



## 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

틸라피아(*Oreochromis niloticus*)의  
비가식부를 이용한 생리활성물질의  
탐색 및 정제

2020년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

생 물 공 학 과

김 은 진

공 학 석 사 학 위 논 문

틸라피아(*Oreochromis niloticus*)의  
비가식부를 이용한 생리활성물질의  
탐색 및 정제

지도교수 박 남 규

이 논문을 공학석사 학위청구논문으로 제출함  
2020년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

생 물 공 학 과

김 은 진

김은진의 공학석사 학위논문을 인준함

2020년 2월 21일



주 심 농학·이학박사 홍 용 기 (인)

위 원 이학박사 이 형 호 (인)

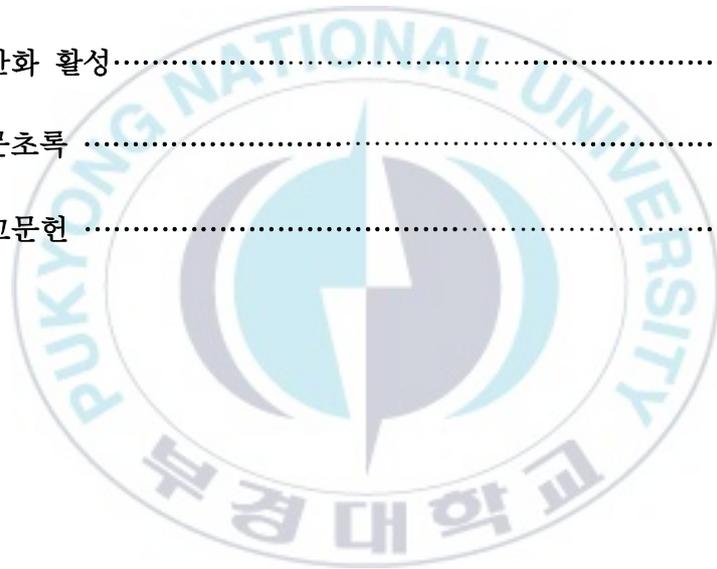
위 원 이학박사 박 남 규 (인)

# 목차

## Part I. 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)의 내장과 껍질 추출물로부터 생리활성물질 탐색

Abstract .....	V
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	3
1. 재료 .....	3
1.1. 실험동물 .....	3
1.2. 시약 및 재료 .....	3
2. 실험방법 .....	4
2.1. 추출 .....	4
2.1.1. 틸라피아 내장으로부터 추출물 조제 .....	4
2.1.2. 틸라피아 껍질로부터 추출물 조제 .....	4
2.2. 항균 및 항곰팡이 활성 측정 .....	5
2.2.1. 사용한 균주 .....	5
2.2.2. 배지의 제조 .....	6
2.2.3. 틸라피아 추출물을 이용한 항균활성 측정 .....	7
2.3. 근육의 수축 및 이완의 측정 .....	7

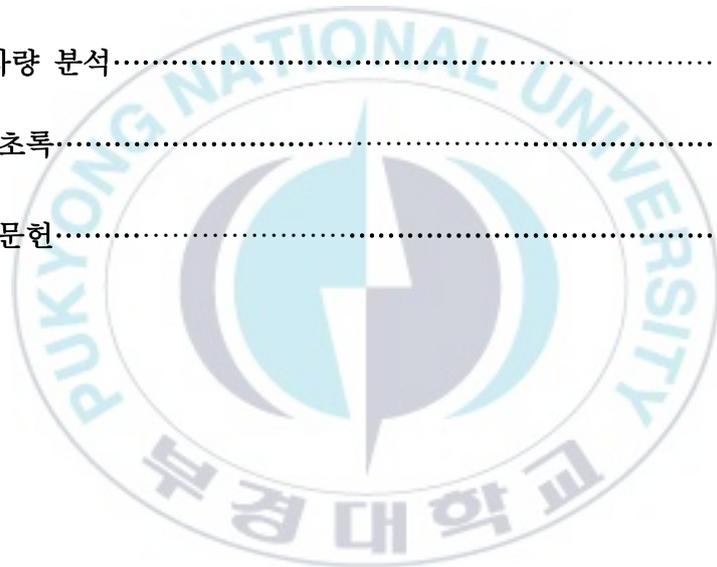
2.3.1. 실험동물로부터 근육의 적출.....	7
2.3.2. 근수축 및 이완활성의 측정 .....	8
2.4. 항산화 활성.....	8
2.4.1. 항산화능 측정 .....	8
Ⅲ. 결과 및 토론 .....	10
1.항균 및 항곰팡이 활성.....	10
2.근수축 및 이완 활성.....	11
3.항산화 활성.....	12
Ⅵ. 국문초록 .....	21
Ⅴ. 참고문헌 .....	22



Part II. 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)의 내장과 껍질 추출물로부터  
 항균활성물질 정제

Abstract	27
I. 서론	28
II. 재료 및 방법	32
1. 재료	32
1.1. 재료 및 시약	32
1.2. 균주	32
2. 실험 방법	33
2.1. 추출	33
2.1.1. 틸라피아 내장으로부터 추출물 조제	33
2.1.2. 틸라피아 껍질로부터 추출물 조제	33
2.1.3. 추출물의 Solid Phase Extraction	34
2.2. 항균 활성 측정	34
2.2.1. 배지의 제조	34
2.2.2. 틸라피아 추출물을 이용한 항균활성 측정	35
2.3. 정제	35
2.3.1. 틸라피아 내장 추출물의 정제	35
2.3.2. 틸라피아 껍질 추출물의 정제	36
2.4. 분자량 분석	37

Ⅲ. 결과 및 고찰 .....	38
1. 추출.....	38
1.1. 티라피아 내장으로부터 추출물 조제.....	38
1.2. 티라피아 껍질로부터 추출물 조제.....	38
2. 항균물질 정제.....	39
2.1. 티라피아 내장추출물로부터 항균물질 정제.....	39
2.2. 티라피아 껍질추출물로부터 항균물질 정제.....	40
3. 분자량 분석.....	41
Ⅳ. 국문초록.....	59
Ⅴ. 참고문헌.....	60



Screening of Bioactive Material from Sub-material of  
the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Eun Jin Kim

*Department of Biotechnology and Bioengineering*  
*Graduate School*  
*Pukyong National University*

**Abstract**

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a species of tilapia native to Africa and is of interest in aquaculture because these fish are fast growing and known to produce good fillets. The visceral and skin tissues of this fish are discarded as industrial waste during fillet production process. Investigating possible use of the visceral tissues of Nile tilapia by screening the biological activities could make Nile tilapia aquaculture more economic. In this study, we evaluated three biological activities of Nile tilapia visceral and skin extracts: the antimicrobial, the antioxidant, and the myoactive activities. The visceral and skin tissues of Nile tilapia was extracted with water containing 5 % acetic acid and then with ethanol. The antimicrobial activity assay of the visceral and skin extracts against 10 bacterial strains and 1 fungal strain revealed that the extracts has broad spectrum antimicrobial activity. The most susceptible strains were *Salmonella enterica* ATCC13311 and *Vibrio anguillarum* KCTC 2711. The antioxidant activity of extracts determined

through DPPH scavenging assay showed approximately low antioxidant activity compared to that of L-ascorbic acid used as standard reagent. The visceral and skin extracts induced contraction of intestinal smooth muscle from *Eptatretus burgeri* and relaxation of apical muscle from starfish *Patiria pectinifera*.



## Part I.

틸라피아(*Oreochromis niloticus*)의  
비가식부를 이용한 생리활성물의  
탐색 및 정제

# I. 서론

최근까지 육상의 동식물과 해조류 및 해양생물에 이르기까지 다양한 생물로부터 항균 및 항곰팡이성 물질, 신경전달물질 및 항산화 물질과 같은 다양한 생물활성 물질들이 발견되었다 [1]. 육상생물과는 달리 수·해양환경에서 서식하고 있는 생물들은 물이라는 특수한 환경하에서 생활하고 있기 때문에 세균에 감염되기 쉬워 자신들을 방어하기 위한 다양한 물질들을 생성하고 분비한다 [2]. 예를 들면 장어의 피부 점액에서 implant antibiotic [3], 넙치의 피부 점액에서 hipposin [4], 참돔 아가미에서 chrysopsin [5], 메기 피부에서 histone-like protein (HLP) [6] 등과 같이 외부환경과 많이 노출되는 부위에서 다양한 항균 또는 항곰팡이성 물질이 발견되었다.

이들 면역관련 물질 이외에도 해양생물에서 신경계 신호 전달과 생체조절의 역할을 하는 신호전달물질이 발견되었다. 이러한 신경전달물질은 척추동물 및 무척추동물에서도 다양한 종류의 물질들이 발견되었다. 예를 들면 oxytocin/vasopressin, Growth hormone-releasing factor (GRF), Tachykinin, Neuropeptide Y (NPY) 계열의 펩타이드 및 Cionin 과 같은 종류들이 있다 [7,8]. 이들은 주로 평활근 운동, 통증 전달 및 혈압조절과 같은 역할을 담당하며 [9], 종 간의 상관관계를 알아보고 진화과정에 대한 정보를 제공한다 [7]. 그 중에서 해양 생물인 대구와 송어에서 substance-P 와 neurokinin A, 잉어에서 urotensin I , 곱상어에서 urotensin II 와 parvalbumin 이 발견되었다 [10-12].

또한 항균 및 신경전달물질 이외에도 양서류의 피부나 어류의 피부에서 항산화 물질도 발견되었다 [13,14]. 특히 전갱이의 껍질, 오징어의 점액, 참치의 혈합육의 가수분해물로부터 여러가지 항산화 물질이 보고되었다

[15-17]. 생체 내에서 발견된 항산화 물질은 식품에 주로 사용되었지만, 최근엔 생체 내에서 발생하는 자유 라디칼이 노화 또는 암과 같은 돌연변이 유발 등을 일으키기 때문에 지금은 노화억제 또는 질병치료제에 관한 연구를 주로 하고 있다 [18]. 하지만 기존의 BHT, BHA 와 같은 합성 항산화제나 alpha-tocopherol, vitamin C, carotenoids, flavonoids 와 같은 천연 항산화제는 독성이 강하고, 활성이 낮으며 이용에 한계점이 있다는 단점이 있다. 이러한 점을 보완하기 위해 활성이 강하고 안전한 항산화제를 천연물로부터 찾고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다 [19].

추출에 사용된 킬라피아는 담수어 양식에서 가장 흔히 이용되는 어종이다. 세계시장에서 다양한 형태로의 킬라피아 수요는 점점 증가하고 있다. 킬라피아 가공산업이 증가할수록 킬라피아 비가식 부위인 부산물의 양도 빠르게 증가하고 있다. 주로 껍질과 두부 그리고 지느러미, 뼈와 같은 부위의 60 %가 부산물로 버려진다. 하지만 이러한 부산물에도 여전히 많은 양의 단백질이 존재한다. 특히, 껍질은 콜라겐과 젤라틴이 풍부하게 존재하고 있다. 킬라피아 껍질과 아가미 조직으로부터 항산화 물질과 혈압강하물질, 상처치유물질 항산화 물질이 보고되었다 [20-22]. 또한 EST 분석기술의 발달과 함께 내장에서 hepcidin [23], piscidin [24],  $\beta$ -defensin [25]의 존재가 보고되었지만, 아직까지 가공되지 않은 본연의 물질로부터 정제된 천연 물질은 보고된 바 없다. 따라서 본 논문에서는 킬라피아의 내장과 껍질에 존재하는 생리활성물질의 생물활성을 조사하기 위해서 이들의 추출물을 사용하여 항균, 항산화 및 평활근 수축·이완 반응을 측정하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1.1. 실험동물

실험에 사용된 먹장어는 부산광역시 남천동 해변시장에서 살아있는 상태로 구입하였다. 또한 틸라피아의 간과 장, 비늘이 제거된 껍질은 충청남도에 있는 Aqua Plaza로부터 받아서 사용하였다. 간과 장은 구분이 해체가 어려워 나누지 않고  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 껍질은 비늘을 제거한 후, 추출 전까지  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 사용한 불가사리는 청사포에서 채집 후,  $13\text{ }^{\circ}\text{C}$  해수 수조에서 보관한 다음 실험 직전에 꺼내 사용하였다.

#### 1.2. 재료 및 시약

항균활성에 사용한 Tryptic soy broth (TSB)와 agarose 는 Sigma사에서 구입하였다. 평활근 수축·이완 활성에는 표준시약으로 carbachol 을 사용하였다. 항산화 활성의 경우, 표준 시약으로 사용한 L-ascorbic acid 와 DPPH 시약은 sigma사의 특급시약을 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 추출

#### 2.1.1. 툴라피아 내장으로부터 추출물 조제

활성물질을 추출하기 위해 툴라피아 내장 (425 g)을 사용하였으며, 추출 과정은 Fig. 1 에 나타내었다. 우선, 툴라피아의 간과 장이 혼합된 내장 425 g 에 증류수를 넣고 100 °C에서 5 분 동안 끓인 후 얼음에서 냉각시켰다. 초산을 첨가하여 샘플양의 4 배에 해당하는 5% 초산으로 최종적으로 맞추고, 냉각시킨 용액을 호모게나이저 (IKA® T10 basic ULTRA-TURRAX, USA)와 실험용 믹서로 조직을 파쇄한 후, 4 °C에서 20 분간 8,000 g 로 원심분리 하였다. 이 과정을 통해 얻어진 상층액 약 1,500 ml 를 농축하여 추출물을 얻었다. 얻어진 상층액 추출물은 용액과 에탄올이 1:2 비율이 되도록 섞어 하루동안 방치하였다. 그리고 다시 12,000 g, 4 °C에서 15 분간 원심 분리한 후 상층액을 농축하고, 100 ml 의 추출물을 얻었다. 최종적으로 추출물은 농축한 후, 증류수를 이용하여 100 mg/ml 의 농도로 만들었다. 그리고 항균, 항산화 및 근육 반응을 확인하는 실험에 사용하였다.

#### 2.1.2. 툴라피아 껍질으로부터 추출물 조제

툴라피아 껍질 (225 g)을 사용하여 추출하는 과정은 Fig. 2 에 나타내었다. 우선, 동결상태로 보관되어 있던 225 g 의 껍질에서 남아있는 어육 부분을 제거하였다. 샘플의 4 배 부피에 해당하는 증류수를 넣고 끓인 후, 껍질을 넣었다. 분쇄기로 껍질을 쉽게 갈기 위해 가위를 이용하여 작게 잘라주었다. 껍질은 넣은 물이 끓기 시작한 후, 5 분간 끓였다. 끓인 툴라피아 껍질 추출물은 호모게나이저를 이용하여 곱게

같았다. 그리고 나서 추출물의 5 %에 해당하는 양의 초산을 첨가하였다. 5 % 초산을 첨가한 추출물은 7,000 g, 상온에서 30 분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액 (800 ml)을 분리하여 추출물과 에탄올 1:3 (v/v)비율로 에탄올 처리를 하여 하루 동안 4 °C에 보관하였다. 에탄올 처리가 된 추출물은 다시 7,000 g, 4 °C에서 30 분간 원심분리하고, 2,800 ml 의 상층액을 얻었다. 이 추출물을 감압 농축하여 420 ml 을 얻었다. 다시 추출물의 3 배에 해당하는 에탄올을 처리하고 원심분리를 같은 방법으로 한번 더 진행하였다. 계속해서 상층액을 감압 농축하여 에탄올을 제거하였다. 농축 용액은 동결 건조기로 건조 시킨 후, 5.09 g 의 완전히 건조된 샘플을 얻었다. 여기에 50.9 ml 의 증류수를 넣고 녹여 100 mg/ml 의 추출물을 만들어 항균활성, 근수축·이완활성 및 항산화 활성에 사용하였다.

## 2.2. 항균활성 및 곰팡이 활성 측정

### 2.2.1. 사용한 균주

항균활성의 측정에 사용한 균주는 곰팡이를 포함한 11 개 균주를 사용하였다. 그람 양성균에 *Bacillus subtilis* KCTC 1021, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Micrococcus luteus* 를 사용하였고, 그람 음성균으로 *Escherichia coli* D31, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* KCTC 2517 을 사용하였다. 또한 물고기의 어병 그람 양성균으로 *Streptococcus iniae* FP5228, 물고기의 그람 음성균에는 *Aeromonas hydrophila* KCTC 2358, *Edward tarda* NUF251 및 *Vibrio anguillarum* KCTC 2711 을 사용하였다. 곰팡이는 *Candida albicans* KCTC 7965 을 사용하였다.

### 2.2.2. 배지의 제조

항균활성을 측정하기 위해서 Ultrasensitive Radial Diffusion assay (URDA)를 수행했다. 사용한 균은 3 ml 의 TSB 에 접종하여 37 °C의 shaking incubator 에서 16 시간 동안 배양하였다. 2 ml 의 TSB 에 배양한 균 100  $\mu$ l 를 옮겨 4 시간 동안 계대배양을 하여 실험에 사용하였다. *V.anguillarum* KCTC2711 는 2 % NaCl 이 들어있는 TSB 에 배양을 하고 agarose plate 에도 2 %에 해당하는 NaCl 을 넣어주었다. *S. aureus* 균은 30 °C에서 16 시간 배양하였다. 균액의 농도는 BioMerieux Vitek, Inc. Colorimeter (Product No. 52-1210, BioMerieux, Inc., USA)를 사용하여 84 %T ( $10^8$  CFU/ml)가 되도록 agarose 가 첨가되지 않은 TSB 배지를 이용하여 희석했다. 균액 희석을 위해 agarose 가 미첨가된 TSB 를 사용하였으며, 이 TSB 의 조성은 다음과 같다. TSB (no agarose): 49.5 ml deionized water, TSB powder 3 g, 1.0M Phosphate buffer (PB) (pH 6.57). 추출물을 주입한 underlayer gel 의 조성은 다음과 같다. Underlayer gel : 49.5 ml deionized water, TSB powder 3 g, agarose 0.5 g, 1.0 M Phosphate buffer (PB) (pH 6.57). 한편, 추출물이 완전히 흡수된 underlayer gel 위에 도포하여 배양한 overlayer gel 의 조성은 다음과 같다. Overlayer gel : 49.5 ml deionized water, TSB powder 5mg, agarose 0.5 g, 1.0 M Phosphate buffer (PB) (pH 6.57). 또한 *V. anguillarum* 은 NaCl 이 들어간 배지에 배양을 하는데 TSB (50 ml)기준으로 0.75 g 의 NaCl 을 첨가해주었다. Agarose plate 를 만들기 위해서는 1 g 의 NaCl 이 첨가된 TSB (no agarose)에 균 농도를 희석하고, underlayer gel 과 overlayer gel 에는 각각 0.2 g, 1.25 g 을 첨가하였다. 만들어진 각 용액은 고압 멸균기에서 멸균시킨 후, 균이

사멸하지 않을 정도의 온도로 내려가도록 42 °C의 water bath 에서 보관하였다.

### 2.2.3. 틸라피아 추출물을 이용한 항균활성 측정

Agarose 가 들어가지 않은 TSB 를 이용해 희석시킨 균액 500  $\mu$ l 를 underlayer gel 에 넣고 잘 섞어주었다. 균액을 잘 섞은 겔을 사각 플레이트에 부은 후 배지를 굳혔다. 진공 펌프를 이용하여 5  $\mu$ l 정도의 부피의 액체가 들어갈 수 있는 약 3 mm 정도의 well 을 만들었다. 활성을 확인하기 위한 추출물을 완전히 건조시킨 후, 5  $\mu$ l 의 0.01 %의 초산에 녹인 후 well 에 주입하고 3 시간 동안 완전히 흡수시켰다. 0.01 %초산에 녹인 추출물이 흡수되고 나면, 그 위에 overlayer gel 을 부어서 굳힌 후 37 °C에서 16 시간 동안 배양하고 활성을 확인하였다. 하지만 *Vibrio* 의 경우엔 다른 균들과 달리 25 °C에서 배양하였다.

## 2.3. 근육의 수축 및 이완 활성

### 2.3.1. 실험동물로부터 근육의 적출

먹장어의 장관 적출은 먹장어의 항문에 해부용 가위를 넣고 장관이 잘려나가지 않도록 조심스럽게 배 부분을 가른 후, 항문으로부터 2~3 cm 부위의 장을 적출하였다. 적출 시킨 장은 바로 Artificial sea water (ASW)에 보관하였다. 또 불가사리로부터 apical muscle 을 적출하여 실험에 사용하였다. 불가사리의 apical muscle 적출은 불가사리의 상각과 하각을 분리한 뒤, 상각의 팔을 하나씩 잘라내어 그 중앙을 지나는 근육인 apical muscle 을 약 2 cm 가량 적출하여 사용하였다.

### 2.3.2. 근수축 및 이완 활성의 측정

적출한 먹장어 장관은 ASW 로 채워 놓은 organ bath 에 장의 윗부분과 아랫부분이 바뀌지 않고 끊어지지 않도록 면실을 이용하여 묶은 후, physiography 에 고정시키고 resting tension 이 1 g 이 되도록 조정하였다. physiography 의 그래프가 안정되게 나타날 때까지 15 분마다 ASW 를 교환해 주었다. ASW 의 조성은 NaCl 445 mM, KCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub>•H<sub>2</sub>O 10 mM, MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O 55 mM, Glucose 10 mM 이다.

그래프가 안정화되면  $5 \times 10^{-6}$  M 의 carbachol 을 주입하여 적출된 장관의 상태를 확인한 후에, 텔라피아 추출물을 주입하며 실험을 진행하였다. 반대로 이완실험은 추출물을 organ bath 에 넣기 전 마다 carbachol 을 주입하여 장관을 수축시킨 후, 추출물을 주입하고 이완활성을 관찰하였다.

적출한 불가사리의 apical muscle 은 불가사리 몸통 부위에 있던 근육이 위쪽으로 향하게 organ bath 에 매달은 후, physiography 의 resting tension 을 1g 되게 하여 안정화시켰다. 안정화가 이루어 질 때까지 15 분마다 ASW 를 교체해 주었고, 안정화되면 2 ml 의 ASW 을 채운 organ bath 에  $10^{-4}$  M carbachol 을 20  $\mu$ l 넣어 바로 활성을 확인하였다. 계속해서 약물을 씻어내고 재안정화 시킨 후, 추출물을 주입하여 활성을 확인하였다.

## 2.4. 항산화 활성

### 2.4.1 항산화능 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용하여 항산화능을 측정하였다. 표준시약으로는 10 mM L-ascorbic acid 를 사용하였고, 이때 사용한 농도를 100 으로 나타내었고 실험에 사용한 샘플의 농도 값에 대한 값을 비교하여 나타내었다. 그리고 0.2 mM 의 DPPH 100  $\mu$ l를

메탄올에 녹인 추출물 및 표준 시약이 있는 96 well 에 넣어주었다. 그리고 바로 37 °C에서 30 분간 반응을 시켜준 뒤, x-fluorescence spectrometer 에서 517 nm 의 파장으로 흡광도를 측정하여 radical 소거능을 측정하였다. 항산화능은 아래에 나타낸 식을 사용하여 Radical Scavenging Effect (%)를 측정하였다.

$$\text{RSE (\%)} = [1 - (\text{OD of sample}/\text{OD of control})] \times 100$$



### Ⅲ. 결과 및 토론

#### 1. 항균 및 항곰팡이 활성

항균활성은 URDA 로 측정하였다. 추출물에 대한 항균 및 항곰팡이 활성은 11 개의 균주에 대하여 실험하였다. 실험에 사용한 추출물의 농도는 100 mg/ml 이고, 이 농도의 추출물을 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 mg/ml 로 희석하여 5  $\mu$ l 씩 gel 에 흡수시켰다.

우선, 티라피아 내장 추출물을 6 개의 각 희석 농도에 대하여 항균활성을 측정하였다. Clear zone 의 크기는 calliper 를 이용하여 측정한 후, MEC (Minimal Effective Concentration, ug/ml) 을 계산하였다 (Table 1). 그람 양성균인 *B. subtilis* 와 *S. aureus* 에서는 각각 2.55, 4.87 의 MEC 값을 나타내었다. 그람 음성균인 *E. coli* 와 *S. entrica*, *S. flexneri* 에서는 6.79, 1.21, 8.17 의 MEC 를 나타내었다. 또한 물고기의 그람 양성균인 *S. iniea* 에서는 23.85, 물고기의 그람 음성균인 *A. hydrophila* 와 *E. tarda* 에서는 50 ug/ml 이상의 높은 MEC 값을 보였다. *V. anguillarum* 에서는 2.67 을 나타내었다. 곰팡이 균인 *C. albicans* 에서는 9.61 의 MEC 를 나타내었다. 가장 좋은 활성은 물고기의 그람 음성균인 *V. anguillarum* 에서 2.67 나타났고, 그 다음으로는 그람 양성균인 *B. subtilis* 에서 2.55 로 좋은 활성이 나타났다. 또한 fungus 인 *C. albicans* 에서도 활성을 보였다. 그러나 *M. luteus* 에서는 활성이 전혀 나타나지 않았고, *A. hydrophila* 와 *E. tarda* 에서도 유의미한 활성이 나타나지 않았다.

또한, 티라피아 껍질 추출물을 6 개의 각 희석 농도에 대하여 항균활성을 측정하였다. Clear zone 의 크기를 측정하여 MEC 를 계산한 결과는 Table

1 에 나타내었다. 그 결과 그람 양성균인 *B. subtilis* 에서 2.78 의 MEC 를 나타냈고, 그람 음성균인 *E. coli*, *S. enteric*, *S. flexneri* 에서는 21.72, 10.05, 12.77 의 MEC 를 나타내었다. 또한 물고기의 그람 음성균인 *E. tarda* 와 *V.anguillarum* 에서도 24.29 와 3.64 의 MEC 를 보였다. 가장 좋은 MEC 값은 물고기의 그람 음성균인 *V. anguillarum* 3.64 에서 나타났고, 그 다음으로는 그람 양성균인 *B. subtilis* 에서 좋은 활성이 나타났다. 반면에 *S. aureus* 와 *M. luteus*, *A. hydrophila*, *C. albicans* 에서는 활성이 전혀 나타나지 않았고, *S. iniae* 에서도 유의미한 활성은 보이지 않았다. 또한 대부분의 균주에서는 내장 추출물의 MEC 값이 껍질 추출물의 MEC 값보다 작았으므로, 내장 추출물에서 항균활성이 우수했다. 이러한 활성의 차이는 추출물을 만드는데 이용된 내장의 양이 껍질의 양보다 많았기 때문에 상대적으로 활성이 높았다. 그러나, 흥미롭게도 *E. tarda* 에서는 내장 추출물 보다 껍질 추출물에서 더 우수한 항균활성을 보였다.

특히 두 추출물은 *V. anguillarum* 에 대해 높은 항균활성을 나타내었다. 일반적으로 *V. anguillarum* 은 천연추출물에 대해 항균작용이 낮게 나타나는 균주임에도 불구하고 이 균주에 우수한 활성을 나타낸 것은 주목할 만한 결과이다. 따라서, part II 의 정제과정에서는 우수한 활성을 지닌 *V. anguillarum* 과 *B. subtilis* 를 이용하여 진행하였다.

## 2. 근수축 및 이완 활성

텔라피아의 내장과 껍질 추출물에 대한 신경성 물질의 활성을 알아보기 위해서 내장추출물은 별 불가사리의 근육과 먹장어 장관의 평활근에 대해 실험을 진행하였다. 근육 및 장관은 실험 직전 적출하였고, ASW 에 담귀 안정화 및 실험을 진행하였다. 표준 시약으로는 carbachol 을 사용하였다.

각 추출물은 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0 mg 의 양을 100  $\mu$ l의 ASW 에 희석하여 2ml 의 ASW 가 들어있는 organ bath 에 주입하여 활성을 측정하였다.

틸라피아의 내장 추출물은 먹장어의 장관에 대해 수축활성을 나타냈다 (Fig. 3). 활성의 크기는  $5 \times 10^{-6}$  M 의 carbachol 에 대하여 백분율로 나타내었다. 그 결과, 0.05 mg 에서 13 %, 0.1 mg 6.7 %, 0.2 mg 에서 33.3 %, 0.4 mg 에서 53.3 %, 1.0 mg 에서 93.3 %, 2.0 mg 에서 100 %의 활성을 나타내었다. 반면에, 불가사리의 apical muscle 에서는 수축반응을 나타내지 않았고, 이완반응에서 활성이 나타났다 (Fig. 4.). 활성의 크기는  $10^{-6}$  M 의 carbachol 에 대하여 백분율로 나타내었다. 이완활성은 추출물 0.1 mg 에서부터 8.3 %, 0.2 mg 에서 25 %, 0.4 mg 에서 33 %, 1.0 mg 과 2.0 mg 에서 각각 58.3 % 및 75 %의 이완작용을 보였다.

틸라피아 껍질 추출물은 불가사리 apical muscle 과 먹장어의 장관에서 수축활성을 나타내었다 (Fig. 3 과 Fig. 5). 불가사리의 apical muscle 에서 0.4 mg 에서 2.5 %, 1.0 mg 에서 5 %, 2.0 mg 에서 17.5 %의 수축활성이 나타났다. 먹장어의 장관에서는 0.05 mg 에서 8.3 %, 0.1 mg 에서 16 %, 0.2 mg 에서 17 %, 0.4 mg 에서 25 %, 1.0 mg 에서 41.67 %, 2.0 mg 에서 75 %의 수축활성이 나타났다.

### 3. 항산화 활성

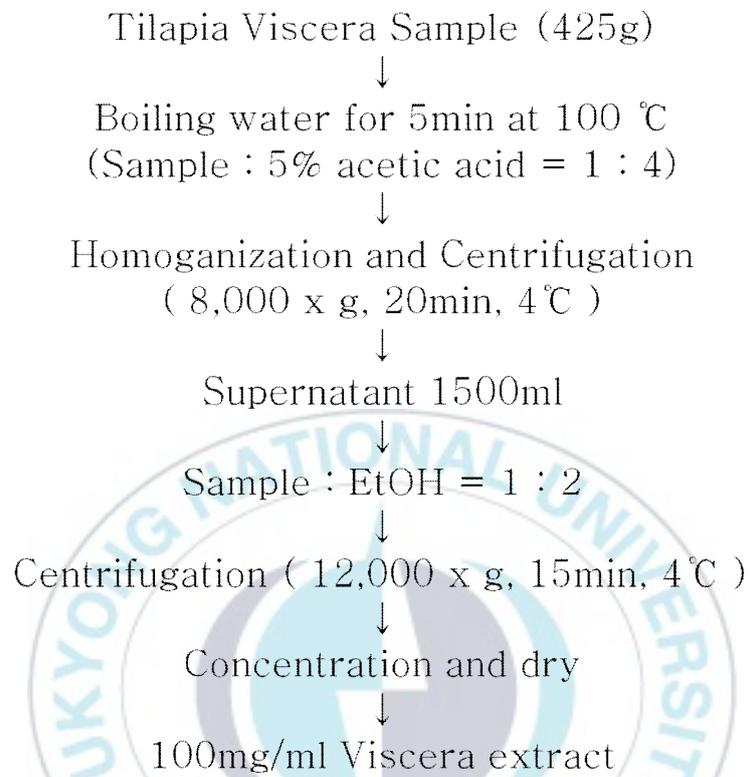
DPPH를 이용해 Radical Scavenging Effect (RSE)를 알아보았다. control으로는 10 mM의 L-ascorbic acid를 사용하였고, 이에 대한 추출물의 항산화 능을 백분율로 나타내었다. 샘플은 메탄올에 녹여서 사용하였다. 틸라피아의 내장과 껍질 추출물에서의 항산화 능은 Fig. 6에

나타내었다. 100 mg/ml의 농도의 내장과 껍질 추출물은 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 mg/ml의 농도로 희석하여 활성에 사용하였다.

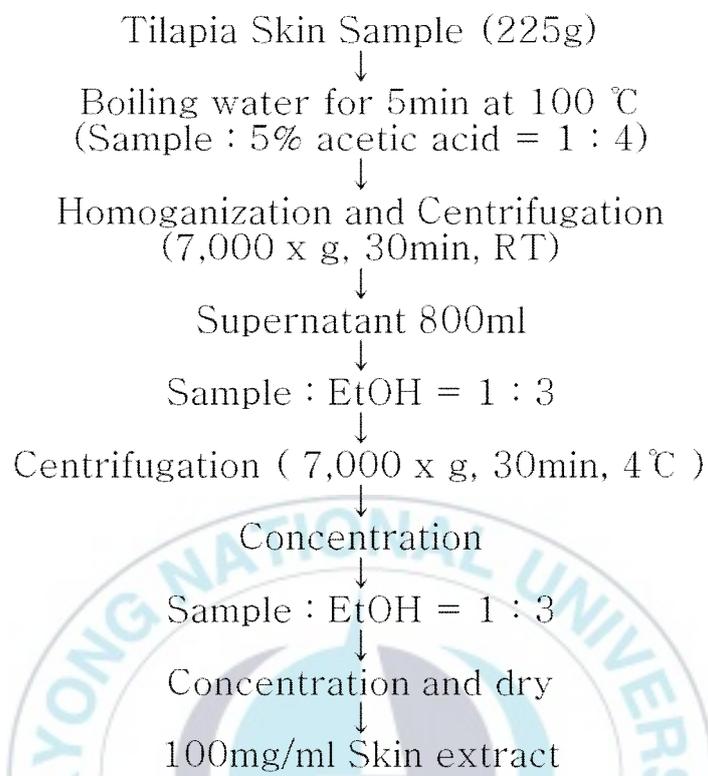
틸라피아 내장에서의 항산화 능은 가장 낮은 농도인 0.78 mg/ml에서 16.6 %, 1.56 mg/ml에서 21.1 %, 3.13 mg/ml에서 18 %, 6.25 mg/ml에서 21.7 %, 12.5 mg/ml에서 23 %, 25 mg/ml에서 25.5 %, 50 mg/ml에서 39 %, 100 mg/ml에서 60 %의 항산화 능을 나타내었다.

틸라피아 껍질에서 항산화능은 6.25 mg/ml에서 3.4 %, 12.5 mg/ml에서 11 %, 25 mg/ml에서 13.7 %, 50 mg/ml에서 22.3 %, 100 mg/ml에서 36.7 %의 항산화 능을 보였다. 이들 결과로부터 내장 추출물에서의 항산화 활성이 껍질 추출물보다 우수한 항산화능을 나타내었다.

최종적으로 이들 결과로부터 틸라피아의 내장 및 껍질 추출물은 다소 활성의 차이는 있었지만 항균, 평활근 이완·수축 및 항산화 활성을 나타내었다. 따라서 이들 미이용 자원에는 유용성 고부가 기능을 지닌 다양한 생리활성 물질이 내포되어 있기 때문에 새로운 물질을 발견하기 위해 지속적인 정제 및 활용이 필요하다.



**Fig. 1. Extraction of Tilapia viscera extract.** Viscera tissue was extracted using boiling extraction method. Supernatant extract was used in bioactivity assay.



**Fig. 2. Extraction of Tilapia skin extract.** Supernatant extract was used in bioactivity assay. Most of glycan like a collagen was removed with alcohol treatment.

Table 1. Minimal Effective Concentration (MEC) of tilapia extracts. Low MEC value describes strong antimicrobial activity. The antimicrobial activity assay of the tilapia extracts against 10 bacterial strains and 1 fungal strain revealed that viscera extract has stronger activity more than skin extract except *E. tarda*.

Microbe	Minimal effective concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
	Viscera	Skin
<b>Gram-positive</b>		
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC1021	2.55	8.68
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC1621	4.87	ND
<i>Micrococcus luteus</i>	ND	ND
<b>Gram-negative</b>		
<i>Escherichiacoli</i> D31	6.79	21.72
<i>Salmonella</i> entrica	1.21	10.05
<i>Shigella flexneri</i> KCTC2517	8.17	12.77
<b>Marine gram-positive bacterium</b>		
<i>Streptococcus iniae</i> FPS229	23.85	>50
<b>Marine gram-negative bacteria</b>		
<i>Aeromonas hydrophila</i> KCTC2358	>50	ND
<i>Edwardsiella tarda</i> NUP251	>50	24.29
<i>Vibrio anguillarum</i> KCTC2711	2.67	3.64
<b>Fungus</b>		
<i>Candida albicans</i> KCTC7965	9.61	ND

ND means not detected in the range of the concentrations tested up to  $50\mu\text{g}/\text{mL}$  of peptides.

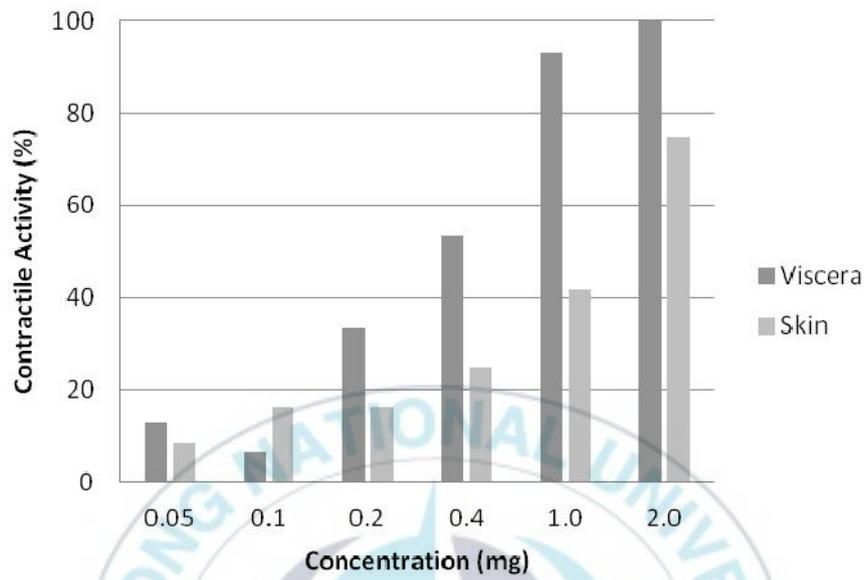


Fig. 3. Responses of Tilapia viscera and skin extracts on *E. burgeri* intestine. These extracts caused contraction of *E. burgeri* intestinal smooth muscle.

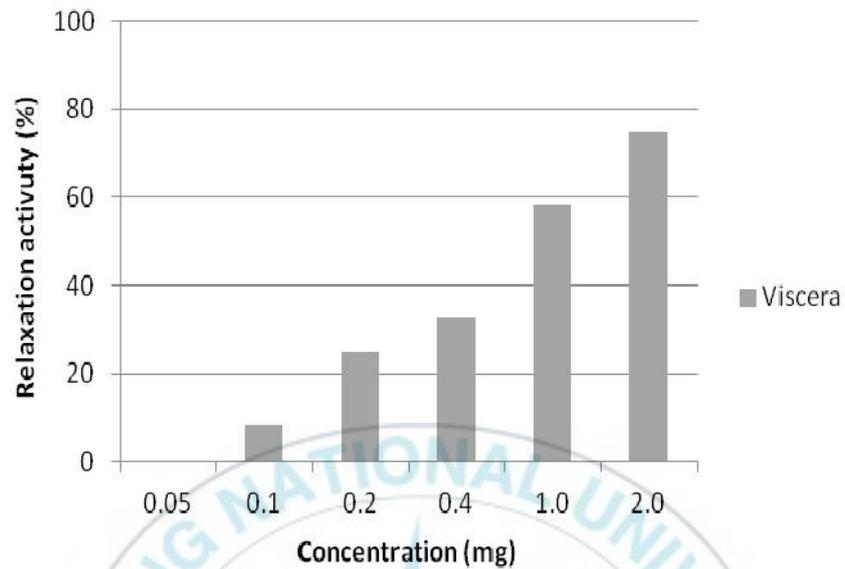


Fig. 4. Response of Tilapia viscera extract on *P. pectinifera* apical muscle. The extract caused just relaxation of *P. pectinifera* apical muscle

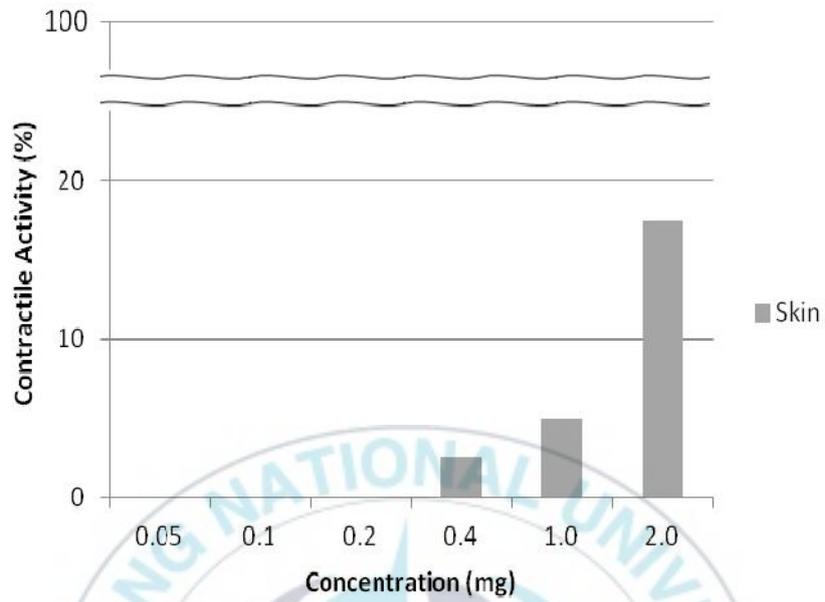


Fig. 5. Response of Tilapia skin extract on *P. pectinifera* apical muscle. The extract caused contraction of *P. pectinifera* the apical muscle.

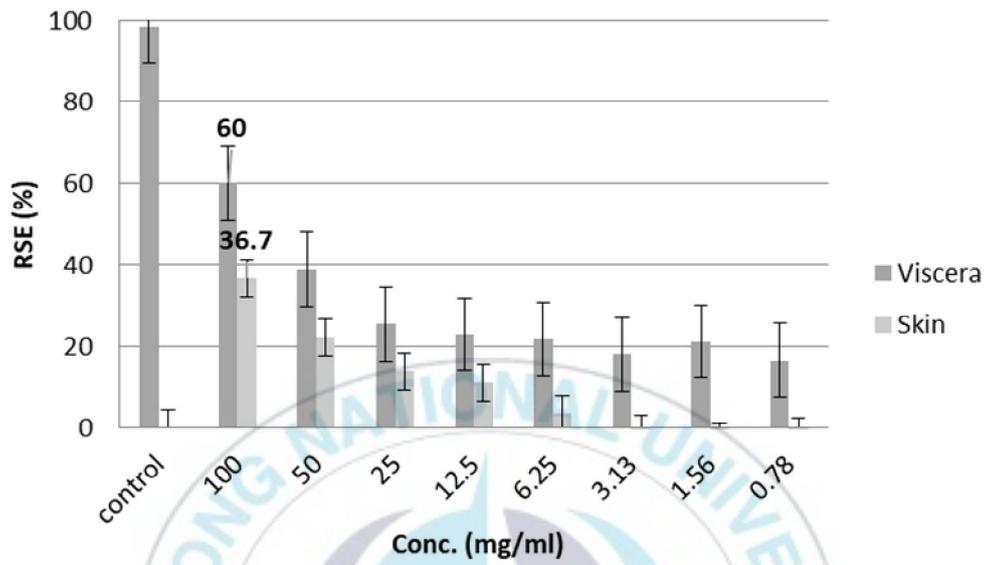


Fig. 6. Antioxidant activity of Tilapia extracts. Viscera crude extract showed good antioxidant effect better than skin crude extract. Control was used by 10 mM L-ascorbic acid.

## IV. 국 문 초 록

본 연구에서는 틸라피아 양식 산업에서 버려지는 부산물인 껍질과 내장에서 유용물질을 탐색하기 위하여 진행되었다. 틸라피아의 5 % 초산을 이용한 열수추출 방법을 사용한 추출물을 이용하여 항균활성, 항산화활성, 근수축 및 이완활성 실험을 함으로써 생리활성물질 탐색을 진행하였다.

항균활성을 확인하는 URDA (Ultra Radical Diffusion Assay)에서는 두 가지 추출물 모두 *Vibrio anguillarum* KCTC2711 에서 가장 좋은 활성이 나타났고, 그 다음은 *Bacillus subtilis* KCTC1021 에서 좋은 활성을 나타내었다.

DPPH 항산화 실험에서는 껍질 추출물에 비해서 내장 추출물에서 비교적 큰 항산화 능을 보였다. 하지만, 두 추출물 모두에서 표준시약과 비교했을 때 우수한 항산화 능을 보이지는 않았다.

근수축 및 이완활성을 나타내는 실험은 불가사리의 apical muscle 과 먹장어의 장관을 적출하여 이용하였다. 내장 추출물은 불가사리 apical muscle 에서 이완 활성과 먹장어의 장관에서 수축활성을 나타냈고, 껍질 추출물은 불가사리 apical muscle 과 먹장어 의 장관 모두에서 수축활성을 나타내었다.

틸라피아의 껍질과 내장 추출물은 항균활성, 항산화 활성 및 근육 수축활성을 나타내었다. 따라서 이들 조직으로부터 고부가가치를 지닌 유용물질을 분리한다면 부산물을이용하여 활용가치를 증대시킬 수 있다고 생각된다.

## V. 참고 문헌

- [1] M. Donia, M.T. Hamann, Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents, *The Lancet Infectious diseases* 3(6) (2003) 338–348.
- [2] R.E. Hancock, G. Diamond, The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences, *Trends in Microbiology* 8(9) (2000) 402–410.
- [3] A. Veeruraj, M. Arumugam, T. Ajithkumar, T. Balasubramanian, Isolation and characterization of drug delivering potential of type-I collagen from eel fish *Evenchelys macrura*, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23(7) (2012) 1729–1738.
- [4] G.A. Birkemo, T. Lüders, Ø. Andersen, I.F. Nes, J. Nissen-Meyer, Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*), *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Proteins and Proteomics* 1646(1–2) (2003) 207–215.
- [5] N. Iijima, N. Tanimoto, Y. Emoto, Y. Morita, K. Uematsu, T. Murakami, T. Nakai, Purification and characterization of three isoforms of chrysophysin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*, *European Journal of Biochemistry* 270(4) (2003) 675–686.
- [6] D. Robinette, S. Wada, T. Arroll, M. Levy, W. Miller, E. Noga, Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 54(5) (1998) 467–475.
- [7] C.H. Hoyle, Neuropeptide families: evolutionary perspectives, *Regulatory Peptides* 73(1) (1998) 1–33.
- [8] S. Holmgren, J. Jensen, Evolution of vertebrate neuropeptides, *Brain Research Bulletin* 55(6) (2001) 723–735.

[9] J.E. Zadina, W.A. Banks, A.J. Kastin, Central nervous system effects of peptides, 1980- 1985: a cross-listing of peptides and their central actions from the first six years of the journal Peptides, Peptides 7(3) (1986) 497-537.

[10] J. JENSEN, J.M. CONLON, Substance-P-related and neurokinin-A-related peptides from the brain of the cod and trout, European Journal of Biochemistry 206(3) (1992) 659-664.

[11] T. Ichikawa, D. McMaster, K. Lederis, H. Kobayashi, Isolation and amino acid sequence of urotensin I, a vasoactive and ACTH-releasing neuropeptide, from the carp (*Cyprinus carpio*) urophysis, Peptides 3(5) (1982) 859-867.

[12] J.M. Conlon, F. O' Harte, D.D. Smith, R.J. Balment, N. Hazon, Purification and characterization of urotensin II and parvalbumin from an elasmobranch fish, *Scyliorhinus canicula* (common dogfish), Neuroendocrinology 55(2) (1992) 230-235.

[13] S. Ranathunga, N. Rajapakse, S.-K. Kim, Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*), European Food Research and Technology 222(3-4) (2006) 310-315.

[14] Z.-J. Qian, W.-K. Jung, S.-K. Kim, Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw, Bioresource Technology 99(6) (2008) 1690-1698.

[15] N.S. Kumar, R. Nazeer, R. Jaiganesh, Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*), Amino Acids 42(5) (2012) 1641-1649.

[16] A. Alemán, E. Pérez-Santín, S. Bordenave-Juchereau, I. Arnaudin, M. Gómez-Guillén, P. Montero, Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity, Food Research International 44(4) (2011) 1044-1051.

[17] S. Saidi, A. Deratani, M.-P. Belleville, R.B. Amar, Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process,

Food Research International 65 (2014) 329–336.

[18] B.N. Ames, M.K. Shigenaga, T.M. Hagen, Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 90(17) (1993) 7915–7922

[19] K. Yamamoto, K. Igawa, K. Sugimoto, Y. Yoshizawa, K. Yanagiguchi, T. Ikeda, S. Yamada, Y. Hayashi, Biological safety of fish (tilapia) collagen, *BioMed Research International* 2014 (2014) 2014–2023.

[20] S. Choonpicharn, S. Jaturasitha, N. Rakariyatham, N. Suree, H. Niamsup, Antioxidant and antihypertensive activity of gelatin hydrolysate from Nile tilapia skin, *Journal of Food Science and Technology* 52(5) (2015) 3134–3139.

[21] B. Zhou, J. Bentham, M. Di Cesare, H. Bixby, G. Danaei, M.J. Cowan, C.J. Paciorek, G. Singh, K. Hajifathalian, J.E. Bennett, Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19 · 1 million participants, *The Lancet* 389(10064) (2017) 37–55.

[22] J.R. Medina-Medrano, T.A. Quiñones-Muñoz, A. Arce-Ortíz, J.G. Torruco-Uco, R. Hernández-Martínez, M.A. Lizardi-Jiménez, E. Varela-Santos, Antioxidant Activity of Collagen Extracts Obtained from the Skin and Gills of *Oreochromis sp*, *Journal of Medicinal Food* (2019) 722–728.

[23] P.-H. Huang, J.-Y. Chen, C.-M. Kuo, Three different hepcidins from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: analysis of their expressions and biological functions, *Molecular Immunology* 44(8) (2007) 1922–1934.

[24] K.-C. Peng, S.-H. Lee, A.-L. Hour, C.-Y. Pan, L.-H. Lee, J.-Y. Chen, Five different piscidins from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: analysis of their expressions and biological functions, *Plos one* 7(11) (2012) e50263.

[25] J.-J. Dong, F. Wu, X. Ye, C.-F. Sun, Y.-Y. Tian, M.-X. Lu, R. Zhang, Z.-H. Chen,  $\beta$ -Defensin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Sequence, tissue expression, and anti-bacterial activity of synthetic peptides, *Gene* 566(1) (2015) 23–31.

## Part II.

틸라피아(*Oreochromis niloticus*)의  
내장과 껍질 추출물로부터  
항균활성물질 정제

Purification of Bioactive Material from Sub-material of Nile tilapia

(*Oreochromis niloticus*)

Eun Jin Kim

*Department of Biotechnology and Bioengineering*

*Graduate School*

*Pukyong National University*

### **Abstract**

Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a fish species that live in fresh water of Africa. Industrially, merely Tilapia meat is consumed in forms of pillets while its viscera and skin are discarded as waste, creating massive amount of industrial waste. Fish viscera is known to contain diverse immune factors such as lysozymes, lectins, antimicrobial proteins and peptides. Thus, fish viscera is a suitable source for the purification of antimicrobial materials. Fish skin acts as a barrier of fish. Therefore, it has a lot of immune factors like fish viscera. In this study, viscera extract of *O. niloticus* was used to isolate the materials with antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* KCTC1021 and *Vibrio anguillarum* KCTC2711. *O. niloticus* viscera (313 g) was extracted with 5% AcOH and separated into three fractions containing eluents of 10%, 60% and 100% MeOH (containing 0.1% TFA) using Sep-pak C18 solid phase extraction cartridge. The eluents of 60% MeOH exerted the most powerful antimicrobial activity, which was then used for the purification of antimicrobial material. Through a series of high performance liquid chromatography, single peak was isolated from tilapia viscera extract. However, molecular weight of the single peak by mass spectrometry was about 2000~4000 meaning there is a complex substances. Investigation of this single peak is in progress to purify single material.

# I. 서론

1928년 페니실린(Penicillin)이 발견되어 1941년 상용화 된 이후 메티실린 (Methicillin), 반코마이신 (Vancomycin), 카바페넴 (Carbapenem)과 같은 항생제가 개발이 되었다 [1]. 그로 인해 많은 박테리아성 질병들이 줄어들었지만, 항생제들이 개발될수록 그만큼 MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*), MRAB (Multidrug Resistant *Acinetobacter Baumannii*), VRE (Vancomycin Resistant *Enterococ*), CPE (Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*)와 같은 항생제 내성균들이 빠르게 등장하였다. 새로운 항생제 등장은 줄어들고 그에 대한 내성균은 지속적으로 등장하게 되면서 기존의 항생제를 대체할 수 있는 새로운 물질의 필요성이 최근 들어 지속적으로 제기되고 있다 [2].

육상 생물과 마찬가지로 수중에서 생활하는 생물들은 세균이나 기생충 또는 곰팡이 등과 같은 외부 물질의 침입으로부터 스스로를 방어하기 위해 생체내에 면역체계를 가지고 있다 [3]. 이러한 면역체계는 비특이적 (innate) 면역과 특이적 (adaptive)면역으로 나눌 수 있다 [4]. 비특이적 면역 반응의 경우는 항균활성 펩타이드 (antimicrobial peptide)나 lectin 등에 의한 체액성 면역반응 (humoral immune response)과 대식세포 (macrophage), 식작용 (Phagocytosis), 캡슐화 (encapsulation)과 함께 자연 살해 세포 (natural killer cell)의 방어작용을 포함하는 세포성 면역반응 (cellular immune response)으로 구성되어있다. 한편 특이적 면역반

응의 경우는 비특이적 면역반응과 마찬가지로 외부로부터 감염이 이루어졌을 때 B 림프구가 항원을 인지하고 분화되어 여러 가지의 특이적 항체를 분비하는 체액성 면역반응과 억제 T 세포, 세포독성 T세포, 기억 T 세포와 B림프구를 활성화하는 역할을 가지는 세포성 면역반응으로 이루어진다 [5].

비특이적 면역반응에서 나타나는 항균활성 펩타이드는 단백질에 비해 크기가 작고 합성 속도가 빠르다는 장점이 있고 [6], 항균작용 이외에 상처치료의 촉진 및 단핵세포의 화학 주성작용을 나타내기도 한다 [7].

이러한 물질은 포유류나 양서류, 곤충, 식물 및 원핵생물에 이르기까지 많은 곳에서 발견된다. 설치류인 쥐의 소장으로부터 cryptidins [8], 한국산 농개구리 *Rana rugosa*의 피부에서 gaegurins [9], 꿀벌 (honeybee)로부터 정제된 apidaecin이 있다 [10]. 또한 식물의 경우에서도 plant defensin과 같은 defensin과 유사한 물질들이 보고되었다 [11-13]. Table 1에 나타낸 것 처럼 어류에서 유래한 대표적 항균성 펩타이드는 미꾸라지 (*misgurnusanguillicaudatus*)로부터 misgurin [14], 도다리 (*pleuronectes americanus*)에서 pleurocidin [15], 농어 (*moronechrysops*)에서 piscidins [16], 가자미(*Pardachiruspavoninus*)에서는 pardaxin 등이 보고된 바 있다 [17].

지금까지 척추동물에서부터 세균에 이르기까지 다양한 생물들로부터 많은 항균활성 펩타이드들이 정제되었다. 또한 어류의 내장 에도 항균활성 펩타이드가 존재한다고 생각되어진다. 하지만 아직까지 어류의 내장을 이용하

여 연구한 예는 그다지 많지 않다. 따라서 본 연구에서는 털라피아의 내장과 껍질 부산물로부터 새로운 항균활성물질을 정제하고자 하였다. 두 추출물은 항균활성을 나타내었고, 털라피아 내장 추출물로부터 몇 가지 물질로 이루어진 복합물이 정제되었다. 현재 계속해서 단일 물질로의 정제를 위한 연구를 진행 중에 있다.



Table 1. Antimicrobial peptides from fish.

Species	Peptide	reference
미꾸라지 ( <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> )	Misgurin	[14]
도다리 ( <i>Pleuronectes americanus</i> )	Pleurocidin	[15]
농어 ( <i>Morone chrysops</i> )	Piscidin	[16]
가자미 ( <i>Pardachirus marmoratus</i> )	Pardaxin	[17]
넙치 ( <i>Hippoglossus hippoglossus</i> )	Hipposin	[18]
참돔 ( <i>Chrysophrys major</i> )	Chrysophsin	[19]

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1.1. 재료 및 시약

실험에 사용된 틸라피아의 내장과 껍질은 충청남도의 Aqua plaza 에서 제공받았다. 내장은 간과 장으로 분리하려 하였지만, 구분이 힘들어 분리하지 않았고 껍질은 비늘은 제거한 상태로 액체질소에 급속 냉각하였다. 샘플들은 추출직전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. HPLC 에 사용된 Water 와 acetonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )은 J.T. Baker (Avantor-performance materials, PA, USA)사의 제품을 사용하였고 이 외의 나머지 시약들도 특급 시약을 사용하였다.

#### 1.2. 균주

항균활성 실험에는 *Vibrio anguillarum* KCTC 2711 과 *Bacillus subtilis* KCTC 1021 을 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 추출

#### 2.1.1. 킬라피아 내장으로부터 추출물 조제

-80 °C에서 보관하고 있던 내장 313 g은 끓는 물에 넣고 최대한 가위로 잘게 잘라 끓기 시작한 시점을 기준으로 약 5분간 끓였다. 이후에 homogenizer (IPK® basic ULTRA-TURRAX, USA)를 이용하여 덩어리로 보이는 입자가 없도록 곱게 갈아준 후, 초산을 넣어 5% 초산 용액으로 맞추었다. 7,000 g, 4 °C에서 30분간 원심분리하고 상층액을 분리하여 감압 농축을 한 다음, 1:3 (v/v)의 비율로 EtOH를 넣고 하루 동안 4°C에 보관하였다. 그리고 에탄올과 반응하여 생긴 당과 같은 침전물을 분리하기 위해 다시 7,000 g에서 원심 분리하였다. 침전물은 제거하고 상층액은 분리하여 감압농축기를 이용하여 약 100 ml로 농축하였다.

#### 2.1.2 킬라피아 껍질로부터 추출물 조제

205.55 g 의 킬라피아의 껍질을 5 % 초산샘플과 초산의 비율이 1:4 에 해당하도록 만들어 열수 추출법으로 추출물을 만들었다. 5 % AcOH 에 해당하는 AcOH 는 껍질을 증류수에 끓이고 식힌 후에 넣어주어 산 성분이 날아가지 않도록 하였다. 그 다음 껍질 샘플을 작게 가위로 자른 다음 최대한 입자가 작아지도록 갈아주었는데, 샘플을 파쇄할 때에는 호모게나이저 (IKA® T10 basic ULTRA-TURRAX, USA)와 실험용 믹서를 사용하였다. 큰 조직이 없게 갈아진 조직은 4 °C, 7,000 g 에서 30 분간 원심 분리하여 상층액과 펠렛을 분리하였다. 분리한 상층액은 800 ml 이었다. 상층액 추출물의 3 배 비율인 2,400 ml 의 에탄올을 넣고

4 °C에서 하루동안 방치하였다. 에탄올 용액을 4 °C, 7,000 g 에서 원심분리하고 상층액을 약 200 ml 으로 농축 후, 건조하여 사용하였다.

### 2.1.3. 추출물의 Solid Phase Extraction

각 두 종류의 추출물은 Sep-pak C18 cartridge (20 cc, Waters)를 이용하여 분리하였다. 우선 Cartridge 는 처음에 충전제가 건조된 상태로 있기 때문에 cartridge 부피의 3 배 용량의 0.1 % TFA 가 들어간 100 % Methanol 을 cartridge 에 주입하여 충전제를 활성화시켰다. 그리고 같은 부피의 0.1 % TFA 가 들어간 증류수로 cartridge 에 있는 메탄올을 씻어낸 후, 추출물을 cartridge 에 주입하여 물질을 충전 시켰다. 충전 된 추출물은 0.1 %TFA 가 포함된 증류수 (D.W.), 10 % MeOH (RM10), 60 % MeOH (RM60), 100 % MeOH (RM100)을 이용하여 4 개 물질로 분리하였다. 분리된 물질은 감압농축기를 이용하여 추출물에 섞여있는 메탄올 성분을 제거하였다. 이후, 티라피아의 내장 추출물의 항균활성측정을 위해서 1/10,000, 1/5,000 (v/v)에 해당하는 양을 사용하였고, 껍질 추출물의 항균활성을 측정하기 위해서는 1/1,000, 1/2,000, 1/4,000 (v/v)에 해당하는 양을 사용하였다.

## 2.2. 항균 활성 측정

### 2.2.1 배지의 제조

사용한 균주는 TSB 에 16 시간 배양한 후, 다시 4 시간 동안 계대배양하여 사용하였다. Ultrasensitive Radial Diffusion Assay (URDA)에 사용되는 plate 는 TSB 를 이용하여 만들었다. 균액 희석을 위해 agarose 가 미첨가 된 TSB 의 조성은 다음과 같다. TSB (no agarose): 49.5 ml deionized water, TSB powder 3 g, 1.0M Phosphate

buffer (PB) (pH 6.57). 추출물을 주입한 underlayer gel 의 조성은 다음과 같다. Underlayer gel : 49.5 ml deionized water, TSB powder 3 g, agarose 0.5 g, 1.0 M Phosphate buffer (PB) (pH 6.57). 그리고 추출물이 완전히 흡수된 underlayer gel 위에 도포하여 배양 한 overlayer gel 의 조성은 다음과 같다. Overlayer gel : 49.5 ml deionized water, TSB powder 5mg, agarose 0.5 g, 1.0 M Phosphate buffer (PB) (pH 6.57). 또한 *V. anguillarum* 은 NaCl 이 들어간 배지에 배양을 하는데 TSB (50 ml) 기준으로 0.75 g 의 NaCl 을 첨가해주었다. Agarose plate 를 만들기 위해서는 1 g 의 NaCl 이 첨가된 TSB (no agarose)에 균 농도를 희석하고, underlayer gel 과 overlayer gel 에는 각각 0.2 g, 1.25 g 을 첨가하였다.

### 2.2.2 틸라피아 추출물을 이용한 항균활성 측정

균액을 골고루 섞어 만든 Agarose plate 를 Vacuum 을 이용하여 약 3 mm 의 홈을 만들고 그 안에 5  $\mu$ l 의 0.01 % 초산에 녹인 추출물을 피펫을 이용해 주입하였다. 약 3 시간 후, 플레이트에 추출물의 흡수 및 확산이 완료되면 37 °C의 배양기에 넣고 16 시간 동안 배양한 후 clearzone 을 calliper 를 이용하여 측정하였다.

## 2.3. 정제

### 2.3.1. 틸라피아 내장 추출물의 정제

정제를 목적으로 하는 펩타이드 결합의 흡수파장은 210~ 220 nm 정도가 된다. 그러므로 일반적으로 뚜렷한 항균활성을 나타내고 양친매성 특징을 가진 펩타이드가 많이 용출되는 RM 60 추출물을 220 nm 파장을 바탕으로 정제를 진행했다. 가장 먼저 Sep-pak 을 이용해 분리한

털라피아 내장 RM60 추출물은 TSK-gel SP-5PW column (7.5 mm X 75 mm, Tosoh, Japan)에 B 용매 농도 구배 0% 80 분, 0 → 100 %로 60 분, 100 %에서 40 분으로 설정하여 부분 정제하였다. A 용매로는 0.02 M PB 수용액 (pH 6.0), B 용매로는 1 M NaCl 이 들어있는 0.02 M PB (pH 6.0)을 사용하였다. 반응을 나타낸 활성의 분획을 합치고 난 후, speed vacuum 으로 농축하여 CAPCELL-PAK C<sub>18</sub> column (4.6 X 250 mm, Shiseido, Japan) 에 B 용매 농도구배를 5 → 65 % 60 분, 2 ml/min 의 유속으로 분석하였다. 여기서 사용된 A 용매는 0.1 % TFA 수용액, B 용매는 acetonitrile (ACN) in 0.1 % TFA 이다. 다시 활성 분획들을 건조시킨 후, SP-5PW column 에 사용하는 시작 용매에 녹여 각각 다시 TSK-gel SP-5PW column (7.5 mm X 75 mm, Tosoh, Japan)에 주입했다. B 용매 구배는 50 → 100 % 50 분으로 진행하였다. 활성이 있는 분획들은 각각 모아 농축하고 CAPCELL-PAK C<sub>18</sub> column 에 주입했다. ACN 농도 구배는 18 → 30 %로 36 분 (1 %에 30 분간) 설정하여 정제하였다. 그리고 마지막으로 분자의 크기에 따라서 물질을 분리하는 superdex peptide FPLC column 을 사용하였다. 이들의 전체적인 정제과정은 Fig. 5 에 나타내었다.

### 2.3.2. 털라피아 껍질 추출물의 정제

우선 Sep-pak 을 이용해 분리한 털라피아 내장 RM60 추출물을 CAPCELL-PAK C<sub>18</sub> column (4.6 X 250 mm, Shiseido, Japan)에 B 용매 농도 구배 5 → 65 % 60 분으로 부분 정제하였다. A 용매로는 0.1 % TFA 수용액, B 용매는 ACN in 0.1 % TFA 을 사용하였다. 24 분에서 30 분 사이에 가장 좋은 반응을 나타냈다. 해당 분획을 speed vacuum 으로 TSK-gel SP-5PW column (7.5 mm X 75 mm, Tosoh, Japan)에 B 용매 농도구배를 0 % 20 분, 0 → 100 % 50 분, 1

ml/min 의 유속으로 분석하였다. 여기서 사용된 A 용매는 NaCl 이 없는 0.02 M PB (pH 6.0), B 용매는 NaCl in 0.02 M PB (pH 6.0)이다. 이 후, 각 분획 별로 다시 CAPCELL-PAK C<sub>18</sub> column (4.6 X 250mm, Shiseido, Japan)에 주입하여 염을 제거하고 피크별로 활성을 확인하였다. 이들의 전체적인 정제과정은 Fig. 2 에 나타내었다.

#### 2.4. 분자량 분석

털라피아 내장 추출물에서 역상 HPLC 를 통해 하나의 분획으로 나타난 물질의 분자량을 측정하기 위해서 Bruker maXisHD LC-MS/MS Q-TOF system 을 사용하였고, 칼럼은 Waters Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 mm x 100 mm, 300 Å, 1.7 µm, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였다.

실험 조건으로는 A buffer (0.1 % formic acid in water [v/v])와 B buffer (0.1 % formic acid in ACN [v/v])를 사용하였으며, 20 % B (0 - 1.0 분), 20 % B → 40 % B (1.0 - 21.0 분), 40 % B → 95 % B (21.0 - 22.0 분)의 조건으로 실험을 진행하였다. 물질의 분자량은 electrospray ionization (ESI) 와 multiple reaction monitoring(MRM)으로 측정하였다.

### Ⅲ. 결과 및 토론

#### 1. 추출

##### 1.1. 톨라피아 내장으로부터 추출물 조제

톨라피아 내장을 5 % 초산을 이용한 열수 추출법을 이용하여 추출물을 제조하였다. 톨라피아 내장 추출물의 항균활성은 Part I의 Table 1에 나타내듯이 다양한 균주에 항균 활성을 나타내었다. 이들 결과를 토대로 이 후, Sep-pak C18 cartridge를 이용한 Solid Phase Extraction (SPE)를 통해 메탄올을 용매로 하여 D.W., RM10, RM60, RM100으로 물질을 분리 용출하였다. 분리된 물질들은 *B. subtilis* KCTC 1021와 *V. anguillarum* KCTC2711 두 균주에 대해 각각 1/2,000, 1/4,000, 1/5,000 그리고 1/5,000, 1/10,000에 해당하는 양을 사용하여 URDA 항균활성을 측정하였다 (Fig.1과 Fig. 2). 그 결과, D.W., RM10, RM60 및 RM100 모두에서 활성이 나타났다. HPLC를 사용하여 극성을 이용하는 C18 column과 이온성을 이용하는 SP-5PW를 번갈아 가면서 사용하였고, superdex FPLC column을 이용해 분자량의 차이로 분리하였다. 톨라피아 내장 추출물의 정제 과정은 Fig. 5에 나타내었다.

##### 1.2. 톨라피아 껍질로부터 추출물 조제

톨라피아 껍질도 5 % 초산을 이용한 열수 추출법을 이용하여 추출물을 제조하였다. 추출과정에서 콜라겐 성분으로 인해 상온에서도 굳는 현상이 생겨서 내장과는 달리 두 번의 에탄올 처리를 하였다. 두 번의 에탄올

처리 후에도 4 °C 이하에서 굳는 현상이 생겼지만, 농도를 희석하여 굳지 않게 하였다. 킬라피아 껍질 추출물의 항균활성은 Part I의 Table 1에 나타내었다. 이 후, Sep-pak C18 cartridge 를 이용하여 SPE 를 실행하였고, 메탄올이 없는 0.1 % TFA 를 함유한 증류수와, 0.1% TFA 를 함유한 RM60, RM100 의 메탄올 층으로 추출물을 분리하였다. 추출물은 1/4,000, 1/2,000, 1/1,000 으로 희석하여 *B. subtilis* 와 *V. anguillarum*에 대하여 항균활성을 확인하였다 (Fig. 3 과 Fig. 4). 그 결과, D.W., RM60, RM100 추출물 모두에서 항균반응을 나타냈으며, 항균활성이 확인된 킬라피아 껍질 추출물 중 RM 60 추출물을 우선적으로 정제하였다. HPLC 를 사용하여 C18 column 과 이온성을 이용하는 SP-5PW 번갈아가면서 정제하였고, 분자량 column 인 superdex FPLC column 을 이용하여 분리하였다. 킬라피아 껍질 추출물의 정제 과정은 Fig. 6에 나타내었다.

## 2. 항균물질 정제

### 2.1. 킬라피아 내장추출물로부터 항균물질 정제

RM60 추출물을 HPLC 에 주입하여 펩타이드 결합의 흡수 파장인 220 nm 를 추적하며 분리정제를 하였다. 가장 먼저 TSK-gel SP-5PW column (7.5 mm X 75 mm, Tosoh, Japan)에 추출물을 주입하여, 0 M 에서 1 M 의 NaCl 농도 구배를 주어 분리를 진행하였다 (Fig. 7). 130 분 ~ 140 분에 해당하는 항균활성 부위는 검정 막대기로 나타났다. 활성을 보인 시간대의 물질을 모아 동결건조 하였다. 두 번째 정제 단계로 5 → 65 %의 gradient 로 CAPCELL-PAK C18 column (4.6 X 250 mm, Shiseido, Japan)에 주입하였다 (Fig. 8). 약 28 분에 나타난 A 분획에서

활성을 확인하였다. 동결건조 후 이온용매에 녹여 SP-5PW column 으로 주입을 하였다. 그 결과, Peak 1~5 (P1~P5) 다섯 개의 피크로 나뉘었다 (Fig. 9). 5 개의 피크를 각각 동결건조 후, Superdex peptide FPLC column 에 차례대로 주입하여 활성을 확인하였다. 그 결과, 다섯 개의 분획 중에서 P4 에서 활성을 나타내었다. P4 의 Superdex peptide FPLC column 을 이용한 분자량 크로마토그램은 Fig. 10 에 나타내었다. Fig. 10 에 나타낸 것처럼 P4 는 분자량 칼럼에 의해 여러 개의 피크로 분리되었고, 그 중 첫 번째 피크에서 항균 활성이 나타났다. Fig. 10 에서 항균활성을 나타낸 첫 번째 피크를 C18 column 에 주입해서 확인한 결과, main peak 에서 항균반응이 나타났고 (Fig. 11), 이 분획의 1/10 을 사용하여 LC-MS 를 측정하였다 (Fig. 12).

## 2.2. 킬라피아 껍질 추출물로부터 항균물질 정제

RM60 추출물을 역상 HPLC 에 주입하여 220nm 를 추적하며 분리정제를 하였다. 우선 CAPCELL-PAK C18 column (4.6 X 250 mm, Shiseido, Japan)에 추출물을 주입하여, 5 → 65 % 의 ACN in 0.1% TFA 의 농도 구배를 60 분에 걸쳐서 부분 분리하였다 (Fig. 13). 24 분 ~ 30 분 사이의 피크에서 항균활성을 나타내었으며, 활성 부분은 검정 막대기로 나타내었다. 활성을 보인 피크의 물질을 모아 동결건조 시킨 후, 0 %에서 20 분, 0 → 100 %로 50 분 TSK-gel SP-5PW column (7.5 mm X 75 mm, Tosoh, Japan)에 주입하였다 (Fig. 14). Fig. 14 에 나타낸 것처럼 Peak 의 분리능이 좋지 않아 활성을 측정하지 않고, 6 개의 peak I ~VI로 모아 각각 역상 HPLC 에 주입하였다 (Fig. 15 a~f). 결과 peak II, peak III에서 피크가 분리되는 것을 확인하였고 (Fig. 15 b, c), 나머지 피크에서는 분리가 나타나지 않았다 (Fig. 15 a, d~f). 또한 이 단계의 분획 전체를 *B. subtilis* 에 대해 URDA 실험을 하였으나, 항균활성이

나타나지 않았다. 아마도 처음단계에서 약한 항균활성을 나타내었기 때문에 정제하는 과정에서 활성이 소실된 것으로 생각된다.

### 3. 분자량 분석

Fig. 11 에서 활성을 나타낸 내장 추출물은 Bruker maXisHD LC-MS/MS Q-TOF system 을 사용하여 분석을 하였다 (Fig. 12). C18 column 을 이용한 HPLC 데이터 상에서 하나의 피크를 얻은 물질의 분자량을 분석한 결과, 607.63(+6), 742.45(+3), 835.25(+4), 968.42(+2)의 multi-ion 상태로 분석되었다. 이들을 토대로 분자량을 계산하면 분자량이 각각 3645, 3341, 2227, 1936 Da 이었다. 정제한 물질에 4 개의 분자량이 존재하는 것으로 미루어 보아 최종 정제한 물질은 복합체로 존재한다는 것을 의미한다.

최근 텔라피아의 EST 연구에 의하면 piscidin, hepcidin,  $\beta$ -defensin 이 존재한다고 알려졌는데, 이들의 분자량은 piscidin 이 2.12 kDa [20], hepcidin 이 2.54 kDa [21],  $\beta$ -defensin 이 4.45 kDa 이다 [22]. 이들 3 종류의 분자량은 본 논문에서 정제를 한 복합물의 분자량들인 약 2,000~4,000 의 범위에 해당한다. 따라서 본 연구에서 항균활성을 가진 텔라피아 유래의 복합물은 텔라피아를 이용한 EST 연구에 의해 밝혀진 piscidin, hepcidin,  $\beta$ -defensin 과 유사한 항균활성물질 일 것이라고 예상된다.

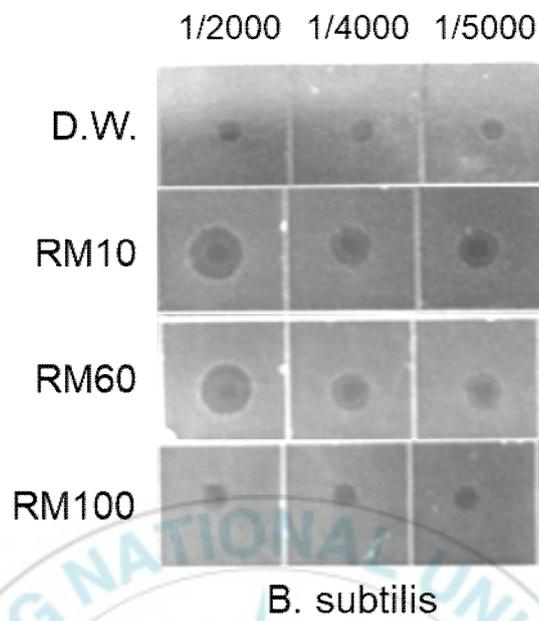


Fig. 1 Antimicrobial activity of Tilapia viscera extract against *Bacillus subtilis* KCTC 1021.

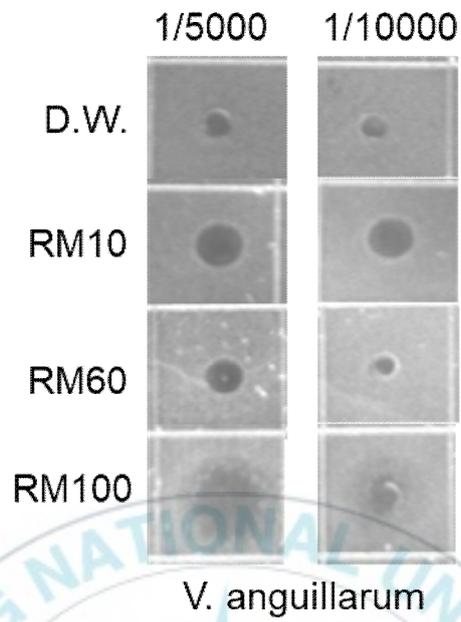


Fig. 2 Antimicrobial activity of Tilapia viscera extract against *Vibrio anguillarum* KCTC 2711.

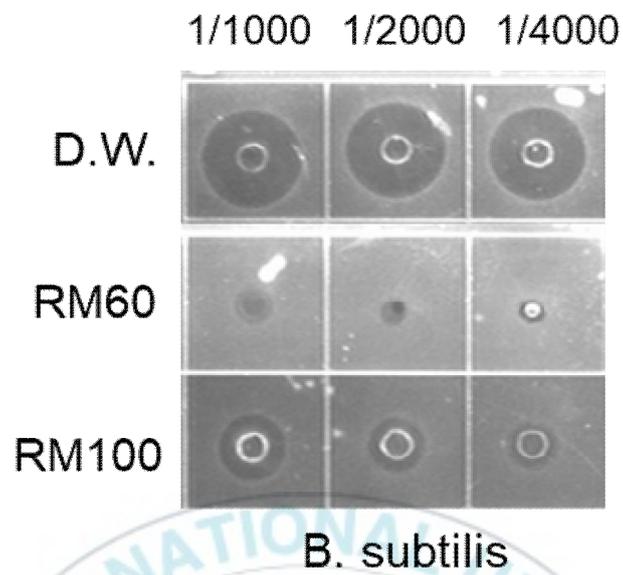


Fig. 3 Antimicrobial activity of Tilapia skin extract against *Bacillus subtilis* KCTC 1021.

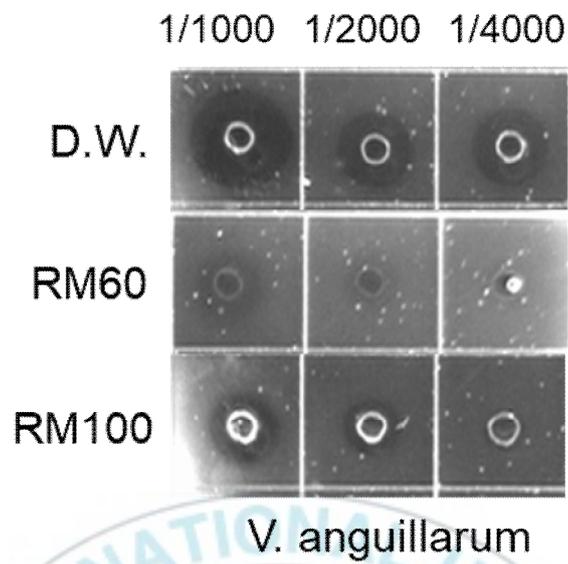
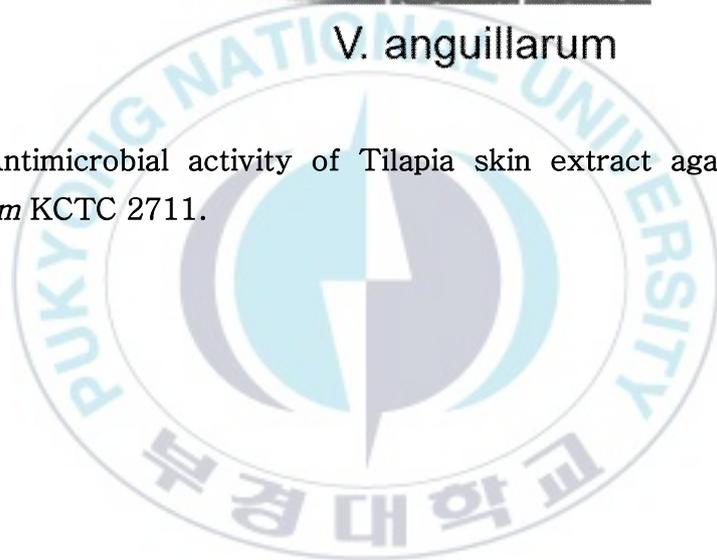
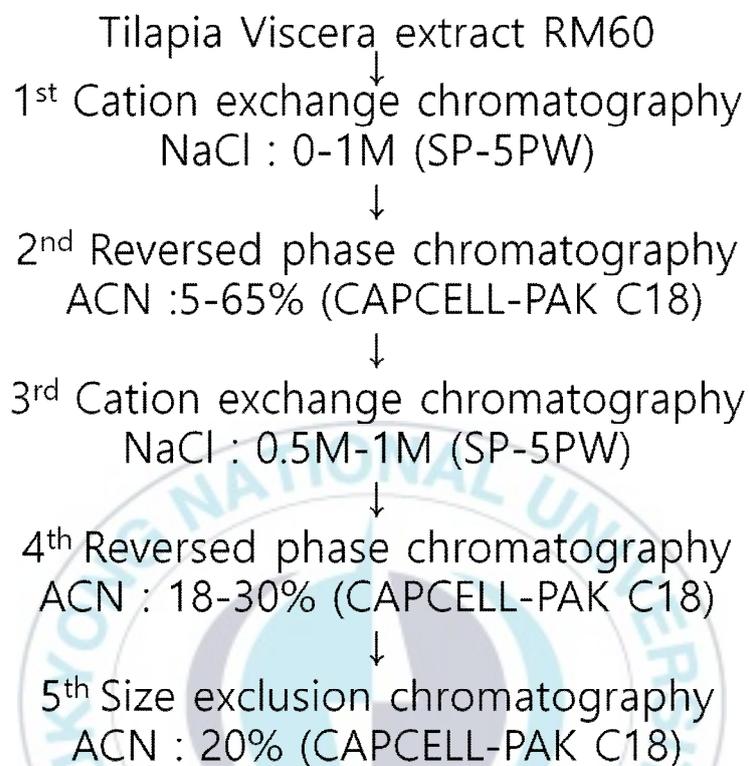
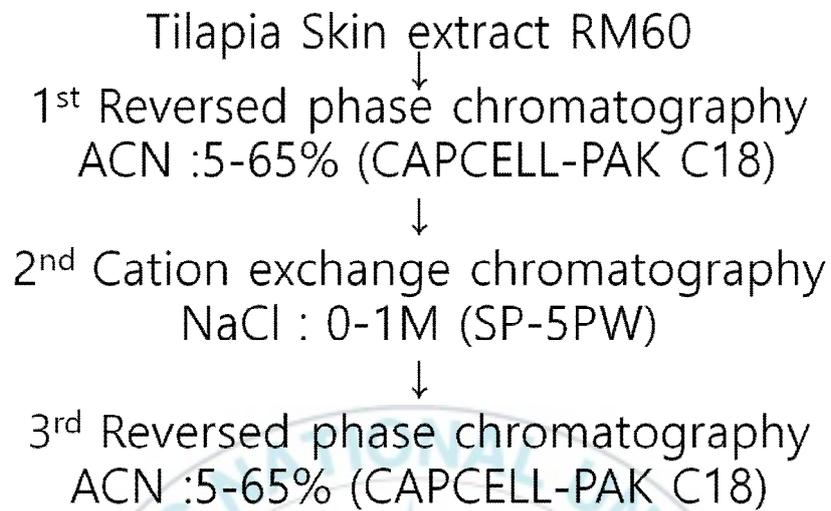


Fig. 4 Antimicrobial activity of Tilapia skin extract against *Vibrio anguillarum* KCTC 2711.





**Fig. 5 Purification steps of *Tilapia viscera* extract.** The extract was purified using cation exchange column (SP-5PW) and reverse phase column (CAPCELL-PAK C18)



**Fig. 6 Purification steps of Tilapia skin extract** The extract was purified using cation exchange column (SP-5PW) and reverse phase column (CAPCELL-PAK C18). But it was not shown antimicrobial activity at the 3<sup>rd</sup> step.

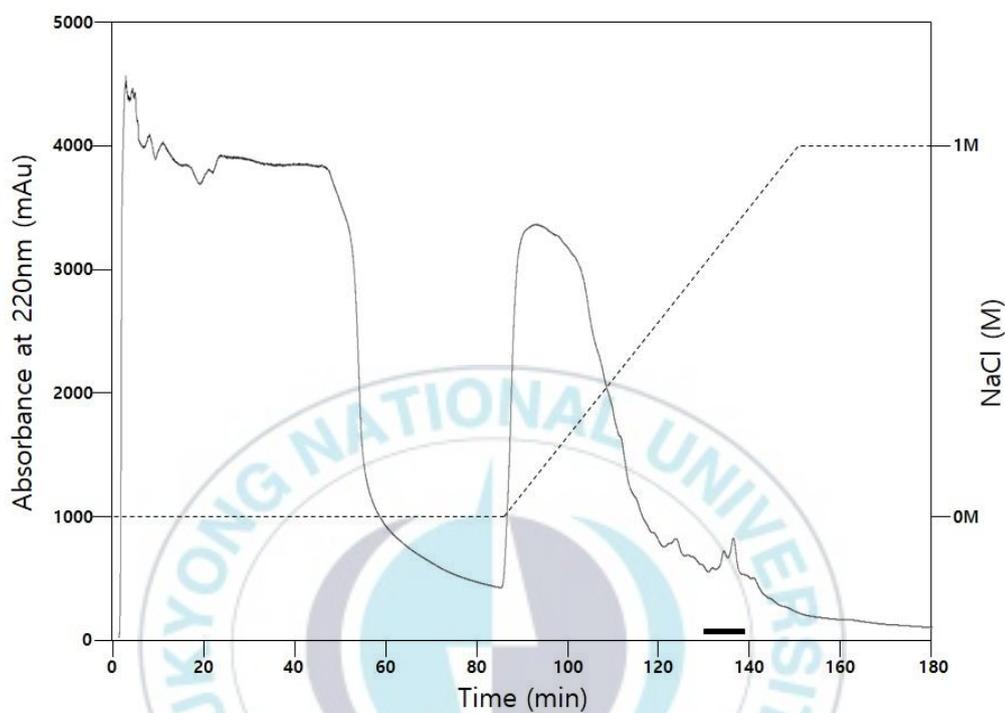


Fig. 7 1<sup>st</sup> purification step cation exchange HPLC of *Tilapia viscera* extract. RM 60 was eluted with a linear gradient of 0 M → 1 M NaCl in 20 mM phosphate buffer (pH 6.0) at a flow rate of 1.0 ml/min. The black bar shows the antimicrobial activity fractions.

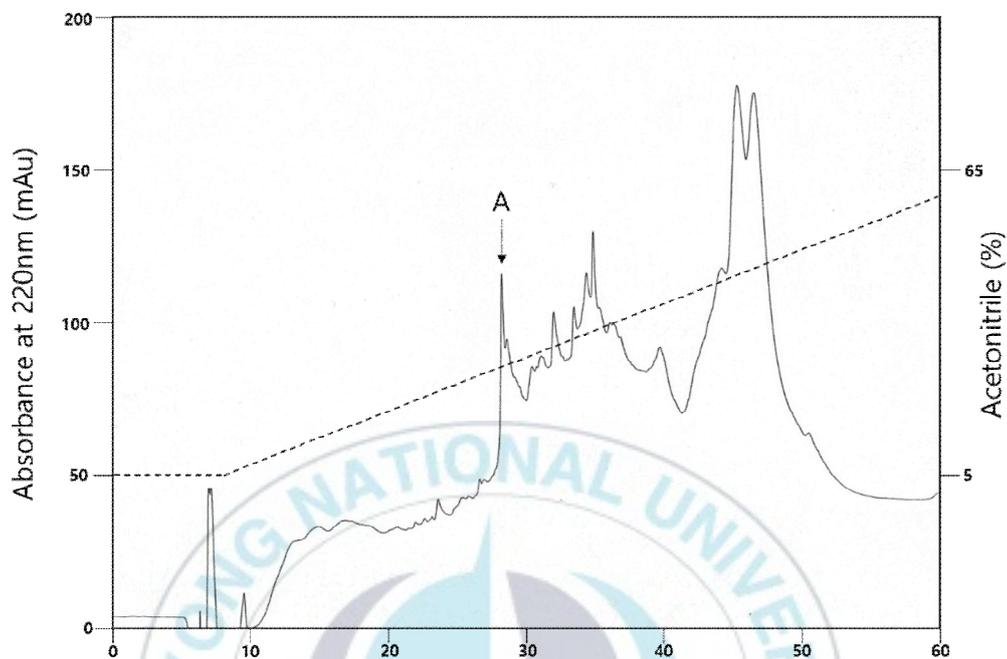


Fig. 8 2<sup>nd</sup> purification step Reverse-phase HPLC of *Tilapia* viscera extract. Active fraction was eluted with a linear gradient of 5 % → 65 % (60 min) ACN in 0.1 % TFA at a flow rate of 2.0 ml/min. The down arrow shows the antimicrobial activity fraction.

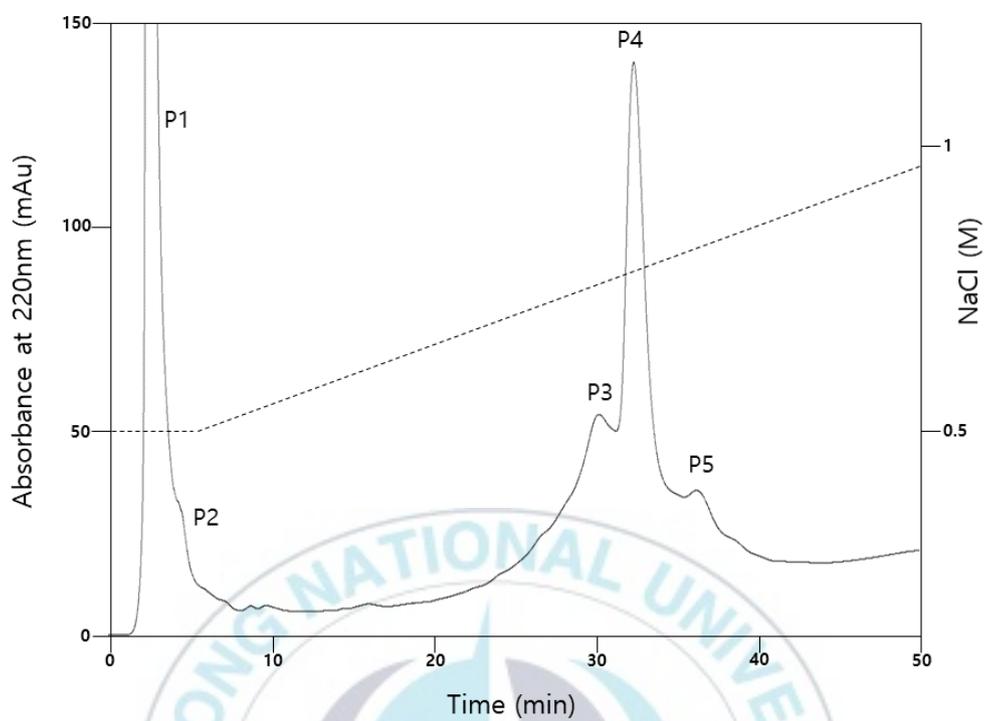


Fig. 9 3<sup>rd</sup> purification step of A peak using cation exchange HPLC column. RM60 was eluted with a linear gradient of 0 M  $\rightarrow$  1 M NaCl in 20 mM phosphate buffer (pH 6.0) at a flow rate of 1.0 ml/min. P4 shows the antimicrobial activity fraction.

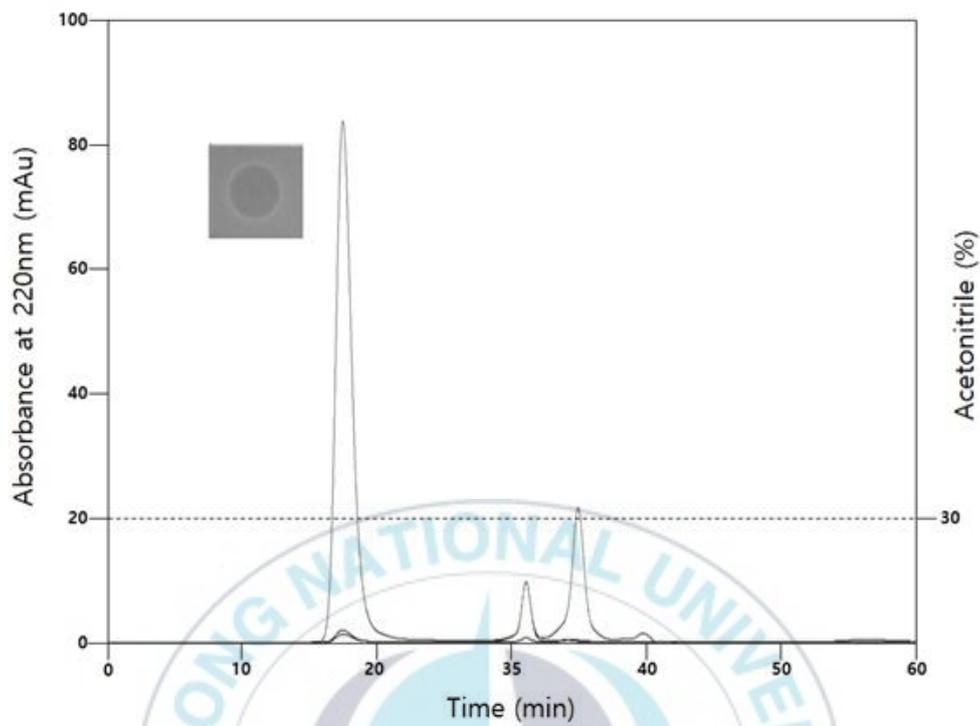


Fig. 10 4<sup>th</sup> purification step of P4 using superdex peptide FPLC column. Active fraction was eluted with an isocratic elution of ACN in 0.1 % TFA at a flow rate of 0.5 ml/min.

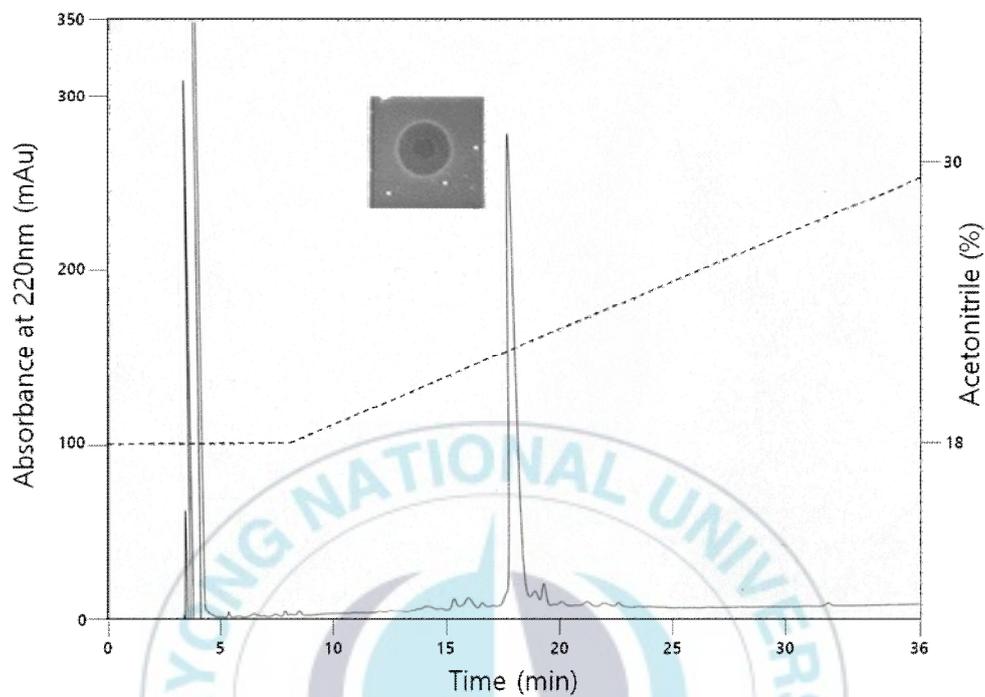


Fig. 11 5<sup>th</sup> purification step reverse-phase HPLC of *Tilapia viscera extract*. Active fraction was eluted with a linear gradient of 18 %–>30 % (36 min) ACN in 0.1 % TFA at a flow rate of 1.0 ml/min. The clear zone shows the antimicrobial activity of the peak.

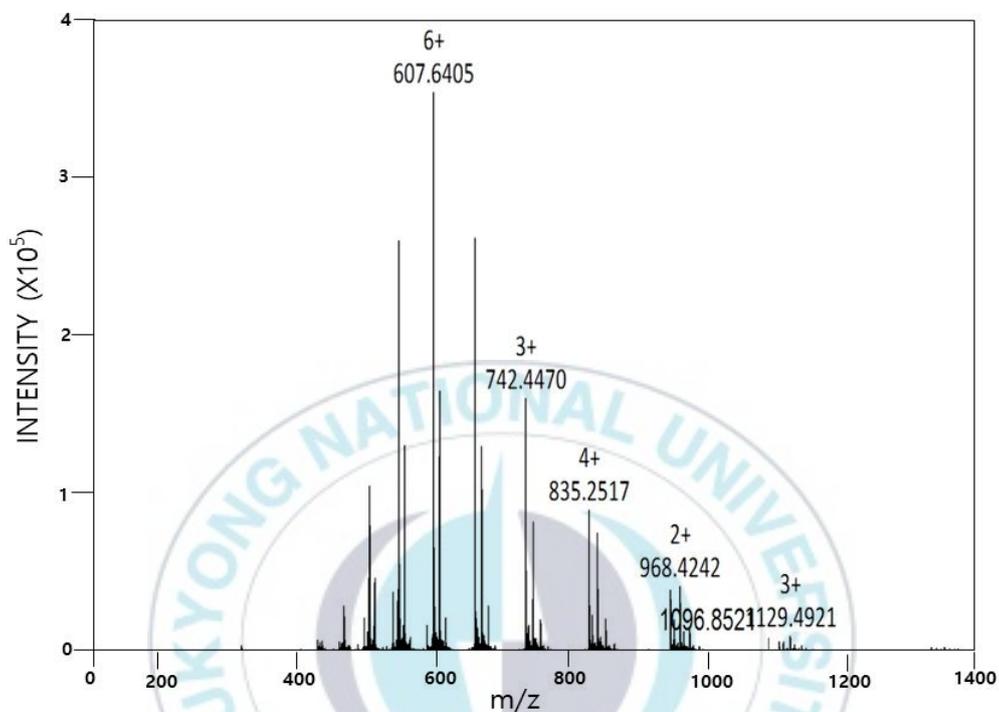


Fig. 12 LC/MS result of single peak from Tilapia viscera extract. This figure shows that the main peak is a multi-substance. It needs to conduct additional steps for purification of the singly charged species.

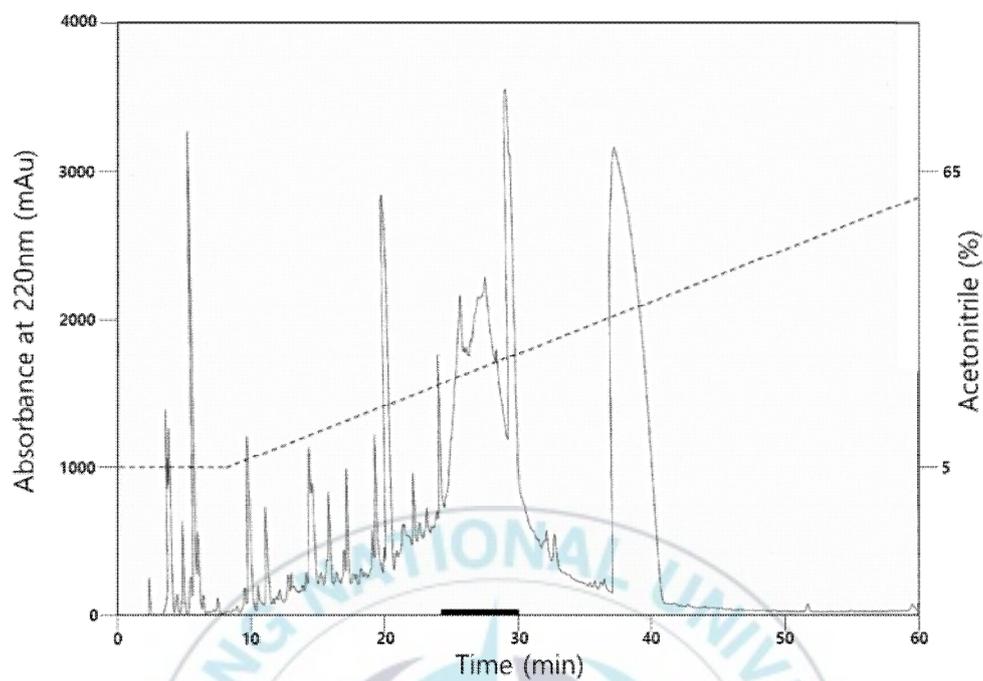


Fig. 13 1<sup>st</sup> purification step of Tilapia skin extract using reverse-phase HPLC. Active fraction was eluted with a linear gradient of 5 % → 65 % (60 min) ACN in 0.1 %TFA at a flow rate of 1.0 ml/min. The black bar shows the antimicrobial activity fractions.

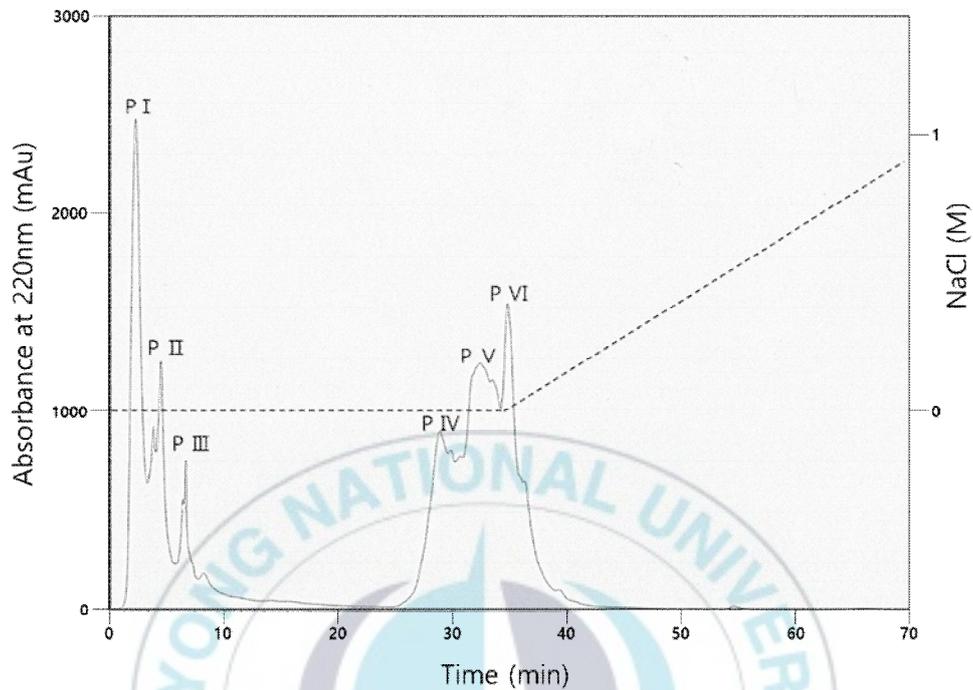
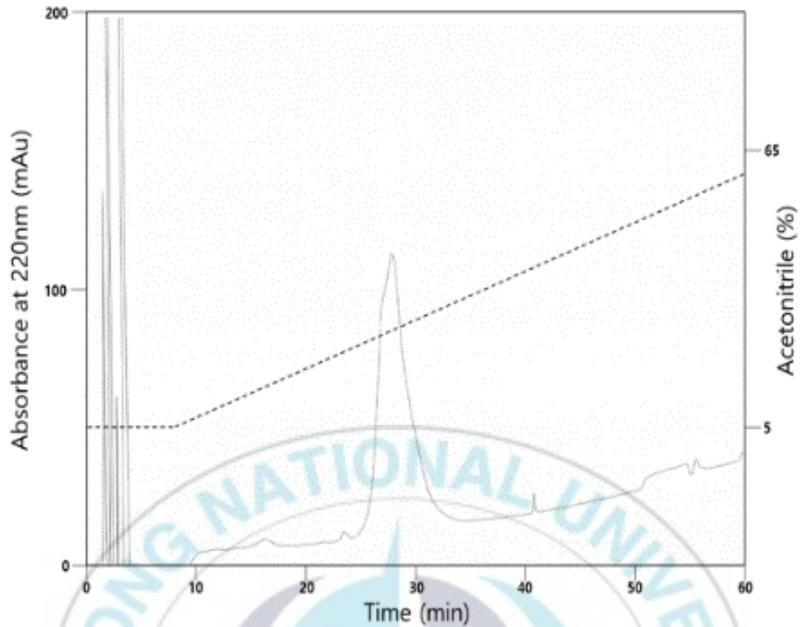
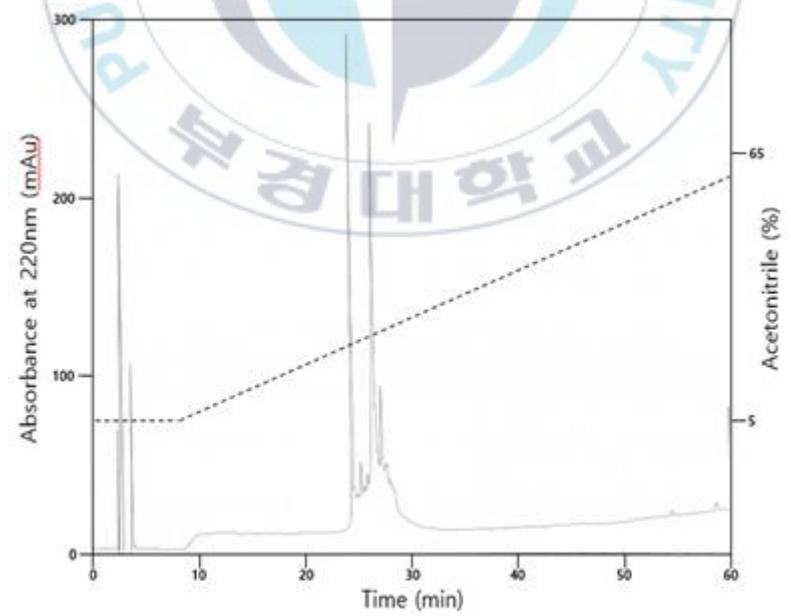


Fig. 14 2<sup>st</sup> purification step of fractions with activity using cation exchange HPLC. RM60 was eluted with a linear gradient of 0 M  $\rightarrow$  1 M NaCl in 20 mM phosphate buffer (pH 6.0) at a flow rate of 1.0 ml/min.

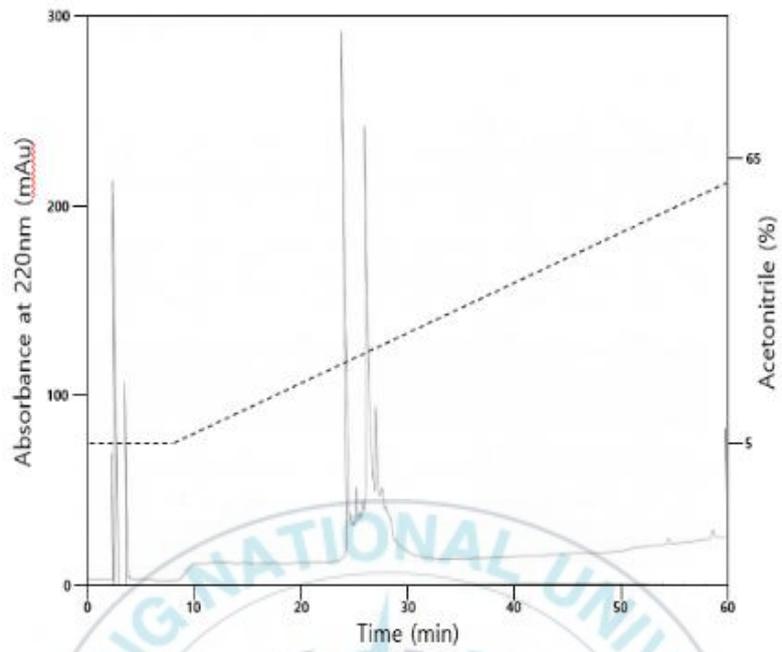


(a) P I

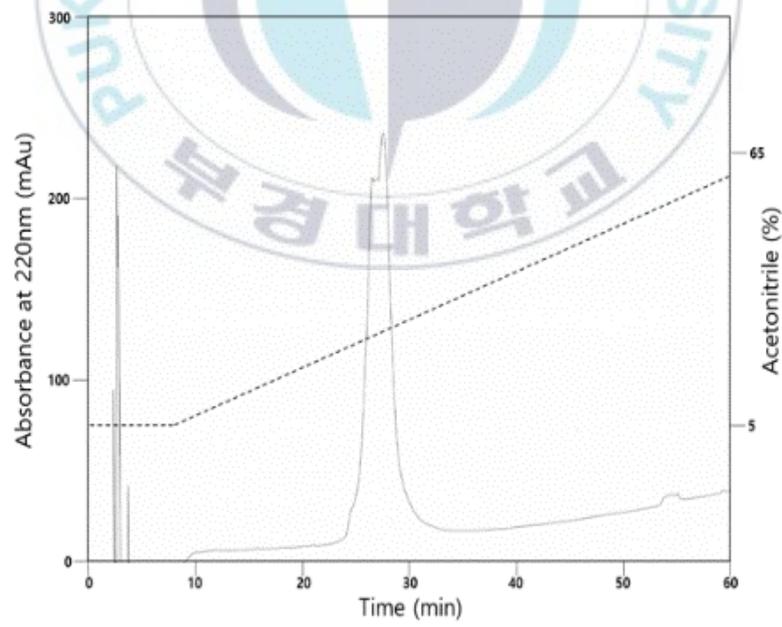


(b) P II

To be continued

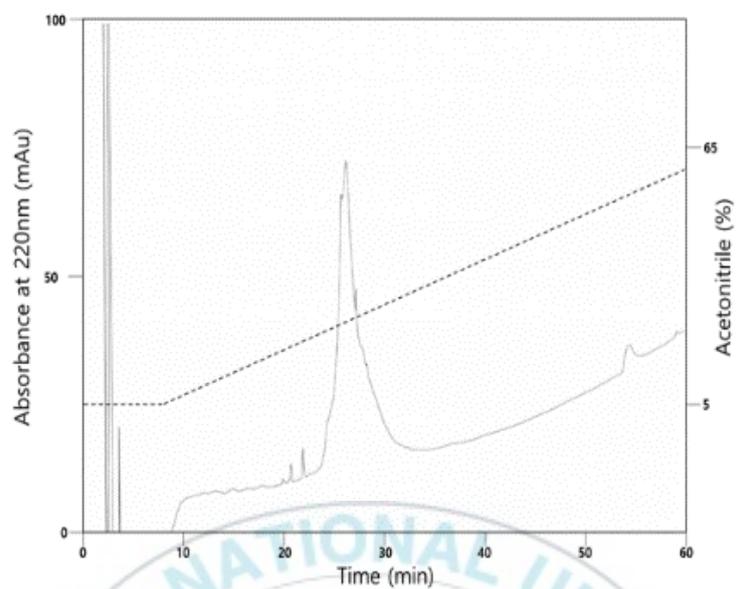


(c) P III

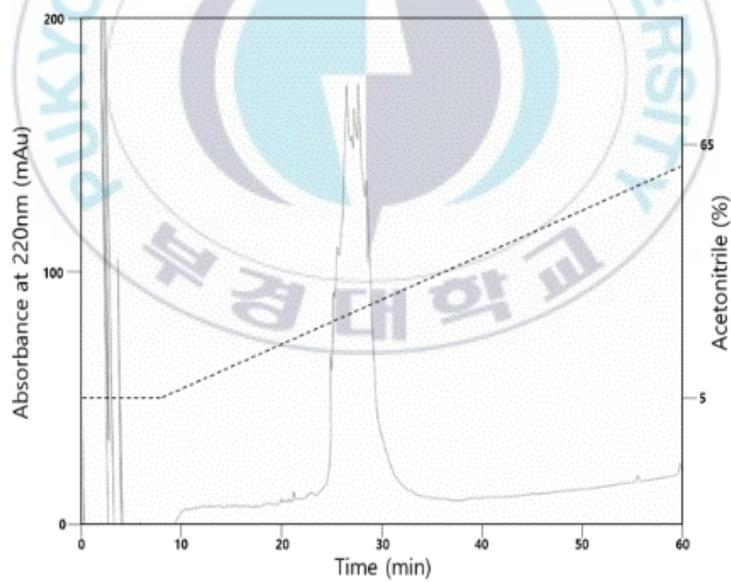


(d) P IV

To be continued



(e) P V



(f) P VI

Fig. 15 3<sup>rd</sup> purification step of P I ~P VI using reverse-phase HPLC. 6 parts of previous step were eluted with a linear gradient of 5 % → 65 % (60 min) ACN in 0.1 % TFA at a flow rate of 1.0 ml/min.

## IV. 국 문 초 록

전세계적으로 수산물의 소비가 증가하면서 틸라피아와 같은 양식어류의 양도 증가하였다. 양식량의 증가와 함께 비가식 부위로 취급되는 어류의 내장이나 껍질에 의한 환경오염도 진행되고 있다. 이와 같은 비가식 부위로부터 새로운 고부가가치를 지니는 유용물질을 발견하고자 하는 시도가 틸라피아에서도 이루어졌지만, 껍질에서의 향산화 물질 이외에는 보고 된 바 없다. 따라서 본 논문은 면역에 관여하는 내장조직과 껍질 피부조직에서 항균활성 물질을 정제하여 어류의 부산물에 부가가치를 더하고자 하였다.

두 조직의 추출물은 5 % 초산에 의한 열수 추출법으로 추출이 하였고, Sep-pak C18 cartridge 를 통해 60 % 메탄올에서 용출된 물질을 사용하여 정제 과정을 진행하였다. 틸라피아의 내장과 껍질의 RM60 추출물은 HPLC 를 이용하여 칼럼을 교체하면서 정제하였다.

HPLC 정제를 통하여 내장 추출물로부터 단일 피크로 보이는 항균물질을 정제하였지만, LC/MS 분석에서 몇 가지의 복합물로 나타났다. 그러므로 단일물질로의 정제를 위해선 추가적인 정제과정이 더 필요하다. 또한 껍질 추출물에서는 HPLC 그래프 상에서 피크의 분리가 잘 이루어지지 않았다. 또한 항균 활성을 확인하는 과정에서 활성이 나타나지 않았기 때문에 더 많은 양의 껍질 샘플을 이용한 추출을 하거나, 새로운 방법에서의 정제가 필요하다고 생각된다.

## V. 참고 문헌

- [1] J. Clardy, M.A. Fischbach, C.R. Currie, The natural history of antibiotics, *Current Biology* 19(11) (2009) R437–R441.
- [2] D.J. Diekema, B.J. BootsMiller, T.E. Vaughn, R.F. Woolson, J.W. Yankey, E.J. Ernst, S.D. Flach, M.M. Ward, C.L. Franciscus, M.A. Pfaller, Antimicrobial resistance trends and outbreak frequency in United States hospitals, *Clinical Infectious Diseases* 38(1) (2004) 78–85.
- [3] R.M. Kini, H.J. Evans, A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A<sub>2</sub>, *Toxicon* 27(6) (1989) 613–635.
- [4] R.E. Hancock, G. Diamond, The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences, *Trends in Microbiology* 8(9) (2000) 402–410.
- [5] C. Uribe, H. Folch, R. Enríquez, G. Moran, Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review, *Veterinari Medicina* 56(10) (2011) 486–503.
- [6] A. Tossi, M. Scocchi, M. Zanetti, P. Storici, R. Gennaro, PMAP-37, a Novel Antibacterial Peptide from Pig Myeloid Cells: cDNA Cloning, Chemical Synthesis and Activity, *European Journal of Biochemistry* 228(3) (1995) 941–946.
- [7] R.I. Lehrer, A.K. Lichtenstein, T. Ganz, Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells, *Annual Review of Immunology* 11(1) (1993) 105–128.
- [8] M.E. Selsted, S.I. Miller, A.H. Henschen, A.J. Ouellette, Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense, *The Journal of Cell Biology* 118(4) (1992) 929–936.
- [9] J.M. Park, J.-E. Jung, B.J. Lee, Antimicrobial peptides from the skin of a Korean frog, *Rana rugosa*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 205(1) (1994) 948–954.

- [10] P. Casteels, C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck, P. Tempst, Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees, *The EMBO Journal* 8(8) (1989) 2387–2391.
- [11] F.T. Lay, F. Brugliera, M.A. Anderson, Isolation and properties of floral defensins from *ornamental tobacco* and *petunia*, *Plant Physiology* 131(3) (2003) 1283–1293.
- [12] E.I. Finkina, E.I. Shramova, A.A. Tagaev, T.V. Ovchinnikova, A novel defensin from the lentil *Lens culinaris* seeds, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371(4) (2008) 860–865.
- [13] P. Sharma, A. Lönneborg, Isolation and characterization of a cDNA encoding a plant defensin-like protein from roots of Norway spruce, *Plant Molecular Biology* 31(3) (1996) 707–712.
- [14] C.B. Park, J.H. Lee, I.Y. Park, M.S. Kim, S.C. Kim, A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, *FEBS letters* 411(2–3) (1997) 173–178.
- [15] A.M. Cole, P. Weis, G. Diamond, Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder, *Journal of Biological Chemistry* 272(18) (1997) 12008–12013.
- [16] U. Silphaduang, E.J. Noga, Antimicrobials: peptide antibiotics in mast cells of fish, *Nature* 414(6861) (2001) 268–269.
- [17] S.A. Thompson, K. Tachibana, K. Nakanishi, I. Kubota, Melittin-like peptides from the shark-repelling defense secretion of the sole *Pardachirus pavoninus*, *Science* 233(4761) (1986) 341–343.
- [18] G.A. Birkemo, T. Lüders, Ø. Andersen, I.F. Nes, J. Nissen-Meyer, Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*), *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Proteins and Proteomics* 1646(1–2) (2003) 207–215.
- [19] N. Iijima, N. Tanimoto, Y. Emoto, Y. Morita, K. Uematsu, T. Murakami, T. Nakai, Purification and characterization of three isoforms of chrysophysin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*, *European Journal of Biochemistry* 270(4) (2003) 675–686.

[20] K.-C. Peng, S.-H. Lee, A.-L. Hour, C.-Y. Pan, L.-H. Lee, J.-Y. Chen, Five different piscidins from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: analysis of their expressions and biological functions, Plos one 7(11) (2012) e50263.

[21] P.-H. Huang, J.-Y. Chen, C.-M. Kuo, Three different hepcidins from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: analysis of their expressions and biological functions, Molecular Immunology 44(8) (2007) 1922–1934.

[22] J.-J. Dong, F. Wu, X. Ye, C.-F. Sun, Y.-Y. Tian, M.-X. Lu, R. Zhang, Z.-H. Chen,  $\beta$ -Defensin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Sequence, tissue expression, and anti-bacterial activity of synthetic peptides, Gene 566(1) (2015) 23–31.



## 감사의 말

이 논문이 나오기까지 대학원 생활동안 도움을 주신 많은 분들에게 이 자리를 빌려 감사의 인사를 드립니다.

먼저 학위를 무사히 마칠 수 있도록 부족한 저를 항상 신경써주시고 이끌어 주신 박남규 교수님께 감사드립니다. 학부 전공과 달라 낯설고 힘들 때 괜찮다며 차근차근 알려주신 교수님의 지도로 인해서 많은 용기를 얻었고, 무사히 석사 생활을 보낼 수 있었습니다.

고혜진 박사님, 처음엔 박사님이 무서웠는데 같이 생활하면서 정이 많은 분이시라는 걸 느꼈습니다. 실험하는 동안에도 문제가 생기면 가장 먼저 도움을 청하곤 했는데, 그 때 마다 해결책을 주시고 방향을 제시하여 주셔서 감사했습니다.

혜영이 언니, 낯설고 모르는 것들 투성이었던 대학원 생활이었는데 언니한테서 사소한 것부터 큰 것까지 많은 도움을 받았고 도움과 함께 따듯함을 느꼈습니다.

Anastasia, 한국어를 능숙하게 잘해서 수업도 같이 듣고, 서로 빨리 친해질 수 있었던 것 같습니다. 덕분에 즐거운 학교생활 했습니다

부모님, 대학원 다니는 동안 물질적으로나 정신적으로나 믿고 의지할 수 있게 해주시고, 묵묵히 지켜봐주셔서 감사드립니다. 하나 뿐인 동생 진영이도 내가 힘들 때 마다 선물도 해주고, 전화해서 안부도 물어봐주면서 신경써줘서 고마워. 가족들 모두 사랑합니다.

그리고 기숙사 룸메이트로 만나서 2년 간 같이 학교생활한 예진이, 이렇게 친해질 줄은 몰랐는데 엄청 친해졌어. 고맙고 고생많았어. 또, 졸업하기까지 행정업무나 졸업사정에 신경써준 학과 조교 재근 오빠, 언제나 내 편에 서서 힘이 되어주는 고향 및 부산에 있는 친구들 모두 감사드립니다.