



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

바위털갯지렁이, *Marphysa sanguinea*
유생 추출물의 요각류에 대한 방어효과



부 경 대 학 교 대 학 원

의 생 명 융 합 공 학 협 동 과 정

오 재 구

공 학 석 사 학 위 논 문

바위털갯지렁이, *Marphysa sanguinea*
유생 추출물의 요각류에 대한 방어효과

지도교수 김 창 훈

이 논문을 공학석사 학위 논문으로 제출함

2015년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

의 생 명 융 합 공 학 협 동 과 정

오 재 구

오재구의 공학석사 학위논문을 인준함.

2015년 2월



주 심 이학박사 정 원 교



위 원 농학박사 이 중 수



위 원 농학박사 김 창 훈



목 차

List of figures	iii
List of tables	v
Abstract	vi
 1. 서론	 1
2. 재료 및 방법	5
2.1. 바위털갯지렁이 유생 채집 및 분리	5
2.1.1. 유 생 채 집	5
2.1.2. 유 생 분 리	5
2.2. 바위털갯지렁이 유생으로부터 방어 물질의 추출	7
2.2.1. 유기 용 매 추 출	7
2.2.2. 정 제 방 법	9
2.3. 구조해석을 위한 질량 분석 및 핵자기 공명 분석	12
2.4. 해적생물(요각류)의 채집 및 분리	13
2.4.1. 요 각 류 채 집	13
2.4.2. 요 각 류 분 리 및 동 정	13
2.4.3. 유 생 방 어 물 질 의 요 각 류 치 사 성 시 험	14
2.5. 바위털갯지렁이 치충	15
2.5.1. 바 위 털 갯 지 령 이 치 충 채 집	15
2.5.2. 바 위 털 갯 지 령 이 치 충 감 수 성 시 험	15

2.6. 통계처리	16
3. 결과	17
3.1. 바위털갯지렁이 유생 채집 및 분리	17
3.2. 해적생물(요각류)의 동정	17
3.3. 바위털갯지렁이 유생의 방어물질 추출	18
3.3.1. 역상수지 칼럼 (ODS-Q3)상에서의 방어물질 분획	18
3.3.2. Packed column(RPAQUEOUS)상에서 방어물질 분획	20
3.3.3. Packed column(ODS SP100)상에서 방어물질 분획	22
3.4. 바위털갯지렁이 유생의 방어물질 수득율	30
3.5. 바위털갯지렁이 치충 감수성 시험	31
3.6. 방어물질의 질량분석에 의한 추정 구조	31
4. 고찰	35
4.1. 바위털갯지렁이 유생	35
4.2. 해적생물(요각류)	37
4.3. 바위털갯지렁이 유생의 방어물질	39
4.4. 유생으로부터 추출된 방어물질의 구제물질 활용	42
5. 요약	43
감사의 글	
참고문헌	

List of figures

Fig. 1. *Marphysa sanguinea* larvae community of inhabitation tube outside.

Fig. 2. *Marphysa sanguinea* larvae separation process.

Fig. 3. Diagram of extraction steps.

Fig. 4. Diagram of purification steps.

Fig. 5. 24 well-plate & 48 well-plate.

Fig. 6. 6 well-plate.

Fig. 7. Ratio of copepod in copepod lethality test.

Fig. 8. Fraction result of ODS-Q3 column.

Fig. 9. Copepod lethality test result(fraction of ODS-Q3 column).

Fig. 10. Fraction result of RPAQUEOUS column(2nd larvae sample).

Fig. 11. 2nd ODS SP100 column fraction result of 4th peak(RPAQUEOUS column).

Fig. 12. 3rd ODS SP100 column fraction result of 4th peak(2nd ODS SP100 column).

Fig. 13. Copepod lethality test result of 6th peak(3rd ODS SP100 column).

Fig. 14. 2nd ODS SP100 column fraction result of 5th peak(RPAQUEOUS column).

Fig. 15. 3rd ODS SP100 column fraction result of 6th peak(2nd ODS SP100 column).

Fig. 16. Copepod lethality test result of 11th peak(3rd ODS SP100 column).

Fig. 17. EI-MS spectrum of '4-4-6' .

Fig. 18. EI-MS spectrum of '5-6-11' .

Fig. 19. Presumed structure of '4-4-6' (linoleic acid).

Fig. 20. Presumed structure of '5-6-11' (linolenic acid).

Fig. 21. Proton NMR spectrum of '4-4-6' (600 MHz, CDCl₃)

Fig. 22. Agglomeration of *Marphysa sanguinea* larvae.

Fig. 23. Major genus in copepod lethality test(*paracalanus* sp.).

Fig. 24. *Marphysa sanguinea* juvenile predation of predacious copepod.

List of tables

Table 1. HPLC conditions for isolation

Table 2. Copepod lethality test of RPAQUEOUS column fraction

Table 3. Copepod lethality test of 4th peak(2nd ODS SP100 column fraction)

Table 4. Copepod lethality test of 5th peak(2nd ODS SP100 column fraction)

Table 5. Yield of defensive substances from *M. sanguinea* larvae 130 g
(2nd larvae sample)



Defensive effects of extract substances in rockworm polychaete *Marphysa sanguinea* larvae on copepods

Jaegu Oh

Department of Interdisciplinary Program of Biomedical Engineering,
Pukyong National University, Busan, Korea

Abstract

In the seed production processes of *M. sanguinea*, the most important problem is the deterioration of survival rate by attacking upon predatory organisms. Predators such as copepod tend to disappear in the larvae producing tanks. It was estimated that larvae might be excreted some deterrents. Therefore, the study was conducted to increase survival rate of early larvae stage through investigate of defensive material from *M. sanguinea* larvae.

Initially, approximately 2.5 million larvae were extracted with methanol(MeOH) and, consequently, separated by 70%, 85% and 100% MeOH using the ODS-Q3 column (1×20 cm). The purified experiment had been conducted by using a chromatographed RPAQUEOUS column(1×25 cm, 40°C, 221 nm, 90% MeOH, 1 mL/min) through HPLC system. Moreover, the copepod lethality tests were conducted at each peak groups and chromatographed on a ODS SP100 column(1×25 cm, 40°C, 221 nm, 90% MeOH, 1 mL/min) by the HPLC system. And then, the each peak(Experiment groups were lost on copepod lethality test)was purified on a ODS SP100 column(1×25 cm, 40°C, 221 nm, 80% MeOH, 1 mL/min) by the HPLC system.

The results showed that '4-4-6' have lethal dose 50 on 70 ppm after 2 hours. And '5-6-11' have lethal dose 50 on 10, 20, 40 ppm after 2 hours. M⁺ ions of '4-4-6' and '5-6-11' were m/z 278, m/z 280 with 278 & 280 in molecular weight, respectively, in mass spectrometry. From these results,

Linolenic Acid (278 MW, $C_{18}H_{28}O_2$) and Linoleic Acid (280 MW, $C_{18}H_{30}O_2$) were identified. In the other hand, their main components were fatty acids.

In conclusion, defensive materials of *M. sanguinea* larvae are estimated in fatty acids and their activities can enhance the overall survival rate of larvae.



1. 서 론

환형동물에 속하는 Polychaeta강은 환형동물 중 가장 기본적인 강으로 전구엽에는 촉수, 부감촉수(palpus), 감촉수와 안점이 있다. 촉수는 종류에 따라 일부 퇴화하거나 변형되어 있다. 동부의 체절 좌우에는 측각이 있고, 이 측각에는 강모의 다발이 있고 감촉수와 아가미 등을 갖고 있다. 소화관은 발달하며 구강, 인두, 식도, 장을 지나 항문에서 끝난다. 종류에 따라 구강에는 소악편, 인두에는 대악이 있고 근육이 발달해 있으며 식도에는 맹관이 있는 것도 있다.

혈관계는 발달해 있고 혈색소를 가지며 유생의 배설기는 원신관이지만 성체는 보통 후신관이다. 일반적으로 자웅이체이고 아생생식을 하는 것도 있다. 발생은 전형적인 나선형이고 담륜자 유생을 만들며 이것은 종류에 따라 여러 가지 모양의 유생으로 변태한다. 모래, 진흙속에 사는 것, 헤엄치는 것, 부유하는 것, 고착하는 것 등이 있고 주로 바다에서 살며 기수와 민물에 들어 가는 것, 동물서의 것, 육상에 올라오는 것 등이 있고 또 생식기에 균유하는 것이 있다. 세계적으로 10,000여 종 정도가 밝혀져 있다.

우리나라에서 서식하고 있는 갯지렁이류 중 산업적으로 중요한 가치가 있는 종으로는 바위털갯지렁이 *Marphysa sanguinea*, 눈썹참갯지렁이 *Perinereis nuntia*, 두토막눈썹참갯지렁이 *Perinereis aibuhitensis*, 넓적발갯지렁이 *Nectoneanthes oxypoda* 등이 있다. 그 중 바위털갯지렁이는 털갯지렁이목, 털갯지렁이과, 바위털갯지렁이속에 속하는 종으로써, 우리나라 전 연안의 조간대 하부에서 조하대 상부의 연한 저질이 섞여 있는 바윗돌이나 자갈사이에 많이 서식한다(Paik, 1989).

이러한 Polychaeta강은 스트레스를 받은 환경 조건에 대한 적응능력 때문에 연구자들은 이들 갯지렁이들을 환경 파수꾼으로서 뿐만 아니라 수서 환경 모니터링을 위한 지표생물로도 이용되어 왔다.

그리고 조간대 환경에서 저질에 굴을 뚫어 해수를 순환시켜 수서 환경을 정화하는 등 저서 생태계에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 생활사가 비교적 짧고 번식력이 강하기 때문에 저서 생태계에서 풍부한 2차 생산자로서 중요하다(Clark, 1977; Vigneswaran *et al.*, 1999; Palacios and Timmons, 2001; Campos *et al.*, 2002; Davidson *et al.*, 2008).

또한 수서생태계에서 물의 유기물을 제거하고 정화하는데 흔히 사용되며(Campos *et al.*, 2002; Davidson *et al.*, 2008; Palacios *et al.*, 2001; Vigneswaran *et al.*, 1999), 특히 *Perinereis* sp.를 비롯한 여러 종의 갯지렁이들의 유기물 이용능이 뛰어난 것으로 알려져 있으며(Fujioka *et al.*, 2007), 갯지렁이 *Sabella spallanzanii*는 주위 환경으로부터 *Bacillus*를 비롯하여 다양한 세균을 축적하고 농축할 수 있는 능력이 있음이 보고된 바 있다(Stabili *et al.*, 2006).

이들은 바위 밑에 숨거나, 사니질 간석지에 구멍을 뚫거나 또는 서식관을 분비물로 만들어 살기 때문에 병원세균으로부터 자신을 방어하는 것도 중요하다. 예를 들어 마당비유렁갯지렁이 *Thelepus setosus*는 thelepin과 같은 항곰팡이 물질을 갖고 있다. 그리고 털갯지렁이류나 참갯지렁이와 같이 낚시 미끼로 많이 쓰이는 환형동물도 많지만, 물고기들이 “싫어하는” 맛을 내는 종류도 있다. 예를 들면 캘리포니아 연안에 사는 명주실타래갯지렁이와 근연인 *Cirriiformia luxuriosa*는 물고기들이 거의 먹지 않는다. 송곳갯지렁이속의 *Lumbrinereis brevicirra*도 피부에서 어독성이 있는 점액을 낸다. 독은 nereistoxin이라는 독특한 물질인데, 송사리를 0.28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 죽게 할 정도로 독성이 강하다. 이는 곤충에게도 강한 독성을 나타내는데, 이것은 콜린에스테라제를 저해하여 신경전달을 억제하기 때문이라고 한다(한국해양 연구소, 1995).

Polychaetes의 천연물은 거의 전부가 C_{15} 이내의 비교적 간단한 탄소골격으로 이루어져 있으나 일부는 상당히 강한 생리활성 효과를 갖고 있음이 밝혀

졌다.

Polychaetes의 천연물로서 가장 잘 알려진 것은 polybrominated aromatic compounds이다. 예를 들면 Soft bottom에 서식하는 tube-dwelling polychaete *Thelepus setosus*(family Terebellidae)로부터 3,5-dibromo-4-hydroxybenzyl alcohol, aldehyde, bis(3,5-dibromo-4-hydroxy phenyl)methane, thelephenol, thelepin 등 다섯 개의 polybrominated compounds가 분리되었으며 이들의 구조는 원소분석, IR, UV, MS 및 화학적 변환 및 합성에 의하여 결정되었다(T. Higa and P. J. Schever, 1974). 이들 중 3중 고리 물질인 thelepin은 옥상진균 *Penicillium griseofulvum*의 대사물질로 유명한 항진균제인 griseofulvin과 구조적으로 유사할 뿐만 아니라 거의 동등한 수준의 항진균 효과를 보이며 상당한 관심을 모았다. Thelepin은 함께 분리된 thelephenol의 phenoxy기에 의한 oxidation/nucleophilic substitution에 의하여 합성된 것으로 추정되었으며 이 가설은 thelepin의 전합성 과정에서 증명되었다(O. Tsuge et al, 1984).

그리고 Soft bottom에 서식하는 polychaete *Phoronopsis viridis*로부터 bromophenol계 물질이 분리된 사례가 있다(Y. M. Sheikh and C. Djerassi, 1975). 간단한 구조로 이루어진 이들은 항균, 항진균, 방부효과와 함께 nematods와 molluscs에 대한 독성을 나타낸다. 이 사실은 bromophenols이 polychaetes의 생존을 돕는 생태학적 효과를 갖고 있을 것이라는 가정을 낳게 한다. 이 가설을 지지하는 중요한 증거로는 polychaetes 이외에도 *Saccoglossus*, *Balanoglossus*, *Glossobalanus*, *Ptychodera*등 동일한 환경에 서식하는 여러 종류의 hemichordates(반색동물)로부터 동일 혹은 유사한 물질이 다수 추출된 점이다(S. A. Woodin et al, 1987).

해산 갯지렁이를 대상으로 한 천연물 연구는 그 중요성이 인정되어 최근 다방면에서 갯지렁이의 천연물에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 본 연구에서 사용된 해산 갯지렁이는 친환경 고부가가치 양식생물로 인정받고 있

는 바위털갯지렁이(*Marphysa sanguinea*)로 바다낚시 미끼 중 최고급 종으로 알려져 있다. 하지만, 생태학적 연구가 미진하고 생활사가 알려져 있지 않고 무분별한 채취와 환경오염으로 자연 개체수가 줄어들어 근래에는 대량채취가 힘든 종이다. 이 종의 국내 가격대는 4 ~ 10 만원/kg으로 어패류 양식에 비해 높은 가격대가 형성되어 있고, 대부분 수입에 의존하고 있는 실정이다.

부경대학교 수산과학기술센터에서는 바위털갯지렁이의 대량종묘생산을 위한 연구가 이루어져 대량종묘생산 시스템을 확보하였으나, 대량종묘생산과정에서 해적생물의 포식에 의한 초기 생존율 저하가 가장 큰 문제점으로 지적되고 있다. 이러한 문제점의 원인은 바위털갯지렁이 대량종묘생산과정에서 바위털갯지렁이 유생의 서식환경과 매우 유사한 환경에서 짧은 시간 내에 대량으로 번식하는 환경적 특성으로 인해, 포식성 요각류에 의한 스트레스와 포식에 의한 것으로 생각되어지고 있다.

하지만 최근, 바위털갯지렁이 대량종묘생산과정 중 유생이 대량(300만미 이상)으로 출현한 수조에서는 해적생물로 작용하는 포식성 요각류를 포함한 플랑크톤 개체군이 바위털갯지렁이 유생 군집을 회피하는 현상이 관찰되었다. 이는 바위털갯지렁이 유생이 외부의 천적을 포함한 다양한 생물들로부터 자신을 보호하기 위한 특별한 수단으로 생각되었고, 초기 유생단계에서 볼 수 있는 유생의 점액질이나 유생내의 특정 방어물질(deterrent)의 분비에 의한 것으로 추정되었다.

따라서 본 연구에서는 바위털갯지렁이의 유생을 채집 및 분리, 추출, 정제하여 유생내의 방어물질을 확인하고, 바위털갯지렁이의 대량종묘생산에 있어 생존율 저하를 일으키는 수중 해적생물의 구제 가능성을 검토하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2. 1. 바위털갯지렁이 유생 채집 및 분리

2. 1. 1. 유생 채집

경상남도 고성군 하일면 부경대학교 수산과학기술센터의 모충사육수조에서 2013년 6 ~ 8월(1차), 2014년 1 ~ 3월(2차), 2014년 6 ~ 8월(3차)에서 각각 수온 약 20℃(누적수온 400℃ 이상)에 어미의 서식공에서 분출되었고, 분출 직후의 유생은 수층의 표면에서 유영을 하였다. 이 유영 유생을 사이펀(siphon)을 통해 채집하였다(Fig. 1).

2. 1. 2. 유생 분리

1차, 2차, 3차에 걸쳐 채집된 유생은 채집 즉시 체(1 mm)로 유생보다 큰 찌꺼기를 걸러낸 후 125 μ m sieve로 농축하면서 멸균해수를 흘려 유생보다 작은 크기의 생물을 제거 하였다. 그 다음 농축된 유생을 원심관(Centrifuge tube, 50 ml)에 넣고 20분간 방치하여 유생이 뭉치기를 기다린 후 뭉쳐진 유생만을 빼내어 다른 생물을 한 번 더 제거 하였다. 마지막으로 원심분리(500 RPM/10 min, Hanil MF-600)하여 유생을 가라앉힌 후 상층액을 제거하고 -20℃에 냉동 보관하였다(Fig. 2). 이때, 채집 및 분리된 유생의 무게는 각각 습중량으로 1차 117.5 g, 2차 125 g, 3차 275 g이었다.

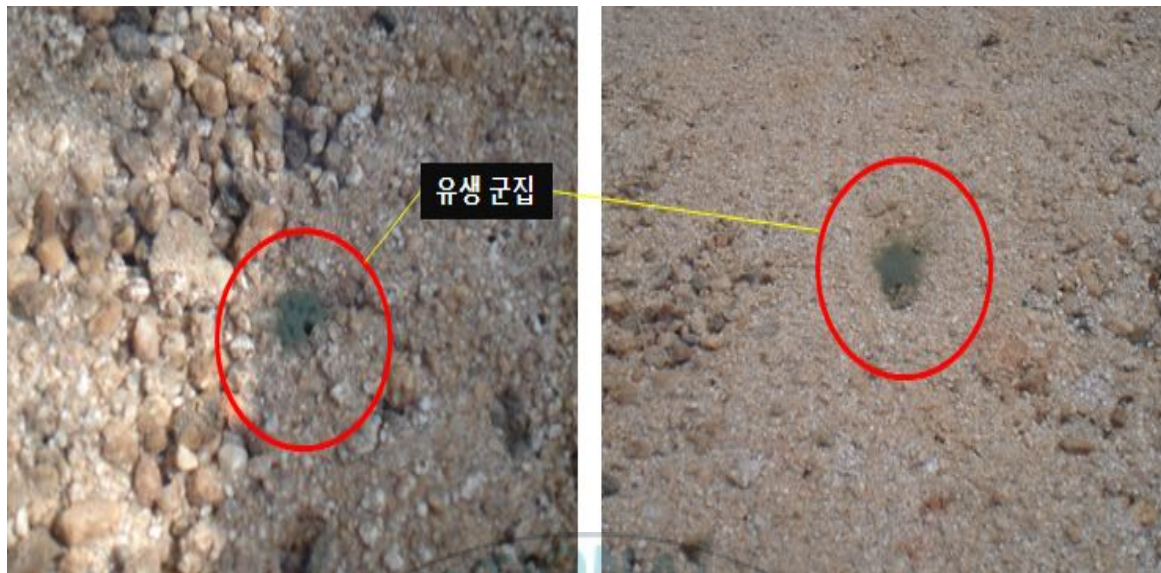


Fig. 4. *Marphysa sanguinea* larvae community of inhabitation tube outside.

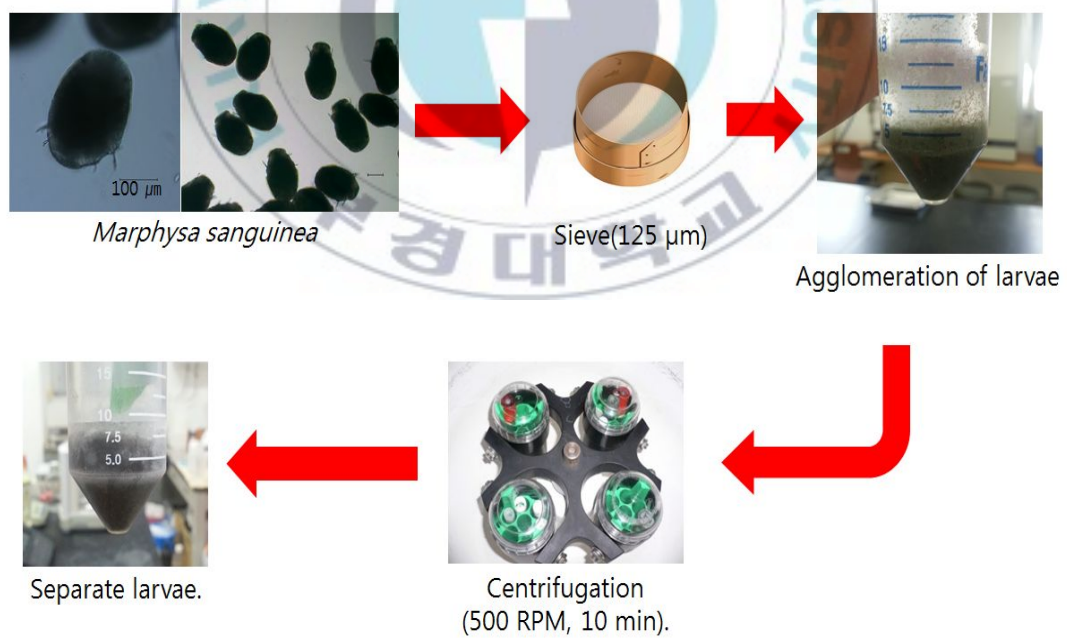


Fig. 5. *Marphysa sanguinea* larvae separation process.

2. 2. 바위털갯지렁이 유생으로부터 방어 물질의 추출

2. 2. 1. 유기용매 추출

1, 2, 3차에 걸쳐 채집 및 분리된 유생은 분석시료 130 g(습중량) 당 HPLC용 MeOH(HPLC grade, J.T Baker) 400 ml를 넣어 용해 한 후 Ultra sonification (SONOREX SUPER - RK106, Bandelin)으로 60분간 추출하였다. 추출 후 10분간 방치하고 상등액을 여과지(TY2-110, ADVANTEC)를 이용하여 잔사를 걸러 냈다. 여과지에 걸린 잔사는 130 g당 200 ml의 MeOH(HPLC grade)를 이용하여 한번 더 용해한 후 Ultra sonification으로 60분 동안 재추출하였다. 그 후 여과지(TY2-110, ADVANTEC)를 이용하여 잔사를 1회 더 걸러 냈다. 바닥에 가라앉은 잔사는 원심관(Centrifuge tube, 50 ml)에 담은 뒤 MeOH(HPLC grade)을 30 ml까지 채워 vortexing 후 원심분리(2000 RPM/ 20 min)하였다. 최종적으로 MeOH(HPLC grade) 추출물은 진공감압농축기(Rotavapor R-114, BUCHii)를 이용하여 40℃이하에서 MeOH(HPLC grade)을 증발시킨 뒤 -20℃에 냉동보관하였다.

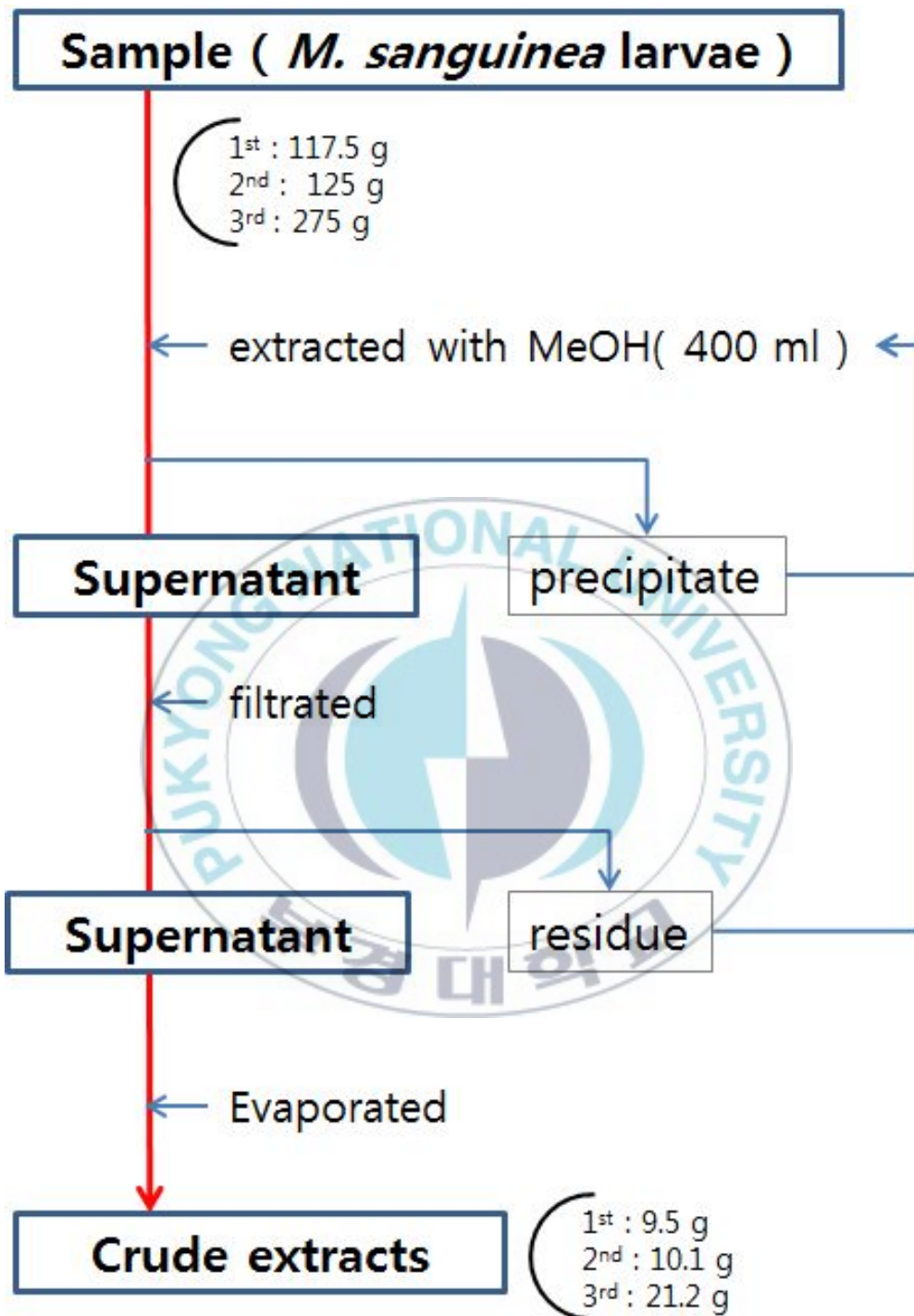


Fig. 6. Diagram of extraction steps.

2. 2. 2. 정제 방법

1. 역상 칼럼(ODS-Q3)에 의한 분획

분획을 위한 칼럼은 먼저 내압용 유리칼럼(1.0 x 20 cm)에 역상 수지(ODS-Q3, 직경 30 μ m, Nomura Chemicals)를 충전하여 칼럼 부피의 5배량의 MeOH(HPLC grade)로 세척하고 70% MeOH 100 ml 흘려 평형화 시켰다. 여기에 MeOH로 추출한 유생 추출 농축물(1차, 9.5 g)을 넣고 70% MeOH, 85% MeOH 및 100% MeOH를 각각 60 ml씩 MeOH 농도를 늘려가면서 순차적으로 흘려 분획하였다. 2차 시료 및 3차 시료에 대하여도 동일한 방법으로 각각 분획하였다. 각 획분의 일부분은 요각류 치사성 시험을 통해서 요각류의 활성이 없어지는 농도구를 확인하였다.

2. HPLC에 의한 활성 물질의 분리 1차 정제(RPAQUEOUS)

역상 칼럼(ODS-Q3, 1 x 20 cm)에서 분리된 각각의 MeOH 농도구에서 유생 방어물질의 요각류 치사성 시험에서 반응이 확인된 시료를 packed column(RPAQUEOUS, NOMURA CHEMICAL, 1 x 25 cm)을 이용하여 정제를 실시하였다. 정제과정은 100% MeOH(HPLC grade)를 이용하여 RPAQUEOUS 칼럼을 충분히 세척한 후 90% MeOH(HPLC grade)로 칼럼을 평형화시켰다. 그 후 칼럼의 온도를 40°C로 유지하는 가운데 일정량(20 μ l)의 시료를 주입하고 90% MeOH(HPLC grade)을 이동상으로 활용하여 유속 1 ml/min으로 정제를 반복하여 실시하였다. 이때 파장은 221 nm 로 검출하였고, 각 peak 별로 시료를 분획하였다(Table 1). 그 후 각 peak별로 요각류 치사성 시험을 실시하여 반응을 확인하였다.

3. HPLC에 의한 치사성 물질의 분리 2,3차 정제(ODS SP100)

1차 정제(RPAQUEOUS 칼럼)에서 반응이 강했던 peak(4, 5)를 각각 농축하여 peaked column(ODS SP100, Senshu Pak, 1 x 25 cm)을 이용하여

정제를 실시하였다. 이 과정에서는 RPAQUEOUS 칼럼 1차 정제과정과 동일하게 100% MeOH(HPLC grade)를 이용하여 ODS SP100 칼럼(1 × 25 cm)을 충분히 세척한 후 90% MeOH(HPLC grade)로 ODS SP100 칼럼을 평형화시켰다. 나머지 조건은 1차 정제과정과 동일한 조건에서 행하였다 (Table 1. 참조).

그리고 각 peak 별로 채집한 시료는 유생 방어물질의 요각류 치사성 시험을 실시하여 반응이 있는 peak을 농축한 후 동일한 조건(ODS SP100, 1 ml/min, 221 nm, 40℃)에서 이동상을 80% MeOH로 교체하여 일정량(4 μ l)의 시료를 주입하고 packed column(ODS SP100) 상에서 3차 정제를 실시하였다. 최종적으로 packed column(ODS SP100)의 3차 정제완료 후 유생 방어물질의 요각류 치사성 시험을 실시하여 바위털갯지렁이 유생으로부터 추출된 방어물질을 확인하였다.

Table 1. HPLC conditions for isolation

HPLC	Younglin 9300 HPLC system
Column	RP Aquous column(1.0 x 25 cm, Nomura Chemicals)
Mobile phase	90% MeOH
Flow rate	1.0 ml/min
Detection	UV wavelength : 221 nm
Column Temperature	40 °C

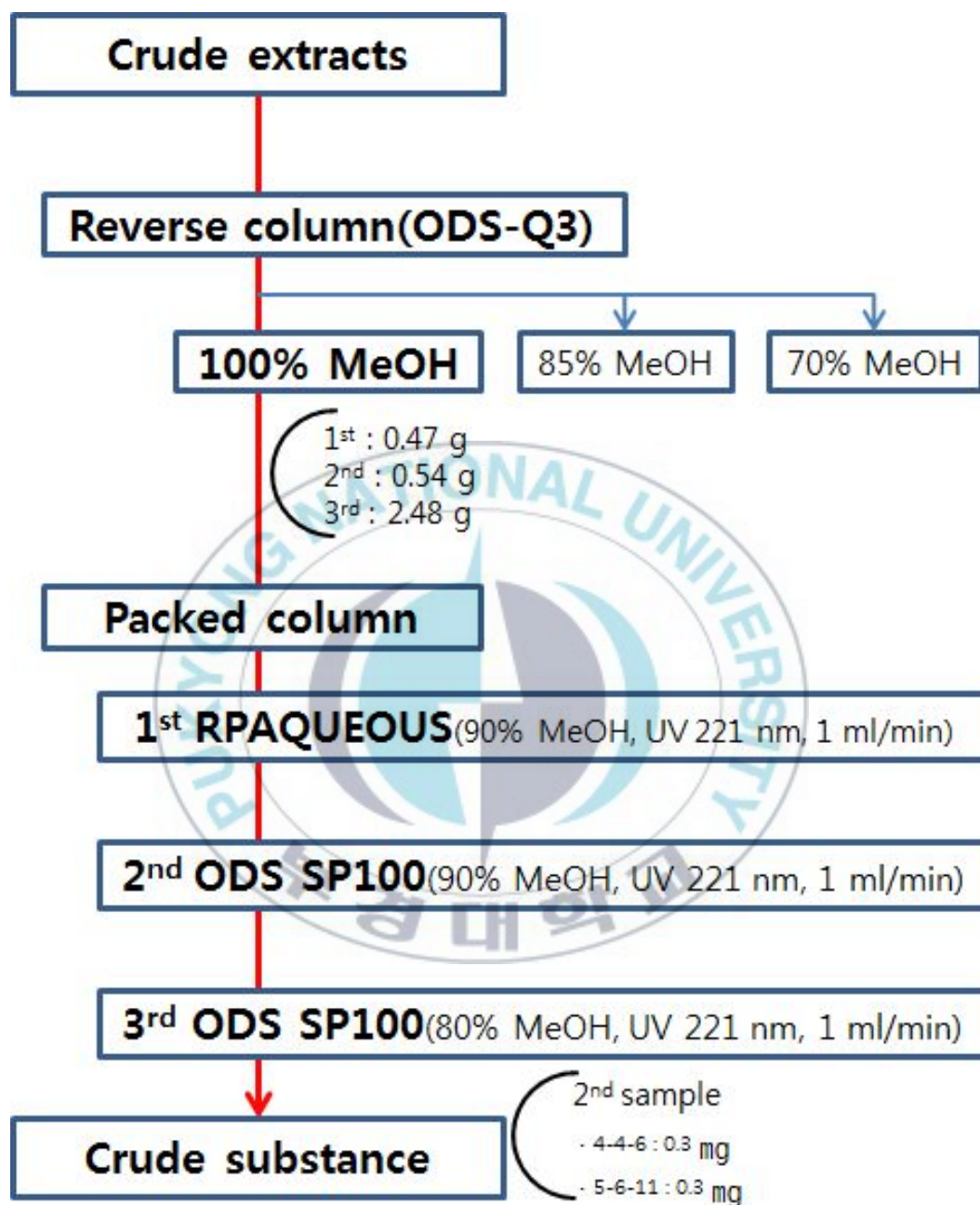


Fig. 7. Diagram of purification steps.

2. 3. 구조해석을 위한 질량 분석 및 핵자기 공명 분석

부분 정제한 ‘4-4-6’ (0.28 mg) 및 ‘5-6-11’ (0.3 mg)에 대하여는 고분해능질량분석기(High Resolution Mass Spectrometer, JEOL, JMS-700)에서 EI mode (70eV)로 측정하였으며, 양자 핵자기공명 분석은 ‘4-4-6’ 시료에 대하여 퓨리에 변환 핵자기공명 분석기(Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer, FT-NMR 600 MHz, JEOL, JNM ECP-600)에서 CDCl_3 를 용매로 하여 측정하였다.



2. 4. 해적생물(요각류)의 채집 및 분리

2. 4. 1. 요각류 채집

경상남도 고성군 하일면 소재의 부경대학교 수산과학기술센터에서 2013년 3월, 7월, 10월, 2014년 1 ~ 4월, 2014년 9 ~ 10월에 수온 20℃ ~ 25℃의 모충 수조와 치충 사육수조의 벽면이나 기질 표면에 유영하고 있는 요각류를 무작위로 사이펀(siphon)을 통해 채집하였다.

2. 4. 2. 요각류 분리 및 동정

바위털갯지렁이 모충사육수조와 치충 사육수조에서 무작위로 채집된 요각류를 80 μ m sieve를 이용하여 80 μ m 이상 크기의 요각류를 농축하여 이용하였다.

바위털갯지렁이 유생으로부터 추출, 분리 및 정제의 각 단계에서 채집된 시료를 이용하여 요각류 치사성 시험을 실시한 뒤 활성을 잃은 요각류 개체들의 크기, 두흉부의 형태 등 외적 형태의 특징을 고려하여 동정을 실시하였다.

2. 4. 3. 유생 방어물질의 요각류 치사성 시험

요각류를 24 or 48 well-plate(Fig. 5)의 각 hole에 각각 30개체로 조성하였고, 일정양(0.2 ml, 0.5 ml, 0.7 ml, 0.75 ml, 1 ml, 1.5 ml, 1.6 ml)의 멸균해수와 함께 넣었다. 대조구로 멸균해수를 사용하였으며, 실험구로는 유생의 MeOH 추출물을 각종 역상 칼럼(ODS-Q3, RPAQUEOUS, ODS SP100)으로부터 극성에 따라 분획한 각각의 획분의 일부 시료만을 따로 빼내어 진공감압농축기(Rotavapor R-114, BUCHD)와 증발기의 질소기류를 이용하여 용매를 모두 증발한 뒤 일정양(0.35 ml, 0.55 ml, 0.7 ml, 1 ml)의 멸균해수로 희석한 것을 실험에 사용하였다. 매시간 관찰(OLYMPUS-IX70)하였으며, 개체의 움직임이 완전히 멈추는 것을 개체가 죽은 것으로 판단하여 반수치사량(LD₅₀, lethal dose for 50 percent kill)을 기록하였다.

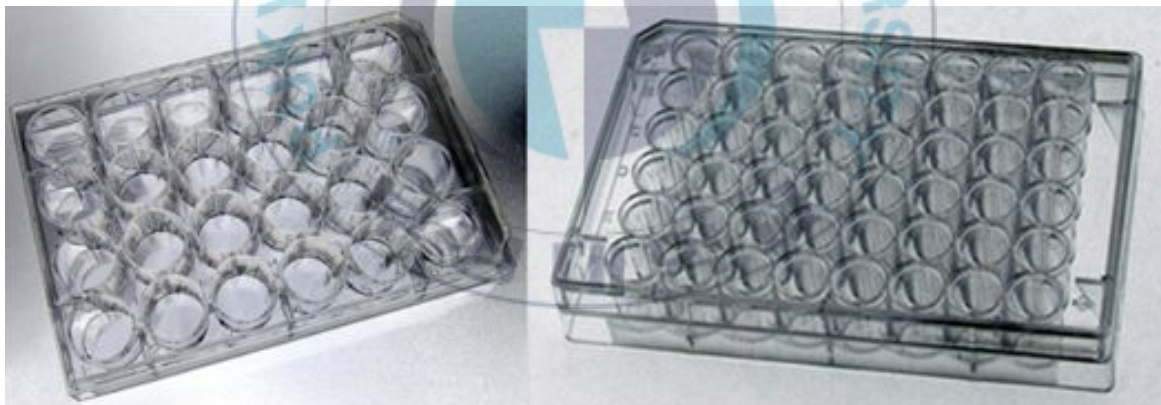


Fig. 8. 24 well-plate & 48 well-plate.

2. 5. 바위털갯지렁이 치충

2. 5. 1. 바위털갯지렁이 치충 채집

경상남도 고성군 하일면의 부경대학교 수산과학기술센터에서 2014년 6 ~ 8월경 생산된 유생을 수온 $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 유량 500 ml/min, 사료 급이 0.1 g/2 day, DO 6 ~ 8 mg/l의 환경에서 7일간 사육된 치충을 직접 채집하였다.

2. 5. 2. 바위털갯지렁이 치충 감수성 시험

바위털갯지렁이 치충을 6 well-plate 각 hole에 5개체를 넣은 후 멸균해수 5 ml 넣었다. 대조구로 멸균해수를 사용하였으며, 실험구로 멸균해수에 희석된 6th peak(2014년 1 ~ 3월 유생 시료의 HPLC에 의한 활성액 분리 1, 2차 정제한 획분(5-6)을 약 35 ppm의 농도 2시간 처리 후 7일간 관찰하였다. 기질은 조성해주지 않았으며, 사육수는 매일 한번 80%를 교환해주었다.



Fig. 9. 6 well-plate.

2. 6. 통계처리

자료의 통계처리는 SPSS program 18 으로 분산분석(ANOVA test)을 실시하여 최소유의차검정(LSD: least significant difference)으로 평균 간의 유의성($P < 0.05$)을 검정하였다.



3. 결 과

3. 1. 바위털갯지렁이 유생 채집 및 분리

경상남도 고성군 부경대학교 수산과학기술센터에서 2013년 6 ~ 8월(자연종묘), 2014년 1 ~ 3월(인공종묘), 2014년 6 ~ 8월(자연종묘)에 각각 생산된 유생의 채집 결과 2013년 6 ~ 8월(1차) 유생 약 250만미, 2014년 1 ~ 3월(2차) 약 250만미, 2014년 6 ~ 8월(3차) 약 550만미를 채집 및 분리하였다.

3. 2. 해적생물(요각류)의 동정

부경대학교 수산과학기술센터 2013년, 2014년 9 ~ 10월의 바위털갯지렁이 모충 사육수조와 치충 사육수조에서 무작위로 채집하였다. 요각류 치사성 시험에 활용된 개체 중 활성을 잃어 사진으로 촬영 후 자세한 형태의 관찰이 가능했던 개체의 수는 193개체였다. 이 중 *paracalanus* sp.(87%), *Tigriopus* sp.(6%), 기타(7%)로 확인되었다.

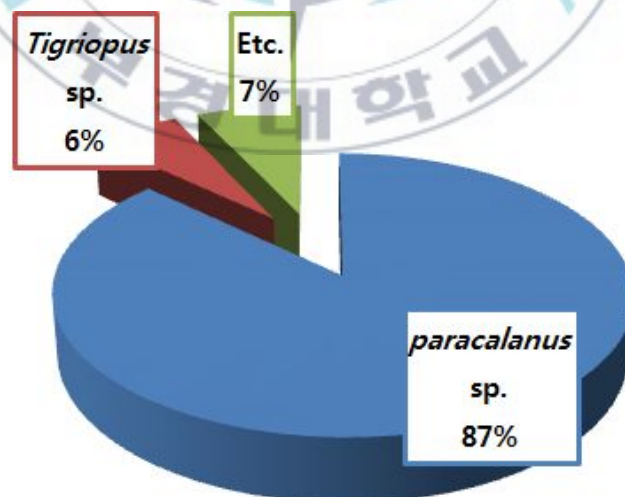


Fig. 10. Ratio of copepod in copepod lethality test.

3. 3. 바위털갯지렁이 유생의 방어물질 추출

3. 3. 1. 역상수지 칼럼(ODS-Q3)상에서 방어물질 분획

바위털갯지렁이 유생을 100% MeOH(HPCL grade)로 추출한 조추출물을 역상 칼럼(ODS-Q3, 1×20 cm)으로 분리하여 채집한 시료를 이용하여 유생 방어물질의 요각류 치사성 시험을 실시하였다.

그 결과 70% MeOH(HPCL grade) 희분(500 PPM)에서는 17시간동안 관찰하였지만 요각류의 활성화에는 아무런 영향이 나타나지 않았다.

85% MeOH(HPCL grade) 희분(500 PPM)에서는 10시간이 경과 후 비교적 작은 요각류 개체들에서 움직임이 느려지는 반응이 관찰되었고, 15시간 경과 후에는 요각류 12개체(약 30%)의 활성화가 없어지는 현상을 관찰하였다.

100% MeOH(HPCL grade) 희분(500 PPM)에서는 8시간이 지나면서 활성화 없어진 개체가 관찰되기 시작하였고, 시간의 경과에 따라 차츰 활성화 없어지는 개체의 수가 증가하였다. 11시간이 경과한 뒤에는 반수이상의 개체가 활성화 없어졌고, 17시간이 경과한 후에는 모든 개체의 활성화 없어짐을 확인하였다.

이때의 70% MeOH 농도구의 시료무게는 0.0724 g, 85% MeOH 농도구의 시료무게는 2.2369 g, 100% MeOH 농도구의 시료무게는 0.5462 g이었다.



Fig. 11. Fraction result of ODS-Q3 column.

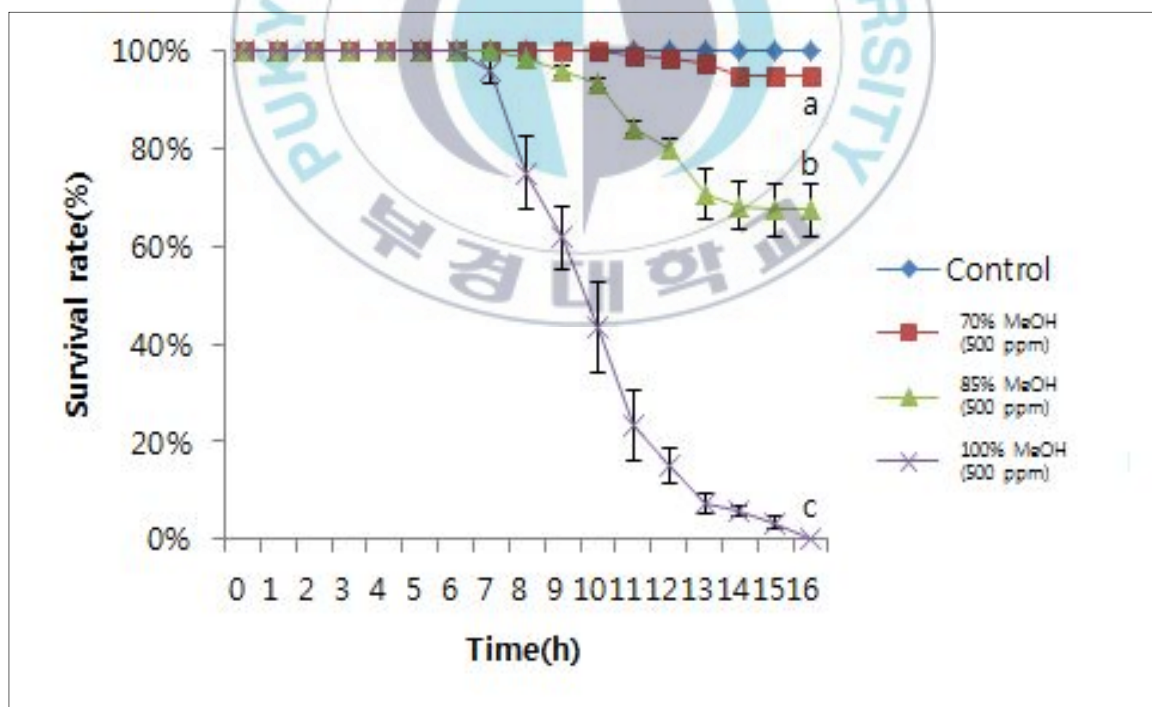


Fig. 12. Copepod lethality test result(fraction of ODS-Q3 column).

3. 3. 2. Packed column(RPAQUEOUS)상에서 방어물질 분획

역상 칼럼(ODS-Q3, 1 × 20 cm) 분획 후 실시한 요각류 치사성 시험에서 요각류의 치사성이 있었던 100% MeOH 농도구를 농축한 뒤 packed column(RPAQUEOUS, 1 × 25 cm)으로 분획을 진행하였다. packed column(RPAQUEOUS, 1 × 25 cm)의 분획 결과는 아래의 그림(Fig. 10)과 같이 나타났다. 여기서 얻어진 시료 중 요각류 치사성 시험에서 반응이 강하게 나타난 peak은 주로 15분에서 30분 사이의 peak였다.

각각의 peak를 요각류 치사성 시험을 한 결과 4th peak에서는 1시간이 경과 후 반수치사량(LD₅₀)을 넘어서는 것을 확인하였고, 5th, 6th peak에서는 2시간이 경과 후 반수치사량(LD₅₀)을 넘어서는 것을 확인하였다. 이때의 4th, 5th, 6th peak의 농도는 각각 430 PPM, 71 PPM, 360 PPM이었다.

요각류 치사성 시험에서 반응이 있었던 4th peak의 무게는 22.4 mg이었고, 5th peak은 20.5 mg이었다.

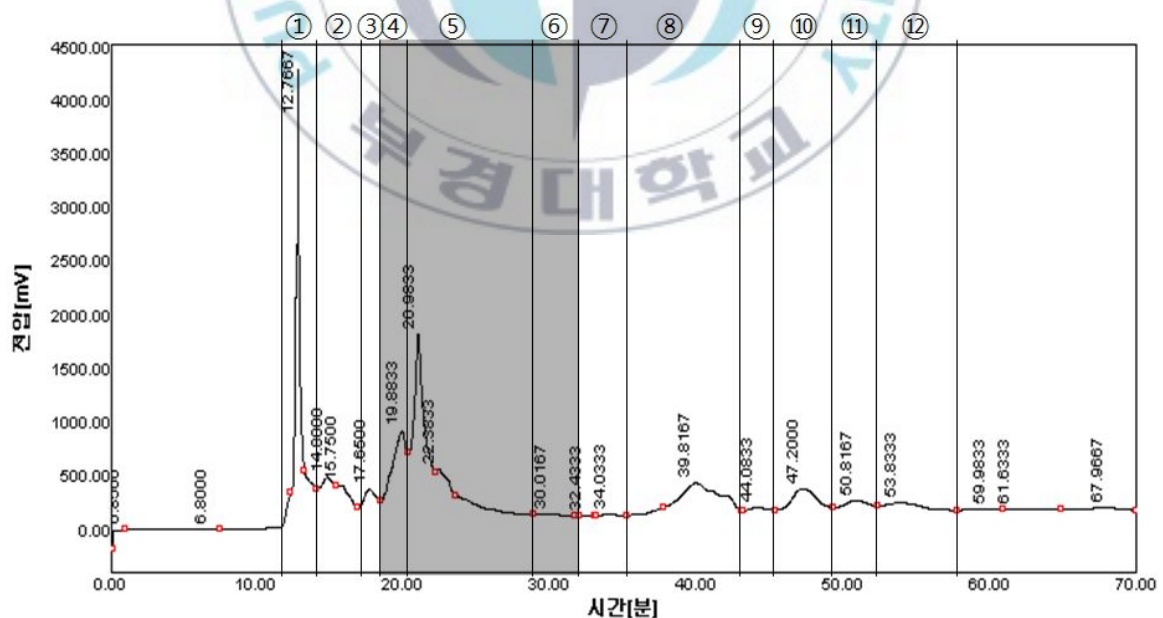


Fig. 13. Fraction result of RPAQUEOUS column(2nd larvae sample).

Table 2. Copepod lethality test of RPAQUEOUS column fraction

* LD₅₀ : +

Time (h)	Control	peaks											
		①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-

* 위의 표는 packed column(RPAQUEOUS)상에서 1차 분획하여 유생 방어물질의 요각류 치사성 시험을 한 결과이다. ④은 18.5분부터 20.5분, ⑤은 20.5분부터 29.8분, ⑥은 29.8분부터 33.3분까지의 peak로 위의 표와 같이 ④(430 PPM)은 1시간 경과 후 ⑤(71 PPM), ⑥(360 PPM)은 2시간 경과 후에 LD₅₀을 확인하였다.



3. 3. 3. Packed column(ODS SP100)상에서 방어물질의 분획

Packed column(RPAQUEOUS, NOMURA CHEMICAL, 1 × 25 cm) 상에서 요각류의 활성을 잃게 했던 4th peak(4), 5th peak(5)를 각각 농축한 후 packed column(ODS SP100, Senshu Pak, 1 × 25 cm) 상에서 분획을 진행하였다.

1. Packed column(RPAQUEOUS) 상에서의 4번째 획분(4th peak)의 분획

1) Peaked column(ODS SP100)상에서 2차 분획

Packed column(RPAQUEOUS)상에서의 4번째 획분(4)의 packed column(ODS SP100)상에서 2차 분획 결과, 아래의 그림(Fig. 11)과 같이 5개의 peak으로 분획되었다. 총 5개의 peak 중 4th peak(4-4, 25 PPM)에서 4시간 경과 후 반수치사량을 넘어섰고, 7시간이 경과하면서부터 약 13%의 생존율을 유지하였다. 이때의 시료 무게는 2.5 mg이었으며, 이 peak을 농축하여 packed column(ODS SP100)상에서 3차 분획을 진행하였다.

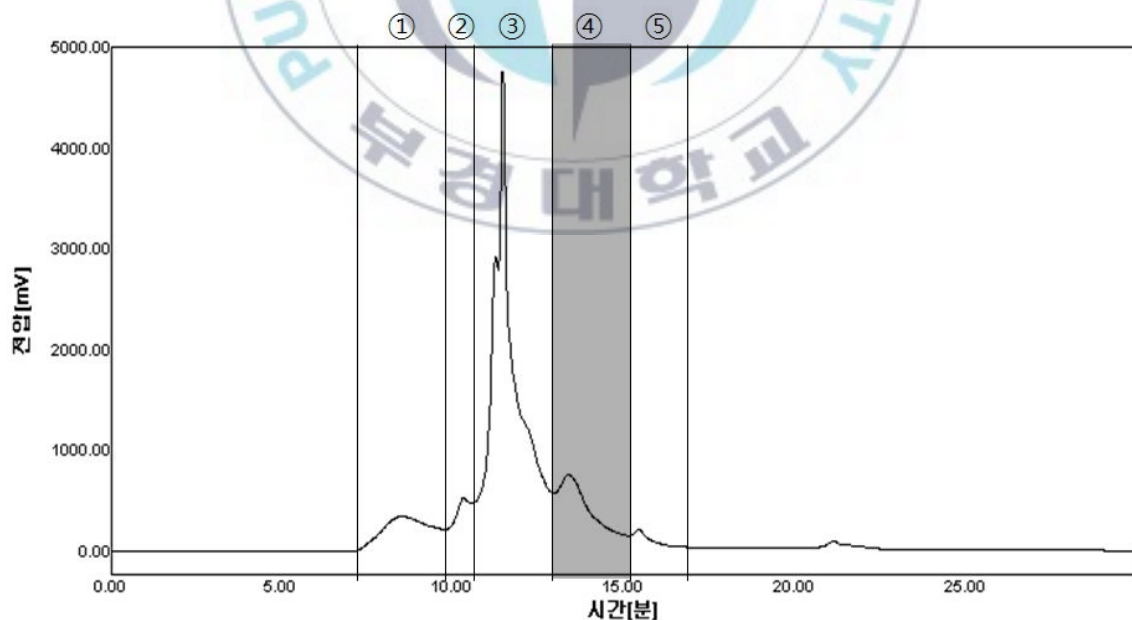


Fig. 14. 2nd ODS SP100 column fraction result of 4th peak(RPAQUEOUS column).

Table 3. Copepod lethality test of 4th peak(2nd ODS SP100 column fraction)

* LD₅₀ : +

Time (h)	Control	peaks				
		①	②	③	④	⑤
0	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	+	—
4	—	—	—	—	+	—

* 위의 표는 packed column(RPAQUEOUS)상에서 4번째 획분(4)을 packed column(ODS SP100)상에서 2차 분획하여 유생 방어물질의 요각류 치사성 시험을 한 결과이다. ④(25 PPM)은 13.0분부터 15.3분의 peak으로 표와 같이 3시간 경과 후에 LD₅₀을 확인하였고, 다른 peak에서는 요각류의 활성을 떨어뜨리는 반응을 관찰할 수 없었다.



2) Packed column(ODS SP100)상에서 3차 분획

2차 packed column(ODS SP100)상에서 4번째 획분(4-4)으로 packed column(ODS SP100)상에서 3차 분획을 한 결과, 아래의 그림(Fig. 12)과 같이 총 9개의 peak로 분획되었다. 총 9개의 peak 중 6th peak(16.0분 ~ 22.3분)에서 요각류의 활성이 없어지는 것을 확인하였고, 이 6th peak을 약 14 PPM과 70 PPM으로 유생 방어물질의 요각류 치사성 시험을 실시하였다. 약 14 PPM으로 처리한 실험구에서는 3시간이 경과하면서부터 요각류의 활성이 없어진 개체를 확인하였고, 5시간이 경과하면서 LD₅₀에 도달하였으나, 시간이 더욱 경과함에도 모든 개체의 활성이 없어지지 않았다. 약 70 PPM으로 처리한 경우에는 2시간이 경과하면서 LD₅₀을 넘어섰고, 활성이 남아있던 요각류의 개체도 시간이 경과함에 따라 서서히 활성이 없어졌고, 7시간이 경과한 후에는 모든 요각류 개체의 활성이 없어진 것을 확인하였다. 최종적으로 6번째 획분(4-4-6)은 0.3 mg의 양이었다.

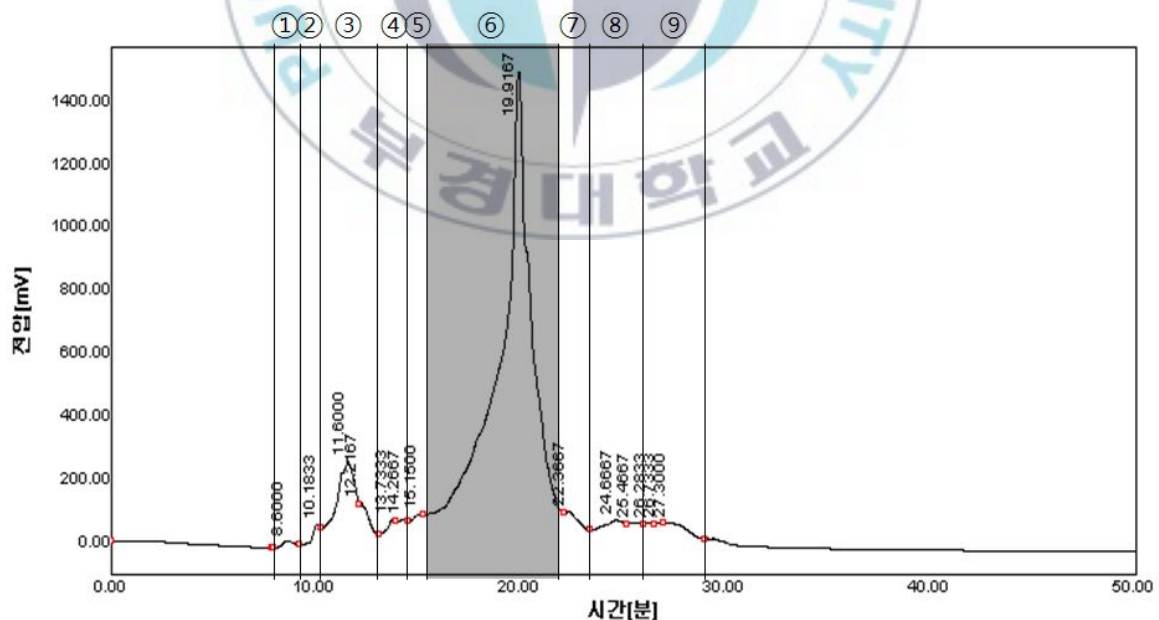


Fig. 15. 3rd ODS SP100 column fraction result of 4th peak(2nd ODS SP100 column).

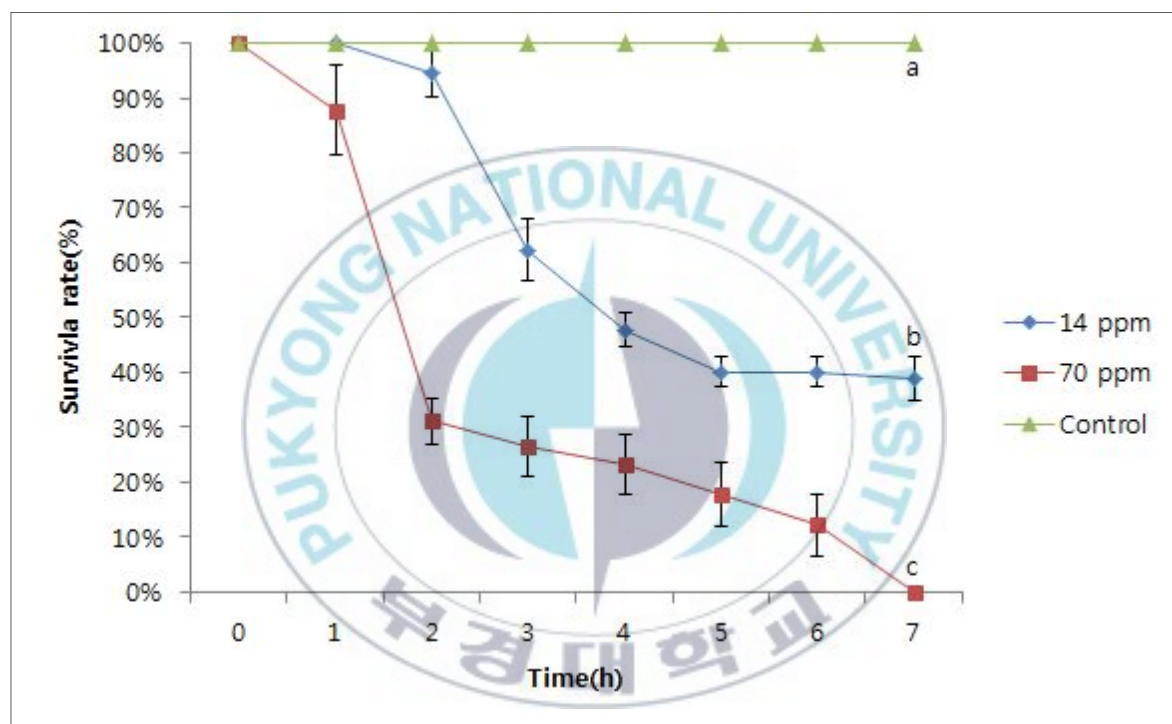


Fig. 16. Copepod lethality test result of 6th peak(3rd ODS SP100 column).

2. Packed column(RPAQUEOUS)상에서의 5번째 획분(5th peak)의 분획

1) Packed column(ODS SP100)상에서 2차 분획

Packed column(RPAQUEOUS)상에서의 5번째 획분(5)의 packed column(ODS SP100)상에서 3차 분획 결과, 아래의 그림(Fig. 14)과 같이 분획되어졌으며, 총 10개의 peak 중 6th peak(5-6, 36 PPM), 7th peak(5-7, 9 PPM), 9th peak(5-9, 9 PPM), 10th peak(5-10, 45 PPM)에서 반응이 확인되었고, 6th peak에서는 1시간 경과 후, 7th peak에서는 2시간 경과 후, 9th, 10th peak에서는 3시간 경과 후에 반수치사량을 넘어섰다. 따라서 가장 peak가 뚜렷하고 반응이 가장 강했던 6th peak(5-6)과 7th peak(5-7)을 농축하였다. 이때의 6th peak(5-6) 무게는 5.1 mg이었고, 이를 packed column(ODS SP100)으로 3차 분획을 실시하였다.

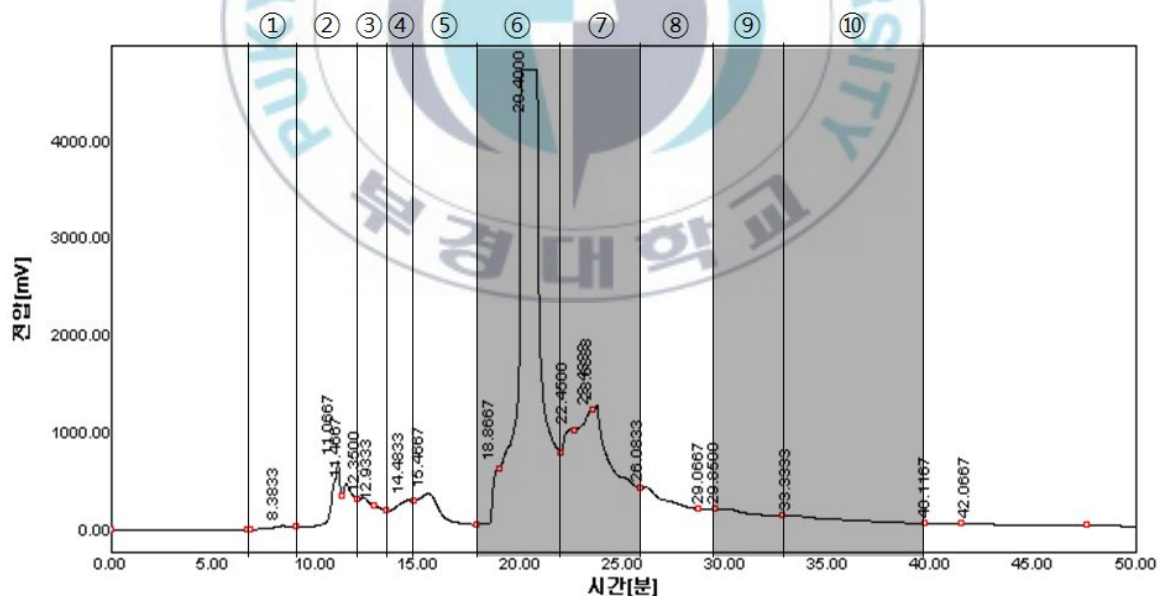


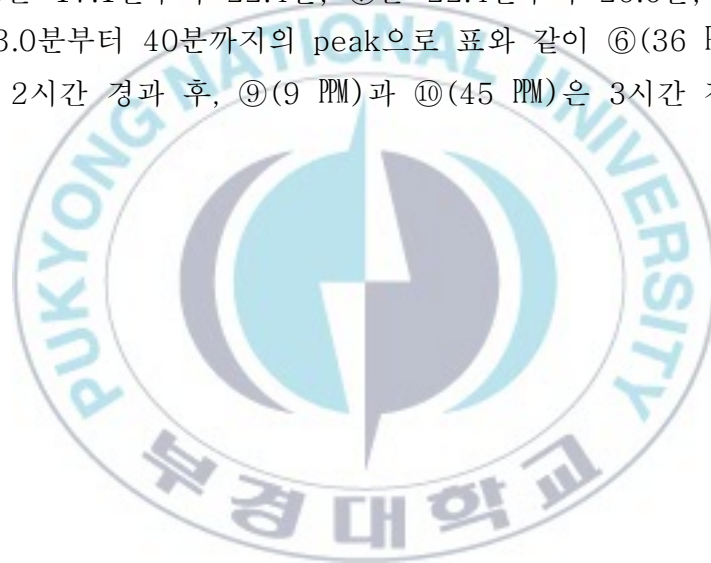
Fig. 17. 2nd ODS SP100 column fraction result of 5th peak(RPAQUEOUS column).

Table 4. Copepod lethality test of 5th peak(2nd ODS SP100 column fraction)

* LD₅₀ : +

Time (h)	Control	peaks									
		①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+
4	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+

* 위의 표는 packed column(RPAQUEOUS)상에서 5번째 획분(5)을 packed column(ODS SP100)상에서 2차 분획하여 유생 방어물질의 요각류 치사성 시험을 한 결과이다. ⑥은 17.1분부터 22.4분, ⑦은 22.4분부터 26.0분, ⑨은 29.0분부터 33.0분, ⑩은 33.0분부터 40분까지의 peak으로 표와 같이 ⑥(36 PPM)은 1시간 경과 후, ⑦(9 PPM)은 2시간 경과 후, ⑨(9 PPM)과 ⑩(45 PPM)은 3시간 경과 후에 LD₅₀을 확인하였다.



2) Packed column(ODS SP100)상에서 3차 분획

2차 packed column(ODS SP100)상에서 6번째 획분(5-6)으로 packed column(ODS SP100)상에서 3차 분획을 한 결과, 아래의 그림(Fig. 15)과 같이 12개의 peak로 분획되었다. 총 12개의 peak 중 11th peak(33.8분 ~ 39.7분)에서 요각류의 활성이 없어지는 것을 확인하였고, 약 10 PPM, 20 PPM, 40 PPM으로 요각류 치사성 시험을 실시하였다. 약 10 PPM과 20 PPM으로 처리한 실험구에서는 2시간이 경과하면서부터 요각류의 대부분의 개체가 활성이 없어진 것을 확인하였고, 3시간 경과 후에는 모든 개체의 활성이 없어졌다. 약 40 PPM으로 처리한 실험구에서는 1시간이 경과하면서부터 일부 개체의 활성이 없어진 것을 확인하였고, 2시간이 경과하면서부터 모든 개체의 활성이 없어진 것을 확인하였다. 최종적으로 11번째 획분(5-6-11)은 0.3 mg의 양이었다.

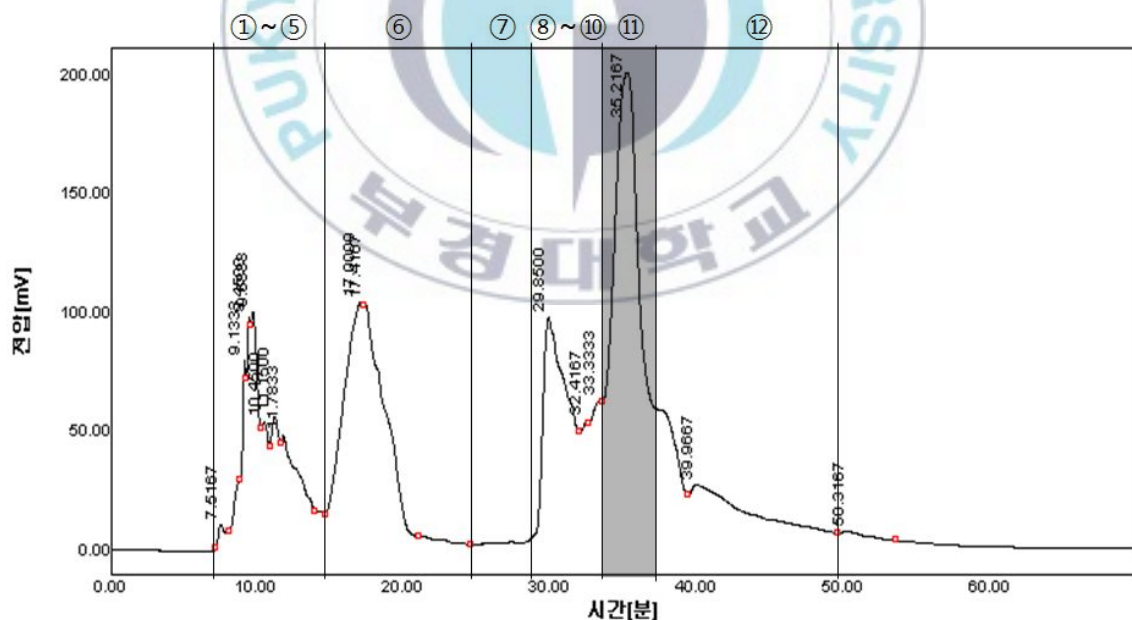


Fig. 18. 3rd ODS SP100 column fraction result of 6th peak(2nd ODS SP100 column).

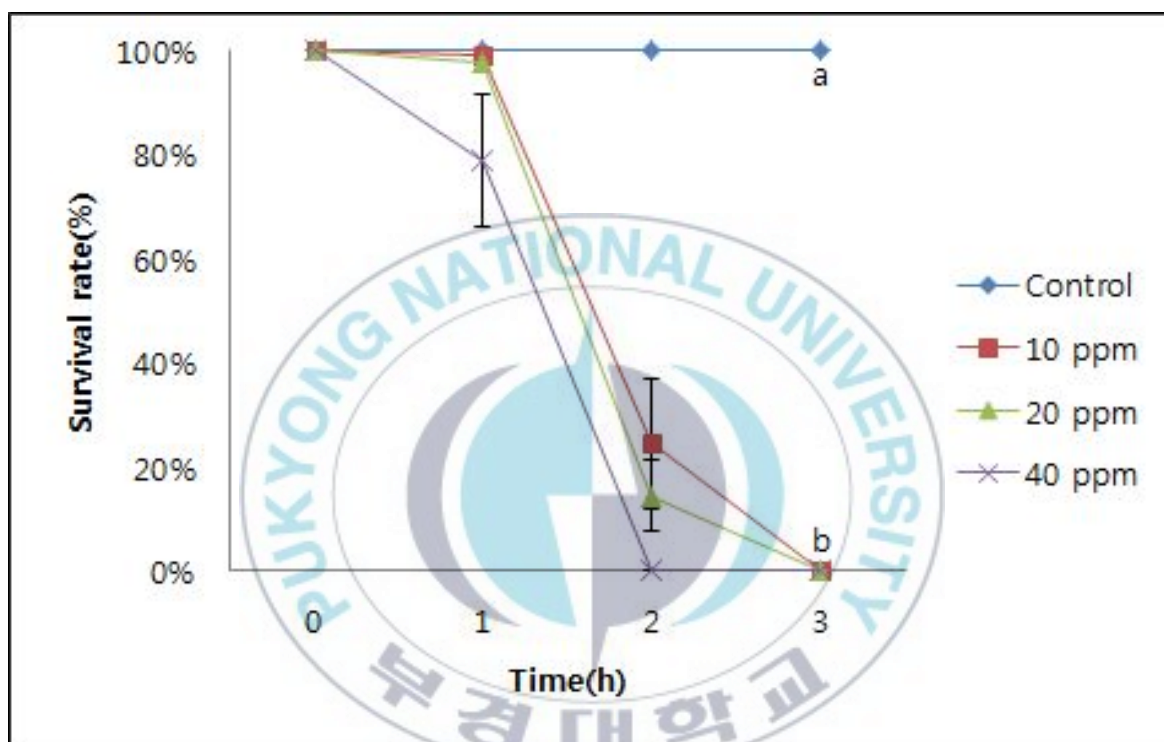


Fig. 19. Copepod lethality test result of 11th peak(3rd ODS SP100 column).

3. 4. 바위털갯지렁이 유생의 방어물질 수득율

본 연구에서 바위털갯지렁이 유생의 방어물질 추출, 분리 및 정제의 수득율은 유생 약 250만미(습중량 : 약 130 g)를 추출 후 역상 칼럼(ODS-Q3)의 분리를 한 결과 0.4%의 수득율을 보였다. Packed column(RPAQUEOUS)상에서 분획 후 요각류의 활성을 강하게 떨어뜨리고 peak의 형태도 뚜렷한 peak 중 4th, 5th peak은 packed column(ODS SP100)상에서 2차, 3차 분획이 진행되면서 4th peak(RPAQUEOUS)은 11%, 12%의 수득율을 보였고, 5th peak (RPAQUEOUS)은 25%, 6%의 수득율을 보였다. 최종적으로 두 개의 peak 모두 0.3 mg의 Crude substance를 획득하였다(Table 5).

Table 5. Yield of defensive substances from *M. sanguinea* larvae 130 g(2nd larvae sample)

유생 250만미	RPAQUEOUS 칼럼		ODS SP100 칼럼	
	1차 분획		2차 분획	3차 분획
	4 th peak	무게 (mg) 수득율 (%)	2.5 11	0.3 12
	5 th peak	무게 (mg) 수득율 (%)	5.1 25	0.3 6
		4		

* Packed column(RPAQUEOUS)상에서 1차 분획 후 유생 방어물질의 요각류 치사성 시험에서 요각류의 활성이 없어졌던 4th peak와 5th peak의 각각의 수득율을 보면, 4th peak는 정제 단계별로 11%, 12%의 수득율이 보였고, 5th peak는 25%, 6%의 수득율이 보였다.

3. 5. 바위털갯지렁이 치충 감수성 시험

Packed column(RPAQUEOUS)상에서의 획분(5)의 2차 packed column(ODS SP100) 획분(5-6)을 이용하여 바위털갯지렁이 치충을 대상으로 한 실험에서 7일이 경과했음에도 치충의 생존에 영향을 주지 않는 것으로 관찰되었다.

3. 6. 방어물질의 질량분석에 의한 추정 구조

요각류 치사성 시험에서 요각류에 대한 치사 활성이 나타난 획분인 ‘4-4-6’ 및 ‘5-6-11’ 시료에 대한 질량분석 결과를 Fig. 17과 Fig. 18에 각각 나타내었다. ‘4-4-6’ 시료는 m/z 278에 ‘5-6-11’ 시료는 m/z 280에 각각 M^+ 이온이 관측되어 분자량이 각각 278 및 280으로 추정되었다.

이들의 추정된 분자량으로부터 ‘4-4-6’은 불포화 지방산의 일종으로 2중 결합을 2개 가진 linoleic acid(9,12-octadecadienoic acid, 분자량 278, 분자식 $C_{18}H_{32}O_2$)와 일치하였으며, ‘5-6-11’은 2중 결합이 3개인 linolenic acid(9,12,15-octadecatrienoic acid, 분자량 280, 분자식 $C_{18}H_{30}O_2$)와 일치하였다. 또한, 이들의 fragment 이온들의 peak들을 linoleic acid 및 linolenic acid의 질량분석 spectrum과 비교한 결과, 이들도 잘 일치하여(William, 2013) 불순물이 들어 있기는 하지만 이들 지방산들이 주성분으로 되어 있으며, 이들이 요각류를 치사시키는 방어물질로 작용하는 것으로 추정되었다(Fig. 19, Fig. 20).

한편, ‘4-4-6’을 중chloroform($CDCl_3$)을 용매로 하여 600 MHz에서 측정한 proton NMR spectrum에서는 시료량이 너무 적어(0.28 mg) 구조를 해석하기는 불가능 하였으나 methyl기(CH_3- , 0.9 ppm)와 methylene(CH_2- , 1.58 ppm)기의 존재가 확인되었다(Fig. 21).

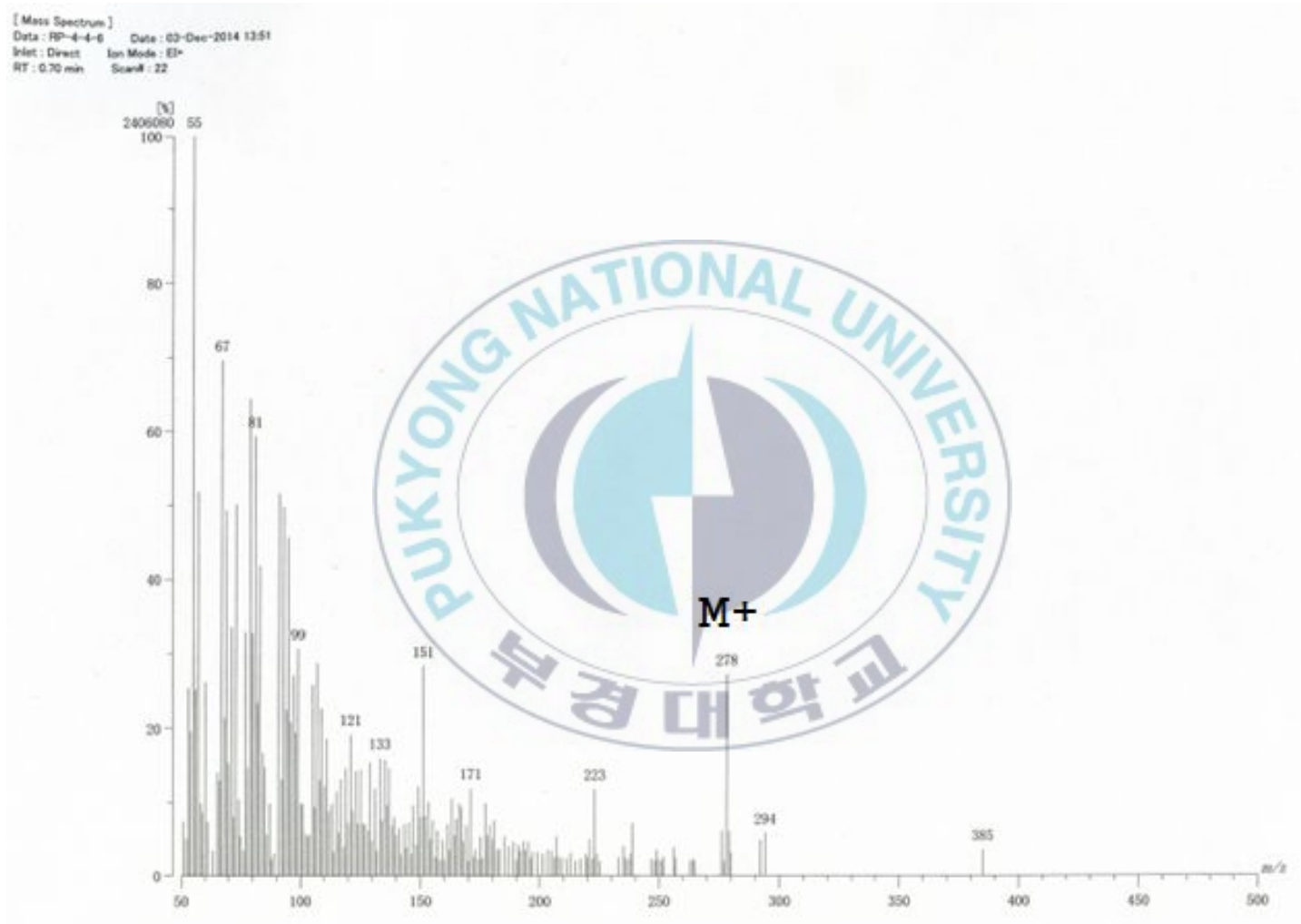


Fig. 20. EI-MS spectrum of '4-4-6' .

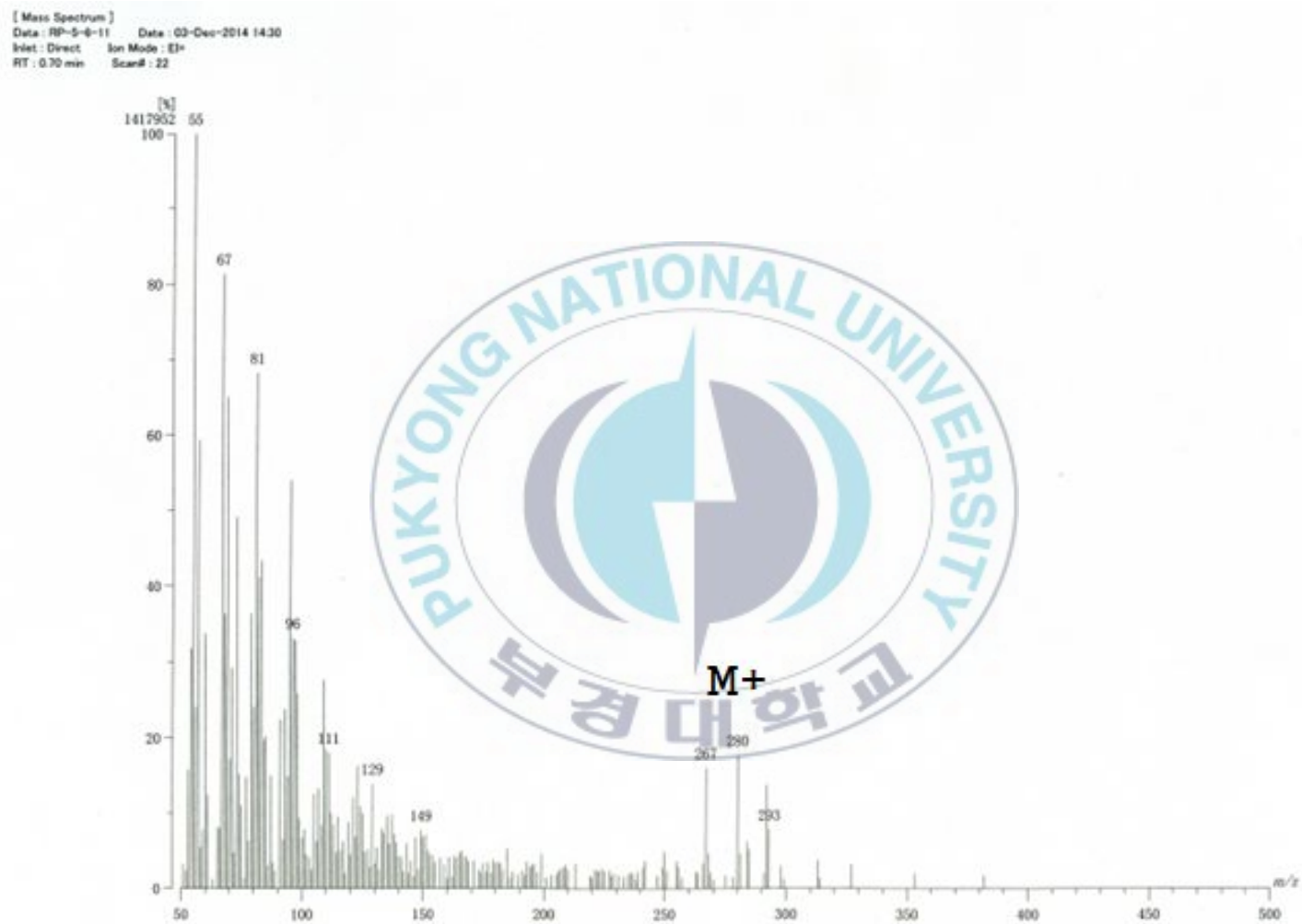


Fig. 21. EI-MS spectrum of '5-6-11' .

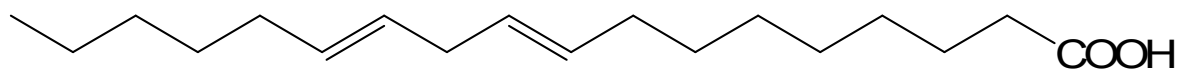


Fig. 22. Presumed structure of '4-4-6' (linoleic acid).

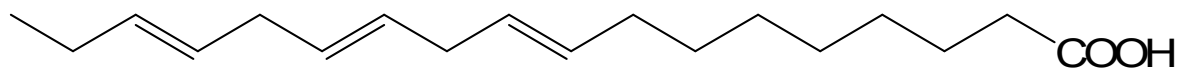


Fig. 23. Presumed structure of '5-6-11' (linolenic acid).

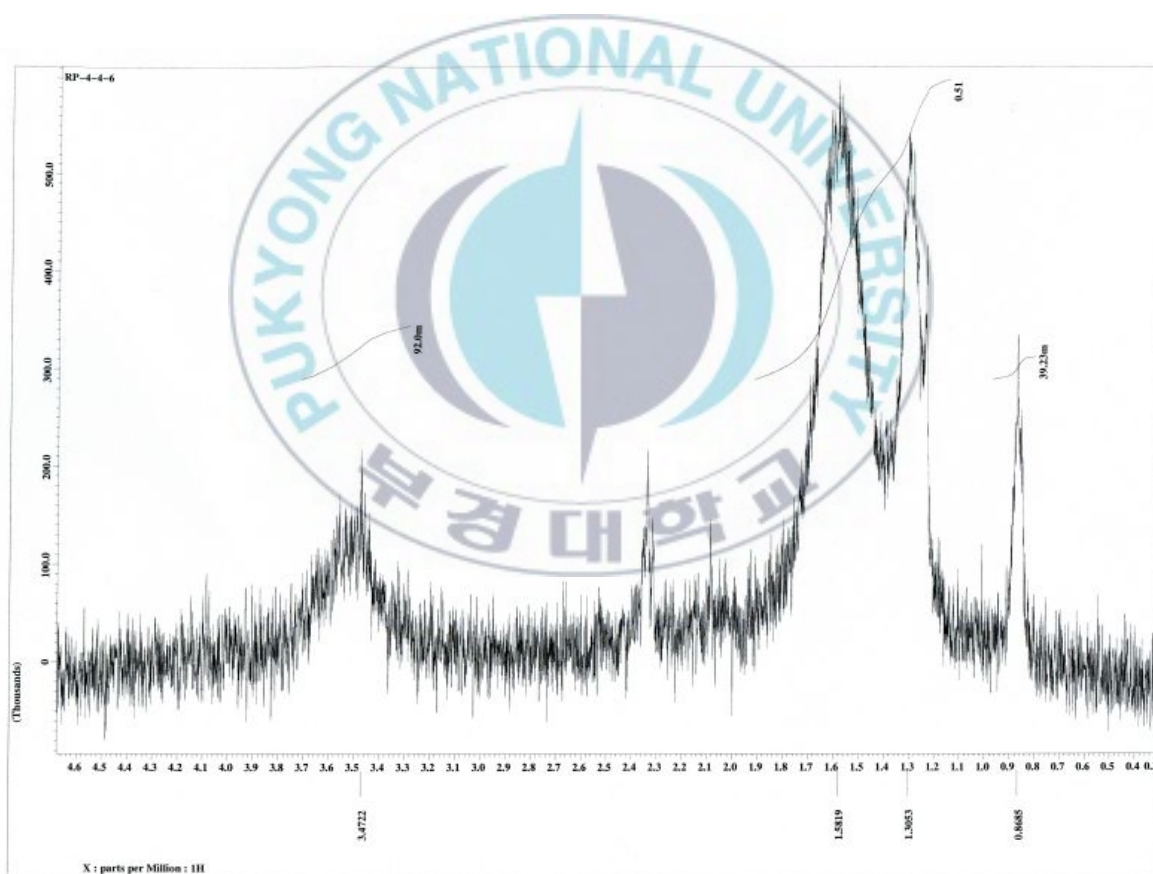


Fig. 24. Proton NMR spectrum of '4-4-6' (600 MHz, CDCl_3).

4. 고 찰

4. 1. 바위털갯지렁이 유생

부경대학교 수산과학기술센터에서 생산되고 있는 바위털갯지렁이 유생은 자연종묘와 인공종묘로 구분될 수 있다. 자연종묘는 유수식 시스템의 자연수온 환경에서 1년간 성성숙을 한 후 생산되어진 유생이고, 인공종묘는 자연수온에서 사육되다가 겨울철 수온조절을 통해 생산되어진 유생이다. 자연종묘와 인공종묘의 차이는 크기에서부터 다른데 자연종묘는 일반적으로 300 μm 이상 크기를 가지지만, 인공종묘는 자연종묘보다 작은 200 μm 이상의 크기를 가진다.

2013년 6 ~ 8월, 2014년 6 ~ 8월에 생산되는 바위털갯지렁이 자연종묘와 2014년 1 ~ 3월에 생산되는 인공종묘에서 채집된 유생을 다른 생물과의 크기 차이를 이용한 분리와 유생의 뭉침 특성을 이용한 분리(Fig. 22), 원심분리기를 이용한 분리로 유생만을 따로 분리하였다.

바위털갯지렁이 유생을 분리함에 있어 타 생물을 따로 분리시키는 것은 비교적 손쉽게 이루어졌으나, 타 생물이 지나치게 많은 경우 유생이 뿔어내는 점액질에 의해 타 생물이 죽고 가라앉게 되어 순수한 유생을 분리하는데 어려움이 있었다.

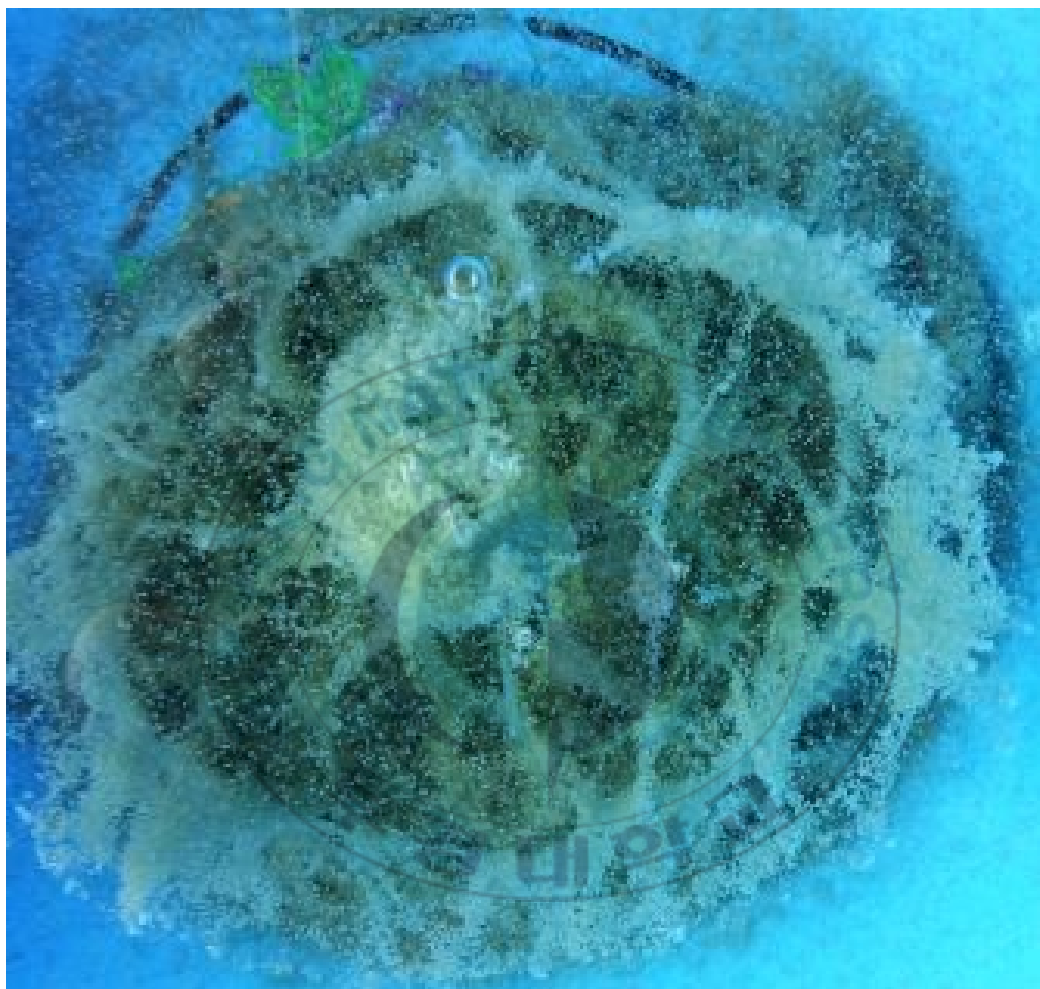


Fig. 25. Agglomeration of *Marphysa sanguinea* larvae.

4. 2. 해적생물(요각류)

바위털갯지렁이 모충사육수조와 치충사육수조에서 무작위로 채집된 요각류 중 대부분은 *paracalanus* sp. (Fig. 23)였다. 이는 실험에서 이용된 전체 요각류의 87%를 차지했으며, 형태적 특징은 장축이 긴 계란형의 두흉부를 가진다. 두부와 흉부는 융합되어 있다. 두부의 앞부분은 둥글며, 제 5흉절의 끝부분도 둥글다. 복절은 암컷에 있어 4마디, 수컷에서는 5마디로 이루어진다. 몸체에서 유일하게 비대칭인 곳은 수컷의 제 5흉지이다. 가는 액사를 포함하여 액각을 가지고 있다. 또한 제 5흉지는 퇴화되어 있으며, 양성 모두 분지되어 있지 않다. 암컷에 있어서는 2마디로 이루어진다. *paracalanus* sp.는 직접적인 포식으로 생존율을 저하시키진 않지만 대량번식을 통해 간접적인 영향으로 스트레스를 증가시켜 바위털갯지렁이 유생의 생존율 감소에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

그리고 Harpacticoid 계통인 *Tigriopus* sp.(Fig. 24)는 6%미만의 비율을 차지하는 정도였지만, 소량의 포식성 요각류라도 밀도가 높은 초기 유생의 사육수조에서는 포식성 요각류의 천적이 없고 대량번식이 가능하기 때문에 유생의 초기 생존율 저하에 큰 영향을 주는 것으로 판단된다.

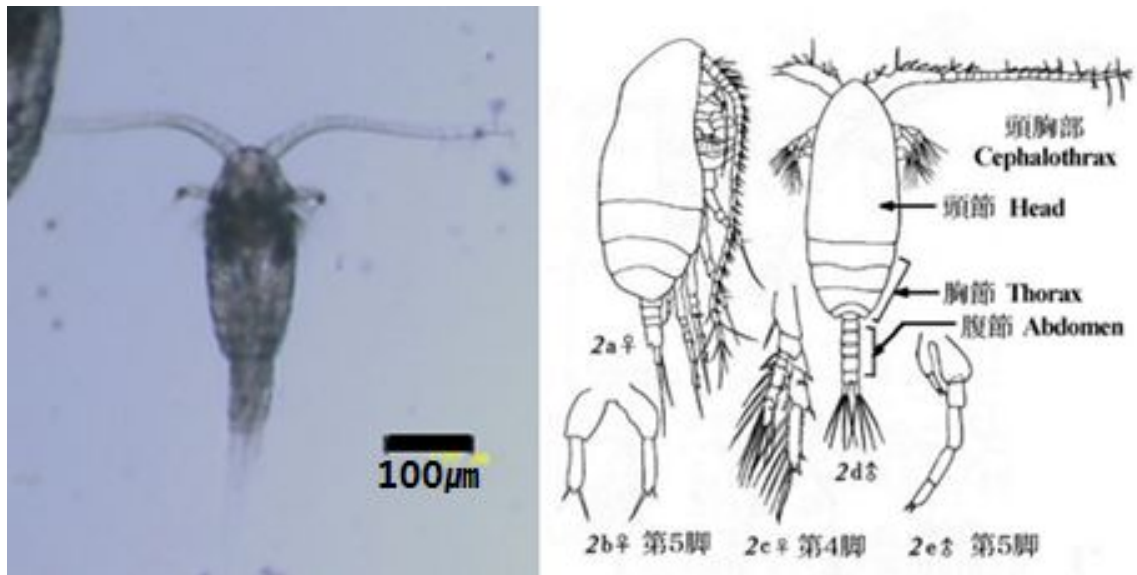


Fig. 26. Major genus in copepod lethality test(*paracalanus* sp.).

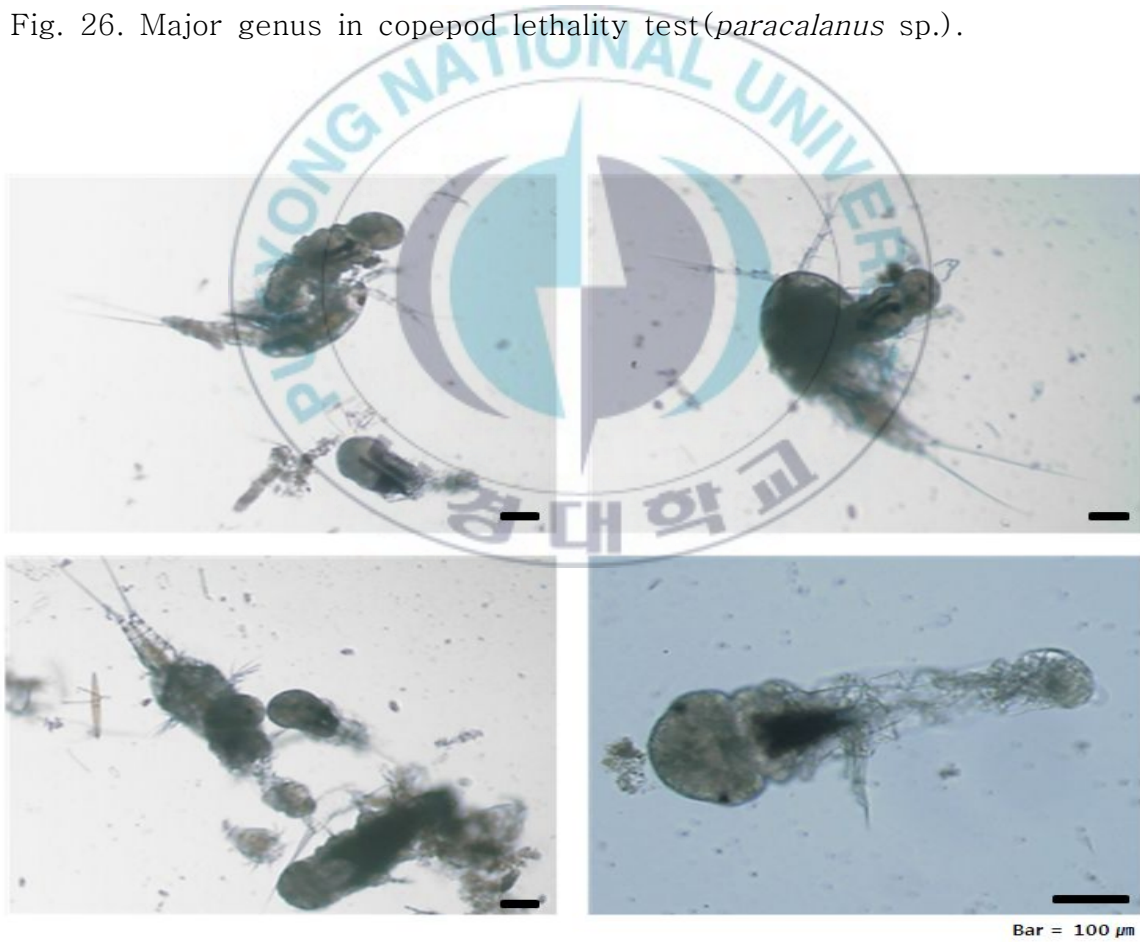


Fig. 27. *Marphysa sanguinea* juvenile predation of predacious copepod.

4. 3. 바위털갯지렁이 유생의 방어물질

바위털갯지렁이 유생의 방어물질을 추출하는 과정에서 여과지에 걸리지 않는 미세한 잔사가 존재하는데 이것을 제거하기 위해 원심분리(2000 RPM/20 min)를 하였다.

역상 칼럼(ODS-Q3)상에서 MeOH(HPLC grade) 농도별 분리를 한 후 방어물질이 있는 것으로 판단되는 100% MeOH(HPLC grade) 농도구를 농축하고 온도가 내려가게 되면 잔사가 생기는데 잔사가 존재하는 가운데 packed column(RPAQUEOUS)상에서 분획하게 되면 잔사에 의해 peak의 높이나 형태가 달라지기 때문에 시료를 30℃ ~ 40℃로 유지한 상태에서 진행하였다.

Packed column(RPAQUEOUS)상에서 분획된 획분 중에 유생 방어물질의 요각류 치사성 시험을 통해 최소 3개 이상이 유생의 방어물질로 판단되었다. 그 중 가장 반응이 강하고 시료의 양이 많은 것을 선별하여 다음 단계의 정제를 진행하였다.

처음에는 packed column(RPAQUEOUS)상에서 90% MeOH(HPLC grade)을 이동상으로 이용하여 분획한 후 이동상의 농도를 85% MeOH(HPLC grade)로 낮춰 2차 분획을 실시하였으나, 분획된 모든 peak에서 요각류의 활성이 없어지는 반응이 나타나지 않았다. 즉, 85% MeOH(HPLC grade)을 이동상으로 이용한 packed column(RPAQUEOUS)의 분획은 유생의 방어물질이 분획되지 않는 것으로 판단할 수 있었다. 그래서 칼럼을 packed column(ODS SP100)으로 교체하여 분획을 실시하였다.

Packed column(ODS SP100)으로 교체 후 90% MeOH(HPLC grade)을 이동상으로 2차 분획을 하였고, 다음으로 3차 분획을 80% MeOH(HPLC grade)을 이동상으로 바꾸어 분획을 진행하였다. 이 과정은 packed column(RPAQUEOUS)상에서 85% MeOH(HPLC grade)를 이동상으로 이용한 분획에서는 바위털갯지렁이 유생의 방어물질을 확인하는 요각류 치사성 시

험에서 요각류의 활성이 없어지는 peak를 확인할 수 없었던 반면, packed column(ODS SP100)으로 교체 후 90% MeOH(HPLC grade)과 80% MeOH(HPLC grade)을 이동상으로 이용하여 분획 한 경우에는 요각류 치사성 시험의 요각류 활성이 없어지는 peak를 확인할 수 있었고, 각각의 peak의 분리도도 packed column(RPAQUEOUS)상에서의 분획 보다 더욱 명확하게 분리되는 것을 확인할 수 있었다.

유생 방어물질의 요각류 치사성 시험은 유생 내의 다양한 물질 가운데 방어물질이라는 특정 물질을 확인하기 위한 실험으로 멸균해수를 넣은 것과 각 peak별 물질을 멸균해수에 용해시킨 것으로 대조구와 실험구를 설정하였다. Packed column(RPAQUEOUS)상에서의 분획 후 각 peak별 물질의 요각류 치사성 시험 결과, 가장 무게가 많고 빠른 시간 안에 반응이 나타난 peak의 물질을 선택하여 ODS SP100 칼럼 상에서 2, 3차 분획을 실시하였다. 각 peak별 물질은 순물질로 보기 어렵기 때문에 농도를 정확히 측정할 순 없었으나, packed column(RPAQUEOUS)상에서의 4번째 획분(4)의 최종 정제 획분(4-4-6)은 대략 70 ppm 정도의 농도에서 2시간 이내에 반수치사량(LD₅₀)에 도달하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 packed column(RPAQUEOUS)상에서의 5번째 획분(5)의 최종 정제 획분(5-6-11)은 약 10, 20 ppm으로 처리하였을 경우 3시간이 경과하게 되면 모든 요각류 개체의 활성이 없어졌고, 약 40 ppm으로 처리한 경우에는 2시간이 경과하면 모든 요각류 개체들의 활성이 없어졌다.

위의 요각류 치사성 시험에서 요각류에 대한 치사성이 나타난 획분인 '4-4-6' 및 '5-6-11' 시료에 대한 질량분석 결과 '4-4-6' 시료는 m/z 278에 '5-6-11' 시료는 m/z 280에 각각 M⁺ 이온이 관측되어 분자량이 각각 278 및 280으로 추정되었다.

이들의 추정된 분자량으로부터 '4-4-6'은 불포화 지방의 일종으로 2중 결합을 3개 가진 linolenic acid(분자량 278, 분자식 C₁₈H₂₈O₂)와 일치하였으

며, '5-6-11' 은 2중 결합이 2개인 linoleic acid(분자량 280, 분자식 $C_{18}H_{30}O_2$)와 일치하였다. 또한, 이들의 fragment 이온들의 peak들을 linoleic acid 및 linolenic acid의 질량분석 spectrum과 비교한 결과, 이들도 잘 일치하여 불순물이 들어 있기는 하지만 이들 지방산들이 주성분으로 되어 있으며, 이들이 요각류를 치사시키는 방어물질로 작용하는 것으로 추정되었다.

이러한 결과로 보아 바위털갯지렁이는 초기 유생 단계에 주변 환경의 포식자들로부터 자신을 보호하기 위한 방법으로 특정한 방어물질을 가지는 것이 분명한 것으로 판단되었다. 이 방어물질이 유생에서부터 성체까지 모든 성장 단계에서 내포하고 있는 물질인지 확인하진 못했으나, 바위털갯지렁이의 생태적 특성을 고려할 때 초기 유생의 부유생활 시기와 착저 후 기질표면에서 생활하는 시기에는 존재 할 것으로 추정된다.



4. 4. 유생으로부터 추출된 방어물질의 구제물질 활용

Packed column(RPAQUEOUS)상에서의 5번째 획분(5)의 packed column(ODS SP100)상에서 2차 분획 결과의 6번째 획분(5-6)으로 요각류와 바위털갯지렁이 치충을 동일한 농도(35 PPM)에서 반응 실험을 한 결과에서는 요각류는 2시간 이내에 활성을 잃었지만 바위털갯지렁이 치충을 대상으로 시험한 결과에서는 별다른 영향을 주지 못하는 것으로 관찰되었다.

따라서 본 연구에서는 바위털갯지렁이 유생의 방어물질로 바위털갯지렁이 대량종묘생산에서 구제 물질로의 활용 가능성을 확인하였고, 이 물질이 어떠한 물질인지 밝혀낸다면 바위털갯지렁이 대량종묘생산에서 생존율을 높이는 물질로 충분히 활용될 수 있을 것으로 판단된다.



5. 요 약

바위털갯지렁이(*Marphysa sanguinea*) 대량종묘생산과정에서 해적생물의 포식에 의한 초기 생존율 저하가 가장 큰 문제점으로 지적되고 있다. *Marphysa sanguinea* 유생이 대량으로 분출된 수조에서는 해적생물이 유생 군집을 회피하는 현상이 관찰되었다. 이것은 초기 유생단계에서 방어물질(deterrent)을 분비하는 것으로 추정되었다. 따라서 바위털갯지렁이의 유생을 채집 및 분리, 추출, 정제하여 수중 해적생물의 구제 가능성을 검토하고자 한다.

바위털갯지렁이 유생은 부경대학교 수산과학기술센터 내에서 생산되는 유생을 자연종묘와 인공종묘를 사이펀(siphon)을 통해 채집하였다. 채집된 바위털갯지렁이 유생(1차, 117.5 g)을 Methanol(MeOH) 추출법으로 유생내의 물질을 추출하였다. MeOH로 추출한 유생 추출 농축물은 역상 칼럼(ODS-Q3)으로 MeOH 농도별(70%, 85%, 100%) 분리를 하였다. 그 후 packed column(RPAQUEOUS)상에서 1차 분획, packed column(ODS SP100) 상에서 2, 3차 분획을 진행하였다. 이 과정은 2, 3차 유생 시료에서도 동일한 과정으로 각각 진행하였다. 이 과정에서 각 단계별 추출 및 정제된 유생 방어물질의 요각류 치사성 시험을 위해 바위털갯지렁이 사육수조 및 치충 사육수조 내의 요각류를 채집하여 멸균해수를 대조구로하고 역상 칼럼(ODS-Q3)과 packed column(RPAQUEOUS, ODS SP100)상에서 분획된 각각의 획분을 실험구로 하는 요각류 치사성 시험을 실시하였다. 요각류 치사성 시험에서 요각류의 치사는 움직임이 없어질 때를 기준으로 하였다.

Packed column(RPAQUEOUS)상에서의 획분 4th peak는 2, 3차 packed column(ODS SP100) 분획을 거치고, 최종 '4-4-6'은 약 70 ppm의 농도에서 2시간이 경과하면서 반수치사량(LD₅₀)을 넘어섰고, 7시간 경과 후

에는 모든 개체의 활성이 없어진 것을 확인하였다.

Packed column(RPAQUEOUS)상에서의 획분 5th peak는 2, 3차 packed column(ODS SP100) 분획을 거치고, 최종 '5-6-11' 은 약 10, 20, 40 PPM의 농도에서 2시간이 경과 후 반수치사량(LD₅₀)을 넘어서는 것을 확인하였고, 3시간이 경과하면서 모든 요각류 개체의 활성이 없어지는 것을 확인하였다.

이상의 결과에서 요각류에 대한 치사성이 나타난 획분인 '4-4-6' 및 '5-6-11' 시료에 대한 질량분석 결과, '4-4-6' 시료는 m/z 278에 '5-6-11' 시료는 m/z 280에 각각 M⁺ 이온이 관측되어 분자량이 각각 278 및 280으로 추정되었다.

이들의 추정된 분자량으로부터 '4-4-6' 은 불포화 지방의 일종으로 2중 결합을 3개 가진 linolenic acid(분자량 278, 분자식 C₁₈H₂₈O₂)와 일치하였으며, '5-6-11' 은 2중 결합이 2개인 linoleic acid(분자량 280, 분자식 C₁₈H₃₀O₂)와 일치하였다. 또한, 이들의 fragment 이온들의 peak들을 linoleic acid 및 linolenic acid의 질량분석 spectrum과 비교한 결과, 이들도 잘 일치하여, 불순물이 들어 있기는 하지만 이들 지방산들이 주성분으로 되어 있으며, 이들이 요각류를 치사시키는 방어물질로 작용하는 것으로 추정되었다.

따라서 이 연구에서 확인된 바위털갯지렁이 유생의 방어물질은 친환경 고부가가치로 인정받고 있는 바위털갯지렁이의 대량종묘생산에 있어 해적생물의 효과적인 구제물질로써 이용될 가능성이 있을 것으로 판단되고, 초기 유생의 생존율향상에 크게 기여할 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문을 쓰기까지 바쁜 와중에도 많은 가르침을 주신 김창훈 교수님께 먼저 고개 숙여 감사드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 논문심사를 맡아주시고 실험에 많은 지도와 가르침을 아낌없이 주신 이종수 교수님, 정원교 교수님께 깊이 감사드립니다. 또, 학부생시절에 연구와 학문에 대한 흥미를 느끼게 해주신 조재윤교수님, 허성범 교수님, 장영진 교수님, 김동수 교수님, 배승철 교수님, 남윤권 교수님, 공승표 교수님, 강성민 교수님께 감사의 마음을 전합니다.

경남 고성 수산과학기술센터에서 아르바이트와 실험실인원으로서 생활을 할 때 삶과 인생에 대한 많은 조언과 가르침을 해주신 한규만 실장님, 김지일 선배님, 윤창호 부장님, 하승진 선생님 감사합니다.

그리고 수산과학기술센터에서 처음 아르바이트 할 때 많은 조언을 해준 철회 형, 학부생일 때부터 석사과정을 마치기까지 항상 힘이 되어 주고 조언을 해준 경훈이 형, 내 부족한 부분을 도와준 Em 누나, 항상 격려해주고 조언을 해준 지효 형, 경미 누나, 정수 형, 수영이 형, (김)민정이, 한동안 함께 생활하며 함께 고생했던 종석 형, 지홍이 형, 학부생때부터 석사과정까지 함께 생활하며 같이 고민해준 성균이, 조용히 옆에서 힘이 되준 병권이, 마지막 1년간의 석사생활에 있어 많은 생각을 하게 해주고 힘이 되어준 (고)민정이, 학부생으로써 많이 힘이 되어 준 승룡이, 민주, 은지, 유진이, 종현이 모두에게 고맙다는 말을 전합니다.

끝으로 제가 하고자 했던 이 과정을 든든히 지원해주신 부모님, 그리고 형에게 감사합니다. 그리고 옆에서 힘이 되어준 친구들에게도 고맙다는 말을 전합니다.

참 고 문 헌

- Alamsjah M.A., S. Hirao, F. Ishibashi, T. Oda and Y. Fujita. 2008. Algicidal activity of polyunsaturated fatty acids derived from *Ulva fasciata* and *U. pertusa*(Ulvaceae, Chlorophyta) on phytoplankton. J. Appl. Phycol. 20, 713–720.
- Bryan, G.W. and Gibbs, P.E. 1987. Polychaete common ragworms as indicators of heavy-metal availability in marine deposits, pp. 37–39. In Capuzzo, J.M. and Kester, D.R. (eds.), Biological Processes and Wastes in the Oceans. Robert E Krieger Publishing Co., Malabar, Florida, USA.
- Byoung-Seob Ko, et al., 1992. Synthesis and biological activity of spirobenzopyranone derivative as analogs of thelepin, isolated from the marine annelid *Thelepus setosus*. Hanguk Nonghwahak Hoechi(J. Korean Agric. Chem. Soc.) 35(6), 470~474.
- Campos, L.C., Su, M.F.J., Graham, N.J.D., and Smith, S.R. 2002. Biomass development in slow sand filters. *Water Res.* 36, 4543–4551.
- Clark, R. B. 1977. Reproduction, speciation and polychaete taxonomy. (in) Essay on polychaetous annelids in memory of Dr. Olga Hartman, 477–502.
- Charles R. Lovell et. al., 1999. Activity of marine sediment bacterial communities exposed to 4-bromophenol, a polychaete secondary metabolite. Vol. 179:241–246.
- Chen et al., 1991 Purification and properties of a unique flavin-containing chloroperoxidase from the capitellid polychaete

- Notomastus lobatus. J. Biol. Chem. 266: 23,909–23,915.
- Cowart et al., 2000 Halogenated metabolites in two marine polychaetes and their planktotrophic and lecithotrophic larvae. Mar. Biol. 136:993–1002
- Davidson, J., Helwig, N., and Summerfelt, S.T. 2008. Fluidized sand biofilters used to remove ammonia, biochemical oxygen demand, total coliform bacteria, and suspended solids from an intensive aquaculture effluent. *Aquacult. Engineer.* **39**, 6–15.
- Fielman et al., 1999. Widespread occurrence of natural halogenated organics among temperate marine infauna. Mar. Ecol. Prog. Ser. 181:112
- Fourcy, D., Jumel, A., Heydorff, M., and Lagadic, L. 2002. Esterases as biomarkers in *Nereis (Hediste) diversicolor* exposed to temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* used for mosquito control in coastal wetlands of Morbihan (Brittany, France). *Mar. Environ. Res.* **54**, 755–759.
- Fujioka, Y., Shimoda, T., and Srithong, C. 2007. Diversity and community structure of macrobenthic fauna in shrimp aquaculture ponds of the Gulf of Thailand. *Jap. Agric. Res. Quart.* **41**, 163–172.
- Gary R. Gaston and Marc Slattery., 2002. Ecological function of chemical deterrents in a tropical polychaete, *Eupolymnia crassicornis* (Annelida, Terebellidae), in Belize. Bulletin of marine science, 79(3):891–897.
- Goerke, Helmut. 1991. Concentrations and localization of brominated metabolites in the genus *Thelepus* (polychaeta: *terebellidae*). Comparative Biochemistry And Physiology. B, Comparative Biochemistry Volume: 99 Issue: 1 (1991-01-01) p. 203–206.

ISSN: 0305-0491.

- Goerke, Helmut.** 1991. Bromophenols in *Lanice conchilega* (Polychaeta, Terebellidae): The influence of sex, weight and season. *Bulletin of marine science*, 48(2): 517-523.
- Joseph R. Pawlik.** 1993. Marine Invertebrate Chemical Defenses. *Chem. Rev.* 93, 1911-1922.
- Kevin T. Fielman., et al.,** 1999. Widespread occurrence of natural halogenated organics among temperate marine infauna. *Marine ecology progress series*. Vol. 181:1-12.
- Niels Lindquist and Mark E. Hay.,** 1996. Palatability and chemical defense of marine invertebrate larvae. *Ecological Monographs*, 66(4), pp. 431-450.
- Paik, E. I.,** 1989. Illustrated Encyclopedia of Fauna & Flora of Korea. Vol. 31, Polychaeta. Ministry of Education, Seoul, pp. 424-425. (in Korean).
- Palacios, G.L. and Timmons, M.B.** 2001. Determining design parameters for recovery of aquaculture wastewater using sand beds. *Aquacult. Engineer.* 24, 289-299.
- Pérez, E., Blasco, J., and Soló, M.** 2004. Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* from the Cádiz bay (SW Spain). *Mar. Environ. Res.* 58, 275-279.
- Stabili, L, Licciano, M., Giangrande, A., Fanelli, G., and Cavallo, R.S.** 2006. *Sabella spallanzanii* filter-feeding on bacterial community: ecological implications and applications. *Mar. Environ. Res.* 61, 74- 92.

- Sarah A. Woodin., et al., 1997. Biogenic bromophenols as negative recruitment cues. Marine ecology progress series. Vol. 157:303-306.
- Tatsunori Ito. The Biology of a Harpacticoid Copepod, *Tigriopus japonicus* Mori1)2). Zoological Institute, Hokkaido University (With 12 Text-figures, 1 Table and 2 Plates).
- Vigneswaran, S., Ngo, H.H., and Wee, K.L. 1999. Effluent recycle and waste minimisation in prawn farm effluent. *J. Cleaner Prod.* 7, 121-126.
- William W. Christie., 2013. Mass spectra of some miscellaneous lipophilic components.
- Yoon et al., 1994. Localization of the chloroperoxidase of the capitellid polychaete *Notomastus lobatus*. *Biol. Bull.* 187:215-222
- 김경훈. 2012. 바위털갯지렁이 대량종묘생산을 위한 초기 사육기법. 부경대학교 대학원 석사 학위논문.
- 김창훈, 장성욱. 2008. 바위털갯지렁이 *Marphysa sanguinea*의 인공종묘생산에 미치는 사육환경의 영향. 한국 양식학회지 21 (1), 34-40.
- 신세연. 2013. 갯지렁이(*Perinereis aibuhitensis*)에서 분리한 광염성 해양 미생물 *Bacillus* sp. EBW4의 특성 및 유기물 분해능 분석. *Korean Journal of Microbiology* pp. 38-45.
- 한국해양 연구소. 1995. 해산 갯지렁이의 천연물에 대한 탐색연구 pp. 22-47.
- 해양수산부. 2000. 서해 특산 다모류로부터 유용신물질의 특성 및 응용성 연구 pp. 311-479.
- 허철희. 2011. 바위털갯지렁이, *Marphysa sanguinea*의 유생발달과 기질에 따른 치충의 성장. 부산 부경대학교 대학원 석사 학위논문.