

노무라 입깃 해파리(*Nemopilema nomurai*)로부터 항균활성물질의 분리 및 정제

문호성 · 김연계* · 이문희 · 윤나영 · 이두석 · 윤호동 · 서정길¹ · 박남규¹

국립수산과학원 식품안전과, ¹부경대학교 생물공학과

Isolation and Purification of an Antimicrobial Material from the Jellyfish *Nemopilema nomurai*

Ho-sung Moon, Yeon-Kye Kim*, Moon-Hee Lee, Na-Young Yoon, Doo-Seog Lee,
Ho-Dong Yoon, Jung-Kil Seo¹ and Nam-Gyu Park¹

Food Safety Research Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-705, Korea

¹Department of Biotechnology, College of Fisheries Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

An antimicrobial material was purified from the acidified whole body extract of the jellyfish *Nemopilema nomurai* by using C18 reversed phase and cation-exchange high performance liquid chromatography (HPLC). Whole body extract and the purified compound (JAP-1) showed potent antimicrobial activities against a wide range of microorganisms including *Escherichia coli* D31, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus iniae* and *Candida albicans*, without significant hemolytic activity. Treatment of JAP-1 with trypsin completely abolished all antibacterial activity against *Bacillus subtilis*, suggesting that JAP-1 is likely to be a proteinaceous antibiotic. The molecular weight of JAP-1 was determined to be 680.10 Da by MALDI-TOF mass spectroscopy.

Key words: Jellyfish, *Nemopilema nomurai*, Antimicrobial material, HPLC, Hemolysis

서 론

인간을 비롯한 대부분의 척추동물 및 무척추동물들은 세균, 바이러스, 곰팡이 등과 같은 외부 물질의 침입으로부터 자신을 방어하기 위한 면역 체계를 가지고 있다(Hancock and Diamond, 2000). 면역체계는 침입자에 관계없이 1차 방어 역할을 하는 선천면역(innate immunity)과 침입자에 대해 특이적인 반응을 하는 적응면역(host defense)으로 나눌 수 있다. 척추동물에는 선천면역과 적응면역이 각각 잘 발달되어 있지만 무척추동물에서는 선천면역만을 포함하고 있다. 특히, 선천면역은 외부 침입물질에 대한 초기방어 및 적응면역의 유도를 담당하므로 그 기능과 역할에 대한 관심이 증대되고 있는 실정이다. 선천면역을 담당하는 대표적인 물질로는 lectin, prophenoloxidase activating factor, phagocytosis, antimicrobial peptide 등이 있다. 이들은 외부로부터 생체 내에 이물질들이 침입하면 1차적으로 그것을 없애는 역할을 담당한다(Relf et al., 1999; Tincu and Taylor, 2004). 최근 들어서 여러 가지의 선천면역 요소들 중에서 비 특이적이고 빠른 반응성을 가지는 항균활성 펩타이드에

대한 관심이 증가되고 있는 실정이다. 현재까지 무척추동물에서 정제되어진 항균 peptide는 해면(Matsunaga et al., 1985), 갯지렁이(Ovchinnikova et al., 2004), 군소(Iijima et al., 2003), 담치(Charlet et al., 1996; Mitta et al., 1999; Mitta et al., 2000), 투구게(Miyata et al., 1989; Saito et al., 1995), 흰다리 새우(Destoumieux et al., 1997) 등이 보고되어 있다.

최근 우리나라 연근해에서 보름달 물해파리(*Aurelia aurita*)와 노무라 입깃 해파리(*Nemopilema nomurai*)가 대량 출현하여 수산어구의 파괴와 어획물의 선도저하, 작업시간 지연 등을 유발하여 정상적인 조업을 불가능하게 하였을 뿐만 아니라 어업인들의 해파리 접촉에 의한 통증유발 등 경제적, 정신적인 피해가 발생하고 있다. 따라서 수산업에 막대한 피해를 입히는 해파리의 효율적 활용 방안에 대한 연구가 시급한 실정이다. 현재까지 보고된 해파리 이용에 대한 연구는 green fluorescent protein 추출 및 특성연구(Smith et al., 2002), 해파리의 콜라겐 추출(Nagai et al., 2000) 및 식품이용(Hsieh et al., 2001) 등이 있다. 특히, 현재까지 보고된 해파리 유래 항균 peptide는 *A. aurita*로부터 정제된 aurelin이 유일하며(Ovchinnikova et al., 2006), *N. nomurai*에서는 아직까지 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구는 *N. nomurai*의 선천면역에 관계할 것으로 예측되는 물질을 추출

*Corresponding author: yeonkyekim@korea.kr

Table 1. List of microbes used for antimicrobial assay

Microbe	Strain	Media	Temperature
Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	TSB	37°C
	<i>Bacillus subtilis</i>	LB	30°C
	<i>Streptococcus iniae</i>	LB	25°C
Gram (-)	<i>Escherichia coli D31</i>	TSB	37°C
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	TSB	25°C
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	TSB	30°C
Yeast	<i>Candida albicans</i>	SDB	37°C

하여 여러 균주에 대해 항균활성을 측정하고, 항균활성 물질을 정제하여 기능성식의약소재로서의 이용가능성을 살펴보고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 사용한 *N. nomurai*는 국립수산과학원 어장환경과에서 제공받아, 해파리 whole body를 실험에 사용하였으며, 모든 시료는 사용하기 전까지 -23°C에 보관하였다.

시약 및 재료

항균활성 측정을 위한 tryptic soy broth(TSB)는 Merck사(Merck, Darmstadt, Germany), agarose Type I(Low EEO Agar)와 trifluoroacetic acid(TFA)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 정제 과정에서 사용된 HPLC용 water와 acetonitrile(CH₃CN)은 Tedia사(Ohio, USA)로부터 구입하였고, 그 이외의 모든 시약은 특급을 사용하였다.

추출방법

동결된 whole body에 4배량의 1% acetic acid(v/v)를 첨가하여 100°C에서 5분 동안 끓여 해파리 유래 자가효소를 불활성화 시키고, 곧바로 얼음에 보관하여 충분히 냉각을 시킨 후에 homogenizer(T10 basic ULTRA-TURRAX, IKA, USA)를 사용하여 조직을 파쇄 시켰다. 조직 파쇄액은 4°C에서 30분 동안 13,000 x g로 원심분리(VS-21SMT, Vision Scientific, Buchon, Korea)를 행한 후에 상층액을 취해서 항균활성 측정 및 물질의 정제에 사용하였다.

항균활성측정방법 및 사용균주

실험에 사용된 균주는 그람 양성균 3종(*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus iniae*) 그람 음성균 3종(*Escherichia coli D31*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*) 및 yeast 1종(*Candida albicans*)을 사용하였으며, 각 균주의 배양 배지 및 온도는 Table 1과 같다. 항균활성 측정 방법으로는 서로 다른 농도를 포함한 두 층의 배지를 사용하는

ultrasensitive radial diffusion assay(URDA)법을 이용하였다(Lehrer at al, 1991). URDA에 사용된 균주는 우선 각각의 배지 및 배양온도에서 18시간 동안 pre-culture 후 BioMerieux Vitek, Inc. Colorimeter(Product No. 52-1210, BioMerieux, Inc., USA)를 사용하여 농도를 84%T(≅ 1 x 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 균액 0.5 mL을 넣고 잘 섞은 후에 plate에 편평하게 부어 굳히고, 굳은 plate에 punch를 사용하여 직경 2.5 mm의 well을 뚫은 후에 5 µL의 각 정제 단계의 sample을 도입시켰다. 모든 sample은 0.01% acetic acid(pH 4.0)에 녹여 활성을 측정하였으며, negative control로 0.01% acetic acid(pH 4.0) 5 µL를 사용하여 용매에 의한 영향이 없음을 확인하였다. Sample이 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. 다음날 well 주위에 생긴 clear zone의 크기를 측정하여 12 mm(Ø)를 100%로 하여 상대활성도를 나타내었다.

$$\text{항균활성도 (\%)} = \frac{\text{clear zone (mm)} - 2.5 \text{ (mm)}}{12 \text{ (mm)} - 2.5 \text{ (mm)}} \times 100$$

항균활성물질의 분리 및 정제

해파리 추출물은 HPLC(Agilent 1100, California, USA)를 이용하여 활성물질을 분리 정제하였다. 즉, 95% A 용매(0.1% TFA in HPLC grade water)와 5% B 용매(0.1% TFA in HPLC CH₃CN)로 평형화시킨 Capcell-Pak C18 column(4.6 mm × 250 mm, Shiseido, Japan)에 시료를 주입한 후, 60분간 용매 B(5-65%)의 농도구배로 용출시켰다. 이때, 유속은 1.0 mL/min로 유지하였으며, 각각의 분리된 희분은 URDA방법으로 *B. subtilis* KCTC1021에 대한 항균 활성을 측정하였다. 얻어진 희분은 10 mM phosphate buffer(PB, pH 6.0)로 평형화된 TSK-gel SP-5PW column(7.5 mm × 75 mm, Tosoh, Japan)에 주입한 후, 100분간 NaCl(0-1 M) 농도구배로 분리하였다. 항균활성이 확인된 희분은 첫 번째 정제과정과 동일한 컬럼 및 용매 조건으로 35분간 용매 B(5-40%)를 이용한 농도구배로 용출하고, 최종적으로 23% B를 이용한 isocratic 조건에서 단일 peak로 정제하였다.

Protease 처리에 의한 활성유무 확인

N. nomurai 추출물 및 정제된 물질(JAP-1)이 단백질성 물질 인지를 확인하기 위해서 trypsin 처리 전, 후의 항균활성 변화를 확인 하였다. *N. nomurai* 추출물 및 JAP-14 µL에 trypsin(1 mg/mL) 1 µL를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 뒤, URDA방법으로 활성 변화를 측정하였으며, 대조군으로 추출물 및 JAP-1

Table 2. Antimicrobial activity of *N. nomurai* extract

Microbe	Strain	Clear zone(mm) [*]
Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	+++
	<i>Streptococcus iniae</i>	++
Gram (-)	<i>Escherichia coli</i> D31	++
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-
Yeast	<i>Candida albicans</i>	++

*Dimeter of zone of inhibition; -: not formed, +: below 3.0 mm, ++: 3.0 mm-6.0 mm, +++: above 6.0 mm

4 μ L에 증류수 1 μ L를 첨가한 것을 사용하였다. 단백질을 분해효소인 trypsin을 처리하여 충분히 반응시킨 후 활성 물질이 분해되어 활성이 소실된다면 활성에 관여하는 물질은 단백질일 것으로 판단하였다.

Hemolysis

인간의 적혈구를 이용하여 용혈활성을 측정하였다. 사람의 혈액에 동량의 50 mM phosphate buffered saline(PBS)을 넣고 혼합한 후 800 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액은 버리고 침전물을 얻었다. 이러한 세척과정을 3회 반복한 후 얻어진 적혈구를 PBS로 1% 혼합용액이 되도록 PBS를 첨가한 후 사용하였다. 얻어진 적혈구 100 μ L를 96-well microplate에 도입시키고 해파리 정제물질, JAP-1 100 μ L를 가한 다음 37°C에서 30분간 반응시켰으며, 이후 반응액을 10분간 1,500 rpm에서 원심분리하여 얻어진 상등액 100 μ L를 새로운 microtiter plate로 옮긴 후 헤모글로빈 유출 정도를 490 nm에서 측정하였다. 적혈구의 100% 용혈을 위한 실험 대조구로는 triton X-100(0.1%)을 사용하였다.

분자량 측정

최종 정제된 JAP-1의 분자량은 MALDI-TOF MS spectrometer (Voyager-DETM PRO spectrometer, PerSeptive Biosystems, USA)를 사용하여 측정하였다. Matrix는 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid를 사용하였으며, standard는 Calmix 2를 사용하였다.

결과 및 고찰

노무라 입깃 해파리 추출물의 항균활성

N. nomurai 추출물의 항균활성을 확인하기 위해서 URDA 방법을 이용하여 그람 양성균 3종, 그람 음성균 3종 및 yeast 1종에 대한 항균활성을 측정하였다(Table 2). 그 결과 추출물은 *B. subtilis*에 대해서 clear zone이 7.0 mm로 가장 강한 항균활성을 나타내었으며 *S. iniae*에서는 3.9 mm의 활성을 나타내었다. 반면 *S. aureus*에 대해서는 활성이 검출되지 않았다. 그람 음성균주에서는 *E. coli* D31에서만 활성을 보였으며 나머

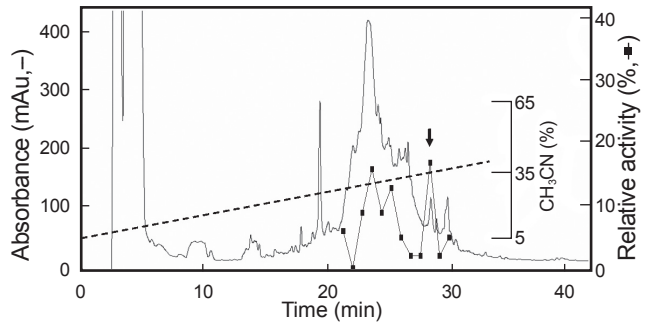


Fig. 1. The 1st reversed-phase HPLC profile onto Capcell-pak C18 column. The arrow represent the antimicrobial activity fraction tested in this work. Black squares represent the relative activity of each fractions.

지 그람 음성균주들에서는 활성을 나타내지 않았다. 또한 yeast인 *C. albicans*에서도 4.0 mm의 활성을 나타냈다. Mygind et al.(2005)은 *Pseudoptectania nigrella*로부터 plectasin을 정제하였다. Plectasin은 95개의 아미노산으로 이루어진 defensin 계열의 항균활성 peptide로 동물세포에 독성을 보이지 않으며 그람 음성균에 대해서는 항균활성이 거의 없지만 그람 양성 세균에 대해서는 강력한 활성을 나타냈다. 이와 유사하게 해파리 추출물 또한 그람 음성균주 보다는 그람 양성균주에 대해 높은 감수성을 나타냈으며, 특히 방어, 넙치, 조피볼락등에서 β 용혈 구균증을 일으키는 어병세균인 *S. iniae*에 대해 활성을 가지는 것으로 보아서 넙치등의 양식장에서 해파리 추출물을 천연 항생제로서 이용 가능할 수도 있을 것으로 판단된다.

항균활성 물질의 정제

위에서 열거한 균주들에 대해 항균활성을 나타낸 추출물은 역상 HPLC column, 이온교환 column을 사용한 4단계의 정제과정을 거쳐 하나의 순수한 항균활성물질 JAP-1을 정제하였다. 첫 번째 정제 과정으로 Capcell-Pak C18 column(4.6 mm X 250 mm, Shiseido, Japan)을 이용하여 분리된 각각의획분들을 URDA방법으로 활성을 측정 한 결과, 항균활성은 21분에서 31분 사이에 용출된 획분에서 항균활성이 나타났으며, 그중 가장 항균 활성이 좋은 28분대의 획분을 받아서 이후 정제과정을 수행하였다(Fig. 1). 다음 단계로 anion exchange column인 TSK-gel SP-5PW column(7.5 mm X 75 mm, Tosoh, Japan)에서 분리한 결과 활성을 가지는 획분은 음이온 column에 흡착을 하지 않은 획분이었다. 그러나 이 단계에서는 활성을 나타내지 않는 많은 단백질이 TSK-gel SP-5PW column에 흡착하는 상태로 제거됨을 알 수 있으며, 다음단계의 정제과정을 용이하게 하는 충분한 역할을 담당하는 것으로 판단되었다. 이후 활성이 확인된 음이온 column에 흡착하지 않는 획분을 모아 Capcell-Pak C18 column(4.6 mm X 250 mm)에 적용시켜 분리한 결과 2개의 major peak가 나타났다(Fig. 2). 그중 먼저 나온 peak를 받아서 최종적으로 Capcell-Pak C18 column(4.6 mm X 250 mm)을 사용하여 0.1% TFA를 포함하는 23% CH_3CN (pH 2.2)용매를 사

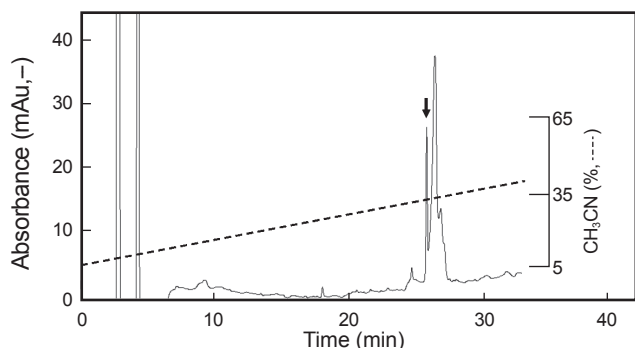


Fig. 2. The 2nd reversed-phase HPLC profile onto Capcell-pak C18 column. Active fraction was eluted with a linear gradient of 5% → 40 % B (35 min) CH₃CN in 0.1 % TFA (pH 2.2) at a flow rate of 1.0 mL/min. The down arrow represents the antimicrobial activity fraction.

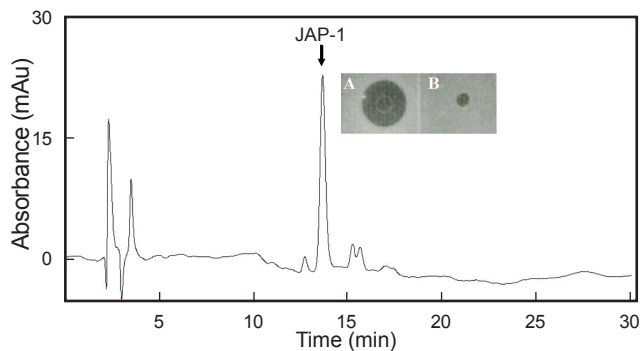


Fig. 3. Final purification of the antimicrobial material by reversed-phase HPLC profile onto Capcell-pak C18 column and its antimicrobial activity. Arrow peak named JAP-1 was eluted isocratically with 23% CH₃CN in 0.1% TFA at a flow rate of 1 mL/min. A; treated with JAP-1, B; treated with 0.01% acetic acid.

용하여 유속 1 mL/min의 조건하에서 하나의 순수한 물질을 정제하였으며, 정제된 물질은 *B. subtilis*에 대해 항균활성을 나타냈다(Fig. 3). 정제된 JAP-1은 동결된 시료 100 g으로부터 0.15 mg%의 수율로 얻어졌다.

정제된 항균활성 물질의 특성

최종 정제된 JAP-1이 단백질성 물질인지를 확인하기 위하여 protease 처리 전,후의 활성 존재 유무를 확인하였다. JAP-14 μ L에 trypsin(1 mg/mL) 1 μ L를 첨가하고 무처리군으로는 증류수 1 μ L를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 URDA방법으로 활성의 변화를 측정하였다. 그 결과 trypsin을 처리한 JAP-1은 항균활성이 완전히 소실된 반면 trypsin을 처리하지 않은 JAP-1에서는 항균활성이 유지 되었다(Fig. 4). 이러한 결과로 JAP-1은 trypsin에 의해 분해가 되는 단백질성 물질일 것으로 판단된다.

또한 JAP-1의 분자량을 측정하기 위하여 MALDI-TOF MS spectrometer(Voyager-DETM PRO spectrometer, Perseptive

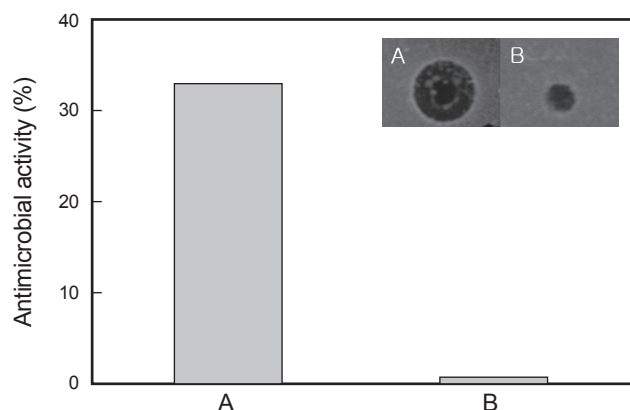


Fig. 4. Antimicrobial activities of nontreated and trypsin treated JAP-1 against *B. subtilis*. A : Non treatment, B: trypsin treated.

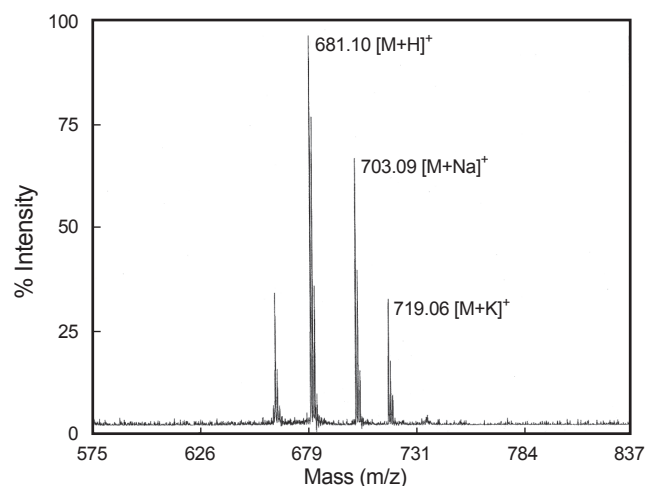


Fig. 5. MALDI-TOF Mass spectroscopy of JAP-1. The transformed spectrum shows a mass of 681.10 Da [M+H]⁺.

Biosystems, USA)를 이용하였다. Matrix는 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid를 사용하였으며, Standard는 calmix 2를 사용하였다. 측정결과 681.10 [M+H]⁺ mass data가 얻어졌으며, 이를 바탕으로 JAP-1의 분자량은 680.10 Da 으로 판단된다(Fig. 5). 따라서 JAP-1은 아미노산이 5-6개정도로 이루어진 짧은 peptide일 것으로 예측된다.

현재 까지 보고된 항균성 peptide중 많은 peptide들이 높은 항균력을 가지는 반면에 세포독성도 가지는 것으로 알려져 있다. 1971년 벌의 독소로부터 melittin이 정제되었지만 강력한 항균활성과 더불어 적혈구에 대한 강력한 용혈활성으로 인해 신규 항생제로 개발하는데 한계를 나타냈다(Lubke et al., 1971). JAP-1의 세포독성을 확인하기 위해서 인간의 적혈구에 대한 hemolysis를 측정한 결과 JAP-1은 인간의 적혈구에 대한 용혈활성은 나타내지 않았다(data not shown). 이러한 결과는 *N. nomurai*에서 정제된 항균 물질인 JAP-1은 세포독성이 낮은 신규의 peptide임을 의미한다.

천연물 유래의 항균성 peptide는 보통 12-50개 정도의 아미노산으로 이루어져 있으며, 양친매성 구조를 이루어 target cell의 막과 특이적으로 반응하여 pore를 형성하거나 세포내부로 들어가 세포내 기관을 공격하여 항균활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Li, 2009). 특정한 구조를 이루며 지질막에 작용하려면 최소한 10개 이상의 아미노산으로 이루어져야 한다고 보고되어 있다(McLean et al., 1991). Solitary wasp에서 정제된 anoplin은 10개의 아미노산으로 이루어져 있으며, linear α -helix conformation을 취하는 가장 짧은 항균성 peptide로 알려져 있다(Konno et al., 2001). 반면에 batenecin, indolicidin, gramicidin 등은 길이가 짧지만 우수하고 광범위한 항균활성을 지닌 항균성 peptide들이다(Frank et al., 1990; Falla et al., 1996; Kondejewski et al., 1996). 이들은 길이가 긴 다른 peptide들과 다른 방식으로 항균활성을 나타낸다고 알려져 있다.

반면, Wang et al. (2007)은 *Eisenia fetida*로부터 항균성 peptide인 earthworm peptide(EP)를 정제하였다. 그 중 EP2와 EP3는 N말단 부분이 acetylation된 hexapeptide이며 분자량은 각각 535.27 Da 및 519.27 Da 이었다. 이들은 그람 양성균, 그람 음성균 및 fungi에도 항균활성을 나타냈다. JAP-1 또한 trypsin의 기질특이성을 바탕으로 lysine 또는 arginine을 분자내에 함유하는 분자량이 680.1 Da인 penta- 또는 hexapeptide로 예상되어 지며, EP와 같이 부분적으로 modification이 된 상태로 존재할 가능성도 충분할 것으로 사료된다. 현재 Peptide의 1차구조는 peptide sequencer를 이용하여 분석중에 있으며, 길이가 짧은 peptide의 경우에는 인공적으로 합성이 용이하며 그에 따른 경제적인 비용의 측면에서 새로운 기능성 식의약소재로서의 개발 가능성이 충분할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 수산과학원(수산물의 영양 및 건강기능성연구, RP-2011-BT-057)의 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

- 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.
- Destoumieux D, Bulet P, Loew D, Van DA, Rodriguez J and Bachere E. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). J Biol Chem 272, 28398-28406.
- Falla TJ, Karunaratne DN and Hancock REW. 1996. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. J Biol Chem 271, 19298-19303.
- Frank RW, Gennaro R, Schneider K, Przybylski M and Romeo D. 1990. Amino acid sequence of two proline-rich batenecins-antimicrobial peptides of bovine neutrophils. J Biol Chem 265, 18871-18874.
- Hancock REW and Diamond G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends Microbiol 8, 402-410.
- Hsieh YH P, Leong FM and Rudloe J. 2001. Jellyfish as food. Hydrobiologia 451, 11-17.
- Iijima R, Kisugi J and Yamazaki M. 2003. A novel antimicrobial peptide from the sea hare *Dolabella auricularia*. Dev Comp Immunol 27, 305-311.
- Kondejewski LH, Farmer SW, Wishart DS, Hancock REW and Hodges RS. 1996. Gramicidin S is active against both gram-positive and gram-negative bacteria. Int J Peptide Protein Res 47, 460-466.
- Konno K, Hisada M, Fontana R, Lorenzi CCB, Haoki H, Itagaki Y, Miwa A, Kawai N, Nakata Y, Yasuhara T, Neto JR, Azevedo Jr WF, Palma MS and Nakajima T. 2001. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. Biochim Biophys Acta 1550, 70-80.
- Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SSL, Jackson R and Eisenhaur P. 1991. Ultrasensitive assay for endogenous antimicrobial polypeptides. J Immunol Methods 137, 167-173.
- Li Y. 2009. The role of antimicrobial peptides in cardiovascular physiology and disease. Biochem Biophys Res Commun 390, 363-367.
- Lubke K, Matthes S and Kbss G. 1971. Isolation and structure of N-formyl melittin. Experientia 27, 765-767.
- Matsunaga S, Fusetani N and Konosu S. 1985. Bioactive marine metabolites, IV. Isolation and the amino acid composition of discodermin A, an antimicrobial peptide, from the marine sponge *Discodermia kiiensis*. J Nat Prod 48, 236-241.
- McLean LR, Hagaman KA, Owen TJ and Krstenansky JL. 1991. Minimal peptide length for interaction of amphipathic α -helical peptides with phosphatidylcholine liposomes. Biochemistry 30, 31-37.
- Mitta G, Hubert F, Dyrinda EA, Boudry P and Roch P. 2000. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. Dev Comp Immunol 24, 381-393.
- 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.
- Miyata T, Tokunaga F, Yoneya T, Yoshikawa K, Iwanaga S, Niwa M, Takao T and Shimonishi Y. 1989. Antimicrobial

- peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *J Biochem (Tokyo)* 106, 663-668.
- Mygind PH, Fischer RL, Schnorr KM, Hansen MT, Sonksen CP, Ludvigsen S, Raventos D, Buskovi S, Christensen B, Marial LD, Taboureau O, Yaver D, Elvig-Jorgensen SG, Sorensen MV, Christensen BE, Kjaerulff S, Frimodt-Moller N, Lehrer RI, Zasloff M and Kristensen HH. 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* 437, 975-980.
- Nagai T, Worawattanamateekul W, Suzuki N, Nakamura T, Ito T, Fujiki K, Nakao M and Yano T. 2000. Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jellyfish (*Rhopilema asamushi*). *Food Chemistry* 70, 205-208.
- Ovchinnikova TV, Aleshina GM, Balandin SV, Krasnodembskaya AD, Markelov ML, Frolova EI, Leonova YF, Tagaev AA, Krasnodembsky EG and Kokryakov VN. 2004. Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina*. *FEBS Lett* 577, 209-214.
- Ovchinnikova TV, Balandin SV, Aleshina GM, Tagaev AA, Leonova YF, Krasnodembsky ED, Men'shenin AV and Kokryakov VN. 2006. Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins. *Biochem Biophys Res Commun* 348, 514-523.
- Relf JM, Chisholm JRS, Kemp GD and Smith VJ. 1999. Purification and characterization of a cystein-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur J Biochem* 264, 350-357.
- Saito T, Kawabata S, Shigenaga T, Takayenoki Y, Cho J, Nakajima H, Hirata M and Iwanaga S. 1995. A novel big defensin identified in horseshoe crab hemocytes: isolation, amino acid sequence, and antibacterial activity. *J Biochem (Tokyo)* 117, 1131-1137.
- Smith CB, Anderson JE, Fisher RL and Webb SR. 2002. Stability of green fluorescent protein using luminescence spectroscopy: is GFP applicable to field analysis of contaminants? *Environmental Pollution* 120, 517-520.
- Tincu JA and Taylor SW. 2004. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3645-3654.
- Wang C, Sun Z, Liu Y, Zhang X and Xu G. 2007. A novel antimicrobial vermipeptide family from earthworm *Eisenia fetida*. *Eur J Biochem* 43, S127-S134.

2011년 7월 18일 접수
 2011년 8월 30일 수정
 2011년 10월 5일 수리