멍게 추출물에서 정제한 항균 펩타이드의 항균제재로서의 효과

최광선, 손석민
호서대학교 식품생물공학과
gv2op@hanmail.net

Effect as antimicobial agents of pufied antipeptide from acid-extracts, Halocynthia roretzi

Choi, Kwang Seon, Son, Seok Min
Department of Food Biological Engineering, Hoseo University

요 약

참멍게의 체액세포로부터 산추출 후, 조 추출물에서 천연항균소재를 개발하기 위해 먼저 멍게 조 추출액을 직접 Tricine-SDS PAGE를 통하여 주요 펩타이드들의 분자량의 범위를 살펴본 결과 6kDa 이하의 분자량의 펩타이드들이 다량 존재함을 알수 있었다. 펩타이드들의 size별 항균활성을 알아보기 위해 여러 사이즈의(100, 50, 30, 10 kDa)의 한외여과막으로 여과하여 그 여과액들의 specific 활성을 알아본 결과 여과막의 cut-off size에 상관없이 거의 일정한 specific activity를 가짐을 알수 있었다. 멍게 조 추출액의 여러 미생물에 대한 항균 스펙트럼을 알아보기 위해 *E.coli, P. aeruginosa, S. typhi, V. parahaemolyticus, L. monocytogenes, B. sutillus, S. aureus, S. mutans* 균주들을 10^5 CFU/ml로부터 4log 감소시키는 농도를 측정한 결과 각각 200, 50, 60, 10, 25, 30, 100, 100ppm 농도였으며, 대표적 상용화 항균 펩타이드인 Nisin과의 항균활성 비교 결과 비슷하거나 월등히 뛰어난 결과를 보여주었다. 또한 추출액의 열안정성을 측정하기 위해 100℃에서 10분간 가열한 후 원액과의 항균력의 차이를 Radial diffusion assay로 알아본 결과 항균력의 차이가 거의 없음을 알수 있었다.

1. 서 론

일반적으로 현재까지 알려진 천연 항균제재로서 우유와 난백에 들어있는 lactoferin, lysozyme 등의 효소제, 과일에 들어 있는 유기산류, 저급 지방산 ester들, 항신료의 정유성분, 갑각류의 키틴질로부터 추출한 chitosan, 미생물에서 생산되는 bacteriocin 등이 제시되고 있으며 이 밖에도 오랜 기간 질병치료제나 식품의 재료로 이용되어 오면서 무해성이 간접적으로 입증된 생약재 및 식용식물 추출물로부터 항균 활성물질 탐색과 활성 본체의 규명에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

지난 20여 년간 다양한 동물체에서 박테리아나 곰팡이의 감염에 대항하여 존재하는 새로운 항생 물질들이 발견되어졌는데 흥미롭게도 이러한 물질들은 비교적 크기가 작은 단백질이나 펩타이드인 것으로 확인되어졌다. 현재, 이러한 숙주 방어 펩타이드는 림프구와 같은 면역세포, 식세포 및 항체 등과 더불어 세균 감염에 대항하는 중요한 면역인자로써 인식되어지고 있다.

특히 최근에는 대상 동물에 대한 관심이 해양무척추동물들로 돌려지고 있는데 삼면이 바다로 둘러싸인 우리나라의 지리학적 위치를 감안할 때 해양돌물은 국내에서 항균 peptide의 존재를 탐색하고 그것을 항균제재로 이용하는데 있어 매우 적절한 동물이라고 할수 있겠다.

멍게가 지닌 항균 peptide에 대한 연구는 불과 5년전부터 시작되었는데, 분리된 peptide들은 구조와 항균활

성에 있어 이제까지의 항균 peptide들과는 매우 다른 특징들을 가지고 있었다. 본 논문은 멍게의 체액세포에서 항균 peptide를 분리·정제하고 천연의 항균재재로서의 가능성에 대한 기초 자료를 만들고자한다.

2. 재료 및 방법

2 1. 재료

본 실험에서는 동해산 멍게 (우렁쉥이, Halocynthia roretzi)는 23 Kg을 사용하였으며 체액세포를 추출하기 위하여 생멍게를 사용하였다.

2 1. 방법

2 1. 1 멍게 체액세포의 산추출

살아있는 상태의 멍게를 70% 에탄올로써 표피를 세척한 후, 멍게의 출수구를 횡으로 절개하여 체액을 25mg EDTA가 담겨진 50ml 튜브에 직접 모았다. 이 때 거즈 등을 이용하여 불순물은 여과시키도록 했다. 추출한 체액은 4℃에서 5분간 2,000rpm에서 원심분리하였고, 침전물로써 얻어진 체액세포들을 0.34M sucrose 30ml에 용해시켜 같은 조건으로 원심분리 시켰다. 다시 침전물로써 얻어진 체액세포들은 실험할 때까지 -70℃에 보관하였다.

2 1. 2 체액세포로부터 항균물질 분리·정제

Gel Permeation Chromatography

체액세포의 산추출물들을 5% acetic acid로 평형이 유지된 Sephadex G-50 column (1.2 × 120cm)에 통과시켰다. 이 때 flow rate는 12ml/hr로 10분에 한 fraction씩 분획하였다. 각 fraction들은 280nm에서 흡광도를 측정하였다.

Preparative Acid-Urea PAGE

Preparative AU-PAGE는 Harwig SSL et al.(1993)의 방법대로 수행되었고; flow rate는 60ml/hr로 하였으며, 2ml을 한 fraction으로 수거하였다.

RP-High Performance Liquid Chromatography

Preparative AU-PAGE를 통해 얻은 fraction들을 5번 단위의 간격으로 overlay assay하여 항균활성을 확인하였다. 활성을 지닌 fraction들을 모아 Speed-Vac으로 농축하였다. 농축된 샘플들을 HPLC system (Gilson 512)에 장착된 C_{18} Reversed-Phased Column (218TP54 Vydac Co. USA)을 통하여 용출시켰다.

Cut-off process

한외여과용 튜브는 규격에 따라 Vivaspin Concentrator 100, 50, 30,10 kDa (Vivascience, USA)를 사용하였다.

2 1. 3 항균활성 분석

Ultrasensitive radial diffusion assay

활성 확인할 샘플을 Speed-Vac(Bioneer, Korea)으로 완전히 건조시키고 6㎕의 0.01% acetic acid에 용해시켰다. 4×10^6 colony forming unit (CFU)로 계산된 log-phase의 균주를 포함한 underlay agar에 일정한 간격으로 직경 3mm의 hole을 뚫은 후, 준비된 샘플 5㎕를 각 hole에 넣었다. underlay agar plate를 뒤집은 상태로 37℃에서 역시 뒤집은 상태로 overnight 배양하여, 균의 생장억제로 나타나는 clear zone의 크기로 항균활성의 정도를 확인하였다. 본 실험에서 clear zone의 직경 0.1mm를 1unit에 해당하는 항균활성으로 정하였다.

Overlay assay

항균활성을 측정하려는 샘플들은 우선 AU-PAGE와 Radial diffusion을 접목시킨 실험방법인 overlay assay를 통하여 단백질 band와 항균활성을 동시에 확인하였다.

2 1. 4 항균물질 분석

Acid Urea-PAGE

본 전기영동 gel은 stacking gel이 없는 12.5%의 continuous gel이 사용되었고 running buffer로는 5% acetic acid가 사용되었다. 전기영동한 겔은 Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma, USA)으로 염색하고 탈색하여 확인하였다.

Tricine SDS-PAGE

4% stacking gel과 16.5% separating gel에 upper buffer로 anode buffer (0.4M Tris, 0.4M Tricine, 0.4% SDS)와 low buffer에 cathode buffer(0.8M Tris)를 사용하여 전기영동하였다. 전기영동한 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였고, 염색된 gel은 Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma, USA)으로 염색하고 탈색하여 확인하였다.

2 1. 5 단백질 정량

본 실험에서는 단백질 정량은 Bicinchoninic acid (BCA) assay (Smith et al., 1985) 방법을 통하여 결정되었다.

3. 결 과

3 1. 항균 펩타이드의 분리 · 정제

5% acetic acid로서 산추출한 추출물을 GPC (Sephadex G-50) 컬럼, Preparative AU-PAGE, RP-HPLC를 이용하여 분리 · 정제하였다. 46분 전후로 하여 단일 피크로 보이는 피크 3개를 Tricine SDS-PAGE하였다. 그 결과 그림 1에서 보듯이 6kDa이하의 항균펩타이드들이 발견되어졌다.

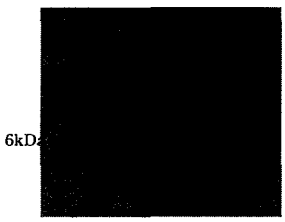

Figure 1. Tricine SDS-PAGE. 1: Low range marker, 2:,18di(the antipeptide from similiar tunicates), 3: peak1 from RP-HPLC , 4:,peak2 from RP-HPLC, 5: peak3 from RP-HPLC

3 2. 항균제재로서의 펩타이드

한외여과 막분리를 통한 항균물질 분리

In vitro상에서 100, 50, 30, 10 kDa 규격의 한외여과막 튜브의 여과물과 비여과액의 항균력을 비교한 결과, 항균물질로 사료되는 100 kDa 이하의 물질들(여과액)에서 현저한 차이를 볼수 있었다.

하지만, 각각의 여과액들의 항균활성은 거의 일정한 활성을 보였다.(data not shown)

100kDa 한외여과 막분리 여과물의 항균효과

100 kDa 한외여과막으로 분리된 여과액은 타 여과막의 여과액과 비교하여 항균활성의 차이가 뚜렷히 나타나지는 않았지만 상대적 단백질량이 많아서 경제적인 부분에 도움이 될 것이라고 생각되었다. 그래서, colonical counting assay를 이용하여 100kDa의 여과액 10-200ppm 농도에서 8종의 식중독균에 대하여 확인해본 결과 10^4 의 균수를 감소시켰다.(data not shown)

조 추출물의 항균활성 안정성 확인

항균활성의 한외여과 여부, 열처리 여부에 대한 조추출물의 안정성을 보기 위하여 조 추출물 원액, 30kDa cut-off 여과액, 30kDa cut-off 비여과액, 100℃ 열처리된 조 추출액에 대한 항균활성을 Radial diffusion assay로 확인해 본 결과 비여과된 액과 조 추출물 원액보다 여과된 액에서 활성이 더 컸으며, 100℃ 열처리된 원액도 최초 원액과 활성의 차이가 없었다.(data not shown)

4. 결 론

본 연구에서 멍게 추출물을 분리 · 정제한 결과 항균 펩타이드가 6 kDa 이하의 분자량을 가진 것으로 밝혀졌으며, specific activity를 보기 위해 100, 50, 30, 10kDa 규격으로 한외여과한 후, 여과액으로 활성을 확인한 결과 거의 비슷한 활성을 보였다. 그래서 100kDa 이하 분자량을 가진 여과된 액의 항균효과 확인을 명확하게 확인해 본 결과 100kDa의 여과액 10-200ppm 농도의 멍게 부분 정제물에 대한 항균효과는 8종의 균에 대해 전반적으로 10^4 정도의 수치를 감소시켰다. 차후 항균제재로서의 가능성을 높이기 위해서 먼저 열에서의 안정성을 확인해 본결과 100℃에서도 항균력의 차이가 없었다. 차후 상용화 항균제재로서의 활용을 위해 기초자료로서 물리화학적 안정성에 대한 결과들이 기대되는 바이다.

5. 참고문헌

[1] Jang, W. S., Kim, K. N., Lee, S. Y., Nam, M. H. and Lee, I. H. "Halocydin : a new antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium*". FEBS Letters, 2002.

[2] Harwig SSL Chen NP, Park ASK, Lehrer RI "Purification of cysteine-rich bioactive peptides from leukocytes by continuous acid-urea poly-acryl-amide gel electrophoresis." Anal. Biochem. 1993.

[3] Schagger H, von Jagow G. "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoreisis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal. Biochem. 1987.

[4] Zasloff M. "Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987.

[5] Park, C. B., Lee I. H.,Park I. Y., Kim, M. S. and

Kim, S. C. "A novel antimicrobial peptide from the loach, Misgurnus anguillicaudatus", FEBS Letters, 1997.
[6] Lubke K., Matthes S., Kloss G. "Isolation and structure of N1-formyl melittin. Experientia." 1971.