

〈Original article〉

## 항균 펩타이드를 이용한 녹조현상 원인종 *Microcystis aeruginosa*의 제어

한 상 일 · 박 윤 경<sup>1</sup> · 최 윤 이\*

고려대학교 생명공학과, <sup>1</sup>조선대학교 생명공학과

### Application of Antimicrobial Peptides against *Microcystis aeruginosa* to Control Harmful Algal Blooms

Sang-Il Han, Yoonkyung Park<sup>1</sup> and Yoon-E Choi\*

Division of Environmental Science & Ecological Engineering, Korea University, Seoul 02841, Republic of Korea

<sup>1</sup>Research Center for Proteinaceous Materials (RCPM), Chosun University, Gwangju 61452, Republic of Korea

**Abstract** - *Microcystis aeruginosa*, a freshwater cyanobacteria species known to be one of the most predominant species responsible for cyanobacterial harmful algal blooms (CyanoHABs). It has been frequently associated with the contamination of neurotoxins and peptide hepatotoxins, such as microcystin and lipopolysaccharides-LPSs. CyanoHABs control technologies so far put in place do not provide a fundamental solution and cause secondary pollution linked with the control measures. For this study, algicidal peptides, which have been reported to be non-toxic and to have antimicrobial properties, were employed for the development of novel eco-friendly control against CyanoHABs. The four peptides (CMA1, CMA2, HPA3P, and HPA3NT3) selected in this study showed significant algicidal effects against *M. aeruginosa* cells inducing cell aggregation and flotation. Moreover, the newly generated peptides (K160242-5) with certain modifications also displayed high algicidal activity. The algicidal activity of the peptides was found to depend on the concentrations and structures of each of amino acid. The results of this study suggested a novel possibility of CyanoHABs control using the non-toxic algicidal peptides.

**Keywords** : *Microcystis aeruginosa*, cyanobacterial blooms, HABs, algicidal peptide, antimicrobial peptide

## 서 론

남세균은 산소 생산, 탄소 고정 및 영양소 순환을 비롯하여 필수적인 생태계 서비스를 제공한다. 그러나 남세균이 과도하게 성장할 경우, 생태계 전체의 기능이 손상될 수 있다 (Schopf 2000; Paerl and Paul 2012; Liu *et al.* 2017). 일반적으로 “CyanoHABs”라고 불리는 남세균 유래 녹조현상은 주로 담수에서 남세균의 폭발적인 성장을 지칭하며, 잠재적

으로 환경과 인간의 건강에 악영향을 미친다 (Dolah *et al.* 2001). CyanoHABs의 부정적 측면은 남세균의 과도한 성장 및 독성에 기인한다. 과다하게 번성한 남세균의 호흡 및 분해에 따른 수계 내 용존산소량 감소는 다른 유기체의 광범위한 사망을 초래할 수 있다. 또한, 수표면의 남세균에 의한 수계 내 광 투과율 저해 역시 생태계에 부정적인 영향을 미칠 수 있다 (Anderson 2009; Paerl and Otten 2013). 더구나 일부 남세균 종은 다른 유기체를 질병 및 사망에 이르게 할 수 있는 독소를 생산하는 것으로 알려져 있다 (Anderson 2009; Paerl and Otten 2013). 생산된 독소는 먹이사슬을 통

\* Corresponding author: Yoon-E Choi, Tel. 02-3290-3042, Fax. 02-3290-3040, E-mail. yechoi@korea.ac.kr

해 플랑크톤 및 저서생물로 전달되고, 최종적으로 가축 또는 인간과 같은 먹이사슬의 최상위권에 잠재적인 위험을 초래할 수 있다(Karlson and Mozūraitis 2011; Olli *et al.* 2015). 또한, 최근의 기후 및 인위적 변화로 인해 전 세계적으로 CyanoHABs의 빈도와 강도가 증가할 것으로 예상되므로, CyanoHABs 관련 문제 또한 더욱 확산될 것으로 예측된다(Paerl and Paul 2012; Briand *et al.* 2016).

CyanoHABs의 주요 원인종은 *Microcystis*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* 등으로 알려져 있다(Paerl and Otten 2013). 이 중 *Microcystis* sp.는 대다수 CyanoHABs의 주요 원인 종이므로 가장 중요하다 하겠다(Paerl *et al.* 2011; Ma *et al.* 2014). 특히, *Microcystis* sp.에 속하는 *Microcystis aeruginosa*는 가장 널리 발생하는 녹조 원인종 중 하나이며, 치명적인 간 독소로 알려진 미소시스틴(microcystin)의 수계 오염의 원인 세균이다(Qian *et al.* 2012). 따라서 많은 국가에서 CyanoHABs의 발생을 예방하고 완화하기 위한 *M. aeruginosa*의 제어에 집중적으로 노력해왔다.

CyanoHABs의 방지를 위해 질소, 인과 같은 부영양화를 일으킬 수 있는 물질을 제거하는 것이 제안되었다. 그러나, 이 방법을 통해 CyanoHABs를 예방하는 것은 지속해서 수계에 유입되는 영양염을 제어하기 어려운 한계가 있었다. 따라서 CyanoHABs가 발생한 수역에 여과, 혼합, 회수, 초음파처리, 전기 분해, 화학 약품 살포, 동물플랑크톤 및 세균의 적용과 같은 다양한 물리적, 화학적 및 생물학적 방법을 적용해 CyanHABs를 제어하는 것이 제안되었다(Anderson 2009; Paerl and Otten 2013). 그러나 상기된 기술의 실제 적용은 명확한 한계를 나타낸다(Lee *et al.* 2001b). 물리적 방법은 작은 수계에 효과적이거나 넓은 수계에 적용하기에는 어려움이 따르고(Paerl and Otten 2013), 화학적 방법은 CyanoHABs 종뿐만 아니라 다른 수생 생물에 악영향을 미칠 수 있으며(Gumbo *et al.* 2008), 생물학적 방법은 다른 생물체의 수계 도입에 따른 생태계 교란, 먹이사슬을 통한 피해 확산 등의 잠재적 악영향을 내포한다. 예를 들어, 살조 세균으로 널리 알려진 *Pseudomonas aeruginosa*는 잠재적으로 동물과 인간의 질병을 유발할 수 있는 세균이다(Ren *et al.* 2010). 따라서 이러한 문제를 피하기 위해서는 새로운 접근법과 재료가 요구된다.

펩타이드는 CyanoHABs 제어에 대해 상기한 단점을 극복할 수 있는 대체재로서 이용 가능하다. 펩타이드는 여러 아미노산으로 구성되어 있으며 미생물 및 세포와 특이적으로 상호작용할 수 있는데, 일부 펩타이드는 미생물 세포로 전달되어 세포 성장이나 생존을 저해하는 항균 특성을 지닌다. 따라서 이러한 항균 펩타이드는 병원균 및 균류를 제어하

는 데 주로 이용되어왔다. 또한, 최근의 연구 결과는 일부 펩타이드가 적조제어에 탁월한 성능을 보임을 밝혔다(Lee *et al.* 2001a; Park *et al.* 2011). 예를 들어, 펩타이드 HPA3NT3 (FKRLKLLFKKIWNWK-NH<sub>2</sub>)는 적조에 대한 선택적 살조 활성을 보였다(Park *et al.* 2011). 이와 유사하게 펩타이드를 이용한 담수 CyanoHABs의 제어에 관한 연구도 이루어지고 있으나, 실제 적용 가능성에 대한 보고는 아직 이루어지지 않았다.

이 연구에서 우리는 CyanoHABs를 제어하기 위해 기존에 무독성 항균 및 항진균 펩타이드로 밝혀진 CA-MA 유래 펩타이드 2종(CMA1, CMA2)과 *Helicobacter pylori* 유래 펩타이드 2종(HPA3P, HPA3NT3)의 *M. aeruginosa* 제어 효율을 조사하였다(Mereuta *et al.* 2008; Lee *et al.* 2010; Lee *et al.* 2013; Lee *et al.* 2015). 또한, 펩타이드 구성 아미노산과 구조적 특이성에 기인하여 신규 펩타이드 4종(K160242~5)을 제조하고 *M. aeruginosa* 제어 효율을 조사하였다. 우리는 본 연구의 결과를 통해 항균 펩타이드를 이용한 CyanoHABs 제어 가능성을 제시한다.

## 재료 및 방법

### 1. 펩타이드의 합성 및 정제

펩타이드는 Liberty microwave peptide synthesizer (CEM Co., USA)를 사용하여 Rink amide 4-methyl benzhydrylamine 수지(0.55 mmol g<sup>-1</sup>; Nova-biochem)에 9-fluorenylmethoxy carbonyl (Fmoc) 고체상 방법으로 합성하였다. 이후 결합제로서 0.45 M 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate, 0.1 M N-hydroxy benzotriazole, dimethylformamide를 이용하여 결합하였다. 그 후 dichloromethane으로 세척하고 trifluoroacetic acid/triisopropylsilane/water 혼합물(90:5:5)로 실온에서 2시간 항온처리하여 절단하였다. 침전을 위해 조 펩타이드(crude peptide)를 diethyl ether와 혼합하고 역상 고속 액체 크로마토그래피(HPLC; Shimadzu LC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 정제한 후 말디 질량분석기(MALDI-MS; MALDI II, Kratos Analytical Instrument, Japan)로 분자량을 분석하였다.

### 2. 균주 및 배양 조건

실험에 이용된 담수 남세균 *Microcystis aeruginosa* KW는 한국생명공학연구원으로부터 제공받았다. *M. aeruginosa*는 BG-11 배지에서 배양하였고, BG-11 배지는 1 L 3차 증류수에 NaNO<sub>3</sub> 1,500 mg, Citric Acid·H<sub>2</sub>O 6 mg (Fisher

Scientific Korea Ltd., Korea),  $K_2HPO_4$  40 mg,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  75 mg,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  36 mg, Ferric Ammonium Citrate 6 mg,  $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$  1 mg,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.22 mg (Sigma-Aldrich Inc., USA),  $Na_2CO_3$  20 mg,  $H_3BO_3$  2.86 mg,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  1.81 mg,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.39 mg (JT Baker Chemical Co., USA),  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.079 mg (MCiB Manufacturing Chemists Inc., USA),  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  0.0494 mg (Mallinckroft Inc., USA)을 첨가한 후 121°C에서 20분간 고압멸균하여 제조하였다 (Stanier *et al.* 1971). 균주의 종배양은 25°C, 1 vvm 폭기 조건에서  $50 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  백색 형광등을 이용하여 배양하였다.

### 3. 항균 펩타이드의 살조 활성 측정

*M. aeruginosa*에 대한 항균 펩타이드 4종(CMA1, CMA2, HPA3P, HPA3NT3)의 살조 활성은 680 nm에서 광학 밀도 (OD)를 측정하는 것으로 이루어졌다 (Chen *et al.* 2017). 먼저, 96-well plate에 10, 50, 100, 200  $\mu M$  농도의 펩타이드를 포함한 BG-11 배지를 200  $\mu L$ 씩 넣어준 후 중간지수단계의 세포를  $1 \times 10^7 cells mL^{-1}$  ( $OD_{680nm}$  약 0.25)의 농도로 도입하였다. 이후 96-well plate를 25°C,  $50 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  백색 형광등 조건으로 옮겨 배양하였다. 배양 2, 4, 8, 24, 48시간 후 SpectraMax<sup>®</sup> M2e microplate reader (Molecular Devices Corp., USA)를 이용하여 *M. aeruginosa*의 엽록소 농도 변화를 측정하고, 이로부터 *M. aeruginosa*의 성장곡선을 구하였다. 이때 동일한 부피의 BG-11 배지를 블랭크로 설정하고, 대조군과 실험군 사이의 엽록소 농도를 비교하여 펩타이드의 살조 효율을 계산하였다. 세포 응집이 측정 결과에 미치는 영향을 최소화하기 위해 모든 측정은 pipetting 직후 수행되었다.

### 4. 양친매성 펩타이드의 살조 활성 측정

*M. aeruginosa*에 대한 양친매성 펩타이드 4종(K160242~5)의 살조 활성은 상기와 유사한 방법으로 측정되었다. 먼저, 96-well plate에 10, 20, 50, 100  $\mu M$  농도의 펩타이드를 포함한 BG-11 배지를 200  $\mu L$ 씩 넣어준 후 중간지수단계의 세포를  $OD_{680nm}$  0.5의 농도로 도입하였다. 이후 96-well plate를 25°C,  $50 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  백색 형광등 조건으로 옮겨 배양하였다. 배양 후 72시간 동안 4시간마다 SpectraMax<sup>®</sup> M2e microplate reader (Molecular Devices Corp., USA)를 이용하여 *M. aeruginosa*의 엽록소 농도 변화를 측정하고, 이로부터 *M. aeruginosa*의 성장곡선을 구하였다. 이때 동일한 부피의 BG-11 배지를 블랭크로 설정하고, 대조군과 실험군 사이의 엽록소 농도를 비교하여 펩타이드의 살조 효율을 계산하였

다. 세포 응집이 측정 결과에 미치는 영향을 최소화하기 위해 모든 측정은 pipetting 직후 수행되었다.

### 5. 펩타이드의 세포 응집 효과 측정

펩타이드의 세포 응집 효과는 1 mL 투명 플라스틱 큐벳과 100  $\mu M$  펩타이드를 사용하여 측정하였다. 먼저,  $5 \times 10^7 cells mL^{-1}$  농도의 세포 1 mL를 투명 플라스틱 큐벳으로 옮긴 후 각각의 펩타이드를 100  $\mu M$  농도로 큐벳에 집중하였다. 이후 큐벳을 밀봉한 후 25°C,  $50 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  백색 형광등 조건으로 옮겨 배양하였다. 1시간 후 상층액에 존재하는 세포 수를 혈구계 (Neubauer counting chamber)와 현미경 (OPTINITY KB-500, Korea Lab Tech Corp., Korea)을 사용하여 계수하고, 응집 효율을 결정하였다.

### 6. 통계 분석

펩타이드의 살조 효율 측정은 6회 반복 수행하였고, 응집 효율 측정은 3회 반복 수행하였다. 결과로부터 표준오차를 구하기 위해 Sigma Plot 10.0 (Systat Software Inc., USA)을 이용하여 통계분석을 실시하였다.

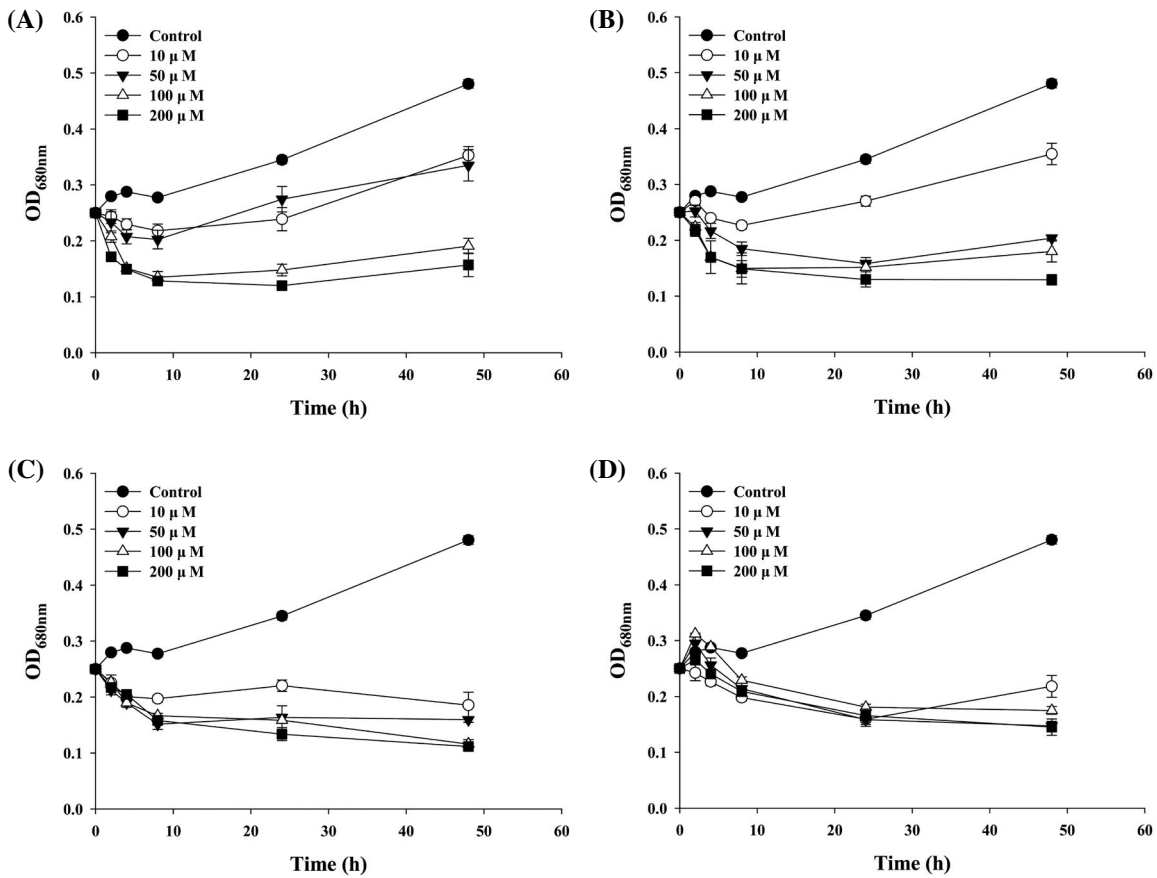
## 결과 및 고찰

### 1. *M. aeruginosa*에 대한 항균 펩타이드의 살조 활성

이 연구에서 우리는 *M. aeruginosa*에 대한 항균 펩타이드의 살조 활성을 확인하기 위해 CA-MA (KWKLFKIGIGKFLHSAKKF-NH<sub>2</sub>) 유래 항균 펩타이드 CMA1, CMA2와 *Helicobacter pylori* 유래 항균 및 항진균 펩타이드 HPA3P, HPA3NT3를 사용하였다 (Table 1). 모든 펩타이드는 *M. aeruginosa*의 광학 밀도를 현저하게 감소시켰다 (Fig. 1). 배양 24시간 후, CMA1, CMA2, HPA3P, HPA3NT3 처리군의 광학 밀도는 각각 대조군 대비 최대 65.2, 62.4, 61.2, 54.0%

**Table 1.** Amino acid sequence and molecular weight of peptides

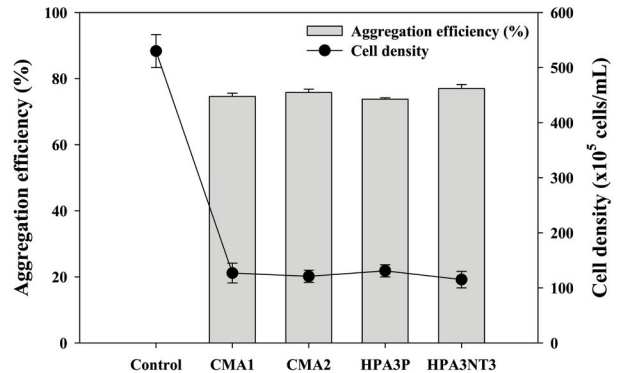
Peptide	Sequence	Molecular weight
CMA1	KWKLFKIGIGKHFHLSAKKF-NH <sub>2</sub>	2404.2 g
CMA2	KWKLFKIGIGKFLSAHKKF-NH <sub>2</sub>	2404.2 g
HPA3P	AKKVFKRLPKLFSKIWNWK-NH <sub>2</sub>	2417.2 g
HPA3NT3	FKRLKLFKKIWNWK-NH <sub>2</sub>	2062.0 g
K160242	AKKVAKRLKLAKKIWN-NH <sub>2</sub>	1908.5 g
K160243	VAKRLKLAKKIWKWK-NH <sub>2</sub>	2023.6 g
K160244	KVAKRLKLAKKIWK-NH <sub>2</sub>	1837.4 g
K160245	AKKVKAACAACAACA-NH <sub>2</sub>	1781.3 g



**Fig. 1.** Algicidal effect of antimicrobial peptides against *Microcystis aeruginosa*. (A) CMA1, (B) CMA2, (C) HPA3P, and (D) HPA3NT3. Error bars: standard error.

만큼 감소하였다. 광학 밀도의 감소는 펩타이드 처리 농도와 높은 상관성을 나타내었고, 주로 초기 8시간 이내에 집중되었다. 마찬가지로 배양 48시간 후 CMA1, CMA2, HPA3P, HPA3NT3 처리군의 광학 밀도는 각각 대조군 대비 최대 67.3, 73.1, 76.7, 69.8% 만큼 감소하였다. 그러나, CMA1과 CMA2 처리군의 배양 48시간 후 광학 밀도 측정값은 배양 24시간 후보다 높게 나타났다. 배양 48시간 후 CMA1 10, 50, 100, 200 μM 처리군의 광학 밀도는 각각 0.3526, 0.3350, 0.1909, 0.1572로 24시간과 대비하여 36.3, 22.1, 29.0, 31.1% 증가하였다 (Fig. 1A). 마찬가지로 배양 48시간 후 CMA2 10, 50, 100 μM 처리군의 광학 밀도는 각각 0.3545, 0.2038, 0.1800으로 24시간과 대비하여 31.2, 28.8, 18.7% 증가하였으며, 200 μM 만이 0.4% 감소한 광학 밀도(0.1293)를 보였다 (Fig. 1B). 이러한 경향은 HPA3P와 HPA3NT3에서는 거의 관측되지 않았다.

우리는 이러한 차이가 펩타이드의 살조 기작의 차이에 기인한 것으로 추정하고 펩타이드의 *M. aeruginosa* 제어기작



**Fig. 2.** Aggregation effect of peptides against *Microcystis aeruginosa*. Error bars: standard error.

을 밝히고자 하였다. 먼저, 모든 펩타이드 처리군에서 처리 즉시 세포 응집이 일어났으므로 각 펩타이드의 세포 응집 효율을 조사하였다 (Fig. 2). 펩타이드 처리 1시간 후 CMA1, CMA2, HPA3P, HPA3NT3-A2 처리군의 상층액 내 세포 밀

도는 각각 74.6, 75.8, 73.8, 77.0% 만큼 감소하였다. 이로부터 우리는 펩타이드의 *M. aeruginosa* 제어기작 중 하나가 여타 응집제와 같이 세포 응집에 의한 것임을 알 수 있었다. 자연에서 *M. aeruginosa*는 광합성을 통해 에너지를 축적하기 위해 세포 내 부력을 조절한다(Sun *et al.* 2016). 그러나 펩타이드에 의해 세포가 매우 강하게 응집될 경우 내부의 세포는 원활한 광합성 수준에 도달하지 못하고 성장이 크게 억제될 것이며, 최종적으로 사멸할 것이다. 따라서 펩타이드는 세포의 응집을 통해 간접적으로 사멸을 유도한다. 이로부터 CMA1과 CMA2에서 나타난 24시간 이후의 광학 밀도 증가가 표면 세포의 성장에 의한 것임을 유추할 수 있다. 그러나 이는 HPA3P와 HPA3NT3에서 관찰된 광학 밀도의 꾸준한 감소를 설명할 수 없었다. 따라서 우리는 HPA3P와 HPA3NT3가 세포 파쇄 등의 제어기작을 통해 *M. aeruginosa*의 직접적인 사멸을 유도하는지 조사하였다. 그러나 HPA3P와 HPA3NT3 처리군에서 세포 파쇄는 관찰되지 않았다.

## 2. 항균 펩타이드의 구조적 특이성 및 신규 펩타이드 디자인

다음으로 우리는 펩타이드 구성 아미노산에 주목했다. CMA1, CMA2, HPA3P, HPA3NT3는 각각 20, 20, 19, 15개의 아미노산으로 구성되어있으며, 8, 8, 7, 7개의 염기성 아미노산을 포함한다(Fig. 3). 풍부한 염기성 아미노산 함량은 펩타이드의 세포 응집에 영향을 주었을 것이다. *M. aeruginosa*의 세포벽 주성분은 펩티도글리칸(peptidoglycan)이며, 음전하를 띤다(Hadjoudja *et al.* 2010). 따라서 4종의 펩타이드는 *M. aeruginosa*의 세포벽과 쉽고 강하게 결합할 수 있고, 가교 결합을 통해 세포를 응집시킬 수 있다. 그뿐만 아니라 펩타이드의 구성 아미노산은 펩타이드가 세포 내로 투과되었을 가능성도 시사한다. 일부 펩타이드는 세포벽을 관통할 수 있으며, 세포 투과성 펩타이드는 일반적으로 염기성 아미노산이 풍부하고 30개 미만의 아미노산으로 구성된 것으로 알려져 있다(Suresh and Kim 2013; Wei *et al.* 2015). 이러한 양이온성 펩타이드는 에너지 및 엔도사이토시스 독립적

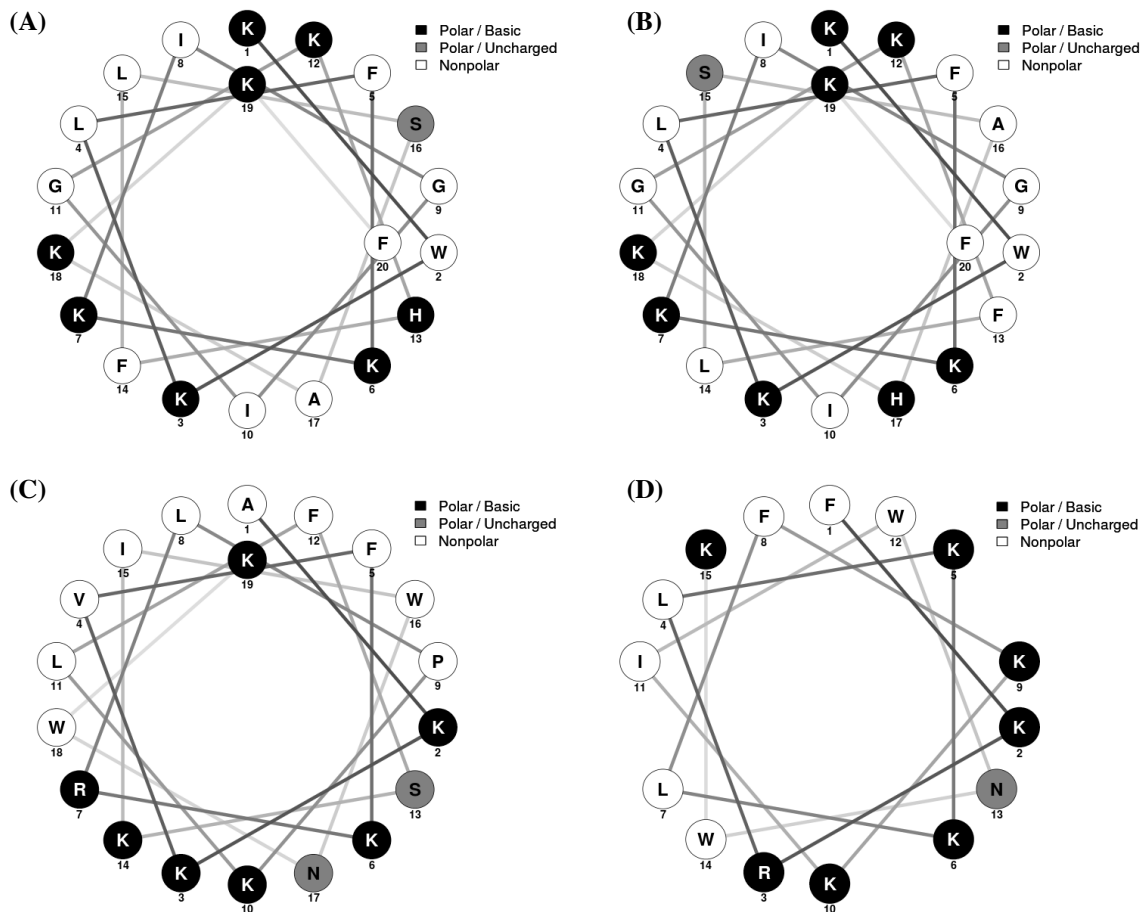


Fig. 3. Helical wheel diagram of antimicrobial peptides. (A) CMA1, (B) CMA2, (C) HPA3P, and (D) HPA3NT3.

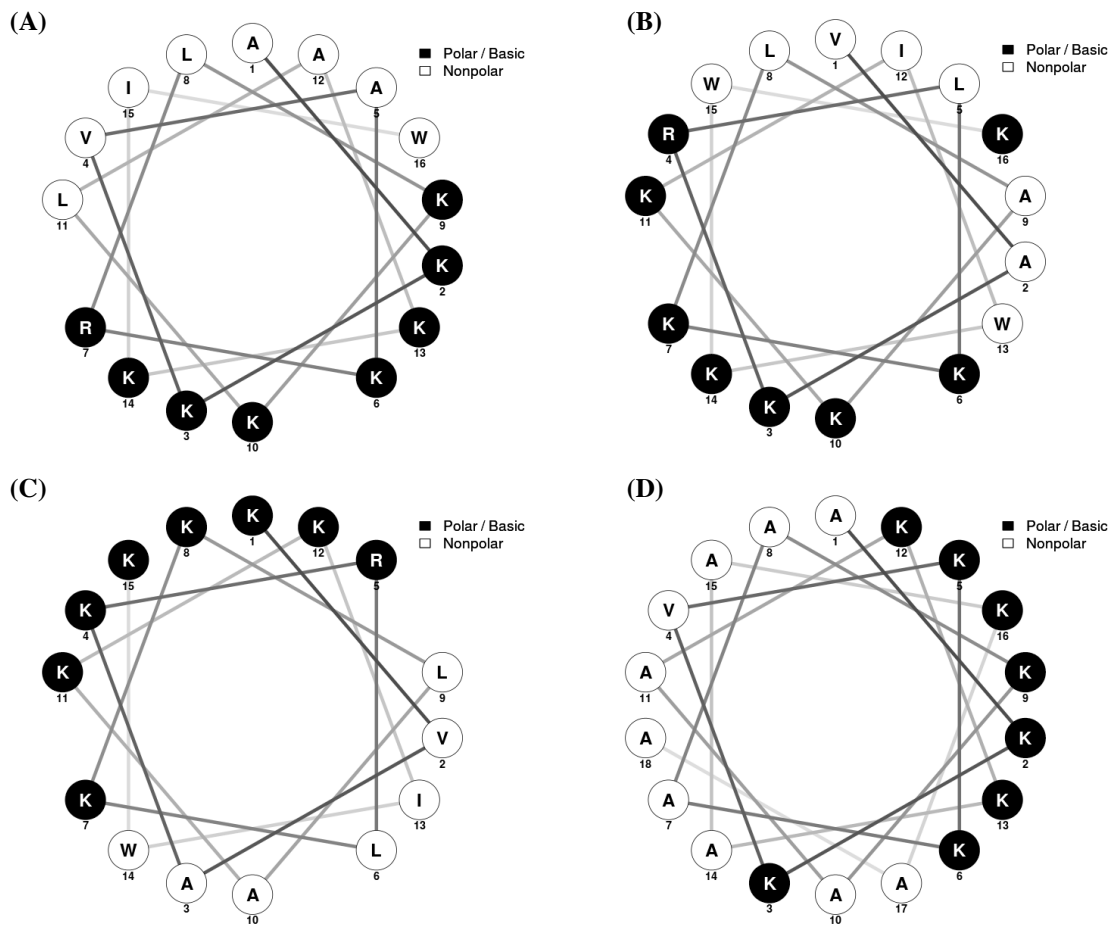


Fig. 4. Helical wheel diagram of amphipathic peptides. (A) K160242, (B) K160243, (C) K160244, and (D) K160245.

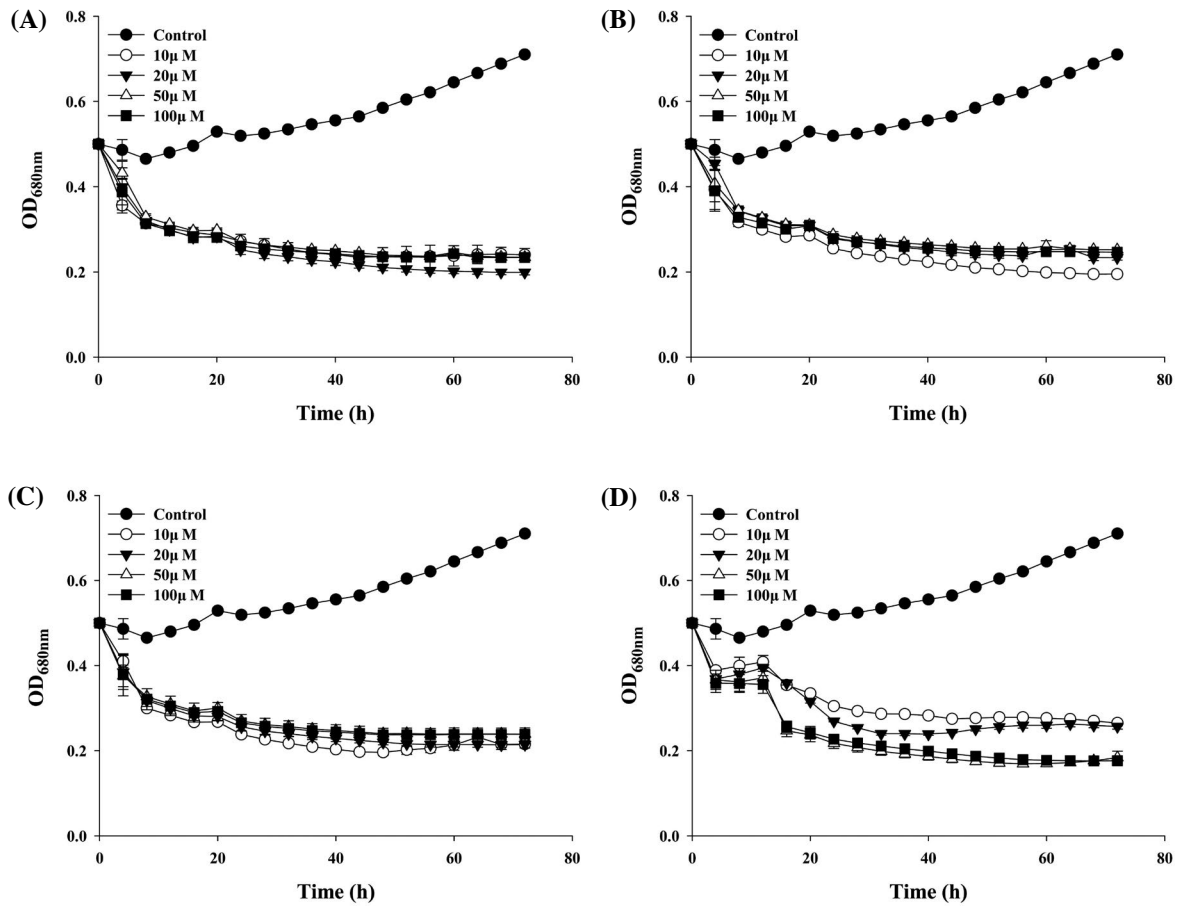
(energy and endocytosis-independent)으로 세포벽을 관통할 수 있다(Vives *et al.* 1997). 실험에 사용된 4종의 펩타이드는 위의 조건에 적합하므로 펩타이드가 세포 내로 투과되었을 가능성이 있다. 또한, *M. aeruginosa*는 최대 28.1%에 달하는 지질 함량을 갖는 균주이므로(Da Rós *et al.* 2012), 펩타이드가 세포 내로 투과될 경우 정전기 상호작용을 통해 음으로 하전 된 지질에 결합하여 세포 내에 잔류할 수 있다(Park *et al.* 2011). 따라서 HPA3P와 HPA3NT3 처리군에서 광학 밀도의 증가와 직접적인 사멸이 관찰되지 않은 까닭은 이들이 세포 내부에서 세포의 성장 저해와 사멸을 유도한 데 따른 것일 수 있다.

또한, 우리는 펩타이드의 아미노산 구조에도 주목했다. CA-MA 유래 펩타이드 CMA1, CMA2와 *H. pylori* 유래 펩타이드 HPA3P, HPA3NT3는 구조적으로 매우 상이하다. CMA1과 CMA2는 극성 아미노산과 비극성 아미노산이 혼재된 구조이나(Fig. 3A and B), HPA3와 HPA3NT3는 극성 아미노산과 비극성 아미노산이 편재된 양친매성 나선 구조

이다(Fig. 3C and D). CMA1, CMA2와 HPA3P, HPA3NT3 간의 세포 제어 차이는 이러한 아미노산 배열에 의한 것일 수 있다. 따라서 우리는 구성 아미노산 비와 아미노산 배열, 분자량 등을 고려한 신규 양친매성 나선 구조 펩타이드 4종(K160242~5)을 디자인하였다(Fig. 4, Table 1).

### 3. *M. aeruginosa*에 대한 양친매성 펩타이드의 살조 활성

우리는 *M. aeruginosa*에 대한 양친매성 펩타이드의 살조 활성을 확인하기 위해 구성 아미노산의 비, 배열, 분자량 등이 각기 다른 신규 펩타이드 4종을 제조하여 *M. aeruginosa*에 접종하였다. 이전 결과와 같이 모든 펩타이드는 *M. aeruginosa*의 광학 밀도를 현저하게 감소시켰다(Fig. 5). 광학 밀도의 감소는 초기 8~16시간 이내에 집중되었고, 배양 24시간 후 K160242~5 처리군의 광학 밀도는 각각 대조군 대비 최대 51.5, 50.9, 54.2, 58.2% 감소하였다. 이후 광학 밀도의 증가를 관찰하기 위해 72시간까지 광학 밀도를 측정하



**Fig. 5.** Algicidal effect of amphipathic peptides against *Microcystis aeruginosa*. (A) K160242, (B) K160243, (C) K160244, and (D) K160245. Error bars: standard error.

**Table 2.** Comparison among algicidal efficiency of peptides (24, 48 h)

Time (h)	Peptide	Peptide concentration ( $\mu\text{M}$ ) / Algicidal efficiency (%)	
		10 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
24 h	CMA1	30.7 $\pm$ 6.0	57.1 $\pm$ 3.0
	CMA2	21.6 $\pm$ 2.6	56.0 $\pm$ 5.0
	HPA3P	36.1 $\pm$ 3.0	54.0 $\pm$ 7.5
	HPA3NT3	53.8 $\pm$ 3.8	47.6 $\pm$ 1.6
	K160242	47.5 $\pm$ 3.0	49.7 $\pm$ 1.3
	K160243	50.9 $\pm$ 1.0	46.5 $\pm$ 1.5
	K160244	54.2 $\pm$ 0.6	48.8 $\pm$ 3.8
	K160245	41.3 $\pm$ 1.3	56.3 $\pm$ 2.2
48 h	CMA1	26.6 $\pm$ 3.3	60.3 $\pm$ 2.9
	CMA2	26.2 $\pm$ 4.0	62.5 $\pm$ 3.9
	HPA3P	61.4 $\pm$ 4.8	75.9 $\pm$ 1.6
	HPA3NT3	54.6 $\pm$ 4.1	63.6 $\pm$ 1.5
	K160242	59.7 $\pm$ 3.6	59.7 $\pm$ 1.3
	K160243	64.1 $\pm$ 0.6	57.4 $\pm$ 0.9
	K160244	66.4 $\pm$ 1.3	59.4 $\pm$ 2.6
	K160245	52.7 $\pm$ 0.5	68.0 $\pm$ 1.4

였으나, 모든 펩타이드와 농도 조건에서 광학 밀도의 증가가 관찰되지 않았다. 또한, 세포의 응집과 파쇄는 이전 결과와 동일하게 나타났다. 모든 세포는 강하게 응집되었으며, 파쇄되지 않았다. 따라서 우리는 펩타이드 구성 아미노산의 배열이 *M. aeruginosa* 세포의 제어에 영향을 미치는 것을 확인하였고, 세포의 제어는 펩타이드의 세포 내 기작에 의한 것임을 확인하였다.

또한, 우리는 펩타이드의 살조 효율에 영향을 미치는 구성 인자를 정확히 파악하고자 펩타이드 8종의 살조 효율을 동일 농도와 시간에서 비교하였다 (Table 2). 10  $\mu\text{M}$  CMA1, CMA2는 처리 시간과 무관하게 모든 양친매성 펩타이드보다 낮은 살조 효율을 나타냈다. 그러나 100  $\mu\text{M}$  CMA1, CMA2의 경우, 배양 24시간 후 거의 모든 양친매성 펩타이드보다 높은 살조 효율을 나타냈고 배양 48시간 후에는 비슷하거나 낮은 살조 효율을 나타냈다. 이는 앞서 서술한 바와 같이 외부 세포의 성장에 의한 광학 밀도의 증가에 따른 것으로 보인다. 양친매성 펩타이드의 비교 결과는 매우 흥

미롭게 나타났다. 펩타이드 처리 농도 10  $\mu\text{M}$ 의 살조 효율은 24, 48시간 모두 K160244가 가장 높게 나타났다. 반면에 100  $\mu\text{M}$ 의 살조 효율은 K160245와 HPA3P가 가장 높게 나타났다. 흥미롭게도 K160244는 실험에 사용된 양친매성 나선 구조 펩타이드 중 구성 아미노산의 수가 가장 적은 펩타이드(15개)이며, K160245와 HPA3P는 가장 많은 펩타이드(18, 19개)이다. 아미노산 20개로 구성된 CMA1와 CMA2가 100  $\mu\text{M}$ 에서 높은 효율을 보였음을 함께 고려할 때, 펩타이드 구성 아미노산의 수와 처리 농도 사이에도 연관이 있음을 유추할 수 있다. 결과적으로, 펩타이드의 살조 기작 및 효율에는 구성 아미노산의 종류, 수, 구조 및 펩타이드의 분자량, 처리 농도 등이 복합적으로 작용한다. 그러나 펩타이드의 세포 제어에 대한 정확한 기작과 관련 인자들을 확인하고 증명하기 위해서는 추가 연구가 요구된다.

## 적 요

본 연구에서는 CyanoHABs를 제어하기 위해 주요 우점 종인 *Microcystis aeruginosa*에 대한 항균 펩타이드의 살조 활성을 조사하고, 구조적 특이성을 바탕으로 새로운 *M. aeruginosa* 제어 펩타이드를 제작하였다. 본 실험에서 CA-MA 유래 펩타이드 CMA1, CMA2와 *Helicobacter pylori* 유래 펩타이드 HPA3P, HPA3NT3는 처리 48시간 후 각각 67.3, 73.1, 76.7, 69.8%의 최대 살조 효율을 보였다. 또한, 신규 펩타이드 K160242~5는 처리 48시간 후 각각 64.0, 64.1, 66.4, 70.1%의 최대 살조 효율을 보였다. CA-MA 유래 펩타이드는 처리 24시간 이후 세포의 재성장이 관찰되었으므로 세포 표면과의 정전기 인력을 통해 세포를 응집하고 간접적으로 제어하는 것으로 조사되었다. 반면에, 양친매성 펩타이드는 세포의 재성장이 관찰되지 않았으므로 세포 응집과 더불어 세포 내 침투를 통해 직·간접적으로 세포를 제어하는 것으로 추정되었다. 또한, 펩타이드의 살조 기작 및 효율에는 구성 아미노산의 종류, 수, 구조 및 펩타이드의 분자량, 처리 농도 등이 복합적으로 영향을 미치는 것으로 나타났다. 그러나 펩타이드를 이용한 CyanoHABs의 제어 가능성을 제고하기 위해서는 정확한 기작과 관련 인자들의 확인 및 증명이 요구된다.

## 사 사

본 연구는 대한민국 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단이 지원한 이공학개인지초연구사업(NRF-2

016R1D1A1B03932773)과 한국기초과학지원연구원이 지원한 연구개발 사업(Project No. C38703)에 의하여 수행되었습니다.

## REFERENCES

- Anderson DM. 2009. Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs). *Ocean Coastal Manage.* 52:342-347.
- Briand E, M Bormans, M Gugger, PC Dorrestein and WH Gerwick. 2016. Changes in secondary metabolic profiles of *Microcystis aeruginosa* strains in response to intraspecific interactions. *Environ. Microbiol.* 18:384-400.
- Chen Y, J Li, J Wei, A Kawan, L Wang and X Zhang. 2017. Vitamin C modulates *Microcystis aeruginosa* death and toxin release by induced Fenton reaction. *J. Hazard. Mater.* 321:888-895.
- Da Rós PC, CS Silva, ME Silva-Stenico, MF Fiore and HF de Castro. 2012. *Microcystis aeruginosa* lipids as feedstock for biodiesel synthesis by enzymatic route. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 84:177-182.
- Dolah FMV, D Roelke and RM Greene. 2001. Health and ecological impacts of harmful algal blooms: risk assessment needs. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 7:1329-1345.
- Gumbo RJ, G Ross and ET Cloete. 2008. Biological control of *Microcystis* dominated harmful algal blooms. *Afr. J. Biotechnol.* 7:4765-4773.
- Hadjoudja S, V Deluchat and M Baudu. 2010. Cell surface characterisation of *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris*. *J. Colloid Interface Sci.* 342:293-299.
- Karlson AM and R Mozūraitis. 2011. Deposit-feeders accumulate the cyanobacterial toxin nodularin. *Harmful Algae* 12:77-81.
- Lee DG, DH Kim, Y Park, HK Kim, HN Kim, YK Shin, CH Choi and KS Hahm. 2001a. Fungicidal effect of antimicrobial peptide, PMAP-23, isolated from porcine myeloid against *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282:570-574.
- Lee JK, CH Seo, T Luchian and Y Park. 2015. The antimicrobial peptide CMA3 derived from the CA-MA hybrid peptide: antibacterial and anti-inflammatory activities with low cytotoxicity and mechanism of action in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60:495-506.
- Lee JK, SC Park, KS Hahm and Y Park. 2013. Antimicrobial HPA3NT3 peptide analogs: placement of aromatic rings and positive charges are key determinants for cell selectivity and mechanism of action. *Biochim. Biophys. Ac-*



- ta-Biomembr. 1828:443–454.
- Lee TH, KN Hall, MJ Swann, JF Popplewell, S Unabia, Y Park, KS Hahm and MI Aguilar. 2010. The membrane insertion of helical antimicrobial peptides from the N-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1798:544–557.
- Lee T, K Nakano and M Matsumara. 2001b. Ultrasonic irradiation for blue-green algae bloom control. *Environ. Technol.* 22:383–390.
- Liu Y, S Chen, J Zhang, X Li and B Gao. 2017. Stimulation effects of ciprofloxacin and sulphamethoxazole in *Microcystis aeruginosa* and isobaric tag for relative and absolute quantitation-based screening of antibiotic targets. *Mol. Ecol.* 26:689–701.
- Ma J, JD Brookes, B Qin, HW Paerl, G Gao, P Wu, W Zhang, J Deng, G Zhu, Y Zhang, H Xu and H Niu. 2014. Environmental factors controlling colony formation in blooms of the cyanobacteria *Microcystis* spp. in Lake Taihu, China. *Harmful Algae* 31:136–142.
- Mereuta L, T Luchian, Y Park and KS Hahm. 2008. Single-molecule investigation of the interactions between reconstituted planar lipid membranes and an analogue of the HP (2–20) antimicrobial peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373:467–472.
- Olli K, R Klais and T Tamminen. 2015. Rehabilitating the cyanobacteria-niche partitioning, resource use efficiency and phytoplankton community structure during diazotrophic cyanobacterial blooms. *J. Ecol.* 103:1153–1164.
- Paerl HW and TG Otten. 2013. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microb. Ecol.* 65:995–1010.
- Paerl HW and VJ Paul. 2012. Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res.* 46:1349–1363.
- Paerl HW, H Xu, MJ McCarthy, G Zhu, B Qin, Y Li and WS Gardner. 2011. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): the need for a dual nutrient (N & P) management strategy. *Water Res.* 45:1973–1983.
- Park SC, JK Lee, SW Kim and Y Park. 2011. Selective algicidal action of peptides against harmful algal bloom species. *PLoS One* 6:e26733.
- Qian H, X Pan, J Chen, D Zhou, Z Chen, L Zhang and Z Fu. 2012. Analyses of gene expression and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* reveal the phytotoxicities of three environmental pollutants. *Ecotoxicology* 21:847–859.
- Ren H, P Zhang, C Liu, Y Xue and B Lian. 2010. The potential use of bacterium strain R219 for controlling of the bloom-forming cyanobacteria in freshwater lake. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26:465–472.
- Schopf JW. 2000. The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. pp. 13–35. In *The Ecology of Cyanobacteria*. Springer, Dordrecht.
- Stanier R, R Kunisawa, M Mandel and G Cohen-Bazire. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriol. Rev.* 35:171.
- Sun LW, WJ Jiang, H Sato, M Kawachi and XW Lu. 2016. Rapid classification and identification of *Microcystis aeruginosa* strains using MALDI-TOF MS and Polygenetic Analysis. *PLoS One.* 11:e0156275.
- Suresh A and YC Kim. 2013. Translocation of cell penetrating peptides on *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Bioeng.* 110:2795–2801.
- Vives E, P Brodin and B Lebleu. 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* 272:16010–16017.
- Wei Y, J Niu, L Huan, A Huang, L He and G Wang. 2015. Cell penetrating peptide can transport dsRNA into microalgae with thin cell walls. *Algal Res.* 8:135–139.

Received: 19 November 2018

Revised: 5 December 2018

Revision accepted: 10 December 2018