

한국산 어류 8종 추출물의 생리활성

배윤정 · 김찬희 · 김은정 · 고혜진 · 김인혜 · 박희연¹ ·
윤호동¹ · 장영채² · 홍용기 · 박남규*
부경대학교 수산과학대학 생물공학과, ¹국립수산과학원 생명공학연구단,
²대구가톨릭대학교 의과대학

Biological Activity of the Extracts of the Eight Korean Fish Species

Yun Jung BAE, Chan-Hee KIM, Eun Jung KIM, Hye-Jin GO, In Hae KIM,
Hee Yeon PARK¹, Ho Dong YOON¹, Young-Chae CHANG²,
Yong-Ki HONG and Nam Gyu PARK*

Department of Biotechnology and Bioengineering, College of Fisheries Science,
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

¹Biotechnology Research Center, National Fisheries Research &
Development Institute, Busan 619-900, Korea

²Department of Pathology, School of Medicine, Catholic University of Daegu,
Daegu 705-718, Korea

A search for contraction and relaxation responses on the smooth muscles, antimicrobial and antioxidant activity in different body parts of 4 freshwater fish and 4 marine fish were conducted. The four freshwater fish studied were *Sarotherodon niloticus* (tilapia), *Channa arus* (snake head), *Cyprinus carpio* (Israel carp) and *Silurus osotus* (catfish), and the four marine fish were *Scyliorhinus torazame* (tiger shark), *Atelepus japonicus* (tadpole fish), *Mugil cephalus* (gray mullet) and *Thamnaconus modestus* (file fish). Frozen samples were extracted with distilled water containing 1% acetic acid. Antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* was detected in extracts from several tissues in all species tested. Relatively high antimicrobial activity could also be detected in the bile extracts from *C. carpio*, *M. cephalus*, and *T. modestus*. Contraction and relaxation responses on smooth muscles could be detected in all species tested, especially in the intestine extracts. Antioxidant activity was also detected in extracts from several tissues in all species tested, while in the extracts from *S. osotus*, excluding livers and spleens, no antioxidant activity was detected. Results from this study suggest that fish are a potential source for the discovery of novel bioactive materials.

Key words: Fish, Antimicrobial activity, Contraction and relaxation response, Antioxidant activity

서 론

최근 해양에 서식하고 있는 척추동물 및 무척추동물로부터 항균, 항곰팡이, 신경전달물질, 항산화물질과 같은 생리활성 물질이 정제되고 있다 (Donia and Hamann, 2003).

해양생물들은 특히 수중에서 생활하기 때문에 육상생물보다 세균에 감염 될 가능성이 더 높지만, 이들로부터 자기 자신들을 보호하기 위해서 생체내에서 방어물질을 생산하여 세균에 대항한다. 우수한 항균 및 항곰팡이 능력을 지닌 대표적인 물질로서는 개상어 간에서 squalamin (Moore et al., 1993), 넙치 피부의 점액조직에서 hipposin (Birkemo et al., 2003), 참돔의 아가미로부터 chrysophysin (Iijima et al., 2003), 메기 피부로부터 HLP (histone-like proteins) (Rovinetto et al., 1998), hybrid striped bass로부터 piscidins (Silphaduang and Noga, 2001)와 moronecidin (Lauth et al., 2002) 등이 발견되었다.

신경전달물질로서는 1962년 나지의 타액선으로부터 eledosin이 발견된 이후 (Erspamer and Anastasi, 1962) 하등동물에서부터 인간에 이르기까지 다양한 생물의 조직으로부터 신경성 펩타이드들 (neuropeptides)이 발견되었다 (Krieger, 1986). 신경성 펩타이드는 신호전달물질로서 신경계에서 신호전달 및 조절 역할을 하며, acetylcholine (ACh)과 같은 비펩타이드성 transmitter와 함께 방출된다고 알려져 있다 (Elliott and Barchas, 1979; Krieger, 1983). 이들은 평활근의 운동조절, 혈관의 수축 및 이완, 통증전달 및 혈압 조절 등의 역할을 담당하고 있으며 (Zadina et al., 1986), oxytocine/vasopressin family, growth hormone releasing factor family와 substance P (SP)/tachykinin family 등이 척추동물 및 무척추동물에서 광범위하게 발견되어 종들 간의 상관관계와 진화과정에 관한 정보를 제공하고 있다 (Hoyle, 1998). 또한 이들 물질들은 다양한 종류의 해양생물들로부터도 발견되었다 (Chauvet et al., 1994; Holmgren and Jensen, 2001; Irwin and Wong, 1995; Iwakiri et al., 1990; Jensen

*Corresponding author: ngpark@pknu.ac.kr

and Colon, 1992; Rinehart, 1983; McMasters et al., 1992; McRory et al., 1997; Parker et al., 1993; Salzet et al., 1993; Waugh et al., 1993; Waugh et al., 1995)

한편, 항산화제는 식품첨가물로 이용되면서 식품산업에 있어서 중요한 위치를 차지하는 물질이었으나 free radical이 노화, 암, 돌연변이 유발 등을 일으키는 요인으로 지적되면서 현재는 노화억제와 질병치료제로써 주목을 받고 있다 (Ames et al., 1993; Rice-Evans and Miller, 1996). 이러한 항산화제로, tert-butylhydroxytoluene (BHT), tert-butylhydroxyanisol (BHA) 등의 합성 항산화제와 α -tocopherol, vitamin C, carotenoids, flavonoids 등과 같은 천연 항산화제가 일반적으로 사용되고 있지만 보다 더 안전하면서 활성이 높은 항산화제를 천연물에서 탐색하는 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Kang et al., 2003; Kim et al., 1997; Koshino et al., 1996; Park et al., 1991). 또한 해양생물들로부터도 항산화 활성을 나타내는 mycosporin-like amino acids (MAAs)가 존재함이 보고되었다 (Dunlap and Yamamoto, 1995).

따라서 본 연구에서는 한국산 담수어 4종인, 틸라피아 (*Sarotherodon niloticus*), 가물치 (*Channa argus*), 향어 (*Cyprinus carpio*) 및 메기 (*Silurus osotus*)와 해수어 4종인, 개상어 (*Scyliorhinus torazame*), 꼬리치 (*Ateleopus japonicus*), 송어 (*Mugil cephalus*) 및 쥐치 (*Thamnaconus modestus*)를 사용하여 조직별로 추출한 후 항균, 항곰팡이, 평활근 수축과 이완작용 및 항산화 활성을 살펴보았다.

재료 및 방법

일반시약

Tryptic Soy Broth (TSB), Yeast Extract, Tryptone (Pancreatic digest of casein), Agarose (Low EEO), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 및 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222)는 Sigma사 (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 또한 Streptomycin sulfate 및 Potatoes Dextros Borth (PDB)는 Gibco BRL사 (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다.

실험동물

실험에 사용한 8종의 어류는 남천동 해변시장에서 살아있는 상태로 구입하였다. 담수어는 역돔 (*Sarotherodon niloticus*), 가물치 (*Channa arus*), 향어 (*Cyprinus carpio*) 및 메기 (*Silurus osotus*)를 사용하였으며, 해수어는 두툽상어 (*Scyliorhinus torazame*), 꼬리치 (*Atelepus japonicus*), 송어 (*Mugil cephalus*) 및 쥐치 (*Thamnaconus modestus*)를 각각 2마리씩 사용하였다.

조직 추출물의 조제

어류는 살아있는 상태로 MS-222로 마취하였다. 마취한 어류들은 각각 아가미 (gill), 비장 (spleen), 장관 (intestine), 간 (liver), 신장 (kidney), 담낭 (bile), 알 (egg) 및 피부 (skin)로 분리하여 중류수로 조직을 세척하였다. 분리한 조직 및 장기들은 1% acetic acid에 1:4 (w/v)의 비율로 혼합한 후 단백질을

제거하기 위해서 10분간 끓인 후, 조직을 파쇄하여 원심분리 (10°C, 45분, 15,000×g)하였다. 상층액은 각각 모아두고, pellet은 다시 동일한 조건으로 추출하였고, 상층액은 농축하여 동결건조 하였다.

항균 및 항곰팡이 활성 측정

세균에 대한 항균활성의 측정은 radial diffusion assay법 (Lauth et. al., 2002)으로 행하였으며, 항균활성을 측정하기 위해서 gram-positive bacteria인 *Bacillus subtilis* PM125 (*B. subtilis* PM125)와 gram-negative bacteria인 *Escherichia coli* D31 (*E. coli* D31)를 사용하였다. *B. subtilis* PM125와 *E. coli* D31는 각각 부경대의 어병진단학 실험실 및 미국 노스캐롤라이나 주립대학교의 수산의약품 연구실로부터 제공받았다. 각 균주는 TSB에 37°C에서 하루동안 배양하였다. 배양한 균주는 원심분리 (10분, 2,000×g)한 후 0.1 M phosphate buffer (PBS, pH 6.7)로 3회 반복하여 세척한 후 균액 ($A_{570\text{nm}}=0.1$)을 tryptic soy agar (TSA) 배지와 혼합하였다. 사용한 TSA 배지의 조성은 다음과 같다: 5×LB broth 20.7 mL, 0.1 M PBS (pH 6.7) 20.7 mL, deionized water 58.6 mL, low EEO agarose 1.57 g, NaCl 0.5 g, Streptomycin sulfate 10 mg.

준비한 배지에 2 mm 되는 구멍을 만든 후, 어류조직 추출물을 주입하였다. 37°C에서 하루 동안 배양한 후, 생성되는 clear zone의 크기로 항균활성의 정도를 확인하였다. 동결건조한 각각의 추출물들로부터 3 mg을 취하여 0.01% 초산용액 1 ml에 녹인 후, 총 시료의 1/50씩을 항균활성 측정에 사용하였다.

항곰팡이 활성은 *Candida albicans* (*C. albicans*)를 사용하였다. Potato dextros agar plates (PDA)에서 전 배양한 *C. albicans*를 potato dextros broth (PDB)에 접종시킨 후 30°C에서 48시간 동안 배양하여 1×10^6 CFU/mL이 되도록 준비하였다. 곰팡이액 100 μ L와 100 μ L 0.01% 초산에 녹인 시료를 96 well plate에 각각 주입한 후, 30°C에서 24시간 동안 배양한 후 620 nm에서 OD값을 측정하여 활성의 정도를 확인하였다.

어류의 장관에 대한 수축활성의 측정

어류의 장관에 대한 수축활성의 측정을 위하여 담수어인 메기와 해수어인 먹장어 (*Eptatretus burgeri*)의 장관을 사용하여 이전의 연구 (Shin et al., 2003)에 의한 방법과 동일하게 측정하였다. 동결건조한 각각의 추출물들로부터 2 mg을 취하여 0.01% 초산용액 1 mL에 녹인 후, 총 시료의 1/50씩을 사용하여 수축활성을 측정하였다.

메기 장관의 수축활성 측정에 사용한 생리용액의 조성은 다음과 같다: NaCl 100.8 mM, KCl 2.5 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mM, KH_2PO_4 1.1 mM, MgSO_4 1.2 mM, NaHCO_3 25.0 mM, Glucose 11.1 mM. 한편, 먹장어 장관의 수축활성 측정에 사용한 생리용액의 조성은 다음과 같다: NaCl 445 mM, KCl 10 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 55 mM, Glucose 10 mM. 추출물에 의한 수축력은 먹장어 장관에 대해서는 10^{-7} M의 carbachol에서, 메기 장관에 대해서는 10^{-5} M의 carbachol

에서 유도된 수축력에 대한 상대적인 수축력으로 나타내었다.

Guinea-pig aorta (GPA)에 대한 이완활성의 측정

Male Hartley계 guinea-pig (300-350 g)을 decapitation하여 복부를 절개한 후 척추를 따라 위치한 aorta를 절취하였다. 절취한 aorta의 결체조직을 제거하고, 2 mm 정도의 고리를 만들어 Force Displacement Transducer (NEC-Sanei, Tokyo, Japan)와 5 mL 반응조와 연결된 L-type wire에 걸었다. 반응조에 담겨진 혈관은 1 g 장력이 유지되도록 90분간 평형화 시켰고, 10분 간격으로 완충용액을 교체해 주었다. 1 g 장력이 유지되면 50 mM high-K⁺ 용액으로 3회 활성화 시켰고, 이후 혈관 수축 물질인 10⁻⁵ M의 prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α})를 이용하여 수축시킨 후 시료를 투여하였다. 각각의 추출물들로부터 4 mg을 취하여 0.01% 초산용액 1 mL에 녹인 후, 총 시료의 1/50씩을 사용하여 이완활성을 측정하였다. 이와 같은 모든 과정은 Krebs's 완충용액 하에서 이루어졌으며, 조성은 다음과 같다: NaCl 118.7 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 24.8 mM, Glucose 10.1 mM.

Guinea-pig ileum (GPI)에 대한 수축활성의 측정

Male Hartley계 guinea-pig (300-350 g)을 decapitation하여 복부를 절개한 후 ileum을 재빨리 적출하여 longitudinal muscle을 분리하였으며, 1-2 cm의 단편으로 만들어 Force Transducer (Narco F-60, Narco Biosystem Inc., U.S.A.)와 지지대에 연결하였다. 1 g의 장력이 유지되도록 90분간 평형화 시켰으며, 10분 간격으로 완충용액을 교체해 주었다. 1 g 장력이 유지되면 10⁻⁵ M의 carbachol을 이용하여 3회 활성화 시켰고, 이후 시료를 적용하였다. 시료의 활성은 carbachol 수축반응을 100%로 하여 시료의 수축 활성을 상대적 %로 나타내었다. 각각의 추출물들로부터 4 mg을 취하여 0.01% 초산용액 1 mL에 녹인 후, 총 시료의 1/50씩을 사용하여 활성을 측정하였다. GPA 실험에 사용한 Krebs's 완충용액의 조성은 동일한 것을 사용하였으며, 반응조는 95% O₂와 5% CO₂로 20분간 포화시킨 후

37°C로 유지되었다.

항산화 활성의 측정

각 추출물은 수분을 완전히 제거하여 4 mL methanol에 용해 시켰다. DPPH는 methanol에 녹여 1.5×10⁻⁴ M이 되도록 준비하였다. 각각의 추출물들로부터 3 mg을 취하여 0.01% 초산용액 1 mL에 녹인 후, 총 시료의 1/50씩을 사용하여 활성을 측정하였다. 1 mL DPPH solution과 추출물의 1/50이 포함된 4 mL를 UV cuvet에서 혼합하여 즉시 520 nm에서 OD값을 측정하였고, 실온에서 30분간 방치한 후 OD 값을 다시 측정하였다. 대조구 (control)로 1 mL DPPH 용액에 4 mL methanol을 혼합한 것을 사용하였다. Radical scavenging effect (RSE)의 활성은 다음 식으로 계산하였다.

$$RSE (\%) = [1 - (OD \text{ of sample} / OD \text{ of control})] \times 100$$

결 과

항균 및 항곰팡이 활성

8종의 어류 조직으로부터 추출한 추출물들의 항균 및 항곰팡이 활성을 조사하기 위해 gram-positive bacteria인 *B. subtilis* PM125, gram-negative bacteria인 *E. coli* D31 및 *C. albicans*를 사용하였다.

담수어 4종의 조직 추출물들을 사용하여 *B. subtilis* PM125와 *E. coli* D31에 대한 항균활성을 조사하였다 (Table 1). 틸라피아와 가물치는 아가미와 비장 추출물에서만 각각 *B. subtilis* PM125 및 *E. coli* D31에 대해 항균반응을 나타냈으며 다른 조직들의 추출물들은 항균반응을 나타내지 않았다. 향어의 경우 담낭, 비장 및 피부 추출물 순으로 *B. subtilis* PM125에 대해 반응을 보였다. 그리고 *E. coli* D31에 대해서는 bile 추출물이 매우 강한 활성을 나타내었고 비장, 간, 신장 및 알 추출물은 유사한 세기의 항균반응을 나타냈다. 특히 담낭 추출물은 다른 조직추출물들보다 *B. subtilis* PM125 및 *E. coli* D31에 대해 강한 활성을 보였다. 한편 메기의 피부 및 알 추출물은

Table 1. Antimicrobial activity for the extract of the freshwater fish tissue against *B. subtilis* PM125 (Bs) and *E. coli* D31 (Ec)

Extracts	Species	Tilapia (<i>S. niloticus</i>)		Snake head (<i>C. argus</i>)		Carp (<i>C. carpio</i>)		Catfish (<i>S. osotus</i>)	
		Bs	Ec	Bs	Ec	Bs	Ec	Bs	Ec
Gill		++	-	+	-	-	-	-	-
Spleen		-	+	+	+	++	+	-	+
Intestine		-	-	-	-	-	-	-	-
Liver		-	-	nt	nt	-	+	-	-
Kidney		-	-	nt	nt	-	+	nt	nt
Bile		-	-	-	-	+++	+++	-	-
Skin		-	-	nt	nt	+	-	+	-
Egg		-	-	nt	nt	-	+	++	-

The final concentration of the extracts used in all species were 12 µg/mL, respectively. -, no antimicrobial activity; +, antimicrobial activity when the size of clear zone is lower than 5 mm; ++, antimicrobial activity when the size of clear zone is between 5 mm and 10 mm; +++, antimicrobial activity when the size of clear zone is over 10mm; nt, not tested.

B. subtilis PM125에 대해 활성을 보였고, 비장 추출물은 *E. coli* D31에 대해 항균반응을 나타냈다.

해수어 4종의 조직 추출물들을 사용하여 *B. subtilis* PM125와 *E. coli* D31에 대한 항균활성을 조사하였다 (Table 2). 두툽상어는 피부와 비장 추출물에서만 각각 *B. subtilis* PM125 및 *E. coli* D31에 대해 항균반응을 나타냈으며 다른 조직들의 추출물들은 항균반응을 나타내지 않았다. 꼬리치는 피부 추출물만이 *B. subtilis* PM125에 대해 반응을 보였다. 송어의 경우 피부 및 담낭 추출물은 *B. subtilis* PM125에 대해 반응을 보였으며, 비장, 신장 및 담낭 추출물은 *E. coli* D31에 대해 항균반응을 나타냈다. 한편 쥐치의 신장 추출물은 *B. subtilis* PM125에 대해 활성을 보였고, 비장 및 담낭 추출물은 *E. coli* D31에 대해 항균반응을 나타냈다. 향어와 마찬가지로 송어와 쥐치의 담낭 추출물은 10 mm 이상의 clear zone을 형성하는 강력한 항균효과를 나타내었다.

8종의 어류의 추출물들을 사용하여 항곰팡이 활성을 측정한 결과, 대부분의 비장 추출물에서 그리고 어종별로 차이가 있지만 피부 및 알 추출물에서 *C. albicans*에 대한 항곰팡이 활성이 관찰되었다 (data not shown).

먹장어 및 메기 장관에 대한 수축 활성

어류 조직 추출물들의 평활근 수축작용을 조사하기 위해서 먹장어와 메기 장관을 사용하였으며, 각각 10^{-7} 및 10^{-5} M의 carbachol에 의해 유도된 100% 수축력에 대해 상대적인 수축 활성의 %를 나타내었다.

Table 3은 먹장어와 메기의 장관에 대한 담수어 4종의 조직 추출물의 평활근 수축 반응을 나타낸다 (Table 3). 대부분의 틸라피아 추출물들은 먹장어 장관에 대해 반응을 나타냈지만, 메기의 장관에 대해서는 장관과 신장 추출물만 반응을 나타내었다. 가물치는 사용한 2종류의 장관에 대해 아가미, 비장 및 장관 추출물에 대해서 반응을 나타냈지만, bile 추출물은 반응을 보이지 않았다. 한편, 향어 및 메기의 대부분의 추출물들은 평활근 수축작용을 나타내었다. 특히 메기의 경우, 알 추출물은 300% 이상의 수축력을 그리고 아가미, 장관, 신장 및 피부 추출물들 또한 150-250%의 높은 수축작용을 보였다.

Table 4는 먹장어와 메기의 장관에 대한 해수어 4종의 조직 추출물의 평활근 수축 작용을 나타낸다. 대부분의 두툽상어 및 꼬리치 추출물들은 먹장어와 메기의 장관에 대해 높은 반응을 나타내었다. 그중에서도 두툽상어는 장관 추출물에서,

Table 2. Antimicrobial activity for the extract of the seawater fish tissue against *B. subtilis* PM125 (Bs) and *E. coli* D31 (Ec)

Extracts	Species	Tiger shark (<i>S. torazame</i>)		Tadpole fish (<i>A. japonicus</i>)		Gray mullet (<i>M. cephalus</i>)		File fish (<i>T. modestus</i>)	
		Bs	Ec	Bs	Ec	Bs	Ec	Bs	Ec
Gill		-	-	-	-	-	-	-	-
Spleen		-	+	-	-	-	+	-	+
Intestine		-	-	-	-	-	-	-	-
Liver		-	-	-	-	-	-	-	-
Kidney		-	-	-	-	-	+	++	-
Bile		-	-	-	-	+++	+++	-	+++
Skin		+	-	+	-	+	-	-	-
Egg		-	-	-	-	-	-	-	-

The final concentration of the extracts used in all species were 12 μ g/mL, respectively. -, no antimicrobial activity; +, antimicrobial activity when the size of clear zone is lower than 5 mm; ++, antimicrobial activity when the size of clear zone is between 5 mm and 10 mm; +++, antimicrobial activity when the size of clear zone is over 10 mm; nt, not tested.

Table 3. Contractile activity for the extract of the freshwater fish tissue on the hagfish (*E. burgeri*) and catfish (*S. osotus*) intestine. Contractile effects were expressed as % the maximal response to carbachol, 5×10^{-7} M on the hagfish intestine and carbachol, 10^{-5} M on the catfish intestine

Extracts	Species	Tilapia (<i>S. niloticus</i>)		Snake head (<i>C. argus</i>)		Garp (<i>C. carpio</i>)		Catfish (<i>S. osotus</i>)	
		hf	cf	hf	cf	hf	cf	hf	cf
Gill		82	0	96	80	83	90	150	220
Spleen		0	0	118	42	17	50	120	146
Intestine		100	70	46	96	104	90	182	271
Liver		82	0	nt	nt	45.8	57	118	171
Kidney		73	50	nt	nt	79	70	151	250
Bile		0	0	0	0	50	30	nt	nt
Skin		nt	0	nt	nt	50	36	120	200
Egg		82	0	nt	nt	0	0	317	308

The final concentration of the extracts used in all species were 20 μ g/mL, respectively. hf, hagfish; cf, catfish; nt, not tested.

Table 4. Contractile activity for the extract of the seawater fish tissue on the hagfish (*E. burgeri*) and catfish (*S. osotus*) intestine. Contractile effects were expressed as % the maximal response to carbachol, 5×10^{-7} M on the hagfish intestine and cabachol, 10^{-5} M on the catfish intestine

Extracts	Species	Tiger shark (<i>S. torazame</i>)		Tadpole fish (<i>A. japonicus</i>)		Gray mullet (<i>M. cephalus</i>)		File fish (<i>T. modestus</i>)	
		hf	cf	hf	cf	hf	cf	hf	cf
Gill		77	43	115	168	107	46	38	42
Spleen		77	40	135	155	40	42	56	58
Intestine		155	153	110	100	157	96	100	63
Liver		118	77	280	114	50	0	72	40
Kidney		nt	nt	115	159	43	0	19	63
Bile		64	0	60	50	0	0	0	0
Skin		27	200	145	145	67	42	38	125
Egg		0	35	200	200	100	nt	88	67

The final concentration of the extracts used in all species were 20 μ g/mL, respectively. hf, hagfish; cf, catfish; nt, not tested.

Table 5. Relaxation activity for the extract of the fish tissue on the guinea-pig aorta

Species	Extracts	Gill	Spleen	Intestine	Liver	Kidney	Bile	Skin	Egg
Tilapia (<i>S. niloticus</i>)		-	-	-	-	++	nt	-	-
Snake head (<i>C. argus</i>)		++	++	++	nt	nt	+	nt	nt
Carp (<i>C. carpio</i>)		-	nt	-	+	+	+++	nt	-
Catfish (<i>S. osotus</i>)		+	++	++	-	+	nt	nt	nt
Tiger shark (<i>S. torazame</i>)		-	-	++	+++	nt	-	-	-
Tadpole fish (<i>A. japonicus</i>)		-	+	-	-	-	-	-	++
Gray mullet (<i>M. cephalus</i>)		-	-	++	++	-	-	-	nt
File fish (<i>T. modestus</i>)		++	-	-	-	-	-	++	-

The final concentration of the extracts used in all species were 16 μ g/mL, respectively. hf, hagfish; cf, catfish; nt, not tested. -, no relaxation activity; +, weak relaxation activity; ++, moderate relaxation activity; +++, strong relaxation activity; nt, not tested.

꼬리치는 알, 간, 아가미 및 비장 추출물 순으로 높은 반응이 관찰되었다. 송어는 담낭 추출물을 제외하고는 먹장어 장관에서 수축반응을 나타냈지만, 메기의 장관에 대해서는 아가미, 비장, 장관 및 피부 추출물만 반응을 보였다. 쥐치의 경우에 있어서도 담낭 추출물을 제외하고는 먹장어 및 메기의 장관에서 수축반응을 나타냈다. 그러나 꼬리치의 추출물들에 비해서는 상대적으로 약간 낮은 활성이 관찰되었다. 담수어와 유사하게 해수어의 경우도 대체적으로 아가미, 비장 및 장관 추출물들에서 강한 평활근 수축 작용이 관찰되었다.

GPA에 대한 이완 활성

GPA에 대한 어류 조직 추출물의 이완 활성 효과를 측정하였다 (Table 5). 가물치와 메기는 아가미와 비장 추출물에서 모두 반응을 나타냈지만, 쥐치는 아가미 추출물에서 그리고 꼬리치는 비장에서만 이완활성을 나타냈다. 장관 추출물의 경우, 가물치, 메기, 두릅상어 및 송어는 서로 유사한 이완반응을 보였으며, 간 추출물의 경우는 향어와 송어보다는 두릅상어에서 약간 더 높은 반응이 관찰되었다. 홍미롭게도 담수어인 툴라피아, 향어 및 메기로부터의 신장 추출물은 이완반응을 나타냈지만 해수어 유래의 신장 추출물들은 반응을 나타내지 않았다. 담낭의 경우 신장과 마찬가지로 가물치와 향어에

서는 반응이 관찰되었지만, 해수어에서는 이완효과가 없었다. 한편, 피부와 알 추출물은 각각 쥐치와 꼬리치에서만 이완반응을 나타냈다.

GPI에 대한 수축 활성

Fig. 1은 메기 추출물들을 사용하여 GPI에 대한 수축반응을 나타낸 것이다. 메기의 간, 아가미, 장관 및 신장 추출물은 평활근에 대해 강한 수축반응을 나타냈으며, 송어 및 메기의 추출물들에 대한 수축 활성의 결과를 나타내었다 (Table 6). 송어와 메기는 아가미, 장관 및 간에서 공통적으로 수축 반응을 보였다. 그러나 신장 추출물의 경우, 메기에서는 반응을 나타냈지만 송어에서는 수축효과가 관찰되지 않았다. 또한 송어의 담낭 추출물도 GPI에 대해 수축활성을 나타내었다. 한편 송어의 경우, 장관 추출물이 다른 조직의 추출물보다 더 높은 반응을 보였으며, 메기에서는 신장 추출물이 다른 조직 추출물보다 다소 높은 수축효과를 나타내었다.

항산화 활성

어류 조직 추출물들의 항산화 활성을 알아보기 위해서 DPPH를 사용하여 RSE를 조사하였다. 항산화 활성 측정에 대한 대조구로서 Vitamin C를 0.8, 4, 20, 100 및 500 μ g/mL

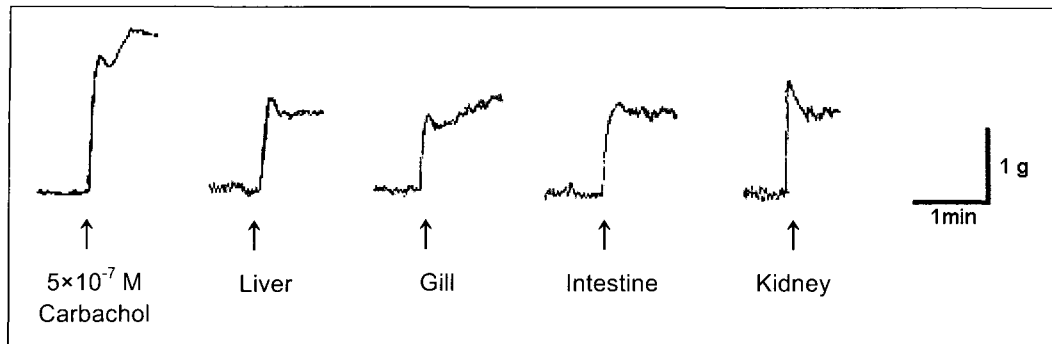


Fig. 1. Typical tracings illustrating the contractile response for the catfish extracts on the guinea-pig ileum. Each arrow represent carbachol (5×10^{-7} M) and the extracts of each tissue applied the ileum. The final concentration of the extracts used in all species were $16 \mu\text{g/mL}$, respectively.

사용하였으며, RSE는 각각 13, 19, 60, 88 및 90%를 나타냈다.

Fig. 2는 담수어 4종의 어류 추출물에 대한 RSE를 조사한 것이다. 틸라피아의 모든 추출물들에서 항산화 효과가 관찰되었으며, 반응의 세기는 알>간>아가미>피부, 비장, 장관>담낭, 신장순으로 나타났다. 가물치는 장관과 비장 추출물에서 약 37%, 아가미 추출물에서 16%의 항산화 활성을 보였다. 그러나 간 추출물은 반응을 나타내지 않았다. 틸라피아와 마찬가지로 향어 역시 실험에 사용된 모든 추출물들에서 반응이 나타났다. 아가미, 신장 및 알 추출물들은 80% 이상의 효과를 나타냈으며, 간과 장관은 각각 47%와 63%의 항산화 효과를 가졌다. 이들에 비해 담낭 및 피부 추출물들은 다소 낮은 효과를 나타냈다. 메기의 경우 간 및 비장 추출물은 각각 50%와 10%의 반응을 보였지만 아가미, 장관, 신장 및 피부 추출물들은 거의 활성을 나타내지 않았다. 홍미류개도 틸라피아, 향어, 메기의 간 추출물들에서는 약 50-70%에 해당되는 항산화 반응이 관찰되었지만 가물치의 간 추출물에서는 반응이 없었다.

Fig. 3은 해수어 4종의 어류 추출물에 대한 RSE를 조사한 것이다. 두툽상어의 경우 아가미, 장관, 간 및 피부 추출물들은 각각 약 80%에 해당되는 비교적 높은 항산화 효과를 나타내었으며, 그 다음으로 담낭과 비장, 알 순으로 반응이 관찰되었다. 꼬리치는 모든 추출물들에서 반응을 나타냈다. 특히 장관, 간 및 알 추출물들은 85-89%, 피부는 74%의 반응을 보였다. 또한 아가미와 담낭 추출물은 둘 다 65%의 활성을 나타냈으며, 비장과 신장에서는 각각 40%와 30%의 활성이 관찰되었다. 송어에 있어서는 피부와 간 추출물이 각각 76%와 73%의 항산화 효과를 나타냈으며, 장관은 44%의 반응을 보였다. 그리고

담낭, 신장, 비장 및 아가미는 대체적으로 10-18%에서 효과를 나타냈다. 쥐치의 장관, 피부 및 알 추출물들은 51-60%에서 그리고 간과 신장은 약 40%의 활성을 보였다. 또한 담낭과 비장 추출물들은 약 30%의 활성을 나타냈다. 그러나 아가미 추출물은 반응을 나타내지 않았다. 특히 해수어의 피부 추출물들은 다른 조직 유래의 추출물보다 높은 항산화 효과를 나타냈으며, 피부 뿐만 아니라 간과 장관 추출물도 다른 조직 유래의 추출물보다 다소 높은 활성을 나타냈다.

고찰

포유동물에 있어서 미생물이 침입하기 용이한 피부, 눈, 호흡기관, 소화기관 등은 자신들을 보호하기 위해 각질층, 점막 및 점액 등에 의해 물리적으로 보호되어져 있다. 어류에 있어서도 외부환경과 직접 접촉하는 피부, 소화관, 아가미 등은 비늘, 표피, 점막상피 등에 의해 보호되어져 있으며 점액세포로부터 분비되는 점액이 그들의 표면을 덮고 있기 때문에 미생물의 부착 및 번식을 억제하고 있다.

어류의 피부 및 아가미로부터 항균성 펩타이드인 Moronecidin (Lauth et al., 2002), histone-like antimicrobial protein (Rovinetto et al., 1998), Chrysopsins (Iijima et al., 2003), Pleurocidin (Cole et al., 1997) 등이 발견되었다. 또한 생체 내에서 비장은 림프구를 만들고 노폐한 적혈구를 파괴하며, 신장은 몸 안의 불필요한 물질을 암모니아로 배설하는 기능을 가지고 있다고 알려져 있다. 최근 돼지의 비장 및 토끼의 신장으로부터도 항균성 펩타이드인 RK-1 (Bateman et al., 1996)과 PR-39 및 NK-lysin (Bonetto et al., 1999)이 각각 정제되었다.

Table 6. Contractile activity for the extract of catfish and gray mullet on the guinea-pig ileum. Contractile effects were expressed as % the maximal response to carbachol, 5×10^{-7} M

Species	Extracts	Gill	Spleen	Intestine	Liver	Kidney	Bile	Skin	Egg
Gray mullet (<i>M. cephalus</i>)		28.6	0	63.6	45.7	0	47.4	nt	nt
Catfish (<i>S. osotus</i>)		50	nt	50	50	66.7	nt	nt	nt

The final concentration of the extracts used in all species were $16 \mu\text{g/mL}$, respectively; nt, not tested.

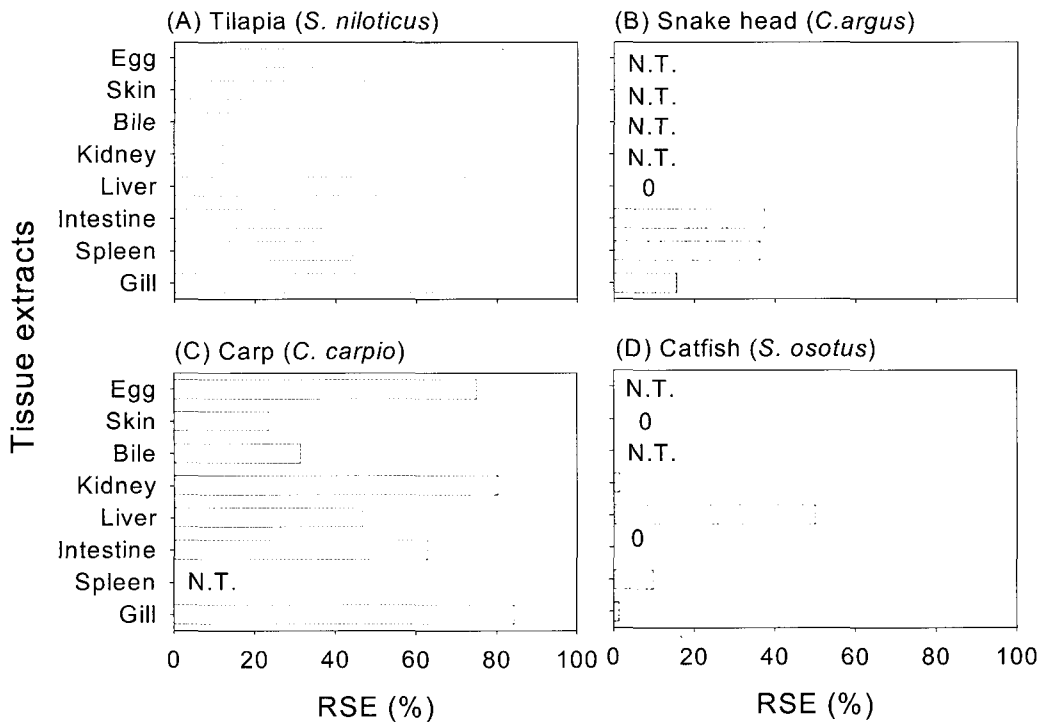


Fig. 2. Radical scavenging activities of various tissue extracts with freshwater fishes, tilapia (A), snake head (B), carp (C) and catfish (D) determined by the reduction of DPPH free radical. The final concentration of the extracts used in all species were 12 μ g/mL, respectively.

한편, 담낭은 간에서 생산된 후, 담낭에 저장되어져 지방을 분해하기 위해서 소장으로 분비되어진다. 담낭은 계면활성제와 같은 bile salt들을 포함하는데, 이들은 세균의 세포막을 파괴하여 세균들을 죽인다고 알려져 있다. (Hofmann, 1998).

본 연구에서는 어류의 다양한 조직별 추출물들의 gram 양성균 및 gram 음성균에 대한 항균활성 및 항곰팡이 활성을 조사하였다 (Table 1과 2). 어종 및 조직별로 활성의 차이가 있지만 항균활성은 주로 아가미, 비장, 신장 및 담낭에서 나타났으며, 피부 및 비장 추출물에서는 항곰팡이 활성이 나타났다 (data not shown). 그러므로 본 연구에 사용된 어류에서도 균에 의한 감염 가능성이 높은 아가미와 피부에는 균의 감염에 대한 비특이적인 면역기능을 수행하는 항균 및 항곰팡이 활성을 가진 펩타이드들이 존재하리라 생각되어진다.

또한 향어와 송어의 담낭 추출물에서는 다른 조직 추출물보다 훨씬 강력한 항균활성이 관찰되었다. 이러한 결과로부터 아마도 송어와 향어의 담낭 추출물에서도 계면활성제와 같은 bile salt들을 존재하고 있음을 시사한다.

담수어와 해수어의 조직 추출물들에 대한 신경성 펩타이드의 존재 여부를 탐색하기 위해 어류의 장관, guinea-pig의 ileum 및 aorta를 사용하여 평활근 수축 및 이완 활성을 측정하였다 (Table 3-6). 실험에 사용한 8종의 어류로부터의 추출물들은 전반적으로 어류의 장관에 대해 수축반응을 나타내었다. 담수어의 경우, 떡장어와 메기 장관에 대한 수축활성의 세기는 메기, 향어, 틸라피아, 가물치 순으로 나타났으며, 조직별 장관

에 대한 수축활성의 세기는 다음과 같은 순으로 나타났다: 장관>아가미>비장>신장>간, 피부>알, 담낭. Table 3에 나타내듯이 메기 조직별 추출물은 다른 3종의 담수어 추출물보다 메기 장관에 대해서 더욱 높은 활성을 나타내었다. 이러한 현상은 메기조직 추출물들이 메기 장관에 대한 특이성에 의한 결과인 것 같다.

한편 해수어의 경우, 어류 장관에 대한 활성은 꼬리치, 쥐치, 두툽상어, 송어 순으로 나타났으며, 조직별 추출물은 다음과 같은 순서대로 수축활성을 나타냈다: 장관>아가미, 비장, 간, 피부, 알>신장>담낭. 담수어와 해수어에서 대체적으로 아가미, 비장 및 장관 추출물들은 강한 평활근 수축 작용을 보였다. 해수어의 피부 추출물들은 장관에 대해 높은 평활근 수축반응을 나타냈지만 담수어의 피부 추출물들에 대해서는 낮은 반응이 관찰되었다.

GPA에 대한 어류 추출물들의 이완 활성의 상대적 세기를 살펴보면 장관>간, 아가미>비장, 신장>담낭>피부, 알 순으로 나타났다 (Table 5). 가물치, 메기, 두툽상어 및 송어의 장관추출물들은 비교적 GPA에 대해 높은 이완효과를 나타냈지만 틸라피아, 향어 및 꼬리치의 경우는 반응을 나타내지 않았다. 또한 다른 조직 유래의 추출물들도 부분적으로 이완효과가 관찰되었다. 그러나 해수어의 신장과 담낭 추출물들은 GPA에 대해 반응을 나타내지 않았다. 한편 GPI에 대해서도 추출물들의 수축반응은 장관, 아가미 및 간에서 수축반응을 나타냈다. 이들 평활근 수축 및 이완의 결과들을 종합해보면 전반적으로

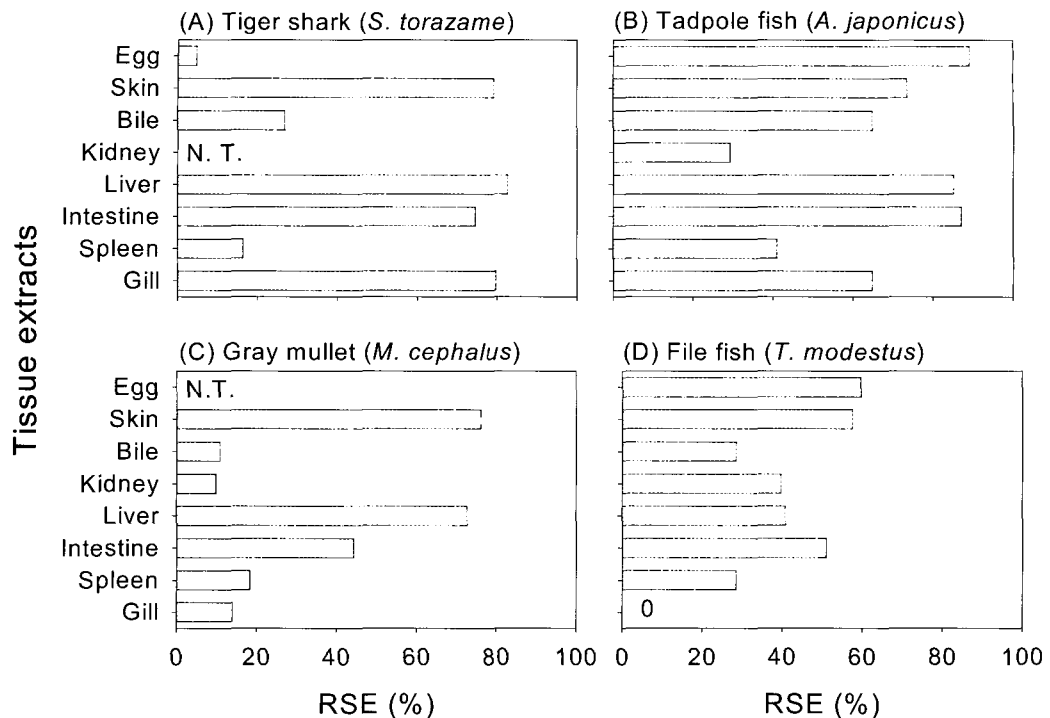


Fig. 3. Radical scavenging activities of various tissue extracts with seawater fishes, tiger shark (A), tadpole fish (B), gray mullet (C) and file fish (D) determined by the reduction of DPPH free radical. The final concentration of the extracts used in all species were 12 μ g/mL, respectively.

장관, 아가미, 간 및 비장 추출물들은 강한 평활근 수축 작용을 보였다. 포유류의 gut에는 다양한 신경성 펩타이드들이 존재하고 있다고 알려져 있다 (Hadley, 1996). 어류의 장관 추출물들이 높은 반응을 나타내는 것으로 보아 어류의 장관에도 새로운 또는 이미 기존에 알려진 신경성 펩타이드들을 많이 내포하고 있으리라 생각된다. 현재까지 어류의 아가미 및 비장으로부터 보고된 신경전달물질은 전무한 실정이다. 본 실험에서 아가미와 비장 추출물들은 장관 추출물보다는 비교적 수축활성이 약하지만 먹장어 및 메기 장관에 대해 현저한 수축 활성을 나타내었다. 이러한 활성의 결과는 아가미와 비장 추출물에 뇌와 장관에 존재하는 신경전달물질과는 다른 새로운 종류의 물질이 존재할 수 있다는 가능성을 제시해 준다.

담수어 및 해수어 추출물들에 대한 항산화 효과를 종합해보면 어류들의 조직마다 radical 소거의 차이는 있지만 주로 아가미, 간, 피부, 알 추출물에서 80%에 달하는 RSE효과를 나타냈다. 특히 틸라피아를 제외한 나머지 담수어의 간 추출물은 50% 이하의 항산화 효과를 보였으나, 해수어의 간 추출물에서 70% 이상의 강한 항산화 효과가 관찰되었다. 이러한 결과는 본 연구에서 사용한 해수어의 간에서 강한 항산화 효과를 가지는 물질이 존재할 가능성을 시사해준다. 어류의 일부 추출물들의 항산화효과는 대조구로 사용한 Vitamin C의 효과와 유사한 활성을 나타내었기 때문에 어류의 조직으로부터도 MAAs (Dunlap and Yamamoto, 1995)와 유사한 유용성 항산화

물질의 존재가 예상되어진다. 따라서 어류는 새로운 생체기능 조절물질의 발견에 대한 가능성을 지닌 자원이라는 것을 본 연구의 결과들은 제시한다.

사 사

본 연구는 2003년도 KSGP (Korea Sea Grant Program) 및 2002년도 동원학술연구재단 (한약제개발연구사업) 연구비에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

- Ames, B.N., M.K. Shigenaga and T.M. Hagen. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7915-7922.
- Bateman, A., R.J. MacLeod, P. Lembessis, J. Hu, F. Esch and S. Solomon. 1996. The isolation and characterization of a novel corticostatin/defensin-like peptide from the kidney. J. Biol. Chem., 271, 10654-10659.
- Birkemo, G.A., T. Luders, Q. Andersne, I.F. Nes and J. Nissen-Meyer. 2003. Hippusin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) Biochim. Biophys. Acta, 1646, 207-215.
- Bonetto, V., M. Anderson, T. Bergman, R. Sillard, A. Norberg, V. Mutt and H. Jornvall. 1999. Spleen anti-

- bacterial peptides: high levels of PR-39 and presence of two forms of NK-lysin. *Cell. Mol. Life Sci.*, 56, 174-178.
- Chauvet, J., Y. Rouille, C. Chauveau, M.T. Chauvet and R. Acher. 1994. Special asvatocin and phasvatocin, two new oxytocin-like peptides in the spotted dogfish (*Scyliorhinus caniculus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 11266-11270.
- Cole, A.M., P. Weis and G. Diamond. 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J. Biol. Chem.*, 272, 12006-12013.
- Donia, M. and M.T. Hamann. 2003. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infect Dis.*, 3, 338-348.
- Dunlap, W.C. and Y. Yamamoto. 1995. Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol.*, 112B, 105-114.
- Elliott, G.R. and J.D. Barchas. 1979. Neuroregulators; neurotransmitters and neuromodulators. *Behavior. Brain Sci.*, 2, 423-424.
- Erspamer, V. and A. Anastasi. 1962. Structure and pharmacological actions of eledoisin, the active undecapeptide of the posterior salivary glands of *Eledone*. *Experientia*, 18, 58-59.
- Hadley, M.E. 1996. *Gastrointestinal Hormones, Endocrinology*, 4th ed., Prentice-Hall Inc., New Jersey, pp. 204-230.
- Hofmann, A.F. 1998. Bile secretion and the enterohepatic circulation of bile acids, In: Sleisenger and Fordtran's *Gastrointestinal and Liver Disease*, 6th ed., Feldman, M.B.F. Scharschmidt, M.H. Sleisenger eds., W.B. Saunders, Co., Philadelphia, pp. 937-948.
- Holmgren, S. and J. Jensen. 2001. Evolution of vertebrate neuropeptides. *Brain Res. Bull.*, 55, 723-735.
- Holye, C.H.V. 1998. Neuropeptide families: evolutionary perspectives. *Reg. Peptides*, 73, 1-33.
- Iijima, N., N. Tanimoto, Y. Emoto, Y. Morita, K. Uematsu, T. Murakami and T. Nakai. 2003. Purification and characterization of three isoforms of chrysopsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*. *Eur. J. Biochem.*, 270, 675-686.
- Irwin, D.M. and J. Wong. 1995. Trout and chicken proglucagon: alternative splicing generates mRNA transcripts encoding glucagon-like peptide. *Mol. Endocrinol.*, 9, 267-277.
- Iwakiri, M., A. Sugiyama, T. Ikeda, Y. Muneoka and I. Kubota. 1990. A novel oxytocin-like peptide isolated from the neural complexes of tunicate, *Styela plicata*. *Zool. Sci.*, 7, 1035-1041.
- Jensen, J. and J.M. Colon. 1992. Substance-P-related and neurokinin-A related peptides from the brain of the cod and trout. *Eur. J. Biochem.*, 206, 659-664.
- Kang, D.G., C.K. Yun and H.S. Lee. 2003. Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea. *J. Ethnopharm.*, 87, 231-236.
- Kim, W.G., J.P. Kim, H. Koshino, K. Shin-Ya, H. Seto and I.D. Yoo. 1997. Benzastatin E, F, and G: new indoline alkaloids with neuronal cell protecting activity from *Streptomyces nitrosporesus*. *Tetrahedron*, 53, 4309-4316.
- Koshino, H., I.K. Lee, J.P. Kim, W.G. Kim, J. Uzawa and I.D. Yoo. 1996. Agrocycvennie, novel class alkaloid from the Korean mushroom. *Phytochemistry*, 41, 213-216.
- Krieger, D.T. 1983. Brain peptide: What, where, and why? *Science*, 222, 975-985.
- Krieger, D.T. 1986. An overview of neuropeptides. In: *Neuropeptide in Neurologic and Psychiatric Disease*, Martin, J.B. and J.D. Barchas eds., Raven Press, New York, pp 1-33.
- Lauth, X., H. Shike, J.C. Burns, M.E. Westerman, V.E. Ostland, J.M. Carlberg, J.C.V. Olst, V. Niset, S.W. Taylor, C. Shimizu and P. Bulet. 2002. Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass. *J. Biol. Chem.*, 277, 5030-5039.
- McMasters, D., Y. Kobayashi and K. Lederis. 1992. A vasotocin-like peptide in *Aplysia kurodai* ganglia: HPLC and RIA evidence for its identity with Lys-conopressin-G. *Peptides*, 13, 413-422.
- McRory, J. and N. M. Sherwood. 1997. Two protochordate genes encode pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and related family members. *Endocrinology*, 138, 2380-2390.
- Moore, K. S., S. Wehrli, H. Roder, M. Rogers, J. N. Forrest, Jr., D. McCrimmon and M. Zasloff, 1993. Squalamine: An aminosterol antibiotic from the shark. *Proc. Natl. Acad. USA.*, 90, 1354-1358.
- Park, J.H., K.C. Kang, S.B. Baek, Y.H. Lee and K.S. Rhee. 1991. Separation of antioxidant compounds from edible marine algae. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 23, 256-261.
- Parker, D.B., I.R. Coe and G.H. Dixon. 1993. Two salmon neuropeptides encoded by one brain cDNA are

- structurally related to members of the glucagon superfamily. *Eur. J. Biochem.*, 215, 439-448.
- Rice-Evans, C.A. and N.J. Miller. 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive compounds of food. *Biochem. Soc. Trans.*, 24, 790-795.
- Rinehart, K.L., Jr. 1983. Biologically active compounds from marine source. *Mar. Chem.*, 12, 229-239.
- Rovinetto, D., S. Wada, T. Arroll, M.G. Levy, W.L. Miller and E.J. Noga. 1998. Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 54, 467-475.
- Salzet, M., P. Bulet, A. Van Dorsselaer and J. Malecha. 1993. Isolation, structural characterization and biological function of lysine-conopressin in the central nervous system of the pharyngodellid leech *Erpobdella otoculata*. *Eur. J. Biochem.*, 217, 879-903.
- Shin, M.J., E.J. Kim, C.H. Kim, H.J. Go, I.H. Kim, H.S. Ryu, M.D. Huh, J.K. Chung and N.G. Park. 2003. Purification of a bradykinin-related peptide from the skin of hagfish, *Eptatretus burgeri*. *J. Kor. Fish. Soc.*, 36, 30-34.
- Silphaduang, U. and E.J. Noga. 2001. Peptides antibiotics in mast cells of fish. *Nature*, 414, 268-289.
- Waugh, D., V. Bondareva, Y. Rusakov, C. Bjenning, P.F. Nielsen and J.M. Conlon. 1995. Tachykinins with unusual structural features form a urodele, the amphiuma, an elasmobranch, the hammerhead shark, and an agnathan, the river lamprey. *Peptides*, 16, 615-621.
- Waugh, D., Y. Wang, N. Hazon, R.J. Balment and J.M. Conlon. 1993. Primary structures and biological activities of substance-P-related peptides from the brain of the dogfish, *Squalus canicula*. *Eur. J. Biochem.*, 214, 469-474.
- Zadina, J.E., W.A. Banks and A.J. Kastin. 1986. Central nervous system effects of peptides, 1980-1985: a cross-listing of peptides and their central actions from the first six years of the journal peptides. *Peptides*, 7, 497-537.

2004년 10월 6일 접수
2004년 12월 22일 수리