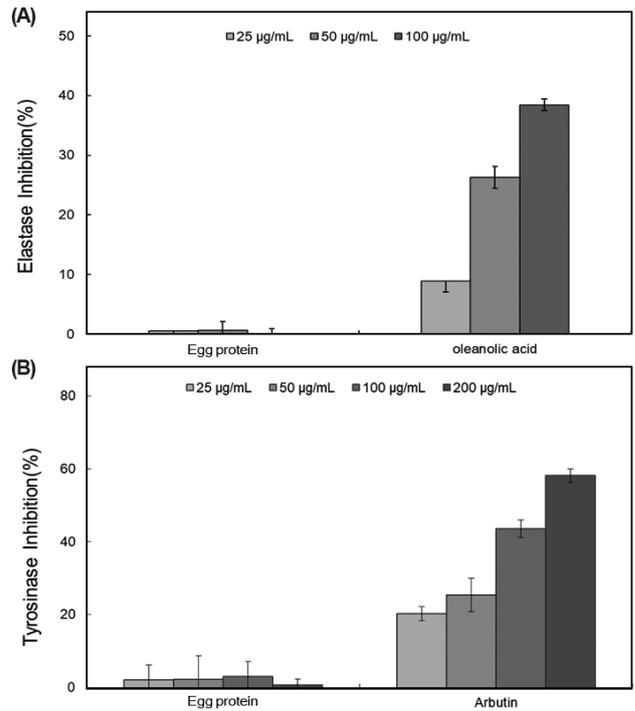


Fig. 2. Elastase inhibition activities (A) and tyrosinase inhibition activities (B) of enzymatic hydrolysates from fertilized eggs of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean±SD of triplicate experiments.

미치는 구조적인 요인 등에 의한 것으로 생각된다. 일반적으로 elastase와 tyrosinase 저해 활성은 페놀성 화합물이나 proline, leucine, histidine과 같은 특정 아미노산 잔기를 포함한 저분자 펩타이드 또는 플라보노이드류에서 강하게 나타나는 것으로 알려진다(Melzig et al., 2001; Schurink et al., 2007; Liyanaarachchi et al., 2018). 하지만 본 연구에 사용한 넙치 수정란 유리 단백질 가수분해물에 의한 활성이 나타나지 않은 것은 상대적으로 단백질 가수분해물의 분자량의 크기 때문으로 추정된다. 그러므로 넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물의 분자량 크기 규명 및 저분자 펩타이드 분획 확보를 통한 추가 elastase 및 tyrosinase 활성 실험이 필요할 것으로 사료된다. 또한 넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물이 직접적인 효소 저해보다 피부 미백 및 항노화 효과와 관련된 다른 경로에서 활성 가능성이 있으므로 이에 대한 연구가 필요하다.

Kang et al. (2025)의 연구에서도 넙치 알에서 단백질 가수분해물을 획득하였으며 tyrosinase 억제 활성을 조사하였으며, 본 연구와 비교하였을 때 상대적으로 높은 억제 활성도를 보였다. 이는 가수분해물을 획득하기 위한 실험 방법의 차이로 생각된다. 본 연구에서는 에탄올에 의한 용매 침전 후 효소 가수분해를 통해 넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물을 획득하였으며, 이 방법은 단백질에 대한 선택성은 상대적으로 낮으나, 공정이 단순하고 시료 손실이 적어 생리활성 탐색을 위한 단백질 가수분해물 확보에 적합하다. 반면, Kang et al. (2025)은 pH 조절을 기반으로 한 등전점 용해/침전 공정을 통해 단백질을 선택적으로 분리한 후 효소 가수분해를 수행하였으며, 이 과정에서 회수된 단백질 가수분해물은 상대적으로 높은 순도를 나타내어 기능성 측면에서 더 우수한 효과를 보인 것으로 판단된다. 따라서 향후 넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물의 기능성 효과를 극대화할 수 있는 가수분해 공정의 최적화에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

ABTS⁺ 라디칼 소거활성

넙치 수정란 유래 단백질의 ABTS⁺ 라디칼 소거활성 조사 결과 양성대조군 BHT 그룹에서는 25 µg/mL 그룹 59.2%, 50 µg/mL 그룹 74.6%, 100 µg/mL 그룹 95.1%, 200 µg/mL 그룹 99.9%, 400 µg/mL 그룹에서는 100.0%의 라디칼 활성을 나타냈으며, 넙치 유래 단백질 처리 그룹에서는 25 µg/mL 그룹 41.8%, 50 µg/mL 그룹 56.0%, 100 µg/mL 그룹 67.8%, 200 µg/mL 그룹 85.4%, 그리고 400 µg/mL 그룹에서 100.0%의 라디칼 활성을 나타냈다(Fig. 3).

ABTS⁺ 라디칼 소거활성 조사 결과 넙치 수정란 유래 단백질이 대조구에 비해 다소 낮은 항산화 활성 능력을 보였으나 저농도보다 고농도에서 활성이 증가하는 농도 의존적인 항산화 활성 능력을 갖는 것으로 나타났다.

어류 부산물에서의 항산화 활성 효과는 멧태(Alaska pollock *Theragra chalcogramma*)에서 프레임 단백질 가수분해물

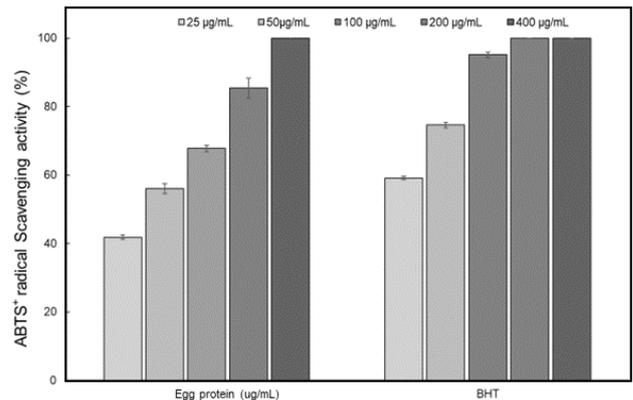


Fig. 3. ABTS⁺ radical scavenging activities of enzymatic hydrolysates from fertilized eggs of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. The data are expressed as a percentage and represent the mean±SD of triplicate experiments. ABTS⁺, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

(frame protein hydrolysate)에 의한 ABTS⁺ 및 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거 활성이 보고되었으며(Je et al., 2007), 연어 부산물에서는 특정 아미노산 서열을 갖는 옥타펩타이드(octapeptide)가 강력한 항산화 활성을 나타내는 것으로 나타났다(Ahn et al., 2014). Topuz et al. (2021)의 연구 결과에 따르면 무지개 송어 알에 포함된 레시틴을 계란 난황 내 레시틴과 비교한 결과 송어 알에서의 레시틴이 더 높은 인지질 함량과 안정적인 유흥 능력을 가지고 있으며, 이러한 특징이 송어 알 레시틴의 항산화 활성을 뒷받침하는 기능적 요소임을 제시하였다. Lee et al. (2025)는 넙치 수정란 추출물이 DPPH 라디칼 소거능을 향상시키며, 이는 넙치 수정란 추출물에 엽산, 콜라겐, 루테인, 코엔자임 Q10, 비타민 E 등의 복합적인 항산화 물질들이 함유되어 있기 때문으로 추정하고 있다. 이 밖에도 Yoon et al. (2018)과 Kang et al. (2025) 역시 넙치를 포함한 어류 알 분리단백질의 가수분해물에 의한 항산화 활성능을 보고되었다. Kang et al. (2025)의 연구에서 넙치 알 분리단백질 가수분해물의 항산화 활성능이 본 실험보다 높은 활성능이 관찰되었으며, 이러한 차이는 단백질 가수분해물 획득 방법의 차이에 따른 것으로 생각된다. 선행연구들을 통해 넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물은 항산화 효과를 갖는 물질들을 포함하고 있으며, 단백질 가수분해물 획득 방법의 차이가 항산화 효과에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 그러므로 넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물 내 주요 항산화 인자 규명 및 효과적인 가수분해물 획득을 위한 후속 연구가 필요하다.

세포 독성 평가(MTT assay) 및 Nitric oxide (NO) 생성 저해능

넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물 처리 농도에 따른 세포 독성 실험 결과 모든 그룹에서 세포독성은 나타나지 않았으며

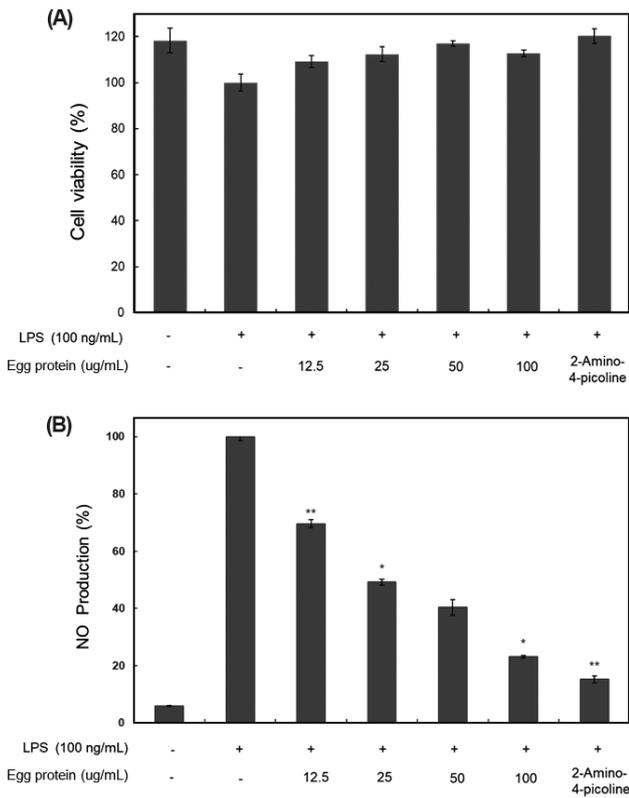


Fig. 4. Effects of enzymatic hydrolysates from fertilized eggs of olive flounder *Paralichthys olivaceus* on cell viability (A) and NO production (B) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus enzymatic hydrolysates from fertilized eggs of olive flounder for 24 h. For the positive control, 2-amino-4-picoline (5 μ M) was used. The data represents the mean \pm SD of triplicate experiments (*P<0.05, **P<0.01). NO, Nitric oxide; LPS, Lipopolysaccharide.

(Fig. 4A), 단백질 가수분해물 처리 농도에 따른 NO 생성량을 조사한 결과 LPS (100 ng/mL) 단독 처리군과 비교하여 넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물은 NO 생성을 12.5 μ g/mL 그룹 30.4%, 25 μ g/mL 그룹에서 50.8%, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL 그룹에서는 각각 59.6%, 76.9% 저해하여 농도 의존적인 결과를 나타냈고, IC50 값은 45.7 μ g/mL이었다(Fig 4B).

넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물의 항염 효과와 유사한 연구 결과는 다른 어류의 알 부산물 연구 결과에서도 보고된다. Gilljam et al. (2023)은 미수정 연어 알 추출물이 첨가된 알긴산염 및 나노 셀룰로오스 드레싱(alginate and nanocellulose dressings) 사용을 통해 염증 표지 감소 및 피부 재생 능력 향상, 조직 손상 감소, 그리고 IL-1 β 분비 감소 등을 확인하였으며, 이를 통해 미수정 연어 알 추출물이 피부 조직의 염증 및 산화 스트레스를 감소시킬 수 있는 강력한 드레싱이 될 수 있음을 시사하였다. Rod-In et al. (2019)는 도루묵(Japanese sand-

fish *Arctoscopus japonicus*)의 난 추출물을 통하여 LPS-유도 RAW264.7 macrophage에서 NO 생성량 감소와 NF- κ B 및 MAPK 신호 억제를 통한 염증 관련 유전자(NOS, COX-2, IL-1 β , IL-6 그리고 TNF- α) 발현 저해를 관찰하였으며, 이를 통해 도루묵 난 추출물이 항 염증 조절 의약품 개발 가능성을 시사하였다. 본 연구에서도 넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물은 RAW cell에서 독성은 나타나지 않았으며, LPS로 유도된 RAW cell에서의 NO 생성량 저해 효과가 나타났다. 이는 넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물의 독성이 낮아 인체 적용 가능성이 높아 향후 건강 식품, 의약품 및 화장품 소재원으로서 잠재적 개발 가치가 있을 것으로 사료된다.

본 연구를 통해 넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물을 분리할 수 있었으며 획득된 가수분해물의 항산화 활성 평가 결과 농도 의존적인 라디칼 소거능을 통한 항산화 효과를 확인하였다. 항염증 활성 평가를 통해 넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물 처리에 의한 NO 생성 억제와 세포독성이 거의 관찰되지 않아 소재로서의 안전성을 확인하였다. 이러한 결과들은 넙치 수정란 유래 단백질 가수분해물의 생리활성 특성을 제시를 통해 기존에 전량 폐기되던 넙치 수정란을 기능성 화장품, 식품 등의 기능적 소재원으로서 활용할 수 있는 기초적인 자료를 제공하며, 추후 성공적인 산업화를 위한 명확한 단백질 성분 분석 및 다양한 생리활성 특성 연구가 필요할 것이다.

사 사

이 논문은 제주특별자치도의 재원으로 제주테크노파크 “2025년도 지역주도형 과학기술 R&D사업” 지원을 받아 수행되었으며, 2025년도 교육부 및 제주도의 재원으로 제주RISE 센터의 지원을 받아 수행된 지역혁신중심 대학지원체계(RISE) (2025-RISE-17-001)의 결과입니다.

References

Ahn CB, Kim JG and Je JY. 2014. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. *Food Chem* 147, 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.136>.

Asaduzzaman AKM and Chun BS. 2015. Quality characteristics of lecithin isolated from deoiled mackerel (*Scomber japonicus*) muscle using different methods. *J Ind Eng Chem* 21, 620-626. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.03.029>.

Barzkar N, Sukhikh S and Babich O. 2024. Study of marine microorganism metabolites: New resources for bioactive natural products. *Front Microbiol* 14, 1285902. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1285902>.

Canovas B, Garrido MD and Penaranda I. 2024. Valorization of common ling (*Molva molva*) roe by-products for the elaboration of a food seasoning: Effect of drying method. *LWT* 208, 116705. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116705>.

- Chalamaiah M, Rao GN, Rao DG and Jyothirmayi T. 2010. Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. Food Chem 120, 652-657. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.057>.
- Cong M, Pang X, Zhao K, Song Y, Liu Y and Wang J. 2022. Deep-sea natural products from extreme environments: Cold seeps and hydrothermal vents. Mar Drugs 20, 404. <https://doi.org/10.3390/md20060404>.
- Coppola D, Lauritano C, Palma Esposito F, Riccio G, Rizzo C and de Pascale D. 2021. Fish waste: From problem to valuable resource. Mar Drugs 19, 116. <https://doi.org/10.3390/md19020116>.
- Galla NR, Pamidighantam PR, Akula S and Karakala B. 2012. Functional properties and *in vitro* antioxidant activity of roe protein hydrolysates of *Channa striatus* and *Labeo rohita*. Food Chem 135, 1479-1484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.098>.
- Ghosh S, Sarkar T, Pati S, Kari ZA, Edinur HA and Chakraborty R. 2022. Novel bioactive compounds from marine sources as a tool for functional food development. Front Mar Sci 9, 832957. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.832957>.
- Gilljam KM, Stenlund P, Standoft S, Andersen SB, Kaaber K, Lund H and Bryn KR. 2023. Alginate and nanocellulose dressings with extract from salmon roe reduce inflammation and accelerate healing of porcine burn wounds. J Burn Care Res 44, 1140-1149. <https://doi.org/10.1093/jbcr/irad006>.
- Guedes M, Vieira SF, Reis RL, Ferreira H and Neves NM. 2022. Potent antioxidant and anti-inflammatory bioactivities of fish roe-derived extracts. Innov Food Sci Emerg Technol 82, 103198. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103198>.
- Hwang JW, Lee SG and Kang H. 2024. Antioxidant, antibacterial properties of novel peptide CP by enzymatic hydrolysis of *chromis notata* by-products and its efficacy on atopic dermatitis. Mar Drugs 22, 44. <https://doi.org/10.3390/md22010044>.
- Islam MJ and Peñarubia OR. 2021. Seafood waste management status in Bangladesh and potential for silage production. Sustainability 13, 2372. <https://doi.org/10.3390/su13042372>.
- Je JY, Park PJ and Kim SK. 2007. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. Food Res Int 38, 45-50. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.07.005>.
- Kang SI, Yoon IS, Kim MK and Heu MS. 2025. Food functionality and bioactivity of enzyme hydrolyzates prepared using protein isolates from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roes. Korean J Fish Aquat Sci 58, 1-14. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2025.0001>.
- Karthikeyan A, Joseph A and Nair BG. 2022. Promising bioactive compounds from the marine environment and their potential effects on various diseases. J Genet Eng Biotechnol 20, 14. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00290-4>.
- Kim IS, Park HJ, Jeong BY and Moon SK. 2021. Comparison of proximate, amino acid, n-3 fatty acid and mineral compositions of fish roes of eight species. Korean Fish Aquat Sci 54, 825-834. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0825>.
- Kim SK and Mendis E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts - a review. Food Res Int 39, 383-393. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.10.010>.
- Kim SK, Ngo DH and Vo TS. 2012. Marine fish-derived bioactive peptides as potential antihypertensive agents. Adv Food Nutr Res 65, 249-260. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416003-3.00016-0>.
- Kim SK and Wijesekera I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. J Funct Foods 2, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.01.003>.
- Lee GW, Yoon IS, Kang SI, Lee SG, Kim JI, Kim JS and Heu MS. 2017. Functionality and biological activity of isolate processed water generated during protein isolate preparation of fish roes using an isoelectric solubilization and precipitation process. Korean J Fish Aquat Sci 50, 694-706. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0694>.
- Lee SE, Park HJ, Han DH, Lim ES, Lee HB, Yoon JW, Park CO, Kim SH, Oh SH, Lee DG, Pyeon DB, Kim EY and Park SP. 2025. *Paralichthys olivaceus* egg extract improves porcine oocyte quality by decreasing oxidative stress. J Anim Sci Technol 67, 325-341. <https://doi.org/10.5187/jast.2024.e26>.
- Liu YF, Oey I, Bremer P, Carne A and Silcock P. 2018. Bioactive peptides derived from egg proteins: A review. Crit Rev Food Sci Nutr 58, 2508-2530. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1329704>.
- Liyanaarachchi GD, Samarasekera JKRR, Mahanama KRR and Hemalal KDP. 2018. Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals. Ind Crops Prod 111, 597-605. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.019>.
- Malaplate C, Poerio A, Huguette M, Soligot C, Passeri E, Kahn CJ, Linder M, Arab-Tehrany E and Yen FT. 2019. Neurotrophic effect of fish-lecithin based nanoliposomes on cortical neurons. Mar Drugs 17, 406. <https://doi.org/10.3390/md17070406>.
- Melzig MF, Löser B and Ciesielski S. 2001. Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. Pharmazie 56, 967-970.
- Molla MR, Asaduzzaman AKM, Mia AR, Zeb MA and Uddin MS. 2015. Extraction and characterization of oil and lecithin from boal (*Wallago attu*) fish. J Food Nutr Res 3, 661-666. <https://doi.org/10.12691/jfnr-3-10-7>.
- Naghdi S, Rezaei M, Tabarsa M and Abdollahi M. 2023. Fish protein hydrolysate from sulfated polysaccharides extraction residue of tuna processing by-products with bioactive and functional properties. Global Chall 7, 2200214. <https://doi.org/10.1002/gch2.202200214>.
- Ngo DH and Kim SK. 2013. Marine bioactive peptides as

- potential antioxidants. *Curr Protein Pept Sci* 14, 189-198. <https://doi.org/10.2174/13892037113149990041>.
- Oh JY, Lee HG, Je JG, Wang L, Kim HS and Jeon YJ. 2020. Evaluation of cosmeceutical properties of fish skin by-product hydrolysates collected during surimi manufacturing process. *Korean J Fish Aquat Sci* 53, 297-307. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0297>.
- Pascual-Silva C, Alemán A, Montero MP and Gómez-Guillén MC. 2025. Storage stability and antioxidant properties of vegetable and marine lecithin liposomes loaded with sea cucumber (*Holothuria forskali*) and musky octopus (*Eledone moschata*) protein hydrolysates. *Food Bioprocess Technol* 18, 4826-4842. <https://doi.org/10.1007/s11947-025-03752-6>.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26, 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- Rod-In W, Monmai C, Lee SM, Jung SK, You S and Park WJ. 2019. Anti-inflammatory effects of lipids extracted from *Arctoscopus japonicus* eggs on LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Mar Drugs* 17, 580. <https://doi.org/10.3390/md17100580>.
- Schurink M, van Berkel WJ, Wichers HJ and Boeriu CG. 2007. Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. *Peptides* 28, 485-495. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.11.023>.
- Shah MR, Liang Y, Cheng JJ and Daroch M. 2016. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high-value commercial products. *Front Plant Sci* 7, 531. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>.
- Shahidi F and Ambigaipalan P. 2015. Novel functional food ingredients from marine sources. *Curr Opin Food Sci* 2, 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.12.009>.
- Sung NY, Jung PM, Yoon M, Kim JS, Choi JI, Jeong HG, Lee JW and Kim JH. 2012. Anti-inflammatory effect of sweetfish-derived protein and its enzymatic hydrolysate on LPS-induced RAW264.7 cells via inhibition of NF- κ B transcription. *Fish Sci* 78, 381-390. <https://doi.org/10.1007/s12562-011-0461-5>.
- Topuz OK, Aygün T, Alp AC, Yatmaz HA, Torun M and Yerlikaya P. 2021. Characterization and emulsifying properties of aquatic lecithins isolated from processing discard of rainbow trout fish and its eggs. *Food Chem* 339, 128103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128103>.
- Ustyuzhanina NE, Bilan MI, Dmitrenok AS, Silchenko AS, Grebnev BB, Stonik VA, Nifantiev NE and Usov AI. 2020. Fucosylated chondroitin sulfates from the sea cucumbers *Paracaudina chilensis* and *Holothuria hilla*: Structures and anticoagulant activity. *Mar Drugs* 18, 540. <https://doi.org/10.3390/md18110540>.
- Vázquez JA, Rodríguez-Amado I, Montemayor MI, Fraguas J, del Pilar González M and Murado MA. 2013. Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: Characteristics, applications and eco-friendly processes: A review. *Mar Drugs* 11, 747-774. <https://doi.org/10.3390/md11030747>.
- Yoon IS, Kang SI, Park SY, Cha JW, Kim DY, Kim JS and Heu MS. 2018. Physicochemical properties of alkaline-insoluble fractions recovered from bastard halibut *Paralichthys olivaceus* and skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* roes by alkaline solubilization. *Korean Fish Aquat Sci* 51, 230-237. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0230>.
- Zhang X, Chelliappan B, SR and Antonysamy M. 2021. Recent advances in applications of bioactive egg compounds in nonfood sectors. *Front Bioeng Biotechnol* 9, 738993. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.738993>.