

부안산 참굴(*Crassostrea gigas*) 추출물로부터 피부 상재균에 대한 새로운 항균 펩타이드, cgCAFLP의 탐색 및 정제

이지은 · 서정길*

국립군산대학교 해양과학대학 식품생명공학전공

Screening and Purification of a Novel Antibacterial Peptide, cgCAFLP, Against Skin Pathogens from the Extract of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* from Buan in Korea

Ji-Eun Lee and Jung-Kil Seo*

Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Kunsan 54150, Korea

This study was performed to screen the antimicrobial activities of the extract from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* against skin pathogens and to purify the relevant antibacterial peptide. The acidified extract showed potent antibacterial activities against gram-positive and gram-negative bacteria but showed no activity against *Candida albicans* and no significant cell toxicity. Among acne-causing pathogens, the acidified extract showed potent antibacterial activity only against *Staphylococcus aureus*, and its antibacterial activity was completely abolished by treatment with trypsin or chymotrypsin, and was inhibited by salt treatment. The acidified extract showed strong DNA-binding ability but did not show bacterial membrane permeabilizing ability. Based on antimicrobial activity screening and cytotoxic effects, a novel antibacterial peptide was purified from the acidified gill extract using solid-phase extraction, cation-exchange, and reversed-phase HPLC. The resulting peptide had a molecular weight of 4800.8 Da and showed partial sequence homology with the carbonic anhydrase 4 (CA4) protein in the hard-shelled mussel. Overall, we purified a novel antibacterial peptide, named cgCAFLP, which is related to carbonic anhydrase 4 (CA4) protein, against skin pathogens. Our results suggest that the Pacific oyster extract could be used as an additive to control some acne-related skin pathogens (*S. aureus*).

Keywords: *Crassostrea gigas*, Skin pathogens, Antibacterial peptide, Purification, cgCAFLP

서론

피부는 외부로부터의 물리, 화학 및 생물학적 위협으로부터 인체를 보호해 주는 1차 방어벽 역할을 하는 중요한 기관으로 알려져 있다(Kim and Jeong, 2012). 그러나 피부는 미생물을 포함하는 생물학적 요인, 자외선 등을 포함하는 물리적 요인, 다양한 화학물질을 포함하는 화학적 요인 및 비정상적인 면역학적 요인(알러젠 등) 등이 존재하는 환경에 지속적으로 노출되면 다양한 피부질환이 발생한다고 알려져 있다(Shea et al., 2008). 많은 피부질환 중에서 *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Cutibacterium acnes*와 *Candida albicans* 등을

포함하는 피부 상재균에 의한 염증성 질환인 여드름 및 아토피가 대표적으로 알려져 있다(Kim et al., 2018). 특히, 여드름은 활발한 사회활동을 영위하는 청소년부터 성인연령층까지 넓은 연령층에 분포되어 나타나는 염증성 피부질환으로서 원인규명과 치료를 위해서 많은 사회적 관심과 활발한 연구가 진행되고 있다(Winston et al., 1991). 많은 연구에도 불구하고 여드름의 주요 발병원인은 명확히 밝혀져 있지는 않으나 피지선의 비정상적인 각질화, 호르몬 불균형에 의한 피지 분비 증가, 여드름 원인균의 증식과 염증반응 등이 주요 발병 원인으로 알려져 있다(Kim et al., 2006a; Han et al., 2009). 이러한 여드름 발병 원인들 중에서도 피부 상재균을 포함하는 여드름 원인균의 증식

*Corresponding author: Tel: +82. 63. 469. 1827 Fax: +82. 63. 469. 7448

E-mail address: jungkileun@kunsan.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0927>

Korean J Fish Aquat Sci 54(6), 927-937, December 2021

Received 20 October 2021; Revised 23 November 2021; Accepted 29 November 2021

저자 직위: 이지은(대학원생), 서정길(교수)

억제와 염증 완화에 대한 연관성 연구가 활발하게 진행되고 있다(Han et al., 2009; Lee et al., 2015). 특히, *C. acnes*는 염증성 여드름 형성의 주요 원인균이며, *S. aureus*와 *S. epidermidis*는 2차 염증 요인으로 작용하여 염증을 더욱 악화시키는 역할을 한다고 알려져 있다(Lee et al., 2012). 또한 표재성 진균증 중의 하나로 알려져 있는 칸디다증의 주요 원인균인 *C. albicans*도 피부질환의 원인균으로 알려져 있다(Park et al., 2017).

일반적으로 염증성 여드름의 치료에는 염증을 억제하거나 주요 여드름 원인 균주인 *C. acnes* 또는 2차 염증 요인으로 알려진 *S. aureus*와 *S. epidermidis* 및 *C. albicans*에 대해 살균효과를 갖고 있는 화학적/미생물학적 항생제를 많이 사용하고 있다(Lee et al., 2010). 현재 주로 사용되는 항생제에는 benzoyl peroxide, tetracycline, erythromycin 등이 있지만, 이러한 항생제들은 항생제 내성 증가와 장기 손상 및 과민반응 등과 같은 다양한 부작용을 유발한다는 문제가 제시되고 있다(Kim et al., 2006a; Han et al., 2009; Lee et al., 2015). 특히, 항생제를 장기간 사용할 경우 여드름 원인 균주뿐만 아니라 피부 정상 균주에 대한 항생제 내성도 발생할 가능성이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 내성균 유발 가능성과 부작용이 없으면서 효과적으로 여드름 원인균들을 저해할 수 있는 천연물 유래의 생물소재 개발을 위한 연구가 활발히 수행되고 있다(Lee et al., 2012; Lee et al., 2018; Lee et al., 2021). 그러나 여드름 개선을 위한 천연소재 연구는 육상 생물 유래의 소재에 집중되어 진행된 반면에 해양생물을 이용한 천연물 소재 연구는 부족한 실정이다.

참굴(*Crassostrea gigas*)은 대표적인 부착성 해양무척추동물 중의 하나로서 홍합, 진주담치 등과 함께 환경 적응력과 높은 영양학적 가치로 인하여 산업적으로 중요하게 인식되고 있는 해양성 패류이다(Han et al., 2008). 참굴은 조간대 지역에서 부착생활을 하며 여과섭식(filter-feeding)을 통해서 먹이를 섭취하는 서식형태때문에 다양한 환경의 변화나 병원성 인자들에 의한 감염 위험성에 지속적으로 노출되어 있다(Zannella et al., 2017). 따라서 참굴과 같은 여과섭식 부착생물들은 열악한 수생 서식환경에서의 생존을 위해서 효과적인 방어기능을 담당할 수 있는 다양한 선천면역 체계와 구성 요소들을 함유하고 있을 것으로 인식되고 있다(Tincu and Taylor, 2004; Lee and Seo, 2021).

현재까지 수행된 해양생물 유래의 피부기능개선과 관련된 연구는 대부분 해조류 추출물을 대상으로 진행되었으며, 참굴 추출물을 활용한 연구는 참굴 효소가수분해물과 초음파 복합처리를 통해 얻은 펩타이드의 피부미백과 피부면역에 대한 연구 등으로 연구범위가 매우 제한적으로 진행되고 있는 실정이다(Han et al., 2008; Kim et al., 2015). 반면에 대부분의 참굴 추출물을 활용한 연구는 선천면역과 관련된 내용이 많은 부분을 차지하고 있다. 참굴의 선천면역을 담당하는 구성요소로는 defensin (Gueguen et al., 2006), cgRPL29 (Seo et al., 2017) 및 cgUbiquitin (Seo et al., 2013) 등과 같은 항균 펩타이드가 알려

져 있으며, 이들은 참굴의 면역조직인 아가미와 외투막에서 주로 발현되며, 다양한 세균에 대해서 강한 항균활성을 나타냄으로써 1차방어에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 연구는 참굴의 항균 펩타이드와 선천면역계와의 연관성을 이해하기 위한 목적으로 수행된 반면, 여드름 균주의 성장 억제와 염증완화를 포함한 피부기능 개선에 대한 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 기능성 항균소재로서의 활용 가능성은 높은 반면 여드름 관련 피부 상재균 억제에 대한 연구는 비교적 부족한 참굴 추출물의 피부 상재균 억제 효과를 탐색하고 활성 물질을 정제 및 규명함으로써 참굴 추출물의 피부기능 개선 분야에서의 활용 가능성을 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

본 실험에 사용한 참굴(*C. gigas*)은 전라북도 부안 격포항(2021년 2월 4일)에서 구입하였으며, 살아있는 상태로 실험실로 운반한 후에 아가미와 외투막 및 내장 조직을 적출한 즉시 추출과정에 사용하였다.

항균활성 측정을 위한 배지성분으로서 사용된 tryptic soy broth (TSB)와 sabouraud dextrose broth (SDB) 및 agarose type I (Low EEO Agar)은 Merck사(Merck, Darmstadt, Germany)와 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 세포독성 실험의 양성 대조구로 사용된 melittin은 Sigma사(St. Louis)에서 구입하였다. 효소처리 실험을 위한 trypsin과 chymotrypsin은 Fisher Scientific사(Fairlawn, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세균 내막 투과성 측정을 위해서 사용된 o-nitrophenyl-β-D-galacto-pyranoside (ONPG)는 Sigma사에서 구입하였다. DNA-binding ability 측정에 사용된 100 bp DNA ladder는 Bioneer사(Bioneer Corp., Daejeon, Korea)에서 구입하였으며, *Vibrio parahaemolyticus* gDNAs는 phenol-chloroform method를 사용해서 추출한 것을 사용하였다(Wilson, 2001). 정제 과정에서 사용된 HPLC용 water와 acetonitrile (CH₃CN)은 Tedia사(Fairfield, OH, USA)로부터 구입하였고, 그 외의 모든 시약들은 특급을 사용하였다.

조직추출

실험실로 운반된 참굴은 흐르는 수돗물에 씻어서 패각에 부착된 오염물을 제거한 후, 아가미(gill)와 외투막(mantle) 및 내장(intestine, 아가미와 외투막을 제외한 모든 부위) 조직을 취하여 5 mL volume이 될 때까지 얼음 속의 냉각된 용기에 채워진 각각의 조직을 모았다. 모아진 아가미와 외투막 및 내장 조직에 가온된 4배량의 1% acetic acid (1:4, v/v)를 첨가하여 100°C에서 5분 동안 끓인 후, 얼음에 보관하여 충분히 냉각시켰다. 냉각된 조직은 homogenizer (T10 basic ULTRA-TURRAX;

IKA, Wilmington, NC, USA)를 사용하여 얼음 속에서 완전히 파쇄시켰다(Speed #6, 2분, 실온). 조직 파쇄액은 4°C에서 20분 동안 8,000 rpm으로 원심분리(VS-21SMT; Vision Scientific, Buchon, Korea)를 행한 후에 상층액을 취해서 항균활성 탐색 및 활성 물질의 정제를 위한 연구에 사용될 때까지 -70°C에 보관하였다(Seo et al., 2005).

항균활성 측정 및 사용 균주

항균활성 측정에는 그람 양성균인 *Bacillus subtilis* KCTC1021, *Bacillus cereus* KCTC1012와 그람 음성균인 *Escherichia coli* D31, *Salmonella enterica* KCTC2514, *Shigella sonnei* KCTC2009를 사용하였다. 또한 피부 상재균으로는 *C. acnes* KCTC3314, *S. aureus* KCTC1621, *S. epidermidis* KCTC1917 및 진균인 *C. albicans* KCTC7965를 사용하였다. 항균활성 측정 방법으로는 서로 다른 농도를 포함한 두 층의 배지를 사용하는 ultrasensitive radial diffusion assay (URDA)법을 이용하였다(Lehrer et al., 1991; Seo et al., 2005). 항균활성 측정에 사용된 균주는 tryptic soy broth (TSB) (세균용 배지) 또는 sabouraud dextrose broth (SDB) (진균용 배지)에 접종한 후 18시간 동안 37°C에서 pre-culture를 수행한 후 colorimeter (Product No. 52-1210; BioMerieux, Inc., Durham, NC, USA)를 사용하여 균 농도를 1×10^8 CFU (colony forming unit)/mL (세균용 배지) 또는 1×10^6 CFU/mL (진균용 배지)가 되도록 조정하였다. 그 후, 9.5 mL의 0.03% TSB 또는 0.03% SDB, 1% Type I agarose 및 10 mM phosphate buffer (PB) (pH 6.5)를 포함하는 underlay gel에 각각의 농도로 희석된 균액 0.5 mL을 첨가하고 잘 섞은 후에 plate에 편평하게 부어 굳혔다. 굳은 plate에 punch를 사용하여 직경 2.5 mm의 well을 뚫은 후에 5 μ L의 시료를 도입시켰다. 시료가 배지에 완전히 스며들면 3시간 동안 37°C에서 1차 배양한 후, 그 위에 10 mL의 6% TSB 또는 6% SDB, 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(Seo et al., 2005). 다음날 well 주위에 생긴 clear zone의 크기를 측정함으로써 항균활성을 확인하였다. 항균활성 측정 동안 양성 대조구(positive control)로는 미국산 잡종 농어(*Morone saxatilis* × *Morone chrysops*)의 mast cell (비만세포)에서 정제된 항균 펩타이드인 piscidin 1을 사용하였고, 음성 대조구(negative control)로는 1% acetic acid 또는 0.01% acetic acid를 사용하였다(Silphaduang and Noga, 2001).

단백질 분해효소 처리에 의한 항균물질의 단백질성 확인

추출물에 포함된 항균물질 또는 정제물의 단백질성을 확인하기 위해서 단백질 분해효소인 trypsin과 chymotrypsin의 처리 전·후의 항균활성 변화를 확인하였다. 추출물 또는 정제물 5 μ L에 enzyme 용액(1,000 μ g/mL in 50 mM PB, pH 7.4 또는 pH 7.8) 1 μ L를 첨가하고 37°C에서 60분 동안 반응시킨 뒤, URDA

법으로 *S. aureus* KCTC1621에 대한 항균활성 변화를 측정하였다(Seo et al., 2017).

추출물에 포함된 항균물질의 salt-effect 확인

추출물에 포함된 항균물질에 대한 salt-effect를 확인하기 위해서 서로 다른 농도의 NaCl을 underlay gel에 첨가한 후 *S. aureus* KCTC1621에 대한 항균활성 변화를 URDA법을 통하여 확인하였다. 이를 위해서 *S. aureus* KCTC1621를 포함하는 underlay gel에 0.5%, 1.0%, 1.5% 및 2.0% 농도가 되도록 NaCl을 첨가하고 각각의 추출물을 첨가한 후 URDA법을 통해서 항균활성 변화를 확인하였다.

추출물의 세포독성 확인

추출물의 human dermal fibroblasts (HDF; 106-05N; Sigma-Aldrich) cell에 대한 세포독성을 확인하기 위해서 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium Bromide) assay를 이용하여 cell viability를 측정하였다(Ko et al., 2020). 이를 위해서 다양한 농도의 추출물(0, 0.5, 1, 10, 50, 100, 200 mg/mL)을 HDF cell에 처리한 후 추출물의 농도에 따른 세포 생존율을 확인하였다. 벌독 유래의 강한 세포독성이 알려져 있는 melittin (Sigma-Aldrich-M2272, from bee venom approx. 85%)을 양성 대조구로 사용하였다(Han et al., 2009).

추출물의 내막 투과성 측정(cytoplasmic membrane permeabilization assay)

추출물의 세균 내막 투과성 측정을 위해서 β -galactosidase 활성을 포함하는 *E. coli* ML35p와 nonmembrane-permeative chromogenic 기질인 o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)가 포함된 용액에 추출물을 도입시킨 후 *E. coli* ML35p의 세포질에서 유출된 β -galactosidase의 활성을 확인하는 실험을 수행하였다(Skerlavaj et al., 1990). 이를 위해서 배양된 mid-log phase의 *E. coli* ML35p를 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 세척을 한 후, 1.5 mM의 ONPG를 포함하는 동일 buffer에 용해시켰다. 그 후, 측정할 추출물들을 첨가한 뒤 37°C에서 60분간 배양하면서 10분 간격으로 유출된 β -galactosidase에 의한 ONPG의 가수분해물인 o-nitrophenol의 농도를 405 nm에서 측정하였다. 막 투과활성 측정의 양성 대조구로는 강한 막 투과성을 포함하는 것으로 알려진 항균 펩타이드인 piscidin 1을 사용하였다.

DNA-Binding (DNA-결합성) Assay

추출물에 존재하는 DNA 결합성 물질의 존재유무를 확인하기 위해서 DNA binding에 의한 DNA band들의 agarose gel-electrophoresis에서의 이동의 저해 정도를 확인하는 DNA-binding assay를 수행하였다(Hsu et al., 2005). 이를 위해서 100 bp DNA ladder (0.1 μ g) 또는 *V. parahaemolyticus* genomic DNA (0.1 μ g)와 추출물을 혼합해서 37°C에서 60분 동안 반응

시키고 0.5 µg/mL EtBr을 포함하는 1.8% 또는 1.2% agarose gel에서 전기영동을 수행한 후 DNA band의 유무 및 이동 정도를 확인함으로써 DNA-binding 정도를 확인하였다. DNA-binding ability의 비교물질로는 미국산 잡종 농어의 비만세포에서 유래한 항균 펩타이드인 piscidin 1을 사용하였다.

Acid-Urea PAGE와 bug-blot

추출물 내의 양이온성 단백질/펩타이드성 물질의 조성 및 활성 band를 확인하기 위해서 acid-urea PAGE와 bug-blot (gel overlay assay)을 *E. coli* D31에 대해서 수행하였다(Seo et al., 2005; Seo, 2016). Bug-blot에 사용될 LB (luria-bertani) plate 제조를 위해서 *E. coli* D31은 TSB에서 37°C로 18시간 동안 배양한 후 colorimeter (Product No. 52-1210; BioMerieux, Inc.)를 사용하여 균 농도를 84%T (= 1×10^8 CFU/mL)가 되게 조정하였다. 그 후, 9.5 mL의 LB, 1% Type I agarose, 10 mM phosphate buffer (PB) (pH 6.7) 및 0.5% NaCl를 포함하는 gel에 희석된 균액 0.5 mL (1×10^8 CFU/mL)를 넣고 잘 섞은 후에 plate에 편평하게 부어 굳혔다.

AU-PAGE와 bug-blot을 위해서 동일한 2개의 gel과 동일한 2개의 시료를 제조하여 2개의 gel에 AU-PAGE 후 염색/탈염 색 용도와 AU-PAGE 후 bug-blot 용도로 각각 사용하였다. 먼저, AU-PAGE를 위한 gel은 urea 3.6 g, D.W. 3.4 mL, 30% acrylamide/1.6% bis-acrylamide solution 5 mL, glacial HAc 0.65 mL를 비커에 넣고 stirring (10분, 실온)과 degassing (20분, 실온, desiccator)을 한 후 TEMED (tetramethylethylenediamine) 0.06 mL, 10% APS (ammonium persulfate) 0.275 mL를 첨가한 후 stirring (1분, 실온)하고, gel액을 붓고 실온에서 16시간 동안 굳혔다. 제조된 gel을 전기영동 장치에 조립한 후 5% acetic acid를 붓고 pre-run (150 v, 50 min, 실온, reversed polarity; lower chamber cathode)을 수행하였다. Well에 도입할 각 시료 20 µL는 20 µL의 2× sample buffer와 1:1 (v/v)로 혼합해서 사용하였고, human histone H1 (~21 kDa) 1 µg, human lysozyme (~11 kDa) 1 µg, aprotinin (~6.5 kDa) 1 µg, magainin II (~2.4 kDa) 1 µg 및 Ab4-7 (~1.3 kDa) 1 µg을 포함하는 20 µL의 standard solution은 20 µL의 2× Sample buffer와 1:1 (v/v)로 혼합해서 사용하였다. Pre-run이 끝난 후 running buffer (5% acetic acid)를 교체하고 각각의 well에 시료를 도입시킨 후 전기영동을 실시하였다(150 v, 50분, 실온, reversed polarity; lower chamber cathode). 전기영동 후, 1개의 gel은 CBB R-250으로 염색과 탈염 색 과정을 수행하여 단백질 성 물질들의 band 유무를 확인하였다. 나머지 1개의 gel은 rinse buffer (10 mM PB buffer, pH 7.4)로 2회 세척을 한 후에 *E. coli* D31을 포함하는 LB plate에 overlay시킨 후 37°C에서 3시간 동안 1차 배양하였다. 1차 배양 후에 overlay시켰던 AU-PAGE gel을 제거한 후에 LB plate는 동일한 온도에서 18시간 동안 2차 배양하였다. 다음날 LB plate에 나타난 clear zone을 염색 및

탈색된 gel의 band 결과와 비교하였다.

Solid phase extraction

아가미 추출물에 존재하는 *S. aureus* KCTC1621에 대한 항균활성 물질의 정제 과정은 Sep-Pak C18 cartridge (Waters #WAT036925, 5 g, 20 CC)를 이용한 solid-phase extraction 방법을 이용하여 수행하였다(Kim et al., 2006b). 이를 위해서 Sep-Pak C18 cartridge는 20 mL의 acidified acetonitrile (ACN) (0.1% trifluoroacetic acid, TFA, 포함)로 활성화시킨 후 20 mL의 acidified water (0.1% TFA 포함)로 세척하였다. 세척된 C18 cartridge에 10 mL의 아가미 추출물을 도입한 후에 20 mL의 acidified water (H₂O), 10% acidified acetonitrile (10A), 60% acidified acetonitrile (60A) 및 100% acidified acetonitrile (100A)을 사용하여 순차적으로 용출시킨 후 각각의 분획을 농축하고 0.01% acetic acid에 용해시켜 *S. aureus* KCTC1621에 대한 항균활성 측정 및 항균활성 물질의 정제 과정에 사용하였다.

항균활성 물질의 분리 및 정제

Sep-Pak C18 cartridge에서 분리된 활성 분획에 존재하는 항균물질의 분리 및 정제 과정은 HPLC (YL9100 HPLC system; Young Lin Instrument Co., Anyang, Korea)를 이용하여 수행하였다(Seo et al., 2017). Sep-Pak C18 cartridge에서 분리된 60% acidified acetonitrile 용출액(60A)에 존재하는 항균물질의 정제 과정은 양이온 교환 및 역상 HPLC column을 순차적으로 사용하여 수행되었고, 정제 과정 중의 분획들에 대한 항균활성은 *S. aureus* KCTC1621에 대해서 URDA법으로 측정하였다. 첫 번째 정제 과정으로 solid-phase extraction 과정에서 가장 강한 항균활성을 나타낸 60A를 TSK-gel SP-5PW column (7.5 mm × 75 mm; Tosoh, Tokyo, Japan)에 도입시키고 다음과 같은 조건으로 정제 과정을 수행하였다. A buffer는 10 mM phosphate buffer (PB; pH 6.0)이며 B buffer는 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM PB (pH 6.0)를 사용하였다. 분리 조건은 0%에서 100%까지 100분 동안 B buffer를 순차적으로 증가시킨 후 1.0 M NaCl에서 20분간 isocratic elution (등용매 용리) 과정을 수행하였으며, 유속은 1.0 mL/min, 파장은 220 nm에서 분리 과정을 수행하였다. 분취된 분획은 salt를 제거한 후 *S. aureus* KCTC1621에 대한 항균활성을 URDA법을 사용해서 확인하였다. 두 번째 정제 과정으로 활성이 확인된 분획을 CapCell-Pak C18 column (4.6 mm × 250 mm)에 적용시켜 다음과 같은 조건으로 최종 정제 과정을 수행하였다. A 용매는 0.1% TFA를 포함하는 H₂O (pH 2.2)이며 B 용매는 0.1% TFA를 포함하는 100% CH₃CN (pH 2.2)를 사용하였다. 분리 조건은 5%에서 65%까지 60분간 B 용매를 순차적으로 증가시켰으며, 유속은 1.0 mL/min, 파장은 220 nm에서 확인하였다. 최종 정제된 물질은 구조 분석을 위한 MALDI-TOF MS 측정과 amino acid sequence 분석에 사용하였다.

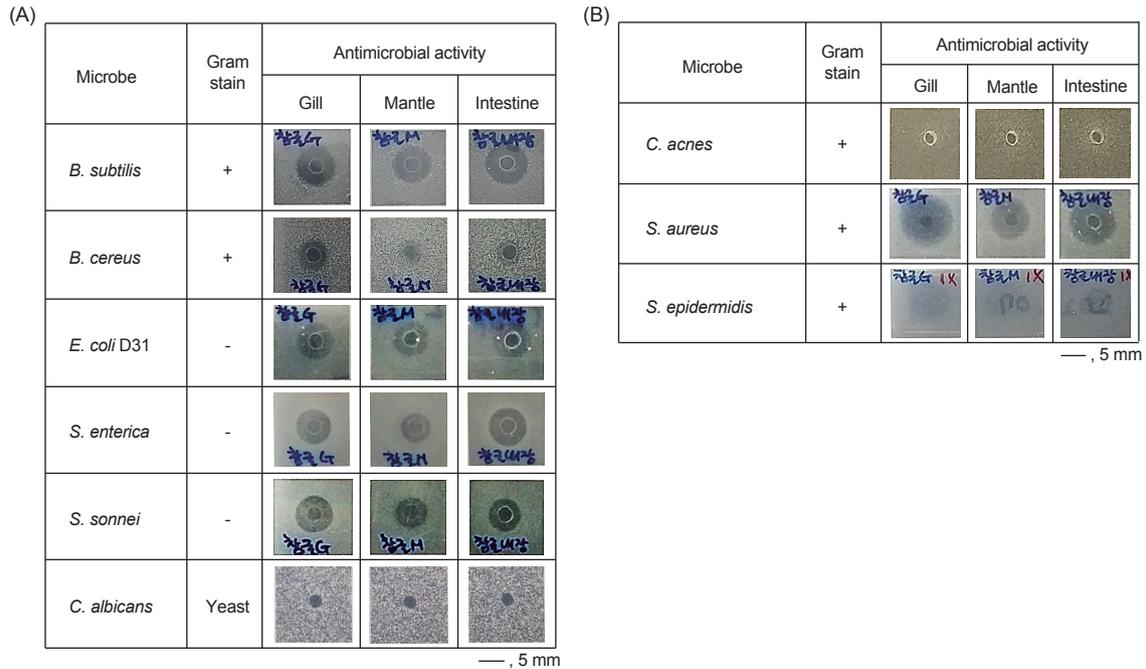


Fig. 1. Antimicrobial activity of the crude extracts of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. A, antimicrobial activity of the acidified gill, mantle, and intestine extract against Gram-positive bacteria including *Bacillus subtilis* and *B. cereus*, Gram-negative bacteria including *Escherichia coli* D31, *Salmonella enterica*, and *Shigella sonnei*, and *Candida albicans*; B, antimicrobial activity of the acidified gill, mantle, and intestine extract against acne-causing pathogens including *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, and *S. epidermidis*. Scale bar indicates 5 mm.

정제 펩타이드의 분자량 측정 및 일차구조 분석

최종 정제된 펩타이드의 분자량은 MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization)-TOF (time-of-flight)/TOF 5800 system (AB SCIEX)를 사용한 linear mode로 측정하였다(Seo et al., 2017). 정제물질을 0.1% TFA/50% CH₃CN (1:1, v/v)에 녹인 후 sinapinic acid (SA) matrix solution (10 mg/mL SA in 0.1% TFA/30% CH₃CN, 1:1, v/v)과 혼합하여 MALDI plate에 도입한 후에 분자량을 측정하였다. 표준물질로는 MS Calibration mixture를 사용하였다. 또한, 정제물의 N-말단 아미노산 서열은 API492 Precise protein sequencer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)를 사용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

추출물의 항균활성

부안산 참굴(*C. gigas*)로부터 채취한 아가미(gill)와 외투막(mantle) 및 내장(intestine) 조직들은 1% acetic acid (초산)를 이용한 약산 추출과정을 수행하였으며, 각 추출물의 항균활성 범위는 *B. subtilis* KCTC1021, *B. cereus* KCTC1012과 *E. coli* D31, *S. enterica* KCTC2514, *S. sonnei* KCTC2009 및 진균인

C. albicans KCTC7965에 대해서 URDA법을 이용하여 측정하였다. 측정 결과, 각 추출물은 측정 세균들에 대해서 강한 항균활성을 나타낸 반면에 진균인 *C. albicans* KCTC7965에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았다(Fig. 1A). 이러한 결과는 추출물의 항균활성 범위는 진균보다는 세균에 한정되어 있을 가능성을 나타내는 것이다(Seo, 2016). 또한, 각 추출물들의 피부 상재균에 대한 항균활성 유무를 확인하기 위해서 3가지의 세균(*C. acnes* KCTC3314, *S. aureus* KCTC1621, *S. epidermidis* KCTC1917)에 대해서 URDA법을 이용하여 항균활성을 측정하였다. 측정 결과, 추출물들은 피부 상재균 중에서 *S. aureus* KCTC1621에 대해서만 특이적으로 항균활성을 나타내었다(Fig. 1B). 이러한 결과는 추출물들은 피부 상재균 중에서 *S. aureus* KCTC1621에 대해서 특이적으로 항균활성을 나타내는 물질을 함유하고 있다는 것을 의미하는 것이다.

각 추출물 내의 *S. aureus* KCTC1621에 특이적으로 항균활성을 나타내는 양이온성 아미노산(Lys과 Arg)과 방향족 아미노산(Trp, Phe, Tyr)을 포함하는 단백질성 항균물질의 존재유무를 확인하기 위하여 각 추출물(5 μL)의 단백질 분해효소인 trypsin 및 chymotrypsin 처리 전·후의 항균활성 변화를 *S. aureus* KCTC1621에 대해서 URDA법을 이용하여 측정하였다(Fig. 2A). 측정 결과, 추출물들은 trypsin과 chymotrypsin 처리

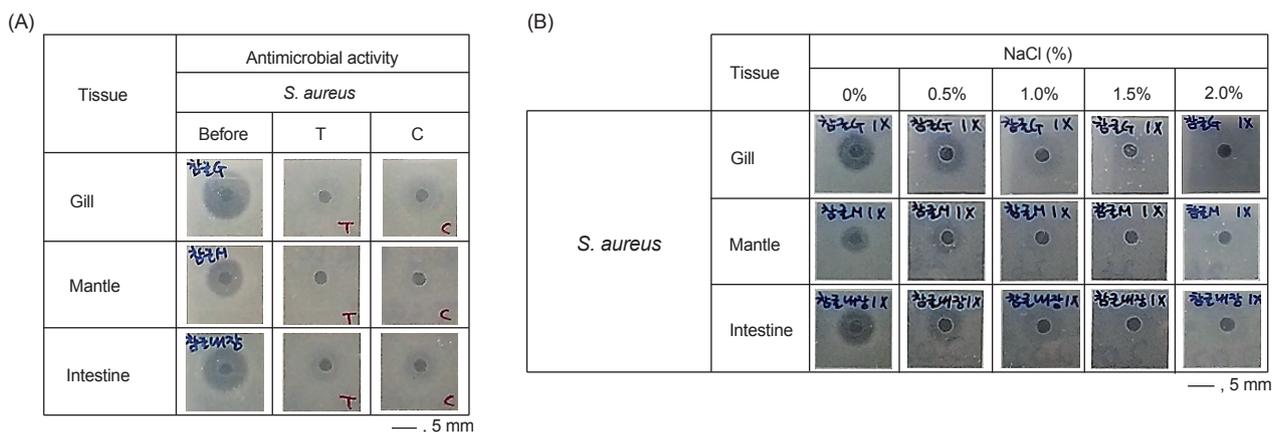


Fig. 2. Proteolytic stability and salinity stability of the crude extract against *Staphylococcus aureus* KCTC1621. A, antimicrobial activity of the acidified gill, mantle or intestine extract (before) and after treated with trypsin, T, or chymotrypsin, C, against *S. aureus* KCTC1621; B, antimicrobial activity of the acidified gill, mantle or intestine extract was tested by incubating the crude extract in the various NaCl concentrations (0-2.0 %) against *S. aureus* KCTC1621. Scale bar indicates 5 mm.

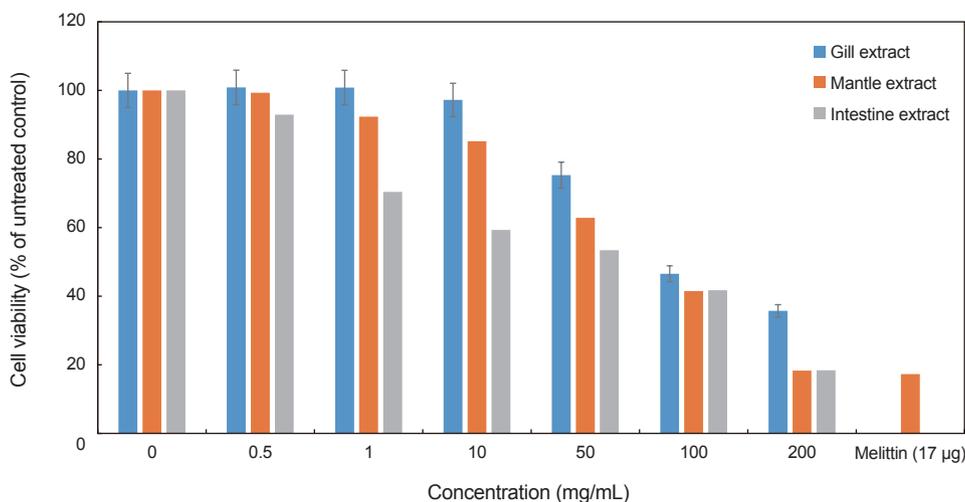


Fig. 3. Cell viability of the crude extracts against human dermal fibroblasts. Antimicrobial peptide, Melittin (17 µg) from the honey bee venom, was used as positive control. The data are expressed cell viability as % of untreated control (Mean ± SD, *P<0.05, Mussel extract vs untreated control).

후에는 *S. aureus* KCTC1621에 대한 항균활성이 거의 소실되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 추출물에 포함된 *S. aureus* KCTC1621에 대해서 특이적으로 항균활성을 나타내는 물질은 아르기닌(Arg) 또는 라이신(Lys)과 같은 양이온성 아미노산과 트립토판(Trp), 페닐알라닌(Phe), 또는 타이로신(Tyr) 같은 방향족 아미노산 등을 포함하는 단백질성 물질일 가능성이 있음을 의미하는 것이다(Lee and Seo, 2021). 따라서 *S. aureus* KCTC1621에 대한 항균활성에는 추출물에 포함된 단백질성 물질이 중요한 역할을 담당하는 것으로 판단된다. 추출물들의 항균활성도 비교에서는 아가미 추출물과 내장 추출물은 유사한

활성도를 나타낸 반면에 외투막 추출물은 상대적으로 약한 항균활성도를 나타내었다.

추출물에 포함된 *S. aureus* KCTC1621에 대해 특이적으로 항균활성을 나타내는 단백질성 항균물질에 대한 salt effect 확인은 *S. aureus* KCTC1621를 포함하는 underlay gel에 0-2% NaCl을 첨가한 후 URDA 법을 사용하여 측정하였다(Fig. 2B). 측정 결과, 추출물들의 항균활성은 0.5% NaCl 농도까지는 활성이 유지 또는 감소되었으나 1.0% NaCl 농도부터는 항균활성이 거의 소실되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *S. aureus* KCTC1621에 대한 항균활성 물질들은 salt에 매우 민감하다는

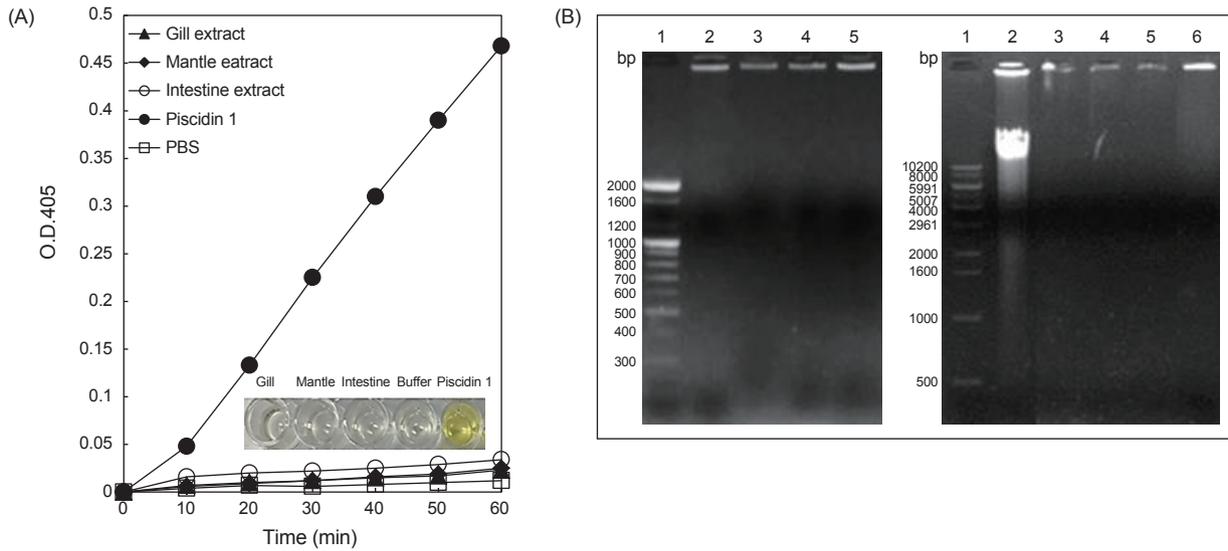


Fig. 4. Cytoplasmic membrane permeabilization of *Escherichia coli* ML35p by the crude extract and gel retardation analysis of the binding of the crude extract to DNA. A, cytoplasmic membrane permeabilization of the crude extract was monitored as an increase in fluorescence intensity by the hydrolysis of the impermeable, chromogenic substrate ONPG in the presence of piscidin 1 (4 µg) or the crude extract (5 µL) for 60 min. The yellow color represents strong membrane permeabilizing ability (inset); B, the binding ability of the extract (5 µL) to DNA was assessed by measurement of the migration of a commercial 100-bp DNA ladder (0.2 µg) (left) or *Vibrio parahaemolyticus* gDNA (right) through an agarose gel (1.8 % or 1.4 %). (Left) Lane 1, 100-bp DNA ladder (0.2 µg); lane 2, positive control, piscidin 1 (1 µg); lane 3, gill extract (5 µL); lane 4, mantle extract (5 µL); lane 5, intestine extract (5 µL). (Right) Lane 1, 1 kb DNA marker (0.2 µg); lane 2, *V. parahaemolyticus* gDNA (0.2 µg); lane 3, gill extract (5 µL); lane 4, mantle extract (5 µL); lane 5, intestine extract (5 µL); lane 6, positive control, piscidin 1 (1 µg).

것을 의미하는 것이다(Nam et al., 2019). 따라서 추출물에 포함된 *S. aureus* KCTC1621에 대해서 항균을 나타내는 물질은 참굴의 hemocytes 외부환경으로 분비되기 보다는 hemocytes 내부에서 항균작용을 수행할 가능성이 있는 것으로 판단된다. 일반적으로 천연물 유래의 항균 펩타이드는 NaCl에 의해서 항균 활성이 저해를 받는 경우가 많으며, 몇몇 해양생물 유래의 항균 펩타이드의 경우에는 NaCl에 대해서 저항성을 가진다고 알려져 있다(Lee et al., 1997; Kerenga et al., 2019).

추출물의 세포독성 확인

추출물의 세포독성을 확인하기 위해서 HDF cell의 세포증식에 대한 영향을 MTT assay를 통해서 확인하였다(Fig. 3). 추출물을 첨가하지 않은 것(0mg/mL)과 강한 세포독성이 알려진 꿀벌(*Apis mellifera*) 독(venom) 유래 항균 펩타이드인 melittin을 양성 대조구로 사용하고, 농도별(0.5, 1, 10, 50, 100, 200 mg/mL)로 추출물을 처리한 후 cell viability를 측정하였다. 측정 결과, 양성 대조구로 사용한 melittin (17 µg)은 강한 세포독성을 나타내었다(Han et al., 2009; Lee et al., 2018). 반면에 추출물들은 0.5 mg/mL 농도까지는 거의 세포독성을 나타내지 않았으나 그 이상의 농도부터는 세포독성을 나타내었으며, 아가미 추출물에 비해서 상대적으로 외투막 또는 내장 추출물이 높은 세

포 독성을 나타내었다. 이러한 결과는 HDF cell에 대해서 참굴 추출물들의 유효 활용 농도범위는 0.5 mg/mL 이하임을 의미하는 것이고, 추출물의 직접적인 활용을 위해서는 아가미 추출물이 상대적으로 더 유의하다는 것을 나타내는 것이다.

추출물에 포함된 항균물질의 세균 내막 투과성 확인 실험

추출물에 포함된 항균물질의 작용부위가 세포막 자체인지를 확인하기 위해서 membrane permeabilization assay를 수행하였다(Fig. 4A). 실험결과, 양성 대조구로 사용한 piscidin 1은 강한 내막 투과성을 나타낸 반면 추출물들은 막 투과성을 거의 나타내지 않았다(Seo, 2016). 이러한 결과는 추출물에 포함된 항균물질은 세균의 세포질 내 물질을 유출시킬 정도로 세균 막에 대해서 강한 투과성을 나타내지 않거나 세포질 내 물질의 유출 없이 세포막을 통과할 가능성이 있다는 것을 의미하는 것이다(Lee and Seo, 2021). 따라서 추출물 내의 항균물질의 예상 작용 부위는 막 자체가 아닌 것으로 판단된다.

추출물에 포함된 DNA-결합성 확인 실험

추출물에 포함된 항균물질의 작용부위가 핵 내부의 DNA 인지를 확인하기 위해서 추출물들과 DNA (100 bp DNA ladder 또는 *V. parahaemolyticus* gDNA)와의 상호작용에 의한 전기

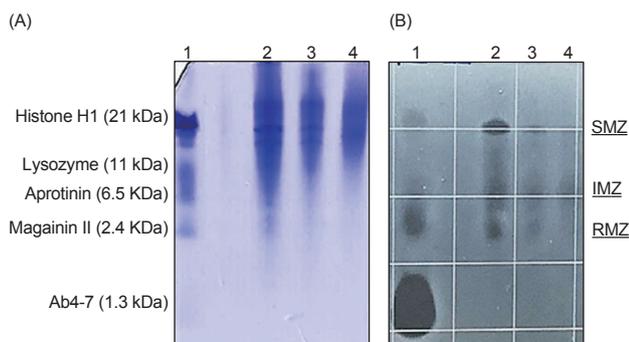


Fig. 5. AU-PAGE and gel overlay assay (bug-blot) of the crude extract against *Escherichia coli* D31. A, AU-PAGE run and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane 1, molecular weight markers: 1 µg of human histone H1, 1 µg of human lysozyme, 1 µg of aprotinin, 1 µg of magainin II, and 1 µg of Ab4-7; lane 2, 20 µL of gill extract; lane 3, 20 µL of mantle extract; lane 4, 20 µL of intestine extract; B, Bug-blot (gel overlay assay) of the acidified extract against *E. coli* D31.

장에서의 DNA migration 저해 활성을 DNA-binding assay를 통하여 확인하였다(Fig. 4B). 측정 결과, 양성 대조구로 사용한 piscidin 1은 100 bp DNA ladder (Fig. 4B left) 및 *V. parahaemolyticus* gDNA (Fig. 4B right)에 대해서 강한 DNA migration 저해 활성을 나타내었으며, 이와 유사하게 추출물들도 두 종류의 DNA에 대해서 강한 DNA migration 저해 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 piscidin 1과 추출물에 존재하는 항균물질은 DNA와 유효한 상호작용(DNA-binding)을 할 가능성이 있다는 것을 의미하는 것이다(Seo et al., 2021). 따라서 추출물에 포함된 항균물질의 작용기작은 세포막을 직접 공격하기 보다는 intracellular components들(예: DNA)과 상호작용함으로써 다양한 DNA 관련 작용/반응에 영향을 주어서 항균작용을 나타내는 것으로 예측된다(Lee and Seo, 2021).

Acid-urea PAGE와 bug-blot

추출물 내의 염기성 단백질/펩타이드의 구성과 그들의 항균활성 유무를 확인하기 위해서 AU-PAGE와 bug-blot (gel overlay assay)을 수행하였다(Fig. 5). 그 결과, 추출물들은 저분자 물질 보다는 상대적으로 고분자 물질의 농도가 높은 것으로 나타났으며, 외투막과 내장 추출물보다는 아가미 추출물에서 구성물질들의 다양성이 더 높게 나타났다(Fig. 5A). 또한, 추출물에 포함된 주요한 항균활성은 slow migration zone (SMZ) (Histone H1, ~11 kDa), intermediate migration zone (IMZ) (Aprotinin, ~6.5 kDa)과 rapid migration zone (RMZ) (Magainin II, ~2.4 kDa)을 포함하는 세 부위에서 나타났으며, SMZ의 항균활성이 IMZ 및 RMZ 보다 상대적으로 강하게 나타났다(Fig. 5B) (Noga et al., 2009). 이러한 결과는 참굴 추출물에는 다양한 분자량의 단백질성 항균물질이 존재하고 있으며, 아마도 고분자

의 단백질성 항균물질이 보다 중추적인 역할을 담당할 가능성이 있음을 의미하는 것이다.

항균활성 물질의 정제

세포독성과 항균활성 결과를 토대로 아가미 추출물로부터 *S. aureus* KCTC1621에 대한 항균활성 물질을 정제하기 위해서 solid-phase extraction (Sep-Pak C18 cartridge) 과정을 통해서 얻은 활성 분획을 양이온 교환 HPLC column 및 역상(C18) HPLC column을 사용한 연속적인 정제과정에 도입하였다. 첫 번째 정제과정으로 아가미 추출물의 solid-phase extraction (Sep-Pak C18 cartridge) 과정을 수행한 후 얻어진 4 가지 분획물(H_2O , 10A, 60A, 100A)들의 *S. aureus* KCTC1621에 대한 항균활성을 URDA법으로 측정하였다. 측정 결과, 분획물들 중에서 60% acetonitrile (60A) 분획물에서 가장 강한 항균활성을 나타내었다(Fig. 6A inset). 두 번째 정제과정으로 solid-phase extraction 과정을 통해서 분리된 활성 분획 60A를 TSK-gel SP-5PW column (7.5 mm × 75 mm; Tosoh)에 도입한 후 얻어진 각각의 용출 분획은 salt 제거 후에 *S. aureus* KCTC1621에 대한 항균활성을 URDA법으로 측정하였다(Fig. 6A). 측정 결과, *S. aureus* KCTC1621에 대한 항균활성은 1.0 M NaCl 농도에서 용출된 분획에서 확인되었다. 세 번째 정제과정으로 cation-exchange chromatography에서 얻어진 1.0 M NaCl 용출액을 CapCell-Pak C18 column (4.6 mm × 250 mm; Shiseido, Tokyo, Japan)에 도입하여 23.5분(28.5% CH_3CN)에 용출된 항균물질을 최종적으로 순수하게 정제하였다(Fig. 6B). 최종 정제된 물질의 trypsin 처리 전·후의 *S. aureus* KCTC1621에 대한 항균활성 변화를 확인한 결과 항균활성이 완전히 소실되었다(Fig. 6B inset). 이러한 결과는 *S. aureus* KCTC1621에 대해서 항균활성을 나타내는 최종 정제물질은 단백질성 항균물질임을 의미하는 것으로서 정제된 항균물질의 일차구조 분석을 위해서 분자량 측정(MALDI-TOF MS)과 N-말단 아미노산 서열분석과정(N-terminal amino acid sequencing)을 수행하였다(Seo et al., 2017).

정제된 항균활성 물질의 일차구조 분석

최종 정제된 항균물질의 분자량은 MALDI-TOF/TOF 500 system (AB SCIEX)을 이용하여 linear mode로서 측정하였다(Fig. 7A). 분자량 측정을 위한 matrix로는 SA (sinapinic acid)를 사용하였으며, 표준물질로는 MS calibration mixture를 사용하였다. 분자량 측정 결과, 정제된 물질의 분자량은 4800.8 Da으로 확인되었다. 이러한 결과를 바탕으로 정제 물질의 일차구조를 분석하기 위해서 edman degradation을 통한 N-말단 서열분석 과정을 수행한 결과 양이온성 아미노산으로서 Lys과 Arg 및 방향족 아미노산인 Phe과 Tyr을 함유한 총 15개까지의 아미노산 서열(1개의 불검출 서열 포함, Cys으로 예측됨)을 확인하였다(Fig. 7B). N-말단 서열분석 결과로부터 확인된 항균 펩타이드의 15개 아미노산 서열을 NCBI의 GenBank database

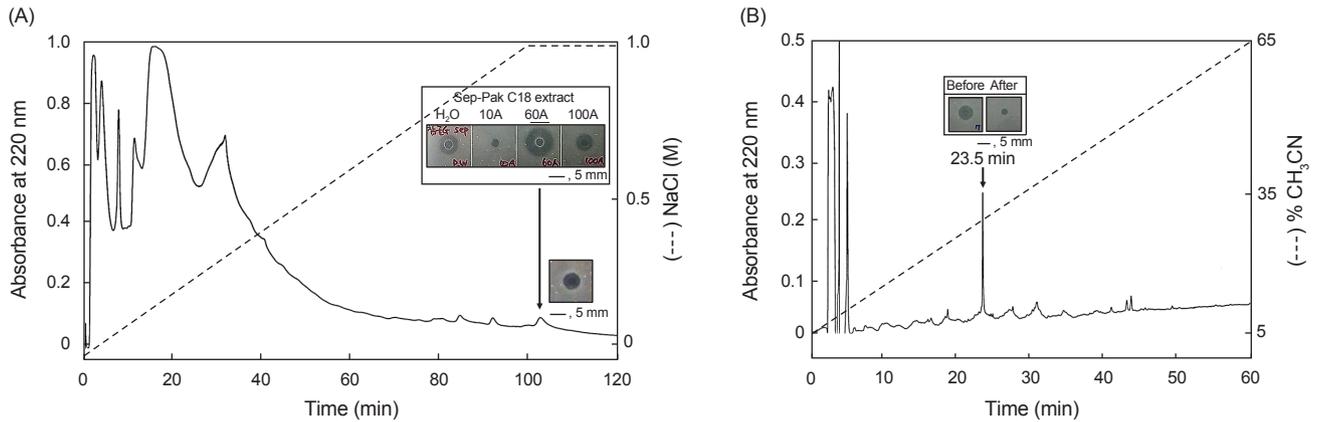


Fig. 6. Purification of antimicrobial peptide from the gill extract. A, Cation-exchange HPLC separation of the gill extract. The active Sep-Pak C18 fraction (60A) (inset-underline) was fractionated by the Cation-exchange HPLC column (TSK-gel SP-5PW, 7.5×75 mm). Elution was performed with a linear gradient of buffer A (10 mM PB, pH 6.0) and buffer B (1.0 M NaCl in 10 mM PB, pH 6.0) from 0 to 1.0 M NaCl for 100 min and isocratic elution for 20 min with 1.0 M NaCl at a flow rate of 1 mL/min. The eluate was monitored at 220 nm. The elution point of the active fraction occurred at 1.0 M NaCl (arrow). Fraction of the absorbance peak (indicated by the arrow) showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* KCTC1621 (inset); B, final purification of the active peak by Reversed-phase HPLC separation. The peak (indicated by the arrow) was purified with a CapCell-Pak C18 column (4.6×250 mm) using a linear gradient of 5-→65 % CH₃CN in 0.1 % TFA for 60 min at a flow rate of 1 mL/min. The eluate was monitored at 220 nm. The elution point of the active peak was at 28.5 % (23.5 min) CH₃CN. Antimicrobial activity of the purified peak (before) and trypsin treated purified peak (after) against *S. aureus* KCTC1621 (inset). Scale bar indicates 5 mm.

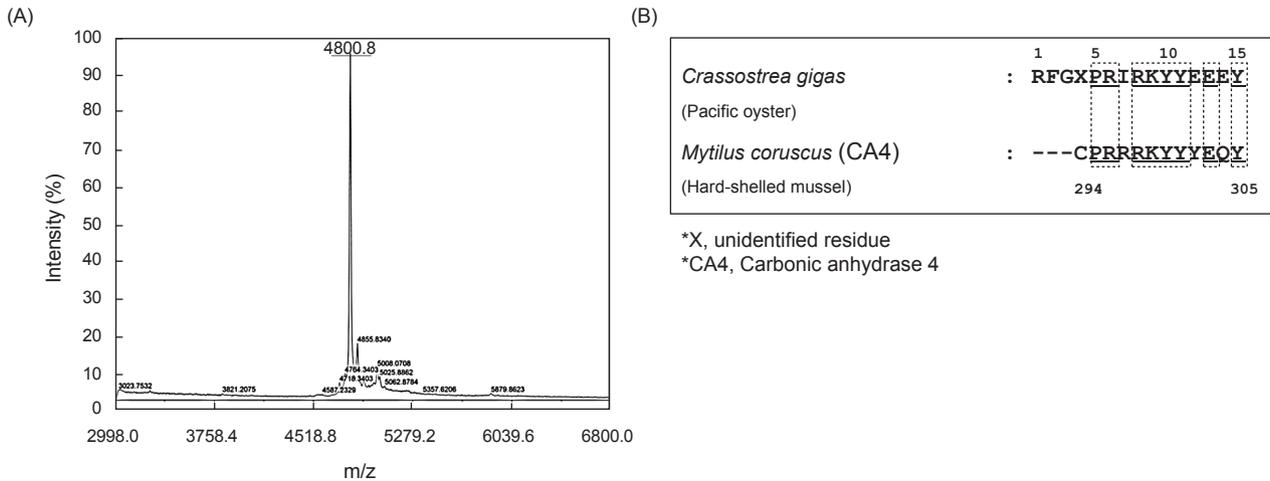


Fig. 7. The molecular weight of the purified peptide and sequence alignment of the identified N-terminal amino acid sequence with CA4 protein from the hard-shelled mussel *Mytilus coruscus*. A, the molecular weight of the purified peptide was determined using an MALDI-TOF/TOF 500 system (AB SCIEX) in linear mode. The mass spectrum showed the singly charged species (4800.8); this indicated a molecular weight of 4800.8 Da; B, the N-terminal amino acid sequence (15 amino acid containing one unidentified residue, X) of the purified peptide and comparison of sequence with the CA4 protein (carbonic anhydrase 4 protein: from residue number 294 to 305) from the hard-shelled mussel *Mytilus coruscus*. The homologous sequence are in dotted line box. Dots indicate non homologous sequences.

protein blast 검색을 실시한 결과 참담치(*Mytilus coruscus*)에서 보고된 CA4 단백질(carbonic anhydrase 4 protein)의 아미노산 서열(294-305번째 아미노산)과 부분적인 유사성을 나타

내었으나 참굴 유래 단백질/펩타이드 서열들과는 유사성이 전혀 확인되지 않았다. 또한, 최근에 보고된 Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*)의 외투막(mantle)에서 정제 및

보고된 α -carbonic anhydrase (CA)와도 서열 유사성이 거의 없는 것으로 확인되었다(Perfetto et al., 2017). 따라서 정제된 항균 펩타이드는 참담치의 CA4 단백질(carbonic anhydrase 4 protein)과 부분적인 서열 유사성을 가지는 새로운 항균 펩타이드로 판단되며, CA4 protein (carbonic anhydrase 4 protein) 또는 CA4 protein 유래 fragment들의 항균기능과의 연관성을 제시할 수 있는 최초의 연구 결과로 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 분석결과를 토대로 정제된 항균 펩타이드는 cgCAFLP (*C. gigas* CA fragment-like peptide)로 명명하였다.

본 연구 결과 부안산 참굴 추출물은 세포독성이 낮은 단백질 성 항균물질들을 포함하고 있으며, 이들의 항균활성은 salt에 의해 저해를 받는 것으로 확인되었다. 또한, 추출물 내의 단백질 성 항균물질은 세균 막을 직접적으로 공격하기 보다는 세포 내 구성물질(intracellular components, DNA 등)들과의 상호작용을 통해서 항균활성을 나타내는 것으로 예측된다(Seo et al., 2021). 그리고 아가미 추출물로부터 피부 상재균 중에서 *S. aureus* KCTC1621에 대해서 특이적으로 항균활성을 나타내는 분자량 4800.8 Da의 새로운 항균 펩타이드를 정제하였으며 N-말단의 15개 아미노산 서열을 규명하였다. 정제된 항균 펩타이드는 참담치(*M. coruscus*) 유래의 CA4 단백질(carbonic anhydrase 4 protein)의 아미노산 서열과 부분적인 유사성을 나타내었으며, CA4 protein 또는 단편들의 항균기능과의 연관성을 설명할 수 있는 최초의 연구결과로 판단된다. 따라서 본 연구 결과는 참굴 유래 단백질/펩타이드들의 선천면역과의 연관성에 대한 이해를 증대시킬 수 있는 기초자료로 활용될 수 있을 뿐만 아니라 피부 상재균인 *S. aureus* KCTC1621의 성장억제 효과를 통한 피부기능 개선 천연물 소재로서 참굴 추출물의 활용 가능성을 제시할 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 2021년도 해양수산기술지역특성화사업의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Gueguen Y, Herpin A, Aumelas A, Garnier J, Fievet J, Escoubas JM, Bulet P, Gonzalez M, Lelong C, Favrel P and Bachere E. 2006. Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *J Biol Chem* 281, 313-323. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510850200>.
- Han JG, Kim HS, Kim MC, Kim JC, Hwang BY and Lee HY. 2008. Skin whitening and skin immune activities of the peptides isolated from *Crassostrea gigas* by ultrasonification processes. *Korean J Food Sci Technol* 40, 394-399.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Kim WT and Park KK. 2009. Antimicrobial property of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom against *Propionibacterium acnes* and aerobic skin flora. *Kor J Pharmacogen* 40, 173-177.
- Hsu CH, Chen C, Jou ML, Lee AYL, Lin YC, Yu YP, Huang WT and Wu SH. 2005. Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin, evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. *Nucl Acids Res* 33, 4053-4064. <https://doi.org/10.1093/nar/gki725>.
- Kerenga BK, McKenna J, Harvey PJ, Quimbar P, Garcia-Ceron D, Lay F, Phan TK, Veneer PK, Vasa S, Parisi K, Shafee TMA, van der Weerden NL, Hulett MD, Craik DJ, Anderson MA and Bleackley MR. 2019. Salt-tolerant antifungal and antibacterial activities of the corn defensin ZmD32. *Front Microbiol* 10, 795. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00795>.
- Kim EH, Jang YA, Kim SB, Kim HH and Lee JT. 2018. Antimicrobial, antifungal effect and safety verification using BCOP assay of extract from *Coptis chinensis*. *J Allp Biol Chem* 61, 297-304. <https://doi.org/10.3839/jabc.2018.042>.
- Kim HA, Park SH, Lee SS and Choi YJ. 2015. Anti-wrinkle effects of enzymatic oyster hydrolysate and its fractions on human fibroblasts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44, 1645-1652. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2015.44.11.1645>.
- Kim HJ and Jeong SK. 2012. New in trends skin barrier research. *J Skin Barrier Res* 4, 15-28.
- Kim HJ, Lim HW, Kim BH, Kim HS, Choi SW and Yoon CS. 2006a. Studies on the anti-acne effect of *Agrimonia pilosa* ledeb. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 32, 53-58.
- Kim IH, Kim JW and Lee JH. 2006b. Purification of antimicrobial peptide from the marine mussel *Mytilus coruscus*. *Environ Mutagens Carcinogens* 26, 25-29.
- Ko SJ, Park EJ, Asandei A, Choi JY, Lee SC, Seo CH, Luchian T and Park YK. 2020. Bee venom-derived antimicrobial peptide melectin has broad-spectrum potency, cell selectivity, and salt-resistant properties. *Sci Rep* 10, 10145. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66995-7>.
- Lee AR, Roh SS and Kim HK. 2018. Anti-microbial activity and Anti-inflammatory effects of Fucoidan extracts. *Asian J Beauty Cosmetol* 16, 191-200. <https://doi.org/10.20402/ajbc.2017.0171>.
- Lee EJ, Bae SY, Nam KW and Lee YH. 2010. Antibacterial and anti-inflammatory effects of medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J Soc Cosmet Sci Korea* 36, 57-63.
- Lee IH, Cho Y and Lehrer RI. 1997. Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavansins. *Infect Immun* 65, 2898-2903. <https://doi.org/10.1128/iai.65.7.2898-2903.1997>.
- Lee JE and Seo JK. 2021. Screening of antimicrobial activity and proteolytic enzyme stability of extract of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Korean J Fish Aquat Sci* 54, 280-286. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0280>.

- Lee MS, Yim MJ, Lee JM, Lee DS, Kim MY and Eom SH. 2021. *In vitro* antimicrobial activities of edible seaweeds extracts against *Cutibacterium acnes*. Korean J Fish Aquat Sci 54, 111-117. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0111>.
- Lee SJ, Kim KH, Lee WR, Kim JY, An HJ and Park KK. 2015. Antibacterial and anti-inflammatory effect of melittin on *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory skin disease *in vivo*. J Apic 30, 95-101.
- Lee SS, Imm JY and Han YS. 2012. The improvement effect of lotus leaf extracts on acne skin. Kor J Aesthet Cosmetol 10, 405-413.
- Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SSL, Jackson R and Eisenhour P. 1991. Ultrasensitive assay for endogenous antimicrobial polypeptides. J Immunol Methods 137, 167-173. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90021-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90021-7).
- Nam BH, Shin EH, Kim YO, Kim DG, Kong HJ, Park JY and Seo JK. 2019. Development of novel antimicrobial peptides derived from anti-lipopolsaccharide factor of the swimming crab *Portunus trituberculatus*. Fish Shellfish Immunol 84, 664-672. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.031>.
- Noga EJ, Silphaduang U, Park NG, Seo JK, Stephenson J and Kozlowicz S. 2009. Piscidin 4, a novel member of the piscidin family of antimicrobial peptides. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 152, 299-305. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.12.018>.
- Park SH, Kim KBWR, Kim MJ, Choi JS, Cho YJ and Ahn DH. 2017. Antimicrobial activity of extracts from different parts and essential oil from *Pinus densiflora* on skin pathogens. J Life Sci 27, 646-651. <https://doi.org/10.5352/JLS.2017.27.6.646>.
- Perfetto R, Pretea SD, Vullo D, Sansone G, Barone C, Rossi M, Supuran CT and Capasso C. 2017. Biochemical characterization of the native α -carbonic anhydrase purified from the mantle of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. J Enzyme Inhib Med Chem 32, 632-639. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1284069>.
- Seo JK. 2016. Screening and purification of an antimicrobial peptide from the gill of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Korean J Fish Aquat Sci 49, 137-145. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2016.0137>.
- Seo JK, Crawford JM, Stone KL and Noga EJ. 2005. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. Biochem Biophys Res Commun 338, 1998-2004. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.013>.
- Seo JK, Kim DG, Lee JE, Park KS, Lee IA, Lee KY, Kim YO and Nam BH. 2021. Antimicrobial activity and action mechanisms of Arg-Rich short analog peptides designed from the C-terminal loop region of American oyster defensin (AOD). Mar Drugs 19, 451. <https://doi.org/10.3390/md19080451>.
- Seo JK, Kim DG, Oh R, Park KS, Lee IA, Cho SM, Lee GY and Nam BH. 2017. Antimicrobial effect of the 60S ribosomal protein L29 (cgRPL29), purified from the gill of pacific oyster *Crassostrea gigas*. Fish Shellfish Immunol 67, 675-683. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.058>.
- Seo JK, Lee MJ, Go HJ, Kim GD, Jeong HD, Nam BH and Park NG. 2013. Purification and antimicrobial function of ubiquitin isolated from the gill of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Mol Immunol 53, 88-98. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.07.003>.
- Shea KM, Truckner RT, Weber RW and Peden DB. 2008. Climate change and allergic disease. J Allergy Clin Immunol 122, 443-453. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.06.032>.
- Silphaduang U and Noga EJ. 2001. Peptide antibiotics in mast cells of fish. Nature 414, 268-269. <https://doi.org/10.1038/35104690>.
- Skerlavaj B, Romeo D and Gennaro R. 1990. Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of Gram-negative bacteria by bactenecins. Infect Immun 58, 3724-3730. <https://doi.org/10.1128/IAI.58.11.3724-3730.1990>.
- Tincu JA and Taylor SW. 2004. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. Antimicrob Agents Chemother 48, 3645-3654. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3645-3654.2004>.
- Wilson K. 2001. Preparation of genomic DNA from Bacteria. Curr Protoc Mol Biol 56, 2-4. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>.
- Winston MH and Shalita AR. 1991. *Acne vulgaris*, pathogenesis and treatment. Pediatr Clin North Am 38, 889-903. [https://doi.org/10.1016/s0031-3955\(16\)38158-5](https://doi.org/10.1016/s0031-3955(16)38158-5).
- Zannella C, Mosca F, Mariani F, Franci G, Folliero V, Galdiero M, Tiscar PG and Galdiero M. 2017. Microbial diseases of bivalve mollusks: Infections, immunology and antimicrobial defense. Mar Drugs 15, 182. <https://doi.org/10.3390/md15060182>.