

Purification of Antibacterial Peptide from the Skin of the Catfish *Silurus asotus*

Hee-Young Sohn, Hye-Jin Go and Nam Gyu Park*

Department of Biotechnology, College of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Received December 2, 2015 / Revised February 1, 2016 / Accepted February 6, 2016

An antibacterial peptide from skin extract of the catfish *Silurus asotus* was purified and characterized. The acidified skin extract was put through a Sep-Pak C18 solid phase extraction cartridge using a stepwise gradient and divided into flow-through (F.T.), 10% methanol-elute (RM10), 60% methanol-elute (RM60), and 100% methanol-elute (RM100) fractions. RM10, RM60, and RM 100 showed antimicrobial activity against *Escherichia coli* D31. On the other hand, the F.T. fraction did not show antimicrobial activity. Among the various fractions, RM 60 had the highest activity. RM 60 was partially purified on a cation exchange column (CM52) by a stepwise gradient. The ammonium acetate (pH 5.15) 0.02 M - 0.8 M fraction showed antimicrobial activity. Then an antimicrobial peptide was purified using a 0.6M fraction with strong antibacterial activity through a series of five C18 reversed-phase HPLC columns. For the characterization of the purified peptide, the molecular weight and amino acid sequence were analyzed by MALDI-TOF MS and Edman degradation. The molecular weight of this peptide was about 4182.1 [M+H]⁺. The amino acid sequence of this peptide was partially determined as follows: PALXXKARREAKVKF. These findings suggest that this peptide plays a significant role in the innate defense system of catfish skin.

Key words : Antibacterial peptide, catfish, isolation, skin

서 론

어류는 수용성 환경에 접촉하며 생활을 하고 있기 때문에 수 많은 병원균에 항상 노출되어 있다. 이러한 이물질의 침입에 방어하기 위해서 어류들은 효과적인 일차적인 방어 기능이 필요하다. 비록 어류들은 척추동물과 유사하게 특이적인 세포-매개 면역반응과 항체를 포함한 특이적 면역반응 체계를 지니고 있지만, 이들 동물과는 다르게 저온, 고염과 같은 극한 환경하에서 제약을 받고 생활하고 있어서 어류의 면역계가 정상적으로 활성화가 되기까지는 많은 시간이 필요로 하게 된다[5, 24]. 한편, 어류의 비특이적 면역체계는 본질적으로 발현되고, 신속하게 생성되며 그리고 비특이적으로 반응하는 특징을 지닌다[2, 8, 10]. 그러므로 어류는 그들의 환경에 광범위하게 존재하는 병원균에 대해 방어 또는 그들의 조직이 감염되지 않도록 조절하기 위해서 일차적으로 그들의 비특이적인 면역반응에 의존하게 된다[24]. 비특이적인 면역반응의 요소들 중에서 특히 항균활성 펩타이드가 어류의 면역에 관해 중요한 역할을 지닌다는 보고가 발표되고 있다[1, 16, 21]. 다양한

종류의 항균활성 펩타이드가 어류, 특히 꺾질, 점액질, 아가미 및 내장 점액질과 같은 일차적인 방어 기관으로부터 정제되었다. 이들로부터 발견된 대표적인 물질은 다음과 같다: piscidin [21], pardaxin [12], misgurin [14], bass hepcidin [20], myxinidin [23], YFGAP [19], 및 pleurocidin [4]. 이들 항균활성 펩타이드들은 곰팡이뿐 만 아니라 다양한 세균들에 대해 항균 작용을 나타낸다[3, 9, 22, 25]. 일차적인 방어기관에서 이들 항균활성 펩타이드들의 발견과 항균활성은 어류에 있어서 비특이적인 면역체계가 매우 중요한 역할을 하고 있다는 것을 제시하고 있다. 한국산 폐기는 한국에서 상업적으로 중요한 어종의 하나이다. 이들 폐기는 구이용 또는 탕으로 널리 사용되고 있으며, 해마다 소비가 꾸준히 증가되고 있는 실정이다. 이로 인해 발생하는 꺾질을 포함한 폐기의 부산물이 상당량 폐기되어 환경오염을 가중시키고 있다. 최근 생물 자원의 제한성 및 환경적인 문제로 인해 어류의 가공으로부터 폐기되는 부산물의 이용과 재활용에 관한 관심이 점차적으로 증대되고 있다[11]. 어류의 부산물과 폐기물인 두부, 내장, 및 꺾질은 다양한 종류의 생리활성 물질을 다량 포함하고 있다고 알려져 있다[6]. 이와 같이 폐기되는 부산물들을 이용하여 수산양식에서 발생하는 어류 질병의 조절제 또는 어류 질병 항생제로 사용될 수 있는 새로운 항균활성 펩타이드와 같은 생리활성 물질의 개발을 한다면, 미이용자원인 폐기물로부터 고부가가치를 지닌 신물질을 발견할 수 있는 커다란 성과를 얻을 수 있으리라 생각된다. 그러나, 아직까지 폐기의 부산물인 꺾질로부터 새로운 기능을 지니는 생리활성 물질 개발에 관한 연구는 그다지 많지 않다. 따라서, 본 연구에서는 폐기의 꺾질

*Corresponding author

Tel : +82-51-629-5867, Fax : +82-51-629-5863

E-mail : ngpark@pknu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

추출물을 사용하여 항균활성을 나타내는 물질을 정제하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 사용한 메기(*Silurus asotus*, 20마리, 체장 30~50 cm)는 2014년 2월에 부산시 남구 남천해변시장에서 20마리를 구입하였다. 메기로부터 껍질을 분리한 후, 즉시 액체질소에 동결시켜 실험 전까지 -75℃에 보관하였다.

시약 및 재료

Ultrafree-MC (0.45 μ m), Syringe filter (0.44 μ m)와 Sep-Pak Vac C₁₈ cartridge는 Waters사(Waters associates, Miliford, MA, USA)에서 구입하였다. Tryptic soy broth (TSB)와 Lactose-Boullion (LB)는 Merck사 (Merck, Darmstadt, Germany)에서, Agarose (Low EEO Agar)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 각각 구입하였다. HPLC-grade의 water (H₂O) 및 acetonitrile (CH₃CN)은 TEDIA사(Ohio, USA)에서 구입하였고, 그 이외의 모든 시약은 특급을 사용하였다.

메기 껍질 조직으로부터 추출물의 조제

동결 보관된 한국산 메기 20마리 분의 피부조직(0.4 kg)을 1차 증류수를 이용하여 10분간 끓인 후, 5% 초산을 첨가한 뒤 조직을 파쇄하여 시료를 4℃에서 40분 동안 10,000x g로 원심 분리하였다. 침전물은 다시 5% 초산용액을 넣고 homogenizer (PT10-35, KINEMATICA AG, Switzerland)로 균질화하여 원심분리(13,000x g, 4℃, 40분)하였다. 두 번에 걸쳐 얻어진 상층액을 농축시킨 다음, 시료:ethanol = 1:1(v/v)의 비율로 ethanol을 첨가하여 -20℃의 냉동고에 하루 동안 보관한 후, 원심분리(13,000x g, 4℃, 40분)하였다. 이 상층액을 농축하여 한 번 더 시료:ethanol = 1:3(v/v)의 비율로 ethanol을 첨가하고 같은 조건으로 원심분리(13,000x g, 4℃, 40분)하였다. 다시 상층액을 농축한 뒤, ethanol과 NaCl을 시료(0.4 l):ethanol (1.2 l):NaCl (10 g)의 비율로 첨가하여 원심분리(20,000x g, 4℃, 30분)하였다. 농축한 상층액에 최종 농도가 0.1 N HCl이 되도록 1 N HCl을 첨가하고, 원심분리(20,000x g, 4℃, 50분)하였다. 하였다. 얻어진 상층액에 ethyl acetate를 첨가한 후, 원심분리(20,000x g, 4℃, 50분)하였다. 그 후, Sep-Pak C₁₈ cartridge (20 ml, Waters)에 농축액을 주입하여 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), 0.1% TFA가 포함된 10% 메탄올(RM10), 60% 메탄올(RM60), 100% 메탄올(RM100)을 순차적으로 사용하여 물질을 용출시켰다. 각 분획의 1/1,000에 해당하는 양을 사용하여 항균활성 측정에 사용하였다.

항균활성의 측정

항균활성을 측정하기 위해 사용된 균주는 Edward J. Noga 교수(North Carolina State University)로부터 분양 받은 그람 음성균인 *Escherichia coli* D31을 사용하였다. 정제과정 및 정제된 물질에 대한 항균활성은 이전의 방법과 동일한 방법으로 측정하였다[18]. 우선 배지 및 배양온도에서 18시간 동안 전 배양한 다음, BioMerieux Vitek, Inc. Colorimeter (Product No. 52-1210, BioMerieux, Inc., USA)를 사용하여 농도를 84%T (= 1×10⁸ CFU/ml)가 되게 맞추었다. 그 후, 9.5 ml의 0.03% TSB, 1% Type I agarose 및 10 mM phosphate buffer (pH 6.5)를 포함하는 underlay gel에 84%T로 희석된 균 0.5 ml을 넣고 잘 섞은 후에 plate에 편평하게 부어 굳히고, 굳은 plate에 punch를 사용하여 직경 2.5 mm의 well을 뚫은 후에, 추출물 총 부피의 1/100을 도입시켰다. 모든 sample은 0.01% acetic acid (pH 4.0)에 녹여 활성을 측정하였으며, negative control로 0.01% acetic acid (pH 4.0) 5 μ l를 사용하여 용매에 의한 영향이 없음을 확인하였다. 추출물이 배지에 스며들면 3시간 동안 1차 배양한 후, 그 위에 10 ml의 6% TSB, 1% Type I agarose 및 10 mM phosphate buffer (pH 6.5)를 포함하는 overlay gel을 붓고 굳힌 후에 동일한 온도에서 18시간 동안 2차 배양하였다. 다음 날, well주위의 clear zone의 유무 및 clear zone diameter (mm)를 확인하여 활성의 세기를 측정하였다.

항균활성 펩타이드의 정제

강한 항균활성을 나타내는 RM60을 사용하여 양이온 교환 및 역상 column을 사용하여 물질을 정제하였다. 첫 단계로 RM 60을 양이온 column인 CM52 (1.8×27 cm)에 주입하여 stepwise 방법으로 0.02 M, 0.2 M, 0.4 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M, 1.5 M 농도의 용액을 사용하여 부분 정제하였으며, 분리조건은 다음과 같다. A 용매; 0.02 M ammonium acetate (pH 5.15) → B용매; 1.5 M ammonium acetate (pH 5.15). 각각의 용출액들은 각각 Sep-pak C₁₈ cartridge를 사용하여 RM100으로 용출시킨 후, 1/500 농도에 해당하는 양으로 항균활성을 측정하였다. 활성이 강한 0.6 M에 해당하는 물질은 5단계의 역상 HPLC를 교차적으로 사용하여 정제하였다. 최종적인 정제과정은 역상 HPLC (Capcellpak C₁₈, 4.6×250 mm, Shiseido) column을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 0.1% TFA를 포함한 28% CH₃CN (pH 2.2)의 isocratic 조건으로 정제하였다(Fig. 1). 각각의 과정에서 분리된 분획들은 *E. coli* D31을 사용하여 항균활성을 측정하였다.

분자량 및 서열분석

최종 정제한 항균활성물질의 분자량을 측정하기 위해서 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Mass spectrometer (Voyager-DETM STR spectrometer, perseptive

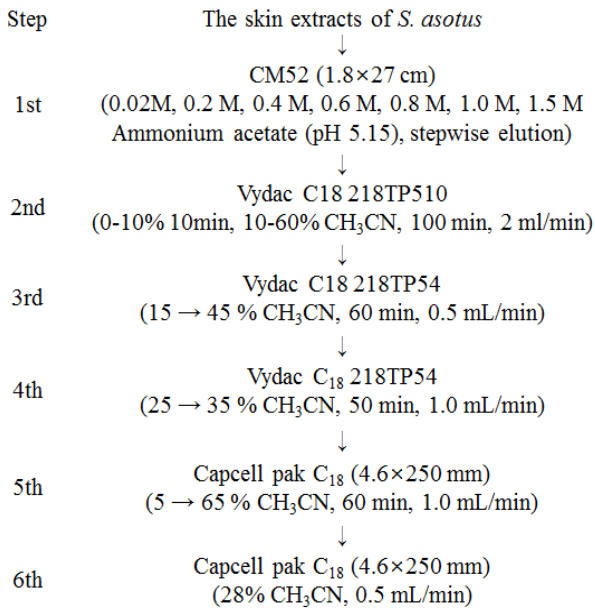


Fig. 1. Procedures for the HPLC purification of antibacterial peptide from the skin extract of catfish *Silurus asotus*.

Biosystem, USA)를 사용하였으며, Matrix는 α -cyano-4-hydroxycinamic acid를 사용하였다. 또한 정제된 천연물의 아미노산 서열을 분석하기 위해서 Edman 분해법을 이용한 Shimadzu (PPSQ-21A, Japan) 아미노산 분석기를 사용하였다.

결과 및 고찰

메기의 껍질로부터 항균물질 추출

메기의 껍질 추출물의 Sep-Pak 분획물들의 항균활성을 조사하기 위해 그람 음성균인 *E. coli* D31에 대해 항균활성을 측정하였다. 그 결과 RM 10은 16 mm의 항균활성을, RM60은 24 mm, RM100은 16 mm의 항균활성을 나타내었다(positive control: Piscidin 14 mm). 특히 RM60은 RM10과 RM100보다 약 1.5배 높은 활성을 나타내었다(Fig. 2). 따라서 활성이 강한 RM60을 사용하여 항균활성 물질을 정제하였다.

항균활성 펩타이드의 정제

항균활성이 가장 큰 RM60은 양이온 column인 CM52를 사용하여 ammonium acetate (pH 5.15) 0.02 M, 0.2 M, 0.4 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M, 1.5 M의 분획으로 다시 부분 정제하여 항균활성을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과, 0.02 M - 0.8 M (10-27 mm) 구간의 용액들은 항균활성을 강하게 나타내었지만 1.0 M과 1.5 M에서는 반응을 나타내지 않았다. 0.02 M (27 mm)과 0.2 M (23 mm)의 경우, 다른 분획들에 비해 큰 활성을 보였지만, 이들 분획들에는 column에 거의 붙지 않고 빠져 나온, 염 또는 아민성 물질, 그리고 dipeptide와 같은 분자량이 적은 물질들이 포함되어 복합적으로 강한 활성을 나타내었다고 생

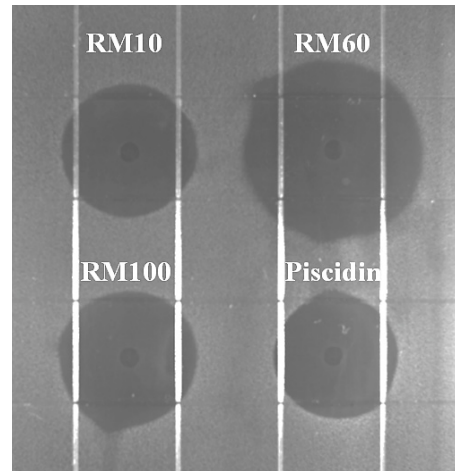


Fig. 2. Antimicrobial activity of the catfish' skin extracts eluted by Sep-Pak C18 cartridge. RM10; 10% methanol extract, RM60; 60% methanol extract, RM100; 100% methanol extract.

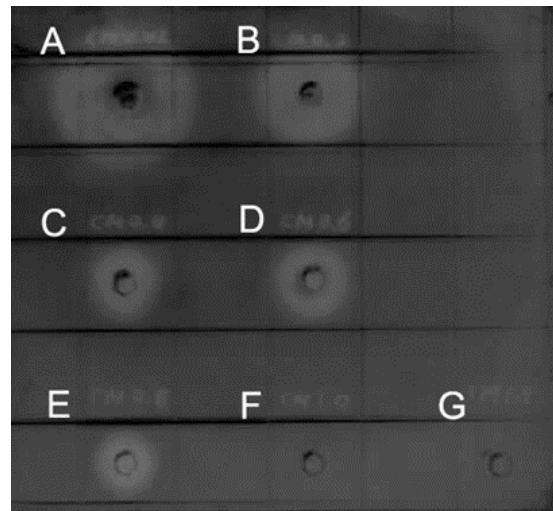


Fig. 3. Antimicrobial activity of the RM60 of skin extracts eluted by CM52 column. Clear zone indicates antibacterial activity of each eluents. A; 0.02M eluent, B; 0.2 M eluent, C; 0.4 M eluent, D; 0.6 M eluent, E; 0.8 M eluent, F; 1.0 M eluent, G; 1.5 M eluent.

각된다. 일반적으로 항균활성 펩타이드는 positive net charge를 띠는 성질을 가지고 있기 때문에, 본 연구에서는 항균활성 펩타이드를 정제하기 위해서 활성이 가장 큰 0.6 M (16 mm)의 분획을 사용하여 HPLC로 계속해서 정제하였다. 첫 번째 단계로 Vydac 210TP510 C₁₈ column을 사용하여 분석하였고, 약 27-36% CH₃CN에서 항균활성을 나타내었다(Fig. 4의 black bar). 반응을 나타낸 활성 분획은 Fig. 1에 나타낸 것처럼 역상 HPLC를 교차 반복적으로 사용하였다. 마지막 단계의 역상 HPLC (Capcellpak C₁₈, 4.6x250 mm)에서 28%의 isocratic 조건으로 최종 정제하였다(Fig. 5A).

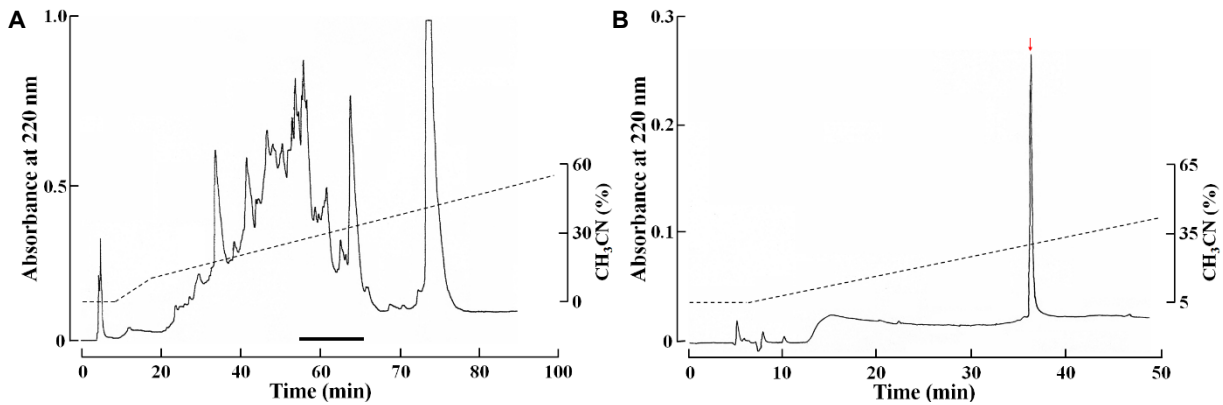


Fig. 4. (A) First reversed-phase HPLC separation of the skin extracts (0.6 M eluent of CM52). The 0.6 M eluent of CM52 was fractionated by the Vydac C₁₈ column (9.2x250 mm). Fraction of the absorbance peak (indicated by the black) showed antibacterial activity against *E. coli* D31. (B) The 4th reversed-phase HPLC purification of the active fraction and the peptide was purified with Capcellpak C₁₈ column (4.6x250 mm).

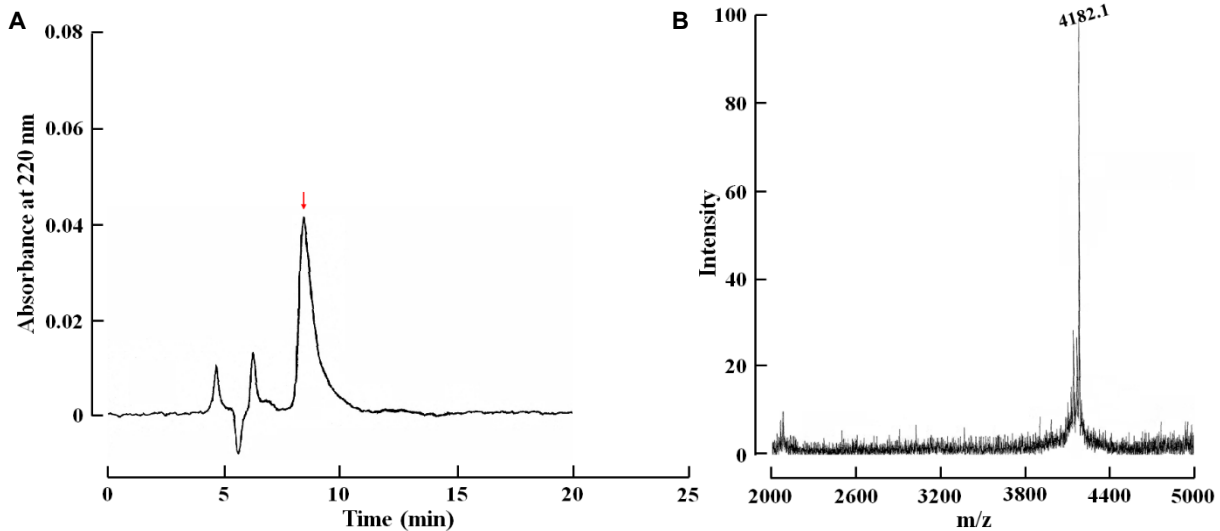


Fig. 5. (A) Final purification of the active fraction. The peptide was purified with Capcellpak C₁₈ column (4.6x250 mm) column and an isocratic gradient of 28% acetonitrile in 0.1% TFA at a flow rate of 0.5 ml/min. The eluate was monitored at 220 nm. (B) The molecular weight of the purified peptide was determined using an MALDI-TOF mass spectrometer.

분자량 및 서열분석측정

정제된 펩타이드의 부분적인 분자량과 아미노산 서열은 MALDI-TOF 질량분석기와 아미노산 서열 분석기를 사용하여 분석하였다. 이 펩타이드의 분자량은 4182.1 [M+H]⁺ (Fig. 5B)이며, 이 물질의 아미노산 서열을 알아보기 위해 분석한 결과, 이 물질의 N-말단의 부분적인 일차구조는 PALXXKARREA KVKF로 13개의 아미노산 서열이 밝혀졌다. 따라서, 분자량과 아미노산 서열결과를 비교했을 때 이 물질은 분석된 13개의 아미노산 이외에 약 25개 정도의 아미노산이 더 구성되어 있을 것으로 추정된다. 항균성 펩타이드는 일반적으로 산성보다는 염기성 아미노산을 많이 포함하고 있는 물질로 알려져 있다. 이 펩타이드 역시 일차구조에서 나타내듯이 Arg과 Lys과 같은 염기성 아미노산을 많이 포함하고 있는 염기성 펩타이드

인 것 같다. 이러한 항균 펩타이드는 미생물들과 접촉이 빈번한 조직인 피부, 점액질 및 체액에서 많이 발견되었으며[17], 수해양생물인 미꾸라지, 떡장어, 넙치, 지렁이 및 불가사리[4, 7, 13-15, 23]의 조직으로부터 새로운 물질들이 발견되었다. 이전의 연구에 의하면 메기로부터 Histone 2A의 fragment인 항균 펩타이드, parasin I이 발견되었다[3]. Parasin I은 19개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 일차구조와 분자량은 다음과 같다; KGRGKQGGKVRKAKTRSS (분자량, 2000.34). 본 연구에서 정제한 물질과 parasin I과의 일차구조 서열 및 분자량을 비교해 보면 일차구조 및 분자량이 다르다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 본 연구에서 정제된 항균활성 물질이 기존에 밝혀진 Histone 2A 유래의 물질과 다른 종류의 물질이라는 것을 의미한다. 따라서 새로이 정제된 물질은 메기의 겹질

에 존재하고 있는 다른 종류의 항균성 물질이라 생각되며, 이 물질은 메기의 껍질에서 선천성 방어 시스템에서 중요한 역할을 하고 있다고 여겨진다. 현재 이 물질의 정확한 서열을 알기 위해서 cDNA cloning 연구를 하고 있는 중이다.

감사의 글

이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2014년)에 의하여 연구되었음(과제번호; CD20140347).

References

- Acosta, J., Montero, V., Carpio, Y., Velázquez, J., Garay, H. E., Reyes, O., Cabrales, A., Masforrol, Y., Morales, A. and Estrada, M. P. 2013. Cloning and functional characterization of three novel antimicrobial peptides from tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* **372-375**, 9-18.
- Bartlett, T. C., Cuthbertson, B. J., Shepard, E. F., Chapman, R. W., Gross, P. S. and Warr, G. W. 2002. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Mar. Biotechnol.* **4**, 278-293.
- Bulet, P., Stöcklin, R. and Menin, L. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* **198**, 169-184.
- 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**, 12008-12013.
- Ellis, A. E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* **25**, 827-839.
- Ferraro, V., Cruz, I. B., Jorge, R. F., Malcata, F. X., Pintado, M. E. and Castro, P. M. L. 2010. Valorization of natural extracts from marine source focused on marine byproducts: a review. *Food Res. Int.* **43**, 2221-2233.
- Go, H.-J., Bae, Y. J. and Park, N. G. 2014. Purification of two novel antimicrobial peptides from pyloric caeca of the starfish *Asterina pectinifera*. *J. Life Sci.* **24**, 860-864.
- House, R. V. and Hastings, K. L. 2004. Opinion in immunotoxicology: multidimensional immunomodulation. *J. Immunotoxicol.* **1**, 123-129.
- Izadpanah, A. and Gallo, R. L. 2005. Antimicrobial peptides. *J. Am. Acad. Dermatol.* **52**, 381-390.
- Jenssen, H., Hamill, P. and Hancock, R. E. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 491-511.
- Klomklao, S., Kishimura, H., Nonami, Y. and Benjakul, S. 2009. Biochemical properties of two isoforms of trypsin purified from the Intestine of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chem.* **115**, 155-162.
- Oren, Z. and Shai, Y. 1996. A class of highly potent anti-bacterial peptides related from pardaxin, a pore-forming peptide from the Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. *Eur. J. Biochem.* **237**, 304-310.
- Ovchinnikova, T. V., Aleshina, G. M., Balandin, S. V., Krasnodembskaya, A. D., Markelov, M. L., Frolova, E. I., Leonova, Y. F., Tagaev, A. A., Krasnodembsky, E. G. and Kokryakov, V. N. 2004. Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina*. *FEBS Lett.* **577**, 209-214.
- 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.
- 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.
- Pasupuleti, M., Schmidtchen, A. and Malmsten, M. 2012. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit. Rev. Biotechnol.* **32**, 143-171.
- Rakers, S., Niklasson I., Steinhagen D. Kruse, C., Schaubert J., Sundell, K. and Paus, R. 2013. Antimicrobial peptides (AMPs) from fish epidermis: perspectives for investigative dermatology. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1140-1149.
- Seo, J. K., Crawford, J. M., Stone, K. L. and Noga, E. J. 2005. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 1998-2004.
- Seo, J. K., Lee, M. J., Go, H. J., Park, T. H. and Park, N. G. 2012. Purification and characterization of YFGAP, a GAPDH-related novel antimicrobial peptide, from the skin of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*. *Fish. Shellfish Immunol.* **33**, 743-752.
- Shike, H., Lauth, X., Westerman, M. E., Ostland, V. E., Carlberg, J. M., Van Olst, J. C., 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.
- Silphaduang, U. and Noga, E. J. 2001. Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature* **414**, 268-269.
- Stark, M., Liu, L. P. and Deber, C. M. 2002. Cationic Hydrophobic Peptides with Antimicrobial Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3585-3590.
- Subramanian, S., Ross, N. W. and MacKinnon, S. L. 2009. Myxinidin, a novel antimicrobial peptide from the epidermal mucus of hagfish, *Myxine glutinosa* L. *Mar. Biotechnol.* **11**, 748-757.
- Ullal, A. J., Litaker, R. W. and Noga, E. J. 2008. Antimicrobial peptides related from hemoglobin are expressed in epithelium of channel catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque). *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 1301-1312.
- van't Hof, W., Veerman, E. C., Helmerhorst, E. J. and Amerongen, A. V. 2001. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol. Chem.* **382**, 597-619.

초록 : 메기의 껍질로부터 항균성 펩타이드의 정제

손희영 · 고혜진 · 박남규*

(부경대학교 수산과학대학 생물공학과)

메기(*Silurus asotus*)의 껍질로부터 항균성 펩타이드를 정제하였다. 메기 껍질의 산 추출물은 단계적 농도구배 조건으로 Sep-Pak C₁₈에 의해 부분적으로 정제되었으며, 그 중에서 특히 60% 메탄올 분획(RM60)이 *Escherichia coli* D31에 대해 가장 좋은 항균활성을 나타내었다. 이 RM60을 사용하여 이온교환 및 5단계의 연속적인 역상 HPLC로 정제하였다. 정제된 펩타이드의 분자량과 아미노산 서열분석은 MALDI-TOF MS와 에드만 분해법으로 분석하였다. 이 펩타이드의 분자량은 약 4182.1 [M+H]⁺이었으며, 분석된 이 물질의 부분적인 일차구조서열은 다음과 같다; PALXXKARREAKVKF. 이러한 결과는 메기의 껍질에서 존재하는 이 펩타이드가 메기의 껍질에서 반응하는 선천성 방어 시스템에서 중요한 역할을 하고 있다고 여겨진다.