

# 진주담치(*Mytilus edulis*) 추출물의 항균활성 및 단백질 분해효소에 대한 안정성 탐색

이지은 · 서정길\*

국립군산대학교 해양과학대학 식품생명공학전공

## Screening of Antimicrobial Activity and Proteolytic Enzyme Stability of Extract of the Blue Mussel *Mytilus edulis*

Ji-Eun Lee and Jung-Kil Seo\*

Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Kunsan 54150, Korea

This study was performed to screen the antimicrobial activities and proteolytic enzyme stability of the acidified extract of the Blue mussel *Mytilus edulis*. The acidified extract showed potent antimicrobial activities against Gram-positive bacteria, *Bacillus subtilis*, and Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* D31, but had no activity against *Candida albicans*. Treatment of extract with trypsin completely abolished all or significant antibacterial activity against the tested bacteria, but slightly decreased antimicrobial activity against *B. subtilis*, and treatment of extract with chymotrypsin retained almost antibacterial activity against the tested bacteria except for *E. coli* D31. To confirm the additional enzyme stability of the extract, antimicrobial activity of the extract was tested after treated with several enzymes. Enzymes treated extract showed potent antimicrobial activity against *B. subtilis* and its activity was also retained for 5 h after trypsin treatments. Non-proteinaceous materials in the acidified extract also showed strong DNA-binding ability but did not show bacterial membrane permeabilizing ability. All our results indicate that mussel extract might contain the proteinaceous or non-proteinaceous antibacterial materials target not bacterial membrane but intracellular components. These results could be used to develop mussel extract as an additive for the improvement of stability or antimicrobial activity of antibiotics against specific bacteria.

Keywords: *Mytilus edulis*, Extract, Antimicrobial activity, Enzyme stability

### 서론

생물들은 외부 미생물의 침입으로부터 자신을 방어하기 위한 효과적인 면역체계로서 선천면역계 또는 선천면역계와 후천면역계를 동시에 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(Hancock and Diamond, 2000). 선천면역계는 외부의 위협으로부터 물리적인 장벽 역할을 담당하는 피부/점막 등과 항균물질, 보체, 히스타민 등과 같은 화학적 장벽 역할을 담당하는 체액성 물질들 및 탐식세포들에 의한 식균작용 또는 염증반응과 같은 반응성 요소 등으로 구성되며 비특이적 1차 방어작용을 담당한다(Clark and Kupper, 2005; Chung, 2019). 반면 후천면역계는 항원 특이적 항체 생산에 의한 체액성 면역과 세포독성 T 세포

에 의한 세포성 면역 등으로 구성되며 특이적 2차 방어작용을 담당한다. 이러한 선천면역과 후천면역은 상호 협력과 조화를 통해서 효과적인 생체 방어체계를 구성/유지하고 있으나 면역계의 구성은 척추동물과 무척추동물에서 차이가 있다고 알려져 있다(Seo, 2016). 선천면역과 후천면역이 모두 잘 발달되어 있는 척추동물과는 달리 선천면역만을 포함하고 있는 무척추동물은 자기방어작용을 선천면역에만 의존한다고 알려져 있다(Seo et al., 2005; Rowley and Powell, 2007).

최근 들어서는 비특이적이면서 빠른 반응성을 나타내는 선천면역의 기능과 그 구성 요소들에 대한 관심이 크게 증대되고 있으며, 특히, 해양무척추동물들에 존재하는 선천면역 성분들과 그 활용에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다(Zaslloff, 2002;

\*Corresponding author: Tel: +82. 63. 469. 1827 Fax: +82. 63. 469. 7448

E-mail address: jungkileun@kunsan.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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0280>

Korean J Fish Aquat Sci 54(3), 280-286, June 2021

Received 15 March 2021; Revised 13 April 2021; Accepted 23 April 2021

저자 직위: 이지은(대학원생), 서정길(교수)

Tom et al., 2011). 해양무척추동물은 혈구세포(hemocytetes)의 탐식작용과 이들 세포로부터 생성/분비되는 다양한 물질들의 효과적인 작용에 의해 1차 방어기능이 수행되고 있으며, 대표적인 구성요소로서 lectin, pro-phenoloxidase activating factor, antimicrobial peptide 및 phagocytosis와 inflammation 등이 잘 알려져 있다(Relf et al., 1999; Tincu and Taylor, 2004; Yu et al., 2005; Wang et al., 2014). 현재까지 밝혀진 해양무척추동물의 선천 면역관련 물질들 중에서 단백질성 항균물질의 직접적이고 효과적인 방어작용이 알려지면서, 이것들이 포함된 해양무척추동물 추출물들의 면역학적 활용을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(van't Hof et al., 2001). 그러나 해양무척추동물 추출물에 포함된 단백질성 항균물질은 단백질 분해효소에 대한 민감성이 매우 높다는 것이 확인되었고 이에 따라 이것들의 활용을 위한 안정성 개선에 대한 연구가 필요한 실정이다(Lee et al., 1997). 따라서 추출물 내에 포함된 단백질성 및 비단백질성 항균물질의 존재 유무와 단백질성 항균물질을 보조할 수 있는 비단백질성 항균에 대한 탐색과 활용 가능성에 대한 연구가 선행되어야 할 분야로 인식되고 있다(Kim et al., 2013).

해양무척추동물 중 진주담치와 같이 부착생활을 하는 무척추동물은 운동성/회피성의 부재로 다양한 해양 환경의 변화나 오염원 또는 병원성 인자들에 대한 효과적인 방어를 할 수 없으므로 환경인자에 효과적인 방어작용을 담당하는 선천면역 체계/요소들을 포함하고 있을 가능성이 매우 높다. 특히, 우리나라 해안의 조간대 주변에서 가장 많이 발견되는 대표적인 부착성 해양무척추동물 중의 하나인 진주담치(*Mytilus edulis*)는 연체동물 부족류 홍합목 홍합과에 속하며 환경 적응력과 번식력에서 큰 주목을 받고 있는 산업적 가치가 높은 패류 중의 하나로 알려져 있다. 현재까지 *Mytilus edulis* (Charlet et al., 1996), *Mytilus galloprovincialis* (Hubert et al., 1996; Mitta et al., 1999) 및 *Mytilus coruscus* (Oh et al., 2018) 등의 홍합 또는 진주담치 추출물들이 포함하고 있는 defensins류를 포함한 단백질성 항균물질의 면역학적 역할에 대한 연구는 활발하게 진행되었지만 단백질 분해효소에 대한 민감성 등을 개선하기 위한 효소 저항성 항균물질에 대한 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 효소 저항성 항균물질에 대한 연구가 비교적 부족한 진주담치 추출물의 항균활성과 단백질 분해효소에 대한 안정성을 탐색함으로써 진주담치 추출물의 항균활성 분야에서의 활용 가능성을 고찰하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료 및 시약

본 실험에 사용한 진주담치(*M. edulis*)는 경상남도 고성 만에서 구입하였으며 살아있는 상태로 실험실로 운반된 후에 아가미와 외투막 조직을 적절한 즉시 추출과정에 사용하였다.

항균활성 측정을 위한 배지성분으로서 tryptic soy broth

(TSB)와 sabouraud dextrose broth (SDB) 및 agarose type I (Low EEO Agar)는 Merck사(Merck, Darmstadt, Germany)와 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 효소 처리를 위해서 trypsin과 chymotrypsin은 Fisher Scientific (Fairlawn, NJ, USA)사에서 구입을 하였으며, proteinase K와  $\alpha$ -Amylase 및  $\alpha$ -Lipase는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 세균 내막 투과성을 측정하기 위해서 사용된 o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, DNA-binding ability 측정에 사용된 100 bp DNA ladder는 Bioneer사(Daejeon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 그리고 연구에 사용된 그 외의 시약들은 모두 특급을 사용하였다.

### 조직추출

실험실로 운반된 진주담치는 흐르는 수돗물에 씻어서 패각에 부착된 오염물을 제거한 후, 아가미와 외투막 조직을 취하여 5 mL volume이 될 때까지 얼음 속에서 모았다. 모아진 아가미와 외투막 조직에 끓고 있는 4배량의 1% acetic acid (v/v)를 첨가하여 100°C에서 5분 동안 끓인 후, 얼음에 보관하여 충분히 냉각시켰다. 충분히 냉각된 조직은 homogenizer (T10 basic ULTRA-TURRAX; IKA, Wilmington, NC, USA)를 사용하여 완전히 파쇄시켰다(Speed #6, 3분, 실온). 조직 파쇄액은 4°C에서 20분 동안 8,000 rpm으로 원심분리(VS-21SMT; Vision Scientific, Buchon, Korea)를 행한 후에 상층액을 취해서 항균활성 탐색과정 등의 연구에 사용될 때까지 -70°C에 보관하였다(Seo et al., 2005).

### 항균활성 측정방법 및 사용 균주

추출물들의 항균활성 측정을 위해서 그람 양성균 3종(*Bacillus subtilis* KCTC1021, *Staphylococcus epidermidis* KCTC1917, *Streptococcus mutans* KCCM4105), 그람 음성균 5종(*Escherichia coli* D31, *Escherichia coli* ML35p, *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) KCTC11946, *Shigella flexneri* KCTC2009, *Vibrio parahaemolyticus* RIMD2110633) 및 yeast 1종(*Candida albicans* KCTC7965)을 사용하였다. 항균활성 측정 방법으로는 서로 다른 농도를 포함한 두 층의 배지를 사용하는 ultrasensitive radial diffusion assay (URDA)법을 이용하였다(Lehrer et al., 1991). 항균활성 측정에 사용된 세균은 tryptic soy broth (TSB)에 접종하고, *C. albicans*은 sabouraud dextrose broth (SDB)에 접종한 후 18시간 동안 37°C (*V. parahaemolyticus*는 25°C)에서 pre-culture를 수행한 후 colorimeter (Product No. 52-1210; BioMerieux Inc., Durham, NC, USA)를 사용하여 균 농도를 84%T ( $\approx 1 \times 10^8$  CFU/mL) (*C. albicans*의 경우는  $10^6$  CFU/mL)가 되도록 조정하였다. *C. acnes*은 RCM 배지에 접종한 후 anaerobic jar에서 Gaspack system (BBL Gaspack 100TM; Franklin Lakes, NJ, USA)을 이용하여 밀봉한 후 37°C에서 3일 동안 혐기 배양 후에 동일한

방법으로 균 농도를 맞추었다. 그 후, 9.5 mL의 0.03% TSB (또는 0.03% SDB), 1% type I agarose 및 10 mM phosphate buffer (PB) (pH 6.5)를 포함하는 underlay gel에 각각의 농도로 희석된 균액 0.5 mL을 첨가하여 잘 섞은 후에 plate에 편평하게 부어 굳혔다. 이때 *E. coli* D31 균주(streptomycin 내성균)를 사용할 경우에는 streptomycin을 10 µg/mL 농도로 첨가하여 잘 섞은 후에 plate에 편평하게 부어 굳혔다. 굳은 plate에 punch를 사용하여 직경 2.5 mm의 well을 뚫은 후에 5 µL의 각 추출물을 도입시켰다. 추출물이 배지에 완전히 스며들도록 3시간 동안 37°C에서 1차 배양한 후, 그 위에 10 mL의 6% TSB (또는 6% SDB), 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(Seo et al., 2005). 다음날 well 주위에 생긴 clear zone의 크기를 측정하여 항균활성을 확인하였다. 항균활성 측정 동안 positive control로는 미국산 잡종 농어(*Morone saxatilis* × *Morone chrysops*)의 mast cell에서 정제된 항균 펩타이드인 piscidin 1을 사용하였고, negative control로는 1% acetic acid 또는 0.01% acetic acid를 사용하였다(Silphaduang and Noga, 2001). Piscidin 1은 (주)펩트론(Pepton, Daegeon, Korea)에서 합성 및 95% 이상의 순도로 정제된 것을 구입하여 사용하였다.

### Enzyme 처리에 의한 항균물질의 특성 확인

추출물에 포함된 항균물질의 단백질질 및 지질이나 탄수화물 성을 확인하기 위해서 단백질 분해효소인 trypsin, chymotrypsin, proteinase K 등과 α-amylase, α-lipase 등의 처리 전·후의 항균활성 변화를 확인하였다. 이를 위하여 진주담치 추출물 5 µL에 enzyme 용액(1,000 µg/mL in 50 mM PB, pH 7.4) 1 µL를 첨가하고 37°C에서 60분 간 반응시킨 뒤, URDA법으로 *B. subtilis* KCTC1021과 *E. coli* D31에 대한 항균활성을 측정하였다(Seo et al., 2017).

### 추출물의 세포독성 확인

진주담치 추출물의 human dermal fibroblasts (HDF)에 대한 세포독성을 확인하기 위해서 MTT assay를 이용하여 cell viability를 측정하였다(Kim and Li, 2012). 이를 위해서 다양한 농도의 진주담치 추출물(0, 0.5, 1.0, 10 mg/mL)을 human dermal fibroblasts cell에 처리한 후 추출물의 농도에 따른 세포 생존율을 확인하였다.

### 추출물들의 cytoplasmic membrane permeabilization assay

진주담치 추출물의 세균 내막 투과성 측정을 위해서 β-galactosidase 활성을 포함하는 *E. coli* ML35p를 사용해서 nonmembrane-permeative chromogenic 기질인 o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG)에 대한 추출물 도입 후의 *E. coli* ML35p의 세포질에서 유출된 β-galactosidase의 활성을 확

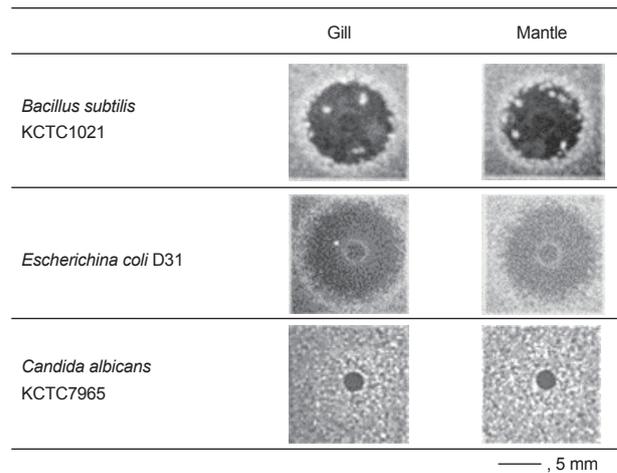


Fig. 1. Antimicrobial activity of the acidified crude extracts of the blue mussel *Mytilus edulis*. Antimicrobial activity of the acidified gill or mantle extract against *Bacillus subtilis* KCTC1021, *Escherichia coli* D31 and *Candida albicans* KCTC7965. Scale bar indicates 5 mm.

인하였다(Skerlavaj et al., 1990). 배양된 mid-log phase의 *E. coli* ML35p를 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 세척을 한 후, 1.5 mM의 ONPG를 포함하는 동일 butter에 용해시켰다. 그 후, 측정할 추출물들을 첨가한 뒤 37°C에서 60분간 배양하면서 10분 간격으로 유출된 β-galactosidase에 의한 ONPG의 o-nitrophenol로의 가수분해 정도를 405 nm에서 측정하였다. 막투과성 측정의 표준물질로는 강한 막 투과성을 나타내는 것으로 알려진 항균 펩타이드인 piscidin 1을 사용하였다.

### DNA Binding Assay

진주담치 추출물에 존재하는 DNA 결합성 물질의 존재유무를 확인하기 위해서 DNA binding에 의한 DNA band들의 agarose gel-electrophoresis에서의 이동의 저해 정도를 확인하는 DNA-binding assay를 수행하였다(Hsu et al., 2005). 이를 위해서 100 bp DNA ladder (0.2 ng)와 추출물을 혼합해서 37°C에서 60분 동안 반응시키고 0.5 µg/mL EtBr을 포함하는 1.4% agarose gel에서 전기영동을 수행한 후 DNA band의 유무와 이동 정도를 확인함으로써 DNA-binding 유무를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 진주담치 추출물의 항균활성

진주담치(*M. edulis*)로부터 채취한 아가미(gill)와 외투막(mantle) 조직들은 1% HAc (초산)를 이용한 약산 추출과정을 통해서 추출되었으며, 각 추출물의 항균활성은 URDA법을 이용하여 *B. subtilis* KCTC1021, *E. coli* D31 및 *C. albicans* KCTC7965에 대해서 측정하였다(Fig. 1). 실험 결과, 각 추출

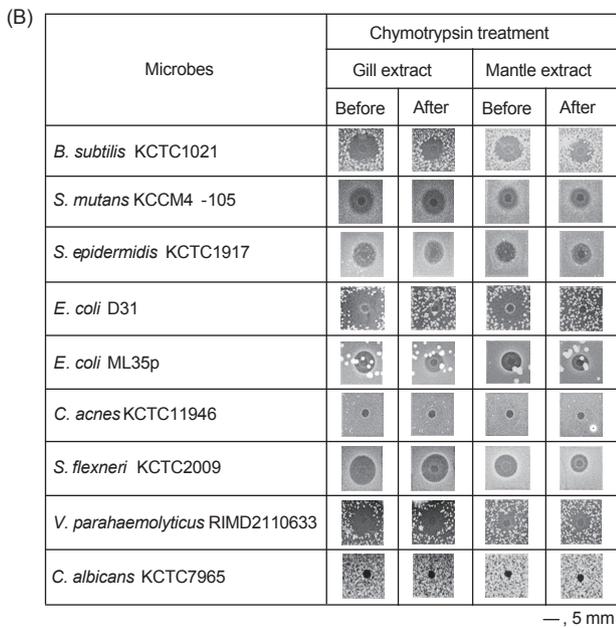
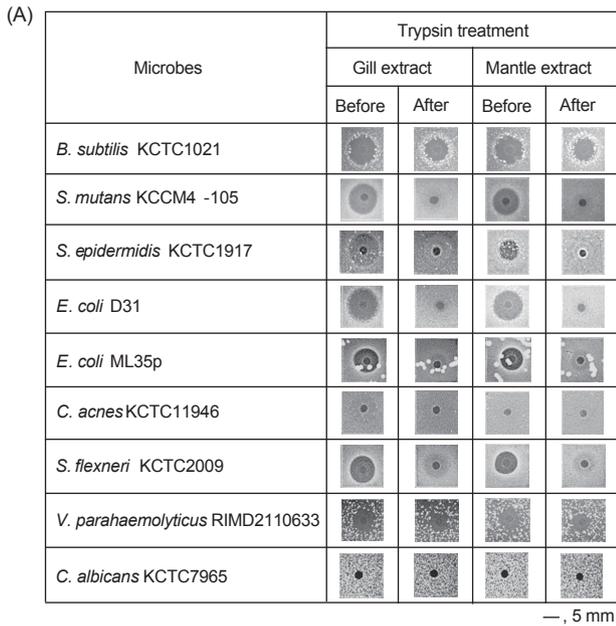


Fig. 2. Antimicrobial activity of the acidified crude extracts of the blue mussel *Mytilus edulis*. Antimicrobial activity of the acidified gill or mantle extract (before) and trypsin (A) or chymotrypsin (B) treated extract (after) against Gram-positive bacteria including *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermidis* and Gram-negative bacteria including *Escherichia coli* D31, *Cutibacterium acnes*, *Shigella flexneri*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Candida albicans*. Scale bar indicates 5 mm.

물은 *B. subtilis*와 *E. coli* D31에 대해서는 강한 항균활성을 나타낸 반면에 *C. albicans*에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았

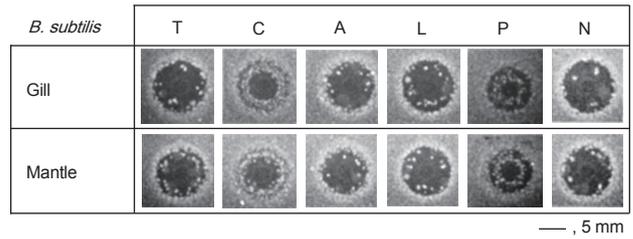


Fig. 3. Antimicrobial activity of the enzyme-treated crude extracts of the blue mussel *Mytilus edulis*. Antimicrobial activity of gill and mantle extract after treated several enzymes including trypsin (T), chymotrypsin (C),  $\alpha$ -amylase (A),  $\alpha$ -lipase (L), proteinase K (P) or not treated (N) against *Bacillus subtilis*. Scale bar indicates 5 mm.

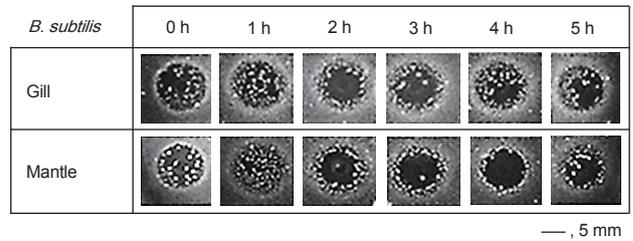


Fig. 4. Antimicrobial activity of the trypsin-treated crude extracts of the blue mussel *Mytilus edulis*. Antimicrobial activity of gill or mantle extract after treated with trypsin for 5 h against *Bacillus subtilis* KCTC1021. Scale bar indicates 5 mm.

다. 이러한 결과는 진주담치 추출물의 항균활성 범위는 세균에 한정되어 있을 가능성을 의미하는 것이다.

각 추출물 내의 positive charge 아미노산(Lys과 Arg)과 방향족 아미노산(Trp, Phe, Tyr)을 포함하는 선천면역 관련 단백질성 항균물질의 존재유무를 확인하기 위하여 각 추출물(5  $\mu$ L)의 trypsin 및 chymotrypsin 처리 전·후의 항균활성 변화를 URDA 법을 이용하여 *B. subtilis* 및 *E. coli* D31를 포함하는 9종의 세균과 *C. albicans*에 대해서 측정하였다(Fig. 2). 측정 결과, 추출물들은 trypsin 처리 후에는 *B. subtilis*와 *V. parahaemolyticus*에 대한 항균활성은 거의 유지가 된 반면에 *E. coli* D31을 포함하는 대부분의 세균들에 대한 항균활성은 거의 소실되었다. 또한, 추출물들은 chymotrypsin 처리 후에는 *E. coli* D31을 제외한 대부분의 세균들에 대한 항균활성은 거의 유지되었다. 그리고 추출물 또는 균주 간의 활성도 비교에서는 아가미 추출물과 외투막 추출물은 그람 음성균과 그람 양성균에 대해서 유사한 항균활성을 나타냈지만 *C. acnes*와 *C. albicans*에 대해서는 항균활성이 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 진주담치 추출물에 포함된 항균물질은 chymotrypsin 보다는 trypsin에 더 민감한 반응을 보이는 물질임을 의미하는 것으로서 아르기닌(Arg) 또는 라이신(Lys)과 같은 양이온성 아미노산을 포함하는 단백질성 물질일 가능성이 있음을 의미하는 것이다. 또한 B.

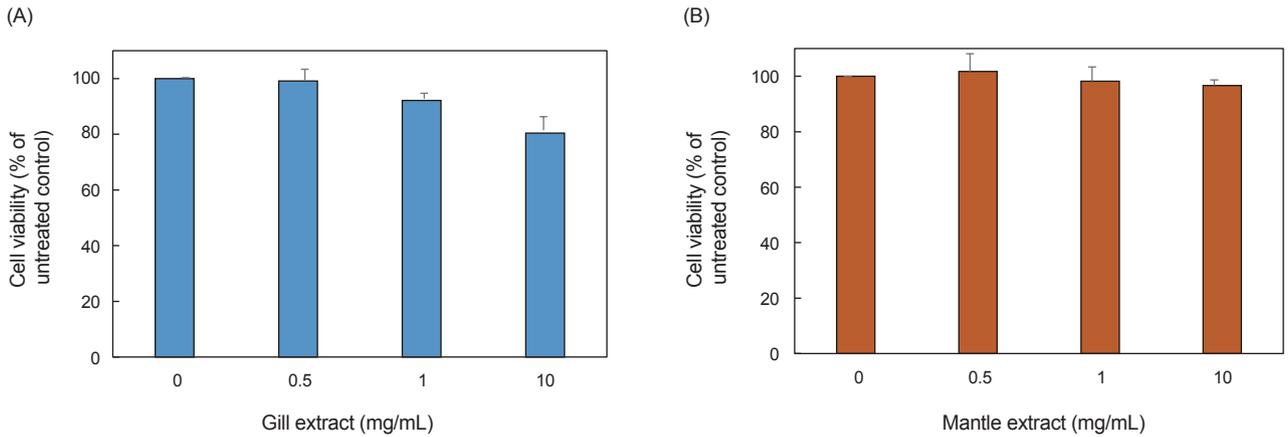


Fig. 5. Cell viability of human dermal fibroblasts after treatment with gill extract (A) and mantle extract (B). The data are expressed cell viability as % of untreated control (Mean±SD, \*P<0.05, Mussel extract vs untreated control).

*subtilis*와 *V. parahaemolyticus*에 대한 진주담치 추출물들의 항균활성은 trypsin과 chymotrypsin 처리에 대해서 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이것은 대부분의 균주들에 대한 항균작용에는 추출물에 포함된 단백질성 물질이 작용을 하지만 *B. subtilis*와 *V. parahaemolyticus* 같은 특정 세균에 대한 항균작용에는 단백질성 물질보다는 비단백질성 물질이 중요한 역할을 담당할 가능성이 있음을 의미하는 것이다.

진주담치 추출물의 효소 안정성

각 추출물 내에 포함된 항균활성 물질의 특성을 확인하기 위해서 각 추출물(5 µL)에 trypsin, chymotrypsin 및 proteinase K를 포함하는 단백질 분해효소와 lipase 및 amylase를 처리한 후 효소 처리 전·후의 항균활성 변화를 URDA법을 이용하여 *B. subtilis*에 대해서 측정하였다(Fig. 3). 측정 결과, 추출물들은 trypsin, amylase, lipase 처리 후에도 *B. subtilis*에 대한 항균활성은 큰 변화없이 유지되었으며, chymotrypsin과 proteinase K 처리 후에도 항균활성이 조금 감소되었지만 거의 항균활성이 유지되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 추출물에 포함된 *B. subtilis*에 대해서 항균활성을 나타내는 물질은 단백질, 지질, 탄수화물과 관계가 없는 물질일 가능성이 있음을 의미하는 것이다.

또한, 추출물 내에 포함된 특정 세균에 대한 항균활성을 나타내는 물질의 효소 처리에 대한 시간 의존성을 확인하기 위해서 각 추출물(5 µL)에 단백질성 항균물질에 특히 큰 영향을 미치는 trypsin을 1-5시간 처리 한 후 항균활성 변화를 URDA법을 이용하여 *B. subtilis*에 대해서 측정하였다(Fig. 4). 측정 결과, 추출물들은 trypsin 처리 후 5시간 내에는 *B. subtilis*에 대한 항균활성이 큰 변화없이 유지되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 추출물 내의 항균활성 물질은 trypsin에 대한 효소 안정성이 적어도 5시간 정도는 유지가 될 수 있음을 의미하는 것이다.

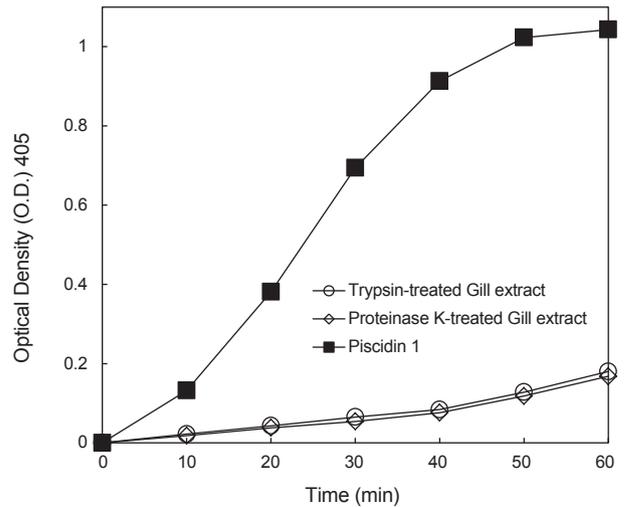


Fig. 6. Cytoplasmic membrane permeabilization of *Escherichia coli* ML35p by the trypsin/Proteinase K-treated gill extract and piscidin 1. Cytoplasmic membrane permeabilization was monitored as an increase in fluorescence intensity by the hydrolysis of the impermeable, chromogenic substrate ONPG in the presence of piscidin 1 (1 µg/mL) or extract (5 µL) for 60 min.

추출물의 세포독성 확인

진주담치 추출물의 세포독성을 확인하기 위해서 HDF의 세포증식에 대한 영향을 MTT assay를 통해서 확인하였다(Fig. 5). 추출물을 첨가하지 않은 것(0 mg/mL)을 대조군으로 농도별(0.5, 1.0, 10 mg/mL)로 추출물을 처리하여 cell viability를 측정하였다. 측정 결과, 외투막 추출물은 10 mg/mL 농도까지 거의 세포독성을 나타내지 않은 반면에 아가미 추출물은 약한 세포독성을 나타내었다. 이러한 결과는 HDF에 대해서 진주담치

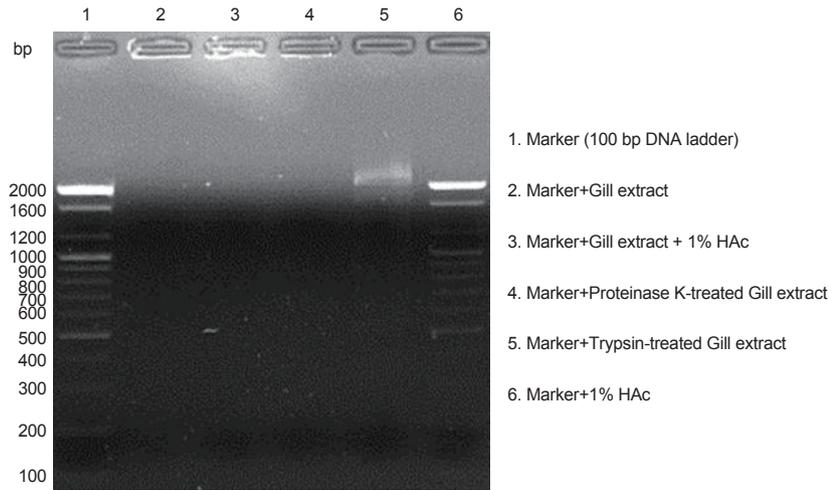


Fig. 7. Gel retardation analysis of the binding of the proteinase K or trypsin treated gill extract to DNA. Binding of the enzyme-treated extract (5  $\mu$ L) to DNA was assessed by measuring the retardation of commercial 100 bp DNA ladder migration through an agarose gel (1.4% gel). Lane 1, 100 bp DNA ladder (0.2 ng); lane 2, gill extract in D.W.; lane 3, gill extract in 1% HAc; lane 4, Proteinase K-treated gill extract; lane 5, trypsin-treated gill extract; lane 6, negative control, 1% HAc.

추출물들은 세포독성이 낮다는 것을 의미하는 것이다.

#### 진주담치 추출물에 포함된 항균물질의 막 투과성 확인 실험

진주담치 추출물에 포함된 비단백질성 항균물질의 상호작용 부위를 예측하기 위해서 trypsin과 proteinase K 처리된 아가미 추출물들의 *E. coli* ML35p에 대한 inner membrane permeabilization assay를 수행하였다(Fig. 6). 측정 결과, 양성 대조군으로 사용한 piscidin 1은 강한 내막 투과성을 나타낸 반면 trypsin 또는 proteinase K 처리된 진주담치 아가미 추출물은 막 투과성을 거의 나타내지 않았다. 이러한 결과는 진주담치 아가미 추출물에 포함된 비단백질성 항균물질은 세균 세포질 내 물질의 유출을 일으킬 정도로 세균 막에 대해서 투과성을 가지지 않으며 세포막과의 직접적인 상호작용 가능성이 낮다는 것을 의미하는 것이다.

#### 진주담치 추출물에 포함된 DNA-결합성 확인 실험

비단백질성 항균물질의 작용부위가 핵 내부의 DNA 인지를 확인하기 위해서 trypsin과 proteinase K가 처리된 아가미 추출물의 DNA migration 저해 활성을 조사하기 위하여 DNA-binding assay를 수행하였다(Fig. 7). 측정 결과, trypsin과 proteinase K 처리된 아가미 추출물은 강한 DNA-binding ability를 나타내었다. 이러한 결과는 진주담치 아가미 추출물에 존재하는 비단백질성 항균물질은 핵 내 DNA와의 결합을 통해 상호작용할 가능성이 있다는 것을 의미하는 것이다. 따라서 진주담치 추출물에 포함된 비단백질성 항균물질은 세포막과 직접적인 상호작용 보다는 intracellular components (예, DNA)들에 결합함으로써 DNA 복제 등의 기능에 영향을 주어서 세균 증

식이 억제됨으로써 항균 작용을 나타낼 가능성이 있음을 의미하는 것이다.

본 연구 결과들을 통해서 진주담치 추출물은 다양한 세균에 대해서 유의한 항균활성을 나타내는 것으로 확인되었으며, 특히 *B. subtilis*와 같은 그람 양성균에 대해서는 비단백질성 항균물질이 중요한 역할을 담당하는 것으로 나타났다. 그리고 추출물 내의 비단백질성 항균물질은 5시간 동안 효소에 대해서 저항성을 나타내었으며, 세균 막과 직접 상호작용하기 보다는 세포 내 구성물질(intracellular components, DNA 등)들과의 상호작용을 통해서 항균활성을 나타낼 가능성이 있을 것으로 예상된다. 이러한 결과를 토대로 진주담치 추출물은 *B. subtilis*를 포함하는 특정 세균에 대한 효소 저항성 강화를 위한 첨가물로서 활용 가능할 것으로 판단된다.

## 사 사

이 논문은 2014년도 정부(해양수산부)의 재원으로 해양수산과학기술진흥원 해양수산생명공학기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구입니다(No. 20140447).

## References

- Chung KT. 2019. Aging of immune system. *J Life Sci* 29, 817-823. <https://doi.org/10.5352/JLS.2019.29.7.817>.
- Charlet M, Chernysh S, Philippe H, Hetru C, Hoffmann JA and Bulet P. 1996. Innate immunity: Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusk *Mytilus edulis*. *J Biol Chem* 271, 21808-21813. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.36.21808>.

- Clark R and Kupper T. 2005. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 125, 629-637. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23856.x>.
- Hancock REW and Diamond G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 8, 402-410. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01823-0](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01823-0).
- Hsu CH, Chen C, Jou ML, Lee AYL, Lin YC, Yu YP, Huang WT and Wu SH. 2005. Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin, evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. *Nucl Acids Res* 33, 4053-4064. <https://doi.org/10.1093/nar/gki725>.
- Hubert F, Noel T and Roch P. 1996. A member of the arthropod defending family from edible Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Eur J Biochem* 240, 302-306. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0302h.x>.
- Kim CS and Li SH. 2012. The effects of pini folium extract on collagen expression and synthesis in normal human dermal fibroblasts. *Kor J Aesthet Cosmetol* 10, 817-822.
- Kim H, Jang JH, Kim SC and Cho JH. 2013. De novo generation of short antimicrobial peptides with enhanced stability and cell specificity. *J Antimicrob Chemother* 69, 121-132. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt322>.
- Lee IH, Cho Y and Lehrer RI. 1997. Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infect Immun* 65, 2898-2903. <https://doi.org/10.1128/IAI.65.7.2898-2903.1997>.
- Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SSL, Jackson R and Eisenhour P. 1991. Ultrasensitive assay for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Methods* 137, 167-173. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90021-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90021-7).
- Mitta G, Hubert F, Noel T and Roch P. 1999. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur J Biochem* 265, 71-78. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00654.x>.
- Oh R, Lee MJ, Kim YO, Nam BH, Kong HJ, Kim JW, Park JY, Seo JK and Kim DG. 2018. Purification and characterization of an antimicrobial peptide mytichitin-chitin binding domain from the hard-shelled mussel *Mytilus coruscus*. *Fish Shellfish Immunol* 83, 425-435. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.009>.
- Relf JM, Chisholm JRS, Kemp GD and Smith VJ. 1999. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab *Carcinus maenas*. *Eur J Biochem* 264, 350-357. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00607.x>.
- Rowley AF and Powell A. 2007. Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific?. *J Immunol* 179, 7209-7214. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7209>.
- Seo JK. 2016. Screening and purification of an antimicrobial peptide from the gill of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Korean J Fish Aquat Sci* 49, 137-145. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2016.0137>.
- Seo JK, Crawford JM, Stone KL and Noga EJ. 2005. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster *Crassostrea virginica*. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 1998-2004. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.013>.
- Seo JK, Kim DG, Oh R, Park KS, Lee IA, Cho SM, Lee GY and Nam BH. 2017. Antimicrobial effect of the 60S ribosomal protein L29 (cgRPL29), purified from the gill of pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* 67, 675-683. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.058>.
- Silphaduang U and Noga EJ. 2001. Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature* 414, 268-269. <https://doi.org/10.1038/35104690>.
- Skerlavaj B, Romeo D and Gennaro R. 1990. Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of Gram-negative bacteria by bactenecins. *Infect Immun* 58, 3724-3730. <https://doi.org/10.1128/IAI.58.11.3724-3730.1990>.
- Tincu JA and Taylor SW. 2004. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3645-3654. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3645-3654.2004>.
- Tom D, Patrick S and Peter B. 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr Opin Microbiol* 14, 251-258. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.004>.
- van't Hof W, Veerman EC, Helmerhorst EJ and Amerongen AV. 2001. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol Chem* 382, 597-619. <https://doi.org/10.1515/BC.2001.072>.
- Wang XW, Zhao XF and Wang JX. 2014. C-type lectin binds to beta-integrin to promote hemocytic phagocytosis in an invertebrate. *J Biol Chem* 289, 2405-2414. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.528885>.
- Yu XQ, Tracy ME, Ling E, Scholz FR and Trenczek T. 2005. A novel C-type lectin-3 from *Manduca sexta* is translocated from hemolymph into the cytoplasm of hemocytes. *Insect Biochem Mol Biol* 35, 285-295. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.004>.
- Zaslouff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395. <https://doi.org/10.1038/415389a>.