

공학석사 학위논문

어류와 불가사리로부터
생리활성물질의 탐색 및 정제

지도교수 홍 용 기

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함



2004년 2월

부경대학교 대학원

생 물 공 학 과

배 윤 정

배 윤 정의 공학석사 학위논문을 인준함

2004년 2월 일

주 심 이학박사 박 남 규



위 원 이학박사 정 현 도



위 원 이학박사 홍 용 기



목 차

Part Ⅰ : 어류 장기별 추출물로부터의 생리활성 물질의 탐색

Abstract	1
서론	2
재료 및 방법	5
1. 재 료	5
1. 1. 어 류	5
1. 2. 일반 시약	5
1. 3. Bacteria. 및 Fungi	5
2. 실험방법	7
2. 1. 추 출	7
2. 2. 항균 및 항곰팡이 활성	7
2. 3. 근수축 활성	8
2. 3. 1. 장관의 준비	8
2. 3. 2. 활성 측정	9
2. 4. 항산화 활성	9
결과 및 고찰	12
1. 추 출	12
2. 항균 및 항곰팡이 활성	12
3. 근수축 활성	15
4. 항산화 활성	19
국문초록	24
참고문헌	25

Screening of bioactive materials from organic extracts of fish

Yun Jung Bae

Department of Biotechnology and Bioengineering
Graduate School
Pukyong National University

Abstract

The main objective of this work is to increase the utilization of by-products from fish species in order to isolate new biologically active compound. This study presents the result of a screening program for antimicrobial, antifungal, contractile and antioxidant activities in organ extracts of eight fish species. Antimicrobial activity used *E. coli* D31 and *B. subtilis* PM125. Spleen extracts of *C. acrpio*, *M. cephalus* and *C. arugs* had the inhibitory activity to *E. coli* D31 and *B. subtilis* PM125. Gill (*S. niloticus*, *C. argus*), bile (*C.acrpio*, *M. cephalus*) and kidney (*T. modestus*) extracts had antimicrobial activity to only *B. subtilis* PM125. Specially spleen extracts from 6 species fish has antifungal activity against *C. albicans*. In before study, some antimicrobial materials isolated from gill, skin of fish. Gill, skin protected fish against diverse bacteria and fungi. In the result of contractile activity about catfish (*Silurus osotus*) and hagfish (*Eptatretus burgeri*) intestine, each intestine extracts of fish were high effecter than other extracts. Gill, intestine, liver, skin, egg extracts had the high level of antioxidant effect about DPPH.

Key words : Antimicrobial, Antifungal, Contractile, Antioxidant, Fish

서 론

40여 년 전부터 수중 생물인 sponge, algae, anemone, coral, snail, fish 등으로부터 항균, 항곰팡이, 항염증, 항암, 구충제, 신경전달물질, 항산화물질 등 생리활성을 갖는 다양한 물질들이 정제되었고, 특성을 밝혀 실제 생활에 이용되고 있다 (1).

곰팡이, 세균과 쉽게 접할 수 있는 물이라는 환경에서 살고, 움직이지 못하고 고정되어 살아가는 sponge, anemone, coral 등은 천적으로부터 자신을 보호하기 위해서 toxin을 만들고 이를 체외로 분비한다 (2). 이런 물질들은 sponge, anemone, coral 뿐만이 아니라 사람에게도 유익한 물질로 이용되고 있다. 현재 정제가 완료되고 그 구조 및 생리활성 특성이 밝혀져 약으로 이용되기 위해서 임상 단계에 있는 물질이 많이 있다. sponge에서 정제된 Discodermolide (3)는 면역억제제, HTI286 (4), KRN7000 (5)은 항암제로, IPS512602 (6)은 염증치료제로 이용되기 위해서 임상 단계를 거치고 있다. 뿐만 아니라 soft coral의 OAS1000 (7), 이끼벌레의 bryostatins (8), 남조류인 curacin A 등 역시 항암제로 사용되기 위해서 임상 단계에 있다. 부착 생물 뿐만 아니라 sea slug에서 정제된 Dolastatin-10 (9), ILX651, Cernadotin, sea squirt에서 정제된 Yondelis (10), Aplidin (11) 등은 항암제, 항염증제 등으로 이용되기 위해서 임상 I 단계와 II 단계에 진행 중에 있다. 최근에는 pseudopterosins이 기능성화장품에 첨가되어 실제로 실생활에서 이용되고 있으며 유방암과 자궁암에 효과가 있는 taxol과 유사한 활성을 나타내는 eleutherobin이 분리되어 주목을 받고 있다 (12).

또한 다양한 신경전달물질 역시 다양한 수중 생물에서 정제되었다. 신경전달물질은 oxytocin/vasopressin family, Growth hormone-releasing factor (GRF) superfamily, tachykinin superfamily, neuropeptide Y (NPY) superfamily, Cionin 등 다섯 종류로 나뉜다 (13, 14). oxytocin과 vasopressin은 10개의 아미노산으로 구성되어 있으며 그 서열이 80% 일치한다. oxytocin은 생식작용과 섭식작용을 조절하는 물질이며, vasopressin은 물의 흡수를 조절하며 antidiuretic 작용을 한다. oxytocin/vasopressin family에 속하는 물질이 거머리(leech) (16), 군소(sea hare) (17), 멍게(sea squirt) (18), 공장어(hagfish)

(19), 가오리(ray) 등에서 정제된 바 있다. (14, 15) GRF superfamily에 속하는 물질은 PRP, PHM, VIP, PACAP-38, Glucagon 등을 들 수 있으며, 연어(salmon) (20, 21), 멍게(sea squirt) (22), 장어(European eel) (22), 무지개송어(rainbow trout) (23) 등에서 정제되었다. substance P (24), Tachykinins (25) family는 neurokinins, frog kinins, scyliorhinins 등이 속하며 말, 기니아픽, 어류 (26-29) 등 척추동물에서 주로 정제되었으며, 평활근(smooth muscle)의 수축 및 혈압강하 등의 작용을 갖는다. 혈관의 상태와 성적 행동을 조절하는 NPY family 역시 다양한 척추동물에서 정제된 바 있다 (30). Cionin은 무척추생물인 멍게(sea squirt)에서 정제되었다 (31).

항산화제는 식품첨가물로 이용되면서 식품산업에 있어서 중요한 위치를 차지하는 물질이었으나 free radical이 노화, 암, 돌연변이 유발 등을 일으키는 요인으로 지적되면서 현재는 노화억제와 질병치료제로써 주목을 받고 있다 (32,33). 산소를 사용하는 모든 생물은 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질 등으로 인해 공격성이 강한 radical 물질이 생기게 되며, radical를 제거하기 위한 항산화 물질들이 존재한다. 1969년 superoxide dismutase (SOD)를 발견한 것을 시작으로 tert-butylhydroxytoluene (BHT), tert-butylhydroxyanisol (BHA)등과 같은 합성 항산화제와 α -tocopherol, vitamin C, carotenoids, flavonoids 등과 같은 천연 항산화제를 사용하고 있다. 그러나 이들 항산화제는 독성이 강하고, 저활성 및 용도의 한계성으로 인해 사용에 제한을 받고 있다. 따라서 안전하면서 강한 항산화제를 천연물에서 탐색하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 항산화제를 찾기 위해서 주로 bacteria, algae, 수중생물 등을 대상으로 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 예를 들면, 방선균 대사산물로부터 benzastatins A~G (34)를 정제하였으며 담자균류로부터 polyozellin (35), agrocybenin (35) 등을 정제하였다. 수중 생활을 하는 해초, 무척추동물, 어류 (36-40) 등은 UV 파장에 의한 피해를 줄이기 위해서 유해한 파장 범위를 흡수하는 mycosporin-like amino acids(MAAs) (41)가 존재함이 밝혀졌다.

본 연구에서는 이처럼 다양한 생리활성 물질의 보고인 수중 생물에서 생리활성물질을 찾기 위해서 어류를 선택하여 항균, 항곰팡이, 근수축, 항산화 활성을 살펴보았다. 이미 이전의 연구에서 어류는 다양한 생리활성물질을 가지고 있음이 보고된 바 있다. 특히 어류는 수중 생물 중에서 비교적 진화적으로 고등

생물에 속하기 때문에 특정의 역할을 가진 장기가 잘 발달되어 있으므로 장기별로 다양한 생리활성물질이 정제된 점이 기타의 수중 생물체와 다른 점이다.

어류에서 정제된 항균 물질 중에서는 dog shark liver에서 squalamine (42), 넙치의 skin mucus에서 hipposin (43), red sea bream의 gill로부터 chrysophsin (44), 메기 skin으로부터 HLP(histone-like proteins) (45), hybrid striped bass로부터 piscidins (46)와 Moronecidin (47) 등이 있다. 최근 내성균의 발생 빈도가 급격히 증가하고 있기 때문에 새로운 항생제의 개발이 시급한데 어류뿐만 아니라 기타의 수중 생물에서 우수한 항균 능력을 가진 물질이 정제되어 많은 주목을 받고 있다. 어류에서 정제된 근수축 활성을 나타내는 생리활성 물질은 godfish의 brain에서 정제된 Carassin (48), rainbow trout에서 정제된 새로운 형태의 tachykinin family (49), cod에서 발견된 새로운 형태의 bradykinins (50) 등을 이야기 할 수 있다. 또한 스트레스나 중금속 오염 등이 발생하면 다양한 항산화제를 체내에서 합성을 하게 된다. 어류에서는 UV 파장을 흡수하는 mycosporine-like amino acid (MAAs) (41)라는 항산화제가 존재함이 밝혀졌다. 본 연구에서는 활발하게 연구되고 있는 어류를 사용하여 생리활성 물질의 탐색을 수행하였다. 예로부터 어류는 식용으로 많이 이용되고 있고, 요즘은 어류의 섭취가 건강에 좋다는 것이 많이 알려져 그 가치가 한 층 더 높아졌다. 이전의 연구를 살펴보면 어류의 skin, intestine, gill, liver 등 다양한 부위에서 생리활성 물질이 정제되었음을 알 수 있다. 이를 토대로 하여 본 연구에서는 어류의 장기별로 추출을 행하였으며, 추출물별로 항균, 항곰팡이, 근수축 및 항산화 효과를 살펴보았다. 어류의 장기들은 폐기되는 것이 대부분인데 이를 사용한 새로운 생리활성 물질이 정제되면 제2의 가치를 창조할 수 있다고 하겠다.

재 료 및 방 법

1. 재 료

1. 1. 어류

실험에 사용한 8종의 어류는 남천동 해변시장에서 살아있는 상태로 구입하였다. 담수어는 역돔(*Sarotherodon niloticus*), 가물치(*Channa arus*), 향어(*Cyprinus carpio*), 메기(*Silurus osotus*)이며 해수어는 두툽상어(*Scyliorhinus torazame*), 꼬리치(*Atelepus japonicus*), 송어(*Mugil cephalus*), 쥐치(*Thamnaconus modestus*)이다. (Table 1)

1. 2. 일반시약

사용한 마취제는 Methanesulfonate salt (3-aminobenzoic acid ethyl ester, MS-222)이며 Sigma (Lot. 27H3742)사에서 구입하였다. 항균활성에 사용한 배지는 Tryptic Soy Broth (TSB)는 sigma(Lot. 111K0006)사에서 구입하였다. 그밖에 radial diffusion assay 시에 사용한 시약은 Yeast Extract (Sigma, Lot. 81K0354), Tryptone (Pancreatic digest of casein, Sigma, Lot. 12K0165), Agarose (Low EEO, Sigma, Lot. 31K00091), Streptomycin sulfate (Gibco BRL, Lot. 11860-038)를 사용하였다. *C. albicans*는 Potato Dextros Borth (PDB)는 Gibco (Lot. 128322)사에서 구입하여 사용하였다.

1. 3. Bacteria 및 Fungi

항균활성에 사용한 두 가지 bacteria는 *Eschrichia coli* D31과 *Bacillus subtilis* PM125 이다. *E. coli* D31은 미국의 NCSU에서 분양 받아 사용하였고, *B. subtilis* PM125는 부경대학교 수산생명의학과 정현도 교수님 방에서 분양 받아 사용하였다.

Table 1. Korean, English and Species name of fish

Korean	English	Species name
역돔(틸라피아)	tilapia	Sarotherodon niloticus
가물치	northern snake head	Channa arus
항어(이스라엘 잉어)	mirror carp	Cyprinus carpio
메기	catfish	Silurus osotus
두툽상어	tiger shark	Scylliorhinus torazame
꼬리치	tadpolefish	Atelepus japonicus
숭어	grey mullet	Mugil cephalus
쥐치	black scraper	Thamnaconus modestus

2. 실험 방법

2. 1. 추 출

살아있는 어류를 MS-222 (Methanesulfonate salt)로 마취하여 장기 및 피부를 분리하였다. 체액을 제거하기 위해서 증류수를 사용하여 조직을 세척하였다. 분리한 장기를 1 % acetic acid와 1 : 4 (v/v)로 혼합한 후 조직을 작은 크기로 잘라서 hot plate에서 끓였다. 추출한 용액을 실온에서 식힌 후 블랜더로 균질화 하여 10 °C에서 45분간, 15,000 ×g로 원심분리 하였다. 상층액은 모아두고, 가라앉은 조직 부분을 다시 1 % acetic acid와 섞어 균질화 및 원심분리를 거치는 과정을 2번 반복 실시하였다.

2. 2. 항균 및 항곰팡이 활성 측정

본 연구에서 항균활성을 측정하기 위해서 Radial Diffusion assay (46)를 수행하였으며, 항균활성을 측정하기 위해서 gram-negative bacteria인 *E. coli* D31과 gram-positive bacteria인 *B. subtilis* PM125를 사용하였다.

Bacteria를 Tryptic soy agar plate (TSA)에 도말하여 37 °C에서 16시간 동안 배양한 후 하나의 colony를 따서 4 ml의 Tryptic soy broth (TSB)에 접종하고 다시 37 °C에서 6시간 동안 mid-logarithmic phase까지 전배양 하였다. 배양한 bacteria는 2000 × g, 10분간 원심분리 하고 media를 제거한 후 4 ml의 100 mM phosphate buffer (PBS, pH 7.0)를 넣어 준 후 bacteria을 용액과 잘 섞어준다. 이를 다시 2000 × g에서 원심분리를 하여 씻어준다. 이 과정을 3번 반복하여 실시한다. washing한 균은 100 mM PBS를 사용하여 570 nm에서 optical density (OD)가 0.1이 되도록 희석시켜 준비한다.

Agar plates의 조성은 다음과 같다: 20.7 ml 5 × LB broth, 20.7 ml 100 mM PBS (pH 6.7), 58.6 ml deionized water, 1.57 g low EEO agarose, 0.5 g NaCl. autoclave하여 준비한 배지를 50 °C가 되도록 식힌 후 앞에서 준비한 bacteria를 넣고 잘 섞어 준다. *E. coli* D31을 사용한 agar plates 조제 시 10 mg의 Streptomycin을 1 ml의 100 mM PBS에 녹인 후 희석하여 준비한 bacteria와 함께 배지에 섞어 준다. plate에 10 ml의 배지를 부은 후 배지가 굳고 배지 표면의 습기가 제거 될 때까지 기다린다.

항균 활성을 관찰하기 위해서 준비된 배지에 2~3 mm 정도가 되는 well을 vacuum을 사용하여 만들어 준 후 well에 시료를 주입한다. 이때 활성을 볼 시료는 수분을 완전히 제거한 후 0.01 % acetic acid에 녹여 사용한다. 시료가 배지로 완전히 스며들면 37 °C에서 16시간 동안 배양하고, well 주위에 생긴 clear zone의 크기로 활성의 정도를 확인한다.

항곰팡이 활성에 사용한 곰팡이는 *Candida albicans* (*C. albicans*)이다. Potato Dextros Agar plates (PDA)에서 자라고 있는 *C. albicans*를 Potato Dextros Broth (PDB)에 접종시킨 후 30 °C에서 48시간 동안 배양한다. 배양된 곰팡이를 일정 취하여 1×10^6 CFU/ml이 되도록 hemocytometer를 사용하여 희석시켜 준비하였다.

96 well plate에 100 μ l의 균을 넣고 수분을 완전히 제거하고 100 μ l 0.01 % acetic acid에 녹여 준비한 시료를 곰팡이가 있는 well마다 주입한다. 이때 시료와 곰팡이를 잘 섞어준다. 620 nm에서 OD 값을 측정하고 30 °C에서 24시간 동안 배양한 후 OD값을 측정하였다.

2. 3. 근수축 활성

근수축 활성은 해수어인 먹장어 (*Eptatretus burgeri*)와 담수어인 메기 (*Silurus osotus*)의 장관을 사용하였다.

2. 3. 1. 장관의 준비

먹장어 (*Eptatretus burgeri*)와 메기 (*Silurus osotus*)의 절개하고 먹장어는 hindgut을 길이가 3~4 cm가 되도록 적출하고, 메기는 gastrointestinal tract를 적출한다. 적출한 장관은 곧바로 buffer에 담근다. 이때 먹장어에 사용한 buffer의 조성은 다음과 같다: NaCl 445 mM, KCl 10 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 55 mM, Glucose 10 mM. 메기 장관에 사용한 buffer의 조성은 아래와 같다. NaCl 100.8 mM, KCl 2.5 mM, CaCl_2 2.5 mM, KH_2PO_4 1.1 mM, MgSO_4 1.2 mM, NaHCO_3 25.0 mM, Glucose 11.1 mM. 적출한 장관은 buffer에 담근 상태에서 장관에 있는 모세혈관 및 adipose tissue 등을 제거하고 면실로 1 cm 정도가 되도록 장관의 아래와 위를 묶었다.

2. 3. 2. 활성의 측정

준비된 장관의 아래쪽은 organ bath 내의 지지대에 고정시키고 위쪽은 isometric transducer에 연결하여 1.0 g의 장력을 주었다. 준비한 장관은 organ bath에서 15분 간격으로 buffer를 교체하여 주었으며 공기를 계속해서 주입해 주었다. 안정화가 된 후 carbacol (5×10^{-7} M)을 투여하여 활성화 시켰다. 본 연구에서 사용한 총 8종 어류의 장기별 추출물은 buffer에 녹인 후 organ bath에 투여하여 활성을 확인하였다.

2. 4. 항산화 활성

DPPH를 사용하여 Radical Scavenging Effect (RSE)를 조사하였다. 각 추출물은 수분을 완전히 제거하여 4 ml methanol에 용해시켰다. DPPH는 methanol에 녹여 1.5×10^{-4} M이 되도록 준비하였다. 1 ml DPPH solution과 4ml 추출물을 UV cuvette에서 혼합하였다. 혼합한 후 즉시 520 nm에서 O.D. 값을 측정하였고 실온에서 30분간 방치한 후 O.D. 값을 다시 측정하였다. control으로 1 ml DPPH solution에 4 ml methanol을 혼합한 것을 사용하였다. RSE의 수치화는 다음 식을 참고로 하였다.

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

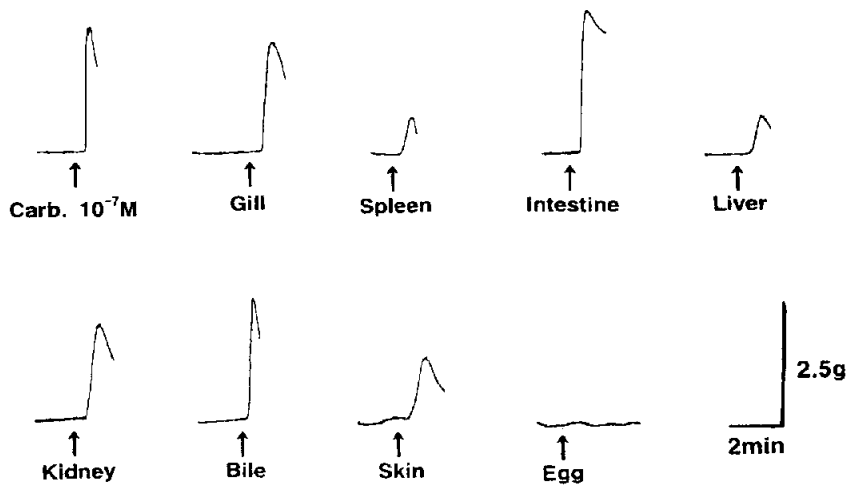


Fig. 1. The responses of internal organs extracts of tadpolefish (*A. japonicus*) on hagfish (*Eptatretus burgeri*) intestine. An aliquot was 1/50 of total extract volume. The arrow is represented that extract applied to the intestine in the organ bath.

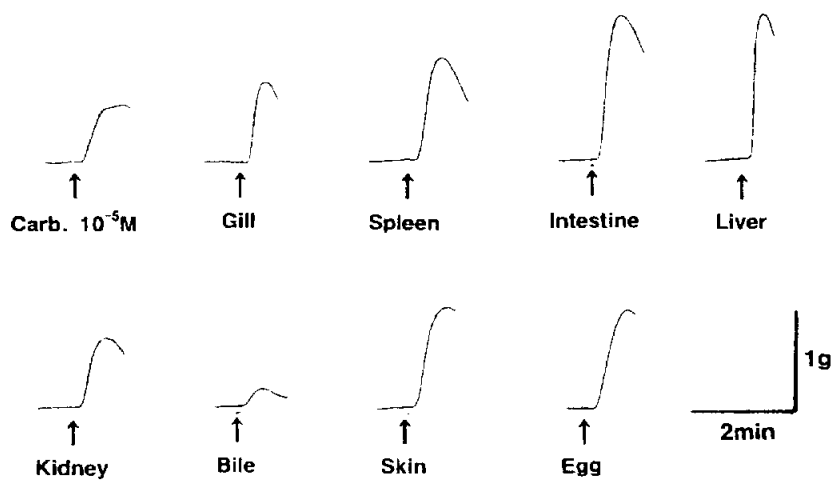


Fig. 2. The responses of internal organs extracts of mirror carp (*C. carpio*) on catfish (*Silurus asotus*) intestine. An aliquot was 1/50 total extract volume. The arrow is represented that extract applied to the intestine in the organ bath.

결 과 및 고 찰

1. 추 출

본 연구에서 4종의 담수어와 4종의 해수어를 살아있는 상태로 구입한 후 MS-222 (Methanesulfonate salt)로 마취하여 skin, gill, intestine, liver, kidney, egg, bile 및 spleen을 적출 하였다. 각각의 장기들은 적출한 즉시 물은 채액 및 이물질을 제거하기 위해서 1차 증류수로 씻은 후 곧바로 각각 다른 비커에서 1 % acetic acid 첨가 후 hot plate에서 끓이면서 추출하였다. 부위별 추출물을 사용하여 항균, 항곰팡이, 근수축 및 항산화 활성을 측정하였다.

2. 항균 및 항곰팡이 활성

1 % acetic acid로 추출한 8종의 어류 장기별 추출물을 이용하여 항균활성능력을 알아보았다. 사용한 균주는 Gram-negative bacteria인 *E. coli* D31과 Gram-positive bacteria인 *B. subtilis* PM125이다. 항균 활성 결과를 Table 2와 3에 나타내었다.

Table 2는 *E. coli* D31에 대한 항균활성 결과를 나타낸다. 담수어 중에서 향어의 spleen 추출물과 kidney 추출물에서 항균활성이 관찰되었으며, kidney 추출물이 spleen 보다는 더 강한 항균효과를 나타내었다. 또한 송어의 spleen 추출물과 bile 추출물 역시 *E. coli* D31에 대해서 항균효과를 나타내었다. 특히 송어 bile 추출물에서는 12mm의 강한 항균 효과를 관찰하였다. 기타의 어류 추출물에서는 *E. coli* D31에 대한 항균효과를 나타내지 않았다.

Table 3에 *B. subtilis* PM125에 대한 항균활성 결과를 나타내었다. 담수어 중에서는 틸라피아의 gill 추출물, 가물치의 gill 추출물 및 spleen 추출물, 향어의 spleen 추출물과 bile 추출물, 메기의 egg 추출물이 *B. subtilis* PM125에 대해서 항균 효과를 나타내었다. 또한 해수어는 송어의 bile 추출물과 쥐치의 kidney 추출물에서 항균효과가 관찰되었다. 활성이 관찰된 추출물 중에서 향어와 송어의 bile 추출물은 10mm 이상의 강력한 항균효과를 나타내었다.

본 연구에서는 어종별로 차이가 있지만 gill, spleen, kidney 및 bile에서 항균활성이 skin 및 egg 추출물에서 항곰팡이 활성이 관찰되었다. gill과 skin은

Table 2. Antimicrobial activity of various fish extract against *E. coli* D31

Fish	Gill	Spleen	Intestine	Liver	Kidney	Bile	Skin	Egg
역돔 (<i>S. niloticus</i>)	-*	-	-	-	-	-	-	-
가물치 (<i>C. argus</i>)	-	-	-	N.T.**	N.T.	-	N.T.	N.T.
항어 (<i>C. acropio</i>)	-	+	-	-	++	-	-	-
메기 (<i>S. osotus</i>)	-	-	-	-	N.T.	-	-	-
두릅상어 (<i>S. torazame</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-
고리치 (<i>A. japonicus</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-
송어 (<i>M. cephalus</i>)	-	+	-	-	-	+++	-	-
쥐치 (<i>T. modestus</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-

* : - : no activity, + : < 5mm, +++ : > 10mm

** : N.T. = Not Test

Table 3. Aatimicrobial activity of various fish against *B. subtilis* PM125

Fish	Gill	Spleen	Intestine	Liver	Kidney	Bile	Skin	Egg
역돔 (<i>S. niloticus</i>)	++*	-	-	-	-	-	-	-
가물치 (<i>C. argus</i>)	+	+	-	N.T.**	N.T.	-	N.T.	N.T.
항어 (<i>C. acipio</i>)	-	++	-	-	-	+++	-	-
메기 (<i>S. osotus</i>)	-	-	-	-	N.T.	-	-	++
두툽상어 (<i>S. torazame</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-
꼬리치 (<i>A. japonicus</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-
숭어 (<i>M. cephalus</i>)	-	-	-	-	-	+++	-	-
쥐치 (<i>T. modestus</i>)	-	-	-	-	++	-	-	-

* : - : no activity, + : < 5mm, +++ : > 10mm

** : N.T. = Not Test

직접적으로 물과 접해있기 때문에 수많은 균에 감염될 가능성이 많다 (53). 특히 gill은 호흡을 담당하는 중요한 기관으로 혈액이 gill을 순환하기 때문에 gill을 통한 감염이 있을 경우 혈액을 따라 균이 어류의 내부 장기에 감염될 가능성이 크다. 또한 skin은 어류의 가장 외부에 있어 물과의 접촉이 가장 많으며 항상 상처에 의한 균 감염의 위험이 있다. 본 연구에서 skin 추출물에서는 항균 효과를 관찰할 수 없었지만, 담수어인 메기, 향어 및 송어의 skin 추출물과 해수어인 개상어와 꼬리치의 skin 추출물에서 항곰팡이 활성을 관찰 할 수 있었다. (data not shown) 그러므로 균에 의한 감염 가능성이 높은 gill과 skin에 항균성을 가진 물질이 존재함으로써 감염을 막는 것으로 생각된다 (54, 55). 이미 이전의 연구에서 물과 접촉이 많은 skin과 gill에 항균성 물질이 있다는 사실이 밝혀진바 있다. 그 예로는 Moronecidin (47), histone-like antimicrobial protein (45), Chrysopsin 1,2,3 (44), Pleurocidin (52) 등을 들 수 있다.

앞서 이야기했듯이 본 실험에서는 가물치, 송어 및 향어의 spleen 추출물이 항균성을 가짐을 알 수 있었으며, 쥐치의 kidney 추출물에서도 항균효과를 관찰 할 수 있었다. 또한 본 연구에서는 각 어류의 spleen 추출물에서 항곰팡이 활성이 관찰되었다. 이전의 연구에서 어류의 spleen과 kidney는 면역에 관여하는 기관으로서 lysozyme, antimicrobial protein과 같은 항균성 물질이 생성한다는 것이 알려져 있다. kidney는 모든 혈액이 걸러지는 장소이므로 혈액을 통한 감염을 줄이기 위해서 항균성 물질을 가지는 것으로 사료된다.

본 연구에서는 향어와 송어의 bile 추출물에서는 다른 조직 추출물보다 훨씬 강력한 항균활성을 관찰 할 수 있었다. 이전의 연구를 통해 bile에 detergent-like salts가 존재함이 알려져 있다. 이것은 균의 막에 detergent와 유사한 작용을 하여 균을 용해시킨다 (56-58). 본 연구에서 송어와 향어의 bile 추출물에서 강한 항균작용이 관찰되었는데 이는 salts의 작용으로 때문에 나타났을 가능성도 배제할 수 없다.

3. 근수축 활성

본 연구에서 사용한 어류는 담수어와 해수어 각각 4종이므로 근수축 활성에는 담수어인 메기 (*Silurus osotus*)와 해수어인 먹장어 (*Eptatretus burgeri*)를 사용하였다. 근수축에 사용한 장관은 메기와 먹장어가 살아있는 상태에서 적출

한 것을 이용하였으며 특성에 맞는 buffer를 사용하였다. 농도는 추출원액 총 부피의 1/50을 사용하였다. carbachol에 대한 장관의 반응을 100 %로 하고, 추출물에 대한 장관의 반응 정도는 carbachol 반응의 크기와 비교하여 나타내었다. 근수축 활성의 결과를 Table 4와 5에 나타내었다.

각각의 추출물은 먹장어와 메기 장관에 대해서 0~300 %의 다양한 크기의 반응을 나타내었다. 특히 각 어류의 intestine 추출물이 먹장어와 메기의 장관에 대해 공통적으로 carbachol 보다 강한 100~156 %에 달하는 근수축 효과를 가짐을 관찰 할 수 있었다. intestine은 강한 근수축 물질을 함유하고 있으며, 본 연구에서 사용한 8종의 어류가 새로운 근수축 물질을 찾기 위한 대상으로 이용될 수 있음을 보여준다. 이전의 연구 결과에 의하면, 어류의 근수축 물질의 경우 brain 및 intestine에서 정제된 것이 많다. 이것은 근수축 물질이 주로 신경계에서 생성되지만 섭식, 생식작용 및 근육의 운동 등에 관여하기 때문에 brain이나 intestine에 많은 농도로 존재하기 때문이다.

본 연구에서는 어류마다 차이는 보이지만 intestine을 제외한 장기에 근수축에 관여하는 물질이 존재함을 알 수 있었다. 특히 intestine 추출물보다는 약하지만 킬라피아, 가물치, 황어 및 두툽상어의 gill 추출물은 먹장어 및 메기 장관에 대해 77 % ~ 95 %에 이르는 비교적 강한 근수축 효과를 관찰 할 수 있었다. 뿐만 아니라, 가물치와 두툽상어의 spleen 추출물은 메기 장관에는 약한 근수축 효과를 보였으나, 먹장어 장관에 대해서 각각 118.1 %와 77.2 %에 달하는 근수축 효과를 보였다. 이는 gill과 spleen에는 이제까지 밝혀진 brain과 intestine에 존재하는 근수축 물질과는 다른 종류의 근수축 물질이 존재할 수 있다는 가능성을 제시해 준다. 뿐만 아니라 킬라피아와 쥐치의 liver 추출물은 먹장어 장관에 대해 각각 81.8 %, 71.9 %에 이르는 근수축 효과를 관찰할 수 있었다. 그러나 bile은 먹장어와 메기 장관 모두에 대해 황어, 꼬리치를 제외하고는 근수축 효과를 나타내지 않았다.

Table 4. Contractile activity on the hagfish (*Eptatretus burgeri*) intestine

Fish	Gill	Spleen	Intestine	Liver	Kidney	Bile	Skin	Egg
역돔 (<i>S. niloticus</i>)	81.8	0	100*	81.8	72.7	0		81.8
가물치 (<i>C. argus</i>)	95.8	118.1	45.8	N.T.	N.T.	0	N.T.	N.T.
황어 (<i>C. carpio</i>)	83.3	16.7	104.2	45.8	79.2	50	50	0
메기 (<i>S. osotus</i>)	150	120.4	182.1	118	151.2	N.T.	120	317.3
두툽상어 (<i>S. torazame</i>)	77.3	77.2	154.5	118.1	N.T.	63.7	27.3	0
꼬리치 (<i>A. japonicus</i>)	115	135	110	280	115	60	145	200
숭어 (<i>M. cephalus</i>)	106.6	40	156.7	50	43.3	0	66.7	100
쥐치 (<i>T. modestus</i>)	37.6	56.3	100	71.9	18.8	0	37.5	87.5

Table 5. Contractile activity on the catfish (*Silurus osotus*) intestine

Fish	Gill	Spleen	Intestine	Liver	Kidney	Bile	Skin	Egg
역돔 (<i>S. niloticus</i>)	0*	0	70	0	50	0	0	0
가물치 (<i>C. argus</i>)	80	42	96	N.T.	N.T.	0	N.T.	N.T.
항어 (<i>C. carpio</i>)	90	50	90	56.7	70	30	36	0
메기 (<i>S. osotus</i>)	220	145.8	270.8	170.8	250	N.T.	200	308.3
두툽상어 (<i>S. torazame</i>)	43.3	40	153.3	76.7	N.T.	0	200	35
꼬리치 (<i>A. japonicus</i>)	168.2	154.6	100	113.6	159	50	145.4	200
송어 (<i>M. cephalus</i>)	45.8	41.7	95.8	0	0	0	41.7	N.T.
취치 (<i>T. modestus</i>)	41.7	58.3	62.5	40	62.5	0	125	66.7

4. 항산화 활성

항산화제에 대한 연구는 주로 식물을 중심으로 많이 이루어지고 있다. 수중 생물의 경우 미역, 김과 같은 해조류를 중심으로 있으며, 이는 이들 해조류가 광합성을 하면서 UV에 의한 피해를 입게 되고 이 피해를 줄이기 위해서 다양한 항산화 물질을 생산하고 있기 때문이다. 본 연구에서는 수중 척추동물인 어류를 이용하여 좀 더 효과적인 항산화제를 찾기 위해서 어류의 조직별 추출물로 항산화 효과를 살펴보았으며, Fig 4-7에 결과를 나타내었다.

담수어의 경우 향어의 gill 및 kidney 추출물은 80 %이상의 강한 항산화 효과를 나타내었다. 또한 틸라피아의 gill, liver 및 egg 추출물에서는 각각 64%, 72.1 %, 81.48 %의 항산화 효과를 관찰할 수 있었다. 기타의 담수어 추출물은 50% 이하의 낮은 항산화 효과를 나타내었다.

해수어의 경우 두툽상어와 꼬리치의 gill, intestine, liver 및 skin 추출물이 각각 80 % 이상의 비교적 강한 항산화 효과를 나타내었다. 그밖에 송어의 liver와 skin 추출물이 각각 72.6 %, 75.9%의 항산화 효과를 나타내었다. 이외의 다른 해수어의 경우 50 % 이하의 낮은 항산화 효과를 나타내었다.

결과적으로 어류마다 차이는 있지만 본 연구에서 사용한 어류에서는 gill, liver, skin, egg 추출물에서 80 %에 달하는 radical 소거능을 가짐을 관찰하였다. 특히 틸라피아를 제외한 나머지 담수어의 liver 추출물은 50 %이하의 낮은 항산화 효과를 보였으나 해수어의 liver 추출물에서 70 % 이상의 강한 항산화 효과를 관찰할 수 있었는데 이는 본 연구에서 사용한 해수어의 liver에서 강한 항산화 효과를 가지는 물질이 존재할 가능성을 시사해준다. 이전의 연구에서 어류의 liver는 중금속, free radical 등에 의한 공격을 받을 시에 다양한 항산화제를 생산하는 장기로 알려져 있다. skin과 egg 추출물은 어종별로 항산화 크기에서 많은 차이를 보였으나, 해수어의 skin 추출물이 담수어보다는 강한 75 % ~ 79 %에 이르는 항산화 효과를 보였다. egg의 경우 어류마다 산란 시기가 달라 egg를 채취할 수 없었던 어류가 있었기 때문에 틸라피아, 향어, 두툽상어, 꼬리치 및 쥐치의 egg 추출물에 대해서만 항산화 효과를 볼 수 있었다. 이는 항산화 물질을 정제하기 위한 주요한 대상이 되었던 해조류뿐만 아니라 어류의 skin과 egg 역시 항산화제 개발을 위한 대상이 될 수 있음을 시사해준다.

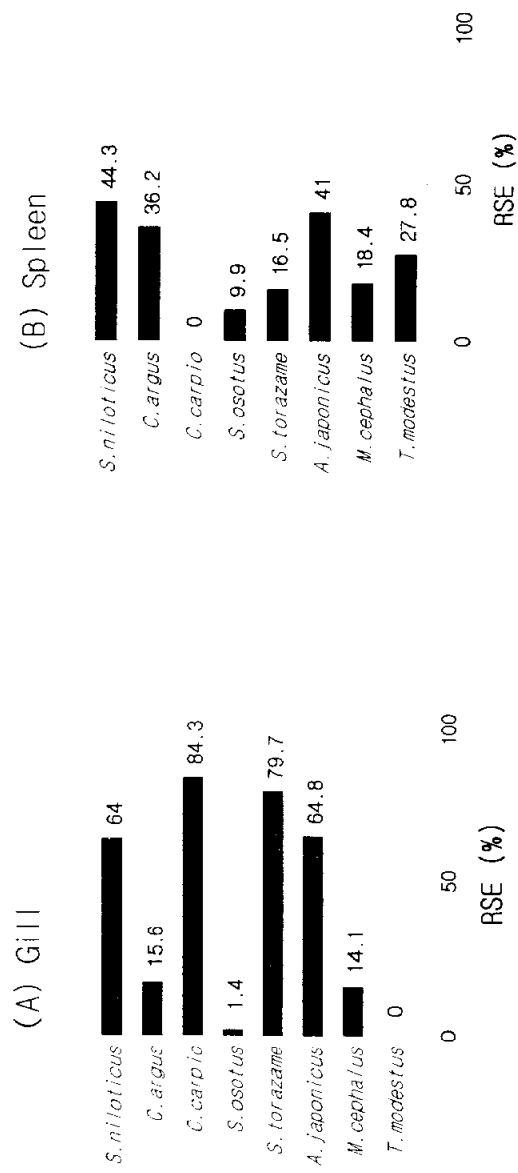


Fig. 4. Radical Scavenging Effect (RSE) using DPPH. (A) Gill extracts (B) Spleen extracts

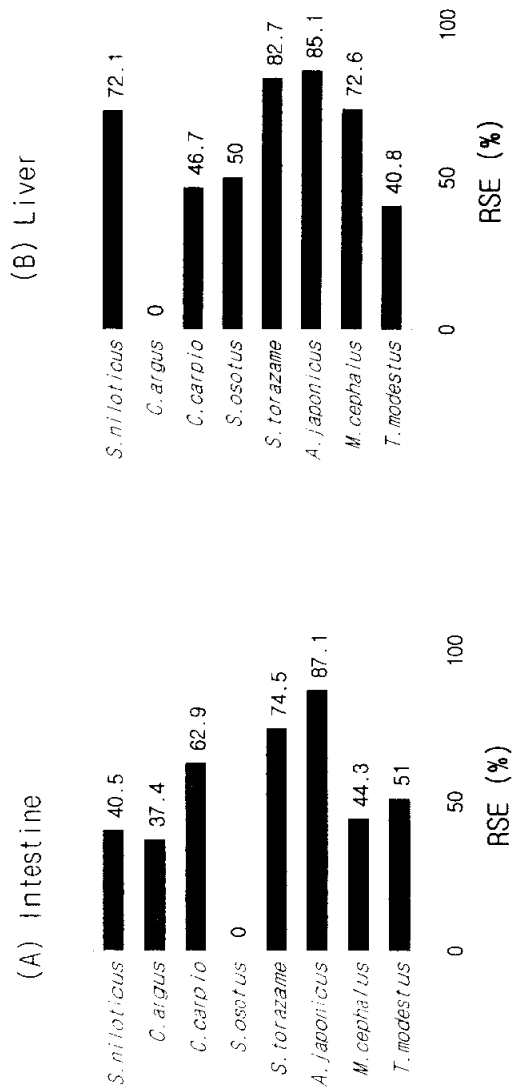


Fig. 5. Radical Scavenging Effect (RSE) using DPPH. (A) Intestine extracts (B) Liver extracts

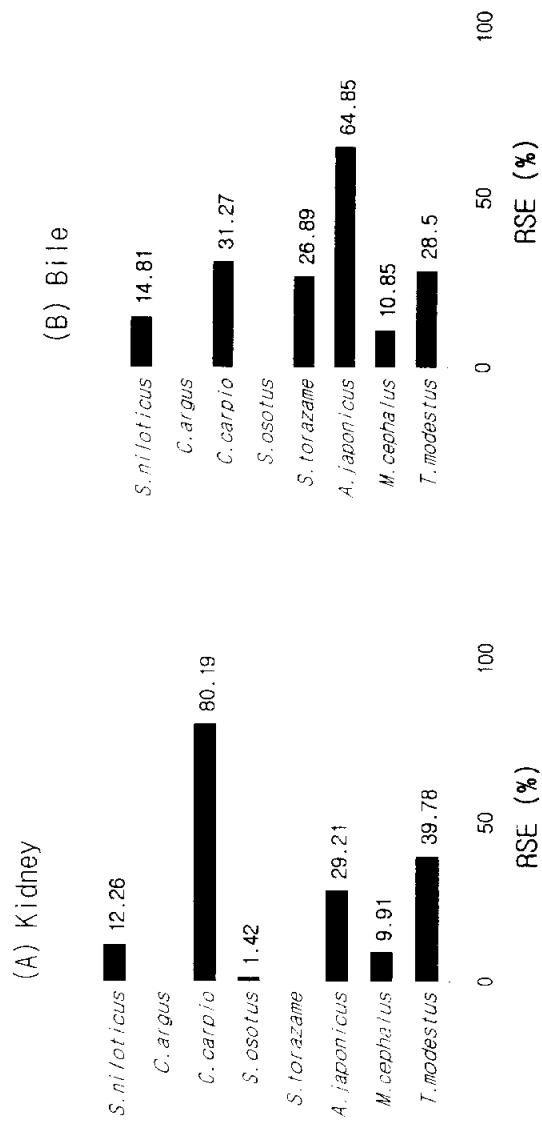


Fig. 6. Radical Scavenging Effect (RSE) using DPPH. (A) Kidney extracts (B) Bile extracts

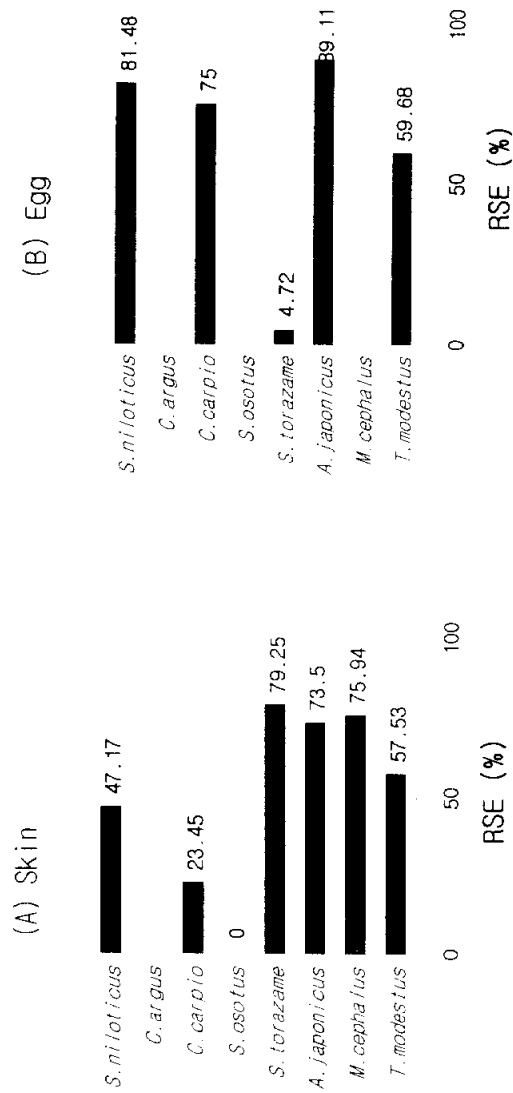


Fig. 7. Radical Scavenging Effect (RSE) using DPPH. (A) Skin extracts (B) Egg extracts

국 문 초 록

본 연구에서는 수중 생물 중에서 척추동물인 어류의 장기별 추출물을 이용하여 항균, 항곰팡이, 근수축, 항산화 활성을 조사하였다.

E. coli D31과 *B. subtilis* PM125를 사용한 항균 실험에서는 향어의 spleen, kidney 추출물과 송어의 spleen, bile 추출물이 *E. coli* D31의 성장을 억제하는 작용을 나타내었으며, 틸라피아, 가물치의 gill 추출물 및 향어, 가물치의 spleen 추출물, 메기의 egg 추출물 등이 *B. subtilis* PM125에 대해 항균활성을 나타내었다. 그리고 향어와 송어를 제외한 어류의 spleen 추출물은 항곰팡이 활성 역시 관찰되었다. 항균 및 항곰팡이 활성을 나타내는 장기는 어류별로 차이가 있으나 주로 gill, skin, spleen, bile 등임을 알 수 있었다. 어류의 경우 항상 물로 접하는 환경에서 서식하므로 물 속에 존재하는 균에 감염될 가능성이 아주 크다. gill과 skin은 어류에서 가장 외부 환경과 접촉이 잦은 부위로서 감염의 위험에 노출되어 있으므로 다양한 항균 및 항곰팡이 물질이 존재하여 감염을 막는 것으로 생각된다. spleen은 면역 관련 장기이므로 항균, 항곰팡이 활성을 나타내는 것으로 사료된다.

hagfish, catfish intestine을 사용한 근수축 실험에서는 30~300 %의 다양한 활성을 보였으나 각 어류의 intestine 추출물이 특히 강력한 근수축 작용을 나타내었다. 어류의 brain, spinal cord, intestine에서 다양한 근수축 물질이 보고된 바 있다. 근수축 물질은 주로 섭식, 생식작용, 수분 유지 작용 등에 영향을 주는 물질로서 brain 및 intestine에서 효과를 나타낸다. 그러므로 본 연구에서 사용한 어류의 intestine 추출물이 가장 뛰어난 근수축 활성을 나타낸 것으로 생각된다.

마지막으로 DPPH를 사용한 항산화 효과는 gill, intestine, liver, skin, egg 추출물이 강한 효과를 나타내었다. 어류에서는 MAAs (mycosporin-like amino acids)라는 항산화 물질이 보고된 바 있다. 특히 liver 조직은 환경 오염 및 생리적 작용으로 인해서 생긴 유해물질(free radical, 중금속)이 체내에서 작용하지 못하도록 여러 가지 항산화물질을 만들어 내는 곳으로 알려져 있다. 본 연구에서는 여러 장기 중에서 liver 추출물에서 강한 항산화 효과를 관찰 할 수 있다. 본 연구를 통해 어류는 장기별로 다양한 생리활성물질을 가짐을 알 수 있으며, 새로운 생리활성 물질이 정제되면 제2의 가치를 창조할 수 있다.

참 고 문 헌

1. Donia, M. and Hamann, M. T. (2003) Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infect Dis.*, **3**, 338-348.
2. Haefner, B. (2003) Drugs from the deep : marine natural products as drug candidates. *DDT*, **12**, 536-544.
3. Kowalski, R. J., Giannakakou, P., Gunasekera, S. P., Longley, R. E., Day, B. W. and Hamel, E. (1997) The Microtubule-Stabilizing Agent Discodermolide Competitively Inhibits the Binding of Paclitaxel (Taxol) to Tubulin Polymers, Enhances Tubulin Nucleation Reactions More Potently than Paclitaxel, and Inhibits the Growth of Paclitaxel-Resistant Cells. *Mol. Pharmacol.*, **52**, 613-622.
4. Mooberry, S. L., Tien, G., Hernandez, A. H., Plubrukarn, A. and Davidson, B. S. (1999) Laulimalide and Isolaulimalide. New Paclitaxel-Like Microtubule-Stabilizing Agents. *Cancer Res.*, **59**, 653-660.
5. Kobayshi, E. (1995) KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol. Res.*, **7**, 529-534.
6. Burgoyne, D. (1992) Contignasterol, a highly oxygenated steroid with the unnatural 14.beta. configuration from the marine sponge *Petrosia contignata* Thiele, 1899. *J. Org. Chem.*, **57**, 525-528.
7. Potts, B. C. (1992) Phospholipase A2 inhibitors from marine organisms. *J. Nat. Prod.*, **55**, 1701-1717.
8. Clamp, A. and Jayson, G. C. (2002) The clinical development of the bryostatins. *Anticancer Drugs*, **13**, 673-683.
9. Poncet, J. (1999) The dolastatins, a family of promising antineoplastic agents. *Curr. Pharm. Des.*, **5**, 139-162.
10. Rinehart, K. L. (2000) Antitumor compounds from tunicates. *Med. Res. Rev.*, **20**, 1-27.
11. Anthoney, D. A. and Twelves, C. J. (2001) DNA: still target worth

- aiming at: A Review of new DNA-interactive agents. *Am. J. Pharm.*, **1**, 67-81.
12. Spinney, L. (2003) Fishing for novel drugs. *DDT.*, **8**, 770-771.
 13. Holye, C. H. V. (1998) Neuropeptide families : evolutionary perspectives. *Reg. peptides*, **73**, 1-33.
 14. Holmgren, S. and Jensen, J. (2001) Evolution of vertebrate neuropeptides. *Brain Res. Bulletin*, **55**, 723-735.
 15. Lenneth, L. and Rinehart, Jr. (1983) Biologically active compounds from marine source. *Marine Chem.*, **12**, 229-239.
 16. Salzet, M., Bulet, P., Van Dorsselaer, A. and Malecha, J. (1993) Isolation, structural characterization and biological function of lysine-conopressin in the central nervous system of the pharyngodellid leech *Erpobdella otoculata*. *Eur. J. Biochem.*, **217**, 879-903.
 17. McMasters, D., Kobayashi, Y. and Lederis, K. (1992) A vasotocin-like peptide in *Aplysia kurodai* ganglia : HPLC and RIA evidence for its identity with Lys-conopressin-G. *Peptides*, **13**, 413-422.
 18. Iwakiri, M., Sugiyama, A., Ikeda, T., Muneoka, Y. and Kubota, I. (1990) A novel oxytocin-like peptide isolated from the neural complexes of tunicate, *Styela plicata*. *Zool. Sci.*, **7**, 1035-1041.
 19. Chauvet, J., Rouille, Y., Chauveau, c., Chauvet, M. T. and Acher, R. (1994) Special asvatocin and phasvatocin, two new oxytocin-like peptides in the spotted dogfish (*Scyliorhinus caniculus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 11266-11270.
 20. Parker, D. B., Coe, I. R. and Dixon, G. H. (1993) Two salmon neuropeptides encoded by one brain cDNA are structurally related to members of the glucagon superfamily. *Eur. J. Biochem.*, **215**, 439-448.
 21. Parker, D. B., Power, M. E., Swanson, P., Rivier, J. and Sherwood, N. M. (1997) Exon skipping in the gene encoding pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in salmon alters the expression of its

- hormones that stimulate growth hormone release. *Endocrinology*, **138**, 414–423.
22. McRory, J. and Sherwood, N. M. (1997) Two protochordate genes encode pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and related family members. *Endocrinology*, **138**, 2380–2390.
 23. Irwin, D. M. and Wong, J. (1995) Trout and chicken proglucagon : alternative splicing generates mRNA transcripts encoding glucagon-like peptide 2. *Mol. Endocrinol.*, **9**, 267–277.
 24. Snijdelaar, D. G., Dirksen, R., Slappendel, R. and Crul, B. J. (2000) Substance P. *Eur. J. Pain*, **4**, 121–135.
 25. Sin, S. Y. and Munecata, A. (1992) Tackyykinin peptide *Sengwhahak nyusu*. **12**, 242–249.
 26. Jensen, J. and Colon, J. M. (1992) Substance-P-related and neurokinin-A related peptides from the brain of the cod and trout. *Eur. J. Biochem.*, **206**, 659–664.
 27. Waugh, D., Groff, K. E., Platzack, B., Youson, J. H., Olson, K. R. and Conlon, J. M. (1995) Isolation, localization and cardiovascular activity of tachykinin from the stomach of the bowfin *Amia calva*. *Am. J. Physiol.*, **269**, R565–571.
 28. Waugh, D., Wang, Y., Hazon, N., Balment, R. J. and Conlon, J. M. (1993) Primary structures an biological activities of substance-P-related peptides form the brain of the dogfish, *Slichinus canicula*. *Eur. J. Biochem.*, **214**, 469–474.
 29. Waugh, D., Bondareva, V., Rusakov, Y., Bjenning, C., Nielsen, P. F. and Conlon, J. M. (1995) Tachykinins with unusual structural features form a urodele, the amphiuma, an elasmobranch, the hammergea shark, and an agnathan, the river lamprey. *Peptides*, **16**, 615–621.
 30. Thorsell, A. and Heilig, M. (2002) Diverse functions of neuropeptide Y revealed using genetically modified animals. *Neuropeptides*, **36**, 182–193.

31. Johnsen, A. H. and Rehfeld, J. F. (1990) Cionin : a disulfotyrosyl hybrid of cholecystokinin and gastrin from the neural ganglion of the protochordate *Ciona intestinalis*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 3054–3058.
32. Rice-Evans, C. A. and Miller, N. J. (1996) Antioxidant activities of flavonoids as bioactive compounds of food. *Biochem. Societ Transactions*, **24**, 790–795.
33. Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7915–7922.
34. Kim, W. G., Kim, J. P., Koshino, H., Shin-Ya, K., Seto, H. and Yoo, I. D. (1997) Benzastatin E, F. and G : new indoline alkaloids with neuronal cell protectin activity from *Streptomyces nitrosporesus*. *Tetrahedron*, **53**, 4309–4316.
35. Koshino, H., Lee, I. K., Kim, J. P., Kim, W. G., Uzawa, J. and Yoo, I. D. (1996) Agrocycvennie, novel class alkaloid from the Korean mushroom. *Phytochemistry*, **41**, 213–216.
36. Park, J. H., Kang, K. C., Baek, S. B., Lee, Y. H. and Rhee, K. S. (1991) Separation of antioxidant compounds from edible marine algae. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**, 256–261.
37. Hoshino, C., Tagawa, Y., Wada, S., Oh, J. H., Park, D. K., Nagao, A. and Terao, J. (1997) Antioxidant activity of quercetin against metmyoglobin-induced Oxidation of fish oil–bile salt emulsion. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1634–1640.
38. Paula, A. L., Pinheiro, T., Santos, M. C., Mathias, M. L., Pereira, M. J. and Crespo, A. M. (2001) Response of antioxidant enzymes in reshwater fish population (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. *Sci. otal Environment*, **280**, 153–163.
39. Kang, D. G., Yun, C. K. and Lee, H. S. (2003) Screening and omparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea. *J. Ethnopharm.*, **87**, 231–236.

40. Dunlap, W. C. and Yamamoto, Y. (1995) Small-molecule antioxidants in marine organisms : antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol.*, **112B**, 105–114.
41. Moore, K. S., Wehrli, S., Roder, H., Rogers, M., Forrest, J. N., McCrimmon, Jr. D. and Zasloff, M. (1993) Squelamine : An aminosterol antibiotic from the shark. *Proc. Natl. Acad. USA.*, **90**, 1354–1358.
42. Birkemo, G. A., Luders, T., Andersne, Q., Nes, I. F. and Nissen-Meyer, J. (2003) Hippusin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1646**, 207–215.
43. Iijima, N., Tanimoto, N., Emoto, Y., Morita, Y., Uematsu, K., Murakami, T. and Nakai, T. (2003) Purification and characterization of three isoforms of chrysopsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 675–686.
44. Rovinette, D., Wada, S., Arroll, T., Levy, M. G., Miller, W. L. and Noga, E. J. (1998) Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus* : characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 467–475.
45. Noga, E. J. (2001) Peptides antibiotics in mast cells of fish. *Nature*, **414**, 268–289.
46. Lauth, X., Shike, H., Burns, J. C., Westerman, M. E., Ostland, V. E., Carlberg, J. M., Olst, J. C. V., Niset, V., Taylor, S. W., Shimizu, C. and Bulet, P. (2002) Discovery and Characterization of Two Isoforms of Moronecidin, a Novel Antimicrobial Peptide from Hybrid Striped Bass. *J. Bio. Chem.*, **277**, 5030–5039.
47. Lin, X. W. and Richard, E. P. (1997) Goldfish γ -preprotachykinin mRNA encodes the neuropeptides substance P, Carassin and neurokinin A. *Peptides*, **18**, 817–824.

48. Kagstrom, J., Holmgren, S., Olson, K. R., Conlon, J. M. and Jenses, J. (1996) Vasoconstrictive effects of native tachykinins in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Peptides*, **17**, 39–45.
49. Shahbazi, F., Conlon, J. M., Holmgren, S. and Jensen, J. (2001) Effects of cod bradykinin and its analogs on vascular and intestinal smooth muscle of the Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Peptides*, **22**, 1023–1029.
50. Bondet, V., Williams, W. and Berset, C. (1997) Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **30**, 609–615.
51. Alexander, M. C., Peddrick, W. and Diamond, G. (1997) Isolation and characterization of Pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J. Biol. Chem.*, **272**, 12006–12013.
52. Schroder, J. M. (1999) Epithelial peptide antibiotics. *Biochem. Pharm.*, **57**, 121–134.
53. Devine, D. A. (2003) Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. *Mol. Immun.*, **40**, 431–443.
54. Norman, F. N., Stafford, J. L., Barreda, D., Ainsworth, A. J. and Belosevic, M. (2001) Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Develop. Comp. Immun.*, **25**, 807–825.
55. Jun, L., Huang, S. and Zhang, Q. (2002) Outer membrane proteins : key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes and Infection*, **4**, 325–331.
56. Gunn, J. S. (2000) Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and Infection*, **2**, 907–913.
57. Araki, Y. I., Lee, S. N., Sugihara, G., Furuichi, M., Yamashita, S. and Hoseto, F. (1996) New cationic surfactants derived from bile acids : synthesis and thermodynamic and biophysicochemical properties such as membrane perturbation and protein solubilizing abilities. *Col. and Sur.*, **8**, 81–92.

목 차

Part II : 별불가사리 (*Asterina pectinifera*)로부터의 항균활성 펩타이드의 정제

Abstract	1
서론	2
재료 및 방법	7
1. 재 료	7
1. 1. 실험동물	7
1. 2. 일반 시약	7
2. 실험방법	7
2. 1. 추출	7
2. 2. 항균 활성의 측정	9
2. 3. 정제	11
2. 4. 분자량 및 서열분석	20
결과 및 토의	20
1. 추출	20
2. 정제	21
3. 분자량 및 서열분석	22
국문초록	27
감사의 말씀	28
참고문헌	29

Purification of two antimicrobial peptide from the liver of starfish (*Asterina pectinifera*)

Yun Jung Bae

Department of Biotechnology and Bioengineering
Graduate School
Pukyong National University

Abstract

Many natural products isolated from marine organism have been known to exert inhibitory effects on a variety of microorganisms and thus may serve as models for the synthesis of new drugs. In this study, two antimicrobial peptides (peak A, peak B) were isolated from the liver of starfish, *Asterina pectinifera*. The liver of starfish was extracted by 5 % acetic acid. This peptides were purified by reversed-HPLC column(Vydac C₁₈, Hypersil C₁₈), ion exchange HPLC column(CM-5PW, DEAE-5PW). In final step using Hypersil C₁₈, we found two main peaks (peak A and peak B). Molecular weight of peak A and peak B were 2951.77 Da and 2980.15 Da. The primary structure of two antimicrobial peptide were 28 amino acid residues by automated amino acid sequencing.

Key words : starfish, antimicrobial peptide, Liver

서 론

최근 들어 내성균이 세계적으로 주목을 받고 있다. 항생제의 경우 세균 내에 항생제가 역할을 발휘할 수 있는 적절한 표적이 있어야 하며, 적절한 농도의 항생제가 표적이 되는 부위로 침투해야 그 역할을 발휘할 수 있다. 내성균의 경우 주로 3가지 경로에 의해 내성을 가지게 된다. 첫째, 세포 내로 항생제가 침투 혹은 축적을 방해하는 경우이고 둘째, 항생제가 작용을 일으키는 특정의 표적에 변형을 일으키는 경우이며 셋째, 항생제가 항균 능력을 일으킬 수 없게 항생제의 불활성화를 유도하는 등의 기전을 통하여 특정 항생제에 내성을 가지게 된다. 내성균이 문제화되는 이유는 특정한 하나의 균에만 그 내성이 멈추는 것이 아니라 내성에 대한 정보를 다른 균에 전달하게 되어 급속히 내성균이 확산된다. 뿐만 아니라 한 종류의 균이 여러 가지 항생제에 내성을 가짐으로 인해서 어떤 항생제에도 영향을 받지 않는 'superbacteria'가 등장하는 등의 문제를 일으키고 있다. 오래 전부터 내성균에 대한 여러 가지 대체 항생제를 개발하기 위해서 노력을 하고 있다. 그러나 항생제의 개발속도보다 내성균이 생성되는 시간이 더 빨라 새로 개발된 항생제의 생명력이 짧다 (1, 2). 결국 기존의 항생제와는 다른 기전으로 작용하는 새로운 형태의 항균물질이 필요하다. 최근 들어 기존의 항생제를 대신할 제2세대의 항균물질로 주목을 받고 있는 것이 항균활성 펩타이드이다 (3, 4, 24).

항균활성 펩타이드가 기존의 항생제를 대체할 새로운 항균물질로써 관심을 끌고 있는 이유를 크게 두 가지로 정리할 수 있다. 첫째, 기존의 항생제와는 다른 작용기전을 이야기 할 수 있다. 항균활성 펩타이드의 작용 기전은 carpet-like mechanism과 barrel-stave mechanism으로 나뉜다. carpet-like mechanism은 항균활성 펩타이드가 cell membrane의 phospholipid를 둘러싸서 막으로부터 phospholipid를 떼어내고 떨어진 phospholipid의 수가 많아지면 결국 membrane을 파괴되어 cell을 분해시키는 작용을 하는 방식이다. barrel-stave mechanism은 항균활성 펩타이드가 membrane에 침투하여 channel을 형성하고 channel을 통하여 cell 외부의 물질을 내부로 uptake 시켜 항균 능력을 발휘한다. 두 가지 mechanism의 주요한 항균 기작은 조금 다르지만 항균활성 물질이 cell membrane에 접근하고 cell membrane에 binding하는

기작은 공통적이다. 항균활성 펩타이드의 경우 양이온을 가지는 아미노산을 포함하고 있어서 음이온을 가진 phospholipid의 head group과 ion interaction으로 결합한다. 일반적인 항생제는 cell membrane의 특정 단백질을 이용하거나, membrane에 존재하는 channel을 통과해서 cell 내부로 침투하기 때문에 membrane 단백질의 변형이나, channel의 변형이 일어나면 침투력이 떨어지게 된다. 그러나 항균활성 펩타이드의 경우 단순히 membrane의 기본 구성성분이 phospholipid를 이용하기 때문에 내성의 발생적도가 훨씬 작아지게 된다 (3-6, 29).

둘째, 다양한 종류의 균과 곰팡이에 대해 항균능력을 가질 뿐만 아니라 항균 능력 이외에도 상처회복을 촉진시키거나, 항암작용, 기존의 항생제의 작용을 돕는 등의 다양한 능력을 가진 물질이라는 점이다. 개구리에서 정제된 Magainin은 항균활성 능력, 상처회복 촉진, 다른 항생제의 작용을 돕는 등의 능력을 가지는 물질이다 (30). Magainin이외에도 bovine에서 정제된 Indolicidin, pig에서 정제된 protegrin 등의 많은 항균활성 펩타이드가 항균능력 뿐만 아니라 다양한 능력을 가진다 (7, 8, 26).

항균활성 물질은 포유류, 곤충, 식물, 미생물, 어류, 갑각류, 파충류 등등 다양한 생물체에서 정제되었다 (9, 10). 이는 모든 생물에서 항균활성 펩타이드가 주요한 생체 방어 물질임을 알 수 있다. 최근에는 물에 쉽게 접하면서 생활하는 생물에 많은 관심이 집중되어 수중 생물로부터 많은 항균활성 펩타이드가 정제되었다 (27, 30). 물과 함께 생활하는 것은 언제나 물 속에 존재하는 많은 미생물과 곰팡이에 의해서 항상 감염의 위험을 가지면서 살아가는 일하므로 기타의 생물체보다는 훨씬 다양하고 항균능력이 좋은 항균활성 펩타이드가 존재할 가능성이 높다. 실제로 다양한 종류의 개구리, 어류, 갑각류에서 항균활성 펩타이드가 정제되었다. 개구리는 수중 생활과 육지 생활을 병행하기 때문에 오래 전부터 항균활성 펩타이드를 찾기 위한 대상이 되어왔다. 대표적인 예로는 Bombinins (11), Magainins (12, 13), Dermaseptins (14), Brevinins (15), Gaegurins (16) 등이 있다. 개구리에서 정제된 항균성 펩타이드는 대부분 skin에서 정제되었다 (36). 수중 생물의 대표적인 척추동물인 어류에서도 다양한 항균활성 펩타이드가 정제되었는데 어류의 경우는 skin (36), gill (37), liver (38) 등의 다양한 장기에서 여러 종류의 항균성 펩타이드가 발견되었다. 어류의 대

표적인 항균활성 펩타이드는 허가자미 (Moses sole fish)에서 Paradaxin (17), 미꾸라지 (Mudfish)에서 Misgurin (18), 넙치 (Flounder)에서 Pleurocidin (19), Hiposin (34), 메기 (catfish)에서 Parasin (20), 농어 (bass)의 Hepcidin, Moronecidin (21, 30) 등이 보고되었다. 그밖에도 갑각류에서는 게에서 Tachyplesin (22)과 Callinectin (23), 새우에서 Penaseidins (24)가 정제되었다. 또한 멍게(Tunicates)에서는 Styelin (25), Clavainin (26), Halocidin (32) 등의 항균활성 펩타이드가 정제되었다. 그밖에 연체동물 및 타모류 등을 사용한 항균활성물질의 정제가 이루어지고 있다 (32, 33).

본 연구에서는 이처럼 많은 종류의 항균활성 물질이 정제된 담수 및 해수에서 살아가는 생물 중에서 별불가사리 (*Asterina pectinifera*)를 선택하여 항균활성 물질을 정제하였다. 불가사리는 생명력이 우수하여 영양분이 부족해도 잘 죽지 않으며, 번식력이 강하며, 생체 재생 능력이 뛰어나다. 이러한 생명력으로 양식장을 중심으로 하여 급속하게 그 수가 늘어나고 있으며, 포식력이 강력하여 생태계 파괴의 주범으로 지적되고 있는 실정이다. 현재 불가사리에 대해 많은 연구가 진행 중에 있다. 별불가사리 (*Asterina pectinifera*)를 이용하여 phospholipase A₂ (27), 섭식 작용 시의 toxin (28)에 대한 연구가 이루어진 바 있다. 그러나 어류, 갑각류, tunicate 등의 다양한 해양생물에서 항균활성 펩타이드가 정제되었으나 별불가사리 (*Asterina pectinifera*)가 속하는 극피동물에서는 항균활성 펩타이드의 보고가 전무한 실정이다. 만약 불가사리에서 새로운 항균 활성 펩타이드가 정제되면 인간과 다른 생물체에 피해를 주고 있는 불가사리를 새로운 방법으로 이용할 수 있는 계기가 될 수 있을 것이라 사료되어 본 연구에서는 별불가사리 (*Asterina pectinifera*)를 이용한 항균활성 펩타이드의 정제를 수행하였다.

Table 1. Antimicrobial peptides isolated from diversity of organisms

peptide	Sequence	Source
Cecropin	RWKIFKKIEKMGRNIRDGIVKAPAEIVIGSAKI	Silk moth
Ceratotoxin A	SIGSALKKALPVAKKIGKIAASPIAKAALP	Mediterranean fruit fly
CRAMP	ISRLAGLLRKGGEGEKLKKIGQKIKNFFQKLVPQPE	Mouse
Lycotoxin	IWLTALKFLGKHAAKHLAKQQLSKL	Wolf spider
Melittin	GIGAVLKVLTGTPALISWIKRKRQQ	Honeybee
Abaecin	YVPLPNVPQPGRRPFPTFPGQGPFENPKIKWPQGY	Honeybee
Bactenecin 5	RFRPPIRRPPIRPPFYPPFRPPIRPPIFPPIRPPFRPPLRFP	Ox
Indolicidin	ILPWKWPWWPWR	Ox
PR-39	RRRPRPPYLPRRPPPPFPRLPPRIPPGFPPRFPFRFP	Pig
Tenecin	HHDGHLGGHQTGHGGGQGGHGGQGGHGGHGGHGG QPGDGHOGGGHGGGGTGGGQHGGHGGTGGHGGGQGYKTHGH	Yellow mealworm

Table 2. Antimicrobial peptides of Marine Organisms

Peptide	Sequence	Source
Pleurocidin	GWGSFFKKAHVGHVKGKAAALTHYL	Fish
Paradaxin	GFFALIPKIISSPLFKTLTLLSAVGSAALSSSGEQE	Fish
Parasin	KGRGKNGGKVRAKAKTRSS	Fish
Misgurin	RNRVKKLSKFSSKKGAAARRRK	Fish
Dicynthaurin	KLQKAVLDCLKAAGSSLSKAAITAIYNKIT	Tunicate
Clavinins	VFQFLGKIIHVGNFVHGFSHVF	Tunicate
Penaeidins	YRGGYTGIPIRPPPIGRPPLR	Shrimp
Tachyplesin	KWCFRVCYRGICYRRCR	Crab
Myticin	HSHACTSYWCGKFCGTASCTHYLCRBLHPGKMCACV	Mollusc

재 료 및 방 법

1. 재 료

1. 1. 실험 동 물

실험에 사용한 별불가사리 (*Asterina pectinifera*)는 포항 호미곶에서 채취하였다. 채취한 불가사리는 수조에서 살아있는 상태로 보관하면서 장, 간, 생식선, 촉수, 몸체, 근육으로 분리하였다. 적출한 조직은 1차 증류수로 씻어 체액 및 이물질을 제거한 후 즉시 액체질소로 급속 동결시켜 추출 직전까지 -70°C 에서 보관하였다. (Fig. 1)

1. 2. 일 반 시 약

항균활성에 사용한 *E. coli* D31과, *B. subtilis* PM125는 Tryptic Soy Broth (TSB)에서 전배양 하였는데 이때 사용한 TSB는 Sigma(Lot. 111K0006)사에서 구입하였다. 그밖에 radial diffusion assay 시에 사용한 시약은 Yeast Extract (Sigma, Lot. 81K0354), Tryptone (Pancreatic digest of casein, sigma, Lot. 12K0165), Agarose (Low EEO, Sigma, Lot. 31K00091), Streptomycin sulfate (Gibco BRL, Lot. 11860-038)을 사용하였다. 정제 과정에서 사용된 HPLC용 water와 acetonitrile은 Tedia (Lot. WS-2211, Lot. AS-1122)사의 제품을 구입하였다.

2. 실험 방 법

2. 1. 추 출

-70°C 에서 보관했던 분리한 별불가사리 (*Asterina pectinifera*)의 장기별 조직들은 고온의 상태인 일차증류수와 1 : 4 (v/v)가 되도록 섞은 후 20분 동안 끓였다. 실온에서 추출액을 식힌 후 blender로 조직을 파쇄 하였고, 전체 추출액이 5 % acetic acid가 되도록 초산 200 ml을 첨가한 후 homogenization하였다. 이후 추출물은 4°C 저온실에서 overnight 보관하였다.

overnight 추출액을 $6000 \times g$, 4°C , 30분간 원심분리 하였다. 원심분리 후

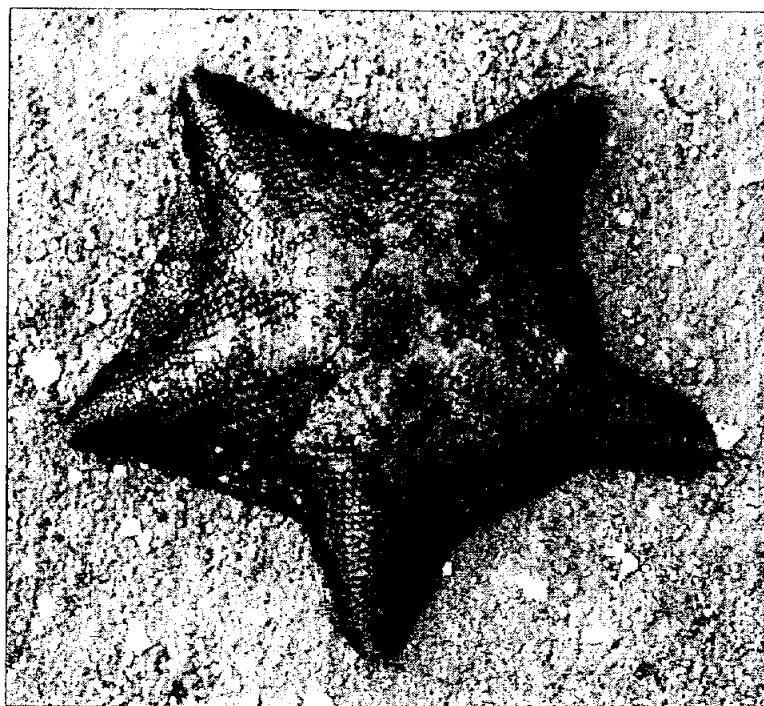


Fig. 1. Starfish (*Asterina pectinifera*). Starfish has very strong reproduction-power and whole body can grow up to new individuals. They gives serious damage to shellfish, ark, scallop, and shellfish farm.

상층액은 모아서 농축하였으며, pellet과 5% acetic acid를 1 : 4 (v/v)가 되도록 혼합한 후 homogenization 및 원심분리 (6000 × g, 4 °C, 30 분)하였으며, pellet를 재추출 하여 생긴 상층액은 농축하여 첫 번째 상층액과 합쳤다. pellet을 사용한 재추출 과정을 3번 반복하였다. 농축된 추출액과 ethanol의 비율이 1 : 3 (v/v)이 되도록 ethanol을 첨가한 후 4 °C 저온실에서 하룻밤 동안 보관하였다. 보관했던 추출액과 ethanol의 혼합액을 다시 원심분리 (6000 × g, 4 °C, 30 분)하여 상층액은 300 ml이 되도록 농축하였다. 농축된 sample에 1 N HCl을 10 ml 첨가한 후 4 °C 저온실에서 하룻밤 보관한 후 원심분리 (15000 × g, 4 °C, 50 분)하고 농축하였다.

Sep-pak C₁₈ cartridge (20 ml, Waters)에 sample을 loading하였다. sample이 흡착된 Sep-pak C₁₈ cartridge에 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) (D.W), 0.1 % TFA가 포함된 10% methanol (RM10), 0.1 % TFA가 포함된 60 % methanol (RM60), 0.1 % TFA가 포함된 100 % methanol (RM100)을 순차적으로 사용하여 sample을 용출시켰다. (Fig. 2)

2. 2. 항균활성의 측정

항균활성을 측정하기 위해서 gram-negative bacteria인 *E. coli* D31과 gram-positive bacteria인 *B. subtilis* PM125를 사용하였다.

bacteria를 Tryptic soy agar plate (TSA)에 도말하여 37 °C에서 16시간 동안 배양한 후 하나의 colony를 따서 4 ml의 Tryptic soy broth (TSB)에 37 °C에서 6시간 동안 mid-logarithmic phase까지 전배양 하였다. 배양한 bacteria는 2000 × g, 10분간 원심분리 하고 media를 제거한 후 4 ml의 100 mM phosphate buffer (PBS, pH 7.0)를 넣어 준 후 bacteria를 용액과 잘 섞어준다. 이를 다시 2000 × g에서 원심분리를 하여 씻어준다. 이 과정을 3번 반복하여 실시한다. washing한 균은 100 mM PBS를 사용하여 570 nm에서 optical density (OD)가 0.1이 되도록 희석시켜 준비한다.

Bacteria를 심을 agar plates의 조성은 다음과 같다. 20.7 ml 5 × LB broth, 20.7 ml 100 mM PBS (pH 6.7), 58.6 ml deionized water, 1.57 g low EEO agarose, 0.5 g NaCl. autoclave하여 준비한 배지를 50 °C가 되도록 식힌 후 앞에서 준비한 bacteria를 넣고 잘 섞어 준다. *E. coli* D31는 10 mg의

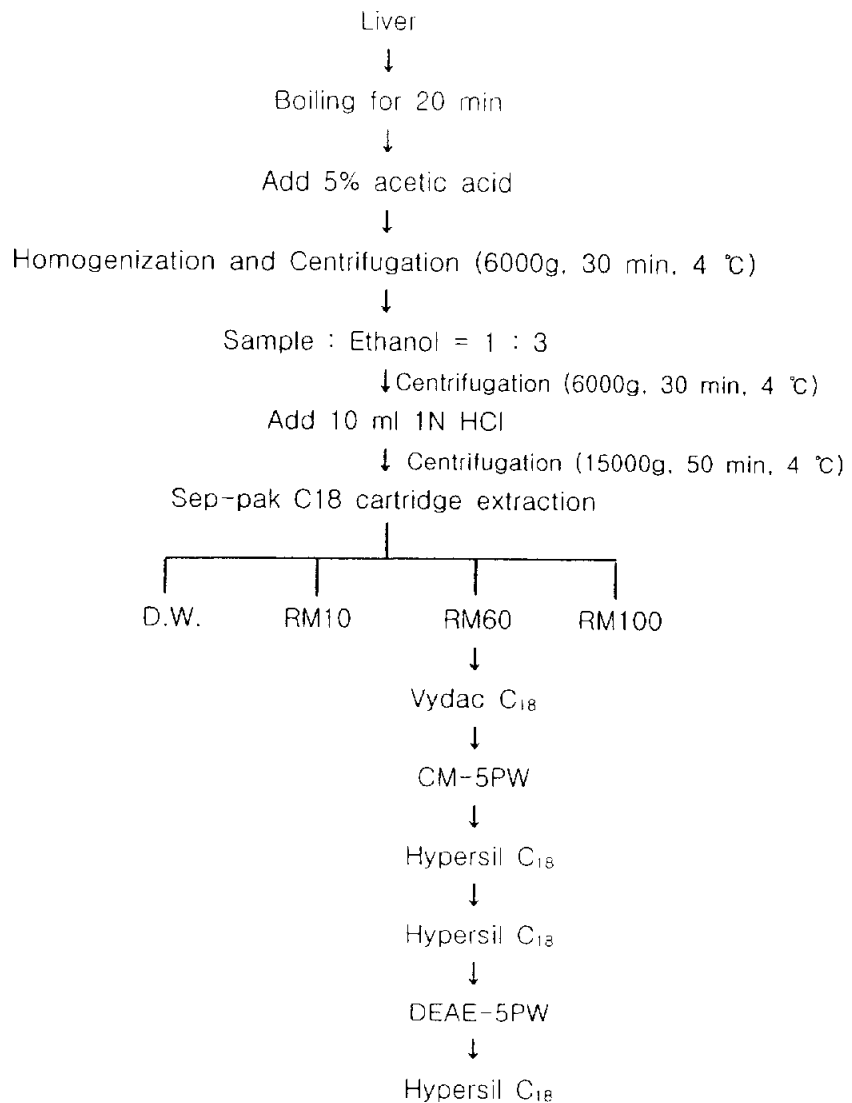


Fig. 2. Extraction and purification of antimicrobial peptide from the liver of starfish, *Asterina pectinifera*

Streptomycin을 1 ml의 100 mM PBS에 녹인 후 희석하여 준비한 bacteria와 함께 배지에 섞어 준다. petri dish에 10 ml의 배지를 부은 후 배지가 굳고 배지 표면의 습기가 제거 될 때까지 기다린다.

항균 활성을 관찰하기 위해서 준비된 배지에 2~3 mm 정도가 되는 well을 vacuum을 사용하여 만들어 준 후 well에 시료를 주입한다. 이때 활성을 볼 시료는 수분을 완전히 제거한 후 0.01 % acetic acid에 녹여 사용한다. 시료가 배지로 완전히 스며들면 37 °C에서 16시간 동안 배양하고, well 주위에 생긴 clear zone의 크기로 활성의 정도를 확인한다. (Fig. 3)

2. 3. 정 제

Sep-pak C₁₈ cartridge를 통해 용출된 RM600이 *E. coli* D31과 *B. subtilis* PM125에 대해 가장 강한 항균활성을 나타내었기 때문에 순수한 단일 물질을 얻기 위해서 4단계의 reversed-phase HPLC (RP-HPLC)과 2번의 ion exchange HPLC 분석을 수행하였다. 각각의 과정을 거친 sample 분획들은 *E. coli* D31을 사용하여 항균활성을 측정하였다. RP HPLC 분석에 사용한 용매는 A : 0.1 % TFA를 포함하는 수용액, B : 0.1 % TFA를 포함하는 100 % acetonitrile을 사용하였다. 정제 단계는 아래와 같다. (Fig. 2.)

첫단계로 RP-HPLC column인 semi-analysed column Vydac C₁₈ (7.5 × 250 mm) 으로 분석을 하였다. 0 - 60 %의 B 용매 linear gradient를 사용하였으며 flow rate은 2.0 ml/min으로 120분간 분석하였다. (Fig. 4)

두 번째 단계는 첫 단계에서 항균활성을 나타낸 분획 42-44을 모아 농축한 후 ion exchange column인 TSK-gel™ CM-5PW (Tosoh, 7.5 × 750 mm)로 분석하였다. 용매는 A : 20 mM ammonium acetate (pH 5.15) B : 1M ammonium acetate (pH 5.15)를 사용하였으며 0 - 100 %의 B 용매 linear gradient를 사용하여 100분간 분석하였다. (Fig. 5)

세 번째 단계는 RP-HPLC column인 Hypersil BDS C₁₈(Hewlett packard, 125 × 2 mm, 3μm)을 사용하였으며 20 - 50 % liner gradient를 60분간, 0.5 ml/min으로 분석하였다. (Fig. 6) 항균활성이 나온 분획을 네 번째 단계인 Hypersil BDS C₁₈ (Hewlett packard, 125 × 2 cm, 3μm)을 27 - 37 %, 40 분, 0.3 ml/min의 조건 하에서 분석하였다. (Fig. 7)

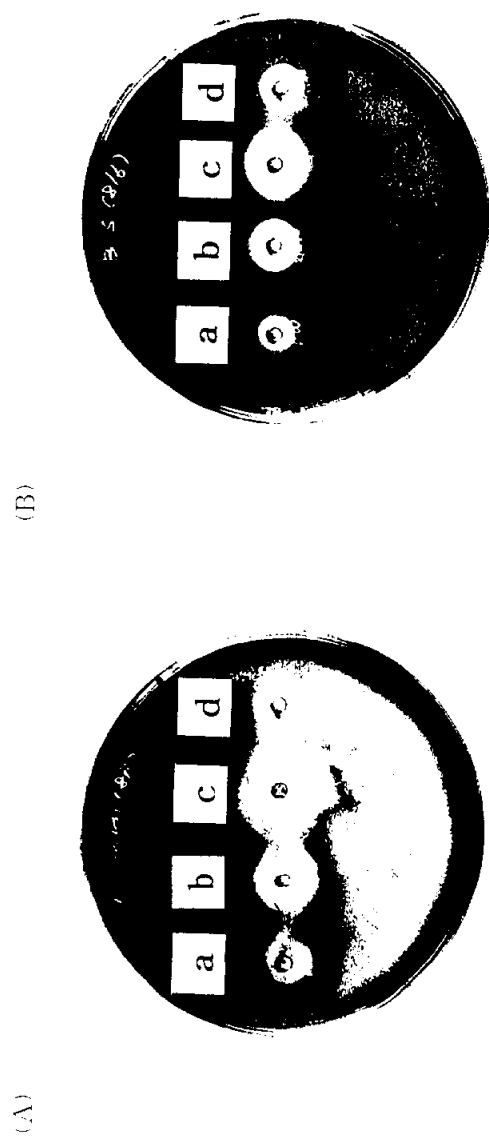


Fig. 3. Radial diffusion antimicrobial assay of solid phase extraction by Sep-pak C₁₈ cartridge against (A) *E. coli* D31 (B) *B. subtilis* PM125: a : D.W., b : RM10, c : RM60, d : RM100

다섯 번째 단계는 Ion exchange column인 TSK-gel DEAE-5PW (Tosoh, 7.5 × 150 mm)를 A : 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), B : 1 M NaCl in 10 mM Tris-HCl (pH 8.8)의 용매, 0 - 100 %, 100분, 0.5 ml/min 조건 하에서 분석하였다. (Fig. 8)

여섯 번째 단계는 Hypersil BDS C₁₈(Hewlett packard, 125 × 2 cm)을 28 - 38 %, 40분, 0.4 ml/min의 조건 하에서 분석하였다. (Fig. 9)

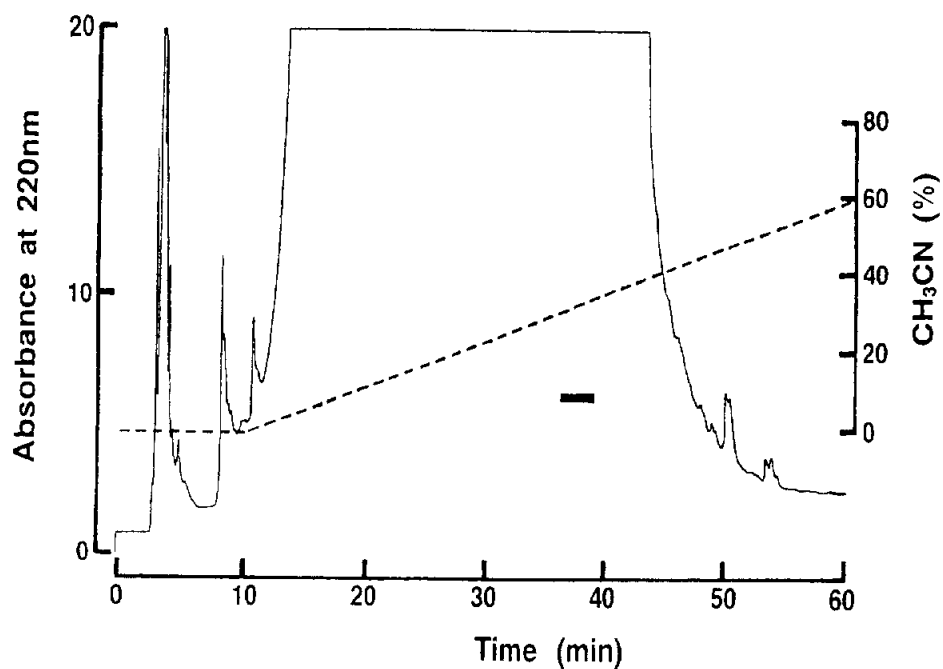


Fig. 4. The 1th step reversed-phase HPLC profile onto Vydac C₁₈ (7.5 × 250 mm) column. Dotted line is linear gradient of CH₃CN in 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) at a flow rate of 2 ml/min. The black bar showed antimicrobial activity about *E. coli* D31.

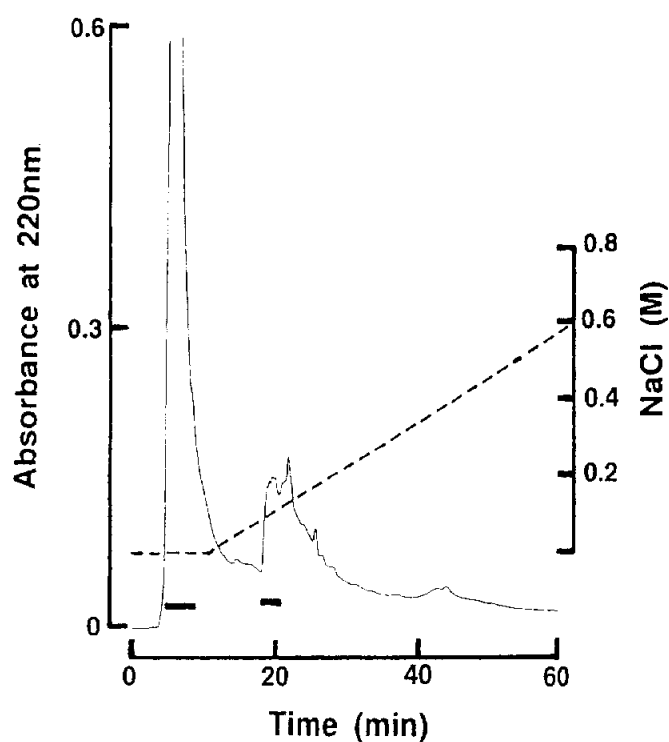


Fig. 5. The 2th step ion exchange HPLC profile onto TSK-gel™ CM-5PW (Tosoh, 7.5 × 7.5 mm) column. Dotted line is linear gradient of ammonium acetate (pH 5.15) at a flow rate of 0.5 ml/min. The black bar showed antimicrobial activity about *E. coli* D31.

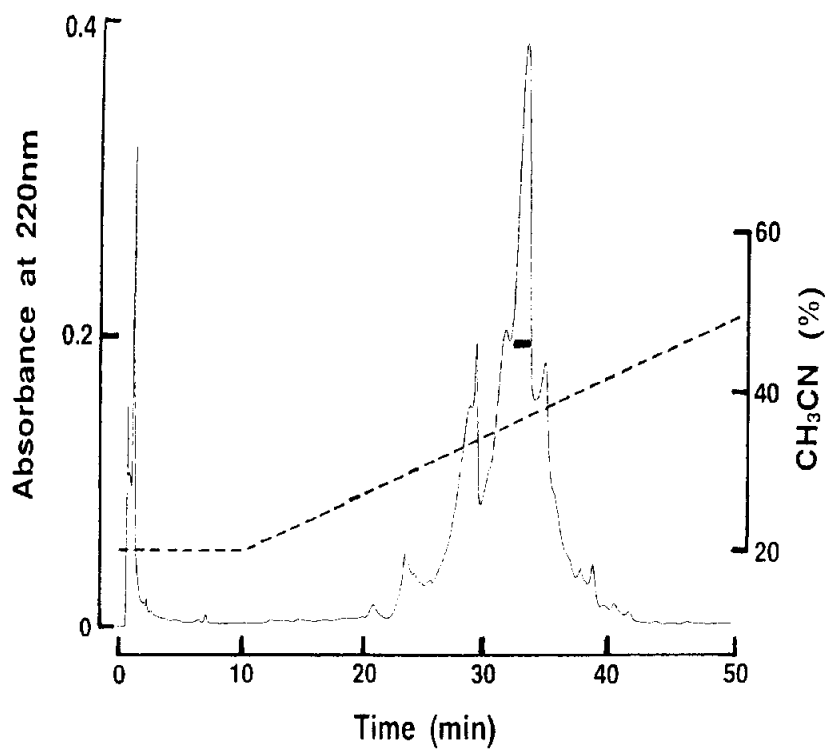


Fig. 6. The 3th step reversed-phase HPLC profile onto Hypersil C₁₈ (Hewlett packard, 125 × 2 mm, 5 μ m) column. Dotted line is linear gradient of CH₃CN in 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) at a flow rate of 0.5 ml/min. The black bar showed antimicrobial activity about *E. coli* D31.

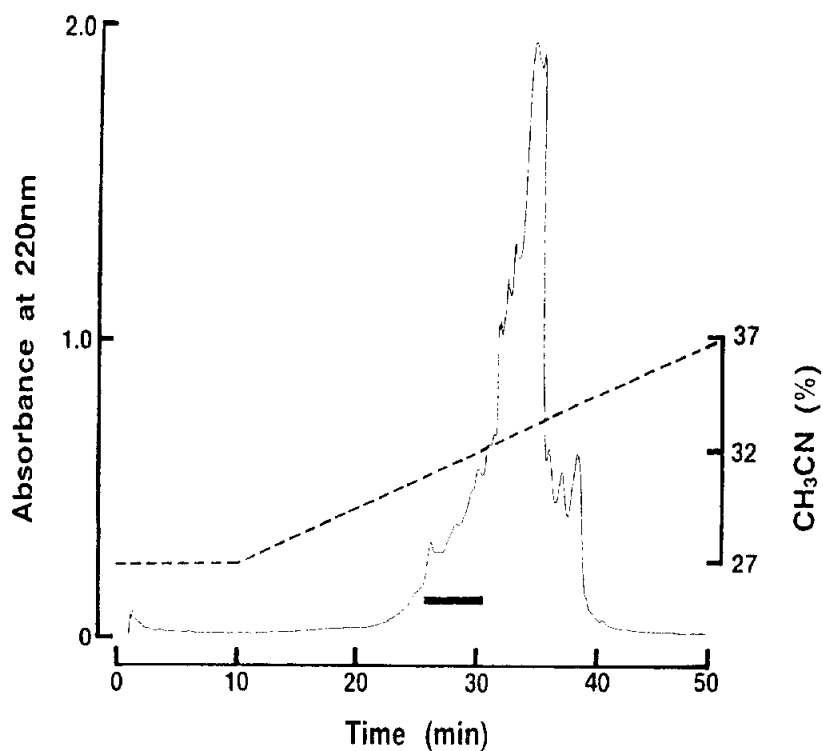


Fig. 7. The 4th step reversed-phase HPLC profile onto Hyersil C₁₈ (Hewlett packard, 125 × 2 mm, 5 μ m) column. Dotted line is linear gradient of CH₃CN in 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) at a flow rate of 0.3 ml/min. The black bar showed antimicrobial activity about *E. coli* D31.

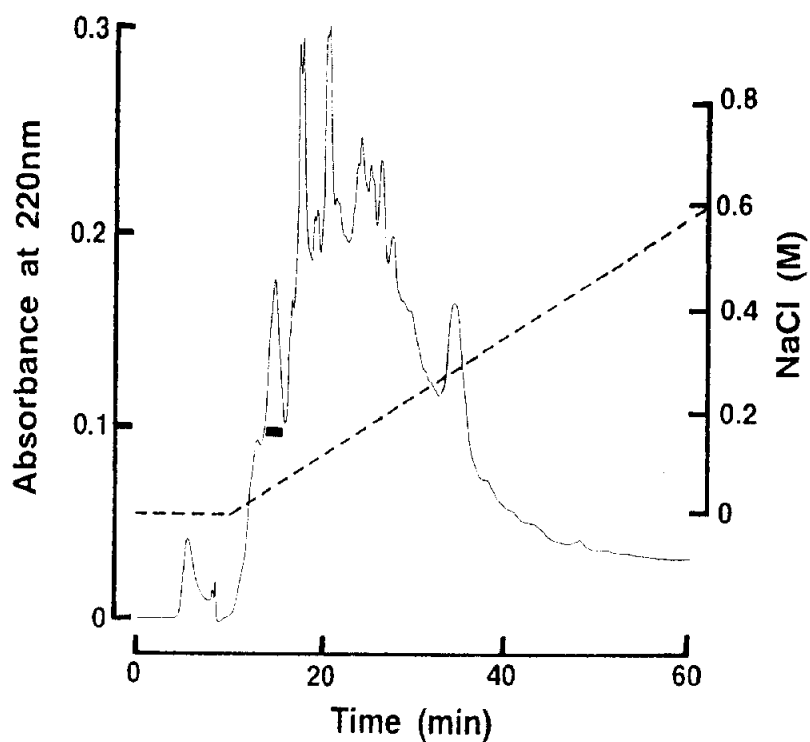


Fig. 8. The 5th step ion exchange HPLC profile onto TSK-gel DEAE-5PW (Tosoh, 7.5×150 mm) column. Dotted line is linear gradient of NaCl (M) in Tris-HCl (pH 8.8) at a flow rate of 0.5 ml/min. The black bar showed antimicrobial activity about *E. coli* D31.

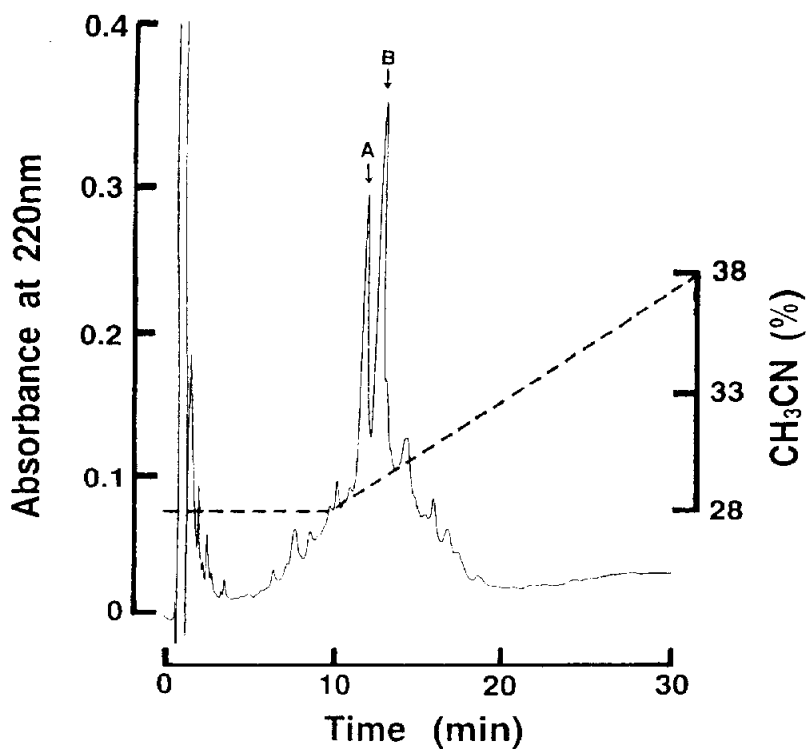


Fig. 9. The 6th step reversed-phase HPLC profile onto Hypersil C₁₈ (Hewlett packard, 125 × 2mm, 3 μm) column. Dotted line is linear gradient of CH₃CN in 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) at a flow rate of 0.4 ml/min. The black bar showed antimicrobial activity about *E. coli* D31.

2. 4. 분자량 및 서열 분석

최종 정제된 항균활성물질의 분자량을 측정하기 위해서 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Mass spectrometer (Vyoger-DETM STR spectrometer, perseptive Biosystem, USA)를 사용하였으며, Matrix는 α -cyano-4-hydroxycinamic acid를 사용하였다.

정제된 천연물의 아미노산 서열을 분석하기 위해서 Edman 분해법을 이용한 Shimadzu (PPSQ-21A, Japan)아미노산 분석기를 사용하였다.

결 과 및 토 의

1. 추 출

포항 호미곶에서 직접 채집해온 315마리의 별불가사리 (*Asterina pectinifera*)는 수조에 보관하면서 해부하여 장, 간, 생식선, 촉수, 몸체, 근육 등 총 6가지의 장기로 구분하여 적출하였다. (Fig. 1) 해부한 장기들은 적출 즉시 액체 질소를 사용하여 급속 냉동하여 사용 직전까지 -70 °C에 보관하여 장기들이 손상되는 것을 방지하였다. -70°C에 보관해두었던 별불가사리 315마리분의 간 조직을 끓고 있는 1차 증류수에 넣어 다시 20분간 끓인 후 blender로 조직을 파쇄하였다. 실온에서 방치하여 완전히 추출액이 식었을 때 추출액 전체가 5 % acetic acid가 되도록 acetic acid를 첨가하였으며, 최종 추출액을 4 °C 저온실에서 12시간 방치하였다.

원심분리 (6000 × g, 4 °C, 40분) 후 상층액은 농축하였으며 pellet은 5 % acetic acid를 첨가하여 재추출 하였다. 재추출은 3번 반복하여 실시하였다. 재추출 시에 나온 용액은 농축 후 처음의 상층액과 합쳤다. 그리고 거대 분자를 제거하기 위해서 ethanol 및 1N HCl를 사용하였다.

농축하여 준비한 sample을 Sep-pak C18 cartridge에 loading하여 0% (D.W.), 10% (RM10), 60% (RM60) 및 100 % (RM100) methanol을 각각 사용하여 sample을 용출 시켰다. 용출 시킨 sample은 각각 전체량의 1/100을 따서 건조시킨 후 0.01 % acetic acid 용액에 녹인 후 *E. coli* D31과 *B. subtilis* PM125에 대해 항균활성을 측정하였다. 각각의 sample은 *B. subtilis* PM125보다 *E. coli* D31에 대해서 강한 항균활성을 나타내었다. 특히 RM60에서 용출된

sample이 기타의 sample보다 큰 clear zone을 형성했다. 뿐만 아니라 DW, RM10, RM100은 clear zone 내부에 약하게 균이 다시 자라기 시작하였으나, RM60 용출액은 clear zone이 투명하였다. 그러므로 RM60에서 용출된 sample을 선택하여 정제 과정을 거치게 되었다. (Fig. 2)

2. 정 제

정제 과정은 4단계의 RP-HPLC 및 2단계의 Ion exchange HPLC 분석을 거쳤다. 첫 단계는 semi-analysed column인 Vydac C₁₈ (7.5 × 250 mm)에서 분석하였으며, 0 - 60 %의 B 용매 linear gradient를 사용하였으며 flow rate은 2.0 ml/min으로 120분간 분석하였다. (Fig. 4) 각각의 분획들은 *E. coli* D31으로 radial diffusion assay를 보았으며, 42-44 분획에 걸쳐서 항균활성을 나타내었다.

첫단계의 활성 분획은 cationic ion exchange column인 CM-5PW (TSK-gelTM, 7.5 × 7.5 mm)를 사용하여 분석하였다. (Fig. 5) 용매 조건은 A 용매가 20 mM ammonium acetate (pH 5.15), B 용매는 1M ammonium acetate (pH 5.15)를 사용하였으며 0 - 100 %의 B 용매 linear gradient를 사용하여 100분간 분석하였다. (Fig. 5) 분석 결과 3-4번 분획 및 9-10번 분획에서 항균활성을 나타내었으며, 이들 중 더 강력한 활성을 보인 3-4 분획을 분석용 Hypersil BDS C₁₈ column (분석 조건 : 20-50 %, 60분, 0.5 ml/min)에서 분석하였다. (Fig. 6) main peak에서 항균활성이 나타났으므로 이 peak에 해당하는 분획을 RP HPLC column인 Hypersil BDS C₁₈ (Hewlett packard, 125 × 2 mm, 5 μ m)을 사용하였으며 20 - 50 % liner gradient를 60분간, 0.5 ml/min으로 분석하였다. (Fig. 6) 항균활성이 나온 분획을 네 번째 단계인 Hypersil BDS C₁₈ (Hewlett packard, 125 × 2 cm, 3 μ m)에서 분석 조건은 40 분간 27-37% B용매 gradient, 0.3 ml/min에서 분석하였다. (Fig. 7) 활성 분획을 다시 음이온 column인 DEAE-5PW (TSK-gel, 싸래, 7.5 × 150mm)에서 분석하였다. (Fig. 8) 조건은 A 용매가 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), B 용매가 1M NaCl의 포함된 10 mM Tris-HCl (pH 8.8)이며, B 용매를 linear gradient로, 0.5 ml/min으로 분석하였다. 분석결과 9번 분획에서 항균활성이 관찰되었으며 이를 Hypersil C₁₈ (Hewlett packard, 125 × 2 cm, 3 μ m)에서 28 - 38

% B용매 linear gradient, 40분간, 0.4 ml/min에서 분석한 결과 최종적으로 2개의 main peak A와 peak B를 얻을 수 있었다. (Fig. 9)

3. 분자량 및 서열 분석

최종 정제 과정에서 분리된 두 개의 main peak의 분자량을 알아보기 위해 MALDI-TOF Mass spectrometer를 사용하였다. 분석 시 사용된 Matrix는 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid이다. 분석 결과 peak A는 분자량이 2951.77 Da 이고, peak B는 2980.15 Da로 분자량이 비슷한 물질로서 약 28개의 아미노산으로 이루어진 것을 알 수 있었다. (Fig. 10과 11)

peak A와 B의 아미노산 서열분석을 측정하기 위해서 Edman 분해법을 이용한 아미노산 서열 분석기 (Shimadzu PPSQ-21A)를 사용하였다. 이 두 물질의 아미노산 서열을 분석한 결과 그 양이 부족하여 일부분의 아미노산 잔기를 알 수 없었다. peak A는 6번, 19번, 22~28번 잔기, peak B는 15번, 26~28번 잔기가 어떤 아미노산인지 정확히 알 수 없었다. peak A와 B의 정확히 밝혀진 잔기의 아미노산 서열을 비교한 결과 그 서열이 유사함을 알 수 있었다. 그러나 12번, 13번, 21번 잔기가 peak A는 Glu, Ile, Thr이고 peak B는 Lys, Leu, Ala 이었다. 정확한 서열을 알기 위해서 cDNA work을 수행 중에 있으며, 서열이 정확히 밝혀지면 구조 분석, 막과의 상호 작용 및 여러 균주에 대한 활성의 정도를 알아볼 예정이다.

별불가사리가 속하는 극파동물에서는 항균활성 펩타이드의 보고가 전무하며, 생태계를 위협하는 불가사리를 새로운 방법으로 이용할 수 있는 계기가 될 수 있을 것이라 사료된다.

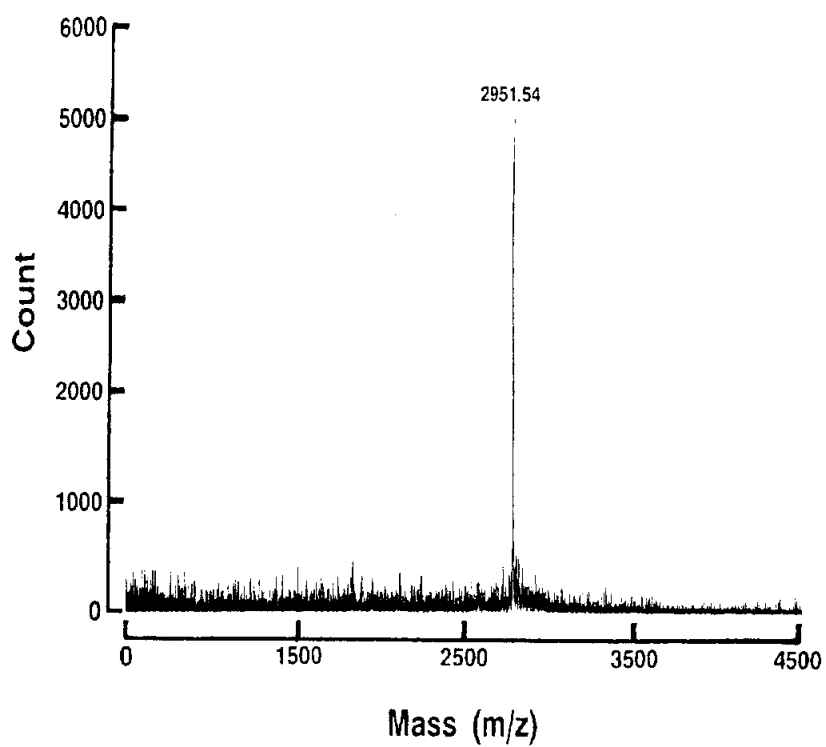


Fig. 10. Molecular weight of antimicrobial peptide A from liver of starfish by MALDI-TOF Mass spectra. (Vyoger-DETM STR spectrometer, perseptive Biosystem, USA)

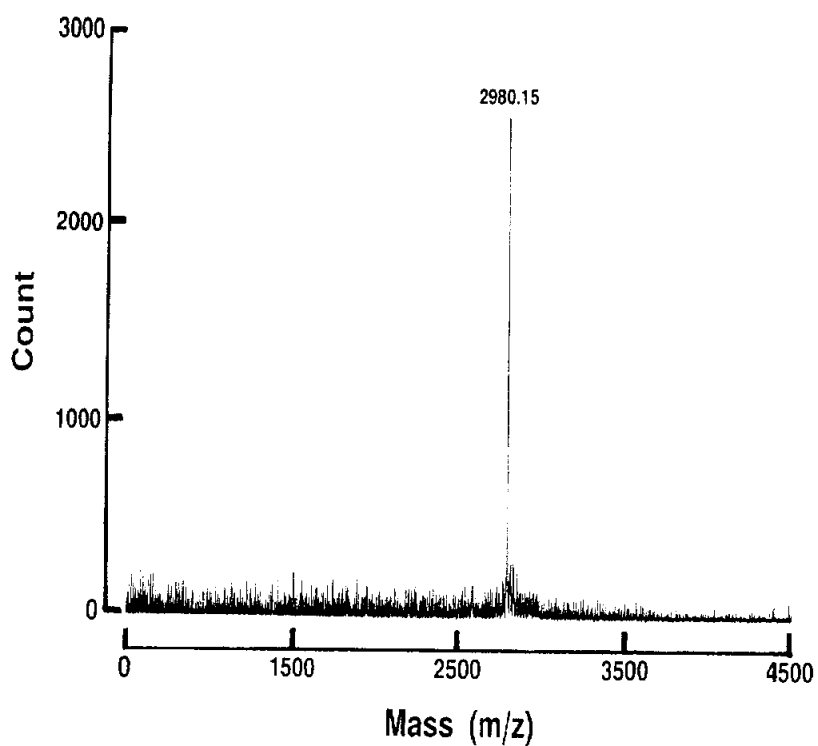


Fig. 11. Molecular weight of antimicrobial peptide B from liver of starfish by MALDI-TOF Mass spectrometer (Vyoger-DETM STR spectrometer, perseptive Biosystem, USA)

Table 3. Sequence of antimicrobial peptide A
from liver of starfish (*Asterina pectinifera*)

Cycle No.	amino acid	Yield(pmol)
1	Ala	41.7
2	Ile	100
3	Gln	100
4	Asn	100
5	Ala	100
6	?	—
7	Glu	8.1
8	Ser	73.4
9	Asp	91.1
10	Leu	70.8
11	Met	33.2
12	Asp	7.2
13	Glu	21.2
14	Ile	42.4
15	Gln	5.6
16	Asp	38.0
17	Ala	38.0
18	Tyr	26.9
19	?	—
20	Gly	4.5
21	Thr	11.1
22	?	—
23	?	—
24	?	—
25	?	—
26	?	—
27	?	—
28	?	—

Table 4. Sequence of antimicrobial peptide B
from liver of starfish (*Asterina pectinifera*)

Cycle No.	amino acid	Yield(pmol)
1	Ala	49.9
2	Ile	23.6
3	Gln	100
4	Asn	100
5	Ala	100
6	Ala	100
7	Glu	15.8
8	Ser	24.8
9	Asp	9.5
10	Leu	100
11	Met	69.4
12	Lys	81.1
13	Leu	77.6
14	Ile	21.0
15	?	-
16	Asp	17.7
17	Ala	44.7
18	Tyr	80.0
19	Lys	23.5
20	Gly	44.0
21	Ala	15.7
22	Lys	20.1
23	Pro	15.9
24	Gly	20.5
25	Ala	36.8
26	?	-
27	?	-
28	?	-

국 문 초 록

내성균의 출현으로 인한 새로운 형태의 항생제가 필요하다. 기존의 항생제와는 다른 항균 mechanism을 가지는 제2의 항생제로 주목을 받고 있는 물질 중 하나가 항균활성 펩타이드이다. 양이온을 띄는 항균활성 펩타이드는 bacteria membrane의 음이온 인지질과 이온 결합으로 반응하여 membrane에 부착하게 된다. membrane에서 인지질을 떼어내거나 channel을 형성하여 bacteria를 용해시킨다.

이전의 연구에서 항균활성 펩타이드는 포유류, 파충류, 곤충, 어류 등 여러 생물체에서 정제되어 그 특성이 밝혀진 바 있다. 특히 물과 쉽게 접하는 환경에서 생활하기 때문에 균에 의한 감염의 위험이 큰 개구리, 곤충, 어류, 갑각류 등에서 다양한 항균활성 펩타이드가 보고되고 있다.

본 연구에서는 다양한 수중생물 중에서 별불가사리 (*Asterina pectinifera*)의 간(liver) 조직에서 항균활성 펩타이드를 정제하였다. 불가사리는 강력한 포식력과 뛰어난 자생력 및 재생 능력을 가지고 양식장을 중심으로 증식하여 해양 생태계를 위협하고 있기 때문에 불가사리를 이용한 많은 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서는 별불가사리 (*Asterina pectinifera*) 간(liver) 조직을 5% acetic acid로 추출하여 RP-HPLC (Vydac C₁₈, Hypersil C₁₈) 및 Ion exchange HPLC (CM-5PW, DEAE-5PW)로 분석하였다. 분석결과 최종적으로 2개의 peak를 정제하였다. 최종 정제된 항균물질의 분자량은 MALDI-TOFF mass로 측정하여 2980.15와 2951.77 Da임을 알 수 있다. 이 두 물질의 아미노산 서열을 분석하였는데 그 양이 부족하여 일부분의 서열만 알 수 있었으며, 약 28개의 아미노산으로 구성된 물질임을 알 수 있었다. 별불가사리가 속하는 극피동물에서는 항균활성 펩타이드의 보고가 전무하며, 생태계를 위협하는 불가사리를 새로운 방법으로 이용할 수 있는 계기가 될 수 있을 것이라 사료된다.

감 사 의 말 씀

논문이 완성되기까지 격려와 가르침을 주셨던 박남규 교수님께 감사드립니다. 그리고 학부 때부터 석사과정까지 많은 가르침을 주셨던 공재열 교수님, 홍용기 교수님, 공인수 교수님, 이형호 교수님, 김종균 교수님과 김성구 교수님께 감사의 마음을 전합니다.

많은 시간을 함께 하며, 항상 도움을 주신 우리 실험실 식구들에게도 감사의 말을 전합니다. 항상 든든한 버팀목이 되어주신 김찬희 선배님, 격려와 조언을 아끼지 않으신 김은정 선배님, 어려울 때 위로의 말을 아끼지 않으신 김인혜 선배님, 말도 되지 않는 제 질문에 항상 최선을 다해 답해주셨던 고혜진 선배님, 멀리 캐나다에서 열심히 생활하고 계신 서정길 선배님께 머리 숙여 감사의 마음을 전합니다. 그리고 항상 웃을 수 있게 즐거운 일을 많이 만들어준 막내 상현이와 같이 석사과정을 지내온 문호성 선배님께도 감사드립니다. 미국에서 실험을 배우는 동안 부모님처럼 대해주셨던 사모님께 감사드립니다.

석사 과정 동안 희노애락을 같이 해온 석사 동기생인 지현, 현진, 은미와 전병진 선배님께 축하의 말을 전하고 싶습니다. 지금은 졸업을 하고 학교에 있지는 않지만 격려와 위로를 아끼지 않았던 98학번 동기인 은영, 예진, 화정, 진경이에게 고맙다는 말을 하고 싶습니다. 항상 따뜻한 말로 저를 감싸주던 친구 배윤위에게도 고마움을 전합니다.

마지막으로 어려운 형편에도 석사과정 동안 힘써 도와주셨던 사랑하는 부모님과 정이 많아 저의 짜증도 다 받아주는 여동생 소정이와 군복무 중인 남동생 종찬이에게 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

참 고 문 헌

1. Song, J. H. (1998) Mechanisms of antimicrobial resistance. *Microbiology and Industry*, **24**, 1-9.
2. Lee, Y. H. (1998) Several issue on the antibiotics resistance. *Microbiology and Industry*, **24**, 10-16.
3. Hancock, R. E. W. and Chapple, D. S. (1999) Peptide antibiotics *Antimicrobial agent and Chemother.*, **43**, 1317-1323.
4. Hancock, R. E. W. and Lehrer, R. (1998) Cationic peptides : a new source of antibiotics. *Tibtech.*, **16**, 82-88.
5. Shai, Y. (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica. Acta.*, **1462**, 55-70.
6. Oren, Z. and Shai, Y. (1998) Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, **47**, 451-463.
7. Hancock, R. E. W. and Diamond, G. (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology*, **8**, 402-410.
8. Hancock, R. E. W. (2001) Cationic peptides : effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lanc. Infec. Dis.*, **1**, 156-164.
9. Kim, S. C. Antimicrobial peptides an their applications as biopesticides and therapeutic agent. 미생물의 산업적이용.
10. Andreu, D. and Rivas, L. (1998) Animal antimicrobial peptides : an overview. *Biopolymers*, **47**, 415-433.
11. Mor, A., Nguyen, V. H., Delfour, A., Migliore-Samour, D. and Nicolas, P. (1991) Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide ofamphibian skin. *Biochemistry*, **30**, 8824-8830.
12. Park, J. M., Jung, J. E. and Lee, B. J. (1994) Antimicrobial Peptides

- from the Skin of a Korean Frog, *Rana rugosa*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **205**, 948–954.
13. Park, C. B., Lee, J. H., Park, I. Y., Kim, M. S. and Kim, S. C. (1997) A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *FEBS Lett.*, **411**, 173–178.
 14. Cole, A. M., Weis, P. and Diamond, G. (1997) Isolation and Characterization of Pleurocidin, an Antimicrobial Peptide in the Skin Secretions of Winter Flounder. *J. Biol. Chem.*, **272**, 120008–12013.
 15. Park, I. Y., Park, C. B., Kim, M. S. and Kim, S. C. (1998) Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Lett.*, **437**, 258–262.
 16. Shike, H., Lauth, X., Westerman, M. E., Ostland, V. E., Carlberg, J. M., Olst, J. C. V., Shimizu, C., Bulet, P. and Burns, J. C. (2002) Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2232–2237.
 17. Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T. and Iwanaga, S. (1988) Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horsehoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). *J. Bio. Chem.*, **263**, 16709–16713.
 18. Khoo, L., Rovinette, D. W. and Noga, E. J. (1999) Callinectin, an Antibacterial Peptide from Blue Crab, *Callinectes sapidus*, Hemocytes *Mar. Biotech.*, **1**, 44–51.
 19. Destoumieux, D., Munoz, M. and Bachere, E. (2000) Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell. Mol. Life Sci.*, **57**, 1260–1271.
 20. Lee, I. H., Cho, Y. and Lehrer, R. I. (1997) Styelins, Broad-spectrum antimicrobial peptides from the solitary tunicate, *Styela clava*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **118B**, 515–521.
 21. Lee, I. H., Zhao, C., Cho, Y., Harwig, S. S. L., Cooper, E. L. and Legrer, R. I. (1997) Clavanins, α -helical antimicrobial peptides from

- tunicate hemocytes. *FEBS Lett.*, **400**, 158–162.
22. Kishimura, H., Ojima, T., Tanaka, H., Hayashi, K. and Nishita, K. (2000) Amino acid sequence of phospholipase A2 from the pyloric ceca of starfish *Asterina pectinifera*. *Fisheries Sci.*, **66**, 104–109.
 23. Komori, T. (1997) Toxins from the starfish *Acanthaster planci* and *Asterina pectinifera*. *Toxicon*, **35**, 1537–1548.
 24. Patrzykat, A. and Douglas, S. E. (2003) Gone gene fishing : how to catch novel marine antimicrobials. *Trends in Biotech.*, **21**, 362–369.
 25. Lauth, X., Shike, H., Burns, J. C., Westerman, M. E., Ostland, V. E., Carlberg, J. M., Olst, J. C. V., Niset, V., Taylor, S. W., Shimizu, C. and Bulet, P. (2002) Discovery and characterization of two isoforms of Moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass. *J. Bio. Chem.*, **277**, 5030–5039.
 26. Lucca, A. J. and Walsh, T. J. (1999) Antifungal peptides : novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicro. and chemother.*, **43**, 1–11.
 27. Benkendorff, K., Davis, A. R. and Bremner, J. B. (2001) Chemical defense in the egg masses of benthic invertebrates: and assessment of antibacterial activity in 39 mollusks and 4 polychaetes. *J. Inverte. Pathol.*, **78**, 109–118.
 28. Haug, T., Kjuul, A. K., Stensvag, K., Sandsdalen, E. and Styrvold, O. B. (2002) Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish & Shellfish Immunology*, **12**, 371–385.
 29. Dathe, M. and Wieprecht, T. (1999) Structural features of helical antimicrobial peptides : their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1462**, 71–87.
 30. Lee, D. G., Park, Y. K., Kim, P. I., Jeong, H. G., Woo, E. R., and Hahm, K. S. (2002) Influence on the plasma membrane of *Candida albicans* by HP(2–9)–magainin 2 (1–12) hybrid peptide. *Biochem.*

Biophys. Res. Comm., **297**, 885–889.

31. Jang, W. S., Kim, K. N., Lee, S. Y., Nam, M. H. and Lee, I. H. (2002) Halocidin : a new antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium*. *FEBS Lett.*, **521**, 81–86.
32. Donia, M. and Hamann, M. T. (2003) Marine natural products and heir potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infect Dis.*, **3**, 338–348
33. Haefner, B. (2003) Drugs from the deep : marine natural products as drug candidates. *DDT*, **12**, 536–544.
34. Mooberry, S. L. Tien, G., Hernandez, A. H., Plubrukarn, A. and Didson, B. S. 1999) Laulimalide and Isolaulimalide, NewPaclitaxel-Like icrotubule-Stabilizing Agents. *Cancer Res.*, **59**, 653–660.
35. Holye, C. H. V. (1998) Neuropeptide families : evolutionar erspectives. *Reg. peptides*, **73**, 1–33.
36. Schroder, J. M. (1999) Epithelial peptide antibiotics. *Biochem. Pharm.*, **57**, 121–134.
37. Devine, D. A. (2003) Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. *Molecular Immunology*, **40**, 431–443.
38. Norman, F. N., Stafford, J. L., Barreda, D., Ainsworth, A. J. and Belosevic, M. (2001) Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Develop. Com. Immun.*, **25**, 807–825.