Journal of the Korean Applied Science and Technology
Vol. 38, No. 1. February, 2021. 292~299
ISSN 1225-9098 (Print)
ISSN 2288-1069 (Online)
http://dx.doi.org/10.12925/jkocs.2021.38.1.292

해삼의 생리활성물질 추출 용매분획에 따른 연구

김용신†

중원대학교 의료뷰티케어학과, 교수
(2021년 2월 8일 접수: 2021년 2월 26일 수정: 2021년 2월 26일 채택)

A Study on the Solvent Fraction for Extraction of Bioactive Substances in Sea Cucumber

Kim-Yong Shin†

Department of Medical Beauty Care Jungwon University, Professor
(Received February 8, 2021; Revised February 26, 2021; Accepted February 26, 2021)

요 약 : 본 연구에서는 해삼속의 폴리페놀과 플라보노이드의 생리활성물질을 추출하기 위한 용매분획의 수율을 확인하고자 연구를 시도하였다. 이미 보고된 사례에서 50%에탄올 추출 용매분획은 해삼 항산화물질의 높은 수율 결과로 확인되었다. 해삼의 항산화물질 추출량을 결정짓는 것은 추출에 적용된 추출 용매분획의 결과로 확인되었다. 또한 '추출용매에 따라 해삼생리활성 항산화물질 추출함량이 크게 차이가 있다.'는 선행연구를 통해 용매분획추출에 관한 필요성의 결과를 얻었다. 50%에탄올 추출 용매분획의 해삼추출물에 포함된 페놀물질의 높은 항산화성분 추출 결과가 증명되었다. 추출용매분획 연구사례에서 수율이 가장 저조한 아세트산에틸 용매분획은 다른 용매분획에 비해 높은 페놀함량을 수확하여 항산화효과가 확인되었다. 이에, 추출 용매분획물의 적용에 따른 수율변화를 통해 항산화추출물의 높은 수율에 미치는 영향을 확인 하였다. 따라서 본 연구를 통해 50%에탄올 용매의 최적화된 해삼생리활성물질 추출 용매분획으로 검증되었다.

주제어 : 해삼추출물, 항산화물질, 플라보노이드, 폴리페놀, 활성산소, 50%에탄올용매

Abstract : In this study, a study was attempted to confirm the yield of the solvent fraction for extracting physiologically active substances of polyphenols and flavonoids in sea cucumber. In the previously reported cases, the 50% ethanol extraction solvent fraction was confirmed as a result of high yield of sea cucumber antioxidants. The determination of the amount of antioxidants extracted from sea cucumber was confirmed as a result of the extraction solvent fraction applied to the extraction. In addition, the necessity of extraction of the solvent fraction was obtained through a previous study that 'there is a significant difference in the content of sea cucumber physiologically active antioxidants extracted depending on the extraction solvent.' The results of extracting high antioxidants from the phenolic substances contained in the sea cucumber extract of the 50% ethanol

†Corresponding author
(E-mail: dydtls0619@naver.com)

extraction solvent fraction were demonstrated. In the study case of extraction solvent fraction, the ethyl acetate solvent fraction, which yielded the lowest, yielded a higher phenol content than other solvent fractions, and the antioxidant effect was confirmed. Accordingly, it was confirmed that the effect on the high yield of the antioxidant extract through the yield change according to the application of the extraction solvent fraction was performed. Therefore, it was verified as an optimized sea cucumber physiologically active substance extraction solvent fraction of 50% ethanol solvent.

Keywords : sea cucumber extract, antioxidant, flavonoid, polyphenol, active oxygen, 50% ethanol solvent

1. 서 론

최근 항산화 물질의 효능이 알려지면서 현대인들의 관심이 집중되고 있다. 인체에는 노화와 질병을 막아주는 항산화 방어막 물질이 존재한다. 항산화 물질의 감소, 지질 과산화, 유해산소(활성산소)증가 등 다양한 산화스트레스 환경요인으로 인해 체내에 활성산소가 과잉 생성되는 원인으로 작용된다. 체내에 존재하는 적정한 활성산소는 몸에 필요 요소로 작용하지만 과다생성 될 경우 염증반응, 피부질환, 피부노화 등 각종 성인병을 유발시킨다[1]. 항산화물질은 활성 산소로부터 DNA와 세포막의 산화를 억제하고, 항·암 항·진균 그 밖에 면역증진 및 생리활성을 돕는 물질로 작용한다. 이에 항산화물질은 산소 라디칼이나 과산화 지질, 라디칼로부터 피부 세포보호, 상처나 염증방어, 피지분비조절, 노폐물배출, 여드름발생 억제 및 개선에 대한 우수한 효과가 확인되었다. 또한 플라보노이드, 폴리페놀이 체내에서 강력한 항산화작용을 하는 해삼 생리활성 효과의 우수성이 널리 알려져 있다[2, 3]. 바다의 인삼으로 불리는 해삼의 효능은 인삼에 들어있는 사포닌이 풍부하여 혈관생성억제, 항·종양성장억제로 항·암 효과, 지혈작용, 칼슘과 인은 뼈와 골격형성, 생리작용, 임산부와 어린이 성장발육에 중요한 역활을 한다. 이같이 해삼추출물은 다양한 분야에서 유효성분을 지닌 생리활성 항산화 물질로 이용되고 있다[4, 5, 6]. 뿐만아니라 해삼에 대한 항산화 효능은 세계 학술연구를 통해 이미 검증되었다. 따라서 지금까지 알려진 해삼추출물 폴리페놀, 플라보노이드에 대한 고수율 추출결과와 해삼 항산화물질 추출시 최적의 추출 용매분획 선정에 따라 추출수율의 변화가 나타난다는 선행연구를 토대로 연구를 실시하였다[7]. '항산화물질을 추출하는데 중점을 두어야하는 추출공정은 고수율 추출용매 선정으로 작용된다.' 또한 '추출용매에 따라 해삼생리활성 항산화물질 추출수율이 크게 차이가 있을 것이다.'라는 용매추출에 관한 필요성의 결과를 얻고자하였다. 따라서 이번 연구를 통해 높은 추출수율에 따른 상관관계가 있는 50%에탄올 용매분획을 선정하였다[8]. 항산화물질 고수율에 미치는 영향은, 선정한 추출 용매분획에 따라 수율이 다르게 변화 발생되는 연구과제를 검증하고자 하였다. 이를 검증하기 위해 항산화 물질 추출 용매분획에 대한 선행연구 결과를 중심으로 분석을 수행하였다[9]. 또한 다양한 검증을 토대로 해삼 항산화물질 추출 용매분획 조건을 선정하였다[10]. 해삼 항산화물질 추출 용매분획 선정은 고수율을 얻은 50%에탄올 추출 용매분획을 적용하여 최적화 추출 용매분획물 선정을 검증하고자 시도하였다[11].

2. 실 험

2.1. 실험재료 및 방법

본 실험재료로 사용한 품종은 흑해삼으로 학명은 홀로투리아속 (*Holothuriaatra*)이다. 수산시장(국내)에서 신선한 해삼을 준비하여 불순물을 증류수로 세척 후 잘게 자른 다음 시료를 실험재료로 사용하였다(Fig. 1).



Fig. 1. Test material black sea cucumber.

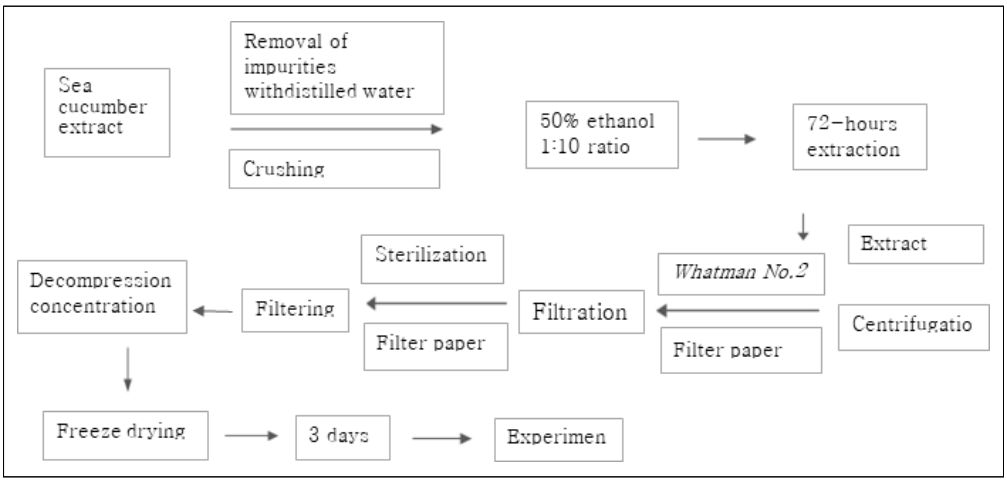


Fig. 2. Procedures of sea Cucumber incubation and ethanol extraction.

2.1.1. 시약 및 기기

실험에 사용한 실험 시약으로 butylated hydroxy toluene (BHT), caffeic acid, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), lipopolysaccharide (LPS), quercetin, arbutin, pyrogallol, griess reagent, sodium phosphate buffer, potassium acetate, aluminium nirate, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone, USA), α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH), penicillin, streptomysin, formaldehyde, fetal bovine serum phosphate buffered saline solution (PBS)를 Sigma Chemical Co. (USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그 외의 기타 용매 및 시약은 일급시약을 사용하였다.

2.1.2. 해삼 추출물 제조

해삼의 항산화물질 폴리페놀과 플라보노이드를 추출하고자 50%에탄올을 해삼 시료의 10배로 제조하였다. 다음 25℃, 72시간 150rpm의 인큐베이터에서 진탕하였다. 원심분리기에서 8,000rpm으로 20분동안 원심분리 실시하였다. 그 후 Whatman No. 2 여과페이퍼로 상층액을 여과시킨 후 멸균 필터지를 이용하여 필터링하였다. 다음은 감압농축(EYELA, Japan)으로 에탄올을 증발시키고 완전 동결건조하여 분말 상태의 해삼추출물을 수확하여 시료로 사용하였다(Fig. 2).

2.2. 실험 및 방법

2.2.1. 총 폴리페놀함량 측정

해삼에 포함되어있는 폴리페놀총함량 측정은 페놀성물질이 Phosphomolybdic acid와 반응시켜 청색의 변화되는 반응을 이용한 것으로 Folin-Denis 법을 응용하여 실시하였다[12, 13]. 본 실험에서는 해삼의 세포벽에 포함된 폴리페놀 성분을 가장 효과적으로 추출하는 50%에탄올 추출용매 방식을 적용하여 추출을 시도하였다. 해삼시료를 0.05㎍/mL, 0.1㎍/mL, 0.25㎍/mL, 0.5㎍/mL, 1㎍/mL은 1㎍/mL 증류수에 용해한 서로 다른 농도로 첨가하여 시료액을 준비하였다. 시료 400㎕에 Folin-Ciocalteau's phenol reagent 시약 400㎕를 배합하고 실온에서 3분정도 두었다. 시료액에 10% $NaCo_3$ 용액 400㎕를 더하여 배합 후, 실온에서 60분 동안 암실 상태로 두었다. 반응이 끝난 후, 96 well plate에 200㎕씩 분주하고 760nm에서 흡광도를 측정하였다[14]. Caffeicacid(Sigma) [15]. 표준물질로 해삼에 속의 폴리페놀 총함량을 측정하였다. 0-100㎍/mL 농도로 준비한 표준검량 기준선으로부터 해삼의 폴리페놀 총함량을 계산하였다(Fig. 3).

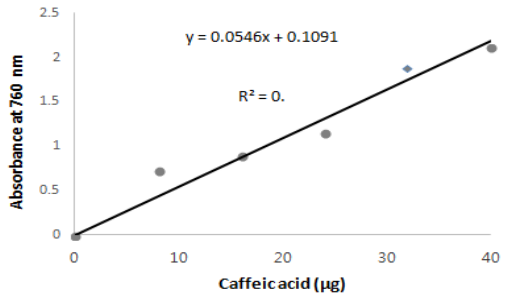


Fig. 3. Standard calibration curve for caffeic acid content of phenolic substances (R2 = 0.963)

2.2.2. 총 플라보노이드함량 측정

Moreno 방법을 활용하여 해삼추출물의 플라보노이드 총함량 측정하는데 사용하였다[16]. 해삼추출물 시료액에 함량별로 10% aluminum nitrate 0.1mL, 1M potassium acetate 20mL, ethanol 860mL를 순서대로 첨가하여 배합하였다. 그 후 실온에서 40분 동안 방치하고 micro plate reader 실행하여 0-100㎕/mL 함량 범위 안에서 수득한 Quercetin(Sigma, USA)을 표준검수 기준으로부터 해삼추출물의 플라보노이드 총함량을 415nm에서 흡광도를 계산하였다(Fig. 4).

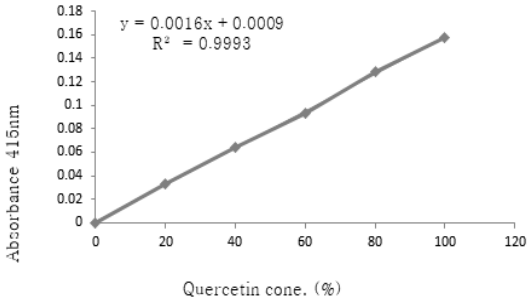


Fig. 4. Standard baseline of quercetin flavonoid content (R2= 0.999).

3. 결과 및 고찰

3.1. 해삼추출물의 항산화효과

3.1.1. 총 폴리페놀함량측정 결과

폴리페놀 화합물은 인체에 존재하는 활성산소를 제거하는 항산화제에 해당된다. 대부분의 생리활성물질은 페놀성 화합물로 수용성물질로 구성되어있다[17]. 천연 동식물에 많이 들어있는, 플라보노이드와 페놀성 화합물 등은 항산화 작용, 항·염증작용 등 생리활성 기능을하는 것으로 밝혀졌으며 다양한 개발이 이루어지고 있다[18, 19]. 활성산소는 인체내의 정상 세포의 물질 대사기능에서 다양한 유형의 지질산화 반응의 잔류물로 생성된다. 식물에 들어있는 폴리페놀 성분은 노화방지, 당뇨병, 고혈압, 항·암 및 항산화 등의 우수한 생리활성 기능성 물질로 작용한다[20]. 본 연구에서 폴리페놀 총함량을 해삼 추출물첨가 0.1% 농도에서 16.25㎍/100g, 0.25% 농도에서 18.11㎍/100g, 0.5% 농도에서 46.96㎍/100g, 1% 농도에서 87.99㎍/100g 으로 각각 다른 폴리페놀 총량을 획득하였다. 이같이 해삼 시료농도가 증가할수록 폴리페놀총량이 증가하는 (Fig. 5)것을 확인하였다. 해삼 폴리페놀 총함량은 0.1% 해삼시료 낮은 배합농도에서 16.25㎍/100g으로 높게 증가되어 추출 용매분획의 유의미한 결과로 확인되었다[21]. 다른 사례의 아세트산에틸 용매

분획과 유사한 결과가 확인되었다. 이는 각각 용매에 의해 얻어진 폴리페놀함량이 이들의 추출 용매분획으로 인해 변화 발생되는 증상의 요인으로 확인되었다. 따라서 해삼의 항산화 물질 분획 추출에 적용되는 용매가 중요한 인자로 작용하는 결과를 알 수있다. 이같은 50%에탄올 용매분획 추출선정은 해삼추출물에 포함된 페놀화합물의 높은 항산화활성으로 사료된다[22]. 따라서 50% 에탄올 용매분획에 따른 해삼추출물 생리활성 기능을 지지하는 결과로 판단된다.

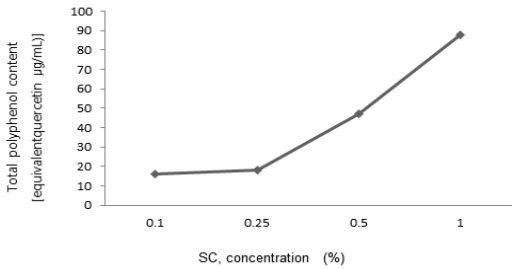


Fig. 5. Sea cucumber antioxidant content analysis, measurement of total polyphenol content (50% ethanol solvent fraction).In a previous study, a confirmation procedure in which the total amount of polyphenol increased as the concentration of the sea cucumber sample increased. The total yield of sea cucumber polyphenol reaches 16.25㎍ /100g at a low mixed concentration of 0.1% sea cucumber sample, and an excellent effect is reported.

3.1.2. 총 플라보노이드 함량측정 결과

본 연구에서 해삼 추출물의 플라보노이드 총함량을 알아보기 위해 해삼시료 (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0%)를 각각 농도를 다르게 준비하고 표준 기준용액으로 산화력이 우수한 quercetin을 적용한 각 추출물의 플라보노이드 총함량이 확인되었다. 다음과 같이 연구결과 (Fig. 6)를 표시하였다. 플라보노이드 총함량은 각각 0.6/mL, 1.24㎍ /mL, 2.26㎍/mL, 5.6㎍/mL, 15.87㎍/mL의 추출 결과로 확인되었다. 플라보노이드 총 함량은 해삼 시료 첨가물이 증가함에 따라 항산화추출물이 점차 증가하는 결과를 보여주고 있다. 시료농도가 증가할수록 플라보노이드 총 함량이 증가하지만, 해삼추출물의 플라보노이드 성분의 낮은 수율은 추출 용매분획에 따른 변화의 원인으로 판단된다. 그러나 해삼추출물의 플라보노이드 총 함량은 저농도 해삼시료에서 높은 플라보노이드 총 함량을 보여주는 결과로 확인되었다. 이 결과는 “폴리페놀은 물이나 알코올에 용해가 잘된다”(23).라는 보고된 연구결과를 입증했으며, 이는 해삼추출물의 효과적인 50%에탄올 추출 용매분획을 시행한 결과로 사료된다.

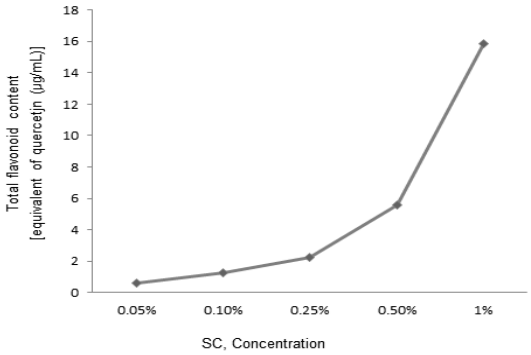


Fig. 6. Analysis of total flavonoid content of sea cucumber bioactive substance (50% solvent fraction). In a case study, a sea cucumber sample with a total flavonoid content of sea cucumber extract, 2.26 ㎍,/mL was obtained at a low concentration of 0.1%, and the total flavonoid content increased as the sample concentration increased, and excellent flavonoid effect was found at a low concentration of sea cucumber extract.

3.1.3. 항산화물질 추출 총함량 분석

“주정을 이용한 고수율 해삼 추출물의 제조방법” 연구에서 해삼의 주요 성분으로 당단백질과 황산 콘드로이친이며, 당 단백질로 다당류로 형성되어 있다. 이와 같이 모두 점착성의 당 단백질로 이루어진 해삼은 유통 상태에 공기와 닿게되면 빠르게 부패 한다. 이러한 문제점 해결 방안은 해삼을 바로 잡아 추출물의 가공 과정을 거쳐 대부분 열수 추출방법을 활용한다[24]. 이 방법으로는 추출수율이 낮아 90~100℃에서 추출이 진행되며, 만약 90℃ 이하로 실시하면 유효성분 추출이 충분히 이루어지기 어렵다. 추출온도가 100℃가 넘게되면 많은 생리활성물질이 용출되거나

파괴된다. 그러나 50%에탄올 용매분획은 고수율 상태로 추출 되어진다. 60~70% 에탄올을 이용하는 원인은 해삼의 주요성분 단백질을 변성하게 되면 지질을 용해시켜 추출을 효과적으로 이행할 수 있다. 물은 세포변성으로 인해 중요한 작용을 수행하며, 따라서 에탄올의 농도가 70%이상 올라가면 해삼의 세포는 변성이 되지않아 추출수율이 떨어진다. 60%보다 낮은 농도에서는 지질의 용해가 잘 되질 않아 물이 세포 안으로 투입되지 않기 때문에 이 역시 추출 수율이 떨어지게 된다. 열수추출물, 100% 에탄올추출 및 50%에탄올 용매분획 순으로 추출 수율을 확인할 수 있었다[25, 26, 27]. 이 사례 연구 검토 결과는 다음(Fig. 7)과 같이 나타내었다.

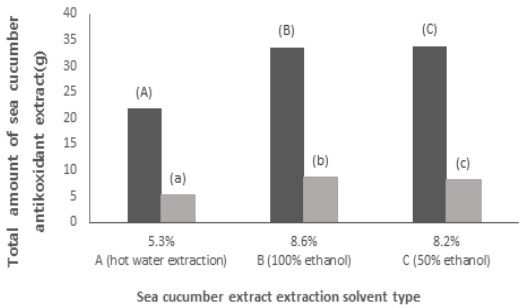


Fig. 7. Analysis of extract content of sea cucumber antioxidant bioactive substances (hot water extract, 100% ethanol, 50% ethanol solvent fraction) A is the hot water extraction amount (21.8 g), a is the hot water extraction yield (5.3%), B is 100% Ethanol solvent extraction amount (33.5g), b is ethanol 100% extraction yield (8.6%). C is the ethanol 50% extraction amount (33.8g), c is the ethanol 50% extraction yield (8.2%).

3.1.4. 항산화물질 총함량 분석

해삼을 메탄올분획으로 추출한 후 유기용매 추출분획을 수행하여 항·염증 작용을 하는 해삼 항산화물질에 관한 것이다. 헥산분획, 클로로포름분획, 아세트산에틸분획 및 부탄올분획 중에서 선택한 유기용매를 이용하여 분획하는 단계를 포함하는 보고사례이다. 해삼 항산화물질 페놀의 총 함량은 헥산분획을 통한 추출 수율 0.062%로 가장 높으며 그 다음으로 부탄올 0.039%, 클로로포름은 0.039%, 최저 아세트산에틸이 0.0054%의 결과로 확인되었다. 아세트산에틸 추출 용매분획 수율은 가장 낮았지만, 아세트산에틸 추출 용매분획은 다른 분획에 비해 높은 폴리페놀 함량을 수득하였다. 1g의 건조 해삼시료에서 20.38mg의 총 페놀량이 함유되어 있다. 아세트산에틸 용매분획의 우수한 페놀 함량은 추출에 사용된 분획용매에 따른 중요한 인자로 보고되었다[Fig. 8]. 이는 각 용매에 의해 추출된 2차 대사산물이 용매들의 극성차이로 인해 변화되어 생물학적 활성에대한 유효성 또한 발생되는 것으로 사료된다[28].

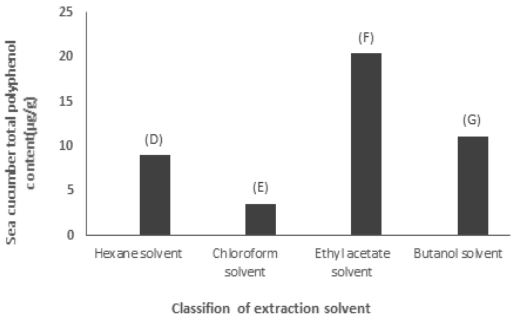


Fig. 8. D is the extraction yield (0.062%) of the hexane fraction (9.0g), and graph E is the total extraction amount (3.53g) of the chloroform extraction. Yield (0.039%), F graph shows the total amount of ethyl acetate solvent extraction (20.4g)) extraction yield (0.0054), G graph shows the total butanol solvent extraction (11.09) and extraction yield (0.039%). The ethyl acetate extraction solvent fraction yield was the lowest, but the highest polyphenol content was obtained in the ethyl acetate extraction solvent fraction (SCEA-F; sea cucumber ethyl acetate fraction) compared to other fractions. 1 gram of dry SCEA-F has a total phenol content of 20.38 mg.

4. 결 론

본 연구는 해삼의 폴리페놀과 플라보노이드의 생리활성 물질 추출 용매분획에 따른 고수율을 검증 하고자 하였다. 이 연구는 해삼 시료농도 증가에 따라 폴리페놀 총함량이 증가되는 것을 확인 하였다. 해삼 폴리 페놀의 총함량은 0.1% 해삼 시료의 낮은 혼합 농도에서 16.25㎍/100g의 결과로 확인되었다. 따라서 50%에탄올의 용매 분획에 따른 해삼 추출물의 생리활성 효능을 보여주고있다. 해삼 생리활성물질 (용매분획 50%에탄올)의 플라보노이드 총함량 사례연구에서 해삼 추출물의 플라보노이드 함량은 0.1% 저농도 해삼시료에서 2.26 μg/mL로 추출되었으며, 해삼 시료의 농도가 증가할수록 플라보노이드 총함량이 증가하고 저농도 해삼 추출물에서 플라보노이드의 효과가 확인되었다. 이에 따라 해삼의 항산화 물질 추출량을 결정짓는 가장 중요한 요인으로 추출 수확에 적용되는 추출 용매분획을 확인한 결과이다. 본 연구에서는 추출 용매분획 적용에 따라 항산화물질 추출물량이 결정된다는 분석 결과를 얻었다. 따라서 해삼에서 항산화활성물질을 추출 할 때 50%에탄올 분획용매가 우수한 것을 확인하였다 이는 해삼 항산화물질 추출 수율이 높은 최적의 추출조건 50%에탄올 분획용매의 바람직한 선정 결과로 판단된다. 본 연구에 따른 50%에탄올 추출 분획용매 적용은 해삼생리활성물질추출과 밀접한 상관관계가 있음을 알 수 있다. 이러한 결과를 바탕로 해삼의 우수한 생리활성물질이 식품 및 의약품, 화장품의 소재 개발에 필요한 자료로 향후 체계적인 연구를 계속 지속할 것으로 기대한다.

References

1. J. H. Lee, K. H. Choi, Y. K. Park, E. G. Kim, E. Y. Shin, “Development of Novel Sulforaphane Contained-composition to Increase Antioxidant and Whitening Effects”. *Journal of the Korean Cosmetic Society,* Vol.44, No.4 pp. 437-445, (2018).
2. J. E. Bang, H. Y. Choi, S. I. Kim, “Anti-oxidative Activity and Chemical Composition of Various Heracleum moellendorffii Hance Extracts”, *Korean Society of Food Preservation,* Vol. 16, No.5 pp. 765-771, (2009).
3. G. M. Na, H. S. Han, S. H. Ye, H. K. Kim, “Physiological activity of Medicinal Plant extracts”, *Korean Journal of Food Preservation,* Vol.11, No.3 pp. 388-393, (2004).
4. J. Y. Park, “Changes in Nutritional Composition of Sea Cucumber (Stichopus japonicus) During Drying”, *Chonnam University,* (2008).
5. D. I. Moon, “Improving effects of Sea cucumber semi-extract on the gastritis and gastric ulcer”, *Wonkwang University,* (2012).
6. M. H. Lee, “Effect of hair dyeing and scalp toner containing Stichopus Japonicus extract on the hair loss”, *Konkuk University,* (2015).
7. K. W. Hong, H. M. Park, “Method for producing high-yield sea cucumber extract using alcohol”, *Korean Intellectual Property Office (KR),* Patent Publication 10-2016-0033284, (2016).
8. J. H. Choi, S. K. “Chung, ”Antioxidant and antimicrobial activities of polyphenols isolated from unripe apples (Malus pumila cv. Hongro)”, *Korean Society of Food Preservation*, Vol.26, No.6 pp. 690-696, (2019).
9. S. G. Kim, S. M. Ryu, D. R. Lee, “Composition comprising anti-inflammatory sea cucumber extract and anti-inflammatory”, *Korean Intellectual Property Office (KR),* Publication number. 10-2012-0028153, (2012).
10. K. W. Hong, H. M. Park, “Method for producing high-yield sea cucumber extract using alcohol”, *Korean Intellectual Property Office (KR),* Patent Publication 10-2016-0033284, (2016).
11. J. H. Choi, S. K. Chung, “Antioxidant and antimicrobial activities of polyphenols isolated from unripe apples (Malus pumila cv. Hongro)”, *Kyungpook University*,

(2018).
12. K. A. Park, Y. M. Choi, S. M. Kang, M. R. Kim, J. I. Hong, "Effects of Proteins on the Reactivity of Various Phenolic Compounds with the Folin-Ciocalteu Reagent", *Korean journal of food science and technology* Vol. 47, No.3 pp. 299-305, (2015).
13. E. J. Kim, J. Y. Choi, M. Yu, M. Y. Kim, S. h. Lee, B. H. Lee, "Total Polyphenols, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Korean Natural and Medicinal Plants", *Korean Journal of Food Science and Technology,* Vol.44, No.3 pp. 337-342, (2012).
14. M. J. Kim, "Effects of Intake of Peucedanum japonicum Thunb Extract and its Application to the Skin on Changes in Body Composition and Skin Conditions", *Konkuk University*, (2015).
15. MR. Al-Sereitia KMAbu-Amerb & P Sena, "Pharmacology of rosemary (Ros-marinus officinalis Linn) and its therapeutic potentials", *Indian Journal of Experimental. Biology,* Vol.37, February, pp. 124-131. (1999).
16. M. I. N. Moreno, M. I. Isla, A. R. Sampietro, M. A. Vattuone, "Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several", *Journal of Ethnopharmacology,* Vol.71, pp. 109-114, (2000).
17. D. H. Jeong, I. S. Choi, "Cosmetic composition for skin whitening containing sea cucumber extract", *Korean Intellectual Property Office (KR),* Publication Patent 10-2008-0111813, (2008).
18. Y. J. Kim, "Cellular Flavonoid Uptake Mediated via The Mammalian Flavonoid Transporter", *Korea University,* (2013).
19. S. H. Park, "Profiling bioactivities of sea cucumber complex extract", *Wonkwang University,* (2015).
20. J. H. Choi, S. K. Chung, "Antioxidant and antimicrobial activities of polyphenols isolated from unripe apples (Malus pumila cv. Hongro)", *Korean Journal. Food Preservation,* Vol.26, No.6 pp. 690-696, (2019).
21. H. S. Ryu, J. H. Moon, J. S. *Suh,* "Chemical Compositions of Glycoprotein and Chondroitin Sulfates from Sea Cucumber(Stichopus japonicus", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrtion,* Vol.26, No.1 pp. 72-80, (1997).
22. J. E. Bang, H. Y. Choi, S. I. Kim, "Anti-oxidative Activity and Chemical Composition of Various Heracleum moellendorffii Hance Extracts", *Korean Journal.Food Preservation,* Vol.16, No.5 pp. 765-771, (2009).
23. K. W. Hong, H. M. Park, "Method for producing high-yield sea cucumber extract using alcohol", *Korean Intellectual Property Office (KR),* Patent Publication 10-2016-0033284, (2016).
24. C. W. Choi, G. O. Lee, "Composition for treating or preventing obesity containing sea cucumber extract", *Korean Intellectual Property Office (KR)*, Registered patent 10-1257329, (2013).
25. S. H. Park, "Profiling bioactivities of sea cucumber complex extract", *Wonkwang University,* (2015).
26. J. H. Choi, S. K. Chung, "Antioxidant and antimicrobial activities of polyphenols isolated from unripe apples (Malus pumila cv. Hongro)", *Korean Journal. Food Preservation,* Vol.26, No.6 pp. 690-696, (2019).
27. J. S. Lee, "Sea cucumber peptide capsule manufacturing method", *Korea Intellectual Property Office (KR)*, Public patent. 10-2007-0105714, (2017).
28. S. G. Kim, S. M. Ryu, D. R. Lee, "Composition comprising anti-inflammatory sea cucumber extract and anti-inflammatory", *Korean Intellectual Property Office (KR),* Publication number. 10-2012-0028153, (2012).