

식용 달팽이 (*Achatina fulica*)로부터 항균성 물질의 분리 및 정제

김인혜¹ · 현진원² · 이재화^{1*}

¹신라대학교 공과대학 제약공학과

²제주대학교 의과대학

Isolation and Purification of Antimicrobial Substance from the Giant Snail, *Achatina fulica*

In Hae Kim¹, Jin Won Hyun², and Jae-Hwa Lee^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, College of Engineering, Silla University, kwaebop-dong 1-1, Sasang-gu, Busan 617-736, Korea

²Department of Biochemistry, College of Medicine and Applied Radiological Science Research Institute, Cheju National University, Jeju-si 690-756, Korea

(Received February 17, 2006 / March 15, 2006)

ABSTRACT : An antimicrobial substance was purified from the giant snail body extract (*Achatina fulica*) using solid-phase extraction and separation on HPLC reversed-phase chromatography. The primary structure were determined by a combination of an automated amino acid sequence and MALDI-TOF Mass. Its molecular mass was found to be 1392.64 Da. This result was in excellent agreement with the theoretical molecular mass calculated from the amino acid sequence. purified peptide showed antimicrobial activity *in vitro* against *Escherichia coli* D31. This result indicate that giant snail whole body was potentially antimicrobial.

Key words : MALDI-TOF Mass, antimicrobial activity, giant snail

서 론

항균활성 펩타이드 (antimicrobial peptide)는 외부 물질의 침입으로부터 자신을 방어하기 위한 면역체계에 의해서 많은 기능을 나타낸다고 알려져 있다. 이러한 면역체계는 침입자의 종류에 관계없이 일차적인 방어 역할을 하는 비특이적 면역 (innate immunity)과 각각의 침입자에 대해 특이적으로 반응하는 특이적 면역 (adaptive immunity)으로 구성되어 있다 (Hancock and Diamond, 2000). 이와 같이 생체체의 외부 물질의 침입에 대해 일차적인 방어 역할을 담당하는 비특이적 면역과 이차적인 방어 역할을 담당하는 특이적 면역반응이 조화를 이루면서 생체방어기능을 한다고 알려져 있다. 특히, 항균활성 펩타이드는 비특이적 면역을 수행하는 여러 물질 중에 식세포 (phagocyte cell)에서 분비되는 단백질에 비해 작은 크기, 합성의 용이함과 더불어 항균 작용이외에 상처 치료의 촉진 및 화학주성 (chemotaxis) 작용을 나타낸다고 보고되어 있다 (Lehrer *et al.*, 1993). 이러

한 이유로 항균활성 펩타이드는 척추동물, 무척추동물 및 식물과 원핵생물의 다양한 개체로부터 정제되어 보고되어 있다 (Zaslloff, 2002). 특히, 양서류인 개구리와 두꺼비의 위, 피부 및 점막 층으로부터 많은 항균활성 펩타이드들이 정제되었다 (Barra and Simmaco, 1995). 이러한 점은 습지와 육지를 번갈아 서식하는 생태적인 특징에 의한 것으로 생각된다.

천연에서 정제한 항균활성 펩타이드들은 주로 α -helix, β -sheet 및 특정 아미노산 잔기를 많이 포함하는 불특정 구조의 3종류로 분류할 수 있다. α -helix 구조를 취하는 펩타이드들은 +2이상의 net charge를 가지고 소수성 잔기들과 친수성 잔기들이 양분되어 있는 양친매성 (amphipathic) 구조를 가지고 있으며 β -sheet 구조를 취하는 펩타이드들은 분자 내에 disulfide bond를 가지고 있다 (Vizioli and Salzet, 2002).

위에서 설명한 항균활성 펩타이드들의 항균활성 메커니즘은 정확하게 밝혀져 있지는 않지만 일반적으로 크게 2가지 형태인 carpet-like와 barrel-stave 메커니즘으로 분류할 수 있다. Carpet-like 메커니즘을 이용하는 항균활성 펩타이드들은 정전기적 상호작용을 이용하여 막에 결합하여 역치농도 (threshold concentration)가 될 때까지 막에 축적된 후, 막

*To whom correspondence should be addressed

구조에 변화가 일어나면 펩타이드들의 소수성 면은 막의 안쪽으로 향하고, 친수성 면은 막의 내부로 향하도록 배치를 하여 막을 micellization하는 detergent-like 메커니즘으로 항균작용을 나타낸다. 한편, Barrel-stave 메커니즘을 이용하는 항균활성 펩타이드들은 소수성 및 정전기적인 상호작용을 이용하여 생체막 및 인공막에 결합한 후, 막 구조의 변화를 유발시켜 막의 투과성을 저해하고 막 속으로 삽입 (insertion)을 일으켜 다발 (bundle)을 형성한다. 그 후, 양친매성 구조를 취하는 펩타이드의 소수성면은 지질의 중심부 (lipid core) 쪽으로 향하고, 친수성면은 지질내부로 향하는 구멍 (pore) 또는 통로 (channel)를 형성함으로써 항균작용을 나타내었다 (Hancock and Scott, 2000). 따라서 다양한 개체로부터 분리된 여러 항균활성 펩타이드들은 2차 구조, 분자의 크기, disulfide bond의 존재 유무 및 구조적인 모티브 (structure motifs) 등의 많은 차이에도 불구하고, net charge 및 양친매성과 구조적 특징을 이용하여 세균의 막과 상호작용을 함으로서 항균작용을 나타낸다는 공통된 작용 메커니즘을 지닌다. 이와 같은 메커니즘을 이용하여 생체막에 결합을 한 펩타이드들은 다양한 방법으로 균의 성장을 저해하게 된다. 예를 들면 defensin의 경우 단일가닥 DNA로의 파괴와 IL-8의 유도에 인한 염증 반응 (inflammatory process)의 조절 (Lehrer and Ganz, 1990), PR-39에 의한 stress 단백질의 합성과 DNA 합성의 저해 (Storici and Zanetti, 1993) 및 buforin (Park *et al.*, 1996)과 DNA와의 직접적인 결합에 의한 항균 작용 (Park *et al.*, 1996) 등과 같이 다양한 방법으로 항균 활성을 나타낸다는 것으로 알려져 있다.

지금까지 척추동물에서부터 무척추동물에 이르기까지 다양한 조직으로부터 많은 항균활성 펩타이드들이 정제되어 보고되어 왔다. 그러나 식용으로만 사용되어온 식용 달팽이 (*Achatina fulica*)에 연구는 보고 된 바가 없다. 본 연구는 식용 달팽이인 (*Achatina fulica*)를 대상으로 분자량이 1392.64 Da인 항균성 물질을 분리하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 사용한 달팽이는 (*Achatina fulica*)는 2005년 1월에 경기도 용인에서 구입하였다. 살아있는 상태의 달팽이를 껍질과 분리 한 후, 액체질소로 급속 동결시켜서 실험에 사용하기 전 까지 -70°C에 보관하였다.

시약 및 재료

Sep-Pak Vac C₁₈ cartridge는 Waters사 (Miliford, MA,

USA)에서 구입하였다. Tryptic soy broth (TSB)와 Lactose-Boullion (LB) 및 Muller-Hinton Broth (MHB)는 Merck사 (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 실험에 사용하였다. HPLC-grade의 water (H₂O) 및 acetonitrile (CH₃CN)은 TEDIA사 (Ohio, USA)와 Merck사 (Darmstadt, Germany)에서 구입하였고, Trifluoroacetic acid (TFA)는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 그 이외의 모든 시약은 특급을 사용하였다.

달팽이 (*Conger myriaster*)로부터 시료의 추출

동결 보관된 달팽이 4.5 kg을 5L의 끓는 물에 15분간 가열하였다. 초산을 5% 되게 넣고 블랜더 (Multi Blender Mill, Nihonseiki, Kaisha, Ltd.)로 파쇄한 후 4°C에서 24시간 추출하였다. 균질화된 추출용액을 원심분리 (7,000×g, 4°C, 30분)하여 상층액을 농축시켰고, 시료 : MeOH를 1 : 5 (vol/vol)의 비율로 첨가하여 원심분리 (8,000×g, 4°C, 30분)로 고분자 물질을 제거하였다. 농축된 시료는 EtOH 및 NaCl을 시료 (100 mL) : EtOH (500 mL) : NaCl (1.2 g) 비율로 첨가하여 원심분리 (15,000×g, 4°C, 30분)를 행하였다. 얻어진 상층액이 0.1 N HCl이 되도록 HCl을 첨가하고, 원심분리 (15,000×g, 4°C, 30분)하여 침전물을 제거한 후 Sep-Pak C₁₈ cartridge에 시료를 주입하였다. Column으로부터 10% MeOH (RM 10), 60% MeOH (RM 60) 및 100% MeOH (RM 100)의 물질들을 각각 용출시켰다 (Fig. 1).

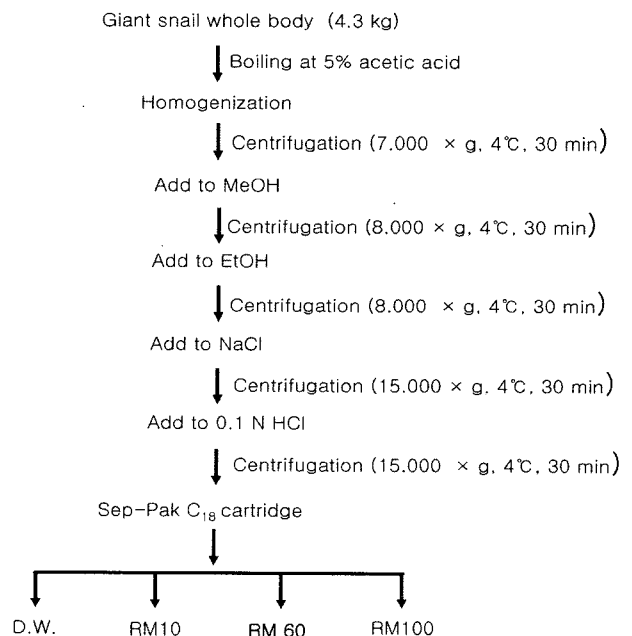


Fig. 1. Extraction of antimicrobial substance from the giant snail whole body, *Achatina fulica*.

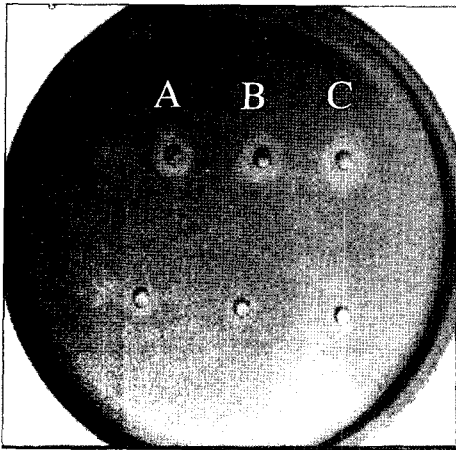


Fig. 2. Antimicrobial activity of the marine mussel extracts eluted by sep-Pal C₁₈ Cartridge. An aliquot of each extract was applied to a freshly poured lawn of *E. coli* D31. A: 10; B; RM 100; C; RM 60.

3 종류의 시료들을 사용하여 *E. coli* D31에 대한 항균활성을 측정하였다 (Fig. 2).

항균활성 물질의 분리 및 정제

E. coli D31에 항균 활성을 나타낸 RM 60은 6단계의 HPLC과정을 통하여 항균활성 펩타이드를 분리 정제하였다 (Fig. 3). 첫 단계로 동결 건조한 추출물 RM 60을 Vydac C₁₈ (10×250 mm, Waters, USA) column에 주입하여 정제하였고 분리조건은 다음과 같다: 유속; 2.0 mL/min, B 용매의 농도; 0 → 60% (120분), 온도; 40°C의 조건으로 정제하였다 (Fig. 4). 활성이 있는 분획을 Vydac C₁₈ (4.6×150 mm, Waters, USA) column에 주입하였고 유속; 1.0 mL/min, B 용매의 농도; 20 → 50% (60분의 조건으로 정제하였고 세 번째 단계는 전 단계와 동일한 column을 사용하였고 B 용매의 농도만 20 → 30%를 사용하였다. 다음 단계는 size exclusion column인 superdex peptide HR 10/30 (10×300 mm, Pharmacia, Sweden)을 사용하였다. 최종적으로 Zorbox SB-phenyl C₁₈ (Agilent, USA) column을 사용하여 유속; 0.5 mL/min, 28% 등용매 조건으로 정제하였다 (Fig. 4). 모든 역상 HPLC 정제 단계에서 A 용매로는 0.1% TFA를 포함하는 H₂O (pH 2.2)와 B 용매로는 0.1% TFA를 포함하는 CH₃CN (pH 2.2)을 이용하여 B 용매 gradient로 분리 정제하였다. 또한 size exclusion HPLC는 0.1% TFA를 포함하는 30% CH₃CN (pH 2.2) dmf 사용하여 물질을 용출시켰으며 정제에 사용한 흡수파장은 220 nm, 254 nm와 280 nm를 사용하였다.

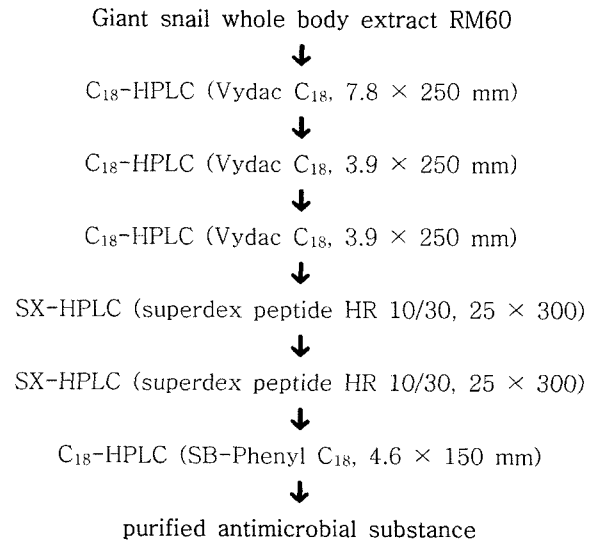


Fig. 3. Procedure for HPLC purification of antimicrobial peptide from the marine mussels, *Achatina fulica*. SX-HPLC; size exclusion HPLC.

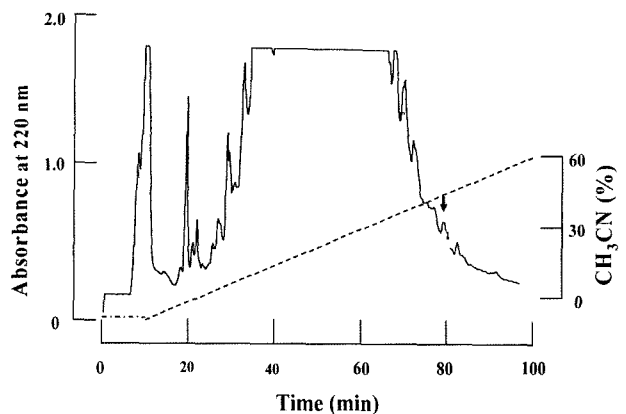


Fig. 4. Reverse-phase HPLC profile of giant snail whole body extracts RM 60. The RM 60 loaded onto a Vydac C₁₈ (10×250 mm) column and eluted with a gradient of CH₃CN (dotted line) at a flow rate of 2.0 mL/min. The fractions indicated by the arrow bar were active region against *E. coli* D31.

항균활성 측정

정제과정 중에 얻은 각 분획에 대한 항균활성의 측정은 Radial diffusion assay법을 이용하여 *E. coli* D31에 대한 성장 억제력을 관찰하였고 활성 측정법은 다음과 같다 (Lehrer *et al.*, 1991). *E. coli* D31를 37°C로 TSB에서 mid-logarithmic phase까지 배양한다. 그 후, 1.0 M phosphate buffer solution (pH 6.7)으로 3번 세정한 균배양액 1.0 mL (OD₅₇₀=0.1, 5×10⁷ CFU/mL)을 LB와 혼합한다. 사용한 LB 배지 조성액은 다음과 같다: 5 X LB broth;

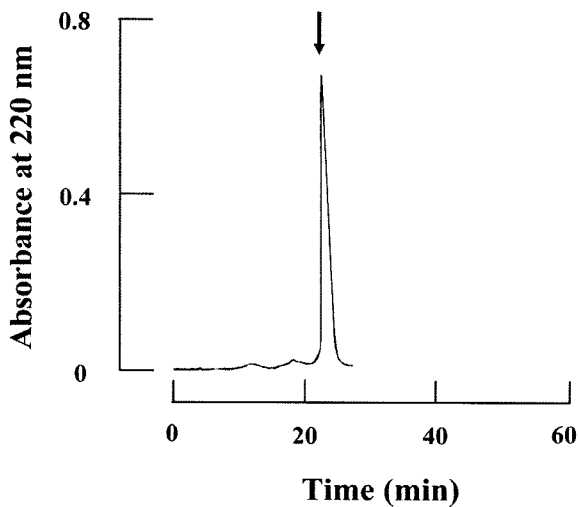


Fig. 5. Final purification of peptide. The active fraction of was loaded onto a Zorbax SB-phenyl C₁₈ (4.6×150 mm) column and eluted isocratically 28% CH₃CN in 0.1% TFA at flow rate of 0.5 mL/min.

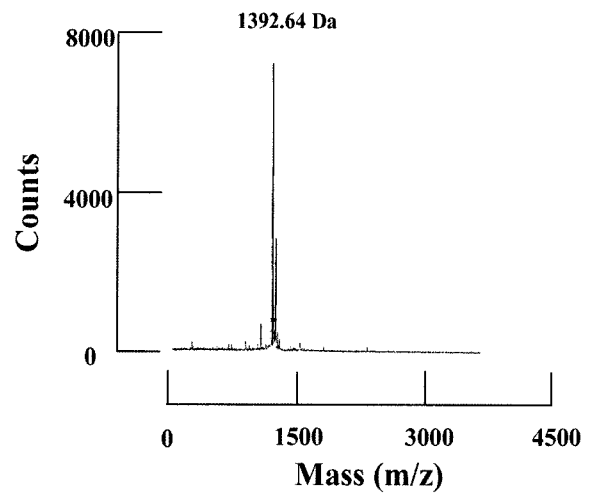


Fig. 6. MALDI-TOF Mass spectra of antimicrobial peptide in marine mussels. Anaysis was carried out with a voyager-DE™STR spectrometry, α-cyano-4-hydroxycinamic acid was used as matrix.

20.7 mL, 1.0 M PBS (pH 6.7); 20.7 mL, D. W.; 58.6 mL, NaCl; 0.5 g, Low EEO agar; 1.57 g. streptomycin; 10 mg/mL 시료는 0.1% 초산 용액에 녹여 사용하였다. 준비된 LB 배지에 2-3 mm 정도의 well을 만든 후, well에 시료를 주입한 후, 37°C 18시간 배양한 후, clear zone의 크기로 활성을 측정한다.

결과 및 고찰

펩타이드의 정제

홍합 (*Mytilus coruscus*) 추출물인 RM 10, RM 60 및 RM 100을 사용하여 *E. coli* D31에 대해 항균활성을 측정하였다 (Fig. 2). 그 중에서 RM 60을 사용하여 항균성 물질을 정제하였다. RM 60은 역상 column과 size exclusion column등을 순차적으로 사용하여 정제하였다. 최종 단계로는 Zorbax SB-phenyl column (4.6×150 mm, Aglient, USA)을 사용하여 유속을 0.5 mL/min으로 하여 0.1% TFA를 포함한 28% CH₃CN의 등용매 조건으로 순수하게 정제하였다 (Fig. 5).

정제한 항균성 물질의 일차구조 및 분자량

최종 정제한 물질의 분자량을 조사하기 위해 MALDI-TOF mass spectra를 사용하여 측정한 결과, 1392.64 Da의 결과를 분자량으로 확정할 수 있었다 (Fig. 6). 아미노산 서열을 결정하기 위해 Edman 분해법을 이용한 peptide sequencer를 사용하여 일차구조를 분석 중에 있다.

요 약

식용 달팽이 (*Achatina fulica*)의 추출물 RM 60을 사용하여 *E. coli* D31을 대상으로 순수한 항균성 물질을 분리 정제하였다. 정제한 항균성 물질은 MALDI-TOF Mass spectrometra를 사용하여 분자량을 측정한 결과, 1392.64 Da의 단일 peak를 얻을 수 있었으며, 이 후 Edman 분해법을 이용한 peptide sequencer를 사용하여 일차구조 분석을 조사하고 있다.

참 고 문 헌

- Barra, D. and Simmaco, M. (1995) Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends Biotechnol.*, **13**, 205-209.
- Hancock, R.E.W. and Diamond, G. (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends Microbiol.* **8**, 402-410.
- Hancock, R.E.W. and Scott, M.G. (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 8856-8861.
- Lehrer, R.I. and Ganz, T. (1990) Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood* **76**, 2169-2181.
- Lehrer, R.I., Lichtenstein, A.K. and Ganz, T. (1993) Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 105-128.
- Lehrer, R.I., Rosenman, M. Harwig, S.S.L. Jackson R. and Eisenhauer, P. (1991) Ultra-sensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods*, **137**, 167-173.

- Park, C.B., Kim, M.S. and Kim, S.C. (1996) A novel antimicrobial peptide from *Bufo*, *Bufo gargarizans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**, 408-413.
- Park, N.G., Yamato, Y., Lee, S.M., Sugihara, G., Park, J.-S. and Kang, S.-W. (1996) The interaction of mastoparan B from venom of hornet *Vespa basalis* with phospholipid matrices. *Bull. Korean Chem. Soc.* **17**, 50-56.
- Storici, P. and Zanetti, M. (1993) A cDNA derived from pig bone marrow cells predicts a sequence identical to the intestinal antibacterial peptides PR-39. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 1058-1065.
- Vizioli, J. and Salzet, M. (2002) Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol. Sci.*, **23(11)**, 494-496.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **415**, 389-395.