

## 붕장어 (*Conger Myriaster*)로부터 새로운 항균활성 펩타이드의 분리 및 정제

김인혜, 서정길, 김은정, 김찬희, 고혜진, 김창훈\*, 박남규  
부경대학교 수산과학대학 생물공학과, \*양식학과

### 서론

일반적으로 척추동물 및 무척추동물들은 세균 및 기생충 등과 같은 외부물질의 침입으로부터 자신을 방어하기 위해 항균성 펩타이드를 생산하는 비특이적 면역체계를 가지고 있다고 알려져 있다.

최근까지 비특이적 면역기능을 수행하는 많은 항균성 펩타이드들이 포유류<sup>1</sup>, 양서류<sup>2</sup> 곤충<sup>3</sup>, 및 식물<sup>4</sup>로부터 분리 정제되었고 구조 활성간의 연구가 활발히 진행되고 있으며 이러한 구조와 활성간의 연구는 거의 육상생물로부터 유래한 항균성 펩타이드에 한정되었고 해양생물, 특히 어류<sup>9-12</sup>를 이용한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

현재까지 담수에 사는 어류로부터 정제한 항균성 펩타이드는 Catfish의 skin으로부터 parasin I<sup>9</sup>, Mudfish로부터 misgurin<sup>10</sup>, 해양에 서식하는 어류로부터는 Flounder skin에서 Pleurocidin<sup>11</sup> 및 Moses sole fish에서 pardaxin<sup>12</sup> 등이 보고되어 있을 뿐이다.

따라서 본 연구에서는 한정적으로 식용에 이용되고 있는 붕장어로부터 새로운 항균성 펩타이드를 정제하기 위해 HPLC와 liquid-growth inhibition assay method를 이용하여 정제과정을 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 추출

동결된 붕장어 껍질 1kg을 methanol : 5% acetic acid (94:6, v/v) 8 l 에 2일간 침지 시킨후 homogenization하여 원심분리 (7,200 g × 4°C)를 행한 후 상층액에 시료의 부피 : NaCl = 1 l : 12 g의 비로 첨가하여 4°C에서 30분 동안 12,000 rpm으로 원심분리를 행하였다.

얻어진 sample은 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge에 충분히 평형화가 된 다음 시료를 주입하여 0%, 60% methanol (RM60)으로 용출 시키고 각각의 용출물을 *B. subtilis* PM125에 대해서 항균활성을 측정하였다. 강한 활성을 나타내는 RM60으로부터 항균활성 펩타이드를 분리하기 위해서 reverse-phase HPLC, gel-filtration, ion-exchange HPLC를

순차적으로 반복 이용하여 정제과정을 수행하였다.

## 2. 항균활성 측정

HPLC를 이용한 각각의 정제과정 후의 항균활성측정은 Trypticase Soy Broth (TSB)를 이용한 liquid-growth inhibition method를 이용하여 측정하였다. Assay에 이용한 균주로는 Gram positive bacteria인 *B. subtilis* PM125를 실험균주로 하여 sterile 96 well-plate (Corning)을 이용하여, 37°C에서 18시간동안 배양을 한 후 microplate autoreader E1309 (Bio-Tek instrument)를 이용하여 630nm에서 absorbance 값을 측정함으로써 활성의 유무를 관찰하였다.

## 결과 및 요약

Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge를 이용하여 얻은 각각의 60 % methanol 추출물 (RM60)이 *B. subtilis* PM125에 대해 항균활성을 나타내었다.

붕장어의 60 % methanol 추출물 (RM 60)을 이용하여 정제과정을 수행한 결과 Gram positive bacteria인 *B. subtilis* PM125에 항균활성을 나타내는 물질을 정제하였으며 현재 구조 분석및 분광학적 연구를 진행중이다. 이러한 결과를 통하여 해양에 존재하는 다양한 생물을 새로운 생리활성물질에 관한 연구의 재료로 이용한다면 해양생물의 자원화가 가능할 것이라고 생각되어진다.

## 참고문헌

1. Lehrer, R. L., Lichtenstein, A. K. and Ganz, T. (1993) Annu. Rev. Immunol. 11, 105-128
2. Steiner, H., Hiltmark, D., Enstrom, A., BEnnich, H. and Boman, H.G. (1981) Nature 292, 246-248
3. Zasloff, M. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 84, 5449-5453
4. Cammue, B. P., De Bolle, M. F., Terras, F. R, Frost, P., Van Damme, J., Rees, S. B., Vanderleyelen, J. and Broekaert, W. F. (1992) J. Biol. CHem. 267, 2228-2233
5. Ziv, O. and Yechiel, S. (1996) Eur. J. Biochem. 106, 7-16
6. Moore, K. S., Wehrli, S., Roder, H., Reger, M., Forrest, J. N., Jr., McCrimmon, D., and Sloff, M. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 90, 1354-1358
7. Alexandet, M., Cole, P. W. and Gill, D. (1997) J. Biol. Chem. 272, 12008-12013
8. Lehrer, R.I., Ganz, T. and Selsted, M. E. (1991) Cell
9. Park, I.Y Park, C.B, Kim, MS and Kim, S.C (1998)FEBS Lett437,258-26278
10. Park, C. B., Lee, J. H., Park, I.Y., Kim, M. S., and Kim, S.C (1997) FEBS Lett,411, 175-178
11. Alexander, M., Cole, P. W and Gill, D. (1997) J. Biol. Chem. 272, 12008-12013
12. Tompson, S.A., Tachibana, K., Nakanishi, K. and Kubota, I. (199-86) Science 233, 341-343