

해조류 추출물로부터 홍합(*Mytilus edulis*)의 부착 저해물질 정제

조지영 · 흥응기
부경대학교 생물공학과

서론

연안 해역에서 해조류와 부착패류는 양식장 시설 뿐만아니라 수취구 어선바닥 등에서 그 피해는 심각한 실정이다. 해조류에 의한 부착은 잎파래 가시파래 등이 주가 되고 패류로는 홍합과 따개비가 주를 이룬다 이들의 부착방지를 위해서 염소살균, TBTO (Tributyltin oxide), CuSO₄ 등의 처리를 하고 있지만 이러한 처리에 의해서는 또다른 환경 문제가 야기되고 있다. 이같은 부착방지 물질 탐색의 일환으로 홍합을 탐색 대상으로 선택하여 각종 해조류 추출물들로부터 부착 방지 효과를 조사하였다. 그 결과 고리매(*Sytosimphon lomentaria*)로부터 가장 높은 활성을 확인 하였고, TLC, silica-gel chromatography, Ion-exchange, HPLC를 통해 정제 하였다.

재료 및 방법

assay 방법

4-5cm의 홍합을 대상으로 foot-stimulating method⁽²⁾에 의해 활성여부를 확인하였다.

해조류 추출물의 조제

Jin's et al⁽¹⁾ 법에 의해 조제하였다.

유기 용매에 따른 용해도

고리매의 메탄올 추출물을 유기용매 즉, Petroleum ether, Hexane, Carbom tetrachloride, Diethyl ether, chloroform, Methylene chloride, Ethylacetate, Acetonitrile, Butanol, iso-propanol, Ethanol, Methanol, DMSO, 에 대한 용해도를 TLC를 이용하여 알아보았다. TLC plate 에 메탄올 추출물을 원액 10 μ l씩 적어 15종의 유기용매와 물을 이용하여 각각 사용하여 6cm까지 전개시킨 후 spot 부분과 2cm 간격으로 나누어 총 4 fraction으로 나누었다. 각각의 부분들은 칼을 사용하여 eppendorf tube에 모은 후 1ml의 메탄올을 첨가 하여 녹인다. 원심분리하여 새로운 eppendorf tube에 상층액만 모아 건조시킨 후 10 μ l에 녹여 활성을 알아보았다.

silica gel chromatography

silica gel(70-230 mesh)과 celite를 5:1 비율로 섞어 hexane 하에서 packing하였다. Hexane=1(fraction 1), Carbom tetrachloride=1(fraction 2), Chloroform :Ethylacetate

=8:2 (fraction 3), Chloroform:Ethylacetate=6:4 (fraction 4), Chloroform:Ethylacetate=4:6 (fraction 5), Chloroform:Ethylacetate=2:8 (fraction 6) Ethylacetate=1 (fraction 7), Ethylacetate:Methanol=8:2 (fraction 8) Ethylacetate :Methanol=6:4 (fraction 9), Ethylacetate:Methanol= 4:6(fraction 9) Ethylacetate :Methanol =2:8 (fraction 10) Methanol=1 (fraction 11)로 순차적으로 분리했다. 각각의 fraction의 용매를 건조시킨 후 해수에 녹여 활성을 확인하였다.

Ion-exchange

Dowex1-X8 (cl type) anion exchange를 이용하여 용매의 pH를 7부터 1까지 사용하여 분리하였다.

HPLC

Dowex1-X8을 행한 후 활성부분을 모아 HPLC 상에서 Nova-pack C₈column(3.9×150mm)를 50분간 1-100% acetonitrile 농도구배를 사용하여 flow rate 1ml/min로 분리하였다.

결과

▶ 해조류의 methanol 추출물 경우 에는 넓패(*Ishige folicea*)와 고리매(*Scytosiphon lomentaria*)가 4mg/ml의 경우 100%의 효과를 나타내었다.

▶ 이 물질의 정제를 위해서 TLC, silica gel filtration, anion exchange를 사용하였고, 용해 도 측정 결과 Petroleum ether, Heptane, Hexane, Carbon tetrachloride chloroform에는 녹지 않으며 Methanol, DMSO 등에는 잘 녹음을 알수 있었다. 그리고 Ethyl ether, Ethylacetate, Acetonitrile, Buthanol 에서는 잘 녹는 물질과 녹지 않는 물질 두가지가 확실히 구분 되었다. 다음으로 silica gel chromatography 상에서 Chloroform, Ethylacetate Methanol을 사용하여 물질을 분리하였다

▶ silica-gel chromatography의 결과 Ethylacetate:Methanol=6:4 (fraction 9), Ethylacetate:Methanol= 4:6(fraction 9), Ethylacetate:Methanol=2:8 (fraction 10), Methanol=1 (fraction11)에서 활성을 나타내었지만 Ethylacetate:Methanol=6:4 (fraction 9)에서 가장 강한 활성을 보였다.

▶ Ion-exchange의 경우 pH2에서 활성을 나타내었고 이 물질은 HPLC상에서 acetonitrile 48%에서 활성을 나타내었다

참고문헌

1. Jin HJ, Kim JH, Sohn CH, DeWreede RE, Choi TJ, Tower GHN, Hudson JB, Hong YK (1997) Inhibition of Taq DNA polymerase by seaweed extracts from British Columbia, Canada and Korea. J. appl. Phycol. 9: 383-388
- 3.Y. Hayasi and W. Miki 1996. A newly developed bioassay system for antifouling substance using the blue mussel, *Mytilus edulis galloprovincialis*. J. Mar. Biotechnol. 4. 127-130.