

The Physiological Responses of Spotted Seahorse *Hippocampus kuda* to Low-pH Water

Cheonman Park, Ki-hyuk Kim, Hye-Na Moon and In-Kyu Yeo*

Department of Marine life Science, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Received June 1, 2017 / Revised July 3, 2017 / Accepted July 4, 2017

The rising concentration of atmospheric carbon dioxide is causing ocean acidification and global warming. The seahorse is an important species in marine ecosystems and fishery markets, however, their populations have recently decreased due to ocean acidification. As a result, we examined changes in the physiological responses of the spotted seahorse *Hippocampus kuda* when it was exposed to acidic sea water (pH 6.0, 6.5, and 7.0) and normal seawater (pH 8.0 as the control) over a period of 15 days. As the pH decreased, the seahorses' body weight and length also decreased. Components in body of ash, the crude lipids and crude proteins also differed significantly with changes in pH, due to stress caused by the seahorses' exposure to the acidic water conditions. The superoxide dismutase levels were significantly lower in the pH 6.0 and 6.5 groups than they were in the pH 7.0 and pH 8.0 groups. However, the catalase and glutathione levels were significantly higher in the acidic sea water groups. We suggest that decreasing the pH level of rearing water induces a stress response in *H. kuda*, damaging their ability to maintain their homeostasis and energy metabolism. Antioxidant enzymes are generally sensitive to acidic stress; in this study, the antioxidant activity was significantly affected by the pH level of the rearing water. These results indicate that physiological stress, induced by exposure to acidification, induces an antioxidant reaction, which can reduce general components in the body and the growth of *H. kuda*.

Key words : Antioxidative activity, ocean acidification, pH stress, physiological response, spotted seahorse

서 론

해마류(Genus *Hippocampus*)는 큰가시고기목(Order Gasterosteiformes), 실고기과(Family Syngnathidae)에 속하는 어류로서 온대 및 열대해역의 산호초가 많고 수심이 얇은 연안에 주로 서식하며, 산란기에는 수컷의 육아낭에 암컷이 알을 넘겨주어 수컷이 출산하는 특이한 산란방식을 가지고 있다[8, 20]. 현재 우리나라에서는 해마(*H. coronatus*), 가시해마(*H. histrix*), 산호해마(*H. mohnikei*), 점해마(*H. trinaclatus*) 및 복해마(*H. kuda*)가 서식하는 것으로 알려져있다[13]. 일반적으로 해마는 아시아에서 널리 이용되고 있는 한약재료(Medicinal herbs)로서 특히 중국에서는 성기능 개선 및 간과 기관지의 치료에 효과적인 한약재료로 여겨져 다방면에서 이용되고 있다[31]. 이 외에 북미와 유럽에서는 해마를 관상용으로서 주로 사육하고 있으며, 건조 해마를 이용한 꿀동품 및 기념품으로

개발하여 판매되고 있다[5]. 해마의 기능성에 대한 기존의 연구에 따르면, 해마 가수분해물이 항암 작용, 항산화 작용 및 퇴행성관절염 치료 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[28, 32, 43, 44].

그러나 최근 해마의 자원량은 기후변화에 따른 해양 산성화를 비롯한 환경변화에 의하여 급격히 감소되고 있는 추세이다[35]. 해양 산성화는 산업 발달에 따른 무분별한 화석원료 사용으로 인하여 지구 온난화 현상이 유발되어 해양의 CO₂농도의 증가로 인하여 발생하게 된다[34]. 이러한 해양 산성화는 수중의 pH 농도를 저하시켜 생태계 변화를 야기할 뿐 아니라 해양 동물의 서식지를 파괴하여 개체 수를 감소시키는 것으로 보고되고 있다[14]. 현재 해양환경 변화에 따른 해마의 성장에 관한 연구는 염분 내성, 광도에 따른 성장률 변화, 수온에 따른 성장 및 생존율 변화 등이 진행되고 있는 실정이다[9, 16, 17, 22]. 또한, 우리나라에 서식하고 있는 것으로 알려진 복해마(*Hippocampus kuda*)의 경우, 동남아시아의 수중 pH 저하로 인해 서식지인 mangrove가 파괴됨으로 해마의 개체수가 감소하는 것으로 보고되고 있으나, 해양 산성화가 해마의 자원량 감소에 직접적인 영향을 미치는지에 대한 연구는 미미한 실정이다[33].

더욱이 일반적으로 해마류는 유동성이 미약한 정착성 수산 동물로서 호흡에 민감하여 수중의 pH의 저하는 생리적 스트

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3474, Fax : +82-64-756-3493

E-mail : ikyuo99@jejunu.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.

레스 요인으로 작용하게 될 가능성이 큰 것으로 여겨지고 있기 때문에 본 연구에서는 수중의 pH 저하가 우리나라 연안에 서식하는 멸종 위기 종인 복해마(*H. kuda*)에 미치는 생리적 영향을 조사하기 위하여, 낮은 pH의 환경수 조건에서 복해마(*H. kuda*)를 사육하여 체내 조성 변화 및 항산화 효소 활성 변화에 대하여 조사를 실시하였다.

재료 및 방법

실험어 및 실험조건

본 실험에서 사용한 실험어는 전남 여수시 돌산읍에 위치한 수산종묘 배양장으로부터 양식되어진 복해마(*H. kuda*)를 분양받아 실험 직전 약 2주일간의 순치 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 사육수조는 0.5 m × 0.5 m × 0.5 m, 250 l 용량의 일체형 수조를 이용하였으며, 실험군은 자연해수(pH 8.0)를 대조군으로 하여 pH 6.0, 6.5 및 pH 7.0의 조건으로 설정하였다. 실험기간 동안 모든 수조는 수온 23.0°C, 염분 35.0 psu 및 용존산소(DO) 7.0 ppm을 유지하였다. 수조의 여과는 순환 여과식 여과 장치를 사용하였고 사육환경의 변화 방지를 위해 별도의 여과재를 사용하지 않았고, 실험기간 동안 정지하여 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 해수의 pH조건은 10 M HCl을 이용하여 각각 pH 6.0, 6.5, 7.0 및 pH 8.0으로 각각 설정하였다. 실험 수조 셋팅 후, 평균 전장 11.45±2.51 cm, 및 체중 5.83±2.84 g인 복해마(*H. kuda*) 20마리를 약 6시간에 걸쳐 서서히 실험군의 pH조건이 되도록 조정된 각각 4개의 사육수조에 크기 및 무게가 유사하도록 분리하여 수용한 후 실험에 이용하였다. 각 pH 조건 별 사육은 15일간 실시하였으며, 사육기간 동안 먹이는 공급하지 않았다. 사육 기간 동안의 pH 변화는 pH측정기(HACH, HQ11dpH meter)를 사용하여 3시간 간격으로 측정하였으며, 사육 후의 체중과 전장은 0.01%의 2-phenoxyethanol로 마취한 후 측정하였다.

체내 조성 변화

사육수의 pH변화에 따른 복해마(*H. kuda*)의 체내조성의 변화는 사육 종료 후 동결건조하여 회분은 직접회화로법(550°C, 6시간)으로, 조단백은 자동 조단백분석기(Kjeltec System 2300, Sweden)로 각각 분석하였으며, 조지방 Soxhlet 추출장치(Soxhlet Heater System C-SH6, Korea)를 이용하여 분석하였다[10].

항산화 활성 분석

사육수의 pH변화에 따른 복해마(*H. kuda*)의 항산화 활성 변화에는 실험어로부터 간을 적출한 후 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) 및 glutathione (GSH) 활성을 분석하여 조사하였다. SOD 활성의 분석은 sigma사의 kit에 포함되어 있는 buffer로 간을 균질화하여 10,000 g에서 10분간 원심분리

하여 얻은 상층액을 이용하여 SOD Assay kit (Sigma-aldrich)의 방법에 따라 진행하였다. CAT 활성 분석은 BioVision사의 kit에 포함되어있는 assay buffer 0.2 ml로 간을 균질화한 뒤 10,000 g에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하여 catalase activity Assay kit (BioVision)의 방법에 따른 분석을 실시하였다. GSH 활성 분석은 5% 5-sulfosalicylic acid (SSA) 0.5 ml를 첨가하여 간을 균질화 후, 8,000 g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하여 total glutathione quantification kit (Dojindo)의 방법에 따라 분석을 실시하였다.

통계처리

본 실험의 혈액성상분석을 제외한 모든 결과는 SPSS version 21 (SPSS Inc., USA)을 활용하여 One-way ANOVA-test로 통계 분석을 실시하였다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test 사후분석을 실시하여 측정하였으며, $p < 0.05$ 에서 유의성을 판단하였다.

결 과

체중 및 전장의 변화

각기 다른 pH농도 환경에서 복해마(*H. kuda*)를 사육 후 어체 무게의 변화를 확인한 결과, 15일간의 사육 실험 종료 후 초기 평균 무게 5.83±2.84 g의 실험어는 pH 8.0, 7.0, 6.5 및 pH 6.0의 농도 감소에 따라 10.72±1.18 g, 5.37±3.69 g, 4.22±3.17g, 및 3.01±3.33 g으로 나타났다(Fig. 1A, $p < 0.05$). 이처럼 대조군인 pH 8.0에서는 실험기간 동안 복해마(*H. kuda*)의 성장이 이루어졌으나, pH가 저하함에 따라 성장이 둔화되거나 오히려 크기가 감소하는 결과를 나타내었다. 전장의 변화에 있어서도 초기 평균 전장 11.45±2.51 cm이었던 실험어가 각각 pH 8.0, 7.0, 6.5 및 6.0의 pH농도의 감소에 따라 14.83±0.75 cm, 11.43±2.86 cm, 10.28±3.26 cm 및 9.27±3.16 cm으로 나타나(Fig. 1B), 체중의 변화와 유사한 결과를 나타내었다. 본 실험에 사용한 복해마(*H. kuda*)의 경우 크기가 작아 혈액 추출에 어려움이 있어 실험 전 구간의 복해마(*H. kuda*)의 혈액을 합하여 분석한 결과 pH의 저하에 따라 다른 혈액 성분에서 calcium 농도가 농도의존적으로 낮아지는 결과를 나타내었다(data not shown). 혈액의 calcium 농도는 생체 내 대사 활성 및 성장과 깊은 관련이 있는 것으로 알려져 있어 본 실험에서 나타난 pH의 저하에 따른 복해마(*H. kuda*)의 크기 변화가 혈액 내 calcium 농도의 저하와도 연관성이 있을 것으로 판단된다.

체내 조성 변화

해마류는 기능성 식품으로 사용되고 있기 때문에 사육에 따른 체내의 성분변화가 자원으로써 가치를 결정 짓는데 중요한 요인으로 인식되고 있다. 따라서 본 연구에서는 사육 환경수의 pH 변화 따른 체내 조성 변화를 분석하였다.

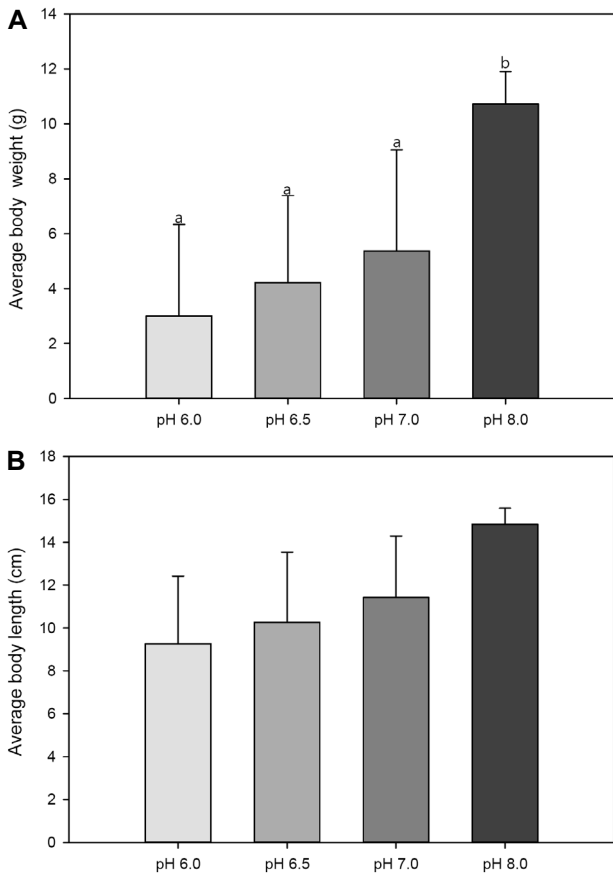


Fig. 1. (A) Changes in average body weight of spotted seahorse (*H. kuda*) maintained to different pH concentrations at pH 6.0, 6.5, 7.0 and 8.0 for 15 days. Each point represents the mean value \pm SD of three replicates. The initial average body weight is 5.83 ± 2.84 g. Values with different superscript are significantly different ($p < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test. (B) Changes in average body length of spotted seahorse (*H. kuda*) maintained to different pH concentrations at pH 6.0, 6.5, 7.0 and 8.0 for 15 days. Each point represents the mean value \pm SD of three replicates. The initial average body length is 11.45 ± 2.51 cm.

pH 변화에 따른 복해마(*H. kuda*) 체내 회분은 pH 8.0, 7.0, 6.5 및 pH 6.0 실험군에서 각각 $21.87 \pm 0.35\%$, $19.34 \pm 0.92\%$, $17.08 \pm 0.98\%$ 및 $16.62 \pm 0.74\%$ 로 나타나 대조군인 pH 8.0 실험군보다 pH 6.0 및 pH 6.5 실험군에서 유의적으로 낮은 수치를 나타냈으며, pH 저하에 따라 체내 회분의 양은 농도의존적으로 감소하는 결과를 나타내었다(Fig. 2, $p < 0.05$). 체내의 조지방은 pH 8.0, 7.0, 6.5 및 pH 6.0 실험군에서 각각 $1.04 \pm 0.02\%$, $1.01 \pm 0.00\%$, $1.00 \pm 0.00\%$ 및 $1.01 \pm 0.00\%$ 로, pH가 저하할수록 조지방 함량 또한 유의적으로 감소되는 것으로 관찰되었다(Fig. 3, $p < 0.05$). 조단백은 pH 8.0, 7.0, 6.5 및 pH 6.0 실험군에서 각각 $82.34 \pm 0.73\%$, $79.81 \pm 1.76\%$, $75.75 \pm 1.22\%$ 및 $71.21 \pm 1.20\%$ 로 나타나 다른 체내 조성의 결과와 마찬가지로 pH가

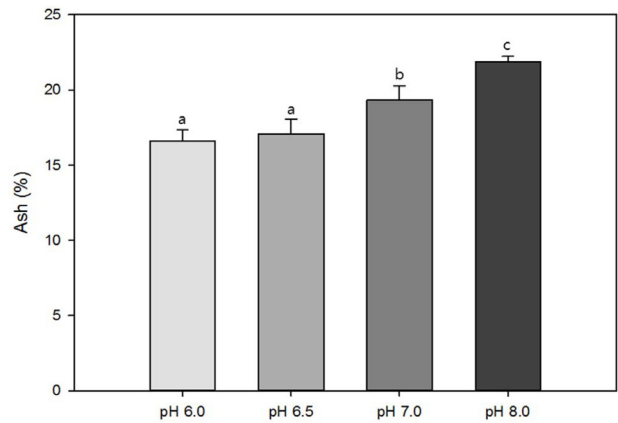


Fig. 2. Changes in ash of spotted seahorse (*H. kuda*) maintained to different pH concentrations at pH 6.0, 6.5, 7.0 and 8.0 for 15 days. Each point represents the mean value \pm SD of three replicates. Values with different superscript are significantly different ($p < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

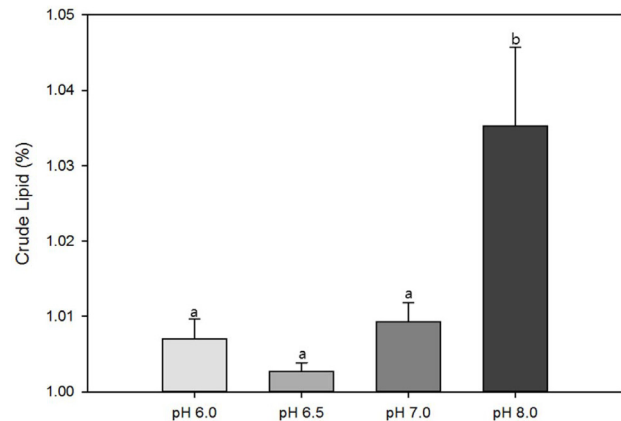


Fig. 3. Changes in crude lipid of spotted seahorse (*H. kuda*) maintained to different pH concentrations at pH 6.0, 6.5, 7.0 and 8.0 for 15 days. Each point represents the mean value \pm SD of three replicates. Values with different superscript are significantly different ($p < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

저하함에 따라 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 4, $p < 0.05$). 이상에서와 같이 pH 저하에 따라 체내 조성인 회분, 조지방 및 조단백은 농도의존적으로 감소하는 결과를 나타내어 pH 저하가 복해마(*H. kuda*)의 체내 조성변화에도 밀접한 관련성을 가지는 것으로 여겨진다.

항산화 활성의 변화

스트레스에 의해 변화하는 것으로 알려진 SOD 활성은 대조군인 pH 8.0 실험군에서 91.23 ± 5.20 U/ml로 나타났으며, pH 6.0 실험군에서 39.11 ± 28.94 U/ml, pH 6.5 실험군에서 64.99 ± 5.18 U/ml 그리고 pH 7.0 실험군에서 82.77 ± 11.39 U/

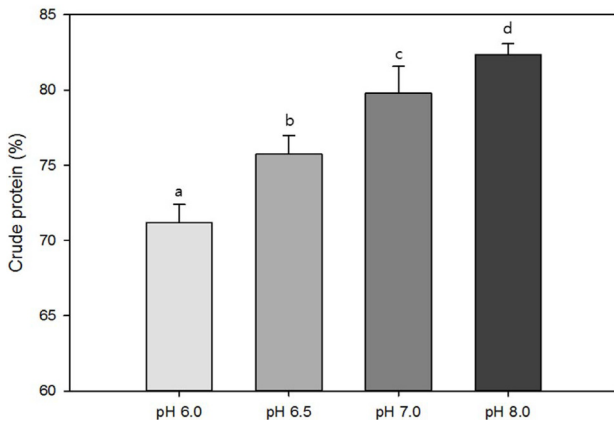


Fig. 4. Changes in crude protein of spotted seahorse (*H. kuda*) maintained to different pH concentrations at pH 6.0, 6.5, 7.0 and 8.0 for 15 days. Each point represents the mean value \pm SD of three replicates. Values with different superscript are significantly different ($p < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

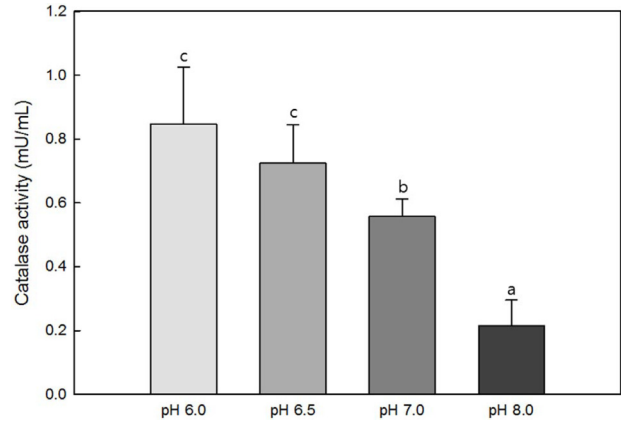


Fig. 6. Changes in catalase activity of spotted seahorse (*H. kuda*) maintained to different pH concentrations at pH 6.0, 6.5, 7.0 and 8.0 for 15 days. Each point represents the mean value \pm SD of three replicates. Values with different superscript are significantly different ($p < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

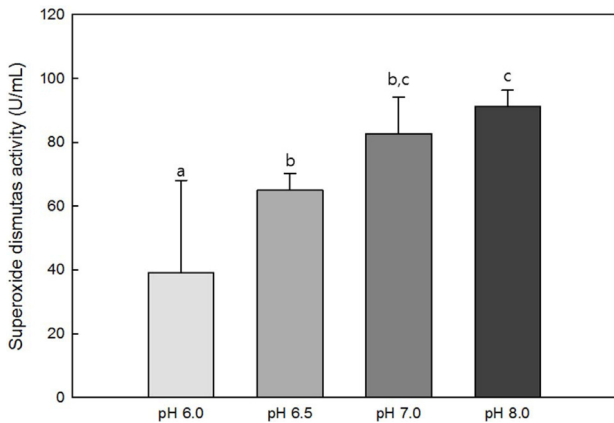


Fig. 5. Changes in superoxide dismutase of spotted seahorse (*H. kuda*) maintained to different pH concentrations at pH 6.0, 6.5, 7.0 and 8.0 for 15 days. Each point represents the mean value \pm SD of three replicates. Values with different superscript are significantly different ($p < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

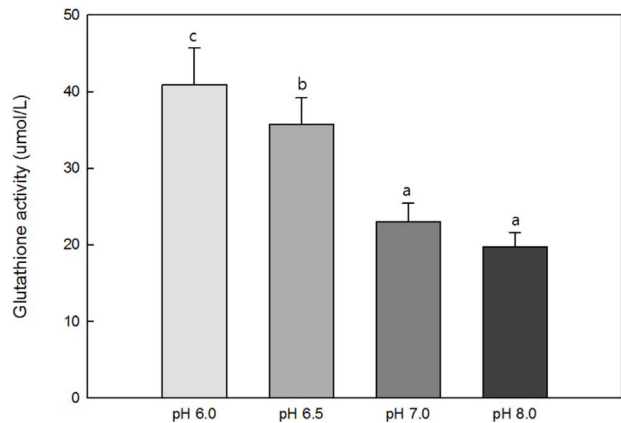


Fig. 7. Changes in glutathione activity of spotted seahorse (*H. kuda*) maintained to different pH concentrations at pH 6.0, 6.5, 7.0 and 8.0 for 15 days. Each point represents the mean value \pm SD of three replicates. Values with different superscript are significantly different ($p < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

ml로 나타났다(Fig. 5, $p < 0.05$). 이처럼 pH 6.0 및 pH 6.5 실험군에서 SOD 활성이 대조군인 pH 8.0 실험군 및 pH 7.0 실험군에 비하여 낮은 수치를 나타내었고, pH 농도 저하에 따라 유의적으로 감소하는 경향이 나타났다(Fig. 5, $p < 0.05$). 그러나, CAT 활성은 pH 6.0 실험군에서 0.85 ± 0.18 mU/ml, pH 6.5 실험군에서 0.72 ± 0.12 mU/ml, pH 7.0 실험군에서 0.56 ± 0.06 mU/ml 및 pH 8.0 실험군에서 0.22 ± 0.08 mU/ml로 각각 나타나 대조군인 pH 8.0 실험군을 제외한 나머지 실험군에서 모두 활성이 높았으며, pH 농도 저하에 따라 유의적으로 증가하는 경향이 나타났다(Fig. 6, $p < 0.05$). 또한, GSH 활성은 각 실험군 별로 pH 6.0 실험군에서 40.93 ± 4.78 μ mol/l, pH 6.5 실험군에

서 35.71 ± 3.46 μ mol/l, pH 7.0 실험군에서 23.04 ± 2.41 μ mol/l 및 pH 8.0 실험군에서 19.66 ± 1.97 μ mol/l로 나타나 pH 6.0 및 pH 6.5 실험군에서 대조군인 pH 8.0 실험군에 비하여 GSH 활성이 현저하게 높은 수치를 나타내었고, pH 농도 저하에 따라 유의적으로 증가하는 경향이 나타났다(Fig. 7, $p < 0.05$). 이상에서와 같이 항산화 효소활성은 SOD에서는 pH 저하에 따라 농도의존적으로 감소하지만, 이와 상반되게 CAT 및 GSH에서는 pH저하에 따라 농도의존적으로 증가하는 결과가 나타내었다(Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7, $p < 0.05$).

고 찰

수중 환경의 산성화는 해양생물에 많은 영향을 야기하며, 대서양 연어 자어(*Salmo salar*), 굴(*Crassostrea virginica*) 및 일본진주조개(*Pinctada fucata*) 등의 어류 및 패류의 성장 억제물 야기한다고 보고되고 있으며, 이러한 원인으로는 수산생물의 신진대사 및 산소수송기능의 저하에 따른 것으로 알려져 있다 [3, 4, 15, 29]. 또한 pH의 저하는 대서양 연어(*Salmo salar*)의 후각기능 장애, Na^+ , K^+ -ATPase activity 억제 및 삼투조절 장애를 유발하여 성장 및 번식을 억제한다[21, 24]. 본 연구에서도 pH의 저하에 따라 복해마(*H. kuda*)의 성장이 감소하였고, 특히 낮은 pH 6.0에서는 오히려 평균 크기가 줄어드는 경향을 나타내었다(Fig. 1A, Fig. 1B, $p < 0.05$) 이러한 결과는 pH저하가 해마의 신진대사 저하 및 삼투조절 장애 등에 의한 것으로 여겨지며, 본 연구에서 추가적으로 조사된 혈중 calcium 농도의 저하 현상과도 관련성이 깊을 것으로 판단된다(data not shown). 해양생물의 혈중 calcium은 혈액 내 수소이온농도와 길항작용을 통해 산소호흡에 관여한다. 주로 아가미와 신장에서 이온조절이 이루어지기 때문에 혈중 calcium과 같은 이온 농도의 변화는 해양동물의 아가미와 신장의 손상뿐만 아니라 혈액 내 삼투압 조절 능력의 손상을 의미한다[36]. 따라서 본 실험에서의 pH의 농도 저하에 따라 복해마(*H. kuda*)의 혈중 calcium 농도 감소가 동반되는 신진대사 및 삼투조절의 장애에 의한 스트레스 유발로 인하여 복해마(*H. kuda*)의 성장 저해가 나타난 것으로 여겨진다.

한편 일반적으로 해마는 기능성 식품으로 이용되거나 한약 재료로서 이용되고 있기 때문에 가치를 평가하는데 조단백, 조지방 및 회분 등과 같은 체내 조성성분의 변화는 매우 중요한 요인으로 작용한다. 수산 생물은 수중 환경의 변화에 따라 체내 항상성을 일정하게 유지하는데, 환경이 급격하게 변화할 경우 항상성을 유지하는 과정 중 체내에 스트레스가 야기되어 체내 조단백, 조지방 및 회분 등의 조성성분이 변화하는 것으로 알려져 있다[2]. 기존의 연구에서 수중의 염분, 산소 및 중금속 등의 다양한 환경변화에 따른 스트레스로 인하여 복족류(*Limacina helicina*), 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 및 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)의 체내 조성성분이 감소되는 것으로 보고되었으며[11, 13, 17], 이러한 현상은 급격한 외부 환경의 변화에서 신경계와 내분비계가 스트레스 자극을 받아 catecholamine 및 glucocorticoid가 분비되어 지방을 분해하고, 단백질 이화작용 촉진을 통해 새로운 형태의 에너지를 공급하기 때문에 유발되는 것으로 보고하고 있다[25, 30, 37]. 이와 유사하게 낮은 pH 환경조건에 갯지렁이(*Perinereis aibuhitensis*)를 노출시킨 결과 체내 단백질과 지방이 감소하는 것으로 보고 되고 있어 본 연구에서 나타난 복해마(*H. kuda*)의 낮은 pH에 노출에 따른 체중 저하 및 체내 조성의 감소 현상은 pH 환경 변화에 의한 스트레스 자극으로 인하여 체내의 단백질과 지방을

에너지원으로 사용하였기 때문에 유발된 것으로 추정된다 [23]. 복해마(*H. kuda*)의 체내 조성 성분 중 지방에 포함되어 있는 6-hexadecenoic acid, 9-hexadecenoic acid 및 12-octadecenoic acid 등은 항혈전 기능에 효과적이며, 단백질 유래의 분리 peptide는 관절염치료에 사용할 수 있는 것으로 알려져 있다 [39, 40]. 본 연구에서는 pH의 저하에 따른 체내의 조단백과 조지방의 수치가 pH농도의 저하에 따라 유의적으로 감소되는 결과를 나타내어(Fig. 3, Fig. 4, $p < 0.05$) 상기의 기능성 물질들의 감소 또한 유도될 것으로 추정된다. 또한 무기질은 전립선 비대증 및 발기부전 치료에 사용될 수 있다고 보고되고 있는데[41], 본 실험에서 pH 저하에 따라 복해마(*H. kuda*)의 체내 무기질량을 나타내는 회분량 또한 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2, $p < 0.05$). 이와 유사하게 무기질로 조성된 껍질을 가진 복족류(*Limacina helicina*)에서는 pH의 저하로 인하여 껍질의 용해가 나타난 것으로 보고되고 있으며[17], 진피층이 아닌 외골격으로 피부가 조성된 복해마(*H. kuda*) 또한 pH가 저하된 사육수 노출에 따라 무기질로 이루어진 골격이 용해되어 무기질이 감소한 것으로 추정된다. 이상의 결과로 미루어 보았을 때 복해마(*H. kuda*) 체내의 조단백, 조지방 및 회분의 감소는 생존율 저하, 병원균 감수성 증가 및 해양 기능성 소재로서의 상품 가치 하락으로 이어질 수 있을 것으로 추정된다.

한편, 다양한 환경적 요인 및 화학적 요인에 의해 해양 어류가 스트레스를 받을 경우 생성되는 활성산소(oxygen free radical)는 여러 가지 질병을 유발하는 원인이므로, 활성산소를 무해한 물질로 환원하기 위해 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT)와 같은 항산화 효소 및 glutathione (GSH)과 같은 항산화 물질이 존재한다[6]. SOD는 체내에서 발생한 superoxide radical (O_2^-)을 H_2O_2 와 O_2 ($2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$)로 치환시키고, 이 치환된 H_2O_2 를 CAT가 생체에 무해한 인자인 O_2 와 H_2O ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$)로 분해하여 활성산소의 유해성을 저해시키는 것과 같이 효소가 순차적으로 작용하는 것으로 알려져 있다[7]. 본 연구에서는 15일간 일반적인 해수의 pH인 8.0보다 낮은 pH의 수중 환경에서 복해마(*H. kuda*)를 사육했을 때 미치는 생리적 영향을 확인하기 위하여 항산화 효소 활성을 분석한 결과, pH가 저하됨에 따라 SOD활성은 대조군에 비해 유의적으로 낮은 수치를 나타내었으나, CAT 및 GSH는 유의적으로 증가하는 것으로 나타내었다(Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7, $p < 0.05$). 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 경우 48시간 동안 아질산에 노출 시, 급성 스트레스로 인하여 SOD활성이 증가되나, 40일 동안 붕어(*Carassius auratus*)가 페놀에 노출 되었을 경우에는 본 실험 결과와 동일하게 오히려 SOD활성이 감소하는 것으로 보고되었다[12, 42]. 또한 20일간 붕어(*Carassius auratus*)를 카드뮴에 노출 후 항산화 효소활성은 SOD활성이 초기에 증가하였다가 시간이 경과함에 따라 감소하며, CAT가 증가하는 것으로 보고되었다[32]. 이와 같이 활성산소가 과다하

게 발생하는 시점부터 활성산소를 무해한 물질로 환원하기 위해 SOD의 활성이 급격히 증가하지만, 변화된 환경에 적응하면 SOD의 활성이 지속적으로 감소한다고 보고되고 있다 [26, 27]. 따라서 본 연구에서도 pH의 저하로 야기된 체내의 활성산소를 1차적으로 SOD가 H₂O₂ 와 O₂로 치환 후 감소하였고, 2차적으로 CAT가 무해한 물질로 분해하기 위하여 활성이 증가한 것으로 추정된다. GSH는 간에서 만들어지는 아미노산이 결합된 펩타이드로 산화적 손상으로부터의 보호에 중추적인 역할을 하는 강력한 항산화 물질로서 친전자성 물질, 활성산소 및 과산화지질을 무독화하는 과정에 이용된다[38]. 조피볼락(*Sebastes schlegelii* Hilgendorf) 및 금붕어(*Carassius auratus*)가 화학적인 환경변화요인에 의해 스트레스를 받을 경우 GSH가 증가되는 것이 관찰되었는데[1, 19], 본 연구에서도 pH 농도 저하에 의하여 발생된 활성산소를 제거하기 위한 방어 기작으로서 CAT와 함께 GSH가 활성화되어 pH가 낮아질수록 GSH의 활성이 높게 나타난 것으로 판단된다(Fig. 6, Fig. 7, $p < 0.05$). 이와 같은 장기간의 낮은 pH 환경은 복해마(*H. kuda*)에 환경 스트레스 요인으로 작용하여 어체 내에서 활성산소가 유발될 수 있다는 것을 암시한다.

이상의 결과들을 종합하여 보면, 복해마(*H. kuda*)가 pH의 산성화에 노출될 경우 낮은 pH가 환경 스트레스로 작용하여 항산화 효소 활성 변화와 체내 조성성분의 저하 및 성장률 저하가 유발 되었으며, 결국 해양 기능성 추출제로서의 가치 하락을 유도할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 제주대학교 학술진흥연구 지원사업에 의하여 연구되었습니다.

References

- Baeck, S. K. 2012. Combined effect of Cu and temperature on physiological and biochemical change of rock fish, *Sebastes schlegelii*. Master. Thesis, Pukyong National University, Pusan, Korea.
- Brett, J. R. and Groves, T. D. D. 1979. Physiological energetics, pp. 279-352. In: Hoar, W. S., Randall, D. J. and Brett, J. R.(eds.) Fish physiology. Academic press, New York.
- Bonga, S. W. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* **77**, 591-625.
- Calabrese, A. and Davis, H. C. 1966. The pH tolerance of embryos and larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull.* **131**, 427-436.
- Choi, Y. U., Rho, S., Jung, M. M., Lee, Y. D. and Noh, G. A. 2006. Parturition and early growth of Crowned Seahorse, *Hippocampus coronatus* in Korea. *J. Aquaculture* **19**, 109-118.
- Dalton, D. A., Langeberg, L. and Treneman, N. C. 1993. Correlations between the ascorbate glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. *Physiol. Plant.* **87**, 365-370.
- Forman, H. J. and Fridovich, I. 1973. Superoxide dismutase: a comparison of rate constant. *Arch. Biochem. Biophys.* **158**, 396.
- Foster, S. J. and Vincent, A. C. J. 2004. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *J. Fish Biol.* **65**, 1-61.
- Hilomen Garcia, G. V., Delos Reyes, R. and Garcia, C. M. H. 2003. Tolerance of seahorse *Hippocampus kuda* (Bleeker) juveniles to various salinities. *J. Appl. Ichthyol.* **19**, 94-98.
- Horwitz, W. and Latimer, G. 2005. AOAC-Association of official analytical chemists, pp. 75-76, Official Methods of Analysis of AOAC International 18th ed., Gaithersburg, Maryland, USA.
- Ishibashi, Y., Ekawa, H., Hirata, H. and Kumai, H. 2002. Stress response and energy metabolism in various tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to hypoxic conditions. *Fish Sci.* **68**, 1374-1383.
- Jo, S. H. and Kim, H. Y. 2014. Changes in hematological responses and antioxidative enzyme activities of Japanese eel *Anguilla japonica* exposed to Elevated Ambient Nitrite. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **47**, 860-868.
- Kim, I. S. and Lee, W. O. 1995. First record of the seahorse fish, *Hippocampus trimaculatus* (Pisces: Syngnathidae) from Korea. *Kor. J. Zool.* **38**, 74-77.
- Knutzen, J. 1981. Effects of decreased pH on marine organisms. *Mar. Pollut. Bull.* **12**, 25-29.
- Kuwatani, Y. and Nishii, T. 1969. Effects of pH of culture water on the growth of the Japanese pearl oyster. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **35**, 242-250.
- Lin, Q., Lu, J., Gao, Y., Shen, L., Cai, J. and Luo, J. 2006. The effect of temperature on gonad, embryonic development and survival rate of juvenile seahorses, *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture* **254**, 701-713.
- Lin, Q., Zhang, D. and Lin, J. 2009. Effects of light intensity, stocking density, feeding frequency and salinity on the growth of sub-adult seahorses *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture* **292**, 111-116.
- Lischka, S., Büdenbender, J., Boxhammer, T. and Riebesell, U. 2011. Impact of ocean acidification and elevated temperatures on early juveniles of the polar shelled pteropod *Limacina helicina*: mortality, shell degradation, and shell growth. *Biogeosciences* **8**, 919.
- Liu, H., Zhang, J. F., Shen, H., Wang, X. R. and Wang, W. M. 2005. Impact of copper and Its EDTA complex on the glutathione dependent antioxidant system in freshwater Fish (*Carassius auratus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **74**, 1111-1117.
- Lourie, S. A., Foster, S. J., Cooper, E. W. T. and Vincent, A. C. J. 2004. A guide to the identification of seahorses, pp. 114, *Project Seahorse and TRAFFIC North America*, Washington D.C.
- Magee, J. A., Obedzinski, M., McCormick, S. D. and Kocik, J. F. 2003. Effects of episodic acidification on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **60**, 214-221.
- Martinez-Cardenas, L. and Purser, G. J. 2011. Effect of tem-

- perature on growth and survival in cultured early juvenile pot-bellied seahorses, *Hippocampus abdominalis*. *J. World Aquac. Soc.* **42**, 854-862.
23. Moon, S. D., Lee, J. H., Sung, C. G., Choi, T. S., Lee, K. T., Lee, J. S. and Kang, S. G. 2013. Cellular energy allocation of a marine polychaete species (*Perinereis aibuhitensis*) exposed to dissolving carbon dioxide in seawater. *J. Kor. Soc. Mar. Environ. Energy* **16**, 9-16.
 24. Moore, A. 1994. An electrophysiological study on the effects of pH on olfaction in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *J. Fish Biol.* **45**, 493-502.
 25. Nardocci, G., Navarro, C., Cortés, P. P., Imarai, M., Montoya, M., Valenzuela, B. and Fernández, R. 2014. Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. *Fish Shellfish Immunol.* **40**, 531-538.
 26. Parihar, M. S., Dubey, A. K., Javeri, T. and Prakash, P. 1996. Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipid content in liver of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature. *J. Therm. Biol.* **21**, 323-330.
 27. Parihar, M. S., Javeri, T., Hemnani, T., Dubey, A. K. and Prakash, P. 1997. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *J. Therm. Biol.* **22**, 151-156.
 28. Ryu, B., Qian, Z. J. and Kim, S. K. 2010. SHP-1, a novel peptide isolated from seahorse inhibits collagen release through the suppression of collagenases 1 and 3, nitric oxide products regulated by NF-kB/P38 kinase. *Peptides* **31**, 79-87.
 29. Saunders, R. L., Henderson, E. B., Harmon, P. R., Johnston, C. E. and Eales, J. G. 1983. Effects of low environmental pH on smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **40**, 1203-1211.
 30. Schreck, C. B. 1982. Stress and rearing of salmonids. *Aquaculture* **28**, 241-249.
 31. She, M., He, G. X., Chen, H. and Jin, Z. J. 1995. An experimental study of five species halobios on anti-aging activity. *Chinese J. Mar. Drugs* **53**, 30-34.
 32. Shin, M. J., Kwon, C. O., Lee, J. E. and Seo, E. W. 2010. Effects of cadmium exposure on tissues of *carassius auratus*. *J. Life Sci.* **20**, 1490-1497.
 33. Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B., Tignor, M. and Miller, H. L. 2007. Climate change 2007: The physical science basis: contribution of working group I to the fourth assessment report of the inter-governmental panel on climate change, pp. 97, Cambridge University Press, New York, U. S. A.
 34. Vincent, A. C., Foster, S. J. and Koldewey, H. J. 2011. Conservation and management of seahorses and other Syngnathidae. *J. Fish Biol.* **78**, 1681-1724.
 35. Vincent, A. C. 1996. *The International trade in Seahorses*, pp. 4-163. TRAFFIC International, Cambridge, U. K.
 36. Waring, C. P., Stagg, R. M. and Poxton, M. G. 1996. Physiological responses to handling in the turbot. *J. Fish Biol.* **48**, 161-173.
 37. Wedemeyer, G. A. and Yasutake, T. W. 1977. Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health. *U. S. Fish Wildl. Ser. Tech. Pap.* **89**, 1-14.
 38. White, C. C., Viernes, H., Krejsa, C. M., Botta, D. and Kavanagh, T. J. 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Anal. Biochem.* **318**, 175-180.
 39. Wu, G. Y. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids.* **37**, 1-17.
 40. Xu, Y. M., Chen, J. W. and Guo, R. 1994. Studies on the phospholipids and fatty acids in traditional chinese medicinal materials Hippocampus and Syngnathus. *Chinese J. Mar. Drugs* **49**, 14-18.
 41. Yue, X. L., Yang, T. W. and Wei, B. H. 1995. Trace elements and amino acids analysis of *Hippocampus* and *Solenognathus*. *J. Tradit. Chin. Med.* **7**, 18-19.
 42. Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J. and Xue, Y. 2004. Effects of chronic exposure of 2, 4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere* **55**, 167-174.
 43. Zhu, A. M. 2005. Pharmacologic researches on ethanol extracts from Hippocampus. *Chinese Pharmaceutical Affairs* **19**, 23-24.
 44. Zhang, Z. H., Xu, G. J., Xu, L. S. and Wang, Q. 1994. Inhibitory effects of *Hippocampus SPP.* extracts on L-glutamic acid induced Ca influx in rats' neurons. *Chinese J. Mar. Drugs* **52**, 6-9.

초록 : 사육수의 pH변화가 복해마(*Hippocampus kuda*)에 미치는 생리적 영향

박천만 · 김기혁 · 문혜나 · 여인규*

(제주대학교 해양생명과학과)

대기의 이산화탄소의 농도 증가는 해양산성화와 지구온난화를 유발하는 것으로 알려져 있다. 해마는 해양생태계 및 수산자원생물로서 중요한 종으로 알려져 있지만, 최근 해양산성화로 인하여 개체수가 감소되고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 멸종 위기 종인 복해마(*Hippocampus kuda*)에 미치는 생리적 영향을 조사하기 위해서 사육수의 산성조건인 pH 6.0, 6.5, 7.0 및 자연해수(pH 8.0)의 환경에서 복해마(*H. kuda*)를 15일 동안 사육 후 체내 조성 변화 및 항산화 효소 활성 변화에 대하여 조사를 실시하였다. 복해마(*H. kuda*)의 크기 및 성장은 대조군인 pH 8.0을 제외한 실험군에서는 pH가 저하함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 체내 조성성분인 회분, 조지방 및 조단백 또한 pH 저하에 따라 농도의존적으로 감소하는 것이 관찰되었다. SOD, CAT 및 GSH와 같은 항산화 효소의 분석 결과, SOD활성의 경우, pH 저하에 따라 농도의존적으로 감소하지만, 이와 상반되게 CAT 및 GSH에서는 pH저하에 따라 활성이 농도의존적으로 증가하는 결과가 나타내었다. 이것은 복해마(*H. kuda*)가 사육수의 pH 저하에 따른 체내 항상성을 유지하는 과정 중 스트레스가 야기되어 에너지 대사가 손상된 것으로 추정된다. 항산화효소는 일반적으로 산성화 스트레스에 민감하게 작용하는데 본 연구에서도 사육수의 pH 변화에 따라 항산화 효소작용이 유의하게 변화하였다. 이러한 결과로 복해마(*H. kuda*)에 있어서 산성화 노출을 통한 생리학적 스트레스가 항산화 반응 및 체내 성분과 성장을 저해하는 것으로 여겨진다.